

Репарация на ДНК

Доц. Милена Атанасова, д.б.
Ръководител сектор “Биология”
МУ-Плевен

Репарация – поправяне

- 1) Повреди в **една от веригите** на ДНК – увредената част се изрязва и след това се възстановява по матричния принцип, като новата верига се синтезира при използване на неувредената верига, като матрица
- 2) Повреди и в **двете вериги** се поправят като:
 - а) свободните краища се зашиват един за друг (обикновено има загуба на генетичен материал)
 - б) изгубеното парче се възстановява, като за матрица се използва хомоложната хромозома (има сложен механизъм на разпознаване и сдвояване на съответните участъци на увредената и здравата хомоложни хромозоми)

-
- Трите “Р” от обмяната на ДНК – репликация, рекомбинация и репарация разкриват динамичното състояние на ДНК.
 - В ДНК на всички живи организми постоянно възникват безброй промени
 - Съществува гениален механизъм за толерантност и отстраняване на тези промени и евентуалните вреди от тях.

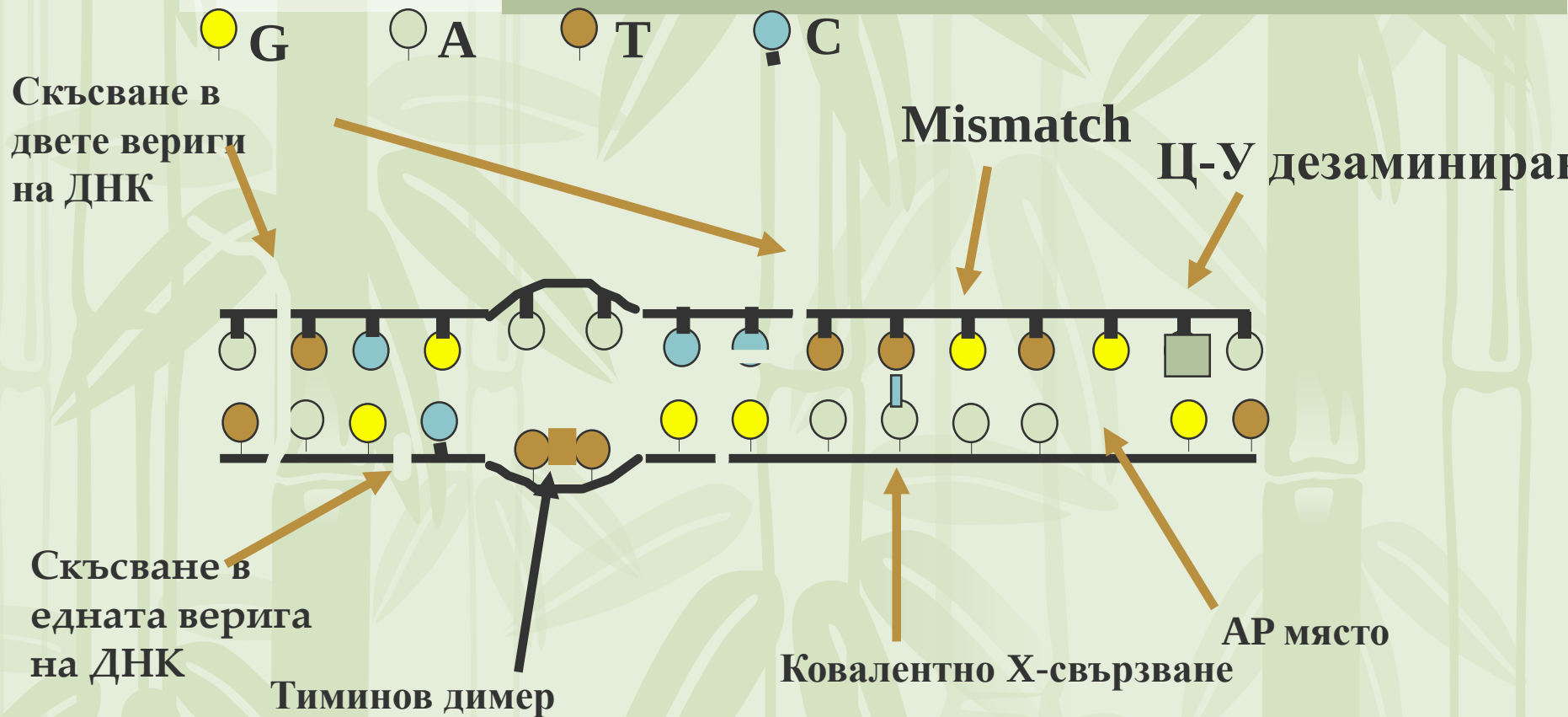
Неспазването на тези механизми може да доведе до сериозни заболявания при човека като: наследствена xeroderma pigmentosum (XP), наследствен рак на дебелото черво (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer HNPCC) и някои форми на рак на гърдата.

XP се характеризира с около 10000 пъти повишен риск от рак на кожата при излагане на слънчева светлина; хората с HNPCC са наследствено предразположени към рак на дебелото черво и други видове рак.



Физични и химични средства като йонизиращо лъчение и **UV-лъчи** оказват вредно въздействие върху структурата и функцията на гените и възникват въпроси как клетката се справя с тези повреди в структурата на ДНК. Откриването на механизма на ДНК- репарацията е направено в края на 40-те години на миналия век от двамата учени Albert Kelner и Renato Dulbecco независимо един от друг. Техните усилия са довели до откриването на явлениято **фотореактивация**. При нея повредите в структурата на ДНК, причинени от облъчването и с UV лъчи се поправят от зависещи от светлината ензимни реакции.

Видове увреждания на ДНК



Спонтанни промени в нуклеотидите

Червено: увреждане с окислител;
синьо: хидролитично разграждане;
зелено: неконтролируемо метилиране

