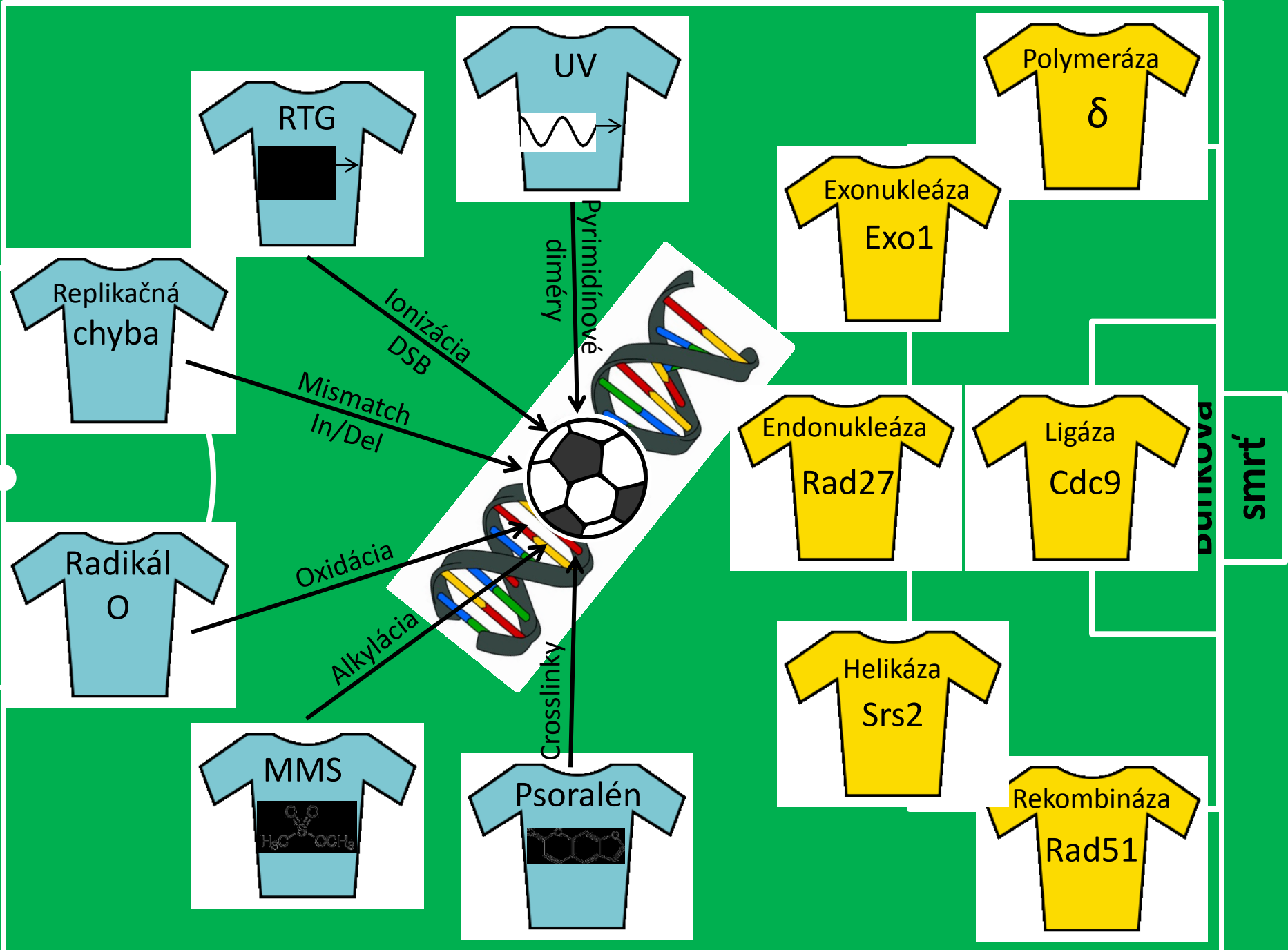


Oprava poškodenia DNA

DNA-opravné proteínové komplexy

Peter Kolesár
10.4.2014



Replikačná chyba

Radikál
O

MMS
CSC(=O)SC

RTG

Psoralén

UV

Ionizácia
DSB

Mismatch
In/Del

Oxidácia

Alkylácia

Pyrimidínové
diméry

Crosslinky

Exonukleáza
Exo1

Endonukleáza
Rad27

Helikáza
Srs2

Ligáza
Cdc9

Rekombináza
Rad51

Polymeráza
 δ

DŮLEŽITÁ

smrť

Poškodenie DNA

~ milión lézií DNA v bunke denne

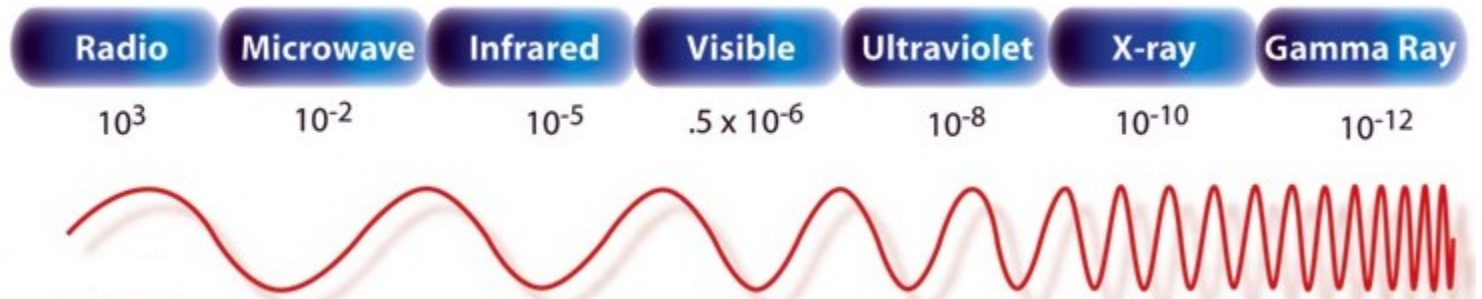
- Zdroje poškodenia:

