

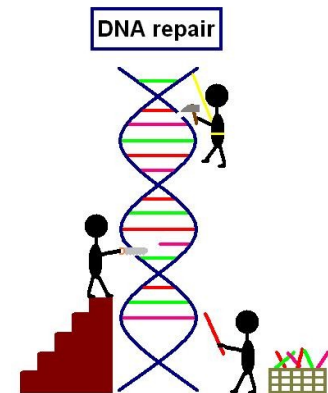
Molekulární mechanismy opravy DNA

aneb starejme se o svoji DNA, nevíme jak
dlouho nám vydrží !!!!!

Lumir Krejci

Laboratory of Recombination and DNA Repair

Department of Biology &
National Centre for Biomolecular Research



Jaký mechanismus se podílí
na opravě dvouřetězcových
zlomů?

Pojmy

mutace - definice a principy

typy genových mutací

mutagen

mechanismy opravy DNA - BER;NER; MMR

onemocnění související s opravou DNA

epigentika

Proč to studejme?



Typy mutací

Genové (bodové)
mutace

Chromozomové (strukturní
aberrace chromozomů)

Genomové (numerické aberrace
chromozomů)

Euploidie

Aneuploidie

Poškození DNA - genové mutace

Tab. 9. Důsledky mutací strukturálních genů.

a) substituce bází

Mutace mění smysl kodonu:

DNA: CAT → CTT

RNA: GUA → GAA

Protein: Val → Glu

Mutace nesmyslná:

DNA: ATG → ATC

RNA: UAC → UAG

Protein: Tyr → stop

Tichá mutace:

DNA: TGA → TGG

RNA: ACU → ACC

Protein: Thr → Thr

b) delece nebo inserce páru bází

Posunové mutace (inzerce):

DNA: TAC TTC AAA CTG → TAC GTT CAA ACT G

RNA: AUG AAG UUU GAC → AUG CAA GUU UGA C

Protein: Met-Lys-Phe-Asp → Met-Gln-Val-stop

Posunové mutace (delece):

DNA: TAC TTC AAA CTG → TAC TCA AAC TG

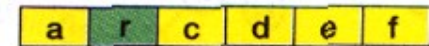
RNA: AUG AAG UUU GAC → AUG AGU UUG AC

Protein: Met-Lys-Phe-Asp → Met-Ser-Leu-

vlákno standardní DNA



substituce



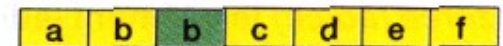
transpozice



inzerce



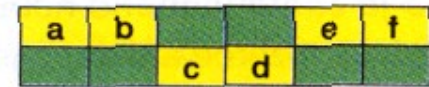
duplikace



delece



inverze

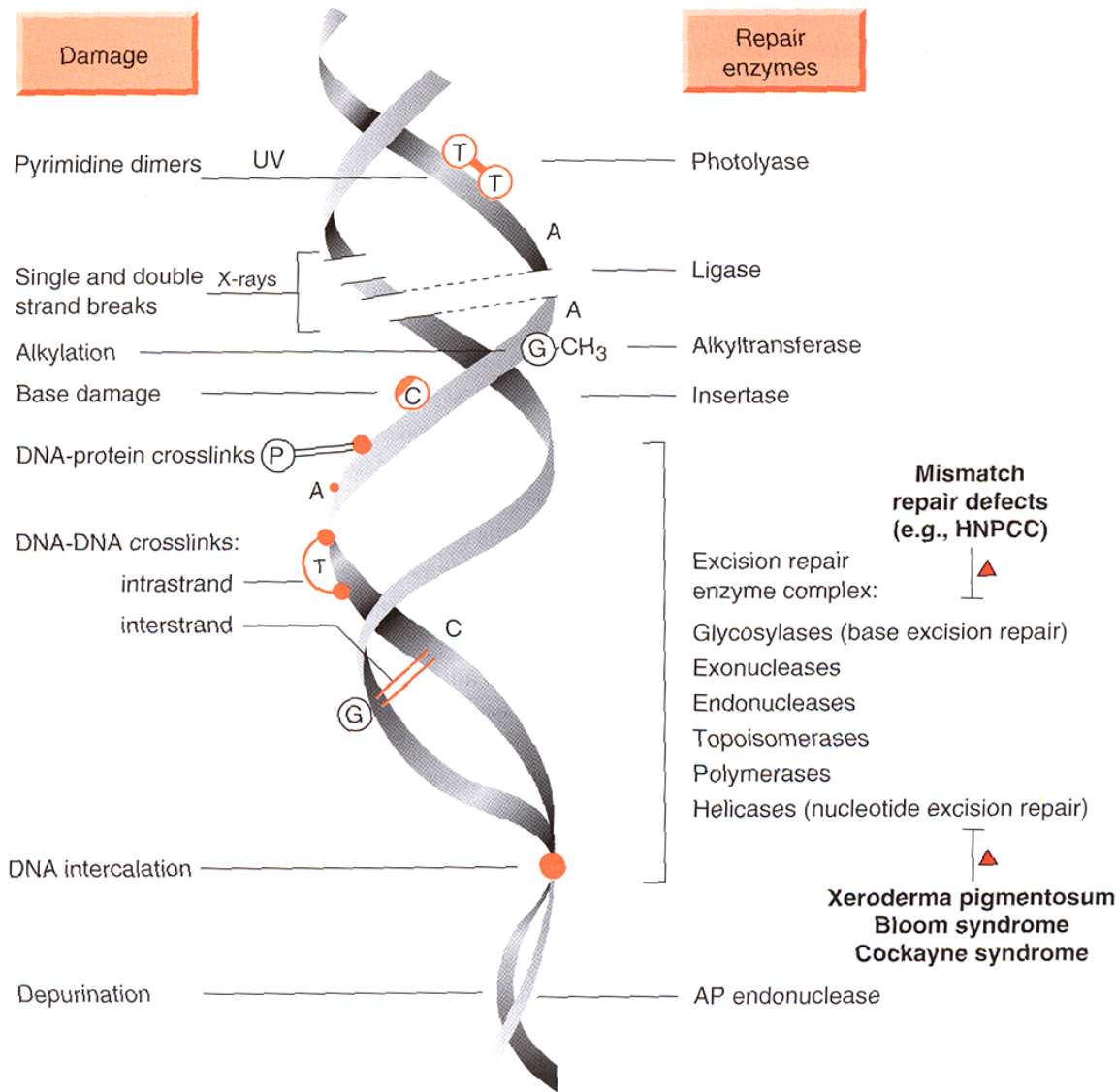


včlenění analogu baze



Nečas a kol., 2000

Typy poškození DNA and spontánní změny



Vnější zdroje

UV (sunlight)
Pollution (hydrocarbons)

Smoking
Foodstuffs

Radiotherapy
Ionizing Radiation
X-rays

Chemotherapy
(Alkylating agents)
Cisplatin
Mitomycin C
Cyclophosphamide
Psoralen
Melphalan

