

# Курс молекулярной биологии

## Тема лекции

**Репарация ошибок репликации.  
Репарация двухцепочечных разрывов.  
Рекомбинационная репарация.  
SOS-репарация**

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

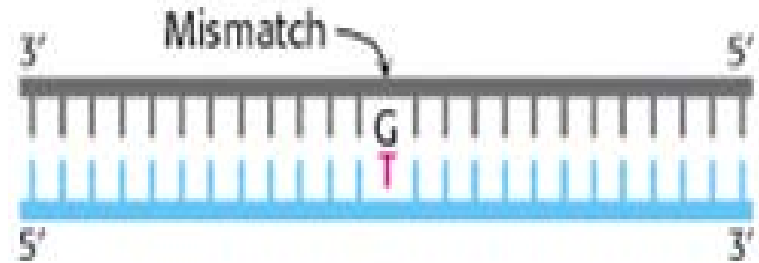
# Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR)

ДНК полимеразы (даже те, у которых есть корректирующая активность) все равно делают ошибки

**Система репарации ошибок репликации должна**

- Быстро находить ошибки
- Различать родительскую и новосинтезированную цепь с тем, чтобы в неспаренном участке заменить ошибочно включенный нуклеотид

# Главная проблема MMR



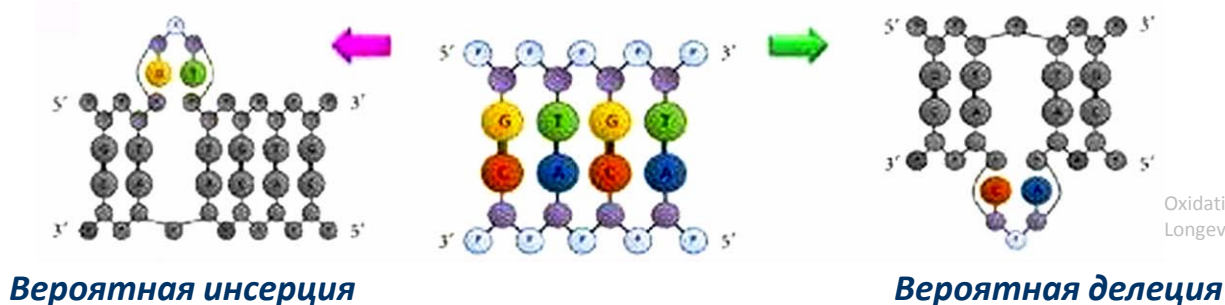
- ✓ Оба нуклеотида нормальные, но друг другу не соответствуют.
- ✓ Какой из них был в исходной ДНК, а какой был неверно включен в дочернюю цепь?

**Какой нуклеотид менять?**

# Mismatch repair (MMR)

## Сайты узнавания MMR

- все комбинации неспаренных оснований, **кроме C:C**
- короткие < 4 п.н. делеции и инсерции - «**инделы**»



Наиболее частые ошибки ДНК-полимераз узнаются особенно хорошо:

- ✓ неправильные пары **G:T** и **A:C**
- ✓ инсерции/делеции в 1 нуклеотид

# Прокариотическая система MMR

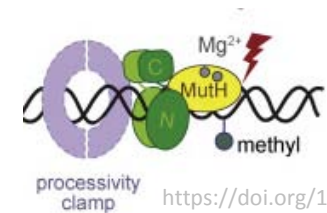
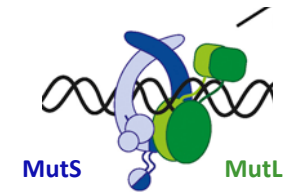
Система MMR задействует белковые продукты четырех генов: *mutS*, *mutL*, *mutH* и *uvrD* (*mutU*):

**MutS** - это ключевой белок системы MMR, обнаруживающий несовпадения в двухцепочечной ДНК, запускает механизм MMR

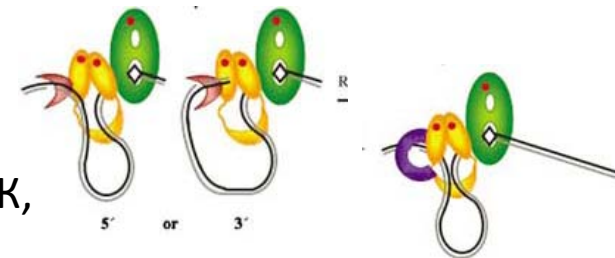
**MutL** действует как посредник между MutS и другими белковыми комплексами MMR. Взаимодействует с активированным гомодимером MutS и стимулирует эндонуклеазную активность белка MutH затем рекрутирует UvrD

**MutH** специфически расщепляет цепь ДНК, содержащую несовпадения, по гемиметилированным сайтам GATC и диссоциирует

**UvrD** - это ДНК-геликаза II, которая раскручивает ДНК, начиная с ника, созданного MutH



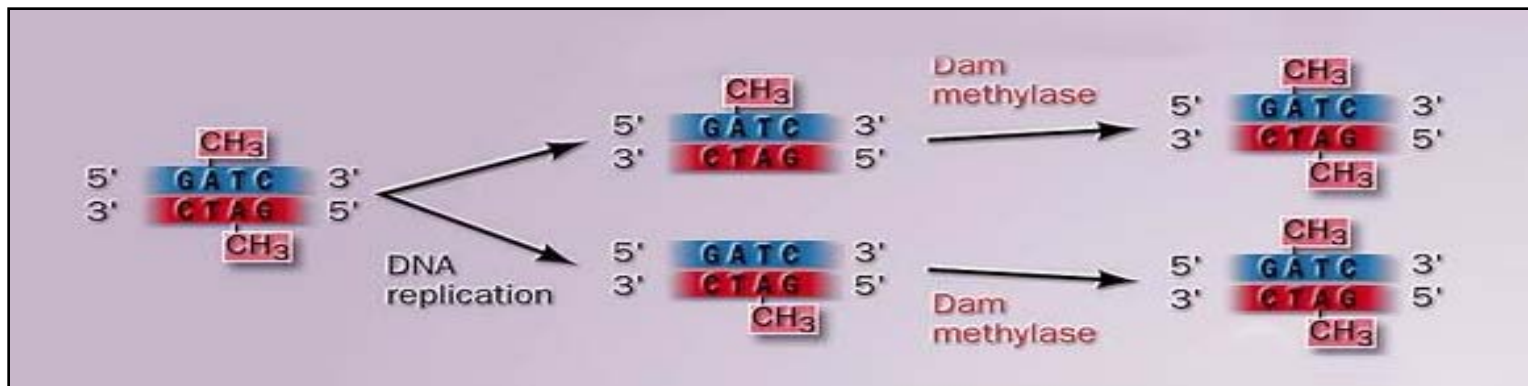
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.012>



MutS-MutL-UvrD-DNA complex

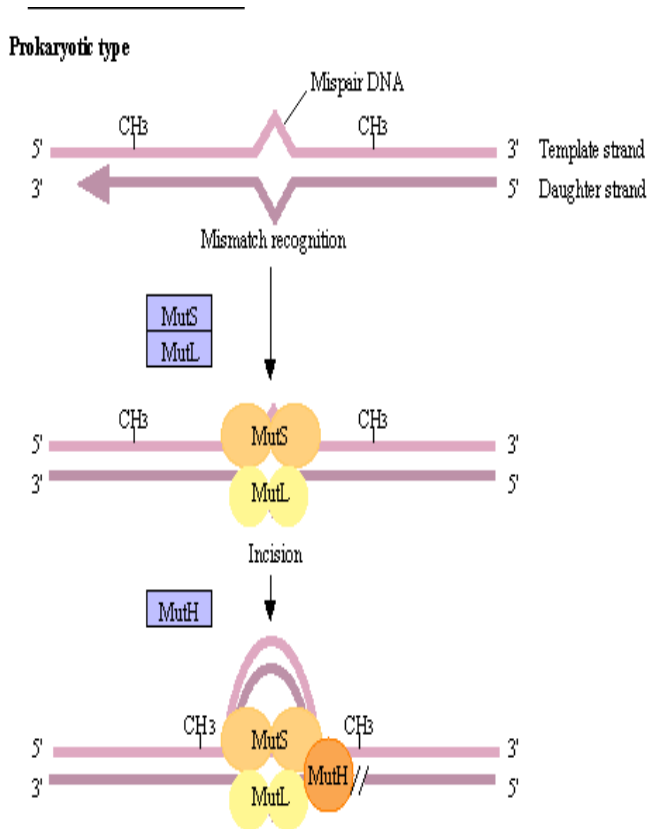
# Метилирование матричных цепей

- Обычно у *E. coli* ДНК метилирована Dam-метилазой по сайтам **GATC**.
- После завершения репликации вновь синтезированная дочерняя цепь ДНК некоторое время остается неметилированной.
- Система **MutHLS** избирательно репарирует неметилированную дочернюю цепь ДНК, тем самым значительно повышая точность репарации.



