### Часть III

# Механизмы репарации ДНК

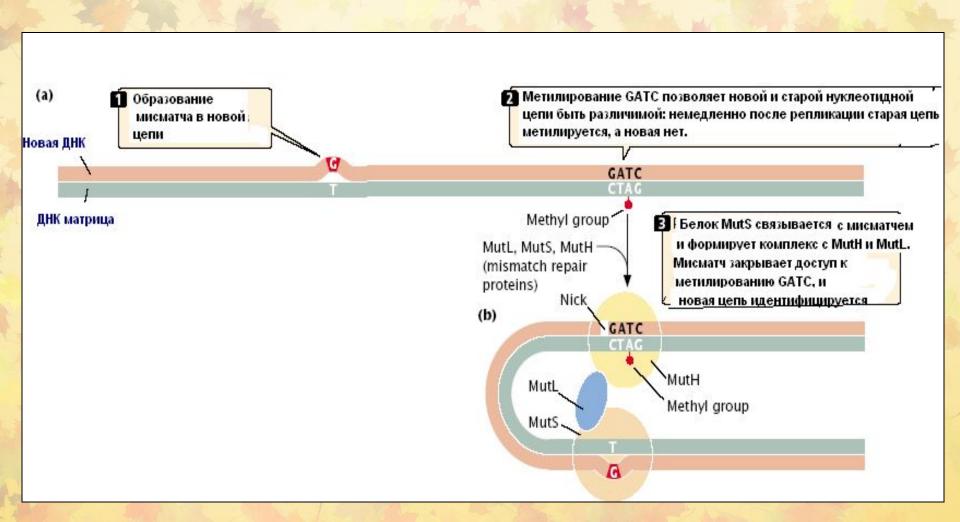
# Механизмы репарации ДНК

Репарационная система	Тип репарируемого повреждения		
Мисматч	Ошибки репликации, включая неверно вставленные основания, а также отставания цепи		
Прямая	Пиримидиновые димеры и др. специфические повреждения ДНК		
Эксцизия оснований (BER)	Модифицированные или поврежденные основания, пиримидиновые димеры		
Эксцивия нуклеотидов(NER)	Повреждения ДНК, которые нарушают дуплекс, включая модифицированные или поврежденные основания, пиримидиновые димеры		

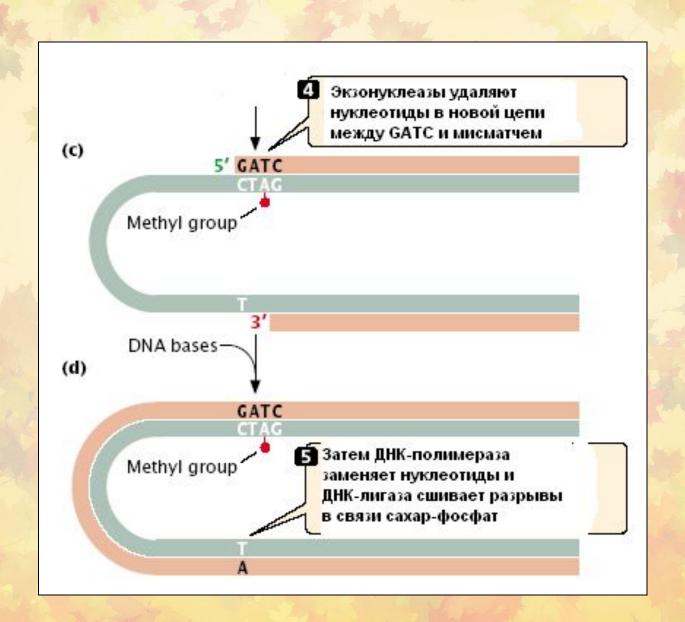
# Объекты для изучения репарации

- Escherichia coli
- Saccharomyces cerevisiae
- Caenorhabditis elegans
- Arabidopsis Thaliana
- Мыши, крысы
- Клеточные культуры человека

# 1. 1. Мисматч репарация (ММR) Этапы 1 - 3



#### MMR. Этапы 4 - 5



# А. Репарация мисматчей у бактерий

- 1. VSP- very short patch repair
- 2. Short patch repair
- 3. Long patch repair

## VSP- very short patch repair – 1

- В основном удаляется T из мисматчей G/T и C/T.
- MutS распознает следующие мисматчи:

### VSP- very short patch repair – 2

MutY заменяет A из мисматчей C/A и G/A. Это адениновая гликозилаза, которая делает апуриновые сайты, распознаваемые эндонуклеазой. После чего запускается эксцизионная репарация.

### MMR млекопитающих

- 9 генов:
- MLH1, MLH3, PMS1-2, MSH2-6

MSH – гомолог MutS

MLH — гомолог MutL

MSH2-6 гетеродимер репарирует 1bp инсерции-делеции MSH2-3 гетеродимер репарирует 1-4 bp инсерции-делеции

#### MMR человека

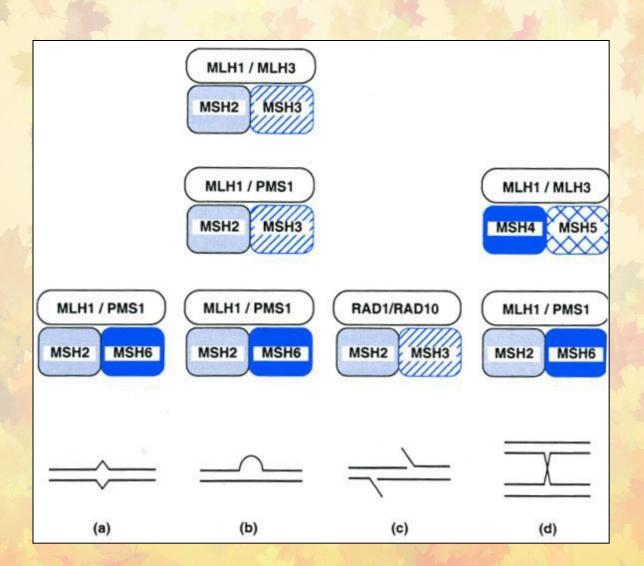
На примере болезни HNPCC (heredity non-polyposis colorectal cancer) в 1993-1994 гг. У человека найдено 6 белков MutS и 4 – MutL.

#### MMR человека

На примере болезни HNPCC (heredity non-polyposis colorectal cancer) в 1993-1994 гг.

- Пациенты с HNPCC имеют дефектную репарацию мисматчей (MMR).
- Наиболее часто мутируют человеческие гомологи MutS и MutL hMSH2 и hMLH1.
- Последний может инактивироваться гиперметилированием.
- У человека MMR устроена сложнее и представлена, по крайней мере, 6-ю MutS и 4-я MutL гомологами

# Комбинация генов при репарации мисматчей



# Показатели риска заболевания раком (Standardized incidence ratios - SIRs) на основании популяционных и клинических исследований дефекта ММR

Tumor site	All MSI-H SIR (60)	Population-based SIR (60)	Clinic-based SIR (60)	Incidence per 100 000 (60)
Colon	6.1 (5.2–7.2)	4.3 (3.4–5.3)	9.6 (7.5–12.3)	5319
Gastric	4.6 (2.7-6.6)	3.3 (1.4-5.4)	7.1 (3.1-11.7)	614
Uterus	4.1 (2.9-5.6)	3.4 (1.9-4.8)	5.4 (3.1-7.9)	2440
Kidney	2.6 (1.4-4.0)	1.8 (0.5-3.3)	4.1 (1.5-7.1)	438
Lung	0.3 (0.2-0.5)	0.2 (0.0-0.4)	0.6(0.2-1.1)	351
Ovary	2.0 (1.0-3.2)	1.6 (0.5-3.1)	2.6 (0.8-5.1)	714
Breast	0.5 (0.3-0.7)	0.4 (0.2-0.6)	0.6 (0.3-1.0)	1250
Hematopoietic	0.5 (0.2-0.8)	0.7 (0.2-1.1)	0.3 (0.0-0.7)	321
Pancreas	1.7 (0.7-2.8)	2.1 (0.8-3.8)	1.0 (0.0-2.7)	292
Prostate	0.3 (0.1-0.5)	0.3 (0.1-0.6)	0.3 (0.0-0.7)	292
Small bowel	7.6 (2.5-13.9)	9.7 (1.9-19.3)	3.6 (0.0-12.0)	175
Cervix	0.3 (0.1-0.5)	0.2 (0.0-0.4)	0.5 (0.0-0.9)	357
Bladder	0.4 (0.1-0.9)	0.3 (0.0-0.7)	0.8 (0.0-1.8)	146
Hepatobiliary	2.4 (0.6-5.0)	0.9 (0.0-3.2)	5.3 (0.0-11.7)	117
Ureter	9.0 (2.0-18.3)	10.0 (0.0-22.9)	6.8 (0.0-21.8)	117
Brain	0.7 (0.0-1.7)	0.7 (0.0-1.9)	0.6 (0.0-2.1)	88
Head/neck	0.3 (0.0-0.6)	0.4 (0.0-0.9)	N/A	88
Melanoma	0.3 (0.0-0.4)	0.2 (0.0-0.6)	N/A	58

#### Механизмы, осуществляющие вклад в специфичность клеточных типов, чувствительных к дефициту MMR

#### MECHANISMS CONTRIBUTING TO THE SPECIFICITY OF MMR DEFICIENT CARCINOGENESIS

#### High Proliferation Rates

GI Epithelium **Blood Leukocytes** Non-melanotic dermal epithelium?

#### Cell Type Specific Mutator Targets

GI Epithelium (TGFBR2, BAX, APC) Endometrium (BAX, MSH6, PTEN)?

