

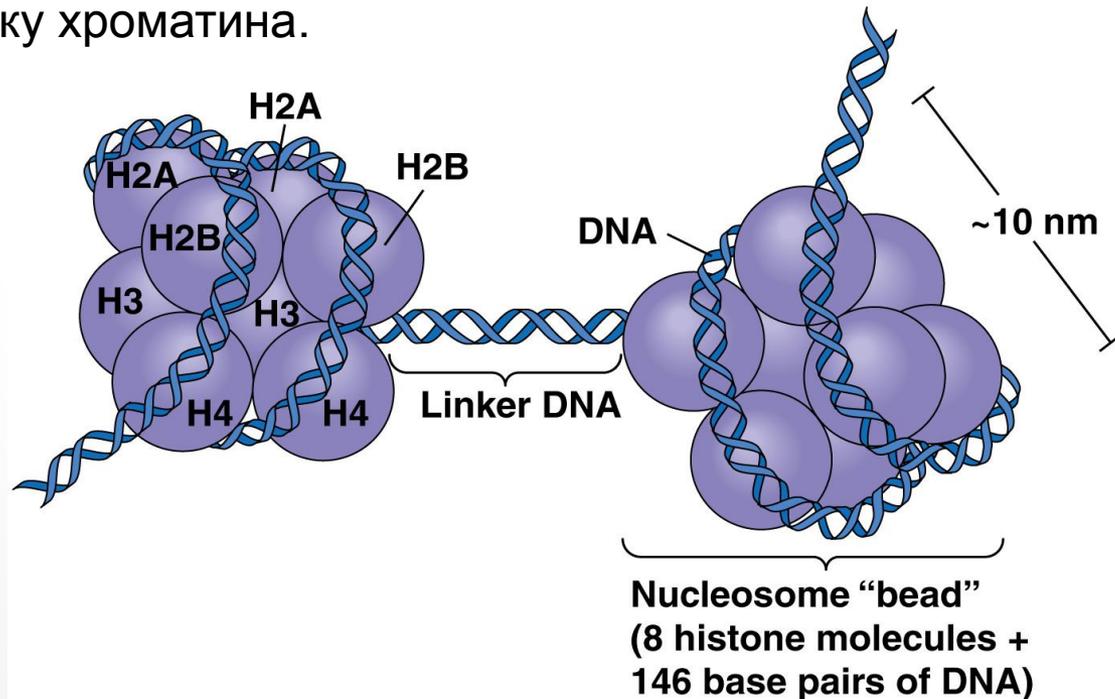
Молекулярная биология:

Лекция 4: Хроматин и репарация

• Доминова Ирина Николаевна

Хроматин – участник ДНК репарации

Репарация ДНК в эукариотических клетках может осуществляться непосредственно в хроматине. Хроматин играет важную роль в детерминировании распределения повреждений ДНК и степени и скорости репарации. Однако, исследования *in vitro* на клетках людей показали, что репарация «голой» ДНК осуществляется более эффективно, чем репарация ДНК в хроматине, и линкерная ДНК в хроматине более доступна для репарации, чем ДНК в нуклеосоме. Таким образом, было установлено, что для открытия доступа белкам системы репарации к ДНК необходимо произвести перегруппировку хроматина.

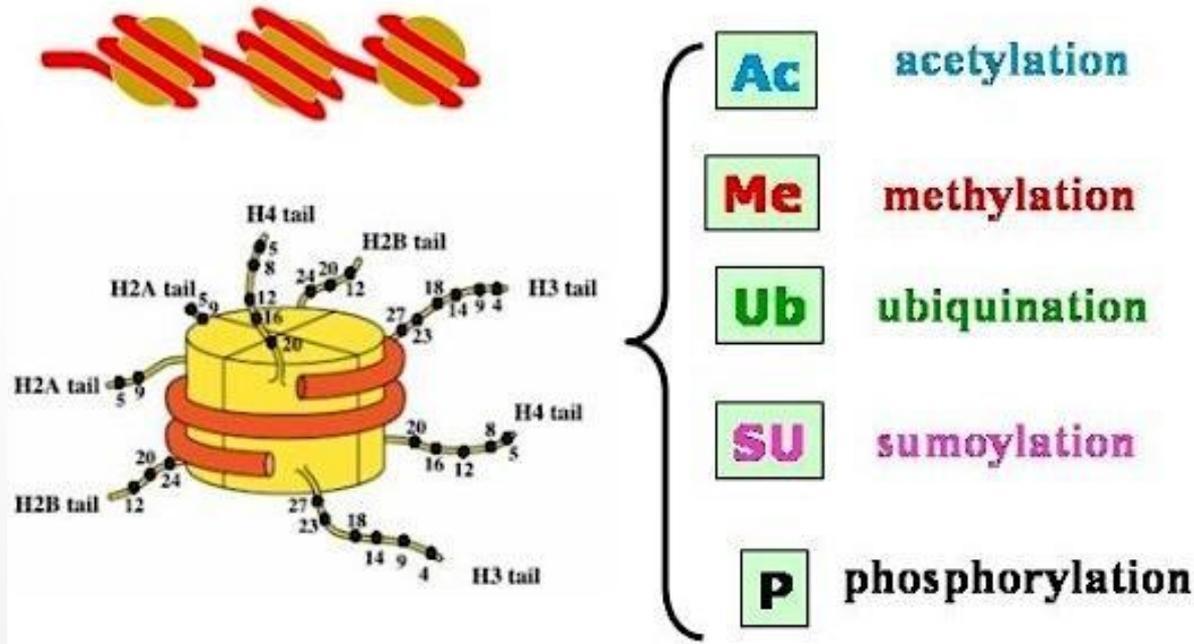


Хроматин – участник ДНК репарации

Кроме того, хроматин представляет собой не только пассивный барьер для репарации, но и является полноправным участником системы ответа на повреждение ДНК (DDR). Для репарации наибольшее значение имеют:

- варианты гистонов и ферменты, вносящие или удаляющие постсинтетические модификации в них;
- конструкторы хроматина;
- шапероны хроматина.

