

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Dora Flačer

## **Popravak DNA izrezivanjem nukleotida**

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Ivna Štolfa

Osijek, 2015. godina

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju**

**Završni rad**

**Preddiplomski studij biologije**

**Znanstveno područje: Prirodne znanosti**

**Znanstveno polje: Biologija**

### **Popravak DNA izrezivanjem nukleotida**

**Dora Flačar**

**Mentor: Dr.sc. Ivna Štolfa, doc.**

#### **Kratak sažetak završnog rada:**

Popravak izrezivanjem nukleotida jedan je od najznačajnijih mehanizama popravka DNA, koji prepoznaje i popravlja različita oštećenja DNA molekule. Prisutan je kod eubakterija, arheobakterija i eukariota. U ovome radu opisana je evolucija samog mehanizma, uspoređeni su mehanizmi popravka kod prokariota i eukariota, te kako poremećaji u ovome mehanizmu mogu uzrokovati različite genetske poremećaje kao što su bolest kože *Xeroderma pigmentosum*, Cockayneov sindrom, itd.

**Broj stranica: 19**

**Broj slika: 5**

**Broj tablica: 4**

**Broj literaturnih navoda: 6**

**Jezik izvornika: hrvatski**

**Ključne riječi:** oštećenje DNA, popravak DNA, genetski poremećaji

**Rad je pohranjen u:** knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek Department of Biology**

**Bachelor's thesis**

**Undergraduate study in Biology**

**Scientific Area: Natural science**

**Scientific Field: Biology**

**Nucleotide excision repair**

**Dora Flačer**

**Supervisor: Ph. D. Ivna Štolfa**

### **Short abstract:**

Nucleotide excision repair is the most versatile mechanism of DNA repair, recognizing and dealing with numerous defects of DNA. It's found in organisms like eubacteria, archea and eukaryotes. In this review the evolution of nucleotide excision repair is described, mechanisms in prokaryotes and eukaryotes are compared and severe genetic disorders like *Xeroderma pigmentosum*, Cockayne syndrome caused by various defects in NER are determined.

**Number of pages:** 19

**Number of figures:** 5

**Number of tables:** 4

**Number of references:** 6

**Original in:** Croatian

**Keywords:** DNA damage, DNA repair, genetic disorders

**Thesis deposited in:** Library of Department of Biology, University of J. J. Strossmayer Osijek and in National University Library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Osnovni dio .....	2
2.1. Popravak izrezivanjem nukleotida kod prokariota .....	2
2.2. Popravak izrezivanjem nukleotida kod eukariota .....	5
2.2.1. Evolucija NER-a kod eukariota .....	12
2.3. Poremećaji uzrokovani nedostatkom NER-a .....	14
2.3.1. <i>Xeroderma pigmentosum</i> (XP) .....	14
2.3.2. Cockayneov sindrom (CS) .....	15
2.3.3. Trihotiodistrofija (TTD) .....	15
2.3.4. Tumori i prerano starenje .....	15
3. Zaključak .....	18
4. Literatura .....	19

## 1. Uvod

Od početaka života na Zemlji, evolucija je ovisila o sposobnosti prilagodbe populacija organizama na okoliš koji se neprestano mijenja. Ta sposobnost prilagodbe djelomično je posljedica pogrešaka koje se događaju tijekom replikacije, ali i toga što DNA molekula nije kemijski inertna te može biti oštećena širokim spektrom fizičkih i kemijskih agensa, izvan ili unutar stanice. Ta oštećenja rezultiraju akumulacijom mutacija koje u nekim slučajevima mogu povisiti stopu preživljavanja organizama, ali u većini slučajeva su pogubne. Kako bi se takvi procesi zaustavili, razvijeni su različiti sustavi za popravak DNA. Jedan od najprilagodljivijih takvih sustava je popravak DNA izrezivanjem nukleotida (engl. *Nucleotide Excision Repair – NER*). Nalazimo ga u svim carstvima života, uključujući arheobakterije, eubakterije i eukariote. Popravak DNA izrezivanjem nukleotida jedan je od najznačajnijih puteva popravka DNA čija je funkcija ukloniti široki spektar DNA oštećenja. Oštećenja se uklanjaju duplim izrezivanjem (engl. *dual incision*) na obje strane lezije što je popraćeno ponovnom sintezom DNA, upotrebljavajući komplementarnu uzvojnica kao kalup te proces ligacije. Zajednički enzimatski sustav odgovoran za dvostruko izrezivanje čine egzonukleaze. Uz primarnu funkciju uklanjanja glomaznih lezija iz DNA, također može popravljati različite DNA adukte i UV oštećenja. S obzirom na takvu prilagodljivost i univerzalnost, ovaj sustav popravka je jedinstven. Prva kompleksnija istraživanja NER-a su napravljena kod prokariota, točnije kod bakterije *Escherichia coli*, a kasnije i kod eukariota. Biološka važnost tog mehanizma popravka očituje se u tome što su mnoge genetske bolesti uzrokovane mutacijama upravo u ovome putu popravka, a vrlo bitna je i njegova uloga u prvoj fazi karcinogeneze, tj. nastanku tumora. Prema tome, živi organizmi bi vrlo teško opstali da nije ovakvog popravka DNA molekule. U ovom završnom radu usporedit će se mehanizmi popravka DNA izrezivanjem nukleotida kod prokariota i eukariota, te objasniti kako pogreške u ovome putu mogu uzrokovati različite genetičke poremećaje i tumor.

## 2. Osnovni dio

### 2.1. Popravak izrezivanjem nukleotida kod prokariota

Istraživanja koja su dovela do otkrića NER-a započela su na bakteriji *E. coli* ranih 1960-tih. Ubrzo je postalo jasno da je ovaj put popravka ključan za preživljavanje bakterija kod različitih DNA oštećenja. Nadalje, otkriveno je da i kod ostalih vrsta bakterija, moguće kod svih, postoji vrlo sličan put popravka DNA izrezivanjem nukleotida. Sam popravak se odvija kroz dva moguća načina: 1) preferencijalni, putem transkripcije i 2) putem cjelokupnog genoma. Dijeli se na tri koraka: prepoznavanje oštećenja, dvostruko izrezivanje i sinteza novog dijela koju slijedi ligacija (Batty i Wood, 1999).

Za NER kod *E. coli* potrebno je šest proteina od kojih tri (Tablica 1) imaju egzonukleaznu aktivnost. Nazvani su tzv. ABC kompleksom – proteini UvrA, UvrB i UvrC (Petit i Sancar, 1998).

Tablica 1. Proteini uključeni u egzonukleaznu aktivnost kod *E. coli* (Petit i Sancar, 1998).

