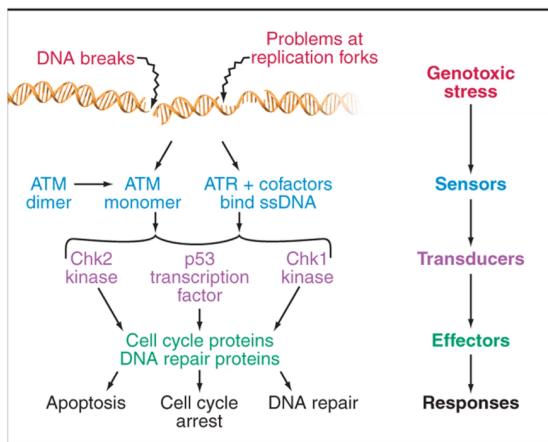


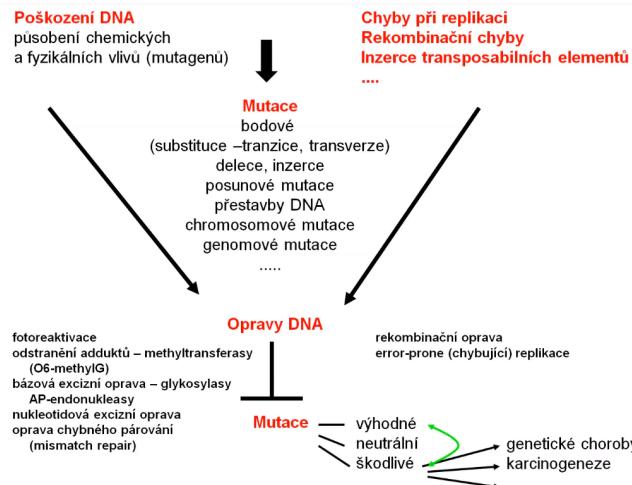
# Mutace



- shrnující obrázek z Pollarda – ukazuje některé typické problémy, se kterými buňka musí pracovat v případě, že se „rozhoduje“ o tom, zda bude pokračovat v další fázi buněčného cyklu
- v průběhu replikace (např. když dochází k zastavení pohybu replikační vidličky) vznikají neopravená jednořetězcová přerušení; pokud se objevují ve velkém množství, je to signál pro zahájení opravy (-> buňka zastavuje proces buněčného cyklu a pokouší se o opravu)
  - rozeznáváno ATR kinázou (příbuzná k ATM); heterodimer ATR a inhibitor rozeznává jednořetězcové úseky, které jsou obsazeny RPA bílkovinou a dalšími sensing bílkovinami -> dochází k aktivaci ATR -> fosforyluje (aktivuje) další efektorové bílkoviny, které zprostředkovají / přenesou signál dál k efektorovým molekulám (ty např. zastaví buněčný cyklus, spustí opravné DNA mechanismu)
  - klíčové přenášeče signálu (transducers): p53 (+ regulační proteiny okolo), Chk1 kináza (checkpoint 1 kináza)
  - -> kaskáda vedoucí k zastavení buněčného cyklu, opravě DNA; pokud je opravení příliš velké, může dojít k indukování apoptózy
- podobný signál: dsDNA zlomy – rozeznávány MRN komplexem; ten je rozpoznáván multimerem ATM (kináza, vyskytuje se jako dimer/multimer) – její interakce s místem poškození, kde se začínají hromadit senzory (bílkoviny, které rozpoznávají příslušné poškození) -> monomerizace ATM (tím se aktivuje) -> fosforylace přenášečů signálu (Chk2 kináza, p53 a další)
  - jedním z klíčových přenášečů signálu a senzorů poškození (často se používá jako detektor poškození v buňce) je *histon H2AX* (jeho fosforylovaná forma – fosfo-H2AX, popř. γ-H2AX – typický marker ukazující dsDNA zlomy)
  - specifická protilátka na γ-H2AX – detekci shluků tohoto fosforylovaného histonu na chromozomech můžeme detektovat dsDNA poškození
- co způsobuje ss/dsDNA zlomy
  - *virové enzymy* – cílem viru je zlomy co nejrychleji opravit (pokud jde o integrující se virus – virus s chronickou strategií – není masivní poškození)
  - *oxidační agens* – jen pokud je poškození vskutku masivní (organismus nepřežije)
  - *záření* – toto poškození může vznikat masivně, buňka toto poškození může opravovat; např. gama záření – vznikají ss/dsDNA zlomy, záleží na tom, zda buňka přežije nebo ne; záleží na typu záření, zásahu do tkáně (např. UV záření způsobuje pyrimidinové dimery, tvrdší záření zlomy)
  - *zablokovaná topoizomeráza (II)* -> dsDNA zlomy; pomocí agens blokujících topoizomerázy se dají studovat mechanismy oprav DNA (-> uvidíme ATM kinázu,

vznikají „centra“, kde dochází k rozpoznání dsDNA poškození, amplifikaci signálu a jeho přenosu dál)

- *restriktázy* – typicky bakteriální enzymy, které jsou součástí aparátu buňky, kterým se brání proti cizorodé DNA, umí štěpit DNA, rozpoznávat vlastní a cizí
- *amplifikace signálu* – γ-H2AX zpětně indukuje vazbu dalších ATM monomerů – probíhá po určitou dobu -> podle množství poškození větší nebo menší buněčná odpověď