Vnitřní zdroje

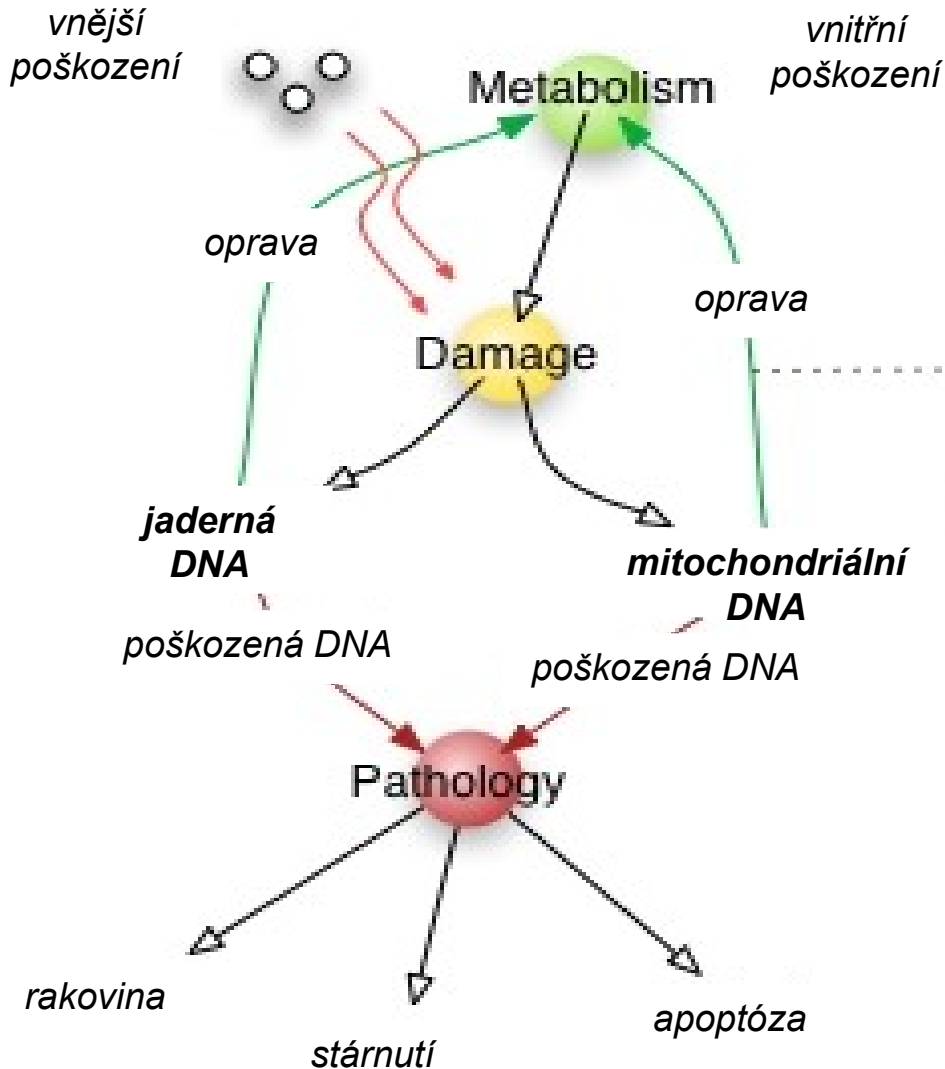
Oxidative damage by free radicals
(oxygen metabolism)
Replicative errors
Spontaneous alterations in DNA
Alkylating agents

Rozsah poškození DNA

- ztráta báze – 26,000
- deaminace cytosinu – 1 000
- alkylace báze – x 10 000
- dimerizace pyrimidínů – 50 000
- ssDNA zlomy – 100,000

Celkem ~ 500 000 poškození/den/buňku

Rovnováha: poškození-oprava



zdravá buňka

rychlost poškození = rychlost opravy

až 500.000
poškození
DNA v buňce
za den

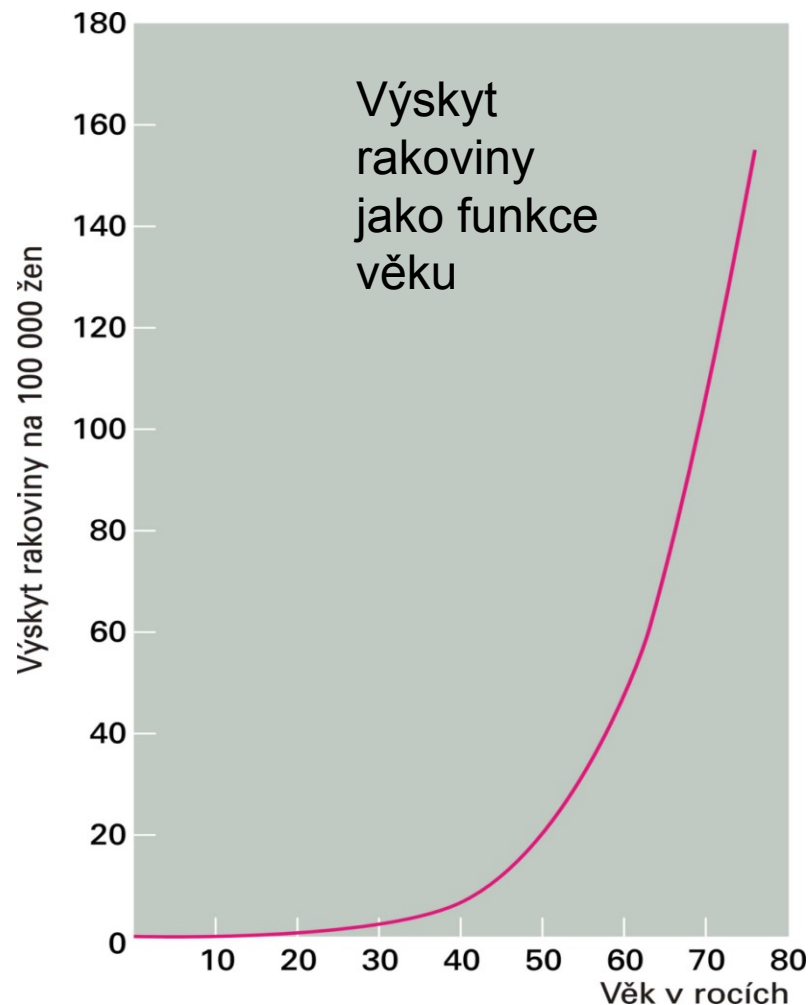
nemocná buňka

rychlost poškození > rychlost opravy

Mutace a rakovina

V lidském těle za život -
 10^{16} buněčných dělení

V prostředí bez mutagenů
 10^{-6} pravděpodobnost
vzniku mutace na buněčné
dělení a gen, takže za
život **10^{10}** mutací na každý
gen



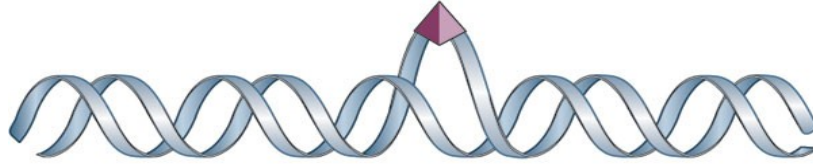
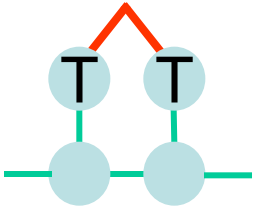
© Espero Publishing, s.r.o.

!!! 1 mutace nestačí; většina mutací je opravena !!!

