



# '21

# ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД

год. 62  
бр. 3 (јун)

YU ISSN 04406826  
UDC 54.011.93



Хемијски Преглед  
[www.shd.org.rs/hp.htm](http://www.shd.org.rs/hp.htm)

90 година од смрти  
**Косџе  
Николића**  
(1844-1931)

и 70 година од смрти  
**Свеџозара  
Јовановића**  
(1895-1951)

**Први доктори  
хемије у Србији**

српско хемијско друштво

# ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД CHEMICAL REVIEW



Годиште 62

број 3  
јун

Editor-in-Chief  
RATKO M. JANKOV  
Deputy Editor-in-Chief  
DRAGICA TRIVIĆ

Volume 62  
NUMBER 3  
(June)

Publisher  
SERBIAN CHEMICAL SOCIETY  
Belgrade/Serbia, Karnegijeva 4

Издаје  
СРПСКО ХЕМИЈСКО ДРУШТВО

Телефон 3370-467

Карнегијева 4

излази двомесечно

ОДГОВОРНИ И ГЛАВНИ УРЕДНИК  
Ратко М. Јанков

ПОМОЋНИК ОДГОВОРНОГ И ГЛАВНОГ УРЕДНИКА  
Драгица Тривић

ЧЛАНОВИ РЕДАКЦИЈЕ  
Јелена Радосављевић, Наталија Половић и Воин Петровић

УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР

Иван Гутман, Снежана Зарић, Јован Јовановић, Славко Кеврешан, Драган Марковић, Владимир Павловић, Радомир Саичић, Живорад Чековић (председник).

Годишња чланарина, укључује часопис „Хемијски преглед“, за 2021. годину износи:

- за све запослене и студенте докторских студија ..... 2.500,00  
- за професоре у основним и средњим школама ..... 1.400,00  
- за пензионере, студенте основних и мастер студија, ђаке и незапослене..... 1.200,00  
претплата за школе и остале институције..... 5.000,00  
- за чланове и институције из иностранства. .... € 70

Чланарину и претплату можете уплатити на рачун СХД:  
205-13815-62, позив на број 320.

Web site: <http://www.shd.org.rs/hp/>  
e-mail редакције: [hempred@chem.bg.ac.rs](mailto:hempred@chem.bg.ac.rs)

Припрема за штампу и штампа:  
РИЦ графичког инжењерства Технолошко-металуршког факултета Београд, Карнегијева 4

Насловна страна и Интернет верзија часописа:  
Слободан и Горан Ратковић,  
RatkovicDesign [www.ratkovicdesign.net](http://www.ratkovicdesign.net)  
[office@ratkovicdesign.net](mailto:office@ratkovicdesign.net)

## САДРЖАЈ

### ЧЛАНЦИ

Драган М. ПОПОВИЋ  
*Dragan M. POPOVIĆ*

ФОТОЛИАЗА – МОЛЕКУЛСКИ МЕХАНИЗАМ  
ОПРАВКЕ UV-ИНДУКОВАНИХ ДНК ЛЕЗИЈА  
PHOTOLYASE – MOLECULAR MECHANISM  
FOR REPAIR OF UV-DAMAGED DNA ..... 50

Александра СТЕФАНОВИЋ  
*Aleksandra STEFANOVIĆ*

ИЗМЕЂУ ЉУБАВИ И МРЖЊЕ: КАРЦИНОМ И РЕАКТИВНЕ  
ВРСТЕ UV-ИНДУКОВАНИХ ДНК ЛЕЗИЈА  
BETWEEN LOVE AND HATE: CANCER AND REACTIVE  
SPECIES ..... 62

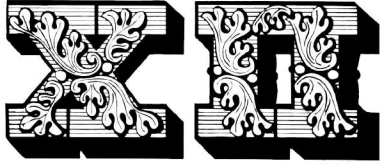
### ВЕСТИ из / за ШКОЛЕ

Катарина ИЛИЋ  
*Katarina ILIĆ*

СЦЕНАРИО ЕДУКАТИВНЕ РАДИОНИЦЕ:  
„ФОРМУЛЕ И НАЗИВИ СОЛИ“  
SCENARIO OF THE EDUCATIONAL WORKSHOP:  
„FORMULAS AND NAMES OF SALTS“ ..... 69

### ВЕСТИ ИЗ СХД

ИЗВЕШТАЈ О РАДУ СРПСКОГ ХЕМИЈСКОГ ДРУШТВА  
У 2020. ГОДИНИ ..... 70



## ЧЛАНЦИ



Драган М. ПОПОВИЋ,  
Виши научни сарадник, Центар за хемију, ИХТМ, Универзитет у Београду,  
(email: dpopovic@ihtm.bg.ac.rs)

### ФОТОЛИАЗА – МОЛЕКУЛСКИ МЕХАНИЗАМ ОПРАВКЕ UV-ИНДУКОВАНИХ ДНК ЛЕЗИЈА

#### КРАТАК ИЗВОД

Оштећења на ДНК структури, као што су одсецања и модификације азотних база или промене на шећерно-фосфатним групама, често су изазвана UV светлошћу, јонизационим зрачењем, токсичним и канцерогеним супстанцама, као и загађењима из животне средине. Да би се одржала генетичка стабилност ћелије, развили су се заштитни механизми који исправљају различите врсте оштећења. Многи ДНК репарациони процеси код прокариотских и еукариотских ћелија су веома слични. Фотолиаза отклања најчешће ДНК дефекте, настале UV (200-300 nm) зрачењем – циклобутан пиримидиске димере (CPD) и (6-4)-фотопродукте, тако што катализује цепање циклобутанског прстена CPD димера на пиримидинске мономере у ретро-Дилс-Алдеровој реакцији иницираној блиском UV или видљивом плавом светлошћу (UV/VIS, 300-500 nm). CPD оштећења ДНК која нису поправљена и отклоњена су високо цитотоксична, изазивајући мутагене и канцерогене промене у ћелији на нивоу ДНК и одговарајућих протеина. Механизам рада овог ензима је познат и у доброј мери експериментално истажен. Ипак, многи термодинамички и кинетички параметри могу бити одређени само путем теоријско-рачунарских студија на чије резултате ће овде такође бити бачен акценат. Поред тога, у овом тексту је понуђен одговор на неколико контраверзних детаља и питања, која су дуго времена била неразјашњена.

#### МЕХАНИЗМИ РЕПАРАЦИЈЕ ДНК КОД ЖИВИХ ОРГАНИЗАМА

Сваког дана наша ДНК се оштећује дејством UV радијације, слободним радикалима, токсичним и канцерогеним супстанцама. Међутим, и без тих негативних спољашњих утицаја, ДНК молекули *in vivo* су по својој природи нестабилни. Хиљаде спонтаних промена на ћелијском геному дешава се на дневној бази. Поред тога, дефекти се могу појавити и када се ДНК копира током ћелијске деобе, процесом који се сваког дана у људском телу дешава неколико милиона пута. Једини разлог што се наш генетски материјал не дезинтегрише у потпуни хемијски хаос је тај што су ћелије еволуцијом развиле више различитих молекулских система који непрекидно прате и врше исправке на ДНК молекулима.

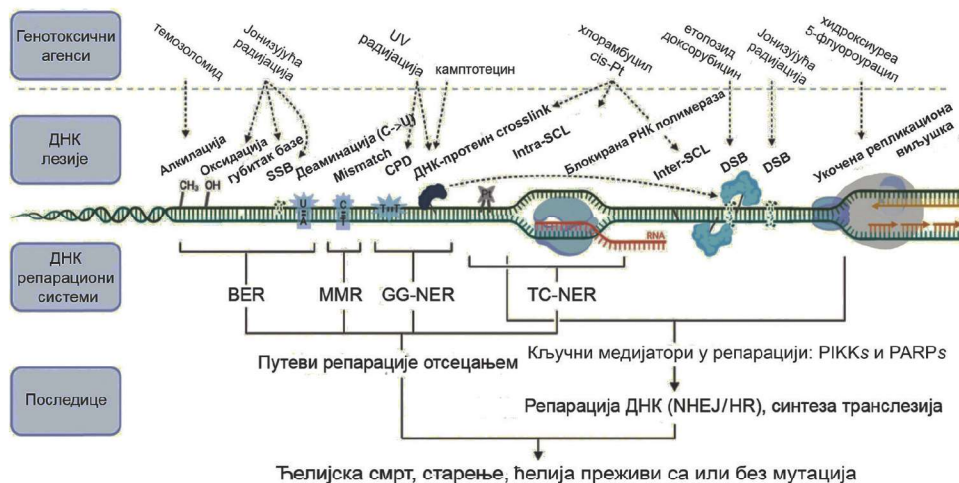
До раних седамдесетих годинама прошлога века, веровало се да су ДНК молекули изузетно стабилни.

Међутим, Томас Линдал (Tomas Lindahl) је већ 1974. год. демонстрирао да је брзина распада ДНК молекула у живим ћелијама (при физиолошким условима) таква да се са правом поставља питање, како је развој живота на Земљи уопште могућ [1]. Ово сазнање довело га је до закључка о постојању молекулске машинерије која врши исправке на оштећеним деловима ДНК, а затим и до открића механизма репарације одсецањем база (base excision repair, BER), који непрестано исправља колапсе на нашој ДНК [2]. Са друге стране, изолованани ДНК материјала се може неограничено дуго чувати на ниским температурама што се користити у савременој форензици или за доказивање родитељства. За разлику од њих, РНК молекули су јако нестабилни и брзо се распадају након изоловања.

Азиз Санкар (Aziz Sancar) је истраживао механизам репарације одсецањем нуклеотида (nucleotide excision repair, NER), који ћелије користе да оправи оштећења настала UV зрачењем на ДНК молекулима [3]. Људи рођени са дефектима у овом репарационом систему неминовно ће развити рак коже ако су изложени сунчевој светлости. Ћелије такође користе NER механизам, између осталог, да коригују дефекте проузроковане мутагеним супстанцама. Овај репарациони механизам је прилично универзалан и може да коригује и оправи више врста дефеката и лезија на ДНК молекулима, али га поседују само плацентни сисари.

Пол Модрич (Paul Modrich) је демонстрирао како наше ћелије коригују грешке које се јављају при ДНК репликацији за време ћелијске деобе. Он је открио и истражио механизам који отклања грешке услед погрешног спаривања нуклеотидних база (mismatch repair, MMR) [4]. Овај механизам редукује учестаност појаве грешака при ДНК репликацији за око хиљаду пута. Урођени дефекти у „mismatch“ репарацији су познати у биологији и узрок су наследној варијанти рака дебелог црева.

