

Л.О. Гуцол, И.Э. Егорова, С.Ф. Непомнящих, Л.Н. Минакина, М.В. Ясько

РЕПАРАЦИЯ НЕСПАРЕННЫХ ОСНОВАНИЙ И ПЕТЕЛЬ ДЕЛЕЦИИ/ВСТАВКИ ДНК У ЭУКАРИОТ

ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иркутск, Россия

Система репарации неспаренных оснований, или мисмэтчей, обнаруживает пары азотистых оснований ДНК, соединённые вопреки правилу Уотсона – Крика, а также другие дефекты, возникающие в процессе репликации ДНК, и способствует их удалению, катализируя вырезание содержащего дефект участка дочерней ДНК и его повторный синтез уже без ошибок. Таким образом, MMR повышает точность процесса репликации на несколько порядков. За исследования репарации ДНК, в том числе MMR, была вручена Нобелевская премия по химии 2015 г.

Ключевые слова: MMR, пострепликативная репарация ДНК, Нобелевская премия по химии, эксцизия оснований, MutS α или MutS β , MutL α , PCNA, ДНК-полимераза δ , ДНК-лигаза I

MISMATCH REPAIR AND REPAIR OF INSERTION/DELETION LOOPS IN EUKARYOTIC DNA

L.O. Gutsol, I.E. Egorova, S.F. Nepomnyashchikh, L.N. Minakina, M.V. Yas'ko

Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

The mismatch repair (MMR) system detects non-Watson – Crick base pairs as well as the defects, appearing in course of DNA replication, and helps to eliminate them by catalyzing the excision of the defect-containing region of daughter DNA and its error-free resynthesis. Thus, MMR remarkably improves the fidelity of replication. After separation, both strands contain non-repairable damages and the mismatches may generate DNA mutation in 50 % of cell progeny after next replication. MMR dysfunction causes surge of mutation rate, abnormal recombination, and cancer in humans and animals. Therefore, the main MMR efficiency parameter is mismatch correction before the next replication cycle. Mismatch detection is made by the MSH2 protein, which forms a heterodimer with either MSH6 or MSH3 (Mut S), depending on the damage (MSH6 is needed for the amendment of single base mispairs, whereas both MSH3 and MSH6 can correct IDLs). A heterodimer of MLH1 and PMS2 (Mut L) controls the interaction between the mismatch-detecting complex of proteins and other proteins essential for MMR, including exonuclease 1, helicase, nuclear antigen of proliferating cells, single-stranded DNA-binding protein and DNA polymerases δ and ϵ . MLH1 can form a heterodimer with two additional proteins – MLH3 and PMS1. PMS2 is required for the correction of single based mismatches, and PMS2 and MLH3 contribute to the correction of IDLs.

The Nobel Prize in Chemistry 2015 was awarded for the studies of DNA repair, i.a. MMR.

Key words: MMR, post-replication DNA repair, Nobel Prize in Chemistry, excision of bases, MutS α or MutS β , MutL α , PCNA, DNA-polymerase δ , DNA-ligase I

Репарация неспаренных оснований (mismatch repair, MMR) является одним из видов эксцизионной репарации. Этот вид репарации исправляет ошибки, возникшие в процессе удвоения ДНК. В ходе репликации с частотой от 1 : 10000 до 1 : 100000 полимеразы вставляют некомплемментарные нуклеотиды. Такие ошибочно вставленные основания называются мисмэтчи (mismatches). После неверно вставленного нуклеотида полимеразы в большинстве случаев не способны продолжить работу и тем самым дают возможность экзонуклеазам, сопровождающим все репликативные полимеразы, удалить неспаренный нуклеотид с 3'-конца вновь синтезируемой цепи. Этот процесс очень эффективен и увеличивает точность репликации на два порядка. Таким образом, белкам MMR приходится иметь дело только с теми ошибками репликации, которым удалось избежать этого корректирующего механизма [13]. Чаще ошибочно вставляются те нуклеотиды, которые производят минимум искажений спиральной структуры; кроме того, у разных ДНК-полимераз относительная частота определённых ошибок репликации может различаться [2].