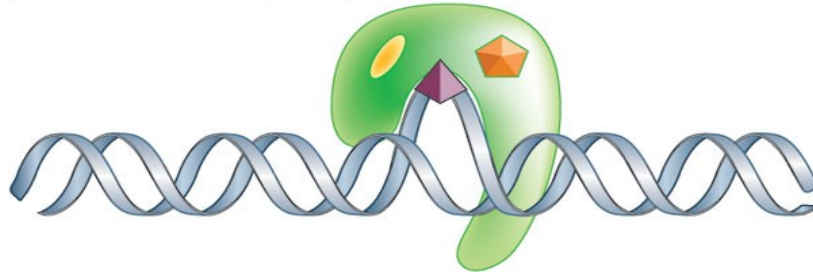
DNA Repair Pathways

- 1. Direct reversals**
- 2. Excision repair**
 - Base Excision Repair (BER)
 - Nucleotide Excision Repair (NER)
- 3. Mismatch repair (MMR)**
 - replication errors
- 4. Recombinational repair (HR and NHEJ)**
 - multiple pathways
 - double strand breaks and interstrand cross-links
- 5. Tolerance mechanisms**
 - lesion bypass (TLS)
 - recombination

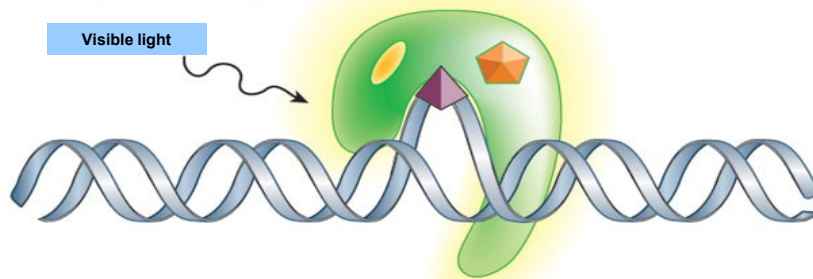
Pyrimidine dimer in UV-exposed DNA



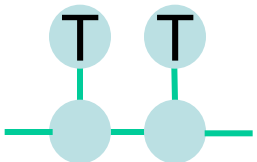
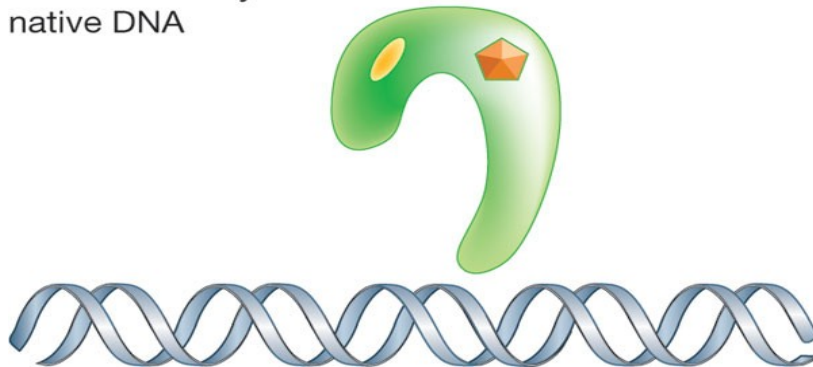
Complex of DNA with photoreactivating enzyme



Absorption of light (>300 nm)



Release of enzyme to restore native DNA



Oprava přímou přeměnou - fotoreaktivace

1) Rozeznání a přímá oprava chybného místa

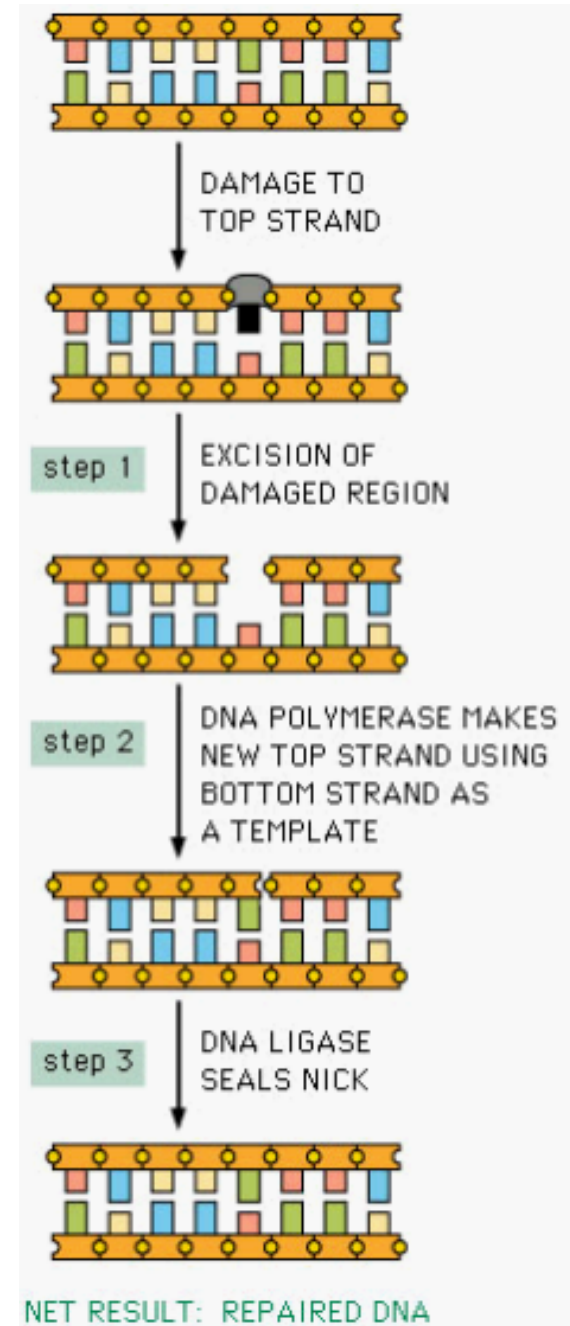
(rozpoznává pyrimidinové dimery)

Base Excision Repair (BER)

- 1) Rozeznání a odstranění chybného místa
- 2) Vyplnění mezery
- 3) Spojení řetězce DNA

Body 2-3 téměř stejné u různých typů oprav, v bodu 1 jsou u různých oprav zúčastněny různé proteiny

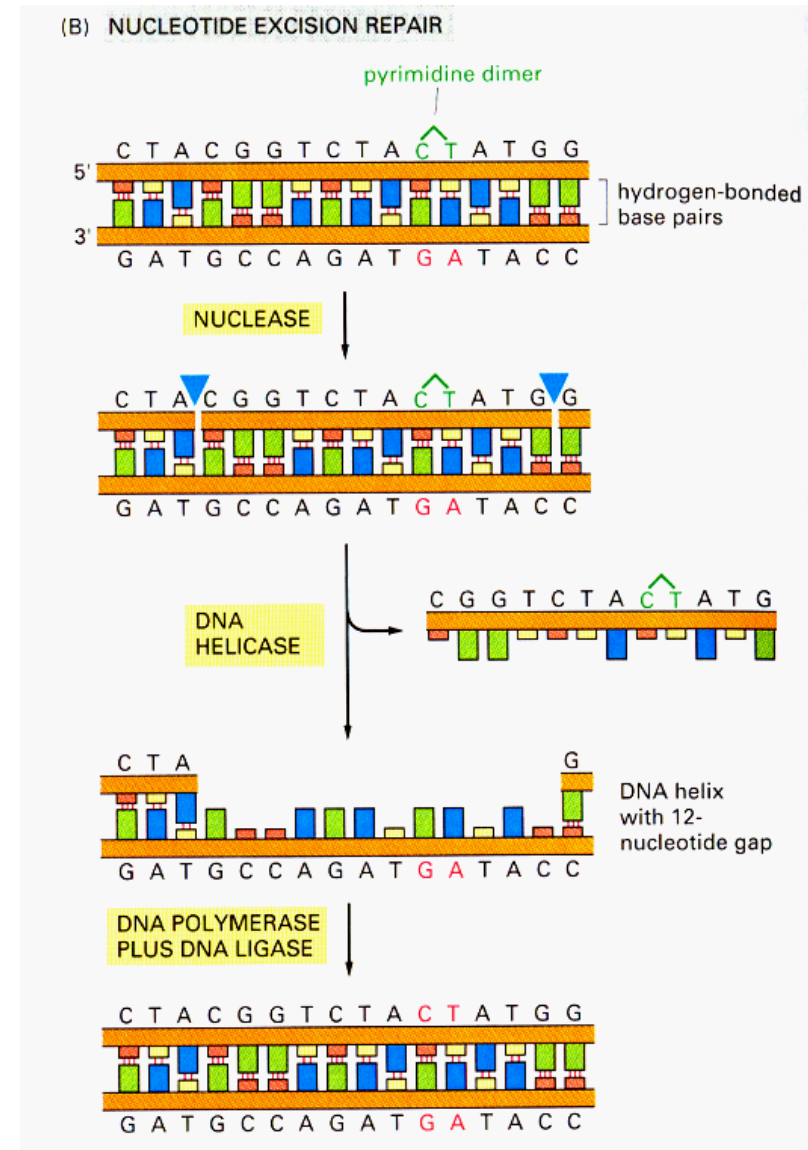
Oprava deaminace, oxidativní a jiné malé poškození báze



