

Молекулярная биология

**Курс лекций для студентов IV курса факультета
биологии РГПУ им. А.И. Герцена**

**Профессор кафедры Зоологии, д.б.н., профессор
Цымбаленко Надежда Васильевна**

Репарация ДНК

лекция 5

Этапы проверки репликации ДНК

- ***Первичный отбор*** нуклеотидов идет по принципу комплементарности. Способностью к этому виду отбора обладают все ДНК-полимеразы благодаря полимеризационной $5' \rightarrow 3'$ активности.
- ***Редактирующий отбор.*** Его проводят все полимеразы благодаря экзонуклеазной активности $3' \rightarrow 5'$.
- ***Исправление ошибок в уже синтезированной ДНК.*** Этим занимаются ферменты репарации.

Репарация ДНК - процесс восстановления исходной нативной структуры ДНК

Репарация осуществляется специальными ферментными системами клетки

С позиций молекулярного механизма первичные повреждения в молекулах ДНК могут быть устранены тремя путями:

1. Прямым возвращением к исходному состоянию;
2. Вырезанием поврежденного участка и заменой его нормальным;
3. Рекомбинационным восстановлением в обход поврежденного участка.

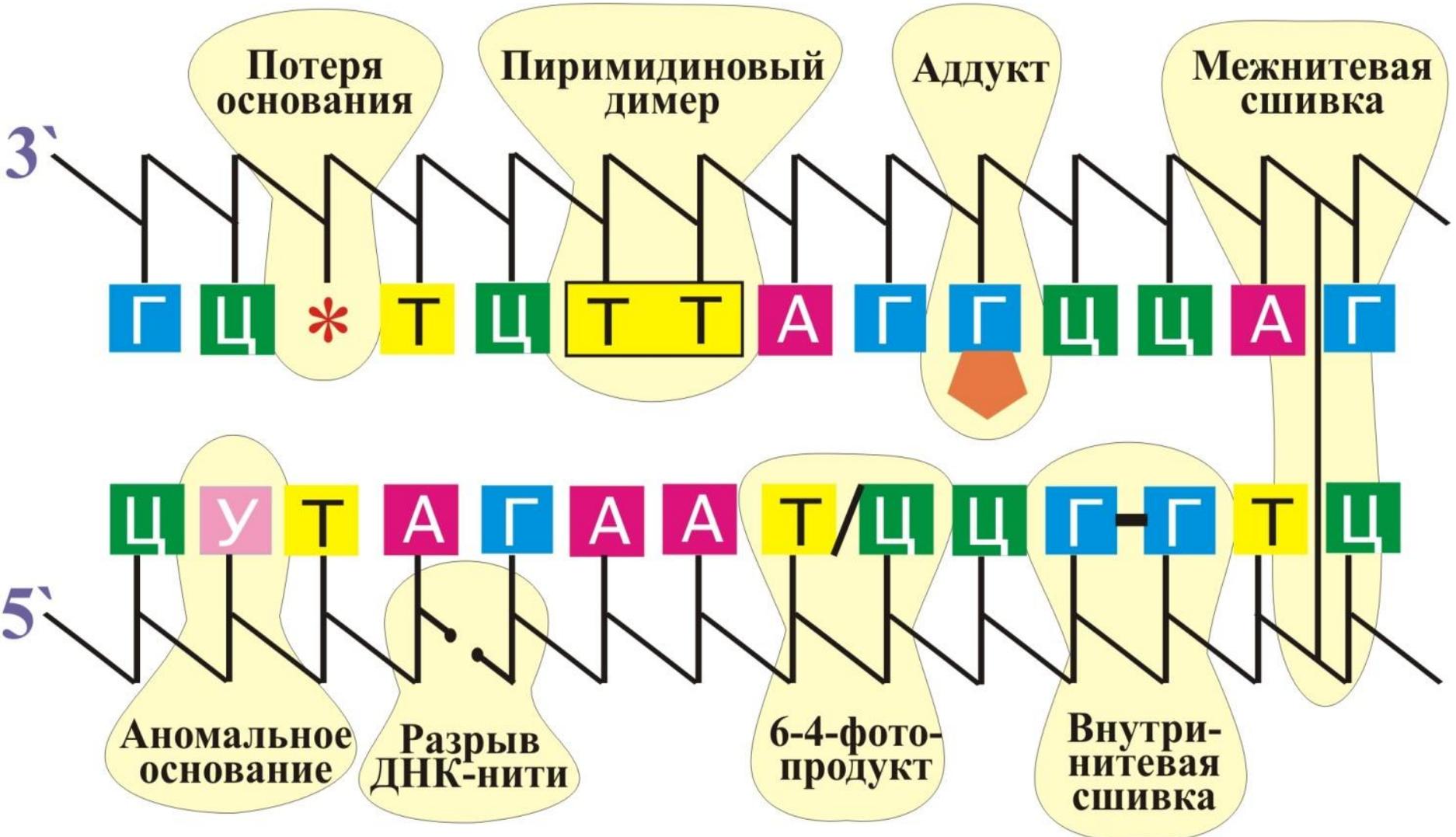
Источники повреждения ДНК

- Радиация
- Химические вещества
- Ультрафиолетовое излучение
- Ошибки репликации ДНК
- **Апуринизация — отщепление азотистых оснований от сахарофосфатного остова**