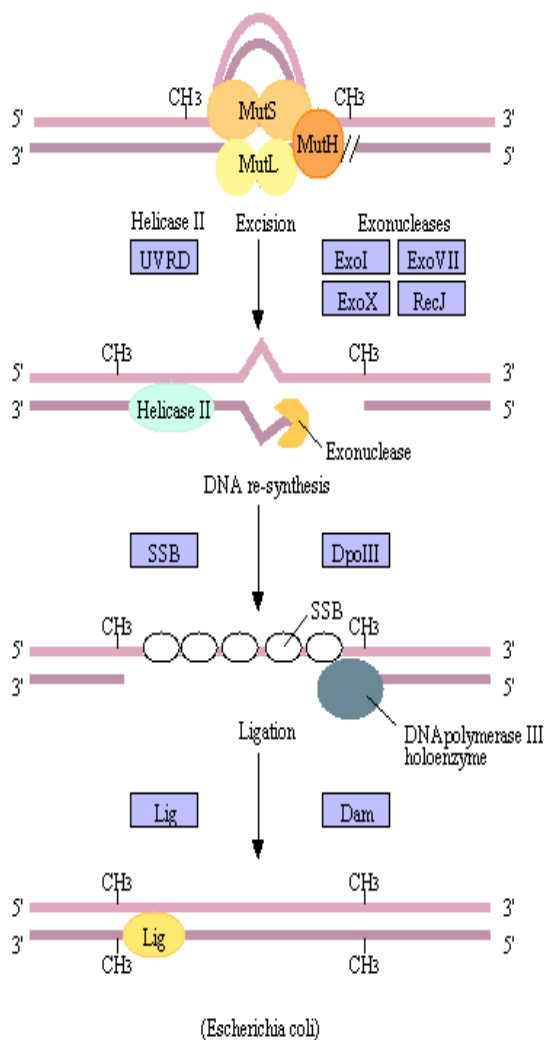
- Если сайты **GATC** полностью метилированы, **MutHLS**-система репарации *E. coli* изменяет ошибочно спаренные нуклеотиды в любой из цепей ДНК с одинаковой эффективностью.
- Использование **Dam**-метиلاзы для распознавания дочерней цепи реплицировавшейся ДНК является уникальным свойством грамотрицательных бактерий.
- У грамположительных бактерий не происходит метилирование цепей ДНК в целях маркировки.
- У человека механизм, различающий материнскую и дочернюю цепь основан на асимметричном связывании некоторых белков при репликации

# Этапы MMR



1. Белок **MutS** распознает повреждение и связывается с ошибочно спаренными нуклеотидами в виде гомодимера.
2. С каждым мономером **MutS** связывается белок **MutL**, не обнаруживающий ферментативной активности, но необходимый для присоединения и активации другого белка – **MutH**.
3. Белок **MutH** – эндонуклеаза, способная находить участок **GATC** и предпочтительно вносить одноцепочечный разрыв в неметилованную цепь вблизи аденина последовательности **GATC**.





4. После полной сборки комплекса **MutHLS**, активации **эндонуклеазной активности MutH** и внесения разрывов в GATC-сайты дочерней цепи, происходит **экзонуклеазное выщепление** участка поврежденной цепи от первичного разрыва до мисмэтча.

➤ *Надрезы могут быть внесены как с 5'-, так и с 3'-стороны относительно неправильно включенного в дочернюю цепь нуклеотида.*

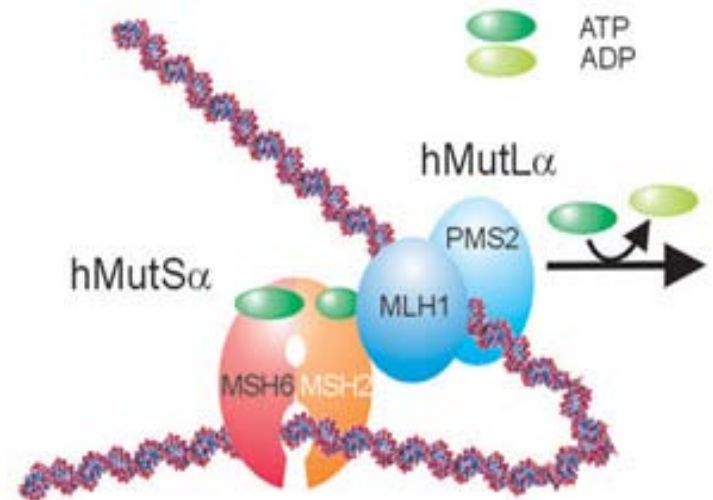
5. Затем в обоих случаях бреши должны быть застроены **ДНК-полимеразой**, а концы воссоединены с помощью **ДНК-лигазы**.

# В эукариотических клетках также существует система коррекции ошибок репликации

Обнаружены гомологи MutS и MutL; гомолога MutH не обнаружено

Гомологи MutS (**MSH** — MutS homolog) образуют два гетеродимерных комплекса

- MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ ) узнает неспаренные нуклеотиды и короткие «инделлы»
- MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ ) узнает длинные «инделлы»

