



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Naprawa i rekombinacja DNA

Materiały dydaktyczne współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

DNA jest ciągle poddawane działaniu czynników uszkadzających pochodzących zarówno z wnętrza komórki jak i ze środowiska.

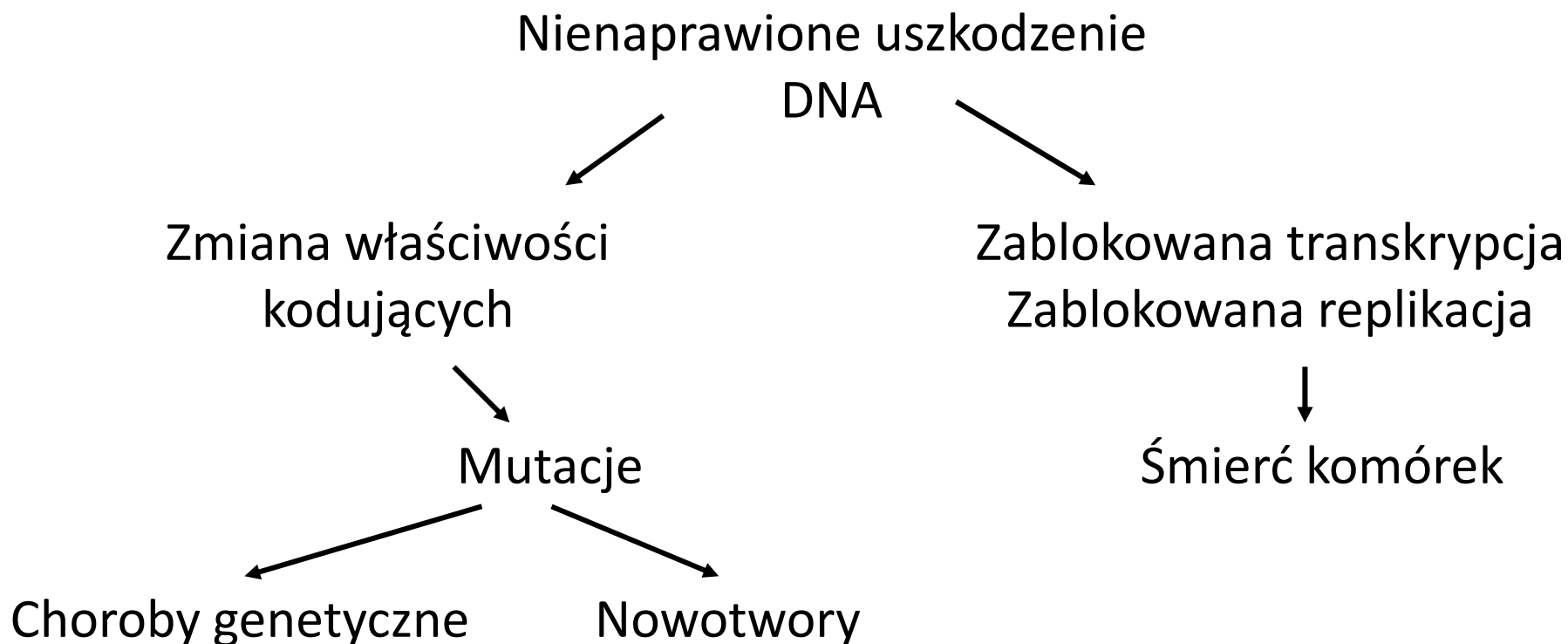
- Kowalencyjne modyfikacje zasad zmieniające parowanie się zasad komplementarnych nici.
 - Tworzenie się par innych niż para Watson'a-Cricka pomiędzy prawidłowymi zasadami DNA.
 - Kowalencyjne modyfikacje uniemożliwiające tworzenie par zasad pomiędzy komplementarnymi nićmi.
 - Przerwanie wiązania N-glikozydowego (hydroliza) i usunięcie zasady z DNA.
 - Pęknięcie pojedynczej nici DNA
 - Pęknięcie dwóch nici DNA
-

Czynniki uszkodzające DNA.

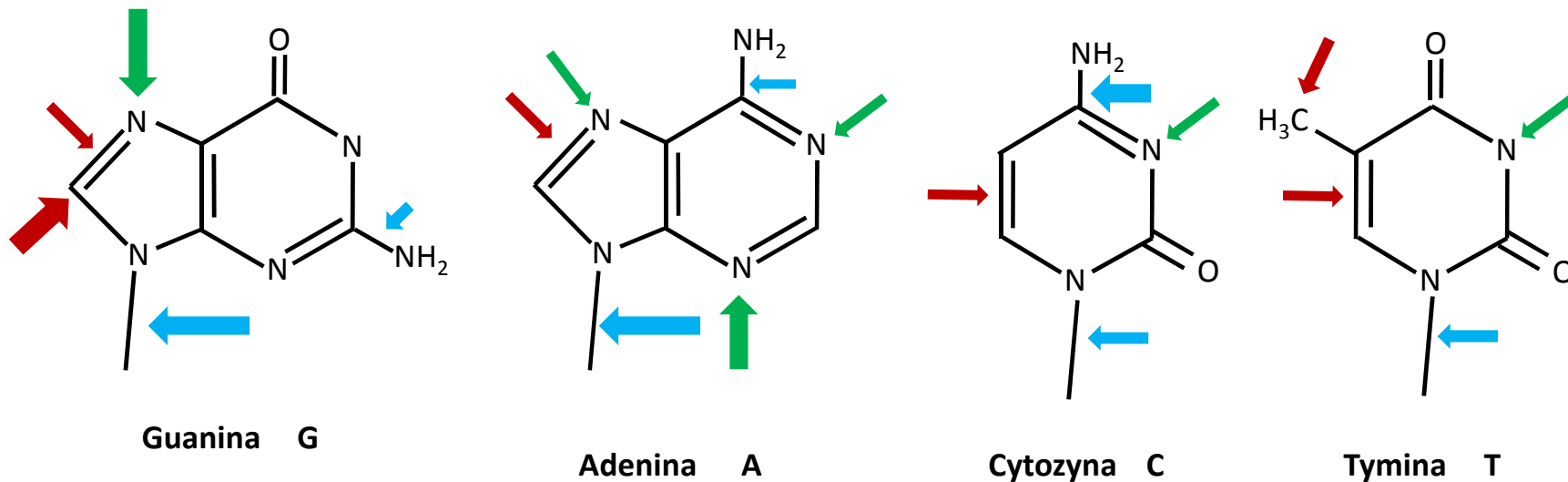
1. Czynniki fizyczne: promieniowanie UV i promieniowanie jonizujące (X, γ).
 2. Czynniki biologiczne – wirusy.
 3. Czynniki chemiczne:
 - Aktywne formy tlenu (ROS – ang. *reactive oxygen species*) powstają samoistnie w komórce w wyniku metabolizmu tlenowego.
 - Poklicykliczne węglowodory aromatyczne (PAH – *polycyclic, aromatic hydrocarbons*).
 - Nitrozoaminy
 - Dioksyne
-

Konsekwencje uszkodzenia DNA

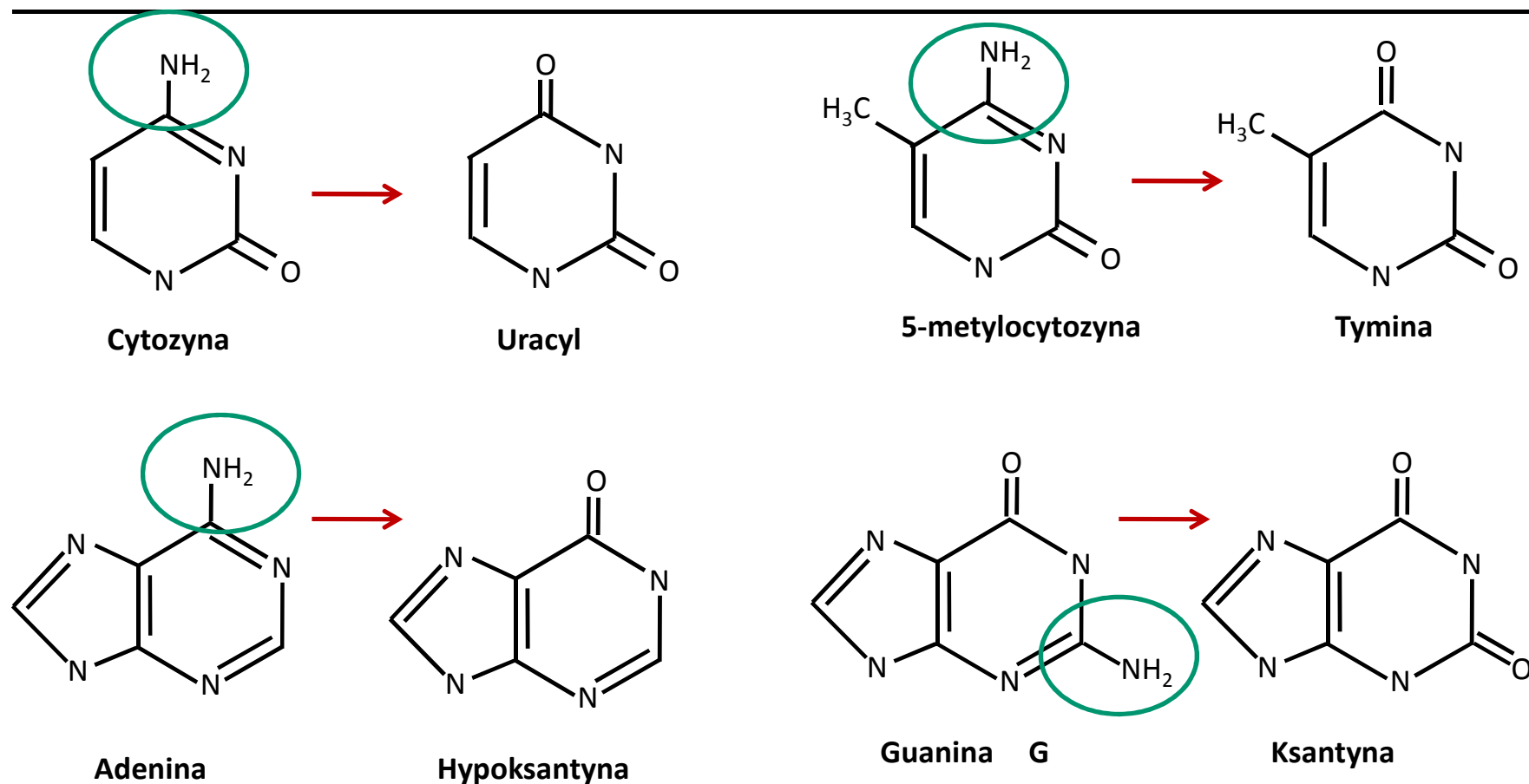
- W komórce występuje $2 \times 3 \times 10^9 \times 2$ nukleotydów DNA.
- W ciele człowieka jest 10^{12} komórek, 1% z nich replikuje DNA i dzieli się każdego dnia.



DNA może ulegać uszkodzeniom nawet wtedy, gdy na komórkę nie działają żadne odbiegające od normy czynniki. Takie uszkodzenia nazywamy spontanicznymi. Mogą one polegać na hydrolizie wiązań (niebieskie strzałki), ataku czynników utleniających (czerwone strzałki) lub metylacji przez endogenne czynniki metylujące (zielone strzałki).

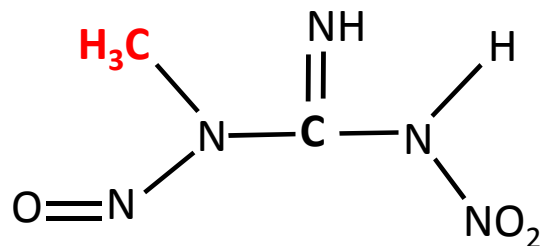


Oksydacyjna deaminacja zasad DNA może również zachodzić spontanicznie. W jej wyniku powstają zasady normalnie nie występujące w DNA mogące powodować mutacje.