Мисмэтчи представляют собой уникальный тип повреждений, так как целиком состоят из неповреж-

дённых оснований и являются исключительно дефектами структуры. Также мишенью MMR являются петли на одной из нитей ДНК, образовавшиеся вследствие делеции или вставки нуклеотидов (петли делеции/вставки, ПДВ). Специфика таких повреждений состоит в том, что после следующего процесса репликации и разделения нитей ДНК ПДВ расправляются, и по ним синтезируется новая дочерняя нить, которая будет длиннее или короче первоначальной. Если до следующей репликации эти изменения не будут исправлены, у половины потомства клетки окажется ДНК с мутациями [13]. Таким образом, MMR повышает точность биосинтеза ДНК в 100–1000 раз [14].

Процесс MMR состоит из этапов определения матричной и дочерней нити ДНК, распознавания дефекта, разрезания цепи вокруг «ошибки», удаления ошибочно включённого нуклеотида либо ПДВ и восстановления правильной (комплемментарной) последовательности дочерней цепи по матричной.

Механизмы различения дочерней цепи, содержащей ошибки, и материнской – эталонной – цепи, находятся в процессе исследования и пока недостаточно изучены у эукариот. Было выяснено, что для активации экзонуклеаз необходимо наличие на

репарируемой нити уже имеющегося разрыва. Предполагают, что у эукариот маркерами, отличающимися материнскую нить от дочерней, являются нелигированные разрывы фрагментов Оказаки. Работы T. Kunkel с сотрудниками показали, что при пострепликативной MMR эксцизия инициируется у 3'-конца дочерней ДНК и, возможно, у 5'-концов фрагментов Оказаки [17].

Основным белком-инициатором MMR является MSH2, который обнаруживает ошибку в структуре нити ДНК и в зависимости от типа повреждения образует гетеродимер либо с MSH6, либо с MSH3: для коррекции мисмэтча требуется MSH6, а для исправления ПДВ необходимо участие и MSH6, и MSH3 [10].

После ассоциации MSH2 со вторым белком образуются комплексы-MutS α или MutS β , которые формируются на нити ДНК в месте локализации ошибки. Ферменты семейства Mut получили это название, потому что ещё до выяснения их функций было замечено, что мутации в кодирующих их генах приводят к резкому повышению частоты возникновения новых мутаций.

MutS α состоит из белков MSH2 и MSH6 [5, 18]. MutS α содержит 80–90 % всего клеточного MSH2 и преимущественно опознает несоответствие оснований и ПДВ, в которых петля содержит 1 или 2 непарных нуклеотида. Также он ограниченно способен распознавать ПДВ большей протяженности [4, 7, 27].

MutS β включает в себя белки MSH2 и MSH3 [1, 27]. MutS β распознает ПДВ протяженностью от 2 до 10 нуклеотидов, слабо распознает однонуклеотидные ПДВ и практически инертен к ошибочно спаренным основаниям [26].

Белки MSH2 и MSH6 содержат АТФ/АДФ-связывающие сайты [9].

Возможность использовать несколько различных белков группы MSH в разных комбинациях придаёт системе MMR у эукариот значительную гибкость, так как эти белки несколько различаются по свойствам. Субъединица MSH6 содержит высококонсервативный аминоконцевой мотив Gly-Phe-Glu, который можно найти уже в белках MMR прокариот. Этот участок вводится в двойную спираль ДНК и взаимодействует с одним из неправильно спаренных оснований, что приводит к изгибу ДНК на 60°. Взаимодействие стабилизируется образованием водородных связей между глутаматом и атомами N3 и N7 неспаренного азотистого основания [24]. ПДВ размером в 1–2 основания опознаются с помощью содержащегося в той же субъединице фенилаланина. В комплексе MutS β непосредственно связывается с повреждениями субъединица MSH3. Она использует для связи с ПДВ разного размера остатки лизина и тирозина и изгибает ДНК на 90°. Эта субъединица также способна связывать небольшие мисмэтчи и участвует в исправлении аддуктов, двунитевых разрывов и повторяющихся триплетов [11, 32]. Интересно, что субъединица MSH2, которая не участвует в связывании мисмэтчей, когда она находится в составе MutS α , в составе MutS β способна связывать крупные ПДВ.