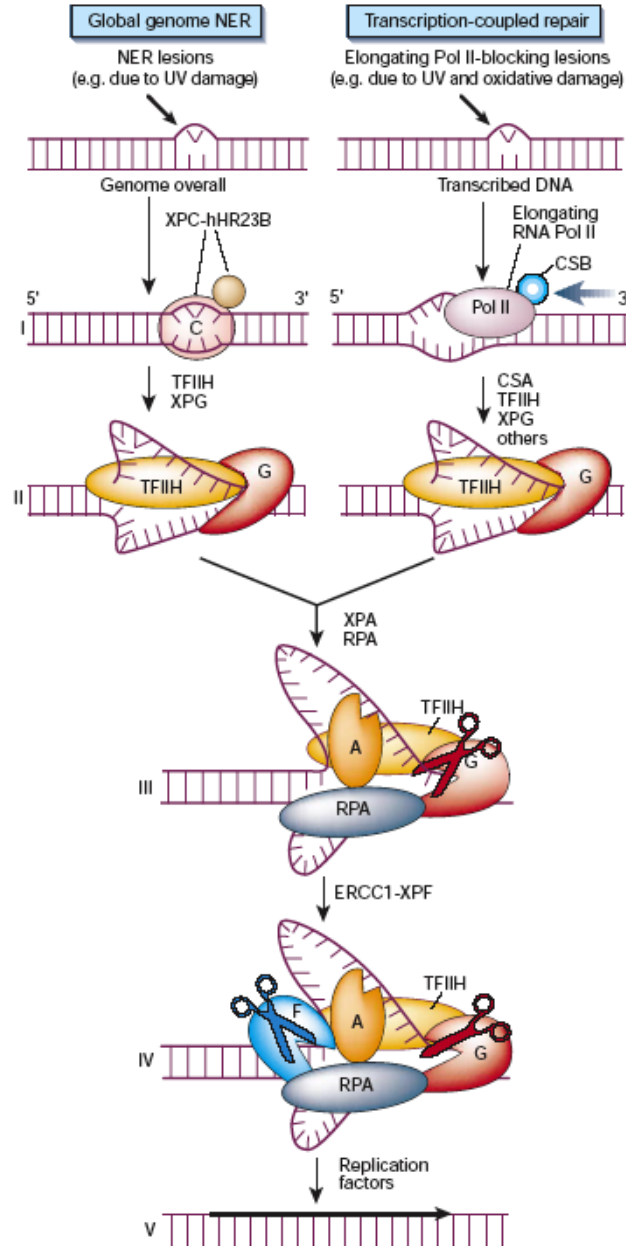
Nucleotide Excision Repair

1. Rozpoznání **proteinovými faktory**
2. Vystřížení postiženého místa i s okolím v obou směrech (**nukleáza**).
3. Rozmotání DNA - bublina (**DNA-helikáza**)
4. Syntéza na základě komplementárního vlákna (**DNA polymeráza δ a ϵ**)
5. Spojení **DNA ligázou**

Oprava dimerů, croslinkované DNA a dalších látek narušujících helix



Nucleotide Excision Repair



CSA & CSB - XPC not required

E. coli

5' incision is 8 nuc. from lesion
3' incision is 4 nuc. from lesion

Mammals

5' incision is 22 nuc. from lesion
3' incision is 6 nuc. from lesion

Poruchy NER u lidí

Xeroderma Pigmentosum

- Occurrence: 1-4 per million population
- Genetic: autosomal recessive, seven genes (XPA-G)
- Disorder: multiple skin disorders; malignancies of the skin; neurological and ocular abnormalities



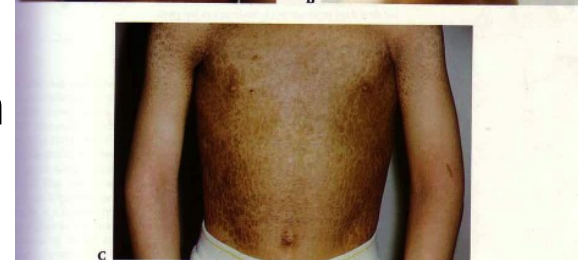
Cockayne's Syndrome

- Occurrence: 1 per million population
- Genetic: autosomal recessive, genes (XPA, B, D & G)
- Disorder: arrested development, mental retardation, dwarfism, deafness, optic atrophy, intracranial calcifications; (no increased risk of cancer)



Trichothiodystrophy

- Occurrence: 1-2 per million population
- Genetic: autosomal recessive, (TTDA, XPB a D)
- Disorder: sulfur deficient brittle hair, mental and growth retardation, peculiar face with receding chin, ichthyosis; (no increased cancer risk)



Oprava chybného párování (Mismatch Repair)

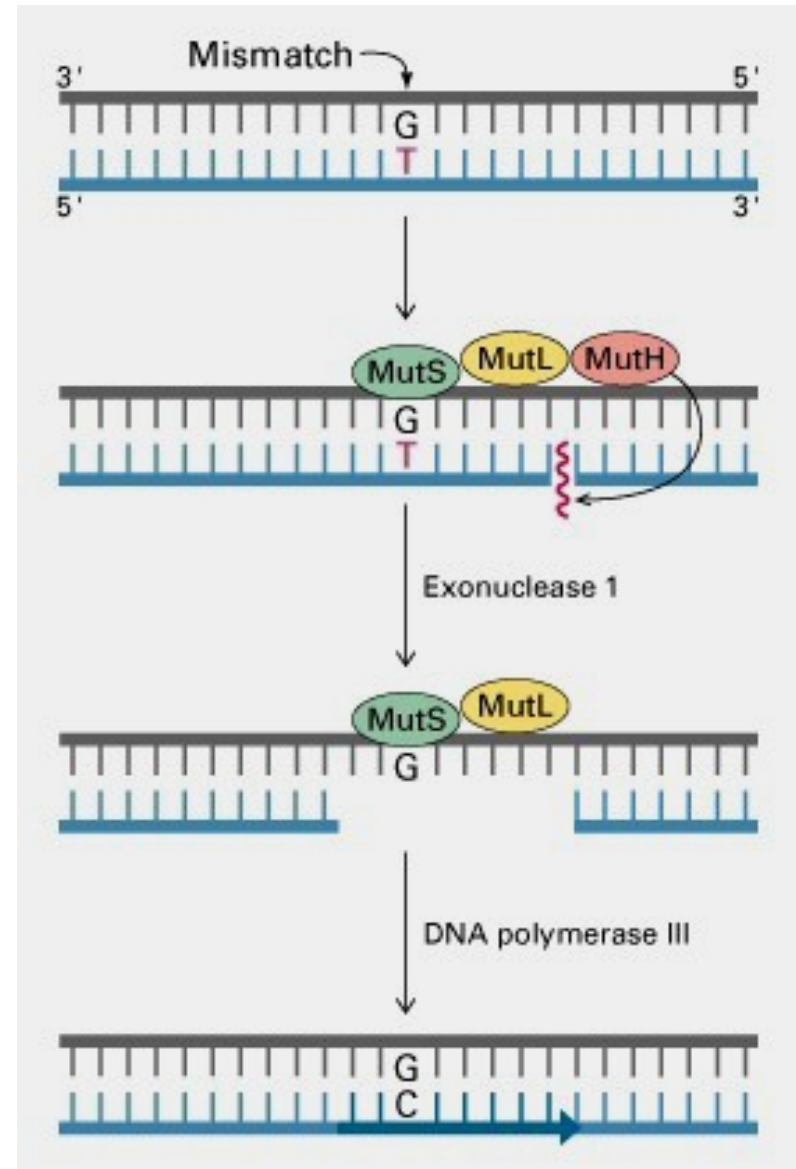
Mechanismus pro zajištění přesnosti replikace

