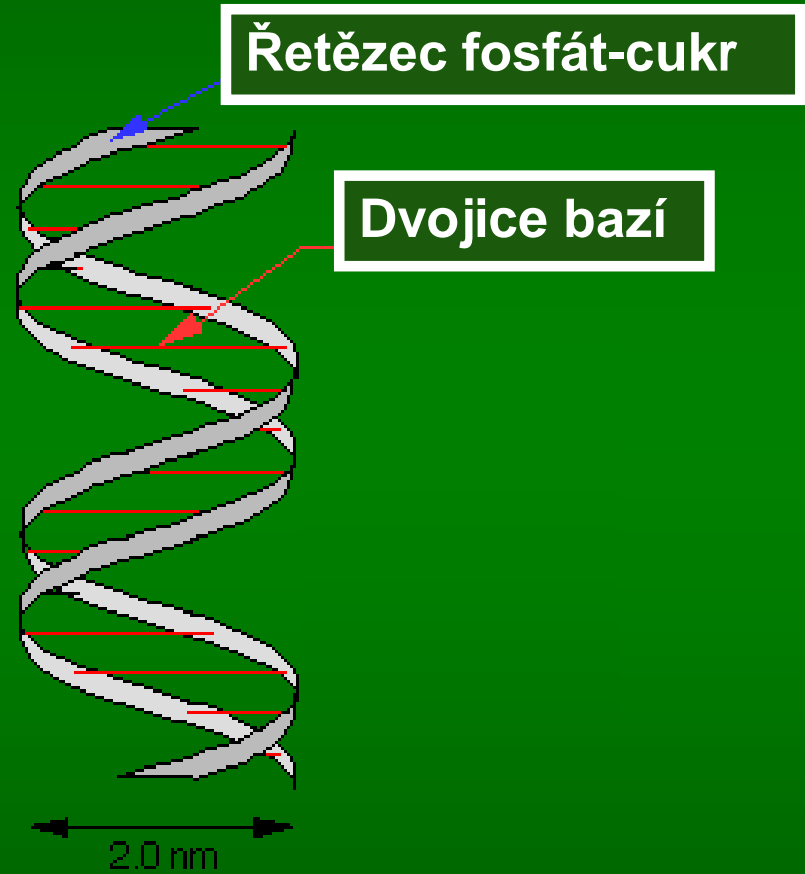
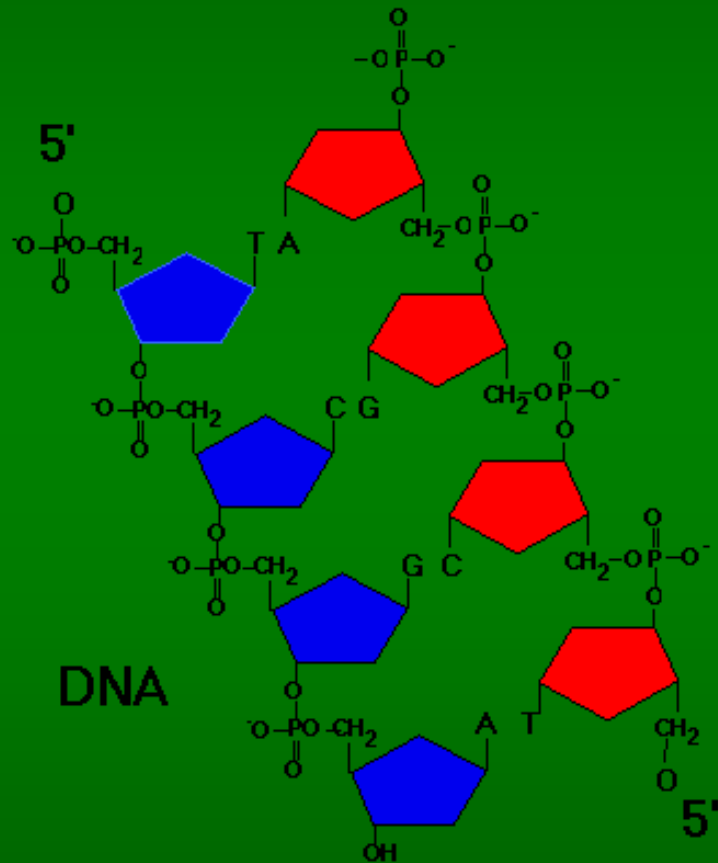
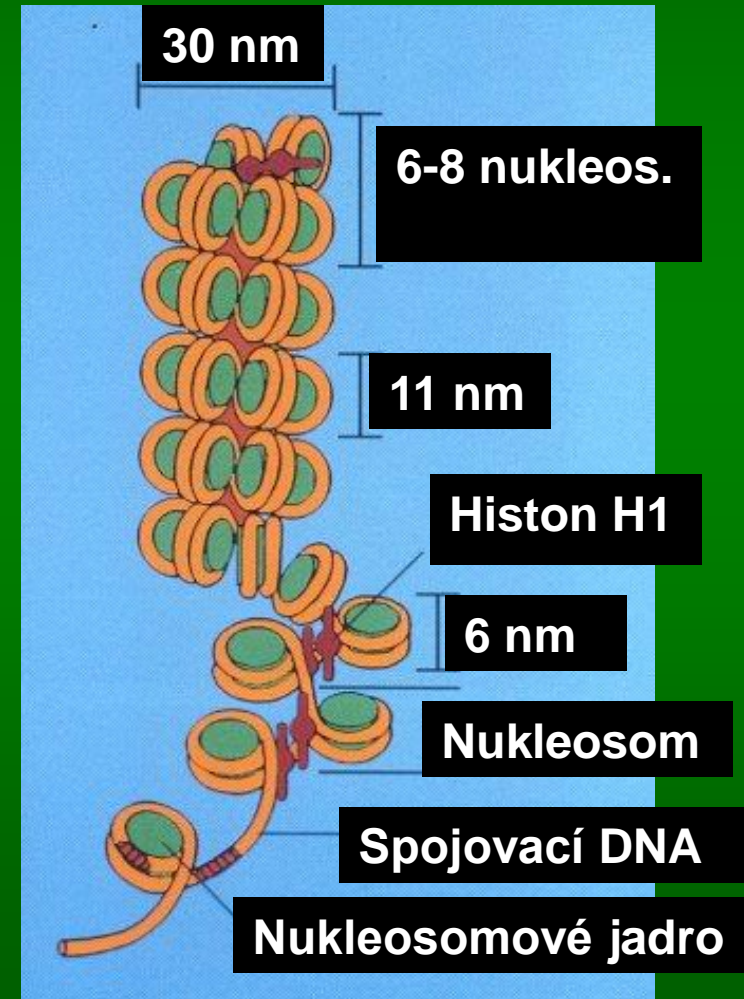
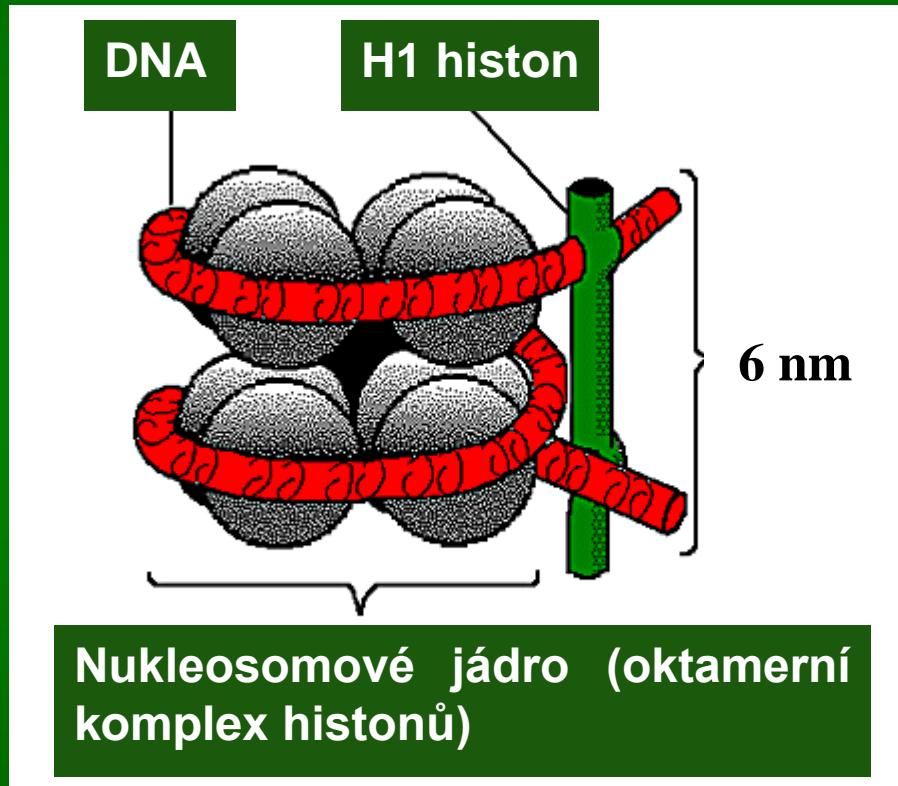