Аминокислоты, опознающие повреждения ДНК, находятся на N-концах соответствующих белков

MSH, тогда как их карбоксильные концы образуют АТФ-связывающие домены [31]. Ещё ранние эксперименты показали, что MSH, будучи связанным с мисмэтчем, претерпевает под воздействием АТФ изменение конформации. После связывания с мисмэтчем MutS α ассоциируется с другим гетеродимерным комплексом MutL α , состоящим из белков MLH1 и PMS2 [19, 25].

Комплекс MutL α объединяет и координирует взаимодействие между белками, распознающими несоответствия, и другими белками MMR. В ходе исследований выяснилось, что субъединица PMS2 комплекса MutL α обладает скрытой эндонуклеазной активностью, которая, будучи активированной, приводит к образованию дополнительных разрывов в нити ДНК, уже содержащей хотя бы один инициирующий разрыв [16].

После связывания гетеромера MutS α с мисмэтчем происходит обмен АДФ на АТФ, и MutS α превращается в «скользящий зажим», а после присоединения к нему гетеромера MutL α весь комплекс начинает скользить (перемещаться) вдоль оси ДНК, пока не встречает еще один комплекс белков – PCNA (proliferating cell nuclear antigen). PCNA является кольцеобразным гомотримером, имеющим две чётко различимых поверхности. На ДНК он загружается с помощью специального загрузчика RFC (replication factor C) с 3'-стороны от ближайшего разрыва и всегда одной и той же поверхностью к 3'-концу. На 3'-субстрате это приводит к активации скрытой эндонуклеазной активности MutL α и образованию дополнительных разрывов по обе стороны от мисмэтча [30].

Для активации эндонуклеазной активности MutL α присоединение PCNA необходимо. Будучи загруженным, кольцо может свободно вращаться вокруг продольной оси ДНК, но неспособно развернуться. Из этого вытекает, что, когда PCNA связывает своих партнеров с ДНК, вновь образовавшиеся комплексы имеют фиксированную ориентацию, которая сохраняется даже после перемещения комплекса на значительное расстояние от места первоначальной сборки. После связывания с PCNA ориентация MutL α фиксирована. Поскольку MutL α имеет всего один сайт с эндонуклеазной активностью, он будет разрезать только одну нить ДНК, причём направление разрезания будет зависеть от того, на какой из сторон PCNA он окажется расположен. Остается невыясненным, почему новые разрывы производятся преимущественно в окрестностях дефекта. Вероятным объяснением является то, что производящая разрезы эндонуклеаза является не просто частью комплекса MutL α с PCNA, но и комплексом PCNA с уже объединёнными MutL α и MutS α , а так как их объединение активируется дефектом, то и количество комплексов вблизи дефекта будет максимальным [29].

На этапе удаления мисмэтча или ПДВ подключается экзонуклеаза I (Exo1), которая является 5'→3'-эксонуклеазой [6, 8]. Exo1 загружается на разрывы активированным комплексом MutS α /MutL α и создаёт пробел в нити ДНК, начинающийся с разрыва и заканчивающийся примерно в 150 нуклеотидах после дефекта [22].

Восстановление ПДВ длиннее двух-трёх нуклеотидов, как предполагалось, имеет механику, идентичную описанной, но с использованием MutS β вместо MutS α . Впрочем, некоторые исследования ставят это под сомнение. В исследовании [12] показано, что MLH1 и PCNA, по-видимому, связываются с MSH3 в одном и том же участке (или на частично перекрывающихся участках). Таким образом, MutS β не может взаимодействовать с MutL α и PCNA одновременно. Кроме того, кольцо PCNA не могло бы мигрировать на 5'-сторону от крупной петли и обеспечить там работу Exo1.