#### Immune Surveillance

Lymphocytes

#### Cell Type Specific Apoptotic Pathways

GI Epithelium? Endometrium? Ovary?

#### MMR-Environmental Toxin Exposure

GI Epithelium GU epithelium

#### Mode of Inheritance

(Germline Recessive vs. Somatically acquired MMR Deficiency) Lymphocytes Monocytes

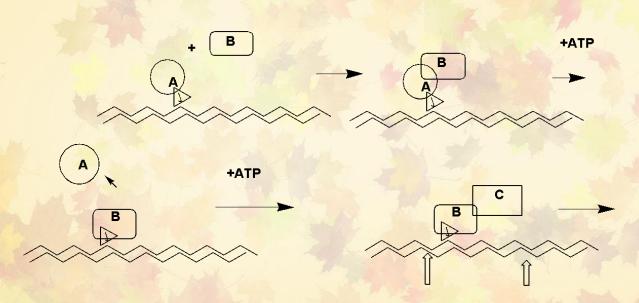
#### Rapid Acceleration/Deceleration

of Proliferation Endometrium? Ovary? GI epithelium?

Non-melanotic dermal epithelium?

Blood leukocytes?

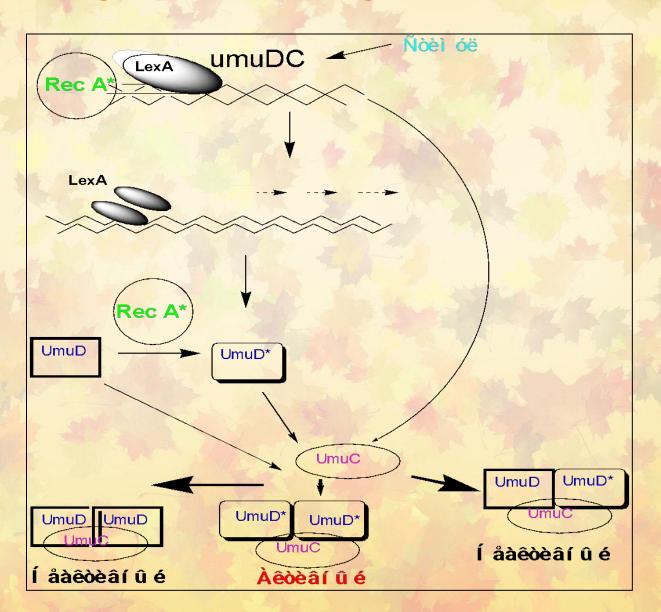
# 1. 2. UVR репарация



Надрез с каждой стороны

UVRD-гликозилаза освобождает ДНК между 2-мя разрывами, вырезает поврежденный участок. ДНК полимераза 1 (III, III) завершает синтез.

# SOS-мутагенез у бактерий



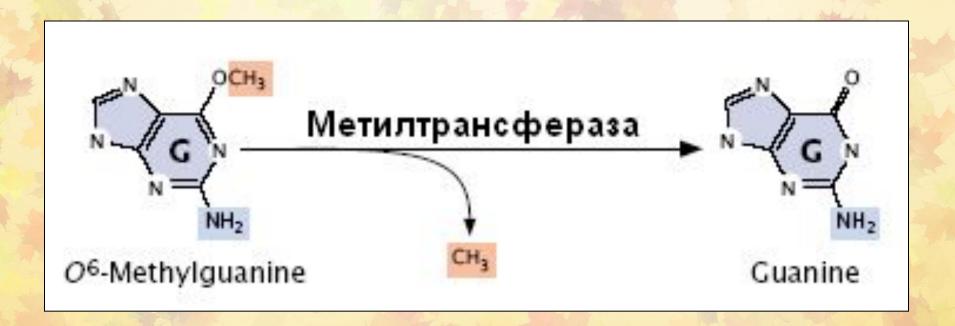
# 2. Прямая репарация

Репарируются О6-метилгуанин и О4-метилгуанин ферментом МТаза (MGMT).

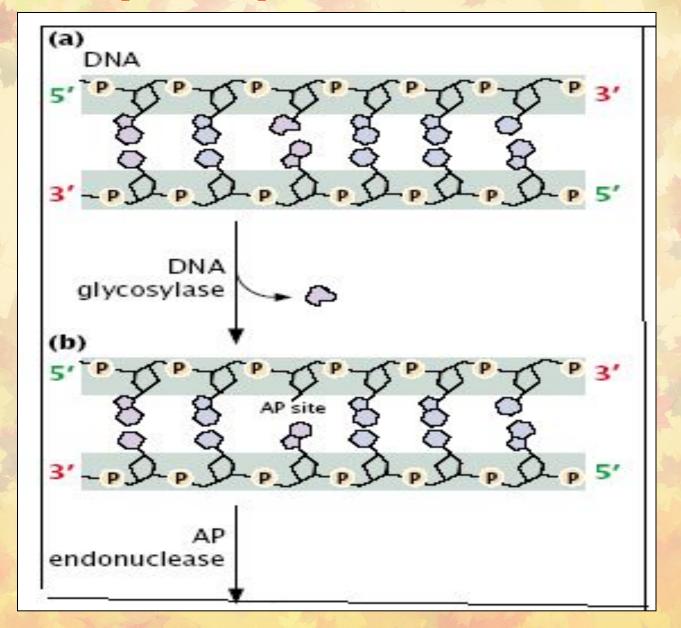
У E. coli 2 фермента (гены ada и ogt).

Если нет активности, то О6-мГ может спариваться с Т, тогда GC → AT. В случае О4-мГ транзиция – AT → GC

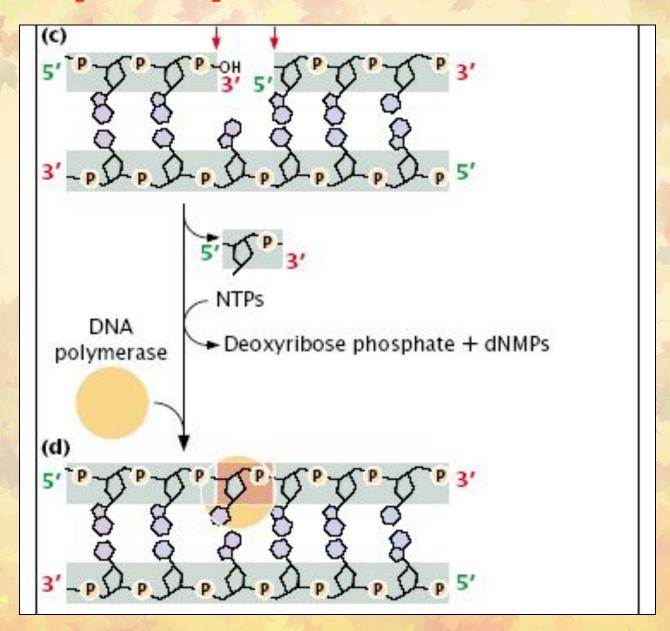
# Пример реакции



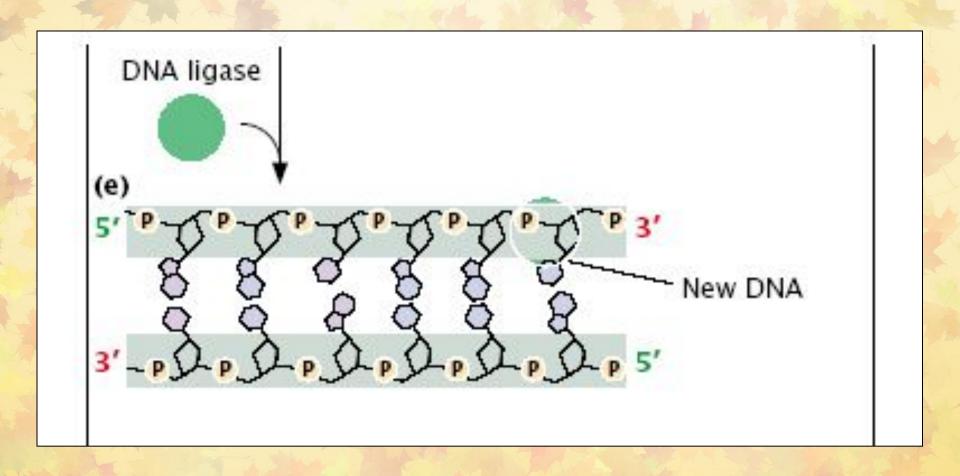
# 3. BER-репарация. Этапы 1-2



# BER-репарация. Этапы 3-4



# BER-репарация. Этап 5



#### модифицированное основание Поврежденная ДНК Удаление повр. ДНК гликозилаза основания АР сайт АР эндо АР эндо АР лиаза PCNA Pol δ, pol β, АР эндо pol B pol δ, pol FEN1/PCNA DNA Ligase III; XRCC1 DNA Ligase I реп. ДНК Short Patch-BER Long Patch-BER Иллюстрация различных путей BER

# 4. NER-репарация

- 1. TCR transcription coupled repair (преимущественная репарация траснкрибируемых цепей гена)
- 2. GGR global genome repair (оставшаяся часть генома)
- NER репарирует многочисленные повреждения ДНК.
- В процесс вовлечены продукты более 30-ти генов.