Током еволуције настало је више биолошких система и механизма који врше исправке или замене оштећених делова ДНК. Они представљају својеврсне „ћелијске алате“ за исправку оштећења на ДНК молекулима. Преглед тих система и механизма је приказан на слици 1. Дати су примери генотоксичних агенаса, који доводе до стварања различитих типова оштећења на ДНК молекулу, означени су ДНК репарациони механизми који их могу опривити и уклонити, као и последице које могу настати по ћелије организма уколико лезије не буду благовремено отклоњене (слика 1).



Слика 1. Илустровани су различити типови оштећења на ДНК молекулу, комплексност и међуповезаност репарационих система. Коришћене су следеће скраћенице: прекид једног ланца (single-strand break, SSB), прекид оба ланца (double strand break, DSB), интер-ланчани cross-link (Inter-SCL), интра-ланчани cross-link (Intra-SCL), репарација отсецањем база (base excision repair, BER), mismatch репарација (MMR), репарација отсецањем нуклеотида на глобалном геному (global genome nucleotide excision repair, GG-NER) и транскрипционо-спрегнути NER (TC-NER). Јонизујуће зрачење може да доведе до губитка пурипске базе (гуанина или аденина) из једног ланца ДНК; реакцијом депуринације, веза између базе и деоксирибозе се хидролитички цепа, при чему фосфодиестарски костур остаје непромењен. Кључни медијатори у репарацији критичних оштећења ДНК услед SSB, DSB и замрзнуте транскрипционе или репликационе виљушке су поли(АДП-рибозне) полимеразе (PARPs) и киназе повезане са фосфатидилинозитол 3-киназом (PIKKs). Систем користи два главна механизма да отклони прекид настао на оба ланца ДНК: путем спајања нехомологих крајева ДНК (non-homologous end joining pathway, NHEJ) без учешћа ДНК темплата и хомологом рекомбинацијом (HR) која користи сестрински хроматидин као темплат за репарацију оштећеног ланца. Адаптирано на основу референце [5].

ДНК је стално изложена штетним и деструктивним агенсима унутрашњег и спољашњег порекла, који сваког дана створе на десетине хиљада ДНК лезија на ћелијском геному [6]. Поред радијације и хемијских агенаса који доводе до cross-link промена, неки други типови лезија су такође откривени. Они укључују хемијске модификације (алкилацију, оксидацију, депуринацију и деаминацију), грешке при ДНК репликацији (mismatch) и спаривању азотних база) и друге препреке у ДНК структури које могу да зауставе репликацију и транскрипцију (на пр., блокада РНК полимеразе, замрзнута репликациона виљушка, потешкоће при репликацији секвенце код свих типова ДНК (сем Б-типа) и сл.) [5].

Постојање вишеструких ДНК оштећења, различитог типа и порекла, објашњава зашто су ћелије еволуирале и створиле високо софистицирану и ефикасну мрежу за праћење, сигнализирање и репарацију, која се групно означава – „одговор на ДНК оштећења“ (DNA damage response, DDR) [6]. Тек је недавно почела да се разуме молекуларна комплексности DDR мреже, која укључује више репарационих система, као што су механизми одсецањем – BER, NER, MMR, рекомбинацијом – HR и NHEJ) путеви, те њихова стална и сложена међукомуникација. Биолошка сврха DDR-a је контрола нестабилности генома у нормалним и здравим ћелијама. Са терапеутске тачке гледишта, DDR представља кључ стратегије за борбу против канцерогених ћелија. Сматра се да би циљање DDR система код ћелија рака могло да спречи неконтролисану пролиферацију канцера [7].

Важност овог поља истраживања је препозната и од Нобеловог комитета, који је награду за хемију 2015. год. доделио Томасу Линдалу, Азизу Санкару и Полу Модричу за пионирске радове у изучавању и мапирању механизма којима ћелије оправљају оштећену ДНК и тиме чувају генетске информације записане у свом коду. Њихов рад довео је до фундаменаталних знања како живе ћелије функционишу на молекулском нивоу и то знање може се користити за развој нових анти-канцер третмана и лекова.

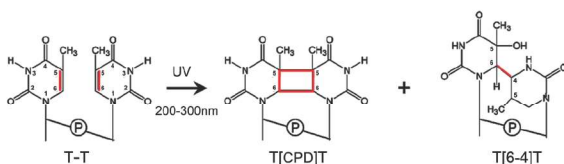
Два најзначајнија механизма за оправку UV-лезија су NER (код плацентних сисара) [3] и фотолиазом-индукована фотореактивација (у већини других живих организама) [8]. У даљем делу овог текста биће пре свега речи о ДНК фотолиазама, њиховој структури, специфичностима и реакционом механизму репарације ДНК молекула.

## UV ОШТЕЋЕЊА НА ДНК МОЛЕКУЛИМА

Сунчева светлост садржи три типа ултраљубичастог (UV) зрачења: UV-A (315–400 nm), UV-B (280–315 nm) and UV-C (100–280 nm). Озонски омотач земље апсорбује сво UV-C и око 90% UV-B зрачења. Стога, UV зрачење које дође до површине земље састоји се углавном од UV-A и малим делом од UV-B фотона. Већина мутагених и канцерогених својстава сунчеве светлости преписује се UV-B зрачењу [9]. Оштећења атмосферског озонског омотача појачавају UV-B радијацију на земљи-

ној површини, што резултује у повећању озбиљних оштећења у биосфери [10].

Излагање UV зрачењу може довести до стварања ДНК фотопродуката између суседних пиримидинских база на истом ДНК ланцу тј. до формирања *cis,sin*-циклобутан пиримидинских димера (CPD) и пиримидин-пиримидон-(6-4)-фотопродуката ((6-4)ФП) [8, 9]. CPD дефекти настају [2π + 2π] циклоадицијом између C5=C6 веза суседних пиримидинских база (тимин и цитозин). Реч је о специјалном случају Дилс-Алдерове (Diels-Alder) реакције инициране UV-фотонима, коју дефинишу Вудвард-Хофманова (Woodward-Hoffmann) правила. (6-4) дефекти настају Патерно-Бучијевом (Paternó-Büchi) реакцијом [2π + 2π] циклоадиције између C5=C6 везе са 5' нуклеозида и C4=O карбонилне групе са 3' нуклеозида, која иде преко оксетанског интермеђијера, нестабиланог на ниским температурама, услед чега се прстен брзо и лако отвара стварајући (6-4) ФП [11], види слику 2.



Слика 2. Приказ UV-индукованих пиримидин – пиримидин дефеката: циклобутан пиримидин димер (CPD) и (6-4)-фотопродукт (T[6-4]T). Фотопродукти се формирају између суседних пиримидинских база (приказан је пар тимина) које припадају истом ДНК ланцу.

CPD димери са ~80% од укупно награђених фотопродуката чине најчешћа оштећења на ДНК генетском материјалу, а могу се *in vivo* створити између свих пиримидинских парова али са неједнаком заступљеношћу. Тренд формирања је следећи: 5'-T[CPD]T-3' > 5'-T[CPD]C-3' > 5'-C[CPD]T-3' > 5'-C[CPD]C-3', при чему је удео T[CPD]T око три пута већи него T[CPD]C дефеката. Код (6-4)ФП ситуација је специфична, па је формирање T[6-4]C лезија чешће него код T[6-4]T парова, док се дефекти на C-T местима уопште не формирају [11].

UV-индуковане ДНК лезије су одговорне за многе деструктивне ефекте, пошто оне могу да делују као физичка блокада за репликацију и транскрипцију. Овим се драстично успоравају или онемогућавају метаболички процеси на ДНК молекулама, што може даље довести до мутација генетског материјала и хелијске смрти. Најчешће мутације на ДНК молекулама изазване фотопродуктима су прелазак C у T или CC у TT. Ако ове промене у генетском материјалу доведу до мутација на протеинима укљученим у контроли хелијског циклуса, апоптози (облик програмиране хелијске смрти) или ДНК репарацији, то би могло резултовати у појави карцинома. Познат је пример p53 мутације која проузрокује рак коже као последицу излагања UV радијацији [9, 12].

## ФУНКЦИОНАЛНА И ФИЛОГЕНЕТСКА КЛАСИФИКАЦИЈА

UV зрачење оштећује ДНК стварањем циклобутан пиримидинских димера (CPD) и (6-4)-фотопродуката, што може даље довести до мутација генетског материјала, канцера и хелијске смрти. Да би се одржао генетски интегритет хелија, фотолиазе су се развиле и еволуирале у ензиме који оправљају оштећења на ДНК молекулама која су настала под утицајем UV зрачења. На основу специфичности према супстрату могу се разликовати CPD фотолиазе и (6-4) фотолиазе. CPD фотолиазе су пронађене у сва три биолошка домена (домен археја, домен бактерија и домен еукариота), док су (6-4) фотолиазе идентификоване само код еукариотских организама и претпоставља се да су настале касније током еволуције [13]. На основу тога што су нађене код великог броја археја, сматра се да су CPD фотолиазе древни ДНК репарациони ензими. Они су били есенцијални за преживљавање организама за време раних стадијума у еволуцији, услед интензивне UV радијације која је пролазила кроз тадашњу атмосферу веома сиромашну кисеоником [14, 15].

Током еволуције фотолиазе су исчезле код плацентних сисара укључујући и људе, а замењене су напреднијим репарационим NER системом. Велики број фотолиазама-сличних гена је идентификован код свих живих организама, и они кодирају протеине који деле високу структурну сличност, имају очувани централни домен и FAD као каталитички кофактор. Ови протеини заједно формирају бројну фамилију флавопротеина, која је означена као криптохром/фотолиаза фамилија (CPF) [16]. Постоје међу њима и одређени чланови CPF протеина, који немају способност да оправљају UV-индукована оштећења на ДНК. Реч је о криптохромима, који регулишу одговор на плаву светлост код биљака, усклађују циркадијални ритам (дневно/ноћне и бројне друге функције свих најважнијих органа у организму) код животиња, као и функцију магнеторецептора код птица и инсеката. Први криптохром нађен је код мале цветне биљке *Arabidopsis thaliana*, урочњак или скупљен из породице крсташа [17], а пар година касније су криптохроми откривени и код људи [18]. Дакле функционално, ензими CPF фамилије деле се у три главне класе: CPD фотолиазе, (6-4) фотолиазе и криптохроме (Cry).

На основу филогенетских студија, CPF ензими припадају једној од седам класа: класа I, II или III CPD фотолиаза, биљни криптохроми, DASII-криптохроми, (6-4) фотолиазе и животињски криптохроми [15, 19]. Недавно је откривена још једна еволуционо стара и потпуно неспецифична класа Fe-S бактеријских криптохрома и фотолиаза (FeS-BCP). Поред FAD каталитичког кофактора и 6,7-диметил-8-рибитил-лумазин антена молекула нађеног само у овој класи, идентификован је и Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> кластер који игра улогу у стабилизацији структуре ензима [20].

