

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Popravak DNA udružen s transkripcijom
Transcription – coupled repair

SEMINARSKI RAD

Lucija Markulin

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular biology)

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Ivančić Bačić

Zagreb, 2012.

Sadržaj

1. Uvod	3
2. NER kod prokariota	5
3. Protein Mfd (TRCF).....	6
3.1. Kristalna struktura proteina Mfd	7
3.1.1. UvrB homologni modul	8
3.1.2. RNAP interagiraju a domena.....	8
3.1.3. DNA-translokacijski modul	9
3.1.4. D3 domena	9
3.1.5. C-terminalna domena	9
3.1.6. Linker helikaze	9
4. Molekularni mehanizam TCR.....	10
4.1. Translokacijska aktivnost proteina Mfd	10
4.2. Disocijacija RNAP	11
4.3. Popravak DNA	12
4.3.1. Struktura proteina UvrB NER.....	12
4.3.2. Kako protein Mfd ubrzava popravak nekodiraju eg lanca?.....	12
4.4. Autoregulacija D7	14
5. Mfd-neovisan TCR.....	15
6. TCR kod eukariota	17
7. Literatura	19
8. Sažetak	21
9. Summary	22

1. Uvod

Asimetriju popravka DNA s transkripcijom povezali su Hanawalt i suradnici 1985. Uoivši to prvi puta u stanicama jajnika kineskog hrka. Promatraju i sekvencu DNA aktivnog gena za dihidrofolat reduktazu (DHFR) zapazili su brže popravljanje ošte enja nego u drugim dijelovima genoma. U istom vremenu u sekvenci gena za DHFR popravljeno je dvije treine UV induciranih ciklobutanskih pirimidinskih dimera (CPD) dok je ukupno u genomu popravljeno tek 15% (Bohr i sur. 1985). Brži popravak aktivnog dijela genoma nije posljedica slabijeg pakiranja dijelova DNA koji se prepisuju jer je u kasnije pokazana velika razlika u efikasnosti uklanjanja UV induciranih pirimidinskih dimera u nekodiraju em lancu (kalupu) i kodiraju em lancu DHFR gena. U vremenu od 4 sata iz nekodiraju eg lanca uklonjeno je 80% dimera dok u 24 sata nije zabilježena ve a koli ina popravka u kodiraju em lancu DHFR gena (Mellon i sur. 1987). Dvije godine kasnije preferentni popravak lanaca uo en je i kod prokariota. U *E. coli* ozra enoj UV zra enjem primijetili da su se pirimidinski dimeri u nekodiraju em lancu induciranog laktoznog operona popravili u vremenu od 5 minuta nakon zra enja dok je u kodiraju em lancu brzina popravka pirimidinskih dimera približno jednaka brzini popravka oba lanca neinduciranog operona. Time su došli do zaklju ka da vjerojatno postoji mehanizam koji povezuje popravak DNA i transkripciju (Mellon i sur. 1989). Proces preferentnog popravka nekodiraju eg lanca u aktivnim genima naziva se popravak DNA udružen s transkripcijom (TCR, *transcription-coupled repair*).

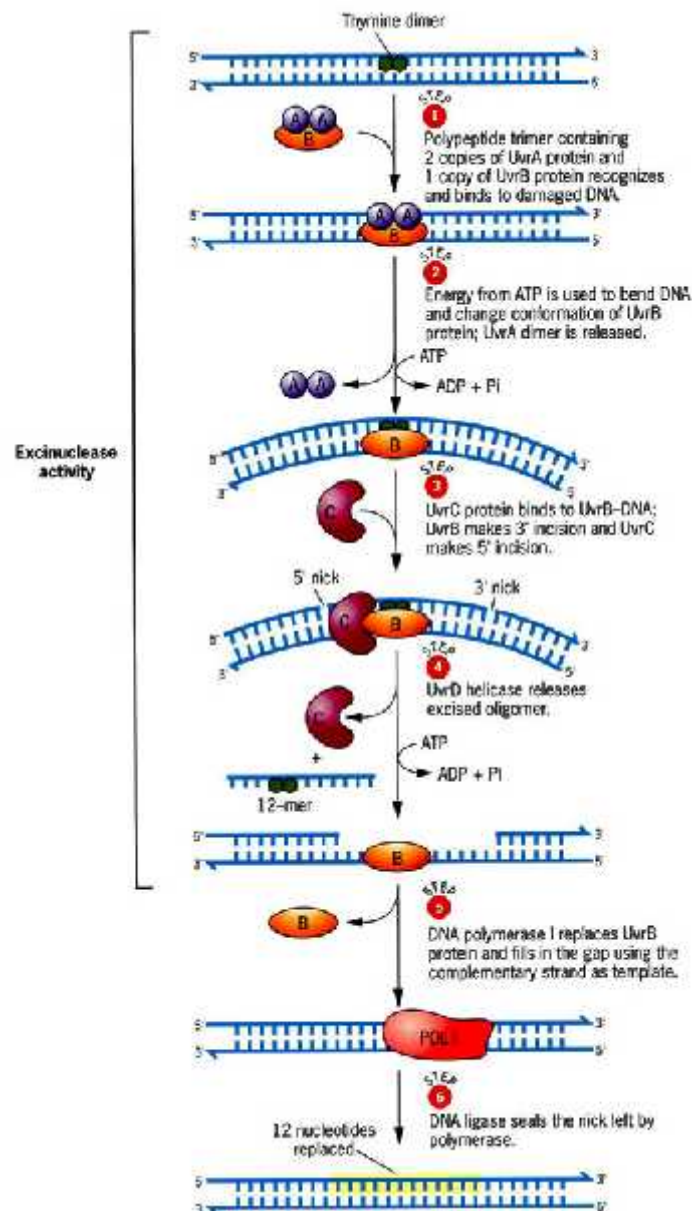
Popravak DNA udružen s transkripcijom je ekscizijski popravak nukleotida (NER, *nucleotide excision repair*) koji popravlja ošte enja nastala UV zra enjem (CPD i 6,4-fotoprodukt, 6,4-P) i drugim kemijskim agensima. NER možemo podijeliti na dva puta TCR-NER i globalni genomski popravak (GGR, *global genome repair*). GGR-NER uklanja ošte enja iz itavog genoma (kodiraju ih lanca i neeksprimiranih regija genoma), a brzina i efikasnost popravka ovise o vrsti ošte enja i stupnju pakiranja DNA. Proteini uklju eni u GGR-NER uklju eni su i u fazu popravka TCR-NER. Razlika ova dva puta je u na inu prepoznavanja ošte enja i inicijaciji popravka DNA. Kod GGR-NER pretraživanje DNA i prepoznavanje ošte enja vrši kompleks dva enzima UvrA i UvrB (UvrA₂UvrB) dok kod TCR-NER prepoznavanje ošte enja je posljedica sposobnosti ošte enja DNA u nekodiraju em lancu da zaustavi RNA polimerazu (RNAP) tijekom faze elongacije transkripcije (Savery 2007). Pokazano je da više tipova ošte enja uzrokuje zaustavljanje RNAP tijekom transkripcije: CPD (Selby i sur. 1990), 6,4-PP (van Hoffen i sur. 1995), jednolan ani lomovi (Zhou i sur., 1993) i drugi. Do zaustavljanja transkripcije može do i i

prilikom nedostatka nukleotida tijekom transkripcije ili ukoliko RNAP nai e na prepreku poput proteina vezanog na DNA.