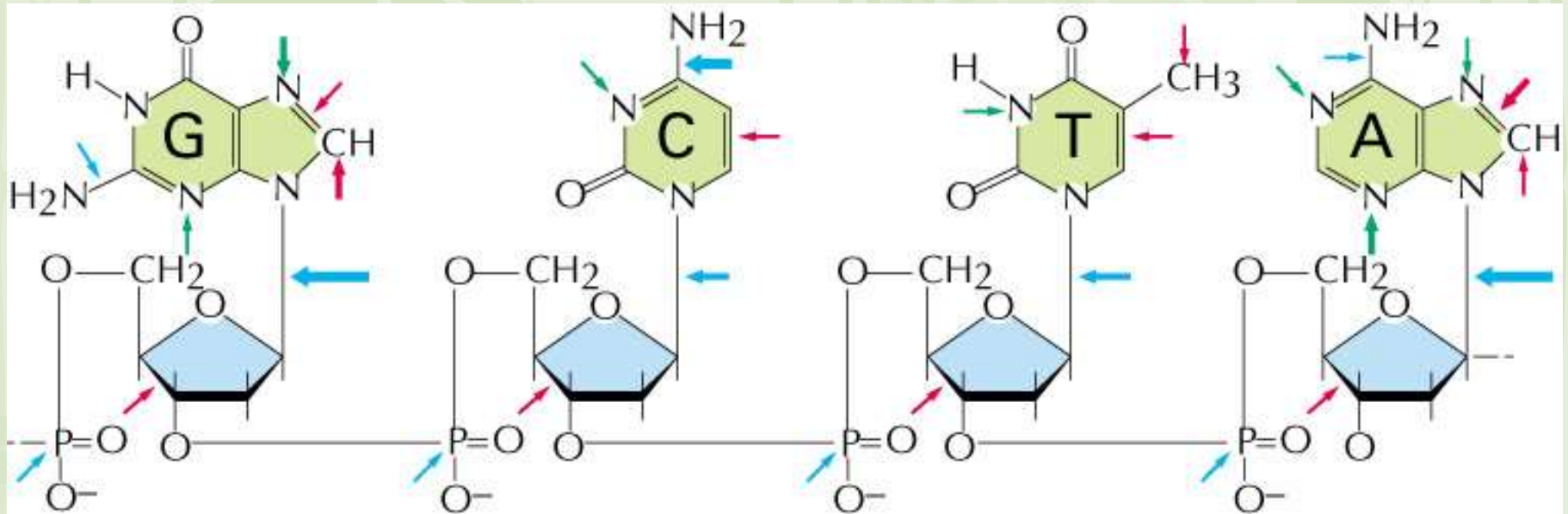


Figure 5-46. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Депуринизация и дезаминиране

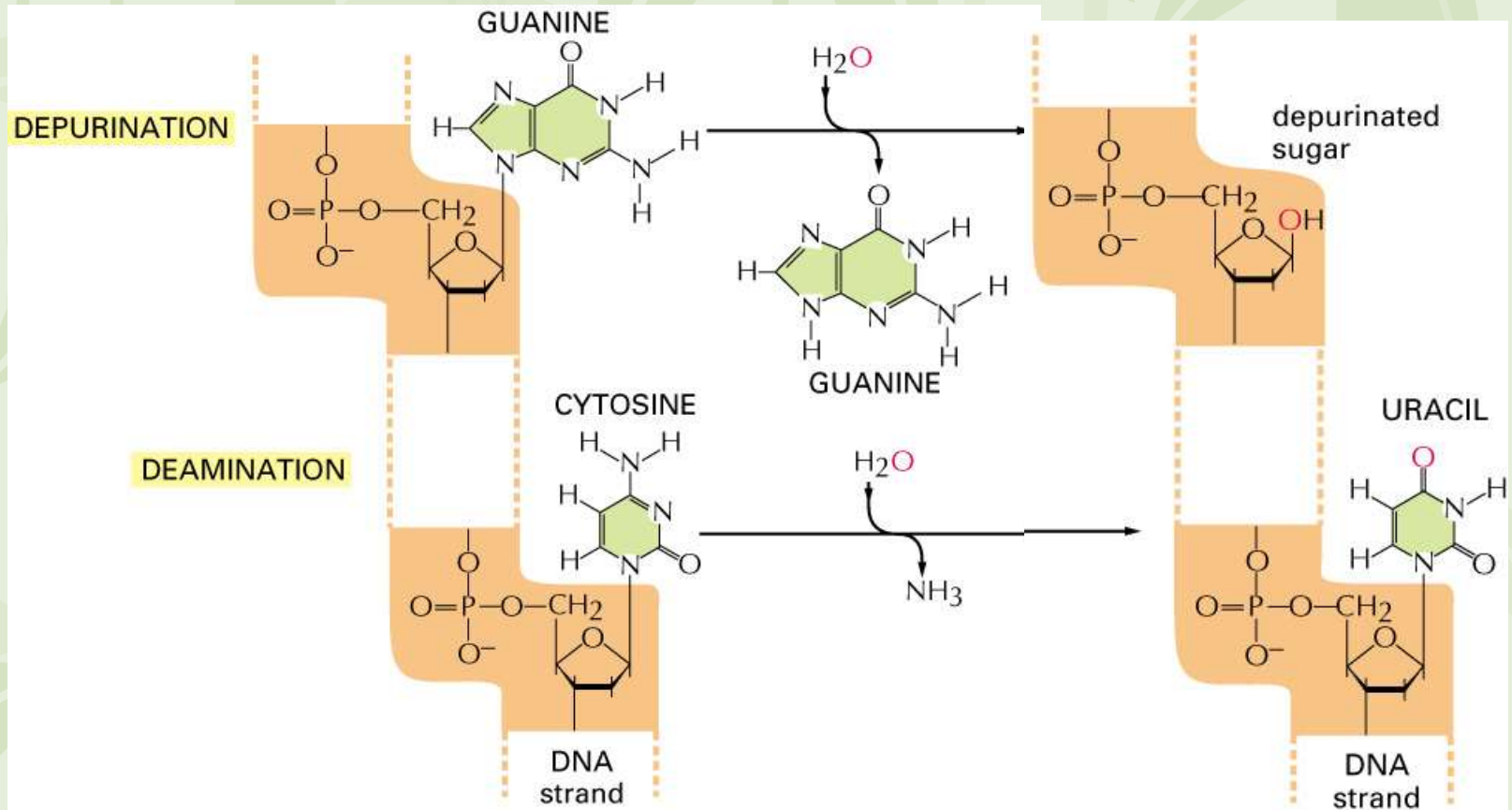


Figure 5-47 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Тиминови димери

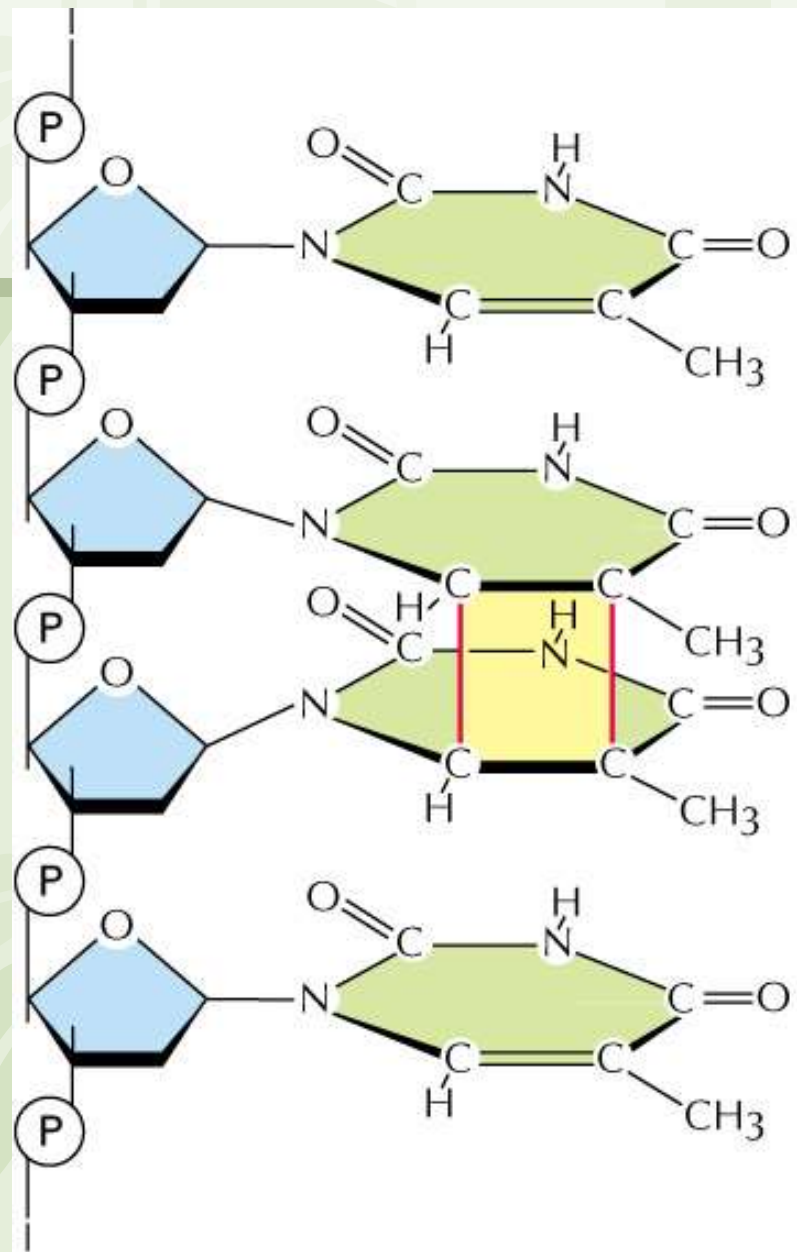


Figure 5-48. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Мутацията се предава на
дъщерната ДНК