Класе I и III CPD фотолиаза нађене су у микробним организмима, док је класа II CPD фотолиаза најчешће идентификована код виших организама, укључујући животиње и биљке, али такође и код архебактерија, еубактерија, и једноћелијских алги [21]. Упркос истом

супстрату, класе I и III CPD фотолиаза показују мању сличност са класом II CPD фотолиаза него са (6-4) фотолиазама [21, 22]. (6-4) фотолиазе уочене су само код еукариота. Биљни Cry формирају специфично блиску групу са класом III CPD фотолиаза, док животињски Cry су блиско повезани са (6-4) фотолиазама [20, 23].

Посебно разнолика и необичних својстава је DASH-Cry класа. DASH (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Human*)-тип криптохрома је присутан у неким бактеријама и биљкама, код различитих врста кичмењака (*vertebrata*), као и гљивама (*fungi*), а првобитно је био сматран само сензорским фоторецептором, због његове немогућности да оправља CPD оштећења у дволанчаном ДНК хеликсу. Међутим, DASH-Cry ипак може да оправља CPD дефекте на једном ланцу ДНК *in vitro*, док његова улога у ДНК репарацији *in vivo* још увек остаје да се разјасни [19].

Данас је широко прихваћено становиште да је заједнички предак свих CPF ензима највероватније била CPD фотолиаза [14] и да су биљни криптохроми еволуирали из класе III CPD фотолиаза, док су животињски криптохроми изведени из (6-4) фотолиаза [13].

## ОТКРИЋЕ ФОТОЛИАЗЕ И ФОТОРЕАКТИВАЦИЈА

Да би се заштитиле од деструктивних ефеката UV-индукованих мутагених лезија, хелије организма су еволуцијом развиле фотореактивацију, као високо специфичну и ефективну репарациону методу. Верује се да је то један од најстаријих и најпростијих ДНК репарационих система у природи. Још 1949. год., Келнер (Albert Kelner) је известио да хелије *Streptomyces griseus*, *Escherichia coli*, *Penicillium notatum* и *Saccharomyces cerevisiae*, озрачене UV зрачењем, показују пораст у преживљавању од 100–400.000-пута ако се након тога изложе видљивој светлости. Овај феномен је назван фотореактивацијом [24], а слични резултати су добивени и са бактериофагама изложеним UV радијацији, а затим инкубираним са сензитивним бактеријама при видљивој светлости [25]. Како фаге убацују свој ДНК материјал у бактеријске хелије, Дулбеко (Dulbecco) је исправно претпоставио да фотореактивација потиче од реверзибилне оправке UV-индукованих ДНК лезија посредством „хелијских фактора“ током инкубације у присуству видљиве светлости, а много година касније Санкар је то детаљно истражио и потврдио [26]. Руперт је сматрао да је фотореактивација ензимски процес вођен фотореактивирајућим ензимом, који је касније назван фотолиаза. Поред тога, Руперт је демонстрирао да фотореактивација следи Михаелис–Ментенову реакциону кинетику с тим да је та катализа апсолутно зависна од светлости. Фотолиаза се везује за UV оштећену ДНК у мраку, а ослобађа се од оправљене ДНК након илуминације са видљивом светлошћу [26, 27].

Фотолиазе из *E. coli* и квасца које су прве биле студиране од стране Руперта, Дулбека и других могу да оправљају само CPD дефекте [25-27]. Четрдесет година након открића CPD фотолиазе, изолована је фотолиаза из *Drosophila melanogaster* (винске мушице) [28] која оправља (6-4) фотопродукате.

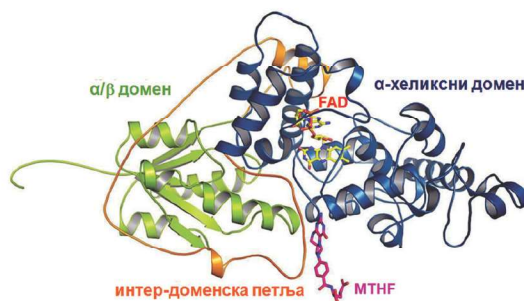
## ДНК ФОТОЛИАЗЕ

ДНК фотолиазе оправљају UV-индуковане ДНК лезије присутне на једном или оба ланца ДНК хеликса путем фотореактивације. На основу специфичности према супстрату разликују се два типа – CPD фотолиазе које оправљају CPD и (6-4) фотолиазе које оправљају (6-4)-фотопродукте. Мада функционо различити, оба типа су еволуционо и структурно блиско повезани [8].

ДНК фотолиазе су мономерни ензими дужине 454 до 614 аминокиселина са молекулском тежином од 50 до 65 kD [23]. Генерално, они садрже два нековалентно везана кофактора (хромофоре). Први кофактор је флавиаденин динуклеотид (FAD), чији је потпуно редуковани облик (FADH<sup>-</sup>) ензимски активан. FADH<sup>-</sup> функционише као каталитички кофактор и електрон донор. Други кофактор је хромофора која сакупља светлост тј. антена молекула који апсорбује UV/VIS фотоне из опсега 300–500 nm, и која варира зависно од протеина. Присуство антена хромофоре није апсолутни услов за активност фотолиазе, пошто фотолиазе којима недостаје ова хромофора су и поред тога биолошки активне. Међутим, антена хромофора након апсорпције блиске UV или плаве светлости, преноси ексцитациону енергију до каталитичког кофактора, што као резултат даје побољшану ефикасности ДНК репарације [8, 29].

### Кристална структура фотолиазе

Park et al. су 1995. год. публиковали прву кристалну структуру једног CPF ензима из класе I фотолиаза изоловану из *E. coli* (слика 3). Њена глобуларна структура је неуобичајена за већину ДНК везивних протеина [30]. Архитектуру фотолиазе карактерише  $\alpha/\beta$  домен на N-терминалу и  $\alpha$ -хеликсни домен на C-терминалу. Два домена су повезана преко дуге интер-доменске петље, која је обмотана око  $\alpha/\beta$ -домена. У  $\alpha$ -хеликсном домену налази се везивни џеп у коме је каталитички кофактор FAD докован за протеински матрикс.



Слика 3. Структура фотолиазе из *E. coli* (PDB код: 1DNP) [30]. Шематски приказ показује  $\alpha/\beta$  домен (зелено) и  $\alpha$ -хеликсни домен (плаво), повезане дугим интер-доменским линкером (наранџасто). Кофактори МТНФ и FAD су дати у љубичастој и црвеној боји.

$\alpha/\beta$  домен показује типичну Росманову терцијалну структуру, која може да везује нуклеотиде [31], са пет издужених паралелних  $\beta$ -набраних плочица које су са обе стране покривене  $\alpha$ -хеликсима. Овај домен обезбеђује везивно место за хромофору која сакупља светлост тј. антена молекула који апсорбује UV/VIS фотоне из опсега 300-500 nm.

Кристална структура комплекса CPD фотолиазе из *Anacystis nidulans* са ДНК-дуплексом који садржи аналог CPD лезије публикована је 2004. год. [32]. Структура је потврдила да CPD фотолиаза локално отвара дволанчани ДНК хеликс на оштећеном месту, омогућавајући CPD дефекту да се несметано убаци у каталитичку шупљину. С друге стране, структурне промене на самом ензиму при везивању ДНК остају само маргиналне.

Кристална структура (6-4) фотолиазе из *Drosophila melanogaster* (винска мушица), везана са дволанчаном ДНК која садржи синтетичку (6-4) лезију објављена је 2008. год. [33]. Нађено је да је основна протеинска архитектура иста као и код CPD фотолиазе, баш као и начин везивања ДНК лезије тј. (6-4) супстрата за активно место ензима. Кристалне структуре криптохрома откриле су хомологију целокупне 3Д-топологије са фотолиазама. Поред тога, криптохроми имају С-терминалну екстензију важну при преносу сигнала, која међутим није присутна у структурним моделима из протеинске базе података (PDB) [13].

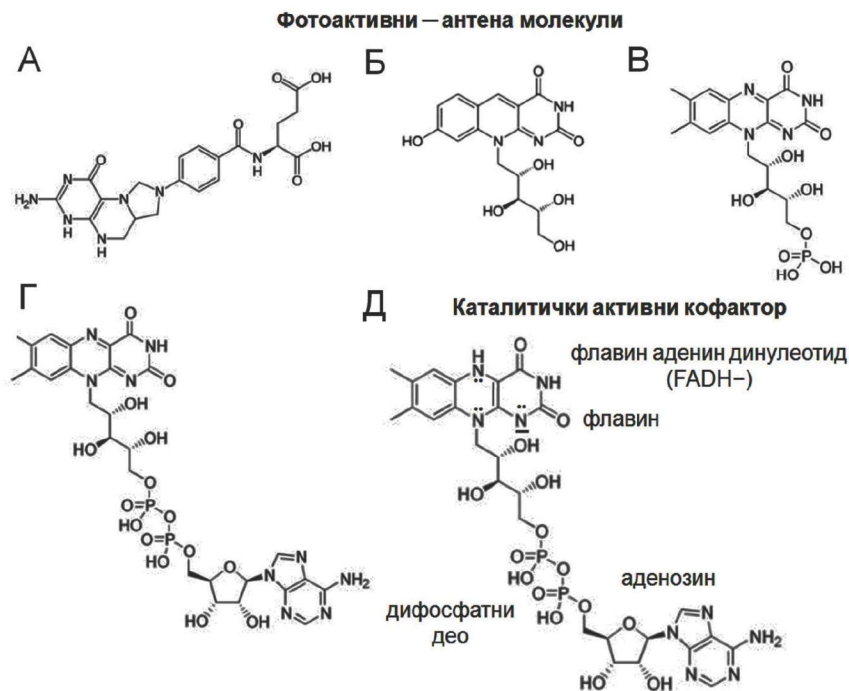
Данас је око петнаестак кристалних структура различитих CPF ензима доступно у PDB бази. Структура пептидног низа фотолиазе из *E. coli* [30] је очувана не само у класи I фотолиаза [32], него и код многих других

протеина из CPF фамилије, као што је класа (6-4) фотолиаза [33], биљни криптохроми, DASH криптохроми, као и у класи II фотолиаза [34]. Укупна RMS девијација (root mean square deviation) за тринаест CPF структура са различитим секвенцама је 2.36 Å.

Изгледа да сви изучени CPF протеини користе исти тип ексцитационе енергије и исти механизам електрон трансфера (ЕТ) који, захваљујући осетљивости на растојање и оријентацију, присиљава протеине да се увијају тако да чувају специфичну терцијалну структуру, како би осигурали оптималан распоред и позицију есенцијалних кофактора и кључних аминокиселинских остатака [13, 35]. Међутим, и поред тога одређене структурне специфичности су нађене како код представника различитих класа, тако и у оквиру исте класе.

