

Курс молекулярной биологии

Тема лекции

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

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

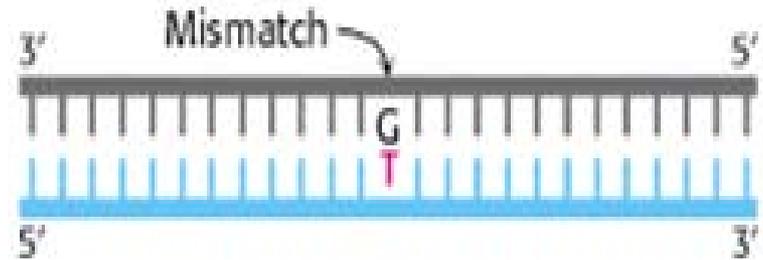
Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR)

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



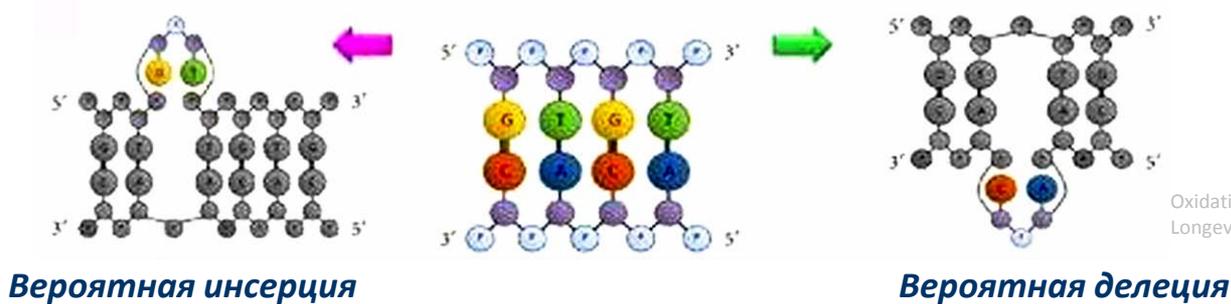
- ✓ Оба нуклеотида нормальные, но друг другу не соответствуют.
- ✓ Какой из них был в исходной ДНК, а какой был неверно включен в дочернюю цепь?

Какой нуклеотид менять?

Mismatch repair (MMR)

Сайты узнавания MMR

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



Наиболее частые ошибки ДНК-полимераз узнаются особенно хорошо:

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

Прокариотическая система MMR

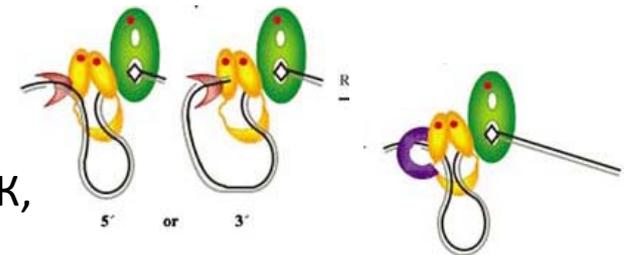
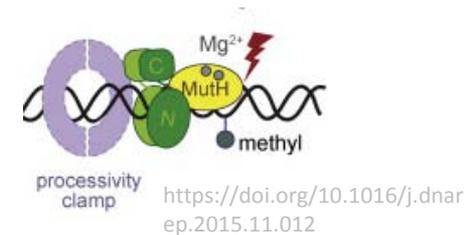
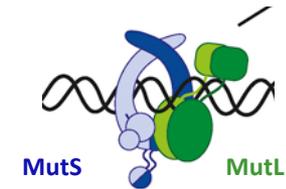
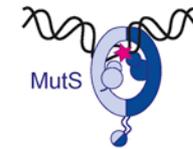
Система MMR задействует белковые продукты четырех генов: *mutS*, *mutL*, *mutH* и *uvrD* (*mutU*):

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

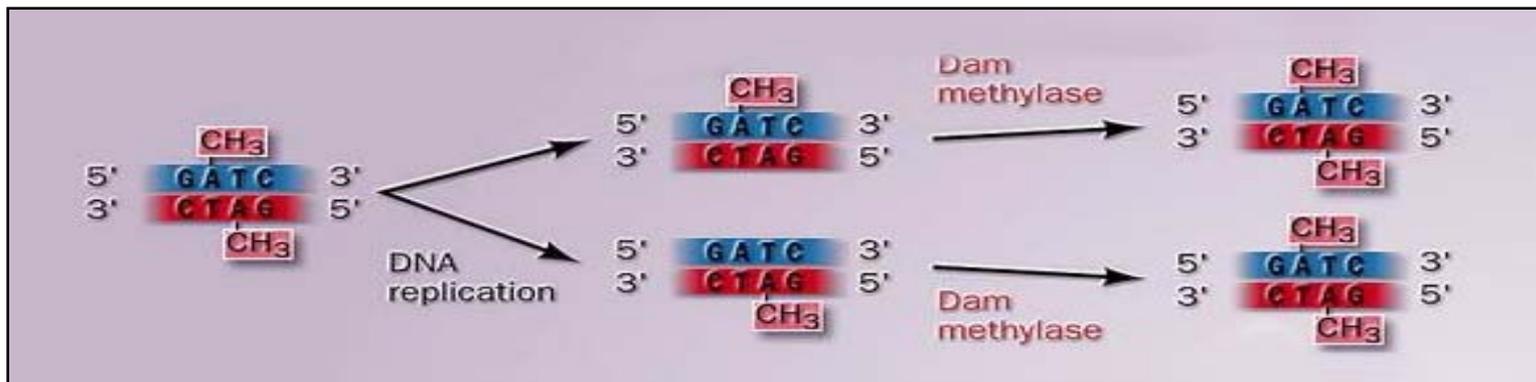
UvrD - это ДНК-геликаза II, которая раскручивает ДНК, начиная с ника, созданного MutH



MutS-MutL-UvrD-DNA complex

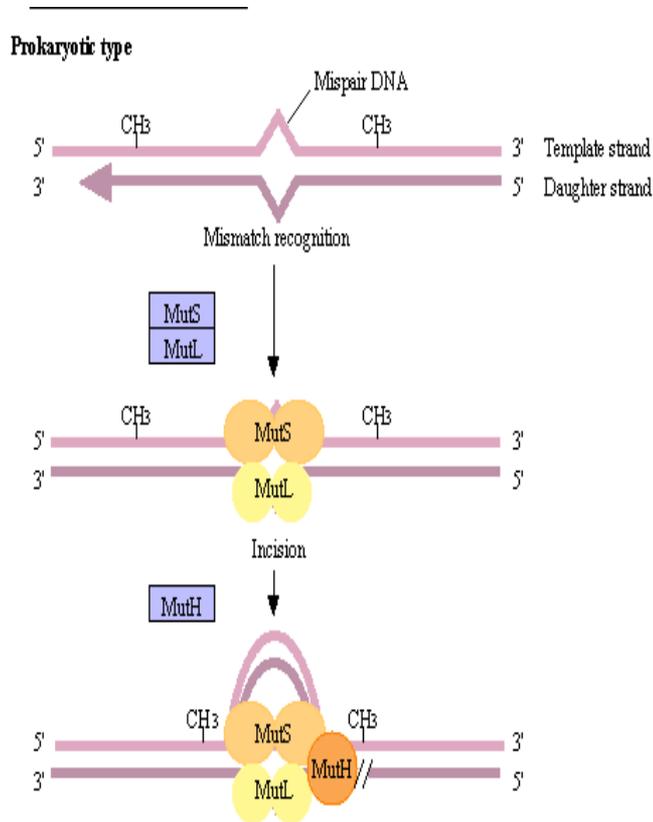
Метилирование матричных цепей

- 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.

