

Курс молекулярной биологии

Тема лекции

Общая характеристика систем репарации, стратегии коррекции повреждений. Пререпликативная репарация

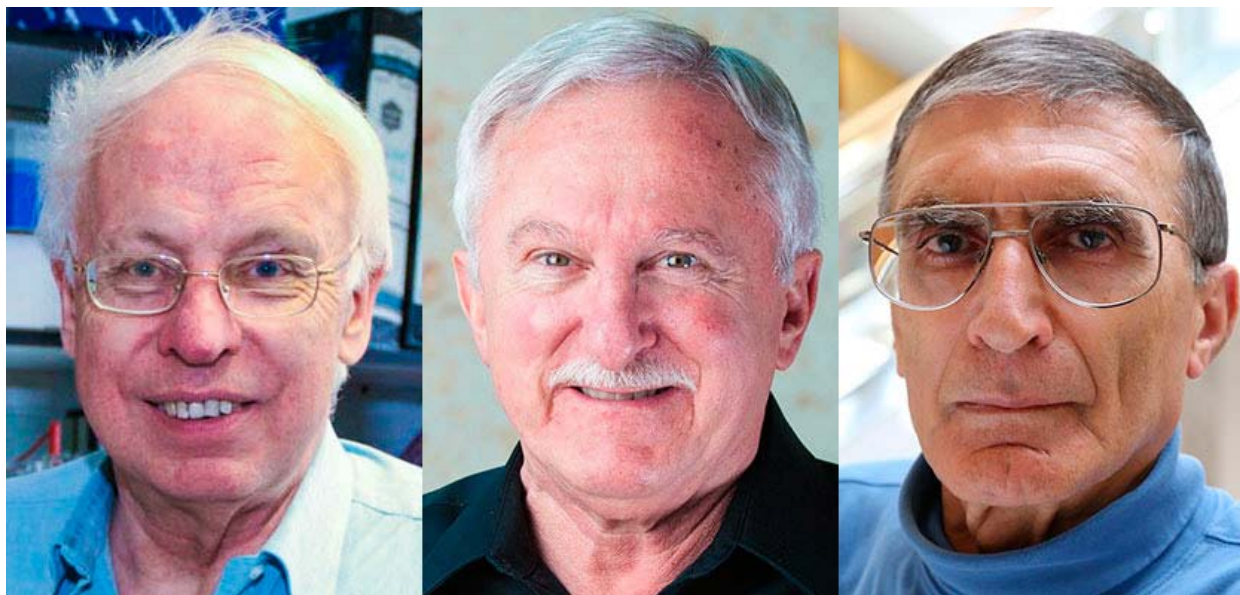
**Захарова Ирина Борисовна,
к.б.н., доцент**

Репарация генетических повреждений

**Это свойство живых организмов
восстанавливать структуру ДНК**

Лауреаты Нобелевской премии по химии 2015 года

«За исследование механизмов репарации ДНК»



**Томас Линдаль
(Tomas Lindahl)**

**Пол Модрич
(Paul Modrich)**

**Азиз Санджар
(Aziz Sancar)**

Репарация основана на двуспиральном строении ДНК

В большинстве случаев поврежденной оказывается только одна цепь ДНК, вторая же цепь сохраняется и служит матрицей, по которой осуществляется коррекция

Задачи: детекция и коррекция повреждения

- либо напрямую,
- либо путем удаления поврежденного участка и застройки по матрице неповрежденной цепи

При повреждении обеих цепей дуплекса для репарации необходимы особые ферментные системы

Причины появления ошибок в ДНК

- Ошибки репликации
- Повреждения ДНК эндогенными агентами
гидролиз (депуринизация, дезаминирование)
- Повреждения ДНК экзогенными агентами
облучение
повреждение химическими агентами
(например, алкилирование)
- Репликация «через повреждения» с использованием полимераз, отличающихся низкой точностью копирования

Типы повреждений ДНК

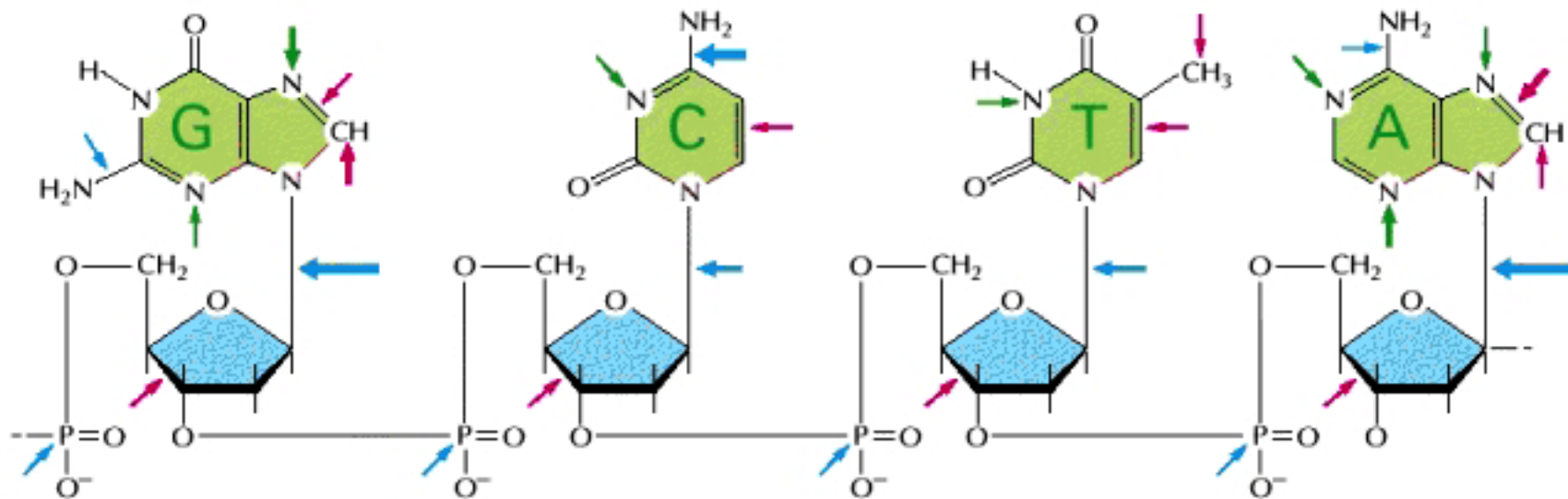
На уровне одного нуклеотида:

- Отсутствие основания
- Некомплементарное основание
- Нарушенное основание

Структурные:

- Одноцепочечные разрывы
- Образование неспецифических связей между цепями (тиминовые димеры и поперечные сшивки)
- Двухцепочечные разрывы

