

Systemy reparace genomu

DNA je na rozdíl od proteinů, lipidů a sacharidů unikátní molekula v buňce. Molekuly, kterých je mnoho se mohou při poškození prostě zaměnit. Udržet DNA v originálním stavu je pro buňku jedna z hlavních úloh. Proto existuje řada reparačních systémů DNA.

DNA je relativně stabilní sloučenina; je však vystavena mnoha poškozujícím vlivům:

- 1) Teplota – denaturace, deaminace basí, ztráta basí glykosylickou hydrolýzou**
- 2) UV záření – vznikají pyrimidinové dimery, 6-4 fotoprodukty**
- 3) Ionizující záření – poškození bazí, jejich fragmentace, zlomy**
- 4) Chemické modifikace – velký počet**

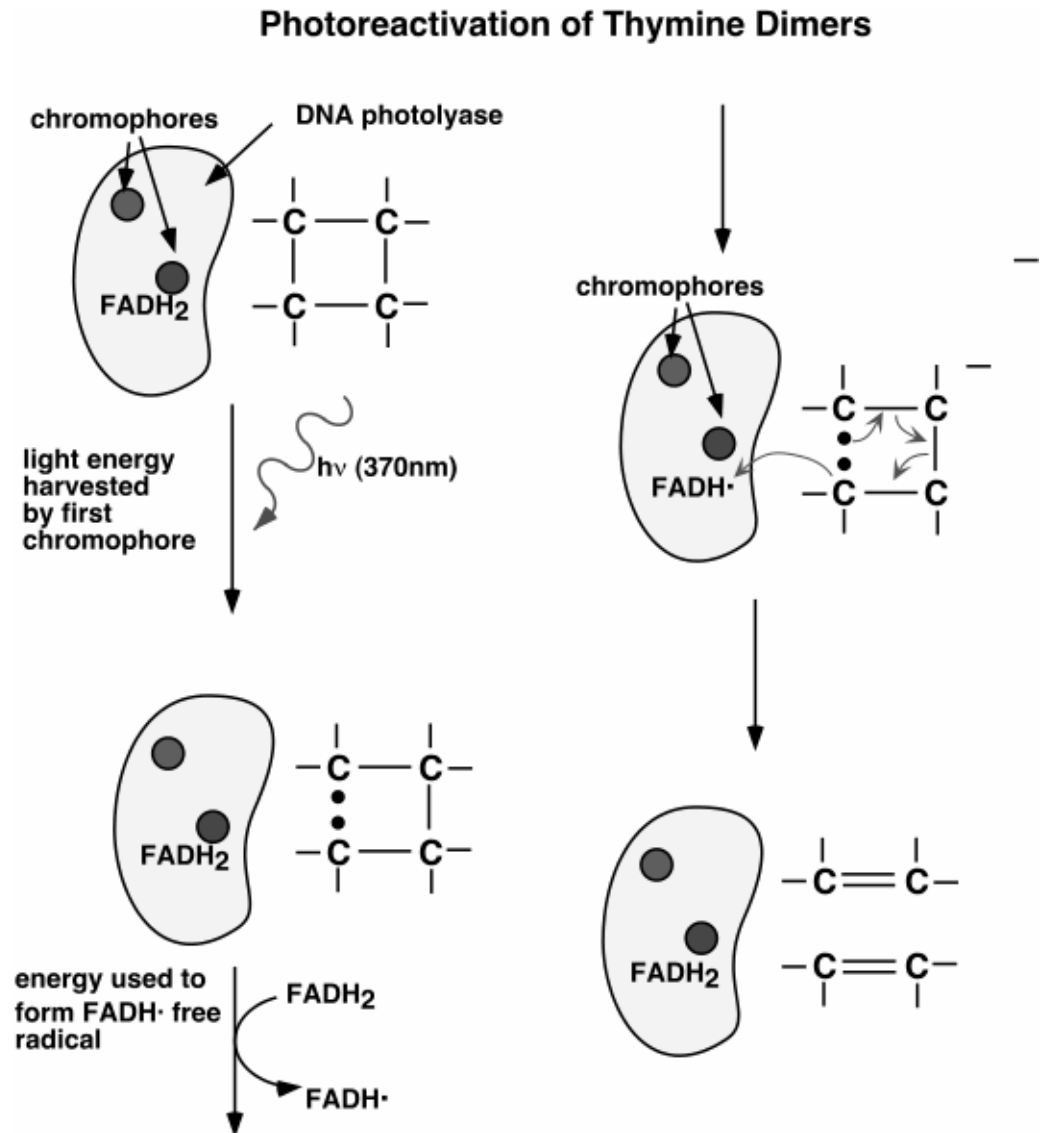
Reparace byla první prozkoumána u E.coli s různými mutanty při působení UV záření. Proto probereme první UV-poškození a související reparační procesy.

Fotoreaktivace – prokaryotní i eukaryotní buňky

První systém reparace se nazývá fotoreaktivace. Uskutečňuje se působením jednoho enzymu – DNA-fotoliázy. Tento enzym štěpí dimery. Energie pro štěpení kovalentní vazby cyklobutanového kruhu se čerpá pohlcením světla (370 nm) chromofory.

E. coli fotoliáza:

- phr gen, 54 kd, monomer
- izolován – modrá barva, absorbuje při 380 nm
- chromofory FADH₂ a pterin
- reparuje pyrimidinové dimery rychlostí 25/min/molekulu
- stimuluje ABC nukleasu



Fotoreaktivace – prokaryotní i eukaryotní buňky

Vazba PL (fotoliázy) na DNA:

- **Velmi selektivní – váže se na dimery**
- **Nezávislá na formě DNA (relaxovaná supercoiled, ssDNA apod)**
- **Rozpoznává cyklobutanový kruh (2 kovalentní vazby), jiné dimery nepoznává**
- **PL asociuje s 6-7 páry bází v okolí dimeru, zapadá do menšího žlábků DNA**