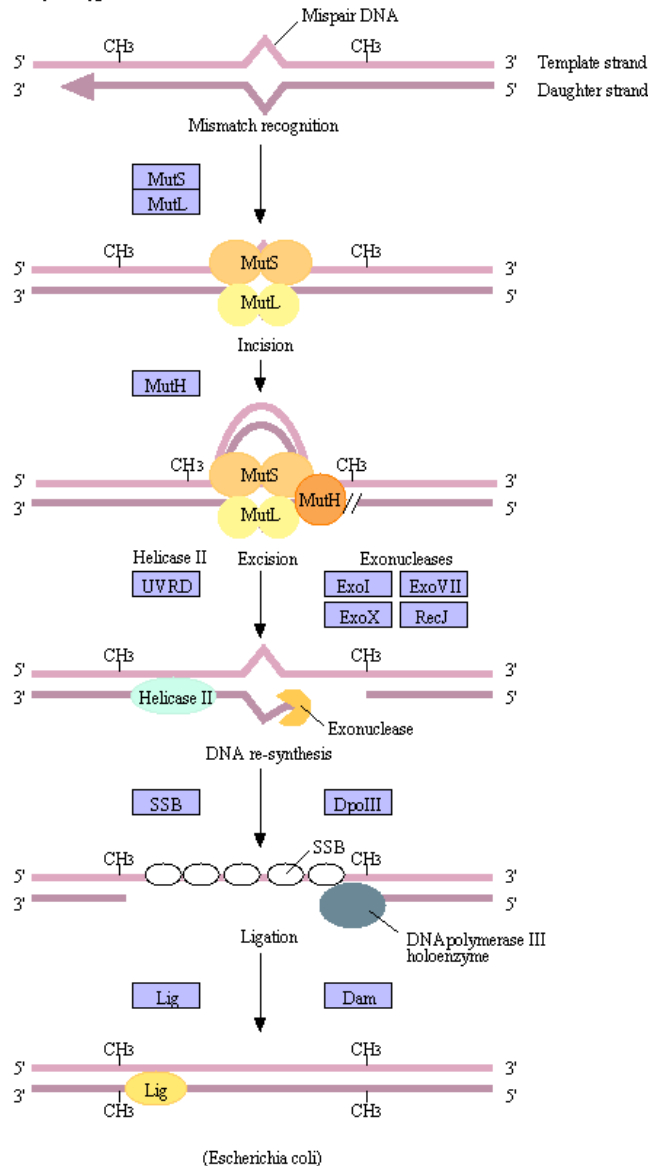


**MMR - это высококонсервативный биологический путь с сильным сходством между MMR человека и прототипом MMR *E. coli***

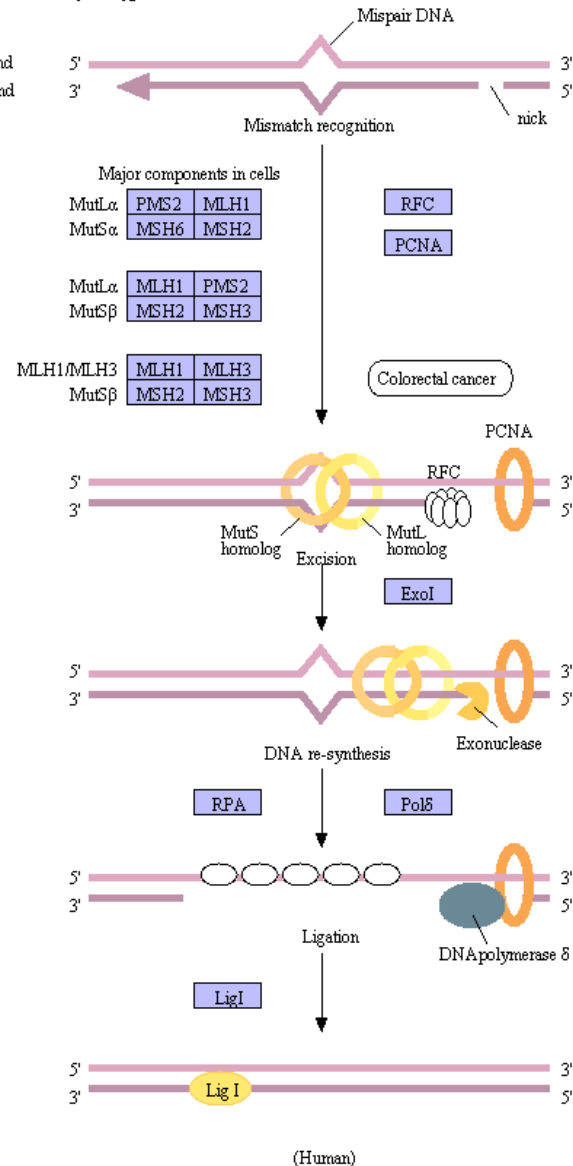
<i>E. coli</i>	Человек	Функции
(MutS) <sub>2</sub>	hMutS $\alpha$ (MSH2-MSH6) <sup>a</sup>	Распознавание несоответствий / повреждений ДНК
	hMutS $\beta$ (MSH2-MSH3)	
(MutL) <sub>2</sub>	hMutL $\alpha$ (MLH1-PMS2) <sup>a</sup>	Молекулярный координатор; эндонуклеаза, терминация mismatch-опосредованной эксцизии
	hMutL $\beta$ (MLH1-PMS1)	
	hMutL $\gamma$ (MLH1-MLH3)	
MutH	? <sup>b</sup>	Дискриминация цепей ДНК
UvrD	? <sup>b</sup>	ДНК-геликаза
ExoI, ExoVII, ExoX, RecJ	ExoI	эксцизия
Pol III holoenzyme	Pol $\delta$	Синтез ДНК
	PCNA	Инициация MMR, синтез ДНК
SSB	RPA	Защита ssDNA; стимуляция и терминация вырезания ДНК, stimulating mismatch excision; termination of DNA excision; продвижение ресинтеза ДНК
	HMG1	Mismatch-опосредованная эксцизия
	RFC	Загрузка PCNA; 3' nick-направленная репарация; активация MutL $\alpha$ эндонуклеазы
DNA Ligase	DNA ligase I	Лигирование ника

# Различия ММР у про- и эукариот

## Prokaryotic type



## Eukaryotic type

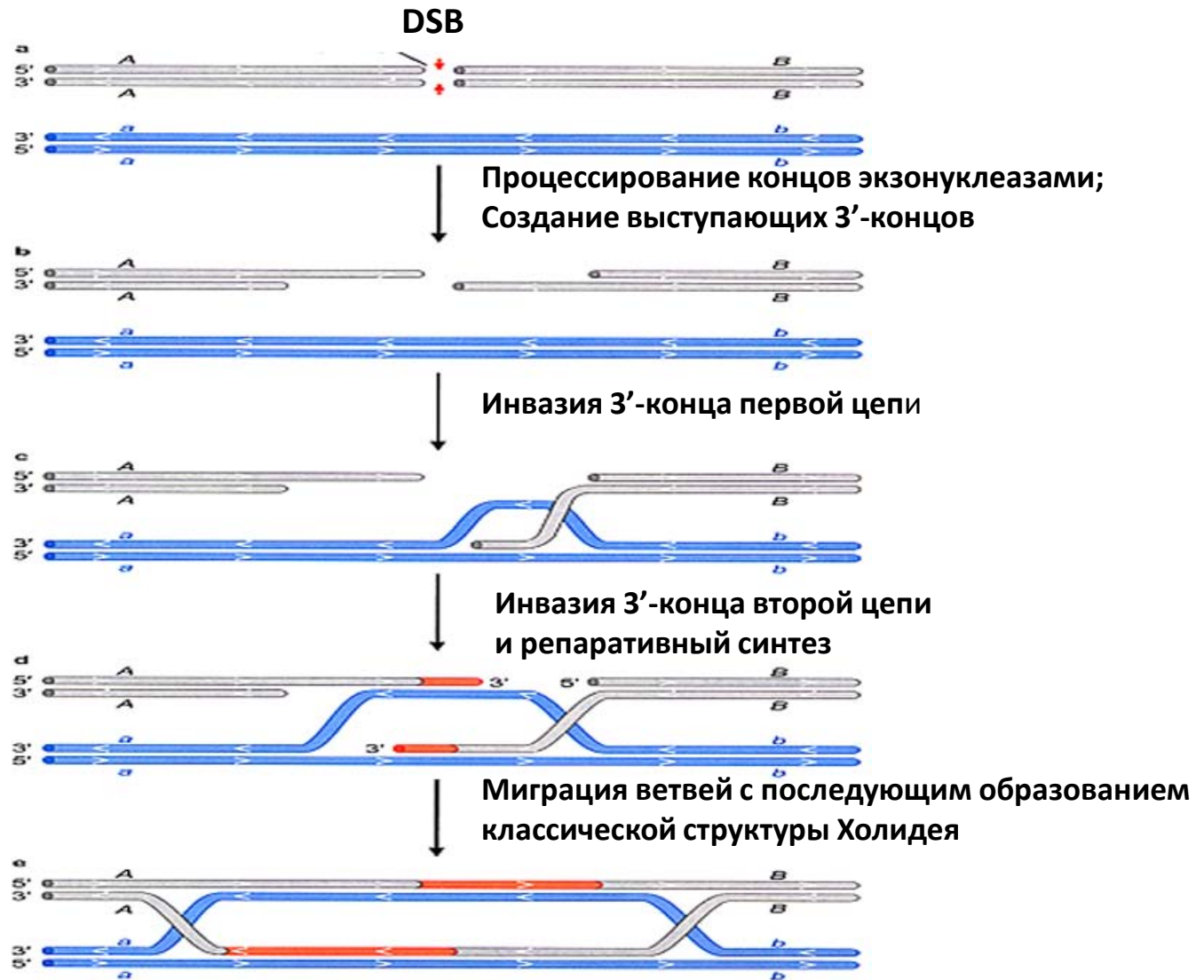


# Репарация двуцепочечных разрывов

основные пути репарации двунитевых разрывов:

- *гомологичная рекомбинация – HR*
- *негомологичное соединение концов ДНК - NHEJ (Non-Homologous End Joining)*
- *отжиг гомологичных однонитевых участков - SSA*

# Репарация двунитевого разрыва посредством гомологичной рекомбинации



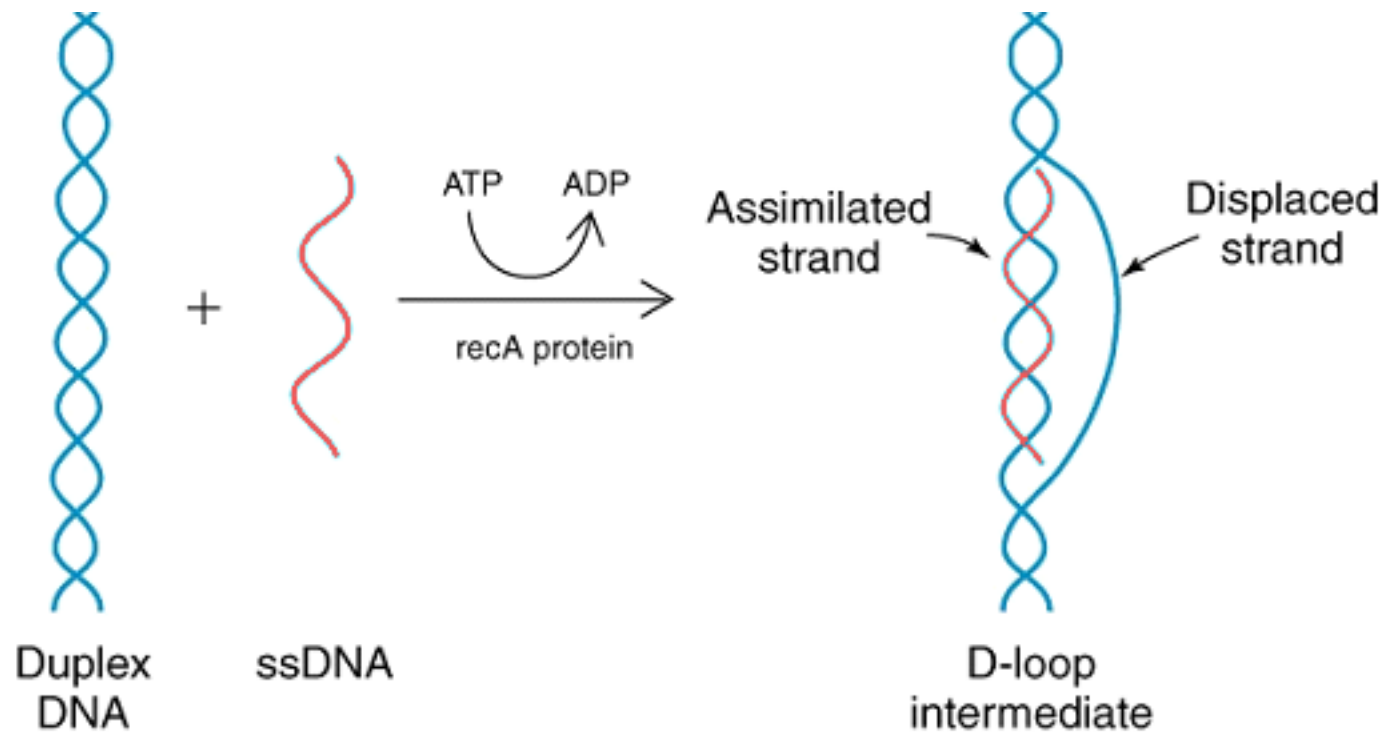
## **Для репарации двунитевых разрывов путем гомологичной рекомбинации необходимы:**