Основные позиции, по которым происходят повреждения



гидролиз



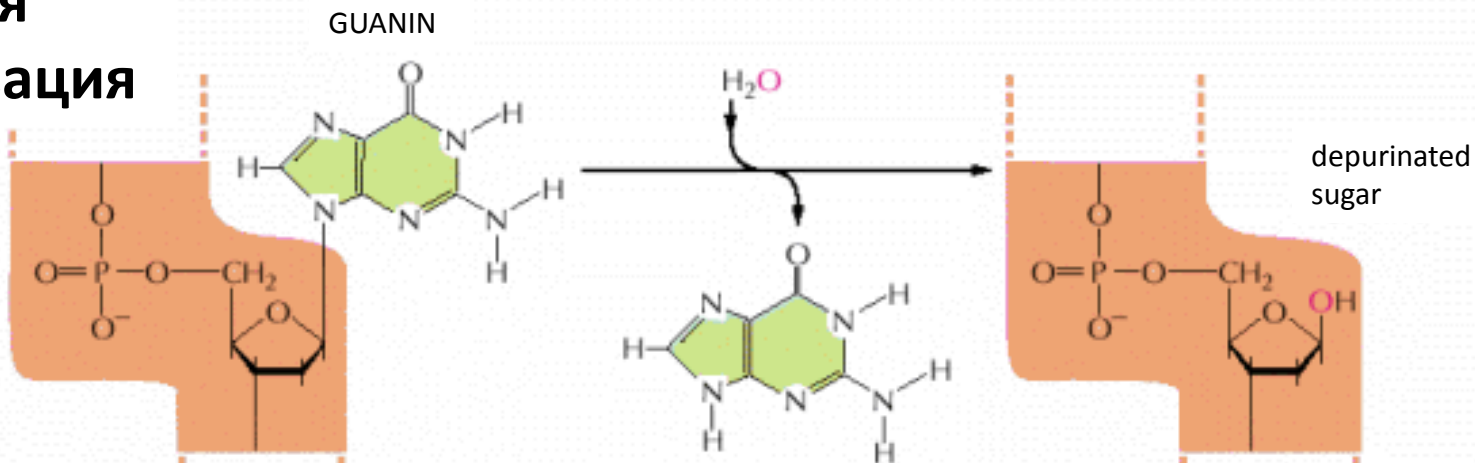
окисление



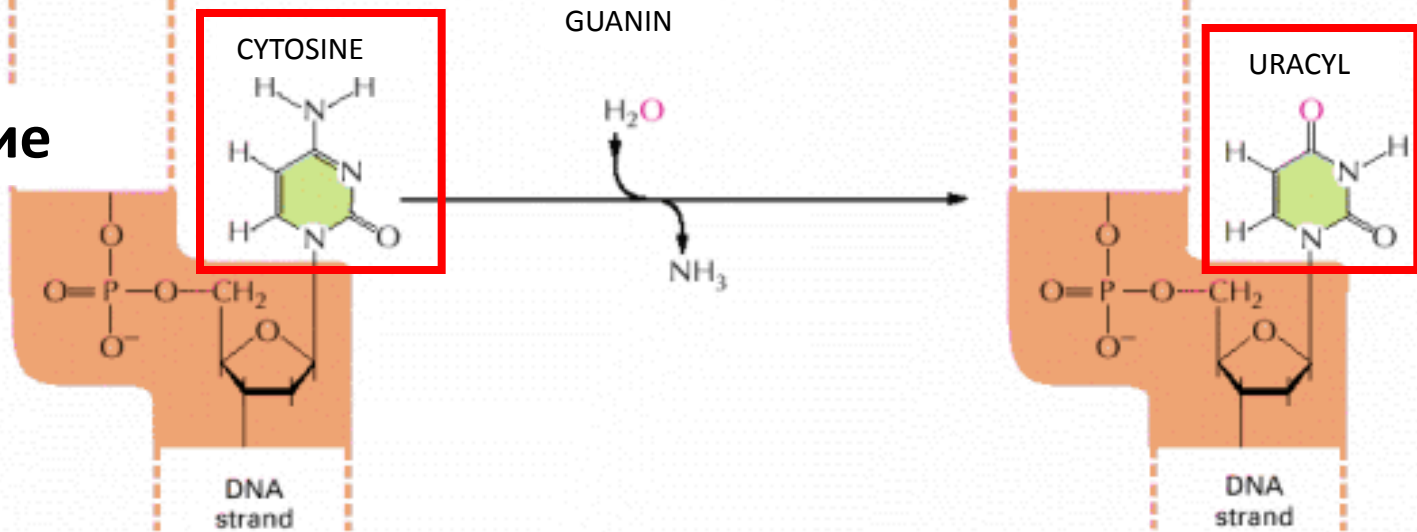
метилирование

Гидролиз

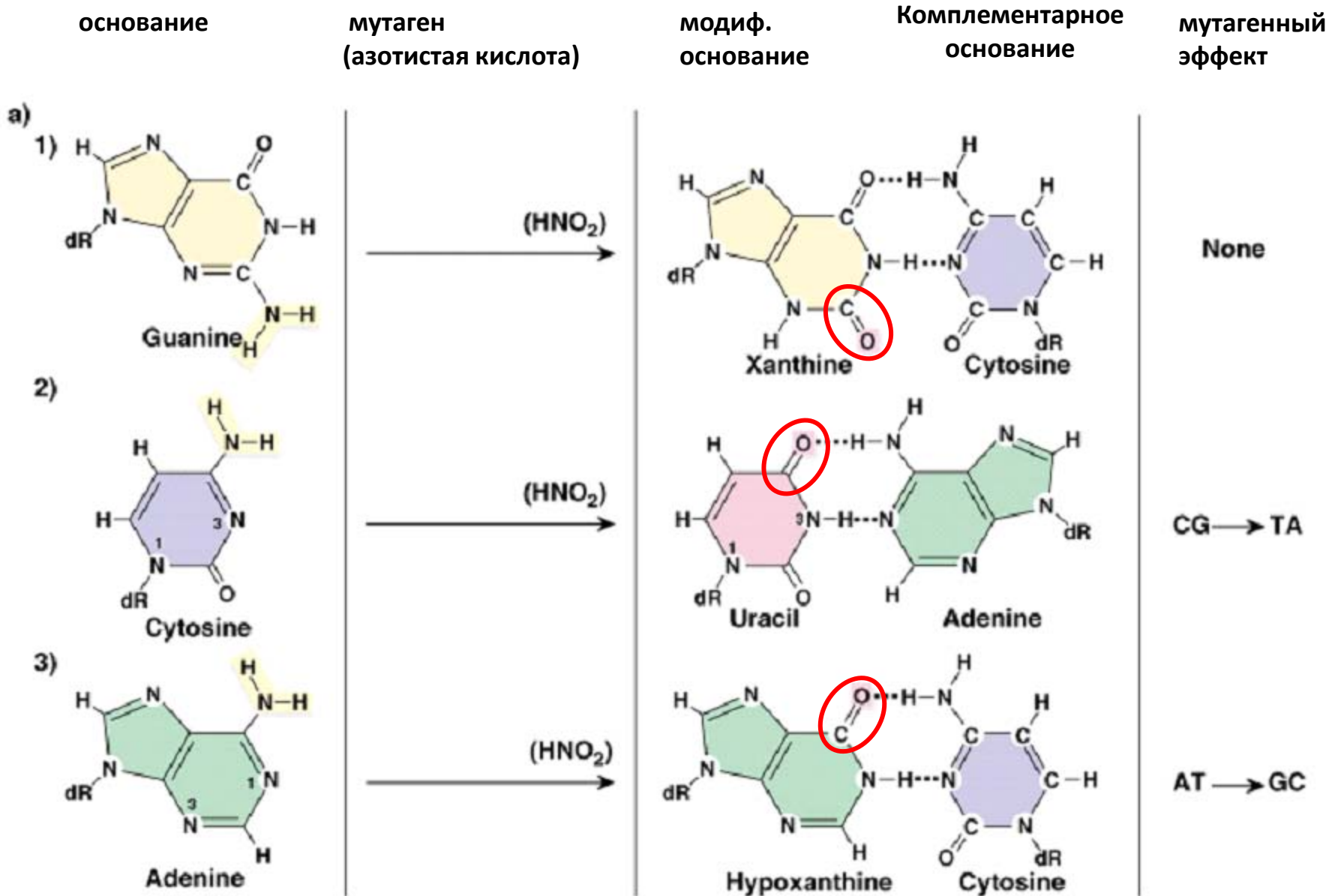
Спонтанная
депуринизация



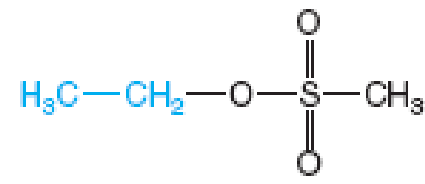
Дезаминирование



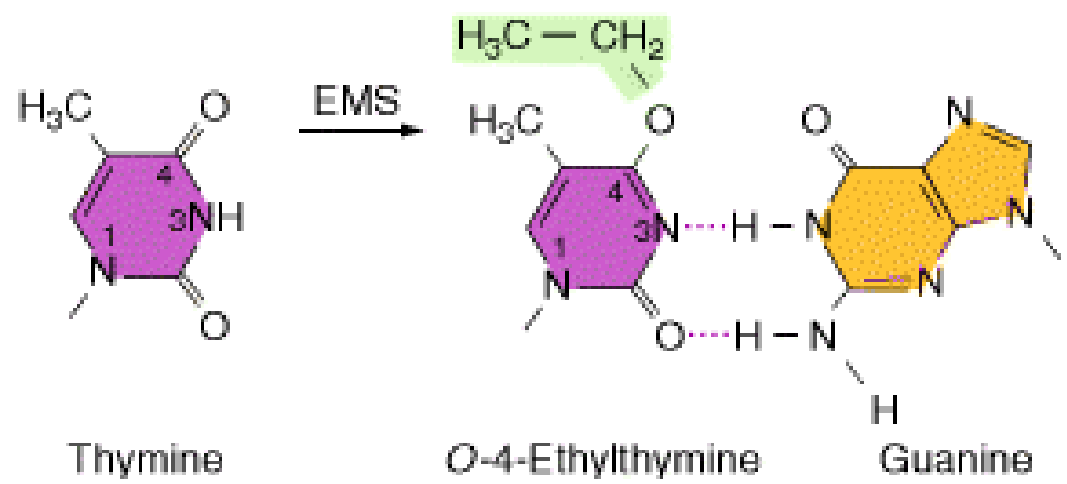
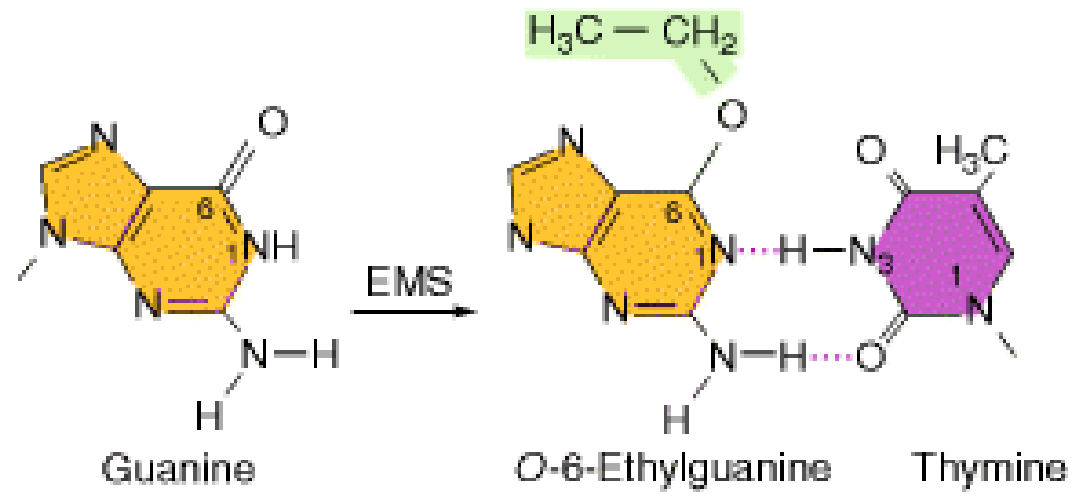
Мутагенные эффекты дезаминирования