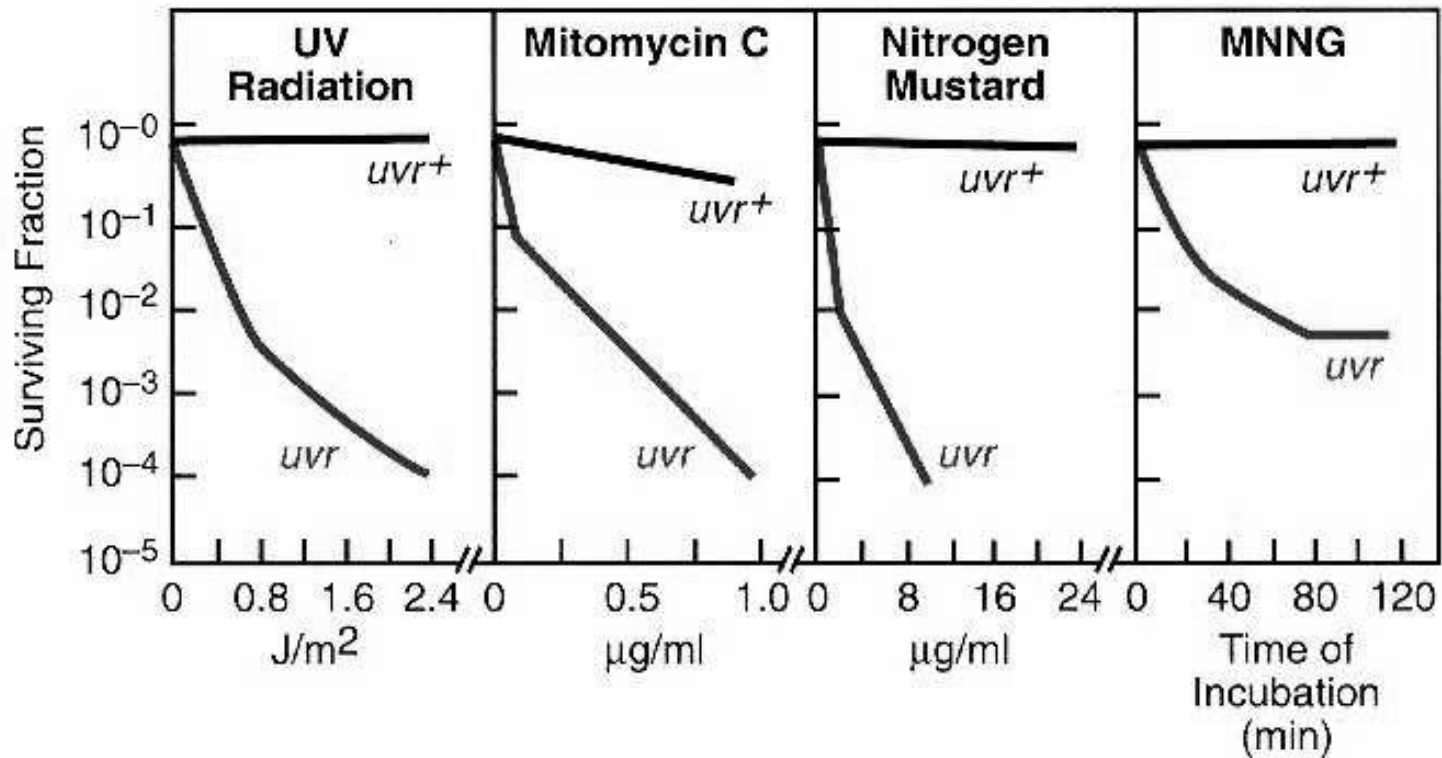
Mechanismus reparační:

- **Aktivuje se enzym přes pohlcení světla oběma chromofory**
- **FADH₂ (flavin) je excitován a předává elektron dimeru, čímž zruší příčnou vazbu**
- **Role druhého chromoforu je pravděpodobně zaplnění místa po odevzdaném elektronu v molekule flavinu**

Fotoreaktivace byla nalezena u mnoha organismů včetně ryb, plazů ale nebyla nalezena u savců. U člověka existuje gen CRY, jenž je sekvenčně podobný fotoliáze, není však schopen fotoreaktivace (uplatnění při nastavení denních rytmů).

Citlivost bakterií k mutagenům

Citlivost bakterií k různým činidlům je silně závislá na přítomnosti a správné funkci genu *uvr*.



Nukleotidová excisní reparace

Excisní reparace dimerů se uskutečňuje působením uvrABC systému.

Komplex uvrAuvrB skenuje DNA a vyhledává dimery.

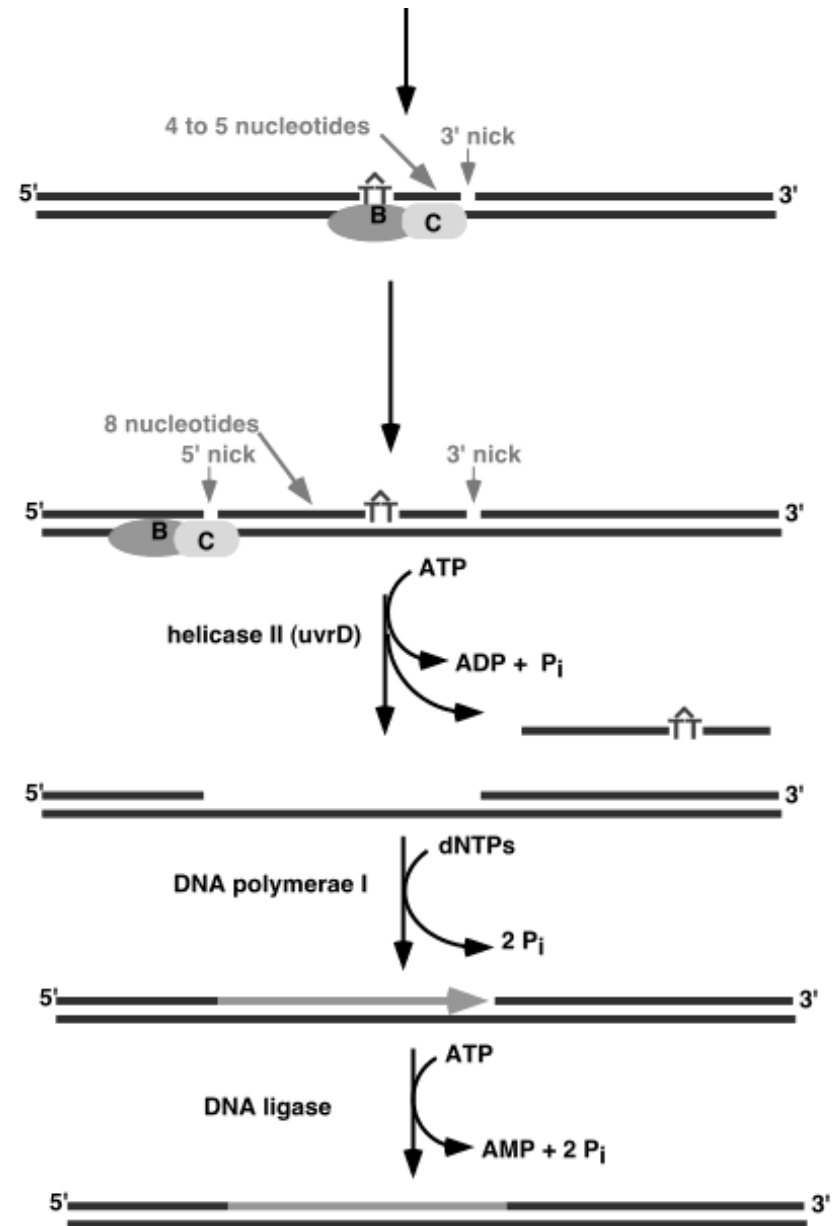
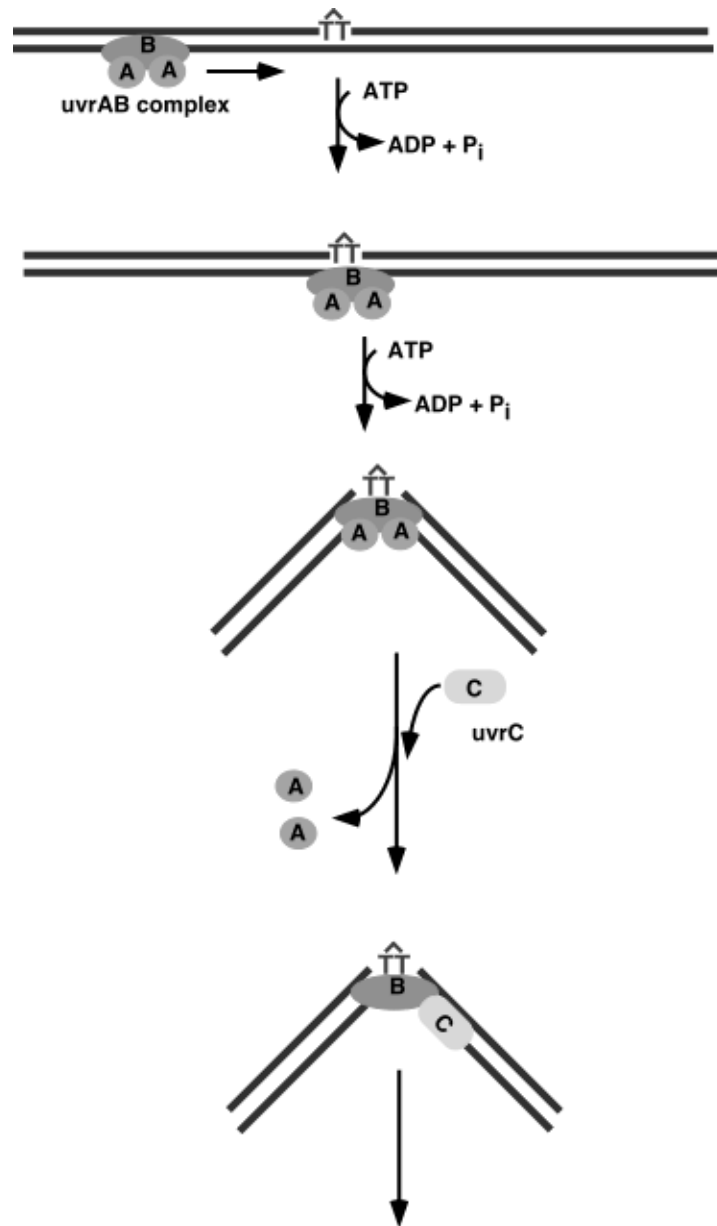
Při jejich nalezení dochází k odpojení uvrA proteinu (ATP závislá reakce) a k připojení uvrC.