1. Párování bází	10^{-1} to 10^{-2}
2. DNA polymerázy - selekce báze - autokorekce	10^{-5} to 10^{-6}
3. Další proteiny	10^{-7}
4. Oprava chybného párování	10^{-10}

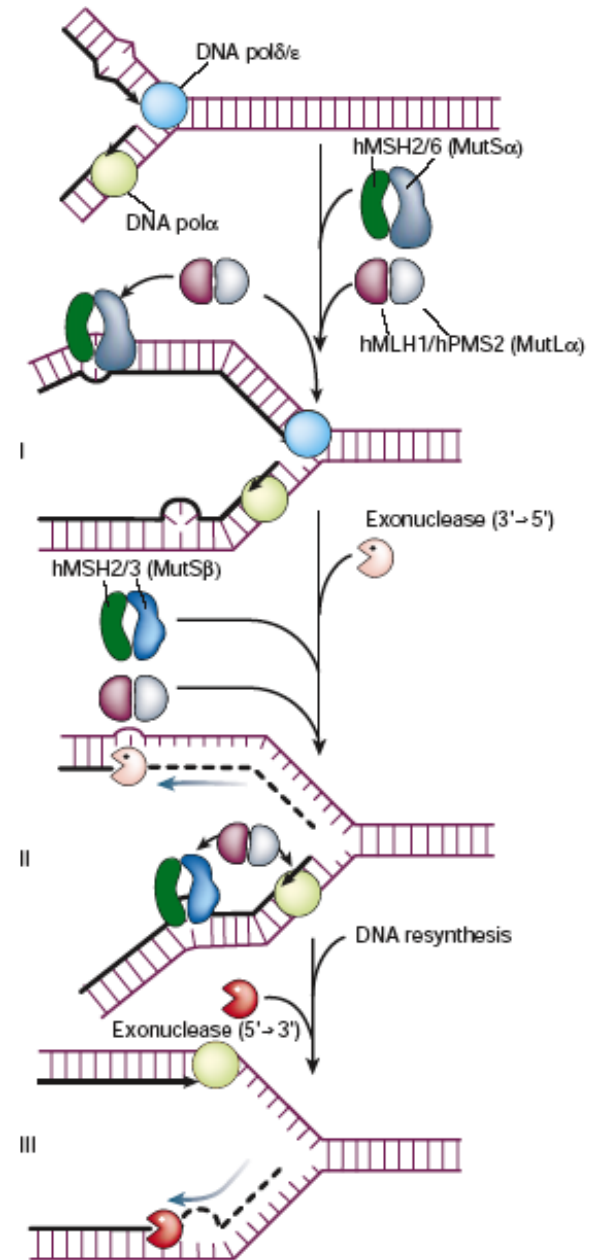
Further reading: A. Bellacosa, Cell Death and Differentiation 8, 1076 (2001)
M. J. Schofield & P. Hsieh, Ann. Rev. Microbiol. 57, 579 (2003)

Mismatch Repair

- 1) MutS protein nasedá s MutL na špatně zařazenou bázi
- 2) Aktivace MutH, který vytvoří zlom v nově vznikajícím řetězci.
- 3) Takto „označený“ řetězec je vyštěpen **exonukleázou**, resyntetizován **DNA polymerázou** a spojen **DNA ligázou**.



Mismatch Repair



Mutace v genech pro Mismatch Repair a Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer (HNPCC)

- Mutace v MMR u 70% rodin
- MLH1 (50%), MSH2 (40%)
- Minoritní role pro MSH6, PMS1, PMS2

- Výskyt v populaci 1:2851 (15-74 let)
- 18% případů pod 45 let
- 28% případů pod 30 let

Rekombinační DNA oprava

Typ poškození:

1. Dvouřetězcové zlomy
2. Interstrandové cross-linky

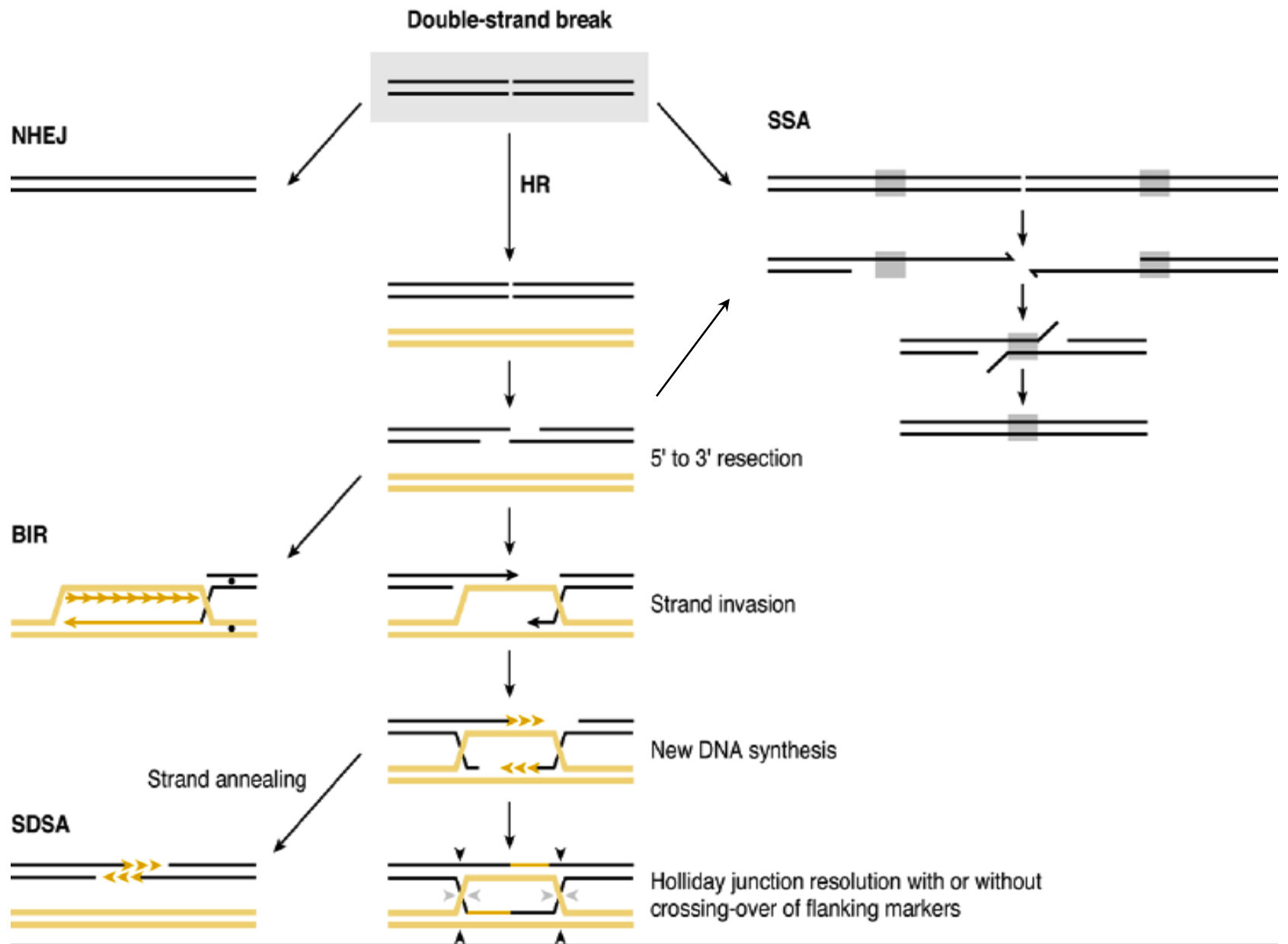
Dvouřetězcové zlomy v DNA

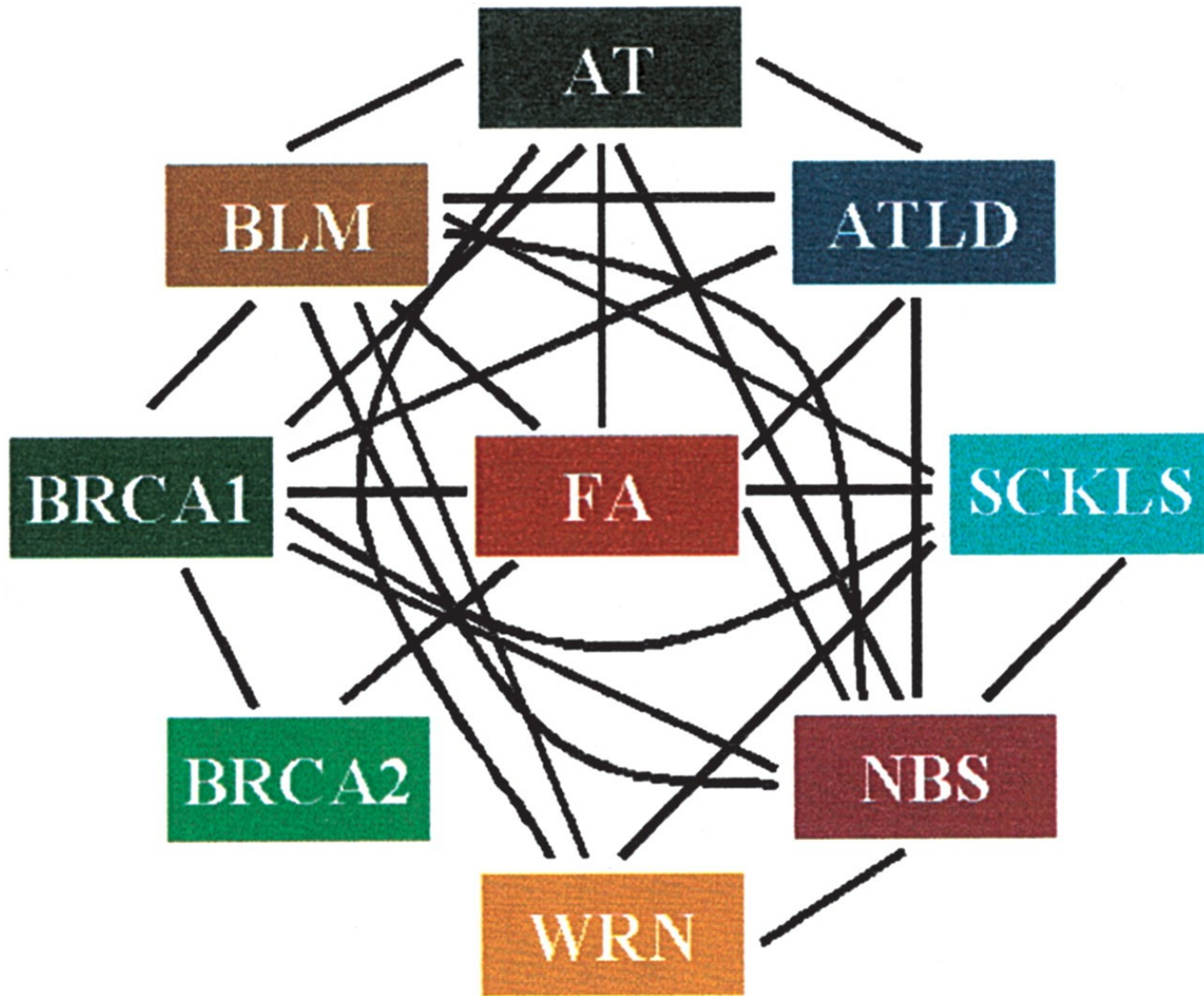
Vznik:

- **Indukované radiací & chemikáliemi**
- **Během replikace poškozené DNA**
- **Slouží k iniciaci meiotické rekombinaci**
- **Součást imunitní odpovědi**

Neschopnost opravy:

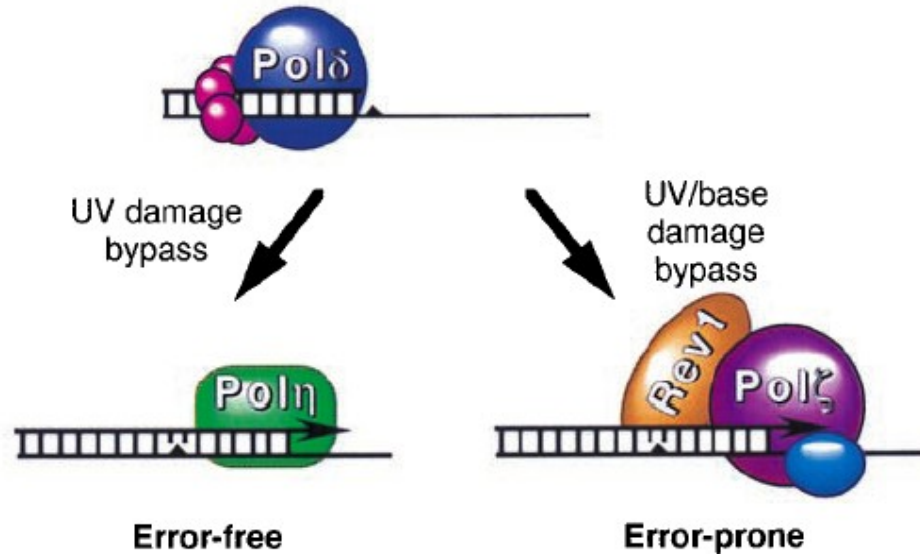
- **Buněčná smrt**
- **Chromosomální aberace**
- **Meiotická aneuploidie**
- **Immuno-deficience**