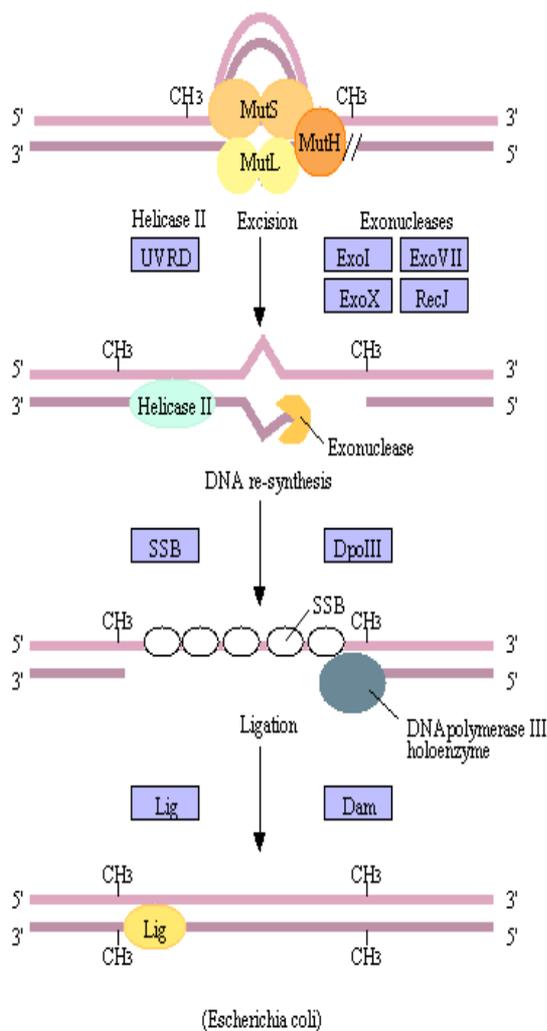


- Если сайты **GATC** полностью метилированы, **MutHLS**-система репарации *E. coli* изменяет ошибочно спаренные нуклеотиды в любой из цепей ДНК с одинаковой эффективностью.
- Использование **Dam**-метиلاзы для распознавания дочерней цепи реплицировавшейся ДНК является уникальным свойством грамотрицательных 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 неметилированную 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.*

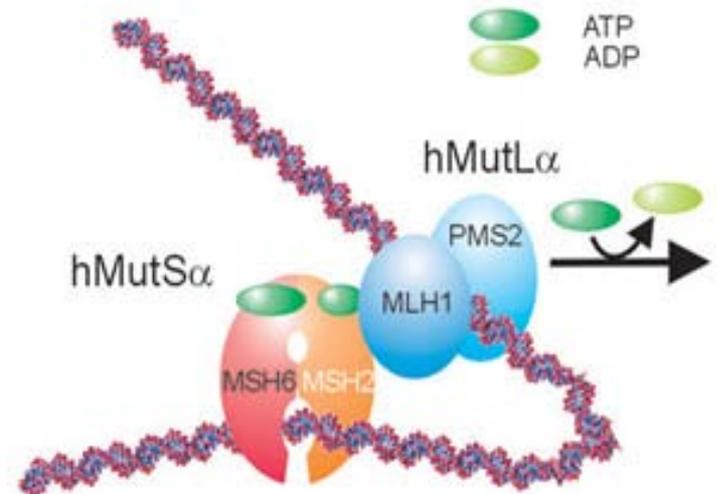
5. Затем в обоих случаях бреши должны быть застроены **ДНК-полимеразой**, а концы воссоединены с помощью **ДНК-лигазы**.

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 α) узнает неспаренные нуклеотиды и короткие «инделлы»
- MSH2-MSH3 (MutS β) узнает длинные «инделлы»

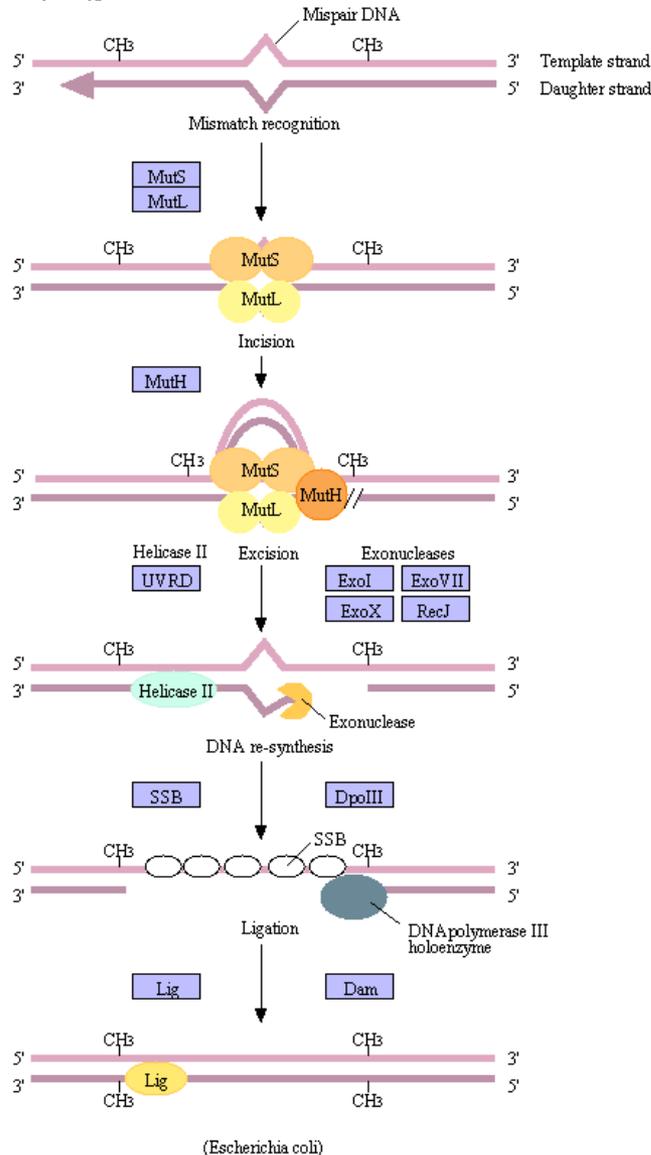


MMR - это высококонсервативный биологический путь с сильным сходством между MMR человека и прототипом MMR *E. coli*