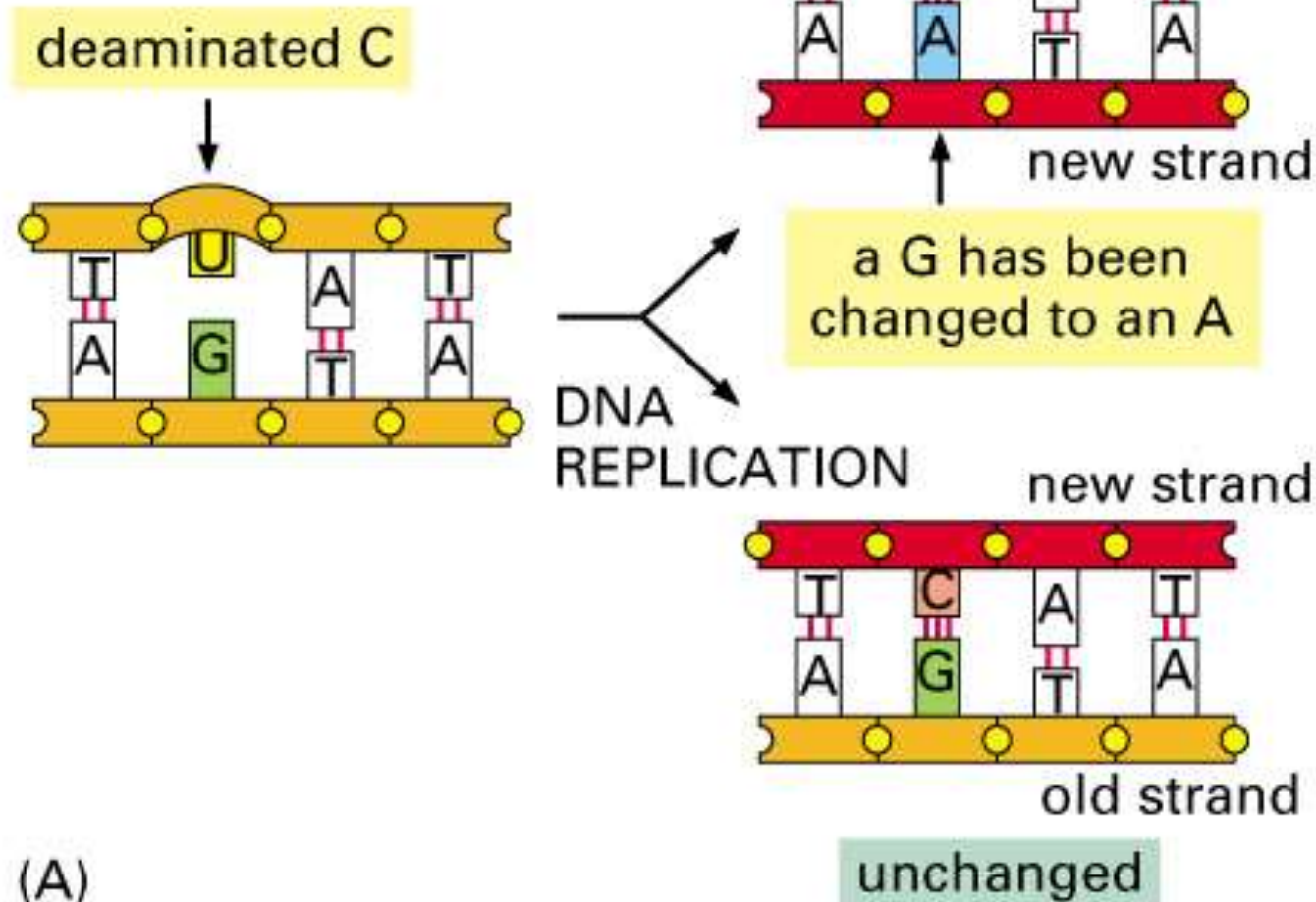


Figure 5-49 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Мутациите се предават в дъщерните молекули.