- Дезаминирование — отщепление аминокетильной группы от азотистого основания

Основные типы повреждения ДНК

- **Повреждение одиночных нуклеотидов**
- **Повреждение пары нуклеотидов**
- **Разрыв цепи ДНК**
- **Образование поперечных сшивок между основаниями одной цепи или разных цепей ДНК**

Основные типы повреждения ДНК



Устройство системы репарации

ДНК-лигаза осуществляет репарацию ДНК

Каждая из систем репарации включает следующие компоненты:

[ДНК-геликаза](#) — фермент, «узнающий» химически изменённые участки в цепи и осуществляющий разрыв Н-связей вблизи от повреждения;

фермент, удаляющий повреждённый участок;

[ДНК-полимераза](#) — фермент, синтезирующий соответствующий участок цепи [ДНК](#) взамен удалённого;

[ДНК-лигаза](#) — фермент, замыкающий последнюю связь в полимерной цепи и тем самым восстанавливающий её непрерывность.



Типы репарации

У бактерий имеются по крайней мере 3 ферментные системы, ведущие репарацию:

Прямая

Эксцизионная

Пострепликативная

У эукариот к ним добавляется еще Miss-mathe и Sos-репарация.

Прямая репарация

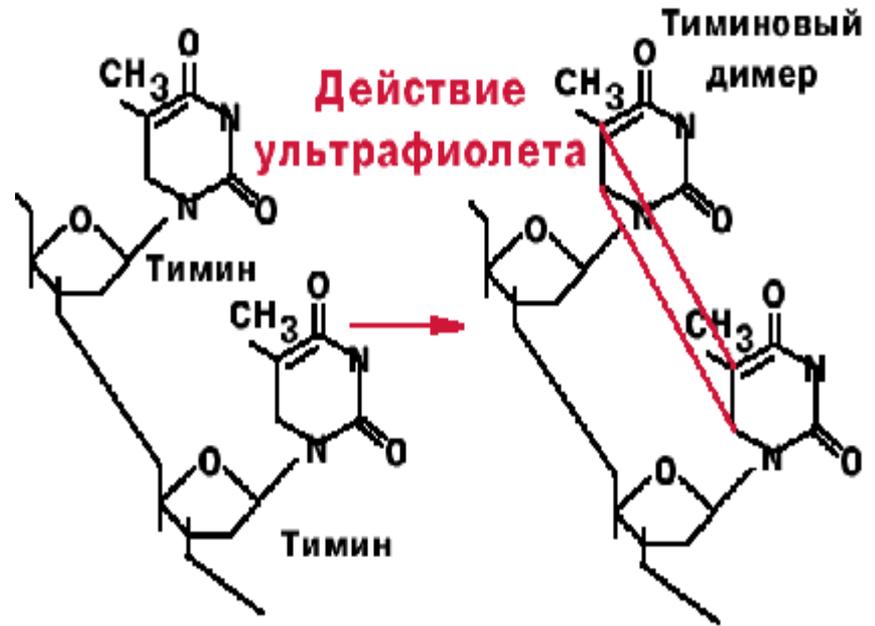
Прямая репарация — наиболее простой путь устранения повреждений в ДНК, в котором обычно задействованы специфические ферменты, способные быстро (как правило, в одну стадию) устранять соответствующее повреждение, восстанавливая исходную структуру нуклеотидов.

