

Sprega transkripcije i popravka DNA

Kragić, Gordan

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:171223>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Gordan Kragić

Student 3. godine Prijediplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

SPREGA TRANSKRIPCije I POPRAVKA DNA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2024. godina

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

12. kolovoza 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2024.

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	4
2.1. Eukariotski transkripcijski faktor TFIIH	4
2.1.1. Građa eukariotskog transkripcijskog faktora TFIIH.....	4
2.1.2. Zadaća eukariotskog transkripcijskog faktora TFIIH	5
2.1.3. Enzimska aktivnost podjedinica eukariotskog transkripcijskog faktora TFIIH u procesu transkripcije RNA-polimerazom II.....	5
2.2. CAK kompleks	6
2.2.1. Građa i različita aktivnost CAK kompleksa.....	6
2.2.2. Kontradiktorna uloga CAK kompleksa u procesu transkripcije	7
2.2.3. Kontradiktorna uloga CAK kompleksa u procesu popravka DNA metodom izrezivanja nukleotida.....	7
2.3. Aktivnost transkripcijskog faktora TFIIH.....	8
2.3.1. Oštećenja DNA izazvana UV zračenjem	8
2.3.2. Podjedinice transkripcijskog faktora TFIIH u procesu popravka DNA izrezivanjem nukleotida .	8
2.4. Uzrok i pristup liječenju bolesti koje su sprezi s transkripcijskim faktorom TFIIH	11
2.4.1. Recesivne autosomske bolesti koje su u direktnoj sprezi s mutacijom transkripcijskog faktora TFIIH	11
2.4.2. Regulacija aktivnosti TFIIH-a kao lijek za karcinome	11
2.5. Zaključak.....	12
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XIII

§ Sažetak

Transkripcija je proces prijepisa nukleotidnog slijeda DNA u RNA. Prepisuje se lanac kalupa DNA, a RNA transkript odgovara kodirajućem lancu DNA. Genetička informacija koja će se prepisati treba sadržavati što manje grešaka. Stoga su evoluirali procesi popravka grešaka i oštećenja DNA kojima se osigurava ispravnost genetičke poruke. Popravkom pogrešaka, prouzrokovanih djelovanjem raznih mutagena kojima je ljudski organizam izložen, postiže se prevencija pojave raznovrsnih tumora i sindroma.¹

Jedan od procesa kojim se uklanjaju greške i oštećenja DNA je popravak izrezivanjem nukleotida (eng. *nucleotide excision repair*, NER). Ovaj popravak ostvaruje se izrezivanjem odsječka DNA u dužini osam nukleotida prema 5'-smjeru te četiri nukleotida prema 3'-smjeru od oštećenog nukleotida. Tako izrezani nukleotidni odsječak disocira, a novi odsječak sintetizira DNA-polimeraza I. Neoštećeni lanac DNA služi kao kalup, dok je 3'-kraj izrezanog lanca početnica spomenutom enzimu. Novosintetizirani slijed povezuje enzim DNA-ligaza s ostatkom DNA.²

Ponekad je popravak izrezivanjem nukleotida povezan s procesom transkripcije. Sprega transkripcije i popravka DNA je ostvarena preko eukariotskog transkripcijskog faktora TFIIH. Taj faktor građen je od jezgre i kompleksa ciklin-zavisne aktivirajuće kinaze (eng. *cyclin-dependent kinase activating kinase*, CAK). Jezgra se sastoji od XPB, p62, p52, p44, p34, p8 te XPD podjedinice, dok CAK kompleks se sastoji od Cdk7, ciklina H te MAT1 podjedinice. Evolucijski je ostao gotovo potpuno očuvan iz razloga što posjeduje ključnu ulogu u transkripciji te u mehanizmu popravka pogrešaka nastalih na molekuli DNA. U procesu transkripcije RNA-polimerazom II, ovaj faktor s ostalim eukarotskim transkripcijskim faktorima tvori predinicijacijski kompleks, a sudjeluje i u ranoj fazi elongacije, transkripcijskoj reinicijaciji te sudjeluje u stvaranju genskih omći (eng. *gene loops*). U procesu NER stvaranjem kompleksa za dvostruko zarezivanje (eng. *dual incision complex*) otvara molekulu DNA te koordinira proces ponovne sinteze izrezanoga dijela molekule. Također, djelovanje TFIIH očituje se i u procesu transkripcije RNA-polimerazom I.¹