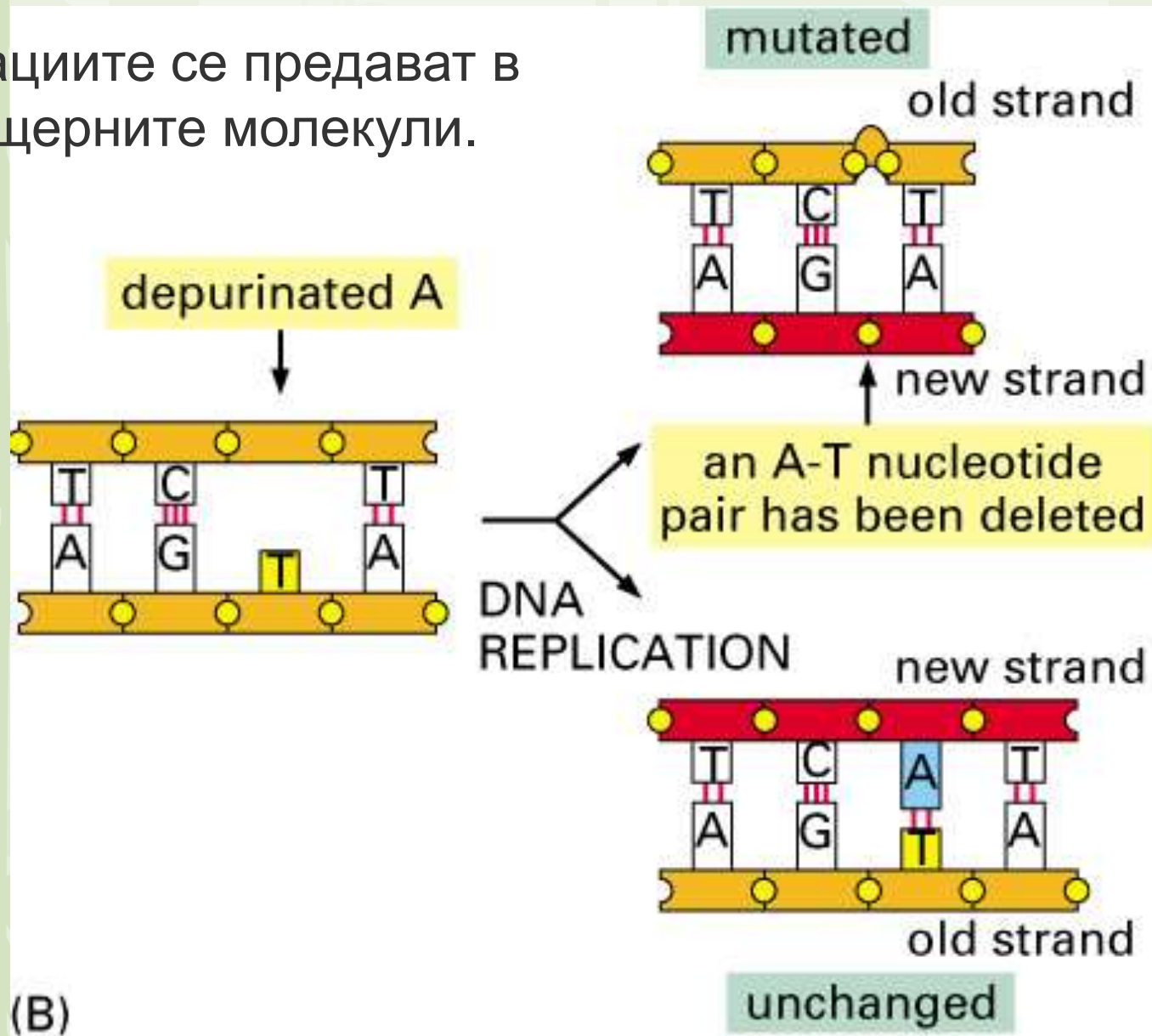


Figure 5-49 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Възможна реакция на организма към увреждането

Три вида:

А – възстановяване на нативната структура преди увреждането

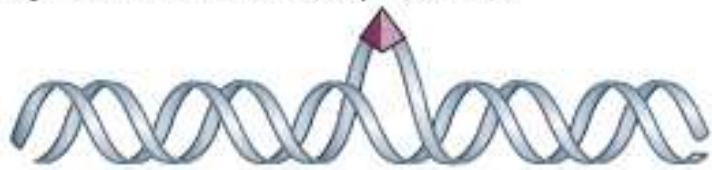
В - премахване на увреждането

С – толерантност към увреждането

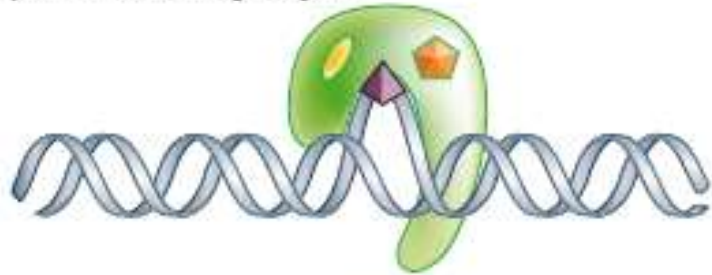
МЕХАНИЗМИ, ПО КОИТО СЕ ИЗВЪРШВА РЕПАРАЦИЯТА НА ДНК

- Директна репарация
- Поправки чрез изрязване:
 - На бази **base excision repair** (BER)
 - На нуклеотиди **nucleotide excision repair** (NER),
 - Поправка на грешно сдвоени бази **mismatch repair** (MMR)

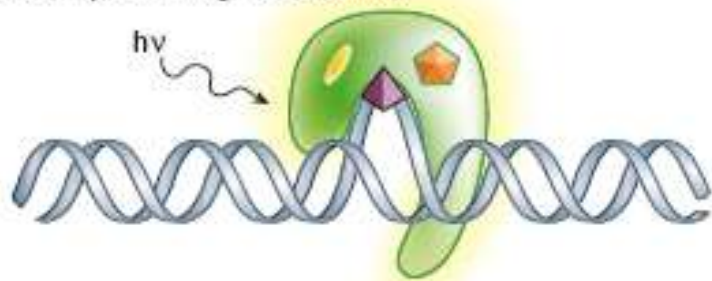
Pyrimidine dimer in UV-exposed DNA



Complex of DNA with photoreactivating enzyme



Absorption of light ($>300\text{ nm}$)



Release of enzyme to restore native DNA



Директна репарация

Възстановяване на нативната структура преди увреждането (напр. **Фотореактивация**) – Не се наблюдава при хора Описана при Actinomycetes през 1949

3 етапа:

- Ензим **фотолиаза**, който абсорбира светлина с $\lambda > 300\text{ nm}$. Фотолиаза (кодирана от *phrA* и *phrB* гени при *E. coli*) (1)**разпознава** деформацията в мястото на димера. УВ лъчението я (2)**активира** и димера се (3)**изрязва**.

BER (base excision repair)

