

## **Odgovor bakterijske stanice na oštećenja u DNA**

### **1. Popravci prije replikacije:**

- 1.1. Reverzija oštećenja
  - 1.1.1. Fotoreaktivacija
  - 1.1.2. Alkiltransferaze
- 1.2. Uklanjanje oštećenja
  - 1.2.1. Bazni ekscizijski popravak
  - 1.2.2. Nukleotidni ekscizijski popravak

### **2. Popravci poslije replikacije:**

Popravak krivo sparenih baza

### **3. Popravci tijekom replikacije:**

- 3.2. Zaobilaženje oštećenja i mogući nastanak mutacija
  - 3.2.1. Odgovor SOS
  - 3.2.2. Rekombinacijski popravak

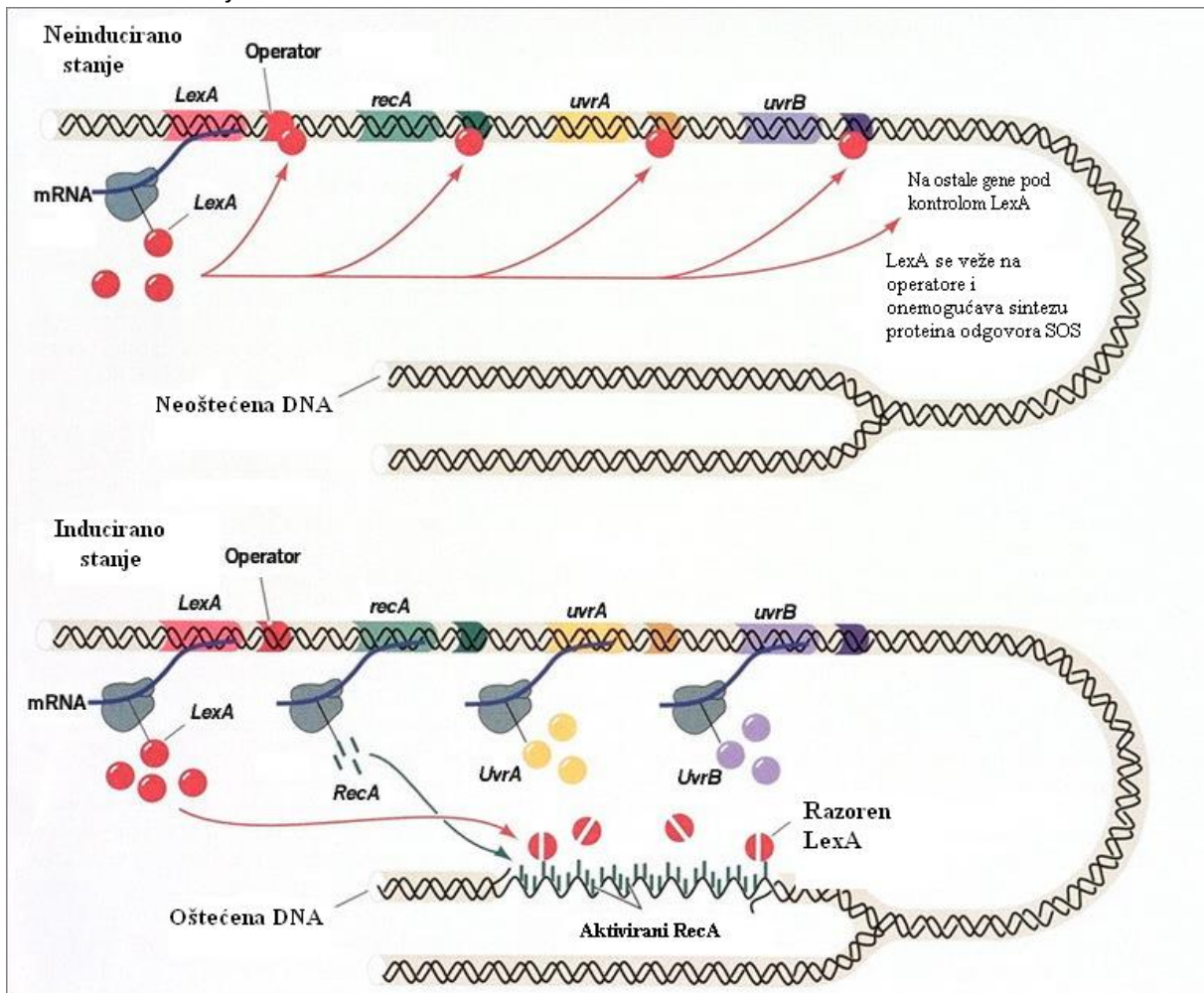
### **Popravci oštećene DNA**

Oštećenja u molekuli DNA koja zaustavljaju replikaciju kromosoma ugrožavaju integritet staničnog genoma kao i stanice. Globalni odgovor na oštećenja u DNA usmjeren je prema očuvanju stanice i aktiviranju više putova popravak DNA. Neki su popravci točni (engl. error free repair) te se uspostavlja prijašnje stanje. Drugi popravci skloni greškama (engl. error prone repair) zaobilaze i toleriraju oštećenja te nasuprot oštećenja dolazi do ugradnje bilo koje nukleinske baze što može rezultirati nastankom mutacija.

