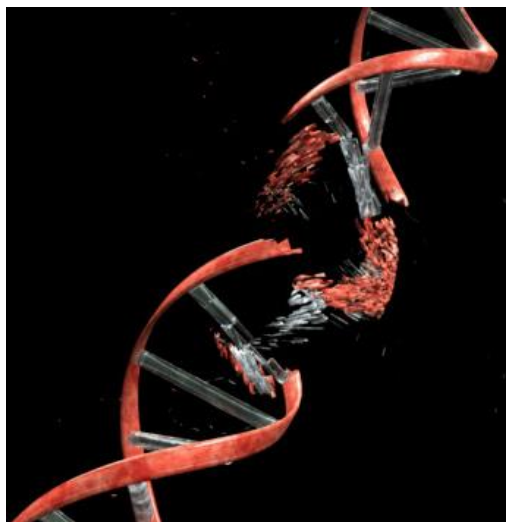


Как мы сами портим свои гены и как природа пытается их «починить». Системы репарации ДНК

проф. Кубарева Елена Александровна

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ



Мутация (лат. *mutatio*) – устойчивое изменение
в последовательности ДНК
(Хуго де Фриз, 1901 г.)

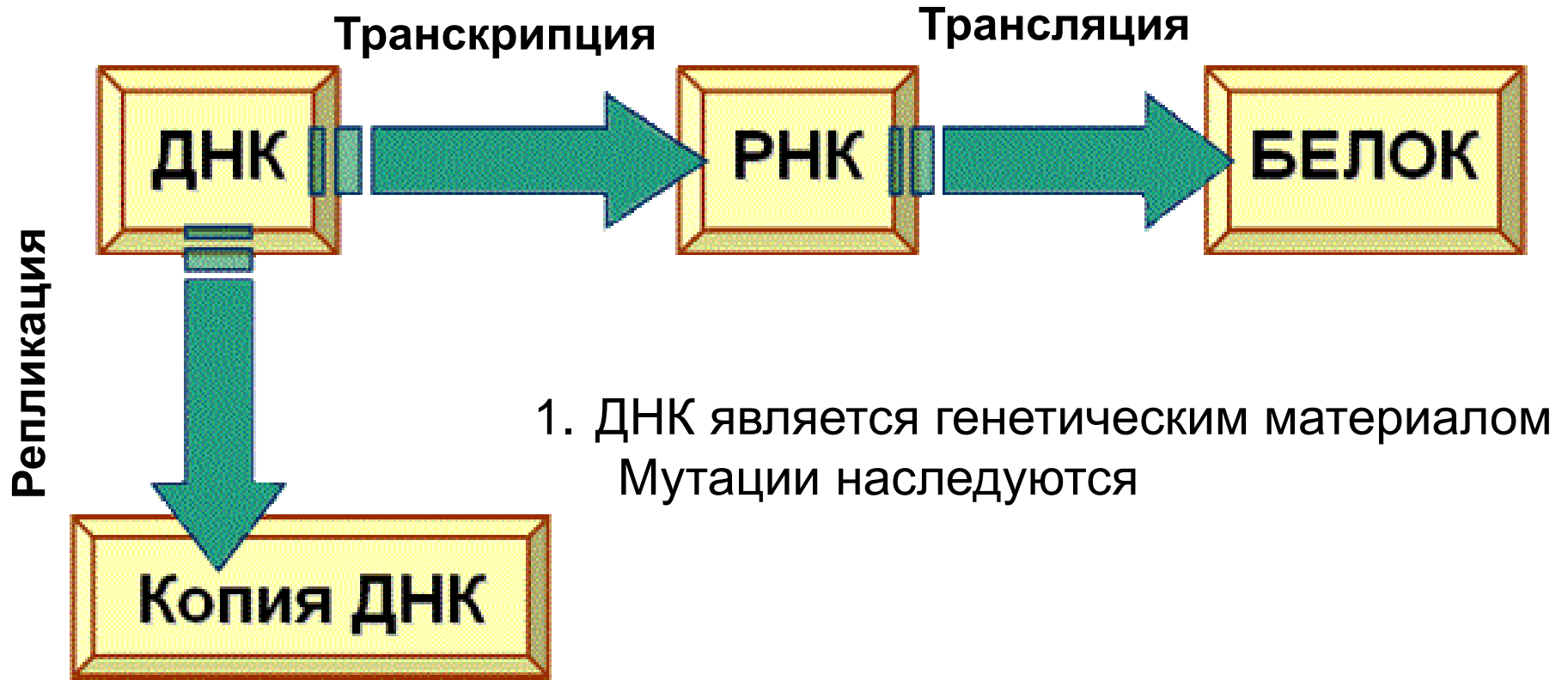
Мутагенез – процесс возникновения мутаций



План лекции

1. Типы мутаций
2. Факторы, приводящие к возникновению мутаций
3. Пути исправления ошибок в ДНК
4. Некоторые примеры заболеваний, вызванных мутациями

Центральная догма молекулярной биологии



2. Мутантная последовательность ДНК передается молекуле РНК
3. Видоизменённая последовательность РНК может при трансляции дать изменённый белок

Классификация мутаций по последствиям

Хорошие

Мутации могут улучшить выживаемость организма. Например, мутации в гене, определяющем возникновение серповидно-клеточной анемии, приводят к повышению устойчивости организма к малярии

Плохие

Мутации приводят к значительному вреду или гибели организма. Например, мутации в гене, определяющем свертываемость крови, вызывают гемофилию

Молчащие или нейтральные

Мутации не оказывают никакого влияния

Синтез белка

Рамка считывания

Второй нуклеотид

Первый нуклеотид

Третий нуклеотид

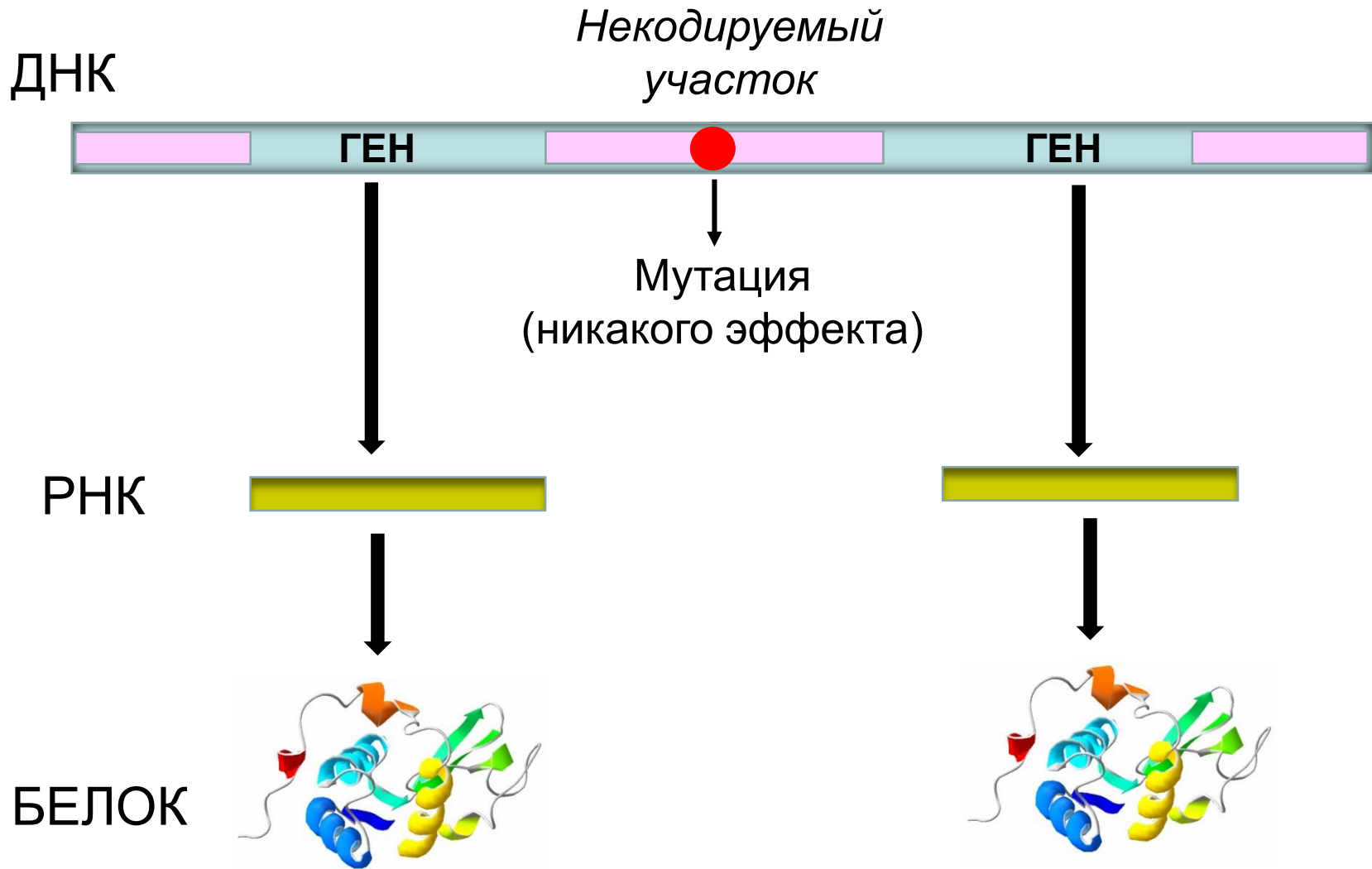
Кодон - единица генетического кода, три нуклеотидных остатка в РНК (триплет), обычно кодирующих включение одной аминокислоты

Рамка считывания - последовательность триплетов нуклеотидов внутри гена

		U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	stop	UGA	stop	A
	UUG		UCG		UAG	stop	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

Молчащие мутации

Изменения в некодирующей ДНК на участке между генами



Молчащие мутации

Мутации внутри интрона

ДНК

ИНТРОН

ИНТРОН



СПЛАЙСИНГ



РНК



ТРАНСЛЯЦИЯ



БЕЛОК

(никаких
изменений)



Гемофилия

Нормальный ген

экзон 3

экзон 4

ген ... CAG TAT GTTG **gt**aaagca...ctatctca**Aag** AT GGA TAT CAG TGT GAG TCC AAT...

мРНК ...CAG UAU GUU GAU CGA GAU CAG UGU GAG UCC AAU CCA UGU UUA...

белок Gly Tyr Val Asp Gly Asp Gly Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu...



Зловредный ген королевы Виктории

экзон 3

экзон 4

ген ... CAG TAT GTTG **gt**aaagca...ctatctca**aG** AG AT GGA GAT CAG TGT GAG TCC AAT



мРНК ...CAG UAU GUU **GAG AUG GAG AUC AGU GUG AGU CCA AUC CAU GUU UAA...**

белок ... Gly Tyr Val **Glu Met Glu Ile Ser Val Ser Pro Ile His Val Stop**

Типы мутаций в ДНК

1. Динамические мутации

2. Мутации со сдвигом рамки считывания

Делеции

Вставки

3. Мутации без сдвига рамки считывания

Единичные замены нуклеотидов

простые (транзиции)

пурин → пурин

пиримидин → пиримидин

Инверсии

сложные (трансверсии)

пурин ↔ пиримидин

4. Повреждения ДНК

Динамические мутации (прогрессирующие мутации)

1. Вызваны увеличением количества (экспансией) простых повторяющихся последовательностей в ДНК – тринуклеотидные повторы $(CGG)_n$, $(CTG)_n$, $(GAA)_n$
2. В ряду поколений обычно наблюдается увеличение количества повтора

ЭКСПАНСИЯ ТРИНУКЛЕОТИДНОГО ПОВТОРА $(CGG)_n$

Синдром Мартина-Белл (синдром ломкой X-хромосомы)

Наиболее часто встречающаяся форма задержки психического развития (1 : 5000)

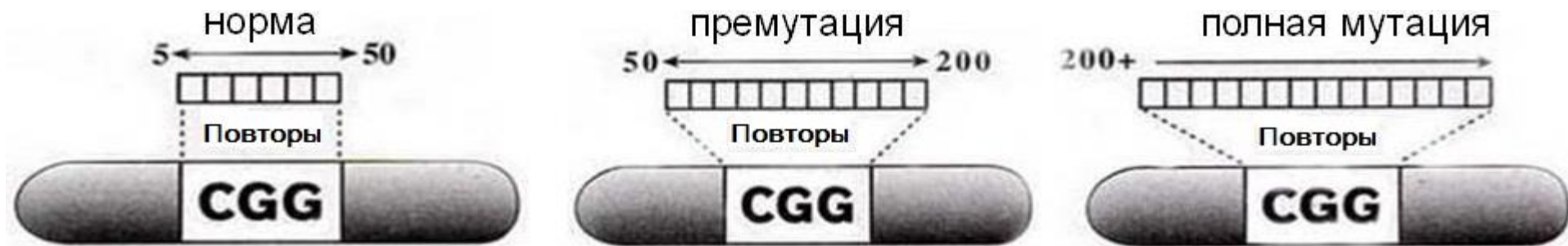
Симптомы проявляются в подростковом возрасте: проблемы обучения, низкий интеллект, удлинённое лицо с оттопыренными ушами