Esencijalnost ovog faktora očitava se u sudjelovanju u osnovnim metaboličkim procesima koji djeluju na DNA, popularno nazvanu „molekula života“. Molekula DNA stalno je izložena mutagenom djelovanju, od kojih je najrasprostranjeniji mutagen UV zračenje. Stoga,

neke mutacije koje utječu na funkciju faktora TFIIH uzrokuju pojavu genetičkih bolesti, koje se iskazuju kao hiperosjetljivost na svjetlo. Dvije bolesti obrađene u ovom radu su su *xeroderma pigmentosum* (XP) te trikotiodostropija (TTD), koje dovode do razvoja kožnih karcinoma te napadaju živčani sustav. Razumijevanje uzroka negativnih posljedica koje nesklad u radu faktora TFIIH može prouzročiti, može dovesti do razvoja lijekova za tumorske bolesti, koji uvelike smanjuju kvalitetu i trajanje života ljudi.

§ 1. UVOD

Proces transkripcije u eukariotskoj stanici potpomognut je s tri RNA-polimeraze: RNA-polimerazom I, RNA-polimerazom II te RNA-polimerazom III, gdje svaka od tih polimeraza ima specifičnu funkciju. Uloga RNA-polimeraze I (Pol I) je kataliza sinteze preribosomske RNA (pre-RNA), RNA-polimeraza II (Pol II) katalizira sintezu glasničke RNA (mRNA) te nekih manjih RNA poput mikroRNA (miRNA), malih jezgričnih RNA (snoRNA), malih interferirajućih RNA (siRNA), dok RNA-polimeraza III (Pol III) katalizira sintezu transportne RNA (tRNA), 5S RNA te pojedinih manjih RNA.¹

Jako dobro proučena, RNA-polimeraza II ima vodeću ulogu u genskoj ekspresiji kod eukariota. Humana Pol II ima relativnu molekulsku masu veću od 510 000, građena je od 12 podjedinica od kojih najveća podjedinica Rpb1 pokazuje visoku razinu sličnosti s β' -podjedinicom prokariotske RNA-polimeraze. Rpb2 podjedinica pokazuje strukturnu sličnost s β -podjedinicom, dok Rpb3 i Rpb11 podjedinice pokazuju poneke sličnosti s α -podjedinicama prokariotske RNA-polimeraze. Aktivni transkripcijski kompleks u kojem sudjeluje Pol II zahtjeva prisutnost različitih transkripcijskih faktora, odnosno brojnih drugih proteina sa specijaliziranim ulogama. Transkripcijski faktori čije djelovanje se veže uz Pol II imaju opću oznaku TFII uz dodatno slovo specifično za pojedini faktor (tablica 1).¹

Tablica 1. Vrste eukariotskih transkripcijskih faktora koji su esencijalni za proces transkripcije RNA-polimerazom II u eukariotskoj stanici, broj njihovih podjedinica, molekulske mase te osnovnih funkcija koje obavljaju pojedini faktori (preuzeto i prilagođeno prema Nelson¹)

Transkripcijski faktor	Broj podjedinica	Relativna molekulska masa podjedinice/a	Funkcija
TBP	1	38000	specifično prepoznaje TATA slijed
TFIIA	2	13000, 42000	stabilizira vezanje TFIIIB i TBP na promotor
TFIIIB	1	35000	veže se na TBP, tvori Pol II-TFIIIF kompleks
TFIID	13-14	14000-213000	nužan za inicijaciju na promotoru
TFIIIE	2	33000, 50000	odvija DNA na promotoru, fosforilira Pol II, aktivira proteine potrebne za NER
TFIIIF	2-3	29000-58000	snažno vezan na Pol II, veže se na TFIIIB i prevenira vezanje Pol II na nespecifične dijelove DNA
TFIIH	10	35000-89000	razmotava DNA na promotoru, fosforilira Pol II