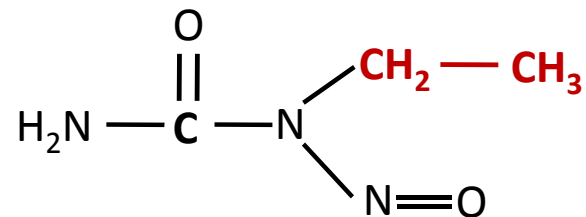


Na podstawie: *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007)

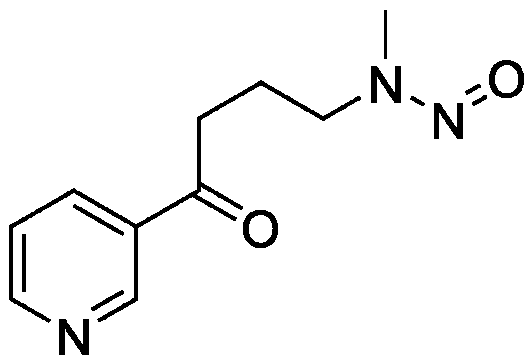
Czynniki alkilujące wywołujące alkilację DNA



N-metylo-N'-nitro-N-nitrosoguanidyna
(MNNG)

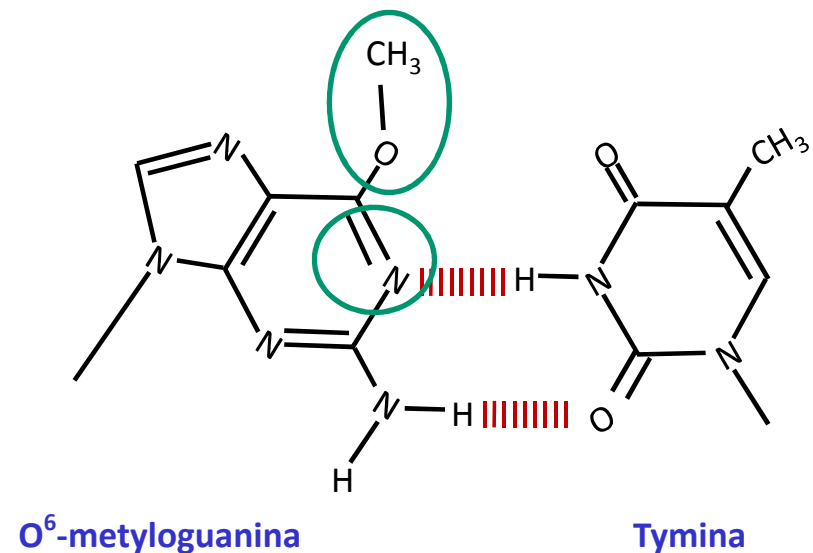
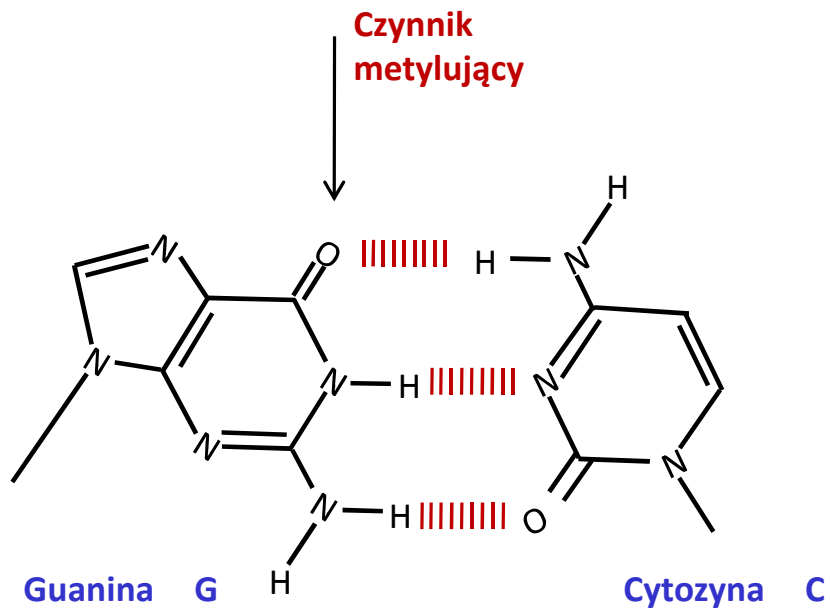


Etylnitrozomocznik

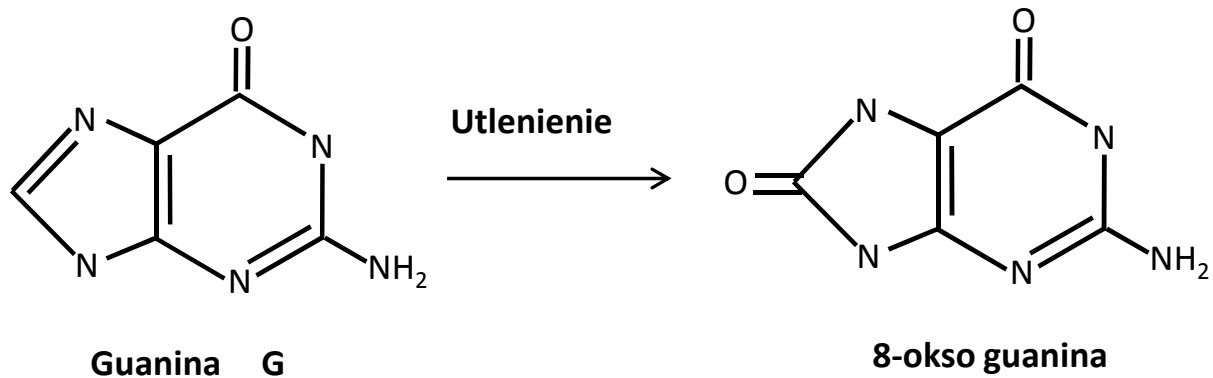


NNK – nitrozoamina obecna w tytoniu. Jest markerem narażenia na dym tytoniowy. Produkty jej metabolizmu (np. przez CYP2A6) są silnymi czynnikami alkilującymi zdolnymi do alkilacji np. pozycji O6 guaniny.

Modyfikacja zasad często prowadzi do zmiany układu donorów i akceptorów wiązań wodorowych co prowadzi do zmiany par zasad w obrębie komplementarnych nici DNA.

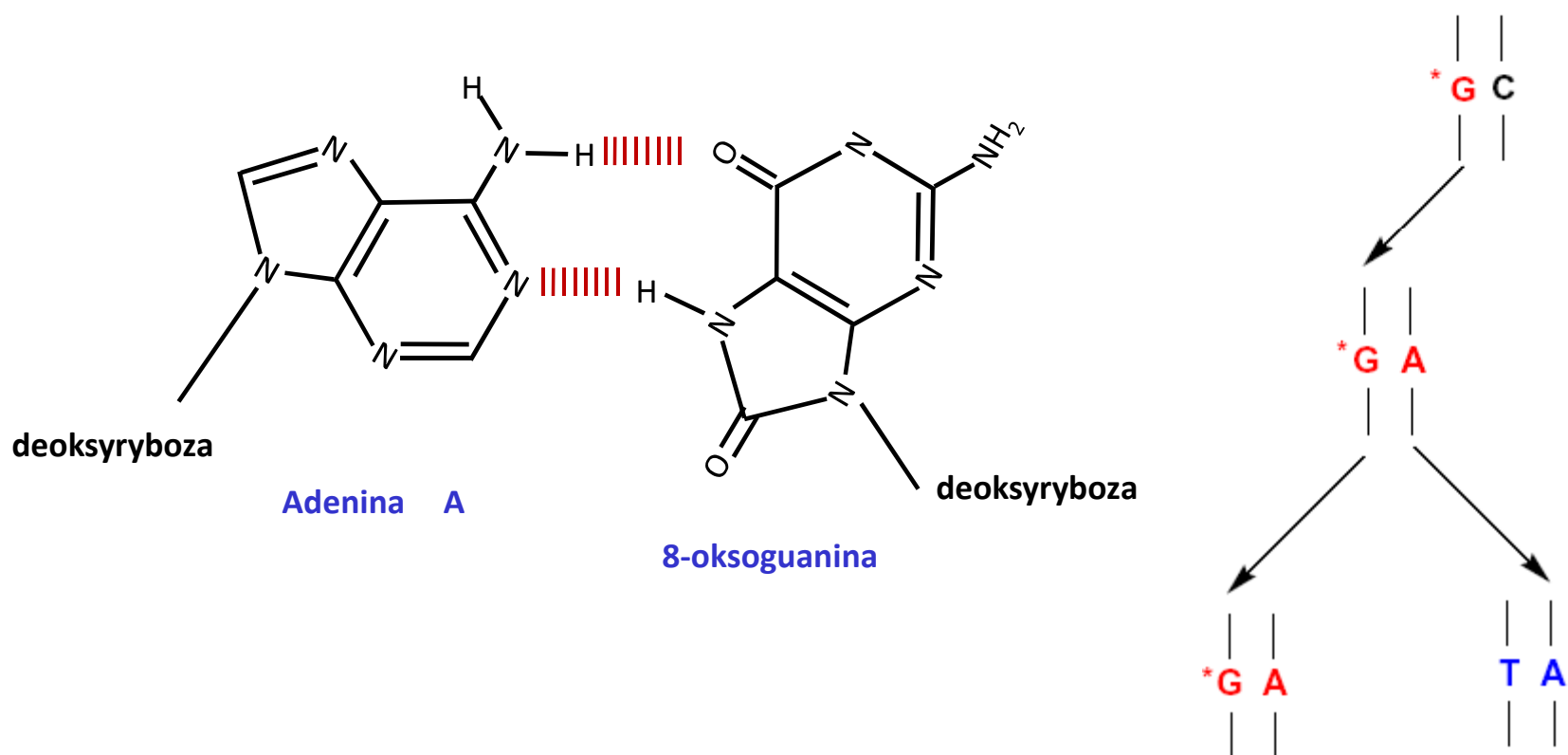


Czynniki powodujące oksydacyjne uszkodzenia i ich powstawanie w komórce.