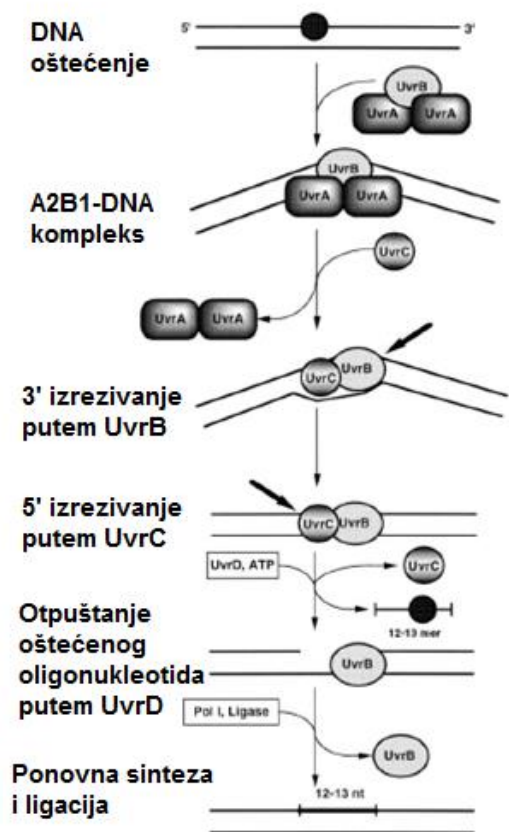
Protein	M <sub>r</sub>	Aktivni dio	Aktivnost	Uloga u popravku
<b>UvrA</b>	(104) <sub>2</sub>	Walker ATPaza	ATPaza	Prepoznavanje oštećenja
		Cinkovi prsti (2)	Vežanje oštećenog dijela	Molekularni „matchmaker“
		Leucinski zatvarač	UvrB vežanje	Popravak putem transkripcije
<b>UvrB</b>	78	UvrA superporodica	TCRF vežanje	
		Helikaza	ATPaza	Prepoznavanje DNA oštećenja
		TRCF homolog	Helikaza	Odmatanje DNA
<b>UvrC</b>	69	UvrB (homolog)	Vežanje oštećenog dijela ssDNA	3' izrezivanje
			Vežanje UvrA	
			Vežanje UvrC	
<b>UvrC</b>	69	UvrB (homolog)	Nespecifično vežanje DNA	Indukcija 3' izrezivanja
			Vežanje UvrB	5' izrezivanje

Preostali proteini uključeni u NER su UvrD, polA i lig. Sam ABC kompleks prepoznaje i uklanja mnoge varijacije DNA lezija, uključujući UV-inducirane fotoprodukte (ciklobutanski pirimidinski dimeri), AP (apirimidinske i apurinske) dijelove, glomazne kemijske adukte te oštećenja nastala umrežavanjem cis- i trans-platine, psoralena i mitomicina (Batty i Wood, 1999).

NER upotrebljava zajednički više stupanjski mehanizam koji osigurava specifičnost, a za nespecifične načine vezanja oštećene DNA osigurava vezanje širokog spektra supstrata. Oštećenja DNA nastala adicijom i unutarnje lezije DNA nastale UV zračenjem prepoznaje UvrA protein koji djeluje kao molekularni „*matchmaker*“ koji u reakcijama ovisnim o ATP-u, osigurava stvaranje specifičnog i stabilnog kompleksa ciljne molekule DNA i efektornog proteina. UvrA može istovremeno prepoznati oštećenje i stvoriti vezu između oštećene DNA i UvrB proteina. UvrB protein se u ovom procesu ponaša kao enzim helikaza i 3' nukleaza (Hoeijmakers, 1993).

Mehanizam djeluje na sljedeći način (*Slika 1*): kompleks A2B1 (UvrA-UvrB) pretražuje DNA uzvojnici te prepoznaje leziju putem (UvrA)<sub>2</sub> koji je specifičan za prepoznavanje oštećenja na dvostrukoj uzvojnici DNA. Kompleks se na tome dijelu zaustavlja i veže. Vezanje aktivira UvrB-ovisnu helikazu koja počinje odmatati/zapetljivati DNA, čime se omogućuje UvrB proteinu prepoznavanje oštećene uzvojnice. Odmatanje se odvija oko pet parova baza oko oštećenja, a zapetljavanje se odvija za 130° unutar glavnog utora na 5' strani lezije.

U drugom stupnju prepoznavanja, protein UvrB, koji specifično veže jednostruku DNA uzvojnici, stvara kompleks s dijelom DNA na kojem je lezija kroz jednu hidrofobnu vezu. Takva veza omogućuje obradu različito kombiniranih kemijskih skupina što je ključno za raznolikost prepoznavanja. Veza proteina UvrB i lezije dovodi do konformacijske promjene koja slabi UvrA-UvrB kompleks; dolazi do disocijacije (UvrA)<sub>2</sub> koji na mjestu oštećenja ostavlja stabilni UvrB-DNA „*preincision*“ kompleks. Otpuštanje (UvrA)<sub>2</sub> također dovodi do izomerizacije kompleksa kako bi nastao [UvrB-DNA] kompleks, manje stabilan, ali sposoban za proces izrezivanja. Taj kompleks omogućuje vezanje UvrC proteina koji će započeti dvostruko izrezivanje (Van Houten, 1990).



Slika 1. Model transkripcijski-neovisnog popravka DNA izrezivanjem nukleotida kod *E. coli* (Petit i Sancar, 1998).

Uklanjanje lezije se odvija izrezivanjima oštećenog dijela DNA uzvojnice na osmoj fosfodieterskoj vezi 5' kraja lezije te na četvrtoj ili petoj vezi 3' kraja, što dovodi do stvaranja oligomera dugog 12-13 nukleotida. Za izrezivanje na 3' kraju potrebna je energija ATP-a, a odvija se neposredno nakon prepoznavanja oštećenja i vezanja UvrC na kompleks UvrB-DNA, aktivirajući UvrB koji započinje izrezivanje. Nakon nekoliko sekundi dolazi do izrezivanja 5' kraja putem UvrC. Kompleks UvrB-DNA oligomer je stabilan i ostaje na svome mjestu dok UvrC spontano disocira. Vezanje UvrD proteina (helikaza II) uzrokuje disocijaciju oligomera i olakšava disocijaciju UvrC-a, dok UvrB vezan za pukotina na DNA molekuli ostaje stabilan. Disocijacijom proteina UvrC dolazi do oslobađanja hidroksilne skupine na 5' kraju reza koju DNA polimeraza I (*Pol I*) koristi za početak sinteze nove DNA molekule. Nakon stvaranja komplementarnog dijela, DNA ligaza spaja krajeve i završava popravak DNA. Visoka specifičnost NER-a za oštećenja DNA nastala adicijom moguća je upravo zbog ovakvog više stupnjevito mehanizma prepoznavanja, a točnost popravka se u većini slučajeva ne razlikuje



od uobičajene semi-konzervativne DNA replikacije, iako se NER općenito smatra „*error-free*“ putem popravka, odnosno popravkom bez grešaka (Petit i Sancar, 1998).