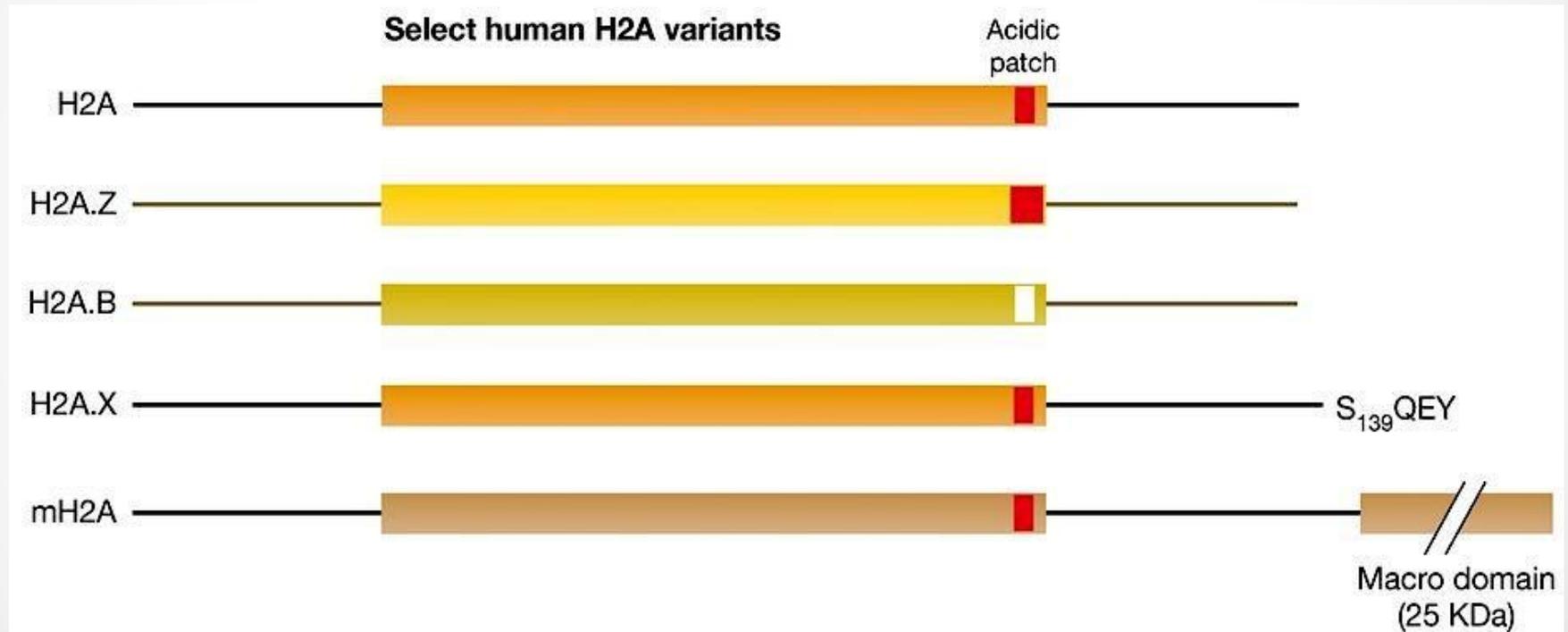
Однако, взаимодействие между этими факторами и механизмами репарации до сих пор изучены плохо.



Хроматин – участник ДНК репарации

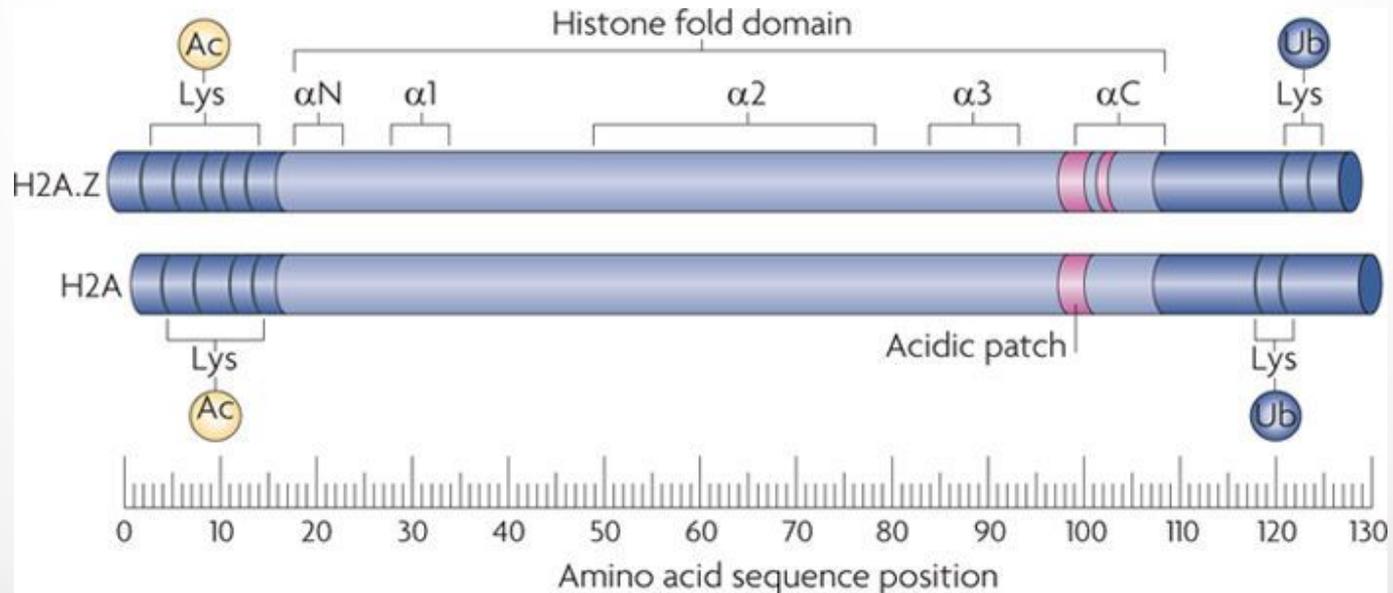
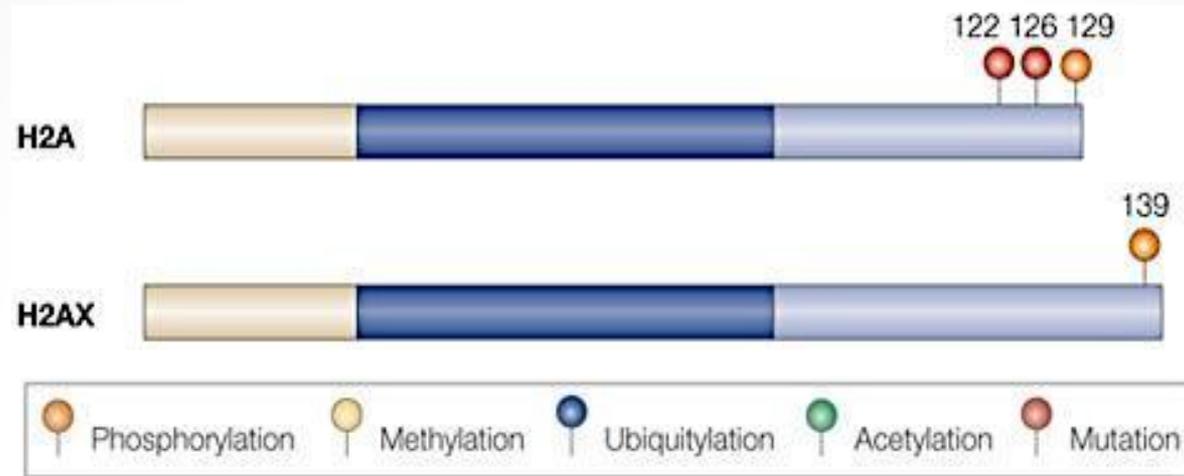
Посттрансляционные модификации гистонов

На сегодняшний день известно, что три варианта гистона H2A принимает активное участие в репарации: H2A.X, H2A.Z и макроH2A.



Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации гистонов

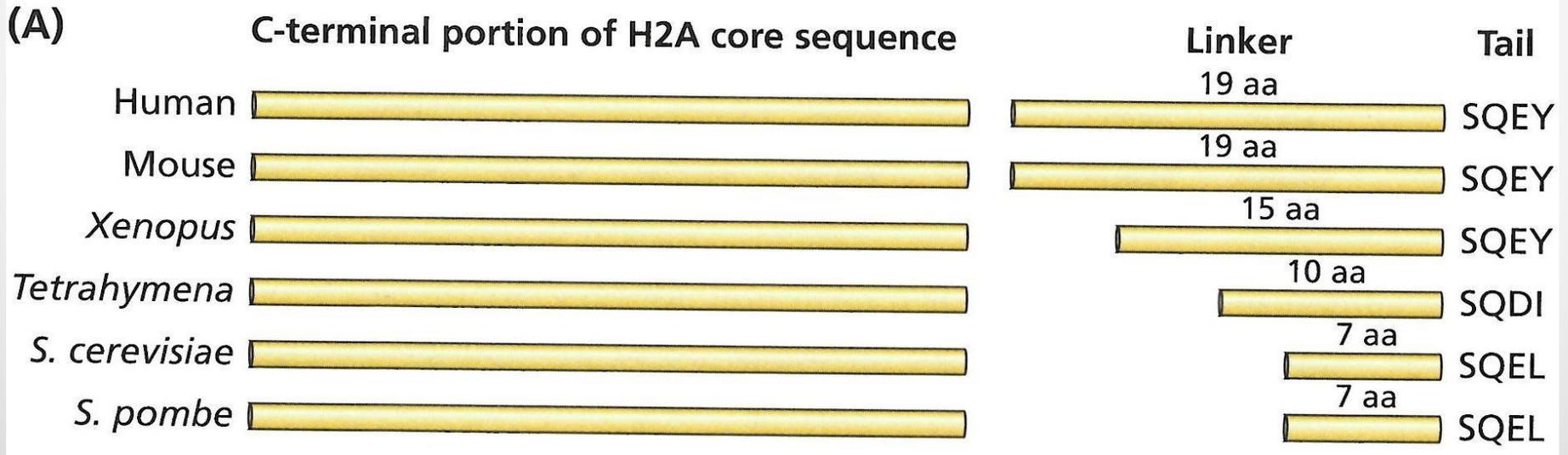


Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации гистонов

Более подробно рассмотрим участие H2A.X и его фосфорилированный вариант γ H2A.X.

Фосфорилирование С-конца гистона H2A.X является одной самых первых стадий, происходящих при репарации двухцепочечных разрывов. H2A.X содержит коровую высоко-консервативную для всех H2A вариантов последовательность и короткий консервативный 4-АК-тный хвост, соединенный с кором посредством линкера переменной длины.



Хроматин – участник ДНК репарации

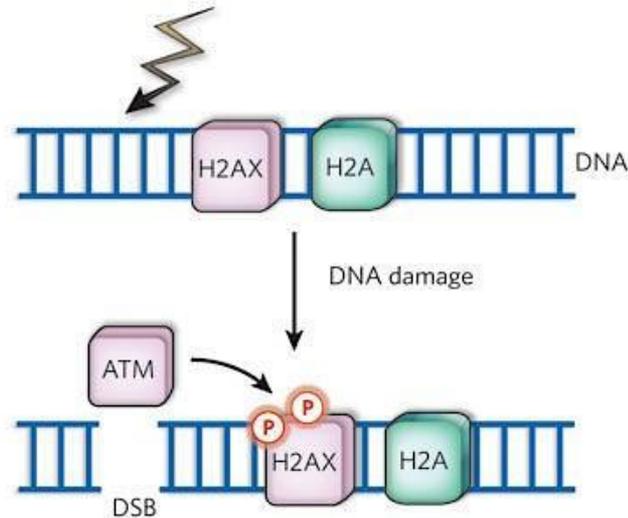
Посттрансляционные модификации гистонов

Консервативный С-конец выступает из частицы нуклеосомного кора рядом с точкой входа/выхода ДНК. При этом относительное содержание гистонов у млекопитающих варьирует в зависимости от типа клеток, но в 30-нм фибрилле хроматина одна молекула гистона H2A.X может присутствовать в каждой пятой нуклеосоме. У дрожжей H2A.X является наиболее распространенным вариантом H2A и составляет примерно 90% от всех гистонов H2A. Фосфорилирование серина на С-конце приводит к появлению γ H2A.X, не являющегося необходимым компонентом репарации двухцепочечных разрывов, что было показано на примере H2A.X-нокаутных мышей, сохраняющих жизнеспособность. Однако, присутствие данного варианта гистона увеличивает начальную скорость репарации и может увеличивать точность этой репарации.

Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации гистонов

Сразу же после образования двухцепочечного разрыва молекулы H2A.X подвергаются фосфорилированию с образованием γ H2A.X вокруг разрыва.



Начальное небольшое количество γ H2A.X быстро распространяется на близлежащие регионы, а в конце процесса репарации исчезает. Увеличение числа молекул γ H2A.X происходит при увеличении дозы радиации, причем эта зависимость линейная. Молекулы γ H2A.X в районе двухцепочечного разрыва образуют так называемый «фокус».

Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации гистонов

«Фокус» представляет собой большую структуру, образующуюся в течение нескольких минут после облучения радиацией на каждом сайте, содержащем двухцепочечный разрыв. Обычно в клетках человека около 10% гистонов H2A представлено H2A.X, таким образом, локус размером 40 Мб будет содержать примерно 40 000 молекул H2A.X, 10% из которых, по-видимому, фосфорилируются в любой момент времени. В теории около 200 «фокусов» покрывают геном человека. «Фокус» также содержит мириады белков, участвующих в ДНК репарации, и хроматин ремоделирующих факторов, которые рекрутируются к сайту с повреждением посредством прямых или непрямых взаимодействий с фосфорилированным γ эпитопом.