#### **3.2.1. Odgovor SOS**

Godine 1974. Miroslav Radman je opisao i imenovao odgovor SOS koji u bakteriji *E. coli* održava integritet genoma pomoću replikacije preko oštećenja u DNA tzv. traslezijске sinteze (engl. translesion synthesis, TLS) te mogu nastati greške i mutacije u DNA (engl. error prone repair). Odgovor SOS induciraju vanjski štetni agensi koji oštećuju DNA. Inducirajući signali u bakteriji *E. coli* su: oštećenja DNA metaboličkim intermedijerima, greške u replikaciji, rekombinaciji ili kromosomskoj segregaciji, povišena temperatura iznad svojstvene metaboličke, izloženost antibioticima i visokom tlaku, blago alkalni uvjeti, toksične tvari i mutageni. Iznenadujuće je da se odgovor SOS može aktivirati i prekidom dvostruke zavojnice koja je nastala restrikcijom endonukleaze same *E. coli*. Signal za ekspresiju gena regulona SOS javlja se upravo u regiji jednolančane DNA kada se DNA polimeraza III zaustavi na oštećenu u DNA. Odgovor SOS reguliran je represorom LexA kao i proteinom RecA koji se veže na jednolančanu nakon zastoja replikacije DNA te djeluje kao aktivator (slika 2). Kompleks RecA-DNA tzv. RecA filament odgovoran je za tri međusobno važne funkcije: indukciju odgovora SOS i induciranu SOS mutagenezu te rekombinaciju DNA. Represor LexA u neinduciranom stanju sprječava ekspresiju gena koji kodiraju za proteine uključene u odgovor SOS (slika 2, neinducirano stanje, gornji dio slike). Nakon izlaganja nekom mutagenom agensu dolazi do oštećenja DNA i nastajanja regije jednolančane DNA. Na jednolančanu DNA (eng. single strand DNA, ssDNA) se veže protein RecA koji postaje aktiviran te inducira autoproteolizu represora LexA (slika 2, inducirano stanje, donji dio slike). Induciranjem odgovora SOS sinteza proteina RecA je brza, 10 molekula u sekundi, a maksimum se postiže sat vremena nakon djelovanja mutagenog agensa. Veća koncentracija nukleoprotein kompleksa i interakcija RecA s LexA izaziva razaranje sve većeg broja represora LexA čime se omogućava ekspresija sve više gena regulona SOS. Produkti ekspresije prvih gena su enzimi (UvrA i UvrB) koji promiču popravak oštećene DNA, a produkti kasnih gena su polimeraze sklone greškama. Kada polimeraze pređu preko oštećenja u DNA i ugrade bilo koju nukleinsku bazu te djeluje DNA ligaza. Tada nestane jednolančane DNA pa se sintetizirani represor

LexA više ne cijepa već se ponovno veže na operatorska mjesta gena odgovora SOS i stanica ulazi u neinducirano stanje.





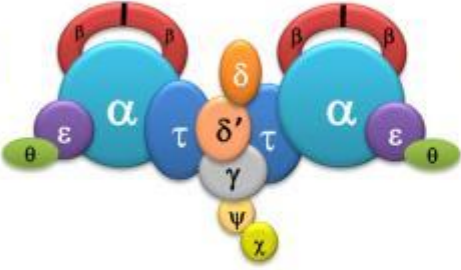


Slika 2. Regulon odgovora SOS u neinduciranom i induciranom stanju. Tijekom neinduciranog stanja u stanici s neoštećenom DNA, represor LexA sprječava sintezu RecA, UvrABC, RecBCD i dugih proteina uključenih u odgovor SOS (gornji dio slike). U induciranom stanju oštećenje DNA potiče protein RecA na vezanje na ssDNA što rezultira samorazaranjem represora LexA i omogućava transkripciju gena regulona SOS (donji dio slike).