Tento komplex (uvrBuvrC) štípně páteř DNA v blízkosti dimeru.

Část řetězce je odstraněna uvrD proteinem – helikázou II za dodání energie z ATP

Další reparace se uskuteční jako prostá syntéza polymerázou a ligázou.

Nukleotidová excisní reparace



Nukleotidová excisní reparace

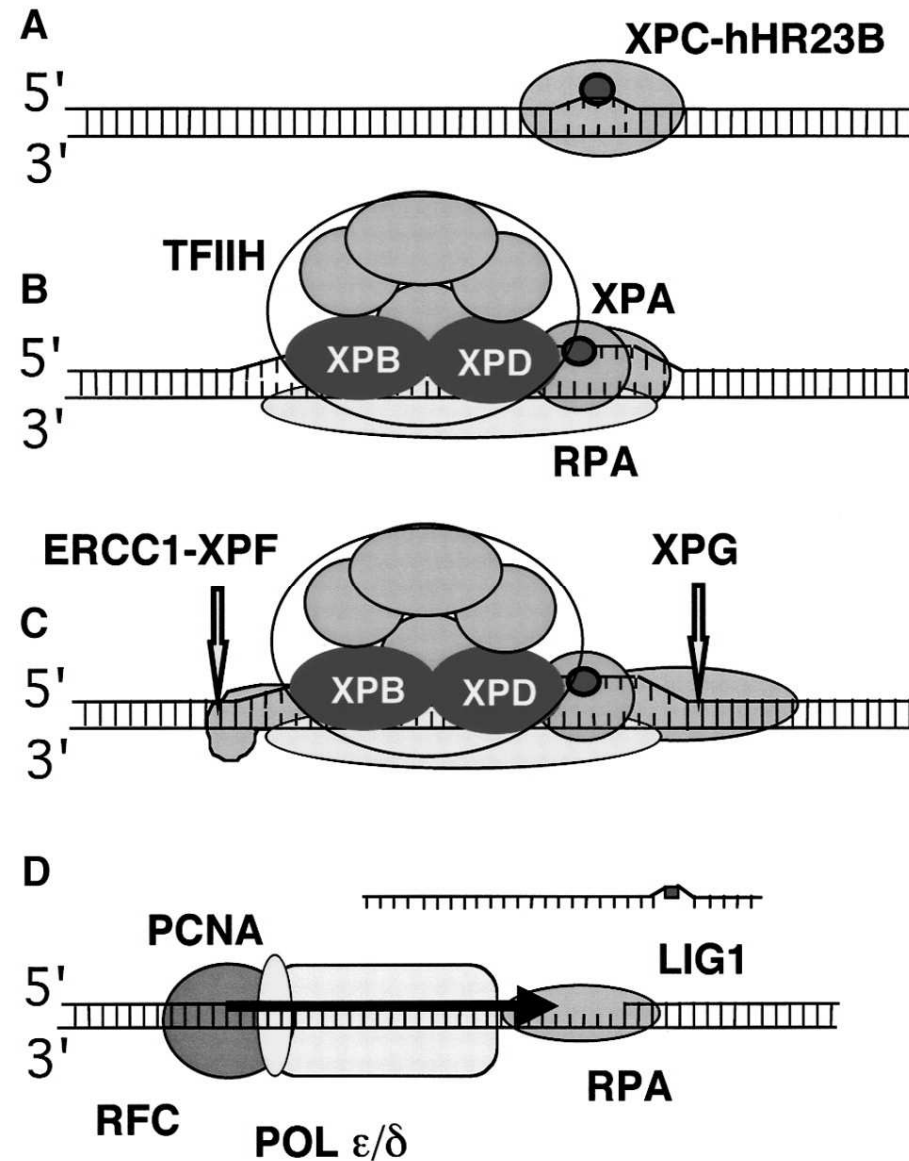
UvrA protein – 2810 bp, ATPáza, vazebná aktivita k DNA. Funguje v dimeru. Poznání substrátu souvisí s deformací helikální struktury DNA. Dimer odtáčí helix o 19-20 stupňů a vytváří přehyb o velikosti 27 st., který zasahuje do velkého žlábků do vzdálenosti 0.26 nm.

UvrB protein – 2019 bp, neváže se k DNA samostatně, pouze spolu s uvrA, nemá ATP-ázovou aktivitu.

UvrC protein 1764 bp – váže se k uvrB na DNA 1 i více molekul a způsobuje excisi. Naštípnutí je současné na obou místech, nikoliv postupné. Štěpí 8-mou fosfodiesterickou vazbu ve směru 5' od poškození a 4-tou nebo 5-tou ve směru 3', což dává 12-13 mer

Gen uvrC odpovídá u člověka ERCC1 gen, u kvasinek RAD10 gen, uvrD genu (helikáze) odpovídá ERCC2 u člověka a RAD3 u kvasinek. U člověka je excizní reparační systém složitější – 4 geny (XPC, DDB, XPA, RPA) se mohou vázat k DNA. Gen uvrB odpovídají dva geny XPB a XPD, které jsou oba potřebné pro vznik pre-incizního stavu. Pro excisi jsou potřebné dva geny XPG a XPF – pro každou zvlášť – místo uvrC u E.coli. Celý komplex disociuje s 24-32 oligonukleotidem, mezeru zaplní pol δ nebo ϵ a ligáza LIG1

Nukleotidová excisní reparace u člověka



Excisní reparace poškozených bazí

Dochází k odstranění poškozených bazí (nikoliv nukleotidů), kdy se hydrolyzuje N-glykosylická vazba mezi bazí a cukrem a odstraní se báze (DNA glykosylazou).