- **Донор гомологии**

(например гомологичная хромосома или сестринская хроматида)

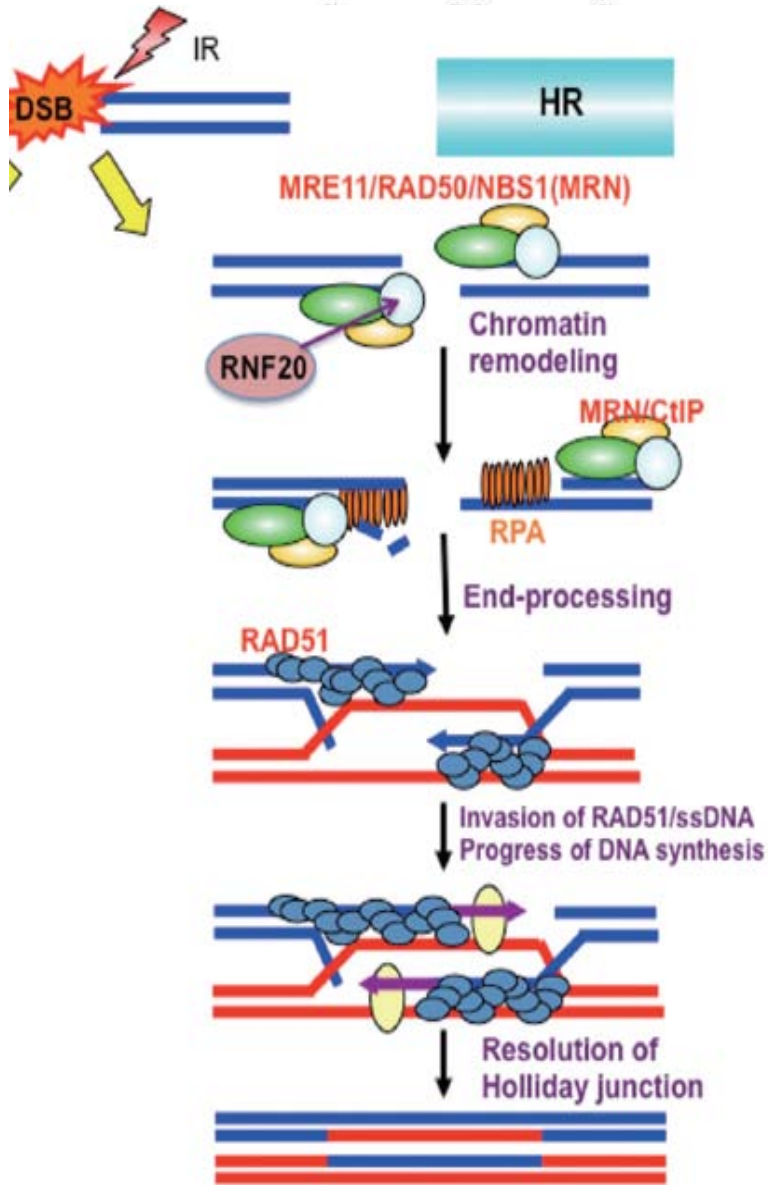
- **Белок, облегчающий инвазию цепи**
- **Другие компоненты системы гомологичной рекомбинации**

У *E. coli* ключевым компонентом системы гомологичной рекомбинации является белок **RecA**, который связывается с однонитевой ДНК и обеспечивает ее инвазию в двойную спираль с образованием D-петли





# HR репарация двунитевых разрывов у эукариот



Комплекс **MRN** имеет 3'-5'-экзонуклеазную активность

В эукариотических клетках гомологом **recA** является **Rad51**

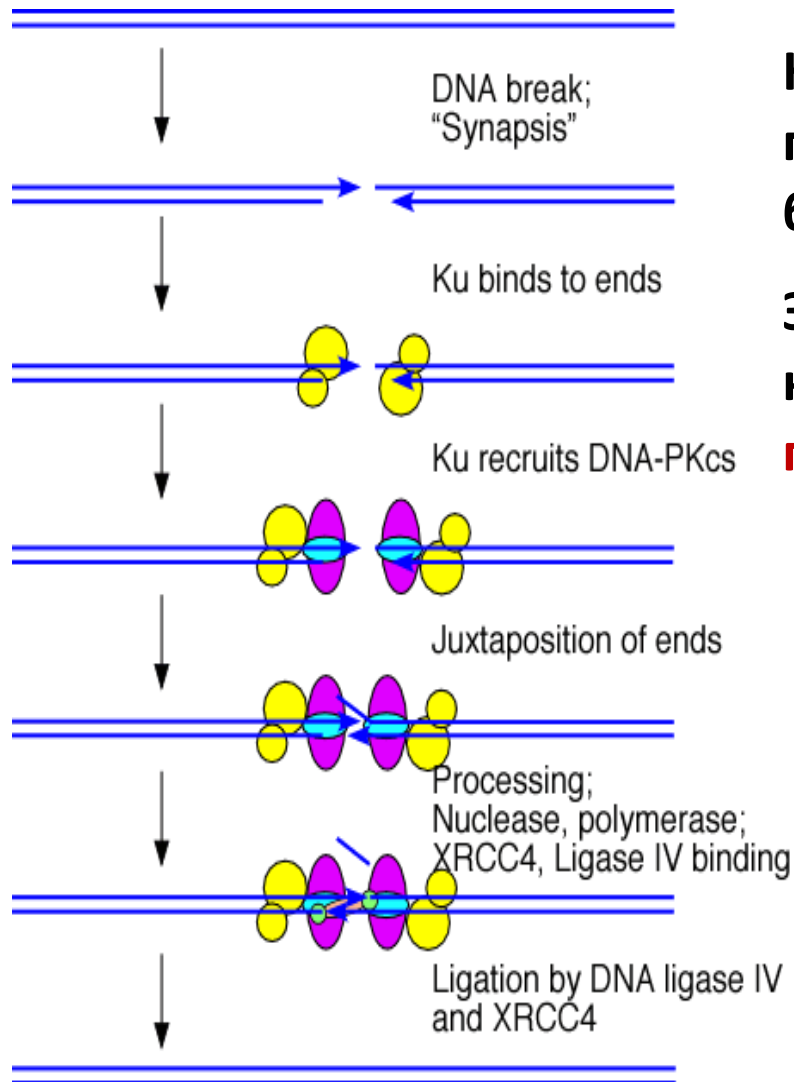
**RPA** - гомолог **SSB**-белка

Покрытая **Rad51** однонитевая ДНК внедряется в гомологичный участок сестринской хроматиды с образованием D петли

3'-конец внедрившейся цепи достраивается ДНК-полимеразой и отжигается с комплементарной цепью исходного дуплекса

Бреши застраиваются и однонитевые разрывы лигируются

# Репарация двуниевых разрывов путем нехомологичной рекомбинации



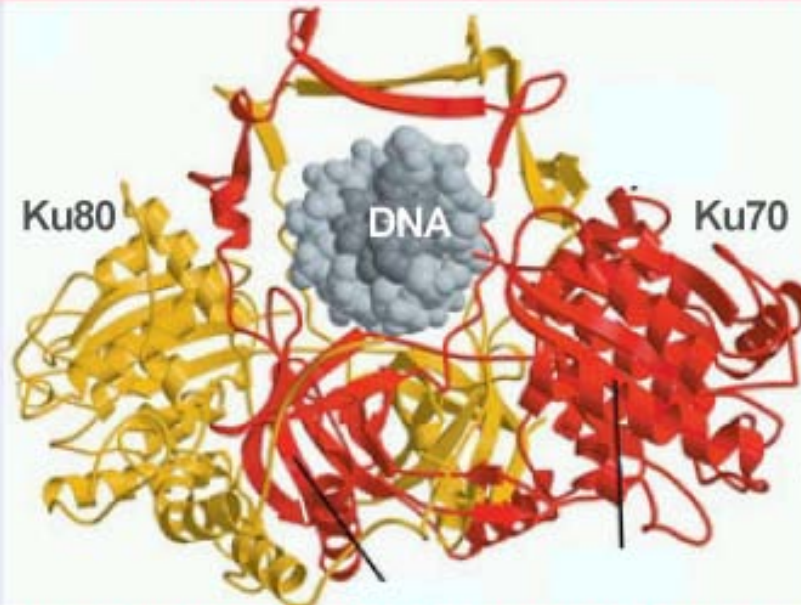
К месту разрыва подходит гетеродимер **Ku**, состоящий из белков Ku70 и Ku80

