

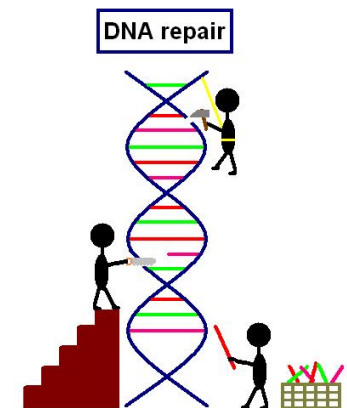
Molekulární mechanismy opravy DNA

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 strukturních genů.

a) substituce bazí

Mutace měnící 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 bazí

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



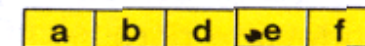
inzerce



duplikace



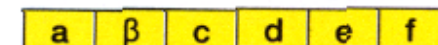
delece



inverze

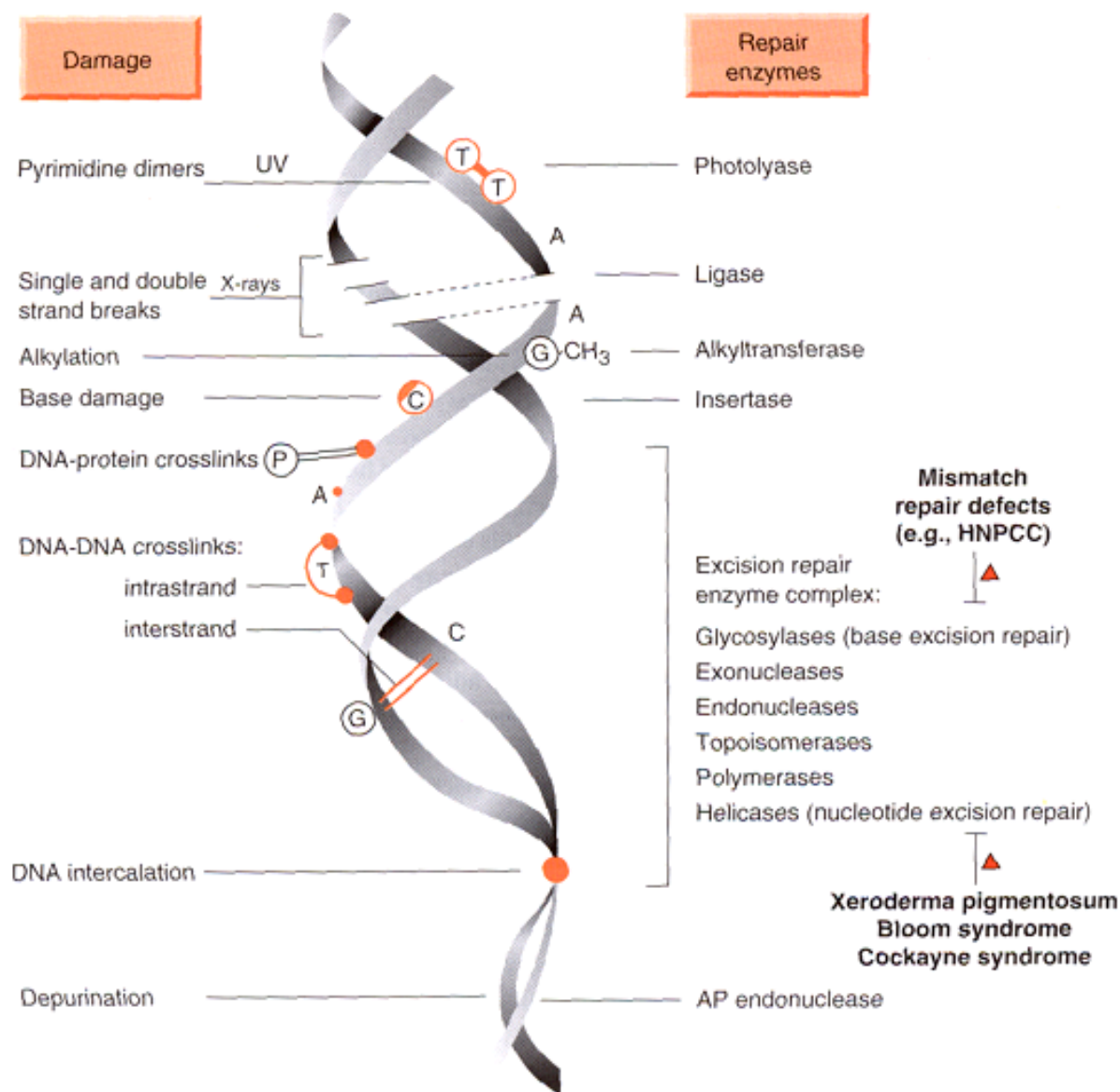


včlenění analogu baze



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

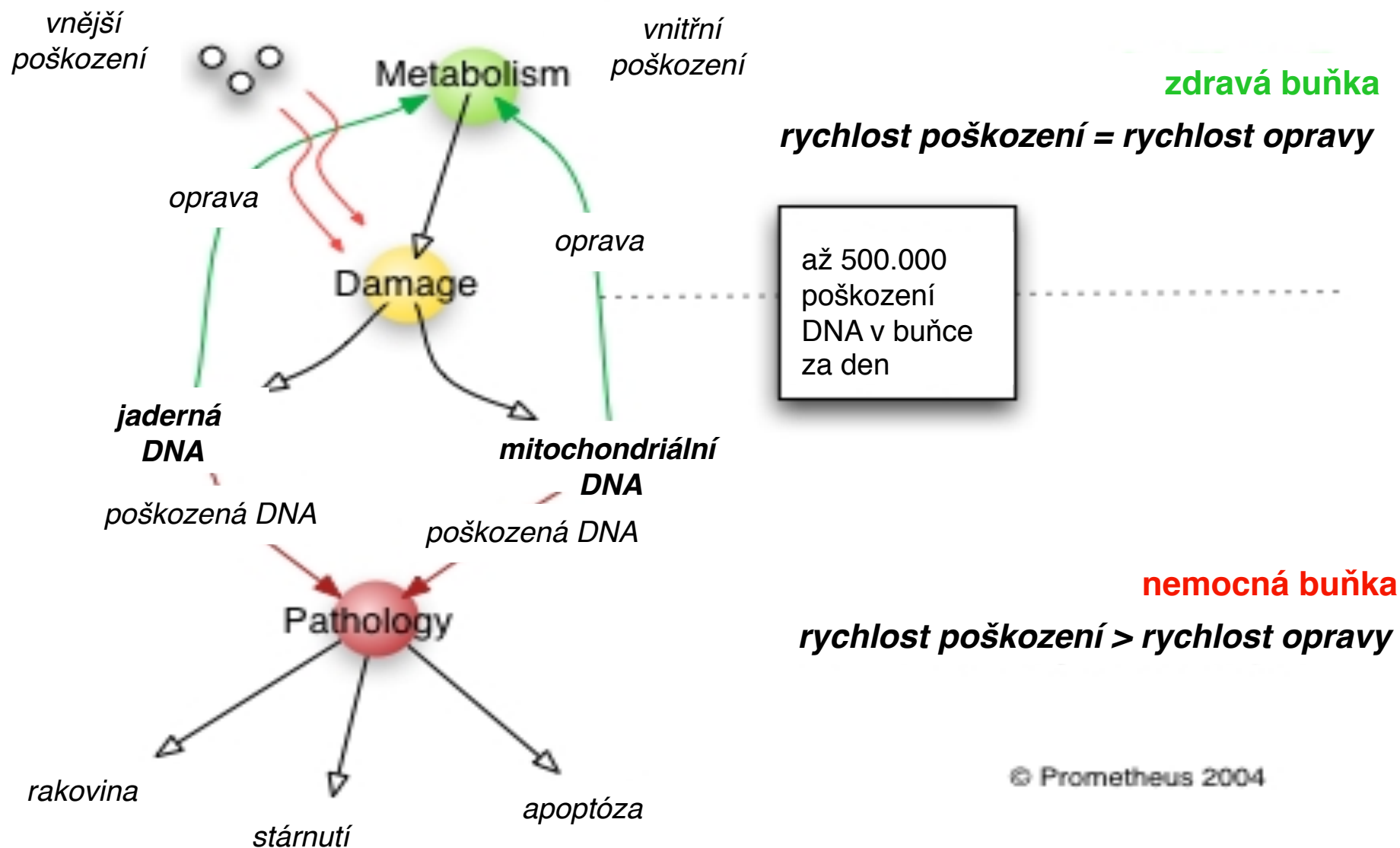
Oxidative damage by free radicals
(oxygen metabolism)
Replicative errors
Spontaneous alterations in DNA
Alkylating agents