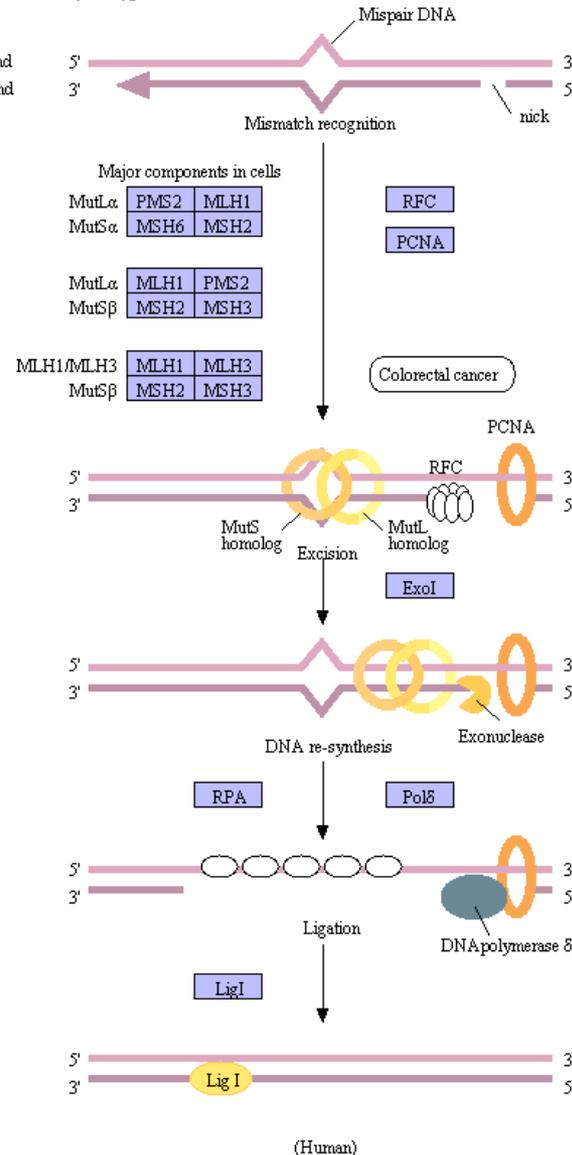
<i>E. coli</i>	Человек	Функции
(MutS) ₂	hMutSα (MSH2-MSH6) ^a	Распознавание несоответствий / повреждений ДНК
	hMutSβ (MSH2-MSH3)	
(MutL) ₂	hMutLα (MLH1-PMS2) ^a	Молекулярный координатор; эндонуклеаза, терминация mismatch-опосредованной эксцизии
	hMutLβ (MLH1-PMS1)	
	hMutLy (MLH1-MLH3)	
MutH	γ ^b	Дискриминация цепей ДНК
UvrD	γ ^b	ДНК-геликаза
ExoI, ExoVII, ExoX, RecJ	ExoI	эксцизия
Pol III holoenzyme	Pol δ	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 MutLα эндонуклеазы
DNA Ligase	DNA ligase I	Лигирование ника

Различия ММР у про- и эукариот

Prokaryotic type



Eukaryotic type

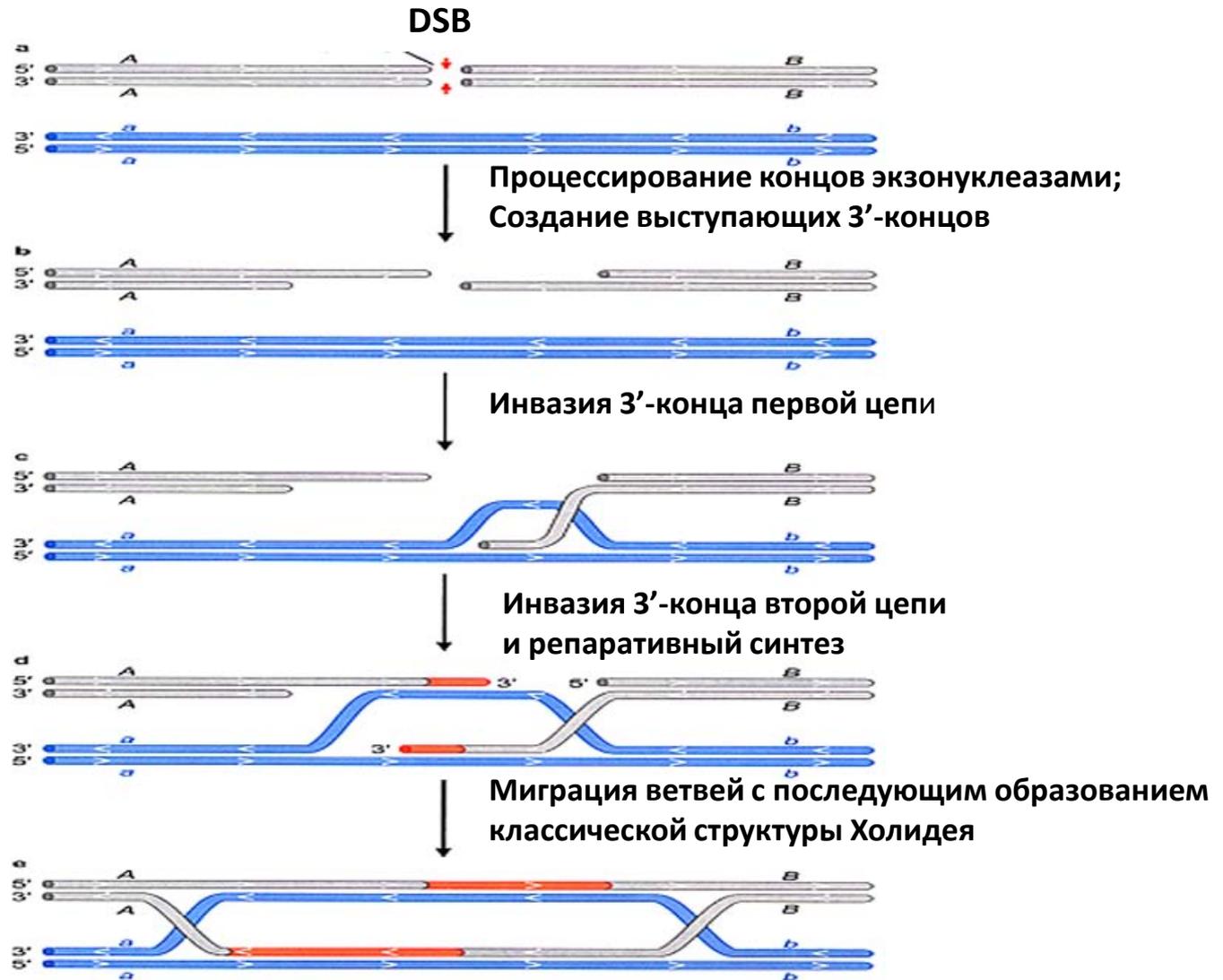


Репарация двуцепочечных разрывов

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



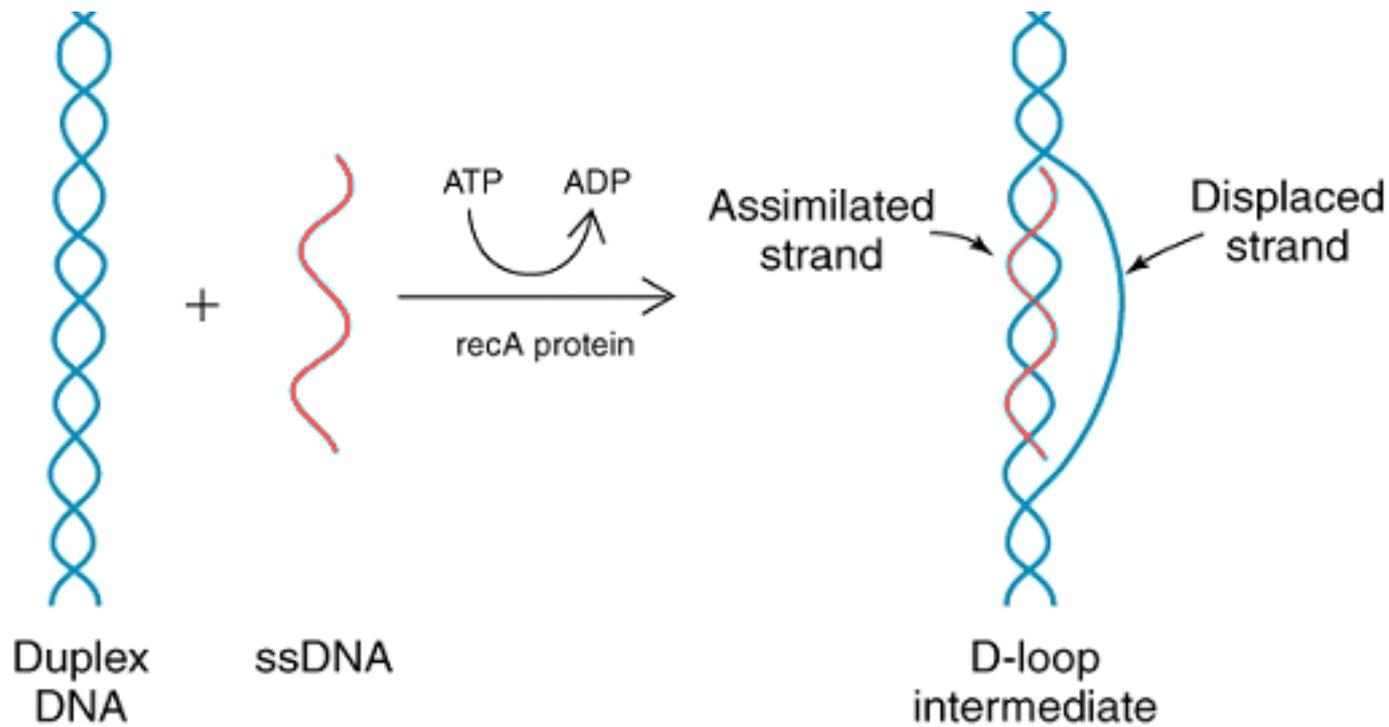
Для репарации двунитевых разрывов путем гомологичной рекомбинации необходимы:

- **Донор гомологии**

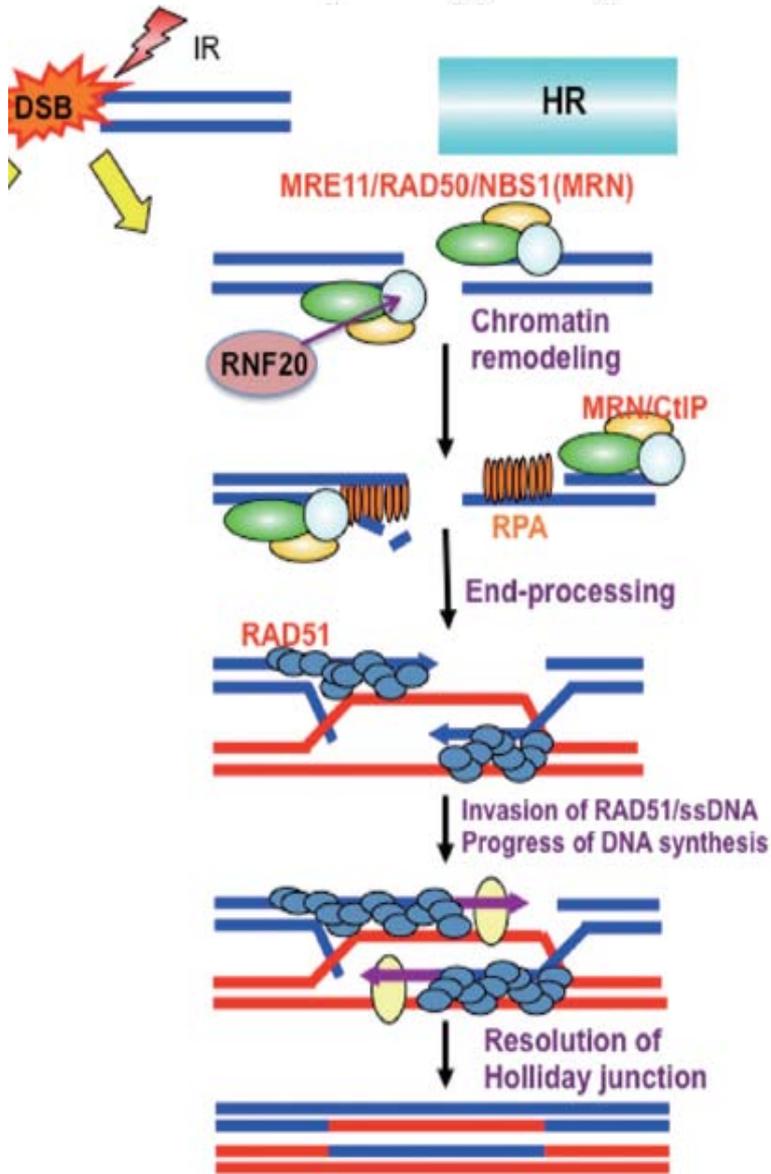
(например гомологичная хромосома или сестринская хроматида)

- **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**

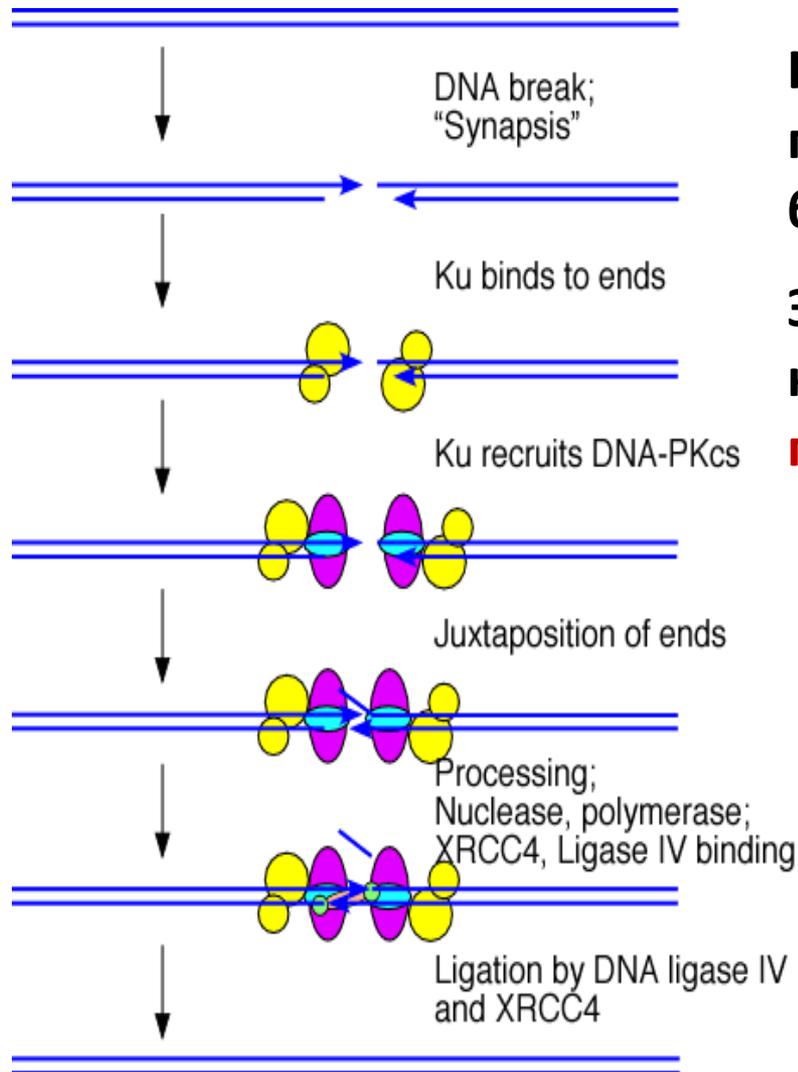
RPA - гомолог **SSB**-белка

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



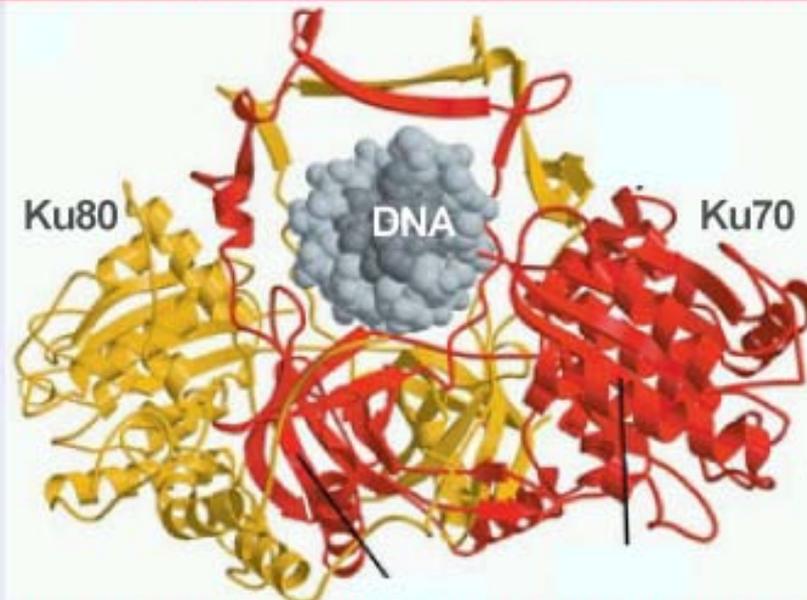
К месту разрыва подходит гетеродимер **Ku**, состоящий из белков Ku70 и Ku80