Dok je TCR kod eukariota uspostavljen *in vitro* tek 2006. bakterijski TCR je puno bolje analiziran osobito kod *E. coli*. Kod *E. coli* je utvr eno da je protein Mfd (*mutation frequency decline*) odgovoran za povezivanje transkripcije i popravka DNA. Prije više od 40 godina Evelyn Witkin izolirala je i okarakterizirala *E. coli* mutant *mfd*. U mutantu *mfd* zapažen je nedostatak pada frekvencije mutacije (MFD). MFD je pojava u kojoj nakon UV ozra ivanja stanica dolazi do gubitka induciranih mutacija nakon inkubacije u uvjetima koji inhibiraju sintezu proteina (Roberts i sur. 2004). Do nedostatka pojave MFD može do i mutacijom u genu *uvrA*, *uvrB* ili *uvrC* što dovodi do gubitka ekscizijskog popravka nukleotida ili mutacijom *mfd* koja samo smanjuje stopu ekscizijskog popravka (Selby i sur. 1991). Mutant *mfd* za razliku od divljeg tipa ima ve u osjetljivost na UV, smanjenu stopu popravka te nema sposobnost preferentnog popravka lanaca DNA. Svojstvo mutanta *mfd* da ne posjeduje preferentni popravak lanaca dovelo je do otkri a MFD. Selby i Sancar pokusima ranih 90ih godina uspjeli su pro istiti proteina Mfd te su pokazali da je upravo on faktor povezan s transkripcijskim popravkom (TRCF, *transcription repair coupling factor*). Oni su u uvjetima *in vitro* u sustav gdje je RNAP bila zaustavljena na CPD tijekom transkripcije dodali komponente NER (UvrA, UvrB, UvrC) kako bi utvrdili da li RNAP usmjerava popravak na nekodiraju i ili kodiraju i lanac. Pokazalo se da RNAP ne usmjerava popravak na nekodiraju i lanac te da ne može biti odgovorna za preferentni popravak lanaca (u uvjetima *in vivo* taj doga aj je zabilježen) (Selby i sur. 1990). Zatim su uspjeli pro istiti protein Mfd i uspješno su dodatkom proteina Mfd mutantu *mfd* komplementirali nedostatak preferentnog popravka lanaca i time pokazali da je protein Mfd (TRCF) kod *E. coli* u *in vivo* i *in vitro* uvjetima jedini potrebni faktor potreban za TCR (Selby i sur. 1991). Dvije su osnovne uloge TRCF: (1) uklanjanje RNAP zaustavljene na ošte enju i (2) indukcija popravka DNA dovo enjem komponenti NER (Deaconescu i sur. 2006).

2. NER kod prokariota

Kod bakterija NER vrši sistem UvrABC (Slika 1.). UvrA se veže na UvrB stvaraju i kompleks UvrA₂UvrB ili UvrA₂UvrB₂ (Verhoeven i sur. 2002). Takav kompleks veže se na DNA i pretražuje DNA detektiraju i distorzije u DNA zavojnici. Nakon detekcije i potvrde ošte enja UvrB se veže na neošte eni lanac, a UvrA disocira. Na UvrB-DNA pre-urezuju i kompleks veže se UvrC koji urezuje DNA 3 do 4 nukleotida 3' od ošte enja i 7 nukleotida od 5' kraja ošte enja. UvrD (Helikaza II) uklanja UvrC i ošte eni oligonukleotidni lanac. UvrB ostaje vezan na DNA dok se ne veže DNA polimeraza I koja sintetizira novi oligonukleotid. Proces završava spajanjem lanca DNA ligazom (Truglio i sur. 2005).



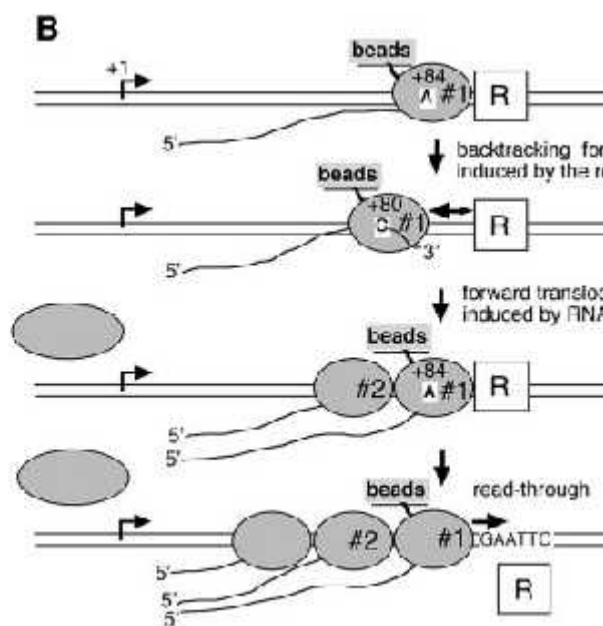
Slika 1. Ekscizijski popravak nukleotida kod *E. coli* (preuzeto sa www.cahe.org).

3. Protein Mfd (TRCF)

Prva istraživanja proteina Mfd proveli su Selby i Sancler određivši njegova biokemijska svojstva i glavne funkcionalne regije. Gen *mfd* je visoko konzerviran i pojavljuje se u 85% sekvenciranih prokariotskih genoma (Roberts i sur. 2004). To je multifunkcionalni protein veličine 130 kDa (1148 aminokiselina).

Protein Mfd je ATP-ovisna DNA translokaza (Savery 2011). Mfd interagira s σ -podjedinicom RNAP kada je ona zaustavljena zbog oštećenja DNA, DNA vezanog proteina ili nedostatka nukleotida. Mfd prilazi RNAP s uzvodne strane. Ta interakcija može biti inhibirana ⁷⁰ faktorom vezanim na RNAP, ali ne i proteinom nizvodno vezanim na DNA (Park i sur. 2002). Zaustavljena RNAP reverzno translocira, ali Mfd svojom translokacijskom aktivnošću vraća 3' kraj RNA u aktivno mjesto te reaktivira (ako nema oštećenja, a ima dovoljno nukleotida) ili otpušta RNAP (u slučaju oštećenja ili blokiranja puta) te dovodi enzime NER (Slika 7.).

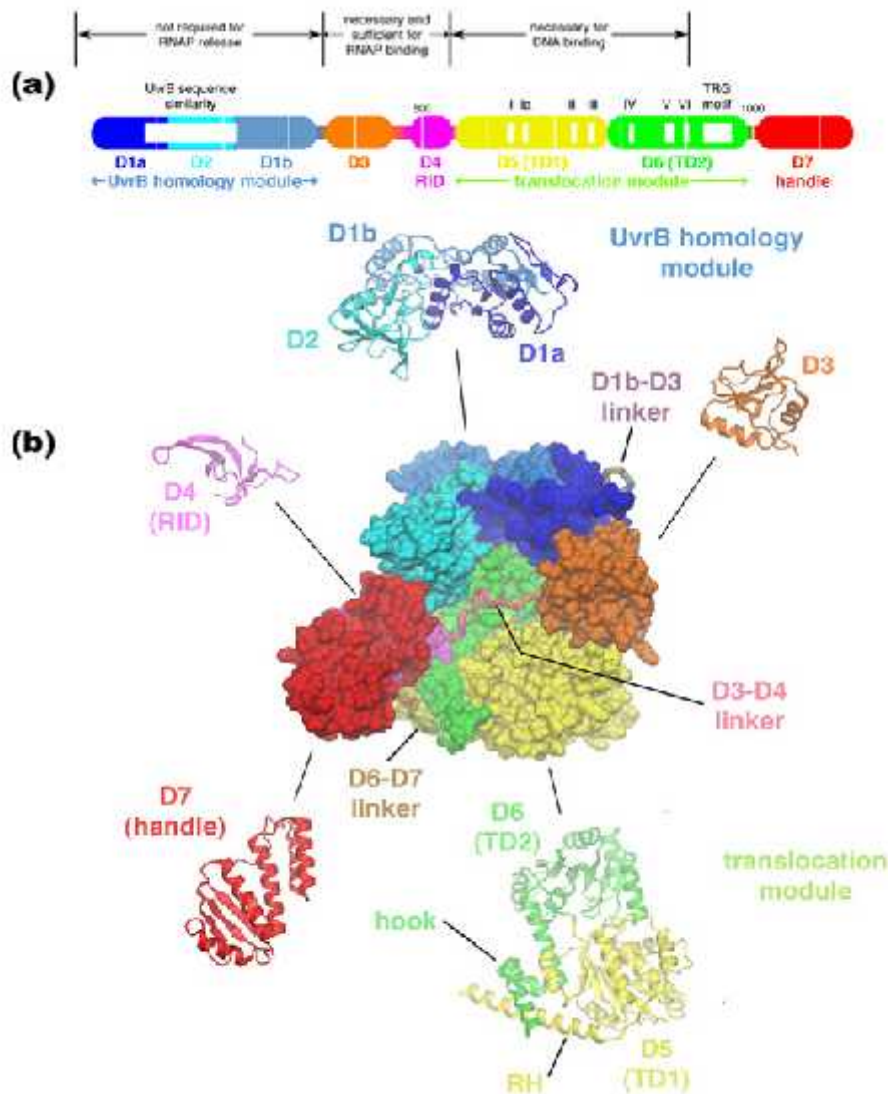
Za razliku od mehanizma koji provodi protein Mfd kada jedan transkripcijski kompleks naiđe na drugi zaustavljeni transkripcijski kompleks taj nadolazeći transkripcijski kompleks pomaže nizvodno zaustavljenom transkripcijskom kompleksu da pređe preko oštećenja, a da pri tome zadrži aktivno stanje (Slika 2.). Uzvodni transkripcijski kompleks(i) guraju zaustavljeni transkripcijski kompleks preko oštećenja na kojem je zaustavljena RNAP. Za razliku od slučaja u koji je uključen protein Mfd ovdje ne dolazi do disocijacije RNAP sa DNA (Epshtein i sur. 2003).