### Polimeraze odgovora SOS

Istraživanja u *E. coli* su pokazala da se u uvjetima stresa kada dolazi do aktivacije odgovora SOS aktiviraju tri DNA polimeraze II, IV i V (DNA mutaze) koje mogu uvesti mutacije traslezijском sintezom DNA (slika 3). Polimeraza II (Pol II) pripada obitelji polimeraza B i kodirana je genom *polB* (*dinA*). Uključena je u stanični popravak, što znači da može replicirati oštećenu DNA. Sinteza Pol II je inducirana u stacionarnoj fazi kad se nakupljaju DNA oštećenja koja blokiraju aktivnost DNA Pol III i tako zaustavljaju replikaciju. U tim uvjetima aktivnost Pol II pokreće replikacijske viljuške u zastoju nizvodno od oštećenja. Ona je procesivna i u većini slučajeva točna, međutim tijekom odgovora SOS uvodi mutacije. Polimeraze V i IV (Pol V i Pol IV) su isključivo sklone greškama što rezultira nastankom mutacija koje su od velike važnosti za prilagodbu bakterije *E. coli* tijekom stresnih uvjeta. Pol V je kodirana genima *umuDC* i aktivni enzim se sastoji od jedne podjedinice UmuC i dvije aktivirane podjedinice umuD' (slika 3). U normalnim stanicama ima je manje od 15 molekula po stanici. Vrlo je uspješna u prelaženju preko pirimidinskih dimera nastalih djelovanjem UV svjetla. Pol IV je kodirana genom *dinB*, također je sklona greškama i manja oštećenja može tolerirati. Polimeraze V i IV pripadaju Y obitelji specijaliziranih polimeraza, koje karakterizira sposobnost replikacije oštećene

DNA, nedostatak procesivnosti i niska vjernost replikacije. Pol IV je u normalnim stanicama prisutna na relativno visokoj razini do 250 molekula po stanici u usporedbi s Pol III koje ima do 20 po stanici. Indukcijom SOS razina Pol IV poraste dodatnih 10 puta. Istraživanjima je dokazano da ima ulogu u mutagenezi na F' epizomu i značajno doprinosi mutagenezi stanica u mirovanju tzv. adaptivnoj mutagenezi.

Precizna uloga Pol IV u normalnim i SOS induciranim stanicama još uvijek je nedovoljno istražena. Međutim, istraživanja su pokazala da Pol IV i Pol V kada su inducirane bilo putem odgovora SOS ili nekim drugim načinom, povećavaju stopu stanične mutacije čak i u odsutnosti oštećenja DNA. Promatranjem u laboratoriju s konstitutivno aktiviranim odgovorom SOS utvrđeno je da je Pol IV povećava frekvenciju mutacije za 10 puta, a Pol V za više od 13 puta.

	Pol I	Pol II	Pol III	Pol IV	Pol V
DNA polymerase family	A	B	C	Y	Y
Activity	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease 5'-3' exonuclease	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease	5'-3' polymerase	5'-3' polymerase
					
Number of molecules/cell					
- SOS	400	50 - 75	10 - 20	150 - 250	< 15
+ SOS	400	350 - 1000	10 - 20	1200 - 2500	200
Biological functions in the cell	DNA replication, Okazaki fragment maturation, DNA repair	DNA replication (backup DNA polymerase), DNA repair, TLS	DNA replication DNA repair	TLS	TLS

Slika 2. Pet DNA polimeraza *E. coli*, njihova svojstva i biološke funkcije. Kratica TLS=translazijska sinteza. Preuzeto od Fijalkowska i sur. (2012) FEMS Microbiol Rev.36, 1105–1121.

## 2.5. Uloga odgovora SOS

Reakcija na stresna stanja je povećana stopa mutacije koja nastaje odgovorom SOS tijekom kojeg dolazi do mogućnosti popravka oštećenja kao i djelovanja polimeraza II, IV i V. Ove polimeraze sklone greškama (DNA mutaze) mogu uvesti krivu bazu tijekom replikacije preko oštećenja u lancu DNA koji je kalup. Na taj način mogu nastati nove kombinacije gena što može rezultirati sintezom drugačijih proteina i nekom novom sposobnošću preživljavanja bakterije u novoj niši na primjer rezistencija na neki antibiotik. Dokazano je da neki antibiotici induciraju odgovor SOS i tako povećavaju rezistenciju *E. coli*. Zato danas znanstvenici nastoje lijekovima onemogućiti aktivnost proteina odgovora SOS u patogenih bakterija da bi se onemogućila pojava rezistencije na specifične antibiotike putem aktivnosti odgovora SOS.