Передача заболевания по материнской линии, тяжесть заболевания возрастает в ряду поколений

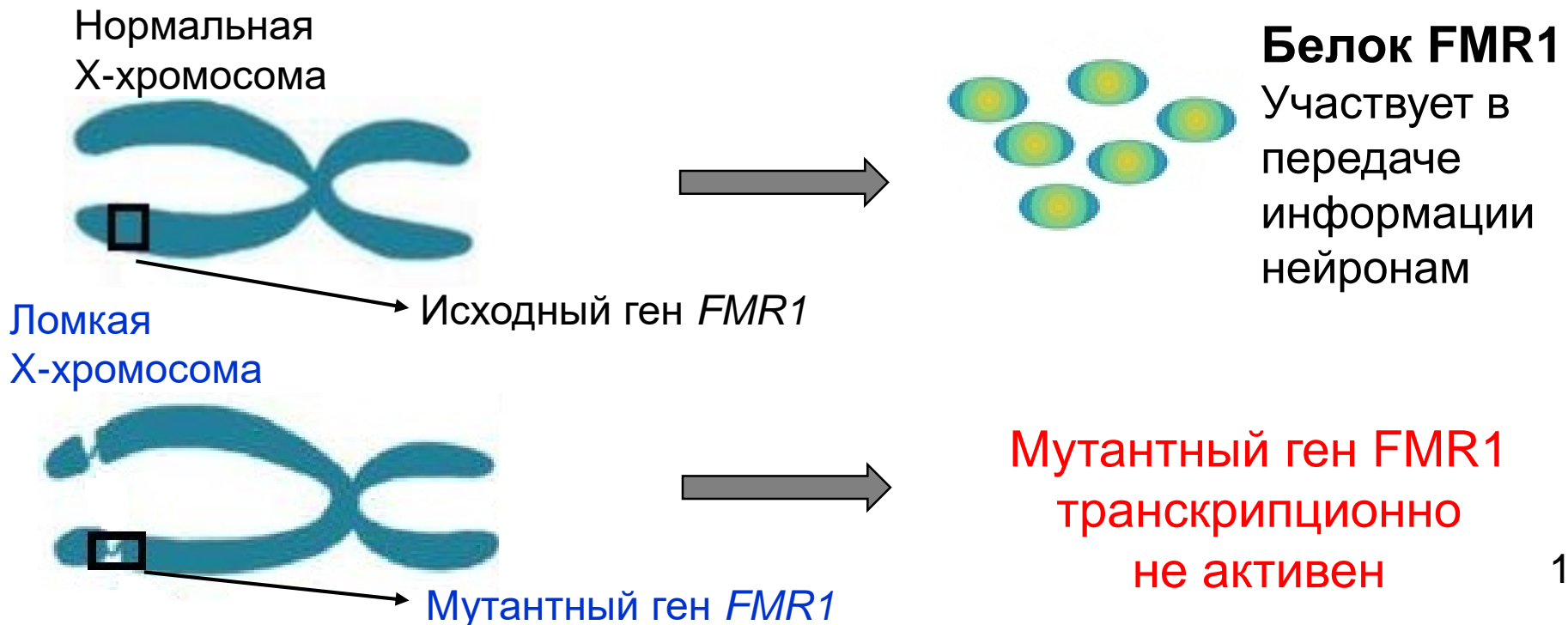


ЭКСПАНСИЯ ТРИНУКЛЕОТИДНОГО ПОВТОРА (CGG)_n

Синдром Мартина-Белл (синдром ломкой X-хромосомы)



Тяжесть симптомов наследственного заболевания зависит от длины повтора



Мутации со сдвигом рамки считывания

Делеции и Вставки (Инсерции)

Исходная
РНК

GAG-GCC-GUA-AUC-GAA-UGU-UUG-GCA-AGG-AAA



Исходный
белок

Glu - Ala - Val - Ile - Glu - Cys - Leu - Ala - Arg - Lys

Удаление одного нуклеотида

Мутантная
РНК

GAG-GCC-G ● A-AUC-GAA-UGU-UUG-GCA-AGG-AAA

Сдвиг рамки считывания

GAG-GCC-GAA-UCG-AAU-GUU-UGG-CAA-GGA-AA

Мутантный
белок

Glu - Ala - Glu - Leu - Asn - Val - Trp - Gln - Gly ----

Мутации со сдвигом рамки считывания

Болезнь Тея-Сакса (*ранняя детская идиотия*) - наследственное заболевание центральной нервной системы

Причина: вставка 4 нуклеотидов в гене HEXA, который кодирует α -субъединицу фермента **гексозаминидазы А**

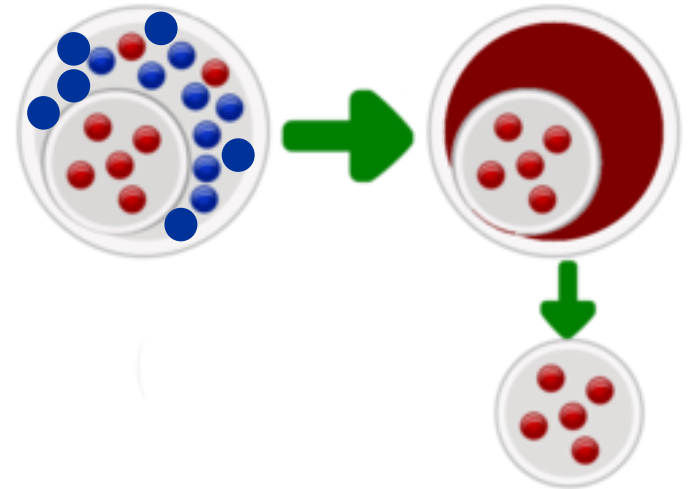
Исходный белок	...- Arg - Ile - Ser - Tyr - Gly - Pro - Asp - ...
РНК	...CGU-AUA-UCC-UAU-GCC-CCU-GAC-...
Мутантная РНК	...CGU-AUA-UCU-AUC-CUA-UGC-CCC-UGA...
Мутантный белок	...- Arg - Ile - Ser - Ile - Leu - Cys - Pro - Stop

Вставка

Отсутствие фермента приводит к накоплению **ганглиозидов** в нейронах мозга, нарушая их работу

Эффект «основателя» и «бутылочное горлышко»

Эффект «основателя» – явление снижения генетического разнообразия при заселении малым количеством представителей рассматриваемого вида новой географической территории



Эффект «бутылочного горлышка» – сокращение генофонда популяции в результате критического уменьшения численности по разным причинам

Исходная популяция



Популяция, прошедшая через бутылочное горлышко

Результат:

накопление генов, характерных для случайно выживших индивидуумов, а не для исходной популяции

Мутации без сдвига рамки считывания

Делеции и Вставки

Исходная
РНК

GAG-GCC-GUA-AUC-GAA-UGU-UUG-GCA-AGG-AAA



Исходный
белок

Glu - Ala - Val - Ile - Glu - Cys - Leu - Ala - Arg - Lys

Удаление трех нуклеотидов

Мутантная
РНК

GAG-GCC-●●●-AUC-GAA-UGU-UUG-GCA-AGG-AAA

Нет сдвига рамки считывания

GAG-GCC-----AUC-GAA-UGU-UUG-GCA-AGG-AAA

Мутантный
белок

Glu - Ala ----- Ile - Glu - Cys - Leu - Ala - Arg - Lys

Отсутствует Val !

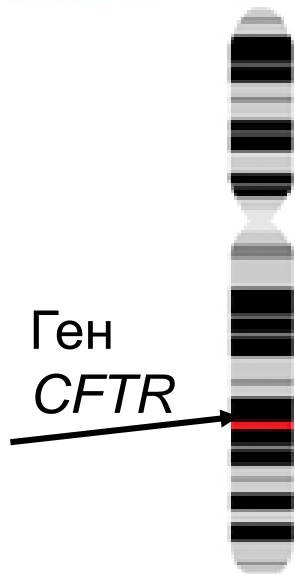
Муковисцидоз (кистозный фиброз) поражает экзокринные железы



густая мокрота
препятствует
дыханию



густая слизь
закупоривает протоки
поджелудочной железы
и желчного пузыря



Ген
CFTR

ДЕЛЕЦИЯ

...U - AUC- AUC-**UUU**-GGU-GUU...
- Ile - Ile - Phe - Gly - Val -

...U - AUC-AUU ----- GGU-GUU...
- Ile - Ile ----- Gly - Val -

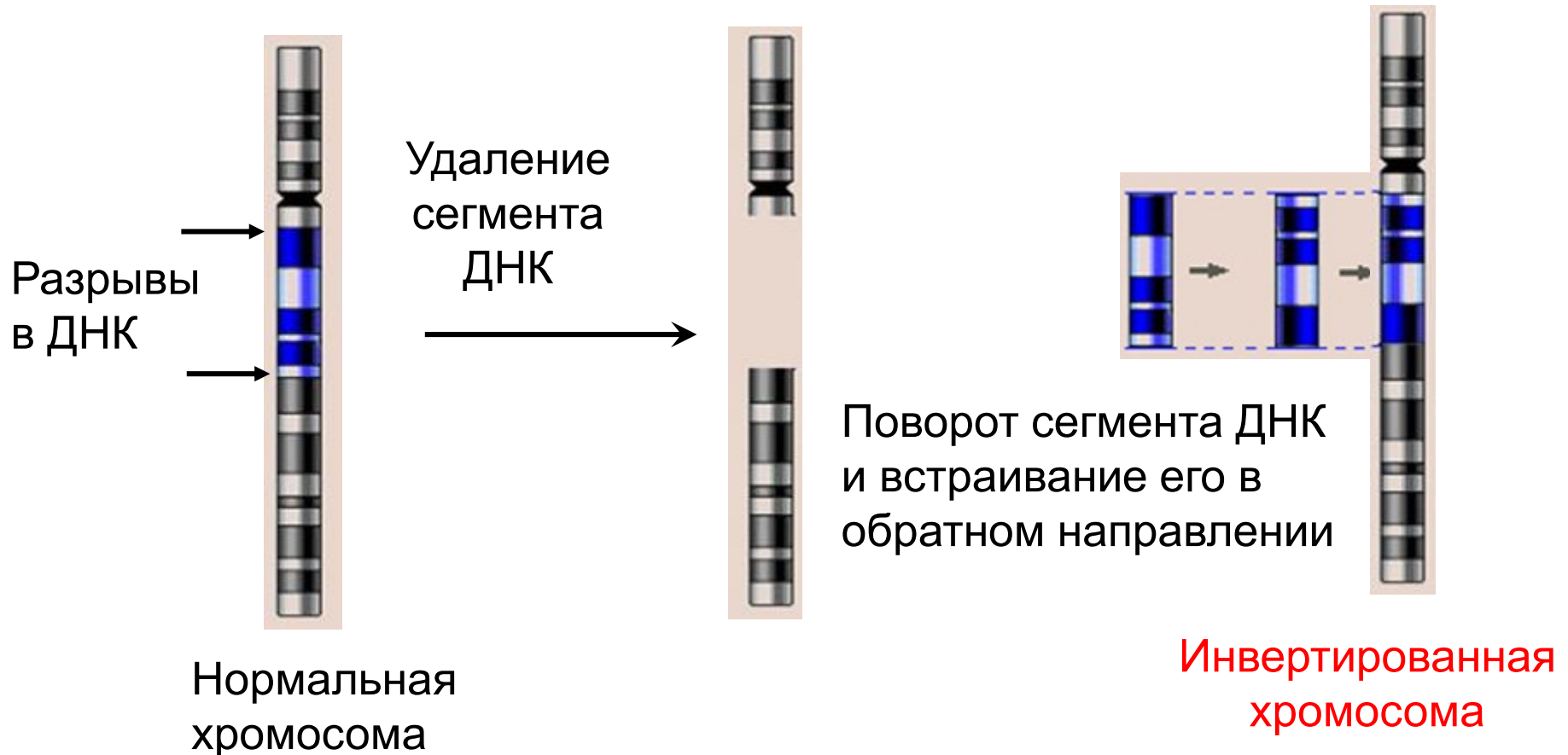
Отсутствует Phe

Белок CFTR – трансмембранный
регулятор проводимости

Мутации без сдвига рамки считывания

Инверсии

Изменения чередования генов в хромосоме за счет поворота участка хромосомы на 180 градусов



Мутации без сдвига рамки считывания

Единичные замены нуклеотидов или точечные мутации

Исходная
ДНК

Молчащая
(silent или
samesense)

Бессмысленная
(nonsense)

Изменение смысла
(missense)