Алкилирование



этилметансульфонат (EMS)



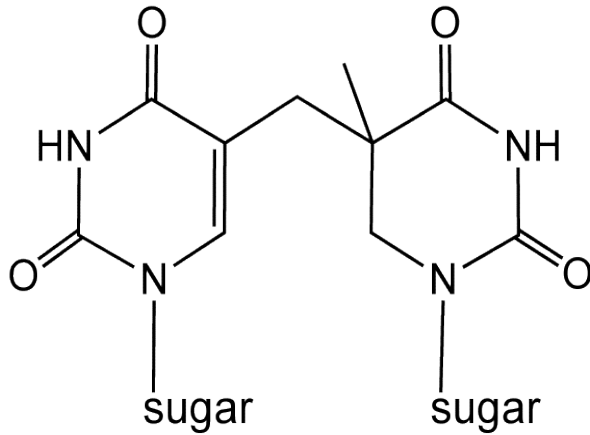
Повреждения ДНК под действием УФ

Фотолиз двойной связи между пятым и шестым атомами в молекулах близкорасположенных пиримидиновых оснований приводит к образованию

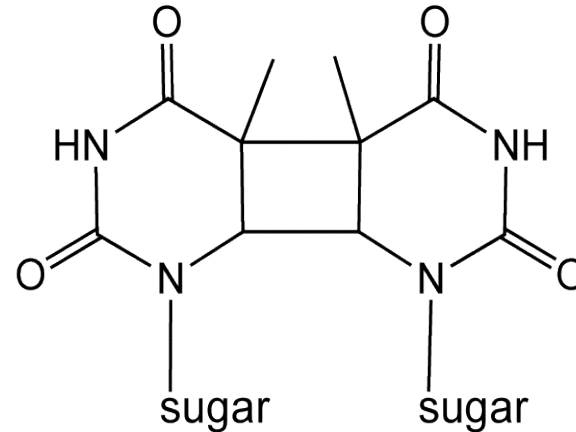
Пиримидиновых димеров

Под действием ультрафиолетовых лучей между двумя соседними пиримидиновыми основаниями (тимином или цитозином) формируются ковалентные связи с образованием циклобутанов или 6,4-фотопродуктов

Повреждения ДНК под действием УФ

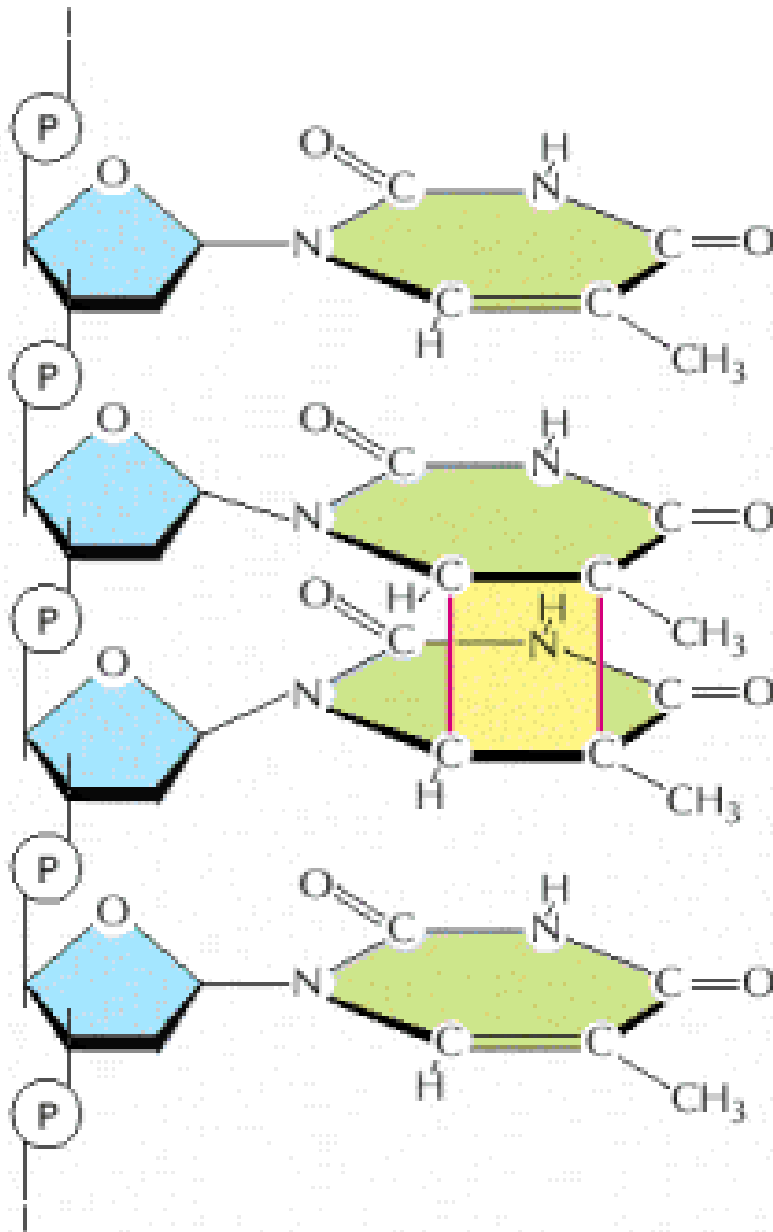


6,4-фотопродукт



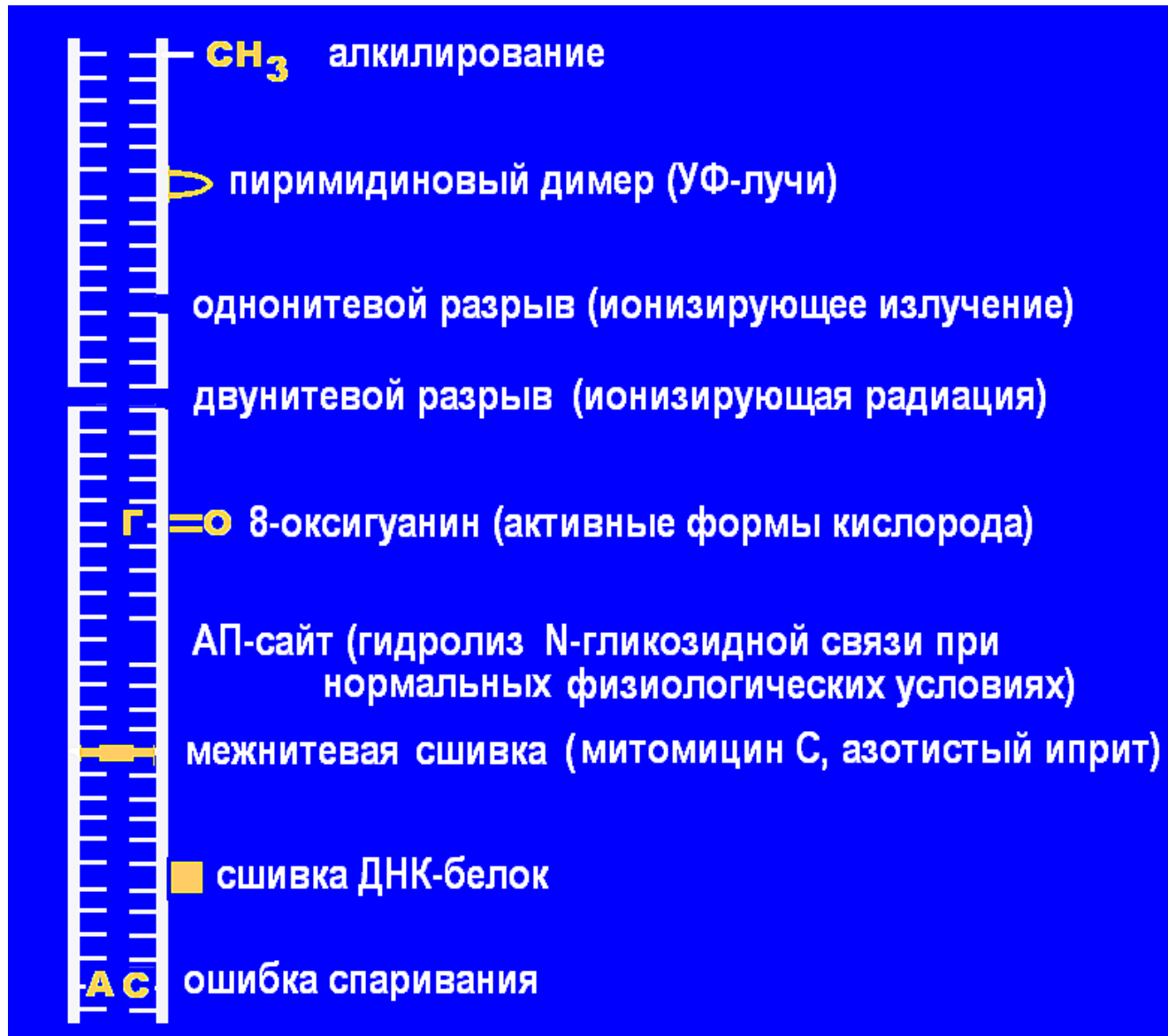
Циклобутан

6,4-фотопродукты, составляют в среднем треть от количества циклобутановых димеров, однако они более мутагенны