Slika 2. Suradnja RNAP u prelaženju prepreka tijekom transkripcije (preuzeto iz: Epshtein i sur. 2003).

3.1. Kristalna struktura proteina Mfd

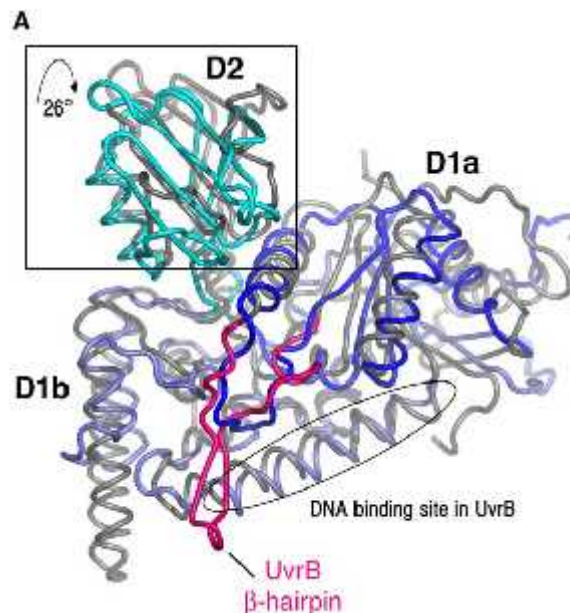
Kristalna struktura koju su 2006. dobili Deaconescu i suradnici pokazuje da je protein Mfd *E. coli* građen od 8 strukturnih domena (D1a, D1b i D2-D7) koje su podijeljene u 5 strukturnih modula (Slika 3.). N-terminalni dio proteina Mfd D1a/D2/D1b tvori UvrB homologni modul, D4 RNAP interagira u domenu (RID), D5/D6 translokacijski modul koji sadrži TD1 (*translocation domain 1*) i TD2, D3 tvori samostalnu domenu, a D7 tvori C-terminalnu domenu. Funkcionalne domene i moduli međusobno su povezani fleksibilnim linkerima što omogućuje proteinu Mfd da prolazi kroz velike konformacijske promjene tijekom izvršavanja svoje funkcije (Deaconescu i sur. 2006).



Slika 3. (a) Primarna struktura proteina Mfd od 1148 aminokiselina. Biješe vertikalne linije označavaju svaku 100. aminokiselinu. Debelom horizontalnom linijom u bojama su označene domene, a tankom horizontalnom linijom linker koji ih povezuju. (b) Pogled odozgo na strukturu proteina Mfd. Domene su označene prema shemi (a), a moduli izdvojeni i prikazani vrpastim modelima (preuzeto iz: Deaconescu i sur. 2006).

3.1.1. UvrB homologni modul

UvrB homologni modul pokazuje veliku strukturalnu homologiju sa tri od pet domena proteina UvrB važne komponente NER. Preklapanjem struktura proteina UvrB i UvrB homolognog modula vidimo da za razliku od proteina UvrB, UvrB homologni modul ne sadrži β -ukosnicu (Slika 4.). β -ukosnica proteina UvrB služi kao senzor distorzija u DNA zavojnici i stabilizira vezanje na mjesto oštećenja. Mfd nema potrebu za tom β -ukosnicom budući da ne prepoznaje oštećenje DNA direktno već indirektno preko zaustavljene RNAP (Deaconescu i sur. 2006). Domena 2 pokazuje najveću homologiju sekvence s proteinom UvrB i povezana je s vezanjem proteina UvrA. Velika sličnost D2 u strukturi i kemijskim svojstvima kod proteina Mfd i proteina UvrB ukazuje na njenu važnost pri vezanju UvrA i najvjerojatnije je ta interakcija vrlo slična u oba proteina (Assenmacher i sur. 2005).



Slika 4. Preklapanje proteina UvrB (siva) i UvrB homolognog modula Mfd (plava). β -ukosnica proteina UvrB pokazana je crvenom bojom. Ovalom je označena predložena regija koja se veže na DNA (preuzeto iz: Deaconescu i sur. 2006).

3.1.2. RNAP interagira s domenama

RID se veže za regiju β -podjedinicu RNAP što omogućuje vezanje proteina Mfd na RNAP. Ukoliko dođe do zamjene aminokiselina bilo u RID ili regiji β -podjedinice gubi se sposobnost da protein Mfd ukloni zaustavljenu RNAP s oštećenja na DNA. Istraživanja su pokazala da supstitucija L449R u RID ukida sposobnost uklanjanja RNAP, ali ne i vezanja na DNA i vezanja i hidrolize ATP-a (Savery 2007, Smith i sur. 2005).

3.1.3. DNA-translokacijski modul

DNA-translokacijski modul sastoji se od dvije domene TD1 i TD2. One sadrže 7 motiva helikaza superfamilije 2 koje su odgovorne za ATPaznu i DNA-translokacijsku aktivnost proteina Mfd. Iako helikaza, ne dovodi do odvajanja lanaca već zajedno s hidrolizom ATP-a uzrokuje kretanje duž DNA. Odrasli dijelovi DNA-translokacijskog modula dijele visok stupanj homologije u sekvenci i u strukturi s DNA-translokacijskim modulom proteina RecG koji ima ulogu u širenju razgrananih DNA struktura u replikaciji i rekombinaciji. Translokacijski modul vjerojatno veže ATP između D5 (TD1) i D6 (TD2). Na C-kraju TD2 nalazi se otprilike 40 aminokiselina dug motiv TRG (*translocation in RecG*) koji također ima važnu ulogu u otpuštanju RNAP sa DNA. Mutacije u toj regiji dovode do gubitka Mfd posredovanog uklanjanja RNAP, ali funkcije vezanja na DNA i hidrolize ATP-a ostaju očuvane. Sve to ukazuje da motiv TRG povezuje hidrolizu ATP-a i konformacijske promjene koje dovode do DNA translokacije (Deaconescu i sur. 2006).

3.1.4. D3 domena

Dosadašnja istraživanja nisu otkrila ulogu D3 u djelovanju proteina Mfd pa se smatra da i nema neku važniju ulogu. Domena D3 ne pokazuje strukturnu homologiju, slabo je očuvana te se smatra vrsno specifičnom domenom proteina Mfd (Deaconescu i sur. 2006).

3.1.5. C-terminalna domena

D7 interagira s RID i UvrB homolognim modulom i pripisuje joj se regulatorna uloga. Autoinhibitorna uloga D7 osigurava da do DNA translokacije dolazi samo u odgovarajućim uvjetima kada je protein Mfd vezan na zaustavljenu RNAP. Vezanje Mfd na RNAP dovodi do repozicioniranja domena što omogućuje DNA translokacijsku aktivnost Mfd. U slučaju delecije D7 moguća je translokacija bez da se Mfd veže na RNAP (Smith i sur. 2007).