(A)

Human chromosome

γ H2A.X focus
(~16–45 Mbp)

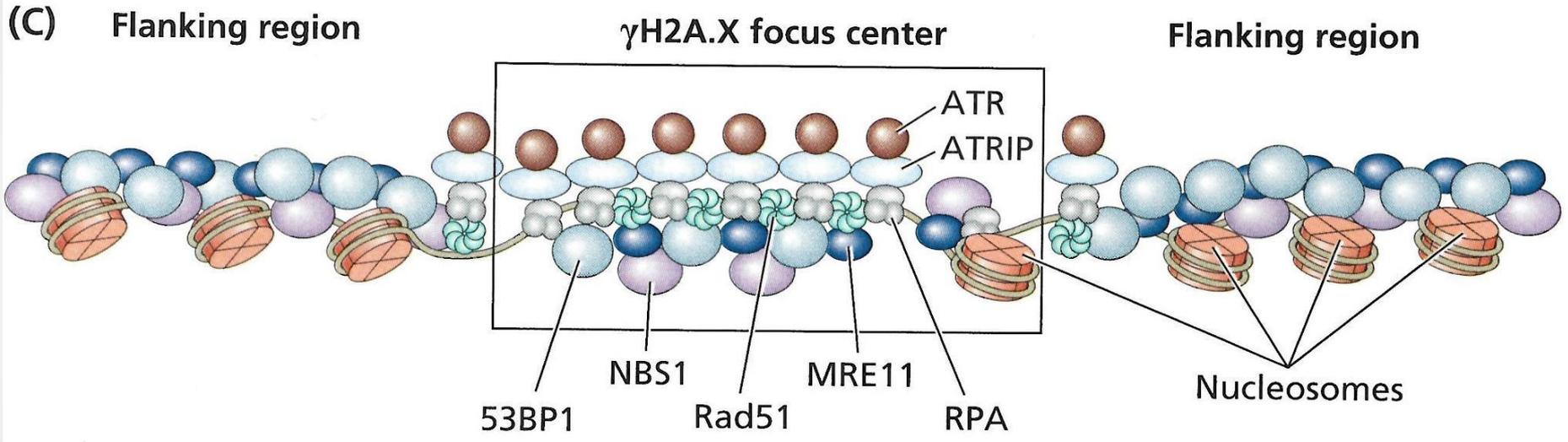
DSB



Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации гистонов

Кроме того, «фокус» обладает определенной микроструктурой, центр которой содержит обрезанные ssDNA области, и белками, которые связываются с этими областями.

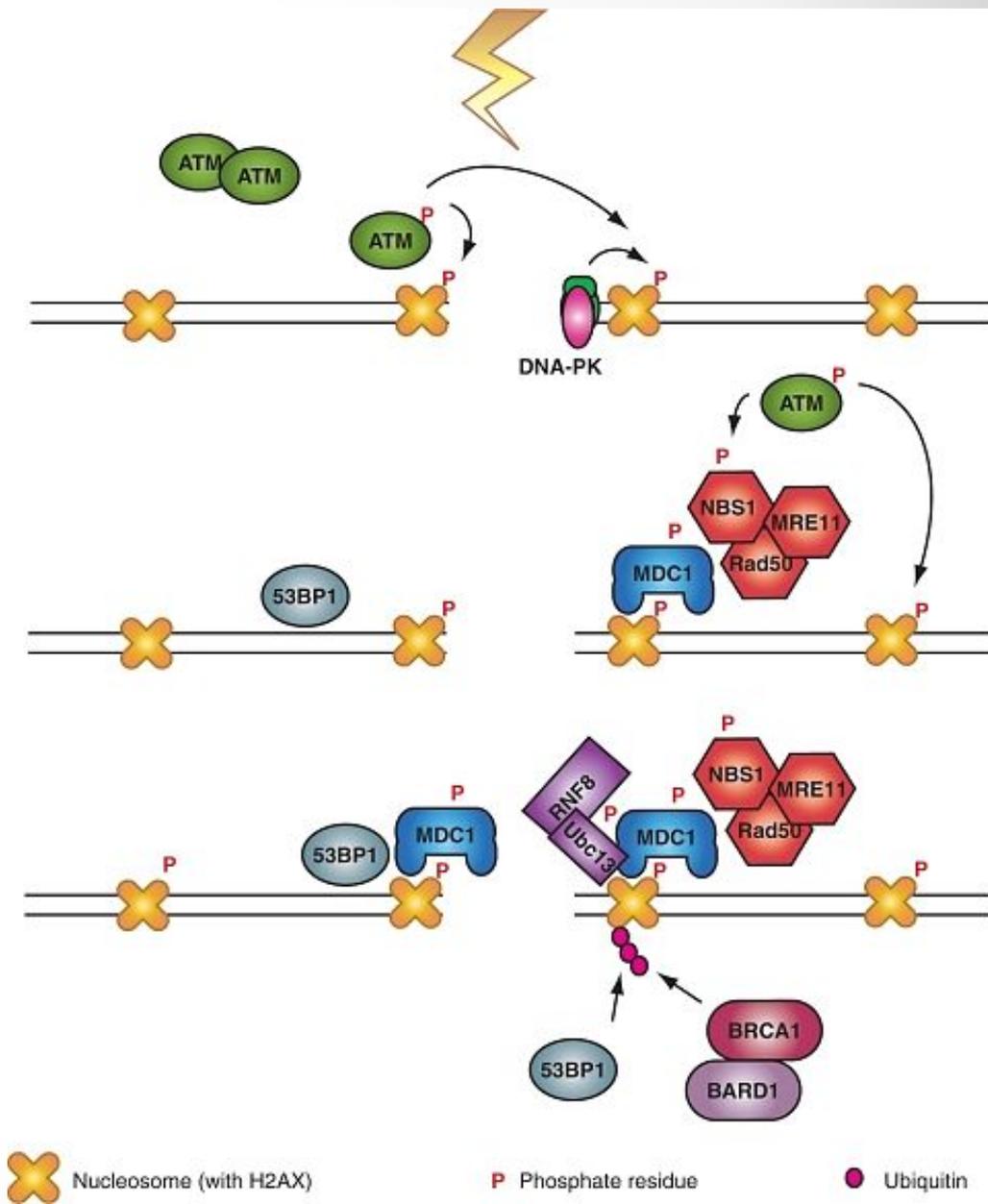


В качестве таких белков выступают Rad51, Rad52, ATR (related) киназа и взаимодействующие с ней ATRIP и RPA, Mre11, NBS1, 53BP1. Фланкирующие регионы также содержат определенный набор белков, которые распространяются от изначального маленького «фокуса», что способствует усилению DDR.

Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации гистонов

Фосфорилирование H2A.X по Ser139 осуществляется посредством ATM (ataxia telangiectasia mutated) киназы и ATR (ATM и Rad-3 related) киназы. Реакция нуклеации начинается с захвата MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1) и продолжается MRN комплексом (Mre11, Rad50 Nbs1), что приводит к дальнейшей активации ATM. Это создает петлю обратной связи, которая приводит к дальнейшему фосфорилированию H2AX и модификациям хроматина, требуемым для рекрутинга 53BP1 (p53 binding protein-1). Каскад активации завершается рекрутированием RNF8 к фосфорилированному MDC1 и полиубиквитинилированием H2AX для рекрутирования BRCA1 / BARD1



Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации гистонов

MRN комплекс, медиатор MDC1, 53BP1 и BRCA1 обнаружены в центральном регионе, однако, они могут также распространяться от физического разрыва на расстояния вплоть до Мб. Поведение белков в этих «фокусах» меняется зависимости от клеточного цикла: некоторые белки, в том числе Mre11, NBS1 и 53BP1 диссоциируют в фазе G2 и почти отсутствуют в метафазе, их структура восстанавливается в G1 фазе; другие белки такие, как MDC1 и BLM остаются в «фокусах» в течение всего клеточного цикла.