консервативная радикальная

TTC

TT**T**

ATC

T**C**C

T**G**C

РНК

AAG

AA**A**

UAG

A**G**G

A**C**G

Lys

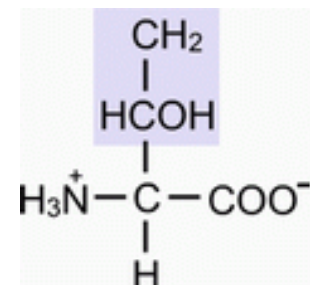
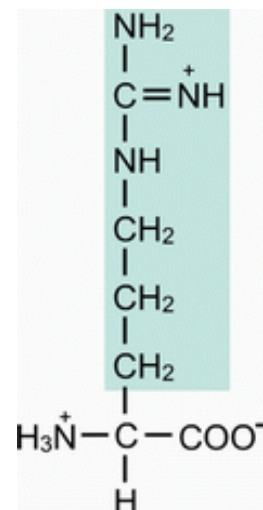
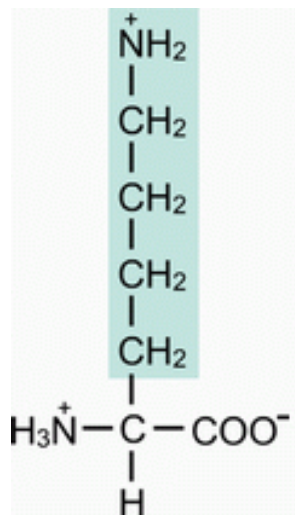
Lys

Stop

Arg

Thr

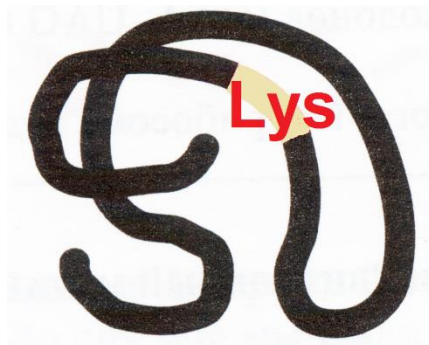
БЕЛОК



Единичные замены нуклеотидов или точечные мутации

Мутация с изменением смысла («миссенс»-мутация)

А. Консервативная замена



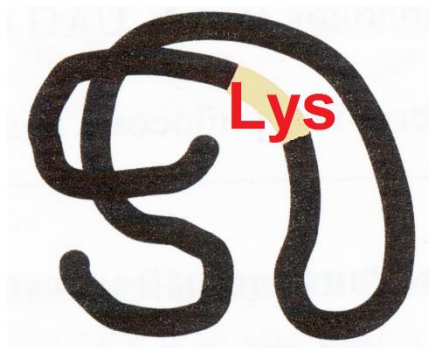
Исходный белок

AAG → A**G**G
Lys → **Arg**



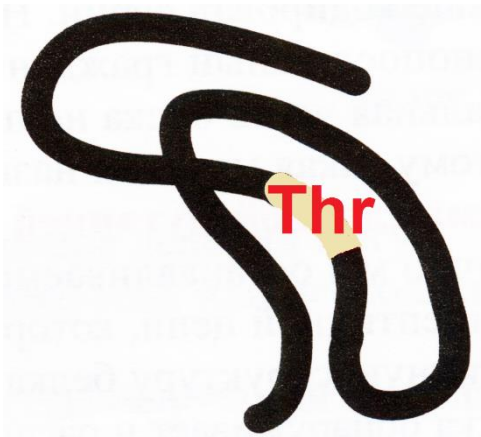
Мутантный белок
(та же третичная структура)

Б. Радикальная замена



Исходный белок

AAG → A**C**G
Lys → **Thr**



Мутантный белок
(другая третичная структура)

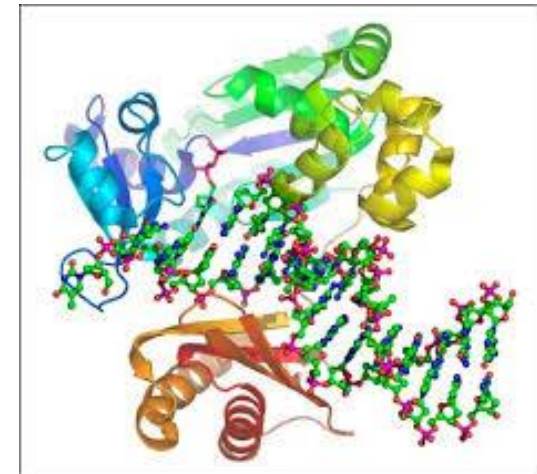
Причины возникновения мутаций

Спонтанные мутации

Ошибки репликации –
образование неканонических пар нуклеотидов («мисматчей»)

Вероятность «ошибок» ДНК-полимераз фагов, про- и эукариот

Объект	Вероятность замены на пару нуклеотидов
Фаг Т4	10^{-8}
Бактерия <i>E. coli</i>	10^{-10}
Муха дрозофила	10^{-11}

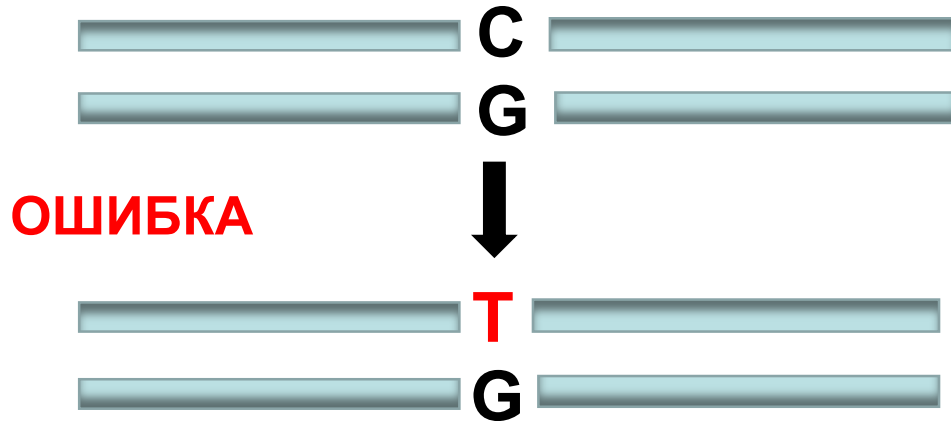


Разницу связывают со скоростью работы ДНК-полимеразы:
чем медленней, тем точнее!

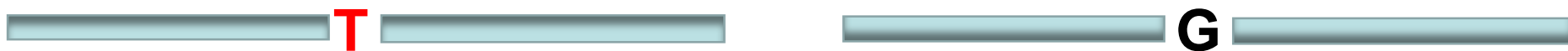
Причины возникновения мутаций

Ошибки репликации

21



Разделение цепей
при репликации



Синтез второй цепи



Мутантная ДНК

«Правильная» ДНК

Индукцированные мутации

Факторы, приводящие к возникновению предмутационных состояний и повреждений ДНК

Физические – различные виды ионизирующей радиации, рентгеновские лучи, ультрафиолетовое излучение, повышенная температура

Химические – токсичные химические соединения (мутагены), свинец, некоторые лекарственные препараты, пестициды, активные формы кислорода и др.

Биологические – вирусы оспы, кори, гепатита, гриппа и др.

«Горячие точки» – участки гена, наиболее подверженные изменениям

Основные типы повреждений в ДНК

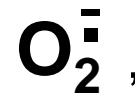
- Разрывы углеводофосфатного остова в цепях ДНК
- Поперечные сшивки между основаниями одной цепи или разных цепей ДНК
- Повреждения нуклеотидов

Разрыв цепей ДНК (разрыв хромосомы)

Нормальный
фрагмент
ДНК

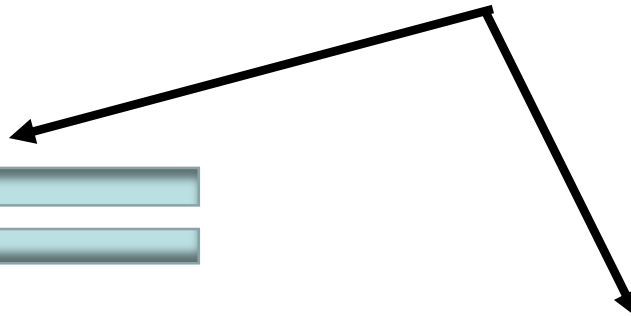


Ионизирующая радиация,
активные формы кислорода
(супероксиданион



радикал гидроксила

HO^{\cdot} , перекиси)



Разрыв
в одной цепи



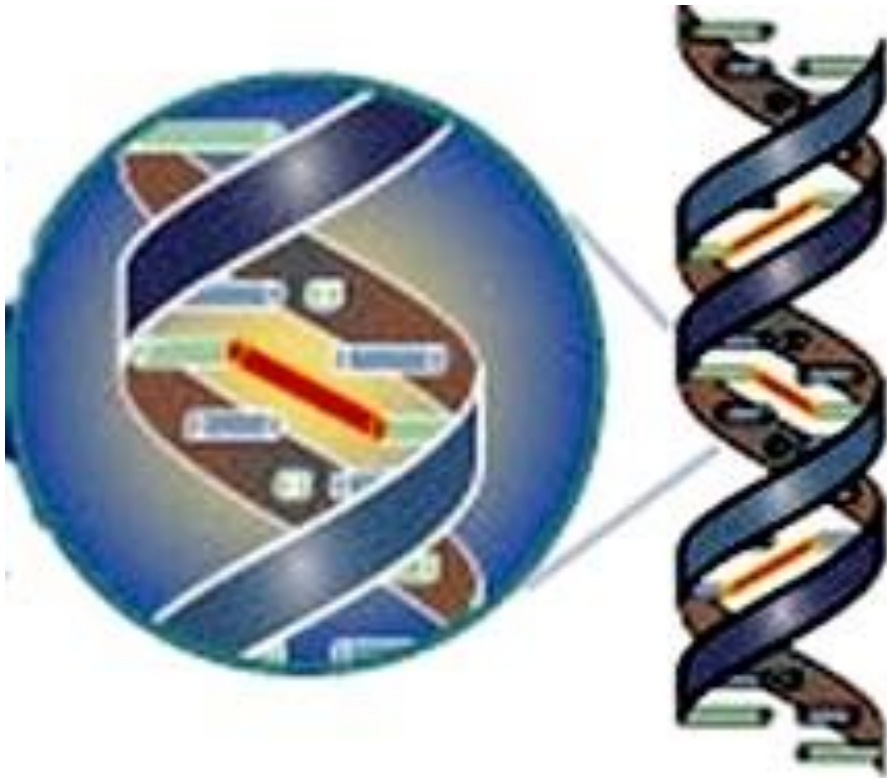
Разрыв в обеих цепях

Поперечные сшивки между цепями ДНК

Некоторые химические агенты приводят к образованию ковалентных связей между основаниями двух разных цепей ДНК:

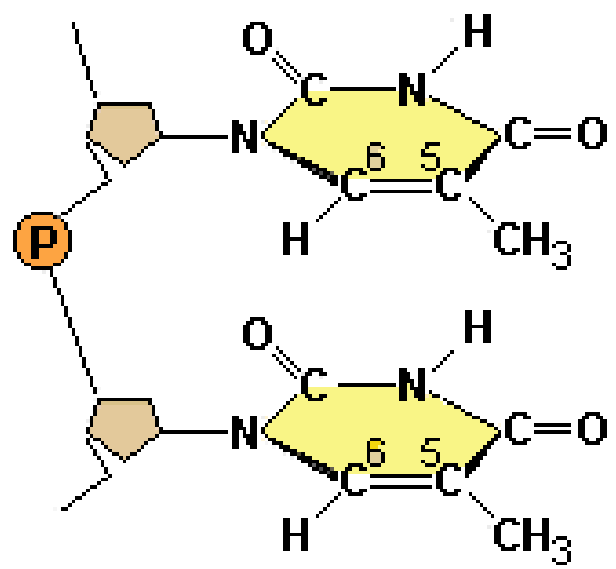
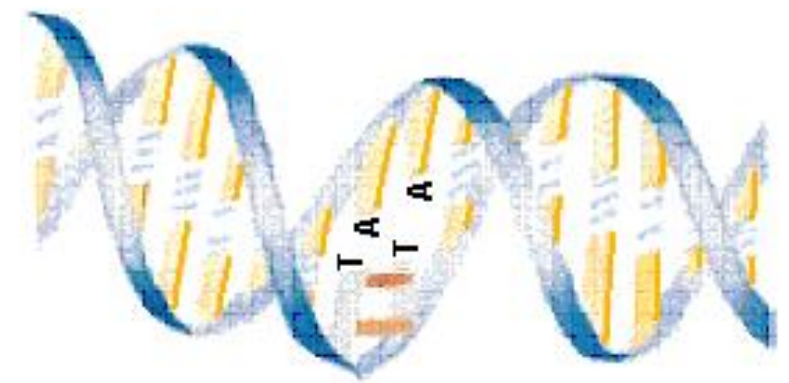
отравляющее вещество иприт - $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$,

препараты используемые в химиотерапии рака (цисплатин, циклофосфамид)