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

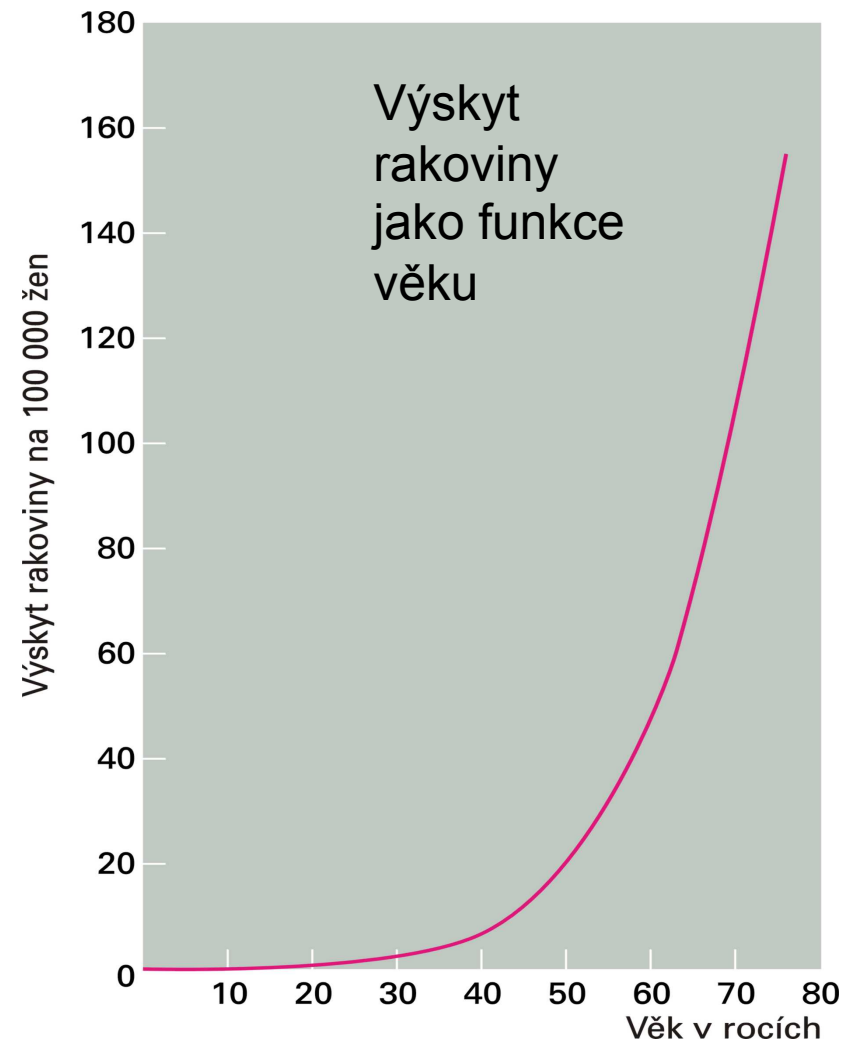
Rovnováha: poškození-oprava



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



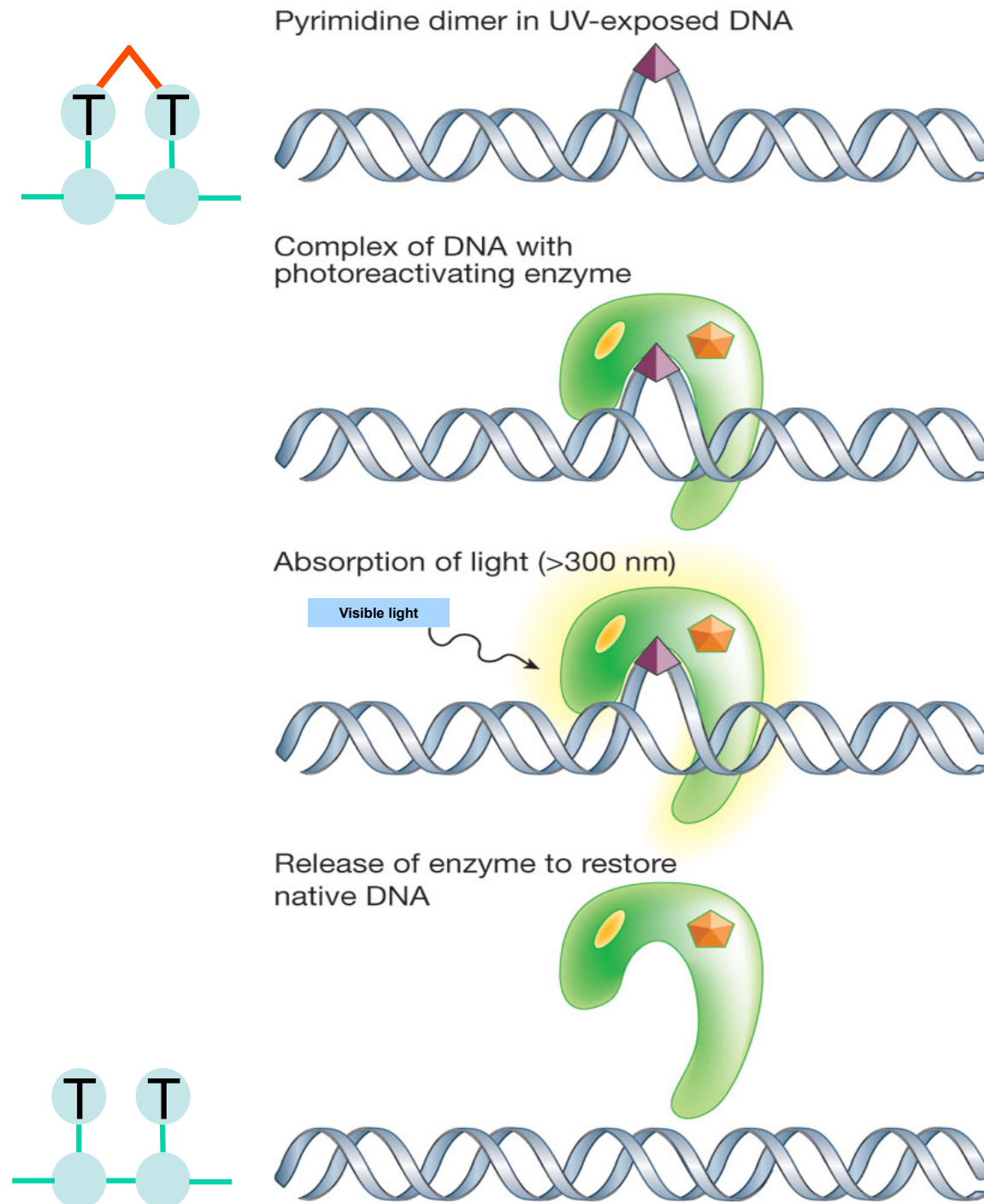
© Espero Publishing, s.r.o.

!!! 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

Oprava přímou přeměnou - fotoreaktivace



1) Rozeznání a přímá oprava chybného místa

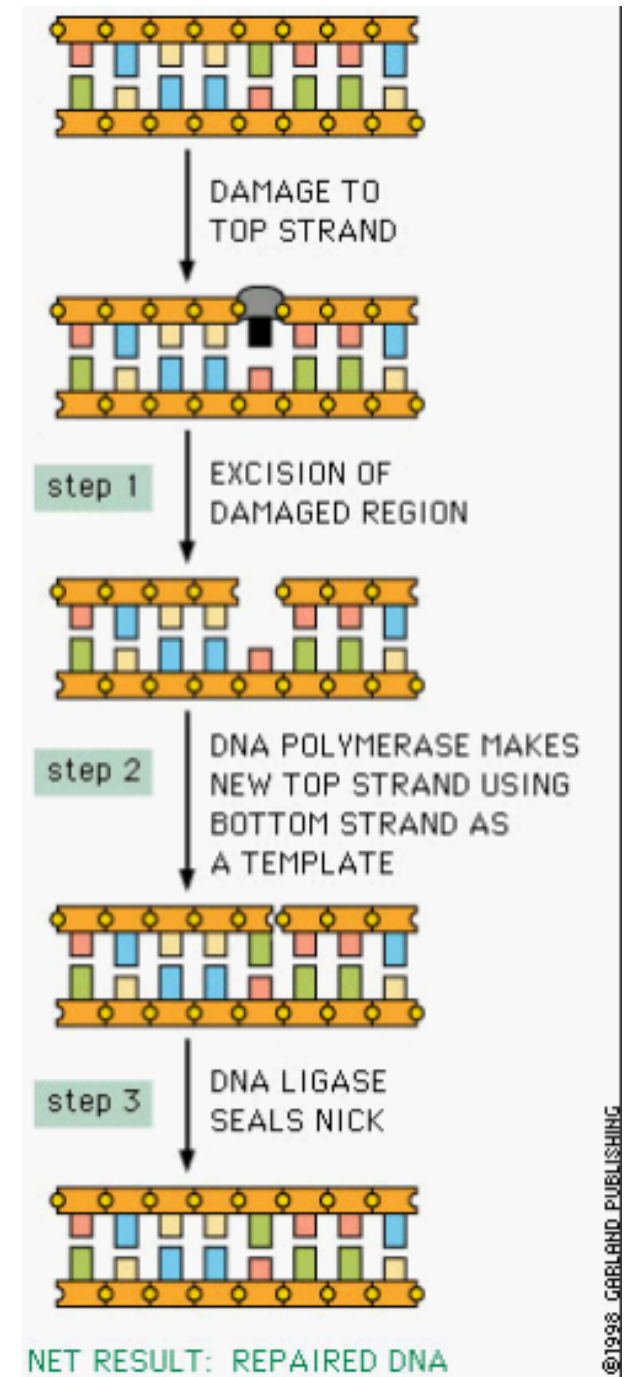
(rozpoznává pyrimidinové dimery)

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

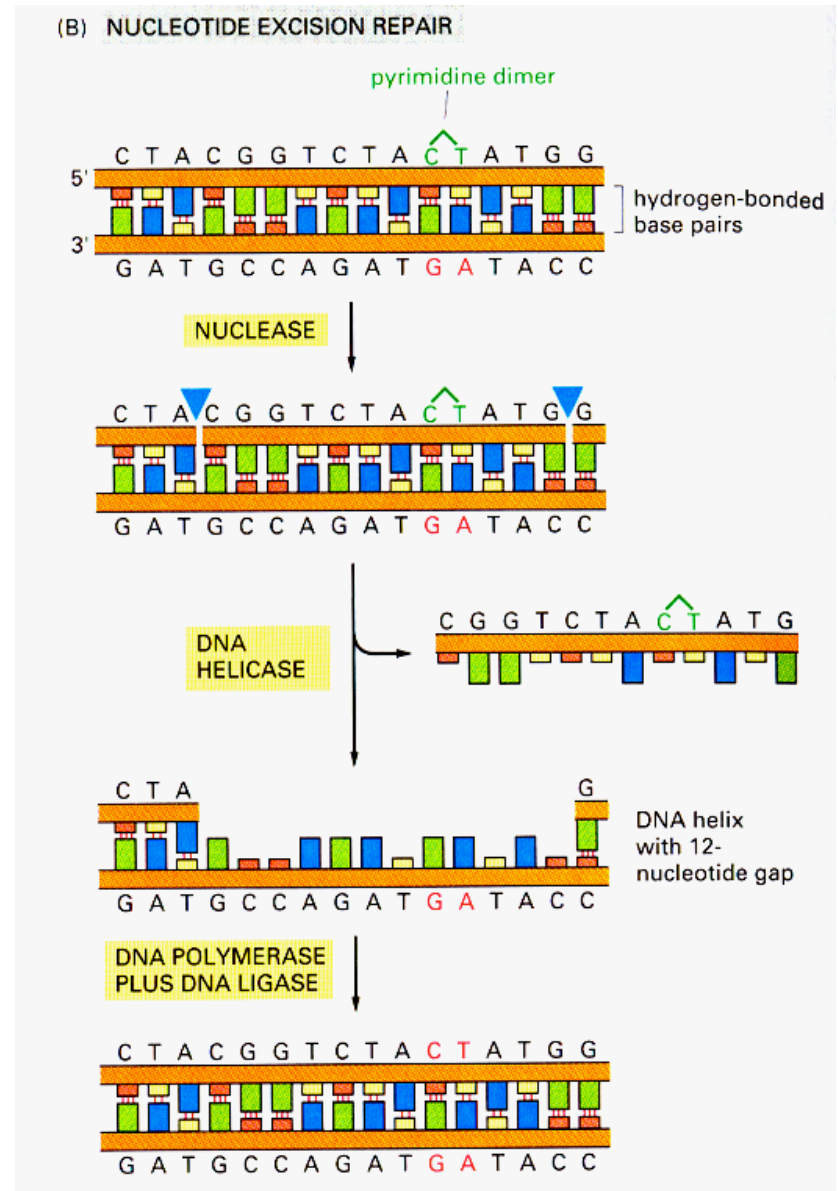
Oprava deaminace, oxidativní a jiné malé poškození báze



