

Nobelova nagrada za kemijo za leto 2015 podeljena za odkritje načina popravljanja napak v DNA

Radovan Komel

Švedska kraljeva akademija znanosti se je odločila, da letošnjo Nobelovo nagrado za kemijo podeli trem biokemikom in molekularnim biologom, ki so pomembno pri-

spevali k odkritju in pojasnitvi molekularnih mehanizmov popravljanja napak v molekulah DNA.



Tomas Lindahl, 77-letni britanski znanstvenik švedskega rodu, raziskovalec na Inštitutu Francis Crick in v Laboratoriju Clare Hall v Hertfordshiru v Veliki Britaniji.



Aziz Sancar, 69-letni ameriški znanstvenik turškega rodu, raziskovalec in profesor na Univerzi North Carolina v Združenih državah Amerike.



Paul Modrich, 69-letni ameriški znanstvenik, Američan, raziskovalec in profesor na Medicinskem inštitutu Howard Hughes na Medicinski fakulteti Univerze Duke v Durhamu v Združenih državah Amerike.

Vir: <http://static01.nyt.com/images/2015/10/07/nytnow/07eveningss-slide-VIIV/07eveningss-slide-VIIV-superJumbo.jpg>.

Odkritje načinov, kako celicam uspe popraviti napake v svojih temeljnih molekulah življenja in s tem ohraniti genetsko informacijo za nemoteno delovanje ter omogočiti njen zvest prenos na celice potomke, je »staro« žebrih trideset let in je bilo s stališča podeljevanja Nobelovih nagrad kljub nedvomnemu pomenu za znanost nekako spregledano. Ni pa bilo spregledano kot eden od temelj-

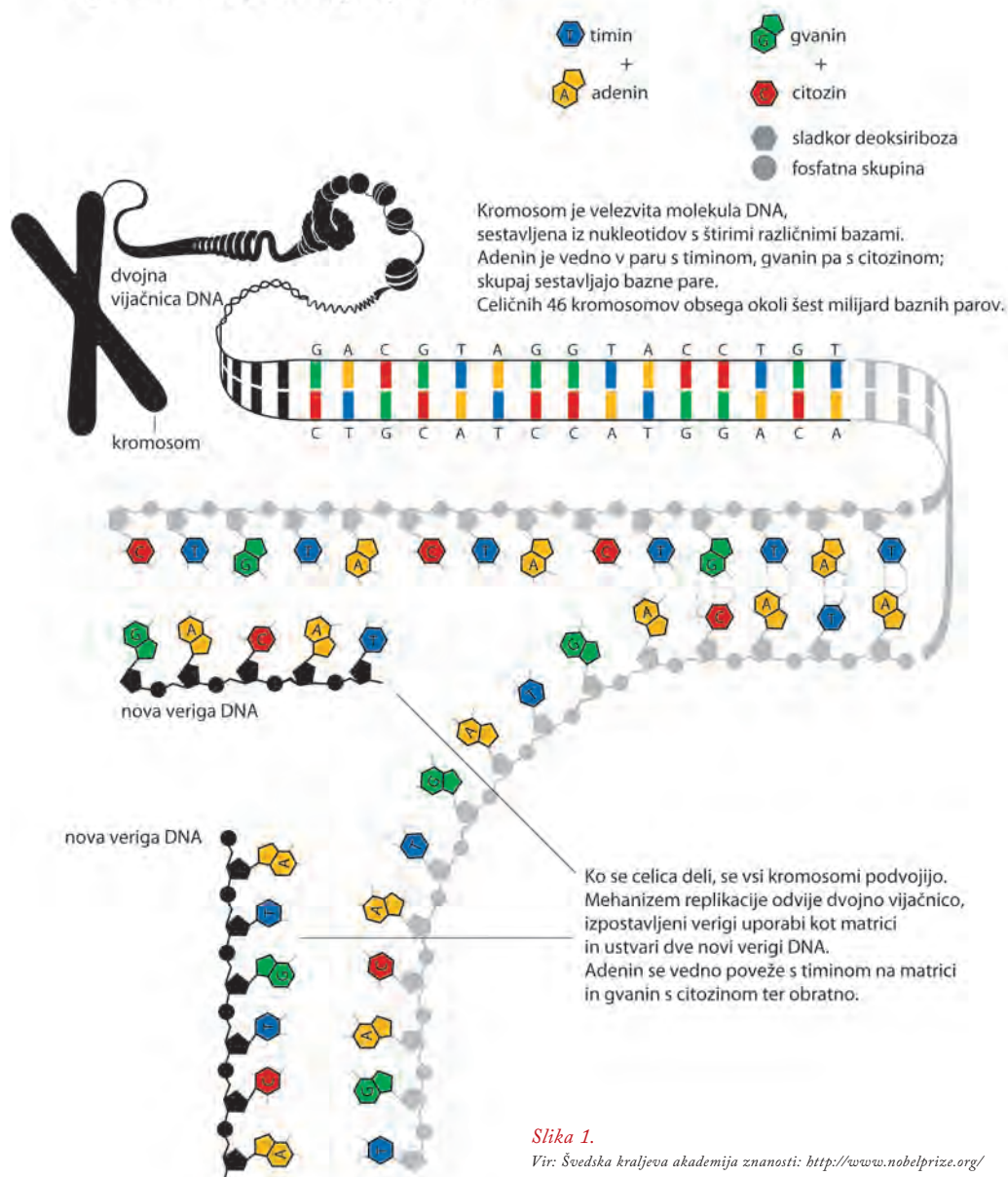
nih elementov pri dolgoletnem raziskovanju in poučevanju molekularnih osnov življenja na področjih biomedicinskih ved in medicine. Z letošnjo podelitvijo nagrade Nobelov odbor popravlja staro napako in ponovno daje priznanje biokemiji in molekularni biologiji kot eni od temeljnih ved sodobne znanosti.