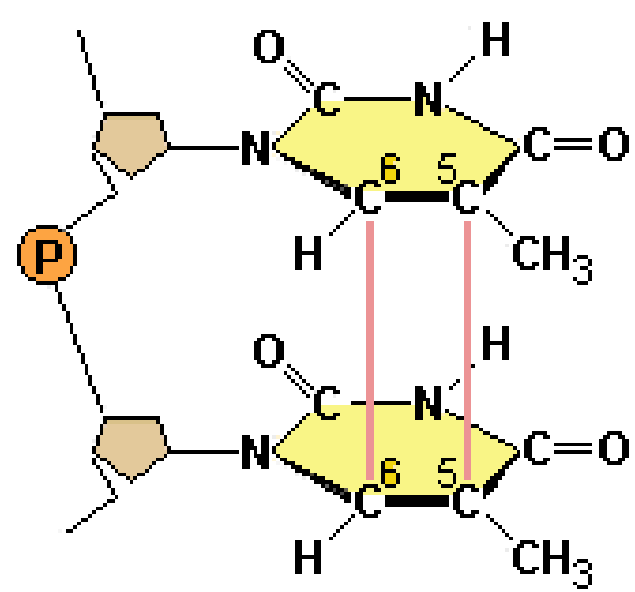


ДНК не может «расплетаться» в процессе репликации

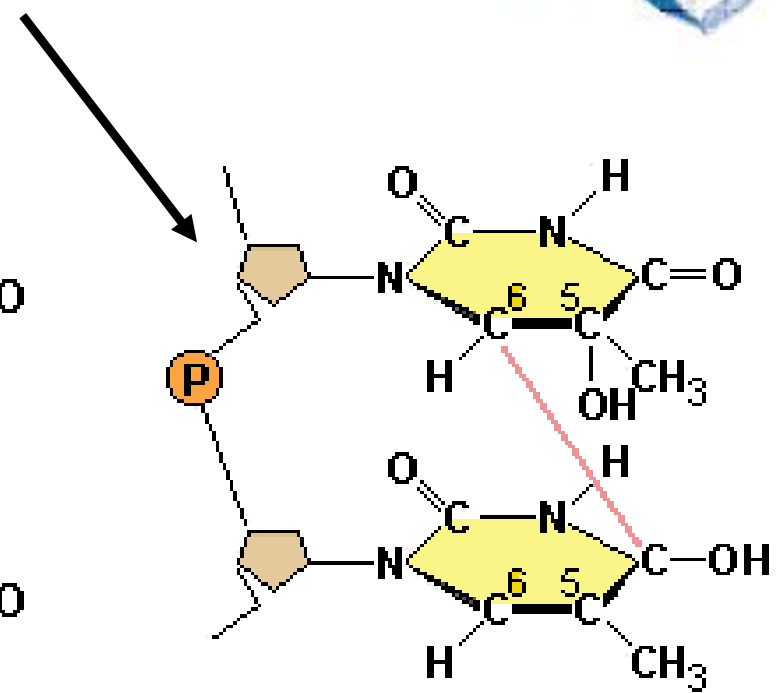
Поперечные
сшивки между основаниями одной цепи



УФ-облучение



Тиминовые димеры

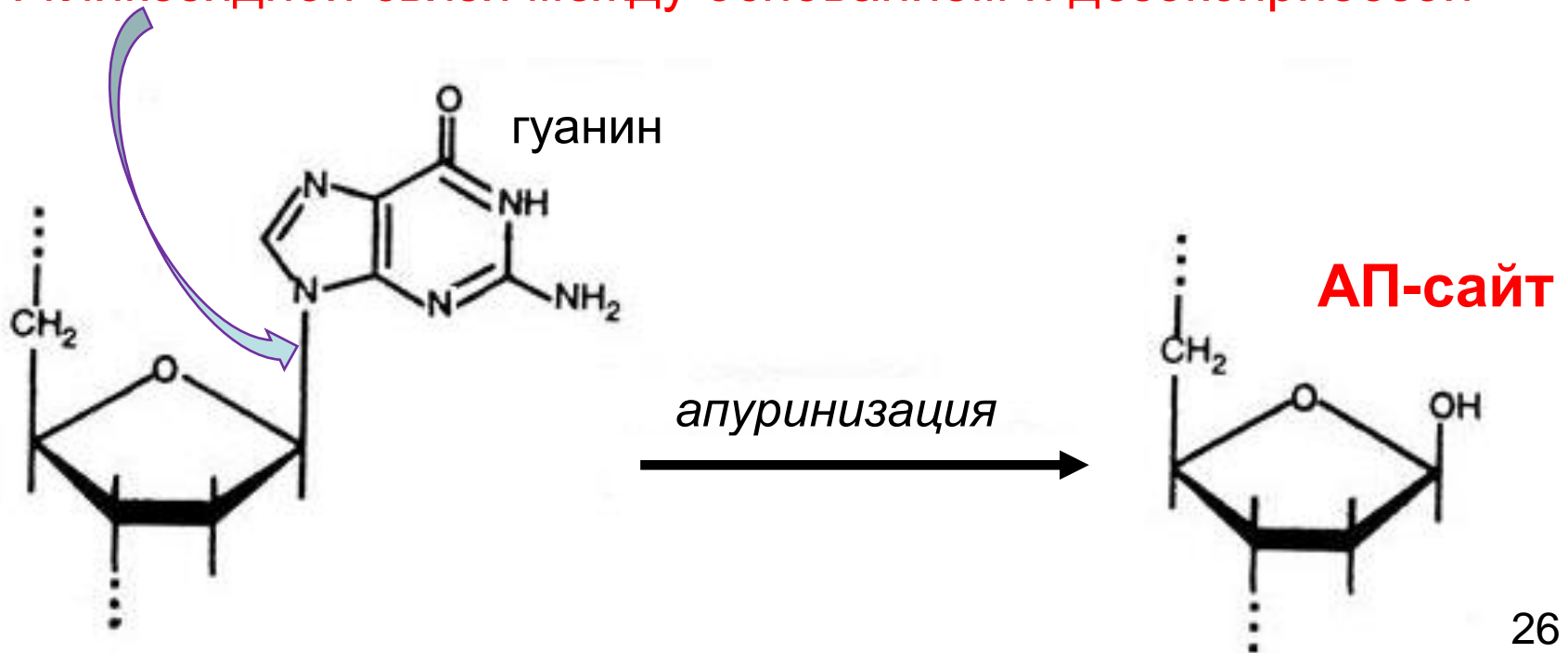


6-4-фотопродукт

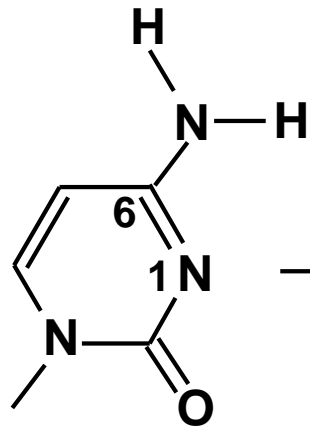
Повреждения нуклеотидов

- Апуринизация/апиримидизация нуклеотидов
- Дезаминирование гетероциклических оснований
- Алкилирование гетероциклических оснований
- Окисление гетероциклических оснований
- Образование аддуктов

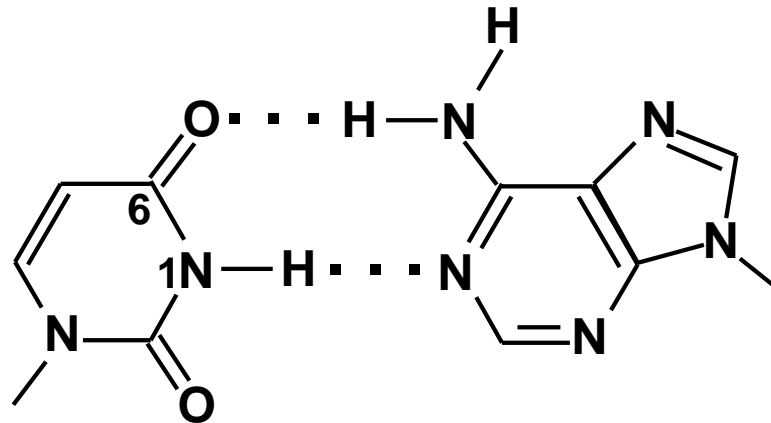
Апуринизация/апиримидизация нуклеотидов - гидролиз
N-гликозидной связи между основанием и дезоксирибозой



Дезаминирование гетероциклических оснований



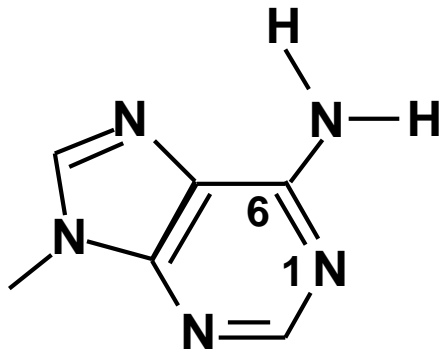
Цитозин



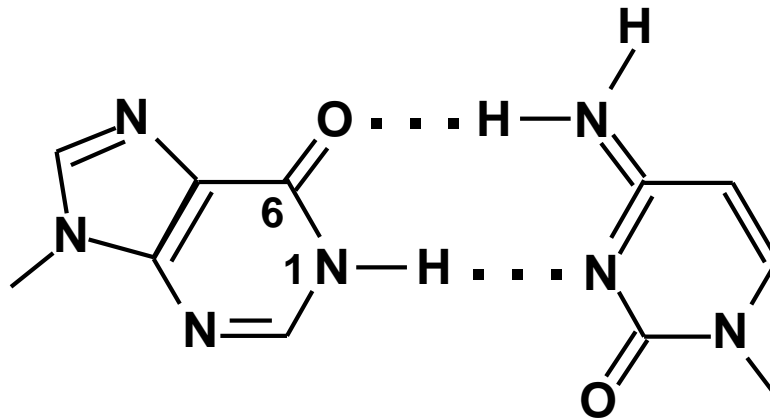
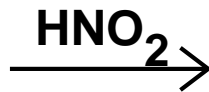
Урацил

Аденин

CG → **TA**



Аденин



Гипоксантин

Цитозин

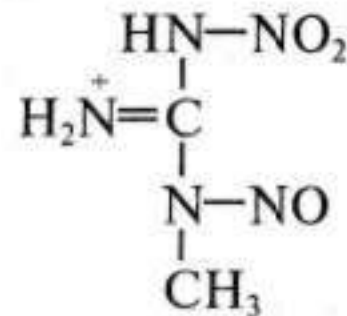
AT → **GC**

Алкилирование гетероциклических оснований

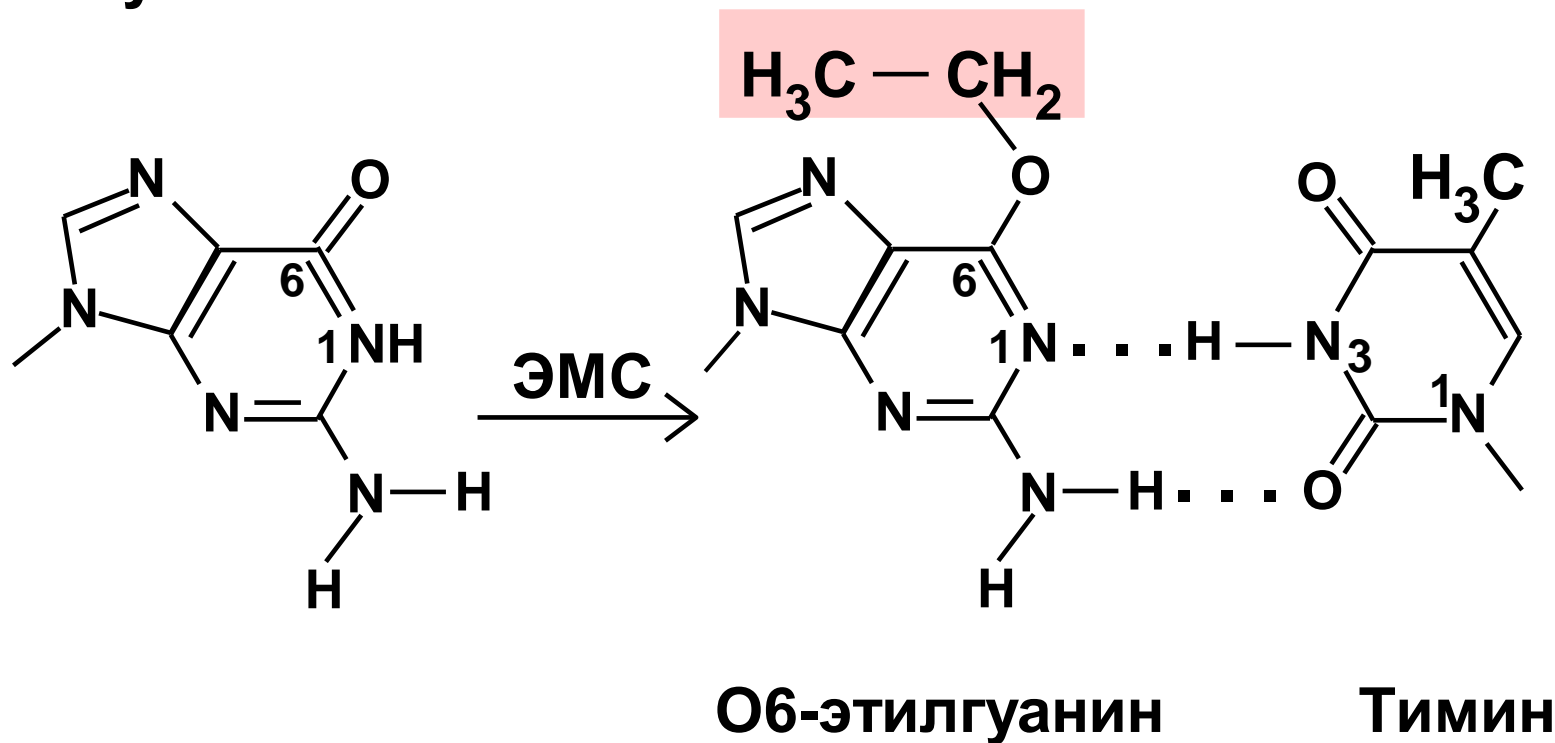
Алкилирующие агенты

N-метил-*N*-нитро-*N*-нитрозогуанидин:

этилметансульфонат (ЭМС): $\text{CH}_3\text{CH}_2 - \text{O} - \text{SO}_2 - \text{CH}_3$



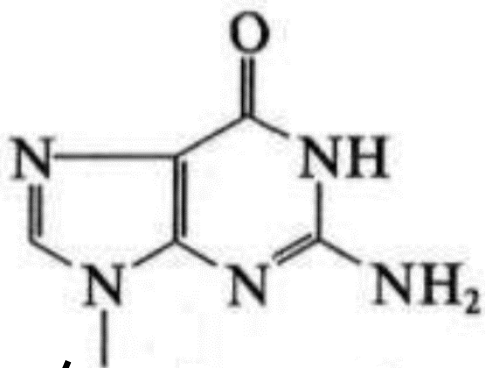
Гуанин



Пара GC заменяется на AT

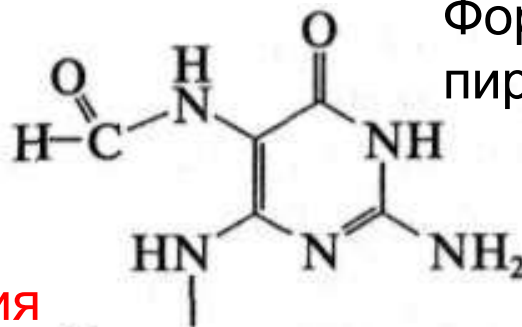
Окисление гетероциклических оснований

Гуанин



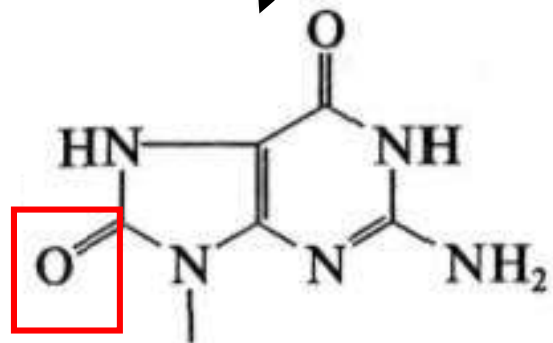
Активные
формы
кислорода

трансерсия



Формаамидо-
пиримидин

Активные
формы
кислорода

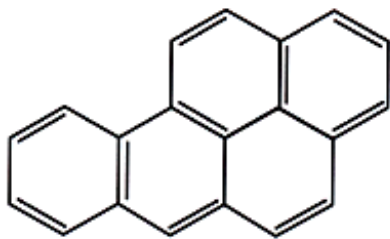


8-оксогуанин (8-охоG)

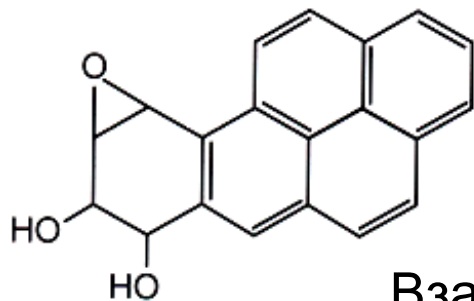


Образование аддуктов между полициклическими ароматическими соединениями и ДНК

Бензопирен



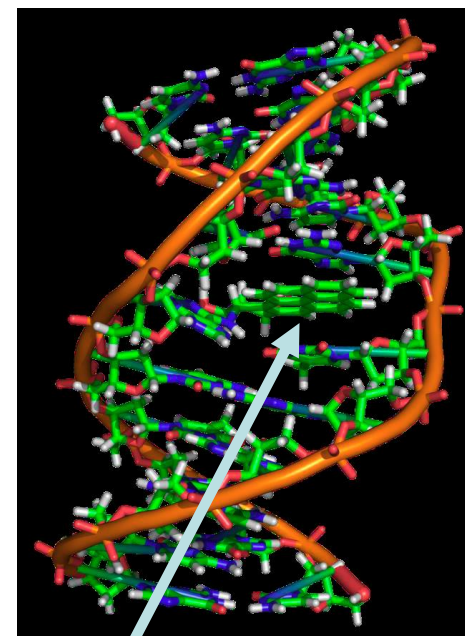
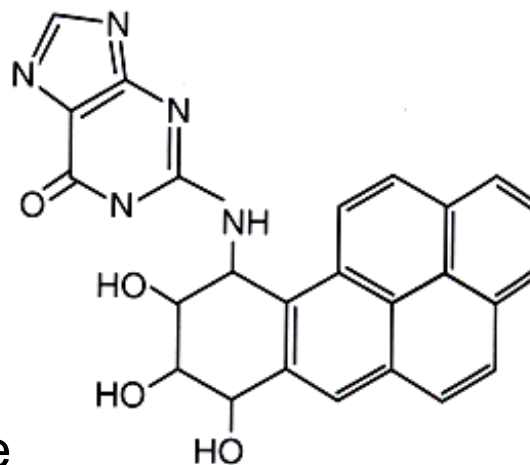
Окисление



Взаимодействие
с гуанином в ДНК



Гуанин



Аддукт гуанина
с бензопиреном

Как мы можем повлиять на свои гены и гены нашего потомства?

1. Избегать УФ-света, контактов с радиацией, строго дозировать рентгеновское облучение
2. Следить за питанием, за приемом лекарственных препаратов
3. Избегать табачного дыма (полициклические ароматические углеводороды, гетероциклические амины, альдегиды, активные окислительные метаболиты, генерирующие свободные радикалы и др.)
4. Знать наличие генетических заболеваний в родословной
5. Исключить родственные браки
6. Получать медико-генетическую консультацию при планировании беременности

ДНК является единственной молекулой, которая способна к репарации

Для клетки характерно:

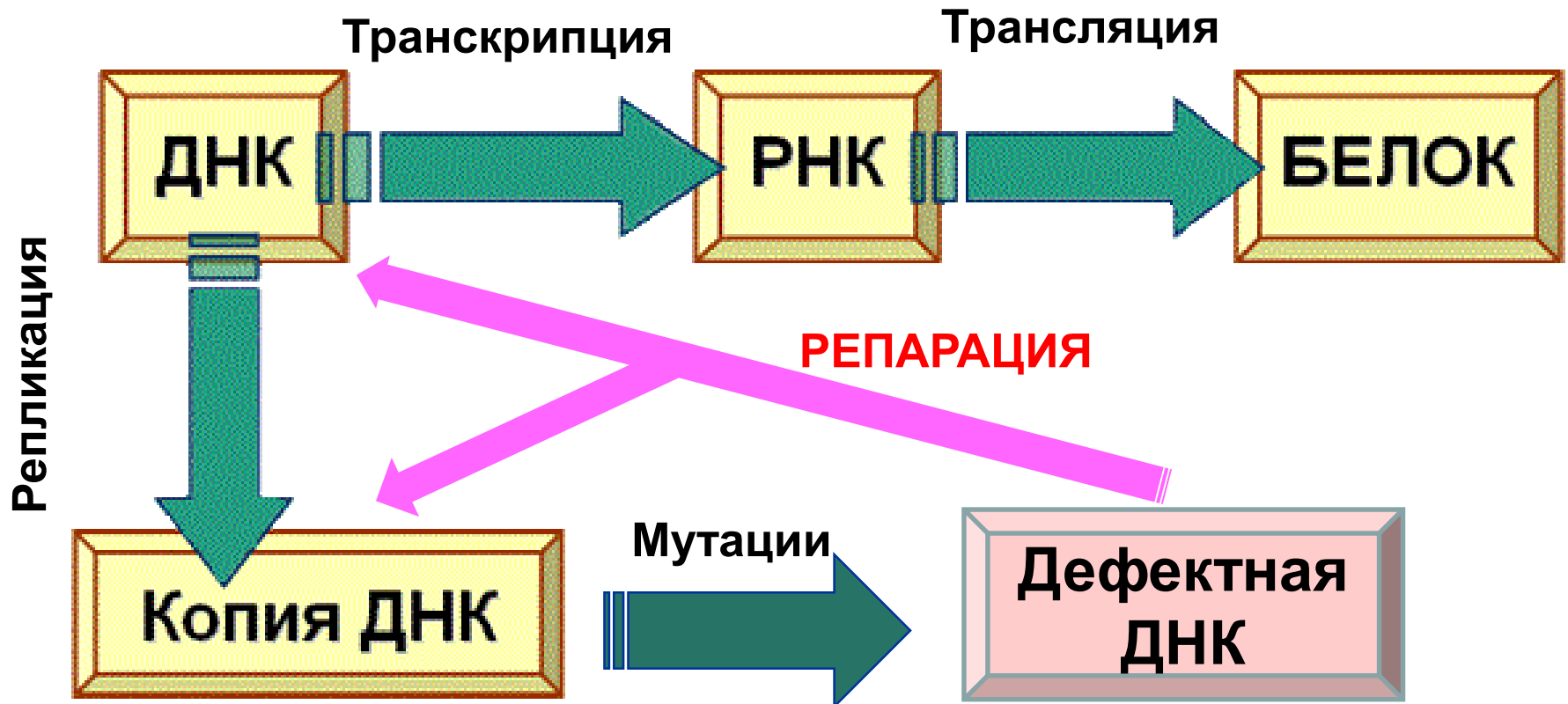
- присутствие белков, специально «патрулирующих» ДНК и осуществляющих поиск дефектов
- наличие большого числа систем репарации

Ежедневно у человека возникает около 50 тыс. одноцепочечных разрывов, более 8 тыс. окисленных и алкилированных оснований, около 100 сложных повреждений (двухцепочечные разрывы, межмолекулярные ковалентные сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок)

Благодаря наличию в клетке систем репарации из 1000 повреждений ДНК различного типа лишь одно приводит к мутации

Биологический смысл процессов репарации

Устранение повреждения в молекулах ДНК и предотвращение образования наследственно закрепленных мутаций

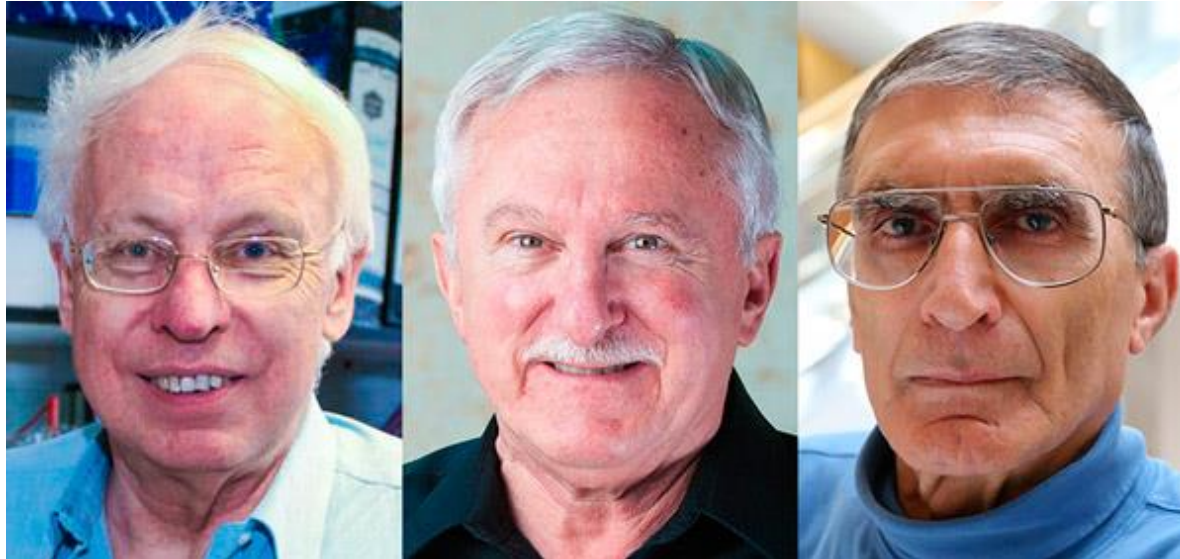


Нобелевская премия по химии 2015 года:
«за исследование механизмов репарации ДНК»

Томас Линдал

Пол Модрич

Азиз Санджар



*В большинстве систем репарации неповрежденная цепь служит матрицей для восстановления целостной молекулы ДНК
Системы репарации ДНК достаточно консервативны в эволюции от бактерий до человека и наиболее изучены у *E. coli**

Основные типы репарации

1. Прямое исправление повреждений

- 3'-5'-корректирующая активность ДНК-полимеразы во время репликации
- репарация одноцепочечных разрывов ДНК с участием ДНК-полинуклеотидлигазы
- репарация метилированных оснований с участием метилтрансфераз
- ферментативная фотореактивация ДНК