# Primární a sekundární struktura DNA

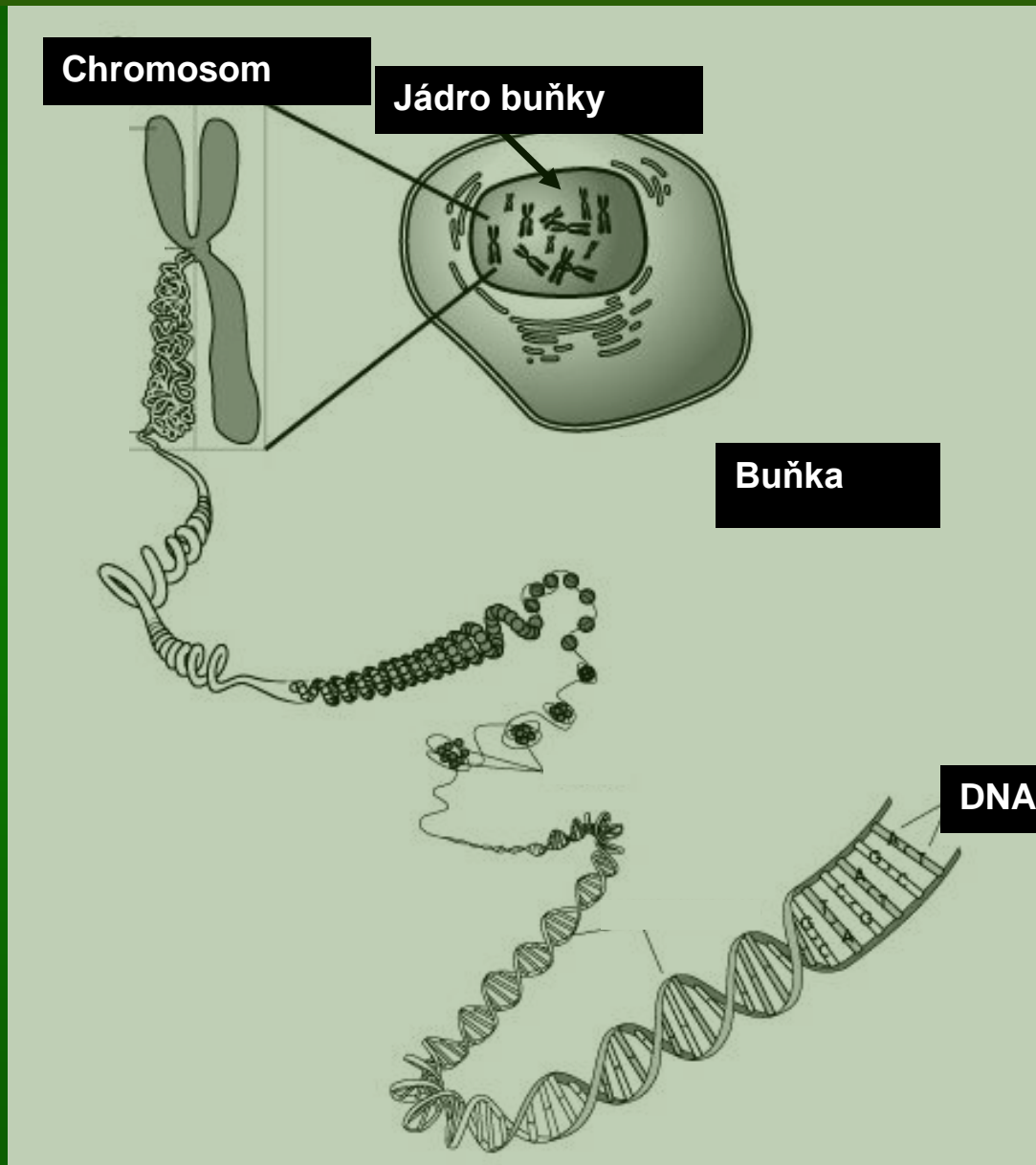


Watson a Crick, 1953

# Nukleosom a chromatinové vlákno



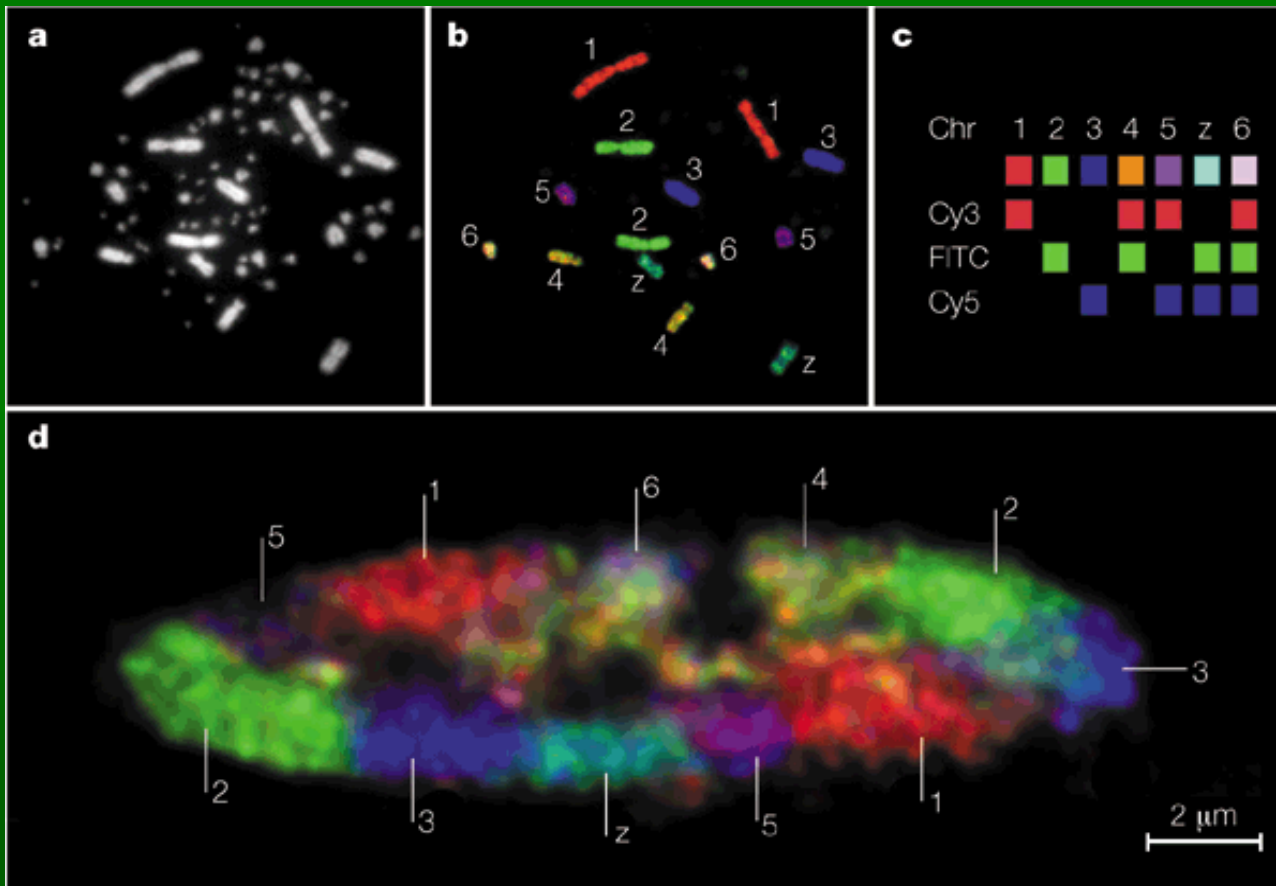
# Vyšší struktura chromatinu



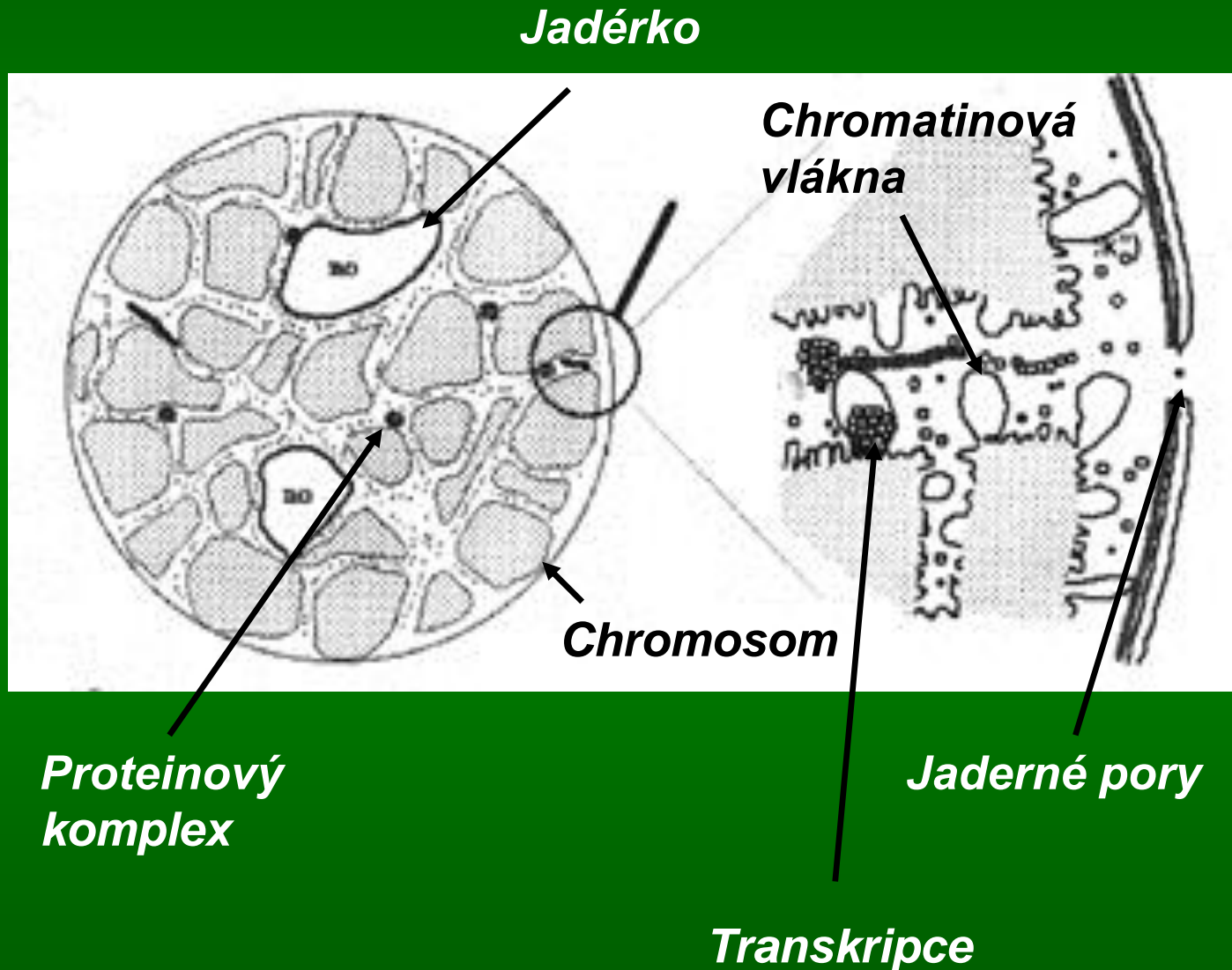


# Chromosomová teritoria

První experimenty, které vedly k závěru, že chromosomy se nacházejí v jádře v podobě ohraničených domén, byly pokusy T. Cremera v létech 1982-1984. Zavedení FISH podstatně urychlilo poznání chromosomů jak v mitóze, tak v interfázi.



# Chromosomové domény (teritoria)



# Poškození DNA zářením

**Jednoduché zlomy** DNA vznikají řadou procesů, často přenesením radikálu báze do 4-té pozice pentózy.

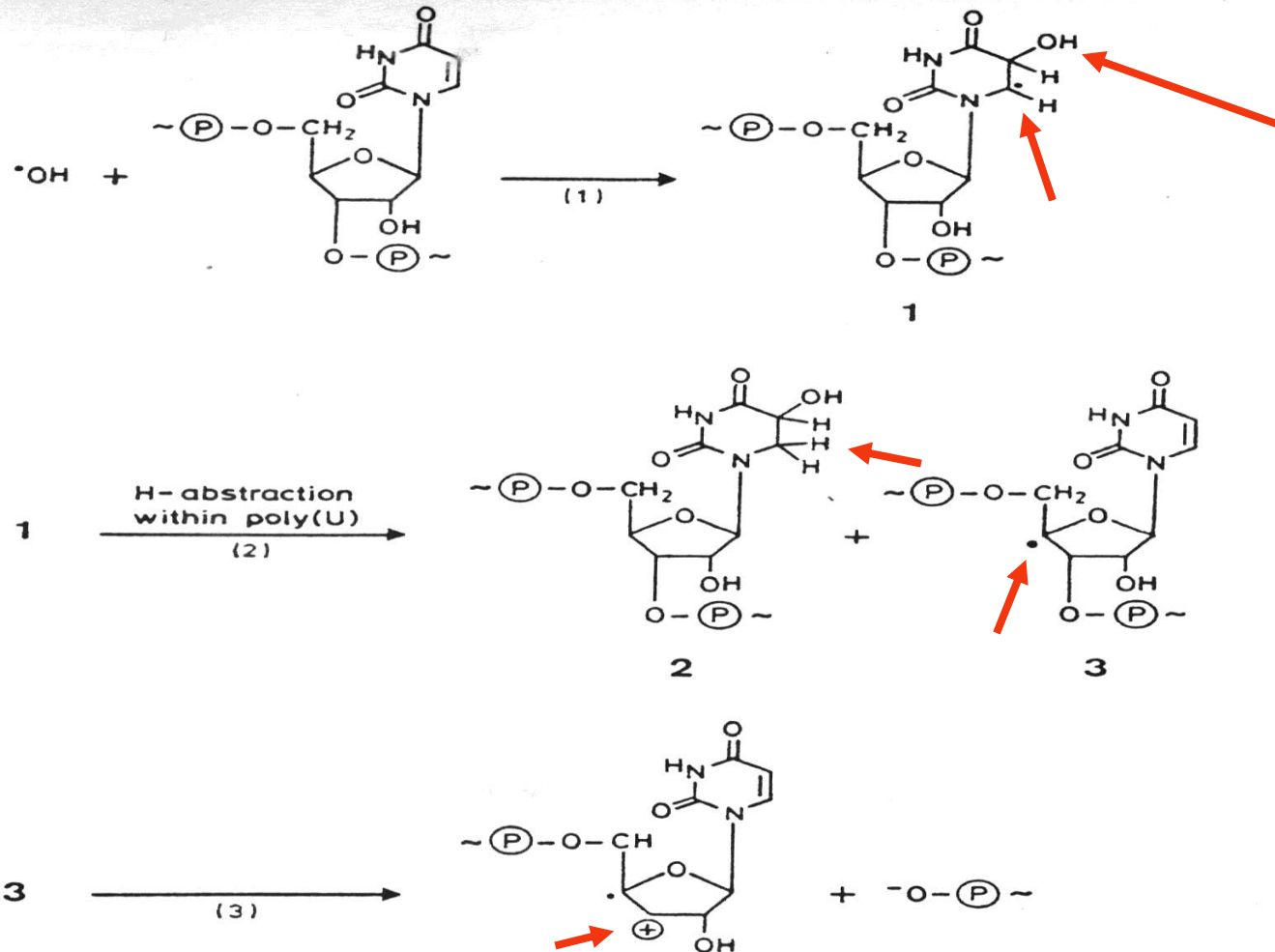
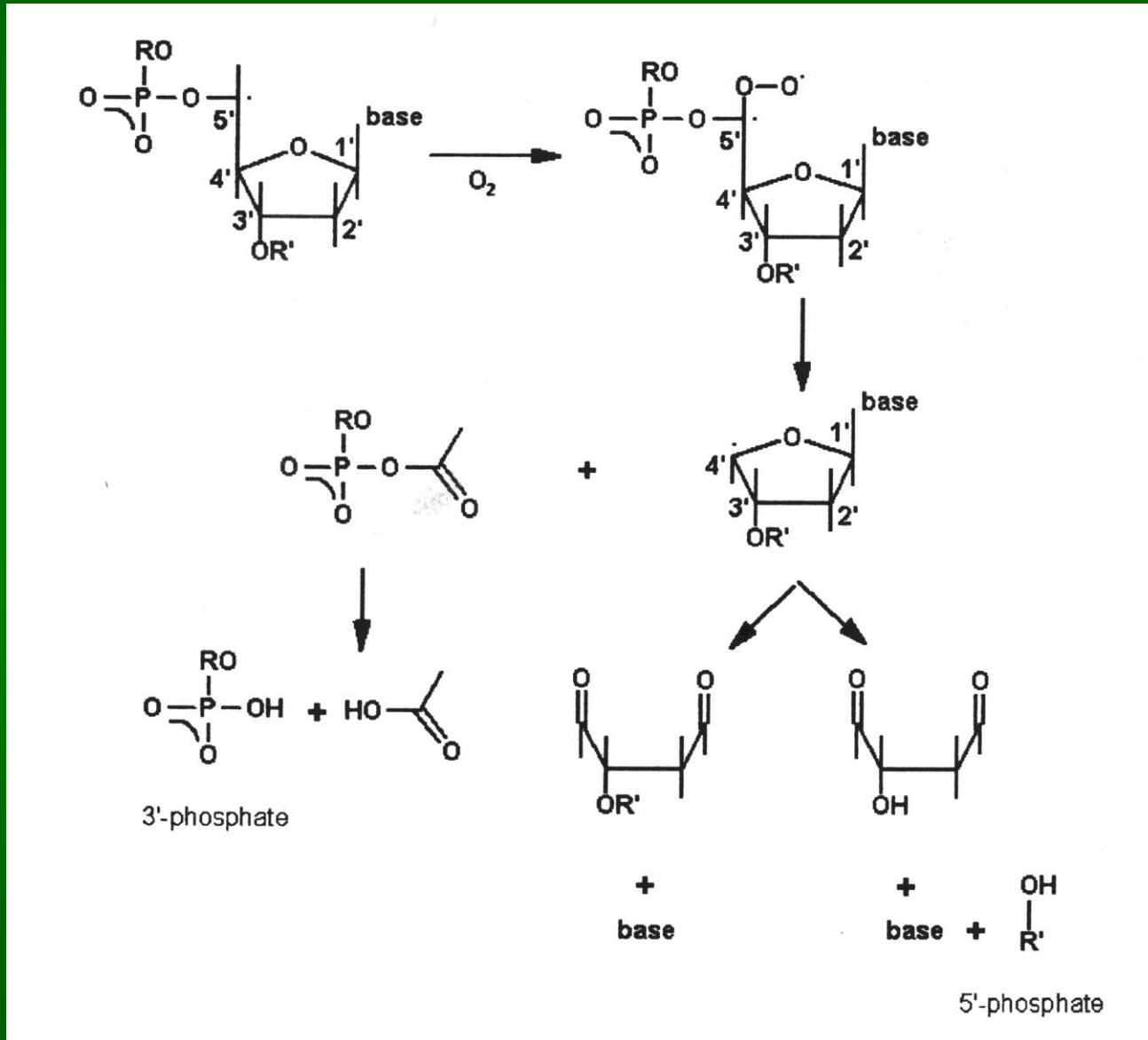


Figure 6.9. Suggested pathway for strand break formation in polyuridylic acid (from VON SONNTAG 1987, with permission)

