

Молекулярная биология:

Лекция 2: Механизмы репарации

• Доминова Ирина Николаевна

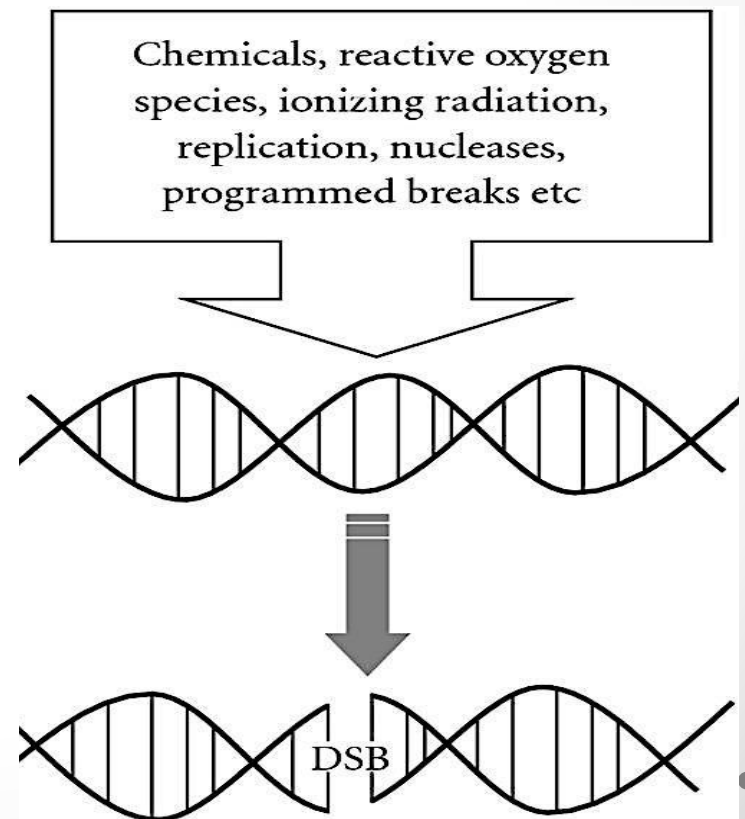
Пути и механизмы репарации

Репарация двухцепочечных разрывов (DSB)

DSB – наиболее опасное повреждение ДНК, поскольку:

- 1) очень сложно 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.

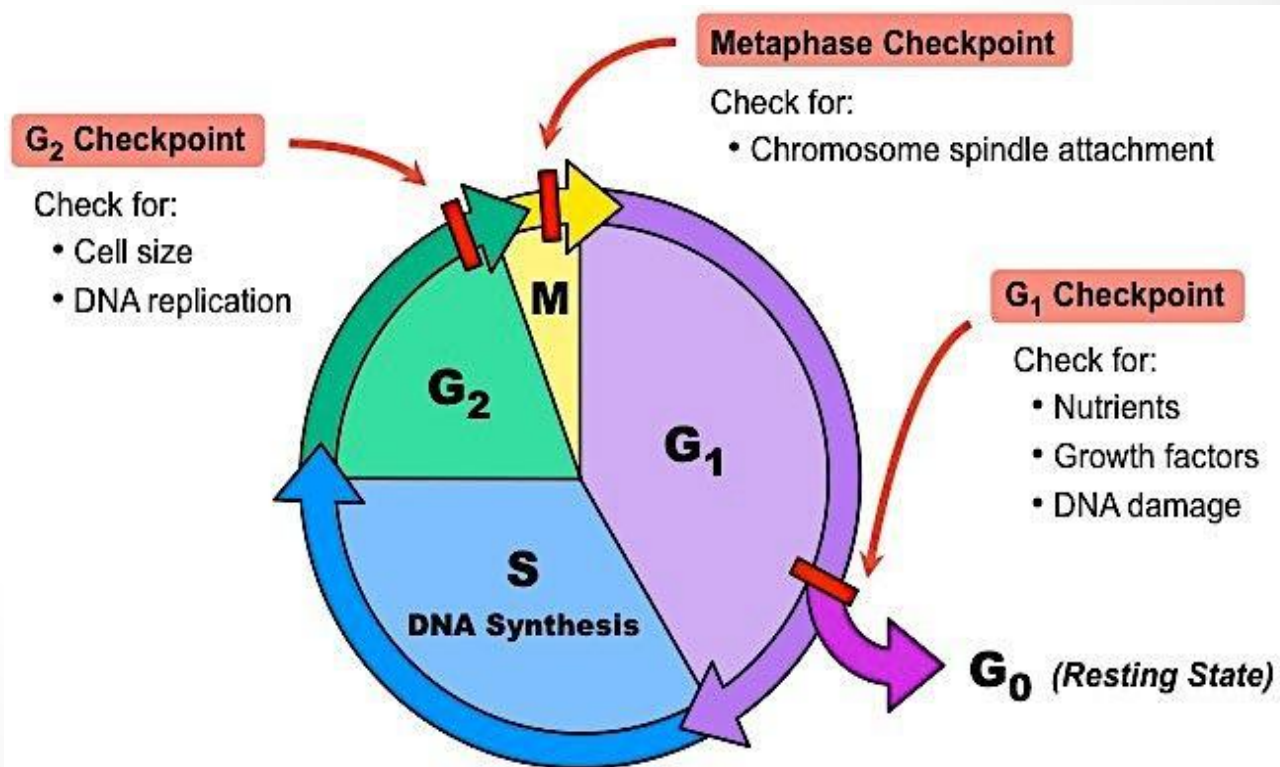
Репарация DSB осуществляется с помощью механизма, известного как **ответ на повреждение ДНК (DNA damage response – DDR)**.



Пути и механизмы репарации

Репарация двухцепочечных разрывов (DSB)

DDR – основной фактор, контролирующий контрольную точку клеточного цикла. Т.е. такую точку, когда прохождение клеточного цикла временно приостанавливается, и клетка проверяет все ли необходимые условия для перехода на следующую фазу цикла соблюдены. К этим условиям относятся: общий метаболический статус клетки, присутствие соответствующих фазе молекул (dNTP в достаточном количестве, необходимом для репликации ДНК), целостность молекул ДНК. При выявлении повреждений ДНК, особенно DSB, клеточный цикл приостанавливается до тех пор, пока повреждения не устранятся.

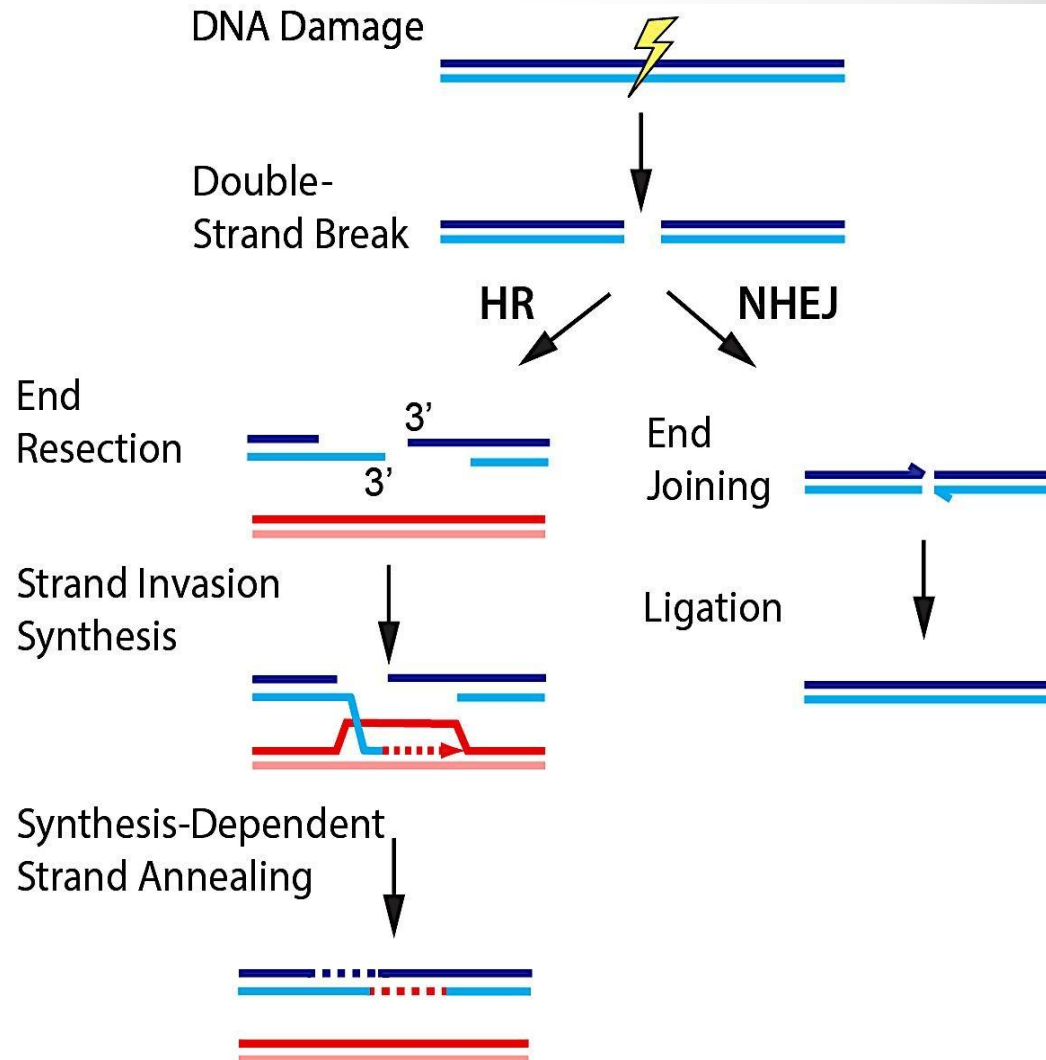


Пути и механизмы репарации

Репарация двухцепочечных разрывов (DSB)

Репарация DSB может осуществляться 2 путями с помощью:

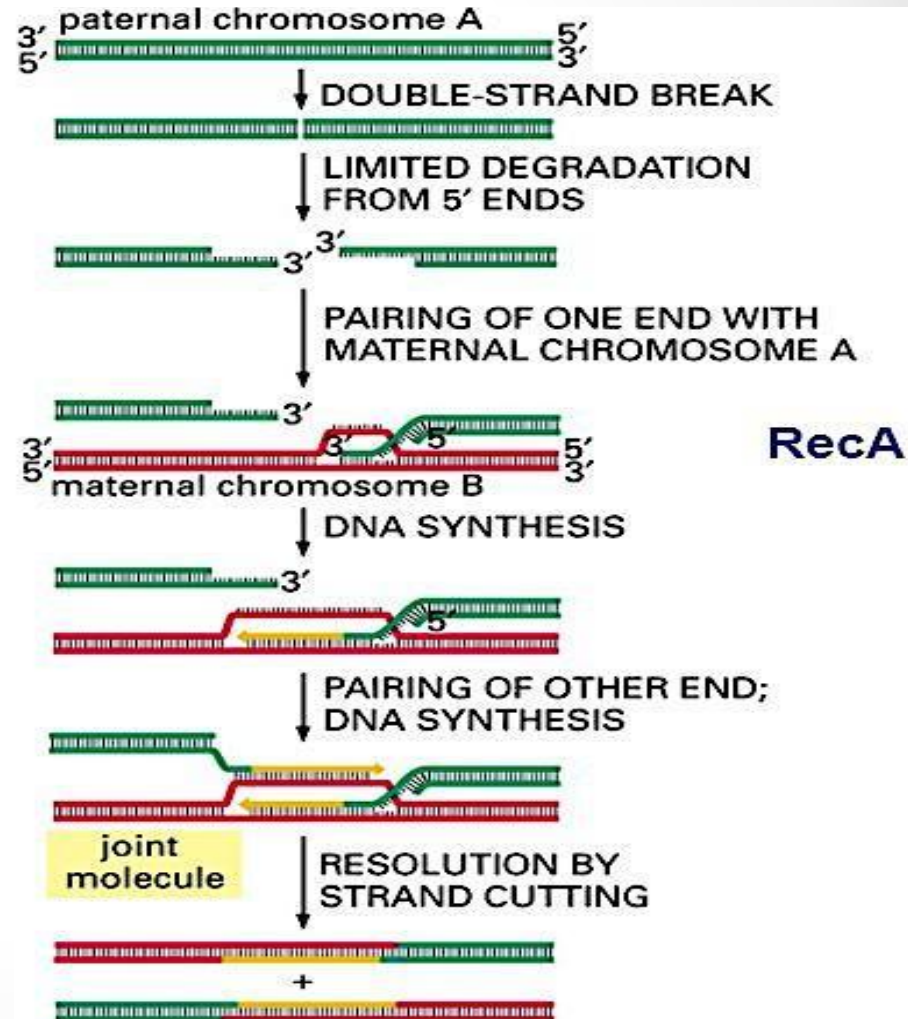
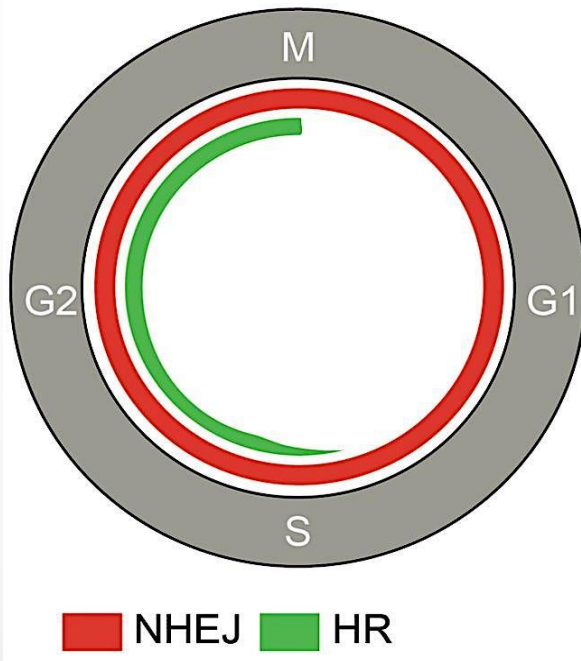
1. Гомологичной рекомбинации (HR);
2. Негомологичного соединения концов (NHEJ).



Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB

HR основана на доступности неповрежденной последовательности ДНК на гомологичной хромосоме, кот. может выступать в качестве матрицы для точного восстановления поврежденной молекулы. Т.о., HR может осуществляться только на S и G2 фазах клеточного цикла. HR приводит к задержке репликативной вилки и образованию межнитевой поперечной сшивки ДНК.



Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB

HR поддерживает целостность генома во время митоза и мейоза, обуславливая генетическое разнообразие. Рекомбинация на стадии мейоза представляет собой запрограммированное событие, инициированное DSB, генерируемым топоизомеразо-подобным фактором Spo11. Где и как выбирается расположение DSB на геноме в процессе мейоза до конца не выяснено. DSB затем подвергается HR, создавая связь (Holliday junction) между гомологичными хромосомами, необходимую для правильной сегрегации хромосом в мейозе, что приводит к образованию как кроссоверов, так и непересекающихся продуктов.

На стадии митоза у дрожжей HR участвует в нескольких процессах:

- переключение типа спаривания,
- восстановление экзогенно или эндогенно сформированных DSB,
- перезапуск заторможенных и/или свернутых репликационных вилок,
- восстановление ssDNA участков, оставшихся после репликации поврежденного ДНК матрицы.

Пути и механизмы репарации

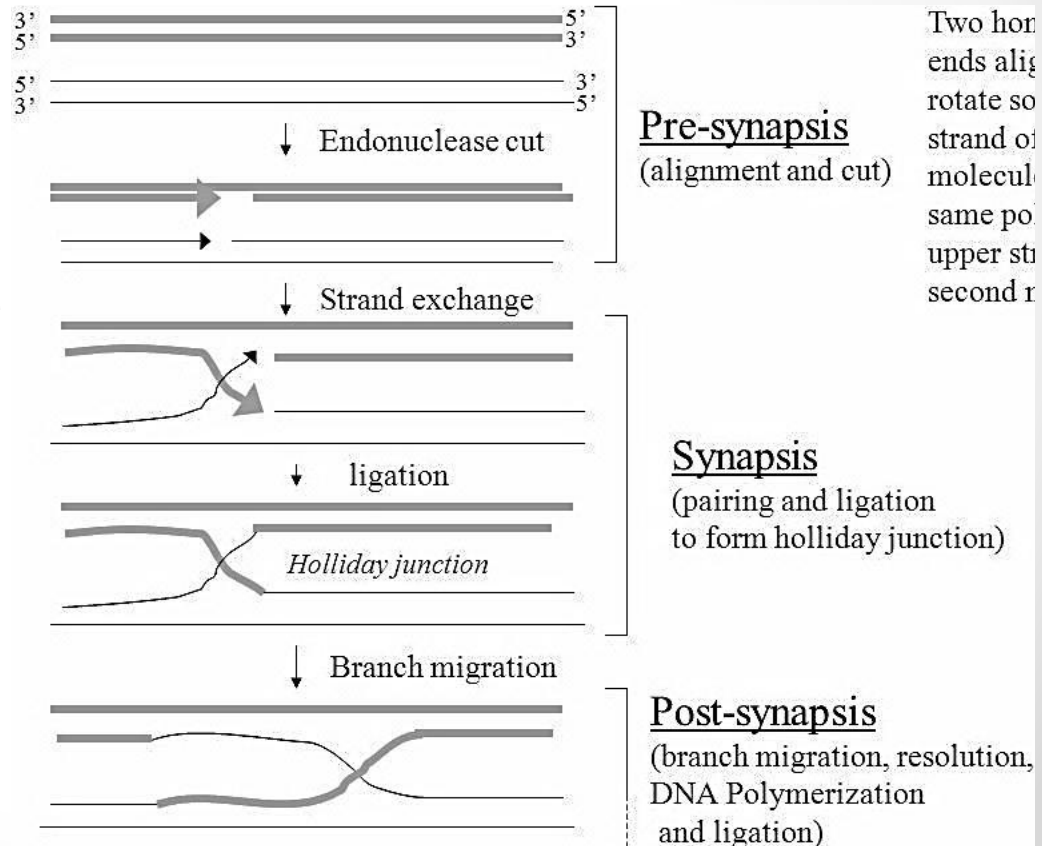
Гомологичная рекомбинация DSB

Основные этапы гомологичной рекомбинации:

1.Пресинапсис. Набор нуклеаз удаляет нуклеотиды с обеих сторон от DSB с образованием 3' одноцепочечных ДНК выступов, что приводит к образованию нуклеопротеиновых филаментов с рекомбиназой Rad51, способных искать гомологию.

2.Синапсис. Нуклеопротеиновый филамент Rad51-ssDNA ищет неповрежденную гомологичную последовательность в геноме, кот. могла бы служить в качестве матрицы для безошибочного копирования недостающей информации.

3.Постсинапсис. Восстанавливается неповрежденная хромосома.



Пути и механизмы репарации

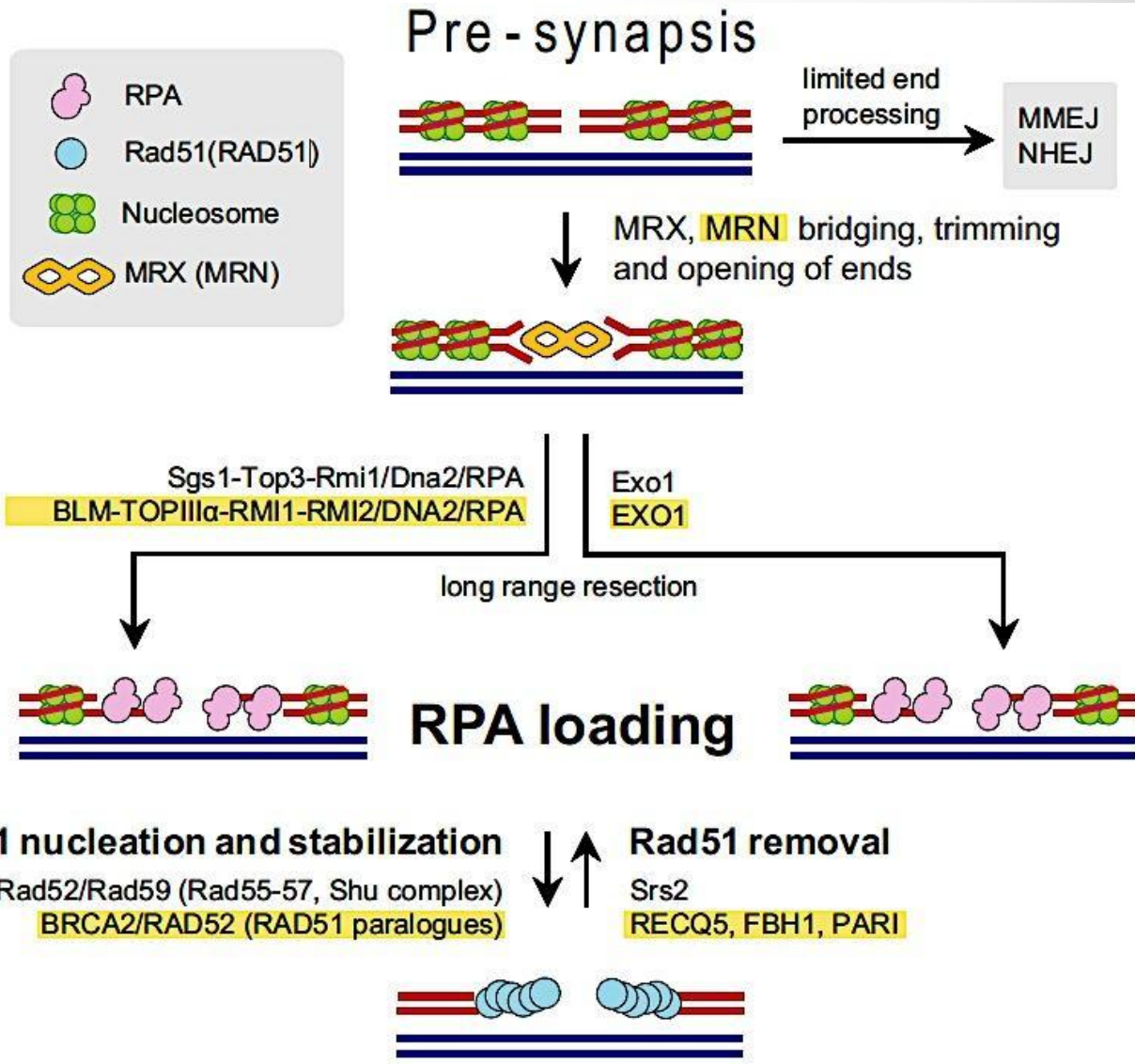
Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинапсис

Стадии пресинапсиса:

Обрезание концов для образования 3' ssDNA выступов, защищенные репликативным белком A (RPA). Скорость образования ssDNA выступов со средней длиной 850 нт во время мейоза или 2 – 4 кб в процессе митозе = 4 кб/ч *in vivo*;

Образование нуклеопротеинового филамента при замещении RPA на Rad51.

Один из важных компонентов 1 стадии синапсиса – комплекс MRN.



Rad51 nucleoprotein filament - structure able to perform homology search

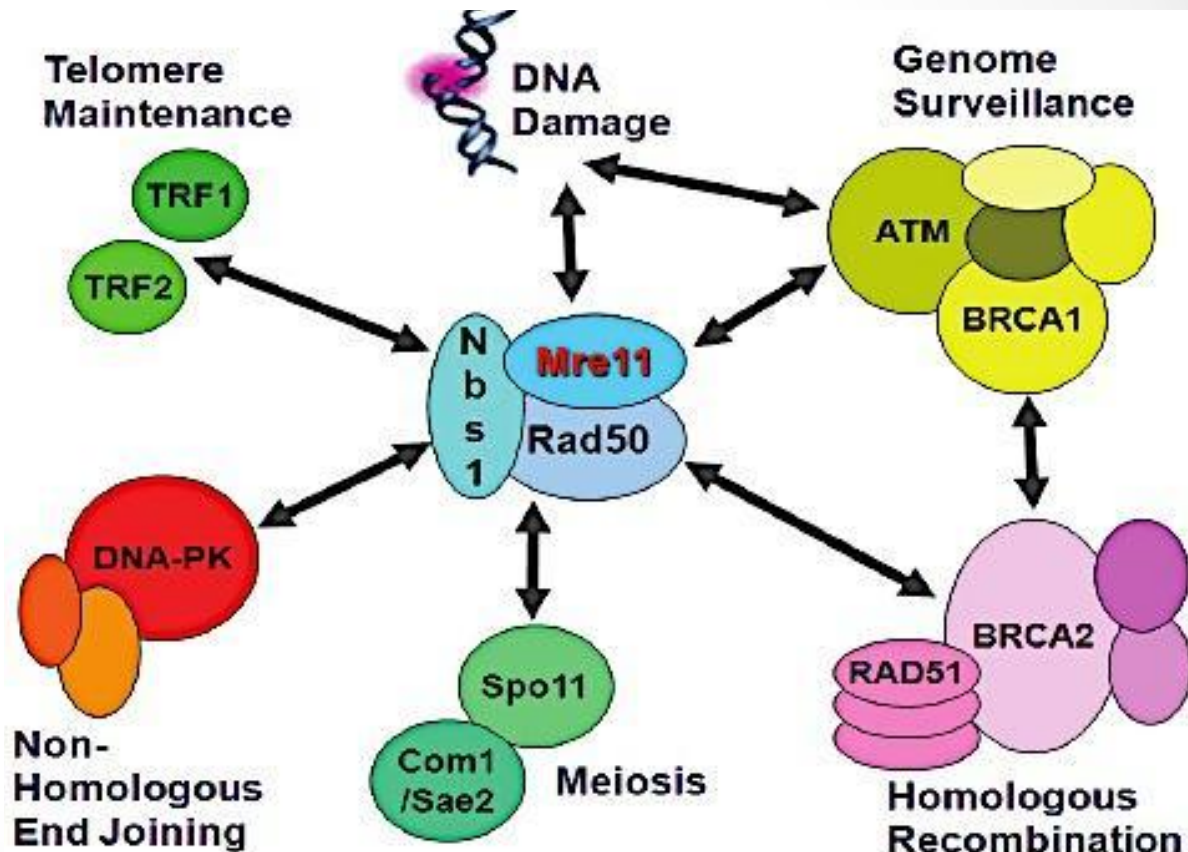
Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинаписис

Участие комплекса **Mre11-Rad50-NBS1 (MRN)** в клеточном ответе на DSB впервые было открыто при изучении телеангиозектатической атаксии, вызванной мутацией в гене MRE11 (ген мейотической рекомбинации 11), и синдрома повреждения Неймегена, вызванного мутацией в гене NBS (гомолог у дрожжей ген Xrs2).

Комплекс MRN задействован в обоих механизмах репарации DSB (HR и NHEJ).

Комплекс определяет поврежденный участок ДНК и взаимодействует с концами поврежденной ДНК, удерживая их в непосредственной близости друг от друга для осуществления репарации.