V zgradbi DNA tiči genetska informacija. Je njen obstoj možen kljub nevarnosti kemijskega nereda?

Že iz srednje šole vemo, da so naše celice zgrajene iz velikega števila različnih vrst molekul. Med njimi so nukleinske kisline

(DNA in RNA) tiste, ki vsebujejo, ohranjajo in predajajo informacijo za izgrajevanje molekul, potrebnih za zgradbo in delovanje celic. Temeljna je dvovertična molekula DNA, zgrajena iz štirih vrst gradnikov (nukleotidov) iz heterocikličnih organskih

Zgradba in podvajanje DNA



Slika 1.

Vir: Švedska kraljeva akademija znanosti: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/fig_ke_en_15_dnastructure.pdf.

baz – purinskih adenina (A) in gvanina (G) ter pirimidinskih citozina (C) in timina (T). Vsak nukleotid v DNA je sestavljen iz ene od omenjenih organskih baz, sladkorja deoksiriboza in fosfatne skupine. Med seboj so povezani preko fosfatnih skupin, z dvojnimi estrskimi vezmi. Tak niz predstavlja enojno verigo DNA, ki se z drugo verigo povezuje v dvojnoverižno DNA. Verigi sta povezani tako, da se večja purinska baza povezuje z manjšo pirimidinsko, gvanin je vedno povezan s citozinom in adenin s timinom: pari purin-pirimidin (gvanin-citozin in adenin-timin) tako zagotavljajo enakomernost vodoravne razdalje med obema verigama in - ker sta verigi združeni v obliko dvojne vijačnice - tudi enakost navpičnih razdalj in kotov med posameznimi pari. Dvojnoverižna DNA je tako razmeroma stabilna, brez motečih torzij in prelomov, ki bi obstajali v primeru nekomplementarnega oziroma naključnega povezovanja baz (nukleotidov). Zaporedje nukleotidov v verigi DNA, ki je pomenko, je genetska informacija: »črke« G, A, C, T (baze oziroma nukleotidi) v različnih kombinacijah lahko sestavljajo »besede« genetske informacije – »beseda« ... -A-A-C-G-T-T-G-A-T- ... je zagotovo in že na prvi pogled drugačna od »besede« ... -G-C-G-A-G-C-T-C-A- ... ali »besede« ... -C-A-T-G-C-G-T-T-A- ... Seveda pa je beseda informacija samo v primeru, da ima vedno enak pomen, ki se ohranja in predaja naprej. V primeru DNA se pomen »besede« izrazi, ko se zaporedje nukleotidov iz ene od obeh verig DNA prepiše v komplementarno funkcijsko zaporedje nukleotidov druge vrste nukleinske kisline - ustrezne molekule RNA. Ta je lahko končni funkcijski produkt prepisovanja (transkripcije) DNA, kot so prenašalne oziroma transportne RNA (tRNA, ki prenašajo aminokislino v sintezo proteinov), ribosomske RNA (rRNA, ki izgrajujejo nosilno mrežo ribosomov, celičnih organelov oziroma »tovarn« za sintezo proteinov) in različne majhne jedrne RNA, ki sodelujejo pri uravnavanju delovanja nukleinskih kislin