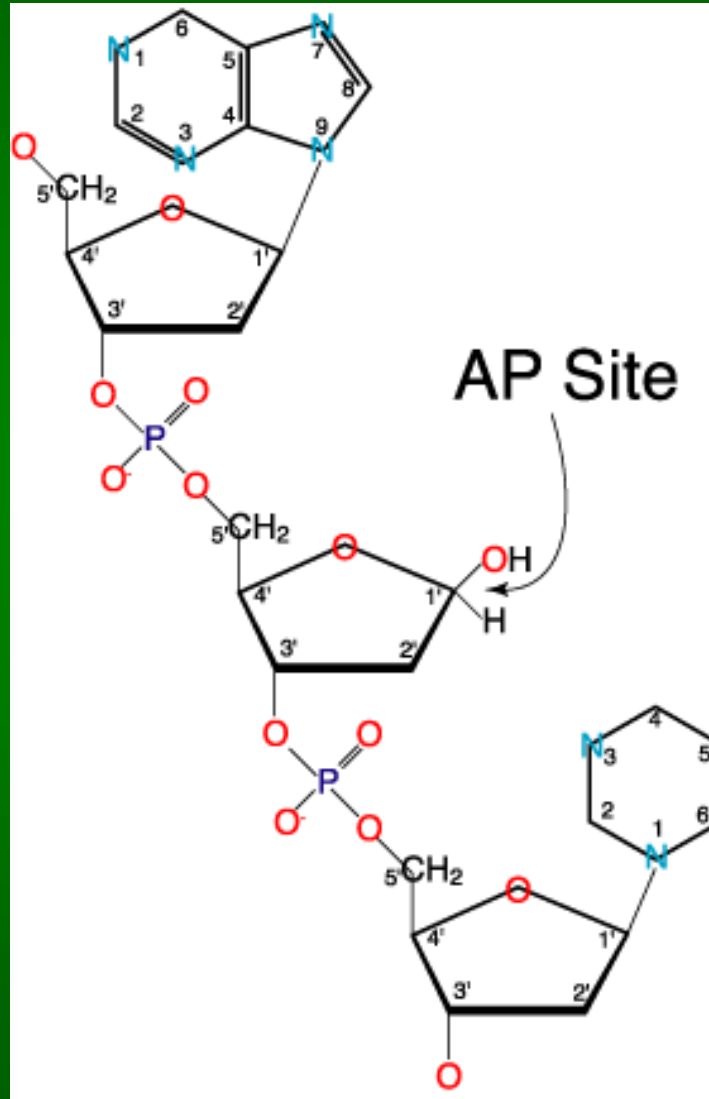
# Poškození DNA zářením

**Jednoduché zlomy** DNA. Vznik zlomů z radikálu na 5-té pozici pentózy.

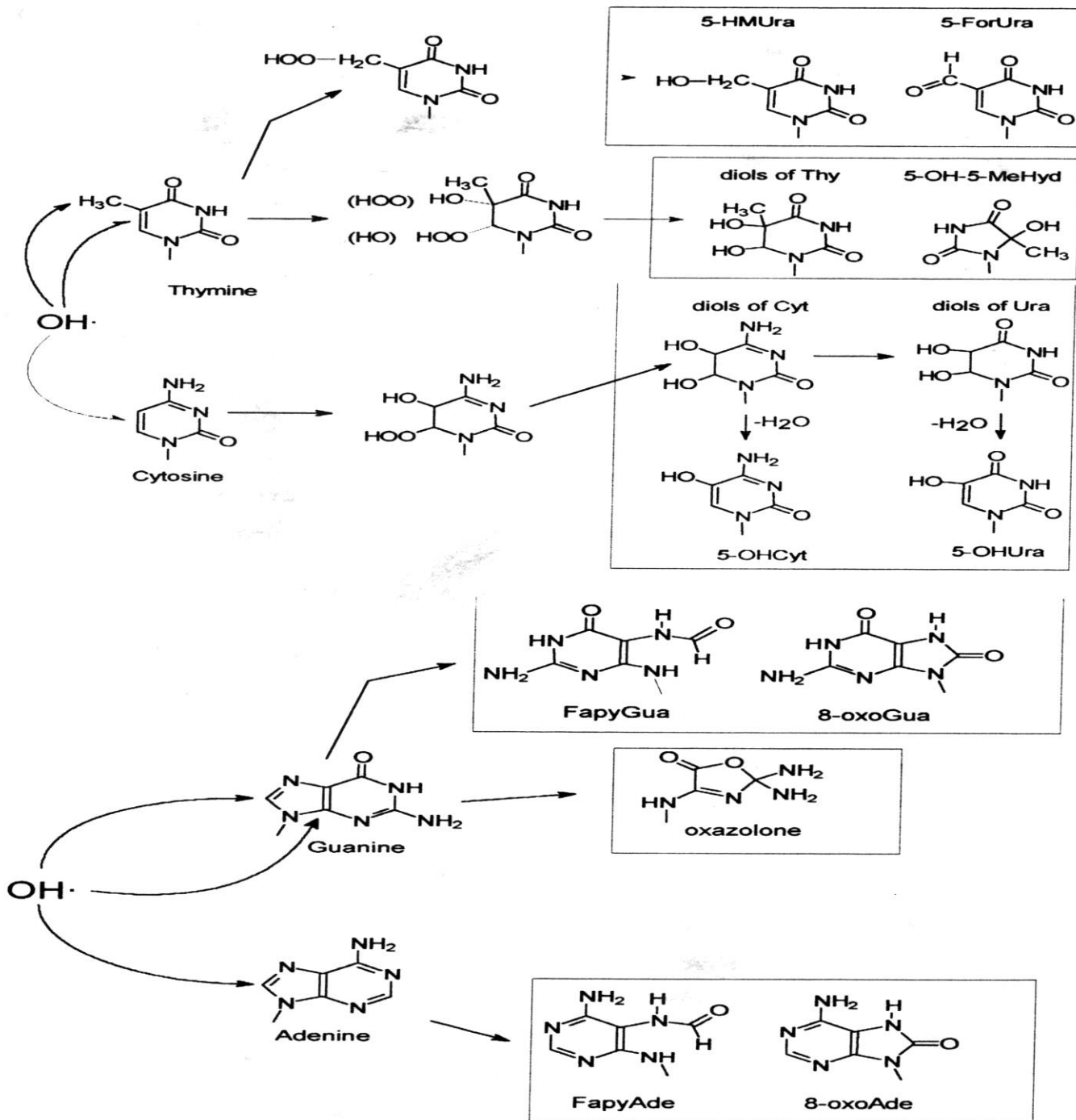


# Typy poškození bází

**Ztráta báze** – z předchozího je vidět, že v řadě případů může dojít ke ztátě bází.

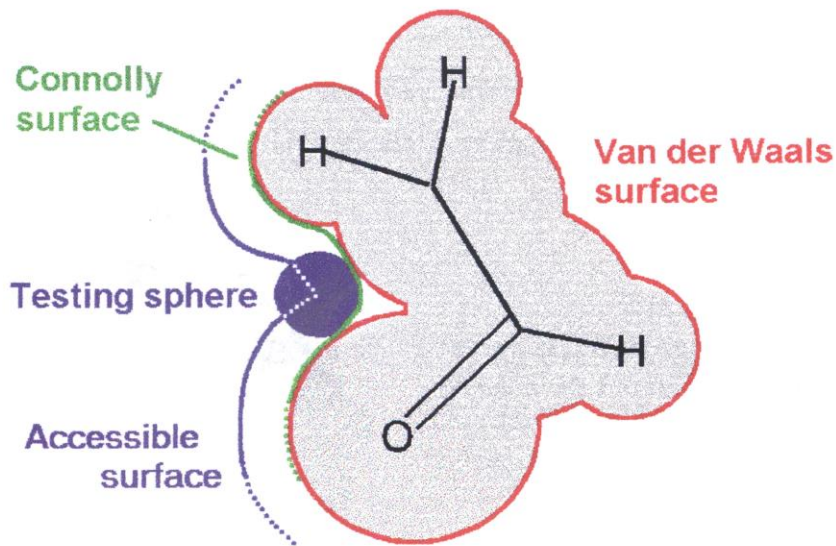






# Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

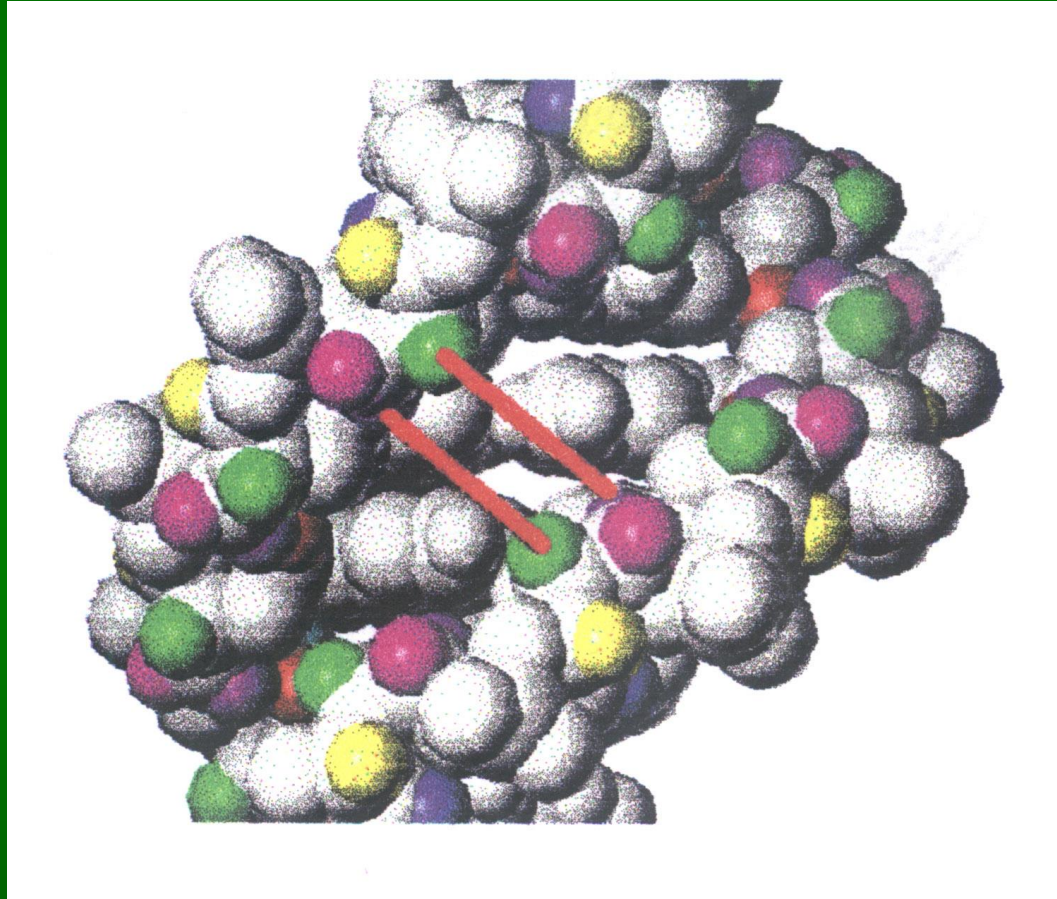
**Modelování DNA** – existují modely struktury DNA, které umožňují stanovit přístupná místa. Je několik přístupů – lze určit tzv. Van der Waalsův povrch a „dostupný povrch“ (nemusí být shodné).



**Figure 2.6:** Different types of molecular surfaces (drawn after <http://scsg9.unige.ch/fln/eng/partie1b.html#a2> ).

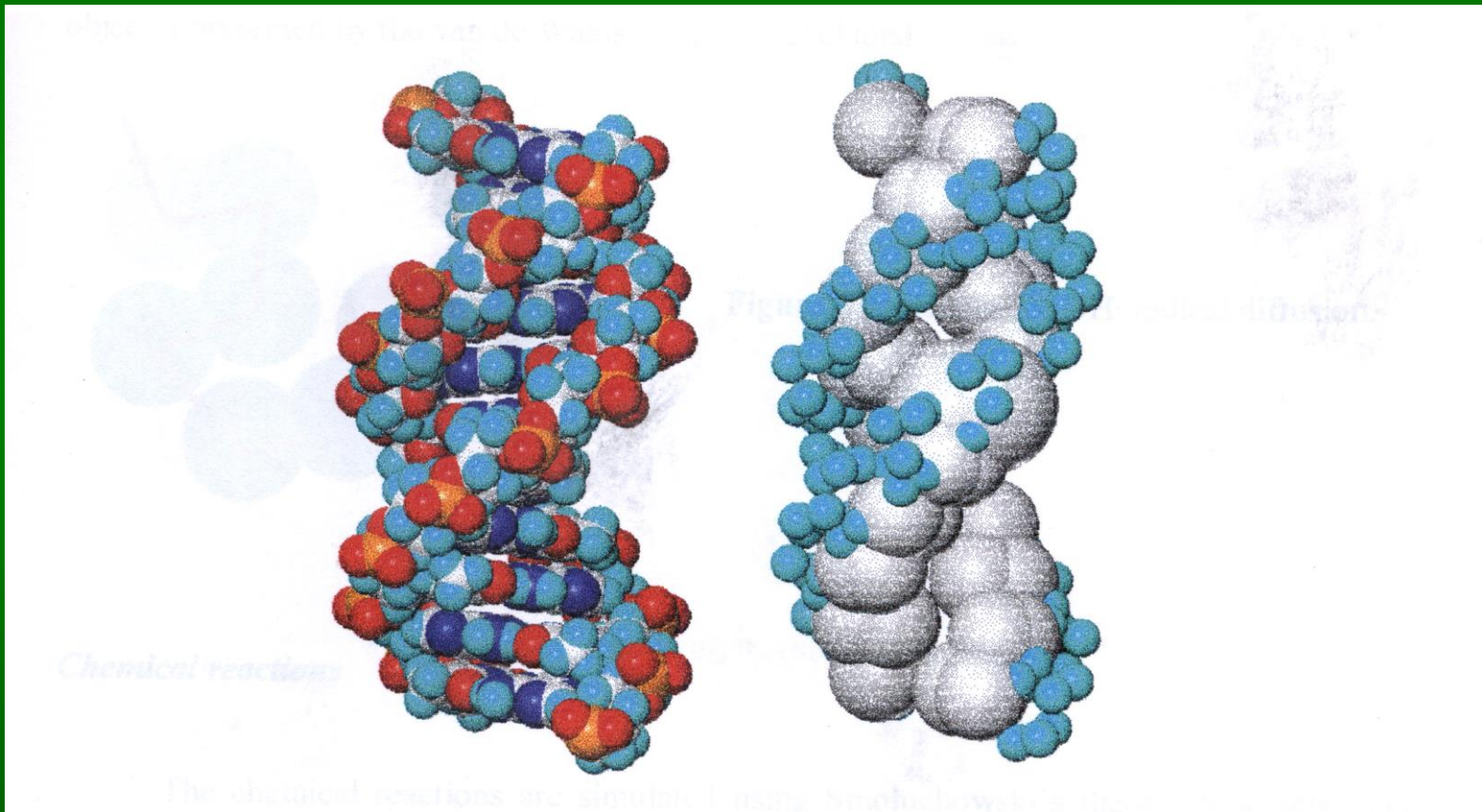
# Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