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

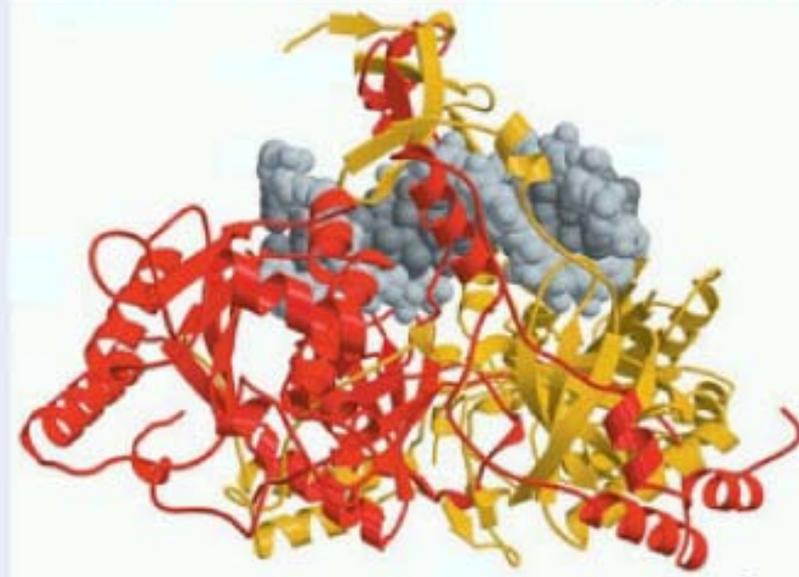
Полимераза **Pol μ** образует комплекс с XRCC4/LigIV и застраивает брешь

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

Ku surrounds DNA seen in cross section

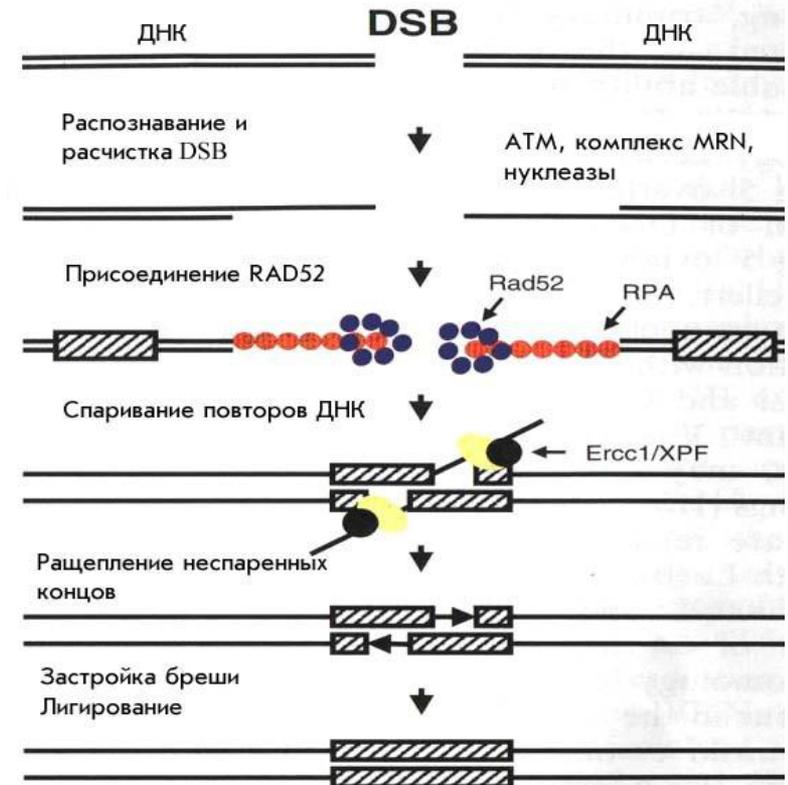


Ku extends for 2 helical turns along DNA



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

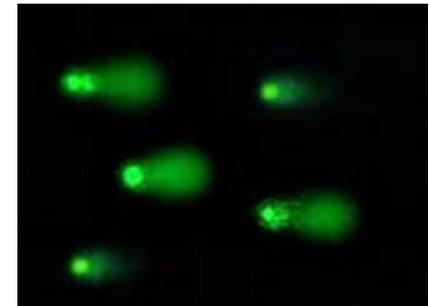
Метод ДНК-комет («DNA-comet assay»)