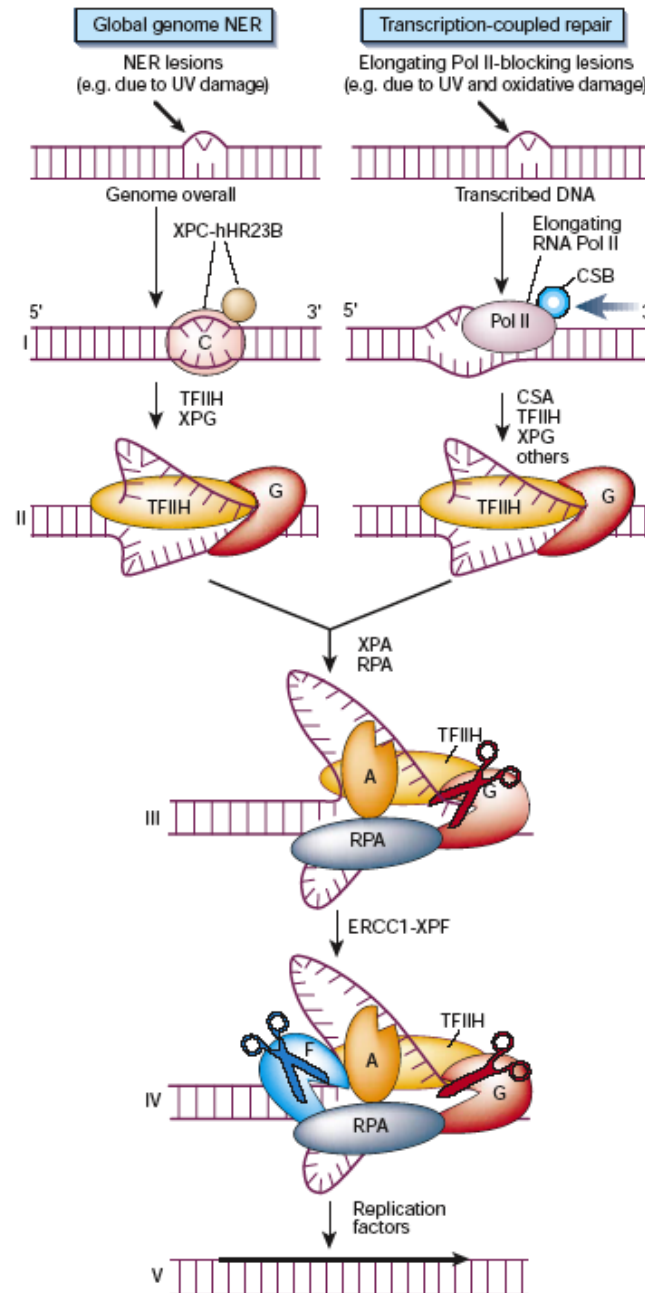
Nucleotide Excision Repair

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



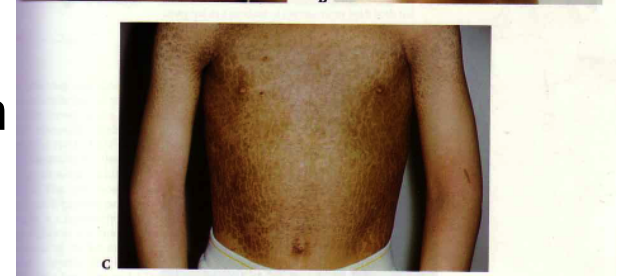
Cockayne's Syndrome

- 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)

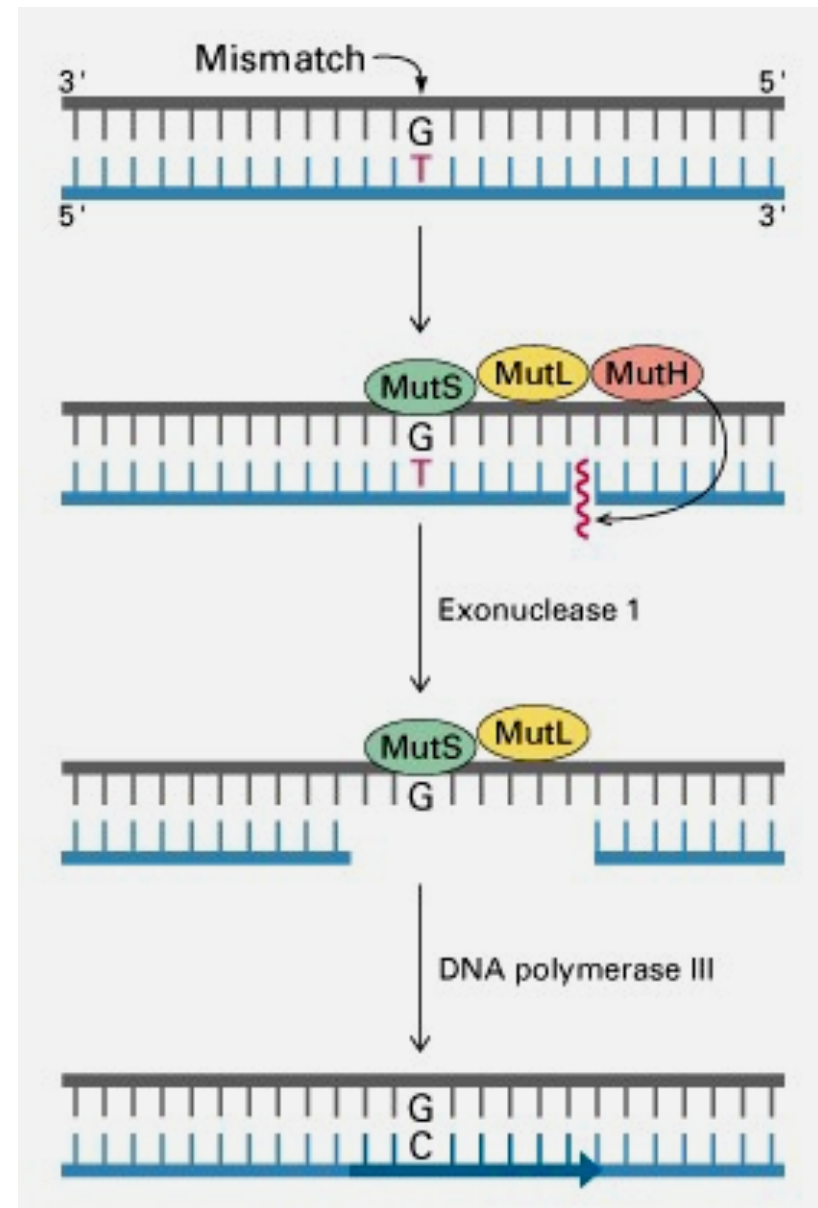
Mechanismus pro zajištění přesnosti replikace

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}

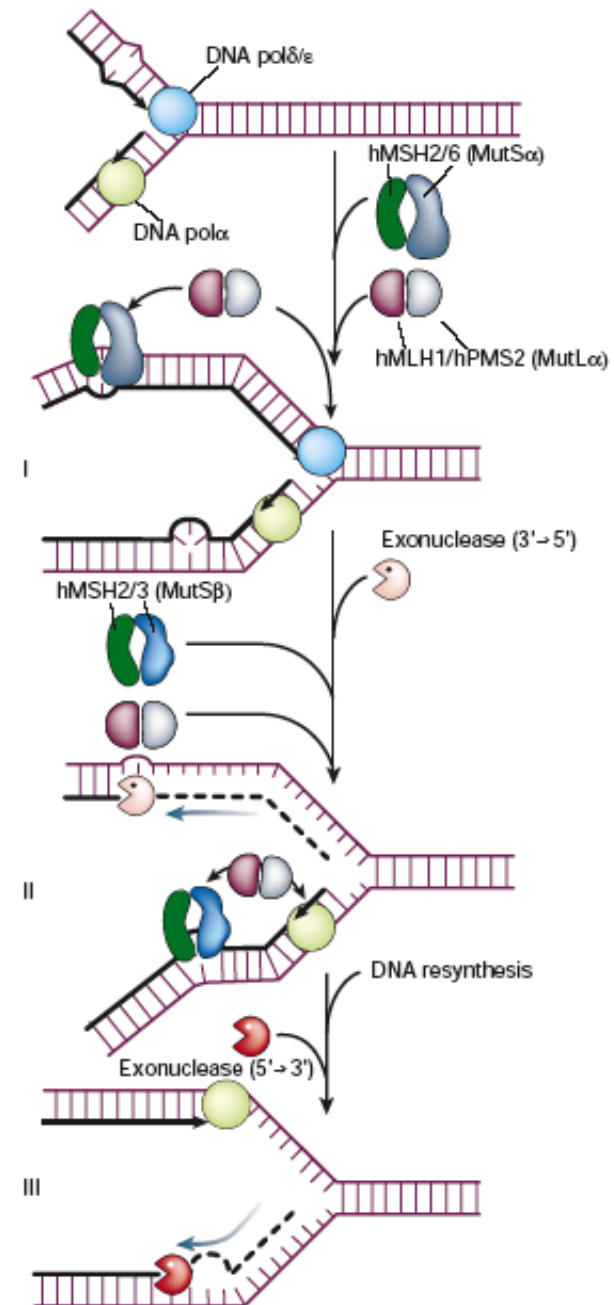
Further reading: A. Bellacosa, Cell Death and Differentiation 8, 1076 (2001)
M. J. Schofield & P. Hsieh, Ann. Rev. Microbiol. 57, 579 (2003)