Незначительное участие в репарациях, в которых участвует белковый комплекс MutS α , может принимать и комплекс MutL γ (MLH1 и MLH3) [3].

Восстановление структуры дочерней нити ДНК выполняет ДНК-полимераза δ (pol δ). Для надёжной фиксации pol δ на цепи также необходимы комплексы PCNA и RFC [21]. Завершается процесс MMR соединением концов сахарофосфатного остова репарированной дочерней нити и образованием фосфодиэфирной связи. Этот процесс осуществляет ДНК-лигаза I [15, 20].

Нобелевская премия по химии 2015 года. Шведская королевская академия наук присудила Нобелевскую премию 2015 г. по химии Томасу Линдалю (Tomas Lindahl) из лаборатории Клэр-Холл Института Френсиса Крика в Хертфордшире (Великобритания), Полу Модричу (Paul Modrich) из Медицинского института Ховарда Хьюса и Медицинской школы при Университете Дьюка (США), а также Азиз Санкар (Aziz Sancar) из Университета Северной Каролины в Чапел-Хилл (США) «за исследование механизма восстановления ДНК» [23].

П. Модрич впервые исследовал механизм репарации мисмэтчей у бактерий. Бактерии исправляли несоответствия, появившиеся после инфицирования вирусами. Модрич воссоздал бактериальный механизм репарации *in vitro* и предположил, что этот же или близкородственный механизм исправляет 99,9% ошибочно спаренных нуклеотидов в ДНК человека после репликации. Его открытие было важной вехой в исследованиях ДНК, связанных с заболеваниями человека. Например, большое внимание привлекает к MMR тот факт, что врожденные дефекты этого механизма могут привести к наследственному неполипозному раку толстой кишки (синдрому Линча) [23, 28].

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, Kolodner R, Fishel R (1996). hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (93), 13629-13634.
2. Arana ME, Kunkel TA (2010). Mutator phenotypes due to DNA replication infidelity. *Semin. Cancer Biol.*, (20), 304-311.
3. Cannavo E, Marra G, Sabates-Bellver J, Menigatti M, Lipkin SM, Fischer F, Cejka P, Jiricny J (2005). Expression of the MutL Homologue hMLH3 in Human Cells and its Role in DNA Mismatch Repair. *Cancer Res.*, (65), 10759-10766.

4. Drummond JT, Li G-M, Longley MJ, Modrich P (1995). Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science*, (268), 1909-1912.
5. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, (75), 1027-1038.
6. Genschel J, Bazemore LR, Modrich P (2002). Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. *J. Biol. Chem.*, (277), 13302-13311.
7. Genschel J, Littman SJ, Drummond JT (1998). Isolation of MutS β from Human Cells and Comparison of the Mismatch Repair Specificities of MutS β and MutS α . *J. Biol. Chem.*, (273), 19895-19901.
8. Goellner EM, Putnam CD, Kolodner RD (2015). Exonuclease 1-dependent and independent mismatch repair. *DNA Repair*, (32), 24-32.
9. Gradia S, Subramanian D, Wilson T, Acharya S, Makhov A, Griffith J, Fishel R (1999). hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Mol. Cell*, (3), 255-261.
10. Gu Y, Parker A, Wilson TM, Bai H, Chang D-Y, Lu A-L (2002). Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J. Biol. Chem.*, (277), 11135-11142.
11. Harrington JM, Kolodner RD (2007). Saccharomyces cerevisiae Msh2-Msh3 acts in repair of base-base mismatches. *Mol. Cell. Biol.*, (27), 6546-6554.
12. Iyer RR, Pluciennik A, Genschel J (2010). MutL α and proliferating cell nuclear antigen share binding sites on MutS β . *J. Biol. Chem.*, (285), 11730-11739.
13. Jiricny J. (2013). Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* URL: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/5/4/a012633>.
14. Jiricny J (1998). Replication errors: challenging the genome. *EMBO J.*, 17 (22), 6427-6436.
15. Jiricny J (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, (7), 335-346.
16. Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P (2006). Endonucleolytic function of MutL α in human mismatch repair. *Cell*, (126), 297-308.
17. Kunkel TA, Erie DA (2005). DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.*, (74), 681-710.
18. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M (1993). Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*, (75), 1215-1225.
19. Li GM, Modrich P (1995). Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (92), 1950-1954.
20. Li GM (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.*, (18), 85-98.
21. Longley MJ, Pierce AJ, Modrich P (1997). DNA polymerase delta is required for human mismatch repair *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, (272), 10917-10921.
22. Modrich P (2006). Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J. Biol. Chem.*, (281), 30305-30309.