- shrnutí toho, jak vzniká poškození DNA, čím je způsobeno, jaké druhy poškození DNA máme, jakým způsobem je poškození opravováno
  - *důležitost termínů*
  - změny v DNA: jsou to mutace? jsou výhodné/nevýhodné/neutrální?
- změny v DNA nejsou obecně něco neprospěšného pro život a živé organismy; z pohledu evoluce v přijatelné míře výhodné
- těžko můžeme říct, které mutace jsou výhodné/neutrální/škodlivé – např. mutace v globinových genech, které způsobují anémii v oblastech s malárií, přináší nositelům výhodu před infekcí Plasmodii; mutace v genu CCR5 -> rezistence vůči infekci HIV (dvojčata v Číně – pokud je tento gen deletován, má to další důsledky, např. vyšší náchylnost k respiračním chorobám)
- -> změna v DNA nemusí být škodlivá ve všech případech / prostředích, závisí na okolnostech
- *poškození DNA*
  - vlivem chemických a fyzikálních vlivů – viz výše (mutageny obecně)
  - viry (a jejich začleňování do genomu)
  - chromozomové přestavby
  - *transpozibilní elementy* – jejich inzerce a nekontrola může vést k přerušení genů, k jeho jiné regulaci (umlčení/exprese)
  - bodové mutace (inzerce/delece) – *jednobázové indely* (popř. vícebázové – mohou zahrnovat jakékoli délky úseků DNA)
  - posunové mutace (-> posun čtecího rámce -> genom může dávat jinou informaci)
  - chromozomové mutace (delece, přestavby)
  - genomové mutace
- většina rozdílů mezi lidmi je způsobena *jednobázovými indely* – individuální lidské genomy se liší zpravidla jednobázovými polymorfismy, které se pak fixovaly v průběhu evoluce
- organismy mají různou toleranci ke chromozomovým poškozením, vzniku aneuploidii, fúzím genů apod. (např. rostliny obecně vydrží mnohem více než člověk – rostliny zvládnou triploidii, člověk ani trisomii)
- *opravy DNA*

- *fotoreaktivace* – pyrimidinové dimery
- *bázové excizní opravy*
- *nukleotidové excizní opravy*
- *oprava chybného párování*
- *rekombinační oprava* – pokud není k dispozici templát, aspoň spojí konce tak, aby vznikl ucelený kus DNA (a nevznikaly holé konce chromozomů)
- opravy velkého i malého rozsahu – od pár bází přes tisíce
- *chybuječné opravy* – DNA polymeráza narazí na adukt / problém, který není schopna vyřešit, tento problém nevyřeší ani opravné mechanismy; v některých případech může buňka toto místo vynechat / dát místo něj jakoukoliv jinou sekvenci -> nedůležitá DNA (buňka může takovou opravu přežít)
- *spontánní poškození DNA*
  - poškození DNA chemickými / fyzikálními vlivy, které vznikají uvnitř buňky (např. reaktivní kyslíkové formy – v buňce vznikají radikály, které mohou způsobovat poškození DNA)

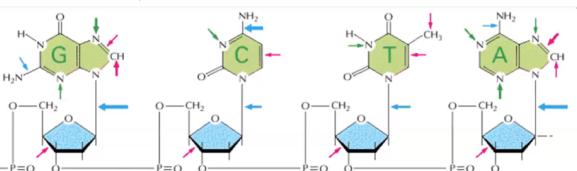
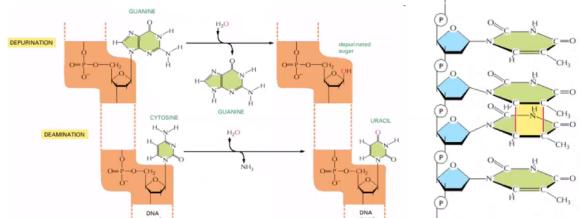


Figure 5-46 A summary of spontaneous alterations likely to require DNA repair. The sites on each nucleotide that are known to be modified by spontaneous oxidative damage (red arrows), hydrolytic attack (blue arrows), and uncontrolled methylation by the methyl group donor S-adenosylmethionine (green arrows) are shown with the width of each arrow indicating the relative frequency of each event. (After T. Lindahl, *Nature* 362:709–715, 1993. © Macmillan Magazines Ltd.)



- uvnitř buňky vzniká řada metabolitů, které buňka potřebuje / mezimetabolity, které se mohou vázat na DNA a tvořit addukty – typicky *S-adenosyl-methionin*
  - tato látka je vysoce energetická, zdroj methylové skupiny, využívána v celé řadě procesů
  - poměrně reaktivní – občas metyluje molekuly v buňce „bez výzvy enzymy“, mezi které patří i DNA
  - na obrázku – tloušťka šípek zvýrazňuje pravděpodobnost, s jakou k poškození na příslušných místech dochází

Table 1 Time needed for a single event at pH 7.4 and 37 °C

Event	Time (h) for event in <sup>a</sup>	
	Single-stranded DNA (2 × 10 <sup>6</sup> bases)	Double-stranded DNA (1 × 10 <sup>6</sup> bp)
Depurination	2.5	10
Depyrimidination	50.8	200
Deamination of C	2.8	700
Deamination of A	140	ND <sup>b</sup>

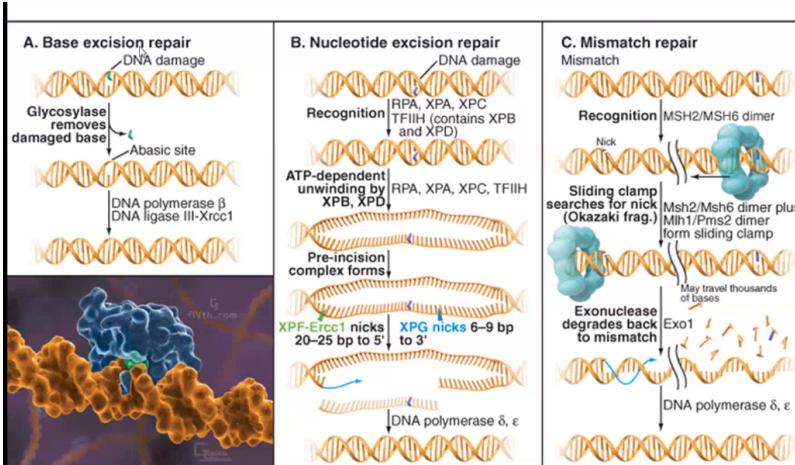
<sup>a</sup>Data computed from the rate constants for these events.