Затем присоединяется каталитическая субъединица протеинкиназы **DNA-PKcs**

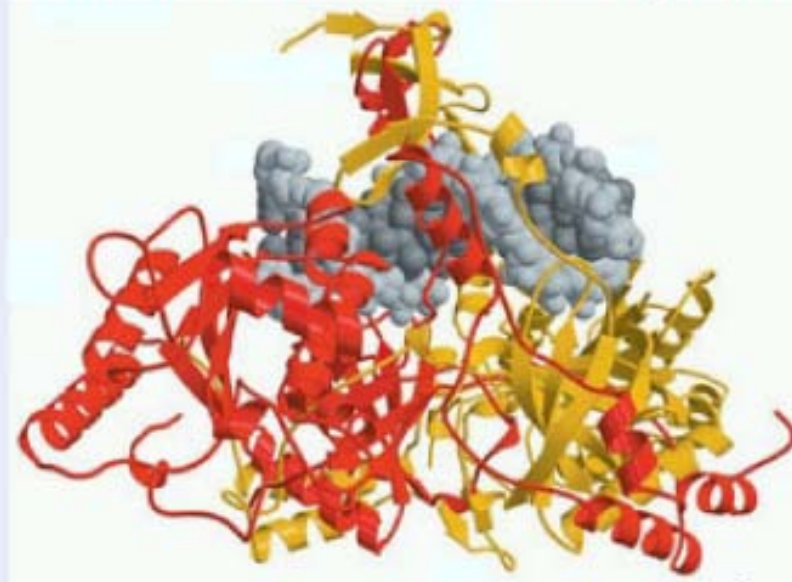
Полимераза **Pol  $\mu$**  образует комплекс с XRCC4/LigIV и застраивает брешь

**XRCC4**, взаимодействуя с **лигазой IV**, усиливает ее ферментативную активность

Ku surrounds DNA seen in cross section

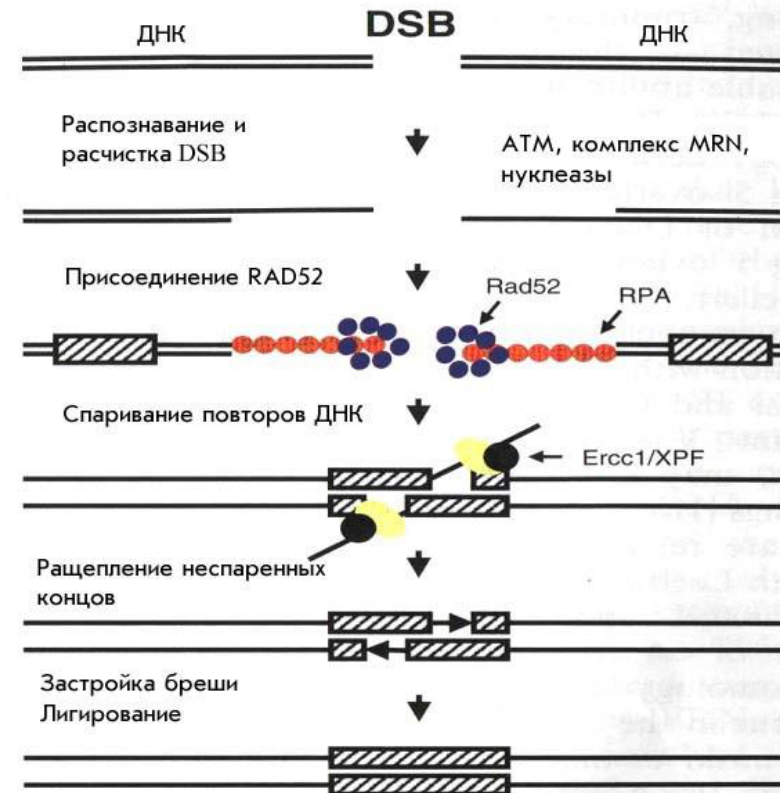


Ku extends for 2 helical turns along DNA



# SSA (single strand annealing) репарация двунитевого разрыва по прямым повторам

- Формирование нуклеазой или геликазой однонитевых выступающих концов на двунитевом разрыве ДНК
- Отжиг гомологических последовательностей на открытых нитях
- Обрезание «лишних» концов
- Лигирование



# Типы репарации двухцепочечных разрывов ДНК

Гомологичная  
рекомбинация  
(**HR**)

11 белков группы Rad52 у дрожжей (и гомологи у человека).

Происходит в поздней S и G2 фазе у млекопитающих

**Последовательность восстанавливается.**

Отжиг гомологичных  
однонитевых  
участков (**SSA**)

Использование гомологичных повторов по разные стороны от разрыва.

**Часть ДНК утрачивается**

Негомологичное  
соединение концов  
(**NHEJ**)

Происходит в G1 и ранней S фазе у млекопитающих.

**Последовательность не восстанавливается**

# Метод ДНК-комет («DNA-comet assay»)

Метод предложен Ostling и Johansson в 1984 г.

Позволяет определять степень повреждений и эффективность репарации ДНК в отдельных неделящихся ядродержащих клетках

## Принцип метода ДНК-комет

1. Иммуобилизация клеток в агарозном геле
2. Лизис клеточных мембран
3. Электрофорез



При наличии разрывов ДНК нарушается структурная организация хроматина и утрачивается сверхспирализация ДНК, что приводит к релаксации ДНК, формируются фрагменты ДНК, не связанные с клеткой

## Детекция разрывов ДНК

- однонитевых – э/ф в щелочной (денатурирующей) среде
- двунитевых – э/ф в нейтральной среде