23. Muges G (2015). Nobel Prize in Chemistry for DNA repair. *Current Science*, 109 (9), 1533-1536.
24. Natrajan G, Lamers MH, Enzlin JH, Winterwerp HHK, Perrakis A, Sixma TK (2003). Structures of *Escherichia coli* DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches: A common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic Acids Res.*, (31), 4814- 4821.
25. Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM (1994). Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*, (371), 75-80.
26. Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, Lettieri T, Hughes MD, Arrigo A, Truong O, Hsuan JJ, Jiricny J (1995). GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science*, (268), 1912-1914.
27. Palombo F, Iaccarino I, Nakajima E, Ikejima M, Shimada T, Jiricny J (1996). hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr. Biol.*, (6), 1181-1184.
28. Pena-Diaz J, Jiricny J (2012). Mammalian mismatch repair: Error-free or error-prone. *Trends Biochem. Sci.*, (37), 206-214.
29. Pluciennik A, Dzantiev L, Lyer RR (2010). PCNA function in the activation and strand direction of MutLalpha endonuclease in mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (107), 16066-16071.
30. Pluciennik A, Modrich P (2007). Protein roadblocks and helix discontinuities are barriers to the initiation of mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (104), 12709-12713.
31. Sachadyn P (2010). Conservation and diversity of MutS proteins. *Mutat. Res.*, (694), 20-30.
32. Surtees JA, Alani E (2006). Mismatch repair factor MSH2-MSH3 binds and alters the conformation of branched DNA structures predicted to form during genetic recombination. *J. Molec. Biol.*, (360), 523-536.

Сведения об авторах
Information about the authors

Гуцол Людмила Олеговна – кандидат биологических наук, доцент кафедры патологической физиологии с курсом клинической иммунологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; e-mail: gutzol@list.ru)

Gutzol Lyudmila Olegovna – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology with the Course of Immunopathology of Irkutsk State Medical University (664003, Irkutsk, Krasnogo Vosstaniya str., 1; e-mail: gutzol@list.ru)

Егорова Ирина Эдуардовна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры химии и биохимии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (e-mail: bh.38@list.ru)

Egorova Irina Eduardovna – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Chemistry and Biochemistry of Irkutsk State Medical University (e-mail: bh.38@list.ru)

Непомнящих Светлана Федоровна – кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры патологической физиологии с курсом клинической иммунологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (e-mail: sfn11@mail.ru)

Nepomnyashchikh Svetlana Fyodorovna – Candidate of Medical Sciences, Senior Lecturer of the Department of Pathological Physiology with the Course of Immunopathology of Irkutsk State Medical University (e-mail: sfn11@mail.ru)

Минакина Лилия Николаевна – кандидат медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (e-mail: minakinal@mail.ru)

Minakina Liliya Nikolayevna – Candidate of Medical Sciences, Docent, Head of the Department of Pharmacology of Irkutsk State Medical University (e-mail: minakinal@mail.ru)

Ясько Михаил Владимирович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры химии и биохимии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (e-mail: yasko_1966@mail.ru)

Yas'ko Mikhail Vladimirovich – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Chemistry and Biochemistry of Irkutsk State Medical University (e-mail: yasko_1966@mail.ru)