<sup>b</sup>ND, not determined.

After Shapiro (1981).

- - jak často k jednotlivým typům poškození dochází
  - rozdíl mezi sklonem k poškození v ss/dsDNA
- *deaminace cytosinu (cytidinu)* -> vzniká uracil (přes enol formu, která je přesmyknuta do keto formy – uracil)
  - v DNA řetězci uracil naproti guaninu (uridin naproti guanosinu, mluvíme-li v nukleosidech)
  - uridin s guanosinem páruje poměrně dobře – poměrně stabilní párování; tento pář ale vypadá jinak než ostatní párování, není tak stabilní jako ostatní -> uracil se

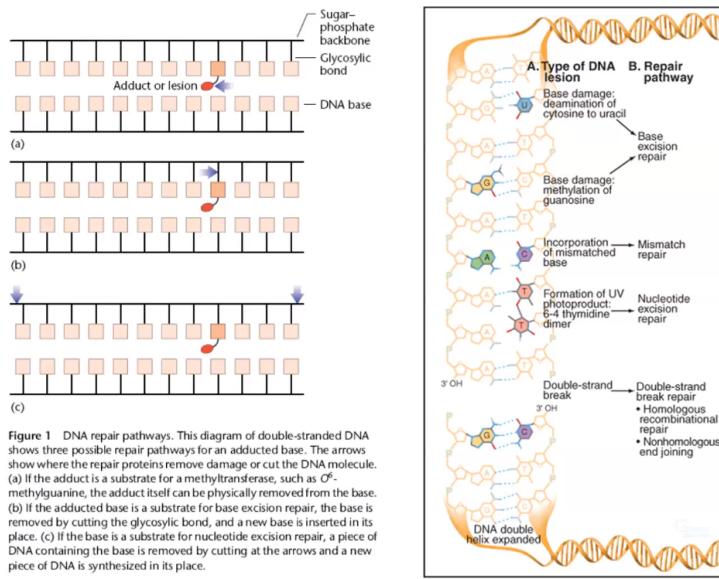
- z řetězce může přetočit do druhé polohy (z anti polohy jde do syn polohy -> vyklonění uracilu ven; distorze na dvojřetězci -> příležitost pro opravu problému)
- **bázová excizní oprava** -> odštěpení uracilu specifickou uracil-DNA-glykosylázou -> apyrimidinní místo (pokud je na DNA apyrimidinní/apurinní místo, takovéto místo je rozpoznáváno apurinní/apyrimidinní endonukleázou) -> rozeznání apyrimidinní endonukleázou – ta štěpí cukrnofosfátovou kostru -> místo bez nukleotidu (jednobázové přerušení) -> doplnění opravou DNA polymerázou  $\beta$  -> jednořetězcové přerušení opraveno ligázu
  - enzymy rozeznávají DNA z hlediska struktury; bílkoviny, které se váží na konkrétní sekvenci, rozeznávají globální strukturu, kterou sekvence tvoří (v tomto případě je rozeznávanou strukturou distorze na dsDNA, kterou rozeznává uracil-glykosyláza)
  - cytidin je v genomech nukleosidem, který je velmi často metylován na 5. pozici; deaminace metylovaného cytosinu -> thymidin a guanosin naproti sobě; musí dojít k rozhodnutí, která z těchto bází je správně (častější posun k AT páru - nahrazení guanosinu adenosinem; existují thymin-DNA-glykosylázy, které vyštěpí thymin, ale je to problematičtější situace a častěji dochází k posunu k AT páru)
  - -> v eukaryotních genomech vznikají CpG ostrovky – místa s velkým obsahem GC páru, kde často cytosin hraje regulační roli a je zde evoluční tlak, aby zde cytosin zůstával



© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

**NER (*E. coli*)** – poškození detekováno UvrA+UvrB > vazba UvrC – štěpení > UvrD vytěsnění ssDNA > doplnění DNA Pol

**MMR (*E. coli*)** – poškození detekováno dimer MutS > MutS+MutL+DNA komplex > aktivace MutH + další bílkoviny > vytěsnění, degradace poškozeného řetězce  
(specifické pro nově syntetizovaný řetězec – bakterie Dam methylace)



**Figure 1** DNA repair pathways. This diagram of double-stranded DNA shows three possible repair pathways for an adducted base. The arrows show where the repair proteins remove damage or cut the DNA molecule. (a) If the adduct is a substrate for a methyltransferase, such as O<sup>6</sup>-methylguanine, the adduct itself can be physically removed from the base. (b) If the adducted base is a substrate for base excision repair, the base is removed by cutting the glycosidic bond, and a new base is inserted in its place. (c) If the base is a substrate for nucleotide excision repair, a piece of DNA containing the base is removed by cutting at the arrows and a new piece of DNA is synthesized in its place.

© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

- **modifikace nukleotidu reaktivní molekulou – metylace na konkrétních pozicích nukleotidů, např. na O-6-methylguanin**
  - řada organismů má možnost takovouto chybu odstranit a odstranit methylovou skupinu methyltransferázou
  - další možnosti je vyštěpení takového nukleotidu + několik nukleotidů kolem – *nukleotidová excizní oprava*
- buňka nemůže mít enzym na každý typ poškození, který se může na DNA objevit (na příslušný nukleotid se může navázat prakticky cokoliv, ale mají např. enzymy na nejčastější metylace a odstraňování podobných typů poškození)
  - další enzymy odstraňující poškození DNA – např. *DNA alkyltransferázy*
    - oprava ss poškození
    - přímá oprava
    - nevede k chybám
    - i mimo období replikace
    - oprava určitých typů alkylačních poškození DNA
    - bakterie a eukaryota
    - odštěpují z báze navázanou alkyllovou skupinu
    - typy
      - **MGMT** – přímý přenos alkyllové skupiny na Cys ve vlastním aktivním centru enzymu („sebevraždený enzym“ – po této akci už nikdy nemůže působit při opravách, musí být degradován)
      - **ALKBH** – zatím nevíme
      - rozeznání alkylované báze DNA alkyltransferázami a jim podobnými proteiny může také indukovat jiné opravné systémy (např. bázovou nebo nukleotidovou excizní opravu)
- **poškození UV zářením -> pyrimidinové dimery – 2 pyrimidiny, které jsou vedle sebe na řetězci, často se spojují cyklobutanovým kruhem**
  - řada organismů má enzym, který je schopen toto poškození v přítomnosti světla najít a odstranit jej (využívají k přerušení cyklobutanového kruhu energii světla)
  - evolučně velmi starý mechanismus – u všech velkých skupin organismů (bakterie, archaea i eukaryota)
  - velmi výhodný mechanismus
  - placentální saveci tuto možnost ztratili (ale vačnatci tuto opravu ještě mají)
  - systém umožňující efektivně opravovat pyrimidinové dimery
  - enzym *photolyáza*

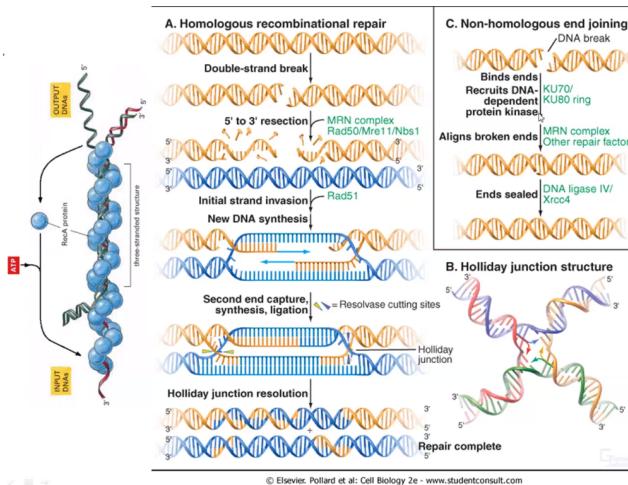
- *vsuvka z genetiky*
  - fotoreaktivací reparace
    - oprava ss poškození
    - přímá oprava (vede k původnímu stavu)
    - nevede k chybám
    - i mimo období replikace
    - **DNA fotolyáza** – oprava **pyrimidinových dimerů** (aktivace absorpcí světla)
      - 2 kofaktory: FAD a MTHF (methylen tetrahydrid floát)
      - enzym se naváže na DNA v místě thyminového dimeru, vyhodí thyminový dimer zprostředka DNA ven (na okraje); pokud je aktivován světlem a světlo absorbuje MTHF -> vybuzení elektronu z FAD -> elektron přenesen na thyminový dimer -> přerušení kovalentních vazeb -> reaktivace FAD -> enzym vrátí opravené dimery dovnitř není u savců
  - *nukleotidová excizní oprava*
    - opravný mechanismus lokalizuje na jednom z řetězců poškození -> rozvinutí řetězce do malé bublinky
    - jeden řetězec v blízkosti poškození na obě strany vyštěpen (degradován) a následně dosyntetizován
    - mechanismus rozpoznávající poškození u nukleotidové excizní opravy – *RPA* (-> bublina stabilizovaná RPA proteinem); XPA, XPB, XPC, XPD, XPF, XPG (XP – geny pro tyto proteiny byly objeveny v souvislosti s onemocněním *xeroderma pigmentosum* – toto onemocnění zabírá vycházet ven na sluneční světlo – rakoviny kůže -> lidé nemají účinnou fotolyázu)
    - *TF2H* – bílkovinný komplex (důležitější v transkripci) – transkripční faktor polymerázy 2H; hraje roli v rozvíjení DNA řetězce při transkripci pro RNA polymerázu; má i jinou funkci při nukleotidové excizní opravě
      - -> transkripcí může ovlivňovat, jak rychle budou opravovány chyby na chromozomu (v úsecích, které jsou silně transkribovány, je lepší oprava mutací)
      - řada bílkovin má celou řadu dalších funkcí než kanonických, které považujeme za hlavní (člověčí škatulkování)
      - více různých funkcí může vést k tomu, že děje, které bychom neočekávali, mohou být propojeny přes bílkovinné komplexy / jeden děj odčerpává faktor pro jiný
      - tvorba bublinky, vazba do komplexu, zprostředkovává štěpení v okolí místa poškození, výměny XPC za XPG, XPF, degradace řetězce, syntéza nového, pomocí ligázy spojení
    - *bakterie*
      - k rozpoznání poškození dochází pomocí bílkovin UvrA+UvrB (zkoumání na opravách po ozáření buněk UV) -> vazba UvrC (štěpení), UvrD (helikáza) -> DNA polymeráza I doplní chybějící řetězec -> spojení ligázou
    - *NER z genetiky*
      - oprava ss poškození
      - nepřímá oprava
      - nevede k chybám
      - i mimo období replikace