oziroma genoma. Večina prepisanih RNA pa so vmesniki, tako imenovane sporočilne oziroma informacijske RNA (angleško *messenger RNA*, *mRNA*), pri katerih je zaporedje nukleotidov matrica za v ribosomih potekajoče prevajanje sporočila (»besede« nukleotidov) v zaporedje aminokislin, ki pomeni temeljno zgradbo ustreznega proteina. Proces prevajanja zaporedja nukleotidov DNA oziroma mRNA v zaporedje aminokislin proteina imenujemo tudi translacija.

Omenili smo, da se mora informacija tudi ohranjati in predajati naprej na naslednje celične generacije. To omogoča podvojevanje molekul DNA (replikacija), ki se zgodi pred delitvijo celice na dve hčerinski celici, od katerih vsaka prejme molekule DNA, ki so enake molekulam DNA predhodne, »starševske« celice. Pri podvajanju se dvoverižna vijačna DNA razvije in razklene, na vsako od obeh »razgaljenih« verig pa encim polimeraza DNA ob sodelovanju številnih drugih proteinov dodaja ustrezne komplementarne nukleotide (na gvanin vedno citozin, na adenin vedno timin in obratno). Končna produkta sta tako dvoverižni DNA, pri katerih je ena veriga iz predhodne DNA in ena na novo sintetizirana, obe pa sta popolnoma enaki predhodnici. Ko se celica deli, hčerinski celici prejmeta vsaka po eno kopijo posamezne vrste DNA. Ker so posamezne molekule DNA v naših celicah skupaj s specifičnimi proteini velevzrite v zgradbe, imenovane kromosomi, pravimo, da se pred celično delitvijo podvajajo kromosomi, kar se tudi dejansko zgodi (slika 1).

Pri oploditvi se 23 kromosomov spermija pridruži 23 kromosomom jajčeca in tako niz 46 kromosomov nastale zigote predstavlja genom bodočega bitja, z vso potrebno informacijo za njegov razvoj, obstoj in delovanje. Opljeno jajčece se nato deli in nastali novi celici se delita naprej, tako da ima zarodek že po enem tednu 128 celic, odrasla oseba pa kar težko predstavljevih nekaj deset tisoč milijard celic. Če bi vso DNA človeškega

organizma sestavili v linearno nitko, bi z njo lahko več kot 250-krat premostili razdaljo Zemlja-Sonce. Kot rečeno, se med razvojem in tudi kasneje (za rast in obnovo obrabljjenih in poškodovanih celic oziroma tkiv) celice delijo in pri delitvi vsake celice se seveda podvoji tudi celotni niz njenih 46 kromosomov, kar vsakokrat pomeni podvojitev genoma, to je skupnega zaporedja šestih milijard nukleotidov. Na časovni ravni se do odraslega organizma zgodi na milijarde celičnih delitev in podvajanj DNA, kar pomeni, da je glede na to oziroma glede na število celic (približno $3,7 \times 10^{13}$ celic) in velikost genoma verjetnost velika, da pri tem pride do številnih napak, kot so vgradnja enega ali več napačnih nukleotidov na en položaj kot tudi izpustitev vgradnje nukleotida v en ali več položajev. In to se ves čas tudi dejansko dogaja, zato bi se napake v odsotnosti zaščitnih dejavnikov vse od spočetka, med razvojem in v teku življenja kopičile ter bi do nerazpoznavnosti izmaličile genom in njegovo informacijo. Poleg tega DNA kljub dvojnoverižni zgradbi in velevzvitju, skupaj s proteini, v zgradbo kromosoma, sama po sebi tudi ni neizmerno obstojna molekula, saj je dnevno izpostavljena številnim uničujočim zunanjim in notranjim kemijskim in fizikalnim dejavnikom. Škodljivi kemijski dejavniki so reaktivne genotoksične molekule iz okolja, pa tudi reaktivni metaboliti, ki stalno nastajajo v različnih fizioloških procesih, k fizikalnim pa štejemo izpostavljenost različnim ionizirajočim sevanjem. Vse skupaj bi to pomenilo nastanek kemičnega nereda, ki bi onemogočil razvoj življenja.