## 2.2. Popravak izrezivanjem nukleotida kod eukariota

Popravak izrezivanjem nukleotida kod eukariota u isto je vrijeme vrlo sličan onomu kod prokariota, s biokemijske strane, ali i različit po vrsti i broju proteina koji su uključeni u sam proces. Iako NER u ljudskim stanicama nije tako dobro proučen kao kod *E. coli*, u proteklim godinama došlo je do značajnih spoznaja. Glavne razlike u popravku izrezivanjem nukleotida kod *E. coli* i čovjeka su: a) 16 do 17 polipeptida, združenih u šest faktora potrebnih za prepoznavanje i izrezivanje (najmanje 25 ih je potrebno za cijeli put); b) duljina novosintetiziranog dijela je 25-32 nukleotida, mnogo dulja od one u prokariota; c) nema konzervacije Uvr proteina bilo kada tijekom evolucije vrsta. Eukarioti su, s obzirom na puno kompleksnije DNA i kromatinske strukture, razvili jedinstveni mehanizam popravka (Petit i Sancar, 1998). NER se u sisavaca odvija uz pomoć multiproteinskog kompleksa koji se sastoji od oko 30 proteina koji postepeno djeluju što se može vidjeti u Tablici 2.

Tablica 2. Proteini uključeni u popravak DNA izrezivanjem nukleotida kod čovjeka (Maddukuri i sur., 2007).

NER faktor	Funkcija	Gen	Kromosomska lokacija	Protein	Veličina (kDa)	<i>S. cerevisiae</i> homolog	<i>E. coli</i> NER faktor
<b>XPC/HR23B</b>	Prepoznavanje oštećenja u GGR						UvrA2B kompleks
	Veže oštećenu DNA s HR23B i omogućuje dolazak drugih proteina	XPC	3p25.1	XPC	125	Rad4	
	Veže oštećenu DNA s XPC i omogućuje dolazak drugih proteina	HR23B	9q31.2	HR23B	58	Rad23 homolog B	
	Zamjena za HR23B	HR23A	19p13.13	HR23A	40	Rad23 homolog A	
<b>DDB</b>	Prepoznavanje oštećenja u GGR						
	Veže oštećenu DNA s XPE	DDB1	11q12.2.	DDB1	127	Ddb1	

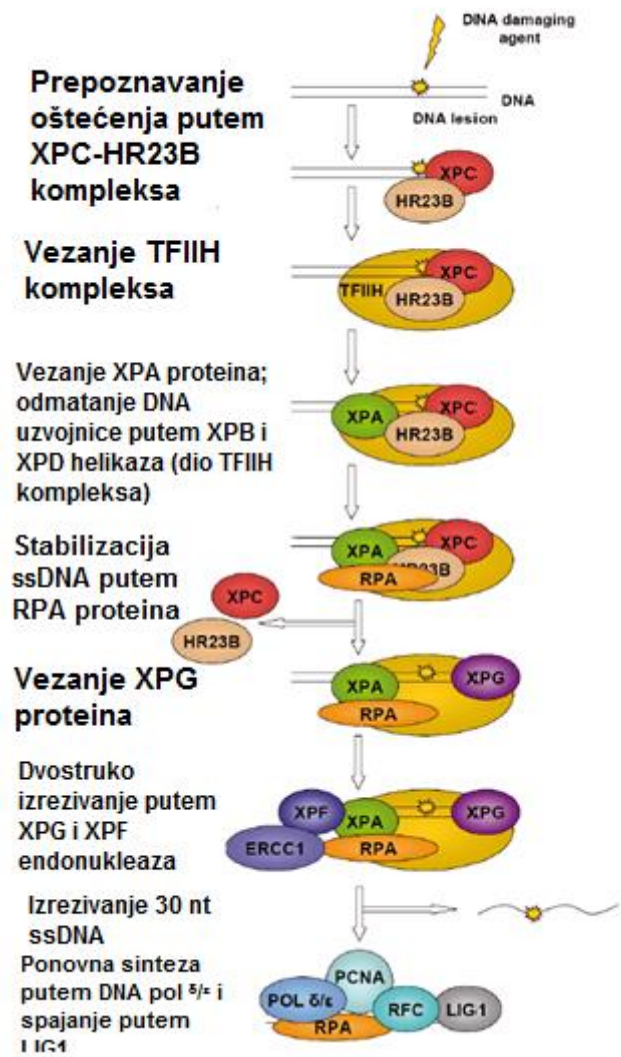
	Veže oštećenu DNA s DDB1	DDB2	11p11.2	XPE	48	-	
<b>CSB</b>	Stabilizacija i remodeliranje DNA-RNAP kompleksa i dolazak drugih proteina u TCR	ERCC6	10q11.23	CSB	168	Rad26	Mfd (uključen u uklanjanje zaustavljene RNAP)
<b>CSA</b>	Podjedinica E3 ubikvitin-ligaza kompleksa u TCR-u	ERCC8 (CKN1)	5q12.1	CSA	48	Rad28	
<b>XPA</b>	Vežanje na oštećenu DNA, stvaranje kompleksa i stabilizacija	XPA	9q22.33	XPA	36	Rad14	
<b>RPA</b>	Vezujući faktor uključen u vežanje DNA, stvaranje kompleksa i stabilizaciju	RPA		RPA (RF-A, HSSB)		Rfa	
	Podjedinica RPA	RPA 1	17p13.3	RPA70	70	Rfa1	
		RPA2	1p35.3	RPA32	32	Rfa2	
		RPA3	7p21.3	RPA14	14	Rfa3	
<b>TFIIH</b>	Potreban u GGR i TCR						
	3'-5' DNA helikaza	XPB	2q14.3	XPB	89	Rad25	UvrD
	5'-3' helikaza	XPB	19q13.32	XPB	80	Rad3	UvrD
<b>XPG</b>	3' izrezivanje	XPG	13q33.1	XPG	133	Rad2	
<b>XPF/ERCC1</b>	5' izrezivanje						
	5' podjedinica za izrezivanje	XPF	16p13.12	XPF	115	Rad1	UvrC
	5' podjedinica za izrezivanje	ERCC1	19q13.32	ERCC1	38	Rad10	
<b>PCNA</b>	Kližuća stezaljka za polimeraze	PCNA	20p12.3	PCNA	37	Pol30	B-stezaljka
<b>POL<math>\delta</math></b>	DNA resinteza			Pol $\delta$			DNA Pol I
<b>POL <math>\epsilon</math></b>	DNA resinteza			Pol $\epsilon$			
<b>LIG1</b>	Ponovno spajanje DNA	LIG1	19q13.32	Ligaza1	102	Cdc9	DNA ligaza

Glavni koraci NER-a kod sisavaca su: 1) prepoznavanje oštećenja DNA, 2) sklapanje proteinskog kompleksa koji izrezuje oštećeni dio, te 3) sinteza i ligacija novonastalog dijela DNA koji ispunjava pukotinu. Ključni korak je izrezivanje fragmenta od otprilike 28 nukleotida koji sadrži oštećeni dio.

