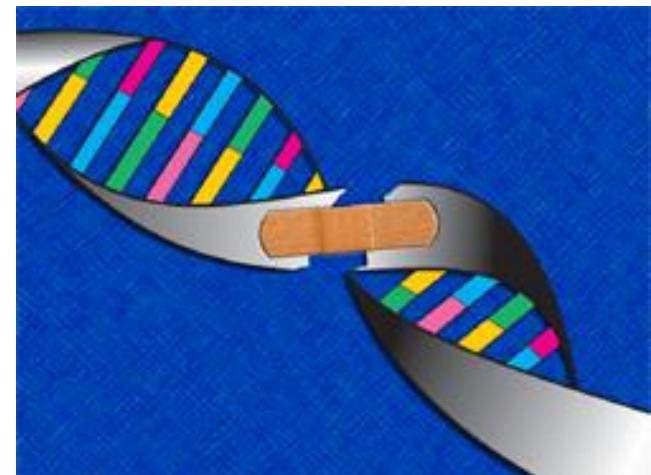
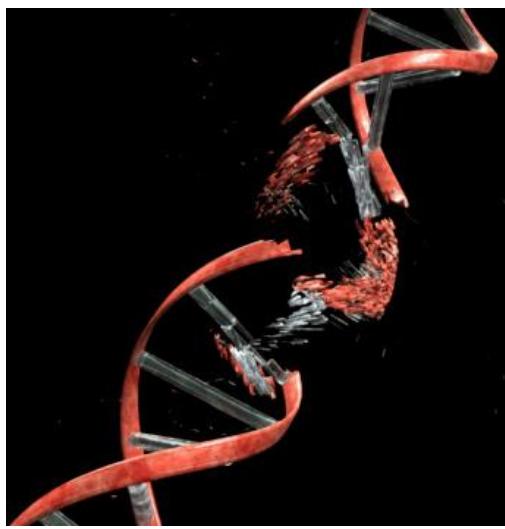


Как мы сами портим свои гены и как природа пытается их «починить». Системы репарации ДНК

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

Репликация



1. ДНК является генетическим материалом
Мутации наследуются
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 серповидноклеточной 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

Молчакие или нейтральные

Мутации не оказывают никакого влияния

Синтез белка

Рамка считывания

Второй нуклеотид

Первый
нуклеотид

Третий нуклеотид

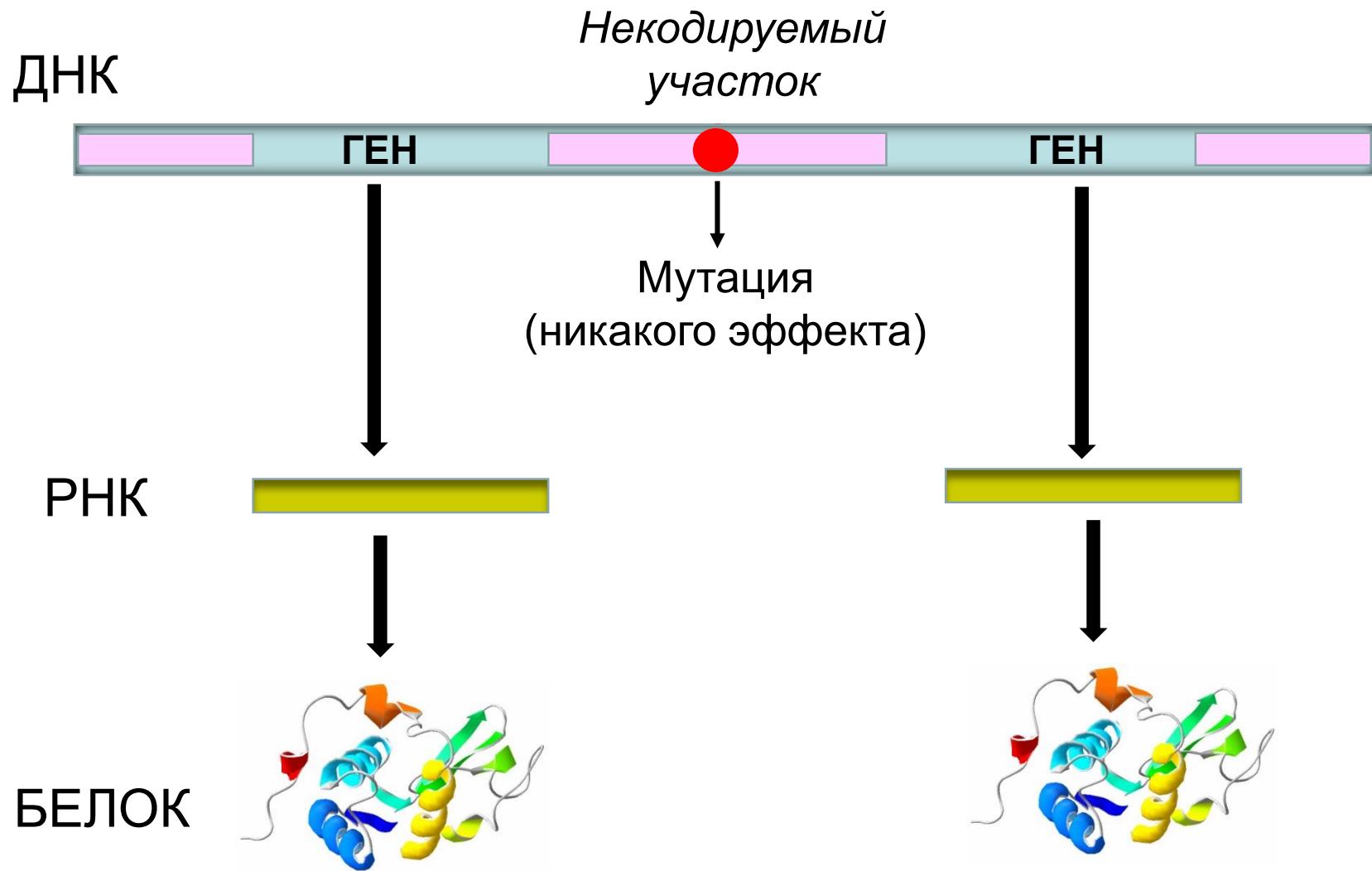
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU	UAU Tyr	UGU Cys	U
C	UUC	UCC	UAC	UGC	C
A	UUA Leu	UCA	UAA stop	UGA stop	A
G	UUG	UCG	UAG stop	UGG Trp	G
U	CUU	CCU	CAU His	CGU	U
C	CUC	CCC	CAC	CGC	C
A	CUA Leu	CCA	CAA Gln	CGA	A
G	CUG	CCG	CAG	CGG	G
U	AUU	ACU	AAU Asn	AGU Ser	U
C	AUC Ile	ACC	AAC	AGC	C
A	AUA	ACA	AAA Lys	AGA Arg	A
G	AUG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

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

Рамка считывания - последовательность триплетов нуклеотидов внутри гена

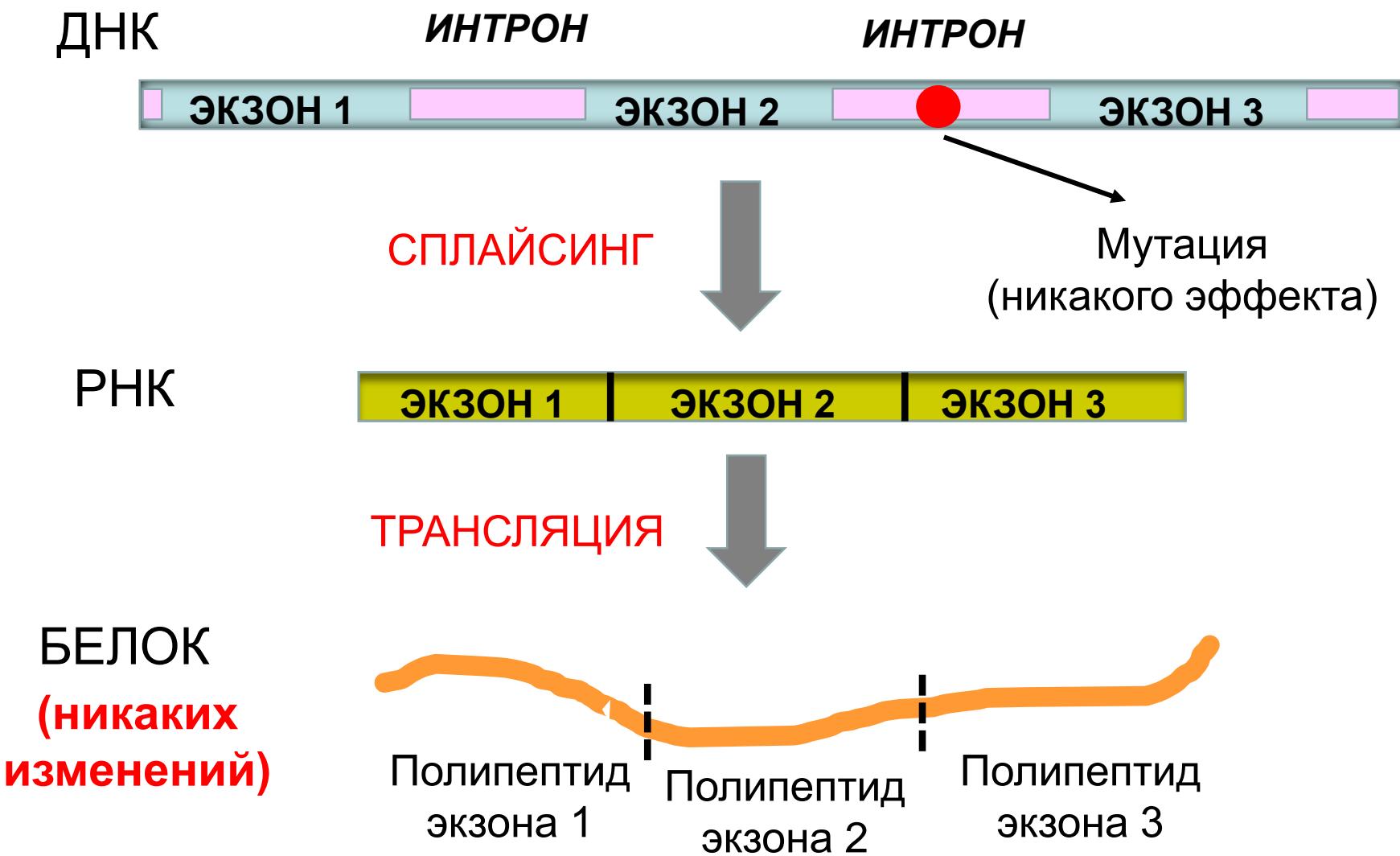
Молчащие мутации

Изменения в некодирующей ДНК на участке между генами



Молчащие мутации

Мутации внутри интрана



Гемофилия

Нормальный ген

экзон 3

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

экзон 4

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

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

экзон 4



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)

норма



премутация



полная мутация



Тяжесть симптомов наследственного заболевания зависит от длины повтора

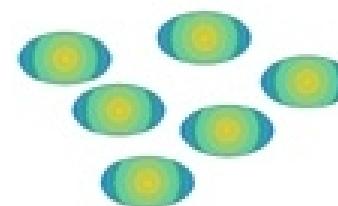
Нормальная
X-хромосома



Ломкая
X-хромосома



Исходный ген *FMR1*



Белок FMR1
Участвует в передаче информации нейронам



Мутантный ген *FMR1*
транскрипционно не активен

Мутантный ген *FMR1*

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 считываания

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

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

Исходный ...- Arg - Ile - Ser - Tyr - Gly - Pro - Asp - ...
белок

РНК ...CGU-AUA -UCC-UAU-GCC-CCU -GAC-...