#### Антиена хромофоре

Друга хромофора код фотолиазе служи као фото-антена која апсорбује квант-светлости и преноси ексцитациону енергију до каталитичког кофактора. Антена хромофоре нису есенцијалне за функцију ензима тј. ензим може обављати биолошку функцију и без њих, као на пример, директном апсорпцијом и ексцитацијом каталитички активне хромофоре FADH<sup>-</sup>→FADH\* фотоном блиске UV-светлости ( $\lambda \approx 360$  nm). Међутим, антена молекули су свакако значајни, јер повећавају ефикасност апсорпције фотона и проширавају опсег спектра светлости у коме је ензим активан. Много већа ефикасност апсорпције фотона светлости код антена хромофоре у односу на FAD последица је директне изложености дела антена молекула спољашњој средини. Насупрот томе FAD је позициониран на дну каталитичке шупљине.



Слика 4. Кофактори у ДНК фотолиазама и криптохромима. Антена хромофоре: А) 10-метилтетрахидрофолат (MTHF) у фотолиази из *E. coli* (PDB: 1DNP) [30]. Б) 8-хидрокси-5-дезафлавин (8-HDF, Fo) у фотолиази из *A. nidulans* (PDB: 1QNF). В) флавин мононуклеотид (FMN) у фотолиази из *T. thermophilus* (PDB: 2J09). Г) FAD као антена хромофора у фотолиази из *S. tokodaii* (PDB: 2E0I). Д) Каталитички активни кофактор код свих ензима из CPF фамилије је флавин аденин динулеотид (FADH<sup>-</sup>) [29].

До пре петнаест година, на основу антена молекула разликовали смо CPD фотолиазе фолатног (*E. Coli*) и деазафлавиноског (*A. nidulans*) типа. Данас знамо да CPD фотолиазе могу поседовати као антена хромофору: 10-метенил-тетрахидрофолат (МТНФ,  $\lambda_{\text{max}} \approx 380$  nm) и неколико нуклеотиду сличних молекула као што су 8-хидрокси-5-деазарибофлавин (8-HDF, Fo,  $\lambda_{\text{max}} \approx 445$  nm), флавин мононуклеотид (FMN,  $\lambda_{\text{max}} \approx 446$  nm) и флавин аденин динуклеотид (FAD,  $\lambda_{\text{max}} \approx 450$  nm) (слика 4), док (6-4) фотолиазе садрже само Fo хромофору [29]. До сада истражени криптохроми садрже МТНФ антена молекула као хромофору, али листа вероватно није коначна.

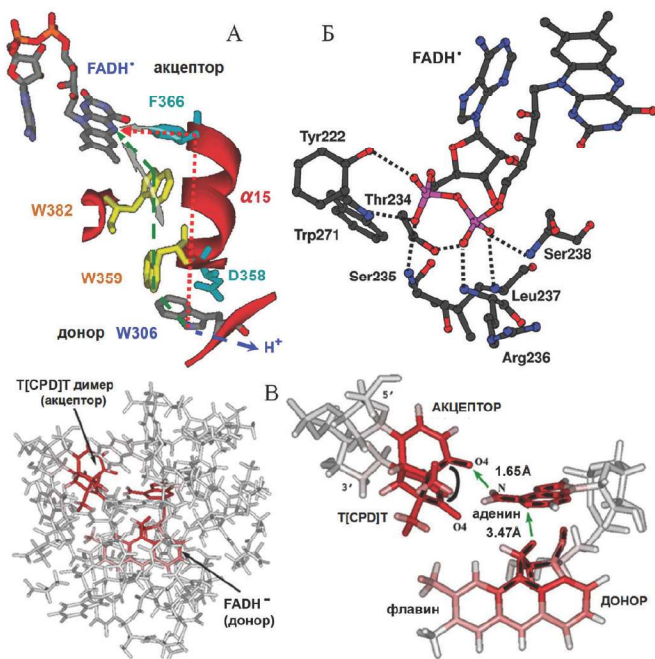
Трансфер ексцитационе енергије са антена хромофоре до FAD дешава се путем Форстеровог (Förster) резонантног трансфера енергије. Ефикасност и кинетика брзине трансфера енергије зависе од спектралних особина, оријентације обе хромофоре и растојања између њих [8]. Свакако да краћа растојања и мањи углови између транзиционих диполних момента два кофактора фаворизују ефикаснији трансфер енергије. Ефикасност трансфера ексцитационе енергије је око 60-70% у фотолиази из *E. coli* [36], 100% у *A. nidulans* фотолиази [37], и 78% у мраку односно 87% на светлости-адаптираном криптохрому Сруз из *A. thaliana* [16]. Студије кристалних структура фотолиаза омогућавају откривање детаља механизма трансфера енергије између антена хромофоре и FAD.

Све хромофоре нуклеотидног типа су позиционирани у сличним џеповима дубоко у унутрашњости N-терминалног субдомена и све су приближно 17–18 Å удаљене од FAD кофактора. Супротно од њих, МТНФ заузима положај унутар плитке шупљине између N- и C-терминалних субдомена и делимично се протеже изван површине ензима. Растојање између МТНФ и FAD од 15–17 Å је само нешто краће у односу на друге антена молекуле [35]. Већина аминокиселинских остатака који интерагују са антена молекулама нуклеотидног типа су идентични или конзервативни. Насупрот томе, везивна места за

МТНФ су мање очувана тј. много мање конзервативна. Тако да је само један од дванаест везивних аминокиселинских остатака конзервативан када се упореде фотолиаза из *E. coli* и DASH-криптохром из *A. thaliana* [8, 16].

### Необичан облик FAD кофактора

Каталитички FAD кофактор је докован за протеински матрикс у активном месту ензима. FAD интерагује са протеинским окружењем, претежно јаким водоничним везама (слика 5Б), али и другим невезивним интеракцијама – стерног, електростатичког и ван дер Валсовог типа, услед чега заузима веома необичну конформацију у облику слова U. Ова конформација хромофоре је енергетски нестабилна у односу на опружену/релаксирану FAD конформацију у воденом раствору (или вакууму), али је у фотолиази стабилизована бројним интеракцијама у везивном месту. FAD у U-конформацији доводи прстен аденина тачно изнад флавина тј. трицикличног (хетеронуклеарног) прстена изоалоксазина. Равни два прстена су скоро међусобно нормалне са најкраћим растојањем између њих од 3.47 Å (слика 5В). Физиолошки значај U-конформације је да обезбеди најкраћи пут за трансфер електрона између донора (флавина) и акцептора (CPD), и тиме омогући брз ET са високим степеном ефикасности. Методом „electronic tunneling currents“ [38, 39] која је развијена у групи проф. Стучебрукова, шефа групе у којој је аутор текста предходно радио, могуће је испитивати проток електрона кроз атоме и хемијске везе, као и правац и интензитет тунеловања електрона (electron tunneling) кроз протеински матрикс. Метода комбинује квантно-механичке прорачуне са Маркусовом теоријом електрон трансфера и идеалан је алат за симулације трансфера електрон на даљину у протеинима (long-range ET). Слика 5В графички приказује струјање електрона при трансферу електрона са фламина, преко аденина на CPD димер и илуструје важност необичне U-конформације FAD кофактора.



Слика 5. Графички приказ контраверзних детаља и питања. А) Који механизам трансфера електрона користи фотолиаза током процеса фотоактивације? Поређење hopping (зелена линија) и super-exchange (црвена линија) механизма. Плава линија означава депротонацију  $W_{306}H^{+}$  до  $W_{306}$ . Б) Неубичајена U-конформација FAD кофактора. FADH<sup>+</sup> је усидрен за активно место ензима бројним водоничним везама преко дифосфатне групе. В) Међусобни положај и оријентација донора (FADH<sup>+</sup>) и акцептора електрона (T[CPD]T) у ензиму. Директним трансфером електрона са редукваног фламина, преко аденина до CPD димера иницира се фоторепарациони процес на ДНК молекулу. Систем је студиран методом atomic tunneling currents [39], при чему атоми са већим протоком електрона су приказани интензивнијом црвеном бојом. Изузетно кратка растојања између молекулских група обезбеђују веома брз ET (око 0.2 ns) [40].



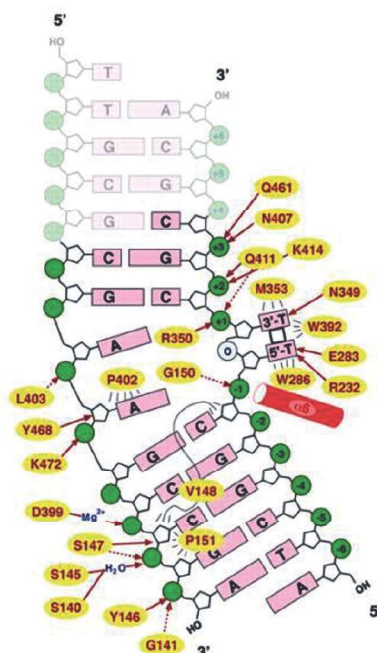
Вредно је поменути да модел структура комплекса CPD димера и фотолиазе, генерисана и оптимизована у нашој групи (слика 5B), се готово идеално поклапа са кристалном структуром из PDB базе – 1TEZ [32] објављеном пар година касније (види текст доле).

#### ДНК везивање

Претпоставља се да 10-20 молекула фотолиазе у свакој хелији скенирају геном тражећи UV-лезије. Ово су структурно-специфични ензими који препознају и везују UV-лезије са изузетно високом ефикасношћу.

Прва решена кристална структура фотолиазе из *E. coli* [30] није довољно разјаснила енигму механизма фотолиаза-ДНК везивања. Откривена је релативно мала и дубока каталитичка шупљина, што је одмах довело до питања како и колико ДНК хеликс може да приђе до ензима, те колико је CPD димер удаљен од FADH<sup>-</sup> кофактора у комплексу ДНК-фотолиазе. Да ли треба очекивати веће конформационе промене на површини ензима и отварање активног места код фотолиазе и/или настају значајне структурне промене у делу ДНК молекула који садржи UV-лезију. Растојање и оријентација између интерагујућих молекула (CPD и FADH<sup>-</sup>) дефинишу енергетику и кинетику процеса репарације, што је такође остало још једно отворено питање. Прорачуни су показали да дволанчани ДНК молекула са CPD дефектом не може да приђе на растојање краће од 4.3 Å, ако нема отварања активног места ензима и већих конформационих промена. То је довело до више различитих хипотеза, међу којима је била и претпоставка по којој пиримидински димер искочи из дволанчаног ДНК хеликса („flipping-out модел“), који се локално расплете око самог места лезије, тако да CPD димер сада може дубље да се увуче у каталитички везивни џеп и оствари блиски контакт са каталитичким кофактором. При томе, сада могу да се награде водоничне везе између карбонилних кисеоника пиримидинског димера и -NH<sub>2</sub> групе аденинског дела FAD молекула (слика 5B). Реч је о веома јакој водоничној вези C=O...H-N дужине 1.65 Å [39]. Блиски контакт CPD димера са каталитичким кофактором омогућава бржи пренос електрона на димер и побољшава ефикасност ензимске катализе.