- závislé na homologii řetězců DNA
- nevyžaduje rekombinaci DNA
- oprava většich poškození DNA + cross linking
- bakterie i eukaryota
- účast komplexu proteinů se specifickou endonukleázovou = *excinukleázovou aktivitou* – tento komplex rozpozná poškození a vyštěpí jednořetězcový oligonukleotid (o určité délce), který toto poškození obsahuje
  - DNA helikáza – rozvolní dvoušroubovici DNA
  - DNA polymeráza – dosyntetizuje chybějící část řetězce podle komplementárního vlákna DNA
  - DNA ligáza – poté spojí oba konce přerušeného řetězce
  - typy
- *global genome NER (= GGR)* – opravy kdekoliv v genomu
- *transcription-coupled NER (= TCR)* – opravy pouze v transkripčně aktivních oblastech
- *NER u Escherichia coli*: excinukleáza UvrC (UvrA, UvrB – váží se na DNA v místě poškození, zjistí, že místo má být opraveno, přitáhnou UvrC) udělá 2 zlomy; helikáza a DNA polymeráza přijdou na opravu (*GGR*)
  - *TCR*: UvrA, UvrB jsou na místo poškození přitáhnuty díky tomu, že se na tomto místě zastavuje RNA polymeráza; dále pokračuje stejně jako *GGR*
- *NER u člověka*: na místo poškození se nejdříve vážou komplexy XPE -> rozeznávány multiproteinovým XPC komplexem, který DNA v místě poškození rozvolní a umožní, aby přišly nukleázy a udělaly zlomy na obou stranách poškození; aktivace NER zaražením RNA polymerázy (-> přitažení excinukleázového komplexu a opravných helikáz, polymeráz atd.)
- *NER při opravě crosslinking*: u buněk, které se nedělí (nikoliv během replikace); fungují stejné komplexy jako u oprav poškození DNA; na doplnění „propasti“ se uplatňují translézní (specializované) DNA polymerázy
- mutace v genech pro proteiny NER -> dědičné choroby
  - *xeroderma pigmentosum*: extrémní citlivost kůže na sluneční záření, extrémní nádorovost kůže, neurologické degenerace
  - *Cockayne syndrom*: opožděný růst, mentální retardace
- *mismatch oprava (MMR)*
  - oprava chybně vložené báze
  - u všech organismů existují homologní bílkoviny – homology MutS/MutL
  - dimer MutS (jeho homolog) u eukaryot – dimer MSH2/MSH6 – rozeznává chybu na DNA
  - v případě, že rozezná chybu, interaguje s dimerem MutL (dimer Mlh1/Pms2) – tvoří „klouzající prstýnek“, který pokračuje po řetězci DNA, i když zachovává informaci, kde byla příslušná mutace (vzniká „smyčka“), pokračuje po dsDNA tak daleko, až rozpozná místo, podle kterého může určit, zda se jedná o mateřský / dceřiný řetězec; pokud je poškození v dceřiném řetězci, je odbourán exonukleázou, doplněn DNA polymerázou a spojen ligázou (zjednodušený systém opravy pomocí MutS/MutL homologů)
  - různé řetězce – různé odlišení mateřského a dceřiného řetězce
  - G<sup>-</sup> bakterie (např. *E. coli*) – speciální systém rozpoznávání mateřský/dceřiný řetězec – obsazování GATC míst v místě replikačního počátku; pokud jsou

hemimetylována (chvíli poté, co tudy projela replikační vidlička), je na tato hemimetylovaná GATC místa navázána bílkovina MutH; pokud dojde k tomu, že MutS/MutL komplex jde po DNA od poškození někam a narazí na MutH, dojde k aktivaci MutH (slabá endonukleáová aktivita) – štěpí dceřiný řetězec – odbourán, vytěsněn, degradován (s časovým odstupem za replikační vidličkou je všechno metylováno – replikační uzel jede po genomu, nově vznikající DNA jsou hemimetylovány, za nimi dochází k methylaci; syntéza nové DNA je rychlá – je možné, že bude odbouráno velké množství nukleotidů)

- způsob, kdy je přítomna MutH nukleáza, je specifický jen pro některé G<sup>-</sup> bakterie
- řada organismů rozpoznává mateřský/dceřiný řetězec podle toho, že nejsou dokončeny opravy Okazakiho fragmentů; u eukaryot se rozpoznání nedokončených Okazakiho úseků účastní PCNA clamp (svorka, která zůstává po jednotlivých krocích Okazakiho fragmentů), dokud není odstraněn
- tato oprava vyžaduje replikaci – probíhá hned po replikaci, *koreplikační oprava*; poškození typu „máme somatickou buňku, která je poškozena zářením“ mismatch nikdy neopraví
- oprava, která opravuje chyby, které nebyly opraveny proofreading aktivitou DNA polymerázy
- *mismatch z genetiky*
  - oprava ss poškození
  - nepřímá oprava
  - nevede k chybám
  - během replikace DNA
  - závislé na homologii řetězců DNA
  - oprava chybného prováni nukleotidů nebo inzerčních a delečních smyček
  - pojistka pro opravu chyb, které zůstaly po proofreading aktivitě polymerázy; oprava chybně spárovaných chromozomů
  - bakterie i eukaryota
  - závislé na rozpoznání původního a nově navázaného řetězce DNA opravným systémem (DNA polymeráza zařazuje normální báze, ale může bázi zařadit chybně)
  - bakterie: původní templátový řetězec metylován -> nové vlákno velmi dobře rozeznatelné, protože ještě není metylované
  - eukaryota: přesný rozeznávací systém zatím není přesně znám
  - *průběh*
    - protein(y), které rozeznají chybu v DNA a navážou se na dané místo
    - proteiny, které rozeznávají mateřský a dceřiný řetězec; mívají endonukleázovou aktivitu -> jednořetězcové naštěpení nového řetězce (neudělá se přímo v místě špatného spárování, ale o velký kus dál)
    - exonukleázy: degradace velkého kusu dceřiného řetěze, který o kus dál obsahoval původní chybu, dojde k místu poškození -> vznik velkých jednořetězcových mezer
    - DNA helikáza – rozvolní dvoujšroubovici DNA
    - DNA polymeráza – dosyntetizuje chybějící část řetězce podle komplementárního vlákna DNA
    - DNA ligáza – poté spojí oba konce příslušného řetězce
  - mutace v genech pro proteiny MMR -> dědičné choroby
    - Lynchův syndrom -> mnohačetné nádory tlustého střeva