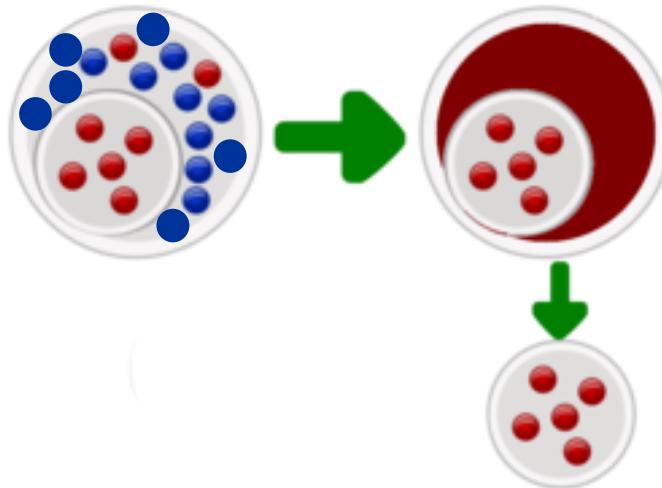
Мутантная
РНК ...CGU- AUA -UCU - AUC-CUA -UGC - CCC -UGA ...

Мутантный ...- Arg - Ile - Ser - Ile - Leu - Cys - Pro - Stop
белок

Отсутствие фермента приводит к накоплению **гангиозидов**
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

Делекции 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

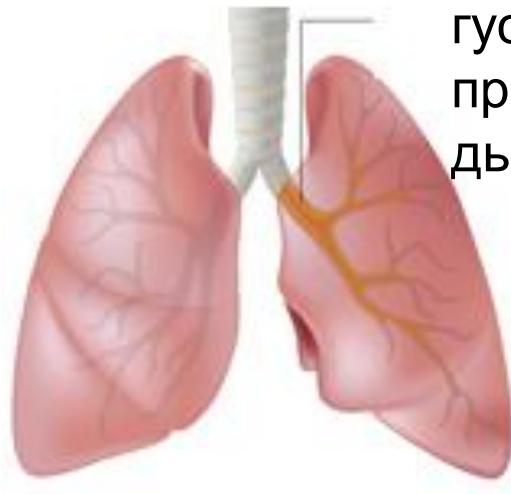
GAG-GCC-----AUC-GAA-UGU-UUG-GCA-AGG-AAA

Мутантный
белок

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

Отсутствует Val !

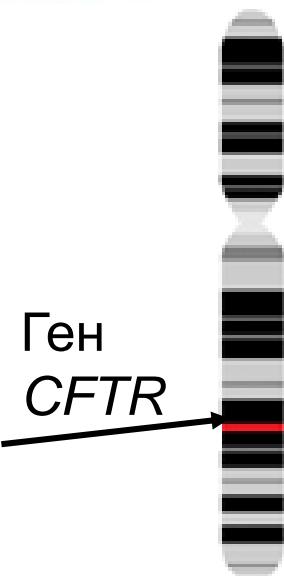
Муковисцидоз (кистозный фиброз) поражает экзокринные железы



густая мокрота
препятствует
дыханию



густая слизь
закупоривает протоки
поджелудочной железы
и желчного пузыря



ДЕЛЕЦИЯ

...U - AUC- AU**C-UU**-GGU-GUU...
- Ile - Ile - Phe - Gly - Val -

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

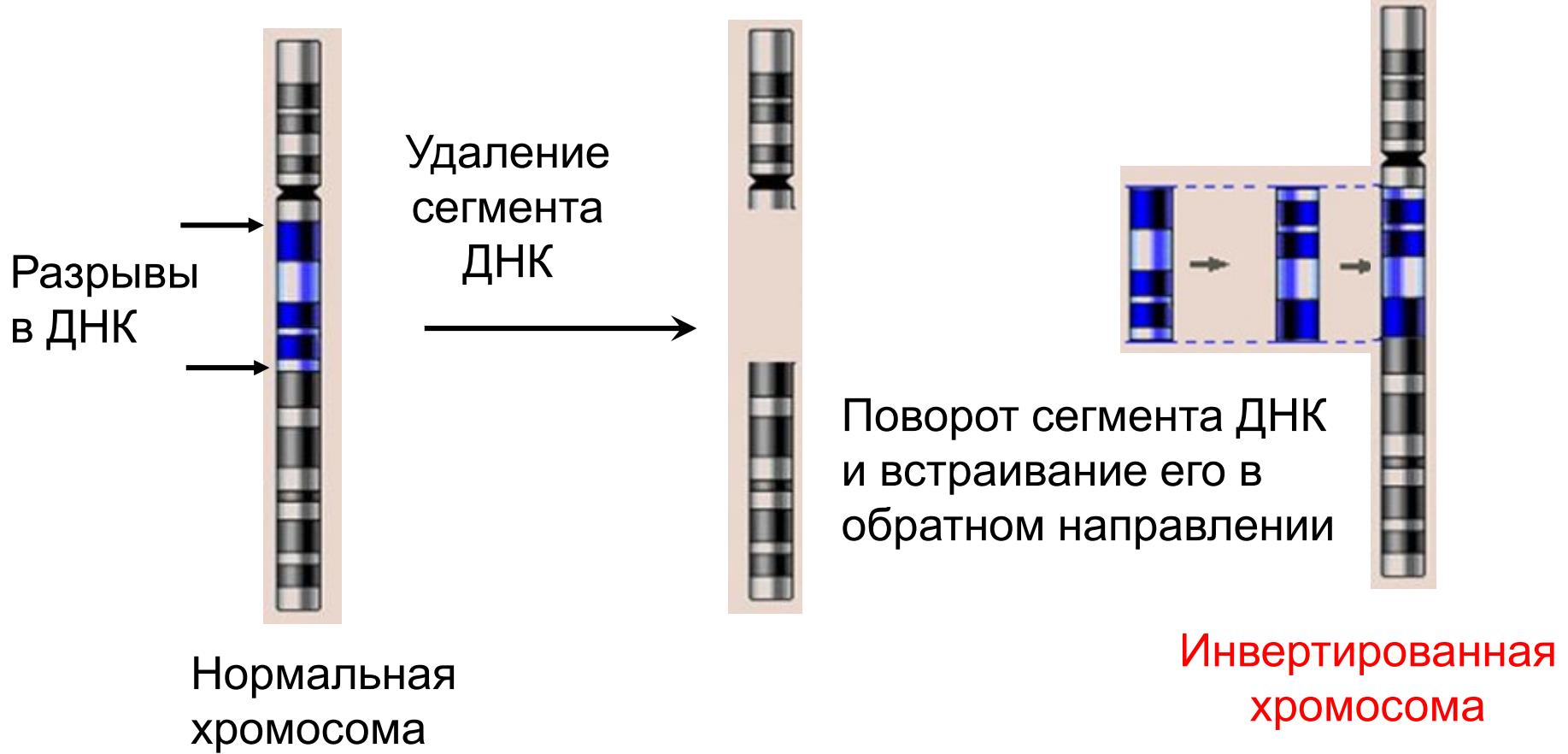
Белок CFTR – трансмембранный
регулятор проводимости

Отсутствует Phe

Мутации без сдвига рамки считываания

Инверсии

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



Мутации без сдвига рамки счтывания

Единичные замены нуклеотидов или точечные мутации

Исходная ДНК	Молчащая (silent или samesense)	Бессмысленная (nonsense)	Изменение смысла (missense)	
TTT	TTT	ATC	TCC	TGC
AAG	AAA	UAG	AGG	ACG
Lys	Lys	Stop	Arg	Thr
БЕЛОК	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C} = \text{NH}^+ \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{H} \end{array}$

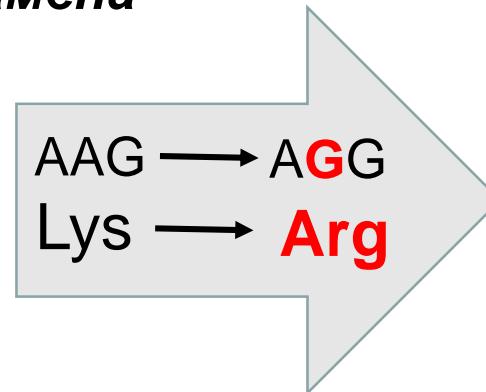
Единичные замены нуклеотидов или точечные мутации

Мутация с изменением смысла («миссенс»-мутация)

А. Консервативная замена

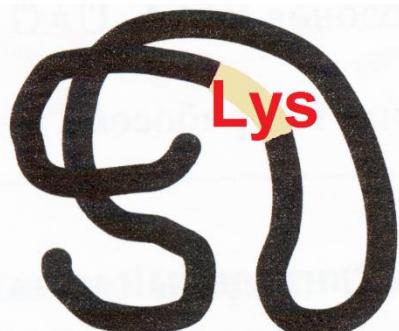


Исходный белок

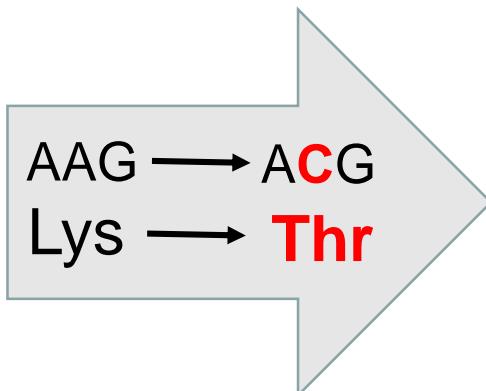


Мутантный белок
(та же третичная структура)

Б. Радикальная замена



Исходный белок



Мутантный белок
(другая третичная структура)