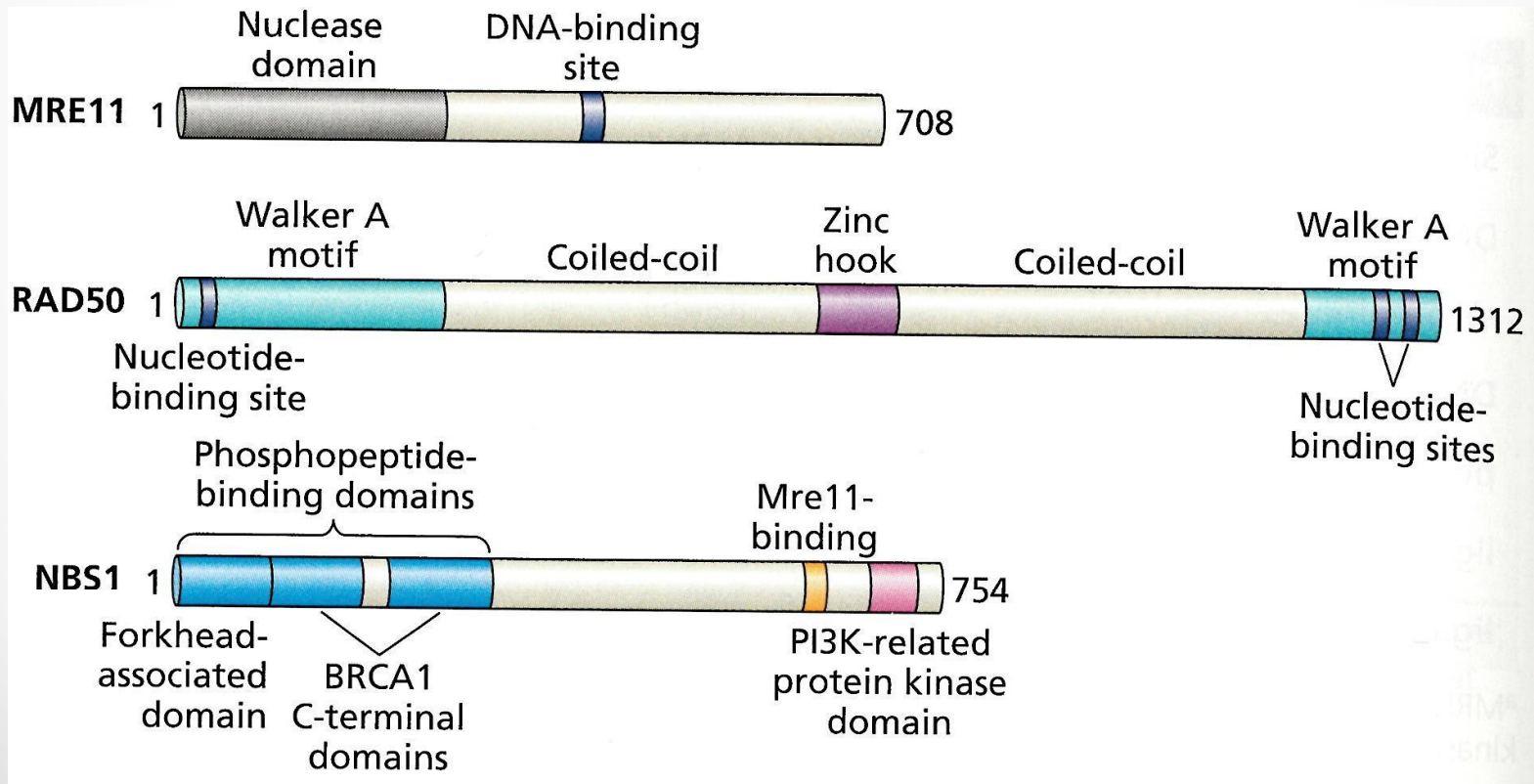
Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинапис

Доменная структура 3 белков комплекса MRN человека.

Rad50 и MRE11 – высоко консервативные белки с ферментативной активностью.

NBS1 – высоко вариабельный от вида к виду белок с пока до конца не установленной ролью. Нулевая мутация любого из трех генов, кодирующих эти белки, на примере мышей и людей, является летальной.



Пути и механизмы репарации

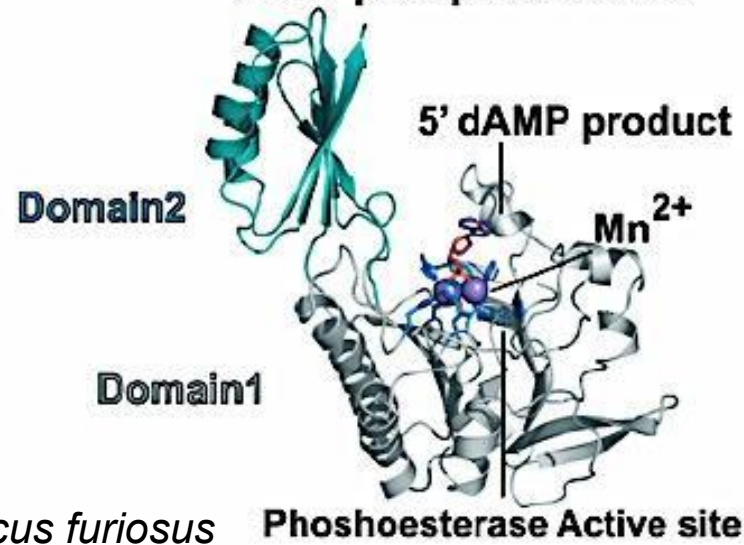
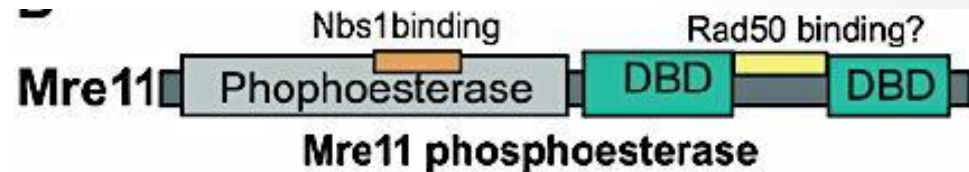
Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинаписис

MRE11 – нуклеаза, способная *in vitro* к диссоциации и отжигу цепей. При этом нуклеазная активность регулируется 2 другими белковыми субъединицами посредством АТФ и гомологичной последовательностью в ДНК субстрате. Координация и модулирование активности MRE11 *in vivo* остаются пока не выясненными. Известно, что MRE11 участвует в начальной обработке концов ДНК, содержащие аддукты (продукты прямого присоединения молекул друг к другу в химической реакции), которые могут препятствовать дальнейшей обработке; и в разрешении возможных вторичных структур концов ДНК.

Н-конец – фосфоэстераза;

С-конец – ДНК-связывающий домен и потенциальный RAD50-связывающий домен.

Каталитический домен MRE11 связан с Mn^{2+} и проявляет экзонуклеазную активность от 3' к 5'.



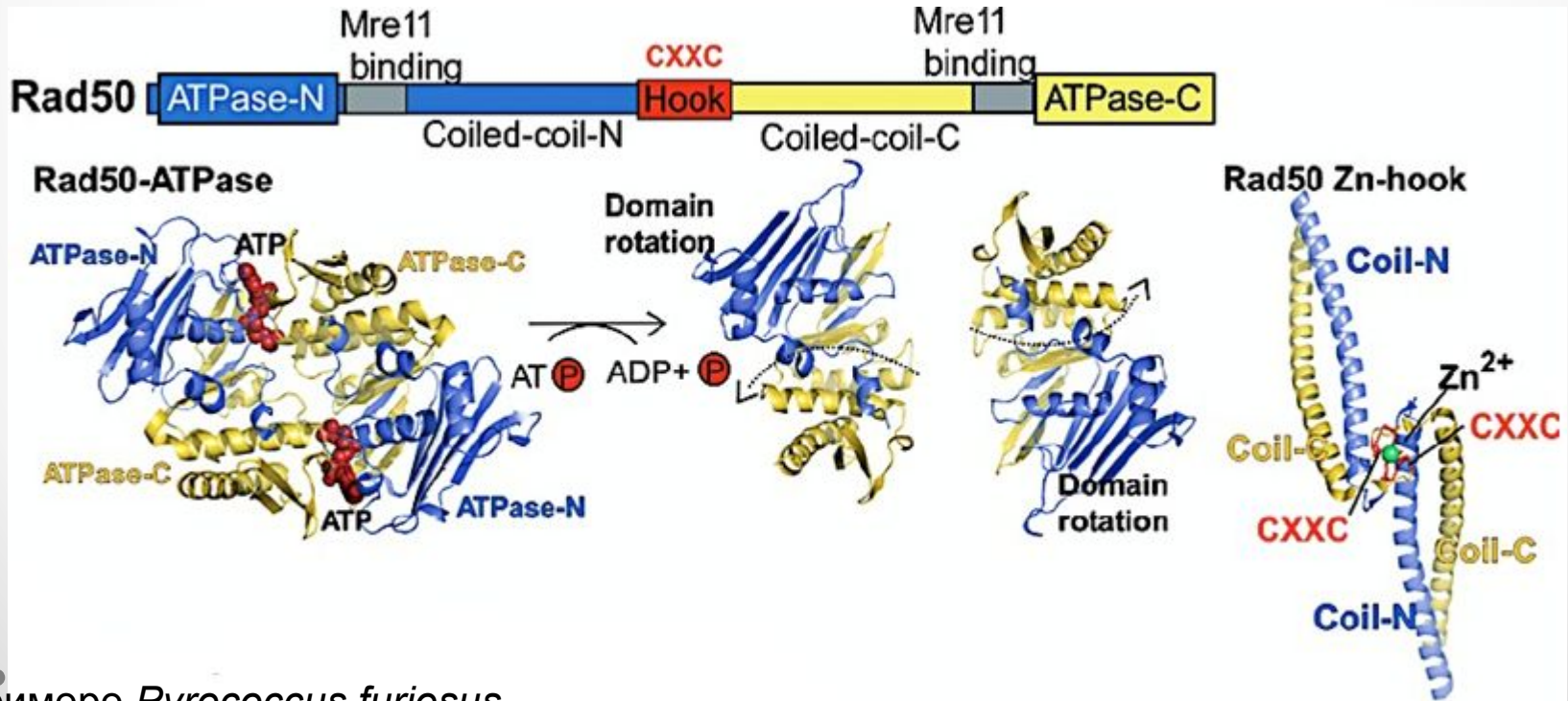
На примере *Pyrococcus furiosus*

Phosphoesterase Active site

Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинапис

Rad50 - член семейства белков структурной поддержки хромосом, связывает и гидролизует АТФ за счет наличия 2 АТФ-связывающих мотивов на своих концах. Мутации в этих мотивах приводят к «нулевому» фенотипу у дрожжей и частичной потере нуклеазной активности у людей *in vitro*. Гидролиз АТФ приводит к конформационным изменениям субдоменов: центральный регион – Cys-X-X-Cys (CxxC) мотив меняет направление суперспирали, координирует Zn^{2+} и опосредует взаимодействие hook-hook.



Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинаписис

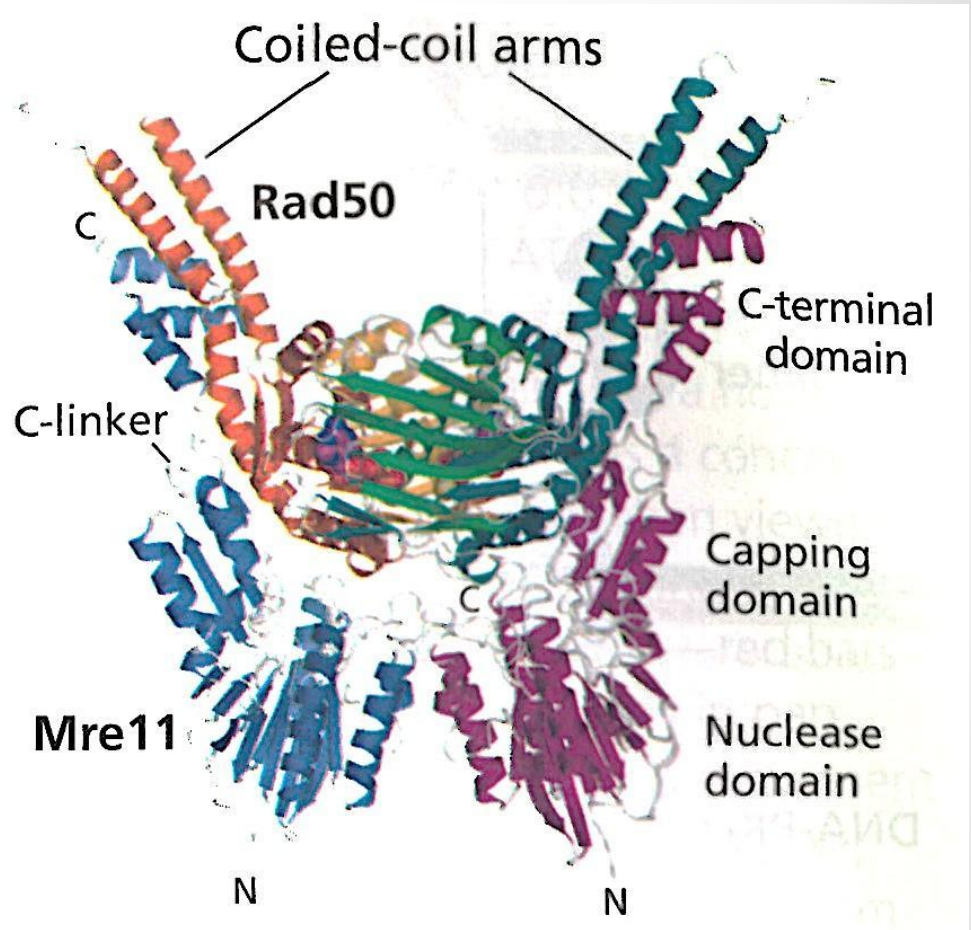
Информация о структуре белка **NBS1** у эукариот в настоящее время отсутствует. Предполагается, что он содержит на N-конце FHA (fork-head associated) и BRCT (BRCA1 carboxy-terminal) домены для взаимодействия с фосфопептидами, а С-конце – MRE11- и ATM-связывающие домены.



Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинапсис

Кристаллическая структура MRN архей. Комплекс состоит из головы и 2 рук. Голова состоит из центральных доменов Rad50 и MRE11, а руки образованы суперспиральным доменом Rad50 и С-концом MRE11. MRE11 связывает 2 молекулы Rad50 в непосредственной близости друг от друга, что обеспечивает их АТФазную активность. Домен С-конца MRE11 удерживает супер спирали Rad50; Capping домен стабилизирует Rad50; MRE11 образует димеры благодаря своим нуклеазным доменам. При связывании АТФ Rad50 нуклеазная активность MRE11 негативно регулируется посредством блокирования активного сайта. Гидролиз АТФ обеспечивает конформационные изменения в гибком С-линкере, что приводит к освобождению активного нуклеазного сайта.