- jeden z mechanismů, kterým dochází ke genovým konverzím během meiózy
- *genová konverze* = jednosměrný nereciproký přesun genetického materiálu z donorové do akceptorové molekuly DNA
- při meióze – přenos mezi nesesterskými chromatidami homologických chromozomů
- týká se krátkých úseků DNA (vytvoří se Hollidayova struktura, vmezeří se DNA...) při rekombinaci v meióze (jednosměrný přesun informace z jednoho chromozomu do druhého – mismatch mechanismy rozeznávají DNA, kterou mají opravit)
- *alelická (interalelická)* – alela na jednom homologickém chromozomu je nahrazena alelou z nesesterské chromatidy druhého homologického chromozomu (během meiózy)
- *nealelická (ektopicická)* – paralogní genetická sekvence nahradí jinou paralogní sekvenci (mimo meiózu) (přesun mezi sesterskými chromatidami; přesun mezi paralogickými sekvencemi na stejně chromatidě) (vznik jinými mechanismy než mismatchem)
- genetické důsledky genové konverze u heterozygotů – odchylky od očekávané dědičnosti



- *homologní opravy*
  - při dsDNA hraje roli rozpoznání místa – MRN komplex, Rad51 protein (eukaryota), popř. funkční analog RecA (bakterie)
  - RecA (Rad51) kooperativně vytěsní RPA protein na ssDNA úseku, obsadí jedno vlákno, toto vlákno umožní invadovat (vmezeřit se) do homologní sekvence DNA; pokud jsou dvě stejné nebo podobné kopie, může dojít k homologní opravě
  - pokud dojde k vmezeření v místě přerušení, překřížení (Hollidayovy struktury) se mohou volně pohybovat a snadno se posunou někam jinam
  - dvouretězcové přerušení mizí
  - genové inženýrství – využívání organismu s velmi posílenou homologní opravou – *Saccharomyces cerevisiae*
- *homologní opravy DNA z genetiky – HR* (= závislá na homologní rekombinaci) (homology recombination-dependent repair)
  - oprava ds poškození
  - nepřímá oprava
  - může vést k chybám (x většinou bývá bezchybná)
  - i mimo období replikace
  - závislé na homologii řetězců DNA
  - vyžaduje rekombinaci DNA

- oprava dvouřetězcových zlomů DNA i zaseknutí replikace DNA
- nižší eukaryota
- mnoho různých mechanismů, hlavní kroky ale společné:
  - *iniciace* – dvouřetězcový zlom musí být rozeznán, úprava jeho konců, jeho zvětšení a vznik ssDNA (účast zejména DNA nukleáz a helikáz)
  - *strand invasion* – hledání a párování homologických sekvencí (účast proteinů specificky se vážících na jednořetězcovou DNA – RecA/Rad51 apod. SSB proteinů)
  - *branch migration* – DNA syntéza podle homologického vlákna, rekombinace (účast zejména různých helikáz, DNA polymeráz a jiných proteinů)
- bakterie
  - *RecBCD dráha* (opravy dvojřetězcových zlomů) (komplex 3 proteinů, které se váží na zlom; jeden funguje jako helikáza, rozvolňuje šroubovici, dokud nedojde k chì sekvenci, kde endonukleáza řetězec naštěpí; volný 3'-OH konec -> další rozvolňování 3'-ssDNA a vazba RecA proteinů -> hledání homologické sekvence -> strand invasion)
  - *RecFOR dráha* (opravy jednořetězcových zlomů, zaseknutí) (5'->3' exonukleáza RecJ -> degradace jednoho řetězce DNA směrem od místa DSB, na vzniklé ssDNA vlákno se vážou SSB proteiny; proteinový komplex RecFOR se váže na rozhraní ds/ssDNA -> nahrazení SSB proteinů RecA -> hledání homologické sekvence -> strand invasion, tvorba D-smyčky)
  - dokončení: RuvAB proteiny v součinnosti s endonukleázou RuvC -> dHJ resolution nebo dissolution (ne SDSA)
- eukaryota
  - vazba Ku proteinů do místa DSB (-> stabilizace konců) -> asociace komplexu MRX (kvasinky) nebo MRN (savci) (ty kousek dál od dvouřetězcového zlomu naštěpí oba řetězce DNA – 2 jednořetězcové zlomy; příbuzné exonukleázy degradují ssDNA po obou stranách od místa DSB -> 3'-přesahy ssDNA na obou stranách DSB, na které se vážou RPA proteiny; výměna RPA za RAD51 -> hledání homologické sekvence -> strand invasion, tvorba D-smyčky -> heteroduplexová DNA -> branch migration)
  - podobné klasické meiotické rekombinaci, ale případě oprav DSB u eukaryot se ale všechny tyto procesy obvykle neodehrávají mezi nesesterskými chromatidami homologických chromozómů, ale mezi sesterskými chromatidami téhož chromozómu
- dokončení reparace závislé na HR u bakterií i eukaryot
- break-induced replication (BIR)
  - slouží k opravám „jednostranných“ DSB (např. při kolapsu replikačních vidlic kvůli lézii DNA)
  - spolu s SDSA další z možných příčin genové konverze (-> delší konvertované úseky)
  - (shrnutí: existuje řada vyústění, v každém se účastní zhruba tytéž proteiny a další složky)
- oprava crosslinking u eukaryot
  - v dělicích se buňkách během S-fáze
  - účast BRCA proteinů
- mutace v genech pro proteiny účastnící se reparace závislé na HR -> dědičné choroby