Transkripcijski faktor TFIIH, osim što sudjeluje u transkripciji, ključan je za popravak grešaka u molekuli DNA u procesu popravka izrezivanjem nukleotida. Dodatno, ovaj faktor, ili neki njegovi dijelovi, sastavni su dio brojnih drugih procesa, poput staničnog ciklusa i kromosomske segregacije. S obzirom da TFIIH sudjeluje u popravku pogrešaka u molekuli DNA, poremećaji u njegovoj funkciji mogu dovesti do pojave specifičnih bolesti kod ljudi, stoga će ovaj rad ponuditi pregled tih genetičkih bolesti s pretpostavkama njihovih uzroka.³ Dvije najpoznatije genetičke bolesti uzrokovane pogreškama u mehanizmu djelovanja ovog faktora su *xeroderma pigmentosum* (XP) te trikotiodostropija (TTD).⁴

Cilj ovog rada je dati pregled dosadašnjih spoznaja o djelovanju transkripcijskog faktora TFIIH na mehanizam popravke pogrešaka u DNA te dovesti taj mehanizam u spregu s

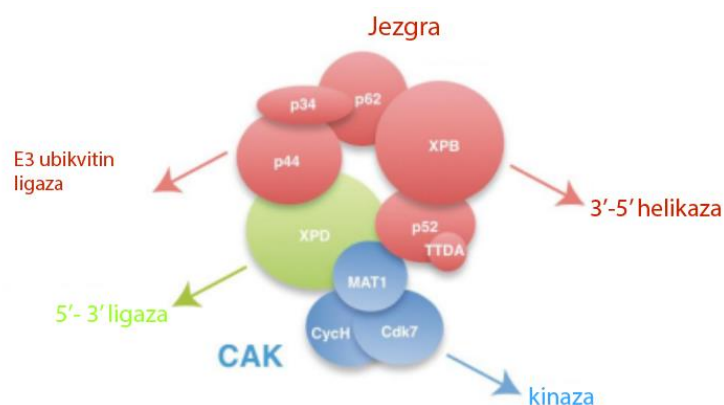
procesom transkripcije. Također, cilj je i skrenuti pozornost kako proučavanje mehanizma djelovanja transkripcijskog faktora TFIID može poslužiti kao okosnica u budućim medicinskim istraživanjima antitumorskih lijekova.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Eukariotski transkripcijski faktor TFIIH

2.1.1. Građa eukariotskog transkripcijskog faktora TFIIH

Eukariotski transkripcijski faktor TFIIH građen je od jezgre, sačinjene od sedam podjedinica, povezane s kompleksom kinaze koja aktivira ciklin-ovisne kinaze (eng. *cyclin-dependent kinase (Cdk) activating kinase*, CAK) koji je građen od tri podjedinice. Jezgra je građena od XPB, p66, p52, p44, p34 te TTDA podjedinica, koje se su specijalizirane za proces popravka grešaka u DNA. Neke podjedinice posjeduju enzimsku aktivnost. Tako XPB ima 3'-5', a XPD 5'-3' helikaznu aktivnost. Cdk7 je kinaza, dok je p44 opisana aktivnošću E3-ubikvitin-ligaze. Povezivanje jezgre s kompleksom CAK ostvaruje se preko XPD-a, dok je sam CAK kompleks sačinjen od Cdk7 (ciklin ovisne kinaze), ciklina H te MAT1 (Slika 1).³ Endonukleaza XPG se često nalazi u sklopu s transkripcijskim faktorom TFIIH u procesima popravka DNA te same transkripcije, stoga se XPG može smatrati jedanaestom podjedinicom ovog faktora. Elektronskom mikroskopijom TFIIH utvrđena je struktura oblika prstena sa šupljinom u središtu, koja gotovo savršeno otvara prostor za smještanje dvostruko zavijene DNA (dsDNA).⁴



Slika 1. Eukariotski transkripcijski faktor TFIIH, građen od jezgre i CAK kompleksa. Jezgra je građena od p44, p62, p34, p52, XPB, XPD te TTDA podjedinice, te je asociirana na CAK kompleks preko XPD podjedinice jezgre i MAT1 podjedinice CAK kompleksa. CAK kompleks uz MAT1 grade i Cdk7 podjedinica uz ciklin H. TFIIH ima četiri osnovne

enzimske aktivnosti: Cdk7 kinazna, XPB 3'-5' helikazna, XPD 5'-3' helikazna te p44 E3-ubikvitin-ligazna aktivnost (preuzeto i prilagođeno prema Zhovmer³).