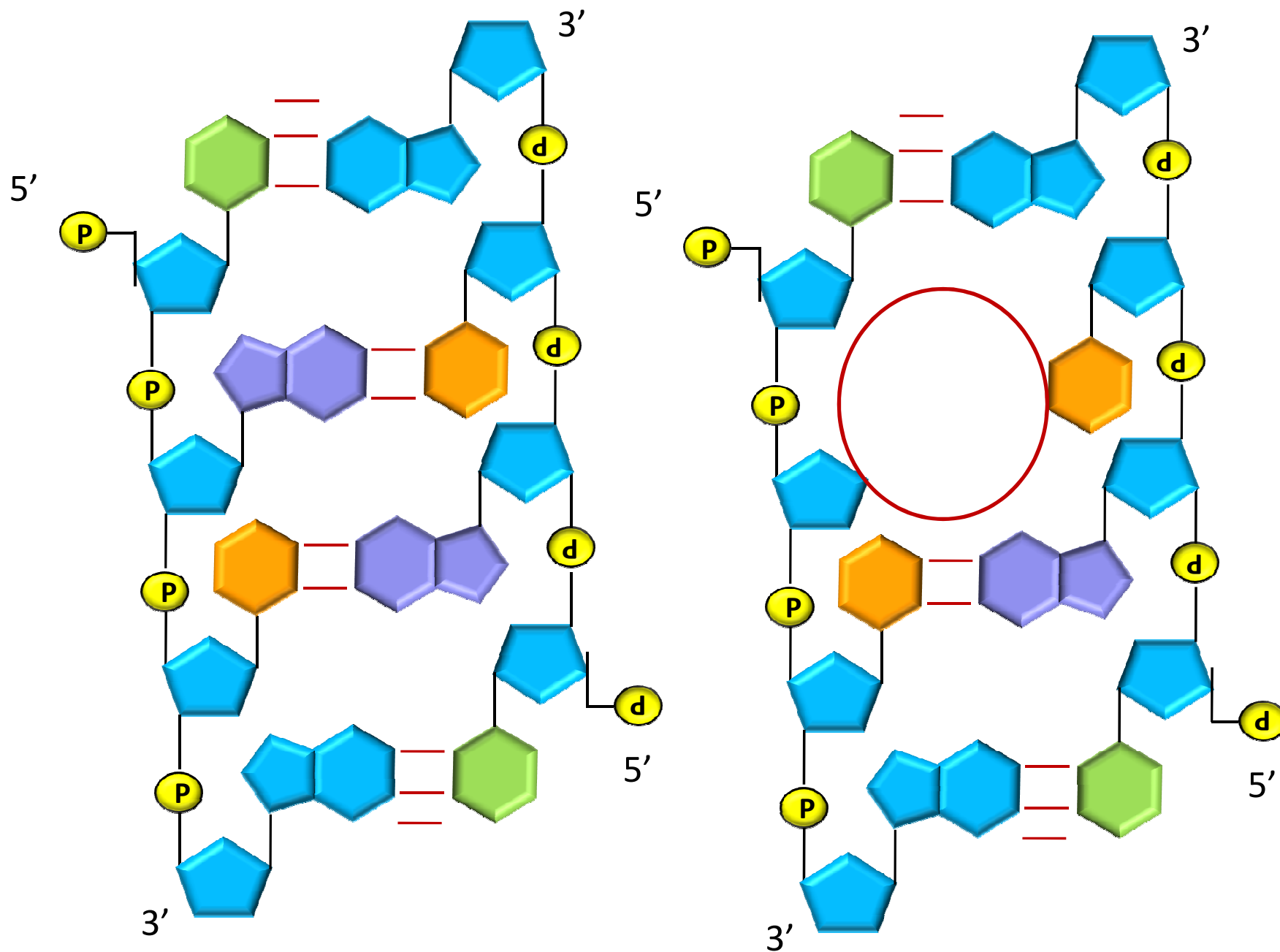


Jedno z najczęściej
występujących w komórce
oksydacyjnych uszkodzeń DNA.

8-oksoguanina (8-hidroksyguanina) może tworzyć parę z adeniną co prowadzi do mutacji G->T. Jest to częste źródło mutacji ze względu na to, że tak zmodyfikowana guanina jest jednym z częściej występujących uszkodzeń DNA.



Depurynacja – jedno z najczęściej występujących uszkodzeń, powstaje spontanicznie



Systemy naprawy DNA

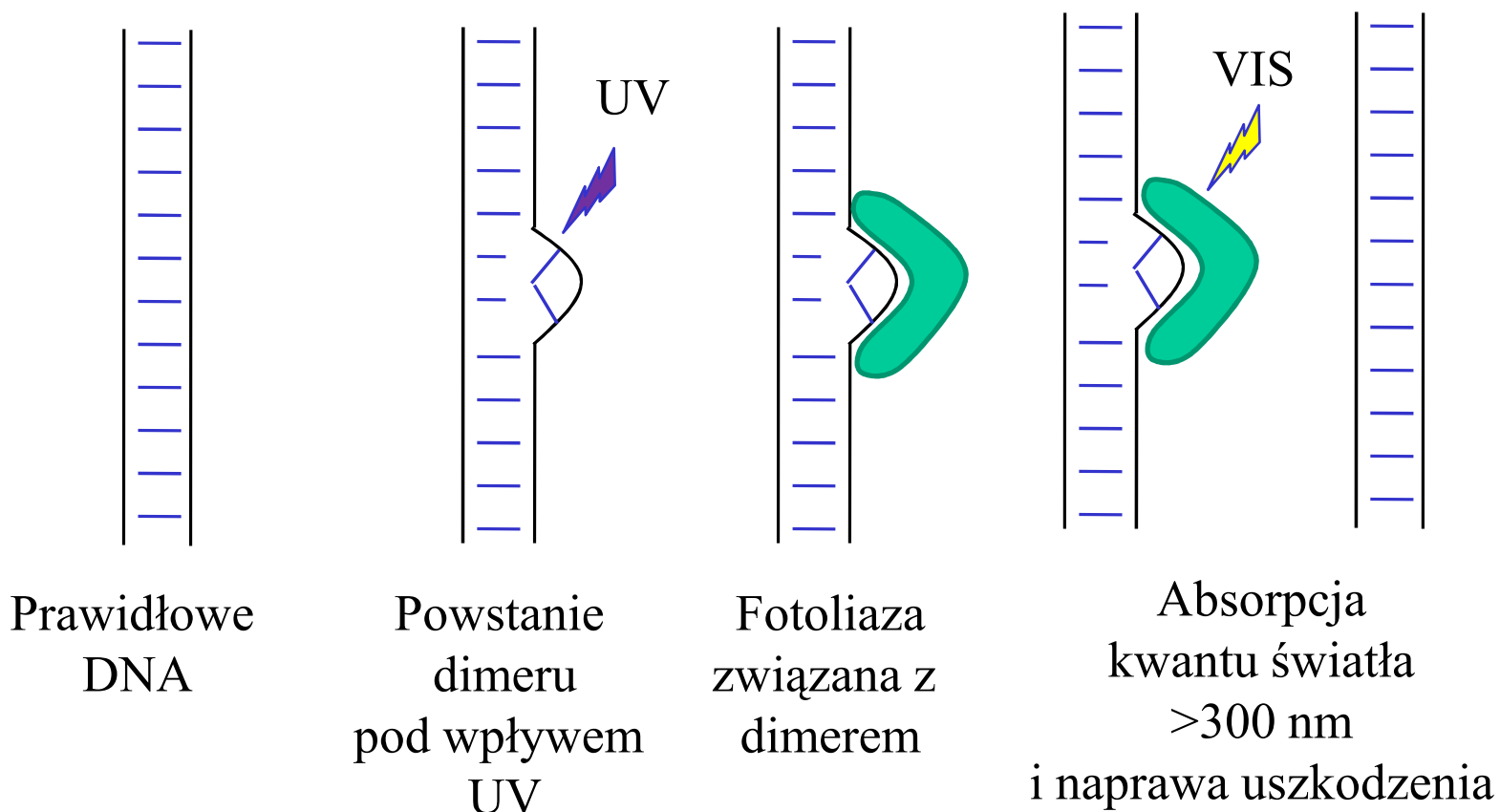
- Naprawa bezpośrednia – uszkodzenie zostaje usunięte bez konieczności naruszania ciągłości łańcucha cukrowo-fosforanowego.
 - Naprawa poprzez wycinanie zasad (ang. *base excision repair*) – pierwszy etap naprawy polega na usunięciu uszkodzonej zasady DNA przez enzym zwany glikozylazą.
 - Naprawa poprzez wycinanie nukleotydów (ang. *nucleotide excision repair*) – polega na usunięciu uszkodzonego fragmentu nici DNA (ok. 20 nukleotydów) zarówno uszkodzonych, jak i sąsiednich, nieuszkodzonych nukleotydów)
-

Systemy naprawy DNA

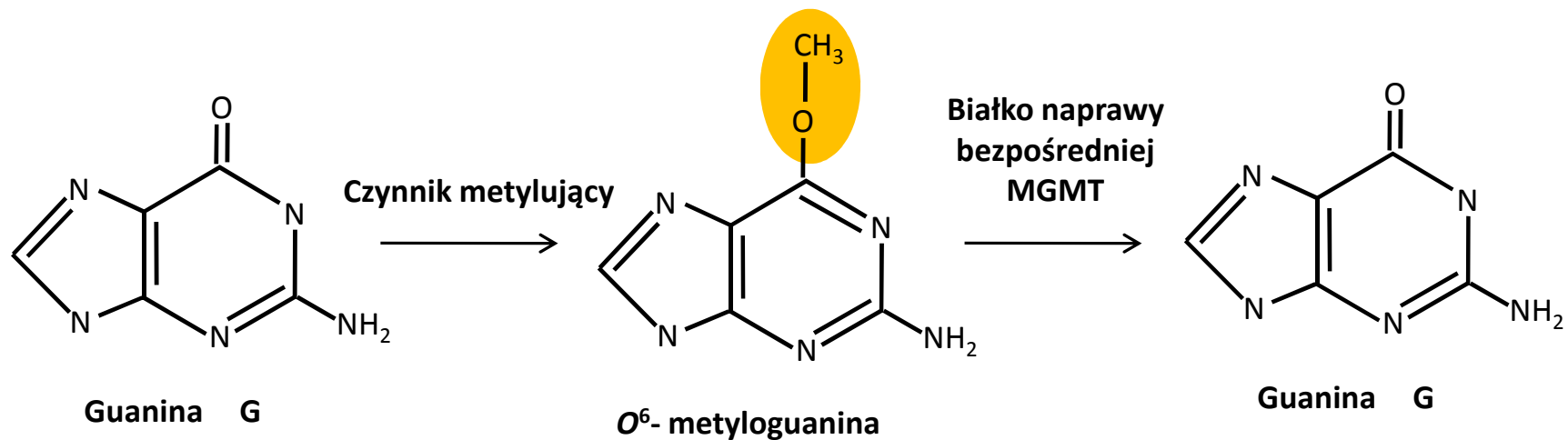
- Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (ang. *DNA mismatch repair*) – system usuwa z nowo powstałej nici DNA nukleotydy błędnie sparowane. Brak chemicznej modyfikacji DNA. Podstawowy problem – usunięcie nukleotydu z nowej nici a nie z nici matrycowej.
 - Naprawa dwunicowych pęknięć DNA: polega na odtworzeniu ciągłości nici DNA. Odbywa się albo poprzez wiązanie niehomologicznych końcówek (mało dokładna) albo poprzez tzw. rekombinację homologiczną (bezbłędna, czasochłonna).
 - Tolerancja uszkodzenia - synteza DNA na matrycy uszkodzonego DNA – ciągłość nici DNA zachowana kosztem mutacji.
-

Naprawa dimeru pirymidynowego przez fotoliazę u bakterii,
ten system naprawy uszkodzeń nie występuje u człowieka.

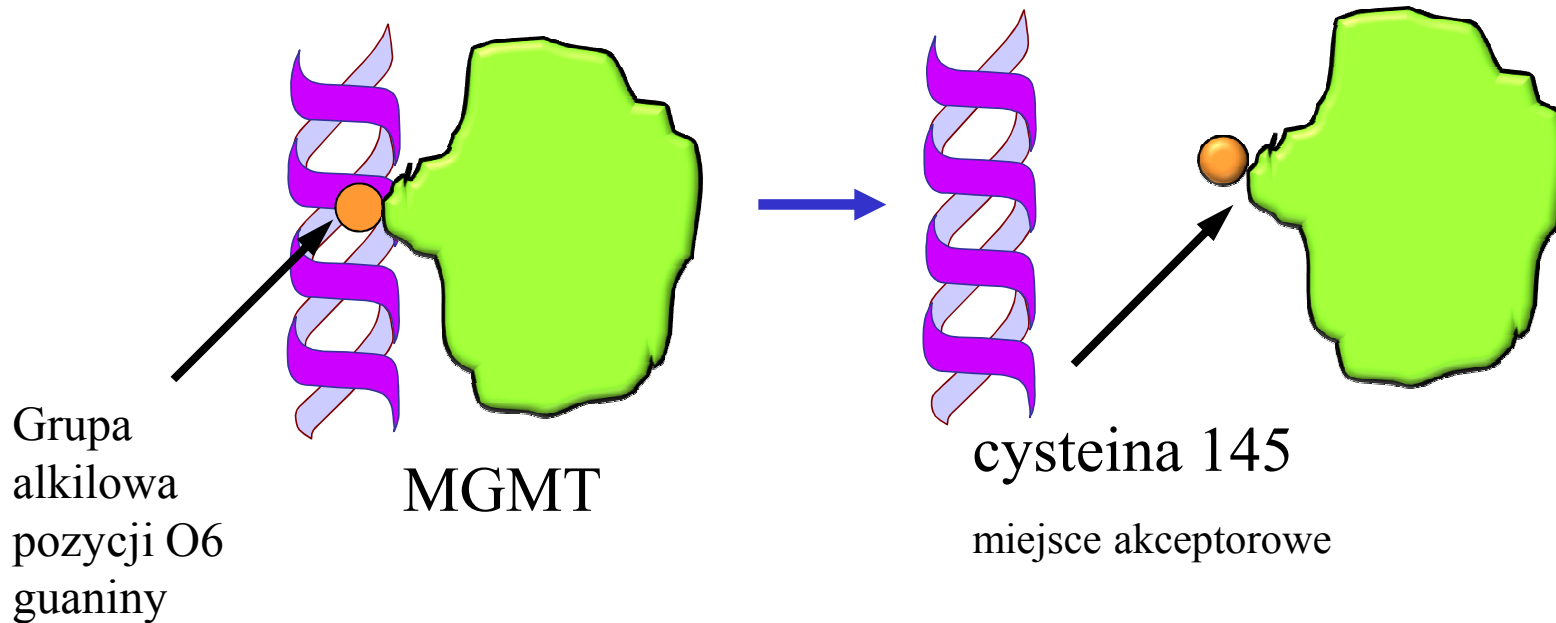
Dlaczego – nie wiadomo.