- mutace v genech BRCA1, BRCA2 -> karcinom prsu, vaječníku (produkty těchto genů interagují s RAD51 nebo jeho homology)
  - Bloomův syndrom – mutace v genu BLM, jehož produktem je helikáza podílející se na vzniku ssDNA přesahů při iniciaci reparace DSB pomocí HR; malá postava až trpaslickví
  - Fanconiho anémie – mutace v některém z genů, jejichž produkty se účastní reparace cross-linking mezi DNA řetězci pomocí HR
    - autozomálně recesivní dědičnost
- *NHEJ (= non homologous end joining) = reparace spočívající v nehomologickém spojení konců*
  - hlavní způsob oprav DSB u vyšších eukaryot
  - oprava ds poškození
  - nepřímá oprava
  - vede k chybám
  - mimo období replikace DNA
  - nezávislé na homologii řetězců DNA
  - nevyžaduje rekombinaci DNA
  - oprava ds zlomů DNA + crosslinking mezi DNA a proteiny
  - dimer Ku proteinů, který rozezná DSB, se naváže na dané místo a dočasně stabilizuje konce DSB (u savců působí v součinnosti s DNA-dependentními proteinkinázami)
  - následně nastupují DNA nukleázy a DNA polymerázy (úprava konců přerušených řetězců tak, aby byly kompatibilní) + DNA ligázy (spojí oba konce přerušených řetězců)
  - bakterie: LigD protein (délá všechno naráz)
  - eukaryota: více specifických proteinů
  - sama o sobě navozuje mutace (delece, adice – většinou menšího rozsahu) (klasická NHEJ ale zřejmě méně často než alternativní formy NHEJ)
  - i když se obvykle spojují konce stejněho řetězce DNA, mohou se spojit např. různé chromozomy -> chromozomové přestavby
  - mutace v genech pro proteiny účastnící se NHEJ reparace -> dědičné choroby
    - především závažné imunodeficiency = SCID
- *alternativní mechanismy oprav ds zlomů* (jsou error-prone, částečně závislé na homologii):
  - *Alt-EJ (= alternative end joining)*
    - zejména MMEJ (microhomology-mediated end joining), ale zřejmě i další mechanismy
    - endo/exonukleázy -> úprava konců DSB -> vazba RPA proteinů přesahující ssDNA řetězce
    - párování obou ss řetězců v oblastech mikrohomologie mezi nimi
    - FEN1 endonukleáza -> odstranění přesahujících ssDNA oligonukleotidů (flap trimming)
    - DNA polymeráza, DNA ligáza -> doplnění případných mezer v DNA řetězcích a spojení řetězců
  - *SSA (= single strand annealing)*
    - oprava DSB mezi dvěma repetitivními sekvencemi
    - endo/exonukleázy -> úprava konců DSB -> vazba RPA proteinů na přesahující ssDNA řetězce
    - vazba specifického proteinu na repetitivní sekvence v takto vzniklé ssDNA po obou stranách původního DSB -> annealing
    - specifické nukleázy -> odstranění přesahujících ssDNA oligonukleotidů

- DNA polymeráza, DNA ligáza -> doplnění případných mezer v DNA řetězcích a spojení řetězců

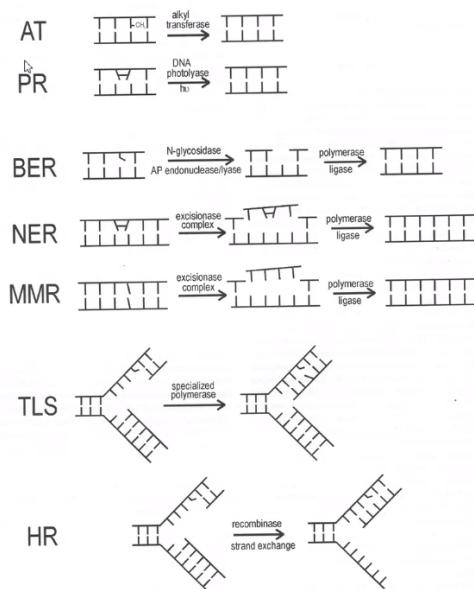


Figure 2. Molecular strategies for coping with DNA damage. Schematic summary of the molecular events associated with damage reversal, damage excision, and damage tolerance. Abbreviations: AT, alkyl transfer; PR, photoreactivation; BER, base excision repair; NER, nucleotide excision repair; MMR, mismatch repair; TLS, trans-lesion synthesis; HR, homologous recombination. Some of the processes (HR, in particular) are shown greatly simplified; for comprehensive review, see Friedberg et al. (26).

Table 2. Representation of major DNA repair pathways in microbial genomes<sup>a</sup>

Genus	<i>T<sub>opt</sub></i> <sup>b</sup>	AT	PR	BER	NER <sup>c</sup>	MMR	TLS	HR <sup>d</sup>
<i>Archaea</i>								
<i>Methanoscirrina</i>	37	+	+	+	Uvr	+	+	RadA
<i>Halobacterium</i>	50	+	+	+	Uvr	+	+	RadA
<i>Thermoplasma</i>	59	?	No	+	No	No	No	RadA
<i>Methanothermobacter</i>	65	+	+	+	Uvr	No	No	RadA
<i>Sulfolobus</i> <sup>e</sup>	80	+	+	+	No	No	+	RadA
<i>Archaeoglobus</i>	83	+	No	+	No	No	No	RadA
<i>Pyrobaculum</i> <sup>f</sup>	98	+	No	+	No	No	No	RadA
<i>Pyrococcus</i>	98	+	No	+	No	No	No	RadA
<i>Bacteria</i>								
<i>Escherichia</i>	37	+	+	+	Uvr	+	+	RecA
<i>Thermotoga</i>	80	+	No	+	Uvr	+	No	RecA
<i>Eucarya</i>								
<i>Saccharomyces</i>	30	+	+	+	Rad	+	+	Rad51

<sup>a</sup>Compiled from The Institute for Genomic Research Comprehensive Microbial Resource (TIGR CMR, version 16.0; <http://pathema.tigr.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>). In the table, “+” indicates that sufficient relevant COGs (gene families) are represented in the genome to form a functional pathway; “?” indicates a match of marginal significance ( $P > 10^{-5}$ ), and “No” indicates that the necessary homologs are not present. For pathway abbreviations, see the legend to Fig. 2.