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

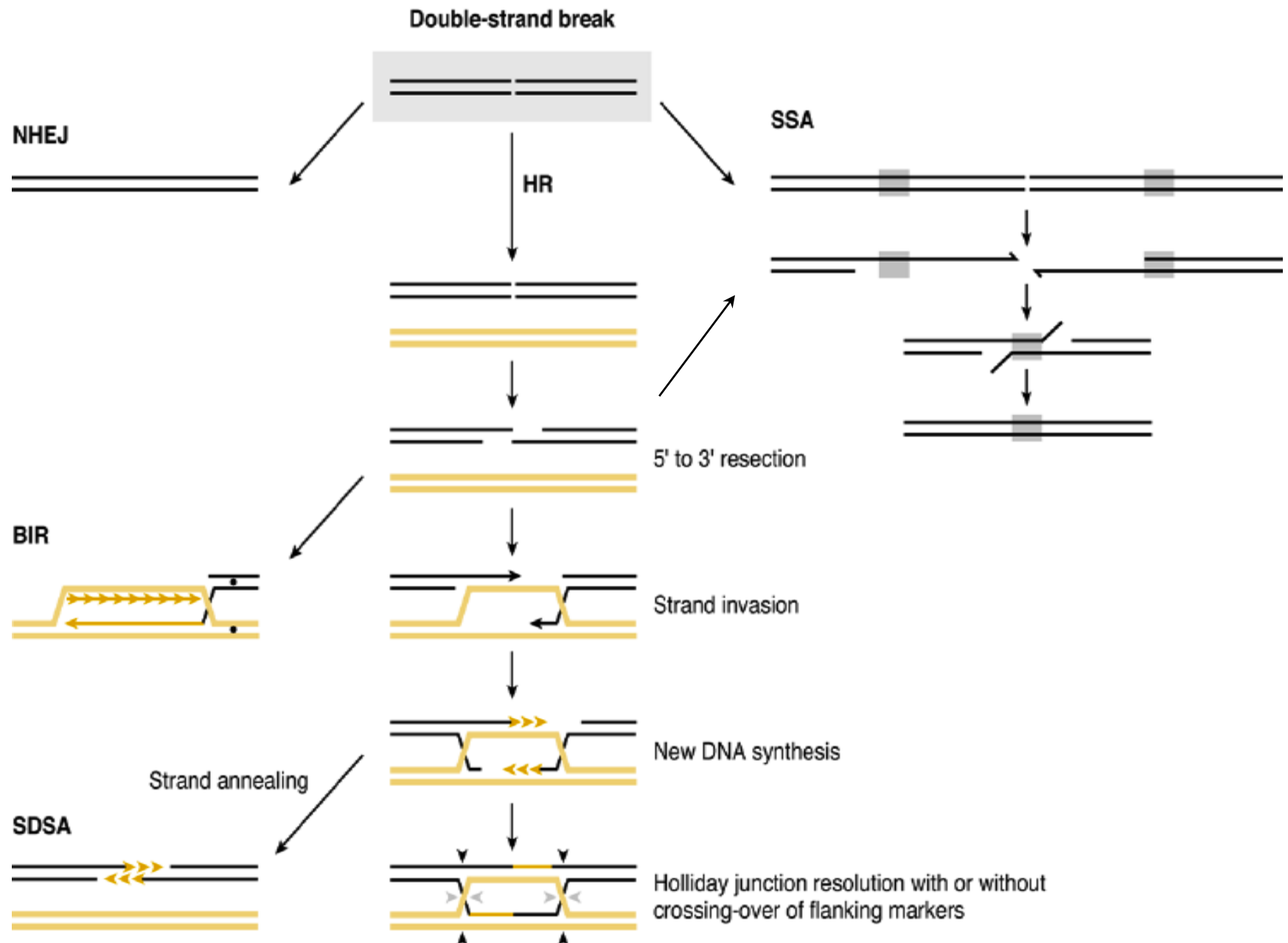
Dvouřetězcové zlomy v DNA

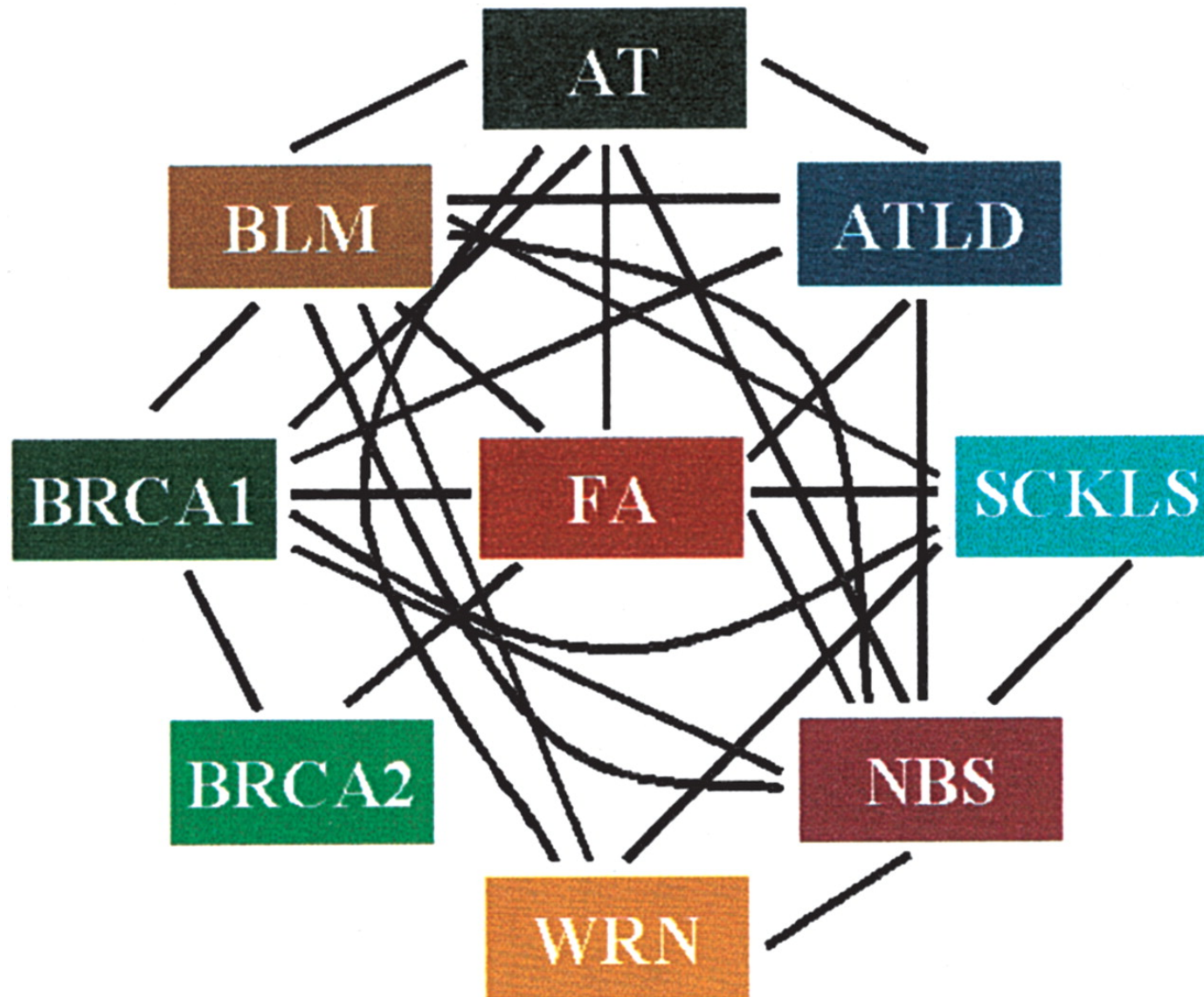
Vznik:

- **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**

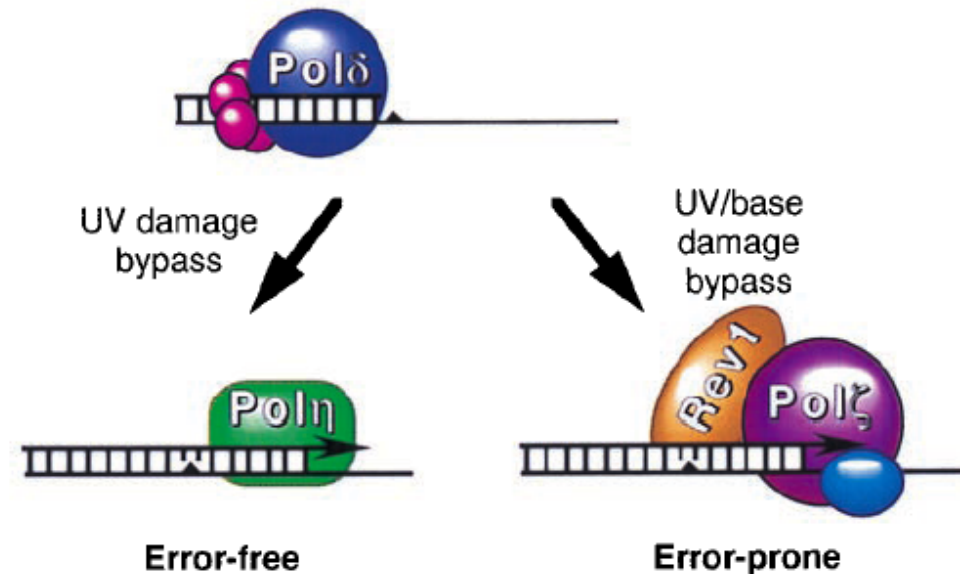




Adapted from Surralles et al., Genes Dev. (2004)