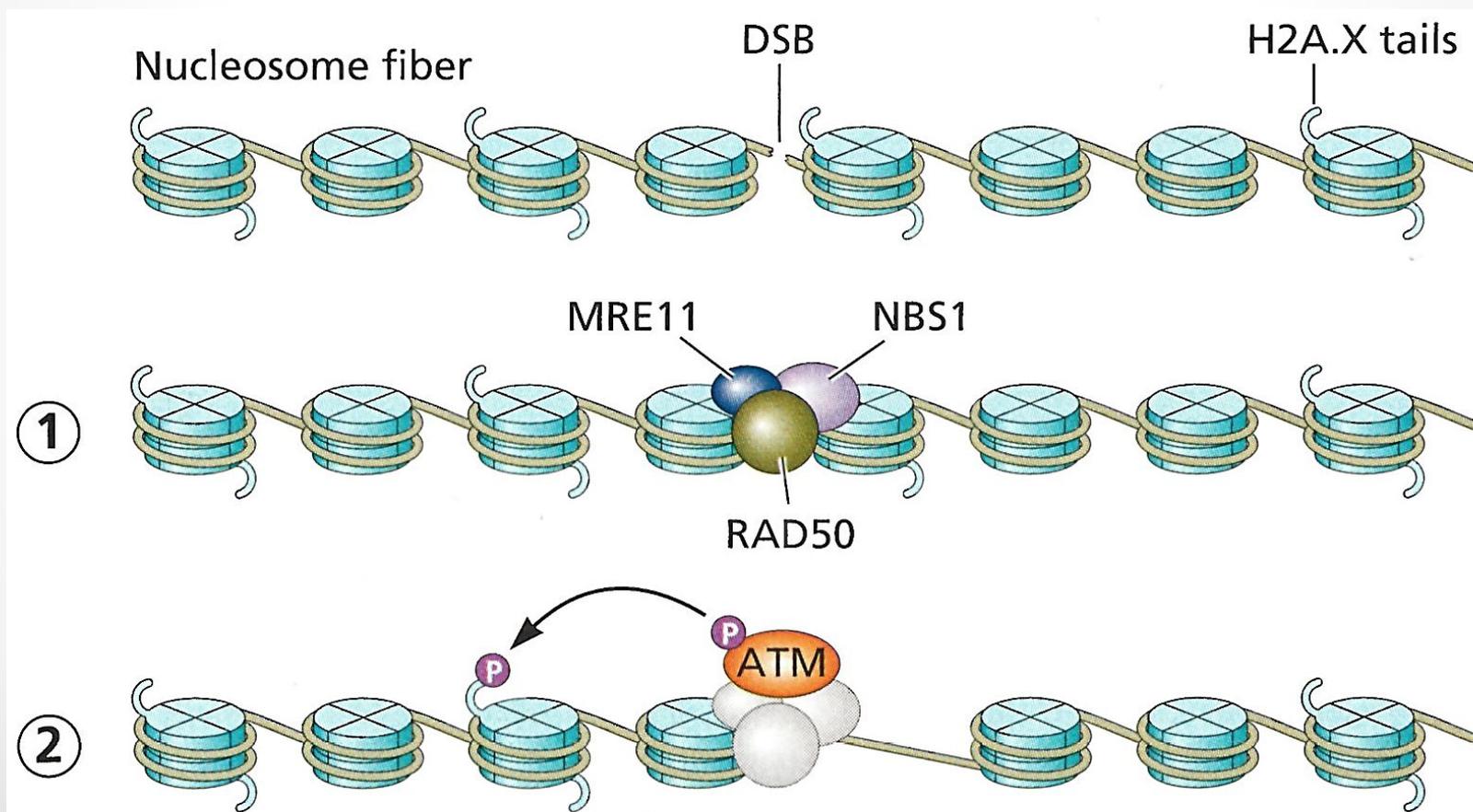
Более того, «фокусы» γ H2A.X могут образовываться на поврежденных теломерах или в раковых клетках. При этом количество и размер фокусов γ H2A.X в раковых клетках очень переменны.

Таким образом, γ H2A.X может рассматриваться как первый элемент, обеспечивающий платформу для сборки функционального комплекса репарации и хроматиновых перестройщиков, необходимых для открытия структуры хроматина для начала репарации.

Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации гистонов

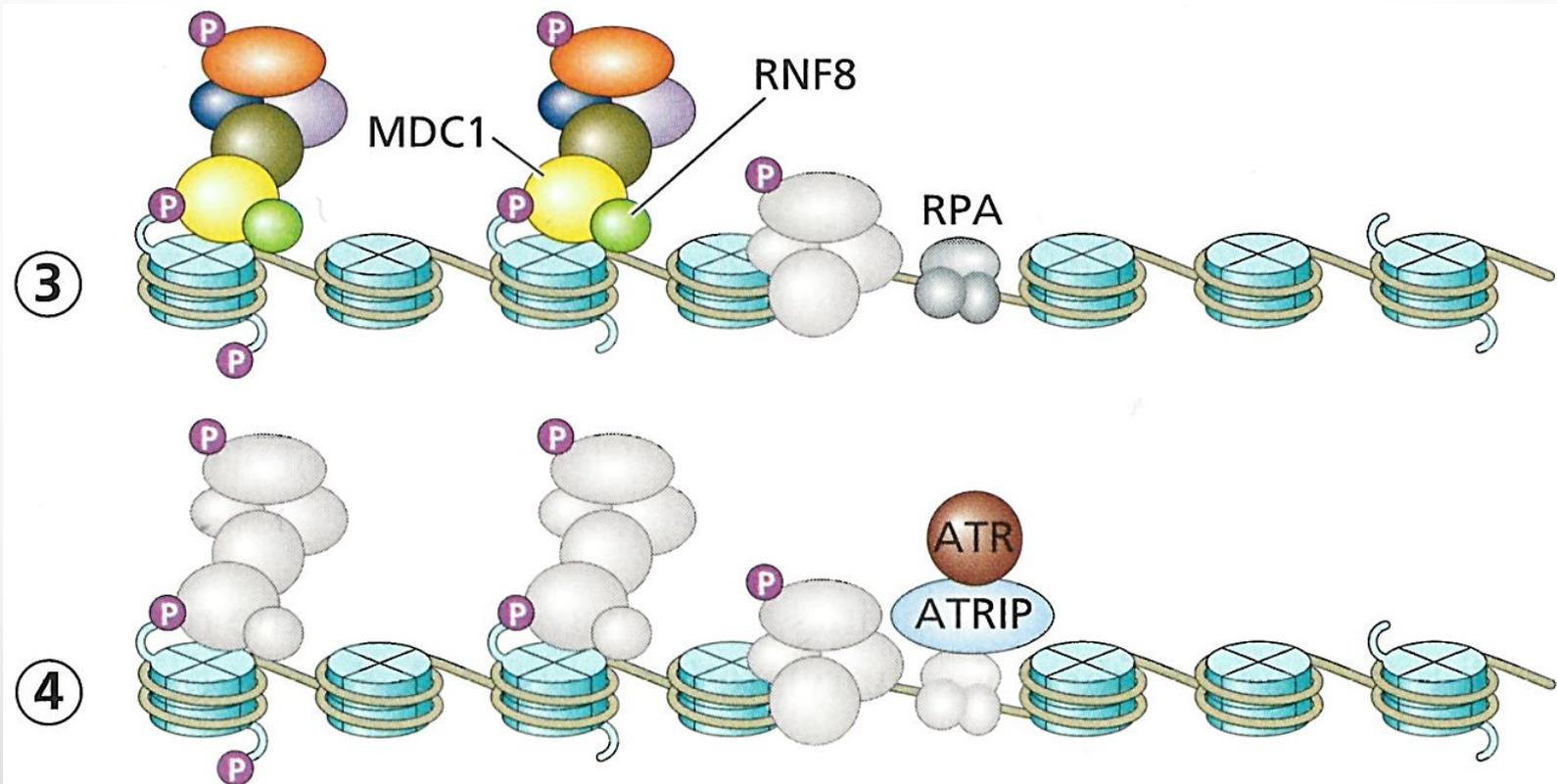
Присутствие DSB в хроматине распознается MRN комплексом, кот. активирует сигнал ATM киназу, фосфорилирующую гистон H2A.X с образованием γ H2A.X в нуклеосоме, фланкирующей повреждение.



Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации гистонов

MDC1 высоко аффинен к γ H2A.X, он связывает и выступает в качестве платформы для всего комплекса. MDC1 рекрутирует дополнительные копии MRN комплекса и ATM, распространяя фокус вдоль хромосомы, а также он рекрутирует хроматиновых перестройщиков и комплексы модификации гистонов. На этом этапе ssDNA участки связываются с репликативным белком A (RPA). Убиквитинированные гистоны рекрутируют медиатор 53BP1 и BRCA1, RPA – ATR киназу посредством взаимодействия с ее партнером ATRIP.

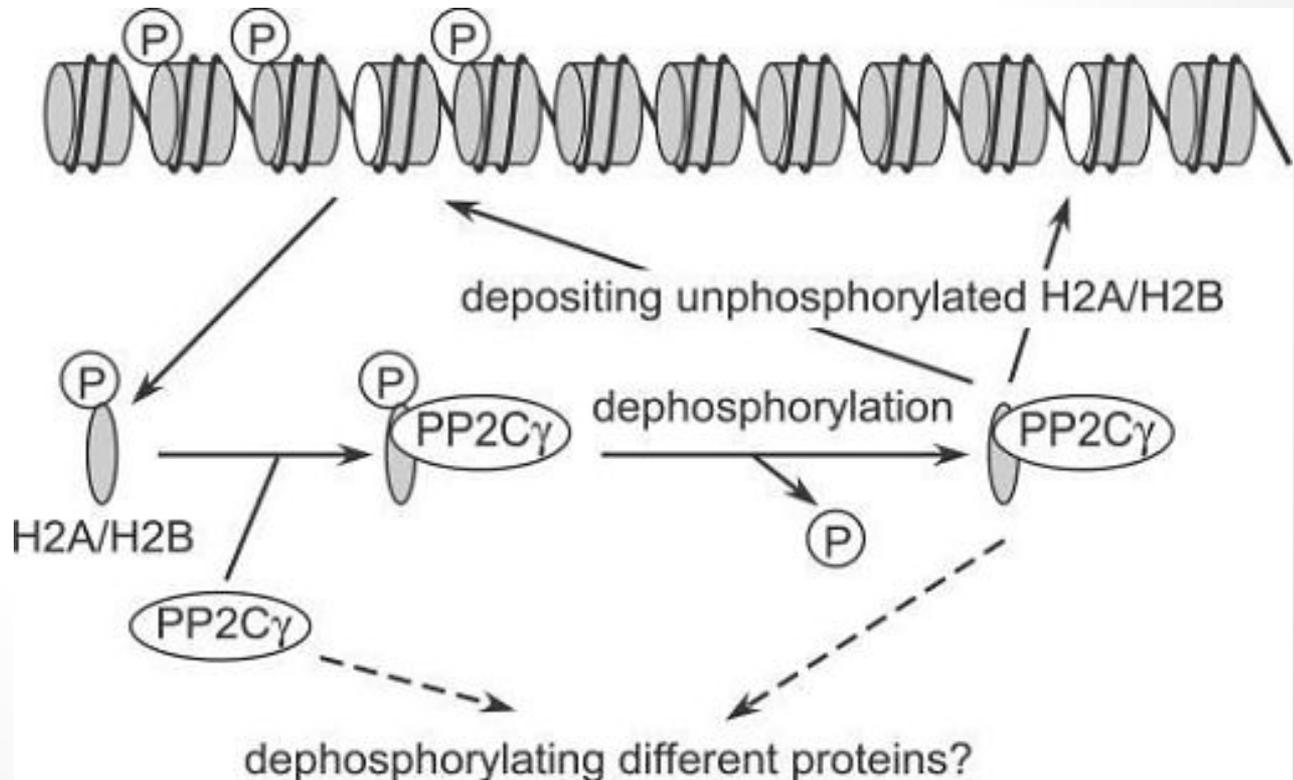


Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации гистонов

Недавние экспериментальные исследования показали, что существуют пути, в которых процессы репарации терминированы. Понятно, что фосфорилированная форма H2A.X должна быть удалена, что является сигналом для возобновления клеточного цикла после успешной репарации. Это удаление может происходить 2 основными путями: дефосфорилированием H2A.X или замещение фосфорилированной формы на канонический H2A вариант.