Виды прямой репарации:

- система ферментативной фотореактивации ДНК
- репарация метилированного гуанина с участием метилтрансфераз
- репарация однонитевых разрывов ДНК с участием ДНК-полинуклеотид лигазы
- репарация АП-сайтов инсертазами.

Тиминовые димеры

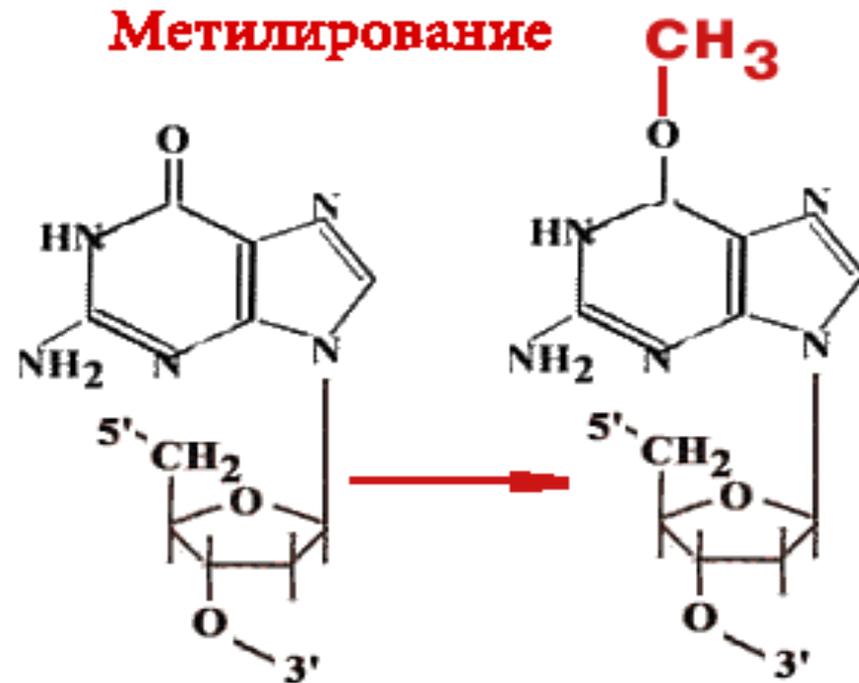
Под действием ультрафиолетового света происходит ковалентное сшивание рядом стоящих тимидинов. При сшивании тимидинов образуется циклобутановое производное, блокирующее репликацию



Фермент *фотолиаза* - узнает тиминные димеры и на свету или в темноте образует с ними комплекс. При освещении видимым светом происходит активация фермента, циклобутановое кольцо разрывается, и вновь получают два тимина. Этот процесс называется *фотореактивацией*

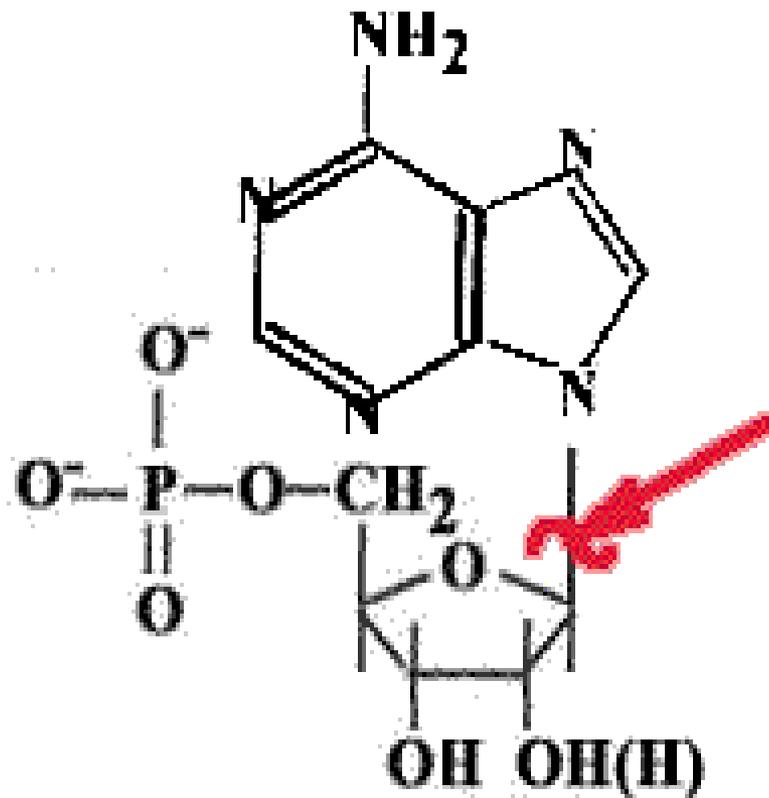
О-6-метилгуанинтрансфераза - Фермент- "самоубийца"