2.1.2. Zadaća eukariotskog transkripcijskog faktora TFIIH

Djelovanje eukariotskog transkripcijskog faktora TFIIH očituje se kroz dva procesa. U procesu transkripcije RNA-polimeraze II, transkripcijski faktor TFIIH pridružuje se tvorevini sačinjenoj od transkripcijskih faktora TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF te Pol II nazvanoj predinicijacijski kompleks. U tom kompleksu TFIIH sudjeluje je mnoštvu procesa poput inicijacije, odvajanja od promotora (eng. *promoter escape*), rane faze elongacije, transkripcijske reinicijacije te tvorbi genskih omči (eng. *gene loops*). Faktor TFIIH sudjeluje još i u procesu transkripcije ribosomskih gena uz pomoć RNA-polimeraze I. Djelovanje tog faktora tijekom ovog procesa još je velikim dijelom nerazjašnjeno, no ukoliko se taj proces imitira u *in vitro* uvjetima, uočava se kako je taj faktor nužan uz kompleks koji je smješten u samoj jezgri na mjestima aktivne transkripcije gena za ribosomske RNA. Štoviše, taj faktor dokazano je prisutan u kompleksu koji sadrži RNA-polimerazu I, uz CBS i XPG faktore procesa popravka DNA izrezivanjem nukleotida. Tijekom procesa popravka DNA izrezivanjem nukleotida, ključno je stvaranje kompleksa dvostrukog zarezivanja (eng. *dual incision complex*), čija je uloga otvaranje oštećenog mjesta na molekuli DNA. Taj kompleks uz TFIIH tvore i XPC-HR23B, XPA RPA XPG te ERCCI-XPF podjedinica. Specifičan faktor za NER proces je TTDA, koji se prilikom djelovanja stranog mutagena na molekulu DNA veže na TFIIH (dodatno opisano u odjeljku 2.3.2.)³

2.1.3. Enzimska aktivnost podjedinica eukariotskog transkripcijskog faktora TFIIH u procesu transkripcije RNA-polimerazom II

Za očuvanje enzimske aktivnosti u procesima transkripcije i popravka DNA nužne su četiri podjedinice faktora TFIIH. Fosforilacija RNA-polimeraze II postiže se preko Cdk7 podjedinice, tako što će se fosforilirati serin 5 i serin 7 C-terminalne domene Rpb1 podjedinice Pol II, čime se regulira proces transkripcije. XPB svojom ključnom ATP-aznom aktivnošću usmjeruje TFIIH do mjesta oštećenja DNA.² Također, ta podjedinica ima direktnu

ulogu u odmatanju DNA. Svojim vezanjem na molekulu, XPB stvara određenu vrstu napetosti koji potpomaže raspad uzvojite strukture DNA na mjestu stvaranja preinicijacijskog kompleksa. Takav mehanizam ukazuje kako uzrok narušavanja uzvojite strukture nije helikazna aktivnost ove podjedinice, već opisana ATP-azna aktivnost. Druge studije uvode tezu kako je Ss12/XPB onaj kompleks koji dovodi do otvaranja DNA na mjestu predinicijacijskog kompleksa. Takva teza opisana je mehanizmom koji sugerira kako Ss12 klizi po lancu DNA u 5'-3' smjeru, čime se otvara molekula DNA.³ XPD posjeduje helikaznu aktivnost kojom otvara DNA na mjestu oštećenja. Važno je za naglasiti da XPD nema direktnu ulogu u procesu transkripcije RNA-polimerazom II, već ima strukturnu ulogu kao komponenta TFIIF te regulira kinaznu aktivnost Cdk7. Uloga specifičnog faktora TTDA je dvojak. S jedne strane, taj faktor stimulira ATP-aznu aktivnost XPB direktnom interakcijom s p52. S druge strane, dodatak TTDA potiče disocijaciju p52 s molekule DNA. Također, poznato je kako prisutnost ove dvije navedene podjedinice potiče ATP-aznu aktivnost. Podjedinica p44 stimulira već opisanu helikaznu aktivnost XPD podjedinice.³