Naprawa bezpośrednia – usuwanie grup alkilowych z niektórych pozycji w zasadach DNA. U człowieka występuje białko MGMT (*O6-methyl-guanine DNA methyltransferase*) usuwające grupy metylowe oraz inne grupy alkilowe związane z tlenem O6 guaniny. Naprawa odbywa się bez przerywania ciągłości nici DNA. Grupa alkilowa zostaje przeniesiona na białko MGMT, które ulega trwałej modyfikacji a następnie degradacji. Nie jest to więc reakcja enzymatyczna *sensu stricto*. Nie wiadomo dlaczego w komórce utrzymuje się tak kosztowny system usuwania jednego typu uszkodzeń DNA.

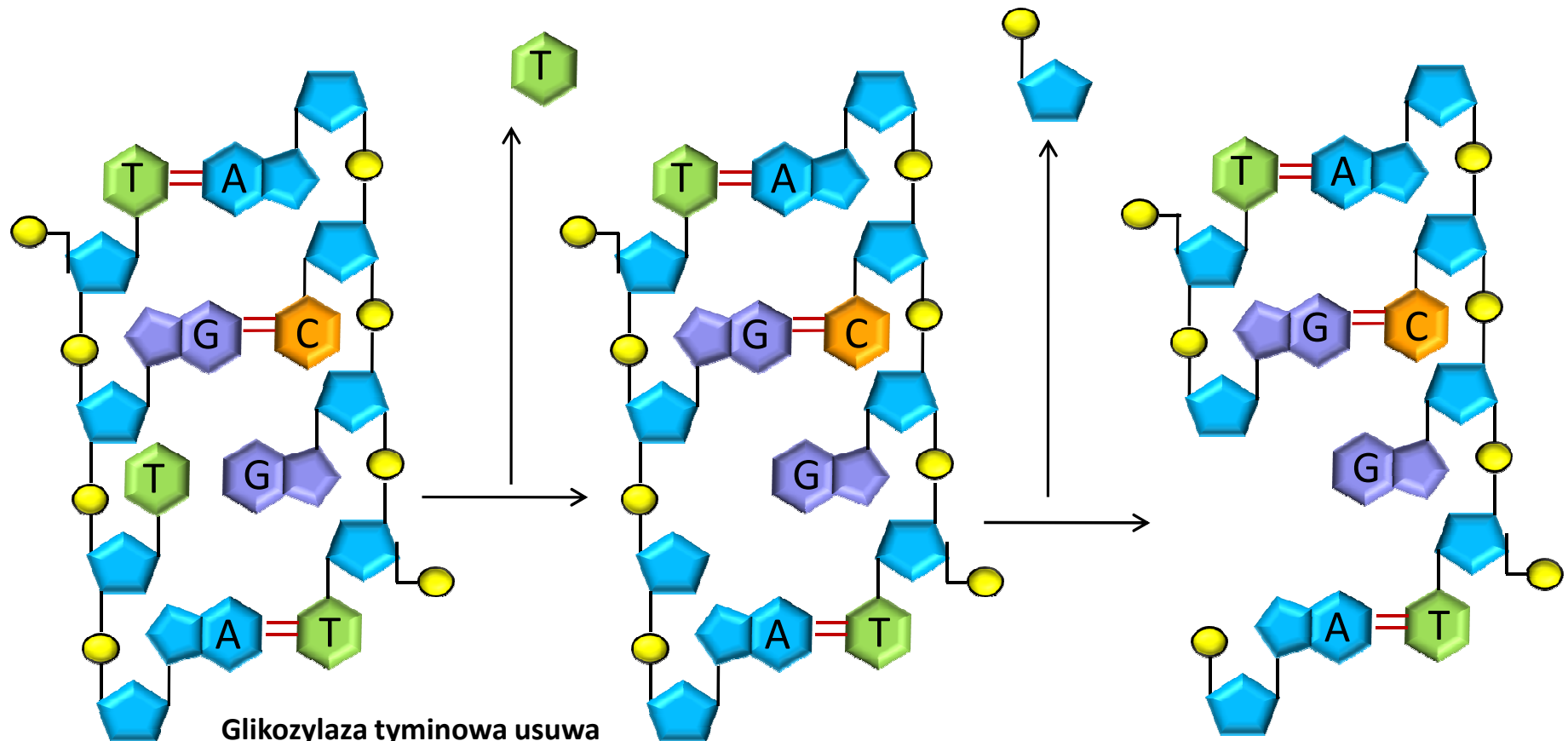


Naprawa bezpośrednia poprzez białko MGMT



- Reakcja przebiega w sposób stechiometryczny; nie wymaga obecności kofaktorów
 - Miejsce akceptorowe białka nie ulega regeneracji
 - Nici DNA nie są przecięte, proces nie generuje błędów
-

Schemat naprawy przez wycinanie zasad (ang. *base excision repair* BER)



Glikozylaza tyminowa usuwa tyminę w parze z guaniną przecinając wiązanie glikozydowe pomiędzy tyminą a deoksyrybozą.

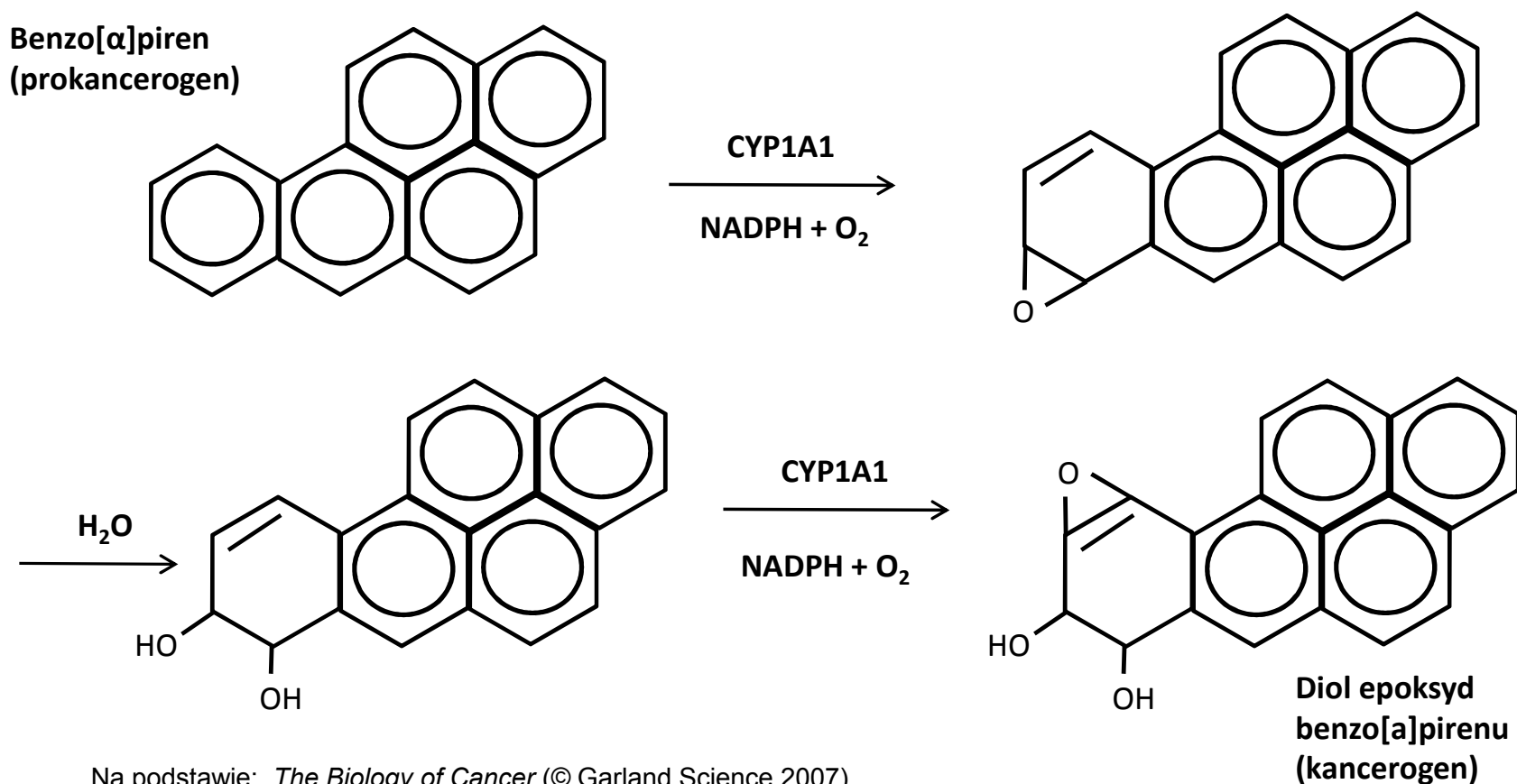
Kolejny enzym usuwa deoksyrybozę pozbawioną zasady oraz grupę fosforanową. Pozostaje nukleotyd z wolną grupą OH oraz kolejny nukleotyd z resztą fosforanową przy węglu 5'. Brakujący nukleotyd jest dobudowany przez polimerazę β DNA. Następnie szczelina jest wiązana przez ligazę.