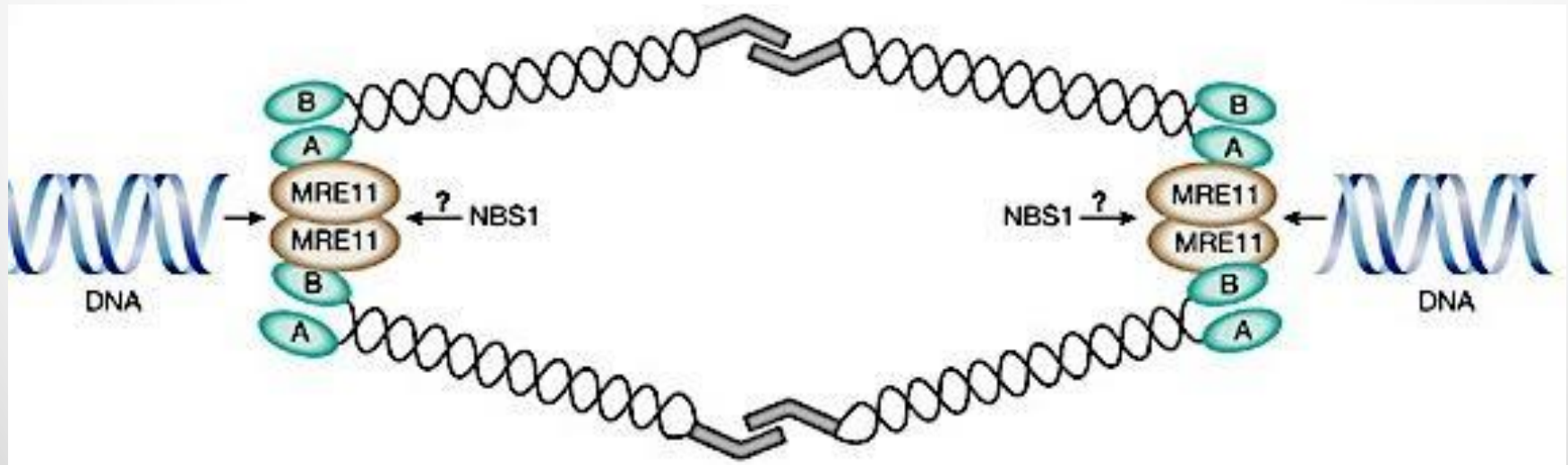


Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинаписис

MRN комплекс связывает концы поврежденной ДНК с помощью MRE11, суперспирали рук Rad50 направлены наружу и взаимодействуют с комплексом MRN на другой стороне разрыва через их мотивы CXXC. На рисунке показано 2 MRN комплекса, однако их может быть на много больше. Множество межмолекулярных взаимодействий между плечами Rad50 в совокупности называют «молекулярной липучкой».

А и В – АТФазные мотивы Rad50.

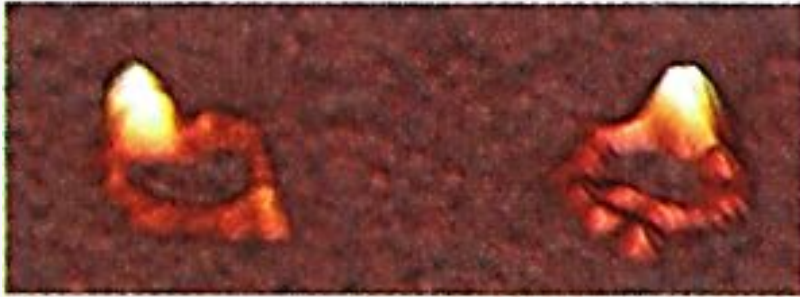


Пути и механизмы репарации

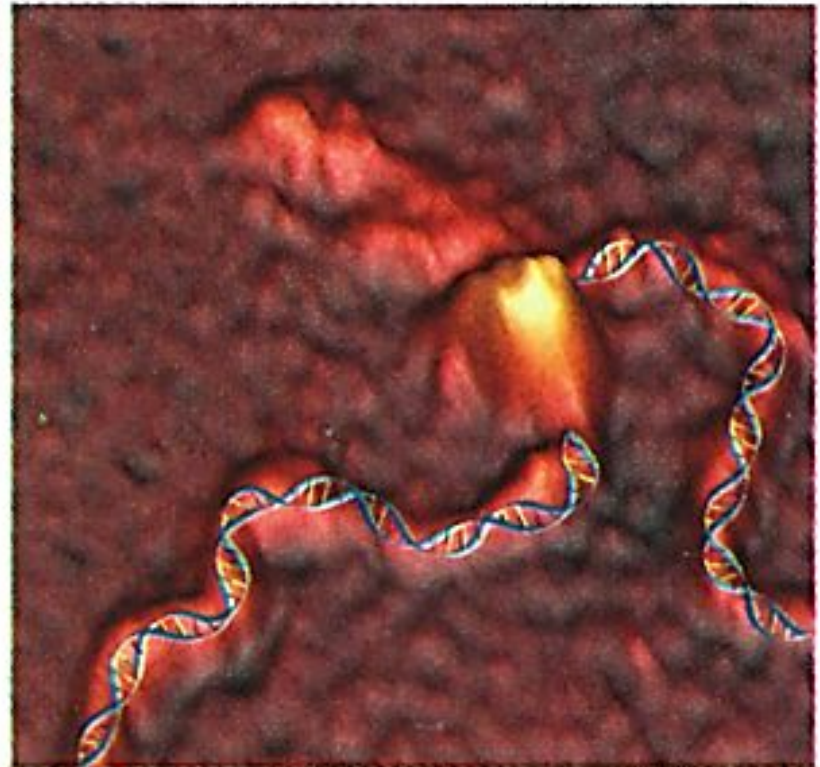
Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинапсис

Изображения с атомно-силового микроскопа

Free MRN
intracomplexes



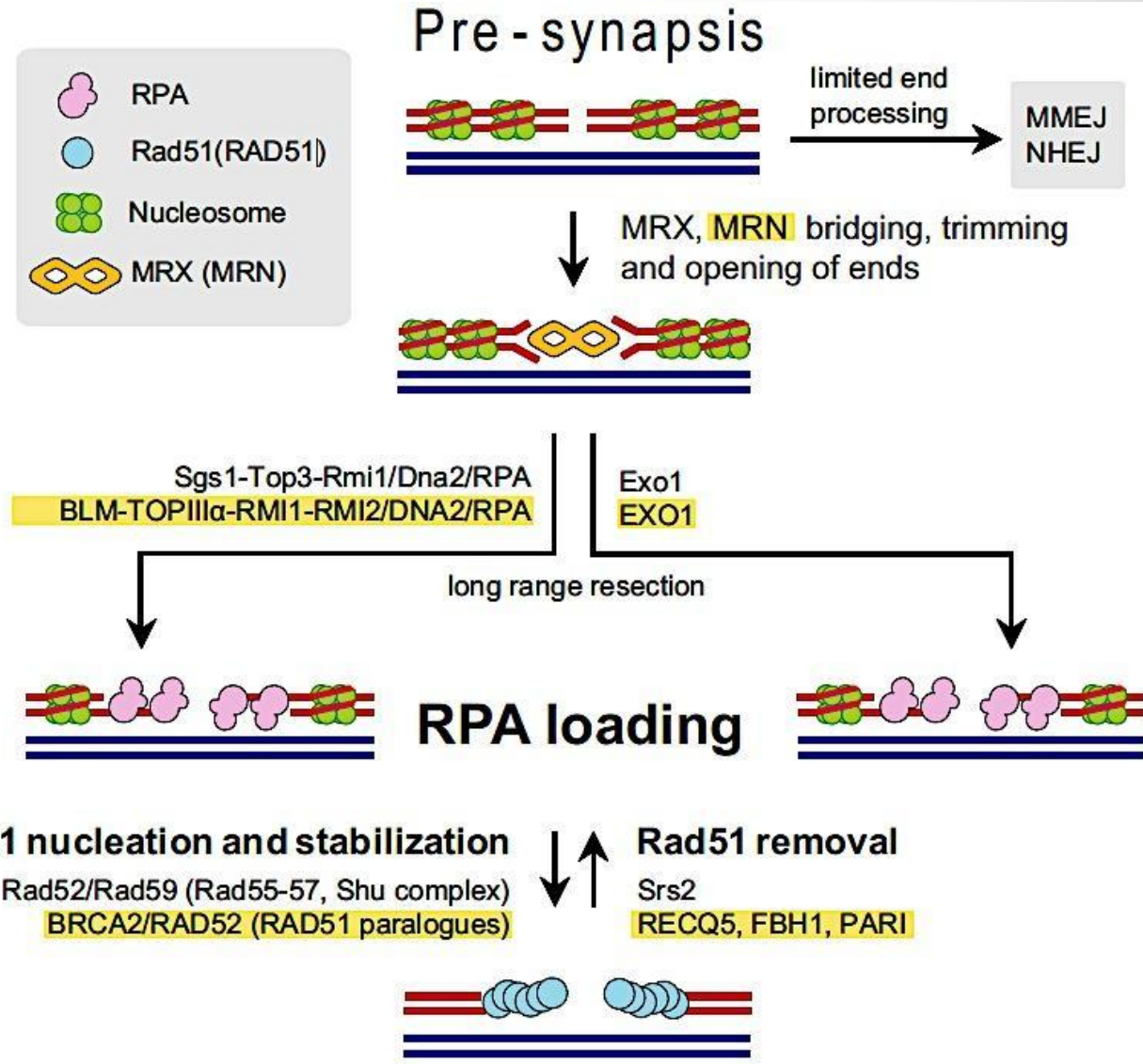
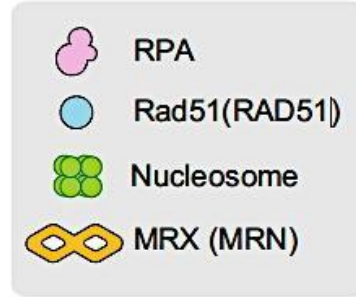
DNA-bound
MRN complex



Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинапсис

При образовании ssDNA выступов предполагается участие дополнительных нуклеаз. Найдено 2 дополнительных пути, требуемых для вырезания больших участков. Первый требует активности нуклеазы Exo1, а второй - действия нуклеазы Dna2 вместе с комплексом Sgs1-Top3-Rmi1 (STR).



Rad51 nucleoprotein filament - structure able to perform homology search

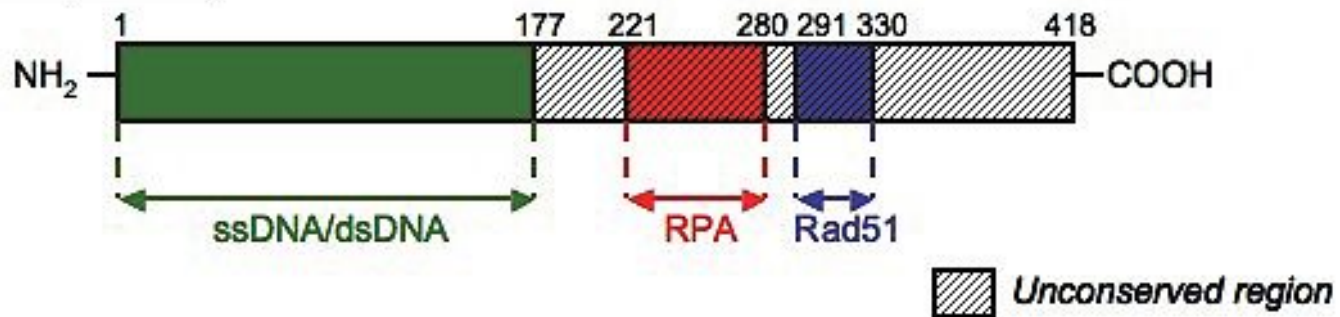
Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинаписис

Наличие RPA на 3'-ssDNA выступе представляет собой термодинамический барьер для присоединения рекомбиназы Rad51, чтобы преодолеть это препятствие, требуется несколько белков, известных как медиаторы рекомбинации.

Rad52 является наиболее важным медиатором рекомбинации у дрожжей, т.к. его удаление приводит к остановке процесса HR. Rad52 способствует *in vivo* и *in vitro* замене RPA на Rad51 на ssDNA. Он связывает ДНК и Rad51, а также RPA, связанную с ssDNA через отдельные домены. Хотя точный молекулярный механизм действия Rad52 остается неизвестным, ясно, что эти взаимодействия имеют решающее значение для его правильной медиаторной функции. *In vivo* Rad52 образует комплекс с паралогом Rad59 - вспомогательный фактор для Rad52, который регулирует его локализацию.

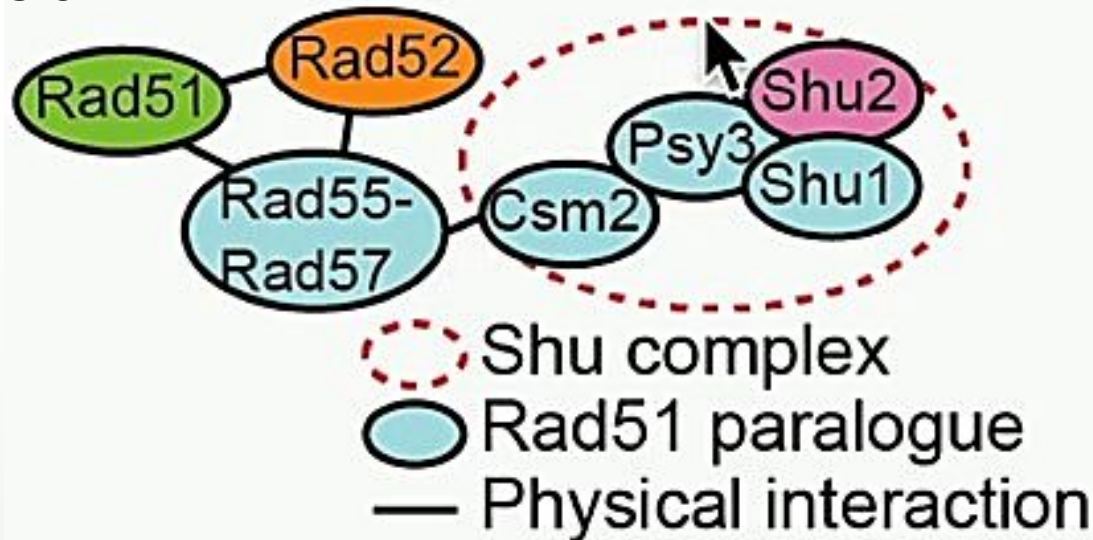
hRad52 (418 aa)



Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Пресинаписис

Другая группа белков-медиаторов рекомбинации состоит из паралогов Rad51. У дрожжей есть четыре паралога Rad51, образующих два разных комплекса. Комплекс Rad55-Rad57 необходим для стимуляции Rad51-зависимой HR. Недавно было показано, что Rad55-Rad57 связывается с филаментами Rad51 для стабилизации нуклеопротеинового филамента, защищая его от разрушения анти-рекомбиназой Srs2. Комплекс Shu содержит еще один набор паралогов Rad51 (Shu1 и Psy3 в комплексе с двумя вспомогательными компонентами, Shu2 и Csm2) и, как было показано, структурно подобен Rad51. Комплекс Shu также помогает стабилизировать филамент Rad51 от разрушения анти-рекомбиназой Srs2.