3.1.6. Linker helikaze

RID i translokacijski modul povezani su dugom helikazom *relay helix* (RH). Na polovinu svoje dužine RH interagira s strukturom nazvanom 'kuka' koja se sastoji od 2 helikaze (HH, *hook helices*), a povezuje motiv TRG s D7. Povezanost motiva TRG, HH i RH omogućuje da se promjena u jednoj domeni prenosi do svih domena proteina (Savery 2007).

4. Molekularni mehanizam TCR

4.1. Translokacijska aktivnost proteina Mfd

Transkripcija gena je proces osjetljiv ne samo na zaustavljanja ovisna o sekvenci nego i oštećenja unutar nekodirajućeg lanca predstavljaju prepreku pri kretanju RNAP. Transkripcijski kompleks zaustavljen na mjestu oštećenja predstavlja dodatni problem i u tome što onemogućuje pristup enzimima popravka DNA mjestu oštećenja budući da se ono nalazi duboko u aktivnom mjestu RNAP. U tom slučaju javlja se TCR koji omogućuje pristup enzimima popravka mjestu oštećenja (McGlynn 2010).

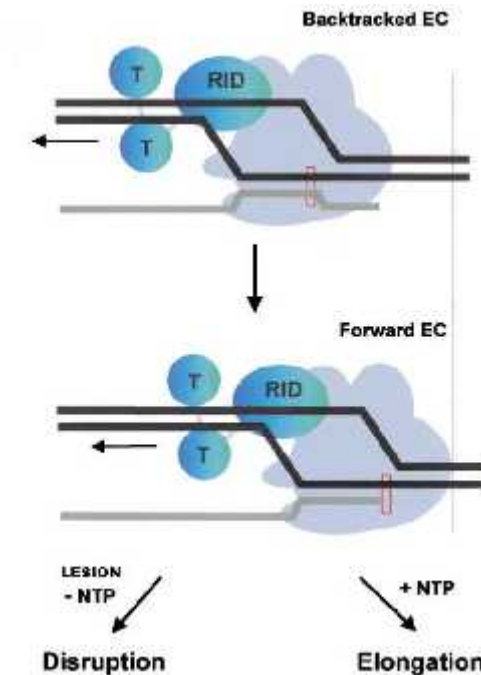
Za vrijeme transkripcije može doći do reverzne translokacije (*backtracking*) RNAP za nekoliko ili više nukleotida pri čemu dolazi do odmatanja DNA uzvodno od RNAP i ponovnog spajanja lanca nizvodno što ne zahtijeva potrošnju energije budući da se istovremeno stvaraju i razaraju vodikove veze. Pri tome 3' kraj RNA transkripta izlazi iz aktivnog mjesta RNAP (Roberts i sur. 2004). Postoji više razloga reverzne translokacije RNAP među kojima su transkripcija preko određenih sekvenci DNA, nedostatak nukleotida, razna oštećenja DNA koja dovode do zaustavljanja RNAP i njene reverzne translokacije (McGlynn 2010).

Jedan od načina spašavanja reverzno translocirane RNAP je izrezivanje 3' kraja transkripta pomoću faktora izrezivanja transkripta GreA i GreB. Ti faktori svojim vezanjem stimuliraju unutarnju endonukleaznu aktivnost RNAP koja cijepa RNA transkript 2-18 nukleotida od 3' kraja. Nakon što 3' fragment disocira nastavlja se transkripcija s novonastalim 3' kraja transkripta (Laptenko i sur. 2003). Dok se ovdje stimuliranjem aktivnog mjesta RNAP da hidrolizira unutarnju fosfodiesterску vezu stvara novi 3' kraj transkripta te ne dolazi do pomicanja RNAP na kalupu, Mfd djeluje drukčijim mehanizmom stimulirajući i translokaciju RNAP u smjeru transkripcije (*forward translocation*).

Svojstvo proteina Mfd da translocira RNAP otkriveno je radioaktivnim označavanjem 3' krajeva i mjesta unutar RNA transkripta i dodavanjem proteina Mfd ili GreB. Park i suradnici primijetili su da u oba slučaja dobiveni transkript sadrži unutarnju oznaku što ukazuje da oba proteina potiču u elongaciju do terminatora međutim samo transkript tretiran s Mfd zadržava i početnu 3' oznaku. Iz rezultata su zaključili da Mfd potiče reverzno translociran transkripcijski kompleks naprijed i ponovo dovodi 3' kraj u aktivno mjesto RNAP (Park i sur. 2002).

Kako bi Mfd mogao potaknuti translokaciju RNAP potrebno mu je 25-30 pb (parova

baza) uzvodno od RNAP kako bi mogao djelovati, ali ne zahtjeva nizvodni dio lanca kalupa (Slika 5.). U slučaju kada je kalup neoštećen i ima dovoljno supstrata NTP nakon translokacije elongacija se nastavlja. Ukoliko nema dovoljno NTP ili se RNAP nalazi na mjestu oštećenja DNA tada dolazi do disocijacije RNAP, a Mfd zatim dovodi enzime popravka na mjesto oštećenja (Slika 6.) (Park, 2002).



Slika 5. 26 parova baza uzvodno potrebnih za vezanje Mfd (preuzeto iz: Park i sur. 2002).

Slika 6. Vezanje i aktivnost Mfd. Gornja slika prikazuje reverzno translociranu RNAP na koju se veže Mfd te ju zatim translocira naprijed (donja) (preuzeto iz: Park i sur. 2002).

4.2. Disocijacija RNAP

Mehanizam kojim Mfd uklanja RNAP s DNA je nepoznat. Pretpostavlja se da sila koja dovodi do translokacije uzrokuje i disocijaciju RNAP u slučaju da translokacija naiđe na prepreku. Sila koja djeluje na DNA dovodi do odvajanja RNA/DNA hibrida i spajanja lanaca u uzvodnom djelu transkripcijskog mjehurića a do trenutka kad je mjehurić dovoljno zatvoren da dođe do otpuštanja RNAP i do tada sintetiziranog RNA transkripta (Savery 2007).

Mfd se pomoću domene RID veže na RNAP i na oko 25 pb neposredno uzvodno od RNAP, tj. veže se na onu regiju koju je RNAP netom prepisala. Mfd zatim potiskuje RNAP naprijed, u smjeru kojem inače RNAP vrši prepisivanje, dok RNAP ne disocira s DNA. Taj događaj zahtijeva hidrolizu ATP-a te helikazne motive, motiv TRG, RID i RID vezuju se na mjesto na RNAP (ne treba N-terminalni dio Mfd, D3 i D7) (Savery 2007).

4.3. Popravak DNA

Ne zna se puno o tome zašto je stopa popravka DNA veća a prilikom TCR nego tijekom GGR-NER. Pretpostavlja se da je tome zaslužan UvrB homologni modul proteina Mfd.