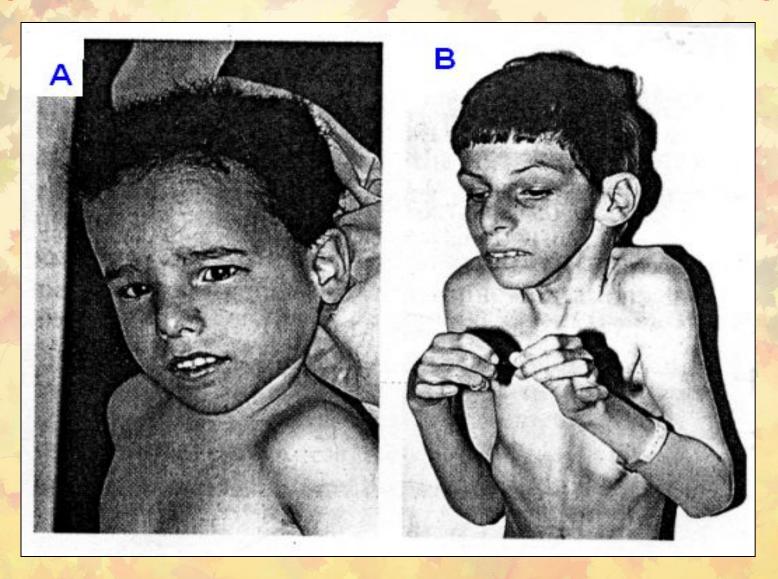
#### Больные пигментной ксеродермой



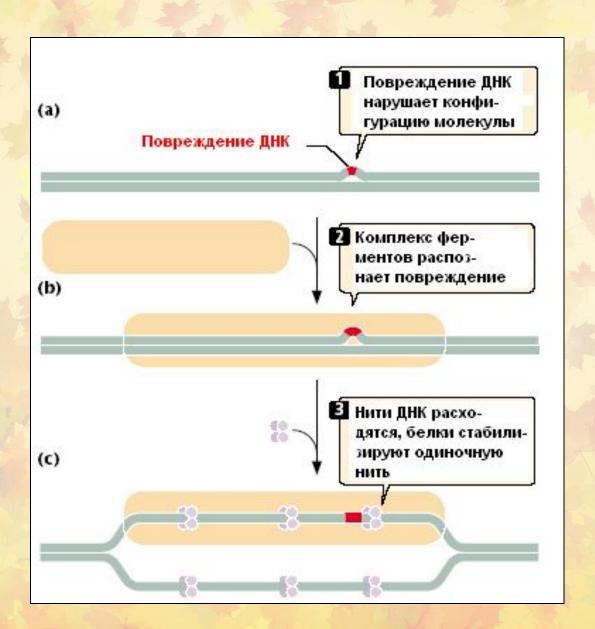


Выявлена в 1968 г. Дефект одного из 7 или более XP генов

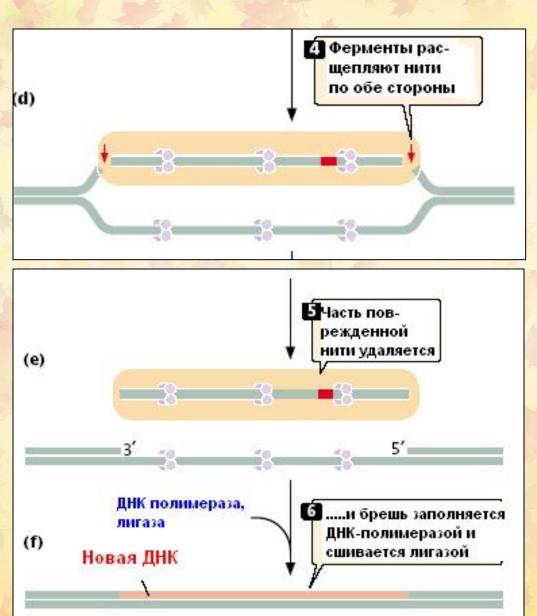
# Больные TTD трихотиодистрофией (A) и CS кокаиновым синдромом (B)



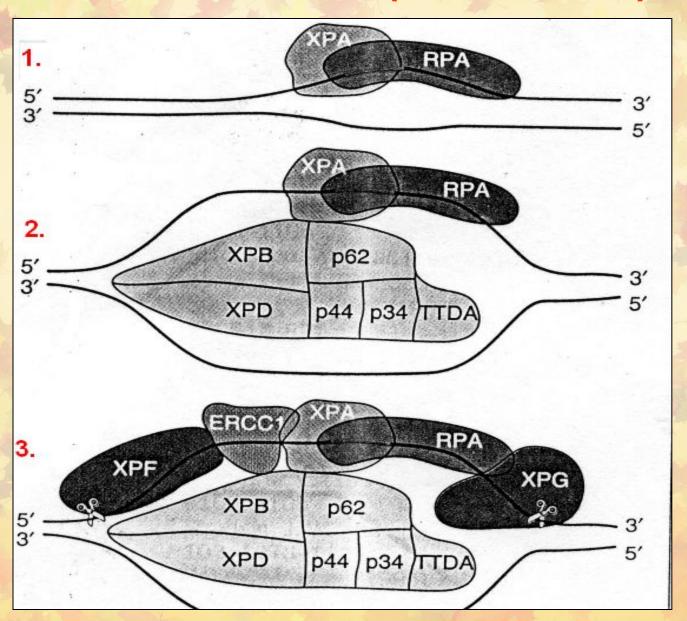
### Этапы NER. 1-3



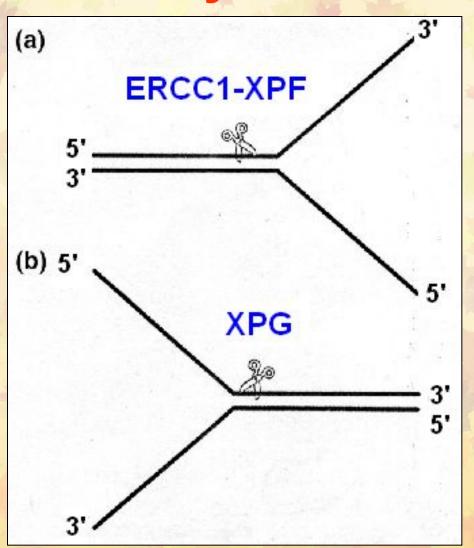
### Этапы NER. 4-6



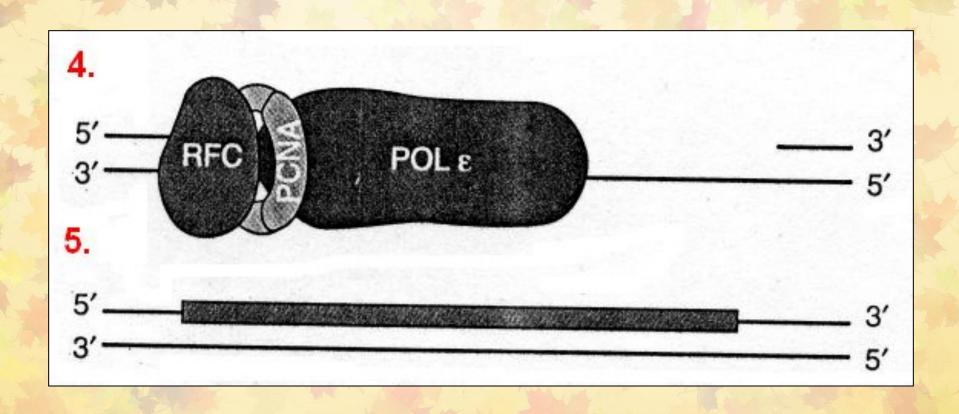
#### Биохимия NER (Этапы 1-3)



# Специфическая активность XP нуклеаз



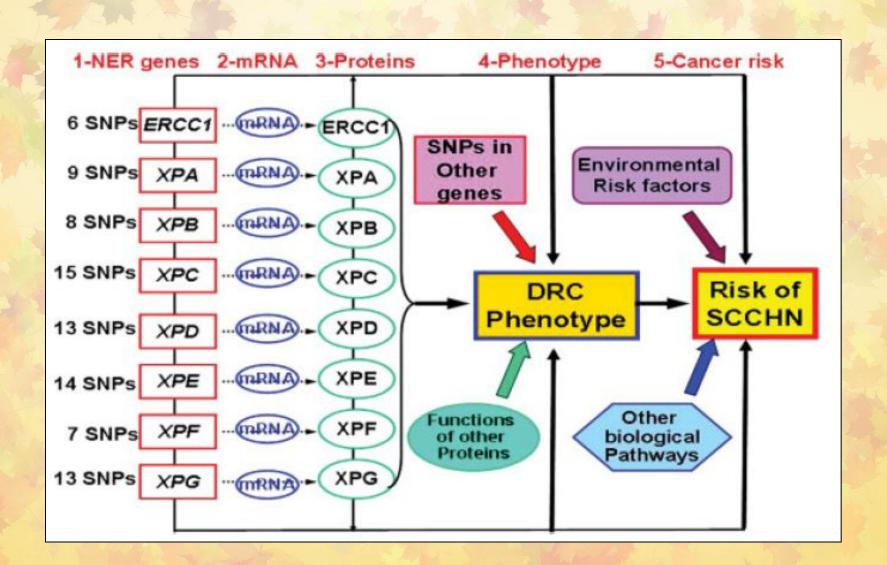
## Биохимия NER (Этапы 4-5)