„Flipping-out хипотеза“ је подржана и побољшана биохемијским студијама [41, 42], компјутерским моделовањем и симулацијама [39, 40, 43], као и NMR спектроскопским подацима [44]. Када је 2004. год. објављена кристална структура фотолиаза-ДНК комплекса (класа I фотолиазе из *A. nidulans*) [32], flipping-out модел је потврђен са много више детаља. Демонстрирано је да препознавање UV-лезије независно од ДНК секвенце се заснива на јонским мостовима и водоничним везама углавном награђеним између ензима и фосфатних група на ДНК ланцу који садржи CPD дефект (слика 6) [32]. Како је ланац која носи CPD димер деформисан и делимично локално расплетен, специфичне интеракције тог дела ДНК и ензима су кључне за препознавање UV-лезије. Дакле, реч о препознавању комплементарности површина и електростатичких интеракција.



Слика 6. Везивање ДНК супстрата за фотолиазу и „flipping-out модел“. Дијаграм је добијен апстраховањем података из кристалне структуре ДНК-фотолиаза комплекса (PDB код: 1TEZ) [32]. Дијаграм приказује интеракције између дволанчаног ДНК хеликса и класе I фотолиазе из *A. nidulans*. Нуклеотиди којима није јасно дефинисана електронска густина су приказани бледом бојом. Зеленим кружићима обележене су фосфатне групе на ДНК молекулу. Стрелице са пуном линијом означавају привлачне интеракције са аминокиселинским бочним остацима, док испрекидане линије одговарају стабилизујућим интеракцијама са атомима пептидних веза.

Структура комплекса (6-4) фотолиазе из *D. melanogaster* и дволанчаног ДНК хеликса са (6-4)-лезијом потврдила је очување истог ДНК везивног механизма код CPD фотолиаза и (6-4) фотолиаза [33]. Један прилично сличан, мада не и потпуно идентичан начин везивања је такође откривен на основу кристалне структуре комплекса ензим-ДНК супстрат код CPD II фотолиазе из *Methanosarcina mazei* [34].

3D-модел дволанчаног ДНК хеликса са контактним местима која интерагују са фотолиазом дат је на слици 7A, док је електростатички потенцијал на површини фотолиазе *E. coli* [30, 40] приказан на слици 7B (види објашњење уз слику). Овај модел је потврдио да је препознавање CPD дефекта у исто време и препознавање комплементарних површина ДНК и фотолиазе уз структурно-специфично везивање CPD димера за активно место ензима. Упоредивањем различитих структура фотолиаза из PDB базе, постало је јасно да све фотолиазе поседују позитивно наелектрисану ДНК везивну површину на ензиму у близини каталитичког активног места у коме је смештен FAD кофактор. Тиме су подржане интеракције са фосфатним групама из ДНК (слика 7B), мада сама наелектрисања на површини нису довољна за везивање ДНК за ензим [40]. Унутрашњост каталитичког џепа показује негативан потенцијал који привлачи

и интерагује са пиримидинским базама из CPD димера, што води до даље стабилизације комплекса у активном месту (слика 7Б).

## ФОТОАКТИВАЦИЈА FAD-A

Фламини везани за протеине могу бити у неком од три редокс стања у пет различитих облика: оксидован облик (FAD), полуређуковани семихинони (неутрални радикал FADH<sup>•</sup>, анјонски радикал FAD<sup>•-</sup>) или потпуно ређуковани хидрохинони (FADH<sup>-</sup> и FADH<sub>2</sub>). Због различитих спектралних особина [45], редокс стања фламина у флавопротеинима могу се *in vitro* анализирати праћењем апсорпционих спектра протеина [46].

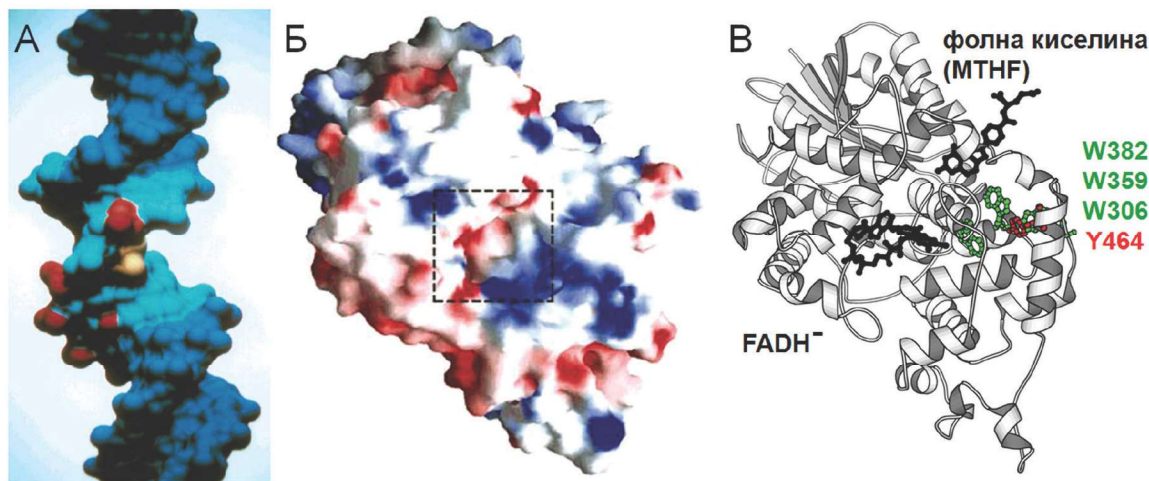
У фотолиазама, каталитички активан облик фламина је FADH<sup>-</sup>, који је *in vivo* доминантан облик. Током пречишћавања фотолиазе под аеробним условима, флавински кофактор се обично оксидује до полуређукованог или чак до потпуно оксидованог облика у одређеним случајевима. Излагање таквих неактивних фотолиаза светлости у присуству ређукујућих агенаса, као што су дитиотреитол, ЕДТА или β-меркаптоетанол, може довести до конвертовања фотоекситованог фламина (FADH<sup>•</sup>) у активни FADH<sup>-</sup> облик [47]. Овај функционално есенцијалан фотоређуковани процес назван је фотоактивација [8].

Фотоактивација *in vitro* захтева фотоекситацију фламина и електрон трансферни низ (пут) до фламина, који ће да обезбеди електрон за његову ређуковацију. Фотоекситациона енергија за фламин се обезбеђује или путем директне апсорпције фотона плаве светлости (630 nm) од стране самог FADH<sup>•</sup> кофактора или MTHF антена хромофора прво апсорбије фотон плаве светлости (≈510 nm), а затим унутар 200 ps путем трансфера енергије

са 60% ефикасности екситује фламин [48]. Типично, пут трансфера електрона састоји се од три триптофана (Trp-тријада), који су лоцирани унутар C-терминалног α-хеликсног домена фотолиазе (слика 7В). Trp-тријада је конзервативна у већини ДНК фотолиаза [30, 33] сем у класи II фотолиаза, код које је једна алтернативна Trp-тријада идентификована на различитој позицији [34], као и код FeS-BCP класе. Електрон трансферни низ који ређукује фотоекситовани FADH<sup>•</sup> посредством конзервативне Trp-триаде, недавно је упоређен код различитих класа CPF ензима, показујући изненађујуће структурно преклапање свих кључних актера електрон трансферног низа.

*In vitro*, фотоекситовани FADH<sup>•</sup> екстрахује један електрон са проксималног Trp382 (*E. coli*) у активном месту ензима и иницијално награди charge-separated (FADH<sup>-</sup> Trp382H<sup>•+</sup>) стање у току 40 ps. Дакле, Trp382 је примарни електрон донор при процесу фотоекситације. Настали Trp382H<sup>•+</sup> катјон радикал, одмах апстрахује електрон са средњег Trp359, а овај затим узима електрон са дисталног Trp306 који је делимично у контакту са спољашњом воденом средином [48]. Настали Trp306H<sup>•+</sup> катјон радикал може да се детектује за <10 ns, који затим депротонује до неутралног радикалног Trp306<sup>•</sup> облика у току 300 ns. Коначно, Trp306<sup>•</sup> радикал се у одсуству спољашњег електрон донора (ређукујућег средства) експоненцијално релаксира са временском константом од 17 ms услед рекомбинационог процеса. Рекомбинациона кинетика је јако убрзана на нижим рН вредностима, јер Trp306<sup>•</sup> треба протонovati пре рекомбинације наелектрисања [36].

Фотоређуковација флавинског кофактора била је интензивно студирана *in vitro* код класе I фотолиазе из *E. coli* и *A. nidulans*, као и код Cru1 из *A. thaliana* [36, 49].

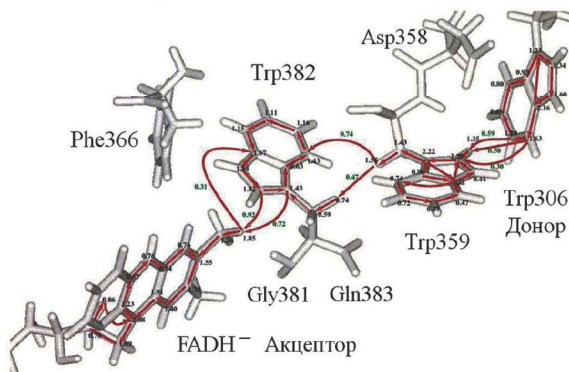


Слика 7. Структуре дволанчане ДНК са CPD дефектом и репарационог ензима фотолиазе. А) Space-filling приказ молекулске површине ДНК. Контактна места која интерагују са фотолиазом су означена бојом: цијан – делови који интерагују на површини фотолиазе, црвена – фосфатне групе и N7 атом гуанина директно укључени при везивању, жута – циклобутански прстен. У овом моделу, ДНК је увијена за 27° унутар главне бразде (major groove) код CPD места. Б) Електростатички потенцијал приказан на површини ензима израчунат је коришћењем линеарне Поасон-Болтцманове једначине и програма MEAD [40]. Позитиван потенцијал је означен плавом, а негативан црвеном бојом. Активно место (означено квадратом) са FADH<sup>-</sup> докованим у унутрашњости је везивно место за CPD димер. В) Ribbon приказ кристалне структуре фотолиазе из *E. coli* са положајем фолне киселине као антена молекула, FADH<sup>-</sup> каталитичког кофактора, триптофанске триаде и Trp464 [30].

Транзиционом апсорпционом спектроскопијом [50], поред триптофана, уочена је и есенцијална улога једног тирозина као унутрашњег-терминалног електрон донора, мада до сада није експериментално идентификовано о коме Туг остатку је реч код фотолиазе из *A. nidulans* и Сгу1 из *A. thaliana*. На основу теоријско-рачунарске студије код *E. coli*, Туг464 је идентификован као потенцијални електрон донор [40], што би по аналогији имплицирало да се код фотолиазе из *A. nidulans* радикалско интермедијерно стање преноси са дисталног Тгр314 на Туг468.