2. Эксцизионная репарация

- эксцизионная репарация оснований (BER)
- эксцизионная репарация нуклеотидов (NER)
- репарация некомплементарных пар нуклеотидов (MMR)

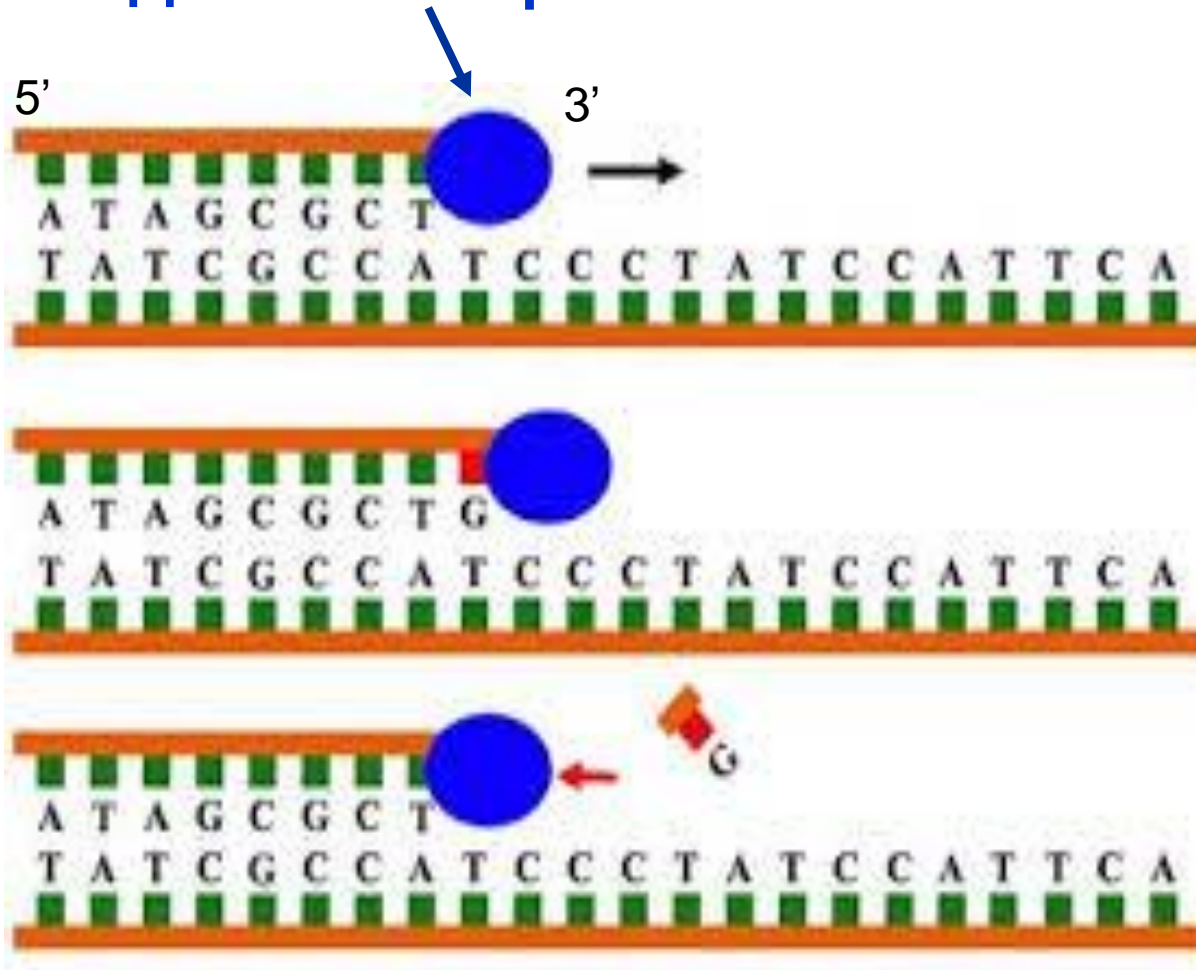
3. Пострепликативная репарация или репарация с участием систем рекомбинации (процесса обмена генетическим материалом путем разрыва и соединения разных молекул ДНК)

4. SOS-репарация

Прямая репарация

Корректирующая активность ДНК-полимеразы во время репликации

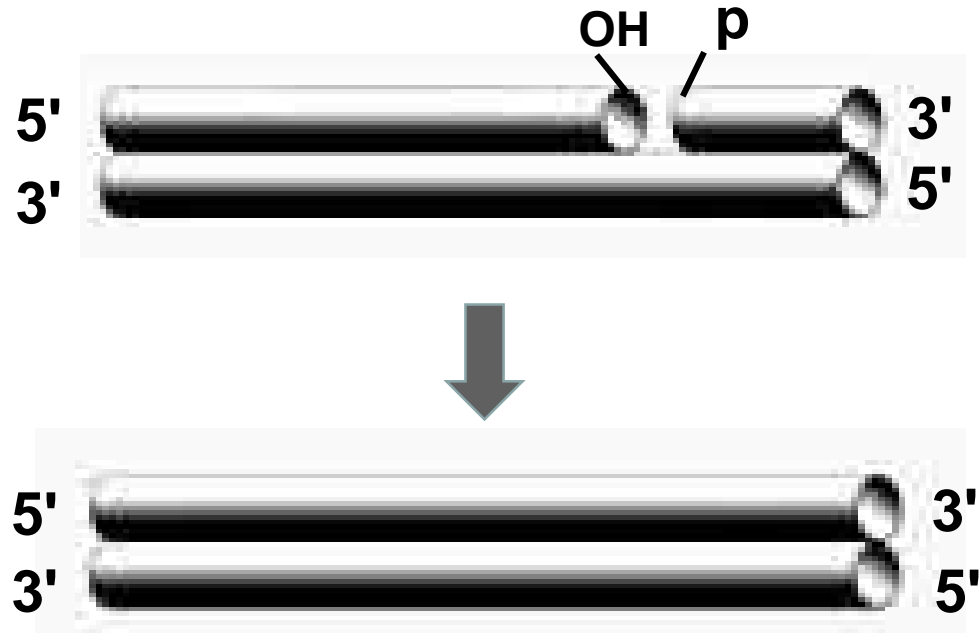
ДНК-полимераза



При встраивании неправильного нуклеотида двойная спираль деформируется. ДНК-полимераза чувствует такой дефект в растущей цепи и сама вырезает неправильный нуклеотид из нее, а затем встраивает правильный

Прямая репарация

Репарация разрывов в ДНК

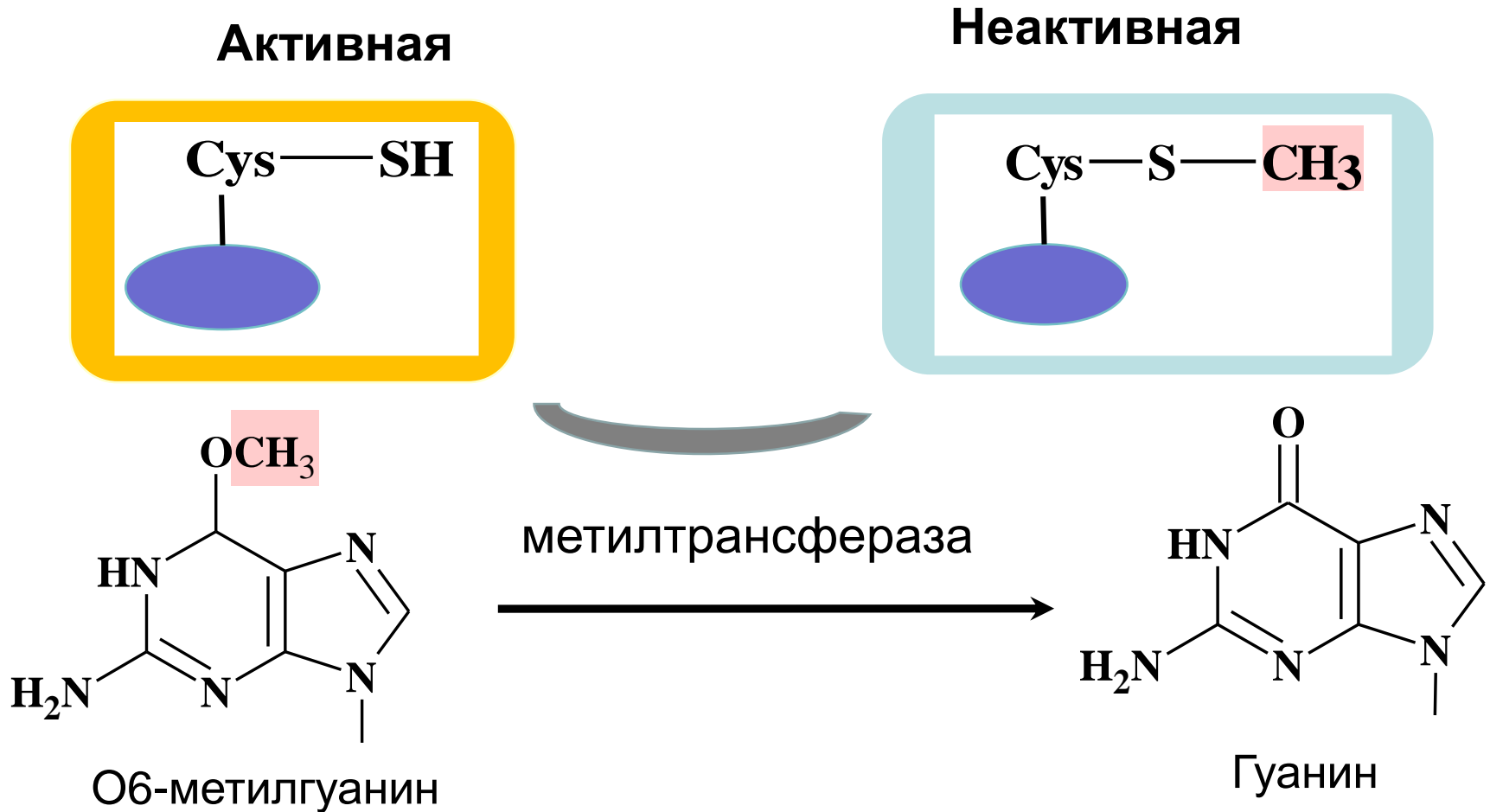


С помощью фермента ДНК-полинуклеотидлигазы (от англ. ligase – соединять, связывать) происходит прямое воссоединение разорванных концов в молекуле ДНК

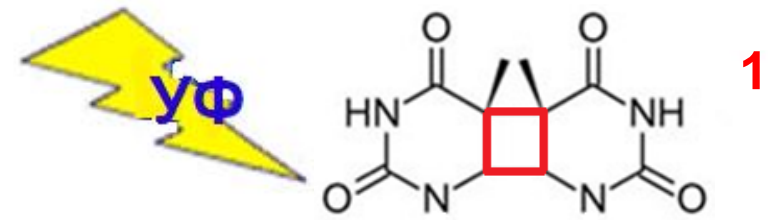
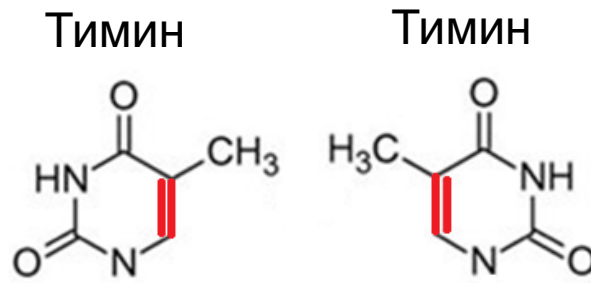
Между концевыми 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной группами фрагментов ДНК на комплементарной матрице образуется фосфодиэфирная связь

Прямая репарация

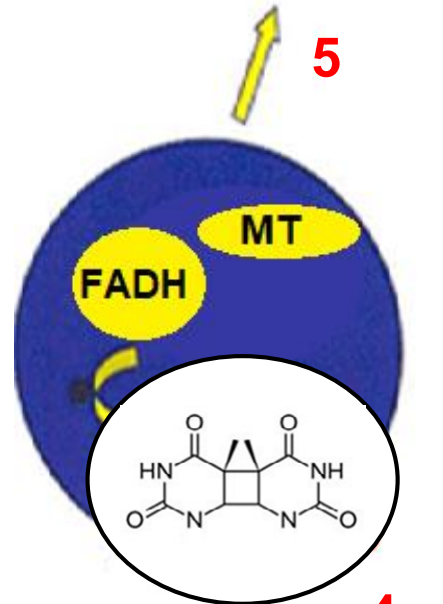
Репарация метилированных оснований с участием метилтрансфераз