**Modelování DNA** – na obrázku jsou znázorněny atomy H4', H5'1 a H5'2 jako zelená, žlutá a fialová – je vidět jejich přístupnost v úzkém žlábkou DNA



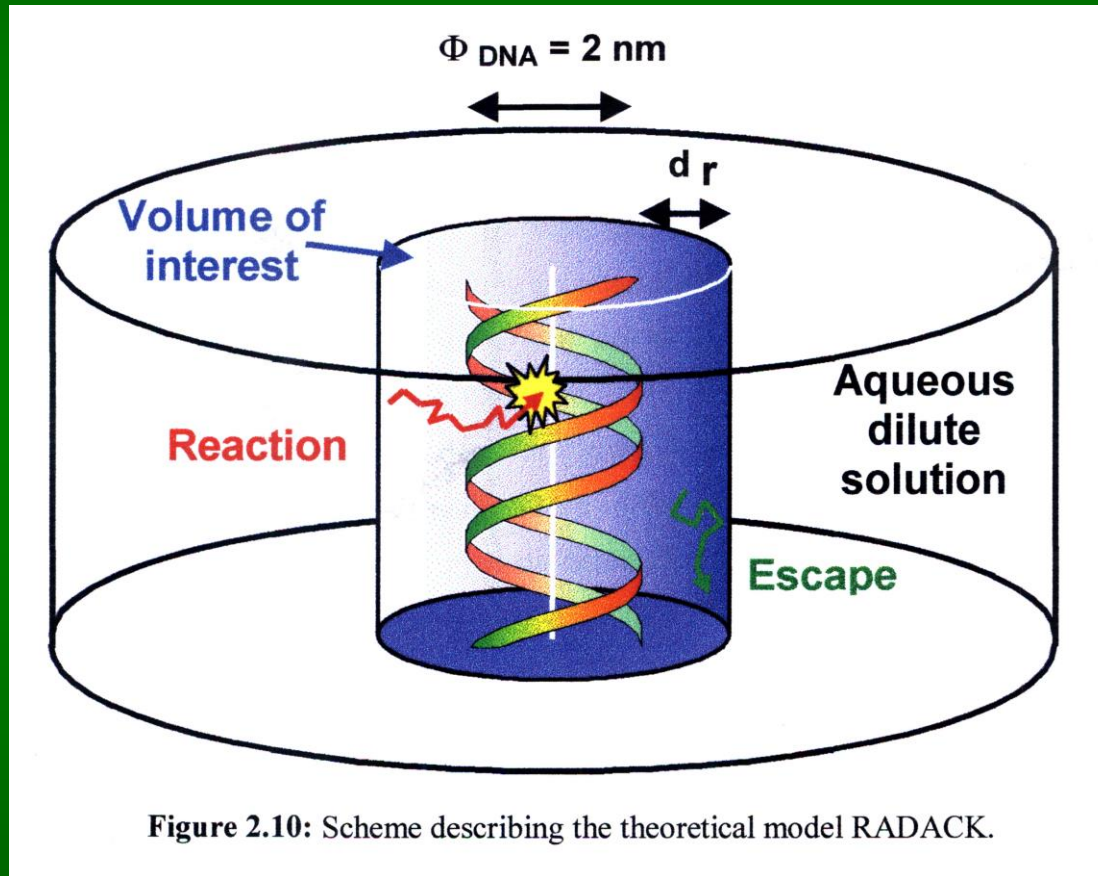
# Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

**Modelování DNA** – na obrázku je van de Waalsův model (vlevo) a model s reakčními sférami (vpravo), v němž jsou poloměry úměrné reakčním rychlostem.



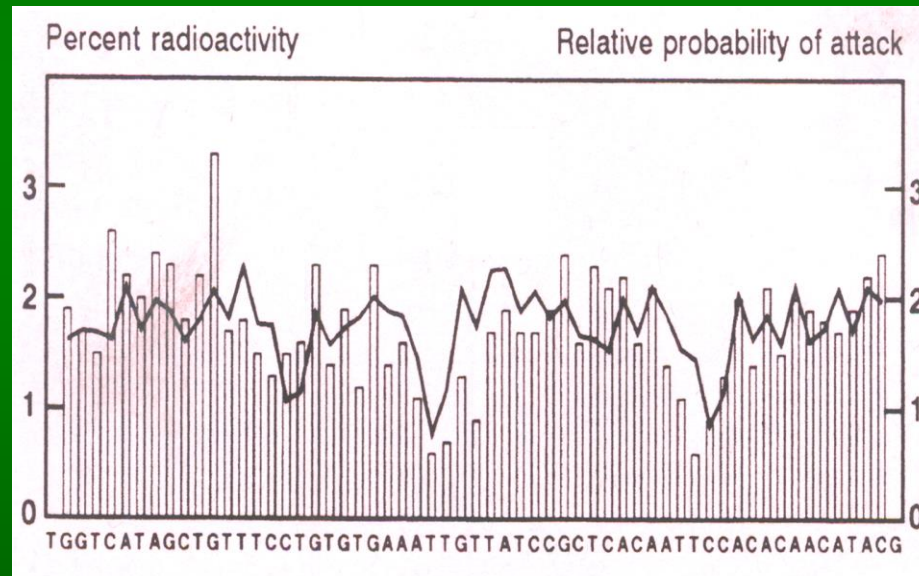
# Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

Modelování působení OH radikálu na DNA – na obrázku DNA a pohybující se radikál, který ji zasáhne.



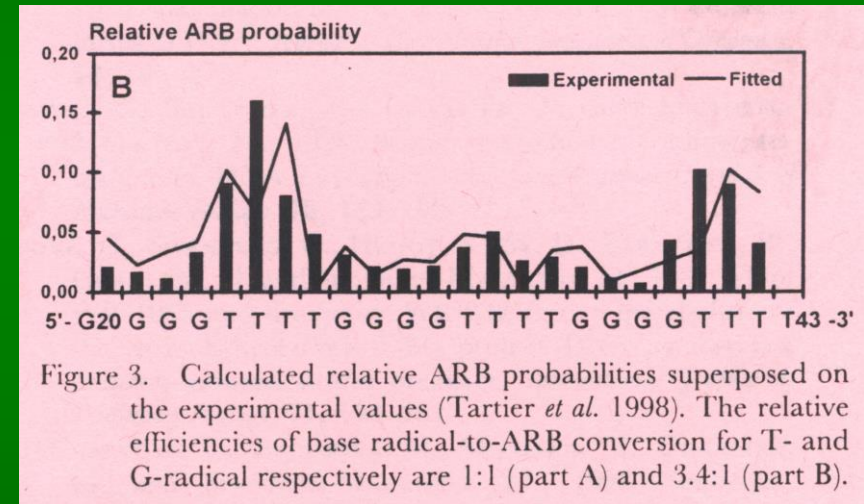
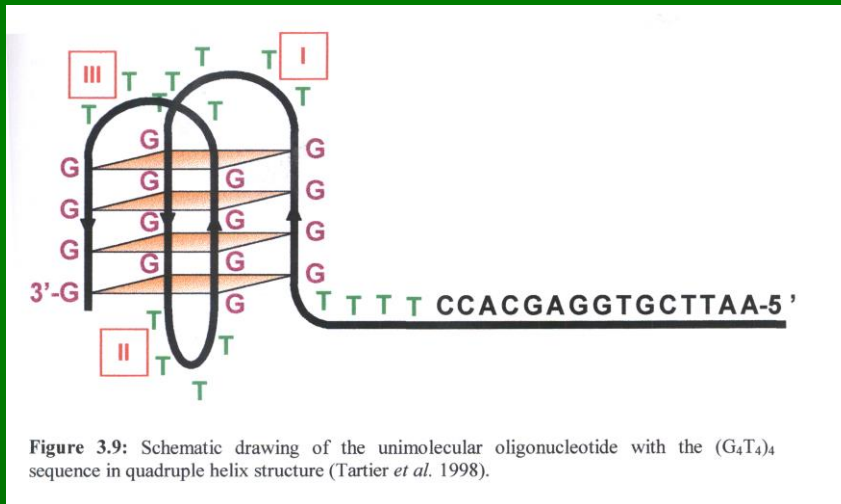
# Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

**Závislost pravd. vzniku zlomu na složení DNA** – byl ozařován fragment DNA a analyzována produkce zlomů v daném místě. Pravděpodobnosti závisí na složení – v blízkosti TTG, TTC jsou minima. Křivka představuje teoretický výpočet.



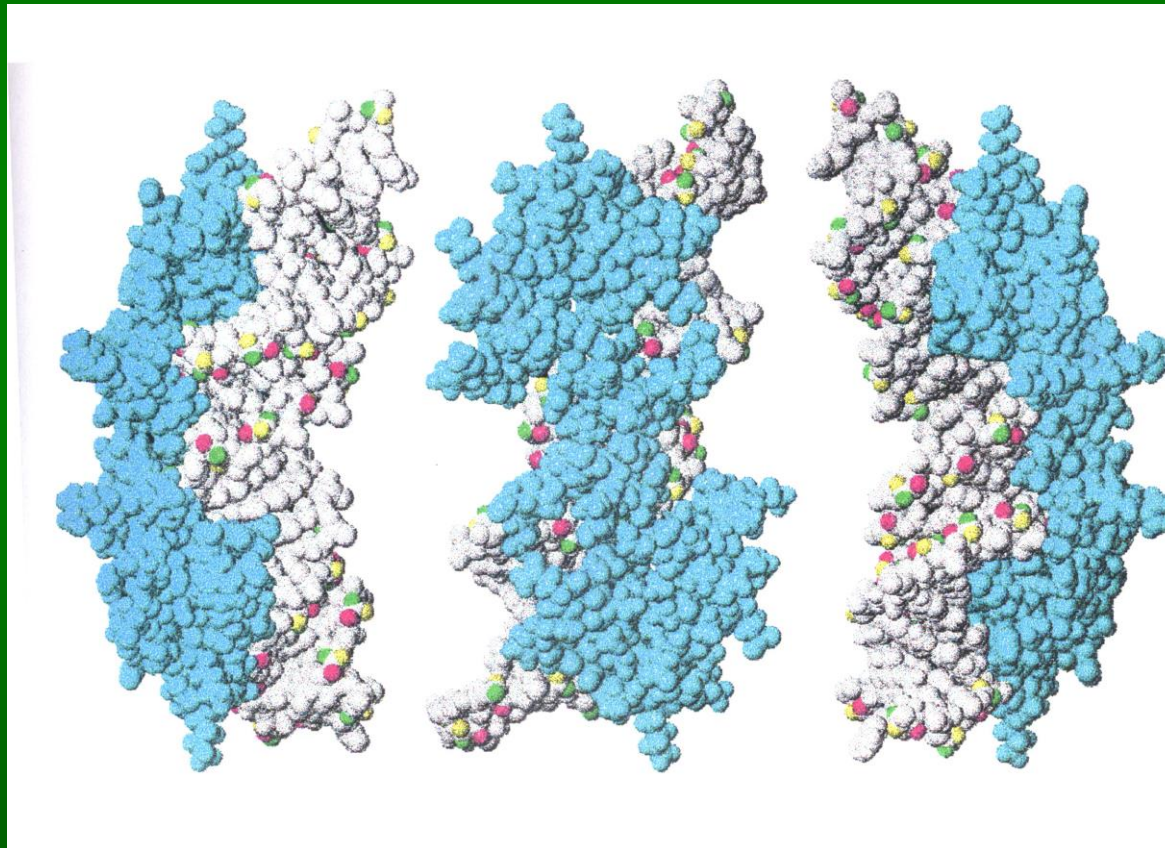
# Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

**Vznik zlomů DNA v tetraplexech** – vlevo je struktura DNA vytvářející tetraplex, vpravo je pravděpodobnost vzniku zlomů podél DNA (experiment a teoretická předpověď).



# Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

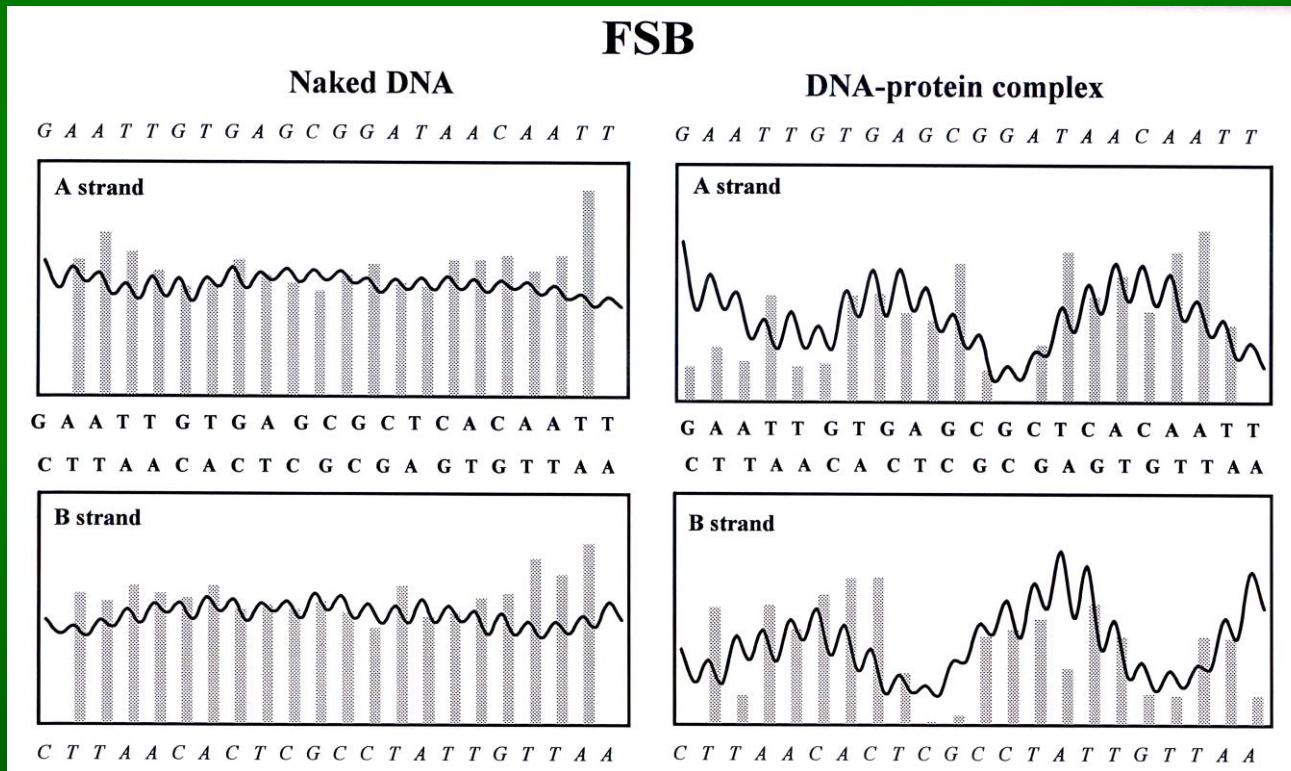
**Vznik zlomů DNA v komplexu s proteinem** – na obrázku je část řetězce DNA v komplexu s lac represorem, jsou zde opět znázorněny atomy vodíku v polohách H4 a H5.





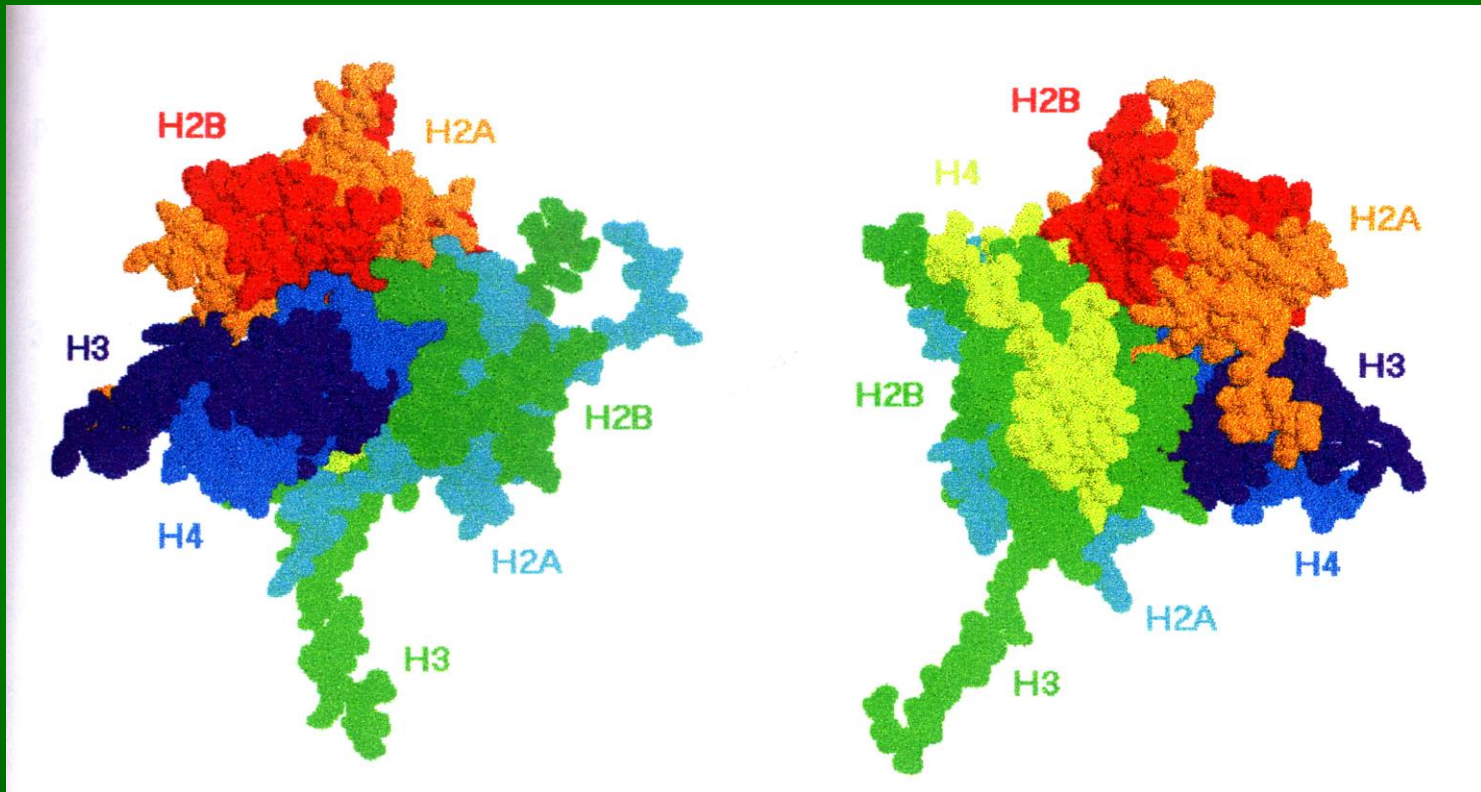
# Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

Vznik zlomů DNA v komplexu s proteinem – vznik zlomů pro volnou DNA a DNA s represorem (vpravo). Je vidět, že s represorem jsou pravděpodobnosti značně odlišné.



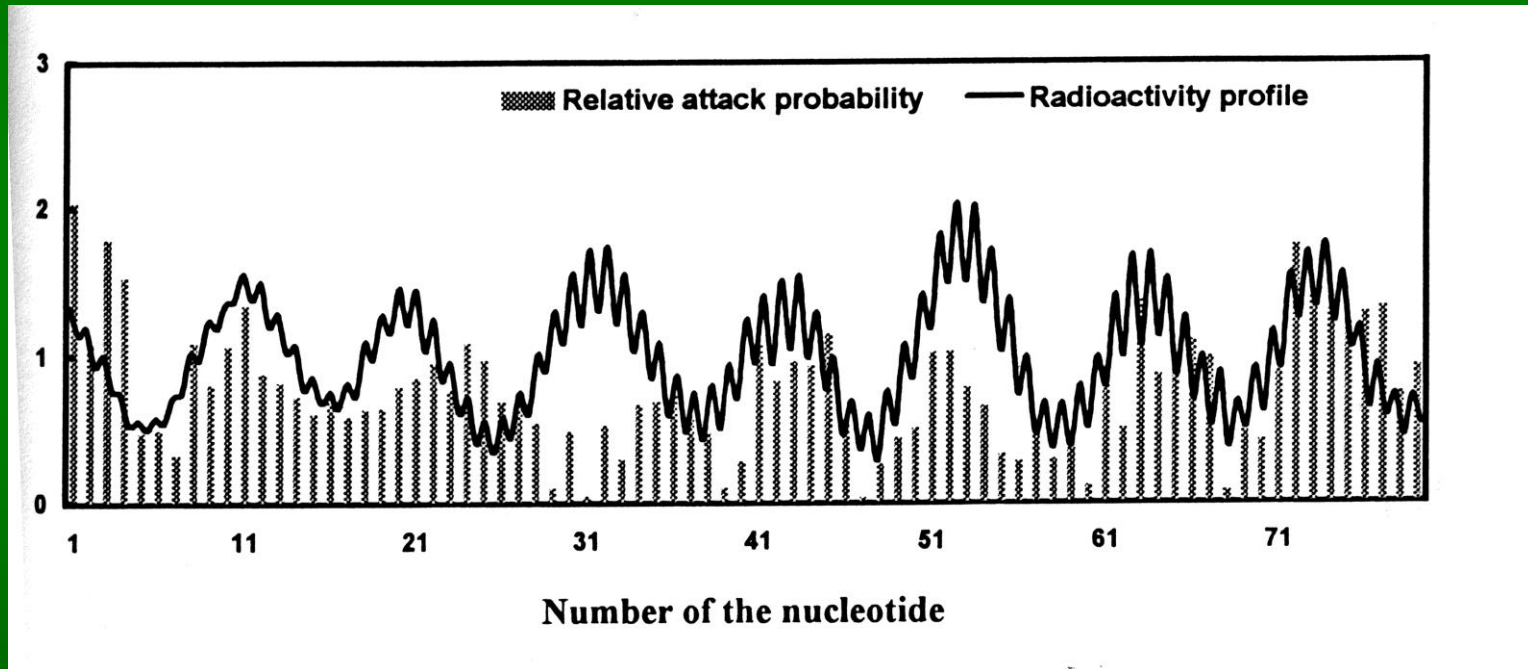
# Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

Vznik zlomů DNA v komplexu s histony (nukleosomy) – na obrázku jsou dva pohledy na oktamer histonů.



# Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

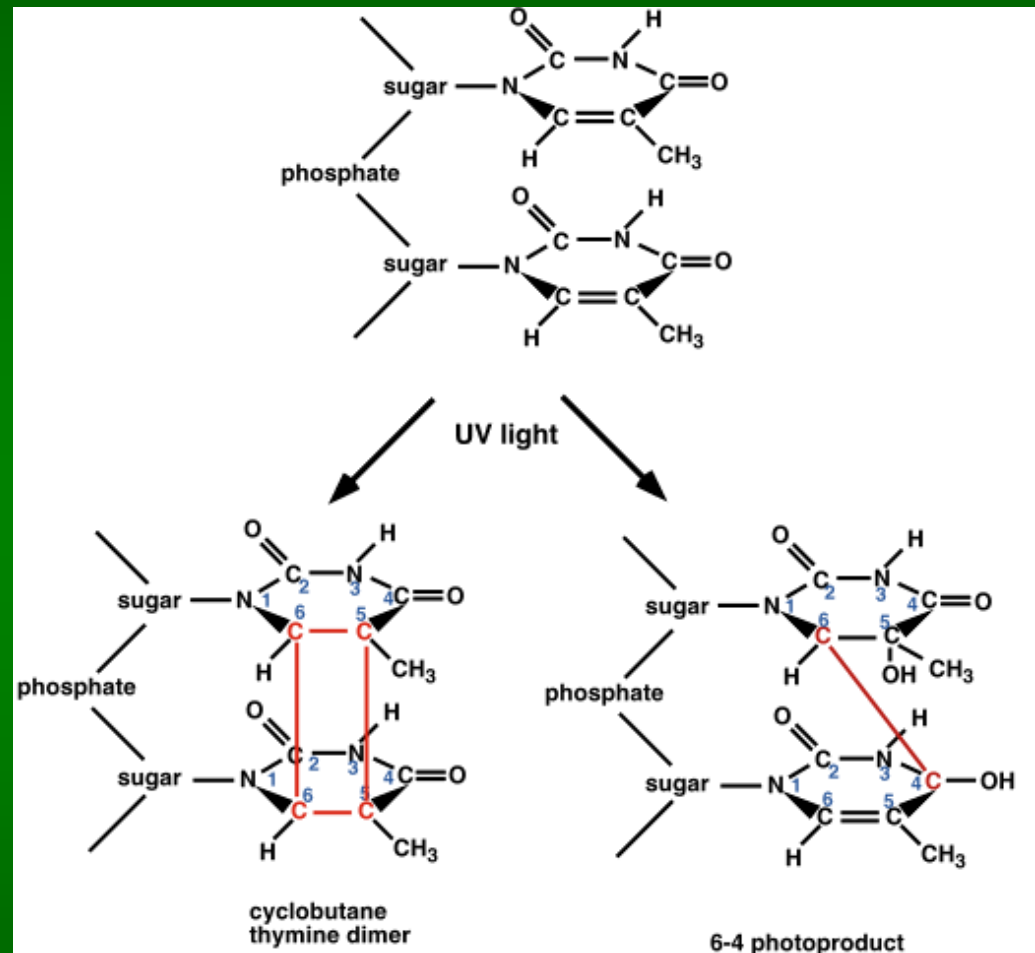
Vznik zlomů DNA v komplexu s histony (nukleosomy) – produkce zlomů závisí na přítomnosti nukleosomů. Teorie a experiment jsou ale poněkud posunuty.



# Poškození DNA působením UV-zářením

Působením UV záření dochází ke vzniku **dimerů a 6-4 fotoproduktů**. Kovalentní vazba vzniká mezi sousedními pyrimidiny, nejčastěji jsou to thyminy.

Oba typy poškození mohou způsobovat **špatné párování při replikaci nebo zastavení replikace**. Proto se vyvinuly systémy reparace těchto poškození. Protože na Zemi žijeme v přítomnosti UV-zářením, vyvinula se řada systémů pro reparaci poškození způsobených tímto zářením.