### Hopping или super-exchange механизам

Да ли фотолиаза користи исти механизам да фоторедукује FAD *in vivo*, још увек није у потпуности разјашњено [51]. Међутим, мутације аминокиселинских остатака триптофанске-тријаде (Тгр382Phe, Тгр359Phe, Тгр306Phe) које блокирају фотоиндуковани ЕТ *in vitro* [52], не ремете ензимску активност фотолиазе *in vivo*, што подржава становиште да је фотоактивација од малог физиолошког значаја *in vivo* [48]. Међутим, ситуација није тривијална, нити потпуно разјашњена. Фотоиндуковани трансфер електрона од Тгр306 до флавина може тећи алтернативним путевима, на пример, hopping механизмом (*in vitro*) [36] и super-exchange механизмом (*in vivo*) [8] (слика 5А). Hopping механизам подразумева пренос електрона кроз простор са једне на другу просторно блиску молекулску групу. Овде су укључени флавин и Тгр-триада, при чему је акцептор FADH<sup>-</sup>, а крајњи електрон донор Тгр306. Скоковит трансфер електрона и померање катјон радикала дуж Тгр-триаде одвијају се у супротним правцима. Методом „atomic tunneling currents“ додатно је подржана директна улога Тгр-триаде у фотоактивационом процесу и показано је да се овај процес може објаснити тунеловањем електрона кроз хемијске везе уз скоковит пренос кроз простор између раздвојених молекулских група [38, 39] (слика 8). Директан трансфер електрона са Тгр306 на FADH<sup>-</sup> (*in vitro*) није остварљив због растојања од око 15 Å, а рачунски је утврђено да би такав ЕТ био превише спор – (пар μs) у поређењу са израчунатом [40] и експериментално измереном брзином [36] hopping трансфера (пар ns). Super-exchange механизам *in vitro* такође никад није експериментално потврђен.



Слика 8. Струје тунеловања у фотолиази из *E. coli*. Анализа резултата „atomic tunneling currents“ методе [38] даје величину и смер тунелованог протока електрона

кроз хемијске везе, али и при скоковитом преносу кроз простор. Циркуларне струје су опажене код ароматичних аминокиселина Тгр359 и Тгр382, као и код донора и акцептора.

Код *super-exchange* механизма, донор (Тгр306) и акцептор (FADH<sup>-</sup>) електрона остају исти, али електрон путује кроз пептидне везе α15 хеликса као кроз жицу, тј. реч је о тунеловању електрона кроз пептидне везе, односно генерално кроз протеински матрикс [8]. Овај механизам такође укључује Asp358 и Phe366 аминокиселинске остатке (слика 5А). Phe366 је просторно-геометријски у идеалној позицији да испоручи електрон флавину, али интригантно је то што мутације триптофана из тријаде са фенилаланином (посебно Тгр382Phe и Тгр306Phe) блокирају фотоиндуковани ЕТ *in vitro* [52], али су без утицаја *in vivo*. Реч је о циљаним мутацијама, при чему се изразити електрон донор– Тгр (или Туг) замењује са Phe који нема способност да преда електрон и тиме блокира електрон трансферни низ/пут до флавина.

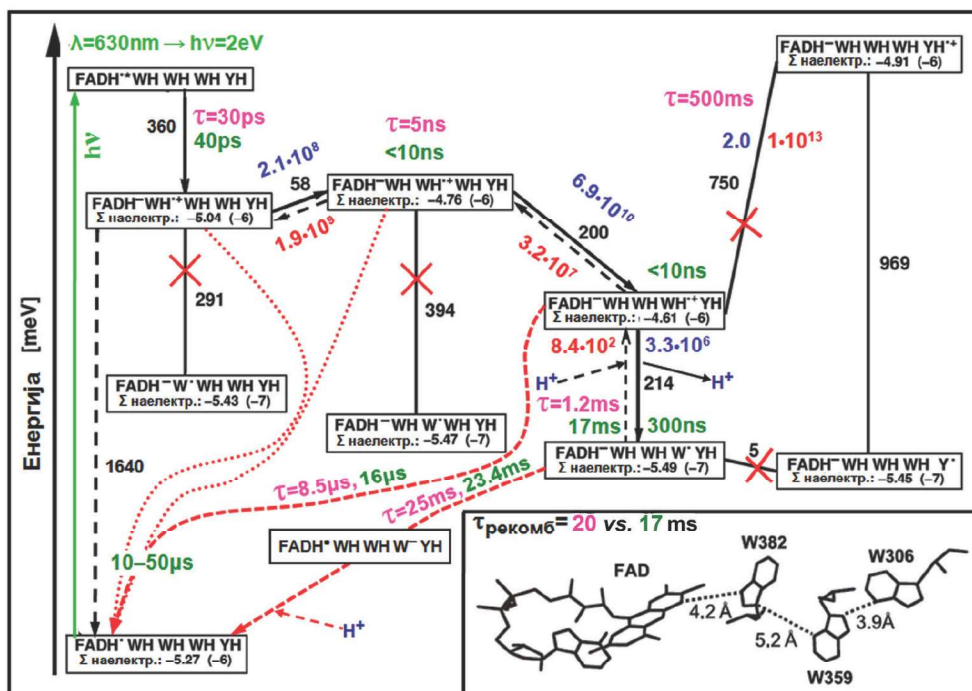
Са недавним открићем да неки CPF ензими имају по две Тгр-триаде до FAD кофактора, од којих се она друга поклапа са Тгр-триадам у класи II фотолиаза [34], можда је дошло време да се редефинише фотоактивациони процес *in vivo*.

Поред тога, у живим ћелијама су присутни одговарајући редукујући агенси, који могу доста дуго да стабилизују редуковани FADH<sup>-</sup> облик каталитичког кофактора, као и оксидационо/протонационо стање Тгр-тријаде и тиме значајно одложе или спрече рекомбинациони процес; што би значило да нема потребе за фоторедукцијом кофактора који је већ у FADH<sup>-</sup> облику. Када се из одређеног физиолошког разлога каталитички кофактор реоксидује, онда ензим има потребу да покрене фотоактивациони процес *in vivo*. Дакле, физиолошка улога и значај фотоактивације је у конвертовању и одржавању каталитички активног кофактора у редукованом FADH<sup>-</sup> облику.

### Кораци у фотоактивационом механизму

Роровић et al., [40] су детаљно студирали енергетски профил фотоактивационог процеса *in vitro* у фотолиази из *E. coli* (1DNP [30]), који укључује све релевантне интермедијере, протонациона и редокс стања свих кључних актера процеса (слика 9).

Одређена су стања протоновања свих титрабилних аминокиселинских остатака, фосфатних група и фолне киселине, оксидо-редукциони потенцијали Тгр из тријаде и Туг464, као и термодинамика (слободне енергије) и кинетика процеса (брзине реакција). Термодинамички параметри су добивени применом континуираних електростатичког метода. Вредности брзина електрон трансфер реакција израчунате су на основу Маркусове теорије ЕТ и Пеиц-Датонове (Page-Dutton) семи-емпиријске једначине, док је енергија прелазних стања и енергетских баријера добијена применом теорије прелазног стања (transition state theory). Поред тога, испитиван је утицај рН на енергије депротоновања триптофанских катјон радикала, као и рН-зависност редокс потенцијала Тгр и Туг у воденој средини и фотолиази. На основу поменутих прорачуна формиран је енергетски профил трансфера радикала током фотоактивационог процеса



Слика 9. Енергетски дијаграм са реакционом шемом за процес фотоактивације код ДНК фотолиазе из *E. coli* [30]. Означена су оксидациона и протонациона стања: FAD, триптофанске триаде (Trp382-Trp359-Trp306) и Tug464, у датом редоследу, заједно са израчунатим укупним наелектрисањем и формалним наелектрисањем протеина. Вертикалне линије су повезане са променама у електронској структури и протонационом стању, док косе линије означавају ЕТ процесе. Дати бројеви црне боје показују разлику у слободној енергији у meV између два интермедијарна стања ензима. Експерименталне вредности временских константи (time constant,  $\tau = 1/k$  [ps, ns, ms]) дате су бројевима зелене боје, а теоријски израчунате вредности су љубичасте боје. Израчунате вредности брзина директних реакција ( $k$  [s<sup>-1</sup>]) су плаве, а повратних реакција црвене боје. Зеленом вертикалном стрелицом је приказана директна ексцитација главне хромофоре FAD из основног (FADH<sup>+</sup>) у ексцитовано (FADH<sup>-</sup>) стање фотоном плаве светлости ( $\lambda = 630$  nm тј.  $E = 2$  eV). Без присуства спољњег редукционог агенса, систем се спонтано враћа у основно стање током рекомбинационог процеса са временском константом,  $\tau_{\text{рекомб}} = 17\text{--}20$  ms.

код фотолиазе из *E. coli* на pH=7.4 (слика 9). Сви прелазни означени црвеним крстићем нису вероватни/могући, зато што су или превише ендергони и спори (формирање Tug464H<sup>+</sup>) или имају превише високу активациону баријеру прелазног стања. Тако, депротоновање катјон радикала Trp382H<sup>+</sup> или Trp359H<sup>+</sup> формираних дубоко у унутрашњости протеина је енергетски веома повољно, али иде са високом енергијом прелазног стања, јер нема једноставног начина да се протон пренесе на неку другу групу или до спољашње водене средине. Брзина овог процеса је зато веома спора у поређењу са компетативним трансфером електрона међу Trp-тријадом (<5 ns).

Такође, је студирана рекомбинација наелектрисања – процес који спонтано води назад до основног стања најнижег у енергији. Без присуства спољашњег редукционог агенса, систем се спонтано реверзибилно враћа у основно стање током рекомбинационог процеса са измереном временском константом,  $\tau_{\text{рекомб}} = 17$  ms (црна испрекидана линија) [36]. Иницијално charge-separated стање је од основног стања више у енергији за 1640 meV. Израчуната  $\Delta G$  дефинисана је редокс потенцијалима  $E_0(\text{TrpH}_382/\text{TrpH}^{+382}) = +1250$  mV,  $E_0(\text{FADH}^-/\text{FADH}^+) = -390$  mV, што се добро слаже са експерименталном проценом да је редокс потенцијал Trp у унутрашњости протеина  $\geq +1.1$  V, односно да је за флавин у фотолиази

у опсегу  $-0.33$  до  $-0.5$  V [36]. Постоји неколико других начина да се систем врати у основно стање, а физиолошки релевантни су само они означени црвеним испрекиданим линијама, са (FADH<sup>-</sup> Trp306H<sup>+</sup>) и (FADH<sup>-</sup> Trp306<sup>+</sup>) интермедијерних стања. Ови интермедијери стоје у динамичкој равнотежи са основним стањем (FADH<sup>-</sup> Trp306H) [53]. Поред тога, предност оваквог рекомбинационог процеса је у томе што тече егзергоним реакцијом путем.