DNA je obstojna zaradi obstoja mehanizma popravljanja napak, ki bi sicer povzročile kemijski nered in njen propad

Življenje se je kljub temu, da vse kemijske procese lahko prizadenejo naključne napake, razvilo in obstaja. To pomeni, da je DNA vseeno razmeroma obstojna, prilagodljiva molekula, kar je tudi bilo splošno prepričanje znanstvenikov v šestdesetih le-

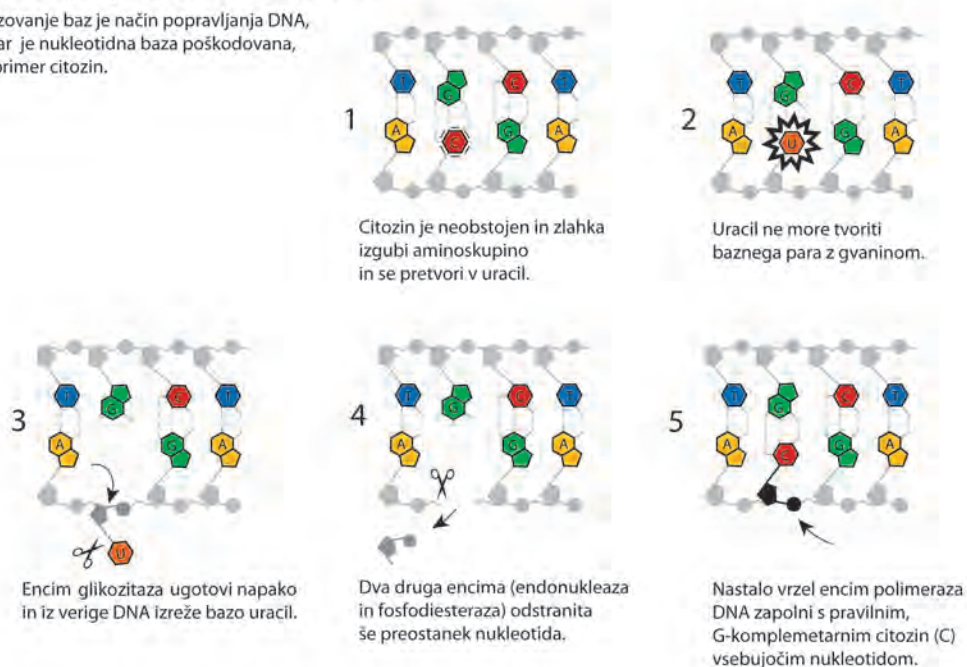
tih prejšnjega stoletja, ko je Tomas Lindahl na Univerzi Princeton v Združenih državah Amerike preučeval molekulo RNA in se soočal z njeno izjemno neobstojnostjo, pri tem pa se čudil, kako to, da pa je njena »sestrska« DNA tako obstojna. Odgovor na to vprašanje je dobil nekaj let kasneje, ko se je vrnil na Karolinški inštitut v Sockholmu in s poskusi podvajanja DNA v razmerah *in vitro* ugotovil, da je tudi ta podvržena sicer v primerjavi z RNA bolj počasni, vendar opazni razgradnji. Ocenil je, da tudi *in vivo*, celo v razmerah zaščite v celici, genom vsak dan doživlja na tisoče možnih uničujočih poškodb in da je pogostnost teh tolikšna, da bi izključevala razvoj življenja in obstoj človeka na Zemlji. Pomislil je, da zagotovo obstaja nekakšen način odpravljanja teh poškodb. Začel je iskati encime, katalizatorje celičnih biokemičnih procesov, ki to omogočajo.

