**Opravy poškodenia DNA**

**Poškodenia DNA**

Procesy v DNA-vysoká presnosť**(**význam pre **ochranu a zachovanie genetickej informácie) Nízka frekvencia-poškodenia DNA**

**Mutácie**

Náhle zmeny genetického materiálu

Zdroj genetickej variability

**Mutagenéza**

**Mutant**

**Mutagén**

Testovanie mutagenity látok-**Amesov test**

**Typy mutácií**

**Tranzícia-** substitúcia purín-purín alebo pyrimidín-pyrimidín

Transverzia-purín-pyrimidín alebo naopak

Posunové-inzercie/delécie 1 alebo 2 nukleotidových párov, ktoré menia čítací rámec

**Zmeny DNA indukované chemickými látkami**

1) pri replikácií, ale aj v nereplikujúcej sa DNA-**alkylačné látky, kyselina dusitá**

2) len pri replikácií DNA **(analóy purínových a pyrimidínových báz)**

**Chemické mutagény**

**Mutagénne analógy báz**-štruktúrne podobné normálnym bázam

Začleňované do DNA v priebehu replikácie

Zvyšuje početnosť chybného párovania

Najčastejšie: **5-bromuracil** (analóg T, páruje sa s A alebo G) a **2-aminopurín** (analóg G a A, p, páruje sa s T)

Kyselina dusitá (HNO2)

Silný mutagén

Spôsobuje **oxidatívnu deamináciu** aminoskupín u A,G a C, a ich zmenu na **ketoskupiny**

Menia sa na vlastnosti vodíkových väzieb modifikovaných báz

**Zmeny súvisiace s pôsobením HNO2:**

**A**sa mení na **hypoxantín,** ktorý sa páruje s C

C sa deaminuje na **U,** ktorý sa páruje s A

G sa deaminuje na **xantín,** ktorý sa páruje s C (táto deaminácia nie je mutagénna)

**Interkalačné činidlá**

Začleňujú sa medzi **dusíkaté bázy** DNA

Zvyšuje pevnosť a **menia konformáciu** duplexu (ohýbanie,stáčanie)

A takýto úsek DNA podstúpi replikáciu dochádza k **deléciám/adíciám** **1 alebo viac párov** báz

Najznámejší: **etídium bromid**

**Alkylačné látky**

Kovalentné naviazanie alkylových skupín na bázy za vzniku **aduktov**

Spôsobujú prenos metylovej/etylovek skupiny na bázy DNA a zmeny v párovaní báz

Zodpovedné za viaceré typy mutácií

Pr. **Yperit, MMS, EMS**

**1. Monofunkčné alkyačné látky ( s 1 reaktívnou skupinou)- poškodenie 1 bázy alebo zlom 1 reťazca**

**2. Bifunkčné alkyačné látky-**medzireťazcové alebo vnútroreťazcové DNA-DNA priečne spojenia-**crosslinks** alebo DNA proteínové priečne spojenia a indukujú chromozómové zlomy a chromozómové aberácie

**Fyzikálne mutagény**

**Ionizujúce žiarenie**

Rozrušenie chemických väzieb-**zlomy, crosslinky** (medzireťazcové väzby)

Chyby opravované **priamo ligázou alebo rekombináciou resp. vystrihnutím krátkeho úseku a resyntézou** (rovnako ako poškodenia UV svetlom a crosslinky)

**UV žiarenie**

Excituje bázy-vznik **pyrimídových dimérov a pyrimidínových hydrátov**

Diméry prerušujú štruktúru 2-závitnice DNA a prekážajú v správnej replikácii

**Typy poškodení**

**Chybné párovanie**

**Medzera v DNA**

**Zmena väzby**

**Zlom**

**Podmienky spustenia opravy DNA**

1. poškodenie **nesmie zasiahnuť gény riadiace a kontrolujúce reparačný mechanizmus**

2. poškodenie nesmie presiahnuť rozsah **1000 bp**

**Opravy vychádzajú z princípu,** že reťazec sa môže vrátiť do pôvodnej formy vďaka **komplementárnej informácii** uchovanej v neporušenom reťazci

**Opravy poškodení DNA**

Viaceré spôsoby opravy **v závislosti od druhu poškodenia a prítomnosti/aktivity príslušných enzýmov**

Chyby môžu byť **opravené, nahradené rekombináciou alebo zachované**

**Desyntetizovanie chýbajúcich úsekov DNA na základe komplementarity sa označuje ako reparačná syntéza DNA**

**E coli-5 mechanizmov:**

**Oprava závislá od fotoreaktivácii**

**Excízna oprava**

**Oprava chybného párovania báz**

**Postreplikačná oprava**

**SOS oprava**

**Chybné provanie báz**

**Mechanizmy preverenia správnosti** replikácie a korektúry

Systém rozlišuje zaradenie báz

1. monitoring:DNA polymerázy-**kontrolujú**

2. monitoring: **vystrihnutie a nahradenie**

Enzýmy: **polymerázy s 3´-5´ exonukleázovou aktivitou**-prok-**DNA polymeráza III**, euk. **DNA polymeráza delta a eta** -opravia poškodenie a replikácia môže pokračovať