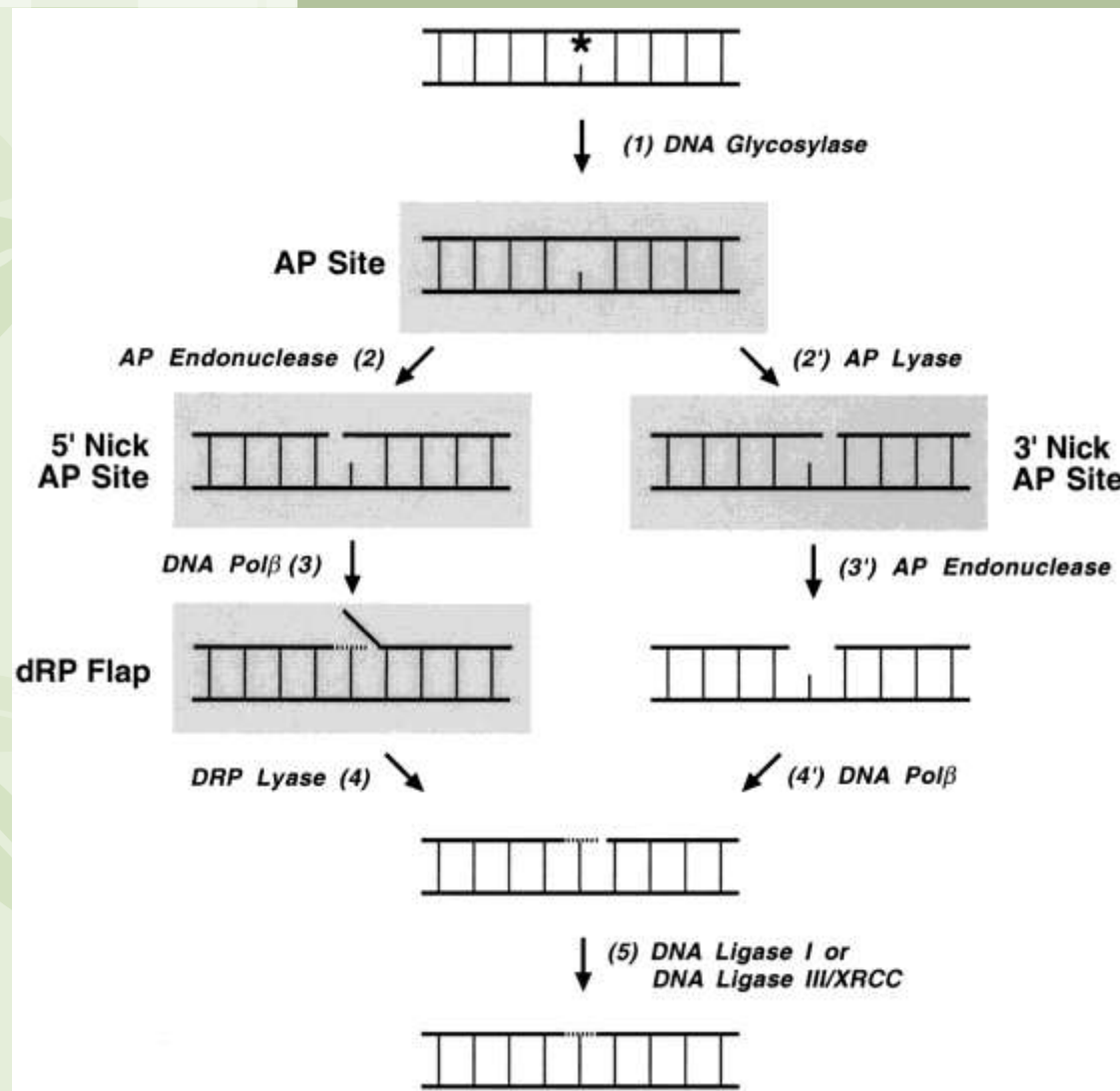
Поправки чрез изрязване на бази

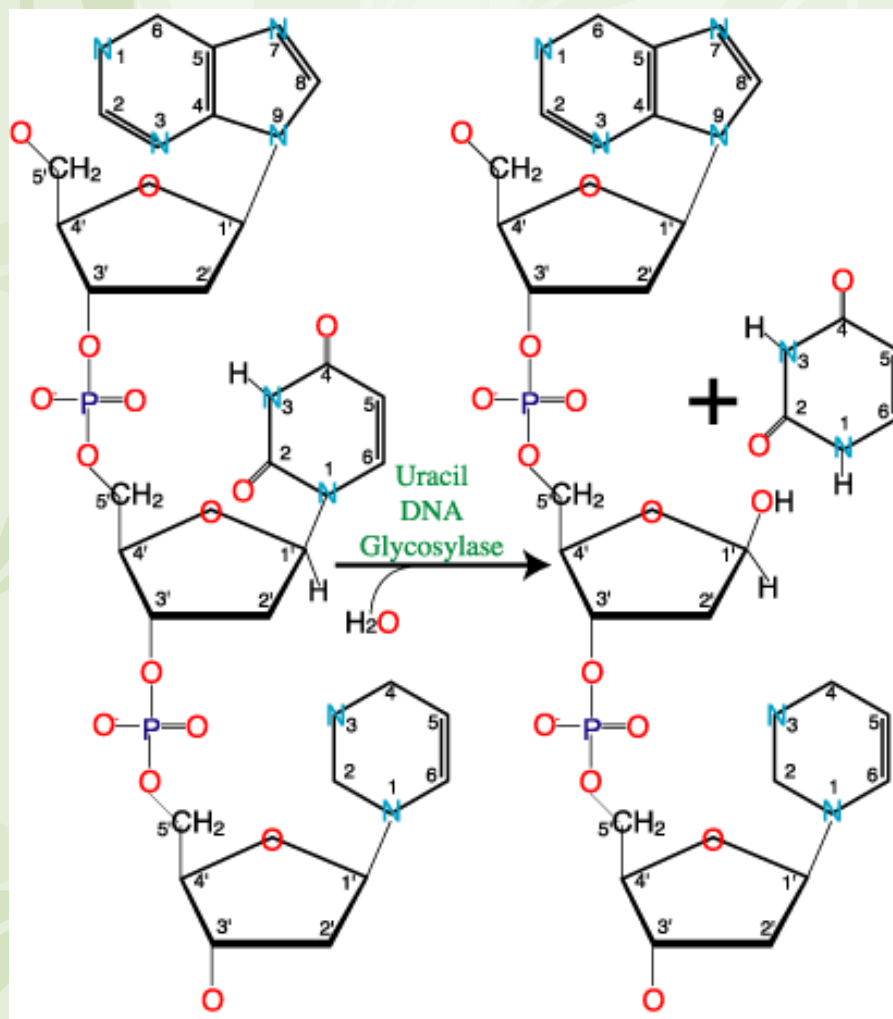
- Основен механизъм за поправка на модифицирани бази, грешно включване на урацил, хипоксантин, 3м-аденин увреждане от свободни кислородни радикали (оксидативен стрес)
- ДНК **гликозилази** разпознават уврежданията и премахват базите чрез разрушаване на гликозидните връзки, като по този начин “обезбазят” мястото - **AP (апуриново/ апиримидиново места)**
- **AP ендонуклеази** изрязват фосфодиестерните връзки в съседство с AP мястото
- AP нуклеотидите се разграждат от **екзонуклеази** празнината се запълва от **полимерази** и съшива от **лигази**

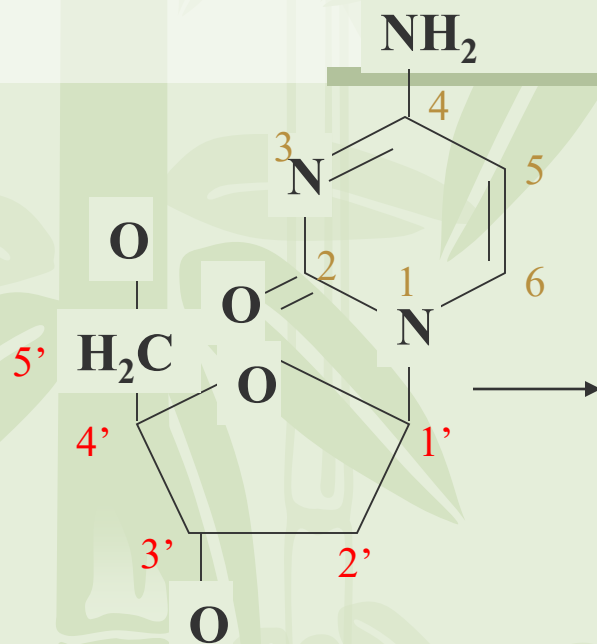
BER

- ДНК гликозилазите са специфични
 - Урацил-гликозилази
 - Хипоксантин-гликозилази
- Полимеразите също се различават:
При еукариоти действа ДНК пол β (една от 11 при еукариотите)

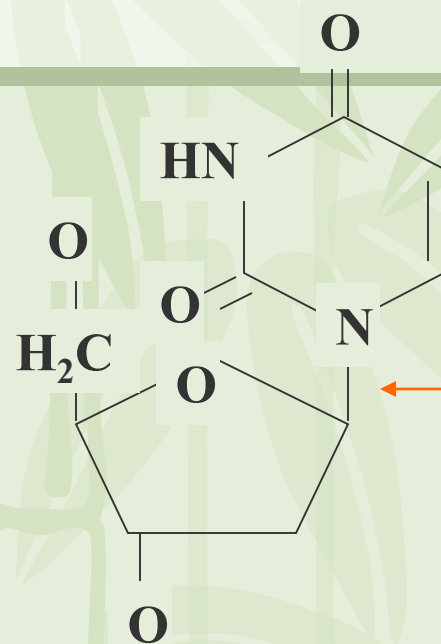
Механизъм на BER







дезоксигЦИТОЗИН



дезоксигурацилТИМИН

CH_3

Гликозидна връзка

Видове увреждания, поправяни чрез BER

- **Оксидативни увреждания;** 8-оксо-Г, силно мутагенен, свързва се А, замяна на ГЦ --> ТА трансверзия
- **Дезоксиурацил:** грешно инкорпориране на дУ или дезаминиране на дЦ
- Тези увреждания не деформират ДНК и не блокират ДНК полимеразите, което има последствия за дъщерните клетки
- **Спонтанна депуринизация** – особено Г – репарира се чрез втората част от механизма на BER