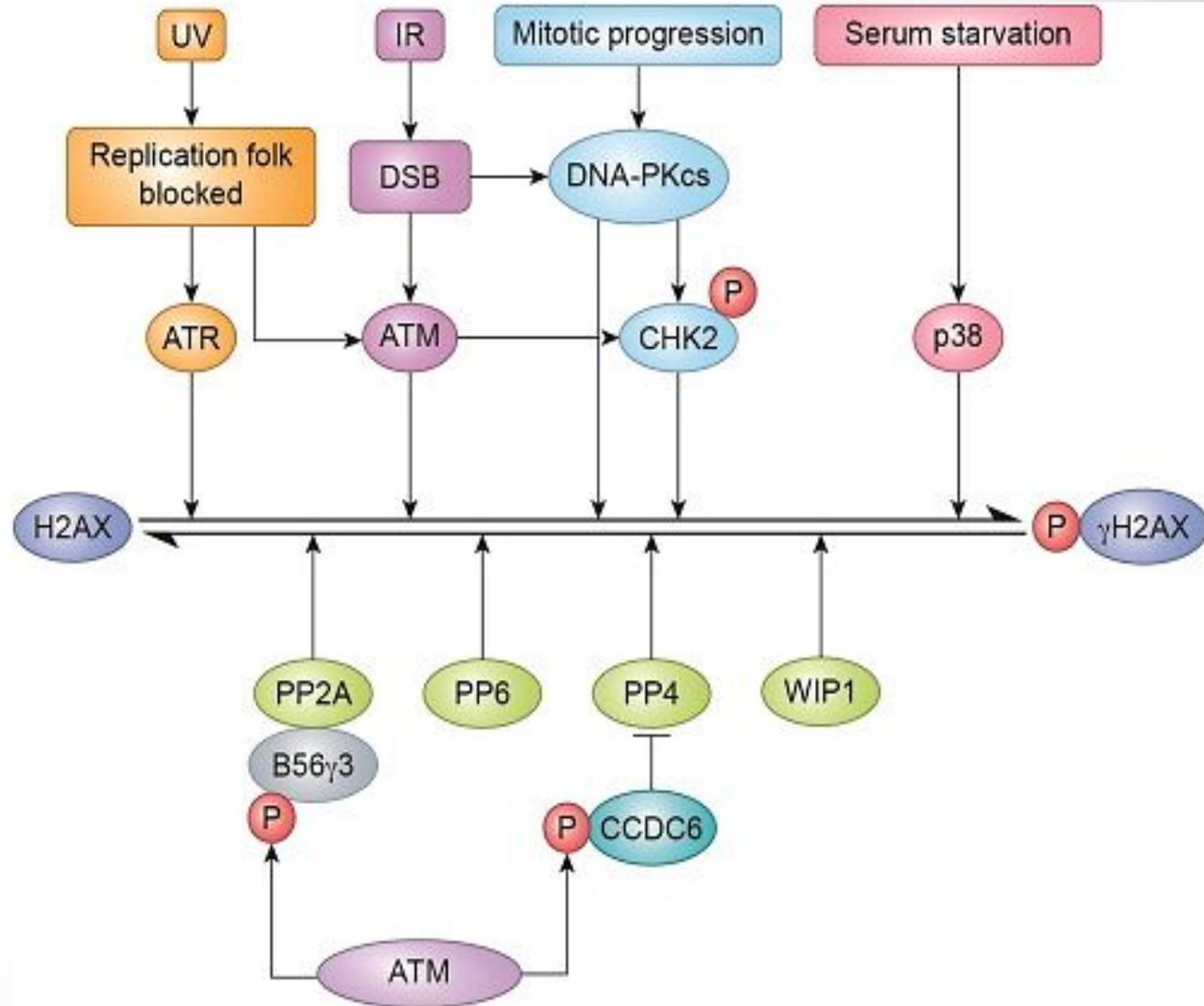
A model for protein phosphatase (PP) 2C gamma (PP2C γ) function. PP2C γ binds to nucleosome-free H2A–H2B (or H2AX–H2B) and removes phosphate groups (indicated by circled P) before the next deposition.



Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации ГИСТОНОВ

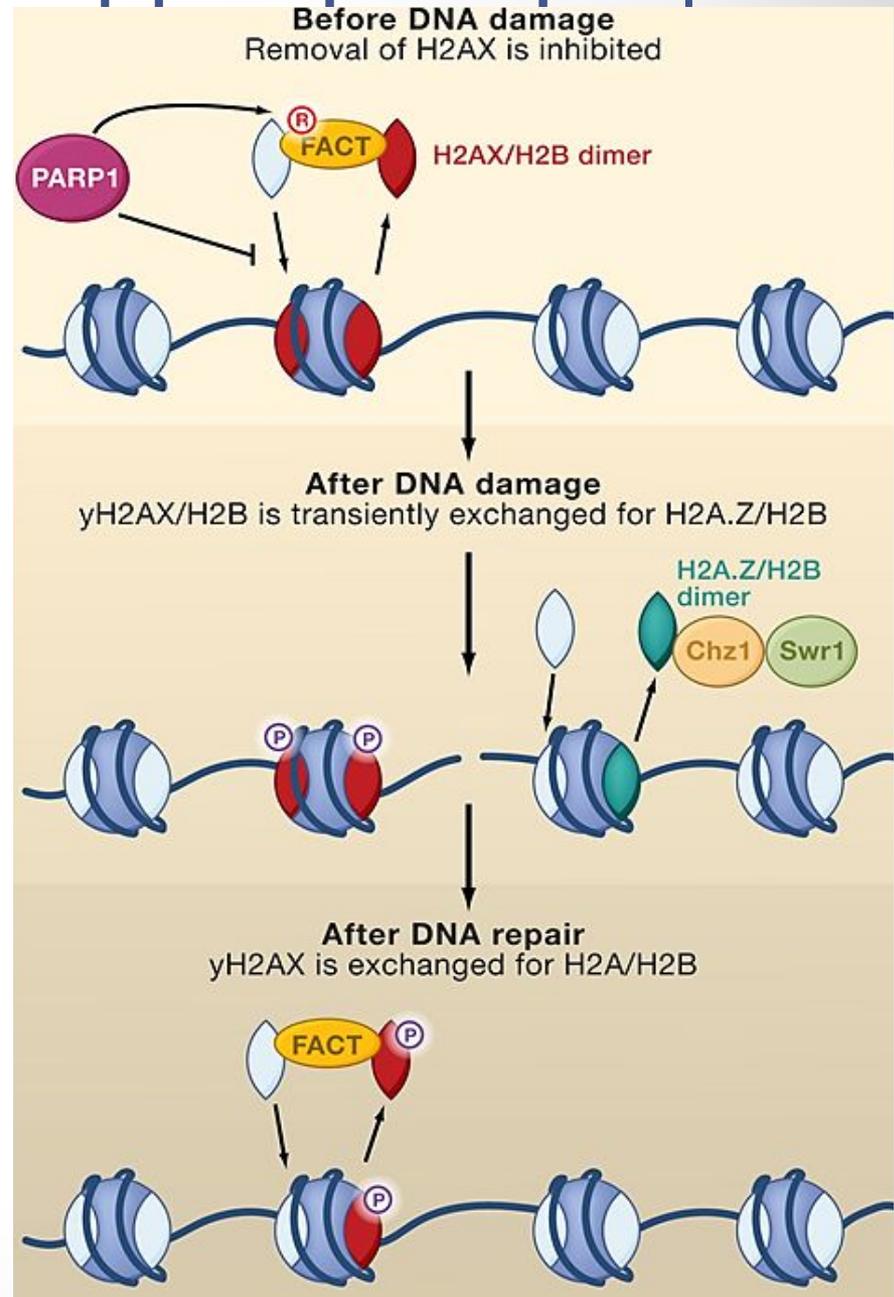
Достигается это, во-первых, посредством действия фосфатаз, напрямую удаляющих фосфатные группы и обнаруженных у дрожжей и млекопитающих, т.о. осуществляется отрицательное регулирование функции репарации, т. е. ее терминирование.



Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации ГИСТОНОВ

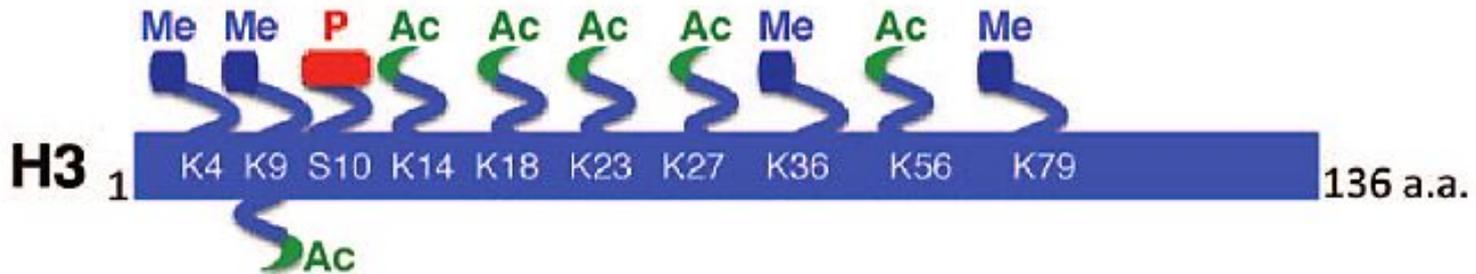
Во-вторых, могут быть вовлечены хроматиновые перестройщики и/или шапероны гистонов. Комплекс гистоновой ацетилазы TIP60 (Tat-interactive protein 60), обнаружен у *Drosophila* и людей, ацетилирует γ H2A. X и обеспечивает, таким образом, его замещение не модифицированным вариантом. Гистоновый шаперон FACT (facilitate chromatin transcription) подвергается полиАДФ-рибозилированию при генотоксическом стрессе, что приводит к разрушению его ассоциации с нуклеосомой и его участию в качестве фактора замены для H2A-H2B димеров.



Хроматин – участник ДНК репарации

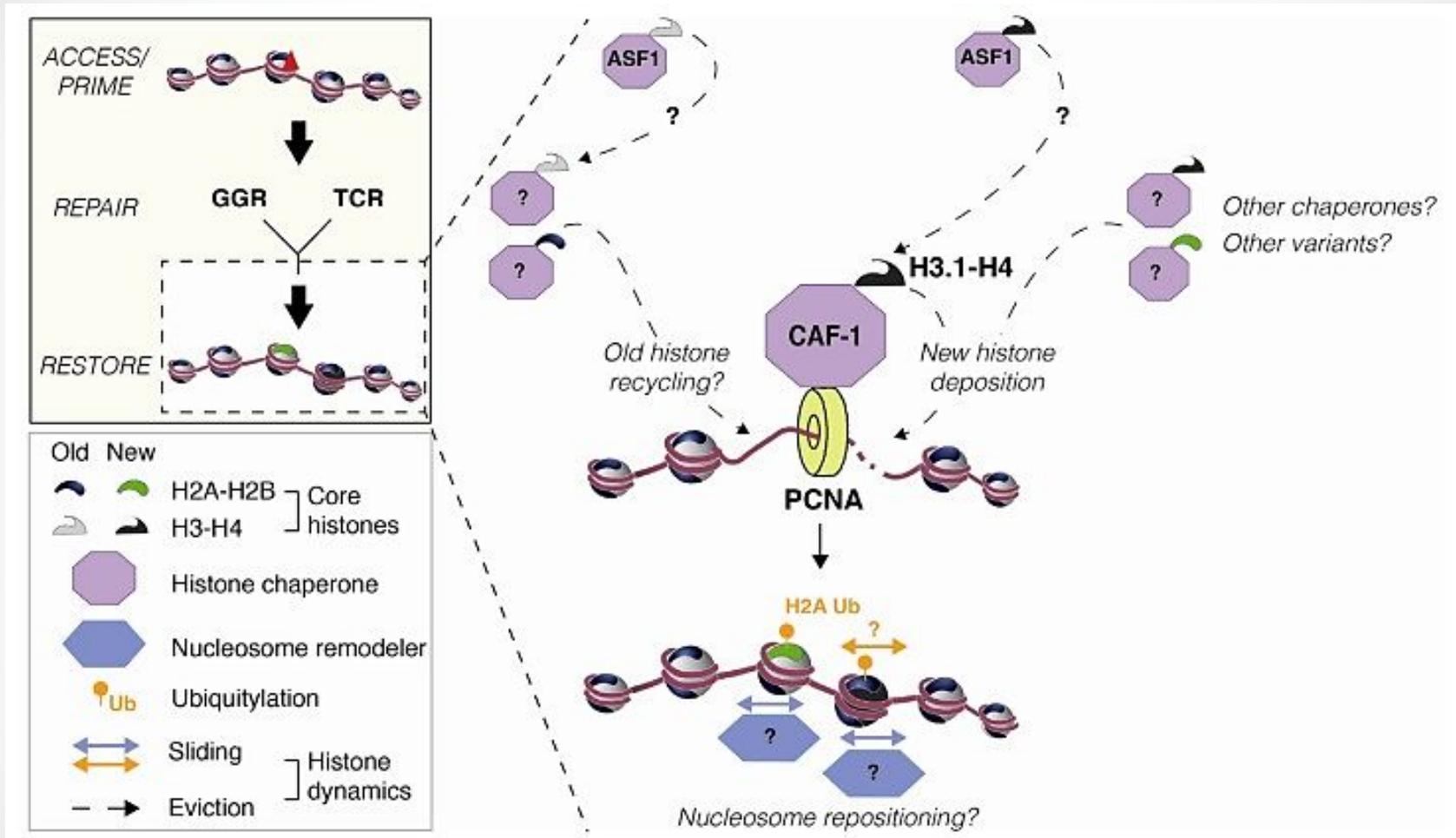
Посттрансляционные модификации гистонов

Некоторые варианты Н3 и специфические шапероны также принимают участие в репарации ДНК. Один из репликативных вариантов гистона Н3: Н3.1 или Н3.2 – связывается с поврежденными сайтами ДНК (УФ- и лазер-индуцированные повреждения) посредством гистонового шаперона CAF1 (chromatin assembly factor 1). Подобное связывание с поврежденными сайтами обеспечивает возможность для замещения гистонов, несущих соответствующие модификации, на новые не меченые гистоны из нуклеоплазматического пула. Такая замена может иметь далеко идущие последствия для целого ряда процессов, включая транскрипцию, поскольку она нарушает маркировку родительского гистона.



Хроматин – участник ДНК репарации

Посттрансляционные модификации гистонов



Histone dynamics at late steps of NER in mammals. Newly synthesized H3.1 histone variants in dimers with H4 (black) are deposited at UVC damage sites. De novo histone deposition is coupled to repair synthesis via a direct interaction between the specific H3.1 histone chaperone CAF-1 (purple) and the polymerase sliding clamp PCNA (yellow).

Спасибо за внимание!