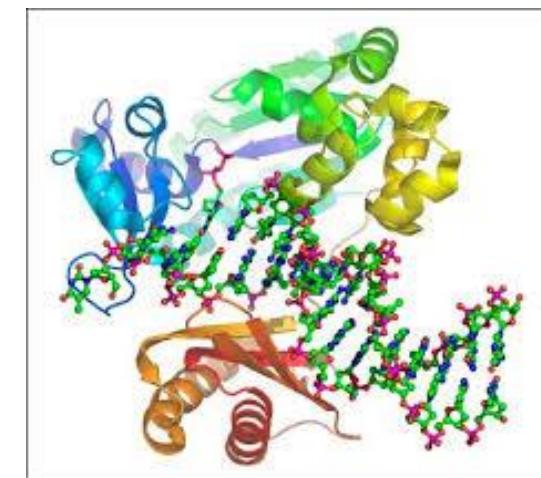
Причины возникновения мутаций

Спонтанные мутации

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

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

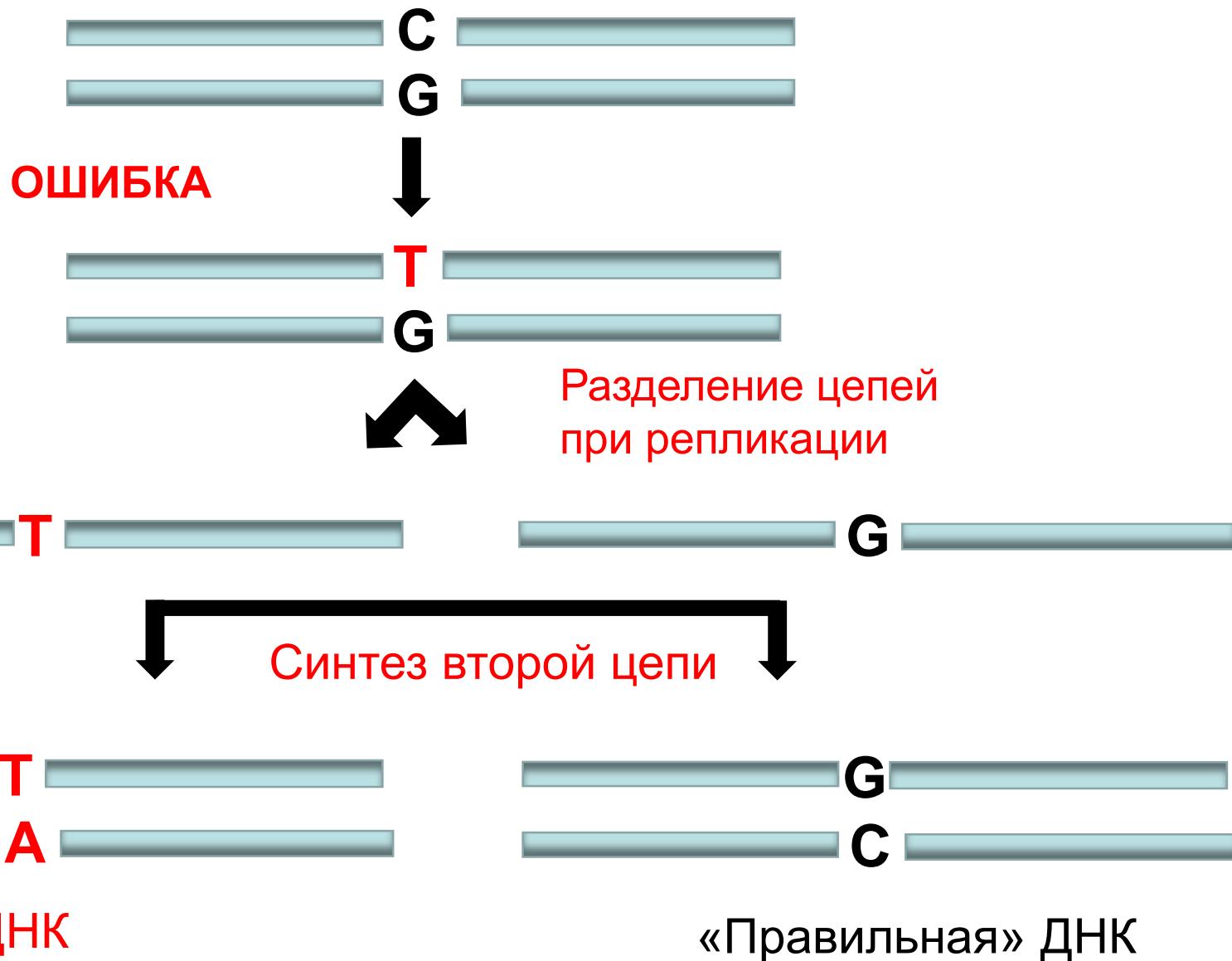
Объект	Вероятность замены на пару нуклеотидов
Фаг T4	10^{-8}
Бактерия <i>E. coli</i>	10^{-10}
Муха дрозофилы	10^{-11}



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

Причины возникновения мутаций

Ошибки репликации



Индуцированные 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

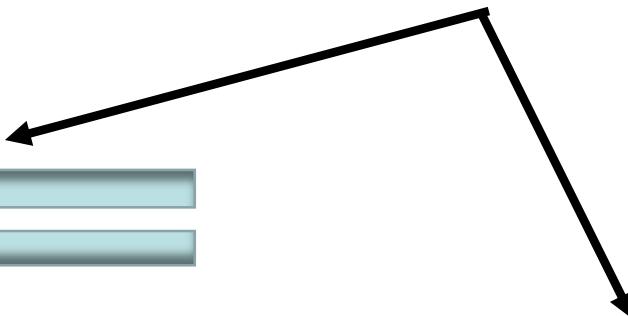
- Разрывы углеводофосфатного остава в цепях ДНК
- Поперечные сшивки между основаниями одной цепи или разных цепей ДНК
- Повреждения нуклеотидов

Разрыв цепей ДНК (разрыв хромосомы)

Нормальный
фрагмент
ДНК



Ионизирующая радиация,
активные формы кислорода
(супероксиданион



Разрыв
в одной цепи



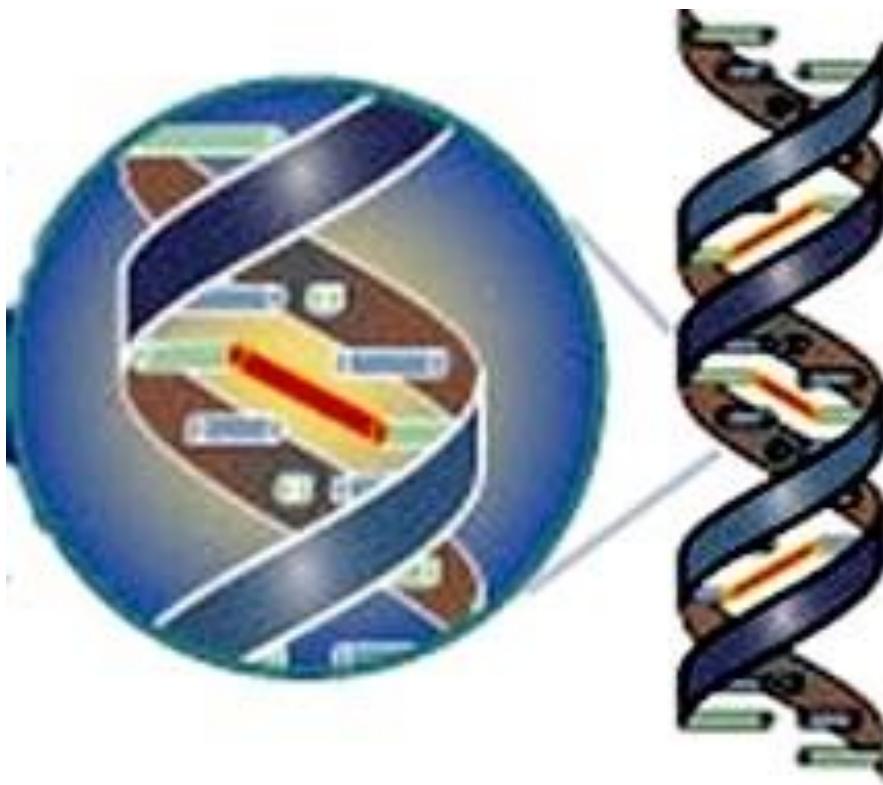
O_2^\cdot ,
радикал гидроксила
 HO^\cdot , перекиси)

Разрыв в обеих цепях

Поперечные сшивки между цепями ДНК

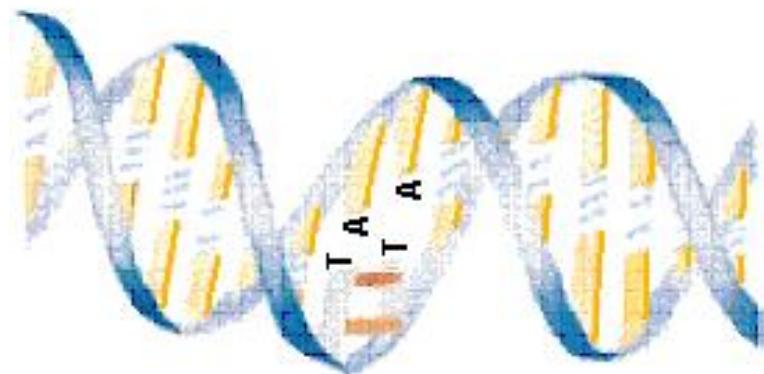
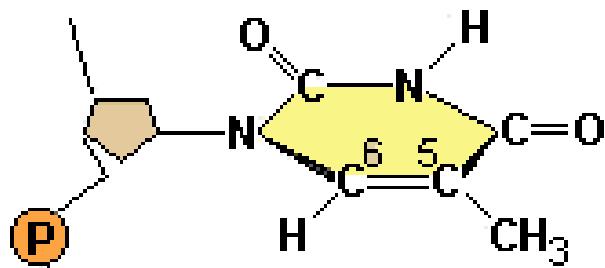
Некоторые химические агенты приводят к образованию ковалентных связей между основаниями двух разных цепей ДНК:
отравляющее вещество иприт - $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$,

препараты используемые в
химиотерапии рака
(цисплатин, циклофосфамид)

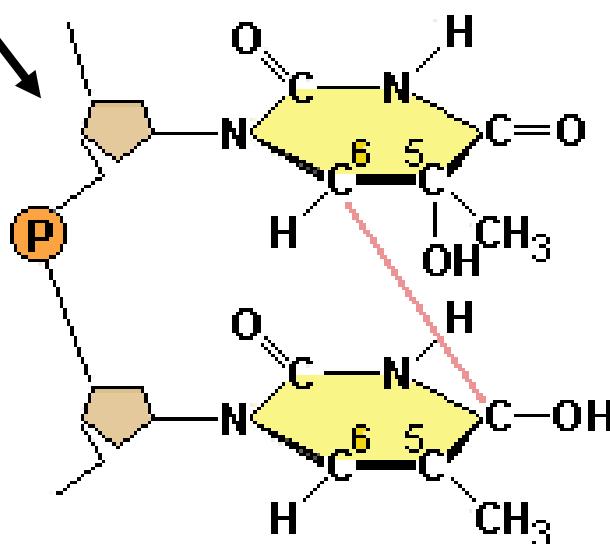
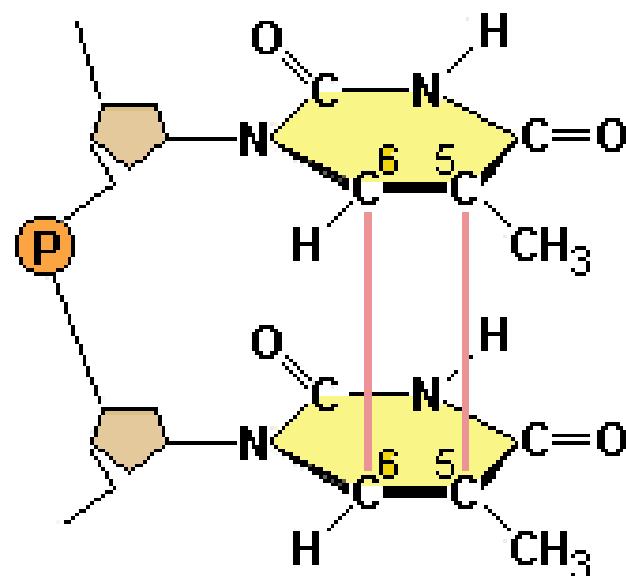