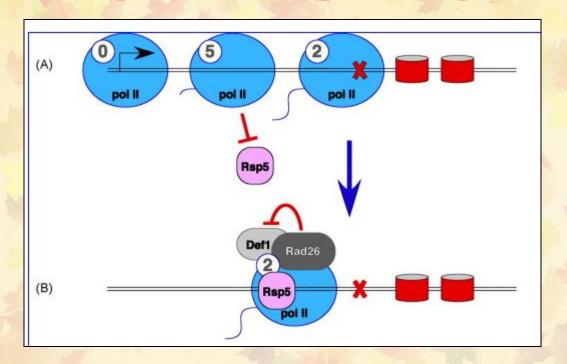
### Повреждение ХР при болезнях

- XP мутации в генах XP A-D,F,G
- TTD серо-дефицитные хрупкие волосы, малый рост, задержка умственного развития, кожи напоминает рыбью чешую, чувствительны к солнцу, г.о. поврежден ген XPD нарушается функции TFIIH, выполняющего функции ФТ, возможно, участвующего в регуляции серосодержащих белков.
- CS карликовость, потеря жировой ткани, задержка умственного развития, катаракта ретины, кариес зубов, острая чувствительность к солнцу

### Вклад NER генов в развитие сквамозной карциномы головы и шеи

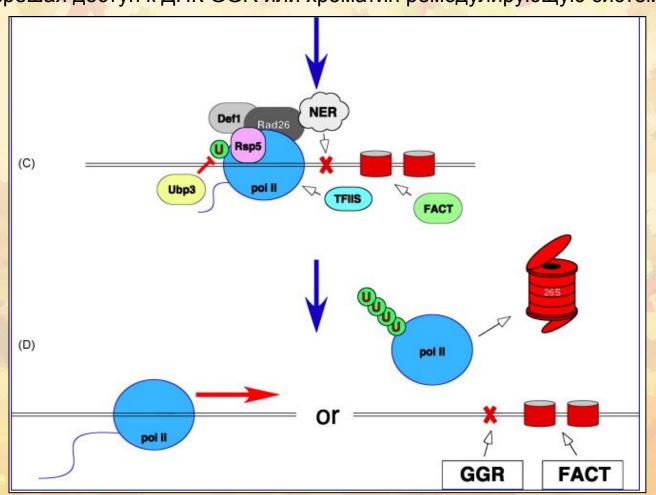


### Роль pol II в репарации

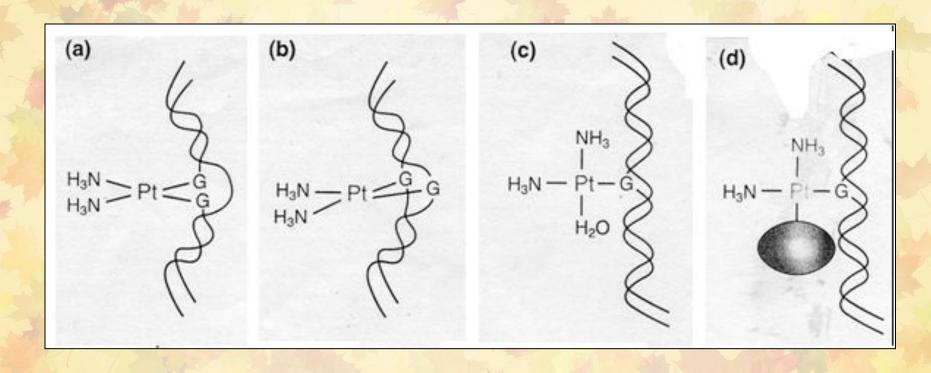


Когда роІ ІІ взаимодействует с промотором, она находится в гипофосфорилированном статусе ('0'). В этом виде она не распознается Rsp5 Ub-ligase. Инициация требует фосфорилирование 5-го остатка серина ('5') в CTD повторах Rpb1, что препятствует распознаванию Rsp5. Так как роІ ІІ продолжает процесс элонгации, происходит последовательное фосфорилирование серинового остатка 2 ('2') в CTD, что конкурирует с образованием Rsp5—Rpb1. После элонгации роІ ІІ происходит остановка транскрипции при повреждении ДНК (красный 'X') или из-за компактного хроматина (красные цилиндры). (В) Прекращение 2-фосфорилирования а роІ ІІ приводит к образованию Rad26/Def1 комплекса и, вероятно, Rsp5.

Rad26 создает NER комплекс в сайте повреждения. В то же время Rsp5 (и Ubc5, не показано) начинают строить Ub-цепь на Rpb1, инициируя 'Ub clock', действие которых может замедляться Ubp3 деубиквитинилирующимферментом. Когда часы работают, факторы, такие как TFIIS—запускающие обратный механизм для pol II—и модулирующие хроматин комплексы, такие как FACT, делают попытку либо запустить NER, либо очистить нуклеосомный блок. (D) Если транскрипция регулируется часами, она начинается (слева). Если время действия Ub-clock истекает, комплекс pol Ilразрушается, разрешая доступ к ДНК GGR или хроматин ремодулирующую систему

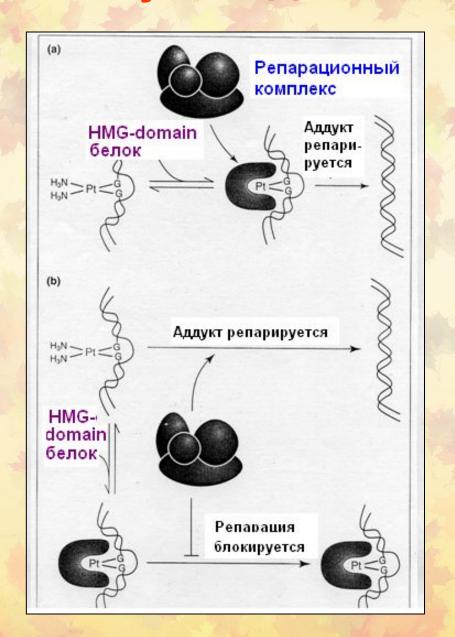


## Аддукты ДНК с цис-платином

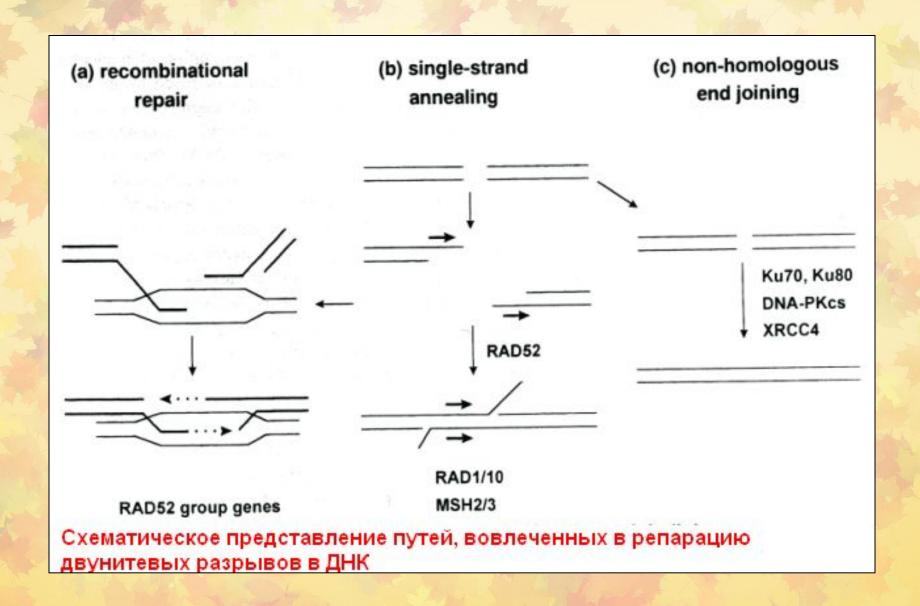


- A) внутринитевые сшивки; В) межнитевые сшивки;
- С) монофункциональный аддукт; D) аддукт с репарационным белком

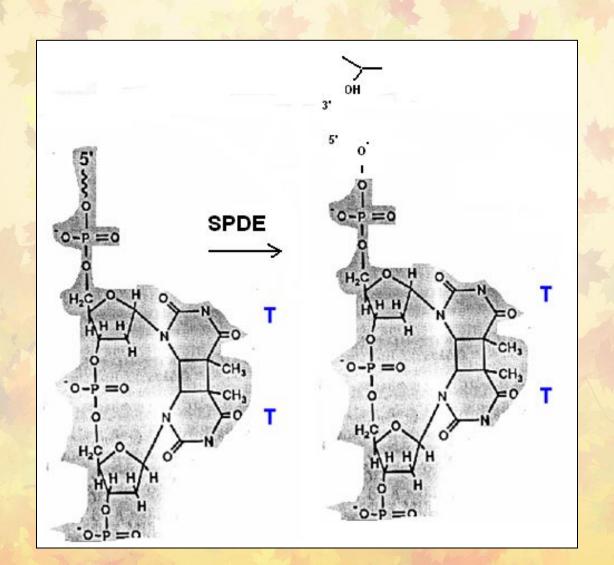
#### Репарация аддуктов ДНК с цис-платином