Kod sisavaca NER se sastoji od dva manja puta popravka, a to su genomski popravak (engl. „*global genome repair*“, GGR) i popravak povezan s transkripcijom (engl. „*transcription-coupled repair*“, TCR), koji su većinom identični, osim samog procesa prepoznavanja. Kod TCR-a, zaustavljena RNA polimeraza II (RNA pol II) na mjestu oštećenja šalje signal za vezanje proteina popravka, dok se kod GGR-a oštećena DNA uzvojnica prepoznaje putem specifičnog proteinskog kompleksa. Prema tome, TCR specifično popravljiva lezije koje blokiraju transkripciju u transkripcijski aktivnim područjima DNA, dok GGR uklanja DNA lezije u cijelom genomu (Maddukuri i sur., 2007).

Kod GGR popravka oštećenje DNA molekule prepoznaje XPC-hHR23 kompleks (Slika 2). Transkripcijski faktor IIIH (TFIIH), XPA i replikacijski protein A (RPA) vežu se na oštećeni dio kako bi stvorili „*preincision*“ kompleks. Dvije helikaze XPB i XPD (dijelovi TFIIH) odmataju dvostruku DNA uzvojnici, dok dvostruko izrezivanje izvode endonukleaze XPG i XPF-ERCC1 kompleksa koje hidroliziraju fosfodieterske veze 2-8 nukleotida nizvodno te 15-24 nukleotida uzvodno od oštećenja. Nastalu pukotinu ispunjavaju polimeraze delta i epsilon (POL  $\delta$  i  $\epsilon$ ) kojima je za rad potrebna kližuća stezaljka (engl. *proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) i replikacijski faktor C (RPC). Na kraju dijelovi DNA molekule spajaju se uz pomoć DNA ligaze I (LIG1).

Nekoliko proteina je uključeno u prepoznavanje oštećenja, a među njima najznačajniju ulogu ima XPC-HR23B kompleks. Ljudski XPC protein (125 kDa) stvara stabilni kompleks s proteinom HR23B (58 kDa, ljudski homolog RAD23 proteina kvasca) na oštećenom dijelu. U ovom kompleksu XPC je odgovoran za vezanje na mjesto oštećenja, dok HR23B stimulira njegovu funkciju i potreban je za zamjenu kompleksa u sljedećim koracima GGR-a. Glavna uloga XPC-HR23B kompleksa je prepoznavanje i vezanje na oštećenu DNA što uzrokuje promjenu u konformaciji DNA te omogućuje vezanje svih proteina uključenih u popravak. Još jedan senzor DNA oštećenja je i faktor prepoznavanja oštećenja DNA engl. „*DNA damage binding factor*, DDB), heterodimer koji se sastoji od DDB1 (127 kDa) i XPE ili DDB2 (48 kDa) podjedinice.

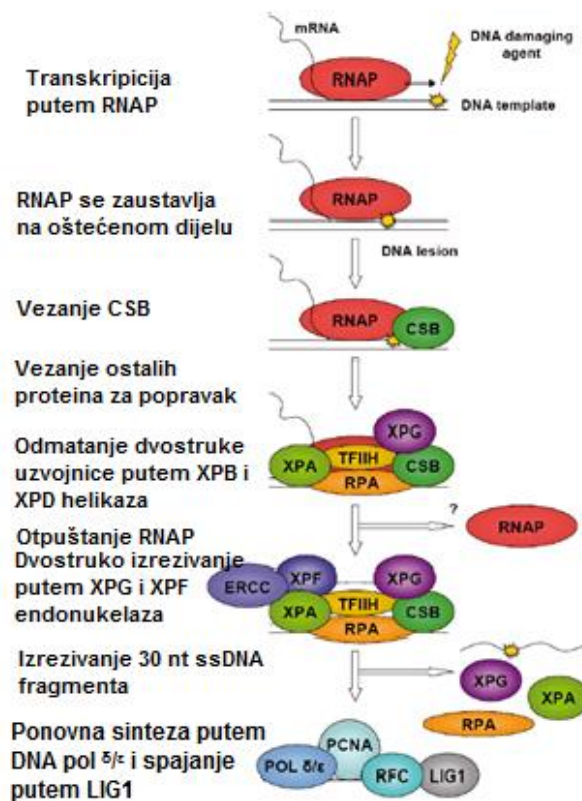


Slika 2. Mehanizam GGR-a (Maddukuri i sur., 2007).

Kod TCR načina popravka oštećenje DNA blokira transkripciju u transkripcijski aktivnim područjima DNA. RNA polimeraza (RNAP) zaustavlja se na mjestu oštećenja te šalje signal za vežanje TCR proteina (Slika 3). Zatim TFIIH, RPA i XPA koji se međusobno stabiliziraju dolaze na mjesto oštećenja. U nekim istraživanjima dokazano je da je ATP-ovisna aktivnost TFIIH potrebna za zaustavljanje RNAP. Nakon toga se kompleksu priključuju i endonukleaze XPG, XPF-ERCC1 kompleks te CSB protein (engl. *Cockayne syndrome group B protein*) odgovorni za dvostruko izrezivanje u reakciji ovisnoj o ATP-u.

Zaustavljanje transkripcije zaustavljanjem rada RNAP je samo po sebi snažan signal za vežanje proteina za popravak. Zaustavljanjem transkripcije stvara se CSB-RNAP veza ili se već postojeći kompleks dvaju proteina stabilizira. Protein CSB (168 kDa) je DNA-ovisna ATP-aza te spada u SNF2 (engl. *Sucrose Non-Fermentable*) porodicu proteina. Jedna od njegovih

glavnih uloga je remodeliranje DNA-RNAP kompleksa tako što djeluje zajedno s kromatinskim faktorima kao što je XPA-vezujući protein 2 (engl. „*XPA-binding protein 2*“, XAB2) i enzim histon-acetiltransferaza (engl. „*Histone Acetyl Transferase*“, HAT) p300. Protein CSB može omogućiti RNAP da prijeđe preko unutarnjih mjesta zaustavljanja i malih oštećenja baza (8-oksiganin), ali ako su blokirajuća oštećenja velika (uzrokovana UV zrakama ili cis-platinom) to nije moguće. U tom slučaju CSB potiče vezanje ostalih TCR faktora na mjestu oštećenja (Maddukuri i sur., 2007).