Имеется 14 позиций, по которым ДНК метилируется. Гуанин может быть метилирован (по кислороду в 6-ом положении) и в такой форме будет связываться не только с цитозином, но и с тиминном. Таким образом, в два шага может произойти замена пары Г-Ц на А-Т. Фермент принимает метильную группу на один из 12 цистеиновых остатков и при этом "гибнет".



Апуринизация

Каждая соматическая клетка теряет за сутки около 10000 пуринов и пиримидинов. В ДНК образуются АП-сайты. Причины апуринизации: изменение рН, ионизирующее излучение, повышение температуры и т.д.



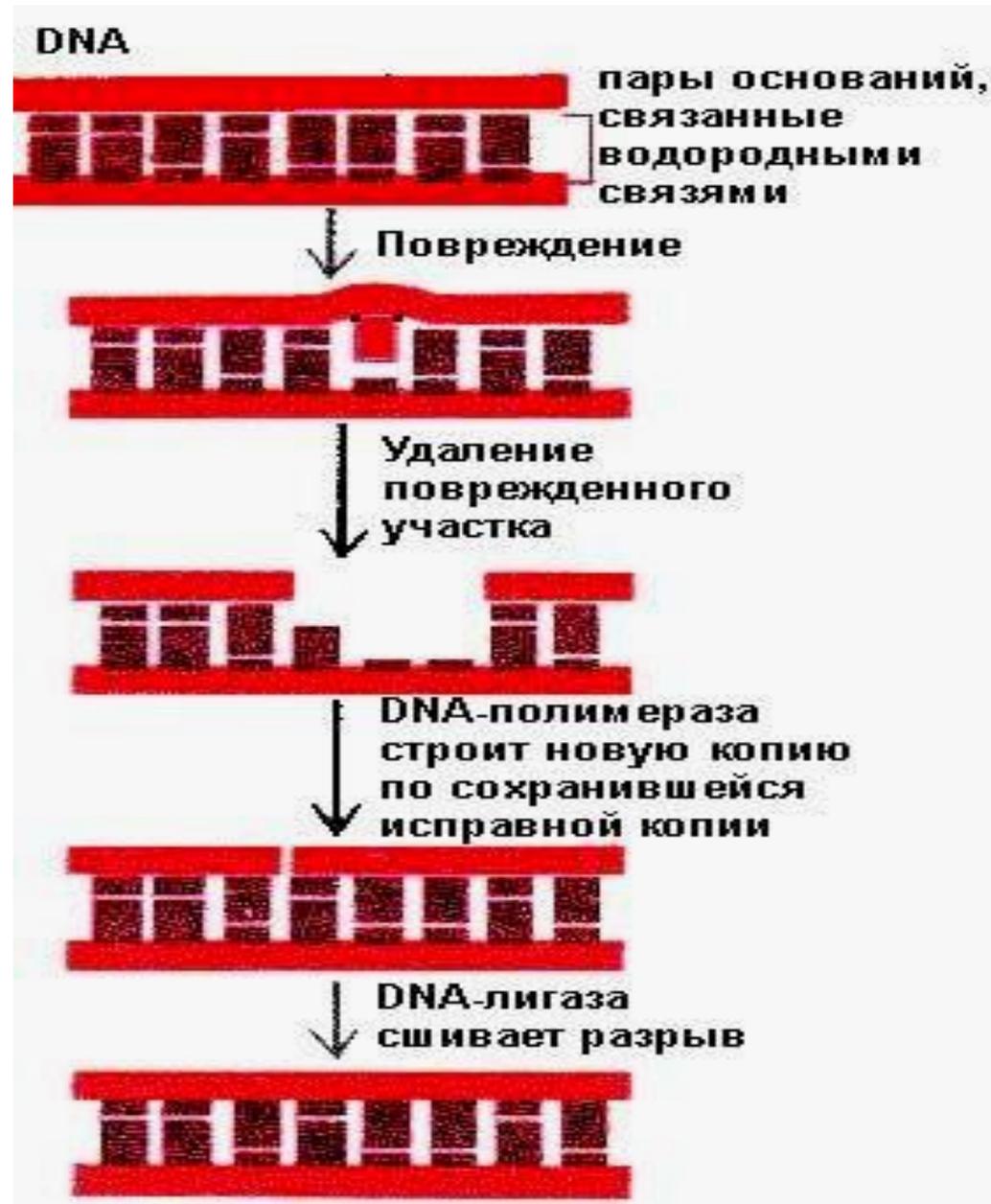
Эксцизионная репарация

Эксцизионная репарация ([англ.](#) *excision* — вырезание) включает удаление повреждённых азотистых оснований из ДНК и последующее восстановление нормальной структуры молекулы.