Translézní DNA Polymerázy

S. cerevisiae



Pol eta

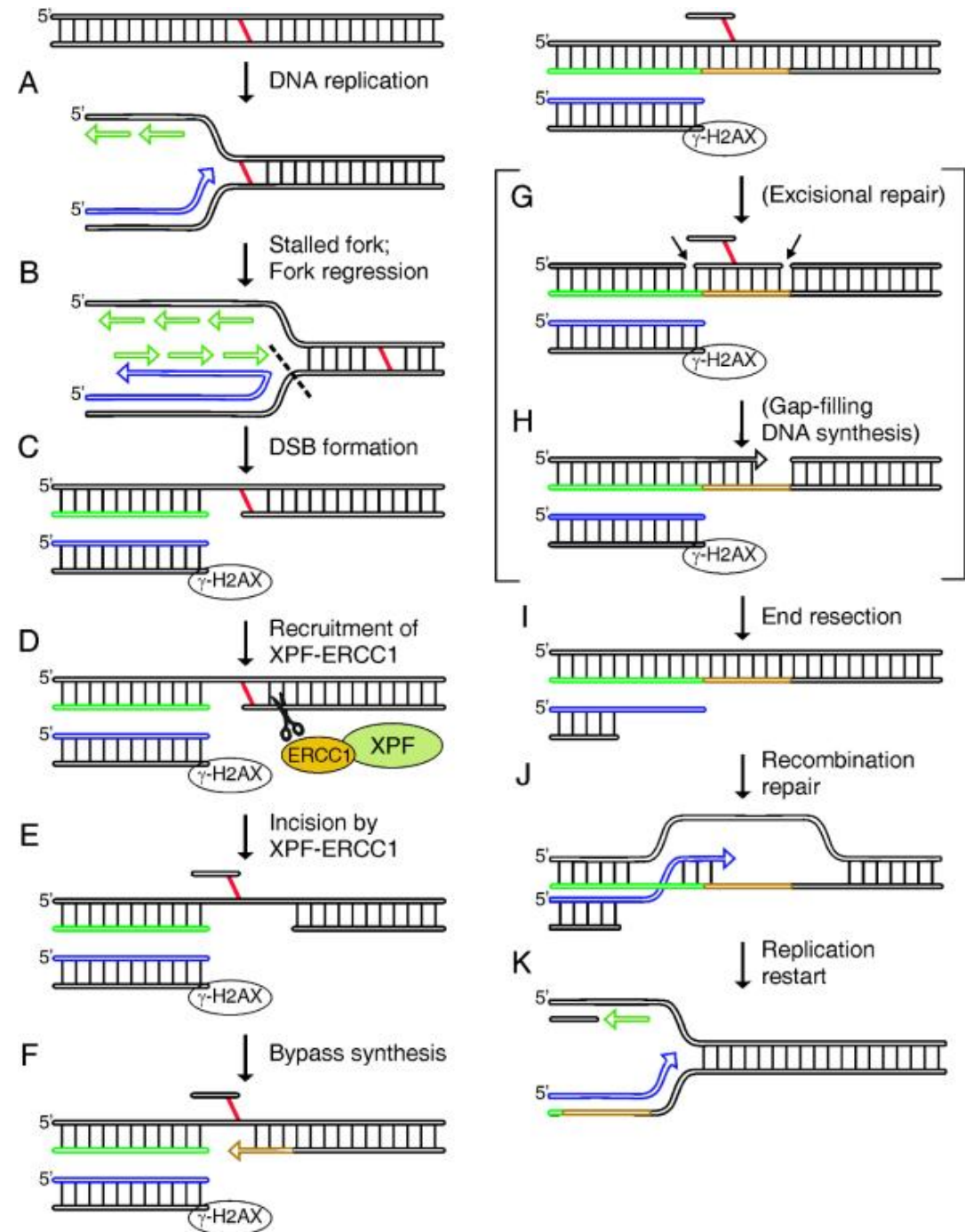
- inserts adenosines opposite TT dimers
- in general has low fidelity
- low processivity
- may be error-prone with other lesions
- Pol eta is a product of the XPV gene

Pol zeta and Rev 1

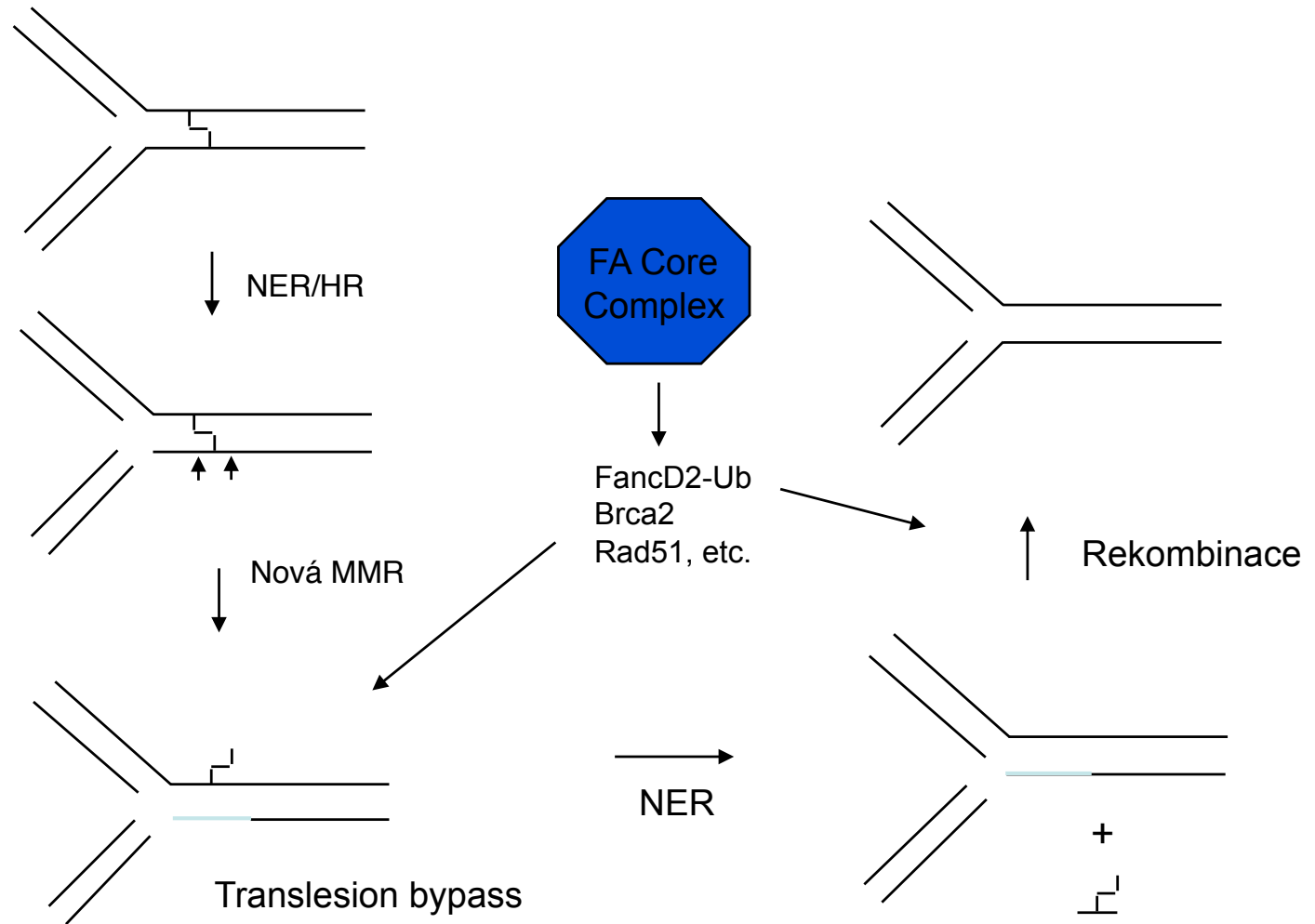
- Rev 1 inserts random bases opposite dimer
- Pol zeta extends bypass by a few bases
- Both polymerases have low fidelity and low processivity