Za raziskavo je uporabil bakterije, katerih celice so mnogo enostavnejše od naših, DNA pa je ravno tako sestavljena iz štirih vrst nukleotidov, ena od njenih slabosti pa je, da je nukleotidna baza citozin kemijsko precej neobstojna, saj zlahka izgubiaminsko skupino in se spremeni v bazo uracil. Če se pri podvajanju DNA to ne bi popravilo, bi v novo nastalih verigah namesto običajnih parov citozin-timin imeli pare uracil-adenin, kar bi seveda spremenilo genetsko informacijo. Z natančnimi poskusi je našel bakterijski encim, ki prepozna napako in izreže bazo uracil, druga dva encima pa odstranita še preostanek nukleotida in polimeraza DNA lahko nato vstavi pravilni nukleotid s citozinom (slika 2).

Sledilo je 35 let plodnega dela in Lindahl je našel številne encime, ki na enak način popravljajo kemične poškodbe tudi pri drugih nukleotidih. V začetku osemdesetih let se je preselil v London, postal direktor novoustanovljenega Laboratorija Clare Hall in končno leta 1996 uspel sestaviti encimski sistem ter v razmerah *in vitro* ponazoriti način popravljanja napak v DNA pri človeku.

Popravljanje z izrezovanjem baz

Izrezovanje baz je način popravljanja DNA, kadar je nukleotidna baza poškodovana, na primer citozin.



Slika 2.

Vir: Švedska kraljeva akademija znanosti, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/fig_ke_en_15_baseexcisionrepair.pdf

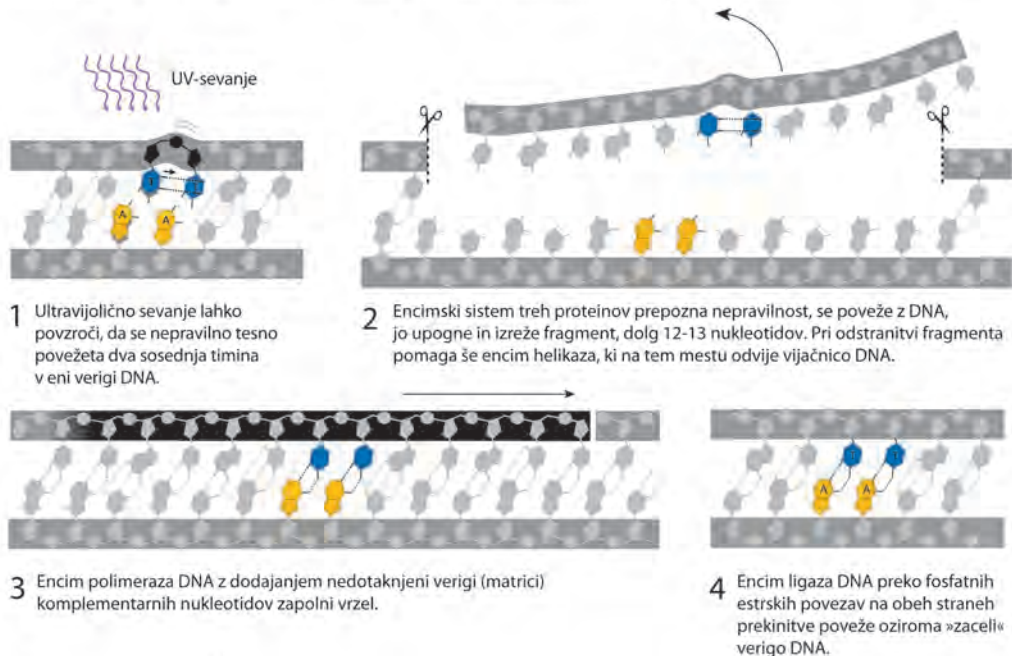
Kaj pa poškodbe DNA zaradi zunanjih dejavnikov?