<sup>b</sup>Temperature (°C) yielding fastest growth (approximate).

<sup>c</sup>“Uvr” indicates a complete pathway of the bacterial type; “Rad” indicates a complete pathway of the eucaryal type.

<sup>d</sup>Family of recombinase found; see Sandler et al. (92) for molecular differences among the families.

<sup>e</sup>Members of the Crenarchaeota; all other archaea listed are members of the Euryarchaeota (122).

- bázová excizní oprava je velmi rozšířená, stejně jako homologní rekombinační opravy
- alkyltransferázy a jejich využití pro opravu methyl-aduktů na DNA jsou poměrně časté

# Analýza mutagenicity

## Testování mutagenicity

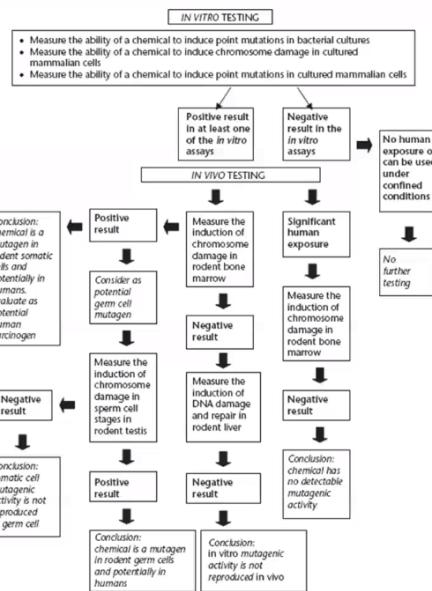
*in silico*  
*in vitro*  
*in vivo*

### Amesův test

*Salmonella typhimurium his-*  
paleta kmenů – mutace bodové  
posunové  
mutace v DNA opravných mechanismech  
mutace v tvorbě LPS  
nadprodukce nitroreduktáz, acetyltransferáz....

#### Conclusions

Short-term bacterial mutation assays such as the Ames/*Salmonella* assay cannot alone predict the consequences of exposure in animals or humans. The mechanism for the formation of mutations and their repair is much more complex in higher organisms. Data from mammalian cells and whole organisms such as plants, insects and animals are needed to confirm and extend the microbial results. Ultimately a battery of tests is needed to compensate for the inadequacies of short-term tests in detecting specific mutagens. It is important therefore to recognize both the limitations and advantages of the Ames/*Salmonella* assay.



Strategy for the detection of the mutagenic activity of a chemical.

- člověk je obklopen novými látkami, které syntetizuje; je potřeba je testovat na jejich vliv na lidské zdraví
- je důležité přemýšlet, jak látky testovat
- řada testů mutagenicity
  - pomocí modelování
  - podle toho, jak jsou reaktivní – v *in vitro* prostředí bez použití buněčných linií
  - za použití mikrobiálních / buněčných linií
  - testování na živých organismech
- problém: veškeré testování, má-li být dokonalé, dříve nebo později skončí na testování na zvířecím modelu
- *Amesův test*
  - využívá kmeny *Salmonella typhimurium* – celou paletu kmenů, které nejsou schopny syntetizovat AK histidin (do média jim musí být přidán histidin, aby rostly, pokud je kultivujeme na médiu bez něj, netvoří kolonie a nerostou)
  - poškozené geny v řetězci pro biosyntézu histidinu jsou poškozeny různým způsobem
  - můžeme studovat, jaká je spontánní reverze mutací (jak často se objevují kmeny, které zpětně mutují tak, aby mohly růst na médiu bez histidinu); tuto změnu můžeme podnítit
  - mutace, která neumožňuje bakterii růst tam, kde by růst mohla: pokud dojde k vyšší frekvenci záměn v místě, kde byla původní mutace, a k tomu, že se s vyšší pravděpodobností bude objevovat opravená verze genu, budou bakterie růst na i na médiu bez histidinu
  - -> můžeme sledovat, zda jsou testované látky mutagenní, a jakým směrem (máme mnoho kmenů, kde je různá varianta mutace: zámenná, posunová...)
  - řada látek se nedostane do bakterií
  - byly připraveny kmeny se zvýšenou schopností ponechávat si cizorodé látky uvnitř buňky (řada buněk všech organismů má tendenci pomocí transportérů vyhazovat nežádoucí látky z buněk); se sníženou tvorbou lipopolysacharidů (buněčné stěny -> látky z prostředí se snáze dostanou dovnitř) atd.

- potraviny / farmaka: většina látek je metabolizována, zejména v játrech (někdy je možno udělat in vitro simulaci – vezme se extrakt z krysích jater, dochází ke změně vlivem komplexu enzymů, které jsou přítomny v extraktu z jater -> metabolizace, vzniklá směs se může testovat Amesovým testem)
- mohou být připraveny kmeny bakterií, které nadprodukují některé savčí nitroreduktázy/acetyltransferázy -> máme prostředí, pro které chceme látku testovat
- -> máme nějaké aktivity: pokud jsou příliš vysoké, je to určité vodítko k tomu, že konkrétní látka by mohla být mutagenní (ale pořád to neznamená, že bude mutagenní i pro člověka)
- mutagenní ≠ kancerogenní, tumorogenní (vliv látek na karcinogenezi se také musí testovat na zvířatech)
- vznikají databáze/katalogy testů karcinogenity / mutagenity / toxicity; EU před časem rozhodla, že vytvoří vlastní katalog (-> vznikla agentura ECHA, sídlí v Helsinkách; údaje o všech látkách, které se u EU vyrobí / dodají v množství větším než 1 t /rok – obrovské množství látek; každoročně se přidávají nové)
  - obrovský objem testování látek -> obrovské množství laboratorních usmrcených zvířat