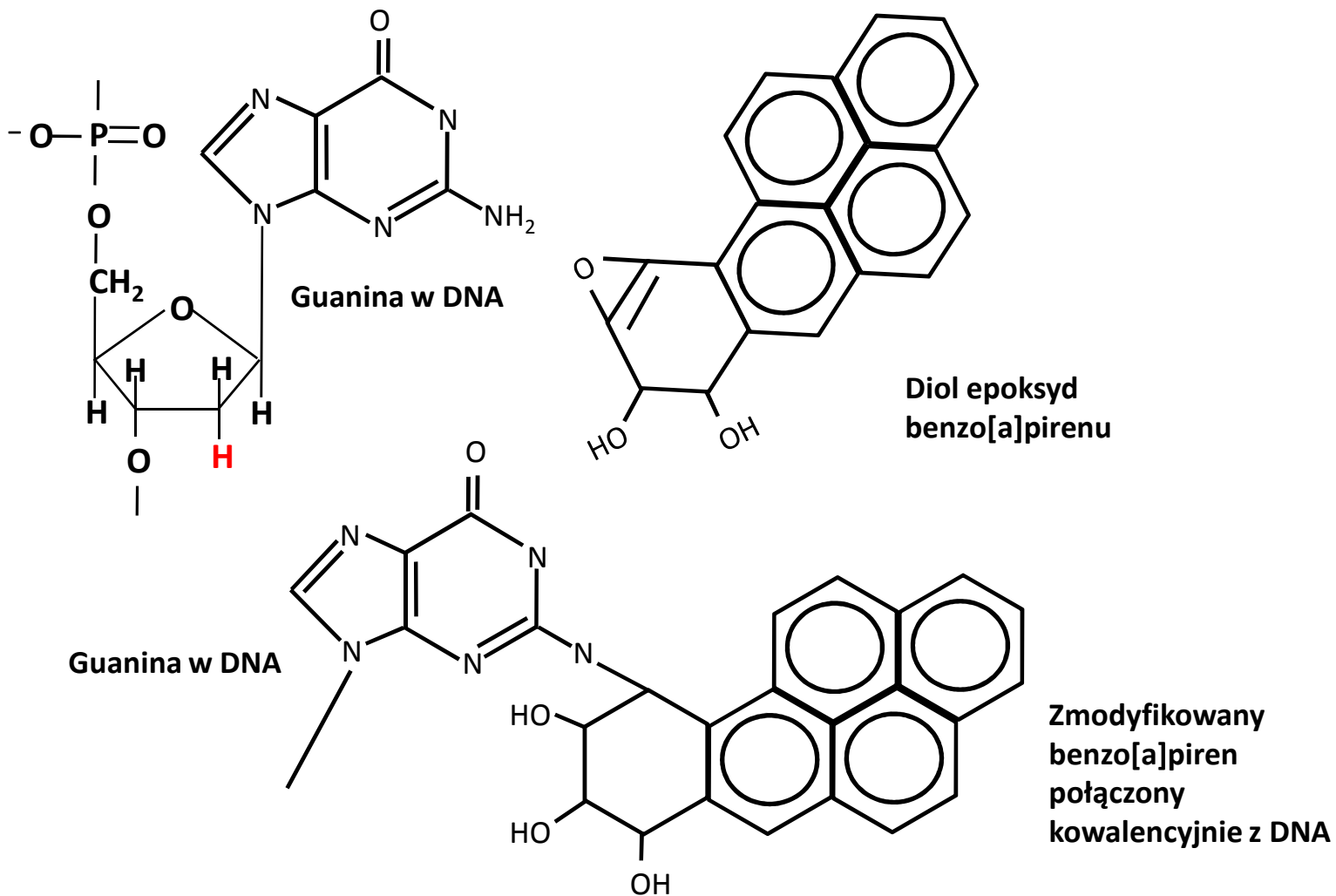
Ludzkie glikozylazy DNA

Skrót	Pełna angielska nazwa	AP	Substraty
UNG	Uracil DNA N-glycosylase	Brak	ssU>U:G>U:A, 5-FU
TDG	Thymine DNA glycosylase	Brak	U:G>εC:G>T:G
UDG2	Uracil DNA glycosylase 2	Brak	U:A
SMUG1	Single-strand-selective Monofunctional Uracil-DNA glycosylase 1	Brak	ssU>U:A, U:G
MBD4	Methyl-CpG-binding domain 4	?	U lub T w U/TpG
MPG	Methyl Purine DNA Glycosylase	Brak	3meA, 7meA, 3meG, 7meG, εA
MYH	Mut Y homolog	Tak?	A:G, A:8-oxoG
OGG1	8-Oxo-Guanine Glycosylase 1	Tak	8-oxoG:C
NTH1	Endonuclease Three Homolog 1	Tak	Glikol-T, glikol-C, formamidopirymidyna

W organizmie występują oksydoreduktazy zwane cytochromami P-450 (CYP). Uczestniczą one w wielu reakcjach biosyntezy (cholesterol, hormony sterydowe) i degradacji związków chemicznych.

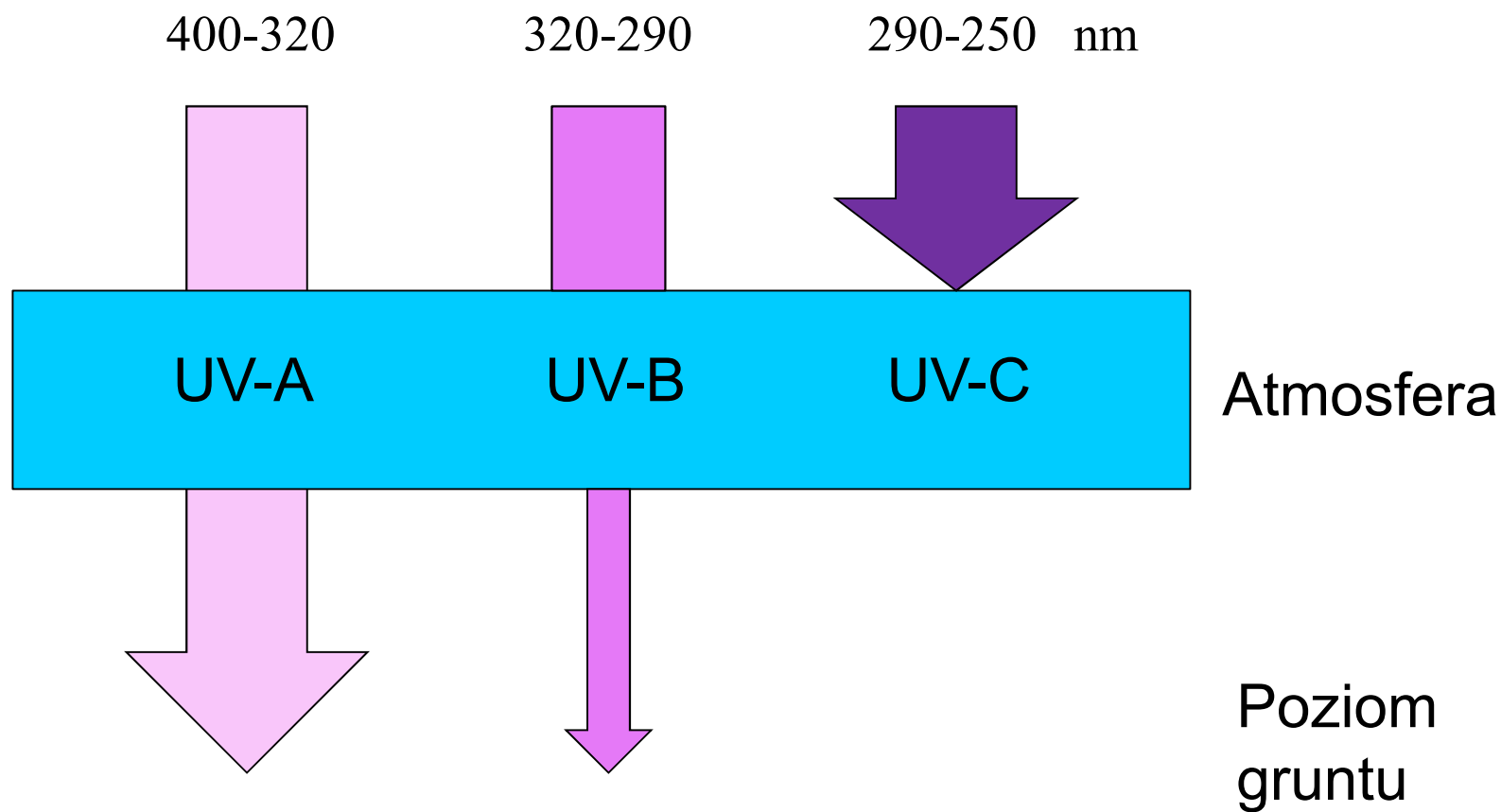
Uczestniczą one również w modyfikacji ksenobiotyków – substancji wytwarzanych poza organizmem. Ksenobiotykami mogą być np. leki lub trucizny dostające się do naszego organizmu wraz z pożywieniem lub wdychanym powietrzem (dym tytoniowy). Ksenobiotykami modyfikowanymi przez CYP są np. policykliczne węglowodory aromatyczne (dym tytoniowy, zanieczyszczenia powietrza, grilowane pokarmy). BaP w dwóch następujących po sobie reakcjach utlenienia zostaje przekształcony do diol epoksydu.





Diol epoksyd benzo(a)pirenu może zostać połączony z cząsteczką organiczną przez komórkowe enzymy i w tej łatwo rozpuszczalnej postaci może zostać wydalony z organizmu. BPDE jest jednak bardzo reaktywną cząsteczką i gdy znajdzie się w pobliżu DNA może połączyć się kowalencyjnie np. z egzocykliczną grupą aminową guaniny tworząc tzw. addukt. Tak zmodyfikowany DNA może być naprawiony przez system NER. Jeśli do naprawy nie dojdzie przed replikacją DNA guaninowy addukt z łatwością generuje mutację G:C->T:A.

Promieniowanie UV jest jednym z głównym mutagenów na jakie są narażone żywe organizmy zamieszkujące powierzchnię ziemi. U ludzi wywołuje ono płaskonabłonkowe raki skóry oraz bardzo groźne nowotwory komórek pigmentowych – czerniaki. Najlepszą ochroną przed tymi nowotworami jest ochrona skóry przed UV zwłaszcza w dzieciństwie i wieku młodzieńczym. Ilustracja przedstawia typy promieniowania UV i ich penetrację przez ziemską atmosferę. Lampy bakteriobójcze emitują UV-C.

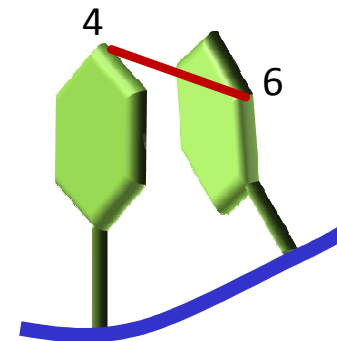
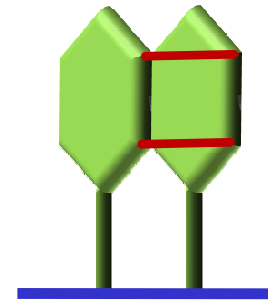


Najczęstsze typy uszkodzeń DNA wywołane promieniowaniem UV.

Uszkodzenia DNA wywoływane przez promieniowanie UV:

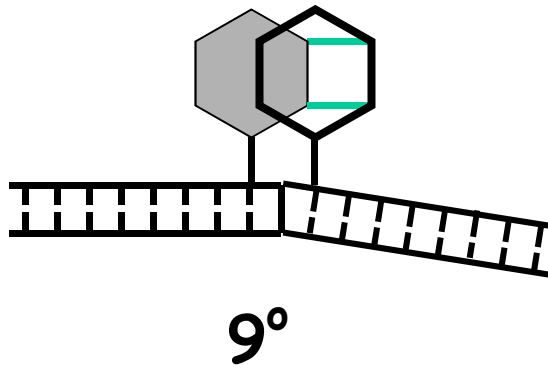
1. Cyklobutanowe dimery pirymidynowe.
2. Fotoprodukty typu 6-4
3. Uszkodzenia oksydacyjne.
4. Pęknięcia nici DNA.

Na ilustracji przedstawiono uszkodzenia 1 i 2.



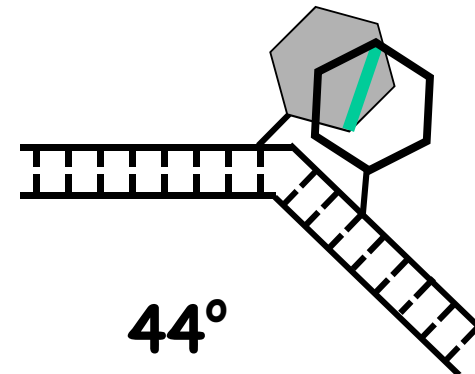
Główne typy uszkodzeń DNA indukowane przez promieniowanie UV i tempo ich naprawy.