Lindahlova preučevanja so bila osredotočena na procese, ki potekajo v razmeroma zaščitenem okolju v notranjosti celice. Kaj pa, kadar vanjo prodrejo uničujoči zunanji dejavniki, na primer ultravijolični žarki, za katere je že dolgo znano, da poškodujejo DNA? Problema se je lotil Aziz Sancar, ki se je za preučevanje bioloških molekul navdušil že med študijem medicine v Istanbulu, ko je končal še študij biokemije, pa se je pridružil ameriškem raziskovalcu Claudiu Rupertu, ki je na Teksaški univerzi v Dallasu preučeval zelo poseben pojav odpornosti bakterij proti ultravijoličnemu sevanju: ko bakterijo izpostavimo smrtnemu odmerku ultravijolične svetlobe, se bakterija lahko nenadoma opomore, če jo takoj zatem

obsevamo še z vidno modro svetlobo. Sancarju je uspelo, da je s pristopi uveljavljajoče se genske tehnologije leta 1976 našel in osamil gen za encim, ki popravlja poškodbe DNA zaradi ultravijoličnega sevanja. Encim fotoreaktivacije, imenovan fotoliaz, je v večji količini, potrebni za nadaljnja preučevanja, nato pridobil s kloniranjem v izbrani bakteriji. To je bila tematika njegovega doktorskega dela, ki pa tisti čas ni poželo kakšnega večjega navdušenja, in zgodilo bi se lahko, da bi raziskave celo zamrle, saj so mu v nadaljevanju zavrnil kar tri prošnje za podoktorsko raziskovalno delo. Zato je nadaljeval kot laboratorijski tehnik na medicinski fakulteti znamenite univerze Yale, na kateri so njegovi novi kolegi preučevali še zmožnost bakterije, da si odpravi z ultravijoličnim sevanjem povzročeno poškodbo DNA tudi brez dnevne svetlobe. Sancar je

Popravljanje z izrezom nukleotidov

Izrez nukleotidov popravlja poškodbe DNA, povzročene z ultravijoličnim sevanjem, in tiste, ki jih povzročajo različne karcinogene snovi, tudi prisotne v cigaretinem dimu.



Slika 3.

Vir: Švedska kraljeva akademija znanosti, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/fig_ke_en_15_baseexcisionrepair.pdf.

s primerjavo za ultravijolično sevanje občutljivih mutant z bakterijami, odpornimi na ultravijolično sevanje, v nekaj letih našel in opredelil tri encime in s poskusi *in vitro* pokazal, da lahko v molekuli DNA prepoznajo z ultravijoličnim sevanjem povzročeno poškodbo, nato zarežejo v verigo DNA na vsaki strani poškodbe in končno odstranijo fragment, dolg 12 do 13 nukleotidov, v katerem je poškodba (slika 3).

V ustvarjalnem okolju univerze Yale predano delo laboratorijskega tehnika, objavljeno leta 1983, ni ostalo prezrto in ponudili so mu profesorsko mesto na Univerzi v Severni Karolini, kjer se je posvetil podrobnejemu preučevanju popravljanja DNA z izrezom nukleotidov. Skupaj z drugimi raziskovalci, med njimi je bil tudi Tomas Lindahl,

je prispeval k spoznanju, da popravljanje z izrezom nukleotidov poteka na kemijsko podoben način v vseh organizmih, tudi pri človeku, čeprav na nekoliko bolj zapleten način kot pri bakterijah.

Včasih se med podvojevanjem DNA zgodi, da se kljub vsemu vstavi napačen nukleotid. Kaj pa zdaj?

Povedali smo, da encim polimeraza DNA med podvajanjem verig DNA na matrično verigo dodaja komplementarne nukleotide; kjer je na matrični verigi adenin, doda timin, kjer je gvanin, doda citozin, in obratno. Novonastali verigi imata vedno pare adenin-timin oziroma timin-adenin in gvanin-citozin oziroma citozin-gvanin. Od časa do časa pa se vseeno zgodi, da se encim »zmoti« in doda napačen nukleotid in