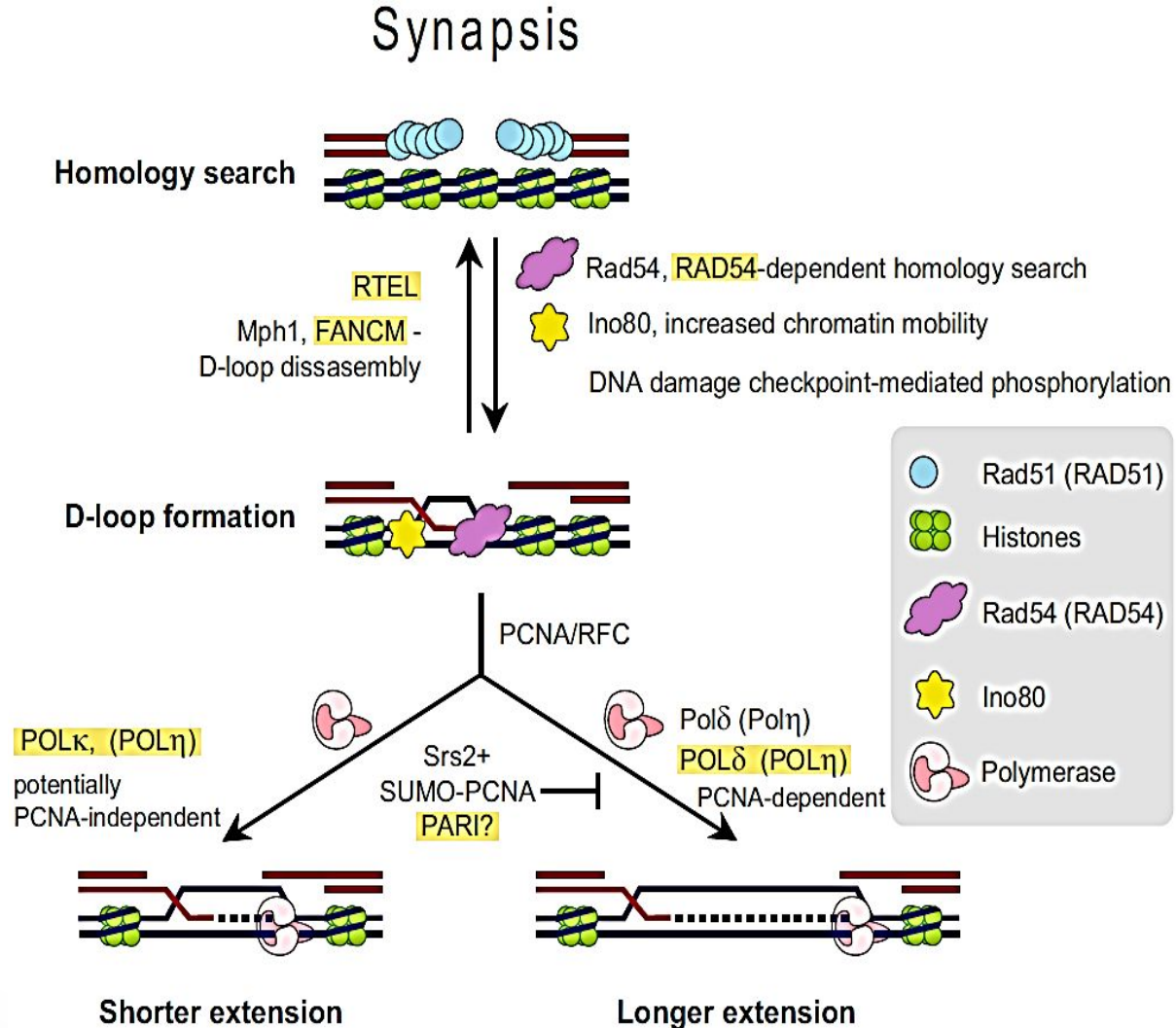


Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Синапсис

Стадии синапсиса:

- Поиск гомологичной цепи в геноме с помощью нуклеопротеинового филамента Rad51, что приводит к образованию переходной структуры, известной как D-петля;
- Копирование отсутствующей генетической информации посредством репликации, в качестве праймера служит захваченная цепь внутри D-петли.



Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Синапсис

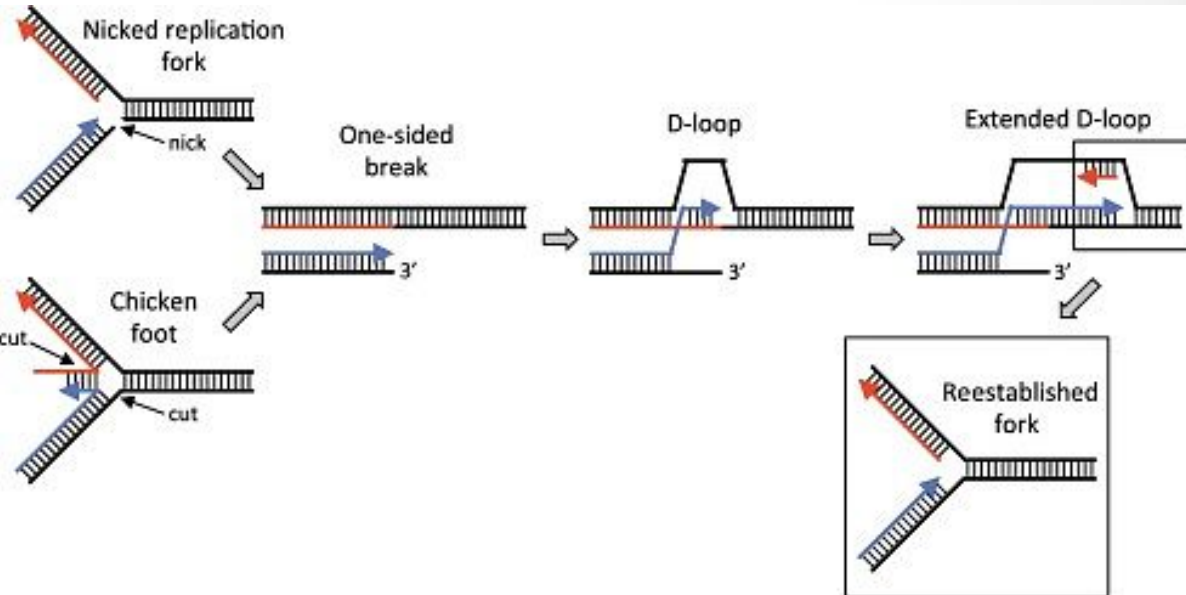
Поиск гомологии, выполняемый филаментом Rad51, по-прежнему остается одним из наименее понятных этапов всего пути HR. Поиск зависит от стадии клеточного цикла, кот. определяет присутствие сестринских хроматид. Ограничивая сайты для поиска гомологии с помощью удерживания сестринских хроматид в непосредственной близости через комплексы когезина, вероятно, облегчается поиск гомологий Rad51. Для аллельной рекомбинации, когда гомологичная последовательность существует в другом месте генома, механизм поиска гомологий неизвестен. Анализ поиска гомологий белком RecA – бактериальным ортологом Rad51 – показывает, что конформационная корректировка, в которой структурная деформация вводится между донорскими и целевыми последовательностями, улучшает обнаружение гомологий. Показано, что нуклеопротеиновый филамент RecA выполняет поиск гомологий с помощью 3D анализа: часть RecA «цепляется» за одну область dsDNA, тогда как другая часть филамента может проверять другие области. Rad51 требуется 15 – 20 минут, чтобы найти гомологию после того, как она была обнаружена в месте разрыва.

Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Синапсис

На 2 стадии синапсиса захваченная цепочка внутри структуры D-петли служит в качестве праймера репликации с целью заполнения недостающей информации. Показано, что полимеразы δ и ϵ , ядерный антиген клеточной пролиферации – PCNA и Dpb11 необходимы для расширения D-петли *in vivo*. При этом, репликативный хеликазный комплекс (Cdc45, MCM и GINS) невозможен. *In vitro* показано, что прежде чем факторы репликации смогут расширить D-петлю, транслоказа Rad54 должна освободить 3'-ОН захваченной в D-петлю цепи от

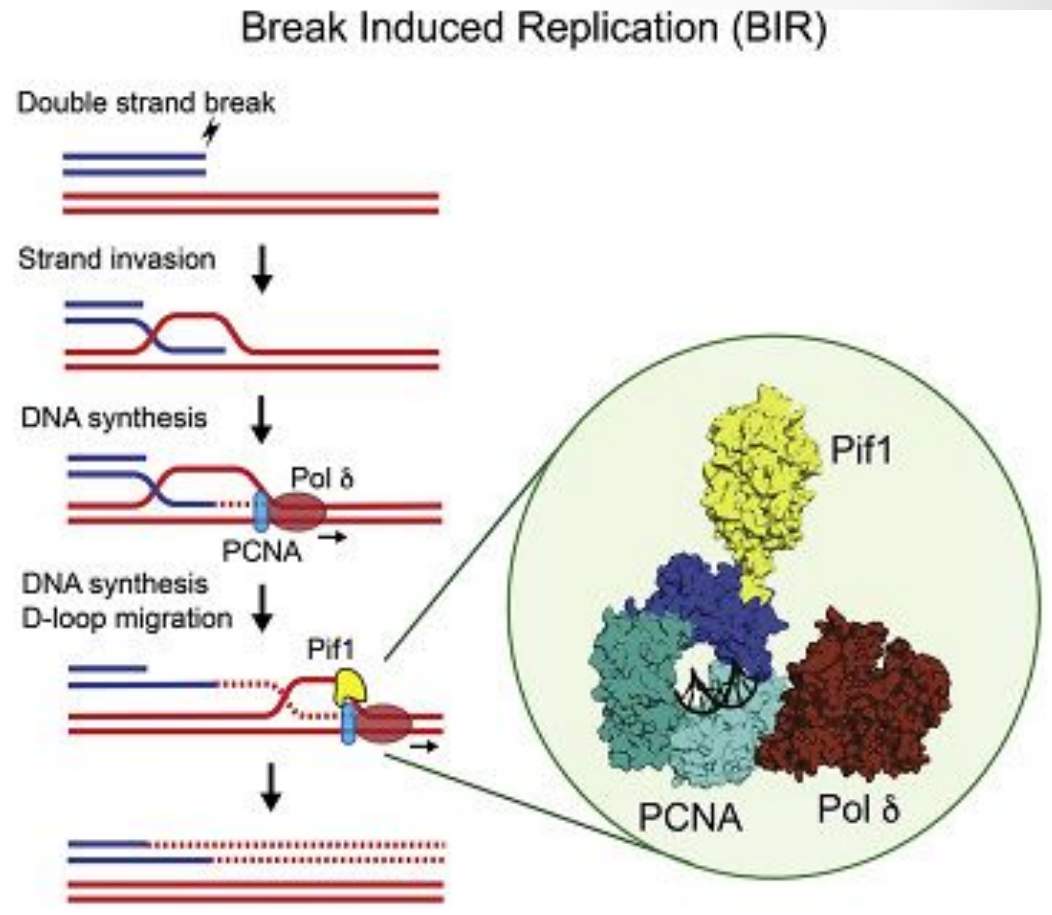
Rad51. Фактор репликации C (RFC) загружает PCNA на D-петлю, чтобы позволить ДНК-полимеразе δ процессивное расширение D-петли. Длина расширения *in vitro* = около 1000 нт.



Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Синапсис

Также показано, что различные ДНК хеликазы влияют на синтез ДНК, связанный с рекомбинацией. Pif1, 5'-3' ДНК-хеликаза, также участвующая в созревании фрагмента Оказаки и гомеостазе теломер, способствует синтезу, связанному с рекомбинацией, путем миграции структуры D-петли, тем самым способствуя разрыв-индуцированной репликации (BIR). Srs2, напротив, блокирует расширение D-петли, нарушая взаимодействие SUMO/PCNA с Pol δ , тем самым устраняя кроссоверы в митотически делящихся клетках.