#### Сумирани резултати прорачуна

1) Да би се формирало иницијално charge separated стање са FADH<sup>-</sup> из електронски ексцитованог FADH<sup>+</sup> стања, довољна количина енергије ( $\approx 400$  meV) је доступна.

2) Први ЕТ (W359→W382) је благо неповољан (+58 meV); други ЕТ (W306→W359) је егзергони са -200 meV, чиме је већ делимично стабилизовано радикалско стање на дисталном W306.

3) Депротоновање катјон радикала WH<sup>+</sup>306 (pKa = 3.8) води до даље стабилизације од 215 meV. Ово је есенцијалан корак који спречава брзу рекомбинацију наелектрисања и додатно стабилизује FADH<sup>-</sup> каталитички облик кофактора.

4) Првобитно се сматрало да процес рекомбинације

наелектрисања је повратни/ реверзибилни процес, при којем доминира репротонација  $W^{\cdot}306$  са израчунатом временском константом,  $\tau=1.2$  ms. Алтернативни процес рекомбинације наелектрисања тече егзергоним путем преко  $W^{\cdot}306$ , а даље је завистан од рН. Рекомбинациона кинетика је јако убрзана на нижим рН вредностима. Без присуства спољњег редукционог агенса, систем се спонтано враћа у основно стање са укупном временском константом рекомбинационог процеса од  $\tau_{рекомд.} = 17-20$  ms.

5) Радијалско стање се не преноси на суседни (3.6 Å удаљени) тирозин, јер је ЕТ ( $Y464 \rightarrow W306$ ) исувише ендергони и кинетички спор (500 ms), а директни трансфер атома водоника ( $H^{\cdot}$ ) је вођен високом енергетском баријером прелазног стања (у супротности са фотолизом из *A.nidulans*, где је терминални електрон донор  $Y468$ ).

6) Купловање специфичних наелектрисаних стања триптофанске триаде са протонационим стањем титрабилних остатака у ензиму је сасвим мало.

7) Ови резултати могу бити релевантни и за друге класе фотолиаза и криптохрома са којима деле високи степен сличности, конзервативну Trp-триаду и каталички FAD кофактор.

8) Изложеност триптофана спољњем раствору или присуство просторно блиских тирозина на површини протеина могло би да игра важну улогу у дефинисању ЕТ и радијалског пута у овим ензимима.

9) По први пут су рачунарском студијом прецизно одређене вредности редокс потенцијала триптофана и тирозинских остатака у протеинима и њихова рН-зависност тј.  $E_o(\text{TrpH}/\text{TrpH}^{\cdot+})$ ,  $E_o(\text{TrpH}/\text{TrpH}^{\cdot})$ ,  $E_o(\text{TyrH}/\text{TyrH}^{\cdot+})$  и  $E_o(\text{TyrH}/\text{TyrH}^{\cdot})$ , што је од велике важности и за друге ензимске системе.

## ФОТОРЕПАРАЦИОНИ МЕХАНИЗАМ

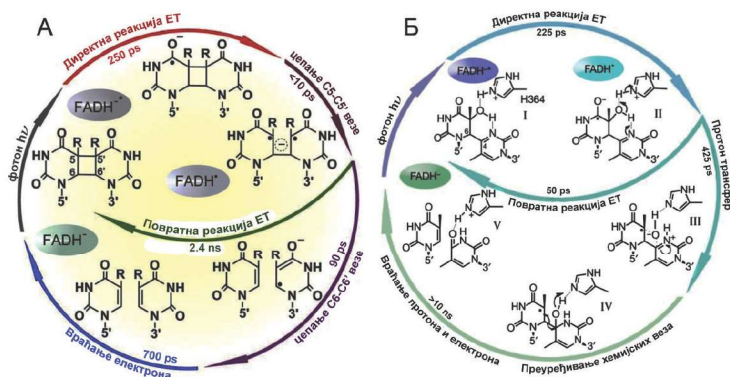
ДНК фотолиаза оправља UV-индукована (200-300 nm) оштећења на ДНК молекулу, цепањем CPD димера на одговарајуће пиримидинске мономере. Главни кораци у фоторепарационом механизму су следећи: 1) апсорпција фотолиазае на ДНК молекул, клизање низ ДНК структуру и скенирање постојећих лезије; 2) препознавање CPD дефекта и структурно-специфично везивање димера за активно место ензима (независно од присуства светлости); 3) екситација фотоактивног  $FADH^{\cdot-}$  кофактора или директно (360 nm) или путем трансфера екситационе енергије са MTHF (UV/VIS светлост, 300-

500 nm); 4) трансфер електрона са екситованог каталишког кофактора  $FADH^{\cdot-}$  до пиримидинског димера; 5) цепање циклобутанског прстена и повратни трансфер електрона до  $FADH^{\cdot-}$ ; 6) десорпција ензима са оправљеног ДНК супстрата. Такође, неке варијације у механизму примећене су у експериментима *in vitro* – Trp277, који се налази близу површине у каталитичком цепању, може да апсорбује UV-фотон ( $\lambda=280$  nm), екситује се и директно реакцијом трансфера електрона, при томе да раздвоји CPD димер на пиримидинске мономере [37].

На основу претходних кристалографских и ултра-брзих спектроскопских кинетичких студија, као и молекулских симулација, већи део репарационог механизма ДНК фотолиазае је структурно и динамички решен [32, 33, 39, 46, 54]. Антена хромофора најпре апсорбује UV/видљиву плаву светлост. Следи трансфер енергије до потпуно редукованог  $FADH^{\cdot-}$  каталишког кофактора, који га доводи у екситовано  $FADH^{\cdot-}$  стање. У екситованом стању кофактор има потребну енергију за пренос једног електрона до CPD или (6-4) лезије, чиме иницира цепања димера на пиримидинске мономере. Електрон се на крају враћа назад до  $FADH^{\cdot-}$  да би се поново успоставило каталички активно  $FADH^{\cdot-}$  стање [40, 55]. Како  $FADH^{\cdot-}$  из реакције излази непромењен, он овде обавља улогу катализатора.

Код CPD лезија (слика 10А), једним електроном редуктовани циклобутански прстен подлеже симетријски забрањеној (на основу Вудвард–Хофманових правила)  $[2\pi+2\pi]$  циклореврзибилној реакцији, након чега следи повратни трансфер електрона до семиредукованог  $FADH^{\cdot-}$  [13]. Иницијални трансфер електрона траје 250 ps. Отварање прстена се дешава у два корака, прво иде цепање  $C5-C5'$  везе током пар ps, а затим цепање  $C6-C6'$  везе са временском константом од 90 ps. Након што је димер подељен, један електрон се враћа назад до  $FADH^{\cdot-}$  са временском константом од око 700 ps [46].

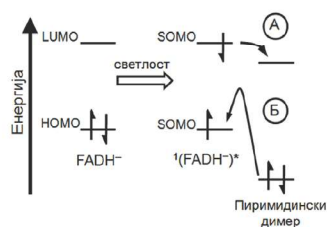
Код (6-4) фотолиаза након екситације (слика 10Б), FAD донира један електрон (6-4) фотопродукту генеришући charge-separated радикалски пар ( $FADH^{\cdot+}$  (6-4) ФП $^{\cdot-}$ ), који затим иницира трансфер протона са есенцијалног His364 остатка до (6-4)ФП. Сукцесивни кораци се природно настављају са интрамолекулским трансфером протона са  $C5-OH$  групе са  $5'$  базе на  $N3$  атом на  $3'$  базу, транзитно градећи zwitter-јон. Затим, O атом нуклеофилно напада  $C4$  позицију на  $3'$  бази транзитно градећи оксетански прстен. Транзитно формирање оксетанске структуре олакшава пренос атома кисеоника са  $5'$  на  $3'$  базу, након чега следи цепање  $C6-C4$  везе.



Слика 10. Комплетан реакциони механизам ДНК фотолиазае којим оправља: А) CPD дефекте; Б) (6-4)-фотопродукте. CPD фотолиазае и (6-4) фотолиазае припадају различитим класама ензима, при чему сваки ензим отклања једну врсту дефекта. Кинетика појединачних корака у фото-циклусу је експериментално спектроскопски одређена [46, 54].

После свих ових промена, His остатак се репротонује, а електрон се враћа назад до FADH<sup>•</sup> чиме се поново успоставља активни облик ензима са FADH<sup>-</sup> кофактором. Овим је (6-4) дефект коначно отклоњен [54].

Дијаграм на слици 11 објашњава зашто је екситација са фотоном светлости и формирање ексцитованог FADH<sup>-</sup> стања неопходно за репарацију ДНК лезије. Наиме, само ексцитовани FADH<sup>-</sup> каталитички кофактор има довољну енергију и способност да пренесе један електрон на пиримидински димер (А) и тиме започне процес цепања циклобутанског прстена. FADH<sup>-</sup> у основном стању не може да пренесе електрон на CPD димер. После раздвајања димера на пиримидинске мономере, један електрон се враћа назад до FADH<sup>•</sup> (Б) успостављајући FADH<sup>-</sup> кофактор са спареним електронима у HOMO орбитали.



Слика 11. Молекулско орбитални енергетски дијаграм за трансфер електрона између  ${}^1(\text{FADH}^-)^*$  и  $\text{Pyr}<>\text{Pyr}$  фотодимера у основном и ексцитационом стању. А) Егзергони ЕТ са FADH<sup>-</sup>\* на  $\text{Pyr}<>\text{Pyr}$  фотодимер, Б) Ендергони ЕТ са  $\text{Pyr}<>\text{Pyr}$  димера на FADH<sup>-</sup>\*. HOMO (Highest Occupied– највиша заузета), LUMO (Lowest Unoccupied– најнижа празна) и SOMO (Semi-Occupied Molecular Orbital– 1e- заузета молекулска орбитала).

## ЗАКЉУЧАК

У знатној мери су проучени и истражени бројни аспекти функционисања различитих класа ДНК фотолитазе, једног од есенцијалних ензима за већину живих организама, који катализује оправку ДНК лезија насталих услед штетног дејства UV зрачења, штитећи при томе ћелијски геном од мутагених и канцерогених промена, које могу довести и до смрти ћелије/организма. Келнер и Дулбеко открили су постојање фотореактивирајућег ензима независно један од другог још далеке 1949. год., а много година касније, после огромног рада и доприноса од стране великог броја експерименталиста и теоретичара, препознат је огроман значај овог поља истраживања. Нобелови лауреати за хемију 2015. год., Линдал, Санкар и Модрич, награђени су за изучавање и мапирање различитих механизма којима ћелије исправљају оштећену ДНК и тиме чувају генетске информације записане у свом коду. Фундаментална знања како живе ћелије функционишу на молекулском нивоу могу се користити за развој нових анти-канцер третмана и лекова. Тек недавно почела је да се разуме молекуларна комплексности високо софистициране и ефикасне DDR мреже за праћење, сигнализацију и репарацију ДНК оштећења, те стална повезаност и сложена межукомуникација различитих репарационих система и механизма. То

је отворило врата даљим истраживањима у биологији, биохемији, кристалографији, молекулој биохемији, биоенергетици и медицинској хемији, између осталог.