Cyklobutanowy dimer pirymidynowy



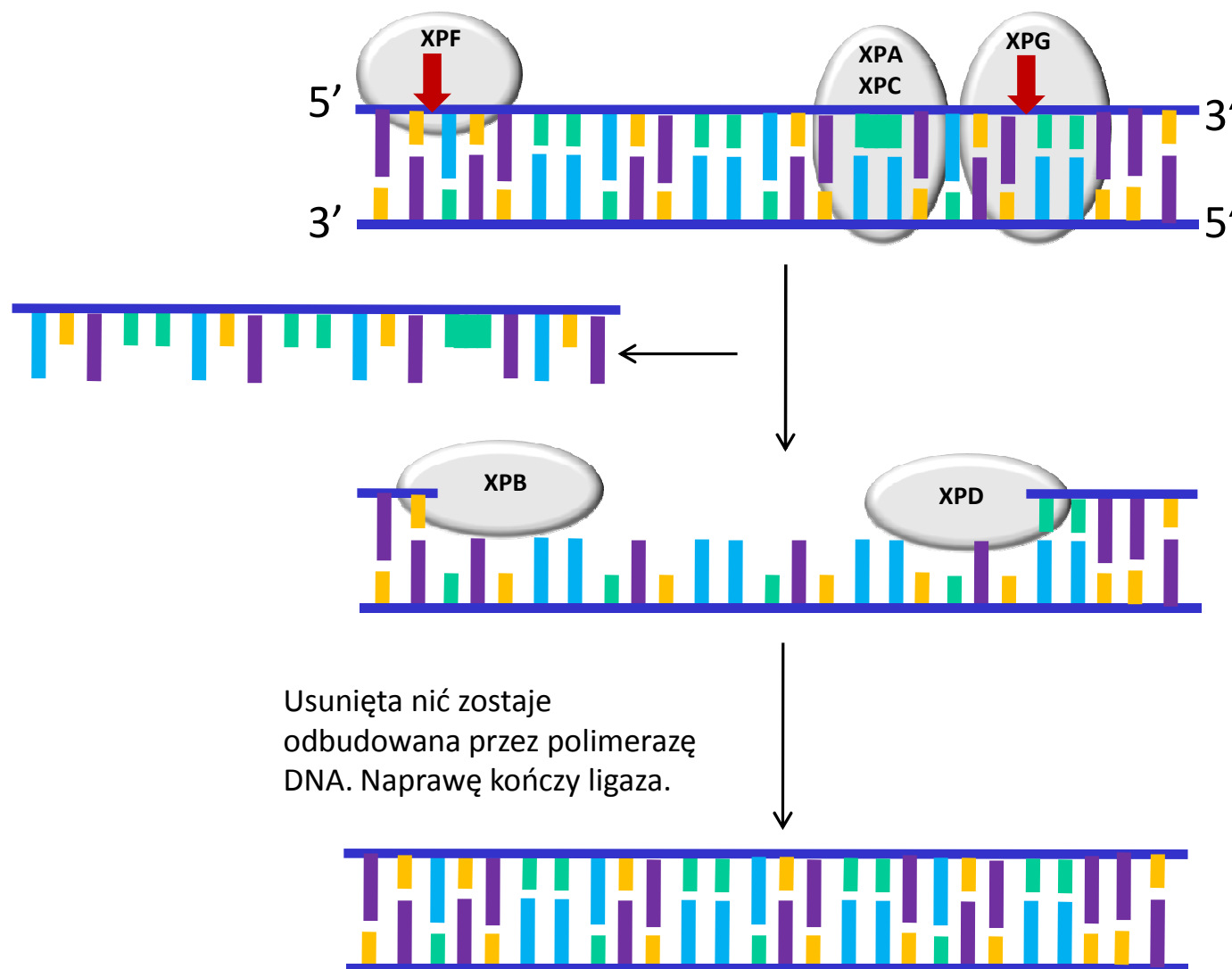
- Najczęstsze uszkodzenie UV
- Naprawiane wolno w ludzkich komórkach (< 24h)
- W nietranskrybowanym DNA gryzoni naprawa niewykrywalna.

Fotoprodukt 6-4



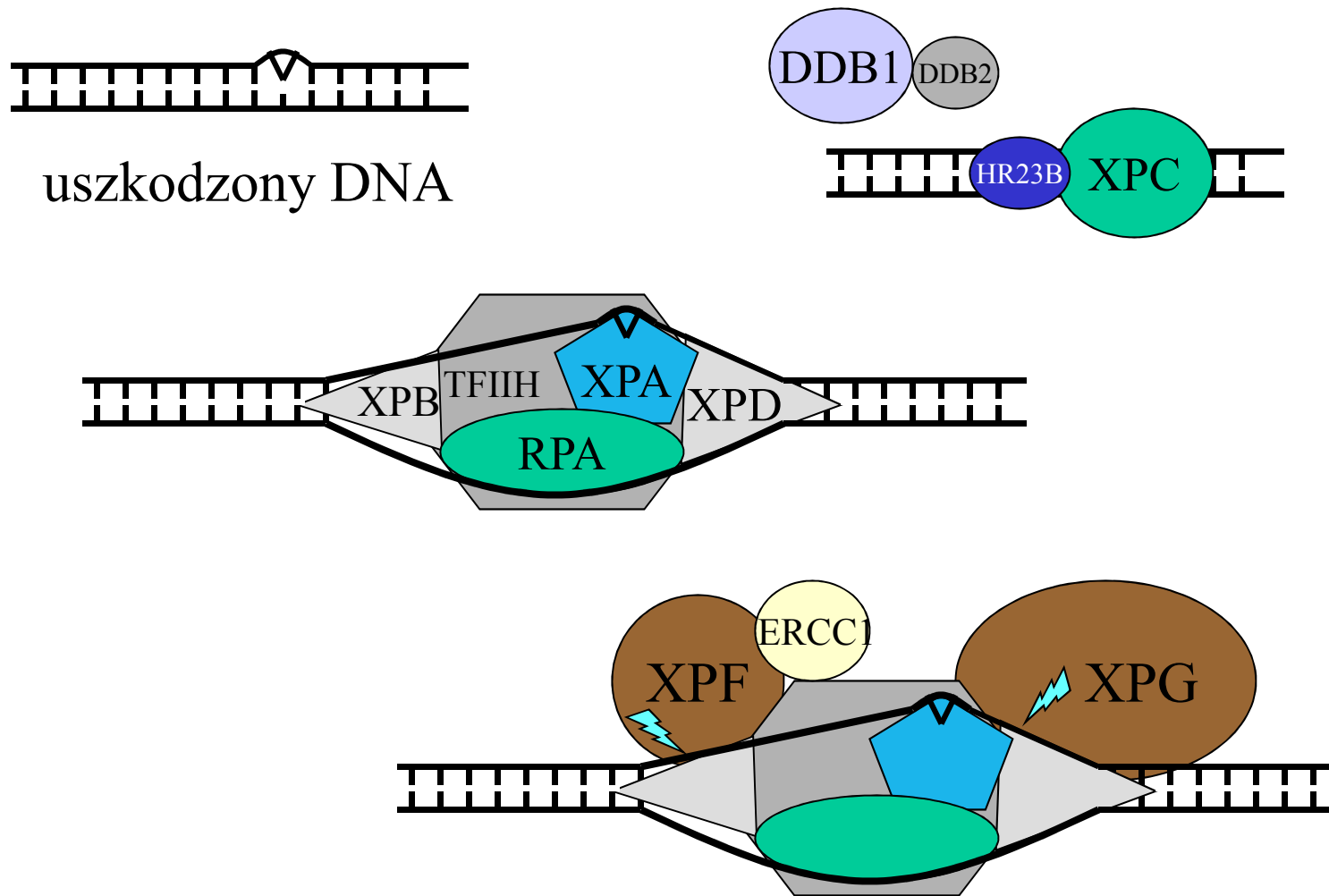
- Rzadziej występujące uszkodzenie UV
 - Naprawiane stosunkowo szybko (< 3h)
-

Uproszczony schemat działania systemu naprawy poprzez wycinanie nukleotydów.

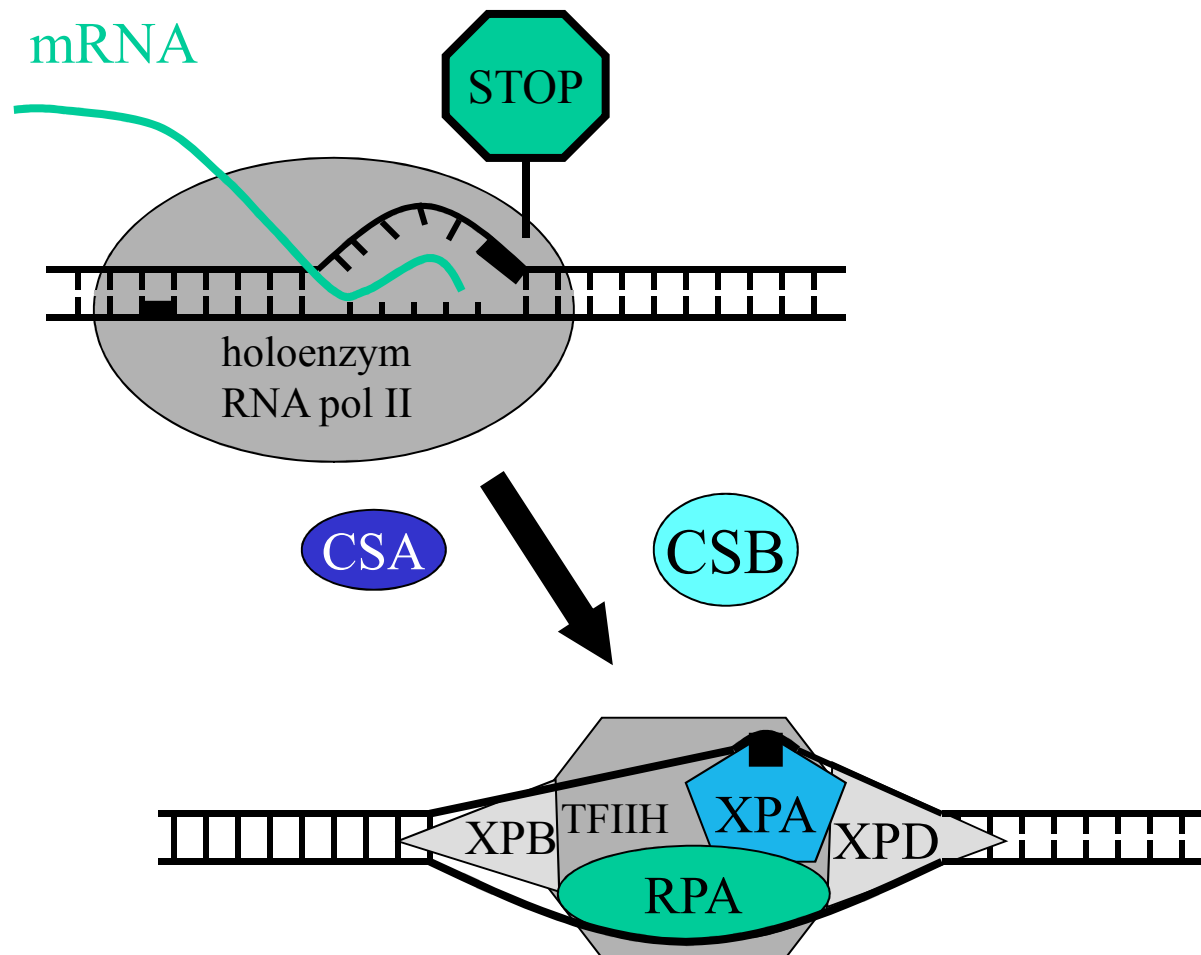


1. Naprawa rozpoczyna się od rozpoznania uszkodzenia przez białka XPA i XPC.
2. Dwie endonukleazy (XPG, XPF) nacinają uszkodzoną nić DNA po obu stronach uszkodzenia.
3. Następnie dwie helikazy (XPB, XPD) rozplatają podwójną nić wokół uszkodzonego nukleotydu i uwalniają ok. 25 nukleotydowy fragment DNA zawierający uszkodzenie.