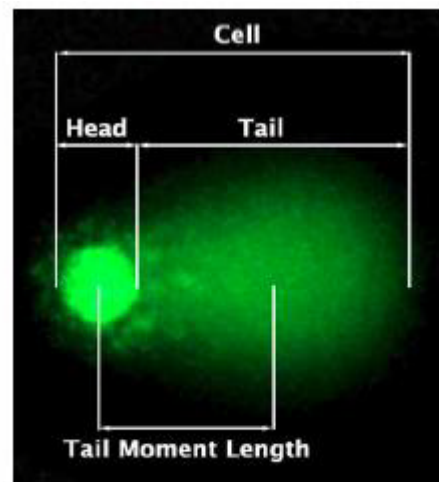
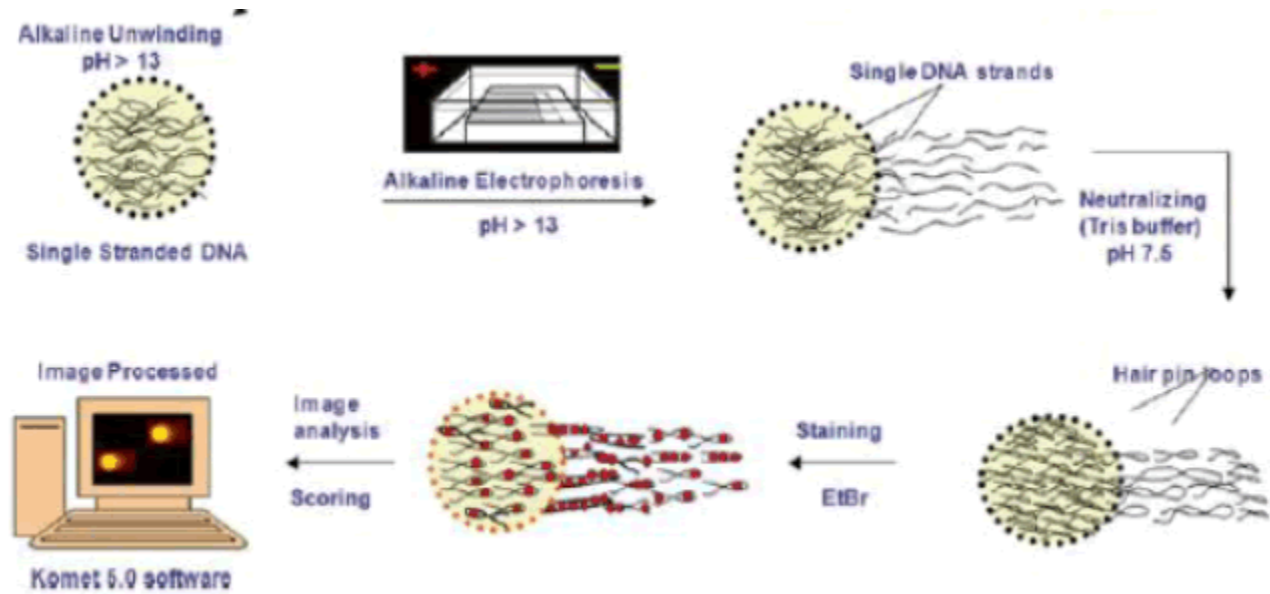
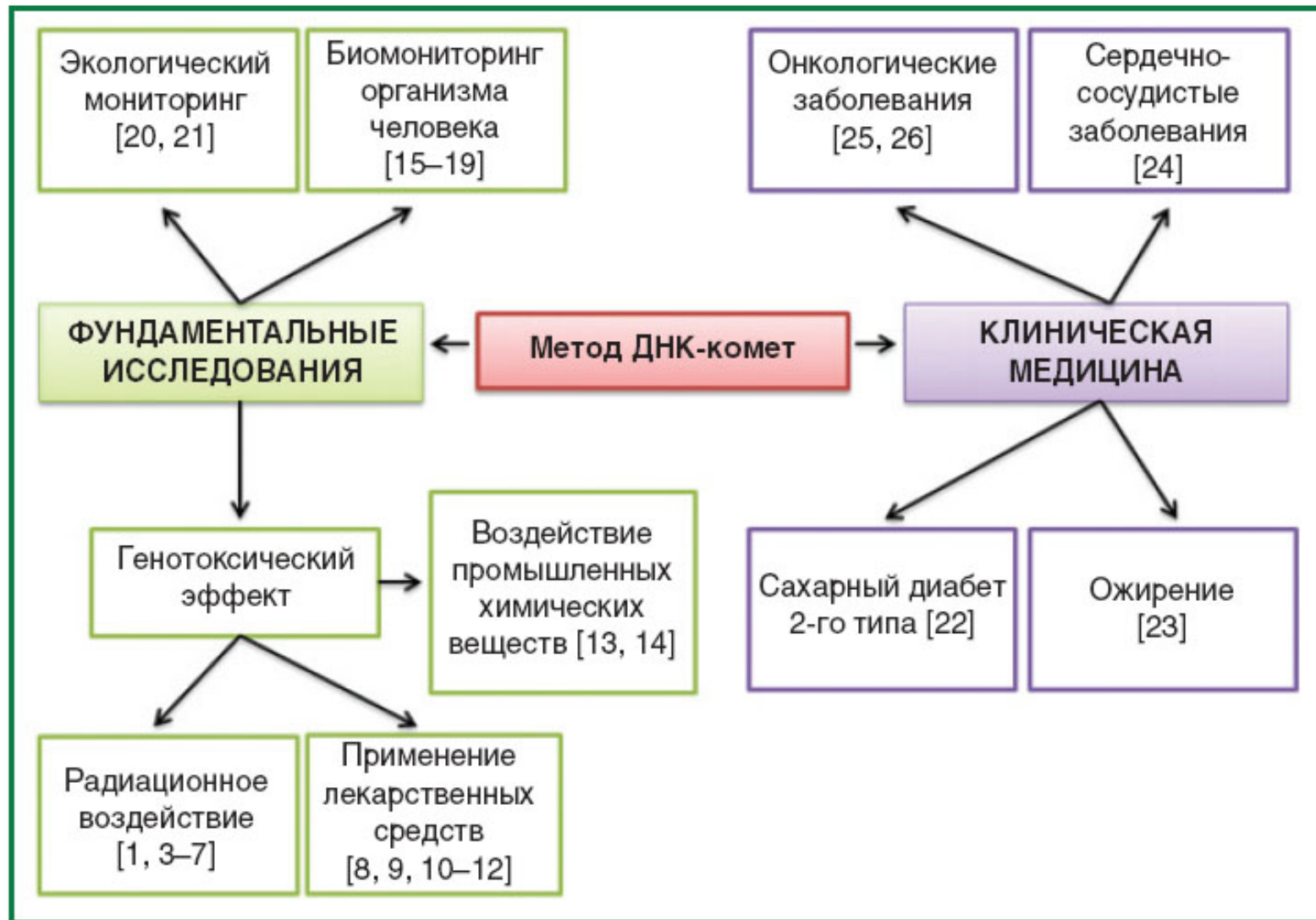


Figure 3: Typical Damaged DNA in Comet Assay.

# Применение метода ДНК-комет в биомедицинских исследованиях





## **Пострепликативная (рекомбинационная репарация)**

**Пострепликативная репарация происходит в случаях**

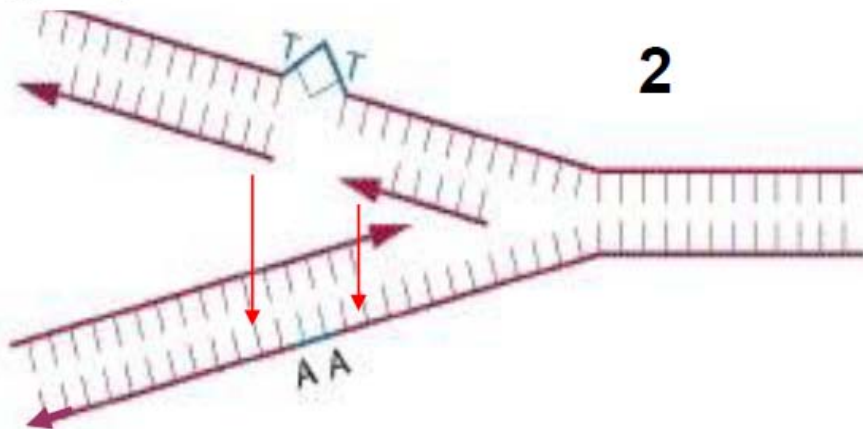
- в ДНК к началу репликации остались повреждения, не устраненные эксцизионной репарацией**
- повреждены гены, контролирующие синтез ферментов, участвующих в эксцизионной репарации.**

**В результате после репликации такой ДНК в дочерней цепи на месте повреждений материнской нити, образуются «бреши».**

Повреждение возникает в ДНК еще до начала репликации



ДНК-полимераза обходит тиминный димер

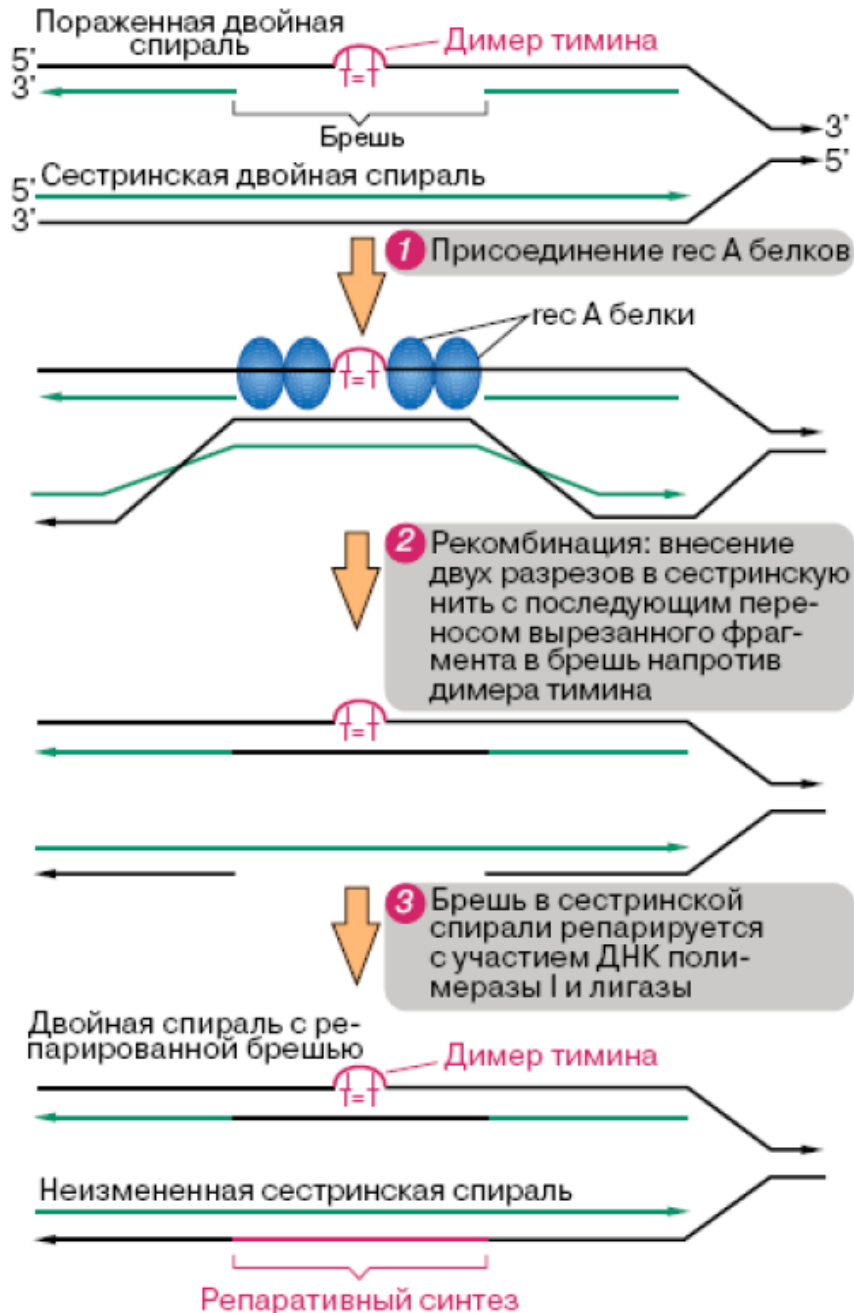


Пострепликативная (рекомбинационная репарация) происходит при участии белков **RecA**