Cross-link repair

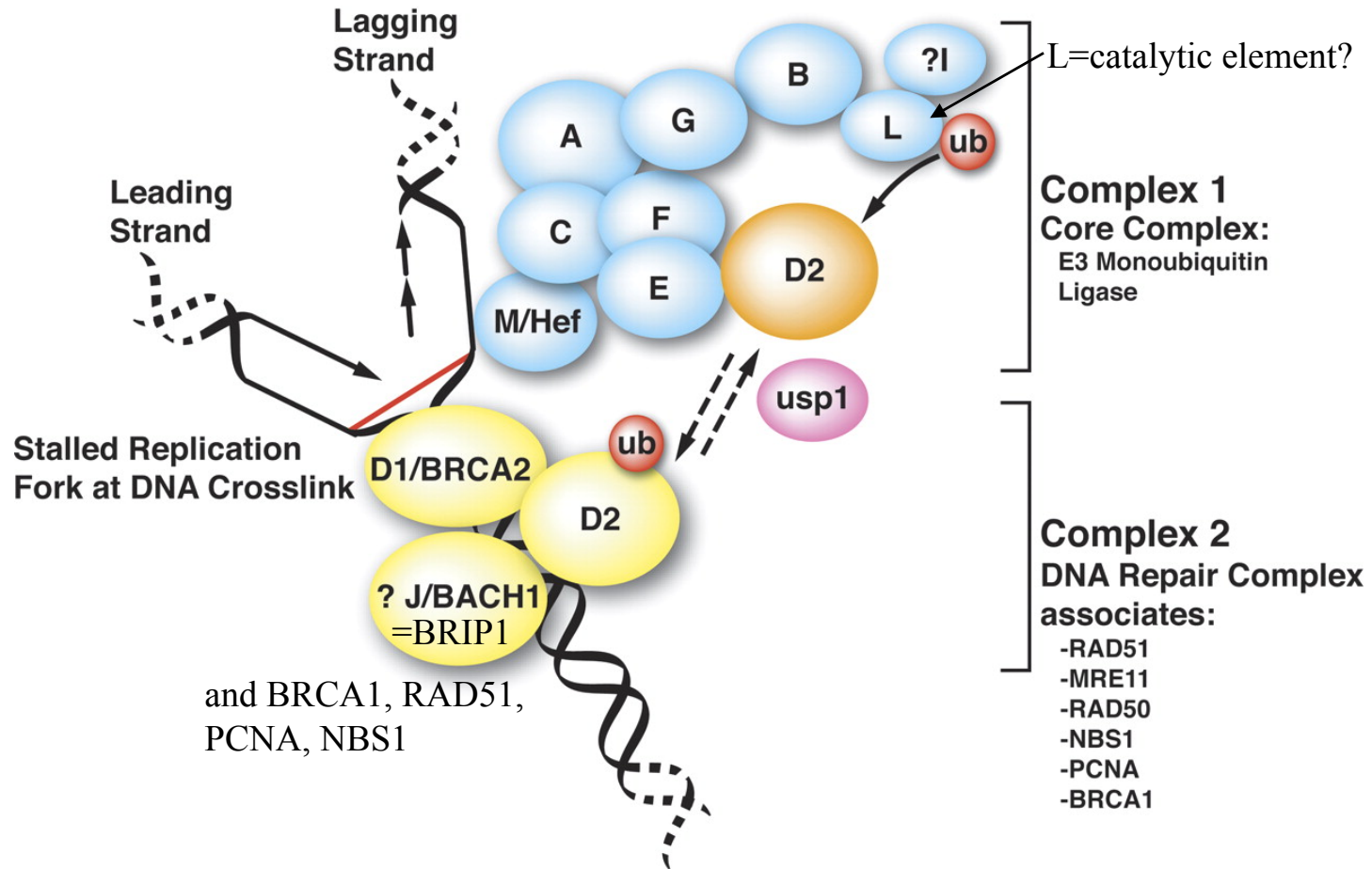
Model for the mechanism of DNA ICL repair in mammalian cells.



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

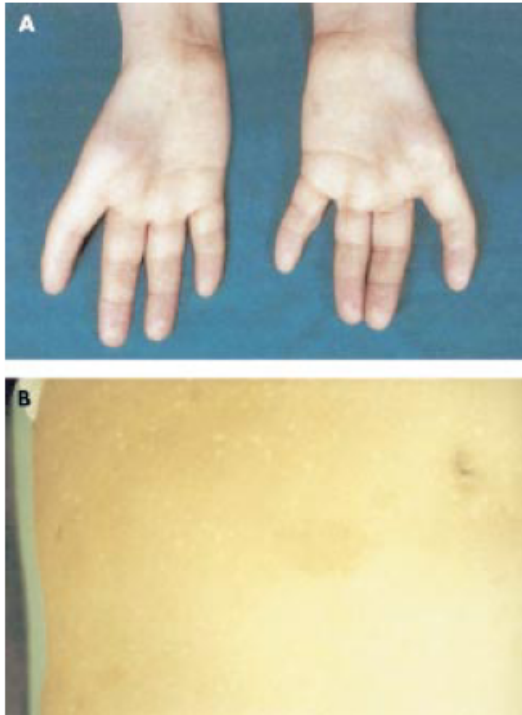


Figure 1 (A) Typical radial ray abnormalities and (B) café au lait patches and hypopigmentation, all common features in FA.



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-prone</u>
Přímá přeměna	+	
NER	+	
BER	+	
HR	+	
SSA		+
NHEJ		+
MMR	+	
Lesion bypass	+	+

Epigenetické modifikace DNA

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

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

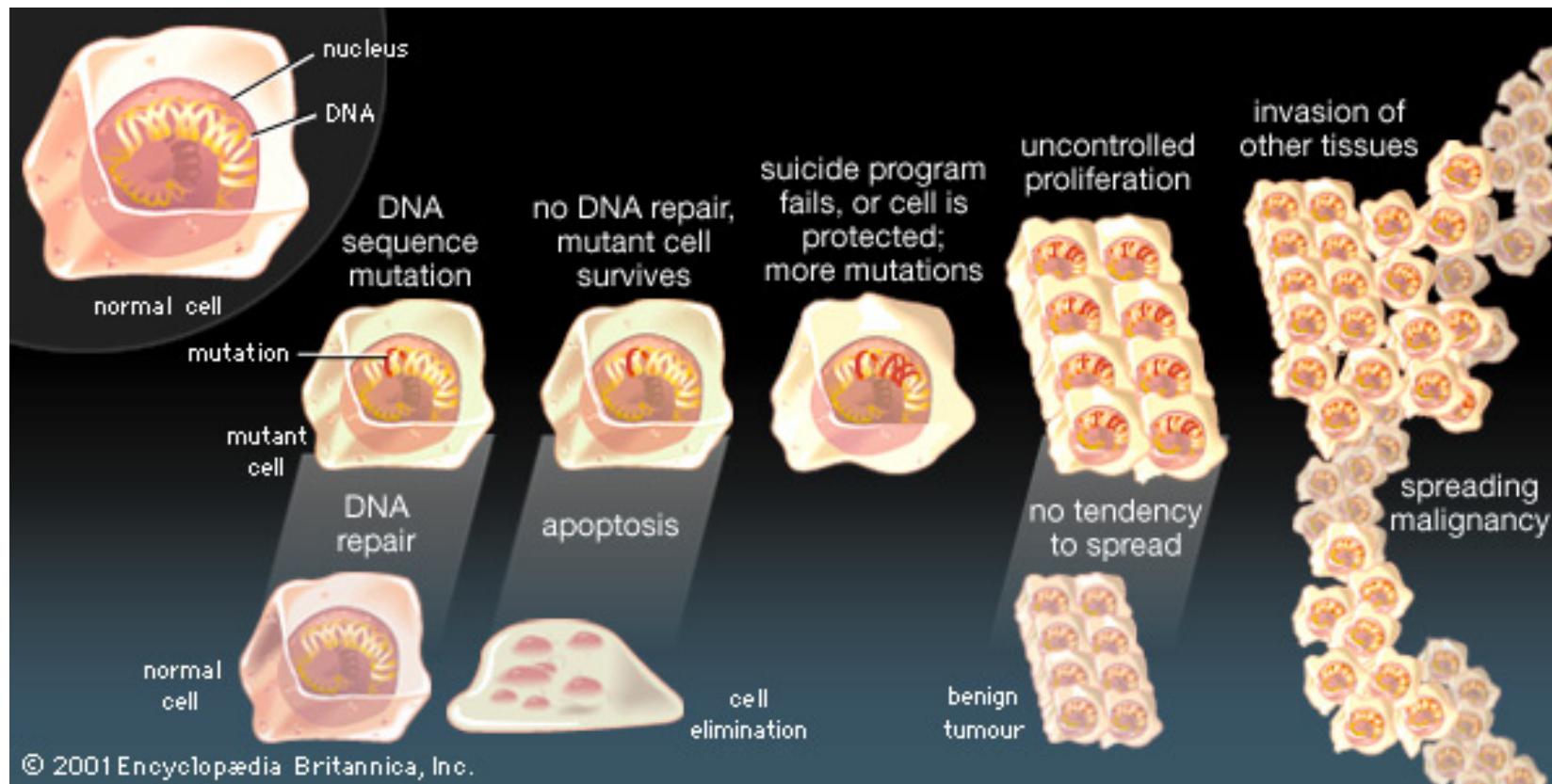
Epigenetika a rakovina

Celková hypomethylace DNA - jev provázející nádorovou chromozomální nestabilitu, oncogeny