Translézní DNA Polymerázy

S. cerevisiae



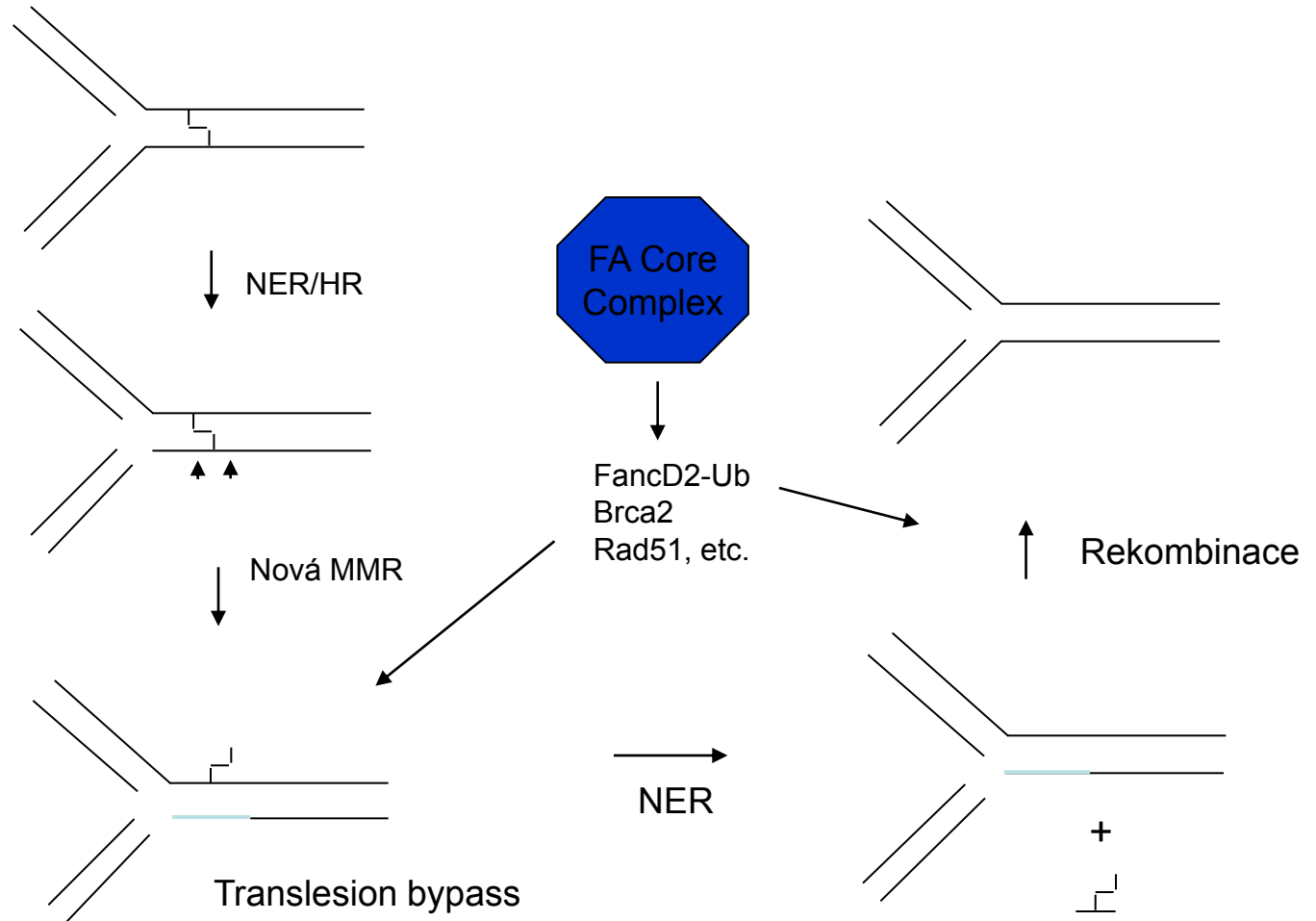
Pol eta

- inserts adenosines opposite TT dimers
- in general has low fidelity
- low processivity
- may be error-prone with other lesions
- Pol eta is a product of the XPV gene

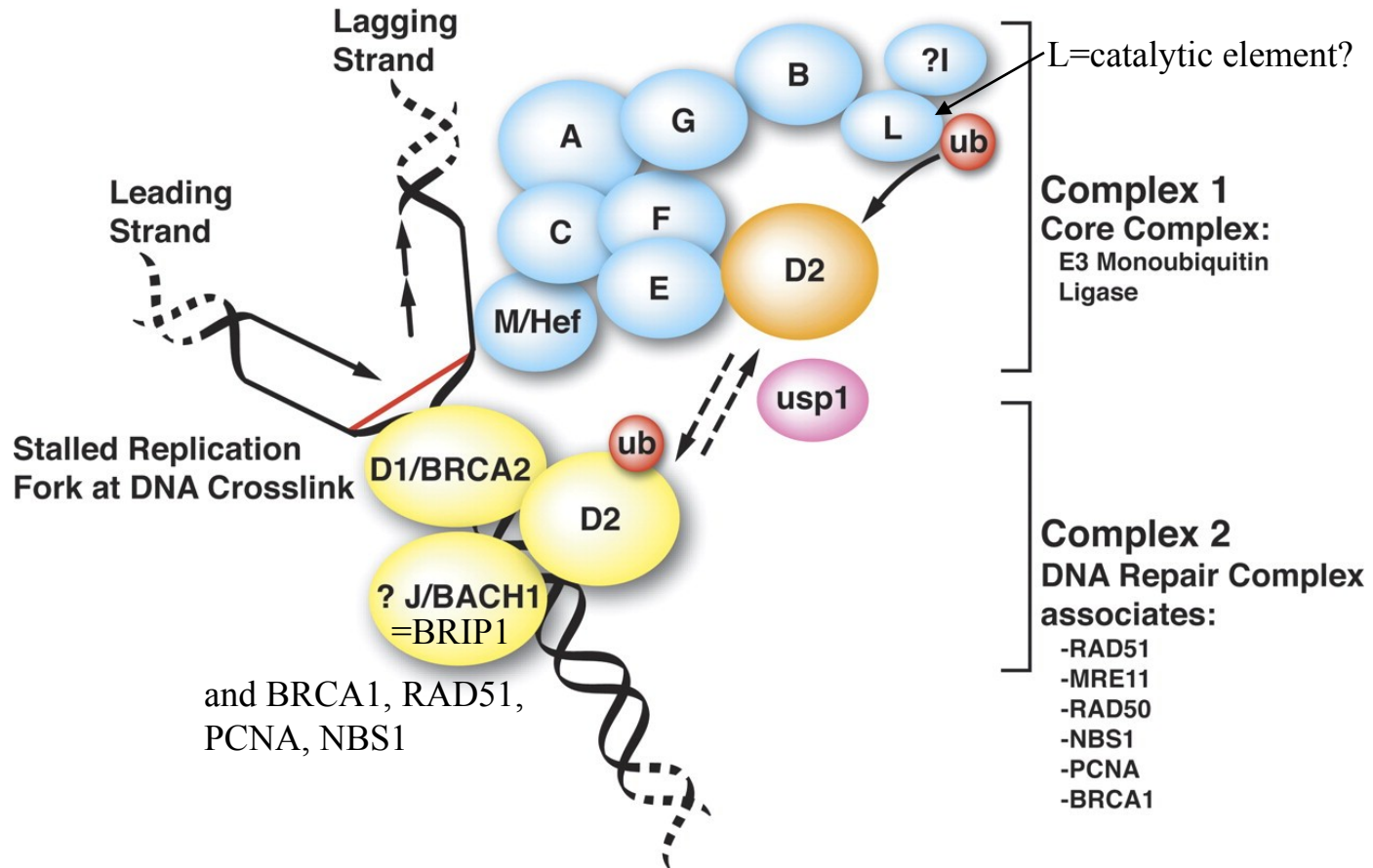
Pol zeta and Rev 1

- Rev 1 inserts random bases opposite dimer
- Pol zeta extends bypass by a few bases
- Both polymerases have low fidelity and low processivity