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

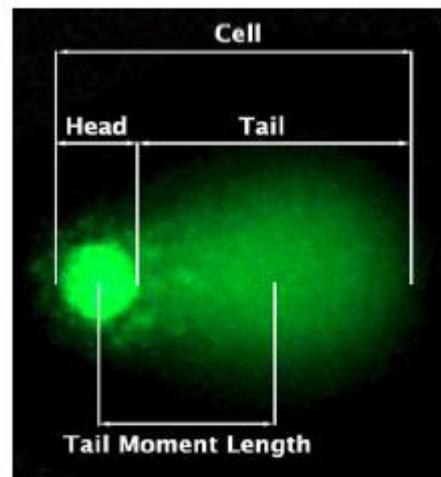
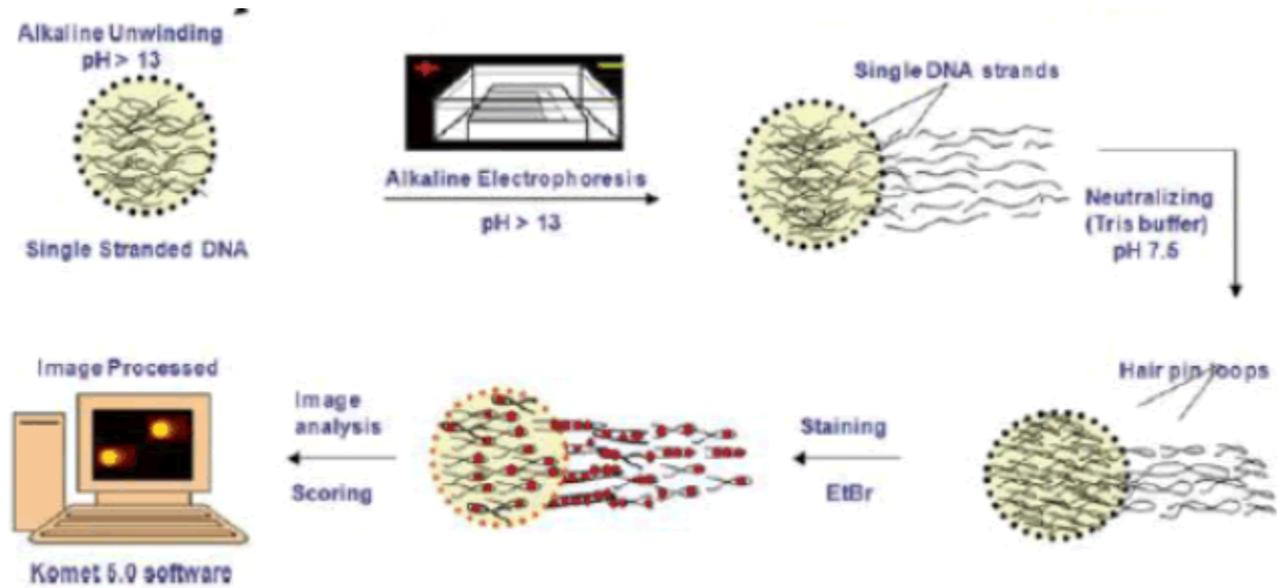
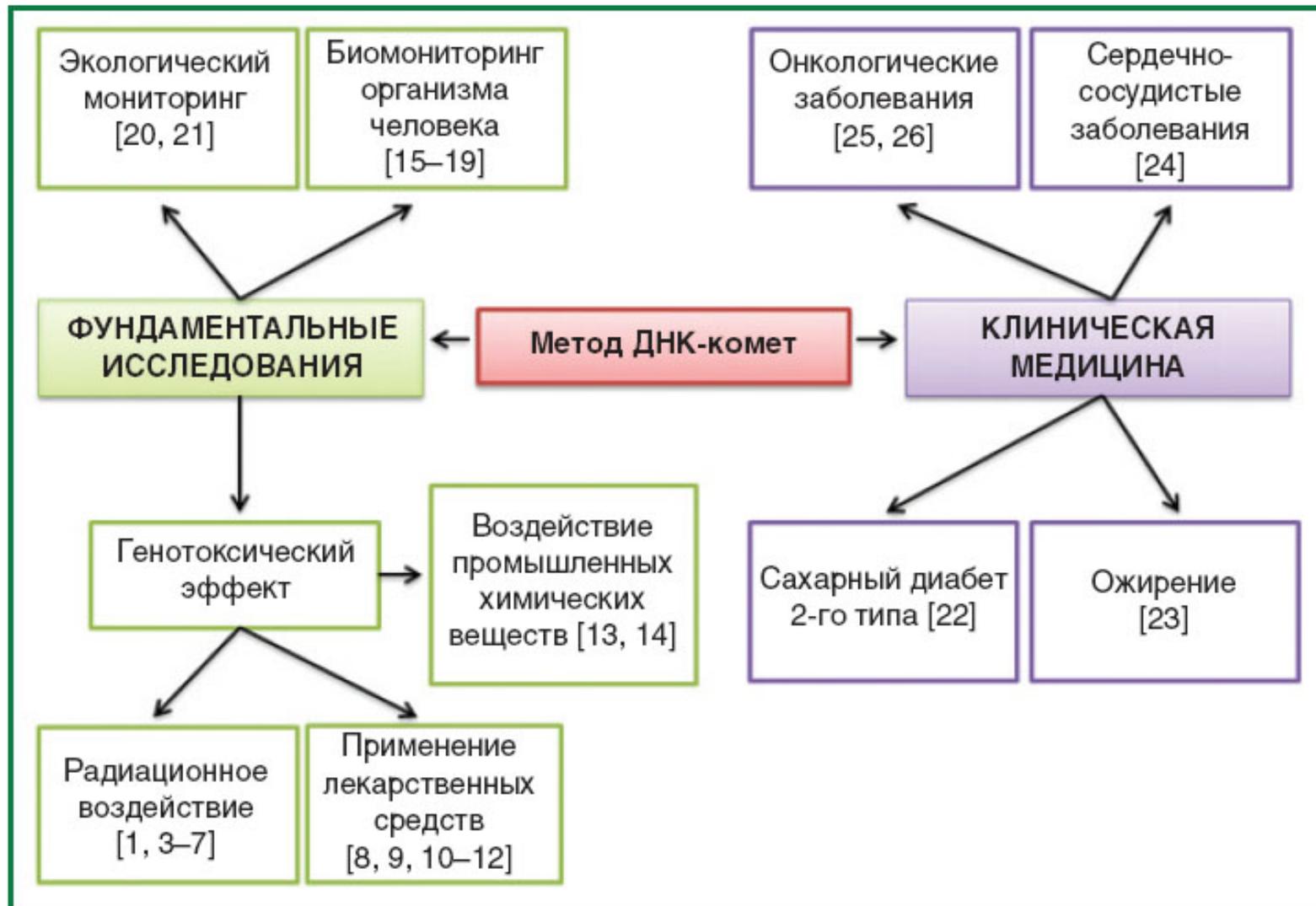


Figure 3: Typical Damaged DNA in Comet Assay.

Применение метода ДНК-комет в биомедицинских исследованиях



Пострепликативная (рекомбинационная репарация)

Пострепликативная репарация происходит в случаях

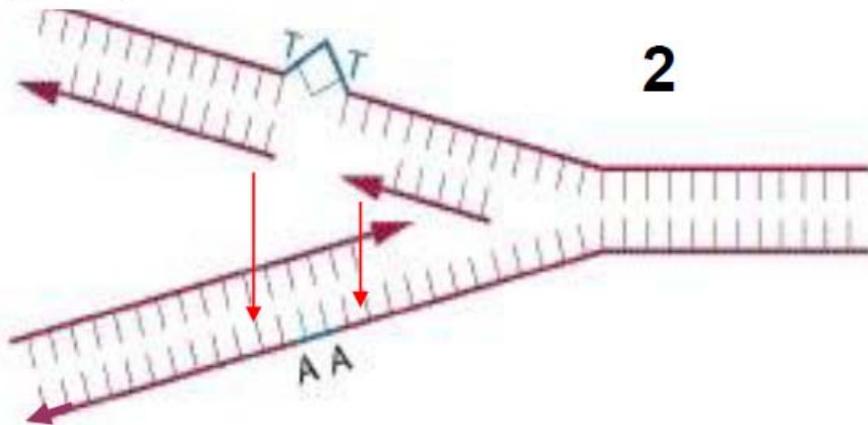
- в ДНК к началу репликации остались повреждения, не устраненные эксцизионной репарацией**
- повреждены гены, контролирующие синтез ферментов, участвующих в эксцизионной репарации.**