Vzniká AP místo (apurinové nebo apyrimidinové), které se opraví endonukleázou (štípe páteř DNA v blízkosti AP místa) a dRpázou (deoxyribofosfodiesterazou).

Vloží se nukleotid polymerázou a páteř se spojí ligázou.

DNA glykosylázy:

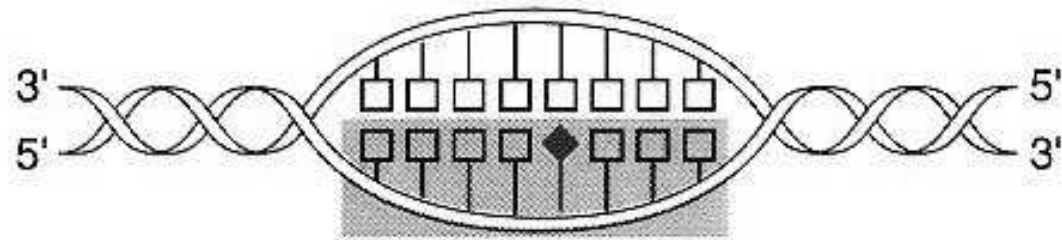
-Malé 20-30 kD, velmi specifické (např. uracil, hypoxantin, 3-metyladenin, hydroxymetyluracil apod), záření vyvolává např. 4,6-diamino-5-FAPY (formamidopyrimidin), který odstraňuje enzym genu fpg (30 KD). Hydroxymethyluracil vzniká rovněž působením záření nebo jiných oxidačních činidel

AP endonukleázy:

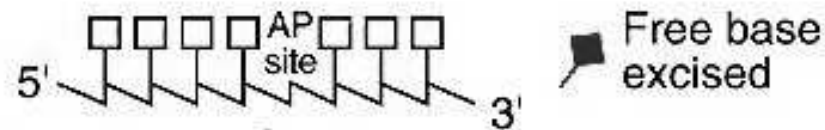
- Štípou fosfodiesterickou vazbu 3' nebo 5' od AP místa (podle toho existují 4 druhy endonukleáz (štípu buď na 3' straně nebo 5' straně od AP a vzniká 3'OH + 5'PO₄, 3'PO₄ + 5'OH).

- Dále jsou různé druhy endonukleáz, např. endo IV – mutanti citliví k alkylujícím činidlům (mitomycin C, bleomycin), endo V – degraduje DNA s uracilem, u člověka existují také AP endonukleázy

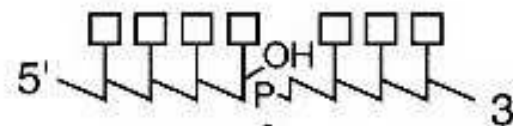
BASE EXCISION REPAIR



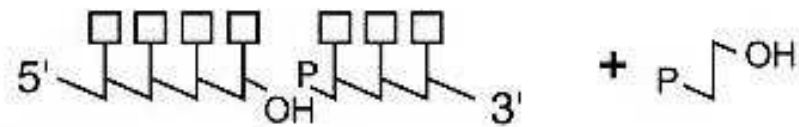
DNA glycosylase ↓ ①



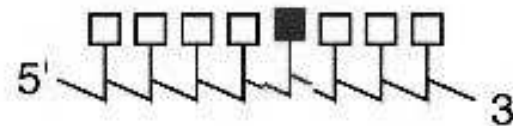
5' AP endonuclease ↓ ②



dRpase ↓ ③



DNA polymerase + DNA ligase ↓ ④

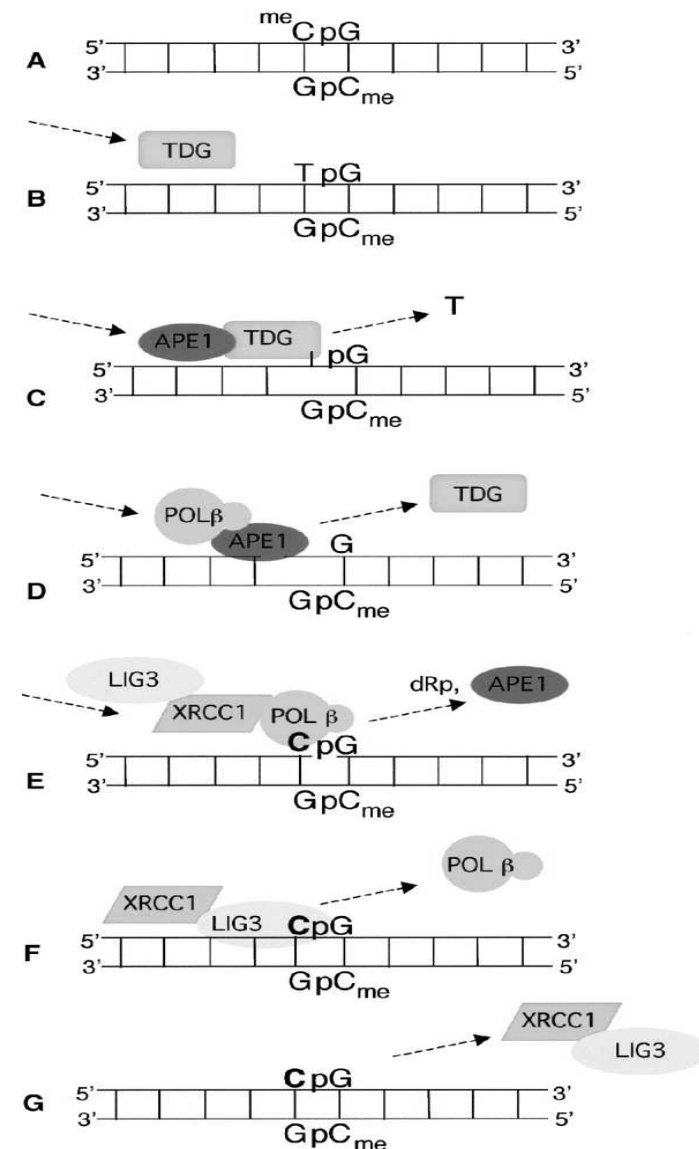


Excisní reparace poškozených bazí u člověka

U člověka existují 3 odlišné glykosylazy pro oxidativní poškození a čtvrtá pro alkylované puriny. Další 4 mohou odstranit uracil z DNA (např. UNG glykosyláza je homologická Ung enzymu E.coli, asociuje se s replikační vidlicí a odstraňuje chybně vložený uracil naproti adeninu. SMUG1 je unikátní pro vyšší eukaryoty a odstraňuje uracil vzniklý po deaminaci cytosinu v DNA).

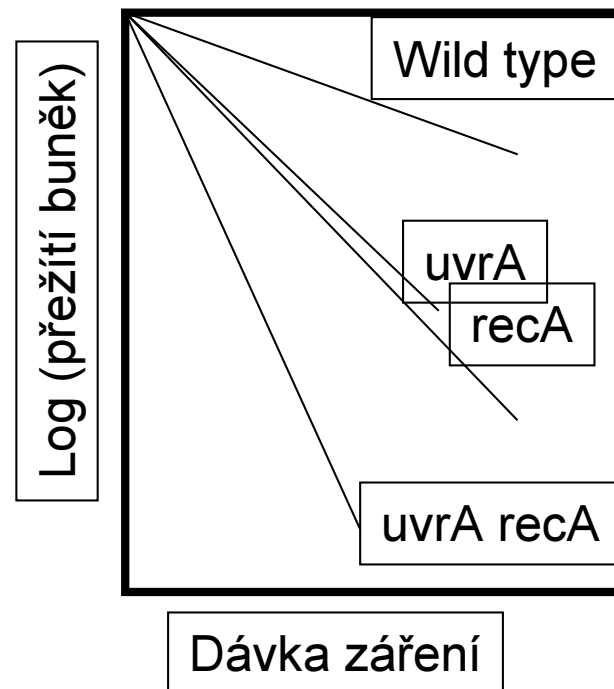
Byla nalezena pouze 1 endonukleáza pro AP místa (APE1). Delece tohoto genu způsobuje embryonální letalitu u myši.