Model opravy ICL (Interstrand CrossLinks)



Schematic interaction of the FA pathway



Richard D. Kennedy et al. *Genes Dev.* 2005; 19: 2925-2940



Fanconi's Anemia

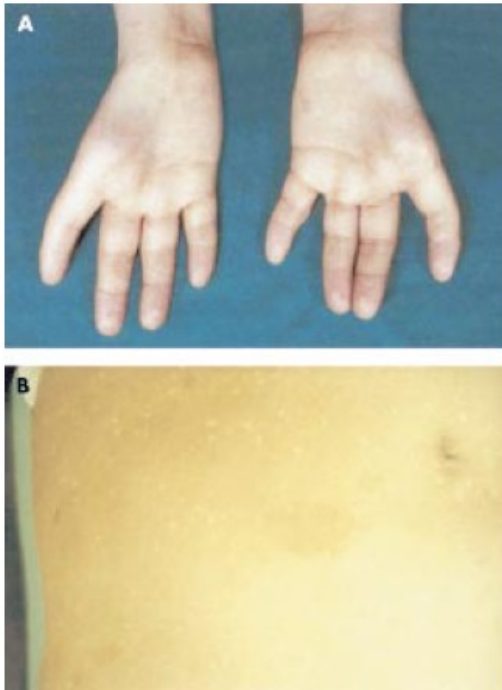


Figure 1 (A) Typical radial ray abnormalities and (B) café au lait patches and hypopigmentation, all common features in FA.



Figure 2 (A, B) A 3½ year old FA child showing radial ray abnormalities. Height and head circumference are both below the 3rd centile.

Congenital abnormalities

- skeletal
- skin pigmentation
- short stature
- male genital
- mental retardation
- cardiac abnormalities
- hearing

Cancer

- myeloid leukemia
- solid tumors

15 genes in FA

BRCA2 is deficient in FA-D1

Review: Tischkowitz & Hodgson,
J. Med. Genet. 40, 1 (2003)

Souhrn DNA oprav

<u>Dráha</u>	<u>Error-free</u>	<u>Error-</u>
Prone Prima přeměna	+	
NER	+	
BER	+	
HR	+	
SSA		+
NHEJ		+
MMR	+	
Lesion bypass	+	+

Epigenetické modifikace DNA

Nejenom samotná DNA ale i chromatin ovlivňují geny a jejich exprese.

Epigenetika - mitoticky a meioticky děděné změny genové exprese, ke kterým dochází beze změny primární genetické informace - strukturní a chemické modifikace chromatinu.

Modifikace DNA - adice chemických skupin - metylace cytosinu-
inaktivace

Modifikace histonů - acetylace a metylace

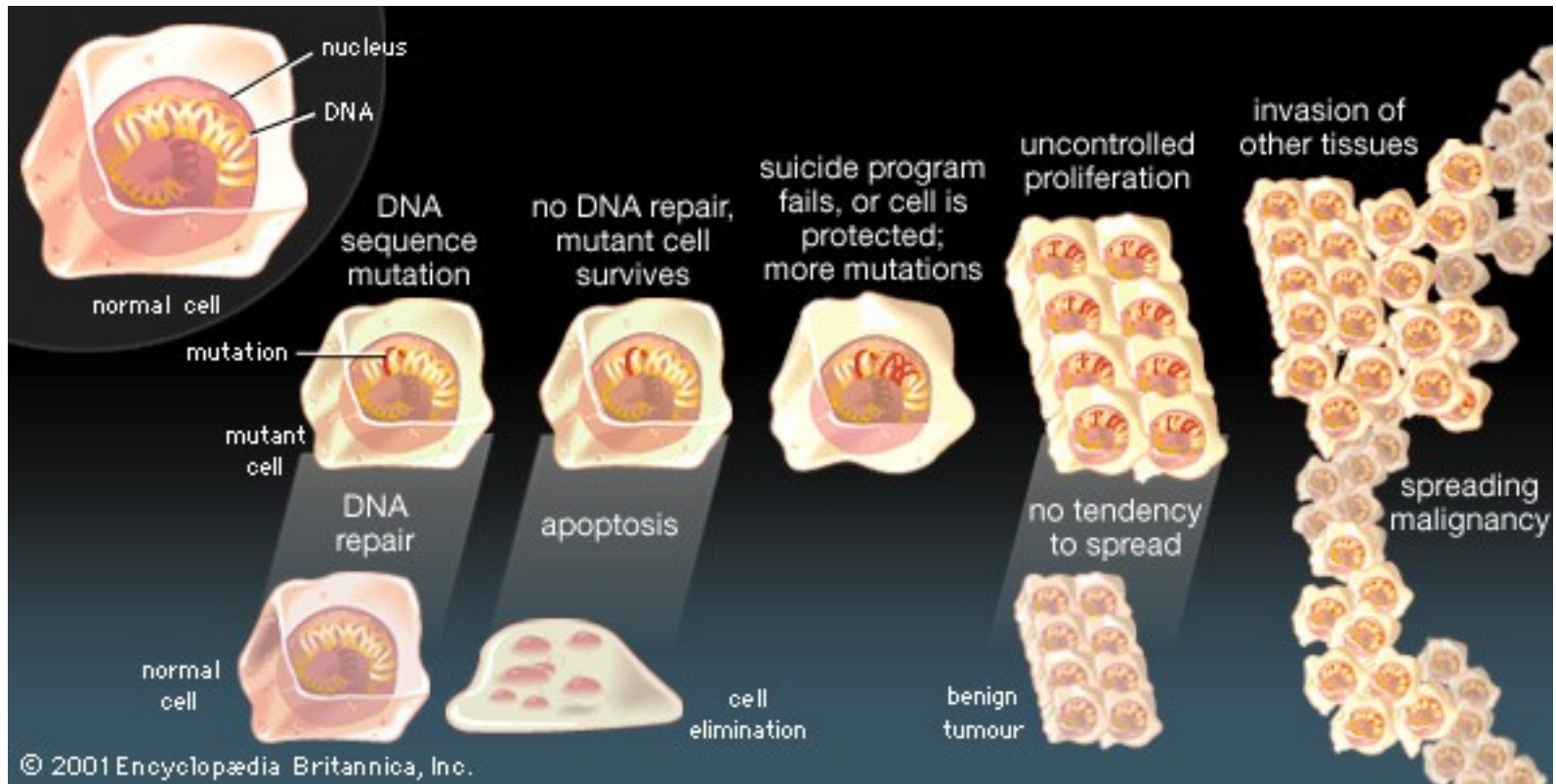
Epigenetika a rakovina

Celková hypometylace DNA - jev provázející nádorovou chromozomální nestabilitu, oncogeny

Hypermetylace DNA a hypoacetylace chromatinu tumor-supresorových genů (RB1) - nádorová transformace

Poruchy parentálního imprintingu - aktivace spící alely nebo inaktivace normálně funkční alely

Mutace and rakovina



Děkuji za pozornost