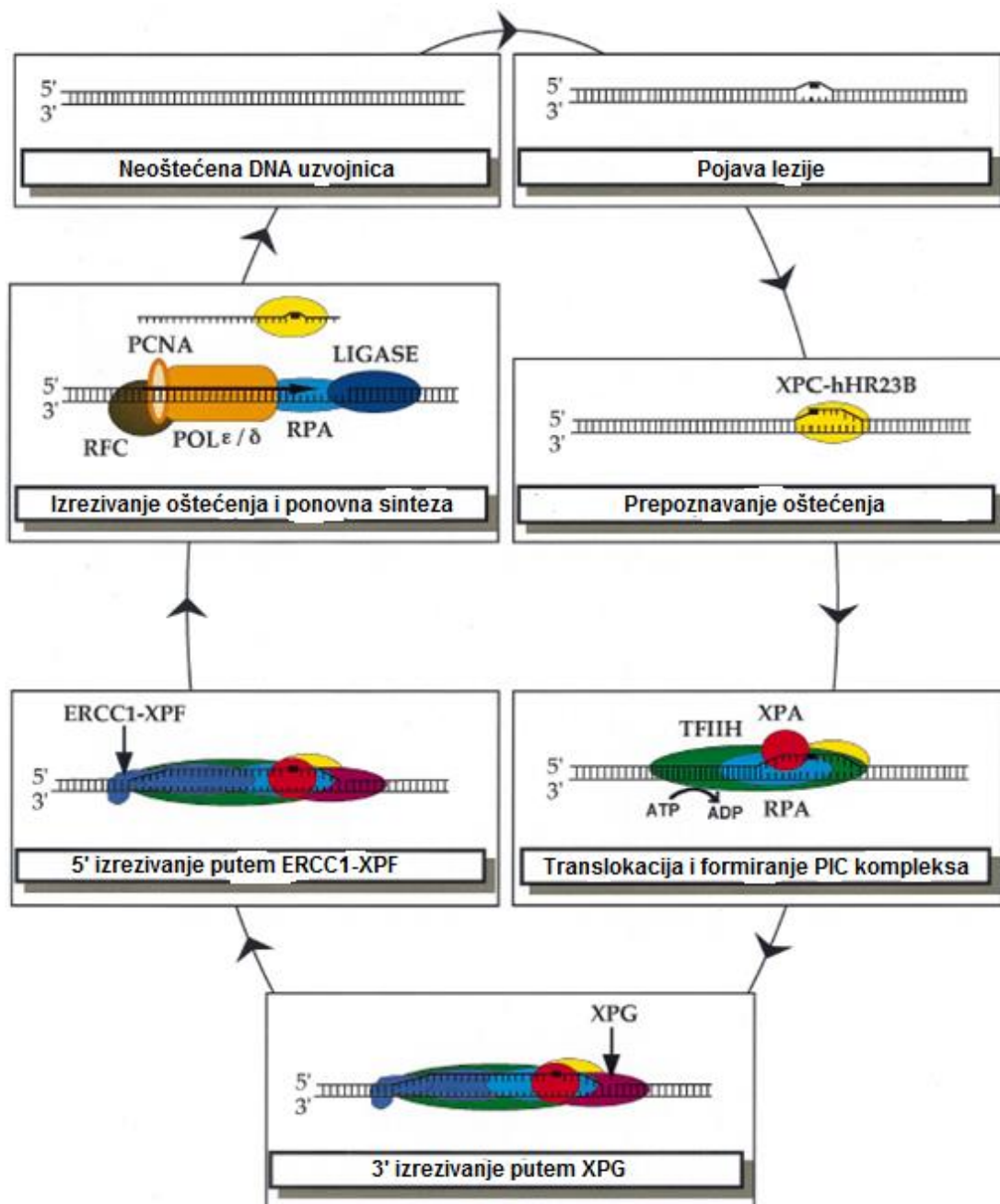
Slika 3. Mehanizam TCR dijela NER-a (Maddukuri i sur., 2007).

Preostali koraci slični su u oba procesa. Kompleks XPC-HR23B u GGR-u, te CSB protein u TCR-u vežu ostale NER faktore kao što su TFIIH, XPA, RPA te XPF-ERCC1. Kompleks XPC-HR23B djeluje s p62 podjedinicom TFIIH kako bi došao na mjesto oštećenja. TFIIH je multiproteinski kompleks koji se sastoji od 10 podjedinica, uključujući jezgru sa 6 podjedinica – XPB, XPD, p34, p44, p52 i p62, CDK-aktivirajući kinazni kompleks (CAK – ciklin-ovisna kinaza CDK7, ciklin H i faktor MAT1), te TFB5. Kod eukariota TFIIH ima dvostruku ulogu, uključen je u inicijaciju RNAP transkripcije i sudjeluje u oba puta NER-a. Kompleks CDK fosforilira karboksi-terminalnu domenu (CTD) RNAP tijekom inicijacije transkripcije. Podjedinice XPB i XPD kompleksa TFIIH su helikaze koje pokazuju DNA-

ovisnu ATP-aznu aktivnost. Enzim XPB (89 kD) katalizira odmatanje DNA u 3'-5' smjeru, dok XPD (80 kDa) djeluje u smjeru 5'-3'. Enzim XPB pokazuje slabiju nukleaznu aktivnost u odnosu na XPD te nije direktno uključen u odmatanje i popravak DNA. Helikaza XPD odmatava fragment od oko 30 nukleotida dvostruke uzvojnice oko oštećenja. U TCR putu, ove reakcije vjerojatno vode do djelomičnog otpuštanja zaustavljene RNAP (Araujo i Wood, 1999).

Kompleks XPC-HR23B djeluje s XPA proteinom (36 kDa) koji je potreban u oba puta, a poznato je da djeluje s RPA, ERCC1 i TFIIH, kao i s oštećenim dijelom DNA. Replikacijski faktor A (RPA) ili ljudski protein koji veže jednostruku DNA (engl. *human single-strand binding protein*, HSSB) sastoji se od 2 podjedinice: RPA14, RPA32 i RPA70 te ima jednolančanu DNA (engl. *single strand DNA*, ssDNA) - vezujuću aktivnost koja je odgovorna za stabilizaciju ssDNA intermedijera dobivenog djelovanjem helikaznih podjedinica TFIIH. U prisutnost XPA-MBD domene, RPA70 podjedinica ima afinitet za neoštećeni dio DNA uzvojnice te tako RPA štiti taj dio od nukleaznog napada. Također, djeluje s XPG i XPF-ERCC1 kompleksom koordinirajući funkciju nukleaza (Maddukuri i sur., 2007).