Na obr. je znázorněna reparace residua po deaminaci 5-methylcytosinu – thyminu. TDG glykosyláza odstraní thymin a přivolá APE1 nukleázu, ta očistí okraj a přivolá POL b, ta vsadí cytosin a přivolá LIG3-XRCC1 komplex.



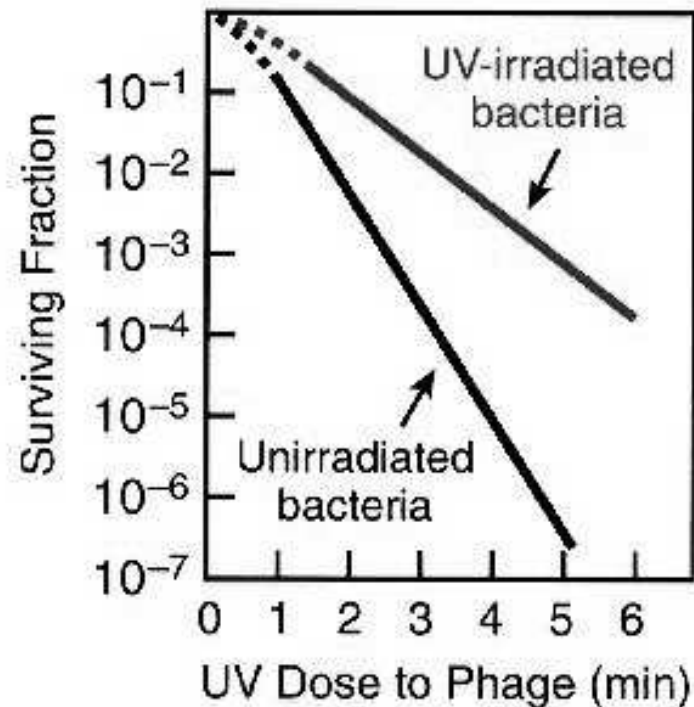
Citlivost mutantů E. coli k UV záření

V 60-tých letech byli izolováni mutanti E. coli citliví k UV-světlu. Nejzajímavější byli mutanti *uvrA* a *recA*, u nich u obou byla citlivost k UV podstatně větší než u buněk standardního (divokého) kmene. Ukázalo se, že existuje dvojitý mutant *uvrA recA*, jehož citlivost je ještě daleko vyšší, u kterého existuje pouze fotoreaktivace, tj. reparace závislá na světle. Existence dvou mutantů se zvýšenou citlivostí k UV záření nezávislých na sobě svědčila o existenci dvou reparačních systémů



W-reaktivace fágových částic

Při ozáření bakteriofága dochází k jeho poškození a ztrátě funkce. Čím je větší dávky, tím méně fágových částic přežívá (je schopno infikovat bakterii). Jestliže však bakterie předtím ozáříme, přežije více fágových částic – tomu se říká W- reaktivace (Weigle).



SOS systém u E. coli

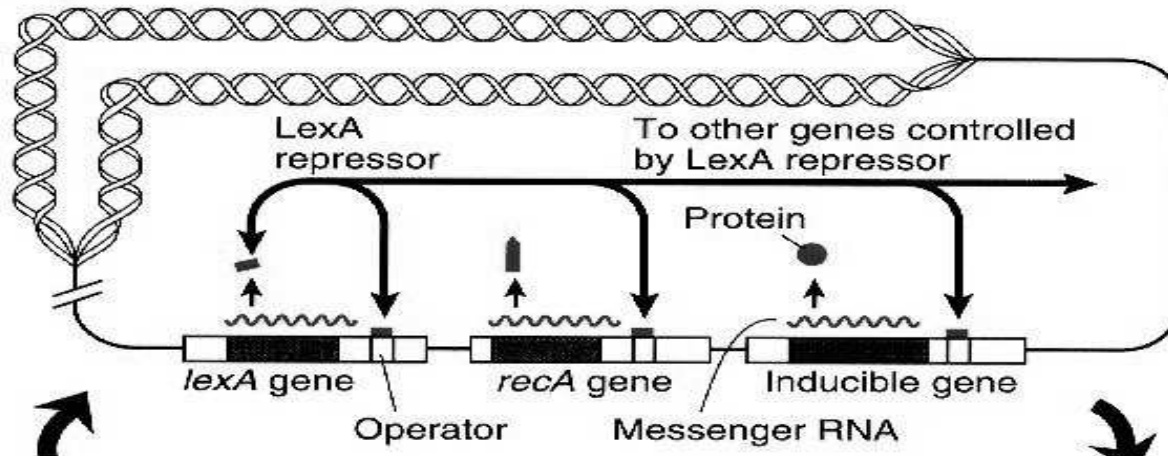
SOS systém u E. coli je inducibilní enzymatický systém, který je odpovědný za reparaci, mutagenezi a další funkce. Základ regulace spočívá na *lexA* a *recA* proteinech.

Za normálních okolností je v buňkách určitá bazální úroveň těchto proteinů, kdy *lexA* represor ve formě dimerů nasedá na operátory řady genů včetně *recA* a sebe sama a blokuje syntézu těchto genů. Konzensusální sekvence pro vazbu *lexA* proteinu je sekvence 5'-CTG-N10-CAG-3', tzv. „SOS box“.

Vznikem poškození DNA dochází k vazbě *recA* proteinu na ssDNA a dále k asociaci s *lexA* proteinem, který se tímto štěpí (často se mluví o *recA*-proteáze), hydrolýza *lexA* odblokuje syntézu řady genů, včetně *recA*, který pak má ještě další funkce – nasedá na DNA a chrání jí v průběhu reparace, způsobuje rekombinaci.

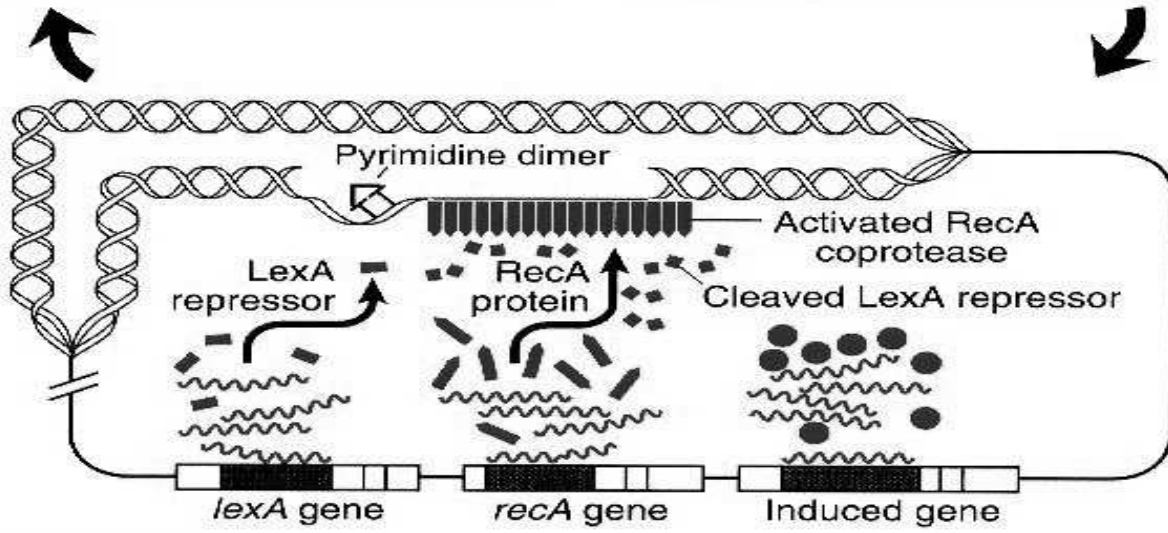
Jakmile je poškození reparováno, klesne úroveň proteázy, *lexA* protein nasedne na operátorová místa a zablokuje syntézu.