4.3.1. Struktura proteina UvrB NER

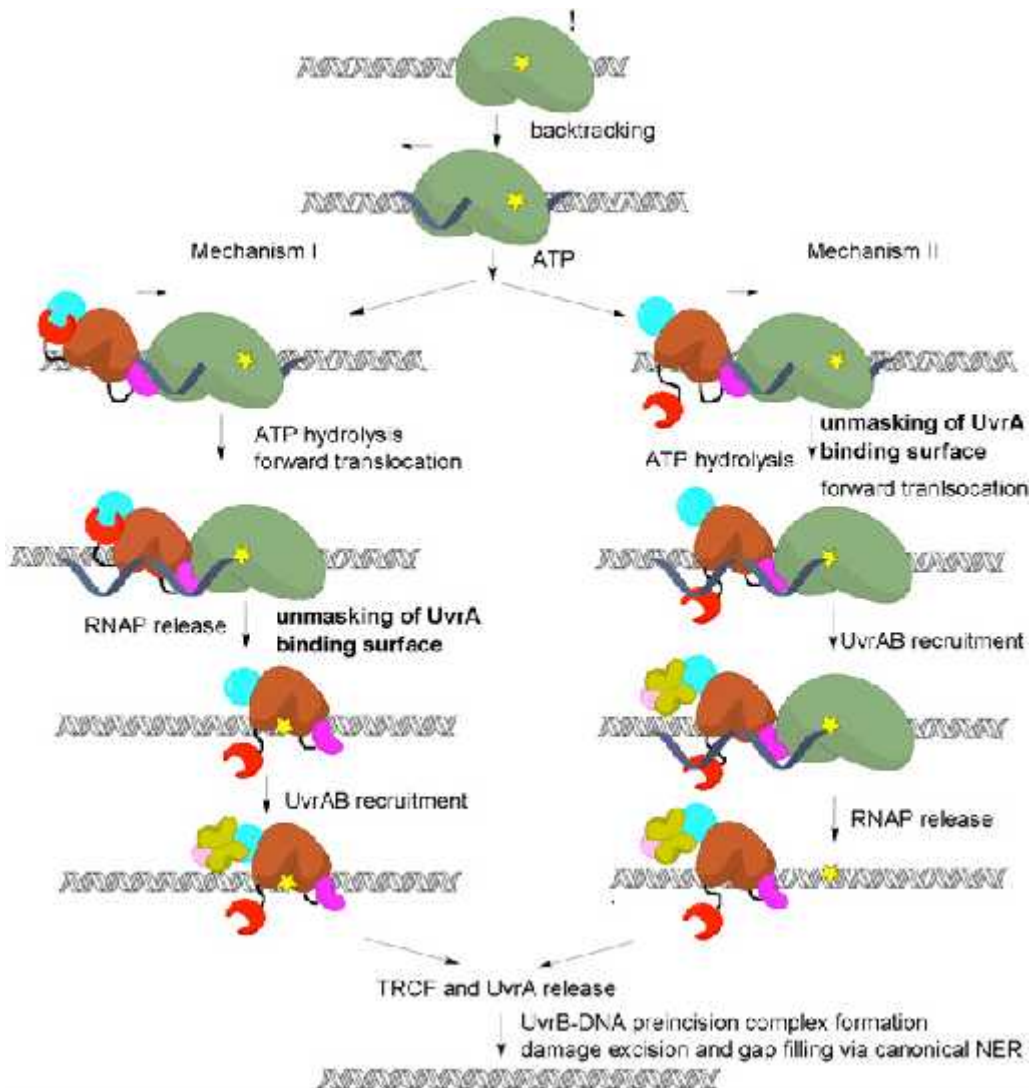
UvrB interagira s UvrA, UvrC, UvrD i DNA polimerazom te je zajedno s UvrA uključena u detekciju i potvrdu oštećenja DNA. Građena je od 5 domena. Domene 1a i 3 su dio modula helikaza superfamilije 2, a sudjeluju u vezanju i hidrolizi ATP-a važnim pri kretanju po DNA. Domena 2 interagira s UvrA, a domena 4 interagira s UvrA i UvrC. Prepoznavanje oštećenja djeluje tako da se -ukosnica 1a domene ubaci između lanaca DNA u regiji gdje je lance lakše odvojiti zahvaljujući i djelovanju UvrA. -ukosnica zatim pritisne DNA na domenu 1b. ATP-om aktivnošću dolazi do translokacije DNA, a oštećenja koja ne mogu proći između domene 1b i -ukosnice zaustavljaju DNA translokaciju i daju signal za pokretanje ostalih koraka NER (Truglio i sur. 2005, Deaconescu i sur. 2006).

4.3.2. Kako protein Mfd ubrzava popravak nekodirajućeg lanca?

Konačan odgovor na to pitanje još se ne zna. Jedan od mogućih odgovora je da nakon disocijacije RNAP s kalupa Mfd ostaje vezan na mjestu oštećenja te da to utječe na konformaciju i ATP-om aktivnost Mfd što bi onda utjecalo na enzime popravka. Ali ne postoje dokazi da Mfd ostaje stabilno vezan na DNA nakon što RNAP ode. Druga teorija je da ukoliko se Mfd i UvrB vežu na UvrA na sličan način može doći do kompeticije za vezno mjesto. Postoje neki eksperimentalni dokazi za ovu teoriju. Do nedavno se smatralo da se dvije UvrA molekule vežu na jednu UvrB te da tvore UvrA₂UvrB kompleks koji pretražuje DNA. Danas rezultati pokazuju da je moguće da nastaje UvrA₂UvrB₂ (Verhoeven i sur. 2002) iz čega se može pretpostaviti da tijekom TCR nastaje UvrA₂UvrB₂Mfd kompleks. Još jedna od teorija je da Mfd pomaže dovođenju UvrA na mjesto oštećenja (ubrzava stopu stvaranja UvrA-UvrB kompleksa na mjestu oštećenja na način da veže UvrA dok RNAP još prepisuje) ili pomaže uklanjanju UvrA iz UvrAB kompleksa. Moguće je i da mijenja svojstva UvrA svojim vezanjem ili konformacijskom promjenom DNA olakšava vezanje UvrAB (Savery 2007).

Istraživanje koje su proveli Manelyte i suradnici 2010. ukazuje na to da Mfd djeluje kao prvi korak u procesu popravka povećavajući i stopu popravka promjenom načina na koji UvrA dolazi na oštećenje, a ne u kasnijem koraku destabilizacijom UvrA-UvrB-DNA

kompleksa. Do tog zaključka su došli analizom mutanata *uvrA* i *uvrB* koji su pokazivali drugačiji uinak na GGR-NER i TCR-NER. Pronašli su 3 mutanta koja su bila lošija u GGR-NER nego u TCR-NER. Sva tri mutanta imala su problem u prepoznavanju oštećenja DNA. Pretpostavlja se da Mfd ili Mfd zajedno s zaustavljenim transkripcijskim kompleksom nadomješta potrebu da UvrA otkrije oštećenje kao u GGR-NER (Manelyte i sur. 2010).

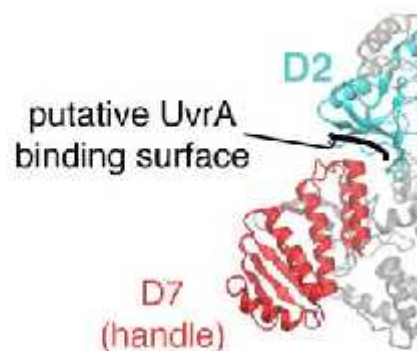


Slika 7. Predloženi TCR mehanizmi. RNAP (zeleno), oštećenje DNA (žuto), translokacijska domena (smeđe), ljuštiasto (RID), D2 (plavo), D7 (crveno), NER (žuto). RNAP zaustavlja se na oštećenju i reverzno translocira, dolazi do vezanja Mfd i translokacije naprijed RNAP te njeno otpuštanja sa DNA. Dva predložena mehanizma se razlikuju u vremenu otkrivanja UvrA veznog mjesta i trenutku vezanja UvrA na Mfd (prije ili nakon otpuštanja RNAP). Dosadašnji podaci daju prednost mehanizmu I (preuzeto iz: Deaconescu i sur. 2012).

4.4. Autoregulacija D7

Translokacijski modul povezan je s domenom 7, a D7 interagira s D2 UvrB homolognog modula prekrivaju i UvrA vezno mjesto (Slika 8.). Struktura Mfd (izolirani protein) prikazuje inhibirano stanje Mfd te da bi došlo do njegove aktivnosti mora doći do konformacijskih promjena. Mfd bez RNAP pokazuje malu ATPaznu aktivnost, a DNA translokacija nije uočena. D2-D7 interakcije drže Mfd u inhibiranom stanju. Da bi Mfd mogao izvršavati svoje zadatke (ATPazna aktivnost, DNA translokacija, UvrA vezanje) mora doći do prekida autoinhibicije (Srivastava i sur. 2011).