ДНК не может «расплетаться» в процессе репликации

Поперечные
сшивки между основаниями одной цепи



УФ-облучение



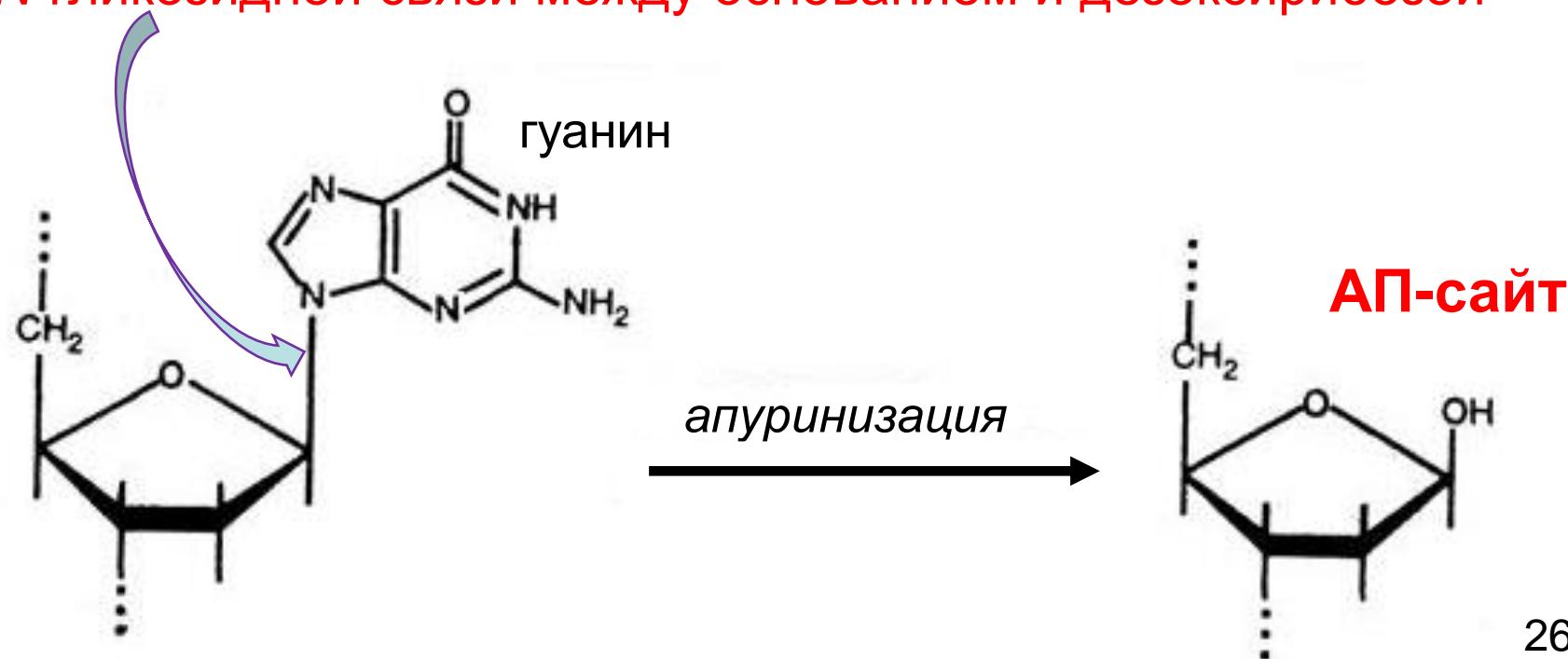
6-4-фотопродукт

Тиминовые димеры

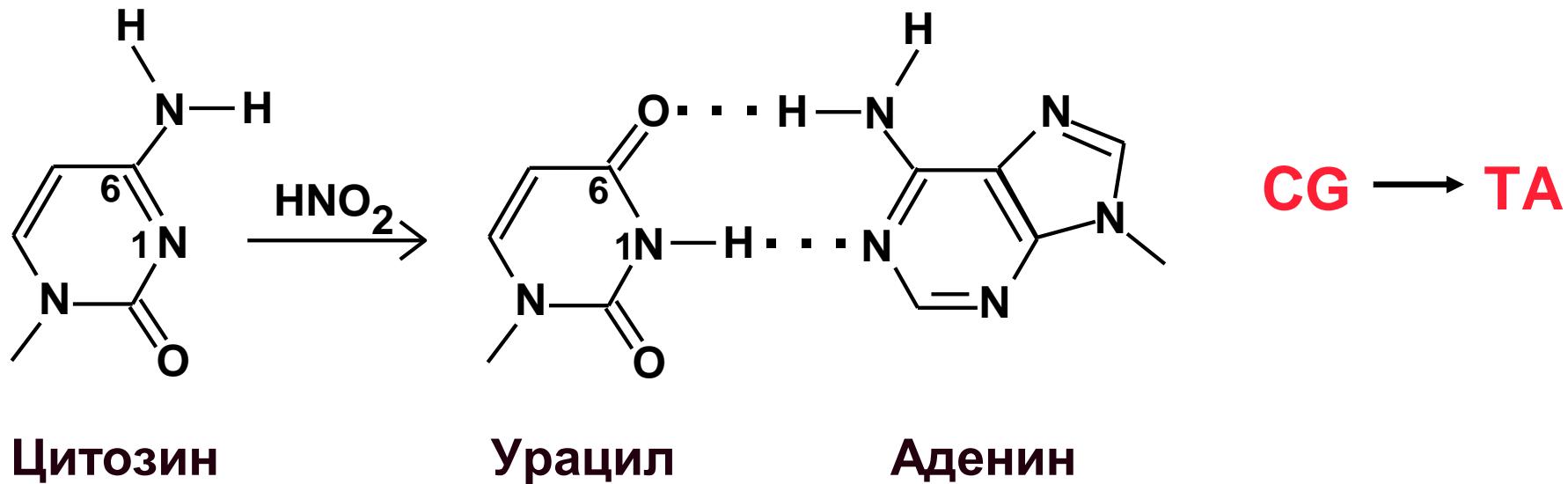
Повреждения нуклеотидов

- 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



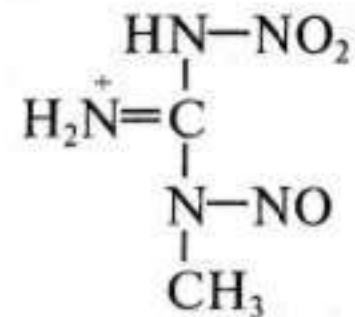
Дезаминирование гетероциклических оснований



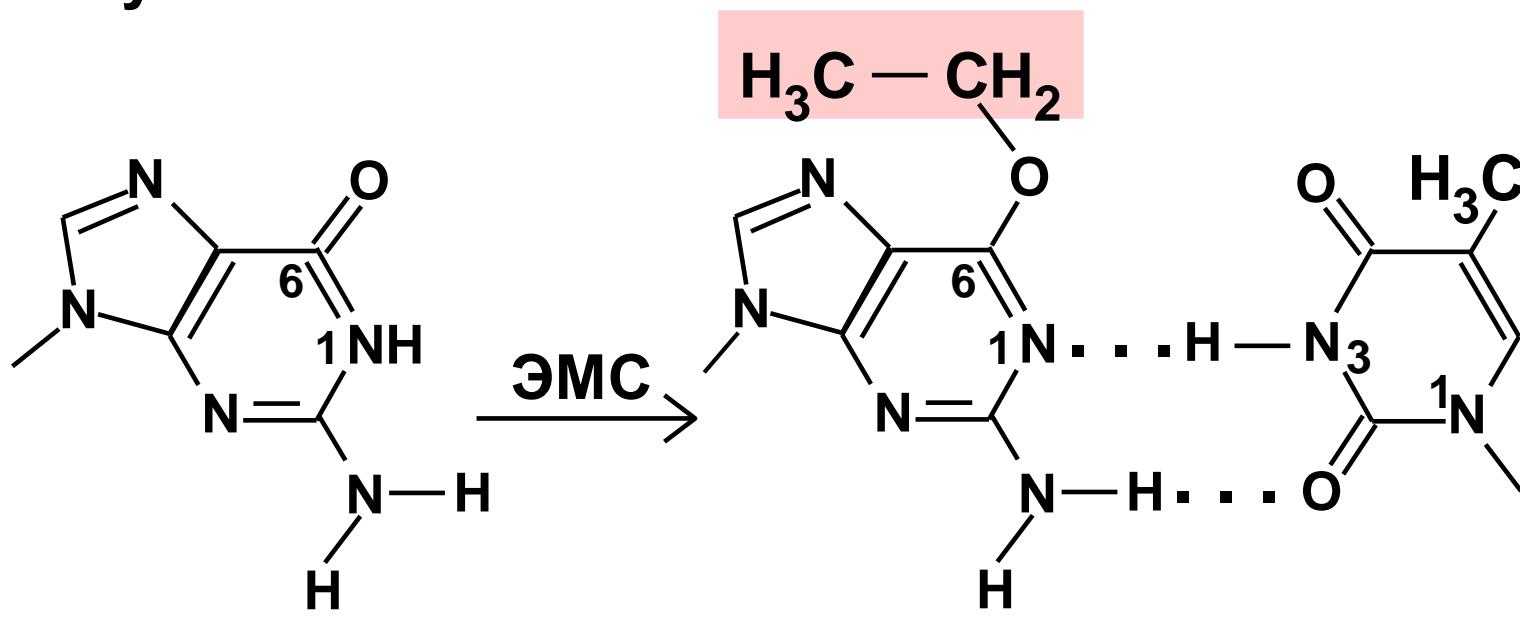
Алкилирование гетероциклических оснований

Алкилирующие агенты

N-метил-*N*-нитро-*N*-нитрозогуанидин:
этилметансульфонат (ЭМС): $\text{CH}_3\text{CH}_2 - \text{O} - \text{SO}_2 - \text{CH}_3$