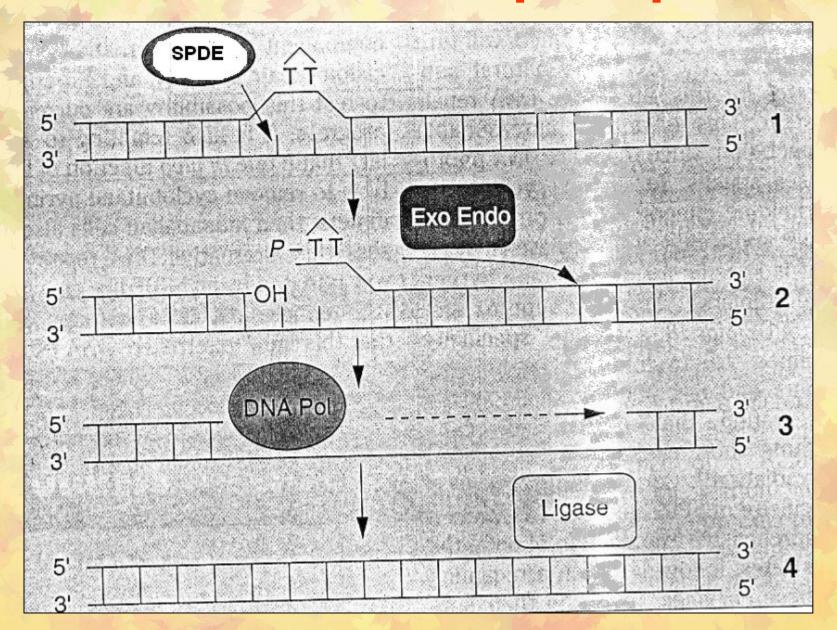
### 5. Другие виды репарации ДНК



## Альтернативный механизм репарации у дрожжей *S. pombe*



## Основные этапы репарации



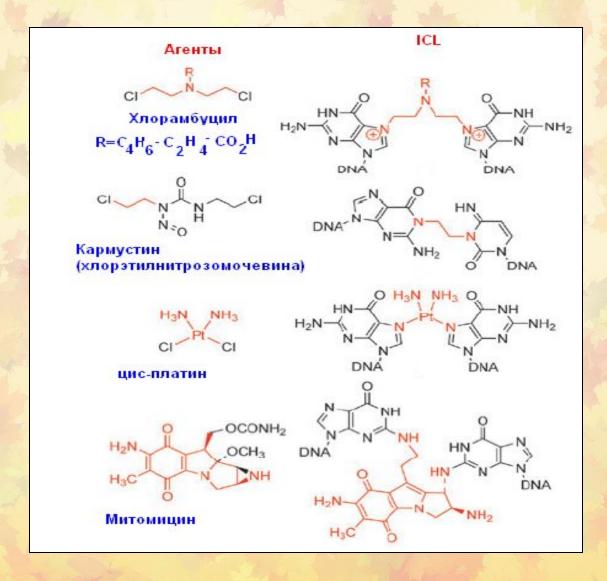
#### Белки АТМ

ATM (="ataxia telangiectasia mutated")
получила название от болезни, пациенты,
среди прочего, имеют высокий риск
заболевания раком

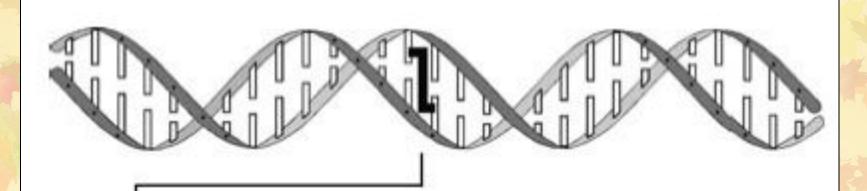
#### Белки АТМ:

- распознают повреждения ДНК, особенно двунитевые разрывы (DSB)
- - выполняют функцию, подобную р53
- - поддерживают нормальную длину теломер

# Примеры ICL, вызванных антираковыми агентами

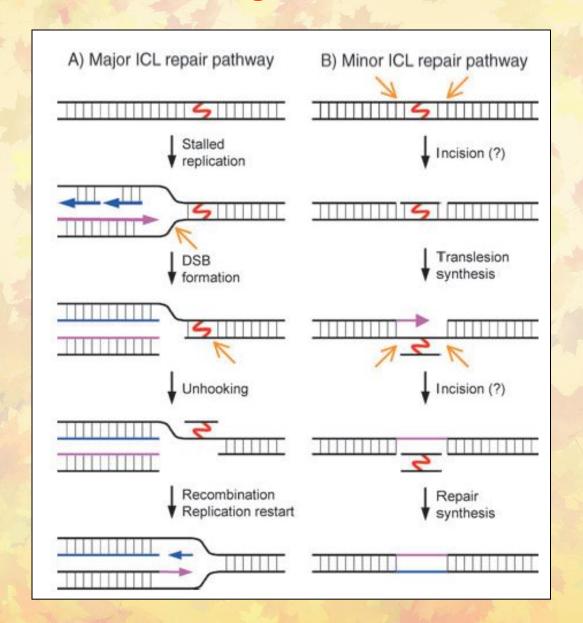


### Клеточный ответ на ICLs



- → Replication Block/DSB formation
- → Transcription Block
- → Cell cylce arrest
- → Apoptosis
- → Activation of FA pathway
- → Induction of Homologous Recombination
- DNA repair

### Репарация ICL у млекопитающих



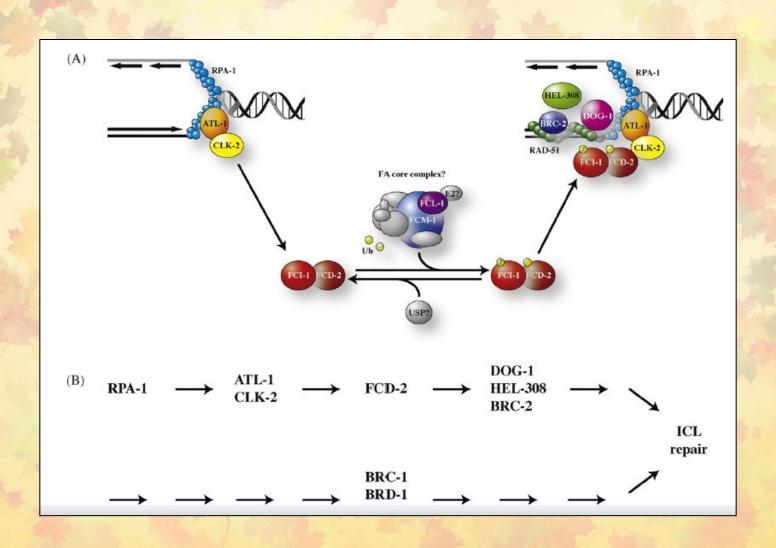
# Fanconi Anemia (FA)путь репарации

 У пациентов с FA повреждено, по крайней мере, 13 генов: FANCA, B, C, D1/BRCA2, D2, E, F, G/XRCC9, I, J/BRIP1/BACH1, L,M/Hef и N/PALB2

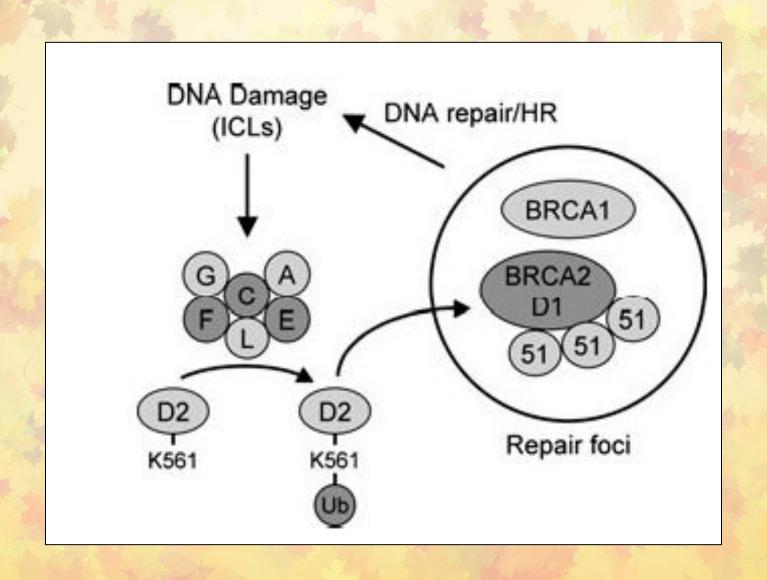
#### Сравнение FA генов у человека, Drosophila, Dictyostelium and C. elegans

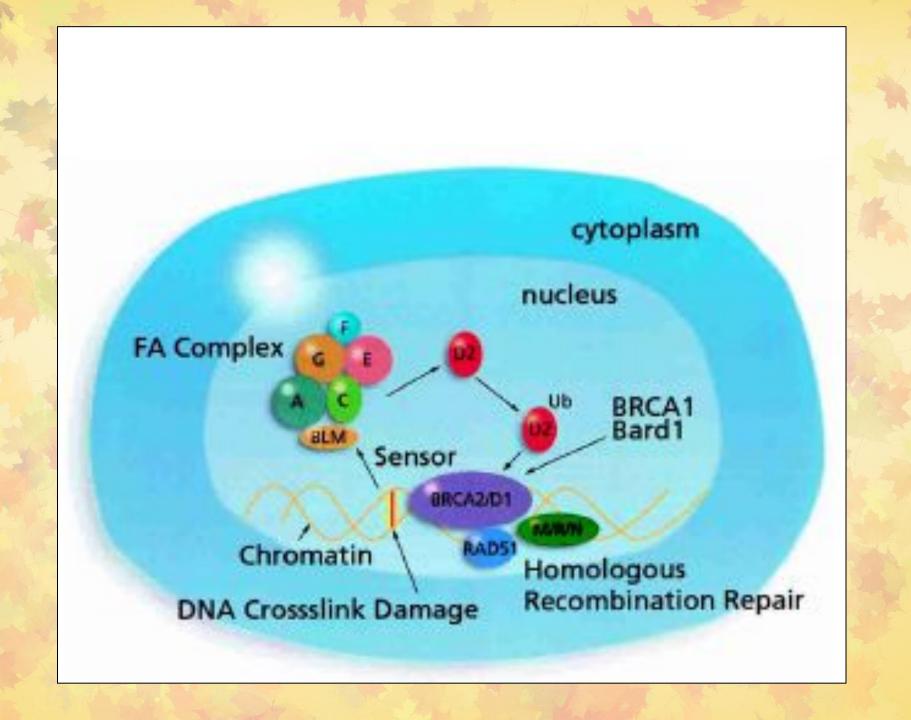
Human FA gene	Identified in Drosophila?	Identified in Dictyostelium?	C. elegans gene	Knock-out phenotype in C. elegans	Alleles available
FANCA	No	No	-		
FANCB	No	No	-		
FANCC	No	No	-		
FANCD1 (BRCA2)	Yes	Yes	brc-2	Lethal (maternal-effect) egl and emb	ok1629 tm1086
FANCD2	Yes	Yes	fcd-2	Both alleles are ICL sensitive	ok1145 tm1298
FANCE	No	No	2		
FANCE	No	No	-		
FANCG	No	No	4 <del>-</del>		
FANCI	Yes	Yes	W02D3.10?	Viable; not yet investigated	tm3081
FANCJ	No	Yes	dog-1	ICL sensitive; G/C-tract deletions	gk10
FANCL	Yes	Yes	Unidentified		-701000
FANCM	Yes	Yes	drh-3?	Both deletion alleles are sterile	btm1217 fj52
FANCN	No	No	-		