# Systemy reparace DNA

**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

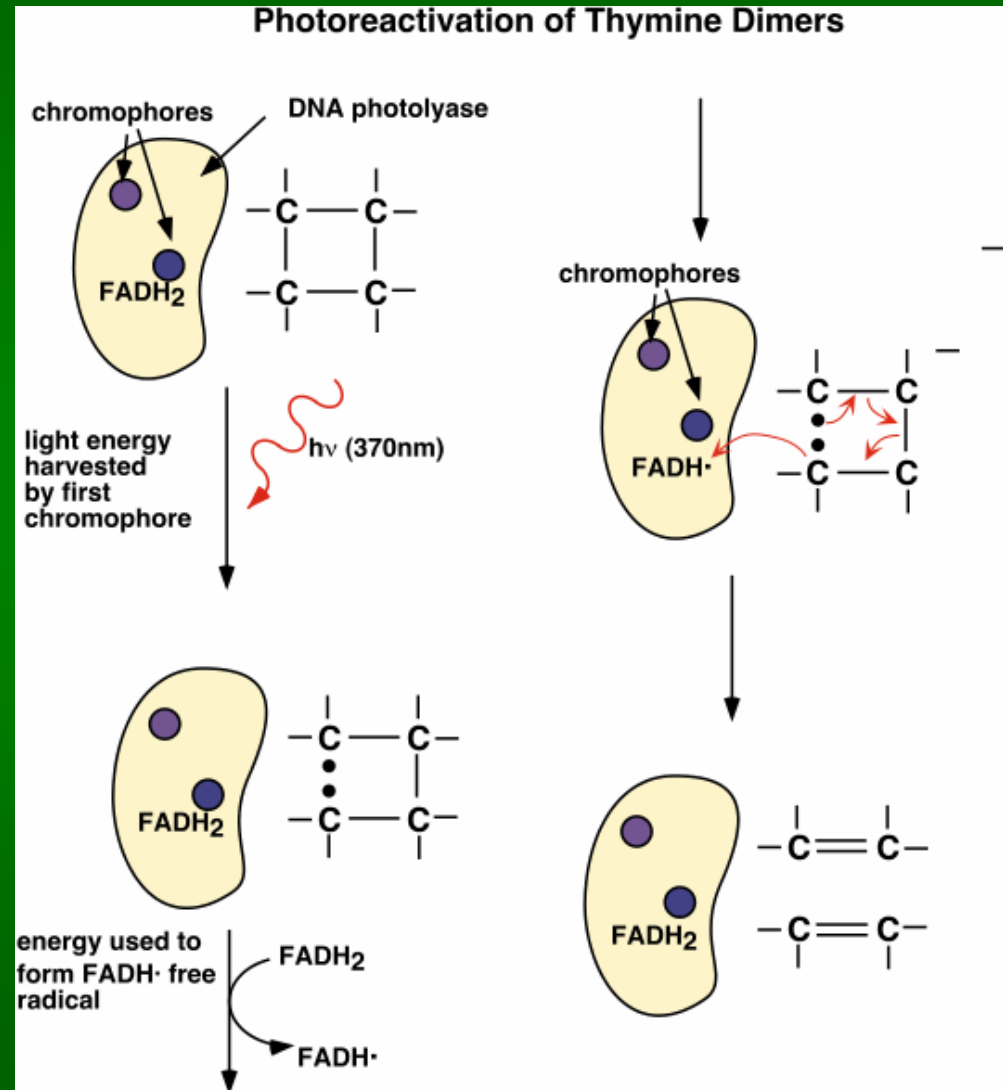
Reparace byla první prozkoumána u E.coli s různými mutanty při působení **UV záření**. Proto probereme první UV-poškození a související reparační procesy.

# 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 FADH<sub>2</sub> 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 nepozná
- PL asociuje s 6-7 páry bazí v okolí dimeru, zapadá do menšího žlábků DNA

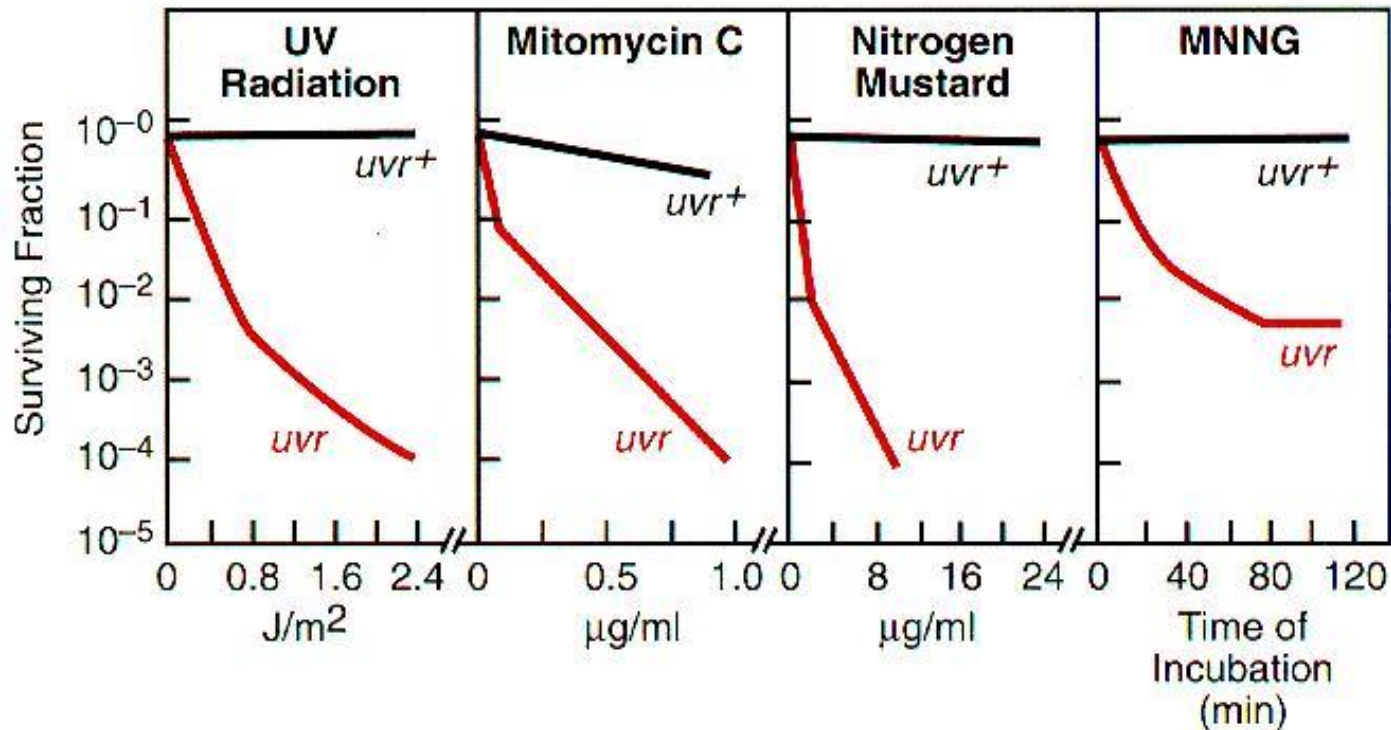
## Mechanismus reparace:

- Aktivuje se enzym přes pohlcení světla oběma chromofory
- FADH<sub>2</sub> (flavin) je excitován a předává elektron dimeru, čímž zruší příčnou vazbu
- Role druhého chromoforu je pravděpodobně zaplnění místa po odevzaném 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 rytů).

# Citlivost bakterií k záření a dalším činidlům

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.

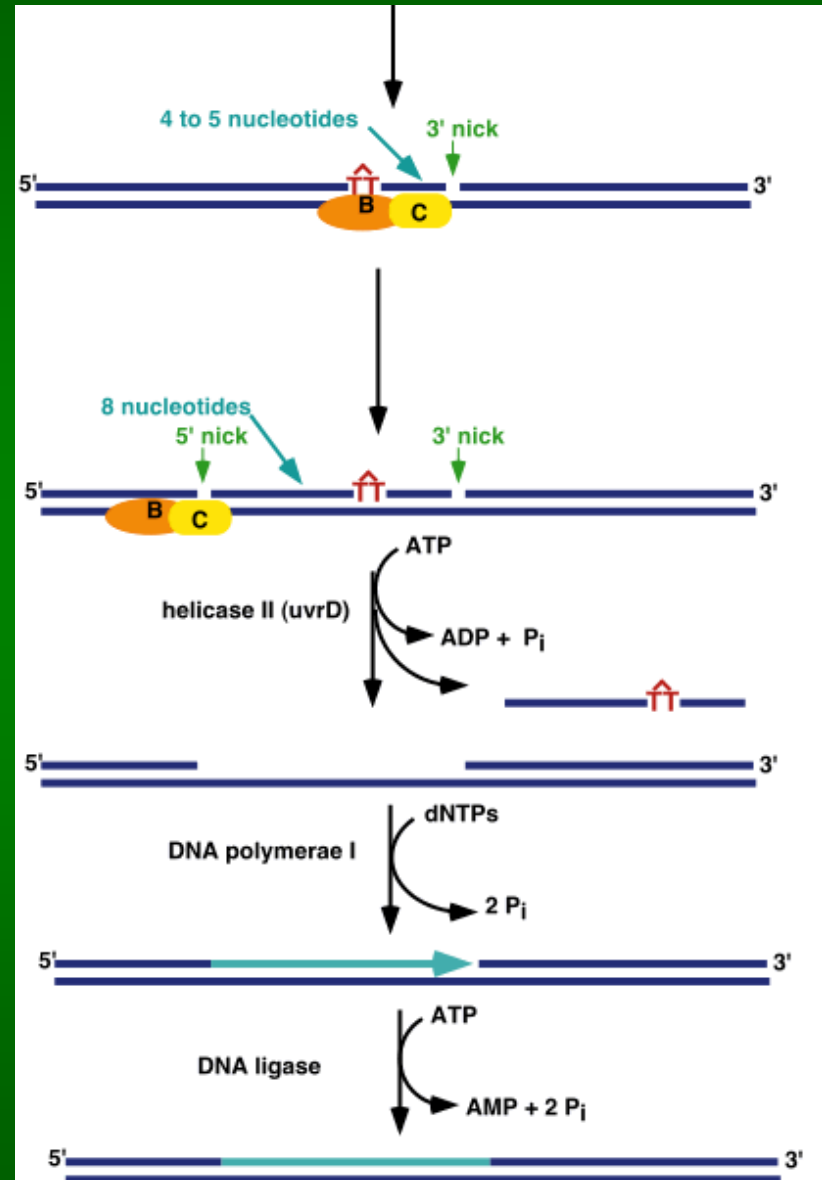
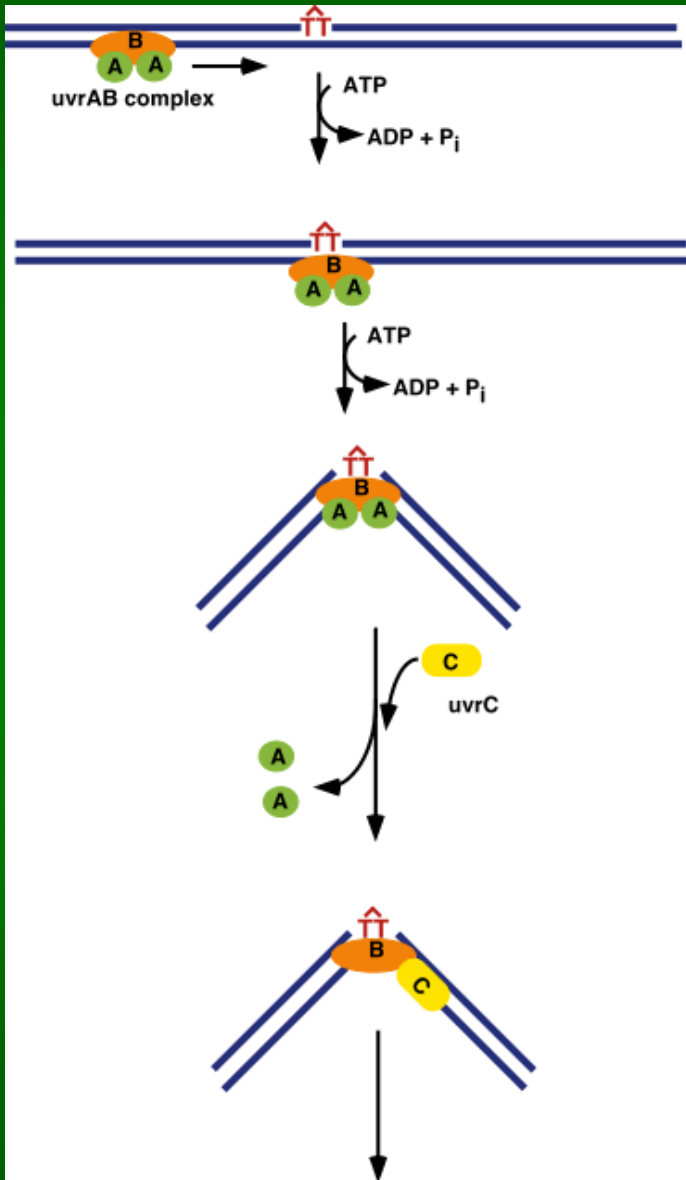
Při jejich nalezení dochází k odpojení uvrA proteinu (ATP závislá reakce) a k připojení uvrC.

Tento komplex (**uvrBuvrC**) **štípne 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

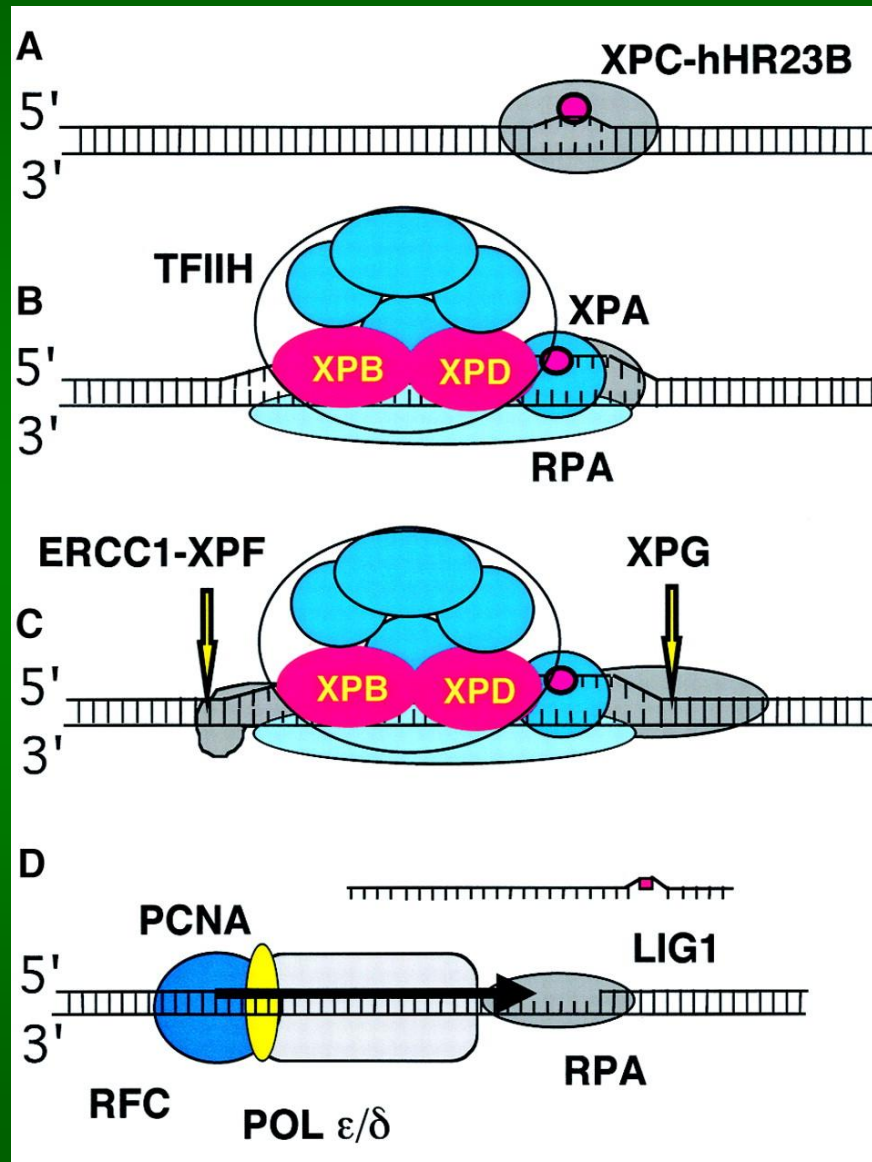
**UvrA protein** – 2810 bp, ATPáza, vazebná aktivita k DNA. Funguje v dimeru. Poznání substrátu souvisí s deformací helikální struktury DNA. Dimer odtáčí helix o 19-20 stupňů a vytváří přehyb o velikosti 27 st., který zasahuje do velkého žlábků do vzdálenosti 0.26 nm.