2.2. CAK kompleks

2.2.1. Građa i različita aktivnost CAK kompleksa

Kompleks CAK građen je od ciklina H, Cdk7 te MAT1. Cdk7 može se nalaziti u različitom udjelu u pojedinim kompleksima. Tako će u kompleksu u kojem je CAK samostalan udio Cdk7 biti 50%, dok ukoliko se CDK asocira na jezgru transkripcijskog faktora TFIIF udio Cdk7 iznosi 40%. Kada CAK kompleks asocira samo s podjedinicom XPD, udio Cdk7 iznosi 10%. Navedeni gradivni dijelovi samog kompleksa CDK direktno reguliraju aktivnost Cdk7, čime se također regulira cijela aktivnost kompleksa. Tako se fosforilacijom Cdk7 podjedinice na treoninu 170 potiče, dok se fosforilacijom serina 164 inhibira aktivnost CAK kompleksa. Važna stabilizacija CAK kompleksa ostvaruje se preko interakcije MAT1 s Cdk7 i ciklinom H.³

2.2.2. Kontradiktorna uloga CAK kompleksa u procesu transkripcije

Cdk7 podjedinica smatrala se esencijalnom za proces transkripcije. No, provođenjem pokusa regulacije transkripcije s temperaturno-osjetljivim alelom Mcs6, mišjim ortologom Cdk7, uočen je poremećaj transkripcije samo pojedinih gena koji sudjeluju u diobi stanice, koji čine manje od 5% svih transkripata. Nadalje, poremećaj na Cdk7 podjedinici utjecao je samo na mali podskup gena, ali nije izazvao poremećaj globalne razine fosforilacije serina 5 Rpb1 podjedinice Pol II. Na osnovu takvih opažanja, zaključeno je da ova podjedinica nije esencijalna u procesu transkripcije Pol II, ali je bitna za transkripciju pojedinih gena. Naravno, djelovanje ove podjedinice kompleksa ne očituje se samo u fosforilaciji serina 5, već je Cdk7 nužan za fosforilaciju transkripcijskog faktora TFIIE, podjedinice p53 te jezgrinih receptora (eng. *nuclear receptors*, NR), koji su specifični transkripcijski faktori čija aktivnost je regulirana različitim ligandima. Fosforilacija NR preko Cdk7 odvija se na njihovoj A/B domeni, a takav oblik interakcije povećava afinitet NR prema proteinima koji reguliraju njihove varijabilne uloge.⁴

2.2.3. Kontradiktorna uloga CAK kompleksa u procesu popravka DNA metodom izrezivanja nukleotida

Inhibicijom aktivnosti Cdk7 podjedinice kompleksa CAK pomoću anti-Cdk7 protutijela smanjuje se učinkovitost samog procesa NER. No, kontradikcija postoji zbog činjenice da je dvostruko izrezivanje moguće provesti i bez CAK kompleksa. Polazeći od te činjenice, sugerira se kako je u *in vitro* uvjetima jezgra TFIIH faktora irelevantan faktor za proces izrezivanja oštećenih sljedova DNA. Također, ukoliko u potpunosti onemogućimo ekspresiju Cdk7 pomoću siRNA, održava se potpuno funkcionalni popravak oštećenih dijelova DNA (ukoliko je naprimjer mutagen UV zračenje), dok se u značajnoj mjeri inhibira transkripcijska aktivacija oštećenih gena.³