**Под действием УФ света
происходит образование
тиминовых димеров**

Схема возможных повреждений ДНК



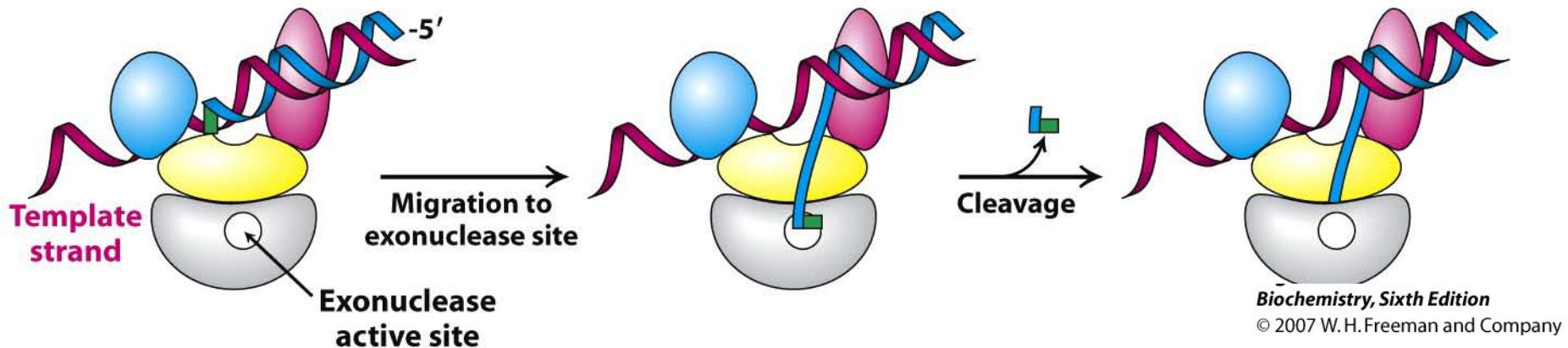
Виды репарации

- Прямая репарация
- Эксцизионная репарация
 - Репарация ошибок репликации
Mismatch repair (MMR)
 - Эксцизионная репарация оснований
Base excision repair (BER)
 - Эксцизионная репарация нуклеотидов
Nucleotide excision repair (NER)
- Пострепликативная (рекомбинационная) репарация
- SOS-репарация

Стратегии коррекции повреждений

При ошибках репликации

- Исправление ошибок ДНК полимеразой - неправильно встроенные нуклеотиды в ходе репликации узнаются и удаляются ДНК-полимеразой за счет ее экзонуклеазной (3'-5') активности.



- Репарация неспаренных оснований (mismatch repair)

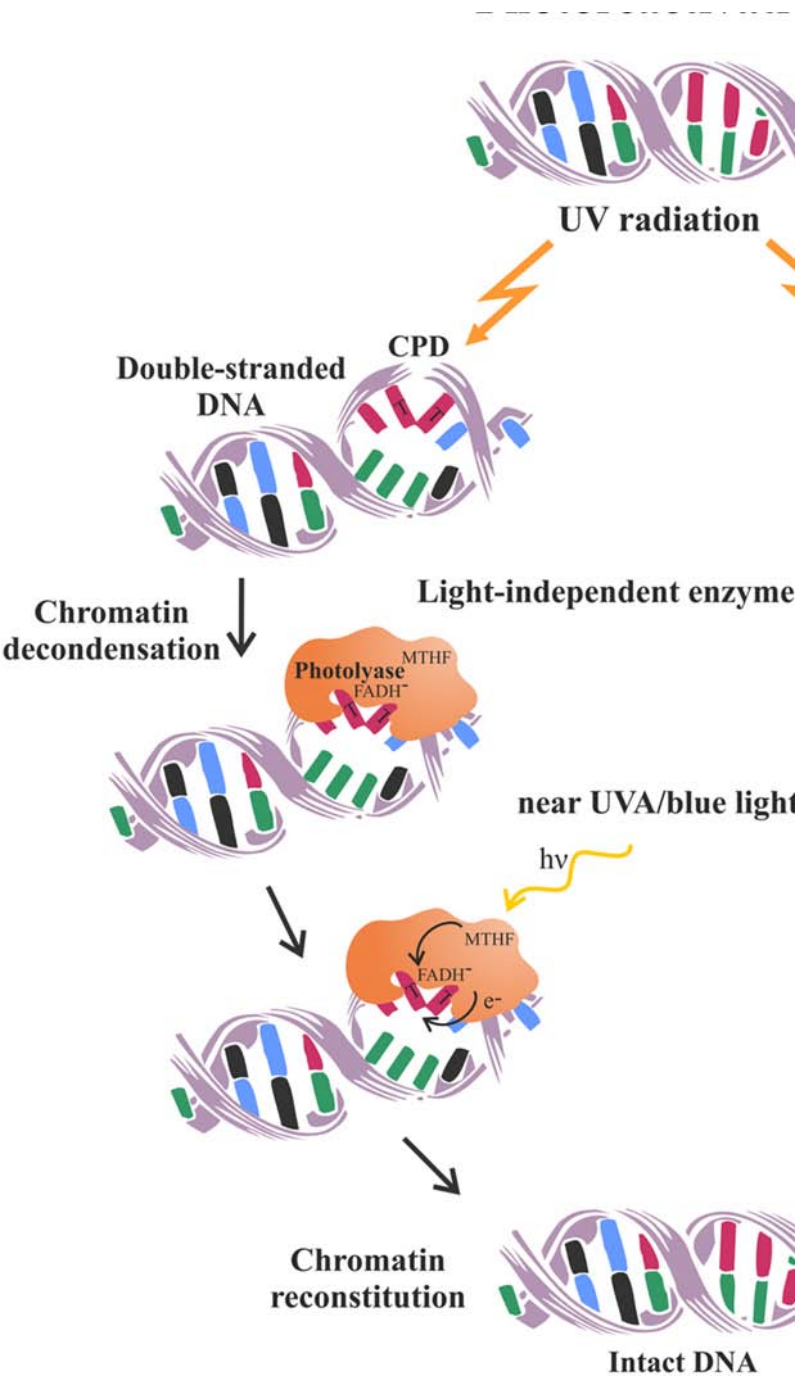
Стратегии коррекции повреждений

При повреждениях ДНК

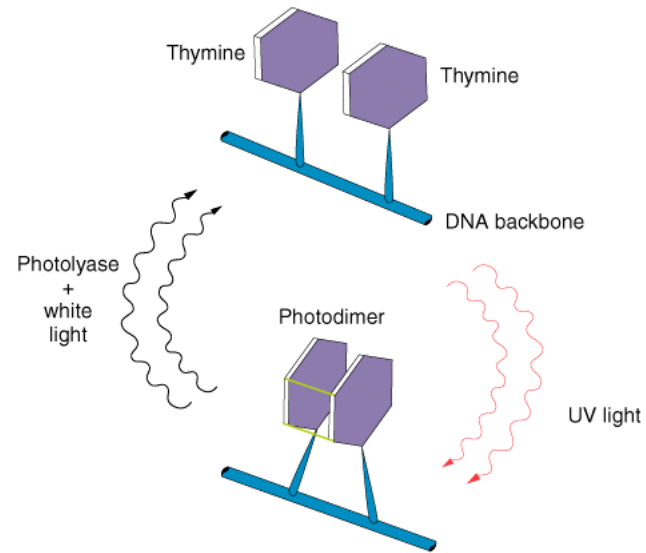
- Прямое удаление повреждений
- Вырезание (эксцизия) оснований (base excision repair)
- Вырезание (эксцизия) нуклеотидов (nucleotide excision repair)
- Рекомбинация и черезблочный синтез особыми полимеразами (не удаляет ошибок но позволяет продолжить репликацию)

Прямая репарация

Вид репарации	Повреждения ДНК	Фермент
Фотореактивация	Пиримидиновые димеры	Фотолиаза
O ⁶ -алкилированного гуанина	O ⁶ -метилгуанин	Метилтрансфераза Не является ферментом
Однонитевых разрывов ДНК	Ник	Лигаза
АП-сайтов путем прямой вставки основания	АП-сайт	Инсертаза