У *E.coli* эксцизионная репарация осуществляется мультиферментным комплексом, включающим белки *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* (ultraviolet repair), которые узнают поврежденный участок и вносят 5'- и 3'-разрывы с разных сторон от него, *uvrD* - геликазу, которая отсоединяет вырезанный олигомер - 12 нуклеотидов, используя энергию АТФ.

Этапы эксцизионной репарации

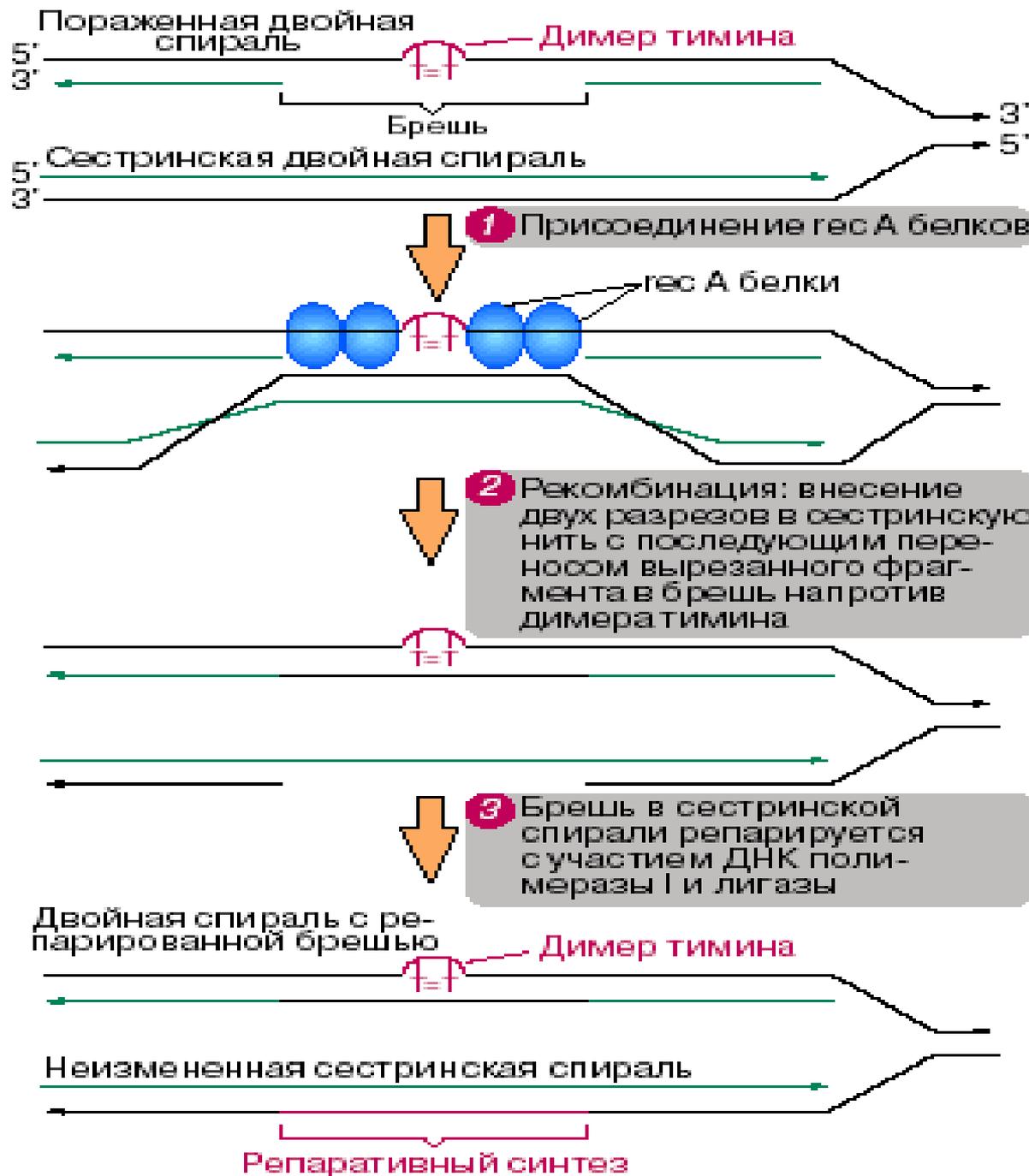
1. Узнавание повреждения ДНК эндонуклеазой
2. Инцизия (надрезание) цепи ДНК ферментом по обе стороны от повреждения
3. Эксцизия (вырезание и удаление) повреждения при помощи геликазы
4. Ресинтез: ДНК-П застраивает брешь и лигаза соединяет концы ДНК