2.3. Aktivnost transkripcijskog faktora TFIIH

2.3.1. Oštećenja DNA izazvana UV zračenjem

DNA ne nosi slučajno ime molekule života, stoga stanica treba razviti mehanizme popravaka grešaka i oštećenja u ovoj molekuli, koje izazivaju brojni mutageni kojima je izložena. Zasiurno čovjekov, a ujedno i bilo koji organizam sisavca, najviše i najduže je izložen mutagenom djelovanju UV zračenja. Mehanizam popravka DNA izrezivanjem nukleotida (NER) najučestaliji je put popravka grešaka, posebno pirimidinskih dimera pod djelovanjem UV zračenja. Kod eukariota, djelovanje ovog mehanizma započinje djelovanjem XPC-HR23B kompleksa, gdje god nastane oštećenje u genomu. Taj kompleks potiče savijanje dvostruke zavojnice, na taj način formirajući oblik prepoznavajuće sekvence prije vezanja kompleksa za započinjanje popravka (eng. *repair-initiating complex*). Vezanjem tog kompleksa šalje se signal koji će zaustaviti napredovanje daljnje transkripcije RNA-polimerazom II, što vodi vezanju transkripcijskog faktora TFIIH i njegovom djelovanju u popravku nastalog oštećenja.⁴

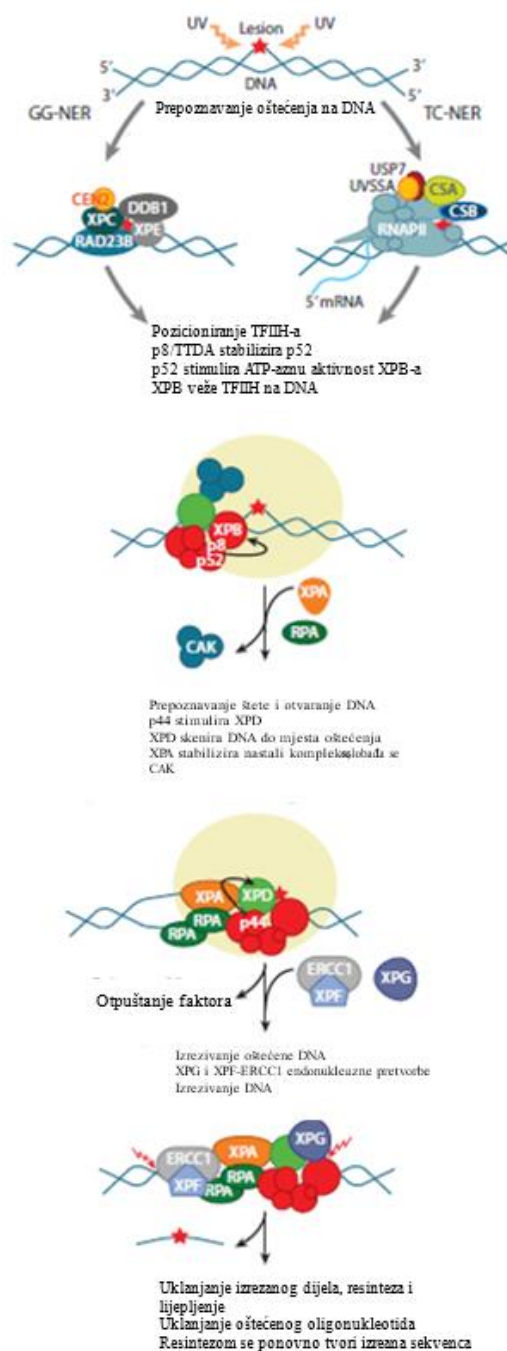
2.3.2. Podjedinice transkripcijskog faktora TFIIH u procesu popravka DNA izrezivanjem nukleotida

Početna faza procesa NER je otvaranje molekule DNA na mjestu oštećenja, kako bi se ona pripremila za popravak nastale greške. Ključne podjedinice transkripcijskog faktora TFIIH za otvaranje same molekule su XPB i XPD koje u ovom mehanizmu djeluju u paru, no uzrok tomu još nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavljalo se kako obje podjedinice odmataju molekulu DNA svojim helikaznim aktivnostima, no ta pretpostavka nije se pokazala istinitom. Naprotiv, dokazana je samo helikazna aktivnost XPD podjedinice, koja odmotava molekulu DNA oko oštećenja. Tek nakon što je molekula DNA odmotana, XPB podjedinica svojom ATP-aznom aktivnošću pozicionira transkripcijski faktor TFIIH za popravak pogreške. Hidroliza ATP-a dovodi do velikih konformacijskih promjena na XPB podjedinici. XPD u svome sastavu ima sekvencu s ARCH domenom i Fe-S klasterom, koji svojom međusobnom interakcijom mogu stvoriti otvor dovoljno velik da jednostruko zavijena molekula DNA prođe kroz njega. Takva molekula DNA podložna je enzimskoj hidrolizi, stoga je potrebno stabilizacijsko djelovanje proteina A. XPA uklanja CAK sa jezgre TFIIH-a