## FA путь у C. elegans.



## Fanconi Anemia путь регулирует репарацию ICLs ДНК с помощью гомологичной рекомбинации





#### SUMO

#### (small ubiquitin-related modifier) конъюгация

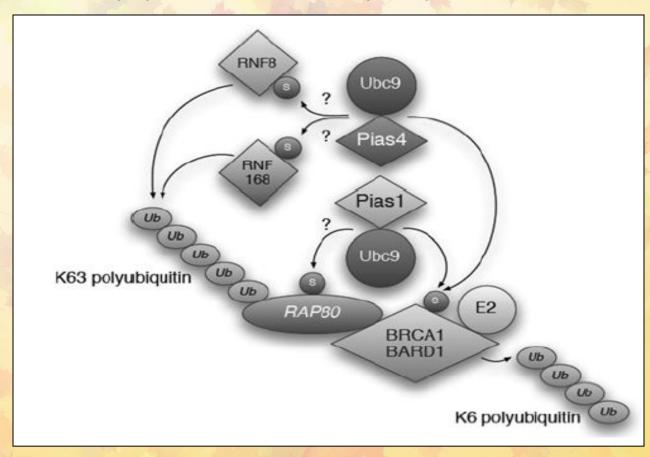
Несколько SUMO E3 лигаз выявлено: SP-RING (secretory protein with a RING finger domain) type, PIAS [protein inhibitor of activated STAT (signal transducer and activator of transcription)] и Nse2/MMS21 (methylmethane sulfonate 21), RanBP2 (Ran-binding protein 2) в ядерных порах, Polycomb protein 2 и TOPORS (topoisomerasel binding, arginine/serine-rich), а RING E3 для обоих: SUMO и ubiquitin.

SUMO формируется из пептидного предшественника и расщепляется одной или более из 6-ти SUMO протеаз SENP [SUMO1/ sentrin/SMT3 (suppressor ofmif two 3 homologue 1)-specific peptidase 2.

## Моделирование влияния SUMO конъюгации на BRCA1

Генотоксический стресс запускает SUMO модификации BRCA1 через активность UBC9–PIAS1 и UBC9–PIAS4 со стороны повреждения ДНК. Белок PIAS4 необходим для полной аккумуляции RNF168 и Lys63-убиквитин,

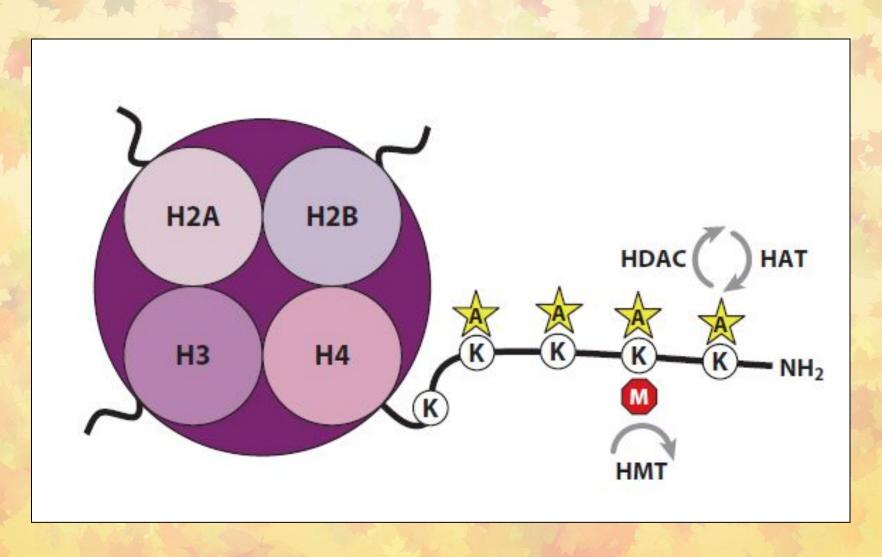
возможно, через регуляцию RNF8/RNF168 лигазных активностей или усилением белокбелковых взаимодействий. PIAS1 необходим для завершения аккумуляции RAP80 и BRCA1.



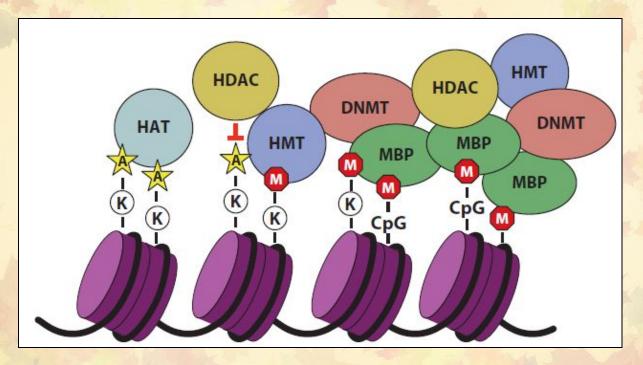
# IY. Эпигенетические модификации ДНК

- Модификации хроматина,
- Метилирование ДНК,
- Геномный импринтинг.

## Нуклеосомная организация ДНК

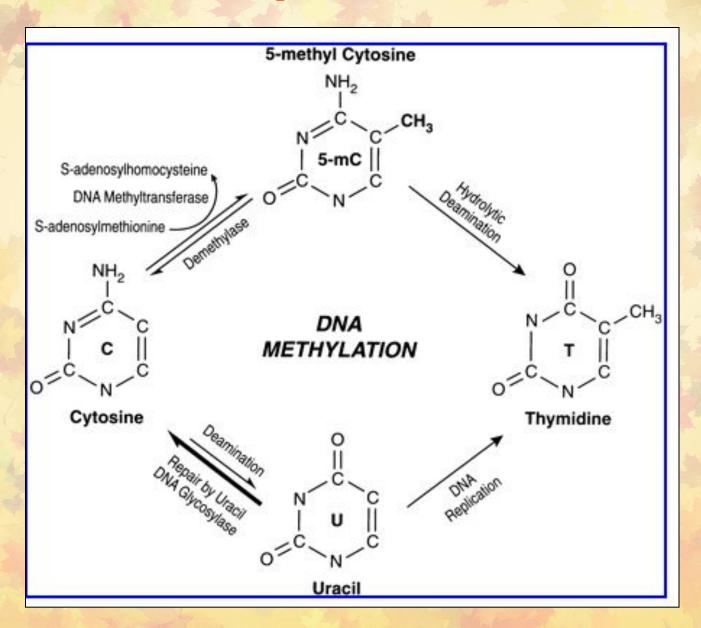


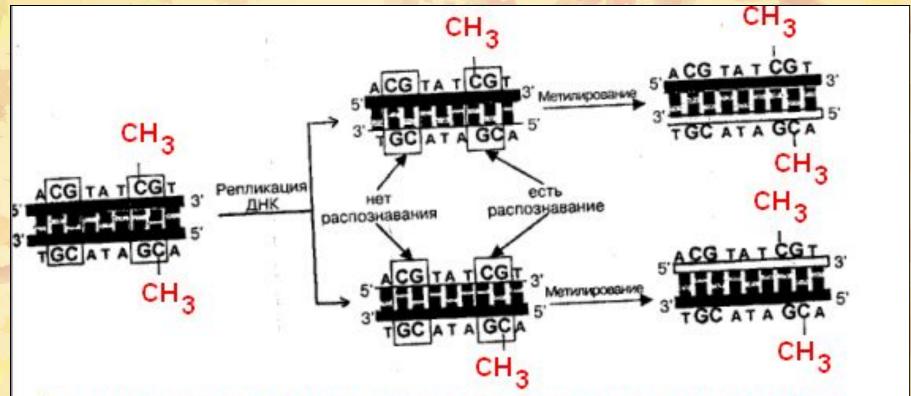
## Регуляции транскрипции ацетилированием гистонов



Гистон-деацетилаза (HDACs) деацетилирует лизиновые остатки, создавая предпосылки для метилирования НМТ. ДНК может также метилироваться по СрG динуклеотидам. Этот процесс опосредован ДНК метилтрансферазой (DNMTs), которая участвует в мультибелковом комплексе, который содержит HDACs и HMTs. Метил-СрG связывающий домен белки (MBPs) могут быть также введены в метилированную ДНК через их взаимодействие с HDACs и HMTs белками.