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

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

Mutace and rakovina



Epigenetika a rakovina - epigenetický progenitorový model rakoviny

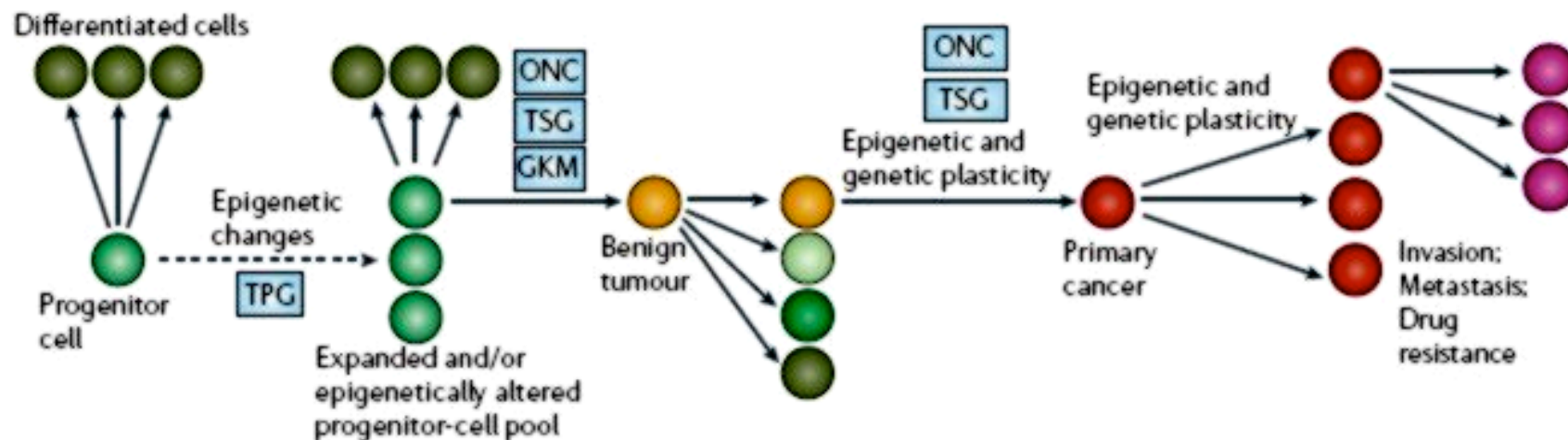
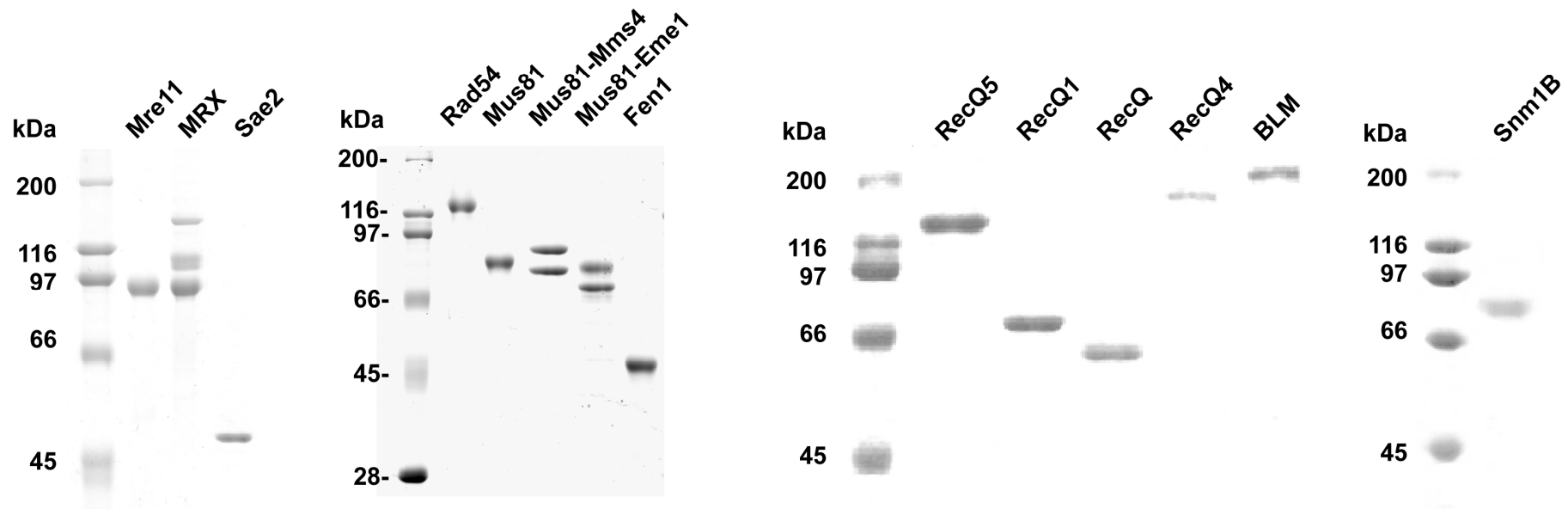


Figure 2 | **The epigenetic progenitor model of cancer.** According to this model, cancer arises in three steps. First is an epigenetic alteration of stem/progenitor cells within a given tissue, which is mediated by aberrant regulation of tumour-progenitor genes (TPG). This alteration can be due to events within the stem cells themselves, the influence of the stromal compartment, or environmental damage or injury. Second is a gatekeeper mutation (GKM) (tumour-suppressor gene (TSG) in solid tumours, and rearrangement of oncogene (ONC) in leukaemia and lymphoma). Although these GKM are themselves monoclonal, the expanded or altered progenitor compartment increases the risk of cancer when such a mutation occurs and the frequency of subsequent primary tumours (shown as separately arising tumours). Third is genetic and epigenetic instability, which leads to increased tumour evolution. Note that many of the properties of advanced tumours (invasion, metastasis and drug resistance) are inherent properties of the progenitor cells that give rise to the primary tumour and do not require other mutations (highlighting the importance of epigenetic factors in tumour progression). © 2005 Nature Publishing Group

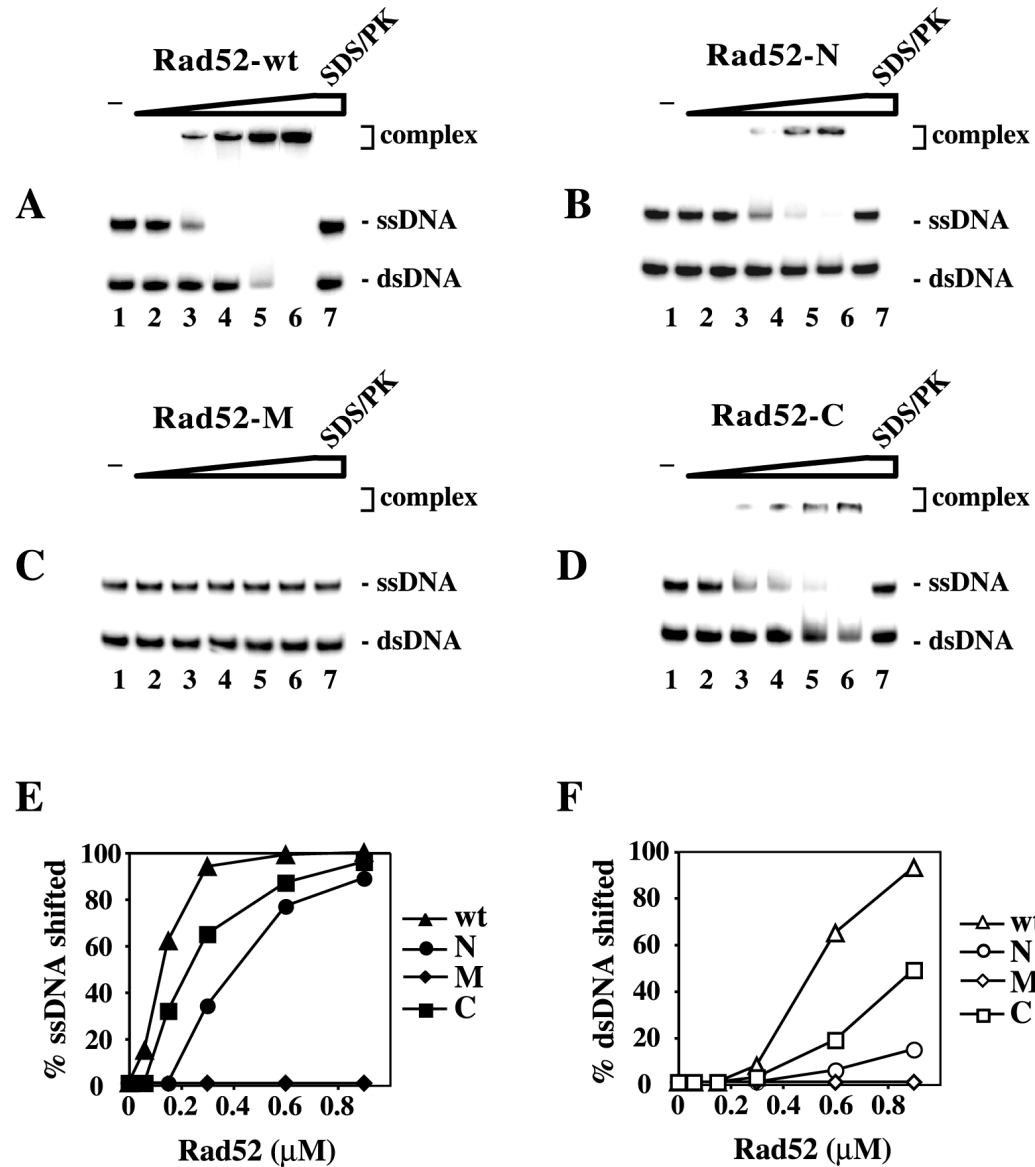
Rakovina vzniká ve 3 krocích: 1) epigenetické alterace kmenových nebo progenitorových buněk 2) iniciační mutace v tumor supresorovém genu nebo onkogenu, 3) genetická a epigenetická nestabilita

Jak to studujeme?