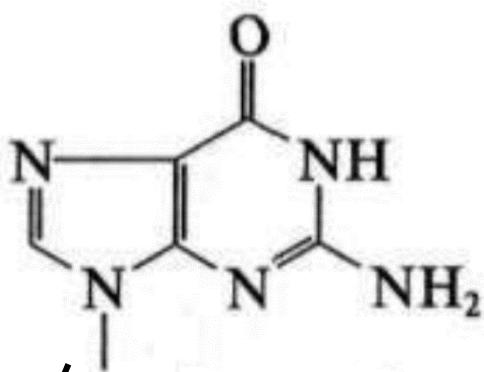
Гуанин



Пара GC заменяется на AT

Окисление гетероциклических оснований

Гуанин

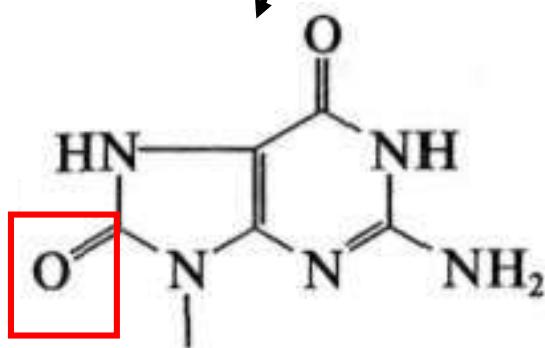


Активные
формы
кислорода

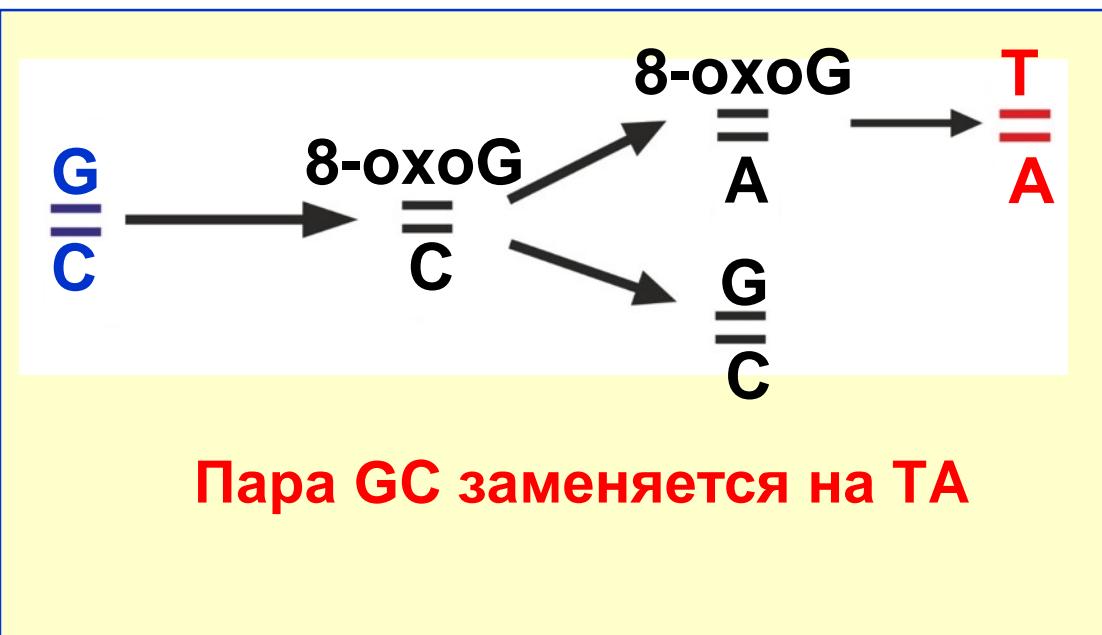


Формамидо-
пириимидин

Активные
формы
кислорода

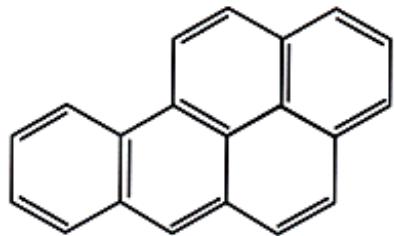


8-оксогуанин (8-oxoG)

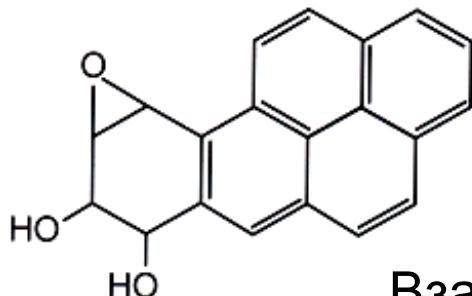


Образование аддуктов между полициклическими ароматическими соединениями и ДНК

Бензопирен

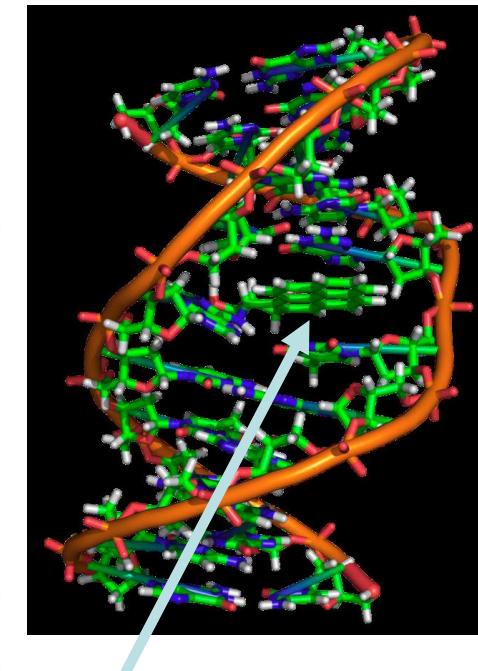
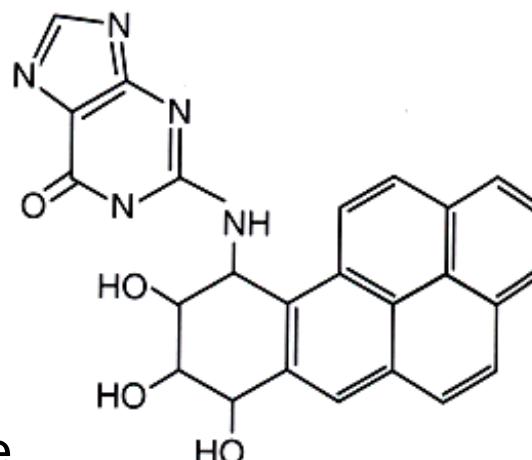


Окисление



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:

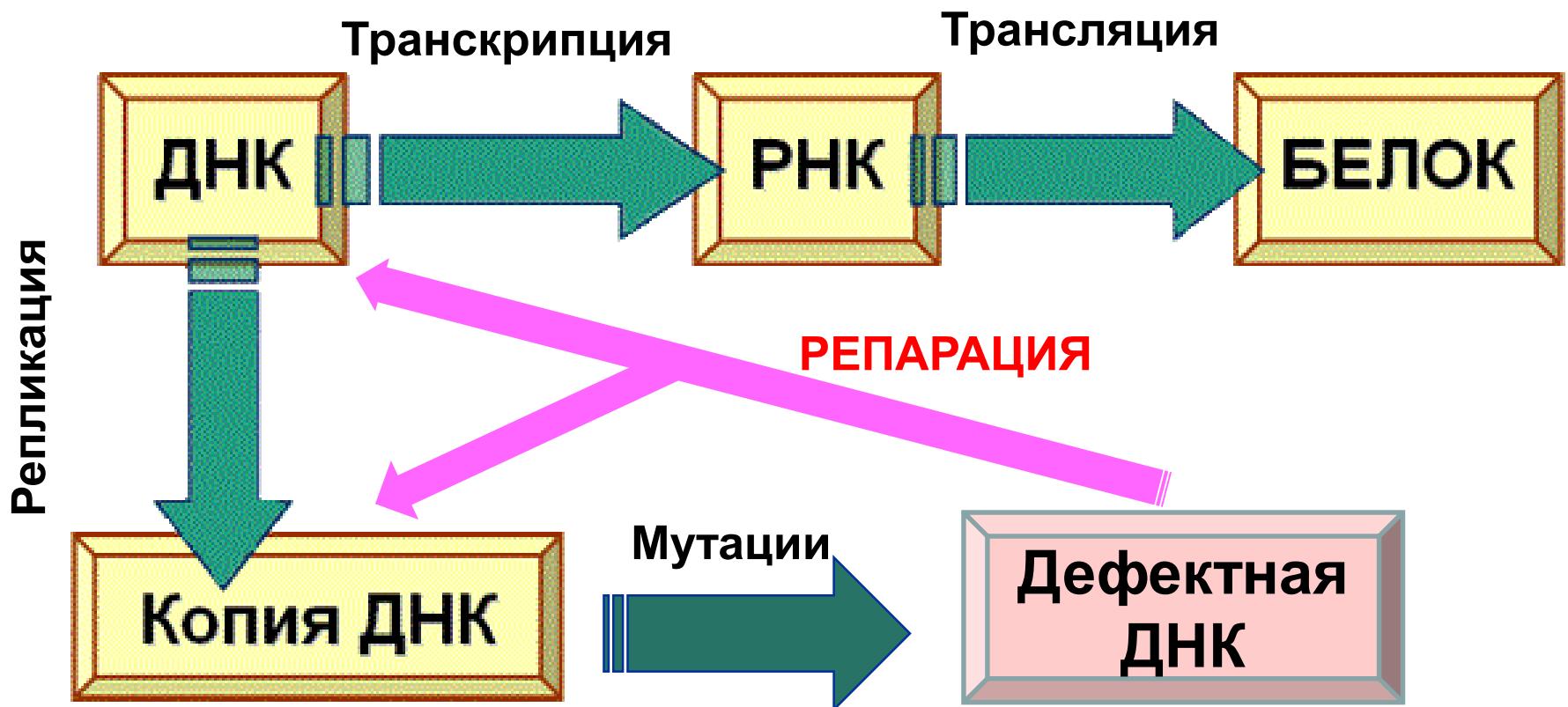
- присутствие белков, специально «патрулирующих» ДНК и осуществляющих поиск дефектов
- наличие большого числа систем репарации

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

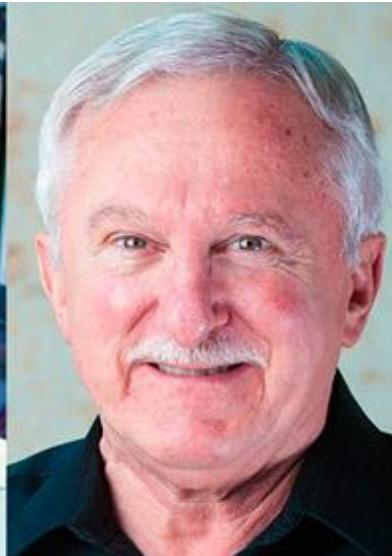


Нобелевская премия по химии 2015 года: «за исследование механизмов репарации ДНК»