NER (Nucleotide excision repair)

Поправки чрез изрязване на нуклеотиди

- Разпознава увреждания, които блокират ДНК репликацията (напр. лезии предизвикани от карциногени) - напр, UV пиримидинови фотодимери
- Деформира двойната спирала
- Изрязване от двете страни на увреденото място:
- Къси участъци изрязана ДНК се поправят чрез реполимеризация и съшиване
- При *E. coli*, участва комплекс UvrABCD
- При еукариоти участват повече протеини
- Често е спрегнат с транскрипцията (TCR, “transcription coupled repair”)
- Дефекти в механизма на NER са в основата на заболяването **Xeroderma pigmentosum**

NER

- Процесът е сложен, участват около 30 различни белтъка, функциониращи в комплекс, наречен **репарозома**. Тази “репаративна машина” улеснява изрязването на увредените нуклеотиди, чрез премахване на участък, дълъг около 30 нуклеотида в който се съдържа увредения елемент.

Протеини участващи в NER при прокариоти

<i>S. cerevisiae</i>	Човек	Функция
Rad14	XPA	свързва увредената ДНК при XPC или RPK пол II
Rpa1,2,3	RPAp70,p32,p14	Стабилизира отворения комплекс с Rad14/XPA); Rad4
	XPC	Works with hHR23B; binds damaged DNA; recruits other NER proteins
Rad23	hHR23B	Cooperates with XPC (see above); contains ubiquitin domain; interacts with proteasome and XPC
Ssl2 (Rad25)	XPB	3' to 5' helicase
Tfb1	p62	?
Tfb2	p52	?
Ssl1	p44	DNA binding?
Tfb4	p34	DNA binding?
Rad3	XPB	5' to 3' helicase
Tfb3/Rig2	MAT1	CDK assembly factor
Kin28	Cdk7	CDK; C-terminal domain kinase; CAK
Ccl1	CycH	Cyclin
Rad2	XPG	Endonuclease (3' incision); stabilizes full open complex
Rad1	XPF	Part of endonuclease (5' incision)
Rad10	ERCC1	Part of endonuclease (5' incision)

Xeroderma pigmentosum

- Автозомно рецесивно заболяване – дължи се на мутации в компонентите участващи в **NER**
- 1874, Moriz Kaposi използва термина за пръв път Извънредна чувствителност към слънчева светлина
- Предразположение към рак на кожата (средна възраст за поява на рак на кожата $c=8$ год. срещу 60 год при в нормалната популация) – особено по откритите части на тялото



Синдром на Соскауне

- Чувствителност към UV радиация, описано от Edward Alfred Cockayne през 1936.
- Мутантни ERCC6 и ERCC8 – белтъците, кодирани от тях участват в репарацията спрегната с транскрипцията
- Допълнителни симптоми - нисък ръст, тежки неврологични аномалии (причинени от демиелинизация), птиче-подобно лице, катаракта
- Средна продължителност на живота 12.5 год, но за разлика от XP няма ясно изразено предразположение към рак на кожата.



Трихотриодистрофия (TTD)

- Характеризира се с UV чувствителност, описана от Price in 1980 год.
- Освен симптомите, характерни за CS, пациентите с TTD имат недостиг на сярна, чупливи косми, люспеста кожа.
- Корелира с мутации в гени за белтъци, участващи в NER (*XPB*, *XPD*, и *TTDA* гени).
- Тези белтъци са част от транскрипционния фактор TFIIH, който е изграден от 10 субединици и е вероятно TTD да влошава транскрипционните процеси, отколкото репарацията на ДНК. Затова понякога се среща като **“транскрипционен синдром”**.

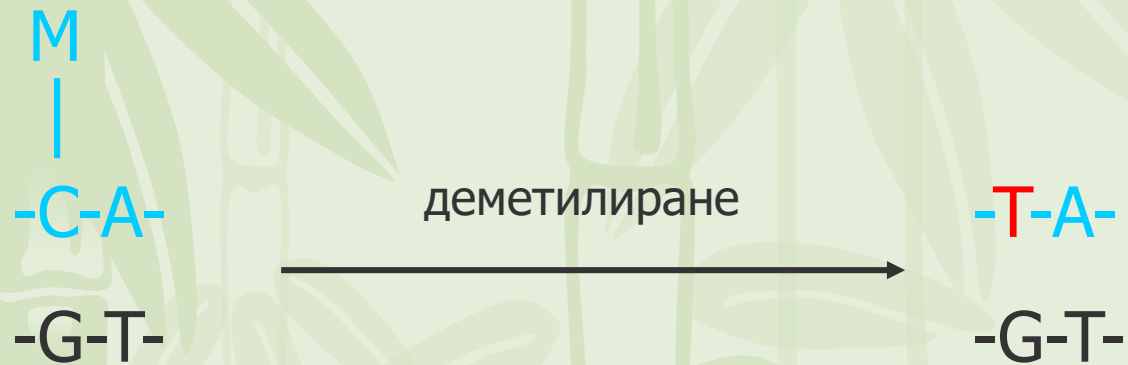


Mismatches repair (MMR)

Поправка на грешно сдвоени бази

- Увреждане на нуклеотиди в двойноверижната ДНК
- Грешна инкорпорация на нуклеотиди
- Липсващи или излишни нуклеотиди
- Описан за пръв път при бактерии
- Подобна система при дрожди
- Значителна хомоложност при по-висшите организми
- Човешки MMR гени описани за пръв път през 1993.