- Основная функция белка **RecA** в клетке бактерий – это участие в процессах гомологичной рекомбинации, пострепликативной и SOS-репарации
- Белок **RecA** имеет два сайта связывания с молекулой ДНК:
  - 1 - для связывания с ssDNA
  - 2 - для связывания с dsDNA

- Ген **recA** входит в состав **SOS-регулона** и имеет собственные промотор и терминатор.
- В нормальных условиях экспрессия **recA** приводит к образованию от 1000 до 10 000 мономеров белка **RecA** на клетку.
- При повреждении ДНК количество молекул возрастает в 50 раз

# Пострепликативная (рекомбинационная репарация)



дуплекс с поврежденным  
основанием и протяженной  
одноцепочечной брешью в  
комплементарной цепи

# SOS-репарация

- **Существование этой системы впервые постулировал М. Радман в 1974 г. Он же дал название этому механизму, включив в него международный сигнал бедствия "SOS" (... --- ... «спасите наши души»).**
- **Эта система включается тогда, когда повреждений в ДНК становится настолько много, что угрожает жизни клетки.**

*SOS-ответ – скоординированная индукция целого ряда генов, которая происходит при повреждении ДНК такими агентами, как УФ-излучение, перекись водорода и др.*

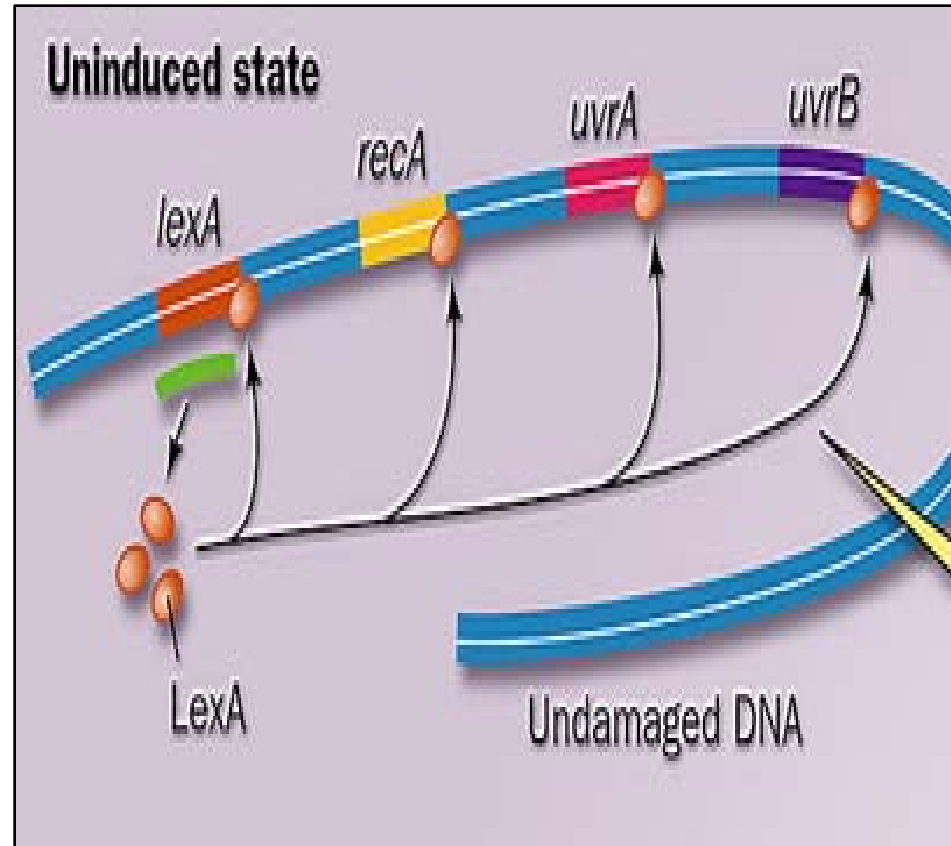
**В индукции SOS-ответа важную роль играют**

- **продукты генов *lexA* и *recA***
- **наличие однонитевых участков в ДНК (*ssDNA*)**

## Lex A (репрессор)

Регулятор транскрипции генов, кодирующих белки, участвующие в репарации повреждений ДНК

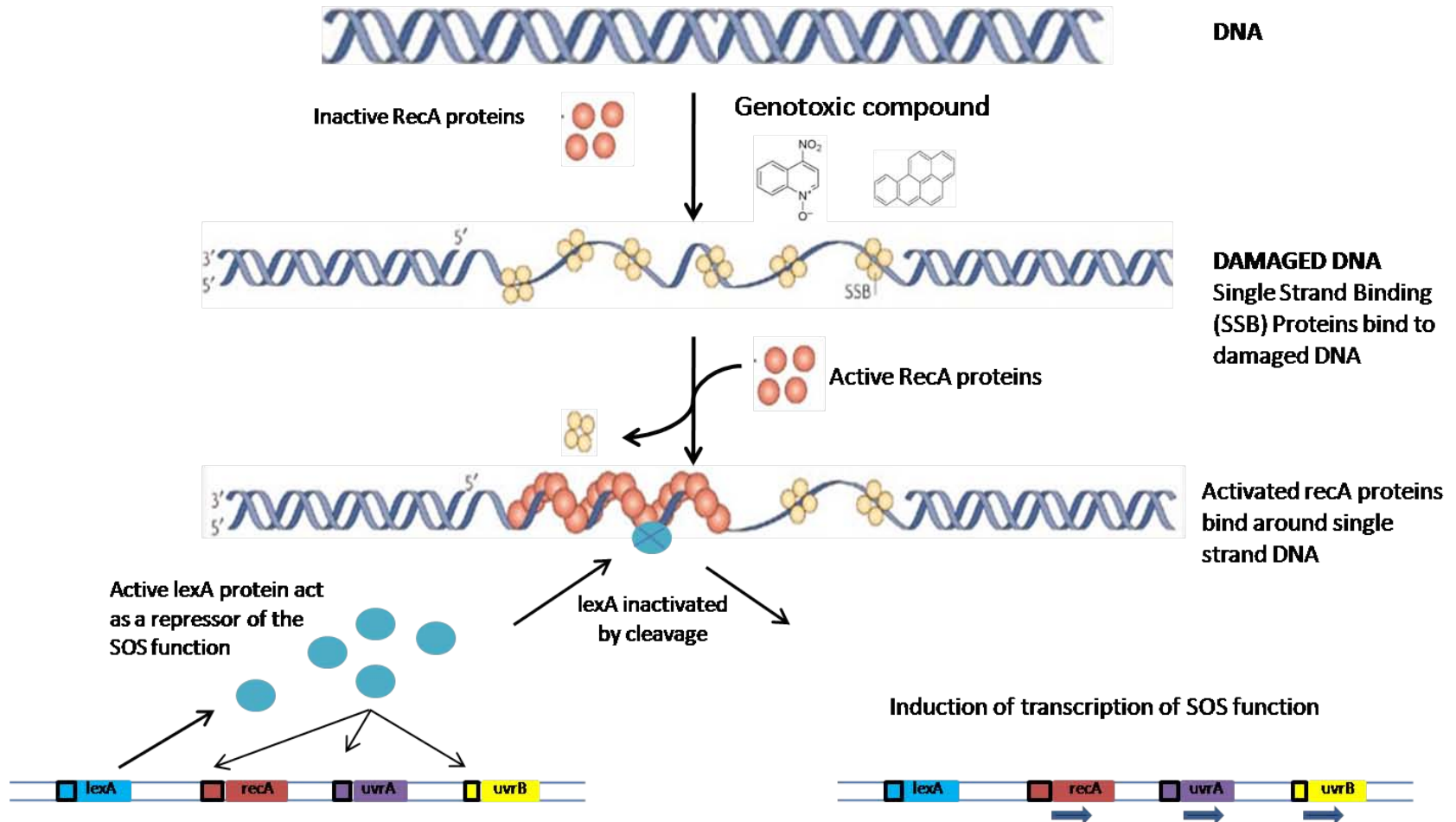
Димеры Lex A связываются с SOS боксами (20 п.н. консенсусы) в операторах генов репарации и ингибируют транскрипцию