te vodi prema postizanju endonukleazne aktivnosti XPF koja se veže na ERCC1. XPG endonukleaza izrezuje oštećeni dio u smjeru od 3' prema mjestu pogreške. Takva aktivnost stimulira kompleks ERCC1-XPF, koji izrezuje u smjeru od 5' prema grešci. Važno je naglasiti činjenicu kako se nastali rez veličine od 22-30 nukleotida kreće popunjavati novima iz 5'-smjera prije nego što uopće započinje 3'-endonukleaza XPG-a (Slika 2).⁴

Najnovije postavljene hipoteze pretpostavljaju kako je upravo XPC podjedinica ona koja prepoznaje pogrešku prije dolaska samog TFIIH-a, a za to koristi pomoć faktora HR23B, proteina za vezanje na DNA oštećenu UV zračenjem pod kraticom UV-DDB (eng. *UV radiation-DNA damage binding protein*) te centrina 2. XPC također interagira s p62 te XPB, te takvom interakcijom povećava se afinitet prema TFIIH-u preko N-kraja XPB-a što povećava njegovu ATP-aznu aktivnost, stvarajući XPB-p52 interakciju.⁴

U ljudskim stanicama, mutacije uzrokuju slabljenje XPB-p52 interakcije, što za direktnu posljedicu ima smanjenje ATP-azne aktivnosti XPB-a, čime se smanjuje ispravno pozicioniranje TFIIH na DNA za popravak pogreške. Na taj način ostvaruje se regulacija takve aktivnosti preko XPB-p52 interakcije. Nadalje, regulacija helikazne aktivnosti XPD-a ostvaruje se preko p44 podjedinice. Ukoliko dođe do mutacija na C-terminalnome kraju XPD-a, očituje se slabljenje spomenute helikazne aktivnosti, a samim time i nemogućnost uspješnog otvaranja DNA na mjestu oštećenja. Također, regulacija endonukleazne aktivnosti XPF/ERCC1 kompleksa je ostvarena zavisnošću s transkripcijskim faktorom TFIIH. Ukoliko dođe do mutacija na XPB podjedinici tog faktora, prestaje izrezivanje oštećene sekvence DNA.⁴



Slika 2. Pregled djelovanja TFIIH u procesu NER. Nastalo oštećenje djelovanjem UV-zračenja blokira djelovanje RNA-polimeraze II (RNPII) (desno) te XPC-HR23B prepoznaje nastalo oštećenje (lijevo) koje vodi kroz proces NER. Pozicioniranjem TFIIH na mjestu nastalog oštećenja, dolazi do identifikacije samog oštećenja te otvaranja DNA uz oslobađanje CAK-a. RPA pokriva neoštećen lanac te počinje izrezivanje oštećene sekvence DNA, uz endonukleazne pretvorbe XPG te XPF-ERCC1. Nakon što se oštećeni dio izreže, započinje resinteza DNA te lijepljene novog dijela (preuzeto i prilagođeno prema Compe⁴).

2.4. Uzrok i pristup liječenju bolesti koje su sprezi s transkripcijskim faktorom TFIIH

2.4.1. *Recesivne autosomske bolesti koje su u direktnoj sprezi s mutacijom transkripcijskog faktora TFIIH*