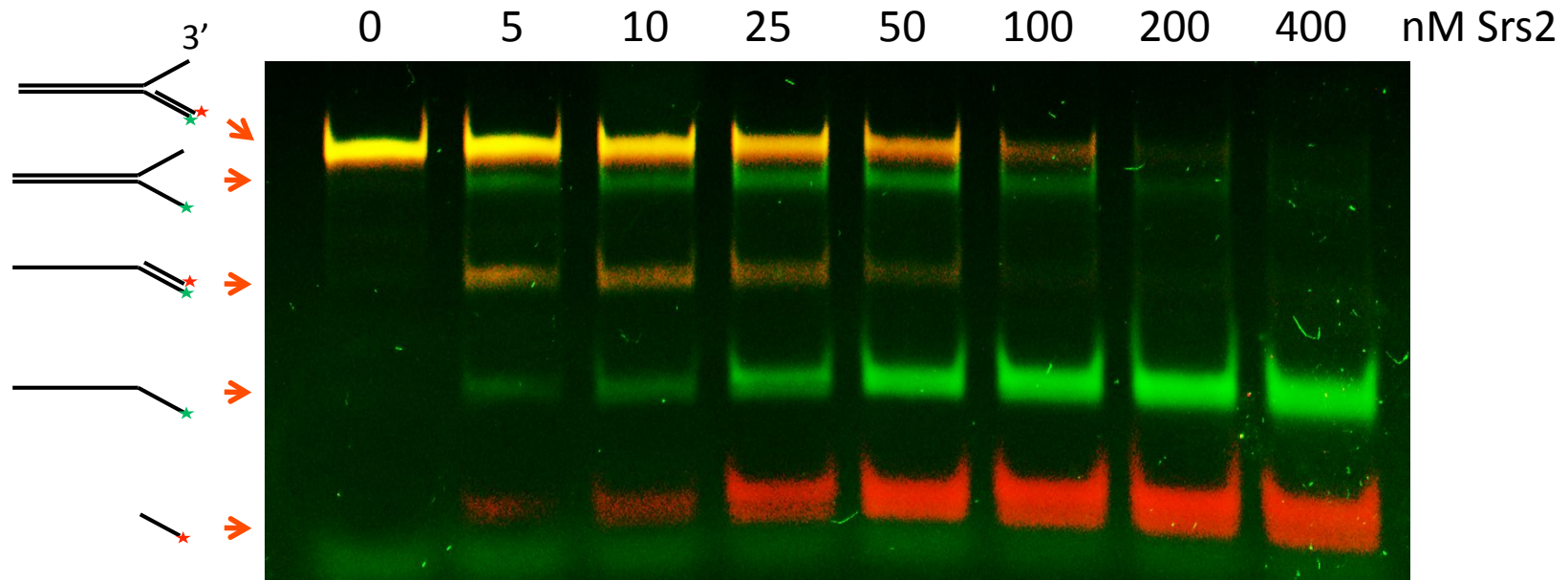
Proteins



Vazba Protein-DNA

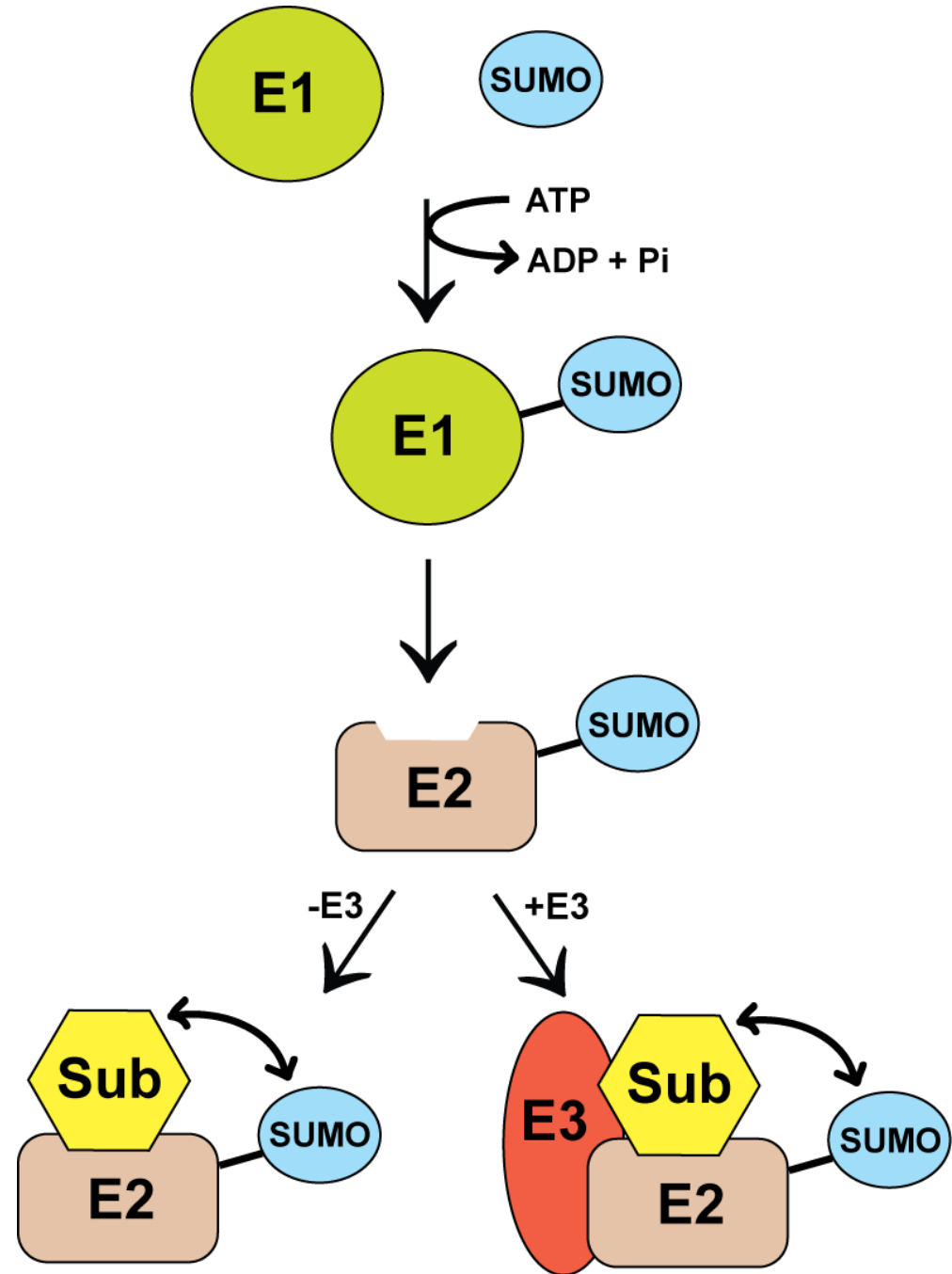


Helikázová aktivita



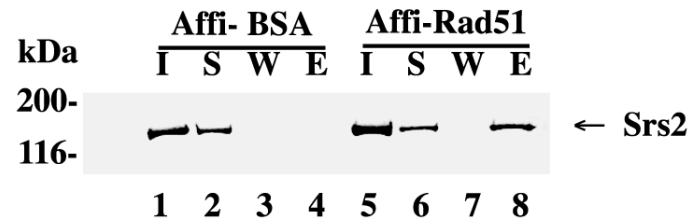
30°C 10'

Protein modification by SUMOylation

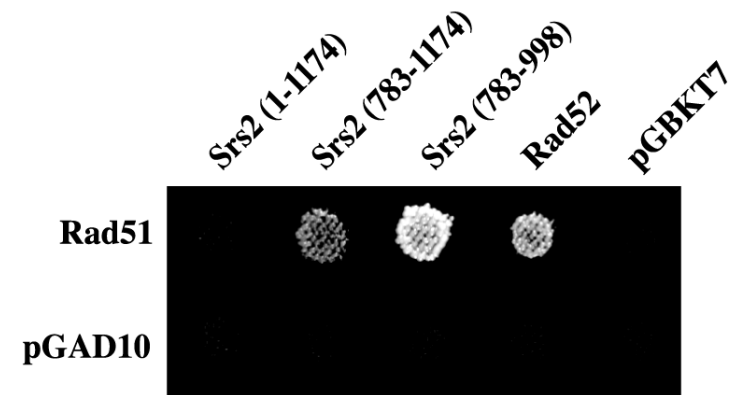


Proteinové interakce

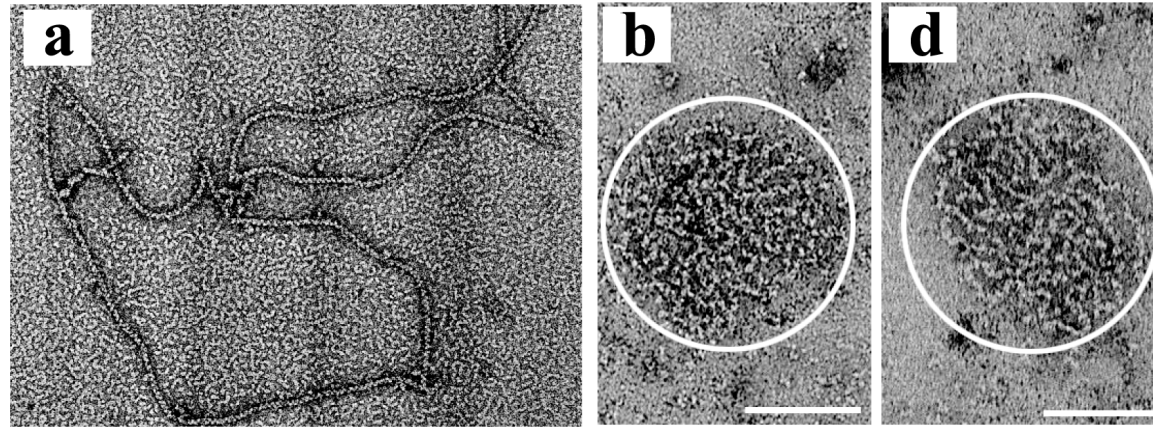
a



b



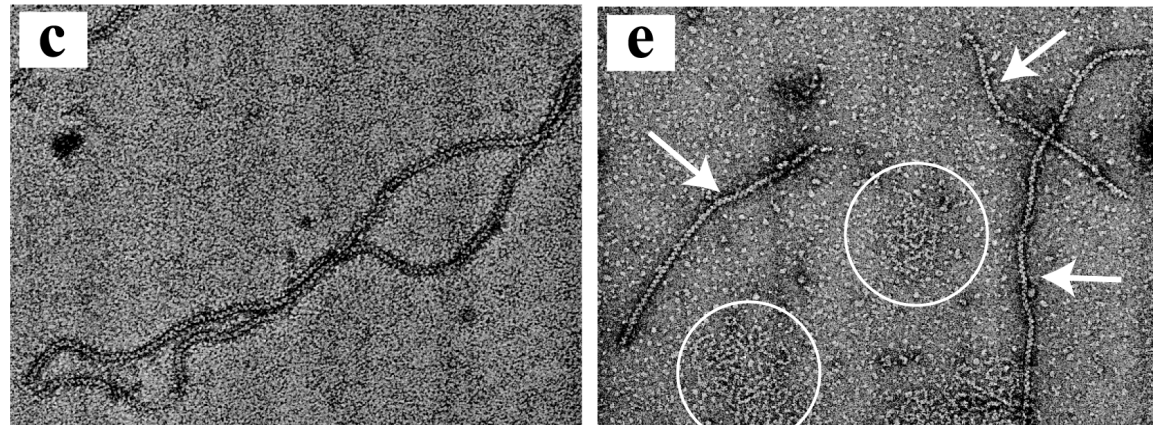
Mikroskopické analýzy



a. Rad51/ssDNA

b. RPA/ssDNA

d. Rad51/ssDNA
→ Srs2/RPA



c. Rad51/ssDNA → RPA

e. Rad51/ssDNA → Srs2/RPA/dsDNA



(U. of Copenhagen): Michael Lisby

(MSKCC): Xiaolan Zhao

(COLUMBIA): Rodney Rothstein

(YALE): Patrick Sung

(WUSTL): Tom Ellenberger

(UC DAVIS): Neil Hunter

(U. Zurich): Pavel Janscak



Děkuji za pozornost