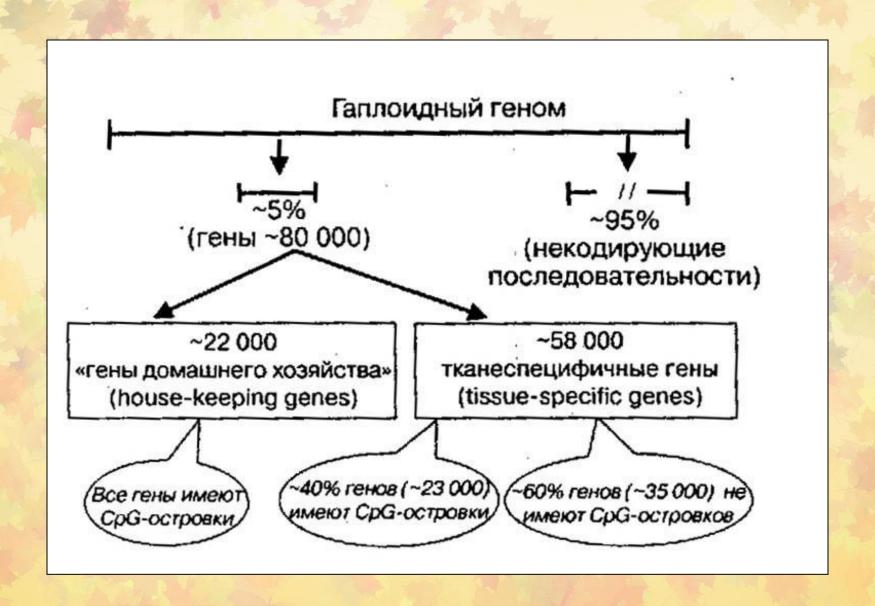
## Метилирование ДНК





Пострепликативное поддерживающее метилирование CpG. В результате репликации динуклеотиды CpG присутствуют только в материнской нити ДНК. ДНК-метилтрансфераза распознает вней метилированные CpG и воссоздает в дочерней нити тот же рисунок метилирования

### Распределение метилирования



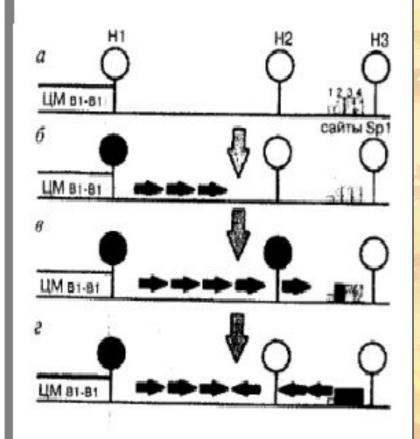
## Статус метилирования и функциональные особенности промоторов, содержащих CpG-островки

Промоторы, содержащие <u>СрG</u> - островки	Практически всегда неметилированы (независимо от транскрипционной активности) во всех нормальных клетках; исключения: гены неактивной X хромосомы и неактивные аллели импринтированных генов в аутосомных хромосомах.		
	Неметилированное состояние ассоциируется с открытой конформацией нуклеосом, характерной для транскрибируемых генов, с уменьшением количества гистонов путем гиперацетилирования		
	Метилирование Ср G-островков ассоциируется с масштабными изменениями в хроматине, компактизацией нуклеосом, с подавлением транскрипции.		
Промоторы, не содержащие <u>СрG</u> - островки	Вариабельность профиля метилирования Метилирование одиночных Ср G- динуклеотидов вблизи или внутри промоторов существенно влияет на структуру хроматина, но может препятствовать связыванию факторов транскрипции, осуществляя тем самым тканеспецифичность экспрессии генов.		

Модель формирования и поддержания профиля метилирования в 5'-области гена Aprt мыши. ЦМ-центр метилирования. В1 - повторы. Н1-3 сайты метилирования. Метилирование de novo инициируется в центре метилирования (не метилазой Dnmt1) и затрагивает сайт H1, после чего рапспространяется в 3'-направлении (реализуется Dnmt1). Распространению метилирования на сайты Н2-3, что чревато инактивацией гена, противостоит цис-ативность сайтов Sp1. Благодаря взаимодействию Sp1 (или подобных ему белков) с сайтами связывания (со 2 по 4) метилирование "выдыхается" на подступах к Н2.

а - неметилированный аллель на ранней стадии развития б,в - после имплантации бластоцита Н1 метилируется de novo

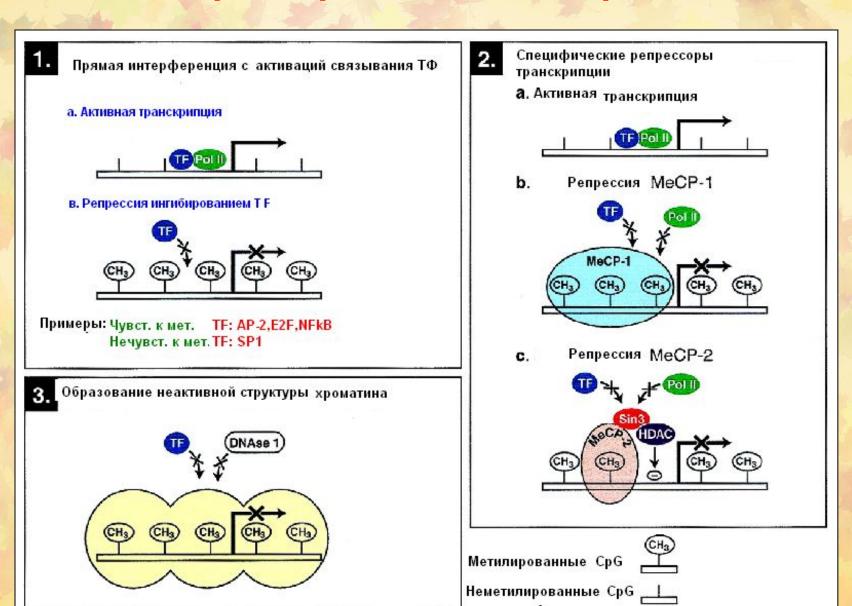
г - блокирование процесса

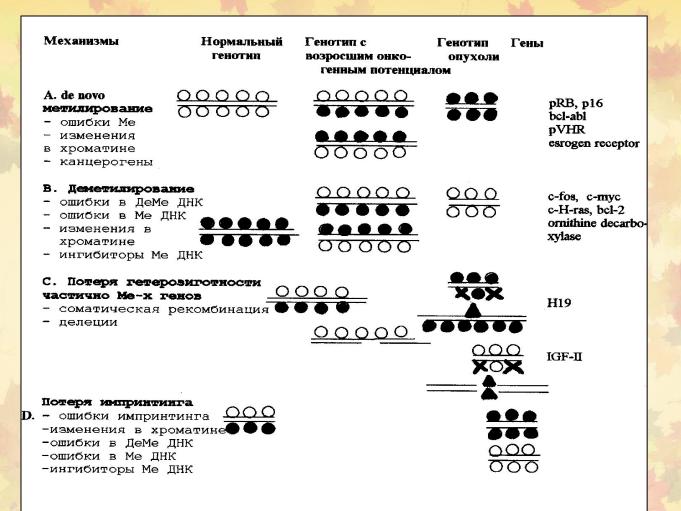


## Функции ДНК-МТаз

ДНК метилтрансферазы Функция		Локализация	Активность
DNMT1	Подд. метил-е, репрессия транс-ии	Репл. фокусы в S фазе	Преимущественно гемиметил. ДНК
DNMT2	Неизвестна	Ядро, не охарактеризована	Низкая активность <i>in vitro</i>
NMT 3A Метил. ремодулирование во время эмбриогенеза, повт. метил., репрессия		Гетерохроматин и нуклеоплазма	de ноvо метилирование
DNMT 3B Метил. ремодулирование во время эмбриогенеза, повт. метил., репрессия		Гетерохроматин и нуклеоплазма	de novo метилирование и поддер, метилирование
DNMT 3L	Метил. ремодулирование во время эмбриогенеза, репрессия, импринтинг, сперматогенез	Гетерохроматин и нуклеоплазма	Not an active enzyme
метил- CpG- связывающие белки	G- связывающие Функция		Специфичность связывания
MeCP2	Репрессия транскрипции	SIN3A, HDAC комплекс	Одиночные, симм. метил. СрG
MBD1 Репрессия транскрипции		Частично HDAC- зав. репрессия	Метил. и неметил. ДНК
IBD2 Репрессия транскрипции		МеСР1 хроматин ремод. комплекс	Метилированная ДНК
MBD3	Репрессия транскрипции	NuRD хроматин ремод. комплекс	Неметилир. ДНК
МВD4 Реп. ДНК, гликозилазный домен, реп. дезам. 5-меС		NA	5-methyl CpG/ТрG мисматчи