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

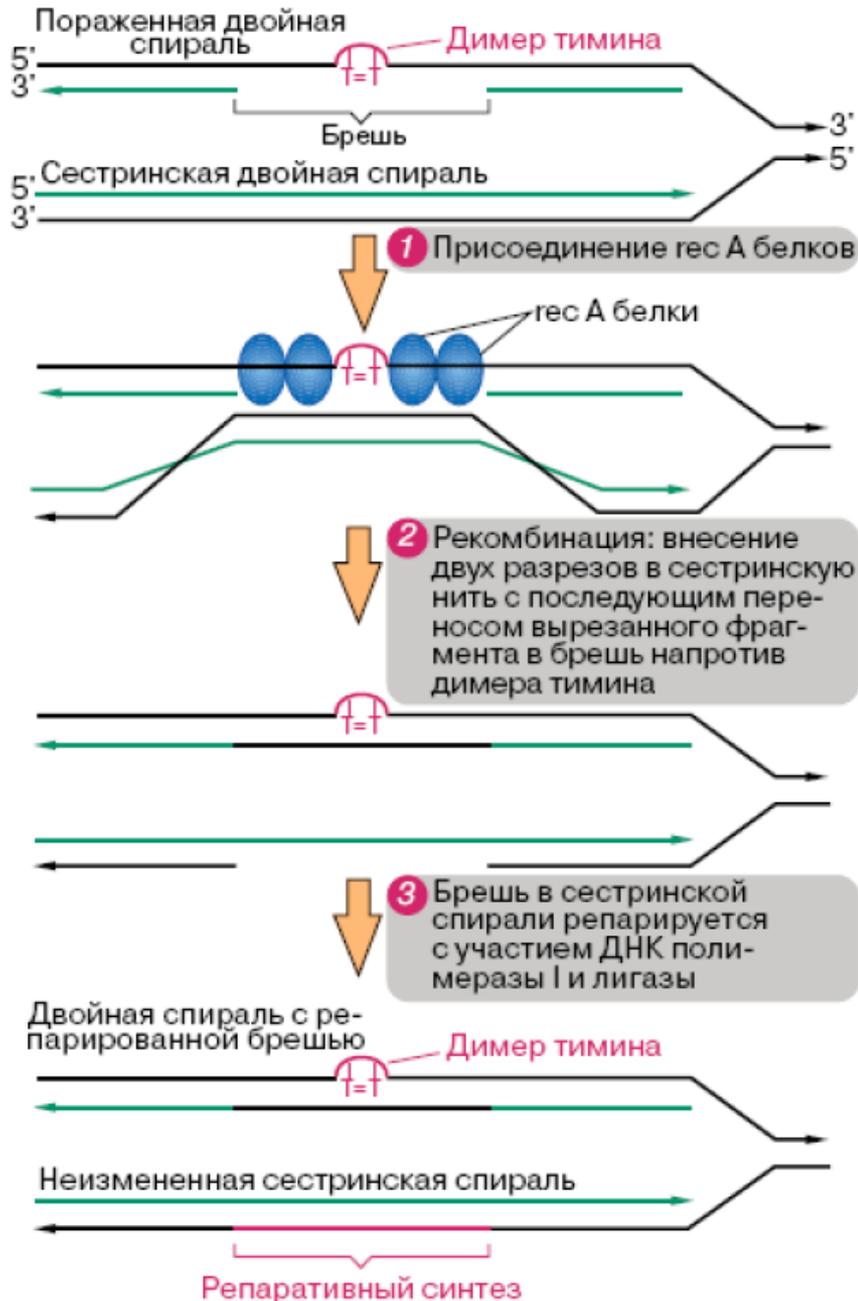


Пострепликативная (рекомбинационная репарация) происходит при участии белков **RecA**

- 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 бревью 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.

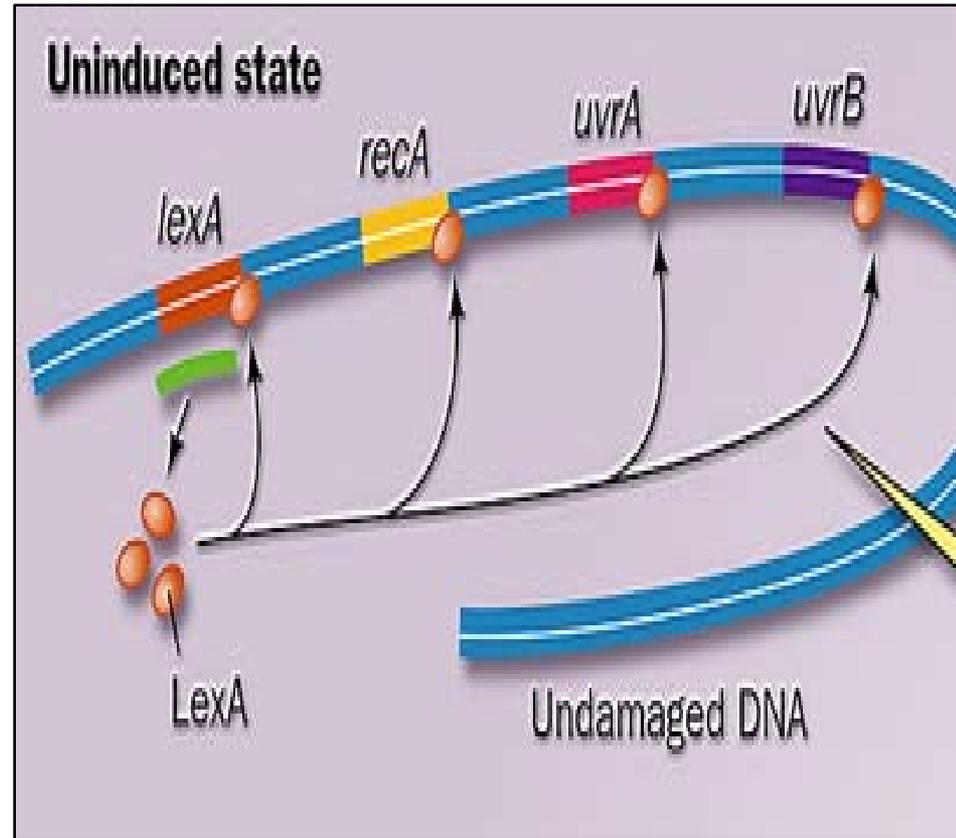
В индукции SOS-ответа важную роль играют

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

Lex A (репрессор)

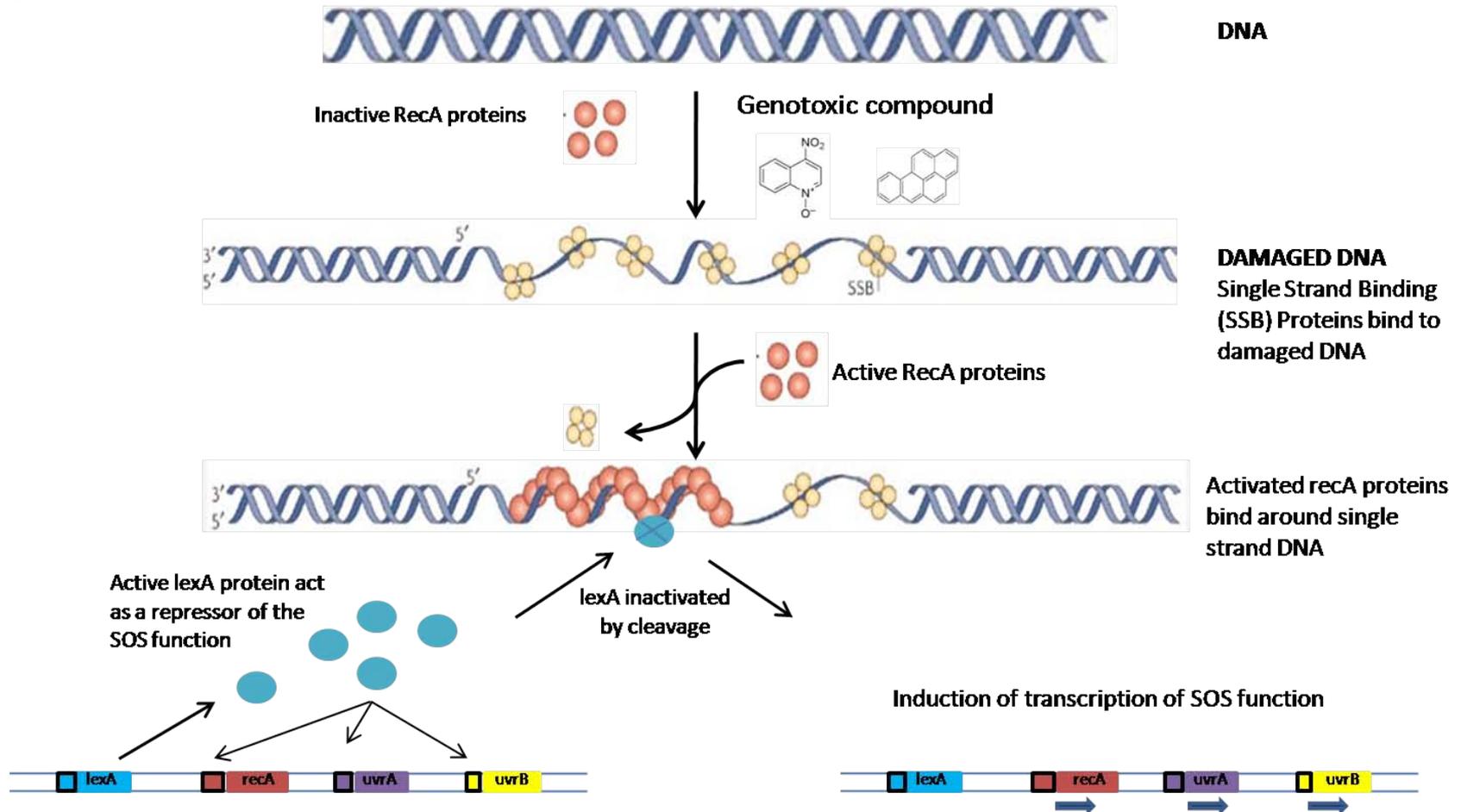
Регулятор транскрипции генов, кодирующих белки, участвующие в репарации повреждений ДНК