UNINDUCED STATE



Repressor accumulates
↑
Drop in RecA coprotease level
↑
Drop in level of signal
↑
DNA repaired

DNA damage
↓
Inducing signal
↓
RecA coprotease activated
↓
LexA repressor cleaved

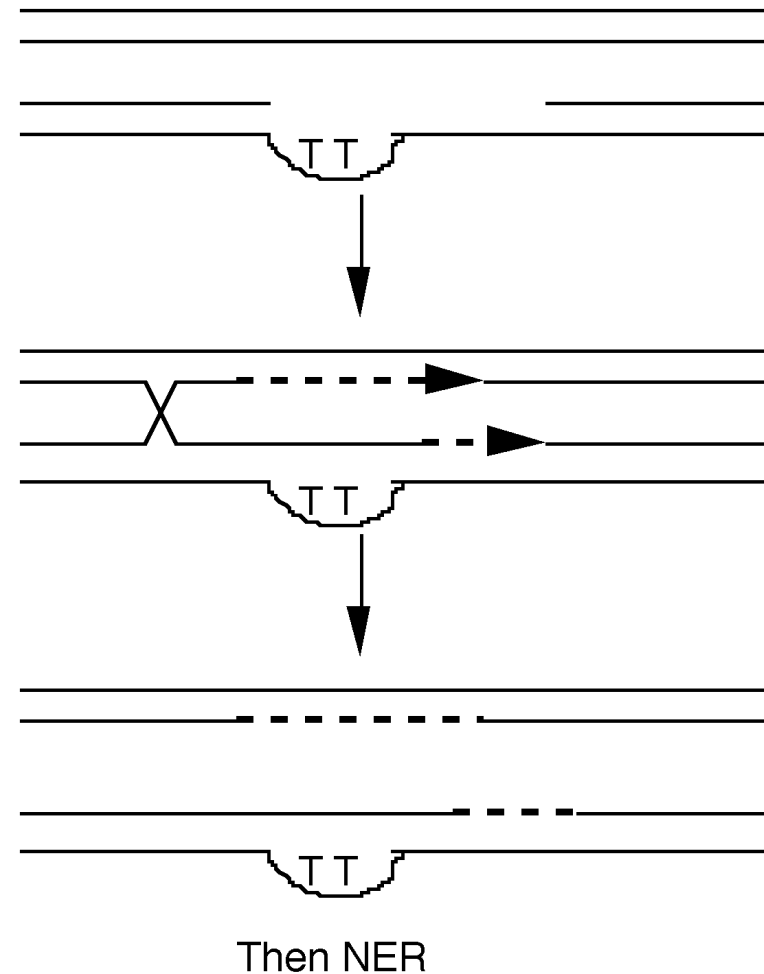


INDUCED STATE

SOS (postreplikativní) reparace

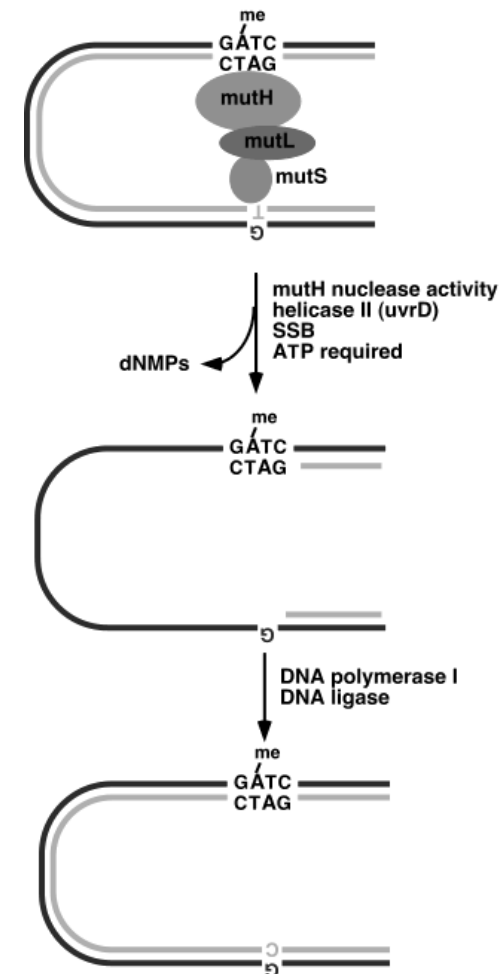
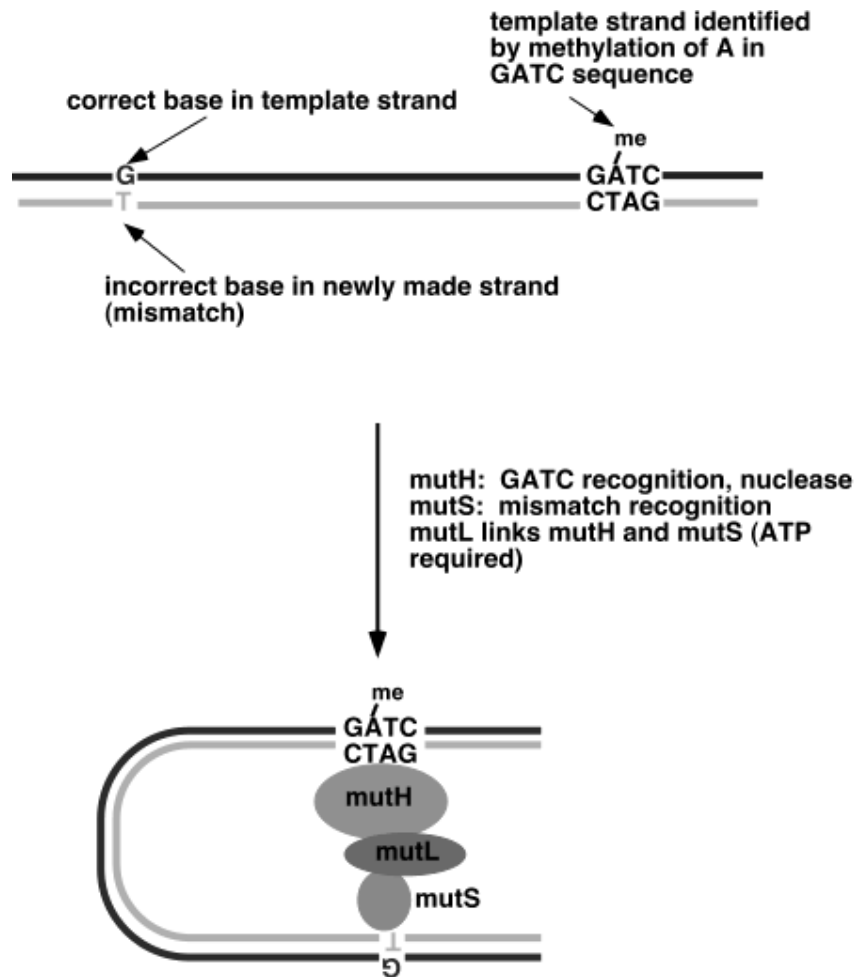
SOS systém umožňuje reparaci DNA v průběhu replikace – na poškození se polymeráza zastaví, disociuje od DNA a syntéza je inicializována ve vzdálenosti 1000 bp dál podél řetězce, zanechávající mezeru s poškozenou bází (nebo dimerem). RecA protein se váže k ssDNA a má schopnost přenést do této mezery řetězec ze sesterského duplexu (chromatidy), který má nepoškozený templát. Tento „crossing over“ zanechává malé gapy, které se uzavřou polymerázou a ligázou.