#### Активация транскрипции метилированием ДНК

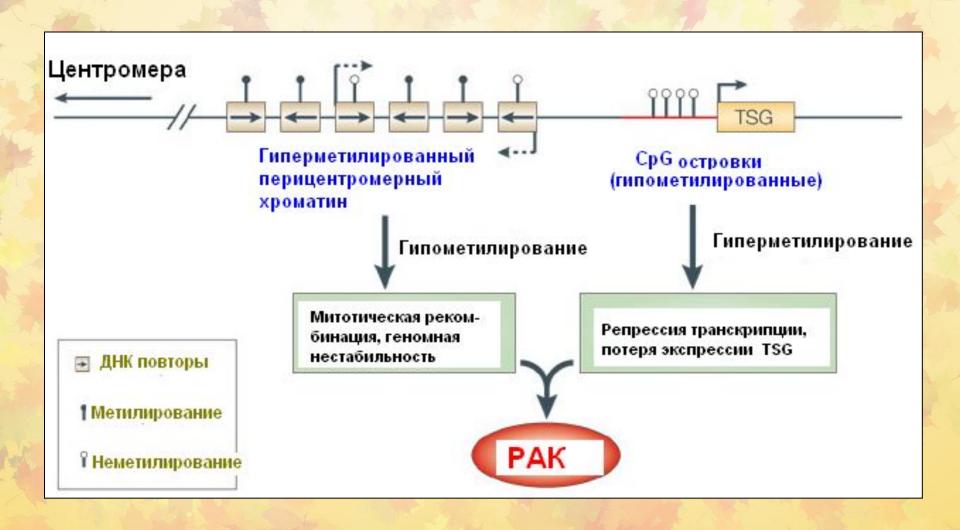




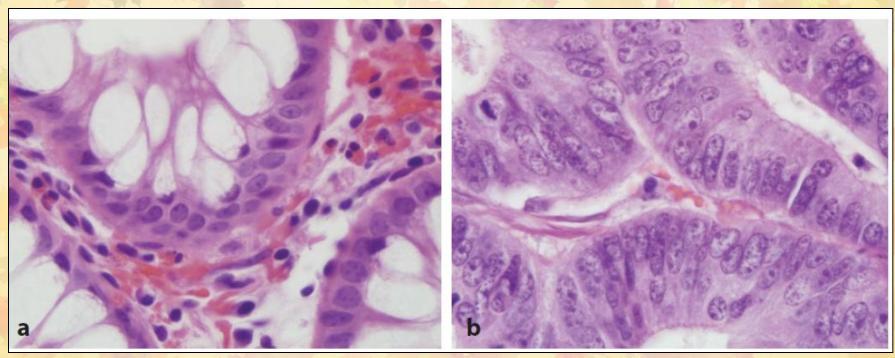
#### Эпигенетические изменения как результат ошибок в метилировании ДНК.

- А). Ошибки Ме ДНК могут увеличивать онкогенный потенциал клетки через гиперметилирование и инактивацию одного аллеля негативного регуляторного гена, контролирующего рост.
- А). и С). дальнейшие ошибки Ме ДНК, делеции, мутации и соматические рекомбинации второго аллеля могут привести к полной потере функции гена.
- В). Ошибки в Ме ДНК могут также увеличивать онкогенный потенциал гтпометилированием и активацией одного или обеих аллелей позитивного регуляторного гена, контролирующего рост.
- D). Потеря импринтинга может привести либо потере экспрессии гена, либо к переэкспрессии импринтированного гена с функциями регулятора роста

## Метилирование ДНК и рак

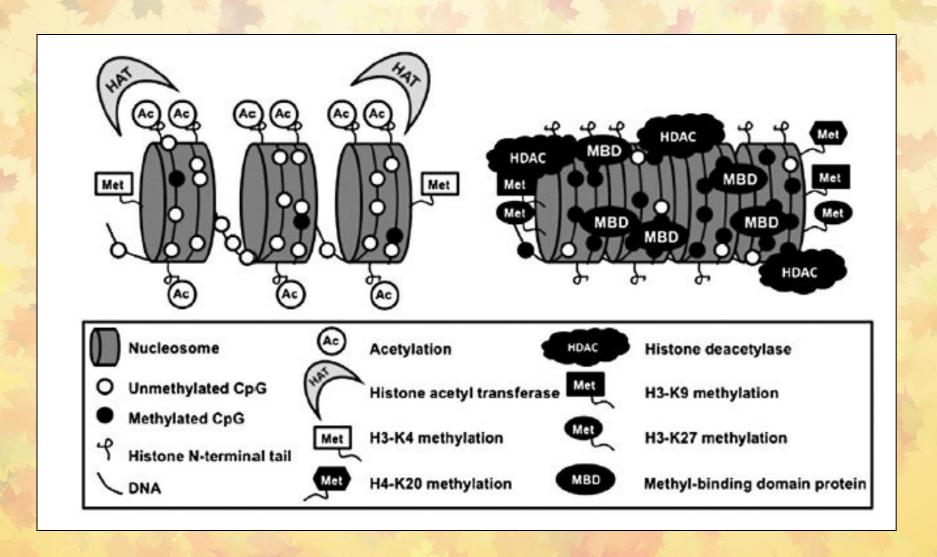


## Морфологические изменения в хроматине

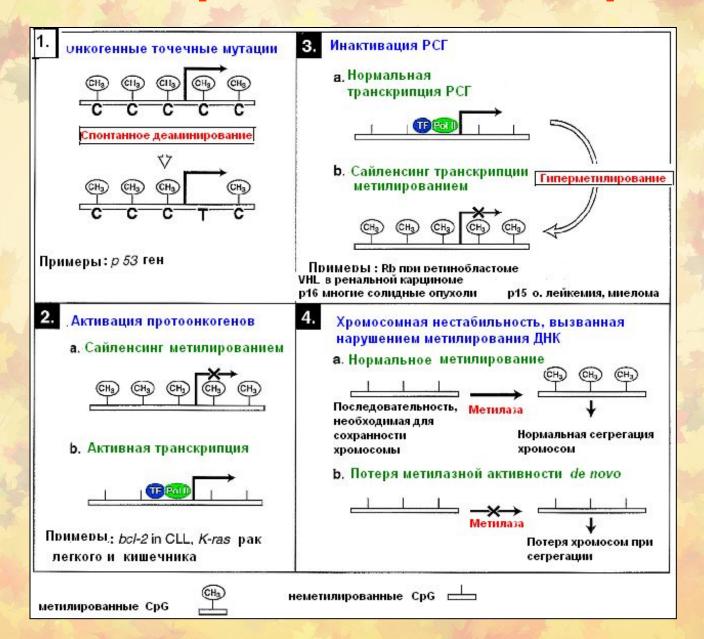


- (a) Нормальный эпителий кишечника: ядра разделены, одинаковы по форме и размеру (мономорфны). Ядерная мембрана имеет мягкие контуры, хроматин дисперсный.
- (b) Рак кишечника: ядра большие и разного размера (плеоморфные), содержимое ядер распределено неравномерно, области с темно окрашенным хроматином перемешаны со светло окрашенными участками.

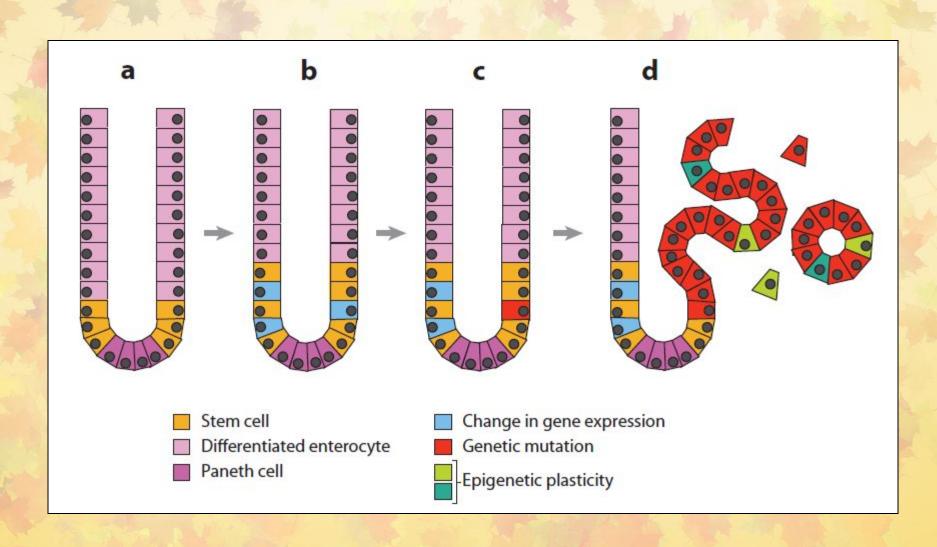
# Общие эпигенетические изменения при раке



### Метилирование ДНК и рак



## Эпигенетическая модель рака кишечника



## Примеры гиперметилирования некоторых генов

Функция гена	Ген	Тип рака
Регуляция клеточного	RB1	Retinoblastoma
деления	CDKN2A (INK4A transcript)	Colon, lung, many others
	CDKN2A (ARF transcript)	Colon
Инвазия раковых	CDH1	Breast, gastric, thyroid, leukemia, liver
клеток	CDH13	Lung, ovarian, pancreatic
	TIMP3	Brain, kidney
	VHL	Renal cell
Репарация ДНК/	MLH1	Colon, endometrial, gastric
детоксикация	MGMT	Brain, colon, lung, breast
	BRCA1	Breast, ovarian
	GSTP1	Prostate, liver, colon, breast, kidney

## Примеры гиперметилирования некоторых генов

Ремо- дулирование хроматина	SMARCA3	Colon, gastric
Клеточные сигналы	RASSF1A SOCS1	Lung, liver, brain  Liver, colon, multiple myeloma
Транскрипция	ESR1	Colon, breast (oestrogen-receptor negative), lung, leukemia
Апоптоз ДАРКІ		Lymphoma

CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; CDH1, cadherin 1 (E-cadherin); CDH13, cadherin 13 (H-cadherin); ESR1, oestrogen receptor 1 (also known as ER); MLH1, mutL homolog 1; RB1, retinoblastoma 1; SMARCA3, SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3 (also known as HLTF); TIMP3, tissue inhibitor of metalloproteinase 3; VHL, von Hippel-Lindau tumor suppressor;

## Метод определения метилированного цитозина