## ABSTRACT

### PHOTOLYASE – MOLECULAR MECHANISM FOR REPAIR OF UV-DAMAGED DNA

Dragan M. POPOVIĆ

Associate Research Professor, Department of Chemistry, University of Belgrade - Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy - National Institute of the Republic of Serbia, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Serbia

Damages in the DNA structure, such as, excision and modification of bases or alternation of sugar-phosphate groups are often caused by UV light, ionizing radiation, toxic and carcinogenic substances, and environmental pollution. To maintain genetic stability, cells protect themselves against these kinds of lesions. Moreover, the main DNA repair processes in prokaryotic and eukaryotic cells are quite similar. Photolyases catalyze the repair of the most common DNA defects caused by UV (200-300 nm) radiation – cyclobutane pyrimidine (CPD) dimers and (6-4)-photoproducts. The DNA repair is achieved by splitting the ring of CPD dimer into pyrimidine monomers in retro-Diels-Alder reaction induced by near UV/ visible blue light (UV/VIS, 300-500 nm). If not repaired the CPD lesions are highly cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic. Molecular mechanism of the enzyme is yet known and pretty well experimentally examined. However, many thermodynamic and kinetic parameters are not easy accessible and could be only obtained by theoretical/computational studies, which results are also discussed here. Beside a general introduction to the photoreactivation mechanism and the structure-function interrelation in the DNA photolyase, this text also addresses a several long-time controversial questions.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] T. Lindahl, Nature 362 (1993) 709–715.
- [2] G. Dianov, T. Lindahl, Curr Biol 4 (1994) 1069–1076.
- [3] A. Sancar, Annu. Rev. Biochem. 65 (1996) 43–81.
- [4] P.J. Pukkila, P. Modrich et al., Genetics 104 (1983) 571–582.
- [5] P.C. Hanawalt, DNA Repair 36 (2015) 2–7.
- [6] S.P. Jackson, J. Bartek, Nat. Rev. 461 (2009) 1071–1078.
- [7] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Cell 144 (2011) 646–674.
- [8] A. Sancar, Chem. Rev. 103 (2003) 2203–2237.
- [9] L.F. Batista, Kaina, B., Meneghini, R., Menck, C. F., Mutation research 681 (2009) 197–208.
- [10] P.J. Aucamp, Photochem Photobiol Sci. 6 (2007) 319–330.
- [11] K. Heil, Pearson, D., Carell, T., Chemical Society reviews 40 (2011) 4271–4278.
- [12] G.P. Pfeifer, You, Y. H., Besaratinia, A., Mutation research 571 (2005) 19–31.
- [13] M. Muller, T. Carell, Curr. Opin. Struct. Biol. 19 (2009) 277–285.
- [14] L.O. Essen, Curr. Opin. Struct. Biol. 16 (2006) 51–59.
- [15] J.I. Lucas-Lledo, M. Lynch, Molecular biology and evolution 26 (2009) 1143–1153.
- [16] I. Chaves, Pokorny, R., Byrdin, M. et al., Annu. Rev. Plant. Biol. 62 (2011) 335–364.

- [17] M. Ahmad, A.R. Cashmore, Nature 366 (1993) 162–166.
- [18] D.S. Hsu, Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R. P., Todo, T., Wei, Y. F., Sancar, A., Biochem-US 35 (1996) 13871–13877.
- [19] V.G. Tagua, M. Pausch, M. Eckel, G. Gutiérrez, A. Miralles-Durán, C. Sanz, A.P. Eslava, R. Pokorny, L.M. Corrochano, A. Batschauer, PNAS 112 (2015) 15130–15135.
- [20] I. Oberpichler, Pierik, A. J., Wesslowski, J. et al., PLoS One 6 (2011) e26775.
- [21] A. Okafuji, Biskup, T., Hitomi, K. et al., DNA repair 9 (2010) 495–505.
- [22] T. Todo, Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T., Ikenaga, M., Science 272 (1996) 109–112.
- [23] S. Weber, BBA 1707 (2005) 1–23.
- [24] A. Kelner, Journal of bacteriology 58 (1949) 511–522.
- [25] R. Dulbecco, Nature 163 (1949) 949.
- [26] G.B. Sancar, Mutation research 451 (2000) 25–37.
- [27] C.S. Rupert, J. Gen. Physiol. 45 (1962) 725–741.
- [28] T. Todo, Takemori, H., Ryo, H., Ihara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Sato, K., Nomura, T., Nature 361 (1993) 371–374.
- [29] C.P. Selby, A. Sancar, Biochem-US 51 (2012) 167–171.
- [30] H.W. Park, Kim, S. T., Sancar, A., Deisenhofer, J., Science 268 (1995) 1866–1872.
- [31] M.G. Rossmann, D. Moras, K.W. Olsen, Nature 250 (1974) 194–199.
- [32] A. Mees, Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A. P. M., Carell, T., Essen, L. O., Science 306 (2004) 1789–1793.
- [33] M.J. Maul, Barends, T. R. M., Glas, A. F., Cryle, M. J., Domratcheva, T., Schneider, S., Schlichting, I., Carell, T., Angew. Chem. Int. Edit. 47 (2008) 10076–10080.
- [34] S. Kiontke, Geisselbrecht, Y., Pokorny, R., Carell, T., Batschauer, A., Essen, L. O., EMBO J. 30 (2011) 4437–4449.
- [35] R. Epple, T. Carell, J Am Chem Soc 121 (1999) 7318–7329.
- [36] C. Aubert, M.H. Vos, P. Mathis, A.P.M. Eker, K. Brettel, Nature 405 (2000) 586–590.
- [37] S.T. Kim, Heelis, P. F., Sancar, A., Biochem-US 31 (1992) 11244–11248.
- [38] M.S. Cheung, I. Daizadeh, A.A. Stuchebrukhov, P.F. Heelis, Biophys. J. 76 (1999) 1241–1249.
- [39] J. Antony, D.M. Medvedev, A.A. Stuchebrukhov, J Am Chem Soc 122 (2000) 1057–1065.
- [40] D.M. Popovic, A. Zmiric, S.D. Zaric, E. W. Knapp, J Am Chem Soc 124 (2002) 3775–3782.
- [41] B.J. Vande Berg, G.B. Sancar, J Biol Chem 273 (1998) 20276–20284.
- [42] K.S. Christine, MacFarlane, A. W., Yang, K., Stanley, R. J., J Biol Chem 277 (2002) 38339–38344.
- [43] D.B. Sanders, Wiest, O., J Am Chem Soc 121 (1999) 5127–5134.
- [44] T. Torizawa, Ueda, T., Kuramitsu, S., Hitomi, K., Todo, T., Iwai, S., Morikawa, K., Shimada, I., J Biol Chem 279 (2004) 32950–32956.
- [45] Y.T. Kao, Tan, C., Song, S. H., Ozturk, N., Li, J., Wang, L., Sancar, A., Zhong, D., J Am Chem Soc 130 (2008) 7695–7701.
- [46] Z. Liu, Tan, C., Guo, X., Kao, Y. T., Li, J., Wang, L., Sancar, A., Zhong, D., PNAS 108 (2011) 14831–14836.
- [47] G. Payne, Heelis, P. F., Rohrs, B. R., Sancar, A., Biochem-US 26 (1987) 7121–7127.
- [48] J. Moldt, Pokorny, R., Orth, C., Linne, U., Geisselbrecht, Y., Marahiel, M. A., Essen, L. O., Batschauer, A., J Biol Chem 284 (2009) 21670–21683.
- [49] C. Aubert, P. Mathis, A.P.M. Eker, K. Brettel, PNAS 96 (1999) 5423–5427.
- [50] B. Giovani, Byrdin, M., Ahmad, M., Brettel, K., Nat Struct Biol 10 (2003) 489–490.
- [51] I.H. Kavakli, Sancar, A., Biochem-US 43 (2004) 15103–15110.
- [52] M. Byrdin, A.P.M. Eker, M.H. Vos, K. Brettel, PNAS 100 (2003) 8676–8681.
- [53] M. Byrdin, V. Sartor, A.P.M. Eker, M.H. Vos, C. Aubert, K. Brettel, P. Mathis, BBA 1655 (2004) 64–70.
- [54] J. Li, Liu, Z. Y., Tan, C., Guo, X. M., Wang, L. J., Sancar, A., Zhong, D. P., Nature 466 (2010) 887.
- [55] A. Stuchebrukhov, PNAS 108 (2011) 19445–19446.



**АЛЕКСАНДРА СТЕФАНОВИЋ**, студент докторских академских студија из биохемије  
 Катедра за биохемију, Универзитет у Београду - Хемијски факултет, Студентски трг 12-16,  
 Београд, Република Србија.  
 Е-пошта: [astefanovic496@gmail.com](mailto:astefanovic496@gmail.com)

## ИЗМЕЋУ ЉУБАВИ И МРЖЊЕ: КАРЦИНОМ И РЕАКТИВНЕ ВРСТЕ UV-ИНДУКОВАНИХ ДНК ЛЕЗИЈА

Од зачећа до смрти циљ организма је одржање хомеостазе. То је динамичка равнотежа у којој организм функционише као савршено усклађена машина. Када ова машина изађе из свог равнотежног стања, под утицајем промена у спољашњој и/или унутрашњој средини, неутралисање ових промена може бити успешно, када организм поново успоставља хомеостазу, или безуспешно, када долази до развоја патолошког стања. Болести срца и канцери су два водећа узрока смрти у свету. Карцином представља патолошко стање које у основи карактерише неконтролисана пролиферација (умножавање) ћелија. У оквиру овог текста видећемо како хемијски реактивне врсте могу бити и пријатељи и непријатељи развитка карцинома, тј. у борби организма да спречи ову патологију. Ова игра мачке и миша се

одиграва свакодневно у свим нашим ћелијама и леп је пример за неке од механизма одржања хомеостазе.

### УВОД

Наше ћелије и макромолекули у њима се свакодневно сусрећу са великим бројем хемијски веома реактивних врста. У две главне групе таквих супстанци (атоми, молекули, јони) убрајамо реактивне врсте пореклом од молекулског кисеоника (ROS; енгл. *Reactive oxygen species*) и реактивне врсте пореклом од азота (RNS; енгл. *Reactive nitrogen species*). Ове врсте могу бити радикалског и не-радикалског типа (Табела 1).