Poškození se neodstraní – pouze dochází ke zředění a poškození čeká na další reparaci (pokud je možná).



Mismatch reparaace

Po replikaci se při chybně vloženém nukleotidu oprava děje tzv. „mismatch repair“ s využitím genů mutHLS. mutH se váže na GATC sekvenci s metylovaným A – tím se pozná starý řetězec DNA, mutS se váže na nespárované místo. MutL spojí mutH a mutS a dojde k vyštěpení řetězce za pomoci helikázy (uvrD).



Reparace zlomů DNA

SSB se reparují velmi rychle s využitím stejných reparačních systémů jak BER nebo NER. Existují však různé typy SSB – část se reparuje ligázou, část s použitím excizní reparace a zbývající poškození těžšího kalibru indukují SOS-reparaci.

DSB se reparují pomocí rekombinace, což u E.coli při 1 genomu na buňku není možné. Replikace u bakterií však probíhá synchronně a doba zdvojení může být kratší než je doba replikace – pak je na buňku více genomů (např. 6-8 kopií). Pak je možná rekombinace.

U savčích buněk se reparují DSB prostým spojením konců. To vyžaduje enzymy, které konce rozpoznají a dotáhnou je k sobě. Reparace nevyžaduje homologii a nazývá se nehomologní spojování konců (NHEJ-nonhomologous end-joining). Pro tuto reparaci je důležitý protein Ku. Je to heterodimer podjednotek Ku70 a Ku80. Defekt této reparace vede ke vzniku translokací.

Dalším typem reparace DSB u savčích buněk je homologní rekombinační reparace. Tato reparace probíhá na sesterských chromatidách (G2 fáze cyklu) nebo s pomocí homologního chromosomu – v G1 fázi to předpokládá hledání tohoto homologa v jádře, což je málo pravděpodobné, proto se předpokládá, že v G1 probíhá pouze NHEJ. Další možnost je u chromosomů s duplikovanou sekvencí.

NHEJ reparace

Proteiny, které se účastní:

DNA ligáza IV – kooperuje s XRCC4 na spojení konců po jejich patřičném opracování

XRCC4 - analog LIF1 genu u kvasinek – spojení konců

XRCC5 – analog HDF2 u kvasinek – označuje se nyní jako Ku80 – spolupracuje s Ku70 nasedá na konce a spojuje je

XRCC6 – analog HDF1, označuje se Ku 70, je velmi hojný tvoří heterodimer s Ku80, nasedá na konce a rozplétá částečně konce.

XRCC7 – DNA protein kináza – aktivuje Artemis

ARTEMIS – nukleáza regulovaná PKcs, připravuje konce pro ligázu.

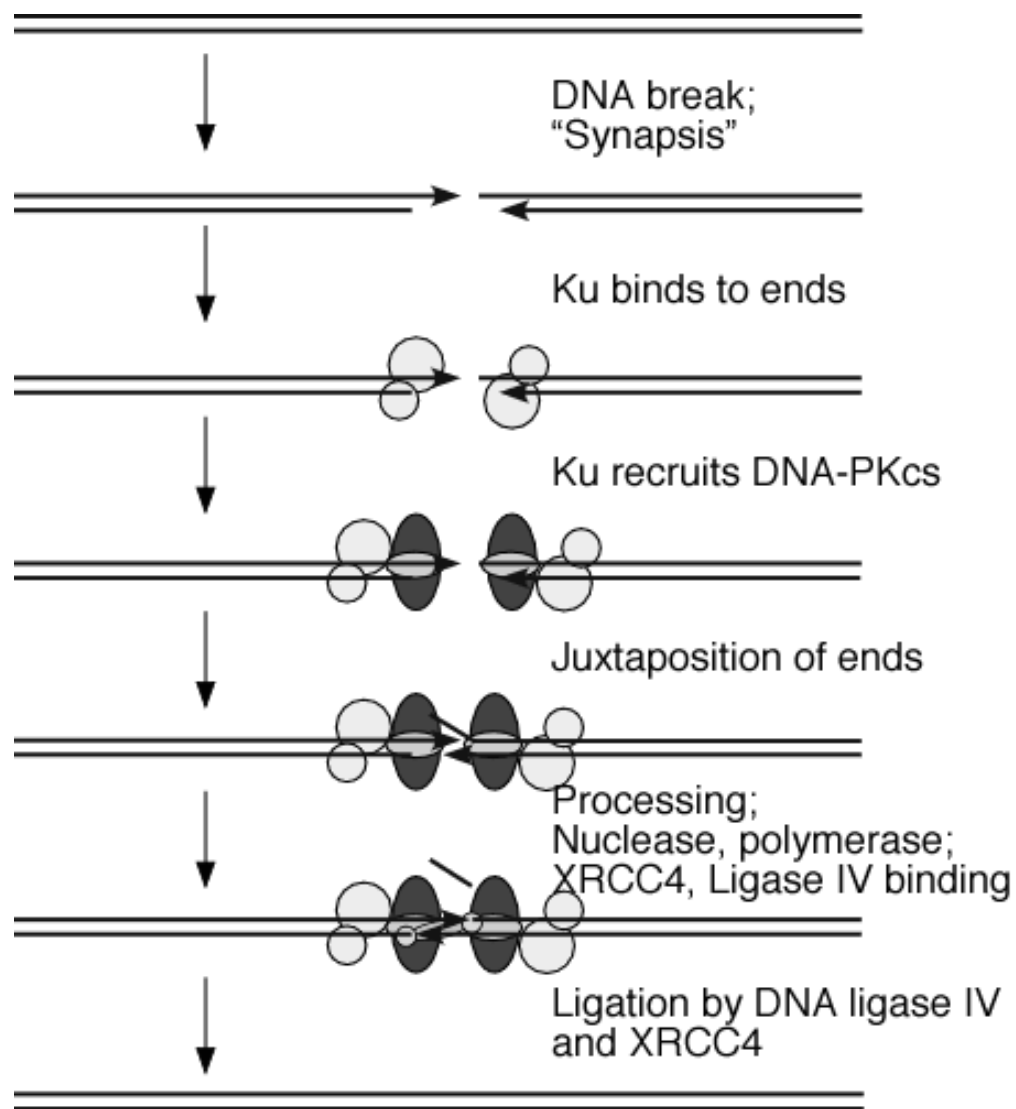
Mechanismus reparace:

Oba zlomy jsou podrženy pohromadě v tzv. synapsi následujícím způsobem:

- 1) Ku proteiny nasednou na konce zlomů a interagují mezi sebou (tj. drží konce u sebe)**
- 2) Ku přivolají protein kinázu PKcs, která se asociuje s ARTEMIS endonukleázou a aktivuje ji, aby očistila konce (ořezala jednořetězcové zbytky)**
- 3) Po očištění se konce spojí – účastní se DNA ligáze IV a XRCC4 protein.**

NHEJ reparace

Oba zlomy jsou podrženy pohromadě v tzv. synapsi následujícím způsobem:

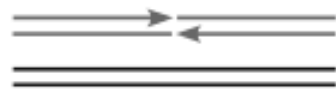


Homologní rekombinace u lidských buněk

Existují dva dobře dokumentované procesy – SDSA a SSA

Synthesis-dependent strand annealing

Single-strand Annealing



Double-strand break



5' to 3' resection



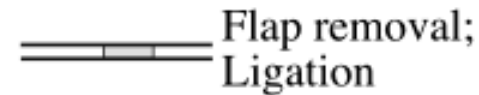
Strand invasion



Annealing



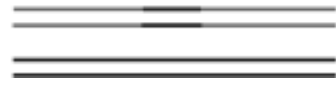
New DNA synthesis



Flap removal;
Ligation



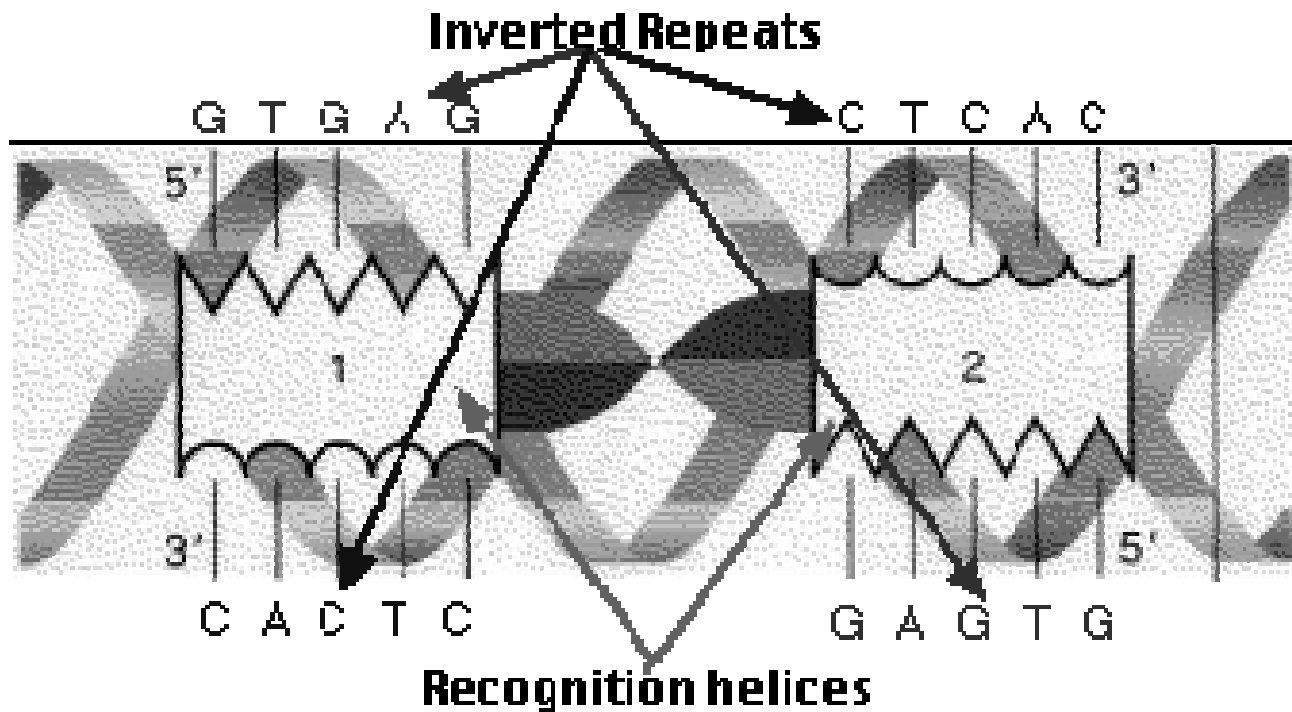
Unwinding from template;
Annealing



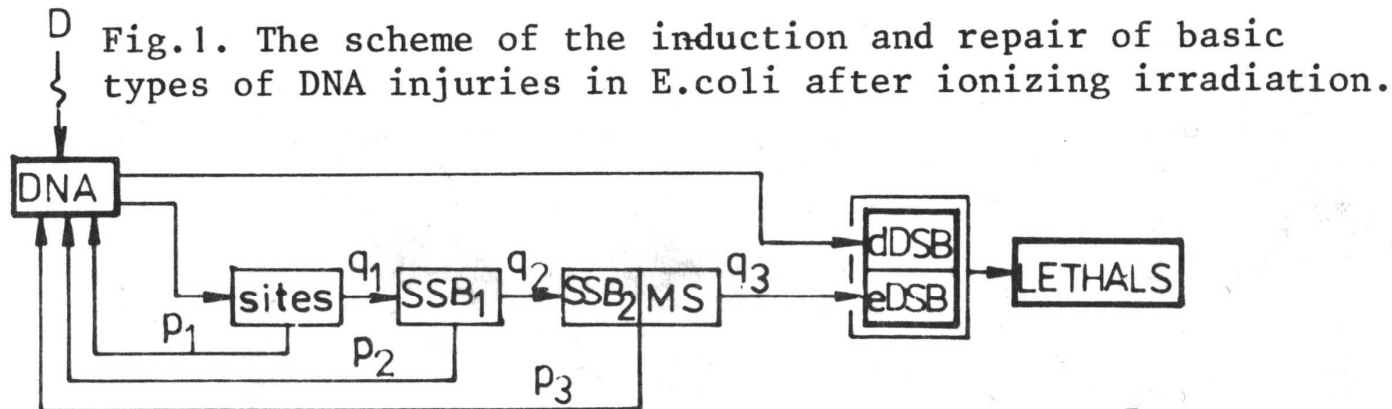
Ligation

Homologní rekombinace

Rekombinační reparace může nastat tam, kde je k dispozici homologní DNA



Hierarchie reparace zlomů u E. coli



Prvotní zlomy DNA (sites) se zčásti mění na zlomy opravitelné systémem excizní reparace (enzym polA, a DNA ligáza) zčásti se mohou reparovat velmi rychle DNA ligázou. Z těchto poškození vznikají jednoduché zlomy (SSB1) na úrovni fyzikálně chemických procesů, ale také z poškozených bazí při excizní reparaci (BER). Tyto zlomy jsou převážně reparovány NER. Část těchto zlomů se transformuje na SSB2, což jsou dlouhé mezery v DNA (gapy). K této transformaci dochází kvůli poškození konců, nebo z jiných příčin, jestliže na zlom narazí replikační mechanismus. Tyto gapy pokud nejsou chráněny recA proteinem, se transformují na DSB (DSB enzymatického původu) a jsou letální u kmene E. coli recA. Přímé DSB jsou letální u buněk standardního kmene (wild type).