Увреждане на ДНК



Грешно включване на нуклеотид

-C-A-G-C-T-

-G-T-C-C-A-

C⇒Т заместване

-C-A-G-C-T-

-G-T-T-C-A-

-C-A-G-C-T-

-G-T-C-C-A-

-C-A-G-C-T-

-G-T-C-C-A-

Правилно
сдвоени

Излишни нуклеотиди

-C-A-G-C-T-

-G-T-C-C-A-

-C-A-G-C-T-

-G-T-C-C-A-

Добавен нуклеотид

-C-A-G-C-T-

-G-T-C C-A-
A

-C-A-G-C-T-

-G-T-C-C-A-

Правилно
сдвоен

MMR

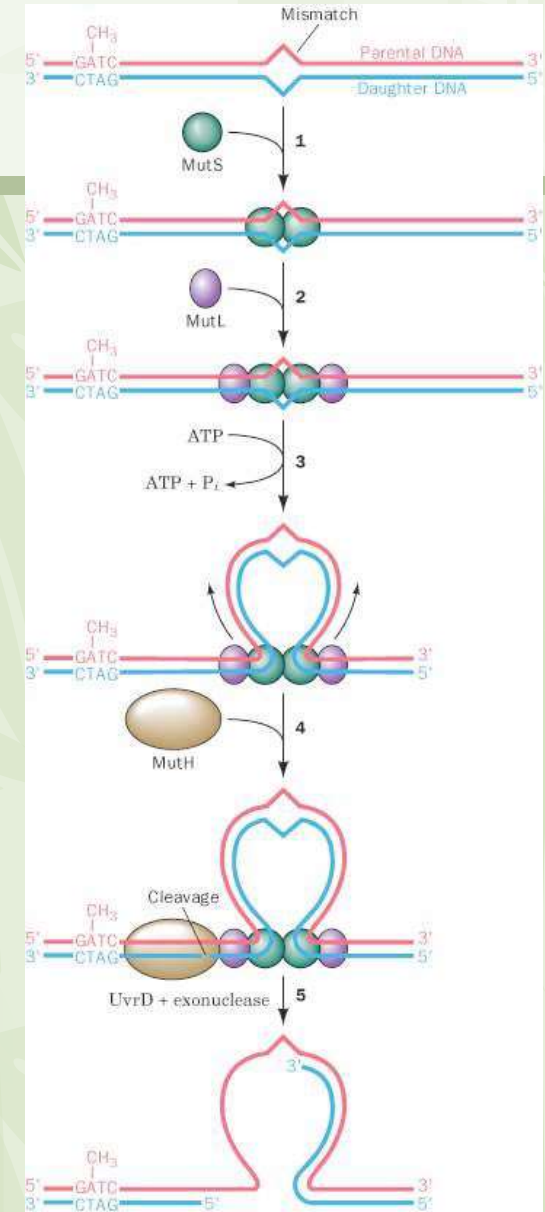
- MMR белтъците се комбинират като хетеродимери
- Разпознават и свързват грешно сдвоените бази
- АТФ консумация
- Въвличат и други белтци
- Разделят, разрушават и синтезират на ново ДНК верига – **новосинтезираната** верига
- Механизмът възстановява около 20 нд

MMR белтъци

- MutS α (MSH2-MSH6)
 - ГТ грешки и къси (1 base pair) бримки/делеции
- MutS β (MSH2-MSH3)
 - По-големи MMR белтъци
- MSH2 загуба обуславя висок риск за рак

MMR при *E. coli*

1. MutS свързва некомплементарната двойка като димер
2. MutS-DNA свързва MutL
3. MutS-MutL сканира ДНК за хемиметилиранани GATC и привлича MutH
4. Разкъсване на неметилираната част
5. UvrD разделя двете вериги
6. Екзонуклеаза разгражда вергата
7. Pol III попълва ника
8. Лигаза възстановява фосфодиестерната връзка



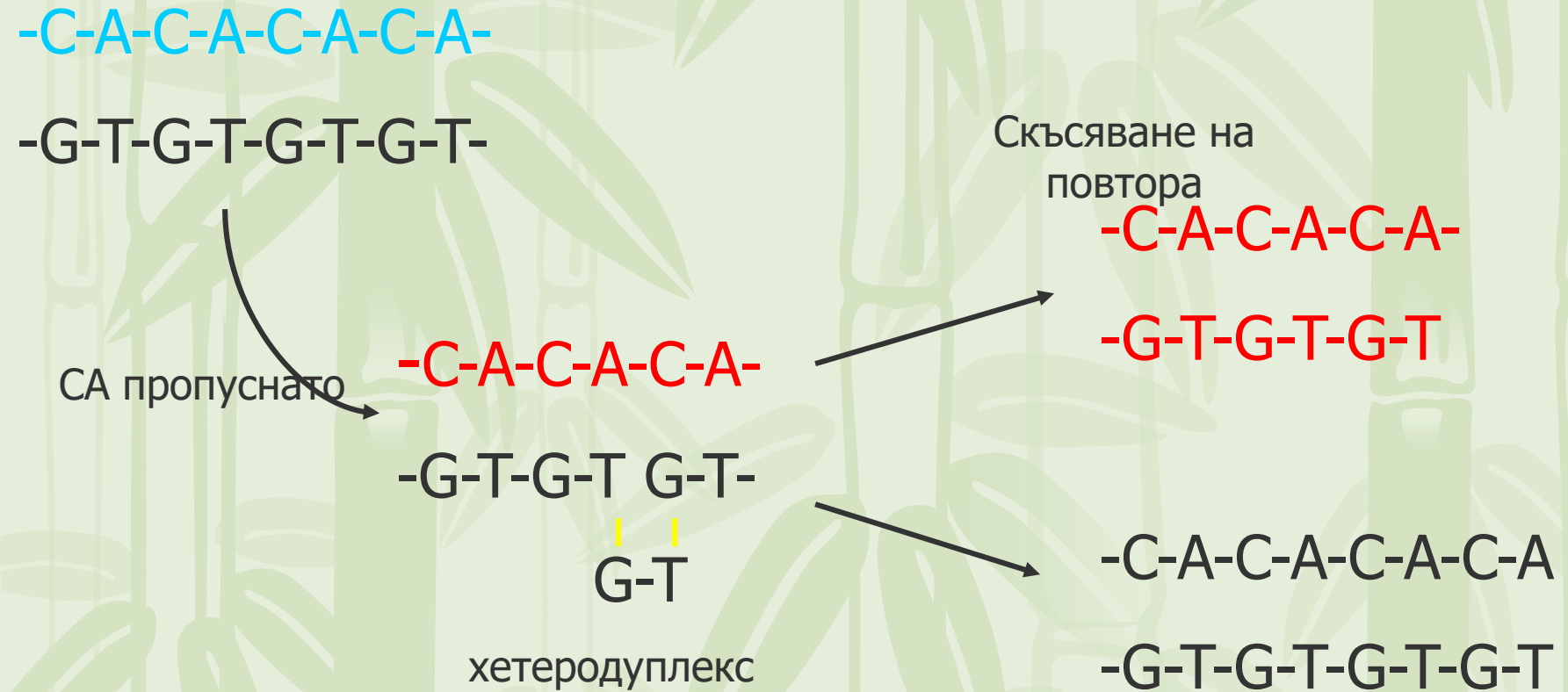
Други MMR белтъци

- ДНК лигаза
- Репликационен протеин А
- Репликационен фактор С
- Пролифериращ клетъчен ядрен агент (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
- Екзонуклеази
- ДНК полимераза δ

Дефекти при MMR

- Дефекти в гените за MMR и функцията им предизвикват:
 - Микросателитна нестабилност
 - Рак

Микросателитна нестабилност



Дефекти при MMR

- Липса или нефункциониращи белтъци
- “Мутантен фенотип” със загуба на капацитета за поправка на грешно сдвоени бази mismatch repair capacity
- “Доминантно негативен ефект”
 - Дефектни протеини ссвързват нормални, формират се хетеродимери
 - 90% от колоректалните карциноми
 - 30% от рак на утеруса