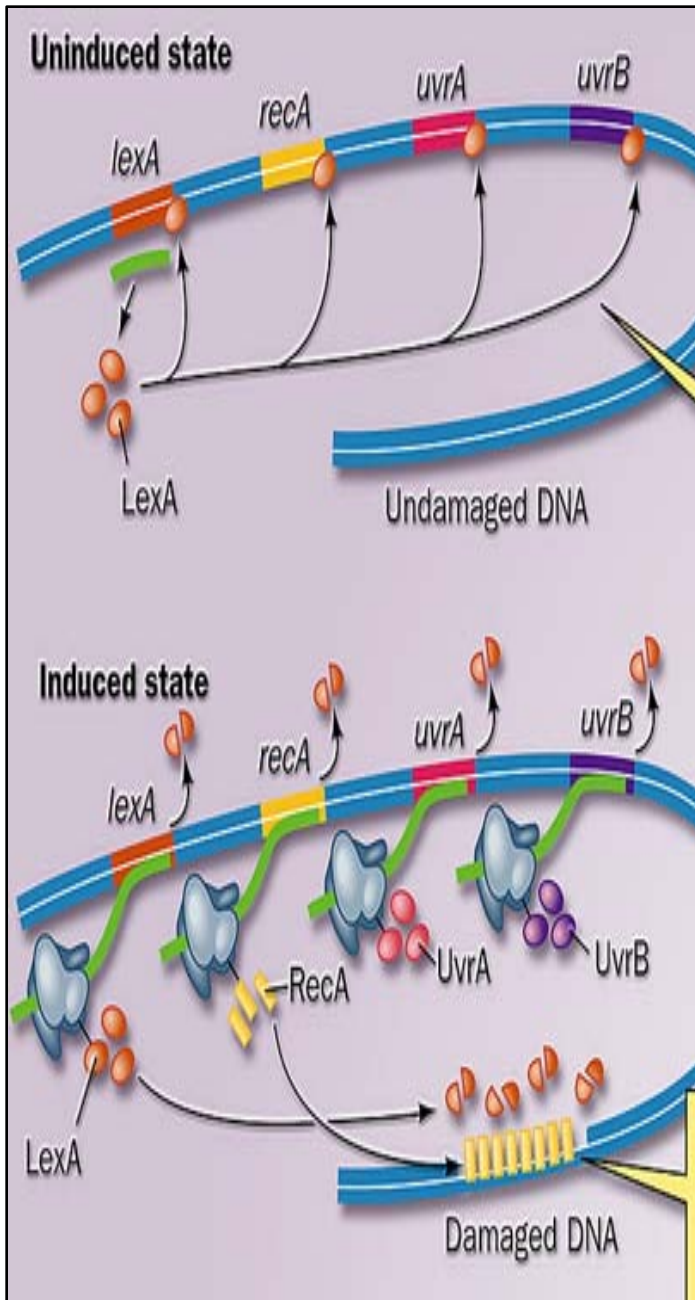
# Rec A

Связывается с однонитевой ДНК и образует ДНК-белковые филаменты



Однонитевые участки ДНК образуются при остановке репликативных вилок

# Индукция SOS-ответа



- Повреждение ДНК и временная остановка репликации ведет к накоплению ssDNA
- RecA в присутствии АТФ формирует филаменты с ssDNA и приобретает копротеазную активность
- Сформировавшиеся нуклеопротеиновые филаменты RecA/ssDNA активируют способность репрессора LexA к аутопротеолизу
- Концентрация интактного репрессора при обширном повреждении ДНК падает в 10 раз в течение нескольких минут

# Регуляция индукции SOS-ответа

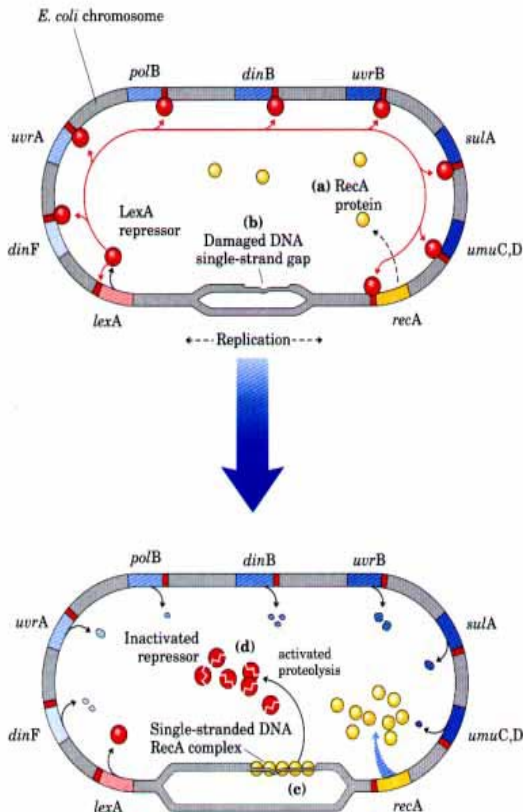
**SOS-гены, образующие SOS-регулон, экспрессируются не все сразу:**

- **LexA имеет к разным генам SOS-регулона неодинаковое сродство (афинность)**
- **Гены, индукция которых необходима только в конце SOS-ответа, имеют по два SOS-бокса**

***SOS-бокс -***

***последовательность нуклеотидов, выполняющая функции оператора у E.coli, с которым взаимодействует репрессор LexA***

# Гены *E. coli*, индуцируемые во время SOS-ответа



Гены	Продукт гена/функция
<b>Экспрессирующиеся первыми</b>	
<i>lexA</i>	LexA/SOS-репрессор
<i>uvrA</i> , <i>uvrB</i>	UvrABC-экзонуклеаза/ эксцизионная репарация
<i>uvrD</i>	Хеликаза II/ эксцизионная и рекомбинационная репарация
<i>polB</i>	ДНК-полимераза II/ синтез ДНК, склонный к ошибкам
<b>Экспрессирующиеся вторыми</b>	
<i>recA</i>	RecA-копротеаза/SOS-дерепрессор, рекомбинационная репарация
<b>Экспрессирующиеся последними</b>	
<i>sulA</i>	SulA/ингибитор деления клетки
<i>umuD</i> <i>umuC</i>	Субъединица UmuD'C/ синтез ДНК, склонный к ошибкам

# Регуляция индукции SOS-ответа

- При снижении концентрации Lex A сначала активируются, гены, контролируемые операторами, в состав которых входят низкоафинные Lex A боксы

**lexA, uvrA, uvrB, uvrD и recA**

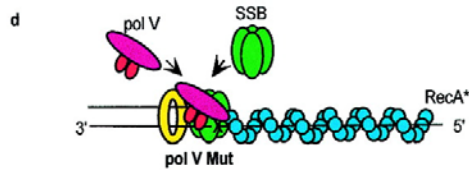
- При дальнейшем снижении уровня Lex A активируются гены, обеспечивающие осуществление репарации с ошибками

**UmuDC оперон**

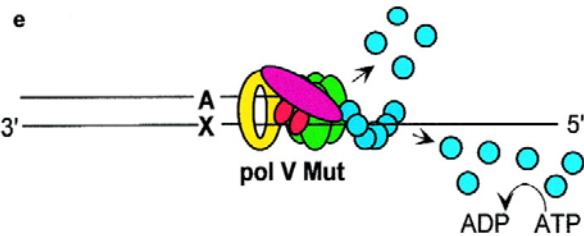
«Ступенчатая» индукция членов SOS-регулона позволяет клеткам с минимальными повреждениями в первую очередь индуцировать системы *безошибочной* репарации - *эксцизионной и рекомбинационной* , *не включая другие, потенциально склонные к ошибкам репарационные пути.*

# Механизм SOS-ответа

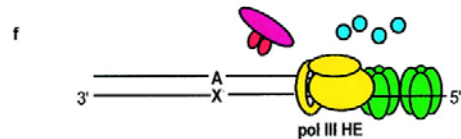
- Белок UmuD подвергается автопротеолитическому расщеплению с образованием активного фрагмента UmuD'
- UmuD' активирует черезблочную полимеразу UmuC
- Образуется комплекс (UmuD')<sub>2</sub>UmuC
- Комплекс (UmuD')<sub>2</sub>UmuC, который изменяет свойства холофермента ДНК полимеразы III таким образом, что она начинает игнорировать повреждения в матричной ДНК, вставляя в дочернюю нить **случайные нуклеотиды**
- Комплекс **(UmuD')<sub>2</sub>UmuC/полимераза III** называют **ДНК полимеразой V** - эта полимеразы осуществляет репликацию через AP сайты, тимидиновые димеры и ряд других повреждений



- Pol V связывается со свободным праймером. Для эффективного связывания необходим контакт с Rec A и с бета-зажимом



- Pol V начинает синтез ДНК, одновременно вытесняя RecA filament



- После удаления всего филамента Rec A Pol V диссоциирует, освобождая место для Pol III.

- Таким образом, *время работы Pol V определяется временем существования Rec A филамента.*
- Pol V успевает включить несколько нуклеотидов.
- Напротив тимидинового димера TT чаще всего включается GA



*У E. coli, помимо ДНК-полимераз I и III существует три дополнительные полимеразы, потенциально обеспечивающие мутагенез*

<b>Полимеразы II и IV</b>	<b>ранние этапы SOS-ответа</b>	<b>обеспечивают синтез ДНК, склонный к ошибкам, и восстановление разрушенной ДНК в репликативной вилке</b>
<b>Полимераза V</b>	<b>работает в конце SOS- репарации</b>	<b>Осуществляет SOS- мутагенез</b>

## **SOS-мутагенез**

**Индукция SOS-ответа приводит к  
существенному увеличению частоты  
мутаций**