Фотореактивация

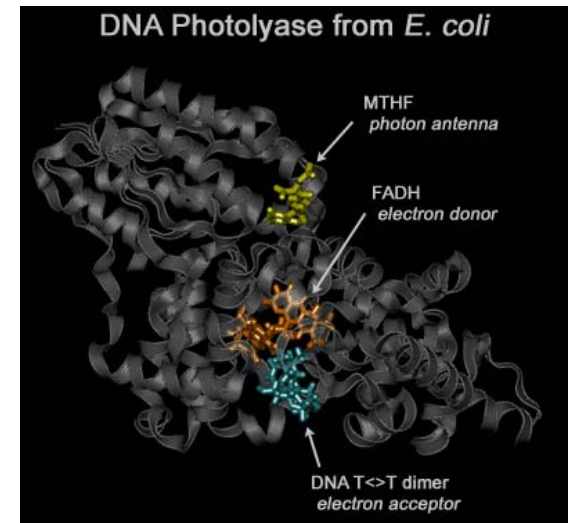


Разделение циклобутановых димеров ДНК фотолиазой

У млекопитающих этой системы нет

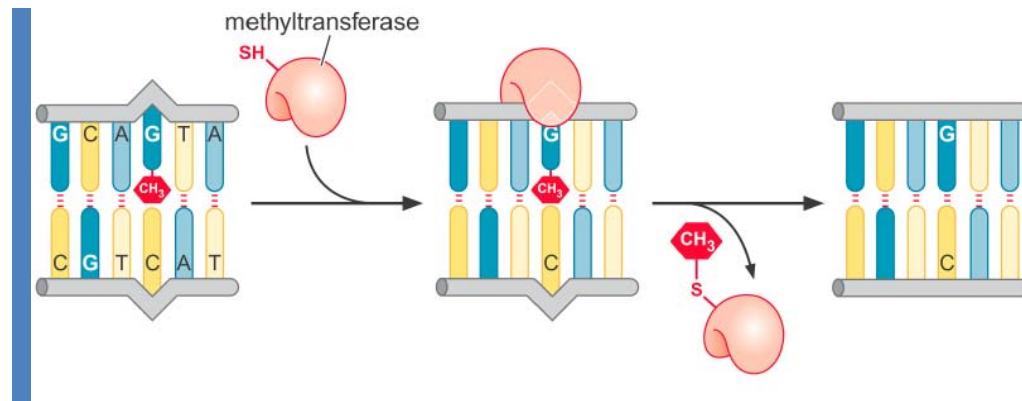
Фототиазы имеют два типа хромофоров

**FADH (флавинадениндинуклеотид)
и MTHF (метенилтетрагидрофолат)**



- **Каталитический кофактор FADH – непосредственно взаимодействует с субстратом – (ТТ димером) в фоторепарирующей реакции.**
- **Светоуловитель MTHF–улавливает энергию и передает ее каталитическому ко-фактору.**

Прямая репарация Об-метилгуанина



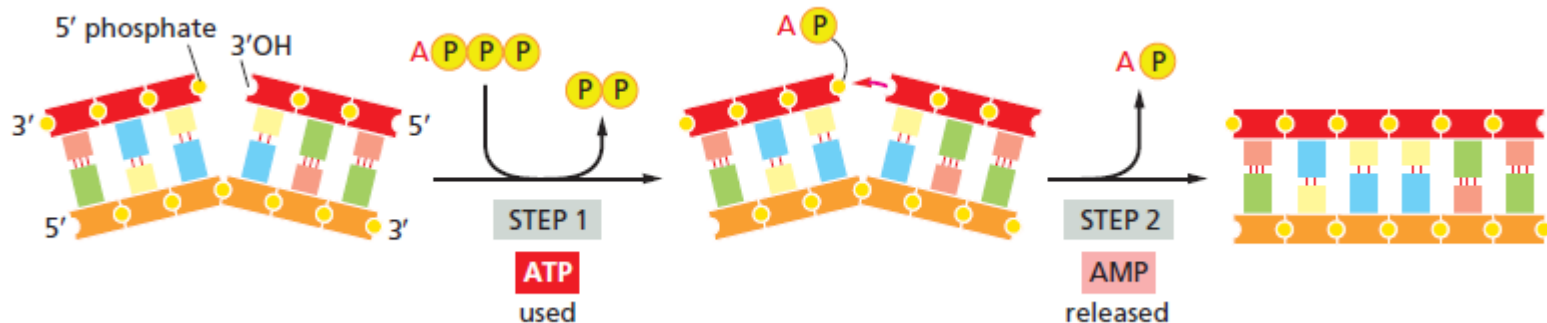
Об-метилгуанин

Все живые организмы (от *E. coli* до человека) имеют ***Об-метилгуанин метилтрансферазу***, которая удаляет метильную (этильную) группу из позиции O⁶ гуанина. При этом белок необратимо связывается с удаленной метильной (этильной) группой

Прямая репарация

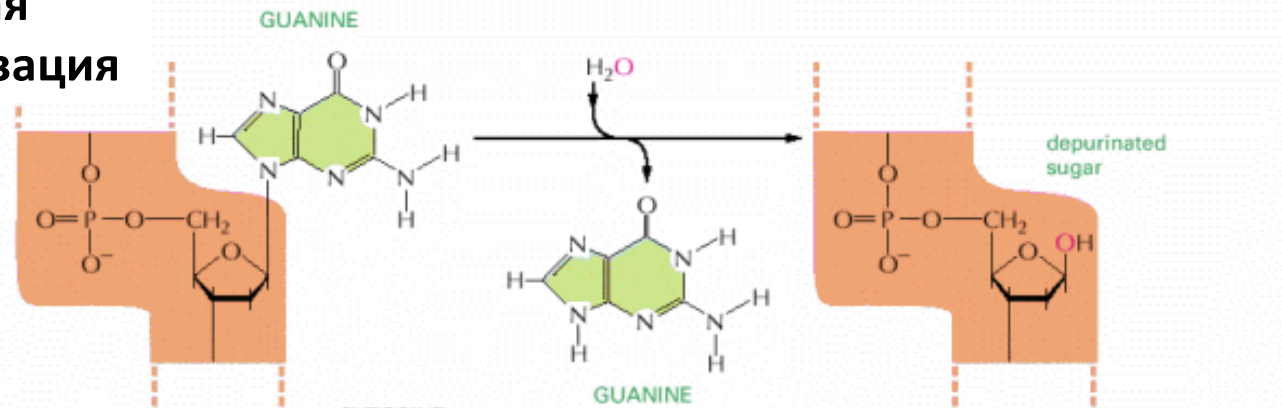
Сшивание однонитевых разрывов

ферментом **ДНК - полинуклеотидлигазой** (от англ. ligase - соединять, связывать), соединяющей одноцепочечный разрыв в цепи ДНК с помощью образования фосфодиэфирной связи между свободным 5'-фосфатным концом и 3'-ОН-группой соседнего олиго- или полидезоксирибонуклеотида



Прямая репарация АП-сайтов ДНК-инсертазой

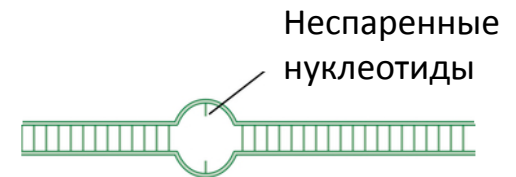
Спонтанная
депуринизация



ДНК-инсертаза (DNA insertase) — фермент эукариотических клеток, способный во время репарации ДНК непосредственно присоединять к дезоксирибозе пуриновое основание в соответствии с правилом комплементарности

Эксцизионная репарация

- **Эксцизионная репарация оснований**
Base excision repair (BER)
- **Эксцизионная репарация нуклеотидов**
Nucleotide excision repair (NER)
- **Репарация ошибок репликации**
Mismatch repair (MMR)



Основные типы повреждений, которые удаляются посредством BER

- **Окисленные основания, в том числе 8-окси-G, который спаривается с A, вызывая GC --> TA трансверсии**
- **Дезоксиурацил**
- **Различные продукты алкилирования оснований (например, 3-meA)**
- **Спонтанно возникающие апуриновые сайты**

