

Abstrakt

DNA jako primární nositelka genetické informace zaručuje organismům žít, růst, rozvíjet se a množit. Tato nejpodstatnější molekula v buňce však podléhá každou chvíli rozličným poškozením. Pokud není opraveno, buňka a organismus nakonec podlehnou nevyhnutelné destrukci. Jedno z nejzávažnějších poškození je meziřetězcové kovalentní spojení DNA vycházející z abazického místa (Ap-ICL, z angl. Abasic site interstrand crosslink). Ap-ICL se tvoří spontánně z abazického místa kovalentní vazbou s adeninem na opačném řetězci. Nedostatek informací o opravných mechanismech, vlivu lokální sekvence a jeho stabilitě vede k otázkám ohledně osudu, toxicity a výskytu těchto lézí v buňkách.

Evoluce vytvořila několik mechanismů jak tato a další jiná poškození opravit a zajistit organismu jeho přežití. Nedávno objevená dráha známa pro opravu Ap-ICL dostala název po glykosylase zodpovědné za odstranění Ap-ICL. DNA glykosylasa NEIL3 je k Ap-ICL přivolána ubiquitylací DNA helikasy, která je součástí komplexu zodpovědného za replikaci DNA. Glykosylasa NEIL3 obsahuje několik domén s motivem zinkového prstu, které se vážou k poškozené DNA a zajišťují její katalytickou funkci. Momentálně není znám molekulární mechanismus opravného procesu glykosylasy NEIL3.

S cílem odpovědět na zmíněné neznámé byla v předložené práci zkoumána *in vitro* rychlost vzniku, výtěžek a stabilita Ap-ICL v závislosti na lokální sekvenci. Experimenty odhalily vliv různých bází v blízkosti abazického místa na tvorbu ICL. Sekvence bohaté na A a T páry podléhají tvorbě Ap-ICL rychleji oproti sekvencím bohatých na G a C páry. Překvapivě se však Ap-ICL vytvoří z abazického místa prakticky nezávisle na okolní sekvenci, avšak s odlišnou rychlostí a výtěžkem.

V druhé části práce byly zkoumány mechanismy rozpoznání nativního DNA substrátu glykosylasou NEIL3. Byla vyřešena struktura dvou GRF domén a katalytické Nei domény z NEIL3. Prostřednictvím strukturních a experimentálních dat práce odhaluje molekulární detaily a preferenci interakce GRF domén s DNA-replikační vidličkou. Nakonec získaná krystalová struktura Nei katalytické domény s DNA-replikačním meziproduktem umožnila návrh mechanismu rozpoznání dvou zastavených replikačních vidlic glykosylasou NEIL3.

Klíčová slova: DNA poškození, abazické místo, neenzymatická kinetika, oprava DNA, NEIL3, GRF