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



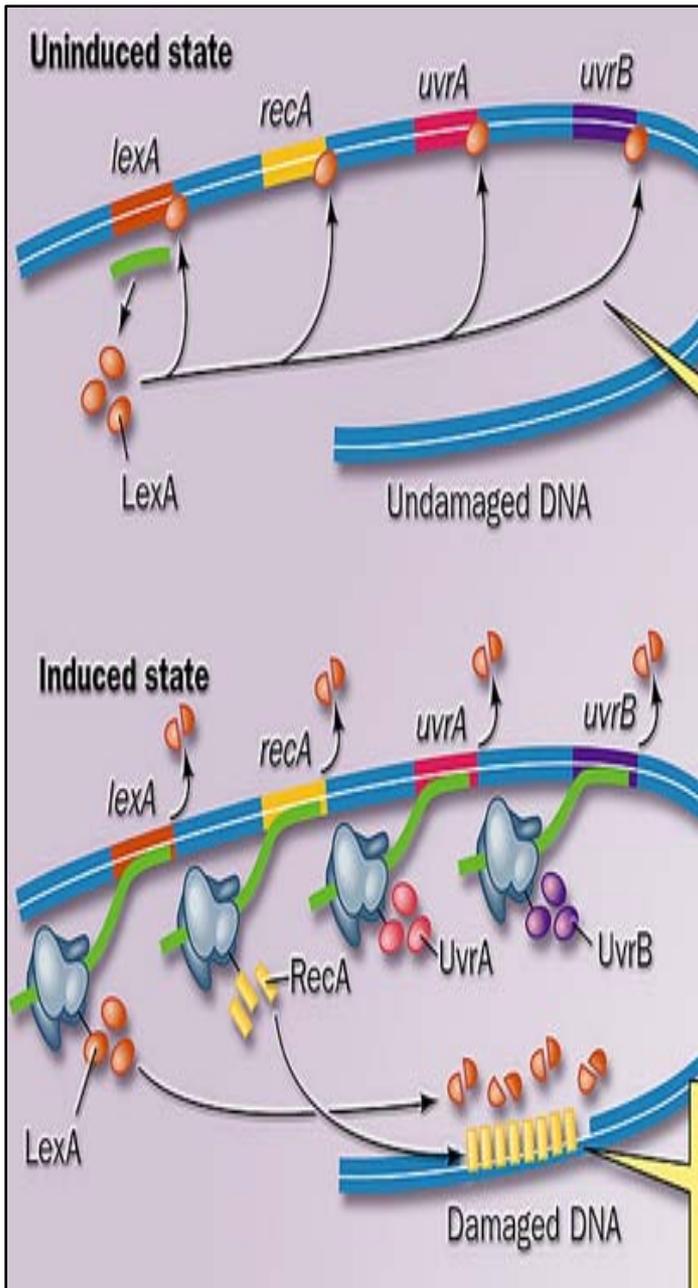
Rec A

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

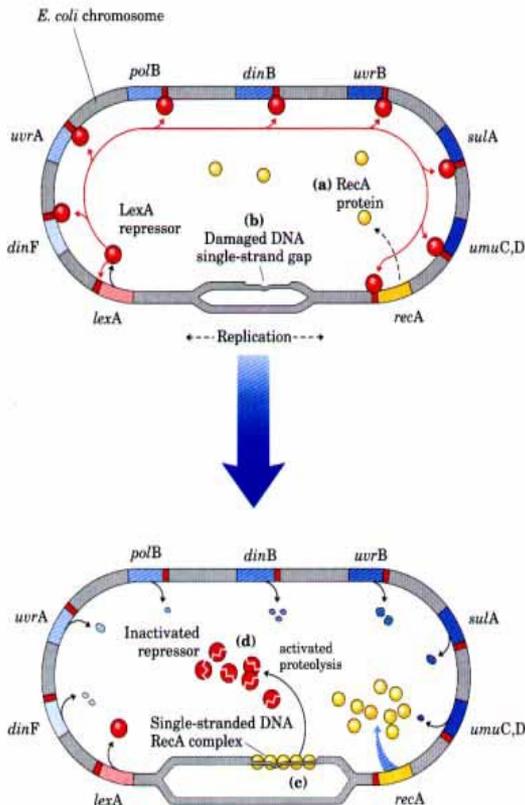
SOS-гены, образующие SOS-регулон, экспрессируются не все сразу:

- **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
Экспрессирующиеся первыми	
<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
Экспрессирующиеся вторыми	
<i>recA</i>	RecA-копротеаза/SOS-дерепрессор, рекомбинационная репарация
Экспрессирующиеся последними	
<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

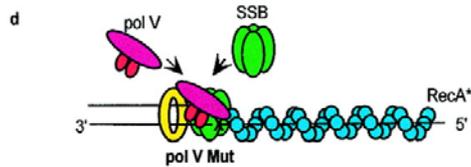
- При дальнейшем снижении уровня Lex A активируются гены, обеспечивающие осуществление репарации с ошибками

UmuDC оперон

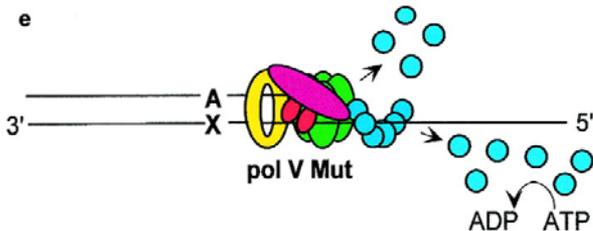
«Ступенчатая» индукция членов SOS-регулона позволяет клеткам с минимальными повреждениями в первую очередь индуцировать системы *безошибочной* репарации - *эксцизионной и рекомбинационной* , *не включая другие, потенциально склонные к ошибкам репарационные пути.*

Механизм SOS-ответа

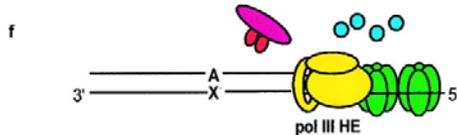
- Белок UmuD подвергается автопротеолитическому расщеплению с образованием активного фрагмента UmuD'
- UmuD' активирует черезблочную полимеразу UmuC
- Образуется комплекс (UmuD')₂UmuC
- Комплекс (UmuD')₂UmuC, который изменяет свойства холофермента ДНК полимеразы III таким образом, что она начинает игнорировать повреждения в матричной ДНК, вставляя в дочернюю нить **случайные нуклеотиды**
- Комплекс **(UmuD')₂UmuC/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 филамент



- 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 ТТ чаще всего включается GA

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

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

SOS-мутагенез

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