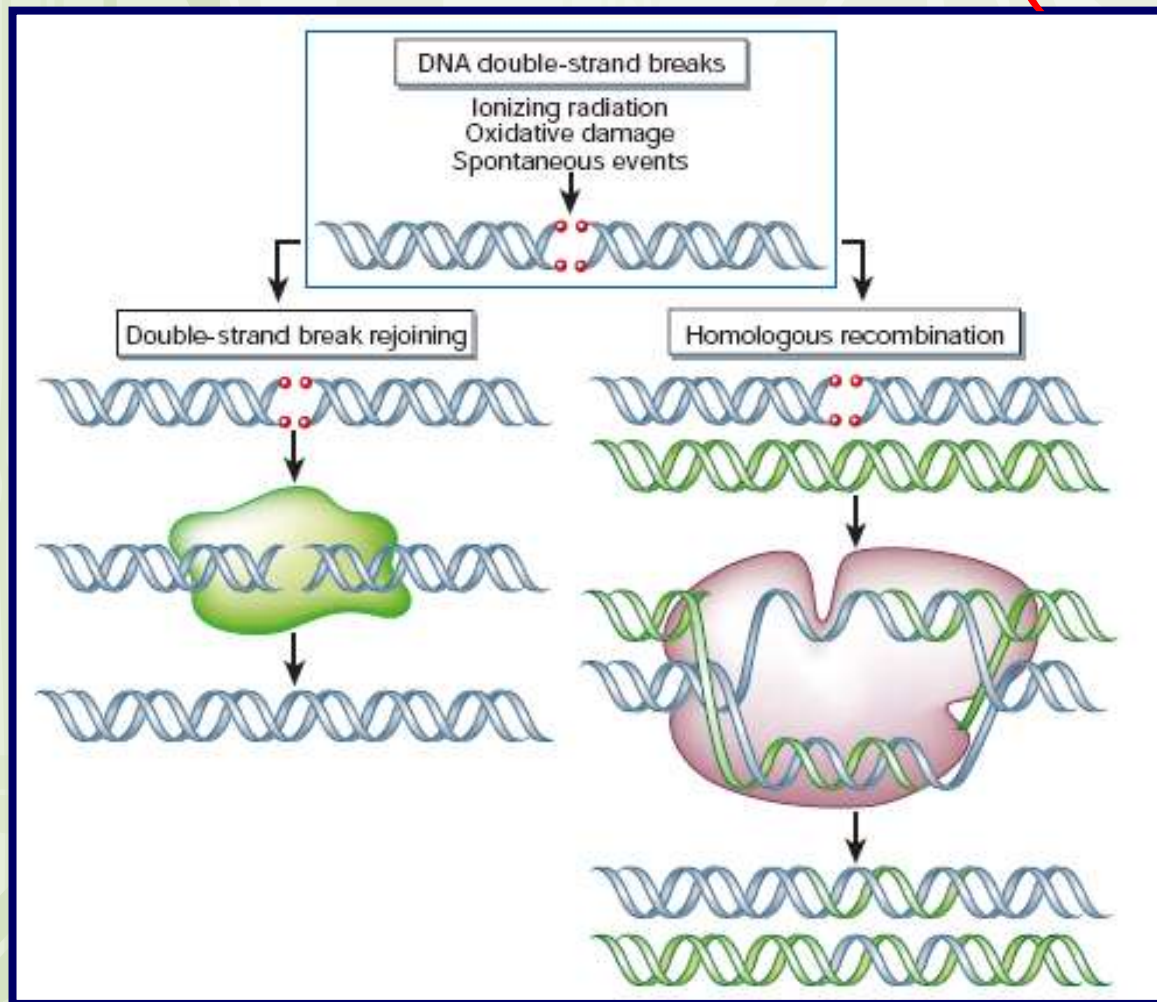
New! Werner syndrome

- Werner синдром, рядка наследствена болест изразяваща се в преждевременно стареене. Хората с този синдром с голяма вероятно заболяват от рак, сърдечносъдови болести, диабет. Умират в ранна възраст, около 40. Установени са множество мутации в тяхната ДНК.
- Тези факти подкрепят теорията за стареене, дължащо се на натрупващите се с възрастта мутации.
- Генът, участващ при синдрома на Werner е идентифициран през 1996. Установено е, че кодира ензим, участващ в репарацията. Хората с тази мутация натрупват мутации ...
- Ензимът или липсва или не е функциониращ. Генът е *WRN*, в 8 хромозома. Кодиращ ензим с централен домен, наподобяващ RecQ хеликази. Тези хеликази участват при **репарацията на двойноверижни скъсвания в ДНК**. In addition to the central domain, there are three exonuclease domains in the N-terminus region and a ribonuclease D localized in the C-terminus region.
- Мутация на друг протеин, кодиран от ген **BRCA1** е причина за наследствен рак на млечната жлеза.

Поправки на двойно-верижни скъсвания (DSBs)

- Обикновено ги предизвикват реактивните кислородни радикали, йонизираща радиация. Трябва да се поправят, за да се запази геномния интегритет.
- DSBs са част от нормални процеси като репликация, мейоза, митоза и сайт-специфична рекомбинация при узряването на лимфоцитите.
- Ако не се поправят DSBs са летални за клетките. Няколко механизма са установени.
- Един от тях се основава на рекомбинацията по време на мейозата. За матрица се използва неувредената хомоложна хромозома.

Поправки на двойно-верижни скъсвания (DSBs)

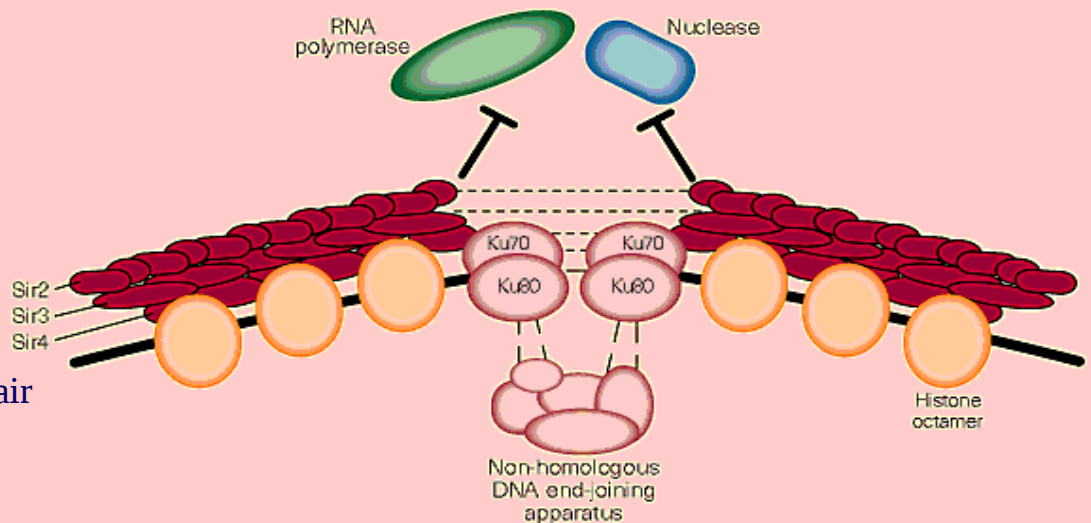


- Два начина

1. Нехомолжно сдвояване на скъсаните краища (в ляво)
2. Хомоложна рекомбинация със сестринските хромозоми (в дясно)

DSBs repair

- **Нехомоложното сдвояване** изисква мултипротеинен комплекс. Централна роля имае **Ku** **протеин**, хетеродимер, който захваща скъсаните краища
- Други белтъци съединяват краищата, но със загуба на нуклеотиди (делеция).
- DSB поправката включва предотвратяване на транскрипцията и разграждане на дефектната ДНК от нуклеази.



- Genomic stability: Silencing and DNA repair connect
- Stephen P. Jackson
- *Nature* **388**, 829-830(28 August 1997)