**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  $\delta$  nebo  $\epsilon$  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:

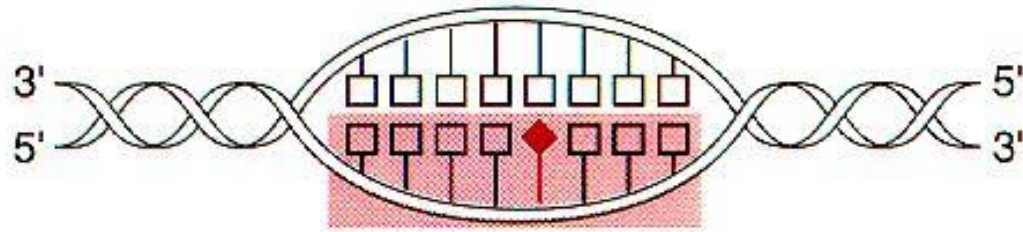
-Malé 20-30 kD, velmi specifické (např. uracil, hypoxantin, 3-metyladenin, hydroxymetyluracil apod), záření vyvolává např. 4,6-diamino-5-FAPY (formamidopyrimidin), který odstraňuje enzym genu fpg (30 KD). Hydroxymethyluracil vzniká rovněž působením záření nebo jiných oxidačních činidel

## AP endonukleázy:

- Štípou fosfodiesterickou vazbu 3' nebo 5' od AP místa (podle toho existují 4 druhy endonukleáz (štípou buď na 3' straně nebo 5' straně od AP a vzniká 3'OH + 5'PO<sub>4</sub>, 3'PO<sub>4</sub> + 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

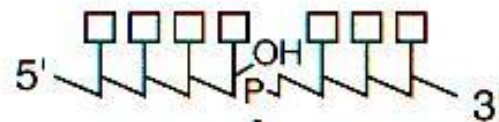


DNA glycosylase ↓ ①

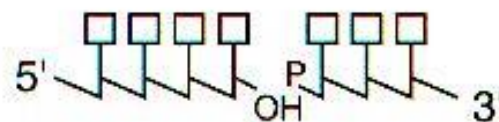


Free base excised

5' AP endonuclease ↓ ②

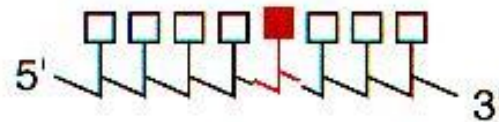


dRpase ↓ ③



+ P-OH

DNA polymerase + DNA ligase ↓ ④

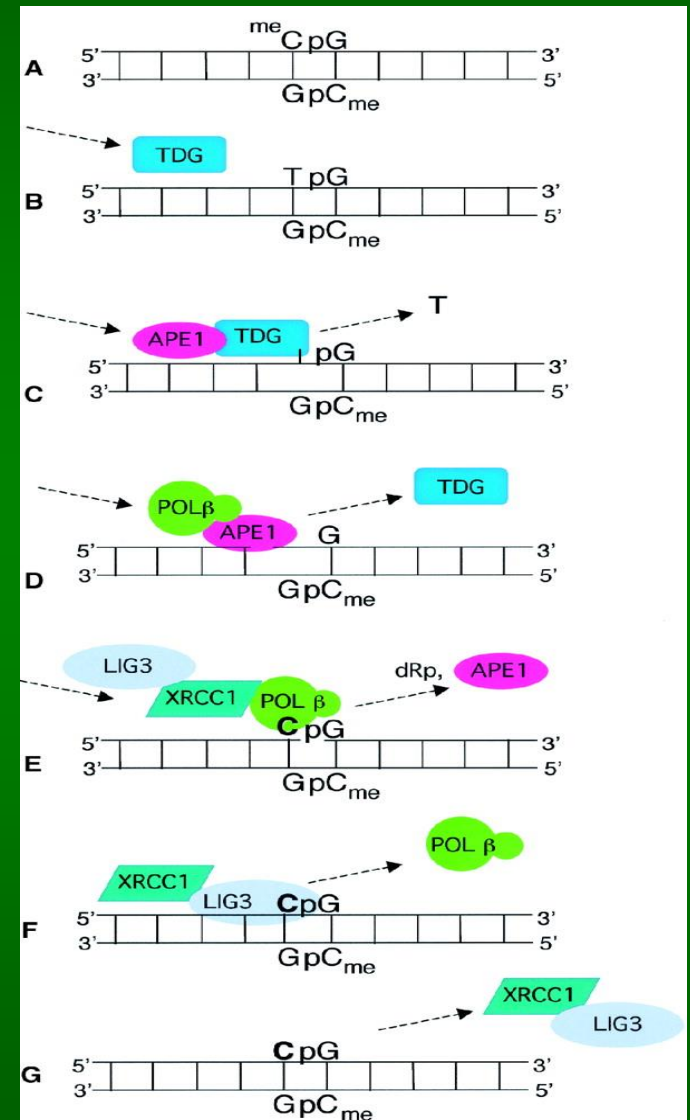


# Excisní reparace poškozených bazí u člověka

U člověka existují 3 odlišné glykosylázy 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).

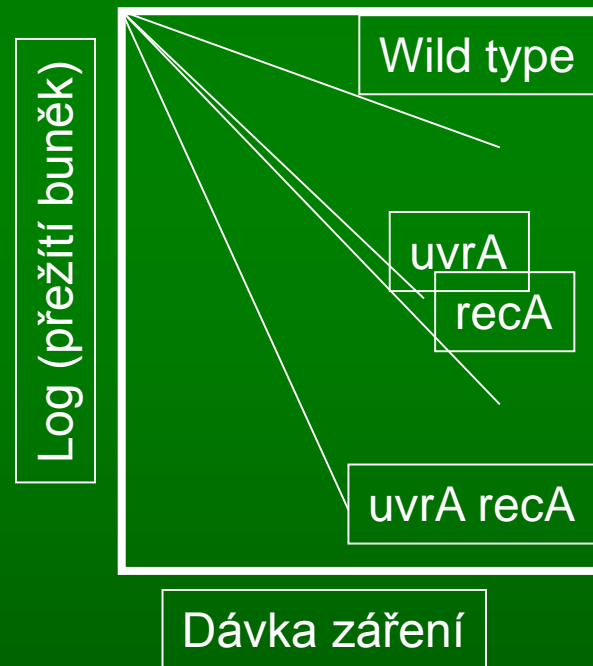
Byla nalezena pouze 1 endonukleáza pro AP místa (APE1). Delece tohoto genu způsobuje embryonální letalitu u myši.

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

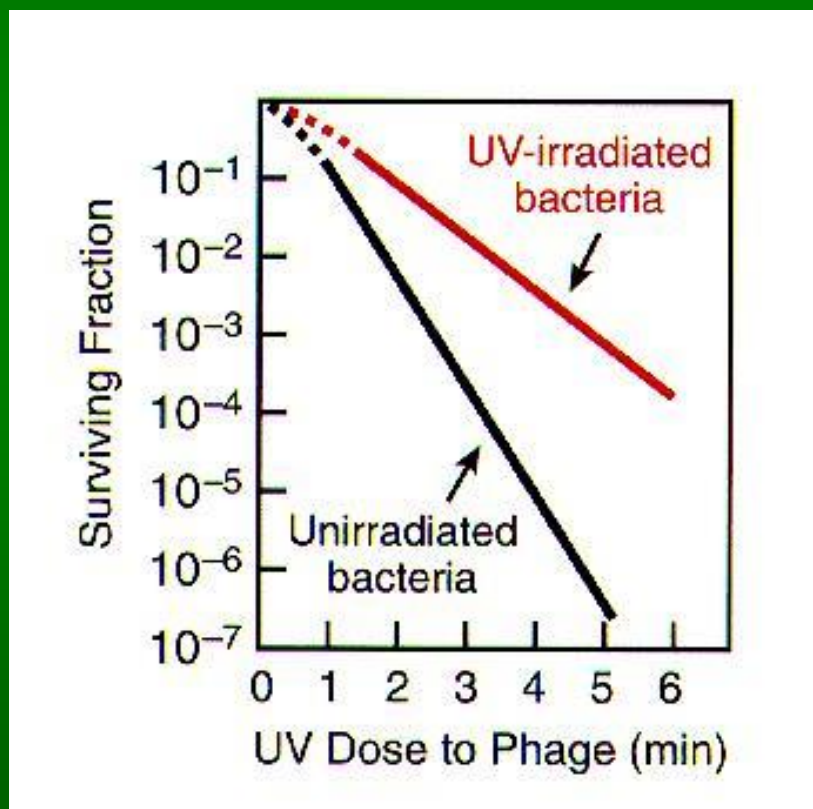
V 60-tých letech byli izolováni mutanti *E. coli* citliví k UV-světlu. Nejzajímavější byli mutanti *uvrA* a *recA*, u nich u obou byla citlivost k UV podstatně větší než u buněk standardního (divokého) kmene. Ukázalo se, že existuje dvojitý mutant *uvrA recA*, jehož citlivost je ještě daleko vyšší, u 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

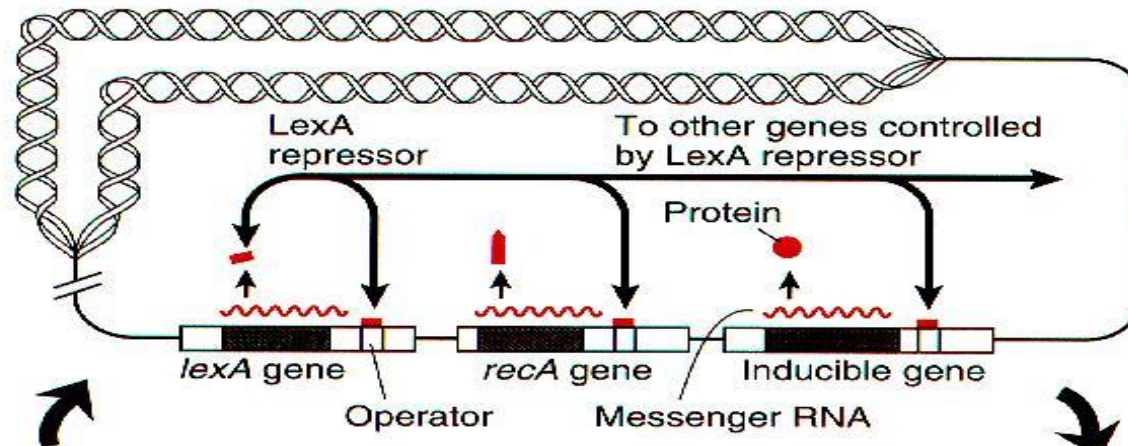
SOS systém u E. coli je **inducibilní enzymatický systém**, který je odpovědný za **reparaci, mutagenezi** a další funkce. Základ regulace spočívá na **lexA a recA proteinech**.

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 reparaace, způsobuje rekombinaci**.

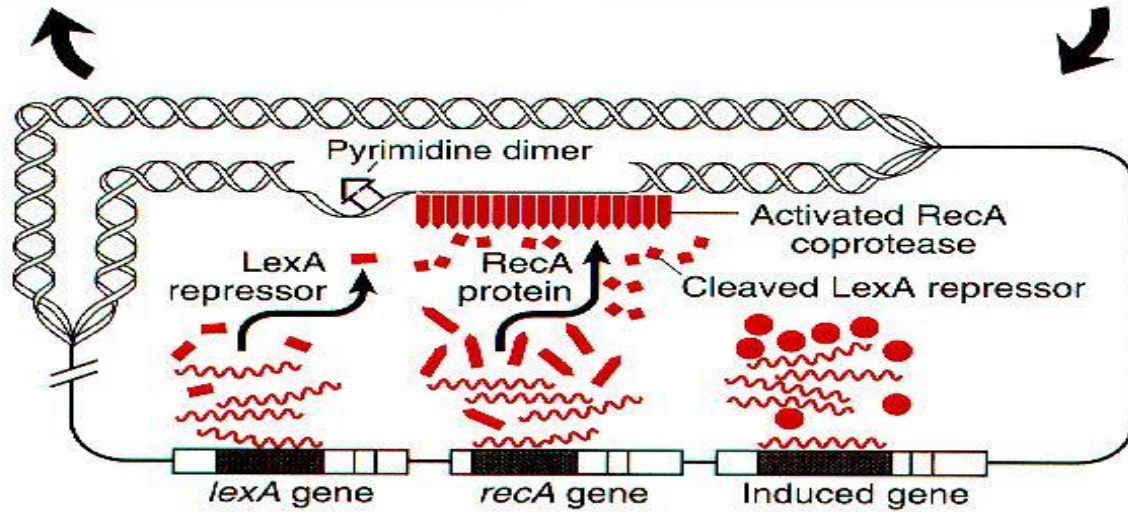
Jakmile je poškození reparováno, klesne úroveň proteázy, lexA protein nasedne na operátorová místa a zablokuje syntézu.