**Opravy poškodenia DNA**

**1. Úplná oprava**

Oprava poškodeného miesta na pôvodný stav:

**A. fotoreaktivačný mechanizmus**

A. Po poškodení **UV svetlom:**

A. 1. aktivácia enzýmu **DNA fotolyáza** viditeľným svetlom

B. 2. pripojenie na diméry

C. 3. štiepenie kovalentných krížových väzieb **s využitím svetelnej energie**

D. 4. Obnova pôvodného stavu a pokračovanie replikácie

**B. Oprava alkylačných poškodení**

Pri poškodení DNA **monofunkčnými alkylačnými látkami:**

Enzým DNA metyltransferáza (Ada-proteín)-odstraňuje metylové skupiny z O6 guanínu a O4 tymínu alebo iných poškodených miest.

2. Excízna oprava

A) Bázová excízna oprava

Odstraňuje abnormálne alebo chemicky modifikované bázy v DNA

1. DNA-glykozylázy rozpoznajú poškodenie a rozštiepia N-glykozidové väzby

2. vzniká apurínové/ apyrimidínové miesto (**AP miesto**), ktoré rozpozná **AP-endonukleáza a fosfodiestéza**

3. Rozštiepenie cukor-fosfátových skupín

4. Prázdne miesto opraví **opravnou syntézou (DNA polymeráza).**

5. Konce spojí **DNA ligáza**

**B) Nukleoidová excízna oprava**

Odstraňuje rozsiahlejšie defekty (tymínové diméry)

1. Endonukleáza **(excinukleáza)** rozpozná a odstráni oligonukleotidový fragment s chybným nukleotidom,

**2. polymeráza** zaradí komplementárne nukleoidy,

**3. ligáza** spojí nový a pôvodný úsek.

**Mismach oprava**

Typom porelikačnej opravy je aj **oprava hybného párovania báz riadená metyláciou**- tento mechanizmus vyštiepi nesprávne zaradený nukleotid nahradí ho správnym s využitím metylového reťazca DNA ako matrice.

**Oprava DNA rekombináciou**

Opravuje DNA, vtedy ak **dôjde k zlomeniu jej reťazcov-**narušenie celistvosti DNA a nejaký úsek DNA môže vypadnúť a stratiť sa.

**Úloha: dosyntetizovanie chýbajúceho úseku a spojenie DNA**

Viac podtypov rekombinačnej opravy:

**Homologická rekombinácia**-zacelí zlomenú DNA tak,že pomocou druhej kópie DNA poskladá chýbajúci úsek DNA

**Nehomologická rekombinácia**-spojí zlomené konce DNA, ak nedošlo k strate veľkého úseku DNA

**Tolerantná oprava**

Obnova funkcie DNA bez odstránenia pôvodného poškodenia

Rozšírenie u prokaryontov (E.coli)

1. Uskutočňuje sa **SOS mechanizmami** (niekoľko typov)

**SOS odpoveď**- koordinovaná syntéza enzýmov zapojených do procesov rekombinácie, replikácie, replikácia a DNA opravných procesov

**2. polymerázy odolávajúce chybám (DNA polymeráza V)**

Ignorujú dimér a do nového reťazca zaradia bázy náhodne-dochádza k chybám, ale replikácia a bunkové delenie môže prebiehať

**3. Poreplikačná oprava**

Nedochádza k oprave pôvodného poškodenia, **opravujú sa medzery v dcérskom reťazci,** ktoré vznikli pri replikácii chybného parentálneho reťazca. **Oprava sa uskutočňuje rekombináciou.**

**Ochorenia podmienené poruchami reparačného mechanizmu**

Autozómovo recesívne ochorenia s poruchami excíznej opravy

1. Xenderma pigmentosum

**Chýbajú enzýmy excíznej opravy (endonukleáza)**

**Poruchy fotoreaktivácie (hromadenie tymín-dimérov)**

**Karcinómy kože, nízky vzrast, oneskorenie pohlavného dozrievania, včasné umieranie**

2. Bloomov syndróm

**Mutácia génu kódujúceho DNA-ligázu I, chromozómové aberácie**

**Porucha rastu, malígne nádory**

3. Cockayneov syndróm

**Hypersenzitivita na UV žiarenie a chemické karcinogény**

**Mentálna retardácia, dermatída a i.**