Mutacije u samo tri podjedinice eukariotskog transkripcijskog faktora TFIIH; XPB, XPD te p8/TTDA vode k razvoju genetičkih bolesti koje se karakteriziraju kao bolesti fotoosjetljivosti, odnosno osjetljivosti na UV zračenje. Jedna od bolesti koju uzrokuju mutacije XPD i XPB podjedinica TFIIH je *xeroderma pigmentosum* (XP), opasna bolest koja, osim što se karakterizira fotoosjetljivošću, vodi k razvoju velikog spektra karcinoma kože. Također, ova bolest može napasti i živčani sustav te prouzročiti brojne neurološke smetnje. Druga genetička bolest koja je uzrokovana mutacijama svih navedenih podjedinica je trikotiodostropija (TTD), koja se karakterizira fenotipom proćelave kose te lako lomljivih noktiju. Ova bolest može u jako rijetkoj učestalosti uzrokovati i mentalnu zaostalost. Zanimljiva je činjenica, kako je nakon dugog znanstvenog proučavanja, ustanovljeno kako su mutacije na podjedinici XPB uvijek vezane za proces NER, dok su mutacije na XPD uvijek vezane za proces transkripcije RNA-polimerazom II. Također, neizostavno je za spomenuti kako nikada nisu uočene mutacije na podjedinicama p62, p52, p44 te p34 koje su esencijalne za održavanje ispravnog rada TFIIH. Naravno, razlog tomu je jasan. Ukoliko se ne može zadržati ispravno djelovanje transkripcijskog faktora koji je neizostavan za popravak grešaka na molekuli života, samim time bi te greške bile toliko učestale i ugrozile bi život bilo kojeg eukariotskog organizma.⁴ Dodatno, s obzirom da TFIIH sudjeluje u procesu transkripcije, koji je esencijalan, mutacije koje onemogućavaju njegovo djelovanje u transkripciji su također izuzetno štetne.

2.4.2. *Regulacija aktivnosti TFIIH-a kao lijek za karcinome*

Zbog središnje uloge TFIIH u stanici, njegove višestruke enzimske aktivnosti imaju značajan potencijal kao mete za nove terapijske strategije. Osim uloge općeg transkripcijskog faktora, TFIIH bi mogao koordinirati regulaciju specifičnih gena koji sudjeluju u odgovoru stanice na stres što znanstvenicima može pomoći u traženju budućeg lijeka za brojne

poremećaje. Za spironolakton koji se koristi kao lijek protiv bolesti srca i krvožilnog sustava, uočeno je da smanjuje aktivnost NER povećavajući razgradnju XPB podjedinice TFIIH-a. Dodatno, spironolakton povećava razinu citotoksičnosti spojeva koji sadrže platinu te se predlaže kao potentni i netoksični dodatak u kemoterapiji utemeljenu na platini. Za spoj pod oznakom THZ1 uočeno je kako kovalentno inhibira Cdk7 podjedinicu. Takva inhibicija pokazala se citotoksična za karcinom pluća malih stanica te samim time regulacija aktivnosti Cdk7 može poslužiti kao okosnica za buduće antitumorske lijekove.⁴

2.5. Zaključak

Eukariotski transkripcijski faktor TFIIH direktna je sprega dva procesa: transkripcije i popravka DNA metodom izrezivanja nukleotida. Djelujući na ta dva različita procesa, TFIIH sa svojih deset podjedinica regulira proces transkripcije te regulira i provodi proces izrezivanja oštećene sekvence genoma. Zbog svoje esencijalne uloge u očuvanju točnosti provedbe ovih procesa na staničnoj razini, mutacije u pojedinim podjedinicama mogu prouzročiti pojavu ozbiljnih recesivnih genetskih bolesti. Te bolesti su karakterizirane pojavom hiperosjetljivosti na svjetlo i nemogućnosti obrane od štetnog djelovanja UV zračenja, najrasprostranjenijeg mutagena. No, prema najnovijim znanstvenim spoznajama uočeno je kako regulacija djelovanja XPB i Cdk7 podjedinica TFIIH ima antitumorsko djelovanje. Samim time, znanstveni svijet treba uložiti napore za proučavanjem lijeka za pojedine vrste tumora, polazeći od djelovanja ovog faktora. Istraživanje transkripcijskog faktora TFIIH, koji osim što predstavlja svojevrsnog čuvara života, moglo bi ponuditi rješenje za liječenje bolesti koje najviše ruše kvalitetu života suvremenog društva.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Leningher's principles of biochemistry*, Freeman McMilan, New York, 2017, str. 1036-1047.
2. J. M. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 808-809.
3. A. Zhovmer, V. Osenkych, F. Coin, *TheScientifficWorldJOURNAL*. **10** (2010) 633–634.
4. E. Compe, J. M. Egly, *Annu. Rev. Biochem.*, **85** (2016) 265-290.