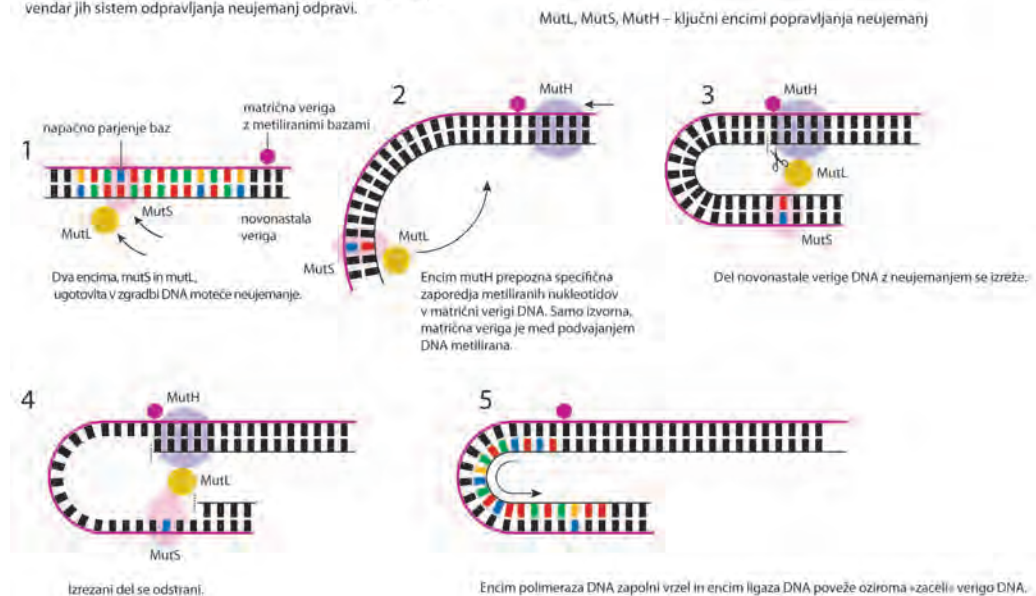
novonastala dvojna veriga DNA ima na tem mestu »neujemanje«. Če bi se to ohranilo pri nadaljnjih celičnih delitvah, bi to lahko pomenilo napako v genetski informaciji. Ali v organizmih poteka popravljanje neujemanj? Temu vprašanju se je posvetil Paul Modrich, ameriški profesor, ki ga je že od mladih nog navduševalo vse, kar je povezano z molekulskimi dogodki v DNA. Srečal se je z delom molekularnega biologa Matthewa Meselsona na Univerzi Harvard, ki je v bakterijsko DNA integriral virusno DNA, v katero je pred tem na določena mesta v eni verigi vstavil napačen nukleotid. Bakterija je napako odpravila, vendar bolj pogosto na eni od obeh verig DNA. Navadno sta obe verigi DNA v bakteriji pred delovanjem encimov zaščiteni z metilnimi skupinami na kratkih nukleotidnih zaporedjih ... GATC ..., vendar za kratek čas med podvajanjem nastajajoča veriga na takih mestih še ni

metilirana in je nezaščiten. Meselson je predpostavil, da to v tistem času še nepoznanemu encimskemu sistemu za odpravljanje neujemanj omogoči, da razlikuje med novo nastajajočo in staro (matrično) verigo in med podvajanjem DNA nadzoruje, ali je vse v redu. Na tej točki sta se prekrizali raziskovalni poti Meselsona in Modricha, ki je raziskoval encim metilaza, s katerim je lahko dodajal metilne skupine v eno ali drugo verigo DNA. Leta 1989 sta skupaj objavila članek z opisom uspešne stvaritve sistema encimov v razmerah *in vitro*, zunaj celice, s katerim je bilo mogoče popravljati neujemanja v molekuli DNA (slika 4).

Ugotovila sta, da je navzočnost metilnih skupin na zaporedjih ... GATC ..., razpršenih po bakterijskem genomu, dejavnik, ki usmerja skupino proteinov (encimov) za popravljanje neujemanj, da svojo vlogo opravi

Popravek neujemanja

Med podvojevanjem DNA v procesu celične delitve se v novi verigi včasih pojavi napačen nukleotid in pride do neujemanja v novonastajajoči dvojni vijalcnici. Na tisoče takih napak se zgodi, vendar jih sistem odpravljanja neujemanj odpravi.



Slika 4.