Ключевой фермент BER - ДНК гликозилазы

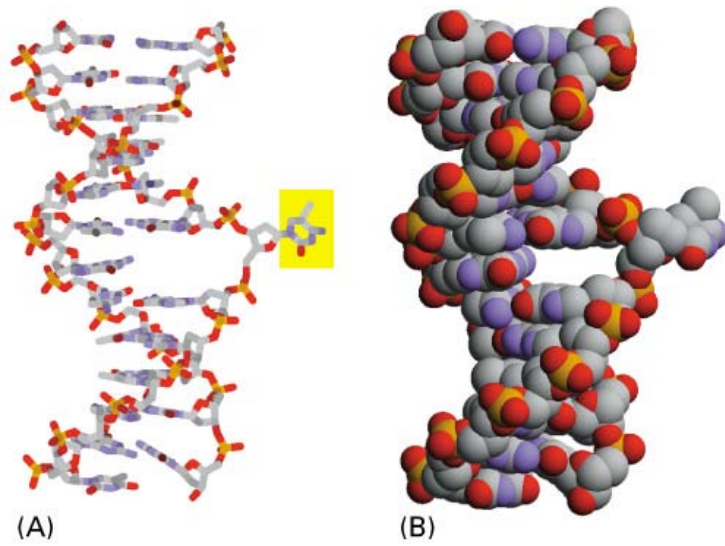
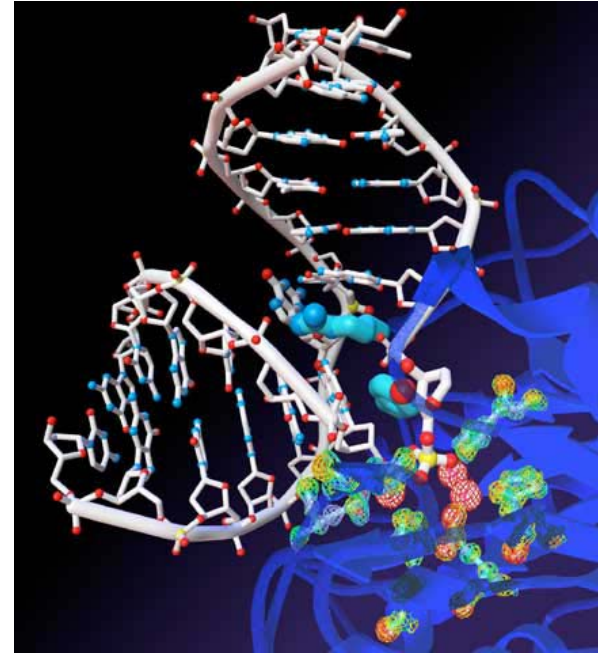
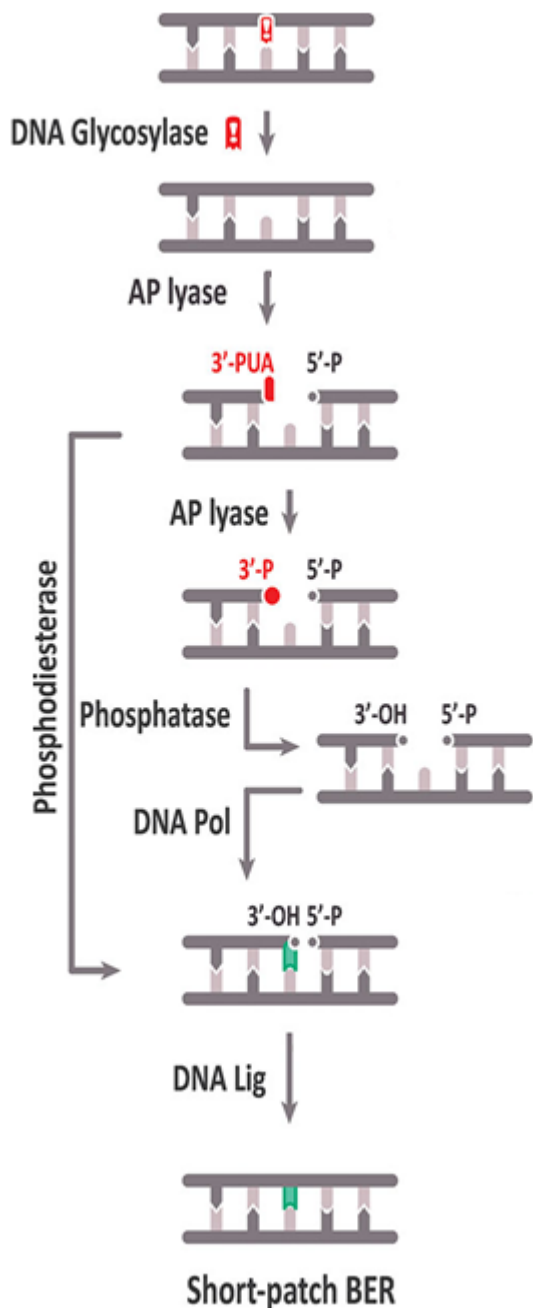


Figure 5-51. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



ДНК гликозилазы «выворачивают» модифицированное основание наружу и отщепляют его от сахара-фосфатного остова

Base excision repair (BER) эксцизия (вырезание) оснований



ДНК-гликозилазы узнают поврежденные основания и удаляют их, разрезая гликозидную связь

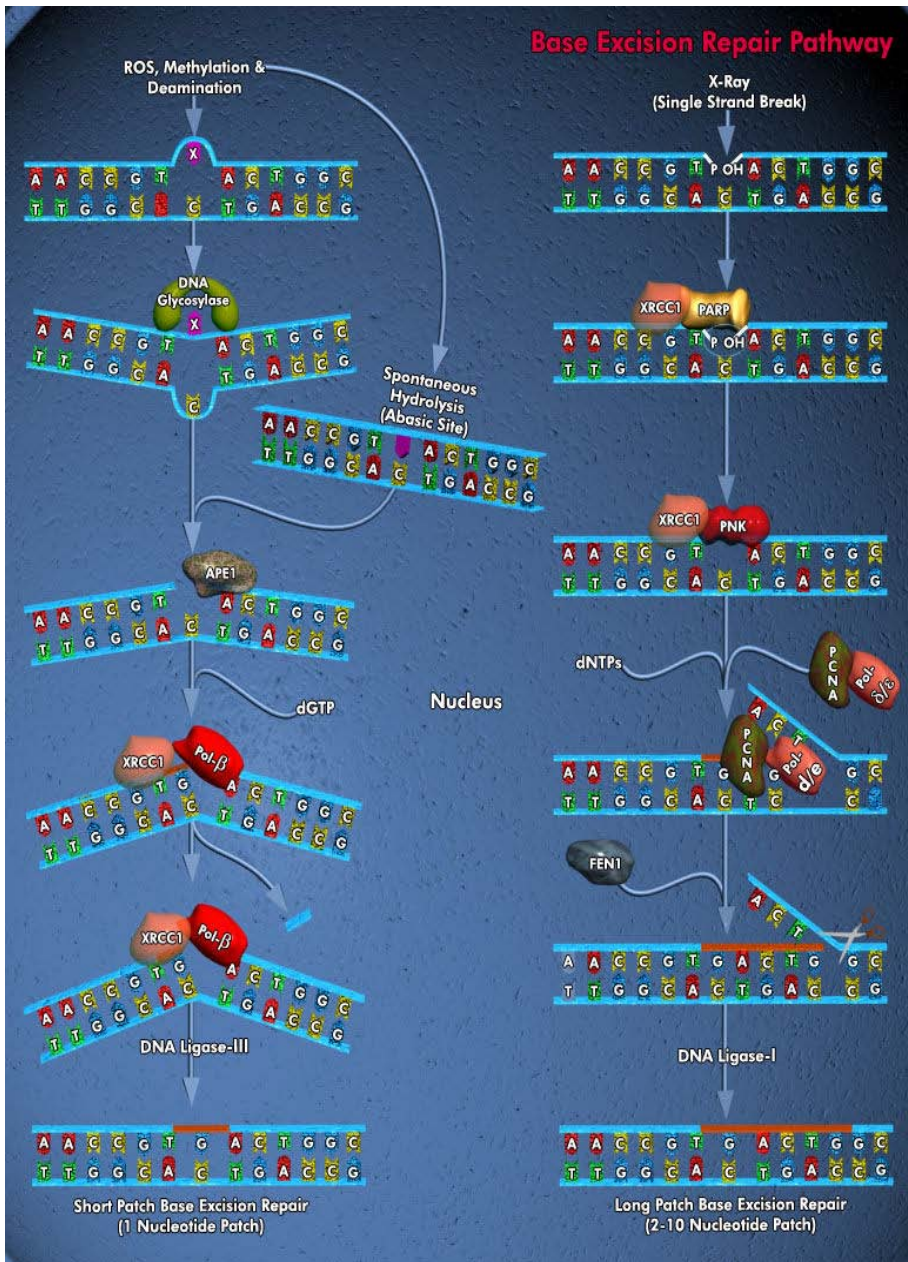
AP эндонуклеаза разрезает фосфодиэфирный остов ДНК рядом с AP сайтом

Фосфодиэстераза отщепляет сахарофосфатную группу без АО

«брешь» застраивается **ДНК-полимеразой**,
ник сшивается **лигазой**

Длинный путь BER

1. **ДНК-гликозилаза** удаляет поврежденное основание с образованием АП-сайта. Сахаро-фосфатный остов сохраняется.
2. **АП-эндонуклеаза** разрезает фосфодиэфирную связь около АП-сайта.
3. **ДНК-полимераза I** инициирует синтез ДНК от 3'-конца этого надреза, заменяя участок поврежденной ДНК в направлении 5' 3' неповрежденной ДНК.
4. Ник, оставшийся после работы ДНК-полимеразы I, зашивается **ДНК-лигазой**.