Пострепликативная репарация

- Пострепликативная репарация осуществляется в тех случаях, когда повреждение доживает до фазы репликации (слишком много повреждений, или повреждение возникло непосредственно перед репликацией) или имеет такую природу, которая делает невозможным его исправление с помощью эксцизионной репарации (например, сшивка цепей ДНК).
- Эта система играет особенно важную роль у эукариот, обеспечивая возможность копирования даже с поврежденной матрицы (хотя и с увеличенным количеством ошибок). Одна из разновидностей этого типа репарации ДНК - **рекомбинационная репарация**.

Рекомбинационная репарация



Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов, или мисмэтч репарация (mismatch repair, MMR).

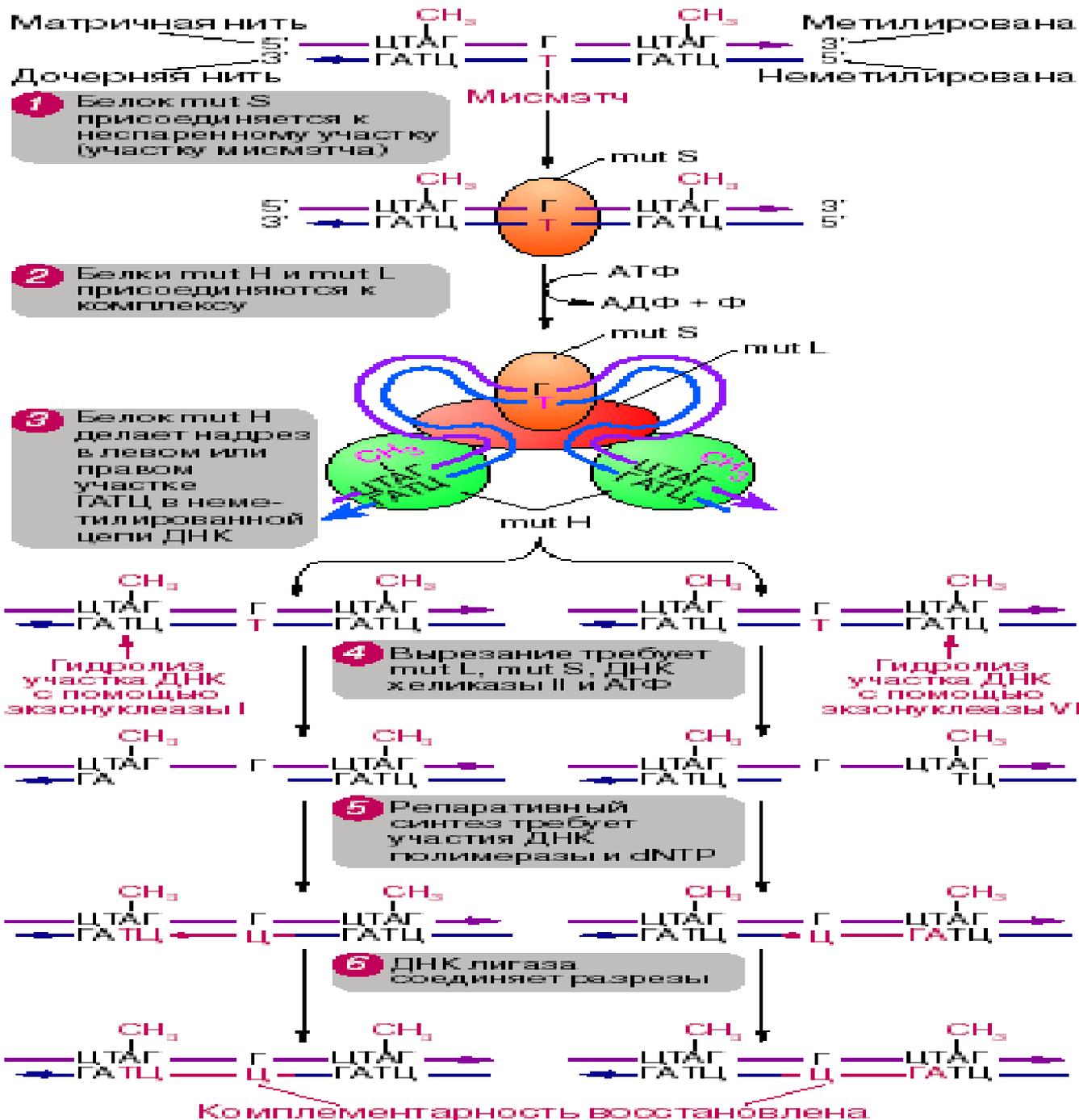
Во время репликации ДНК бывают ошибки спаривания, когда вместо комплементарных пар А-Т, Г-Ц образуются некомплементарные пары. Неправильное спаривание затрагивает только дочернюю цепь. Система репарации мисмэтч должна найти дочернюю цепь и произвести замену некомплементарных нуклеотидов.

Мисмэтч репарация

Как отличить дочернюю цепь от материнской?

- **Оказывается, специальные ферменты метилазы присоединяют метильные группы к аденинам в последовательности ГАТЦ на материнскую цепь и она становится метилированной, в отличие неметилированной дочерней. У *E.coli* продукты 4-х генов отвечают за мисмэтч репарацию: *mut S*, *mut L*, *mut H*, *mut U***