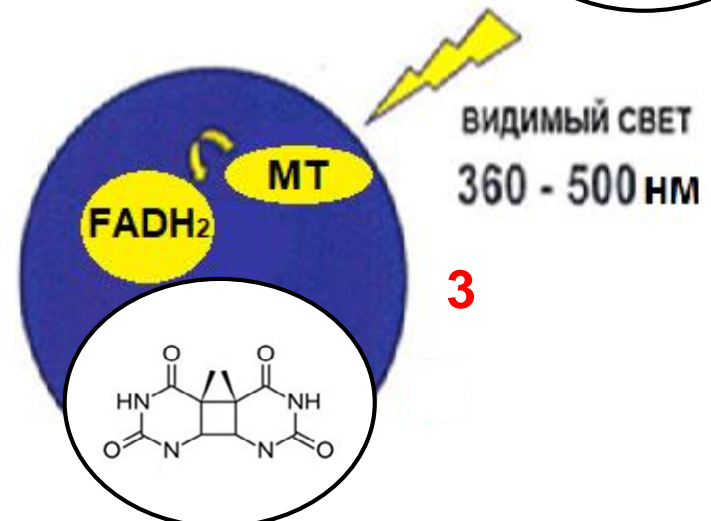
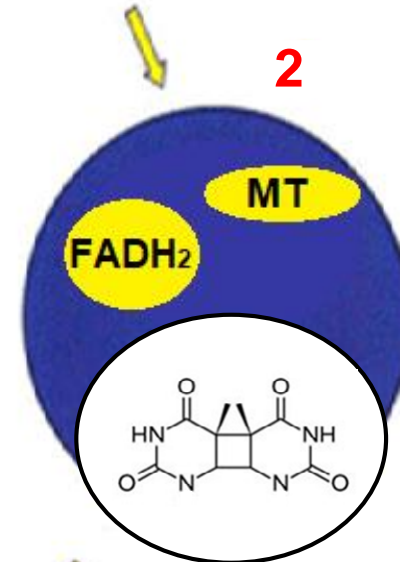
О6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза переносит метильную группу с О6-метилгуанина на один из своих остатков Cys



Фотореактивация
ДНК
с помощью
фототиазы



ФОТОЛИАЗА



Метилтетрагидрофолат (МТ),
выполняет функцию антенны,
поглощая фотон синего света.
Энергия возбуждения передается
флавинадениндинуклеотиду (FADH_2).
Флавин отдает электрон
пиримидиновому димеру,
устраняя повреждение.

Пещерные рыбы подтвердили «динозавровую» теорию уязвимости млекопитающих перед ультрафиолетом!



Сомалийская пещерная рыба *Phreatichthys andruzzii* за миллионы лет жизни в полной темноте утратила способность к фотреактивации - репарации ДНК, регулируемой видимым светом.

Haiyu Zhao *et al.* **Modulation of DNA repair systems in blind cavefish during evolution in constant darkness.** *Current Biology*, 2018

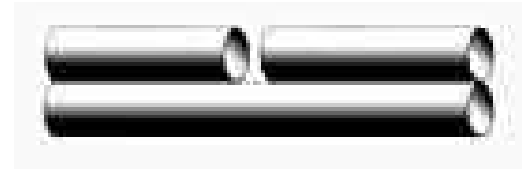
Эксцизионная репарация

Обобщенная схема восстановления нормальной структуры ДНК

1. Узнавание дефекта в ДНК



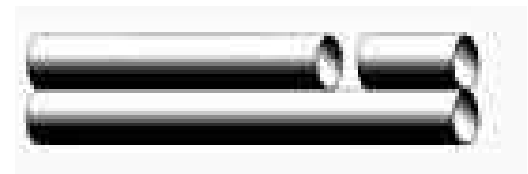
2. Расщепление ДНК
около дефекта



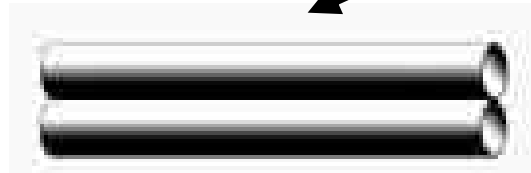
3. Вырезание поврежденного
участка нуклеазами



4. Застраивание бреши
ДНК-полимеразой

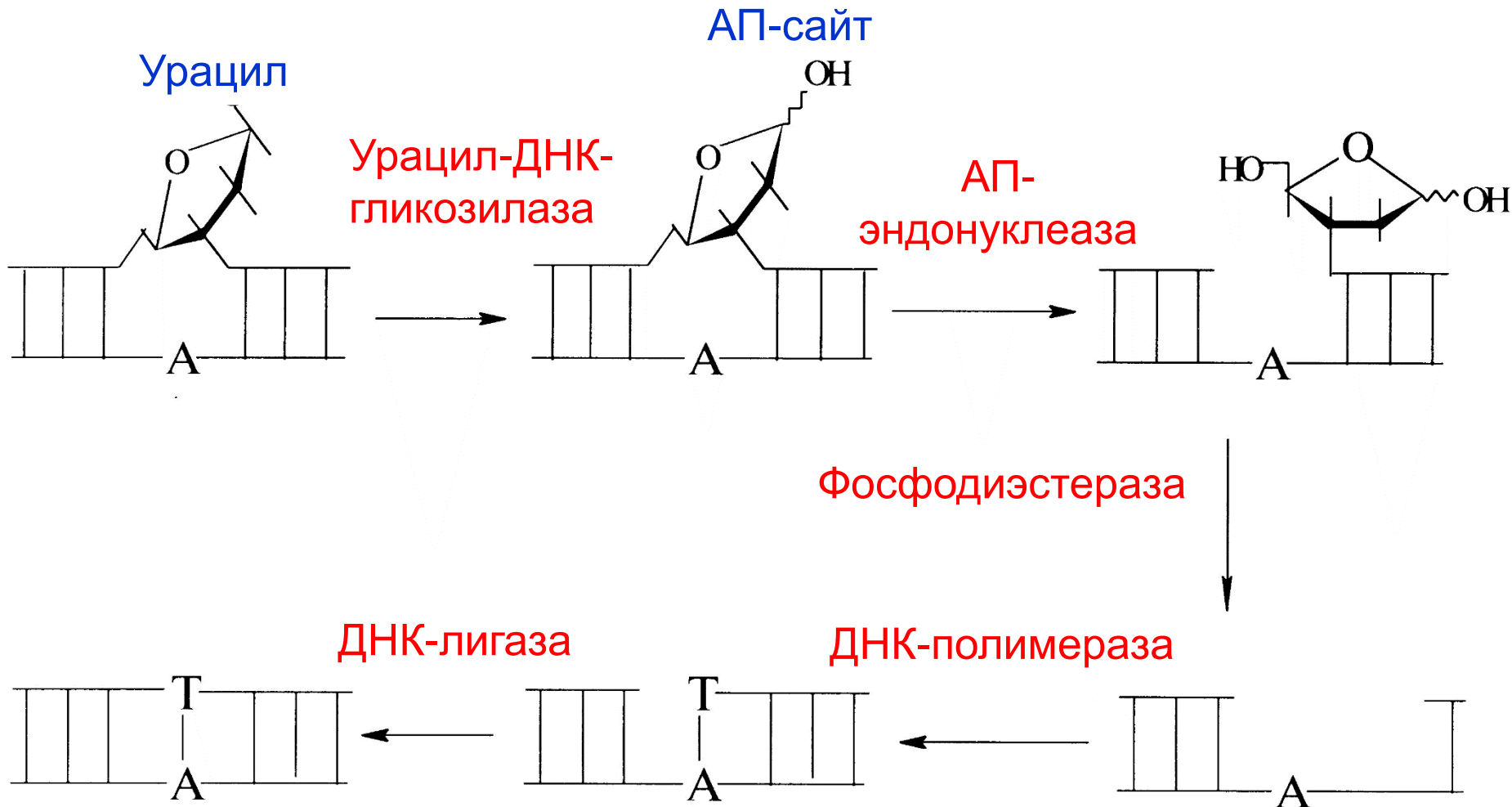


5. Соединение разрыва
в цепи ДНК-лигазой



Эксцизионная репарация оснований (*base excision repair, BER*)

42



Таким способом репарируются:
урацил, гипоксантин, формамидопиримидин,
5,6-тимингидрат, 8-оксигуанин, 3-метиладенин, 7-метилгуанин

IX Всероссийский фестиваль НАУКА 0+ (9-16 октября 2019 г.)

Шведско-британский биохимик проф. Томас Линдал посетил Москву и Санкт-Петербург

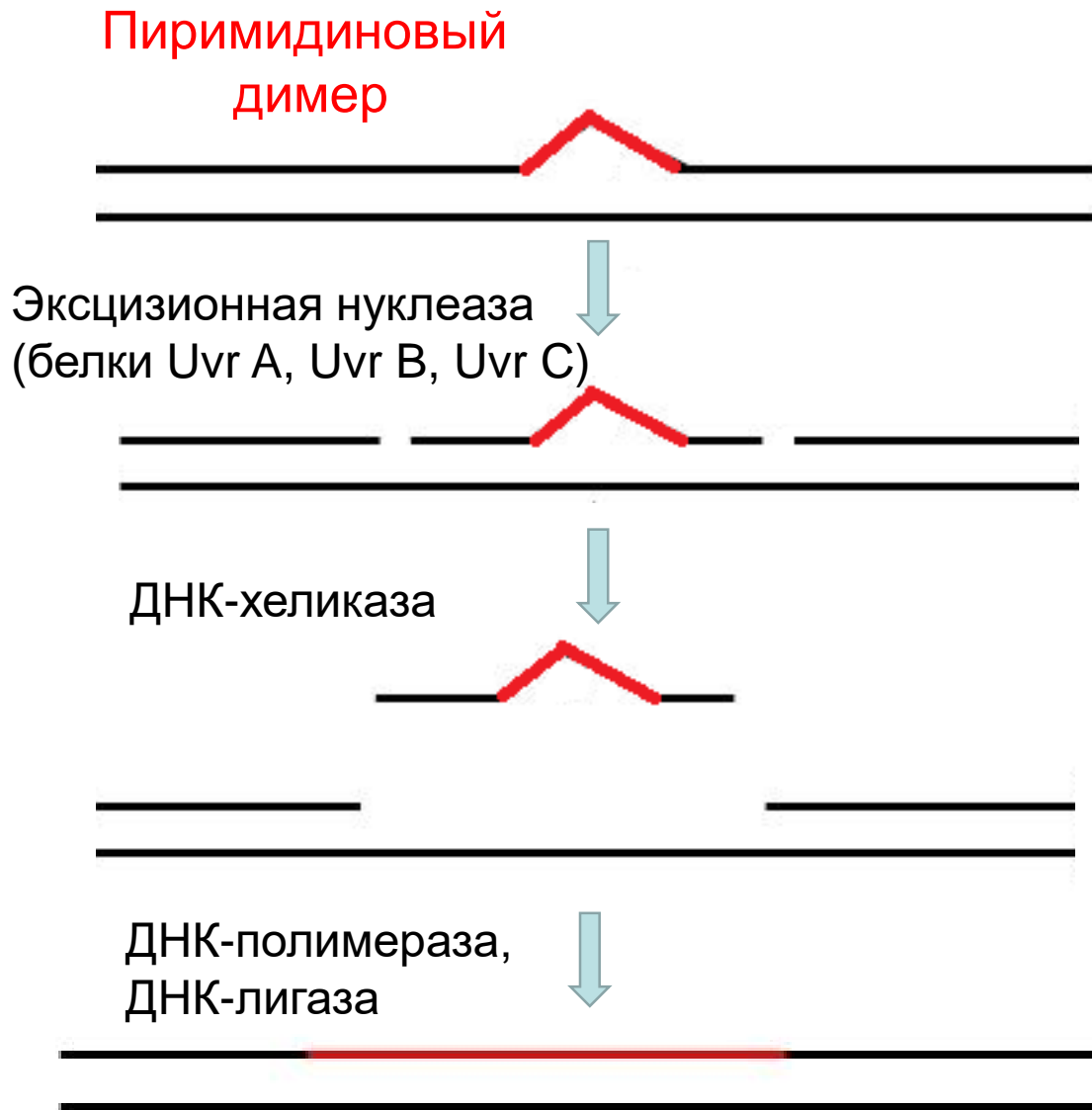


МГУ

НИИ физико-химической биологии и
кафедра химии природных соединений Химического факультета

Эксцизионная репарация нуклеотидов (*nucleotide excision repair*, NER)

44



1. Комплекс ферментов (эксцизионная нуклеаза) связывается с ДНК в месте крупного повреждения и расщепляет дефектную цепь с обеих сторон от повреждения
2. Фрагмент ДНК длиной 13 нуклеотидов удаляется с помощью ДНК-хеликазы
3. Брешь застраивается ДНК-полимеразой, а разрыв в цепи ликвидируется ДНК-лигазой

Пигментная ксеродерма – заболевание, связанное с нарушениями в работе системы эксцизионной репарации нуклеотидов (неспособность удалять тиминовые димеры из ДНК)

Симптомы - повышенная чувствительность к солнечному свету, приводящая к развитию рака кожи; пигментация, повышенная сухость кожи, язвы, рубцы



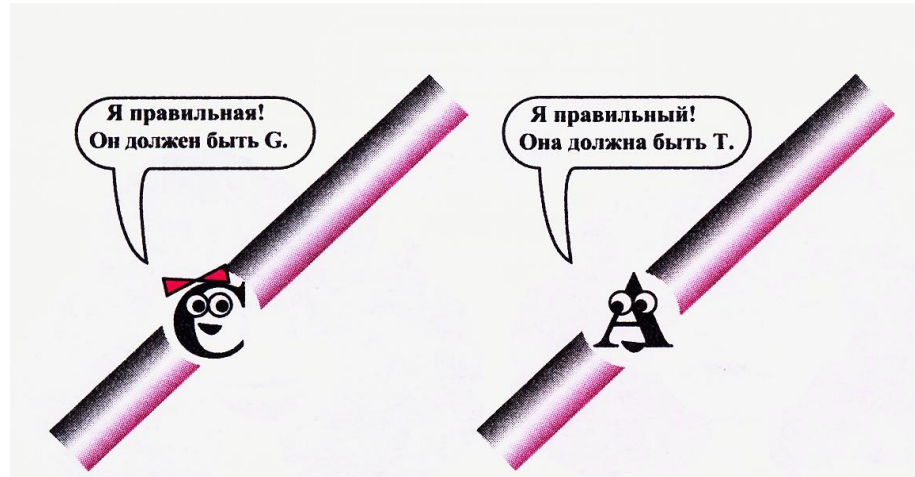
У большинства больных пигментной ксеродермой также выражены неврологические расстройства, предположительно из-за отсутствия у них репарации определенных повреждений, вызванных высокой активностью окислительного метаболизма в нейронах

Система репарации
некомплементарных пар
нуклеотидов
(Mismatch Repair, MMR)
удаляет «неправильный»
нуклеотид и встраивает
«правильный»

Д. Кларк, Л. Рассел,
Молекулярная биология,
2004



Какой из двух нуклеотидов был неправильным?