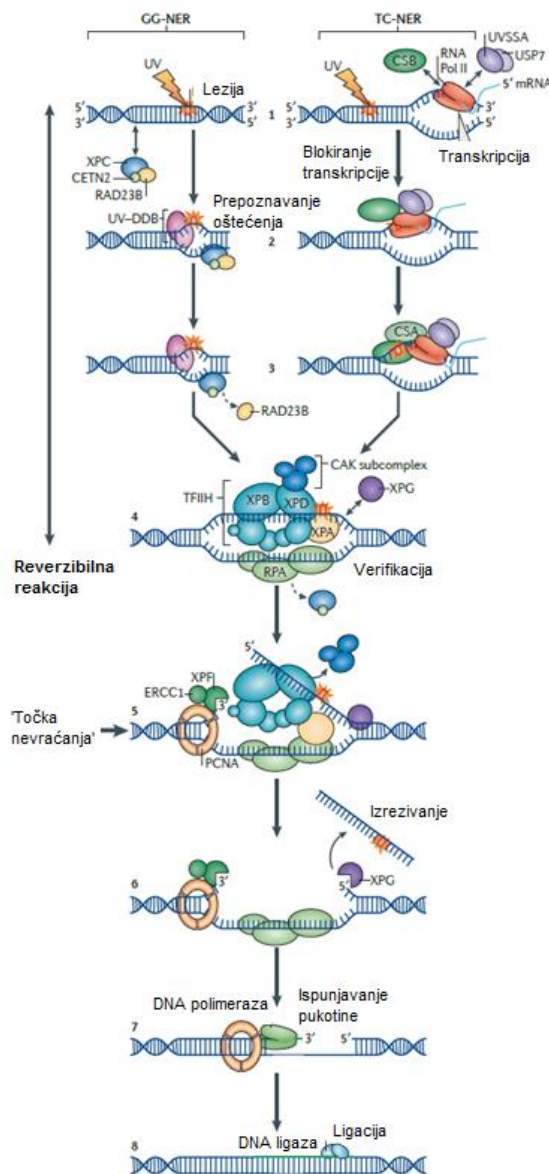
Vezanje nukleaza XPG i XPF-ERCC1 kompleksa dovodi do dvostrukog izrezivanja u blizini oštećenog dijela. Nukleaza XPG hidrolizira fosfodietersku vezu 2-8 nukleotida na 3' kraju oštećenja, dok XPF-ERCC1 hidrolizira vezu 15-24 nukleotida na 5' kraju. Vezanje XPF-ERCC1 i XPG na XPA (preko ERCC1) i RPA (preko XPF) omogućuje točno pozicioniranje na oštećeni dio DNA te stimulira izrezujuću endonukleaznu aktivnost XPG i XPF-ERCC1 proteina (slika 4). U TCR-u, XPG se povezuje s CSB-om na RNAP. Protein XPG (133 kDa) je član porodice FEN1 proteina, strukturno specifičnih endonukleaza koje imaju sposobnost izrezivanja raznovrsnih DNA supstrata. Posjeduje dva visoko konzervirana nukleazna motiva odvojena razmaknicom koja služi kao protein-protein mjesto prepoznavanja i određuje specifičnost supstrata. Vezanjem XPG na '*preincision kompleks*' potiče se konformacijska promjena potrebna za aktivaciju XPF-ERCC1 kompleksa, posljednjeg koji se pridružuje kompleksu za izrezivanje. Protein XPF (115 kDa) stvara čvrst kompleks s ERCC1 (38 kDa) proteinom. XPF ima nukleaznu aktivnost slično kao središnji dio ERCC1, ali on ne sadrže potrebne ostatke za enzimatsku aktivnost (Maddukuri i sur., 2007).



Slika 4. Model popravka DNA izrezivanjem nukleotida kod netranskribirane DNA (Batty i Wood, 1999).

Nakon izrezivanja oštećene DNA, nastala pukotina od otprilike 30 nukleotida se ispunjava djelovanjem polimeraze  $\delta$  (POL $\delta$ ) ili  $\epsilon$  (POL $\epsilon$ ), te novosintetizirane dijelove DNA spaja ligaza. Protein RPA ostaje vezan na ssDNA-intermedijer te sudjeluje u uključivanju PCNA u proces sinteze. Proces resinteze putem polimeraza se odvija uz PCNA te zahtjeva i RFC. On veže 3'-hidroksilni kraj klice i smješta PCNA na DNA kalup uz utrošak ATP-a. Enzim

DNA ligaza veže se na PCNA, okružuje i djelomično odmata DNA te katalizira spajanje 3'-hidroksilnog i 5'-fosfatnog kraja (Slika 5).



Slika 5. Usporedni model GGR i TCR mehanizma (Marteijn i sur., 2014).

### 2.2.1 Evolucija NER-a kod eukariota

Cijeli NER mehanizam vrlo je dobro konzerviran u prirodi što vidimo na primjeru prokariota i eukariota koji pokazuju sličnosti u prepoznavanju oštećenja, njihovom izrezivanju i sintezi nove DNA molekule. Iako su prokariotski i eukariotski enzimi NER-a homologni unutar svakog carstva, postoji manje sličnosti u sljedovima kada se ove dvije grupe organizama usporede. Prokariotski NER mehanizam djeluje putem UvrABC sustava,



dok kod eukariota nalazimo veliki broj različitih proteina. NER proteini su dobro očuvani kod eukariota, ali neke značajne razlike su pronađene kod udaljenih srodnika (tablica 3). Prototipni proteini sisavaca prisutni su u genomima životinjskih modela kao što su *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans*, što pokazuje da je NER većinom jednak kod svih životinja. Geni za XPA i CSB pronađeni su kod *C. elegans* i uključeni su u zaštitu organizma od UV zračenja, što potvrđuje njihovu ulogu u popravku DNA. Slično tomu, kod *Drosophila* nalazimo XPA, XPB, XPD, XPF, XPG i ERCC1 ortologe.

Tablica 3. Prisutnost NER ortologa u nekoliko eukariotskih organizama (Costa i sur., 2003).

Ljudski protein	<i>C. elegans</i>	<i>D.melanogaster</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>P.falciparum</i>	Archaea*
<b>XPA</b>	Da	Da	Da (Rad14)	Ne	Ne	Ne
<b>XPB</b>	Da	Da	Da (Rad25)	Da	Da	+/-
<b>XPC</b>	Da	Da	Da (Rad4)	Da	Ne	Ne
<b>XPD</b>	Da	Da	Da (Rad3)	Da	Da	+/-
<b>XPE/DDB p48</b>	Ne	Ne	Ne	Da	Ne	Ne
<b>Podjedinica</b>						
<b>DDB p127</b>	Da	Da	Ne	Da	?	Ne
<b>Podjedinica</b>						
<b>XPF</b>	Da	Da	Da (Rad1)	Da	Da	+/-
<b>XPG</b>	Da	Da	Da (Rad2)	Da	Da	+/-
<b>CSA</b>	?	?	Da (Rad28)	Da	?	?
<b>CSB</b>	Da	?	Da (Rad26)	Da	?	Ne
<b>ERCC1</b>	Da	Da	Da (Rad10)	Da	Da	Ne
<b>hHR23A i hHR23B</b>	Da	Da	Da (Rad23)	Da	Da	Ne