Napravljena su 4 mutanta u kojima je došlo do remećenja D2-D7 interakcija (delecija N-kraja, delecija C-kraja Mfd, supstitucijske mutacije u D2 i D7). Mutanti *mfd* pokazivali su veći u stopu hidrolize ATP-a nego divlji tip kao i povećanu stopu DNA translokacije. Zaključeno je da D2-D7 interakcija ne samo da blokira vezanje UvrA nego i stabilizira konformaciju proteina Mfd u kojoj je ATP hidroliza i DNA translokacija inhibirana. Pretpostavka je da divlji tip u interakciji s RNAP prolazi kroz konformacijske promjene time se aktivira ATP hidroliza i DNA translokacija potrebne za otpuštanje RNAP (Smith i sur. 2007). Autoregulacija D7 osigurava da do translokacijske aktivnosti Mfd dolazi samo u odgovarajućim uvjetima, tj. kada je Mfd vezan za zaustavljeni transkripcijski kompleks. D7 nije potreban za TCR, ali njegova autoregulatorna uloga sprječava nepotrebne interakcije Mfd s UvrA koje bi mogle dovesti do smanjenja rada GGR-NER (osobito ako ima više proteina Mfd nego UvrA) (Smith 2007).

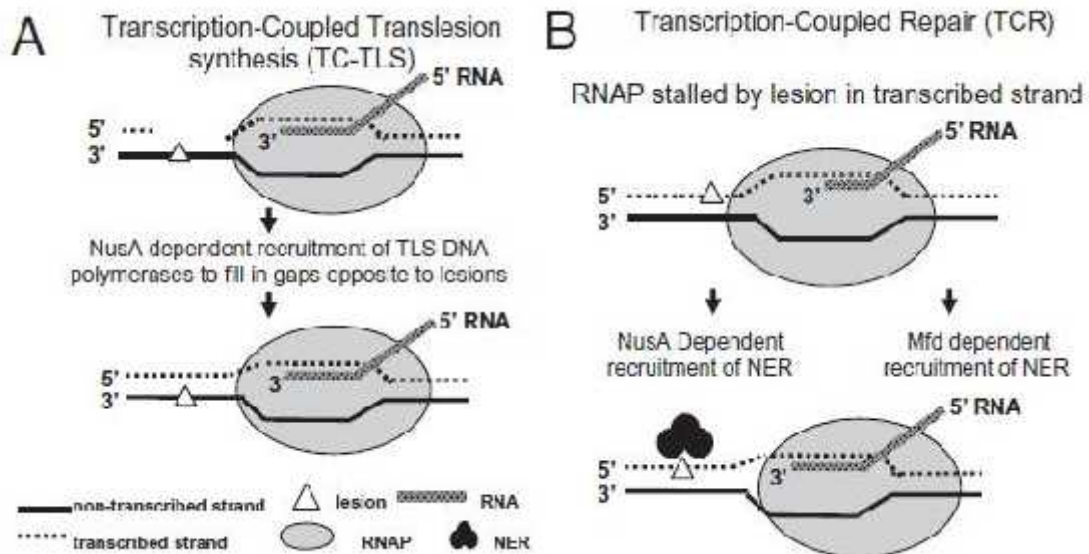


Slika 8. Struktura Mfd. Prikaz D2-D7 interakcije i pretpostavljenog UvrA veznog mjesta na D2 UvrB homolognog modula (preuzeto iz: Deaconescu i sur. 2006).

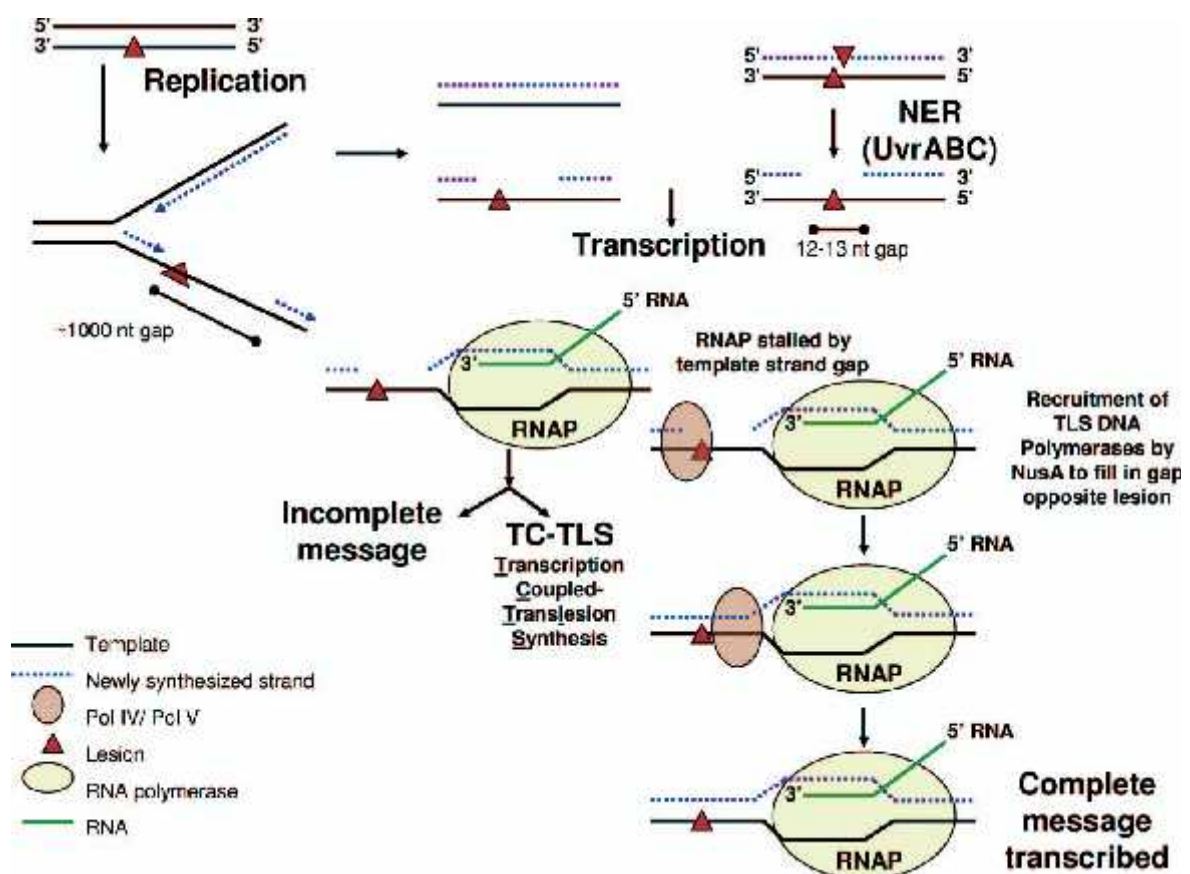
5. Mfd-neovisan TCR

Elongacijski faktor RNAP protein NusA koji je ima ulogu u pauziranju i terminaciji transkripcije ima ulogu i u popravku DNA povezuju i transkripciju s translezijskom sintezom DNA (TCR-TLS, *translesion synthesis*) i NER (TCR-NER). TLS je replikacija preko ošte enja DNA koja blokiraju replikativnu DNA polimerazu. Kod *E. coli* postoje dvije TLS DNA polimeraze DinB (pol IV) i UmuD₂C (pol V) koje s smanjenom vjeroš u replikacije i s mogu noš u pojave mutacija sintetiziraju novi lanac DNA (Cohen i sur. 2011). Ukoliko tijekom transkripcije RNAP nai e na prazninu u nekodiraju em lancu ona se zaustavlja. Praznina može biti posljedica ošte enja u kodiraju em lancu koje DNA polimeraza ne može zaobi i. U tom slu aju proteina NusA koji je povezan s RNAP u fazi elongacije transkripcije može regrutirati TLS polimerazu koja popravlja ošte enje i omogu uje nastavak transkripcije istom RNAP (ako nije disocirala za vrijeme popravka) ili novom RNAP. Na ovaj na in TLS je usmjeren maksimalnom pomaganju nastavka transkripciji (Slika 10.) (Cohen i sur. 2009). NusA ima ulogu ne samo u toleranciji ošte enja DNA (TLS) nego i u popravku DNA (Slika 9.). NusA promovira popravak NER. Interakcijom s UvrA, NusA dovodi enzime ekscizijskog popravka nukleotida do mjesta ošte enja.