## 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

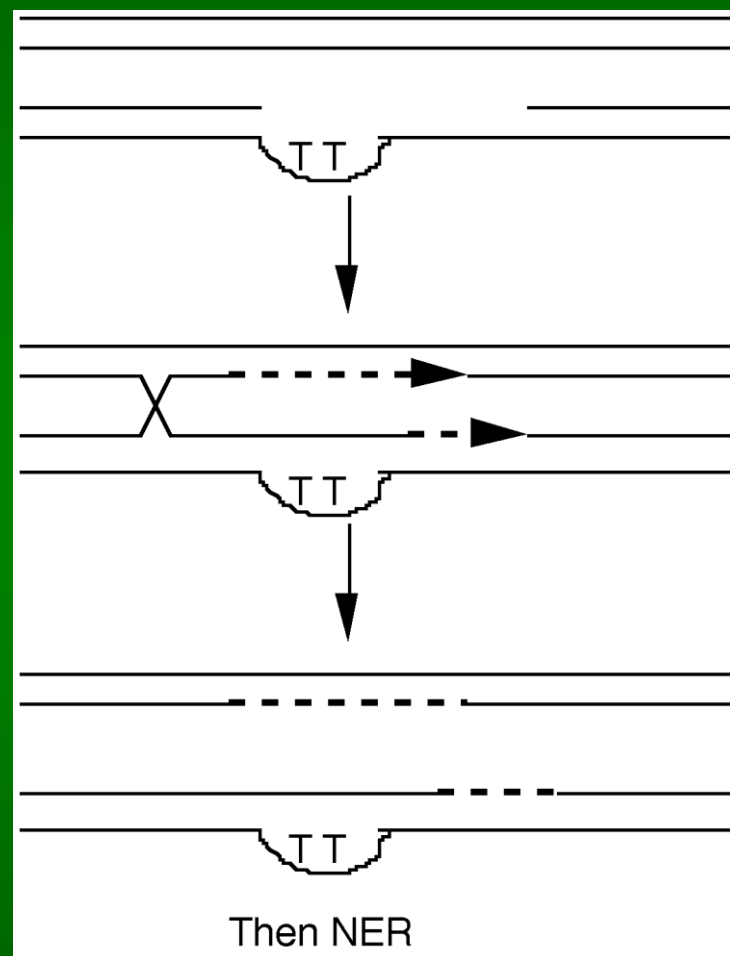


## INDUCED STATE

# SOS (postreplikativní) reparace

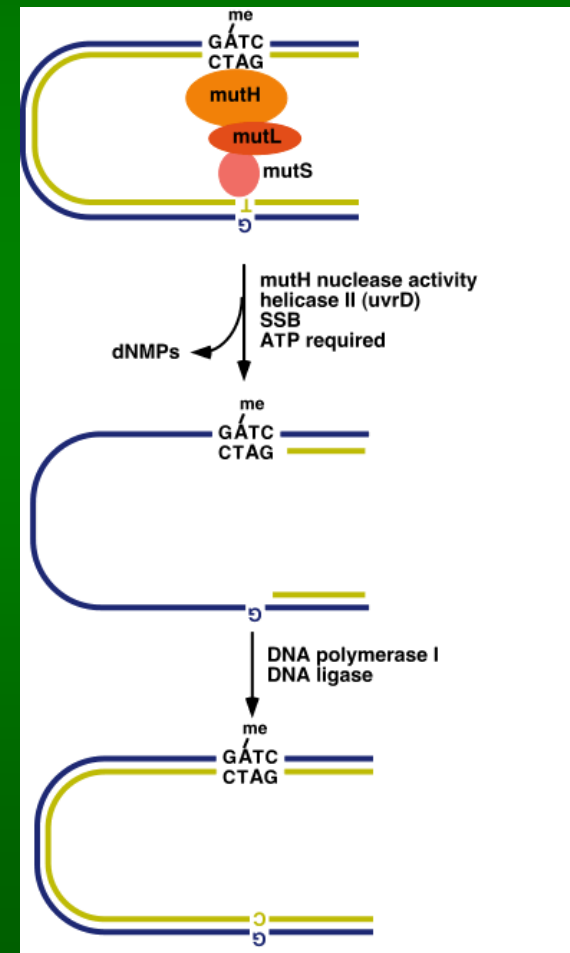
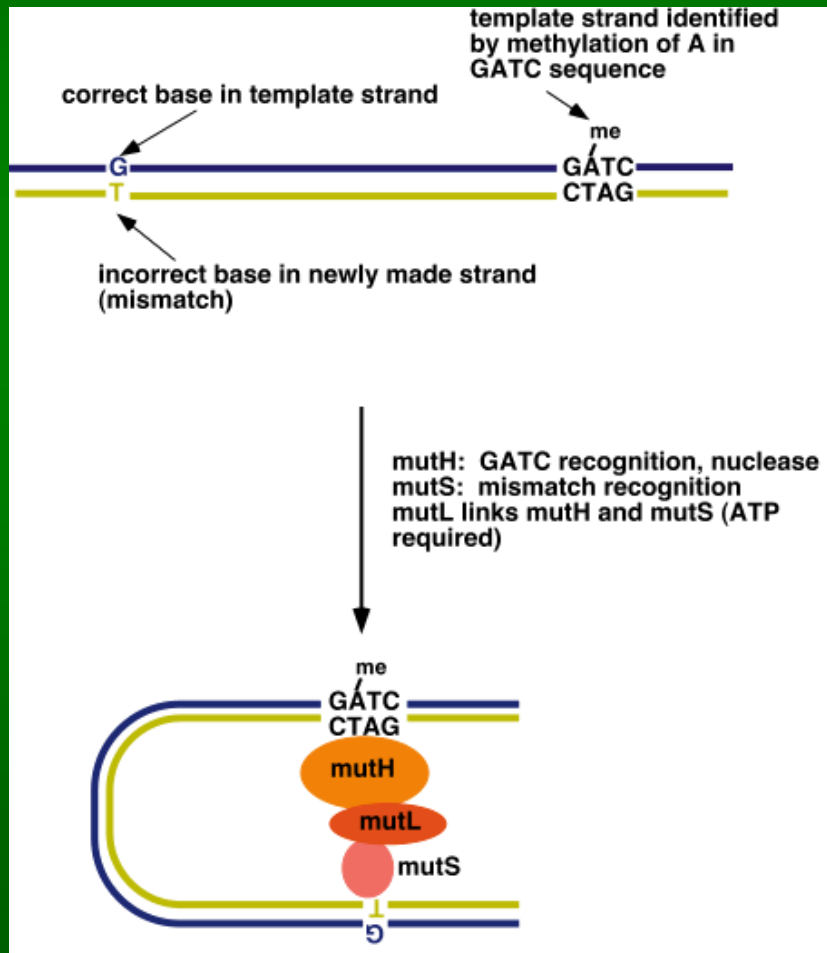
SOS systém umožňuje reparaci DNA **v průběhu replikace** – na poškození se polymeráza zastaví, disociuje od DNA a syntéza je inicializována ve vzdálenosti 1000 bp dál podél řetězce, zanechávající mezeru s poškozenou bazí (nebo dimerem). **RecA protein se váže k ssDNA a má schopnost přenést do této mezery 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 repair

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.

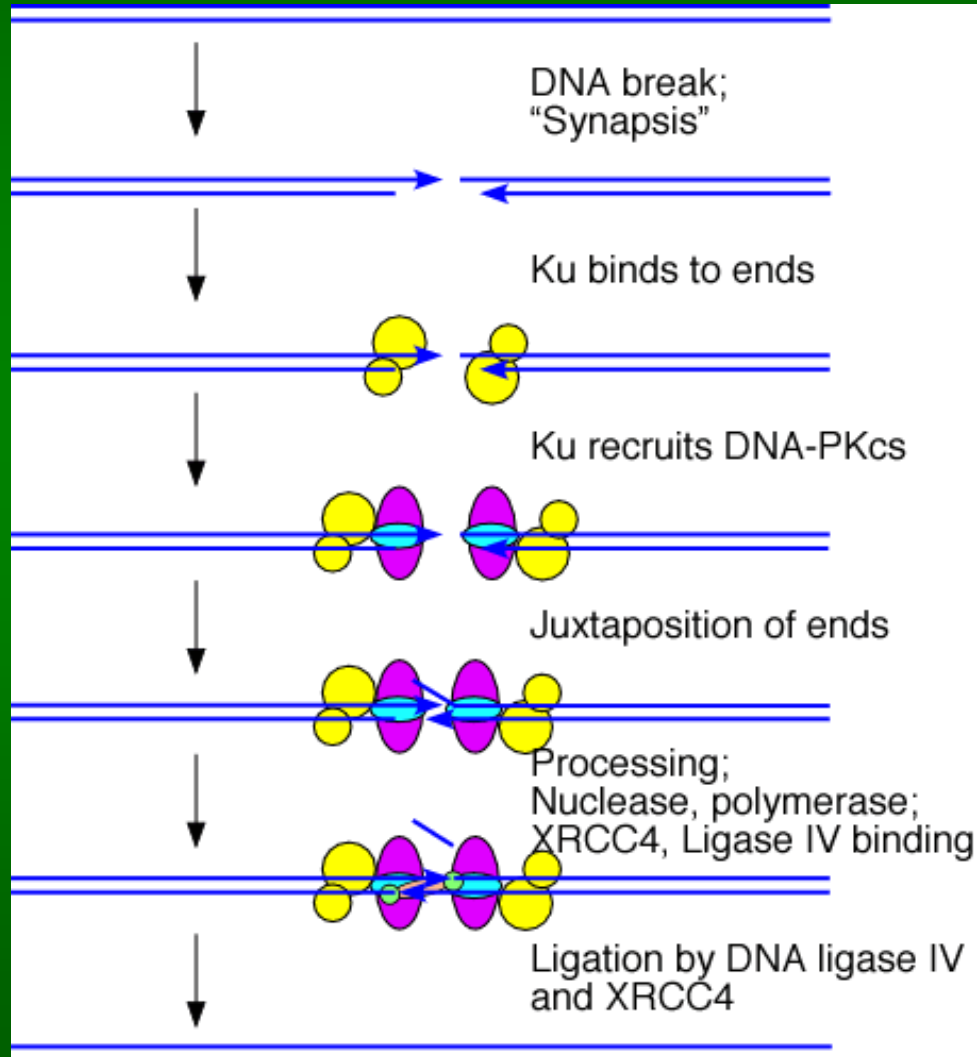
## Mechanismus reparace:

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

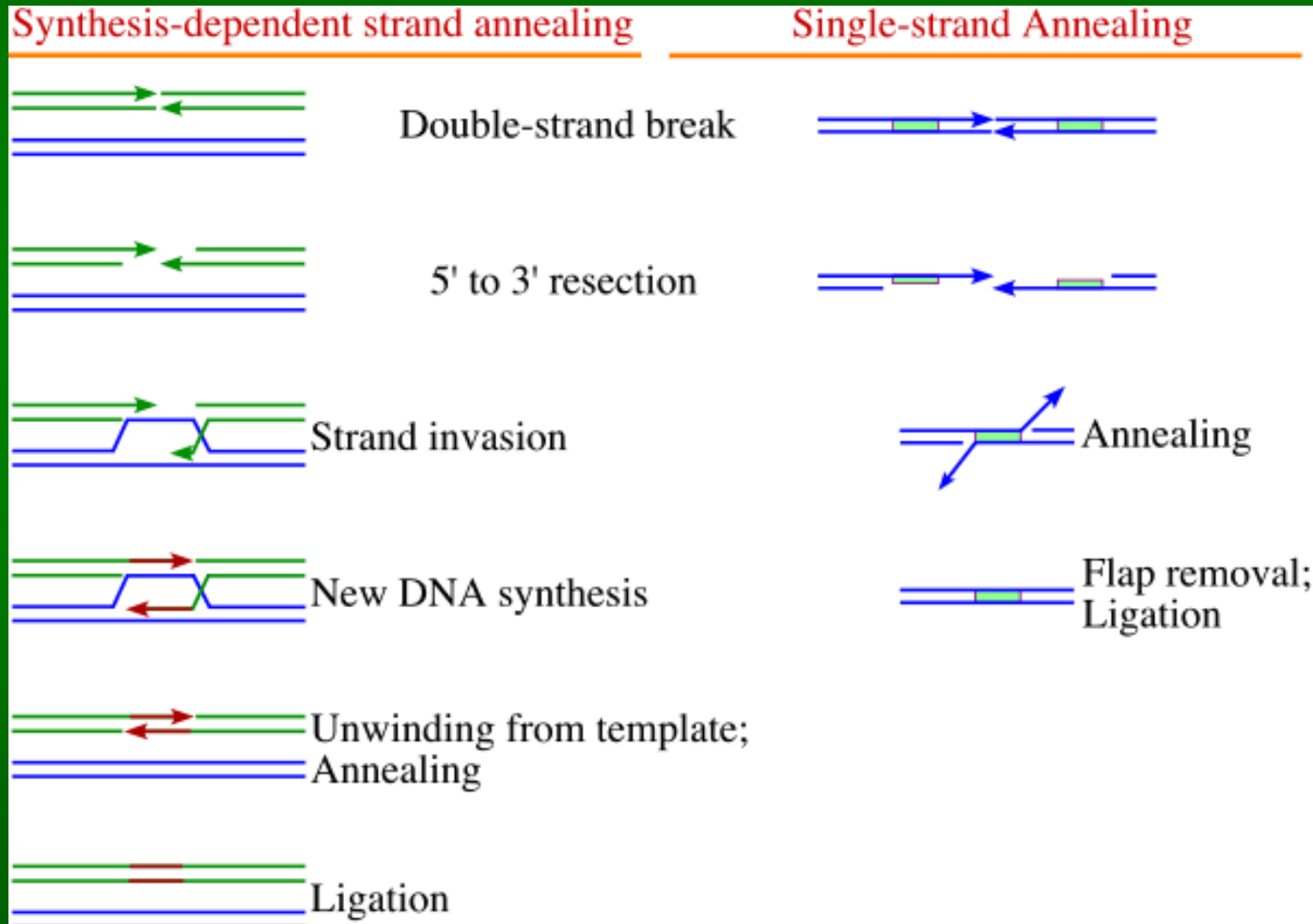
Oba zlomy jsou podrženy pohromadě v tzv. synapsi následujícím způsobem:





# Homologní rekombinace u lidských buněk

Existují dva dobře dokumentované procesy – SDSA a SSA



# Homologní rekombinace

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