Najveće razlike pronađene su kod biljaka i protozoa, te proučavane na vrstama *Arabidopsis thaliana* i *Plasmodium falciparum*. Kod vrste *A. thaliana* pronađeni su ortolozi XPB i XPD helikaza, te XPF i XPG endonukleaza, no i kod *A. thaliana* i *P. falciparum* ne postoji XPA homolog, iako oboje imaju XAB1 ortolog koji je u ljudskim stanicama poznat po XPA-vezujućim svojstvima. U oba slučaja jedini gen koji kodira nešto slično XPA, odgovara proteinima povezanim s odvajanjem kromatina, ali se značajno razlikuju u veličini i slijedu aminokiselina. Postoje različite dvojbe o tome je li uloga XPA u procesu prepoznavanja precijenjena ili ovi organizmi jednostavno imaju neke druge, trenutno nepoznate, proteine koji sudjeluju u tom procesu. Kod *P. falciparum* nedostaje također i protein XPC što upućuje na velike razlike u GGR mehanizmu.

Kod arheobakterije *Methanobacterium thermoautotrophicum* put popravka je identičan kao kod bakterija. Do danas je otkriveno najmanje 16 potpunih genoma arheobakterija, a samo nekoliko skupina njih, najviše mezofilnih metanogena i halofila, sadrži UvrABC ortologe. One koje nemaju UvrABC, imaju ortologe eukariotskih nukleaza XPF i XPG, kao i XPB i XPD helikaze. Arhealni XPF protein je prisutan u dva oblika: jedan je kraći te sadrži samo nukleaznu domenu, a drugi je sličan eukariotskom XPF. Pretpostavlja se da je NER put kod carstva arheja eukariotskog karaktera, ali je kod nekih vrsta istisnut bakterijskim oblikom. Ono što dodatno komplicira ovakvu situaciju kod arheja je to da ne postoje ortolozi ostalih eukariotskih proteina koji sudjeluju u popravku, kao što su XPA, XPC i XPE. Takav problem nalazimo i kod vrste *Plasmodium*, što upućuje na to da se NER usavršavao tijekom evolucije što dokazuje prisutnost novih proteina kod viših eukariota (Costa i sur., 2003).

## **2.2. Poremećaji uzrokovani nedostatkom NER-a**

Oštećenje proteinskih kompleksa u NER-u uzrokuje ozbiljne genetske poremećaje kao što su bolest xerodermapigmentosum (XP), Cockayneov sindrom (CS) i trihotiodistrofija (TTD). Do danas je identificirano oštećenje 11 gena povezanih s ovim poremećajima.

### *2.2.1. Bolest Xeroderma pigmentosum*

Ovaj sindrom je genetski raznolik, pri čemu se stanice pacijenata dijele u 8 genetskih grupa s obzirom na gene i proteinske poremećaje (XP-A do XP-G i XP-Variant) (Marteijn i sur., 2014). XP A-G uzrokuju mutacije u 7 proteina, glavnih komponenata NER sustava. Jedna od varijanti, XPV uzrokovana je mutacijom DNA polimeraze  $\eta$  koja je odgovorna za sintezu novih fragmenata DNA kod oštećenja DNA nastalih djelovanjem UV zračenja. Kod pacijenata s XP utvrđena je ozbiljna fotoosjetljivost te i do 1000 puta veća osjetljivost na UV svjetlost i pojava tumora očiju. Oko 50% pacijenata pati od akutnih opekline kože na minimalnoj izloženosti suncu te razvija pjegavost na izloženoj koži. Kod oko 30% XP pacijenata dodatno dolazi do neurodegeneracije što je okarakterizirano senzo-neuralnim gubitkom sluha, nenormalnim hodom i atrofijom mozga. Sve je to povezano s nakupljanjem mutacija zbog inaktivnog NER sustava. Najozbiljnije sklonosti raku kože su pronađene kod pacijenata s mutacijama gena koji kodiraju XPC, DDB1 ili POL $\eta$ , a jedinstveni su za GGR i ne sudjeluju u TCR mehanizmu popravka (Friedberg, 1990).

### 2.2.2. Cockayneov sindrom (CS)

Suprotno od XP, kod CS-a dolazi do oštećenja u proteinima potrebnim za TCR, kao što su CSA i CSB. Otprilike 80% slučajeva rezultat je mutacija CSB-a, a ostatak CSA-a. CS je rijetki autosomalni recesivni poremećaj karakteriziran postnatalnom fizičkom i psihičkom retardacijom, patuljastim rastom, mikrocefalijom, preranim starenjem, hipomijelinacijom bijele tvari, senzoneuralnim gubitkom sluha, kalcifikacijom centralnog živčanog sustava te degeneracijom retinalnih i Purkinjeovih stanica, ali nije primijećena povećana pojavljivost tumora kože.

### 2.2.3. Trihotiodistrofija (TTD)

Trihotiodistrofija je klinički raznolik sindrom kojeg karakteriziraju ozbiljne neurološke, somatske i skeletne deformacije. Pacijenti imaju progeroidne karakteristike slične pacijentima s CS i XP, ali imaju i druge karakteristike kao što su lomljiva kosa zbog nedostatka sumpora, postnatalni prestanak rasta, mentalnu i fizičku retardaciju te ihtiozu. Ovi pacijenti također nisu skloni pojavi tumora. Imaju mutacije XPD, XPB i TTDA, tri podjedinice TFIIH, koji uz ulogu u NER-u, služi kao glavni transkripcijski faktor za mnoge gene uključene u normalni razvoj organizma. Sličnosti i razlike ovih poremećaja prikazane su u tablici 4 (Maddukuri i sur., 2007).

### 2.2.4. Tumor i prerano starenje

Poremećaji u GGR putu mogu uzrokovati nakupljanje oštećenja po čitavom genomu, ali njih mogu zaobići za to odgovorne DNA polimeraze. Usprkos tomu što zaobilaženje oštećenja omogućuje preživljavanje stanica, uzrokuje i povećan broj mutacija što objašnjava snažne predispozicije za pojavu tumora kod pacijenata s XP. Pacijenti grupe C (XP-C) i E (XP-E), koji imaju poremećaje u GGR-u, su blago hipersenzitivni na UV zračenje i pokazuju kožne poremećaje kao što su hipo- i hiperpigmentacija, te imaju najveću mogućnost za dobivanje raka od svih XP grupa.

Tablica 4. Kliničke karakteristike poremećaja povezanih s NER-om (Leibeling i sur., 2006).