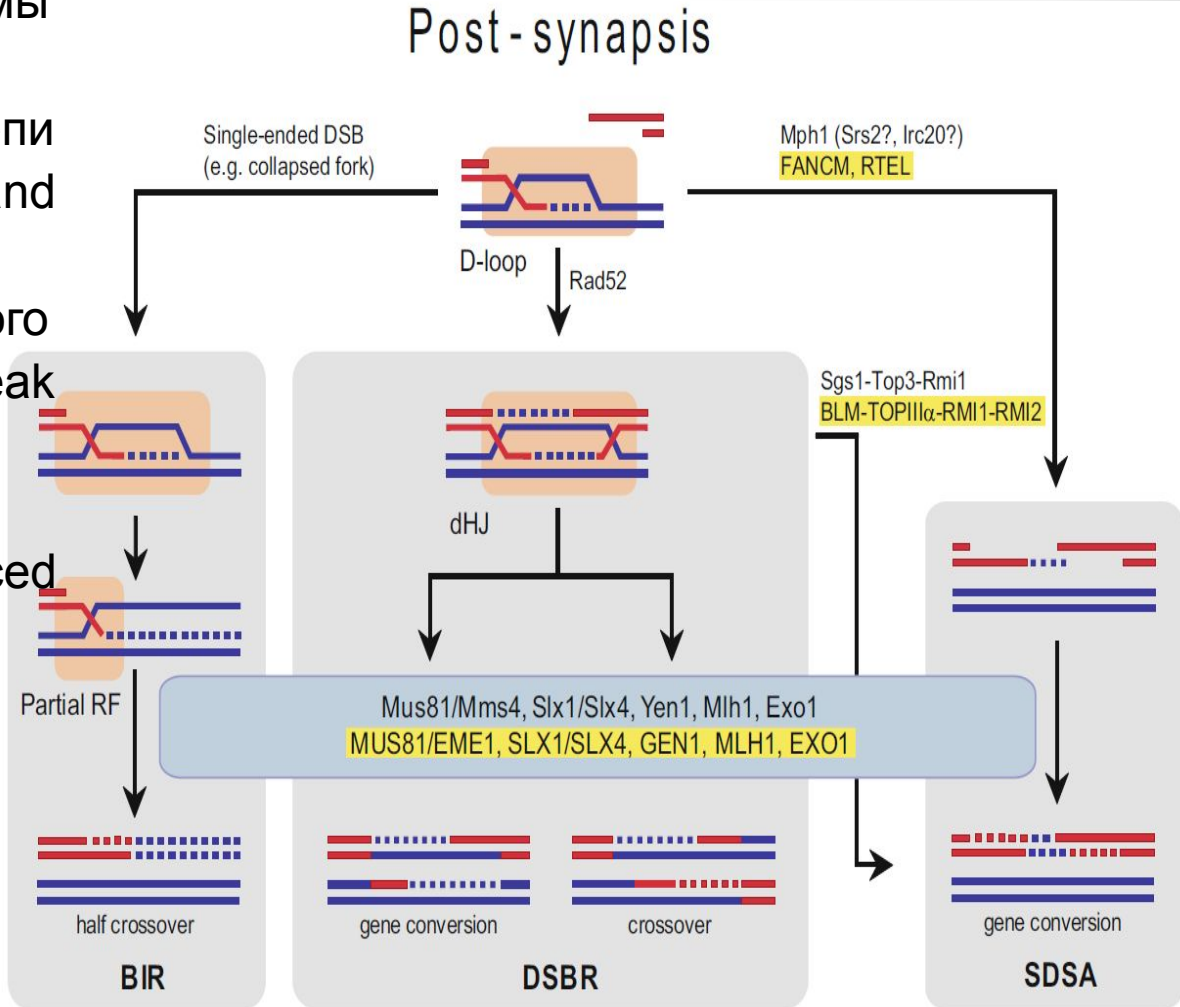


Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Постсинапсис

Альтернативные механизмы постсинапсиса:

1. Синтез-зависимый отжиг цепи (Synthesis-Dependent Annealing – SDSA),
2. Репарация двухцепочечного разрыва (Double-Strand Break Repair – DSBR),
3. Разрыв-индуцированная репликация (Break-Induced Replication – BIR).



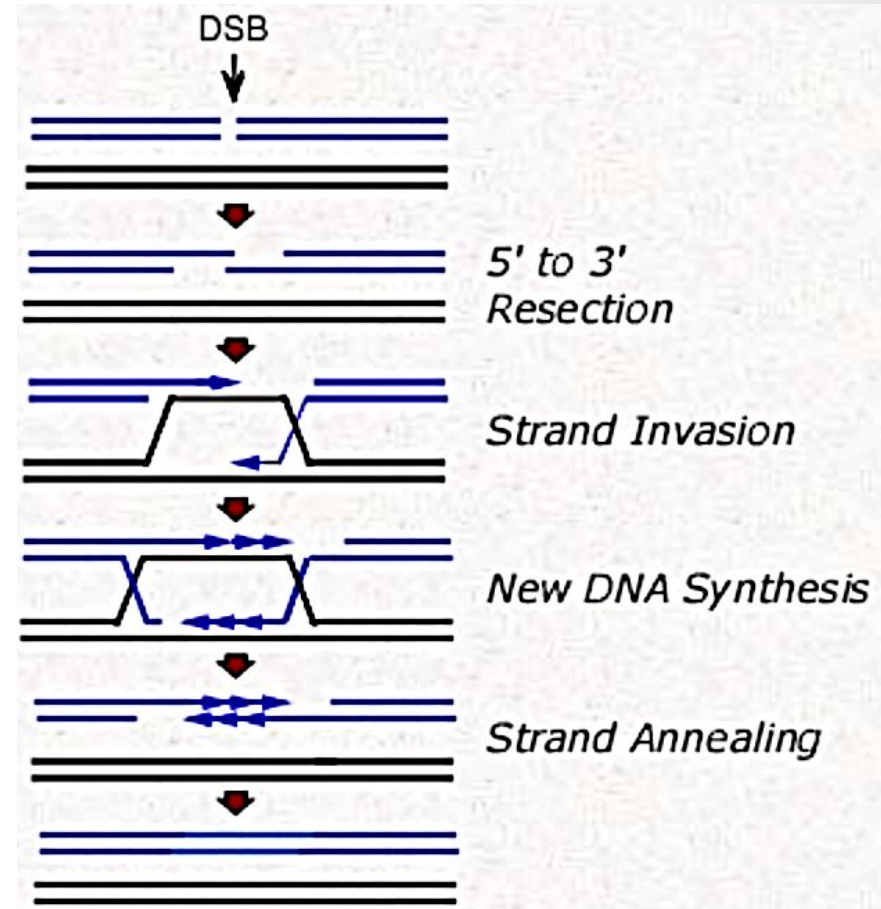
Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Синапсис

В клетках на стадии митоза могут образовываться некросоверные продукты в результате SDSA. Во время SDSA расширенная D-петля смещается на одну или несколько хеликаз. После этого

происходит смещение отжигов ssDNA со вторым концом DSB и осуществляется второй цикл синтеза ДНК. После лигирования ДНК-лигазой Cdc9 восстанавливается целостность генома и образуются исключительно продукты конверсии генов без кроссинговера.

SDSA обеспечивается 4 хеликазами: Mph1, Srs2, Sgs1 и Irc20. Srs2 может стимулировать SDSA путем подавления захвата второго конца или путем ограничения синтеза ДНК, связанного с рекомбинацией, SUMO-PCNA-зависимым способом.



Пути и механизмы репарации

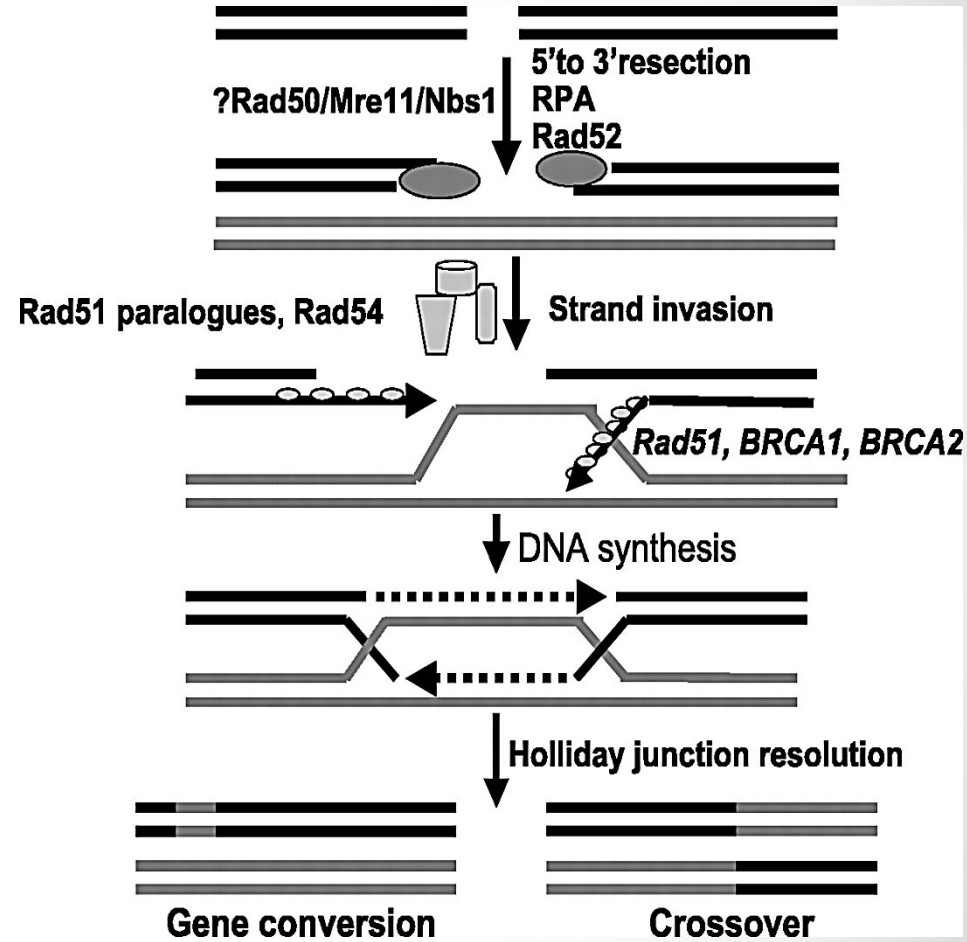
Гомологичная рекомбинация DSB: Синапсис

DSBR в отличие от SDSA характеризуется стабилизацией расширенной D-петли вторым концом поврежденной ДНК, которая катализируется белком Rad52. Rad52 также способствует синтезу ДНК, зависящему от синтеза второго конца. После второго раунда синтеза ДНК на другом поврежденном конце образуется двойной Holliday junction (dHJ). С этого момента могут быть реализованы два альтернативных механизма: «растворение» или «разрешение», для обработки dHJ и восстановления целостности генома. В клетках на стадии митоза чаще могут образовываться некросоверные продукты. Это достигается путем «растворения», которое не связано с расщеплением dHJ и выполняется комплексом STR. Внутри этого комплекса активности декатеназы Top3 и хеликазы Sgs1 отлично подходят для растворения dHJ. Rmi1 является структурно-специфическим ДНК-связывающим белком, который нацеливает Sgs1-Top3 на соответствующие субстраты, стабилизирует комплекс STR и стимулирует растворение.

Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Синапсис

Однако даже при митозе некоторая доля рекомбинации дает кроссоверы благодаря «разрешению» dHJ одной или несколькими структурно-специфическими эндонуклеазами. Для «разрешения» dHJ с целью обеспечения целостности генома необходимо несколько разных нуклеаз или одна из них в скоординированном режиме. Симметрично расщепленный dHJ может быть непосредственно реорганизован Cdc9. Между тем асимметрично расщепленный HJ требует дополнительной обработки концов, возможно, с помощью комплексов Mus81-Mms4 и Rad1-Rad10.



Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Синапсис

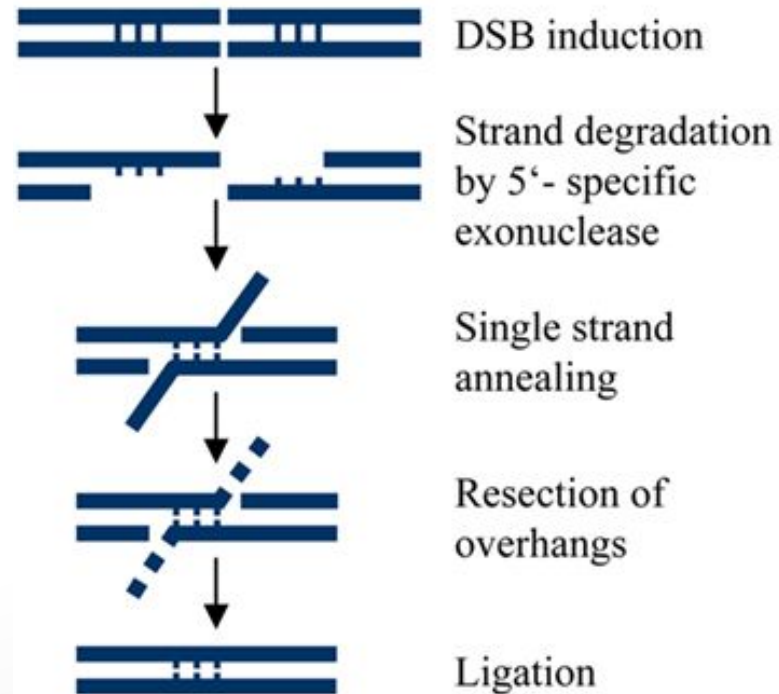
BIR – путь, используемый при одноцепочечных DSB, и имеет значение при перезапуске заторможенных или свернутых репликационных вилок и в рекомбинация-зависимом удлинении теломер для поддержания концов хромосомы в теломераза-дефицитных клетках. Инициация синтеза ДНК длится на 3 – 5 часов дольше, чем для SDSA. Существует также несколько возможных способов инициирования синтеза ДНК. Один из них состоит в разрешении структуры D-петли и сборе частичной репликационной вилки с синтезом ДНК, протекающим вдоль целой хромосомы. Другие варианты связаны с миграцией D-петли с координированным или с диссоординационным синтезом ДНК. В то время как первая модель генерирует продукты полуконсервативной репликации, другие характеризуются консервативной репликацией.

Для эффективной BIR требуются факторы рекомбинации, факторы реплисомы и субъединица комплекса полимеразы δ , Pol32. Синтез ДНК более мутагенен по сравнению с обычной репликацией и часто приводит к грубым хромосомным перестройкам.

Пути и механизмы репарации

Гомологичная рекомбинация DSB: Синапсис

Одноцепочечный отжиг (Single-Strand Annealing - SSA) в основном используется клетками, когда обширное обрезание DSB выявляет области гомологии в **cis** (т.е. на той же молекуле ДНК). SSA уплотняет разрыв с использованием той же молекулы ДНК, на которой был сформирован DSB, а не с использованием матричной молекулы в *trans*. Конечное обрезание – этап с ограниченной скоростью до 4 кб/ч. В отличие от других путей HR SSA не зависит от Rad51. Когда область ssDNA достигает повторяющейся последовательности с обеих сторон DSB, Rad52 или Rad59 отжигает дополнительные цепи. В отличие от нормального mismatch repair хеликазы участвуют в отторжении отожденных цепей, раскручивая несогласованные последовательности для следующей стадии. Отжиг приводит к образованию 3' хвостов. Эти промежуточные соединения расщепляются Rad1-Rad10, в случае небольших гомологий – Msh2-Msh3. Подбор и активность этих нуклеаз регулируется Saw1 и белком Slx4. После расщепления последующий синтез ДНК и лигирование восстанавливают целостность генома.



Пути и механизмы репарации

Негомологичное соединение концов (NHEJ)

NHEJ – основной путь восстановления DSB, заключающийся в простом восстановлении целостности молекулы ДНК посредством сшивания 2 концов.