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 фотоприведение ДНК

2. Эксцизионная репарация

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

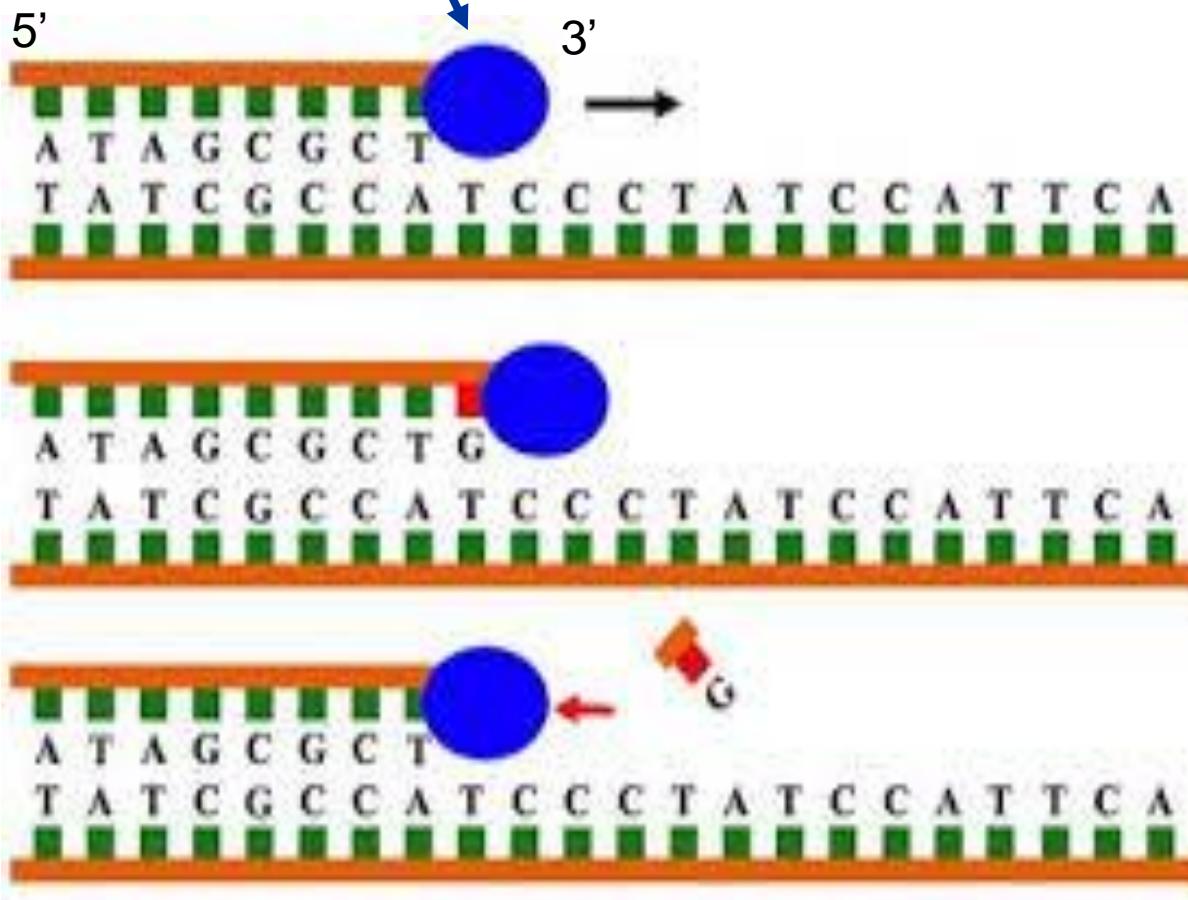
3. Пострепликативная репарация или репарация с участием систем рекомбинации (процесса обмена генетическим материалом путем разрыва и соединения разных молекул ДНК)

4. SOS-репарация

Прямая репарация

Корректирующая активность ДНК-полимеразы во время репликации

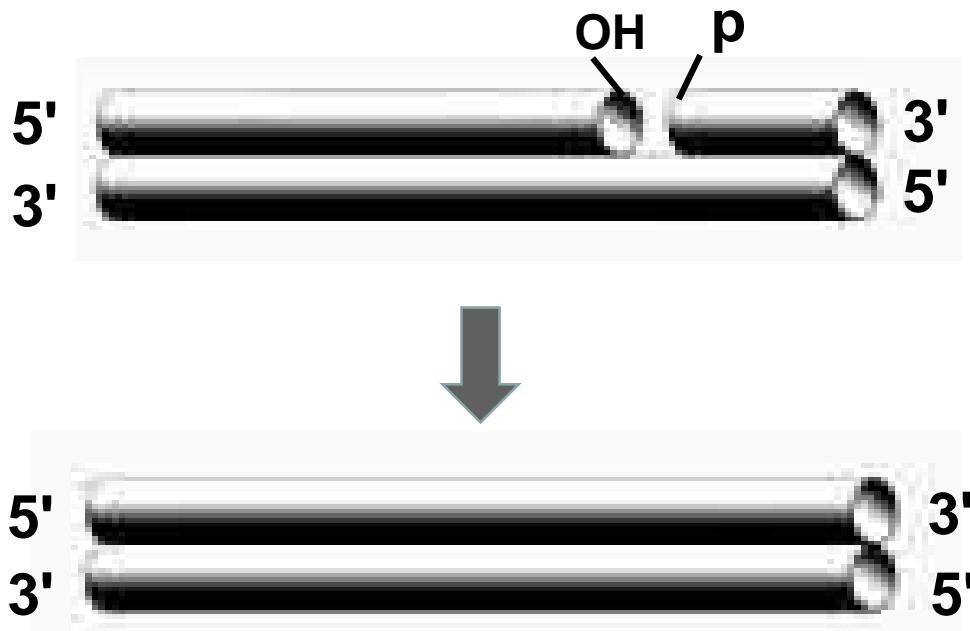
ДНК-полимераза



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

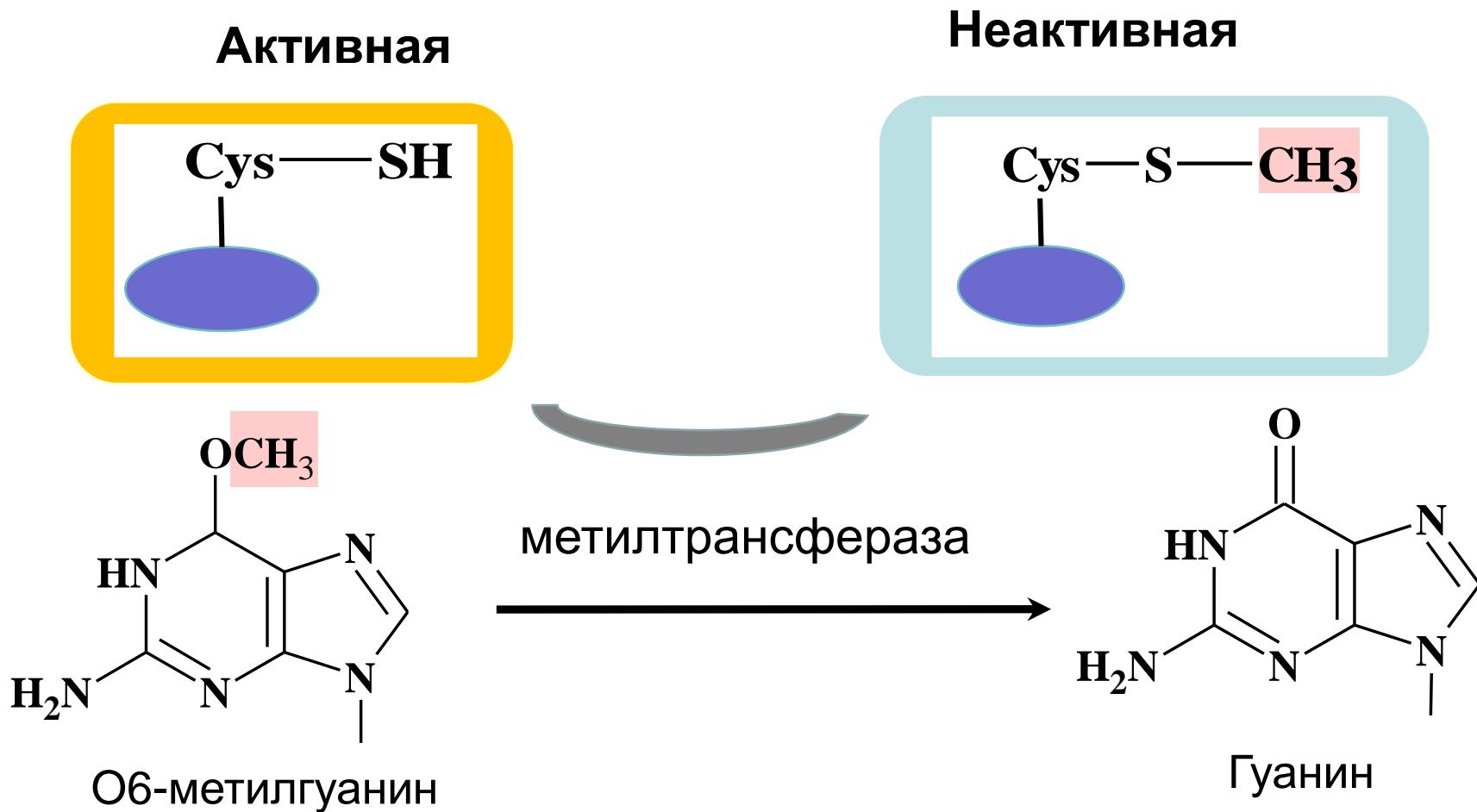


С помощью фермента ДНК-полинуклеотидлигазы (от англ. ligase – соединять, связывать) происходит прямое воссоединение разорванных концов в молекуле ДНК

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

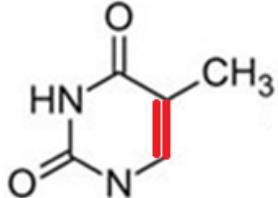
Прямая репарация

Репарация метилированных оснований с участием метилтрансфераз

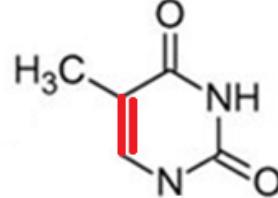


Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза переносит метильную группу с Об-метилгуанина на один из своих остатков Cys

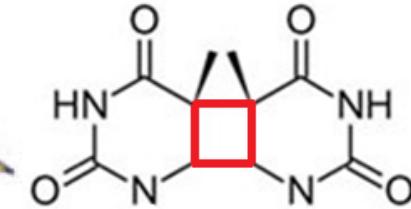
Тимин



Тимин

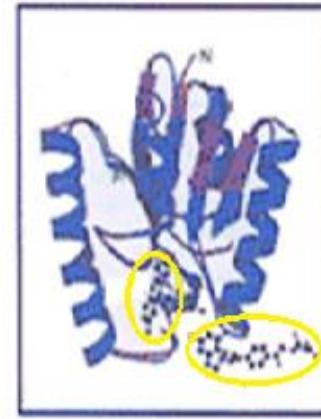
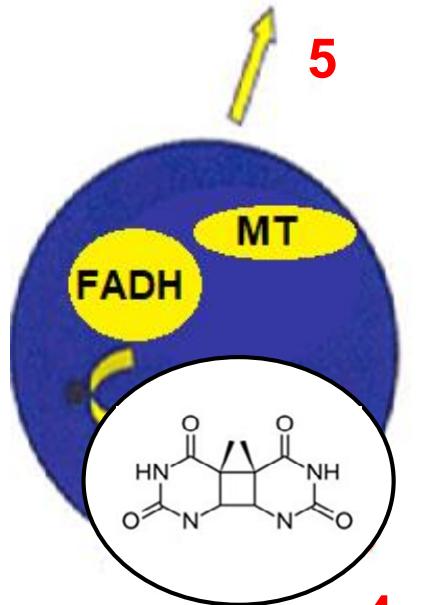


Тиминовый димер

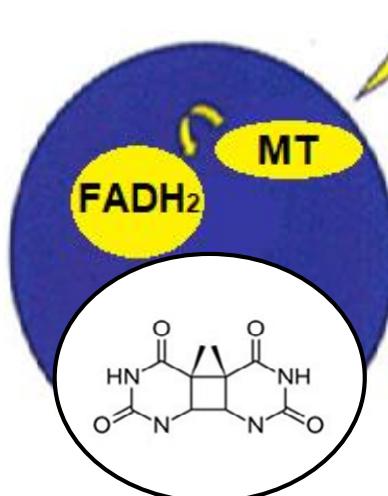


1

Фотореактивация ДНК с помощью фотолиазы



2



3

ВИДИМЫЙ СВЕТ
360 - 500 нм

Метинилтетрагидрофолат (МТ),
выполняет функцию антенны,
поглощая фотон синего света.
Энергия возбуждения передается
флавинадениндинуклеотиду (FADH₂).
Флавин отдает электрон
пириимидиновому димеру,
устраняя повреждение.