Kliničke karakteristike	Fenotip:	XP	XP i neurološke abnormalnosti	CS (+/- XP)	TTD (+/- XP)	COFS*
Osjetljivost na sunce		Da	Da	Da	Da	

<b>Pjegavost</b>	Da	Da		
<b>Rak kože (NM** i M***)</b>	Da	Da		
<b>Ihtioza</b>			Da	
<b>Lomljiva kosa</b>			Da	
<b>Lomljivi nokti</b>			Da	
<b>Tiger-tail kosa</b>			Da	
<b>Kosa s manjkom sumpora</b>			Da	
<b>Smanjena kognitivna sposobnost</b>		Da	Da	Da
<b>Neuronska degeneracija</b>		Da		Da
<b>Senzoneuralni gubitak sluha</b>		Da	Da	
<b>Degeneracija retinalnog pigmenta</b>			Da	
<b>Gubitak subkutanog tkiva</b>			Da	
<b>Ataksija</b>		Da (kod nekih)	Da	
<b>Patuljasti rast</b>		Da (kod nekih)	Da	Da
<b>Skeletalne abnormalnosti</b>			Da	Da
<b>Mikrocefalija</b>				Da
<b>Kalcifikacija mozga</b>			Da (kod nekih)	Da

(\*COFS: Cerebro-okulo-facio-skeletalni sindrom; \*\*Ne-melanomski rak kože;

\*\*\*Melanomski rak kože)

Također imaju povećan rizik od različitih unutarnjih tumora što je rezultat akumulacije endogeno uzrokovanih oštećenja koje bi inače bile popravljene putem GGR-a. Mutacije kod ovih pacijenata prisutne su u genima koji su odgovorni za glavne NER reakcije te utječu i na TCR put. Pacijenti s mutacijama XPA pokazuju i neke dodatne simptome kao što je pojačana neurodegeneracija. To pokazuje vezu između TCR poremećaja i gubitka neurona, a sindrom je poznat kao De Sanctis-Cacchione sindrom.

Nedostatci u TCR-u uzrokuju akumulaciju transkripcijskih kompleksa zaustavljenih zbog oštećenja, koji ili nisu prepoznati putem GGR-a ili putem drugih sustava za popravak. Očigledno, transkripcija je vitalna za sve organizme i poremećaji u TCR-u ugrožavaju stanične funkcije, iniciraju preranu smrt stanica i posljedično ubrzavaju starenje. Posljedice mogu varirati od uzorka do uzorka, ovisno o metabolizmu, izloženosti genotoksinima, aktivnosti antioksidacijskih sustava i sustava za popravak kao što su GGR i popravak izrezivanjem baza (engl. *Base Excision Repair*, BER). To objašnjava progeroidni fenotip (fenotip ubrzanog starenja izražen kod mladih pacijenata) povezan s nedostatkom TCR-a u

ozbiljnim, progresivnim neurorazvojnim poremećajima kao što je Cockayne sindrom te još ozbiljniji cerebro-okulo-facio-skeletalni sindrom (COFS). Karakteristike ovih sindroma su rani prestanak rasta, mikrocefalija, mentalna retardacija kao posljedica dismijelinizacije, degeneracija mrežnice, senzoneuralni gubitak sluha, kaheksija, fotosenzitivnost i vrlo reduciran životni vijek. Prosječan životni vijek pacijenata s CS je 12 godina, dok kod pacijenata s COFS većinom manji od 2 godine. Kod pacijenata s CS starenje je većinom ubrzano u tkivima koja su sastavljena od nedjeljivih ili slabo djeljivih stanica kao što su neuroni i Schwannove stanice koje formiraju mijelinski ovoj. Međutim mogu biti zahvaćeni i ostali organi uključujući kostur, bubrege i jetru. Profiliranjem genske ekspresije u miševima s NER poremećajima, uključujući i TCR poremećaj, otkrivaju potiskivanje glavnih hormonalnih okosnica koje su odgovorne za rast i metabolizam. Umjesto toga, energija je usmjerena na održavanje i obrambene mehanizme, kao što su antioksidacijski mehanizmi i otpor na uvjete stresa. Na ovaj način te životinje vjerojatno pokušavaju produžiti kratak životni vijek što objašnjava smanjeni rast kod pacijenata s CS i sličnim poremećajima. Reducirani rast i poboljšani obrambeni mehanizmi zato pridonose nedostatku pojave tumora kod CS, dok nedostatak GGR i TCR pokazuju gotovo suprotne kliničke karakteristike kada su u pitanju pojava tumora i prerano starenje. To može biti objašnjeno disfunkcijom specifičnih molekularnih mehanizama i njihovih uloga u sprječavanju mutageneze i smrti stanica (Marteijn i sur., 2014).

### 3. Zaključak

Biološki odgovori na različite genetske poremećaje u posljednje vrijeme se sve više istražuju. Ovo područje ne samo da obuhvaća specifične mehanizme DNA popravka, već i povezanost tih mehanizama sa staničnim ciklusom, mutagenezom i apoptozom stanica u odgovoru na oštećenje DNA. Ono što ostaje nepoznanica je biokemijska uloga XPE proteina u stanicama sisavaca, uz različite uloge ostalih vrlo bitnih proteina kao što su XPB, XPD, ERCC1 i XPG. Sličnosti i razlike između prokariotskog i eukariotskog mehanizma NER-asu vrlo značajne, ali uočljivo je da je popravak kod eukariota evoluirao u drugom smjeru. Mnogi faktori mehanizma imaju dvojne funkcije i čini se da djeluju i u ostalim aspektima DNA metabolizma. NER je primarni primjer kako više od 30 proteina može djelovati zajedno u jednom mehanizmu otklanjanja širokog spektra različitih oštećenja. Pogreške u popravku molekule DNA povezane su smutagenezom i pojavnošću tumora. Impresivni napredak genetike nastavlja obećavati različite genske terapije kao mogućnost za liječenje određenih genskih poremećaja kao što je XP. Dotad naše razumijevanje temeljne veze između poremećaja u NER-u i sklonosti pojavi tumora kod ljudi zahtjeva ozbiljne preventivne strategije kao što su u prvom redu edukacija te rana dijagnoza.

#### 4. Literatura

Araujo SJ, Wood RD. 1999. Protein complexes in nucleotide excision repair. *Mutation Res* 435: 23-33.

Batty DP, Wood RD. 1999. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241: 193-204.

Costa RMA, Chiganças V, da Silva Galhardo R, Carvalho H, Menck CFM. 2003. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85: 1083-1099.

Friedberg EC. 2001. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 22-33

Van Houten B. 1990. Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Microbiol rev* 54(1): 18-51.

Hoeijmakers JHJ. 1993. Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. *Trends Genet* 9(6): 211-217.

Leibeling D, Laspe P, Emmert S. 2006. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Hist* 37: 225-238.

Maddukuri L, Dudzińska D, Tudek B. 2007. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 4. The role of nucleotide excision DNA repair (NER) system in mamalian cells. *Acta Biochim Pol* 54(3): 469-482.

Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ. 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 465-481.

Petit C, Sancar A. 1999. Nucleotide excision repair: From *E.coli* to man. *Biochimie* 81: 15-25.