Zašto postoje dva mehanizma TCR-NER? Cohen i suradnici ustvrdili su da neki adukti (posebice oni uzrokovani nitrofurazonom) zaustavljaju RNAP i do 4 nukleotida uzvodno od mjesta ošte enja. Razli iti tipovi ošte enja tako tvore razli ite vrste zaustavljenih transkripcijskih kompleksa koji onda zahtijevaju razli ite TCR. Za Mfd-ovisan TCR važna je translokacijska aktivnost Mfd kako bi došlo otpuštanja RNAP i otkrivanja ošte enja enzimima popravka dok NusA najvjerojatnije pomo u RNAP osje a ošte enje koja onda reverzno translocira i tako omogu uje vezanje enzima NER. Poznavanje NusA-ovisnog NER-TCR je na samom po etku i sve navedeno su samo pretpostavke. Potrebno je ustvrditi da li su u taj proces uklju en još neki imbenici, na koji na in NusA dovodi enzime NER na ošte enje, da li je mogu i popravak ošte enja i u kodiraju em lancu (McGlynn 2010). Ono što možemo zaklju iti jest da stanica maksimalno nastoji minimalizirati u inak ošte enja DNA na transkripciju.



Slika 9. Dva puta proteina NusA. (A) transkripcijom povezana translezijska sinteza (TC-TLS) (B) NER udružen s transkripcijom (TCR) (preuzeto iz: Cohen i sur. 2010).

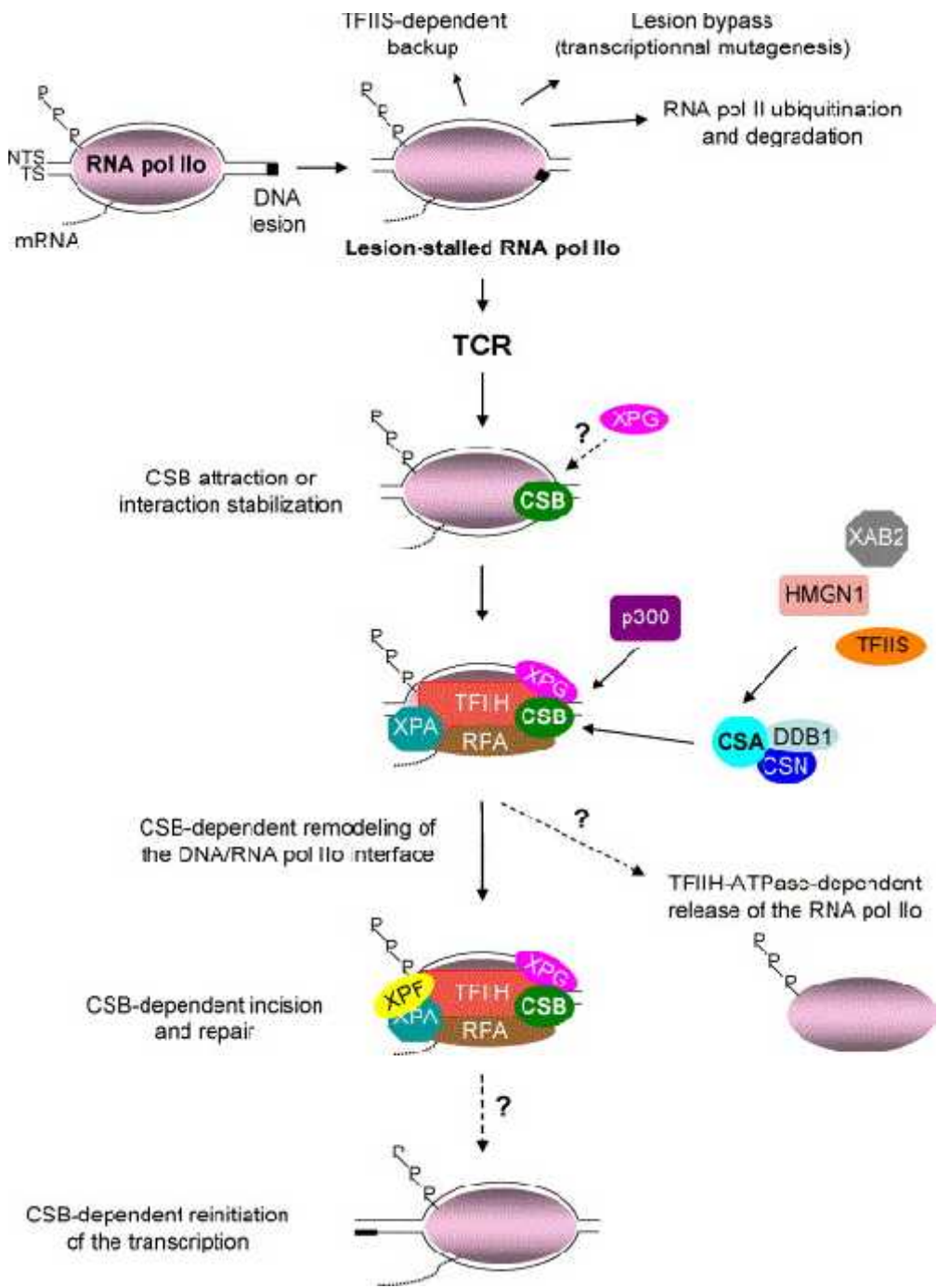


Slika 10. Model s transkripcijom povezane translezijske sinteze. RNAP zaustavljena prazninom u nekodirajućem lancu može pomoći u NusA regrutirati TLS DNA polimerazu koja popuni prazninu i omogućiti daljnji tijek transkripcije (preuzeto iz: Cohen i sur. 2009).

6. TCR kod eukariota

Proces TCR o uvan je proces koji je mnogo složeniji kod eukariota nego kod bakterija. Kod ljudi mutacije u genima važnim za TCR dovode do pojave Cockyane sindroma (CS). CS je rijetka, ali teška bolest koju karakteriziraju abnormalnosti u razvoju, postnatalne mentalne retardacije, fizikalni nedostaci, UV osjetljivost, degeneracija mozga, gubitak pigmentacije što sve dovodi do preuranjene smrti. Za razliku od bolesti Xeroderma pigmentosum kod CS osjetljivost na svjetlost ne zna i predispoziciju za pojavu raka kože. Budu i da se teške bolesti poput CS vežu uz mutacije u genima za TCR znanstvenici nastoje što bolje utvrditi mehanizam TCR kako bi bolje razumjeli bolest i pronašli adekvatnije terapije (Sarasin i sur. 2006). Do CS dolazi mutacijom u jednom od pet gena: mutacija u *CSA*, *CSB* (oboljeli od CS) i *XPG*, *XPB* (podjedinice TFIIH) i *XPG* (uz CS boluju i od bolesti *Xeroderma pigmentosum*).

Kad prilikom elongacijske faze transkripcije RNA polimeraza II (RNAPII) nai e na ošte enje ona se zaustavlja i djeluje kao jaki signal za djelovanje p53 što dovodi do zaustavljanja stani nog ciklusa i apozoze. Prema jednom od modela TCR-NER kod ljudi protein CSB se veže na zaustavljenu RNAPII te zatim privla i TFIIH i XPG pri emu najvjerojatnije djelovanjem TFIIH dolazi do otpuštanja RNAPII. Dosadašnja istraživanja su pokazivala da su za otpuštanje RNAPII potrebni TFIIH, XPG i CSB, a nova istraživanja pokazuju da u nekim uvjetima ne mora do i do otpuštanja RNAPII ve samo do njene konformacijske promijene. Zatim dolazi do vezanja XPA i RPA pri emu dolazi do potvrde ošte enja, a sam popravak DNA vrše enzimi NER (Slika 11.) (Assenmacher 2006).



Slika 11. Model TCR kod eukariota. Još se ne zna da li dolazi do otpuštanja RNAP ili ne (preuzeto iz: Sarasin i sur. 2006).