Мисмэтч репарация



↑
Гидролиз участка ДНК с помощью экзонуклеазы I

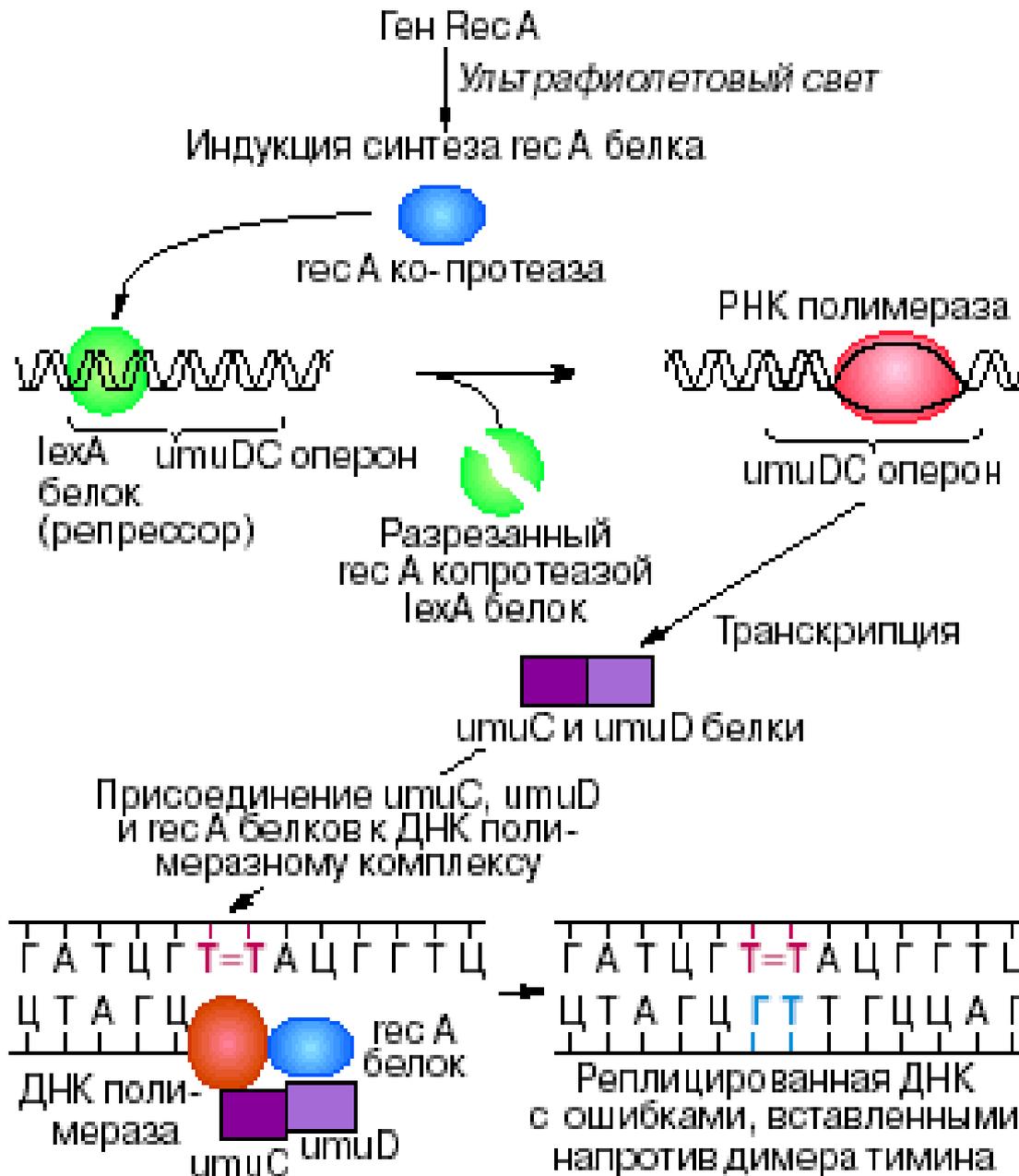
↑
Гидролиз участка ДНК с помощью экзонуклеазы VI

Комплементарность восстановлена.

SOS -репарация

Обнаружена в 1974 г. М.Радманом. Он дал название, включив в него международный сигнал бедствия. Включается тогда, когда повреждений в ДНК настолько много, что они угрожают жизни клетки. Индуцируется синтез белков, которые присоединяются к ДНК-П комплексу и строят дочернюю цепь ДНК напротив дефектной матричной. В результате ДНК удваивается с ошибкой и может произойти клеточное деление. Но если были задеты жизненно важные функции клетка погибнет.

SOS - репарация



Распространенность репарирующих систем

Тип репарации	Бактерии	Растения	Насекомые	Животные	Человек
Фотореактивация	+	+	+	+	+
Репарация O ⁶ -гуанинов	+	+	+	+	?
Эксцизионная репарация оснований	+	?	?	+	+
Эксцизионная репарация нуклеотидов	+	+	+	+	+
Мисмэтч-репарация	+	?	?	+	+
Пострепликативная репарация	+	+	?	+	+
SOS-репарация	+	?	?	+	+

РЕПАРАЦИЯ ДНК И НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

Нарушение системы репарации у человека является причиной:

- **Преждевременного старения**
- **Онкозаболеваний (80-90 % всех раковых заболеваний)**
- **Аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, СКВ, болезнь Альцгеймера)**

Болезни, связанные с нарушением репарации

- **Пигментная ксеродерма**
- **Атаксия-телеангиэктазия или синдром Луи-Бар**
- **Синдром Блума**
- **Трихотриодистрофия (ТТД)**
- **Синдром Коккейна**
- **Анемия Фанкони**
- **Прогерия детей (синдром Хатчинсона-Гилфорда)**
- **Прогерия взрослых (синдром Вернера)**