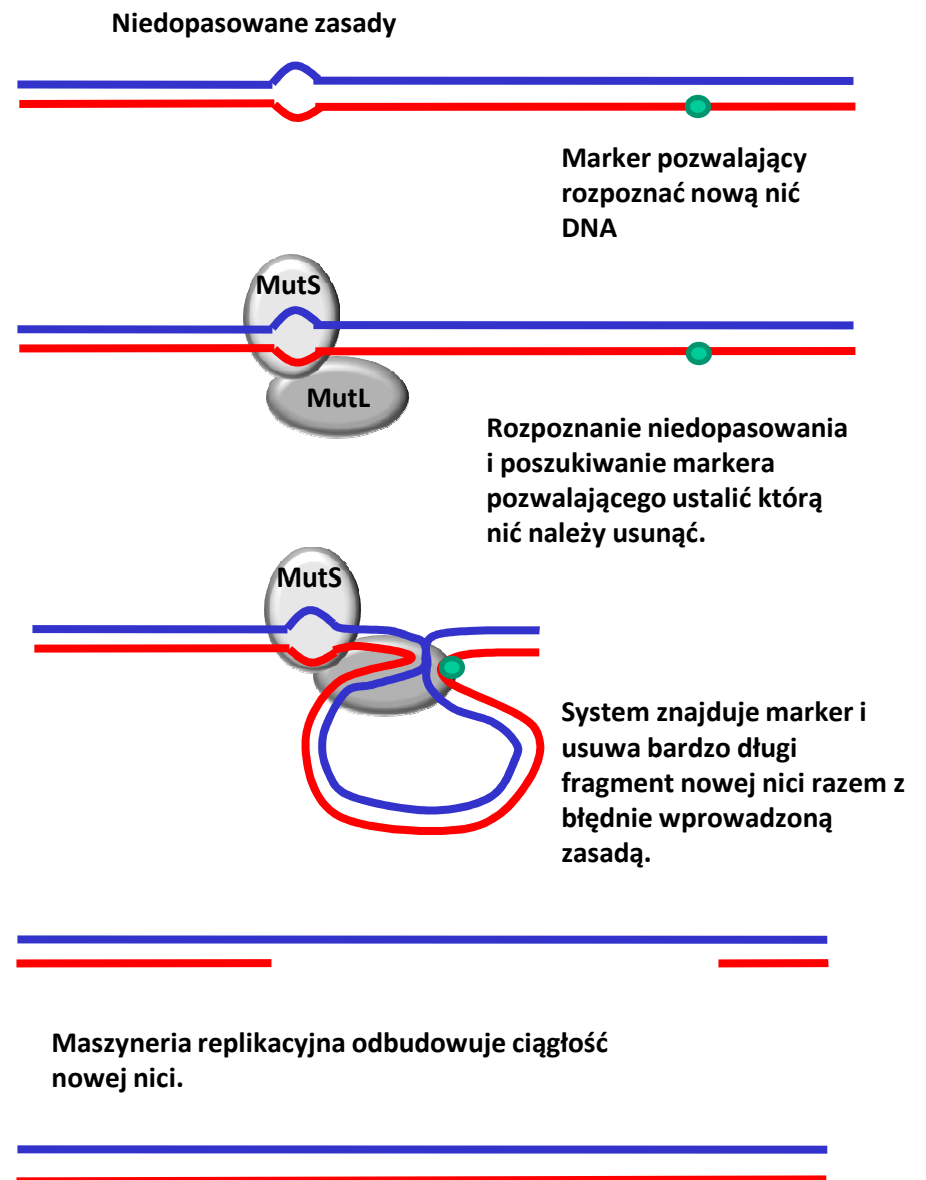
Mechanizm działania NER-GGR. Tzw. globalna naprawa genomu. Odbywa się stosunkowo powoli. Dotyczy nici DNA nie ulegających transkrypcji. Uszkodzone nici DNA są rozpoznawane przez specjalne białka: np. DDB1, DDB2, XPC.



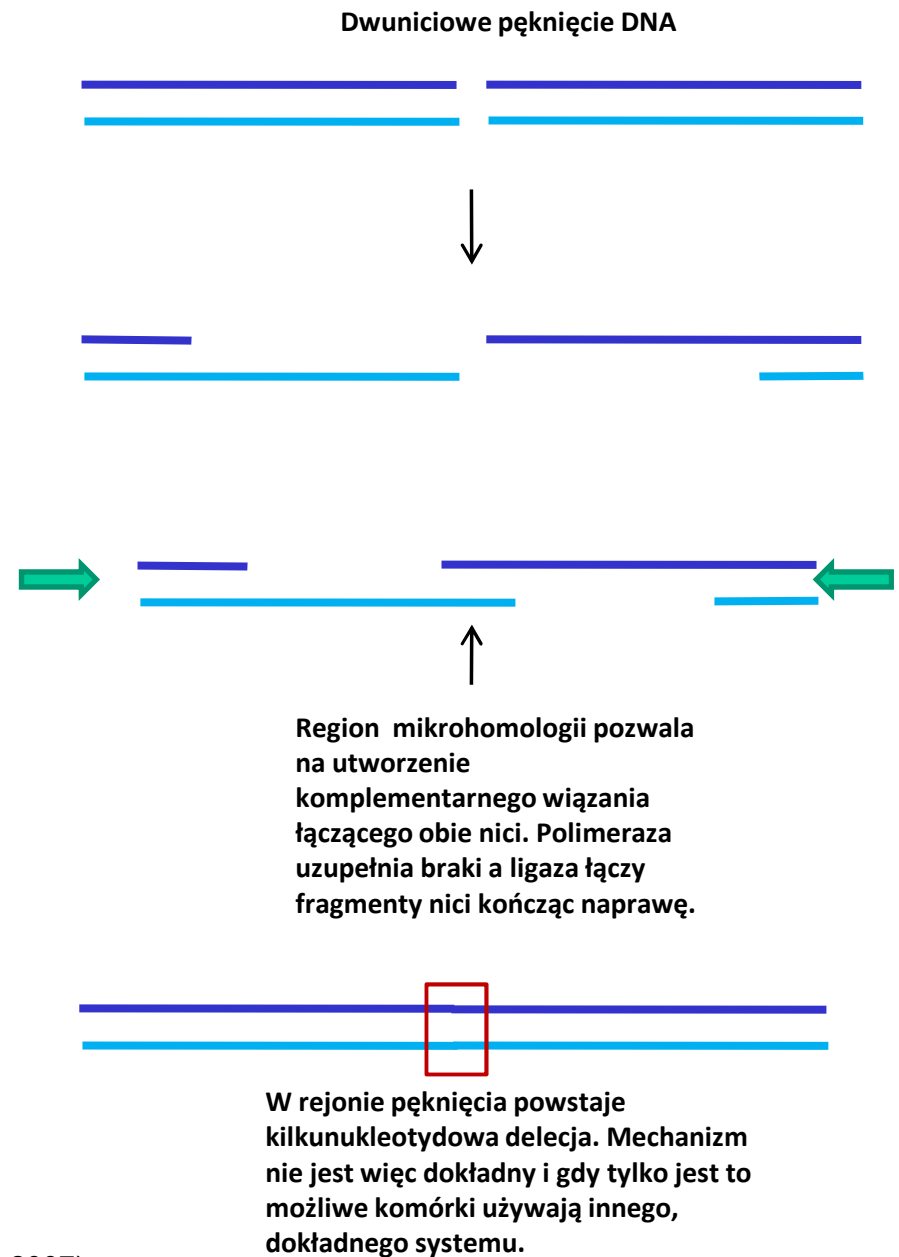
Mechanizm działania NER-TCR (naprawa sprzężona z transkrypcją). Białkiem rozpoznającym uszkodzenie jest polimeraza RNA. Przerywa ona transkrypcję i przy współudziale białek CSA i CSB zostaje usunięta z matrycy, aby zrobić miejsce dla białek naprawczych, które kończą naprawę tak jak podczas GGR.



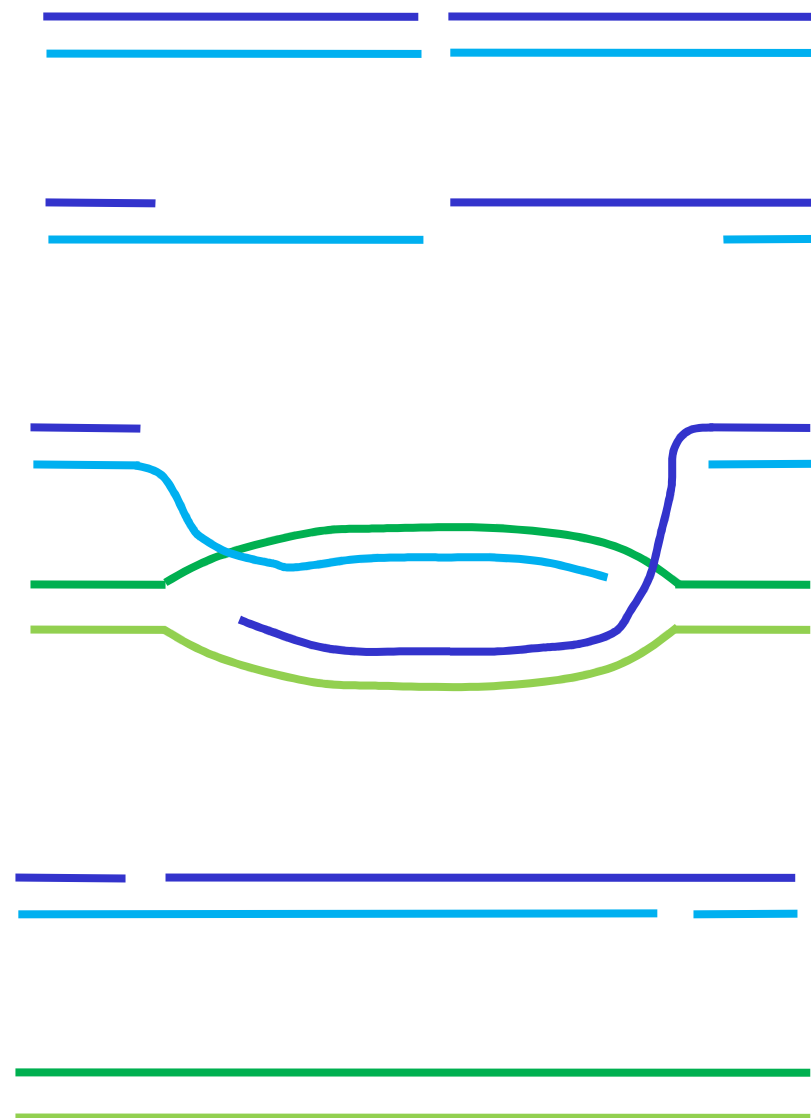
Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów. System ten usuwa poprawne nukleotydy, które błędnie zostały wprowadzone do nowej nici DNA. Błędnie wprowadzony nukleotyd nie tworzy pary Watsona-Cricka z nukleotydem nici matrycowej. Białko MutS rozpoznaje niedopasowane zasady. Następnie system musi ustalić, która z dwu zasad znajduje się na nowo zsyntetyzowanej nici. W nowej nici występują przerwy pomiędzy niepołączonymi fragmentami Okazaki. To stanowi wskazówkę umożliwiającą usunięcie długiego fragmentu nowej nici wraz z niedopasowanym nukleotydem. Następnie nowa nić zostaje odbudowana przez polimerazę DNA.