7. Literatura

- Assenmacher N, 2006. Structural and biochemical analysis of the UvrA-binding module of the bacterial transcription-repair coupling factor Mfd. *Ph.D. dissertation*, Ludwig-Maximilians University, Munich.
- Assenmacher N, Wenig K, Lammens A, Hopfner KP, 2005. Structural Basis for Transcription-coupled Repair: the N Terminus of Mfd Resembles UvrB with Degenerate ATPase Motifs. *Journal of Molecular Biology* **355**, 675-683.
- Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC, 1985. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* **40**, 359-369.
- Cohen SE, Walker GC, 2011. New discoveries linking transcription to DNA repair and damage tolerance pathways. *Transcription* **2**, 37-40.
- Cohen SE, Lewis CA, Mooney RA, Kohanski MA, Collins JJ, Landick R, Walker GC, 2010. Roles for the transcription elongation factor NusA in both DNA repair and damage tolerance pathways in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**, 15517-15522.
- Cohen SE, Godoy VG, Walker GC, 2009. Transcriptional Modulator NusA Interacts with Translesion DNA Polymerases in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **191**, 665-672.
- Deaconescu AM, Sevostyanovab A, Artsimovitchb I, Grigorieffa N, 2012. Nucleotide excision repair (NER) machinery recruitment by the transcription-repair coupling factor involves unmasking of a conserved intramolecular interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **109**, 3353-3358.
- Deaconescu AM, Savery N, Darst SA, 2007. The bacterial transcription repair coupling factor. *Current Opinion in Structural Biology* **17**, 96-102.
- Deaconescu AM, Chambers AL, Smith AJ, Nickels BE, Hochschild A, Savery NJ, Darst SA, 2006. Structural Basis for Bacterial Transcription-Coupled DNA Repair. *Cell* **124**, 507-520.
- Epshtein V, Toulme F, Rahmouni AR, Borukhov S, Nudler E, 2003. Transcription through the roadblocks: the role of RNA polymerase cooperation. *European Molecular Biology Organization Journal* **22**, 4719-4727.
- Laptenko O, Lee J, Lomakin L, Borukhov S, 2003. Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase. *European Molecular Biology Organization Journal* **22**, 6322-6334.
- Manelyte L, Kim YIT, Smith AJ, Smith RM, Savery NJ, 2010. Regulation and Rate Enhancement during Transcription-Coupled DNA Repair. *Molecular Cell* **40**, 714-724.
- McGlynn P, 2010. Linking transcription with DNA repair, damage tolerance, and genome duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**, 15314-15315.
- Mellon I, Hanawalt PC, 1989. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* **342**, 95-98.
- Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC, 1987. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* **51**, 241-249.

- Park JS, Marr MT, Roberts JW, 2002. *E. coli* Transcription Repair Coupling Factor (Mfd Protein) Rescues Arrested Complexes by Promoting Forward Translocation. *Cell* **109**, 757-767.
- Roberts J, Park JS, 2004. Mfd, the bacterial transcription repair coupling factor: translocation, repair and termination. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 120-125.
- Sarasin A, Stary A, 2006. New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. *DNA repair* **6**, 265-269.
- Savery NJ, 2011. Prioritizing the repair of DNA damage that is encountered by RNA polymerase. *Transcription* **2**, 168-172.
- Savery NJ, 2007. The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. *Trends in Microbiology* **15**, 326-333.
- Selby CP, Witkin EM, Sancar A, 1991. *Escherichia coli mfd* mutant deficient in "mutation frequency decline" lacks strand-specific repair: In vitro complementation with purified coupling factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**, 11574-11578.
- Selby CP, Sancar A, 1990. Transcription preferentially inhibits nucleotide excision repair of the template DNA strand in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 21330-21336.
- Smith AJ, Szczelkun MD, Savery SJ, 2007. Controlling the motor activity of a transcription-repair coupling factor: autoinhibition and the role of RNA polymerase. *Nucleic Acids Research* **35**, 1802-1811.
- Smith AJ, Savery NJ, 2005. RNA polymerase mutants defective in the initiation of transcription-coupled DNA repair, *Nucleic Acids Research* **33**, 755-764.
- Srivastava DB, Darst SA, 2011. Derepression of Bacterial Transcription-Repair Coupling Factor is Associated with a Profound Conformational Change. *Journal of Molecular Biology* **406**, 275-284.
- Truglio JJ, Rhau B, Croteau DL, Wang L, Skorvaga M, Karakas E, Dellavecchia MJ, Wang H, Van Houten B, Kisker C, 2005. Structural insights into the first incision reaction during nucleotide excision repair. *European Molecular Biology Organization Journal* **24**, 885-894.
- van Hoffen A, Venema J, Meschini R, van Zeeland AA, Mullenders LH, 1995. Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *European Molecular Biology Organization Journal* **14**, 360-367.
- Verhoeven EE, Wyman C, Moolenaar GF, Goosen N, 2002. The presence of two UvrB subunits in the UvrAB complex ensures damage detection in both DNA strands. *European Molecular Biology Organization Journal* **21**, 4196-4205.
- Zhou W, Doetsch PW, 1993. Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**, 6601-6605.

8. Sažetak

Popravak DNA udružen s transkripcijom jedan je od putova NER, a javlja se kad RNAP zastane na oštećenju u nekodirajućem lancu. Nekodirajućem i lanac popravljaju se puno brže nego kodirajućem i lanac istog gena ili neekspresirana regija genoma. Iako je TCR prvi put otkriven kod eukariota taj fenomen najbolje je okarakteriziran kod *E. coli*. Glavnu ulogu u TCR kod bakterija ima protein Mfd kao ATP-ovisna DNA translokaza, a poznat je i kao faktor povezan s transkripcijskim popravkom (TRCF). Model djelovanja Mfd pretpostavlja da Mfd prepoznaje zaustavljenu RNAP te da reverzno translociranu RNAP pomoću energije ATP translocira naprijed na njenu prvotnu poziciju. Zatim dolazi do otpuštanja RNAP i dovođenja enzima NER. Postoji i alternativni put Mfd-ovisnom TCR, a to je TCR u kojem otpuštanje RNAP i popravak DNA povezuje elongacijski faktor NusA.

Puno se toga ulaže u poznavanje mnogo kompleksnijeg mehanizma TCR kod eukariota zbog činjenice da mutacije u genima povezanima s gubitkom TCR dovode do teških bolesti kod ljudi. Mehanizam TCR kod ljudi je uglavnom nepoznat usprkos tome što su poznati neki od glavnih sudionika tog procesa poput proteina CSA, CSB, TFIIH i XPG.

Važno je ustvrditi mehanizam TCR ne samo zbog problema koje zaustavljena RNAP stvara u stanici i bolesti koje uzrokuje nefunkcionalni TCR već i zbog toga što je TRCF uključen u povezivanje centralnih staničnih procesa i što bi daljnja saznanja o načinu na koji TRCF pomoću svojih domena utječe na RNAP i NER pomoglo u otkrivanju točnog mehanizma ovog procesa.

9. Summary

Transcription-coupled DNA repair (TCR) is one of the subpathways of nucleotide excision repair (NER) that occurs when RNA polymerase is stalled at sites of DNA damage in the template strand. Template strand is repaired more quickly than similar lesions in coding strand or unexpressed parts of genome. Although the TCR was first observed in eukaryotes TCR phenomenon is best characterized in *E. coli*. The main role of TCR in bacteria has Mfd (ATP-dependent DNA translocase), also known as a transcription repair coupling factor (TRCF). Model for TCR postulate that Mfd recognizes and binds specifically to stalled and reverse translocated RNAP and using energy derived from ATP hydrolysis translocates forward RNAP to the transcription block. That results in RNAP release, transcript termination and recruitment of the NER machinery to the site of lesion. Recent studies show existence of alternative Mfd-independent TCR pathway mediated by elongation factor NusA.

A lot is invested in understanding of more complex mechanism of TCR in eukaryotes due to the fact that mutations in genes associated with loss of TCR lead to severe disease in humans. The mechanism of TCR in humans is largely unknown despite having known some of the major participants in this process, such as CSA, CSB, TFIIH and XPG proteins.

It is important to establish the mechanism of TCR not only because of the problems that stalled RNAP causes in the cell and diseases caused by dysfunctional TCR but also because the TRCF is involved in linking central cellular processes and knowing how TRCF uses its multiple domains to manipulate RNAP and the NER would help shed the light on the functional mechanism of TCR.