Vir: Švedska kraljeva akademija znanosti, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/fig_ke_en_15_mismatchrepair.pdf

vijo na verigi z napačno vstavljenim nukleotidom. Vsi trije letošnji nagrajenci so seveda preučevali, ali in kako poteka popravljanje neujemanj tudi pri sesalcih. Modrichu je uspelo, da je s prečiščenimi proteini iz človeške celice v laboratoriju leta 2002 poustvaril sistem popravljanja neujemanj pri človeku. Obenem pa je tudi ugotovil, da metiliranost DNA, ki ima v evkariontskih organizmih drugačno vlogo, v tem primeru ni dejavnik usmerjanja verižno specifičnega popravljanja neujemanj. O natančnem mehanizmu popravljanja pri evkariontih, ki je sicer v mnogočem zelo podoben tistemu pri bakterijah, obstaja več hipotez, ki jih znatnost sedaj preverja.

Biološki in medicinski pomen napak v DNA in njihovega popravljanja

Popravljanje z izrezovanjem baz, popravljanje z izrezom nukleotidov in popravljanje neujemanj so samo trije od mnogih načinov, ki vzdržujejo našo DNA. Vsak dan morajo odpraviti na tisoče poškodb, ki jih povzročajo izpostavljenost soncu, cigaretni dim in številne druge genotoksične snovi, in popraviti na tisoče neujemanj, do katerih prihaja med delitvijo celic. Sistem je zelo učinkovit, vendar včasih kaj tudi spregleda ali pa zaradi svoje lastne okvare deluje slabše. V primeru, ko se napake v DNA prenašajo v naslednje celične generacije, imamo lahko opravka z mutacijami, ki se kažejo v spremembah lastnosti. Z vidika evolucije mutacije same po sebi niso nujno zlo, so v številčno omejenem obsegu v posamezni generaciji celo potrebne za razvoj organizmov in vrst, saj jih v primeru dobrotne učinka kot prednostne izbere naravni izbor. In v tem pogledu je pretanjen ravnotežje med spreminjanjem genomov in njihovo obstojnostjo nujen pogoj za - časovno gledano - dolgotrajni razvoj in seveda za obstanek življenja. Z vidika krajšega življenjskega obdobja pa so uničujoče mutacije vzrok za številne bolezni, kot so rak, živčnodedgenerativne bolezni in bolezni, povezane s staranjem.

Poseben primer je rak, ki je lahko tudi posledica mutacije v enem ali več genih, ki so zapis za pomemben protein/proteine popravljalnega sistema. Če je sistem okvarjen, ne prepozna dovolj dobro poškodb oziroma napak v DNA in te se po več celičnih generacijah z leti nakopičijo in sprožijo usodno kaskado bolezni. Zgodnje odkrivanje okvar popravljalnega sistema je lahko pomembno pri preprečevanju nastanka bolezni, v primeru bolezni pa tudi za izbiro primernega načina zdravljenja. V tem pogledu smo tudi na naši medicinski fakulteti dali majhen prispevek, ko smo z metodami genske tehnologije ustvarili eksperimentalni sistem za preverjanje usodnosti mutacij v genu, ki nosi zapis za ključni protein sistema popravljanja neujemanj DNA pri človeku. Raziskave po svetu pa so danes usmerjene tudi v razvoj novih zdravil, ki bi dokončno zaustavila sistem popravljanja napak v celicah raka. Ta je pri raku sicer okvarjen, vendar ne popolnoma, in zato vsaj deloma deluje in tako rakasti celici zagotavlja njen obstoj oziroma vzdrževanje in prenašanje njenega nereda na celice potomke. V primeru, da bi ga z zdravilom popolnoma zaustavili, pa bi hitro kopičenje mutacij privedlo do prevelikega nereda in propada celic, brez možnosti delitve v nove celice raka.

Viri:

Švedska kraljeva akademija znanosti. *Nobelprize.org: Scientific Background of Nobel Prize in Chemistry 2015 – Mechanistic Studies of DNA Repair*: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/advanced-chemistryprize2015.pdf.

Švedska kraljeva akademija znanosti. *Nobelprize.org: The Nobel Prize in Chemistry 2015 – Popular Science Background: DNA repair – providing chemical stability of life*: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/popular-chemistryprize2015.pdf.

Vogelsang, M., Comino, A., Zupanec, N., Hudler, P., Komel, R., 2009: *Assessing pathogenicity of MLH1 variants by co-expression of human MLH1 and PMS2 genes in yeast*. *BMC Cancer*, 28 Oct. 2009;9: 382. doi: 10.1186/1471-2407-9-382.