Короткий путь

Длинный путь

Экцизионная репарация нуклеотидов

Nucleotide excision repair (NER)

- Узнавание повреждений
- Связывание **мультисубъединичного комплекса** с поврежденным сайтом
- Двойное надрезание поврежденной цепи на расстоянии нескольких нуклеотидов от поврежденного сайта в обоих направлениях 5' и 3'
- Освобождение олигонуклеотида, содержащего повреждение между двумя надрезами
- Заполнение образовавшейся брешки ДНК полимеразой
- Лигирование

Ферментативный комплекс эксинуклеаза

У *E. coli* :

UvrA

UvrB

UvrC

UvrD

У человека

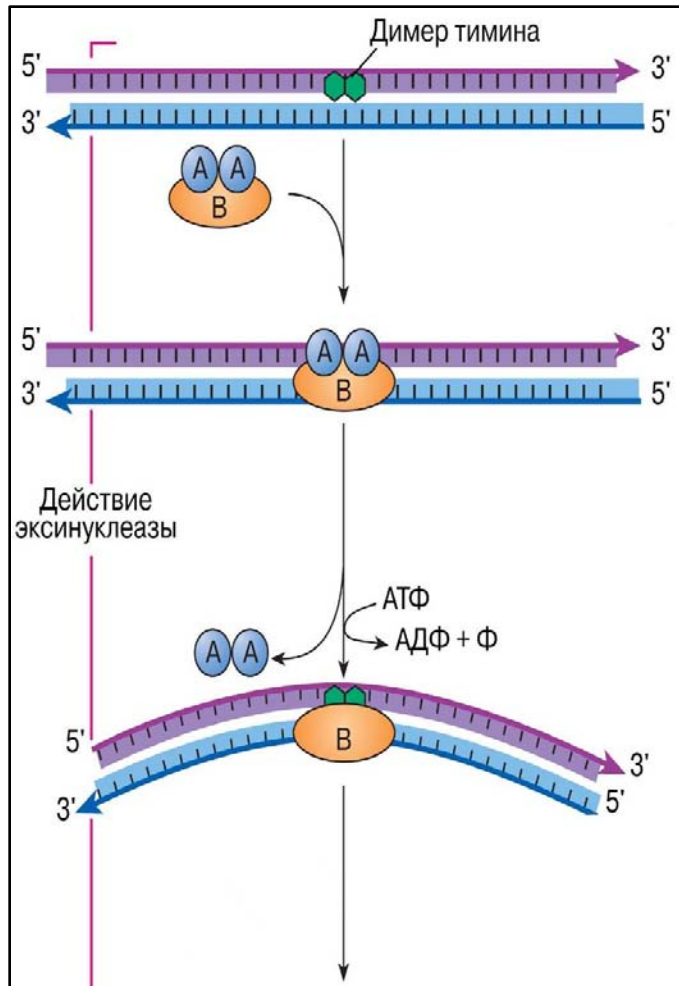
25 различных полипептидов:

16 - протомеры эксинуклеазы,

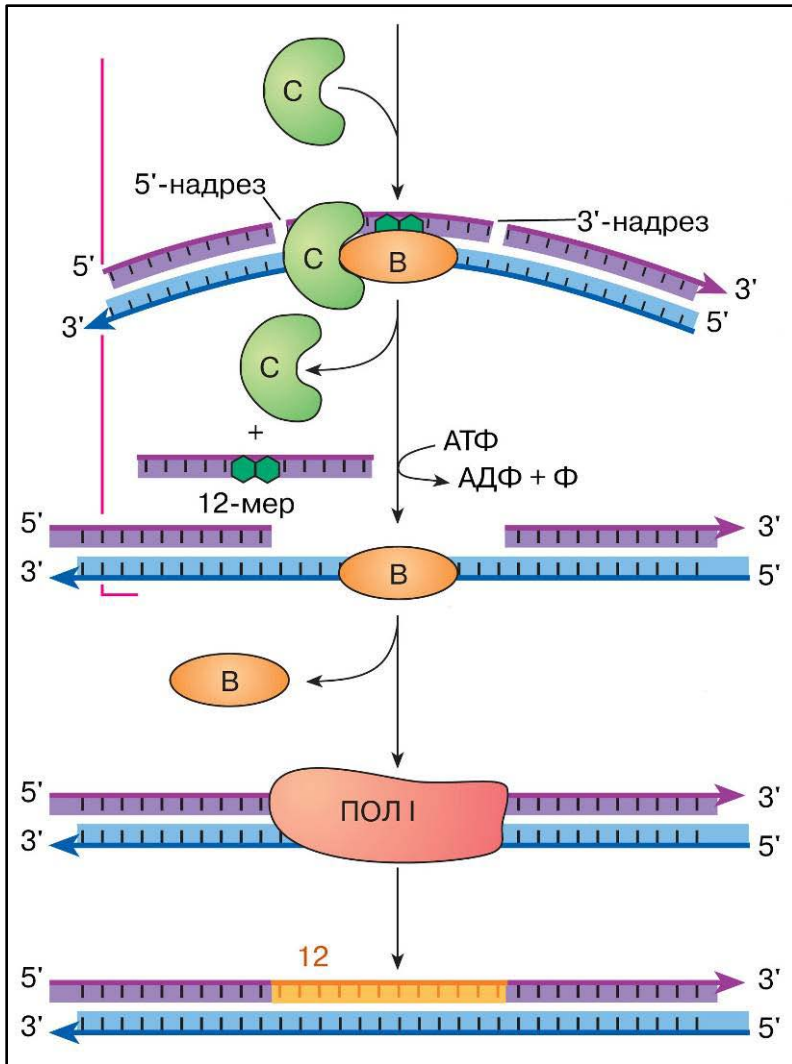
**9 - осуществляют синтез
репарируемого участка
молекулы ДНК**

протомеры эксинуклеазы взаимодействуют с ДНК в определенной последовательности, осуществляя АТР-зависимую реакцию выщепления олигонуклеотидного фрагмента из репарируемой цепи ДНК

Экцизионная репарация нуклеотидов у прокариот

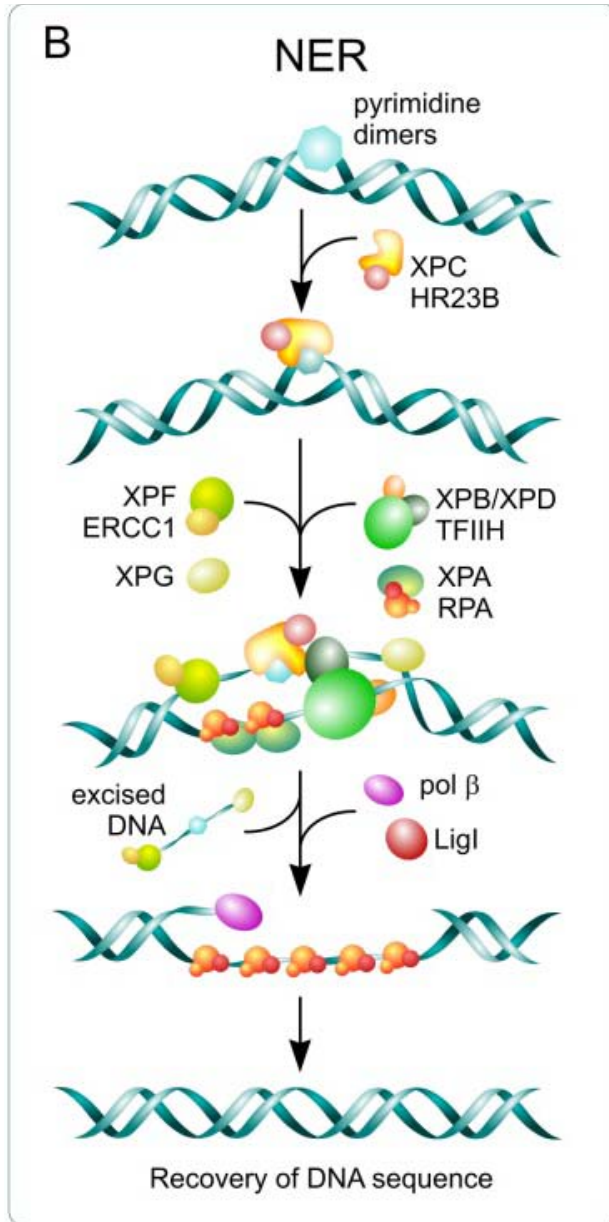


- Комплекс из двух белков **UvrA** и одного **UvrB** сканирует ДНК, выявляет поврежденное место и присоединяются к нему
- После выявления поврежденного участка **UvrA** освобождается из комплекса



- **UvrB** вызывает локальную денатурацию поврежденного участка и привлекает **UvrC**,
- Комплекс **UvrBC** вносит однонитевые разрывы с 5'- и 3'- конца от повреждения
- DNA хеликаза **UvrD** обеспечивает удаление из дуплекса фрагмента ДНК, содержащего повреждение
- **DNA Pol I** застраивает брешь и лигаза «зашивает» однонитевой разрыв
- Восстановленный фрагмент ДНК

Эксцизионная репарация нуклеотидов у эукариот



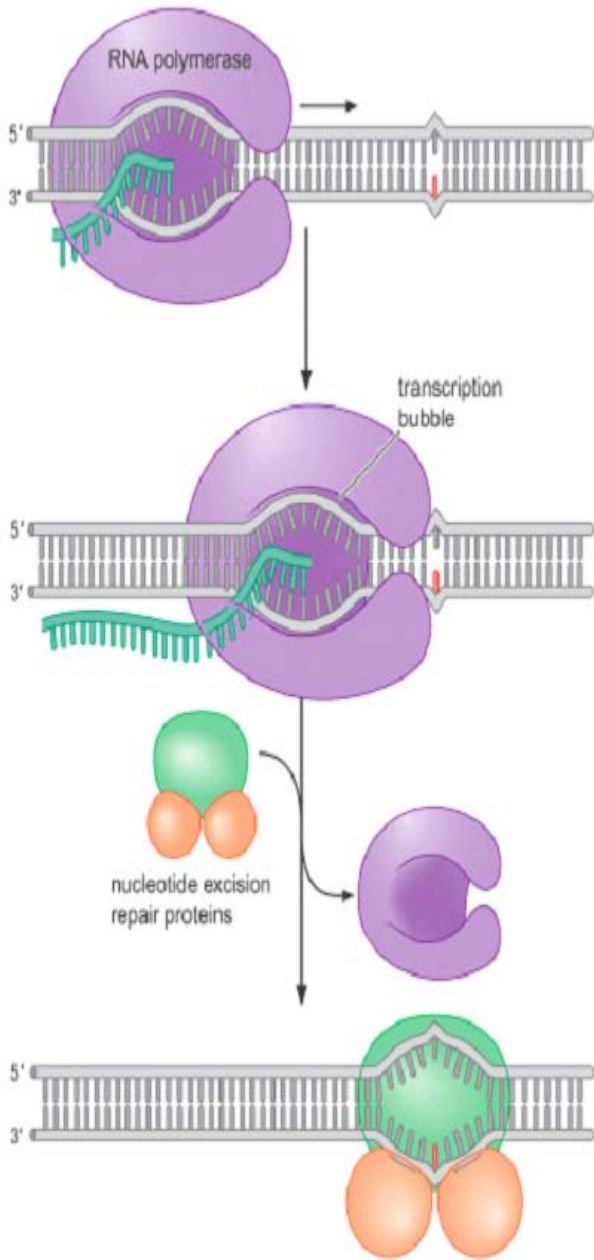
XPC в комплексе с HR23B узнают повреждения и вызывают локальную денатурацию ДНК.