При этом возникают ошибки в последовательности восстановленной ДНК, поскольку DSB приводит к образованию гетерогенных концов ДНК, не поддающихся сшиванию с помощью лигаз. Поэтому при NHEJ сначала достраиваются необходимые концы. Концы, необходимые для нормальной работы лигаз, могут образовываться как за счет добавления нуклеотидов, так и удаления их.

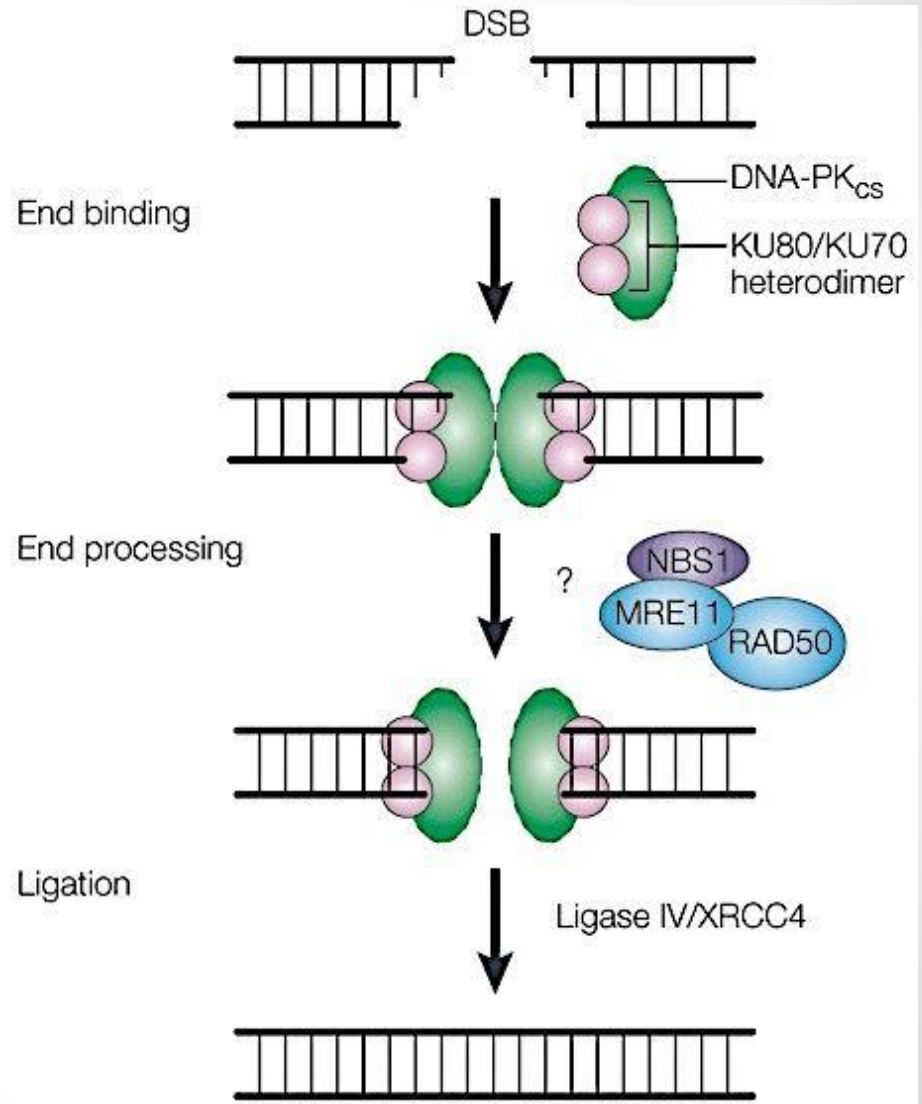
Т.о. NHEJ приводит к накоплению мутаций в геноме каждой соматической клетки. Положительным моментом NHEJ является быстрота восстановления структурной целостности молекул ДНК.

Пути и механизмы репарации

Негомологичное соединение концов (NHEJ)

NHEJ начинается с распознавания повреждения. В этом процессе задействован димер ku70-Ku80 (≈ 300 тыс. молекул / клетку у человека). Ku был открыт как аутоантигенный белок и назван в честь пациента со склеродермией. Ku может соединяться с концами поврежденной ДНК, образуя два Ku комплекса в процессе восстановления по одному на каждый из двух концов.

DNA-PKcs – каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы.



Пути и механизмы репарации

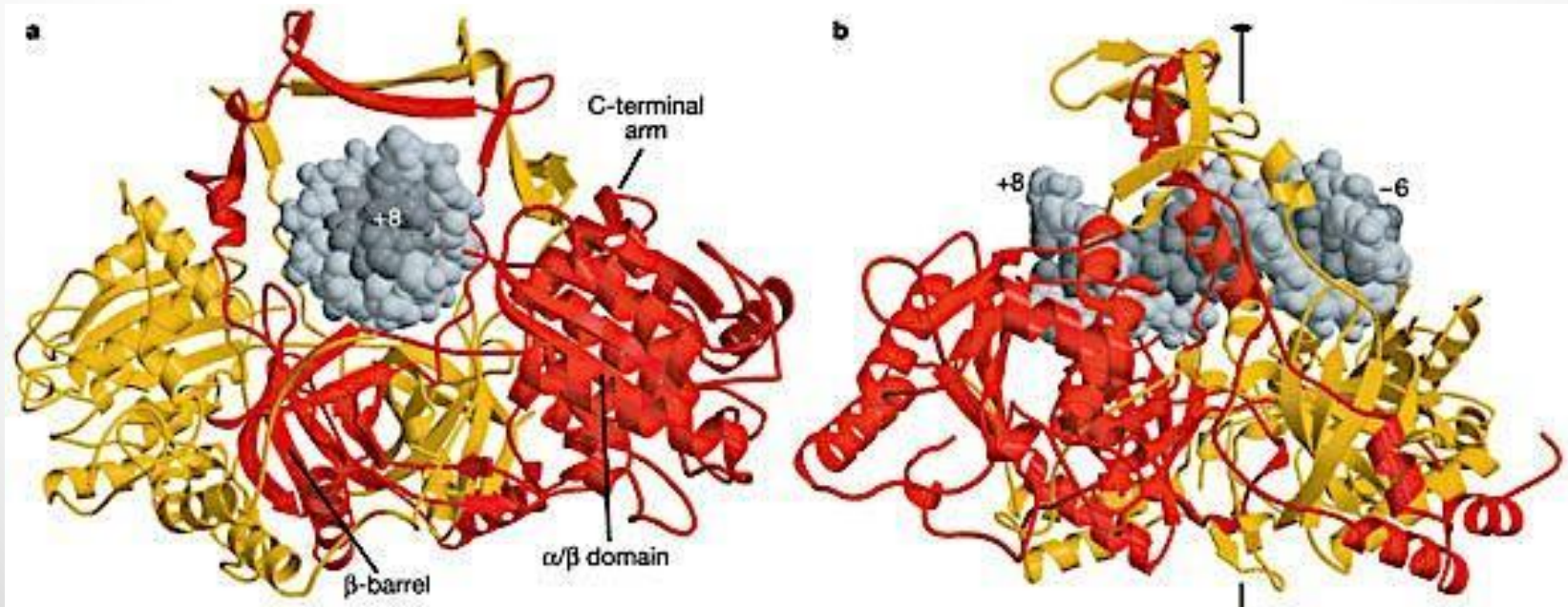
Негомологичное соединение концов (NHEJ)

Схематичное представление доменных организаций Ku70 и Ku80



Структура **Ku70-Ku80** димера, связанного с ДНК.

Ku70 – красное окрашивание, Ku80 – желтое. +8 – концы пар оснований на поврежденной молекуле ДНК. Сахаро-фосфатный остов – светло-серый, азотистые основания – темно-серый.



Пути и механизмы репарации

Негомологичное соединение концов (NHEJ)

Кроме Ku70-Ku80 димера в NHEJ принимают участие:

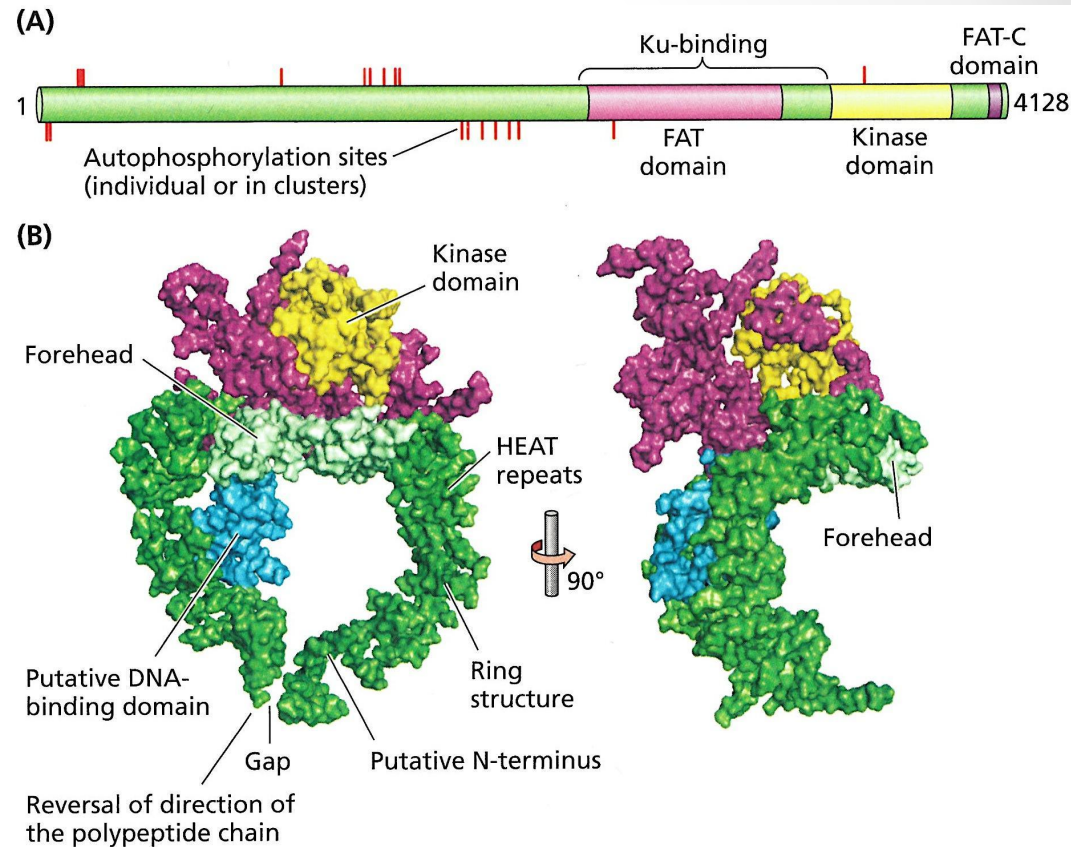
- Каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs), киназная активность которой активируется при связывании с концами разорванной молекулы ДНК. DNA-PKcs фосфорилирует большое количество белков, вовлеченных в этот путь: RPA (репликативный белок А), ДНК лигазу IV (LigIV) и ее партнера XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4) и XLF/Cernunnos (XRCC4-like factor). также связывается с и регулирует активность белка Artemis.
- Artemis – эндонуклеаз, кот., как предполагается, вовлечена в обработку концов ДНК перед лигированием. Другие ферменты, такие как TdT (терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза) и PNK (полинуклеотид киназа) также участвуют в процессинге ДНК концов.
- ДНК полимеразы поврежденных участков (Translesion DNA polymerases): Pol μ и Pol λ .
- LigIV-XRCC4-XLF комплекс.

Пути и механизмы репарации

Негомологичное соединение концов (NHEJ)

Структура DNA-РКс человека

А) Доменная структура. В) Кристаллическая при разрешении 6,6Å. α-спиральные HEAT повторы или helix-turn-helix мотивы облегчают изгиб полипептидной цепи в полую круговую структуру, которая имеет вогнутую форму, если смотреть со стороны. Киназный домен расположен на поверхности этой структуры, а ДНК-связывающий – внутри. FAT домен (семейство фосфатидилинозитол-3 киназ) и высоко-консервативный С-концевой домен FAT-C расположены вокруг киназного домена.

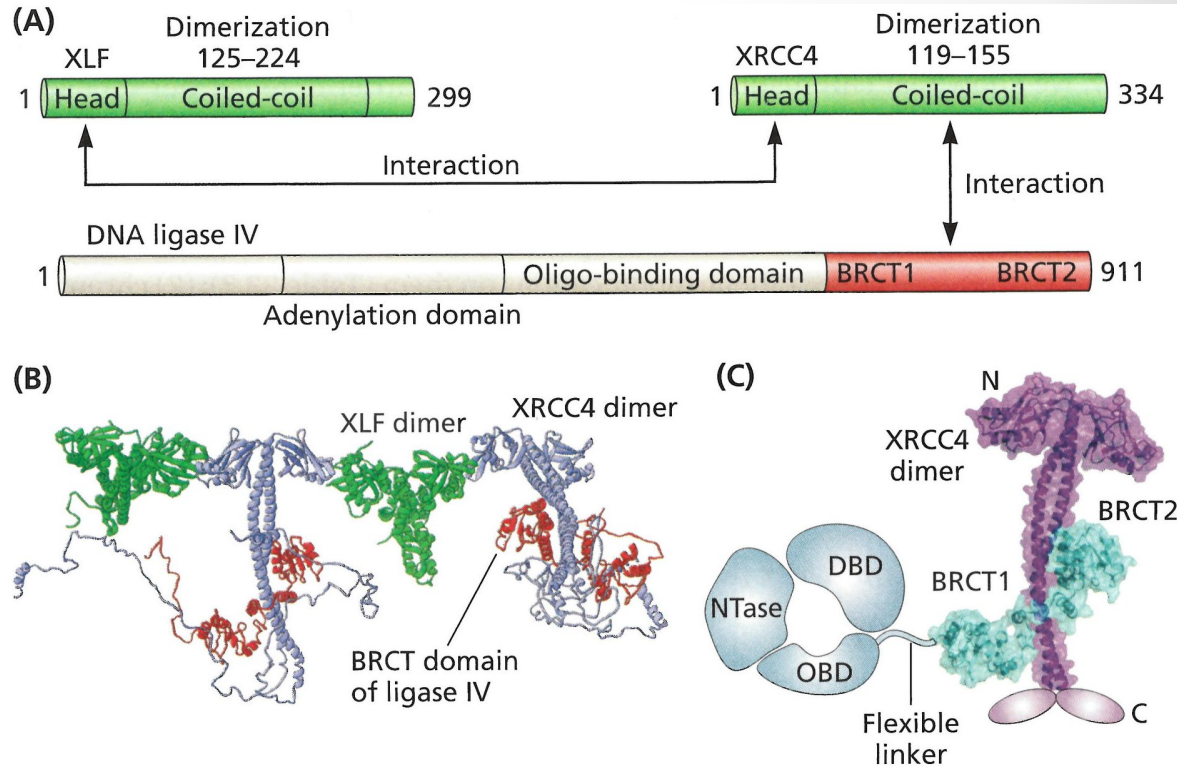


Пути и механизмы репарации

Негомологичное соединение концов (NHEJ)

XRCC4-XLF-DNA ligase IV комплекс

А) Доменная структура. **В)** В филаменте, образованном 3 белками, чередующиеся повторяющиеся звенья XLF и XRCC4 размещают BRCT домен лигазы с одной стороны нити филамента. **С)** Тандем BRCT доменов соединен с каталитической нуклеотидилтрансферазой (NTase) и с ДНК-связывающим доменом (DBD) лигазы с помощью подвижного линкера, который позволяет концам ДНК лигироваться без необходимости лигазы диссоциировать из филамента.