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



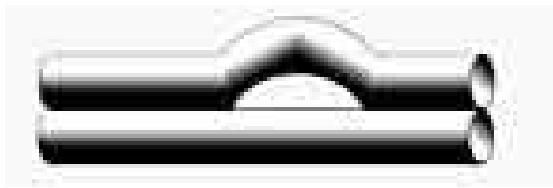
Сомалийская пещерная рыба *Phreatichthys andruzzii* за миллионы лет жизни в полной темноте утратила способность к фотреактивации - репарации ДНК, регулируемой видимым светом.

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

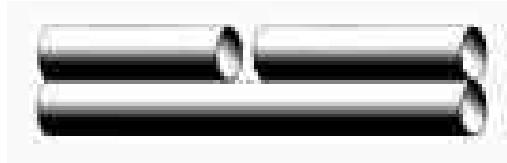
Эксцизионная репарация

Обобщенная схема восстановления нормальной структуры ДНК

1. Узнавание дефекта в ДНК



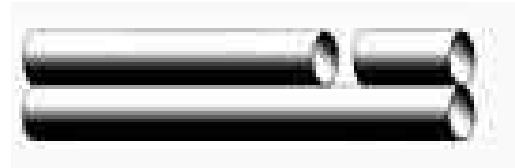
2. Расщепление ДНК
около дефекта



3. Вырезание поврежденного
участка нуклеазами

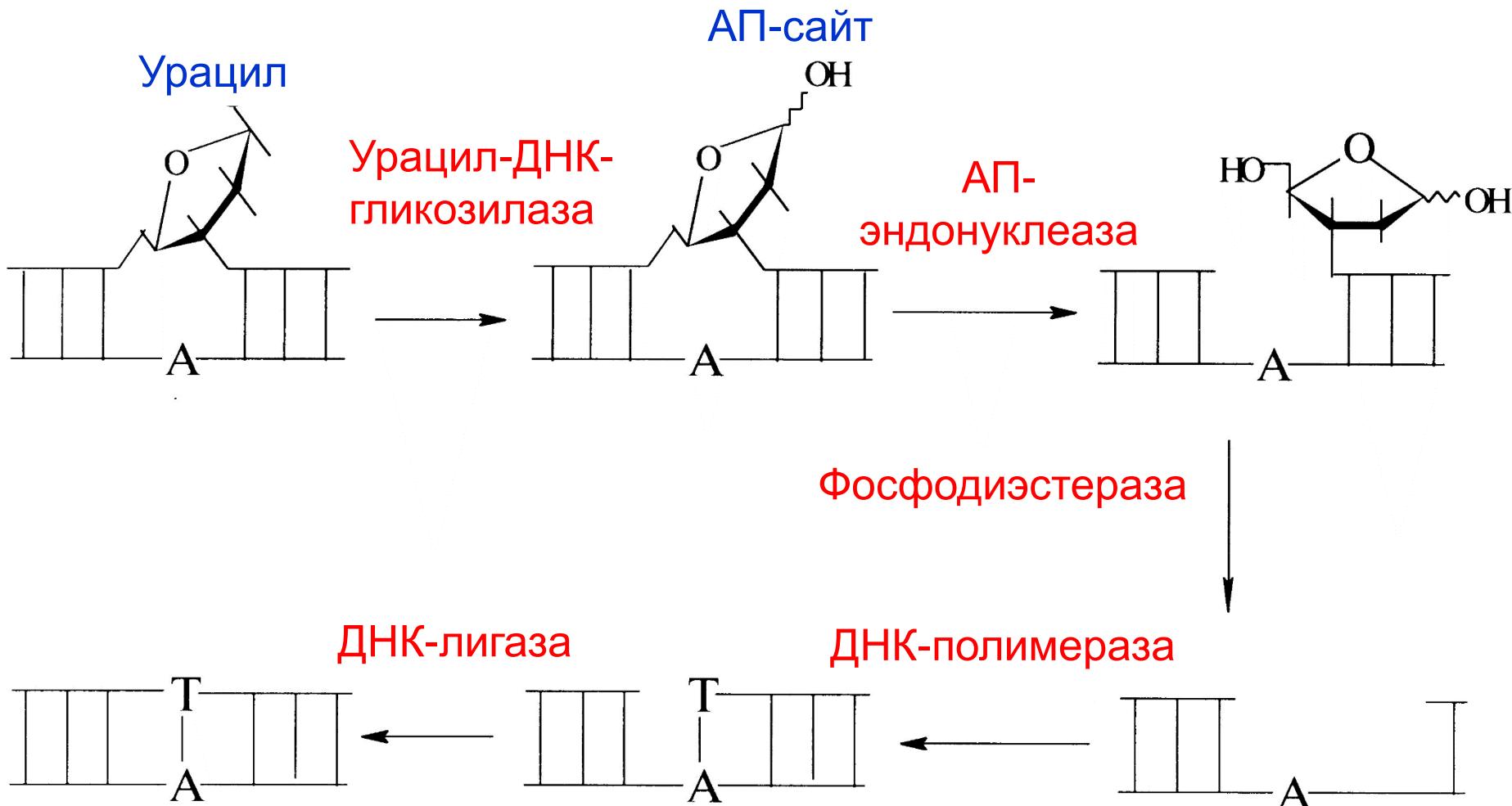


4. Застраивание бреши
ДНК-полимеразой



5. Соединение разрыва
в цепи ДНК-лигазой

Эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER)



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

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

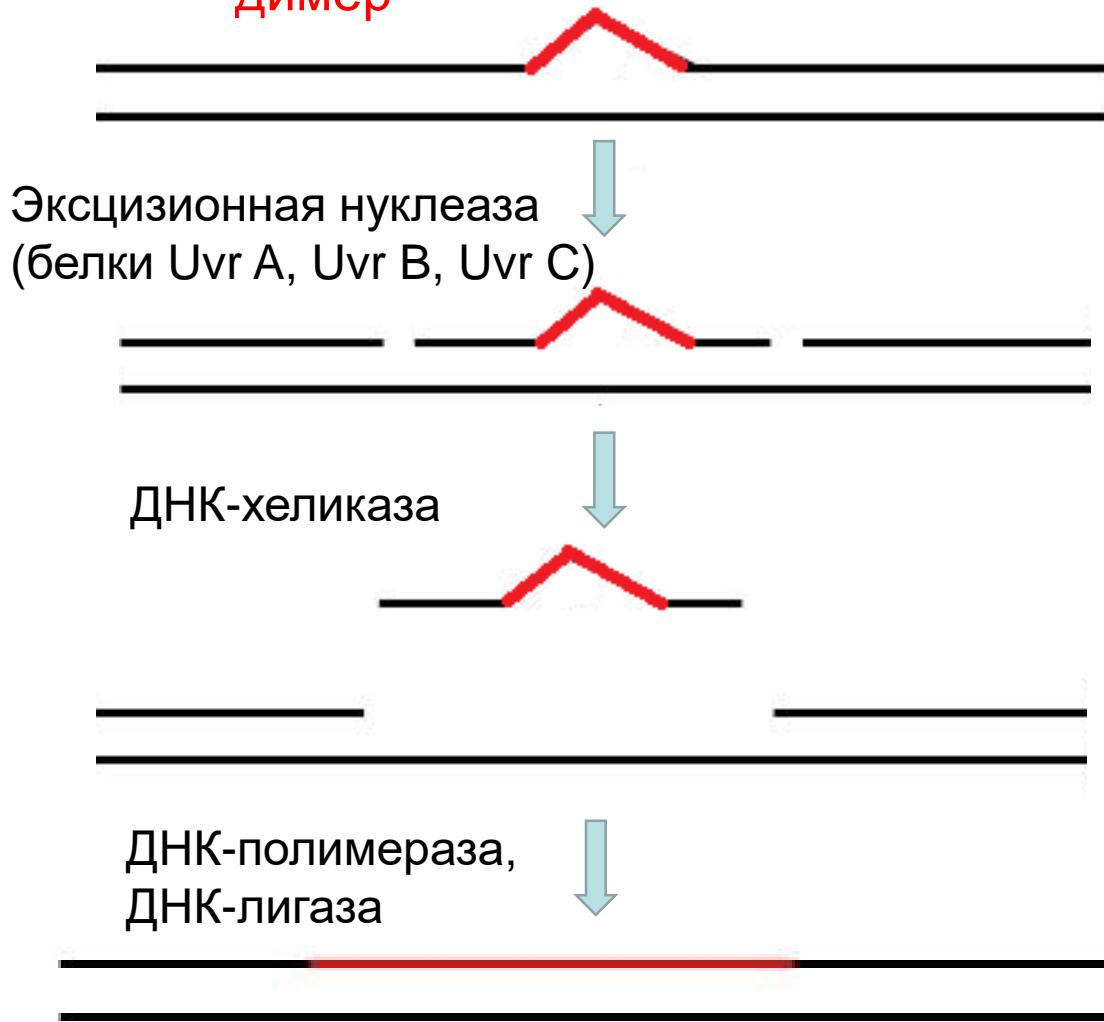
**Шведско-британский биохимик проф. Томас Линдаль
посетил Москву и Санкт-Петербург**



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

Эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER)

Пиримидиновый димер



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)

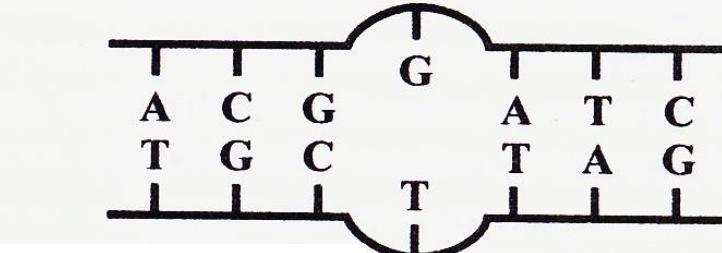
Симптомы - повышенная чувствительность к солнечному свету, приводящая к развитию рака кожи; пигментация, повышенная сухость кожи, язвы, рубцы



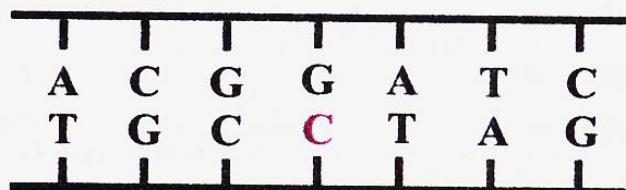
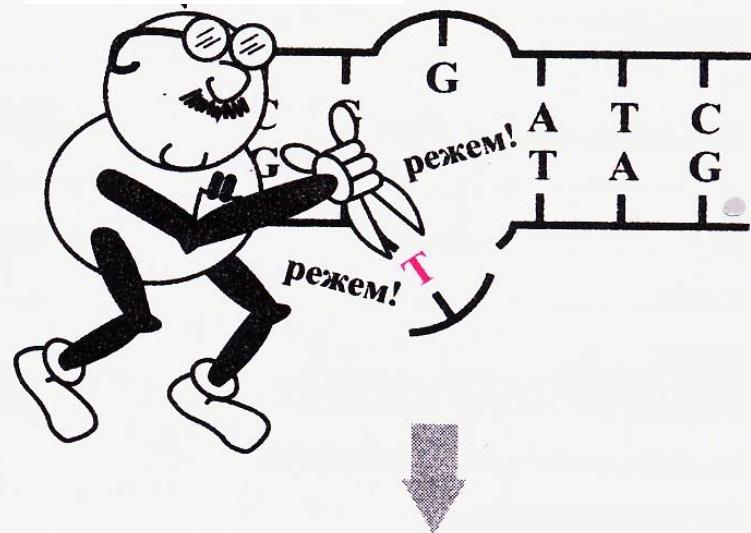
У большинства больных пигментной ксеродермой также выражены неврологические расстройства, предположительно из-за отсутствия у них репарации определенных повреждений, вызванных высокой активностью окислительного метаболизма в нейронах

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

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



Система MMR
детектирует
дефект в
структуре ДНК



Какой из двух нуклеотидов был неправильным?