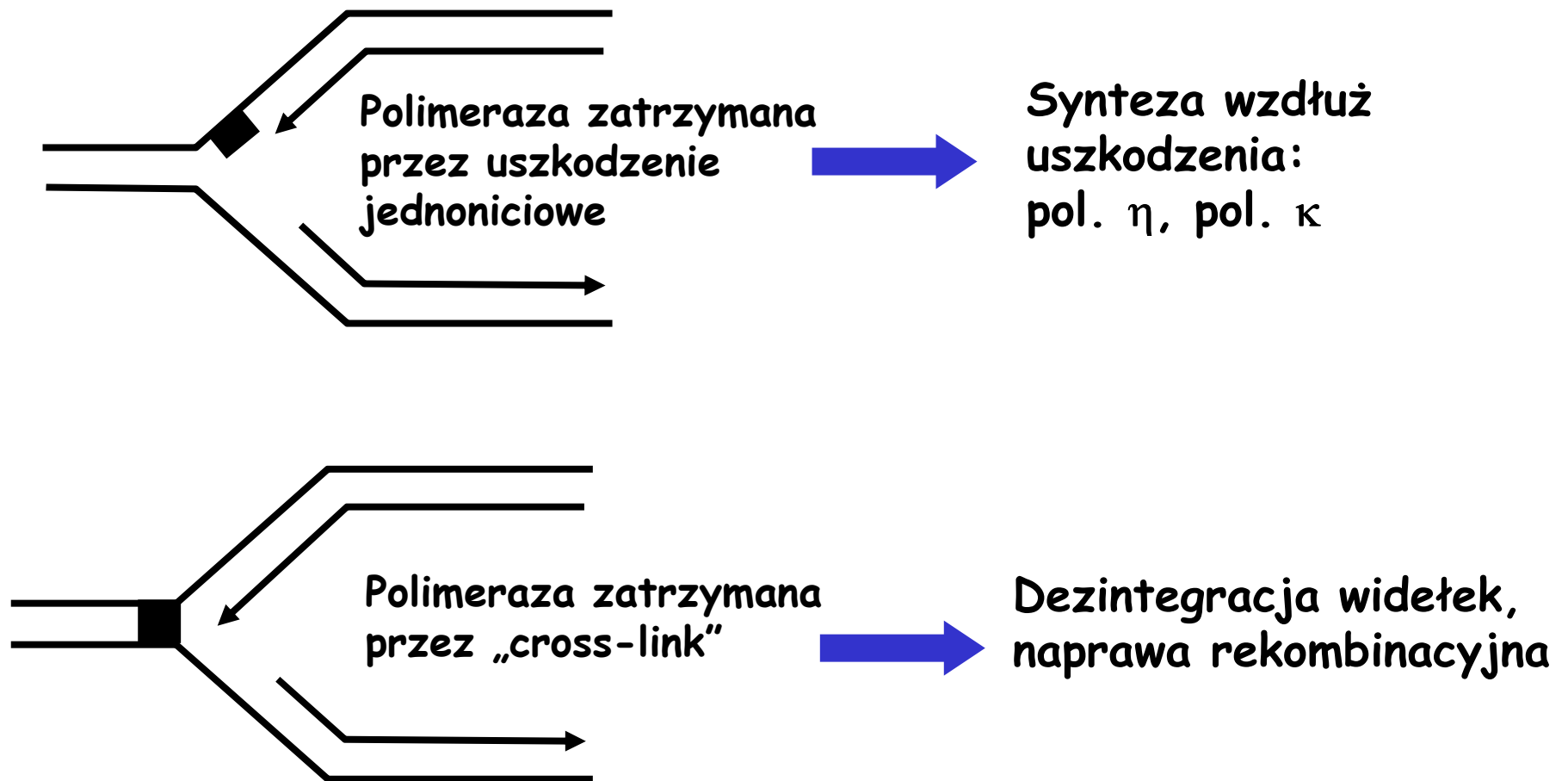
Naprawa podwójnych pęknięć poprzez łączenie niehomologicznych końcówek. Odbywa się wtedy gdy występuje pęknięcie a w pobliżu nie ma homologicznej sekwencji mogącej służyć do bezbłędного odtworzenia ciągłości nici. Po rozpoznaniu pęknięcia następuje jego oznaczenie przez swoiste białka i komórka zostaje powiadomiona o jego wystąpieniu. Następnie egzonukleaza usuwa jednoniciowy fragment z każdej końcówki. Tworzą się fragmenty jednoniciowe ulegające hybrydyzacji. Następnie polimeraza i ligaza uzupełniają brakujące fragmenty. Proces ten zwykle generuje krótkie delecje w miejscu pęknięcia.



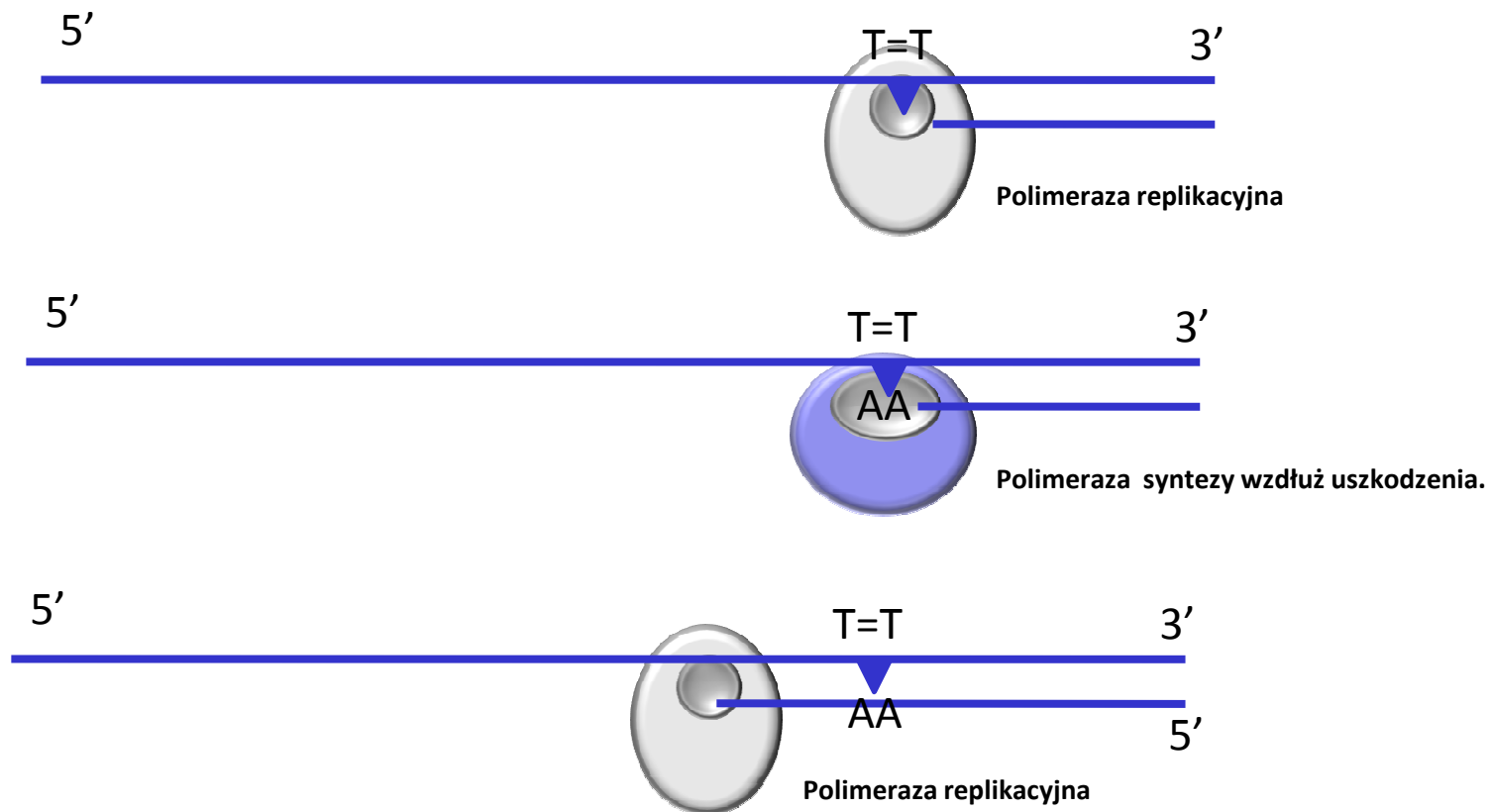
Naprawa podwójnych pęknięć poprzez rekombinację homologiczną. Proces rozpoczyna się od oznaczenia pęknięcia i powiadomienia komórki o jego wystąpieniu. Umożliwia to komórce zareagowanie poprzez np. zatrzymanie cyklu komórkowego. Później następuje usunięcie jednoniciowego fragmentu po każdej stronie. Powstałe wolne fragmenty jednoniciowego DNA poszukują homologicznego, nieuszkodzonego fragmentu DNA siostrzanej chromatydy. Wiążąc się z nim umożliwiają polimerazie DNA syntezę brakującego fragmentu. Następnie nowe nici odłączają się od siostrzanej chromatydy wiążą się na powrót ze sobą umożliwiając polimerazie i ligazie dokończenie naprawy. Pęknięta helisa zostaje bezbłędnie odtworzona.



Spotkanie widełek replikacyjnych z uszkodzeniem DNA.



Schemat syntezy na matrycy uszkodzonego DNA. Gdy replikacyjna polimeraza DNA napotka tzw. nieinstruktywne uszkodzenie odpada od matrycy. Jej miejsce zajmuje polimeraza, której rolą jest „odgadnięcie” jakie nukleotydy należy wprowadzić naprzeciw uszkodzonej matrycy. Zwykle „zgaduje” one poprawnie wprowadzając np. AA naprzeciw dimeru tymidynowego. Jednak czasami polimeraza popełnia błąd i generuje mutację. Z punktu widzenia komórki mniej szkód może wyrządzić mutacja niż pęknięcie DNA do którego doprowadziłyby zatrzymane widełki replikacyjne.



Rodzaje i funkcje niektórych polimeraz DNA.

Oznaczenie grecką literą	Nazwa ludzkiego genu	Funkcja
α	<i>POLA</i>	Główna polimeraza replikacyjna
β	<i>POLB</i>	Naprawa BER, naprawa pojedynczych pęknięć.
γ	<i>POLG</i>	Replikacja mitochondrialnego DNA
δ	<i>POLD1</i>	Główna polimeraza replikacyjna
ϵ	<i>POLE</i>	Główna polimeraza replikacyjna
ζ	<i>POLZ</i>	Replikacja uszkodzonej matrycy
η	<i>POLH</i>	Replikacja uszkodzonej matrycy
θ	<i>POLQ</i>	Replikacja uszkodzonej matrycy, naprawa zespolonych nici (cross-link repair)
ι	<i>POLI</i>	Replikacja uszkodzonej matrycy ?
κ	<i>POLK</i>	Replikacja uszkodzonej matrycy
λ	<i>POLL</i>	Naprawa przez łączenie niehomologicznych końcówek.

Genetyczne predyspozycje do chorób nowotworowych spowodowane mutacjami genów naprawy DNA lub genów systemów sygnalizujących uszkodzenia.

Nazwa predyspozycji	Nazwa genu	Przeważający typ nowotworu	Nieprawidłowy enzym lub proces
HNPCC	4-5 genów	Rak jelita grubego	Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów.
Xeroderma pigmentosum	8 genów	Rak skóry	Naprawa przez wycinanie nukleotydów.
Ataxia telangiectasia	<i>ATM</i>	Białaczkę, chłoniaki	Sygnalizacja dwuniciowych pęknięć DNA.
Rodzinny rak piersi i jajnika	<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i>	Rak piersi i rak jajnika	Naprawa rekombinacyjna dwuniciowych pęknięć DNA.
Zespół Wernera	<i>WRN</i>	Mięsaki, rak tarczycy	Helikaza i egzonukleaza rekombinacyjna, naprawa telomerów
Zespół Blooma	<i>BLM</i>	Guzy łagodne różnego pochodzenia	Helikaza rekombinacyjna
Zespół Nijmegen	<i>NBS</i>	Głównie chłoniaki	Naprawa dwuniciowych pęknięć
Zespół Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	Wiele różnych nowotworów	Odpowiedź komórki na wystąpienie różnych typów uszkodzeń.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Materiały dydaktyczne współfinansowane ze
środków Unii Europejskiej w ramach
Europejskiego Funduszu Społecznego.