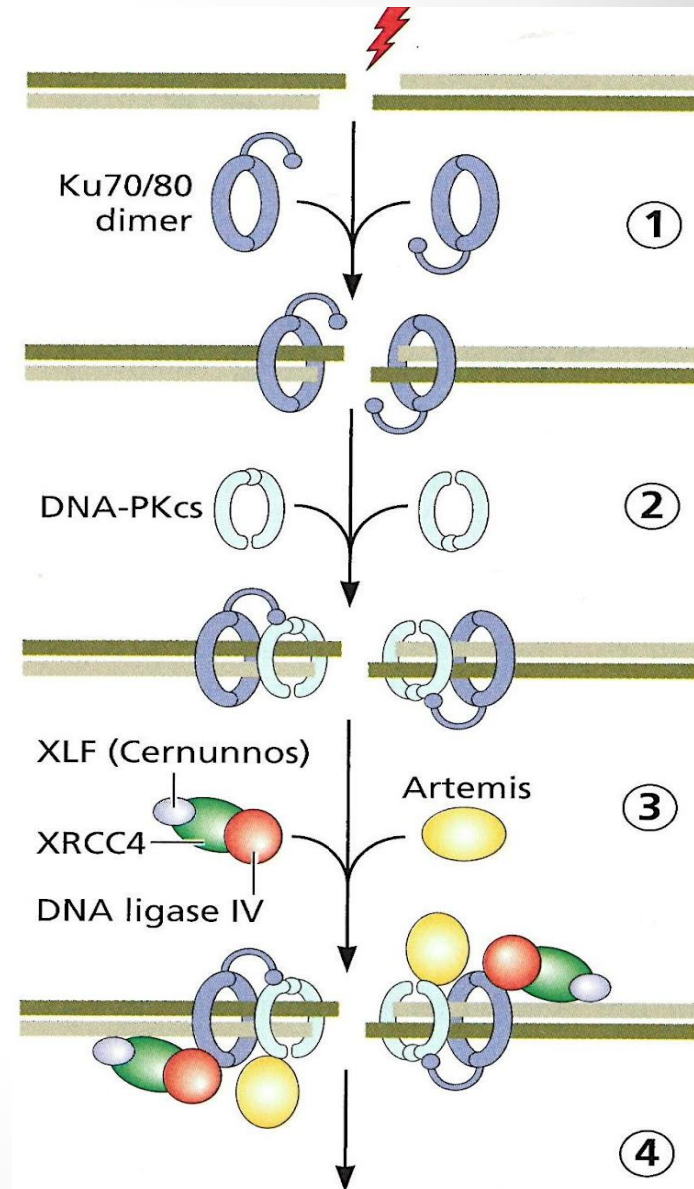
Пути и механизмы репарации

Негомологичное соединение концов (NHEJ)

NHEJ после воздействия ионизирующей радиации.

1, 2 – Ku70-Ku80 гетеродимер распознает DSB, связывается с концами ДНК и связывает DNA-PKcs с помощью своего гибкого С-концевого участка, кот. индуцирует внутреннюю транслокацию Ku димера примерно на один поворот спирали для облегчения доступа остальным ферментам.

3 – ДНК концы процессируется додним или несколькими ферментами, в число кот. могут входить: Artemis – нуклеаза, способная расщеплять большое количество ДНК структур; ДНК полимеразы; TdT, кот. может добавлять концам ДНК нуклеотиды без матрицы, в то время как ДНК полимеразы поврежденных участков могут заполнять пробелы; XRCC4 стабилизирует лигазу и связывается с ДНК.

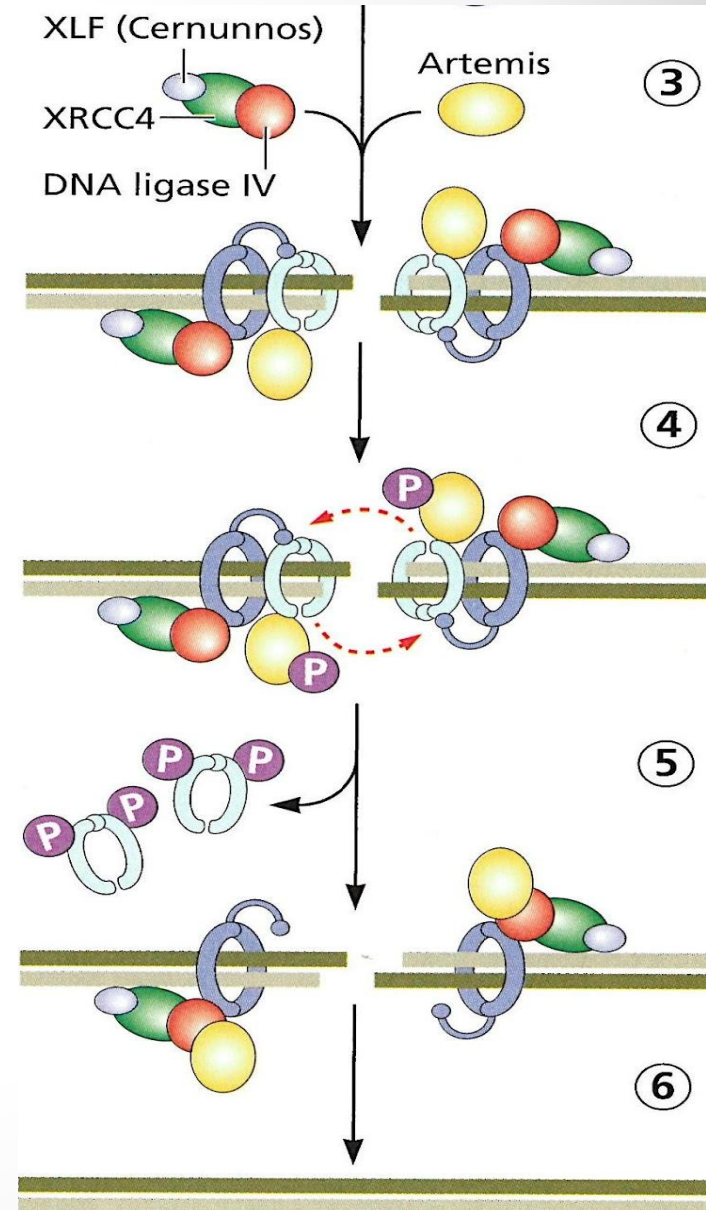


Пути и механизмы репарации

Негомологичное соединение концов (NHEJ)

4,5 – Нанизывание одноцепочечных концов ДНК на молекулы DNA-PKcs активируют киназы. DNA-PKcs подвергается аутофосфорилированию, что открывает центральную ДНК-удерживающую полость, и отделяется от ДНК-концов. Это событие может обеспечивать преимущественный доступ комплексу XRCC4-XLF-DNA ligase IV. DNA-PKcs фосфорилирует Artemis (и, возможно, Ku), активируя его эндонуклеазную активность.

6 – Если ДНК концы комплементарны, незамедлительно происходит лигирование. Если нет, то XRCC4-XLF-DNA ligase IV остается связанным с комплексом и благодаря своей полимеразной и нуклеазной активности процессирует концы. После того, как концы становятся комплементарными XRCC4-XLF-DNA ligase IV завершает реакцию.



Пути и механизмы репарации

Негомологичное соединение концов (NHEJ)

Некоторые ученые классический путь репарации NHEJ с участием DNA-PKcs выделяют как новый путь - D-NHEJ, поскольку DNA-PKcs является эволюционно молодым компонентом, кот. отсутствует у бактерий и низших эукариот. Недавние исследования *in vitro* с использованием ДНК вируса SV40 в культуре клеток обезьян продемонстрировали существование резервного пути репарации без участия DNA-PKcs, Ku, LigIV, названного V-NHEJ. В этом пути участвуют PARP-1 в качестве сенсора поврежденной ДНК; MRN и CtIP в качестве ферментов, обрабатывающих концы; гистон H1 и хеликаза Вернера как посредники. Вовлечение Pol β , ligase III и XRCC1 отличает этот путь от HR и D-NHEJ. Этот резервный путь может обуславливать более высокую заболеваемость раком, чем 2 других, и, т.о., заслуживает повышенного внимания.

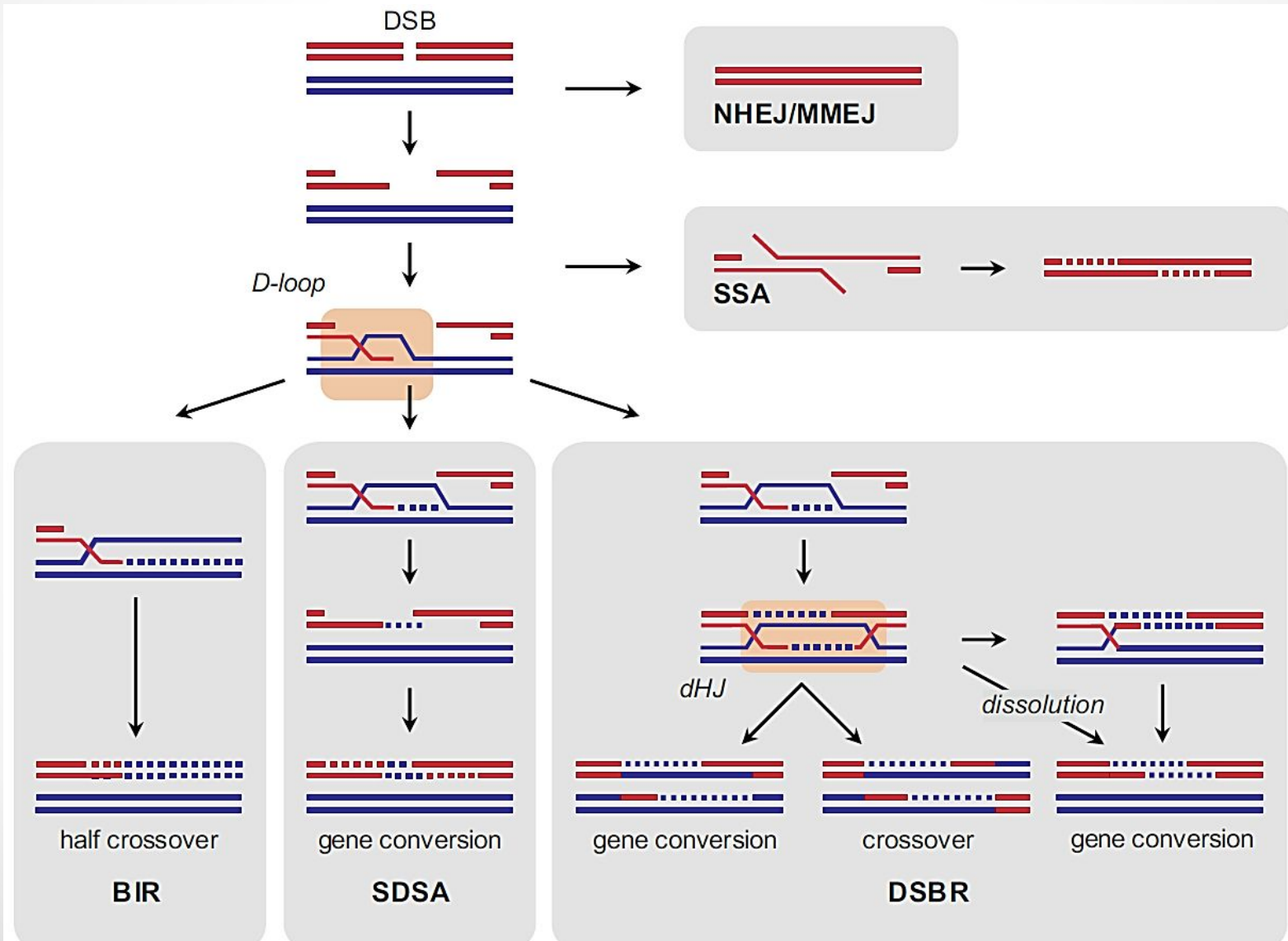
Пути и механизмы репарации

Основные белки, участвующие в 2-х основных путях репарации ДНК

Function	Homologous Recombination, HR	Nonhomologous End-Joining, NHEJ
Single-strand break sensor molecules	MRN ^a	Ku70–Ku80
DNA end-processing enzymes	MRN, CtIP, Exo1, Dna2	Artemis, TdT ^a , PNK ^a
recombinases	Rad51	
DNA repair mediators	Rad52, BRCA2, Rad51 paralogs	DNA-PKcs
polymerases	Pol δ , Pol ϵ	Pol μ , Pol λ
ligases	ligase I	ligase IV
ligase-promoting factors	PCNA?	XRCC4, XLF–Cernunnos

Пути и механизмы репарации

Пути, участвующие в репарации двухцепочечных разрывов ДНК



Спасибо за внимание!