XPB+XPD - субъединицы **TFIIH** - общий транскрипционный фактор, обладающий хеликазной активностью.

XPA стабилизирует комплекс и привлекает другие белки

ERCC1-XPF – эндонуклеаза, вносящая 5'-разрыв. **XPG** – эндонуклеаза, вносящая 3'-разрыв

RPA помогает позиционировать нуклеазы по краям расплавленного участка ДНК



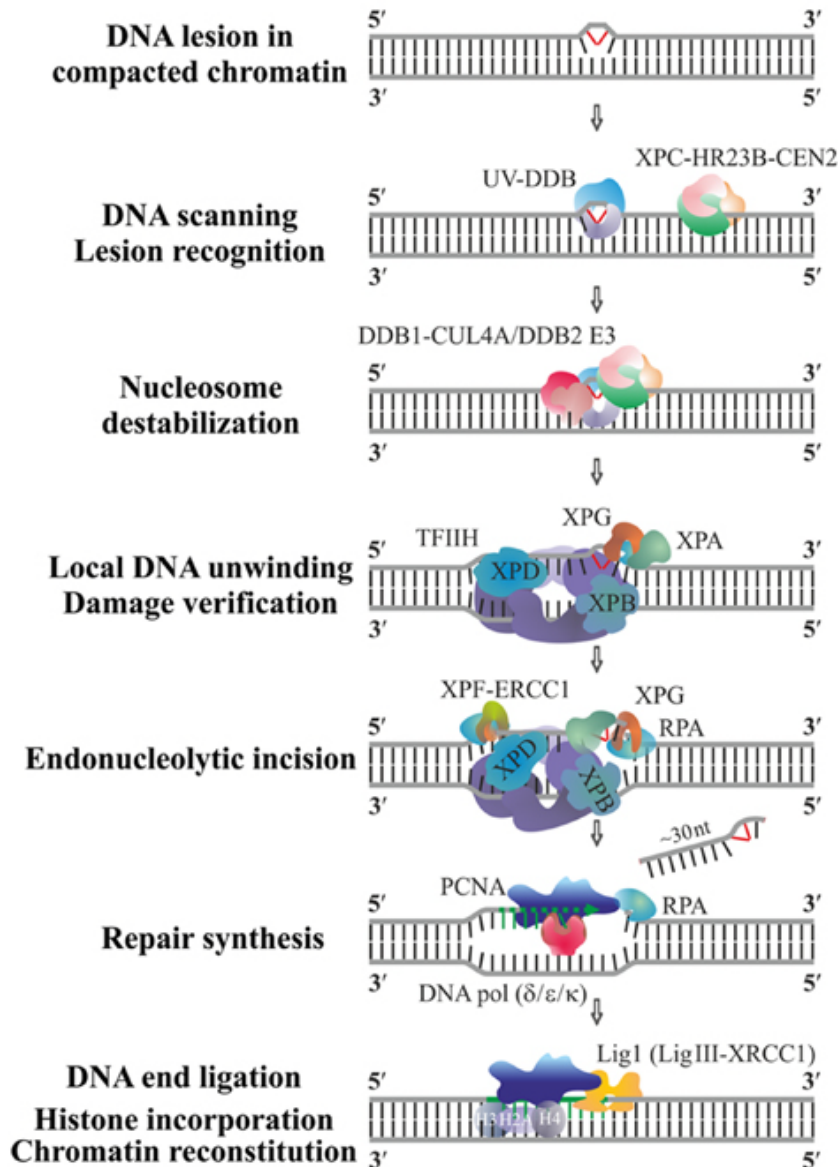
Повреждения ДНК могут вызвать остановку элонгирующей РНК-полимеразы

Если во время транскрипции осуществляющая ее РНК-полимераза II наталкивается на повреждение в ДНК, то связывается с белками **CSA** и **CSB**

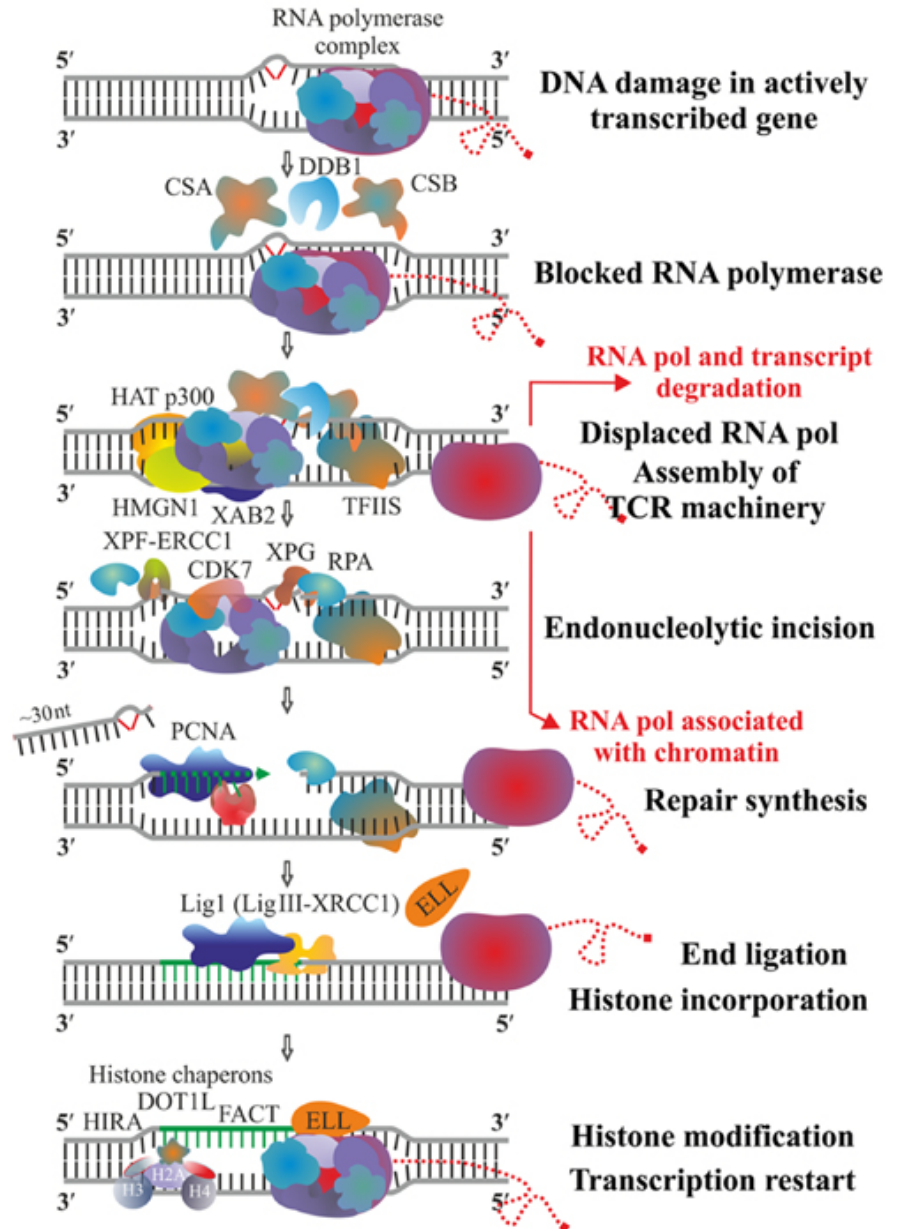
Ферменты NER узнают такой задержанный комплекс и процессируют его

NER

Global Genome Repair



Transcription-coupled Repair



Различия и сходство NER у про- и эукариот

Признак	Прокариоты	Эукариоты
Эксинуклеаза	<i>uvrA</i> , <i>uvrB</i> , <i>uvrC</i> и <i>uvrD</i>	16 белков
Размер удаляемого олигомера	12–13 нуклеотидов	27–29 нуклеотидов

Гены NER *E. coli* *uvrA*, *uvrB* и *uvrC* негомологичны соответствующим генам эукариот