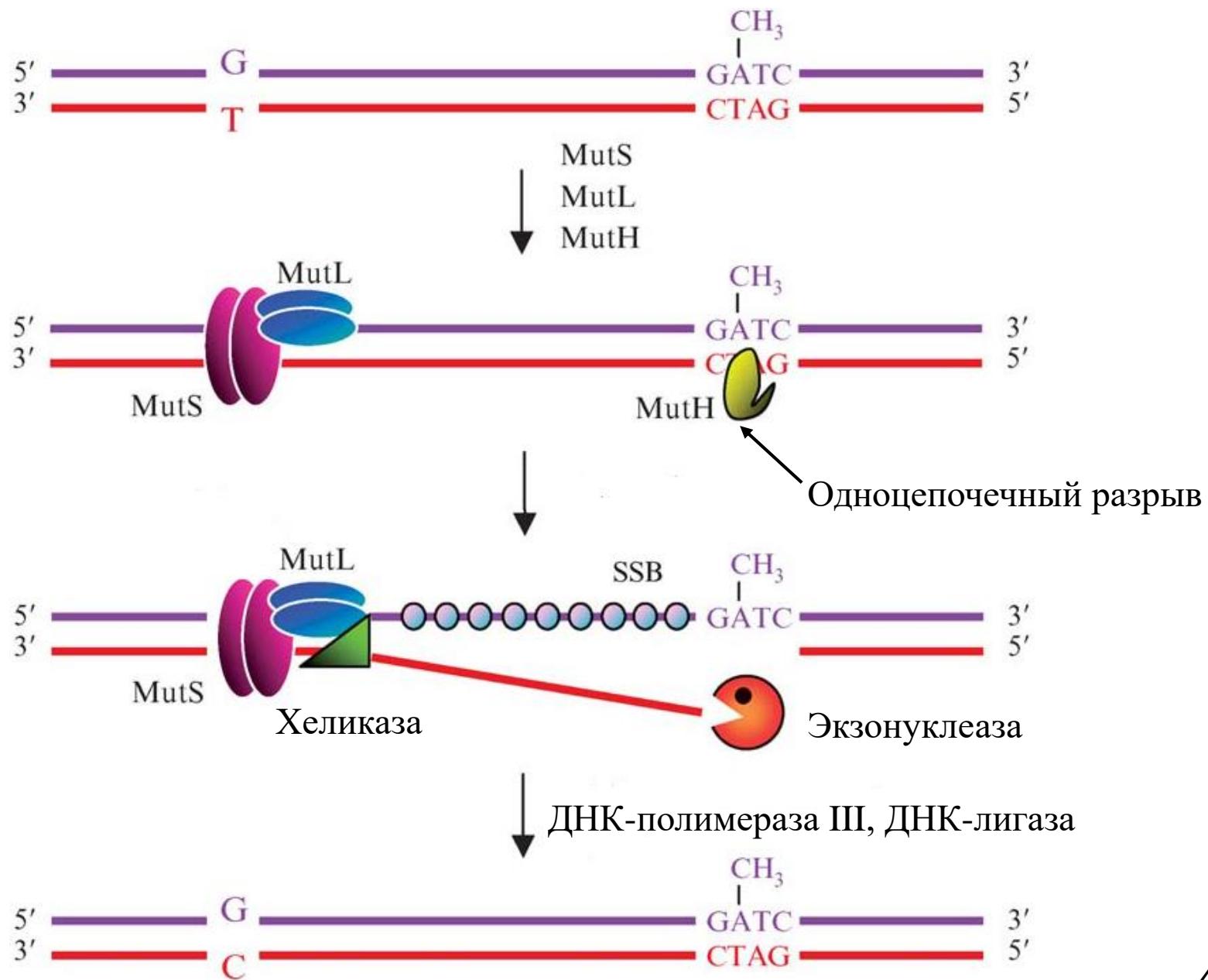
Д. Кларк, Л. Рассел,
Молекулярная биология,
2004

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



Дам-метилтрансфераза

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

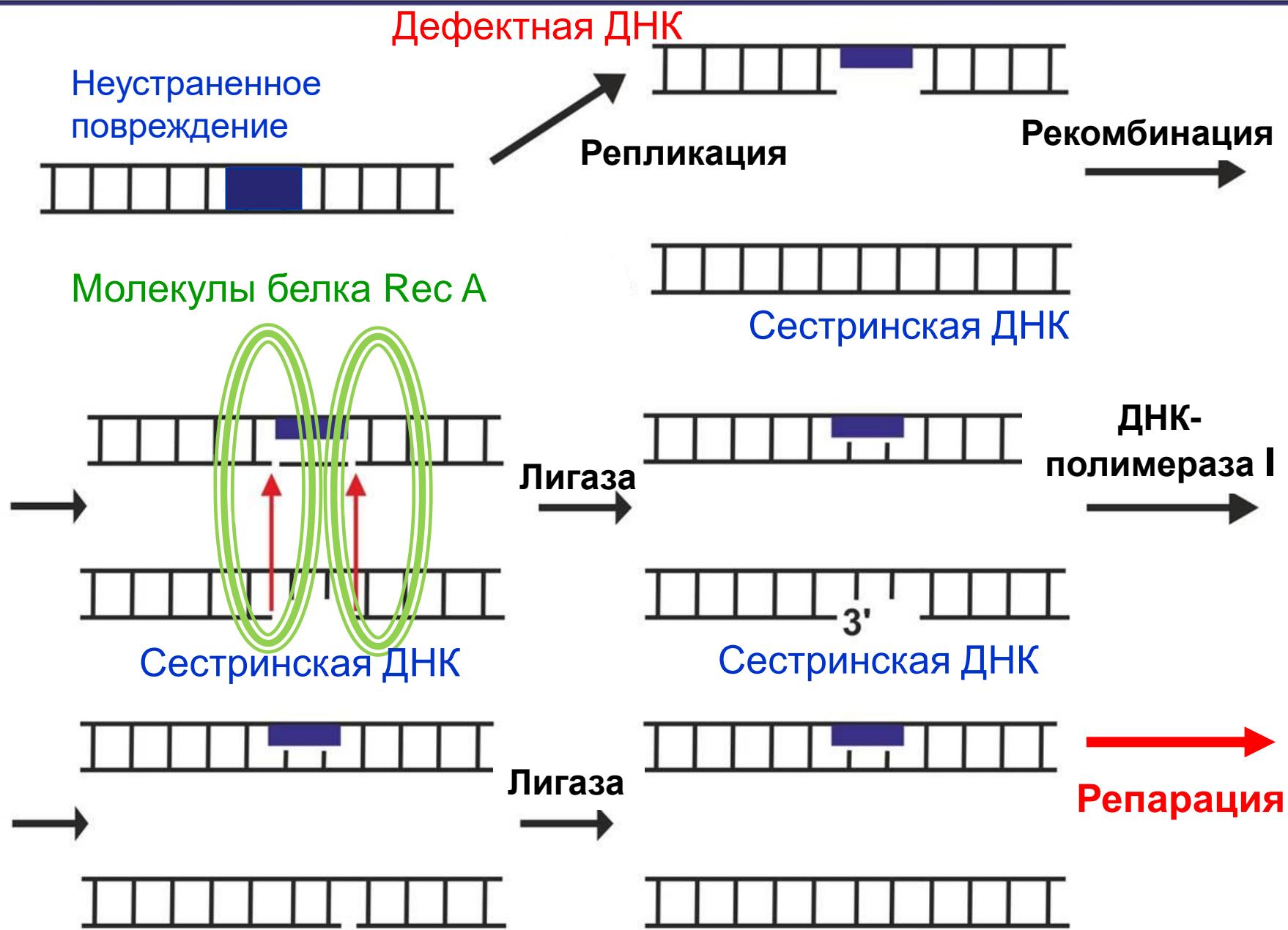


Мутации в генах белков, ответственных за репарацию неканонических пар нуклеотидов, приводят к развитию наследственного неполипозного рака прямой кишки (синдрома Линча)



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

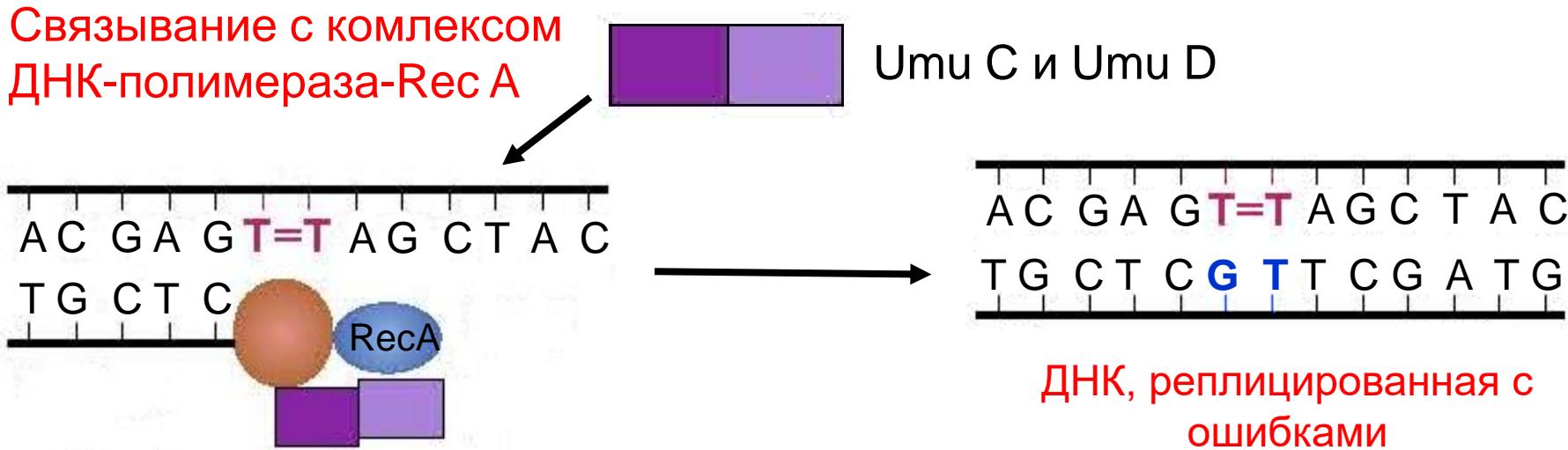
«SOS» - международный сигнал бедствия («спасите наши души»)

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–Rec A, понижая точность его работы. Репликация ДНК происходит, но дочерняя цепь несет мутации напротив дефектов в материнской цепи

Связывание с комплексом
ДНК-полимераза-Rec A



В устраниении 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.