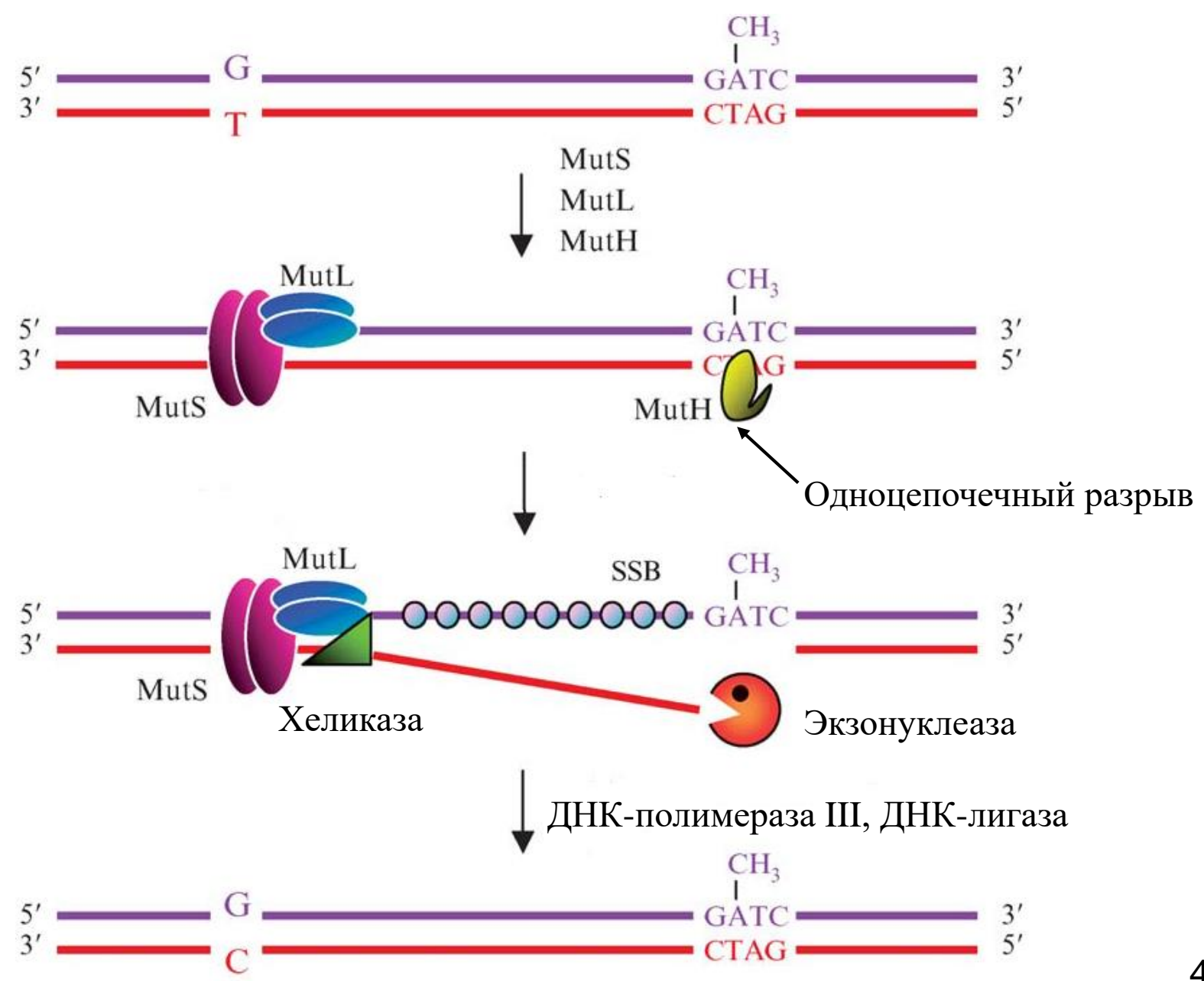
Д. Кларк, Л. Рассел,
Молекулярная биология,
2004

В *E. coli* монометилированная последовательность 5'-GATC-3' позволяет отличить материнскую цепь от вновь синтезированной – несущей ошибку.



Dam-метилтрансфераза

Метил-зависимая репарация неканонических пар нуклеотидов в *E. coli*

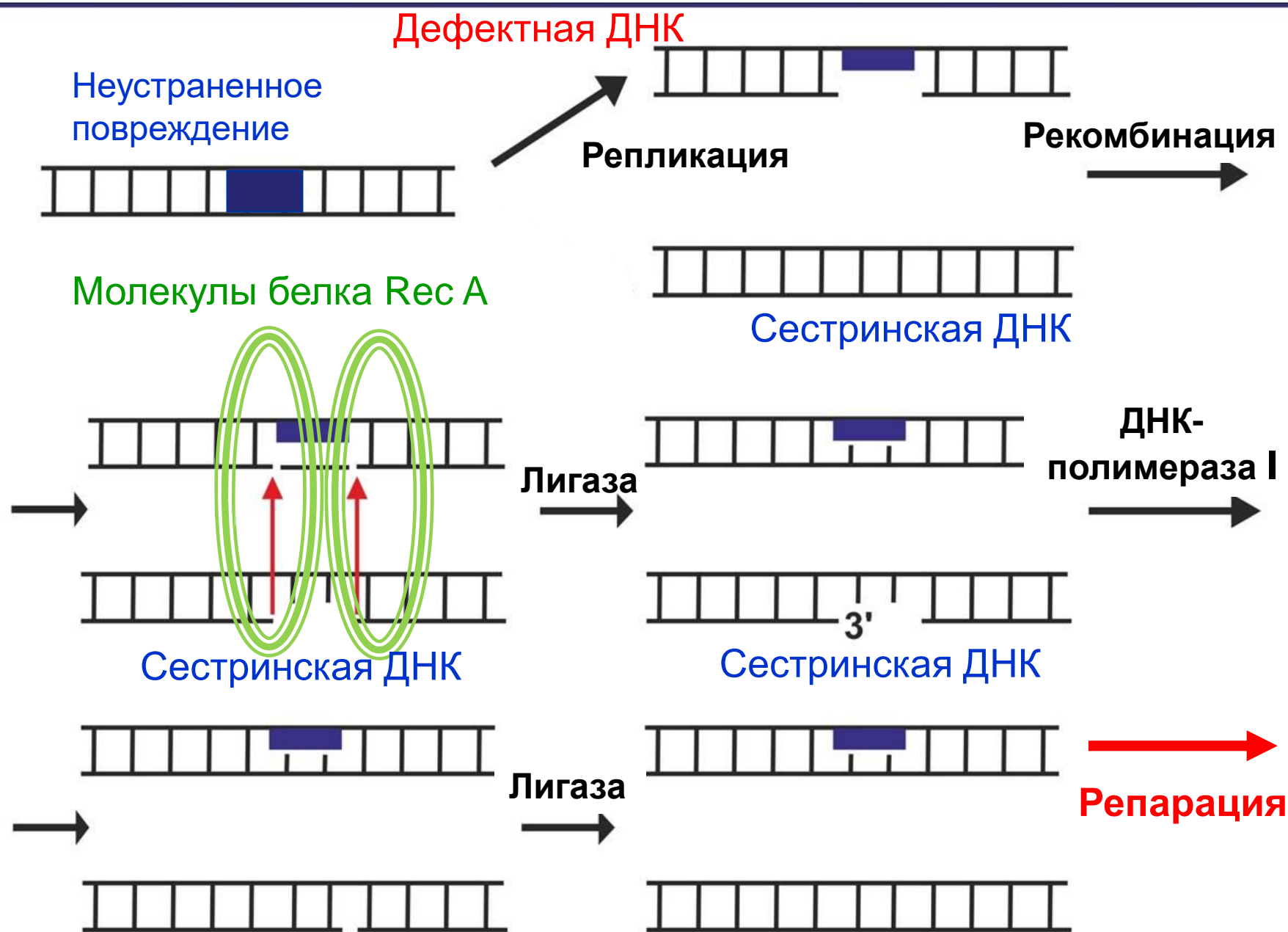


Мутации в генах белков, ответственных за репарацию неканонических пар нуклеотидов, приводят к развитию наследственного неполипозного рака прямой кишки (синдрома Линча)



У половины больных рак толстой кишки выявляют до 50 лет. В таких семьях часто наблюдаются первично-множественные злокачественные опухоли.

Пострепликативная репарация или рекомбинационная репарация



SOS-репарация

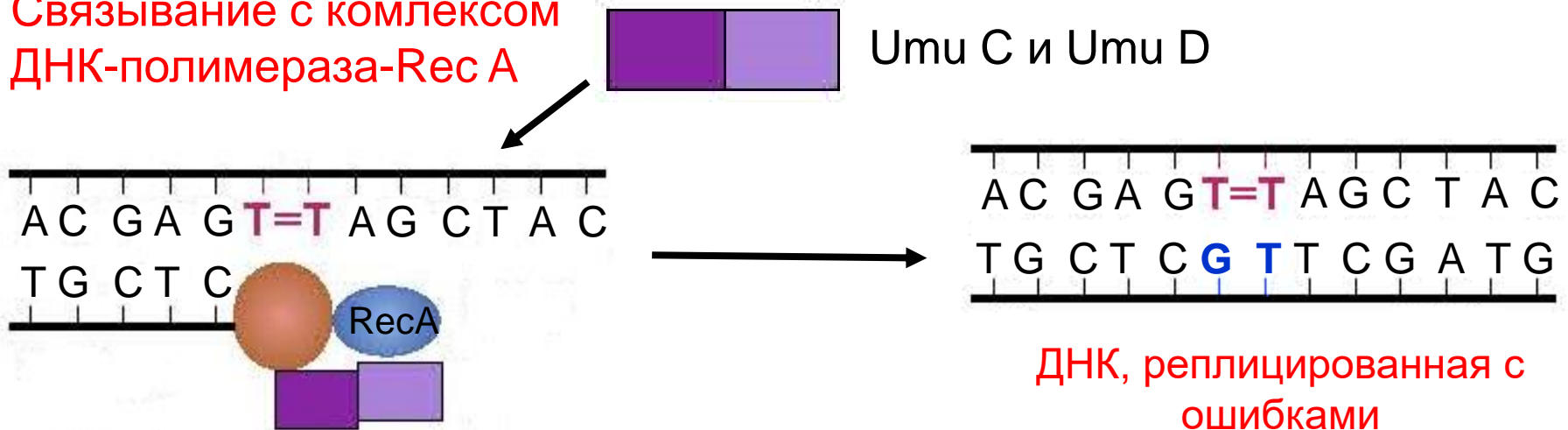
«SOS» - международный сигнал бедствия («спасите наши души»)

SOS-репарация включается, когда повреждений в ДНК становится настолько много, что это угрожает жизни клетки.

SOS-репарация у *E. coli*

Белки **UmuC** и **UmuD** связываются с комплексом ДНК-полимераза III–RecA, понижая точность его работы. Репликация ДНК происходит, но дочерняя цепь несет мутации напротив дефектов в материнской цепи

Связывание с комплексом
ДНК-полимераза-RecA



В устранении мутаций ДНК задействовано около 150 генов. На производство белков репарации клетка тратит большую часть своих ресурсов. В тех случаях, когда репарационных возможностей недостаточно для сохранения генетического статуса организма, наступает программируемая смерть клетки – **апоптоз**



Литература

1. Д. Нельсон, М. Кокс. Основы биохимии Ленинджера, том. 3, 2015 г.
2. А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. Молекулярная биология, 2005 г.
3. Репарация ДНК (ред. О.И. Лаврик, С.Н. Ходырева, Н.И. Речкунова), 2016 г.