1, endogénne – chyby pri replikácii DNA

- bukový metabolizmus (kyslíkové radikály)

2, exogénne – UV, röntgenové a gamma žiarenie
(ionizujúce žiarenie)

Wavelength
(meters)



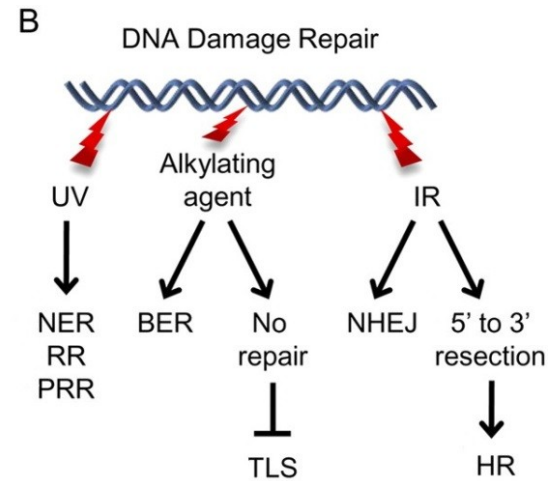
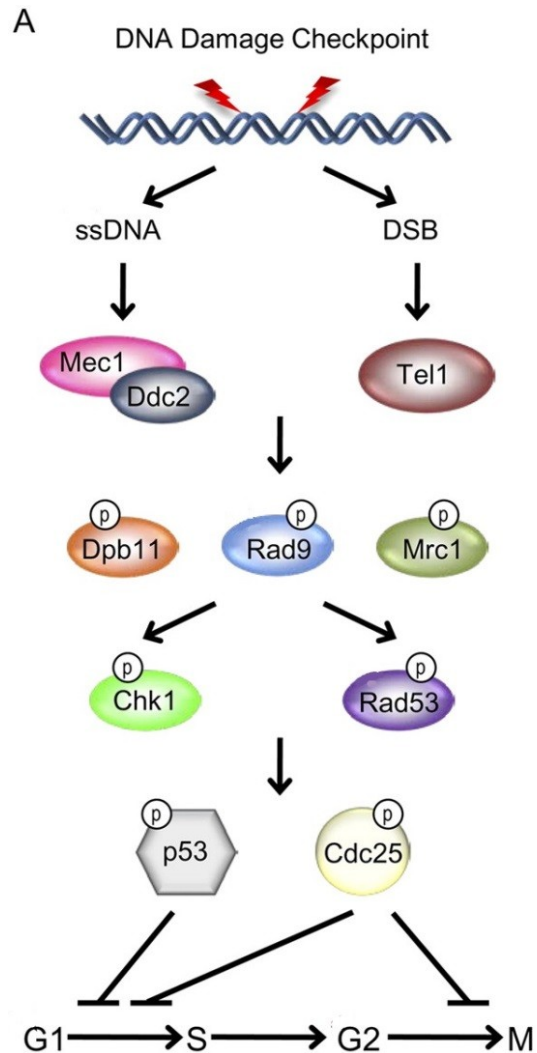
- mutagénne chemikálie

- vírusy

Typy DNA poškodení

- oxidácia báz (8-oxoG, ...)
- alkylácia báz (metylácia – 7-metylG, 1-metylA,...)
- pyrimidínové diméry (T-T, C-C) - spôsobené UV
- hydrolýza báz (deaminácia, depurinácia, depyrimidinácia)
- nesprávne priradenie báz – mismatch (chyba pri replikácii DNA)
- zlomy v DNA – jednovláknové / dvojvláknové (spôsobuje ionizujúce žiarenie, chemikálie)
- crosslinky v DNA (kovalentná väzba medzi dvoma vláknami DNA)

Reakcia bunky na poškodenie DNA

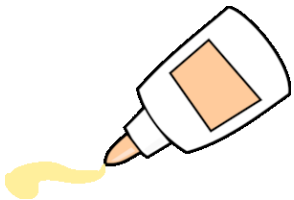
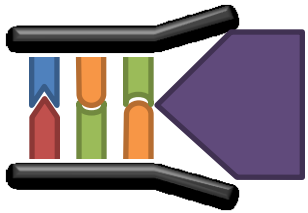


DNA-opravné proteínové komplexy

- Na opravu súčasne potrebné rôzne enzymatické aktivity
- Vzájomnou väzbou enzymaticky aktívnych a adaptorových proteínov vznikajú DNA-opravné komplexy špecifické k danému poškodeniu DNA
- Katalytické domény zhromaždené v opravnom komplexe vedú k zvráteniu DNA poškodenia
- Po oprave sa komplex opäť rozpadá na podjednotky
- Pri regulácii reverzibilnej formácie komplexov sú dôležité post-translačné modifikácie proteínov (fosforylácia, sumoylácia, ubikvitinácia,...).

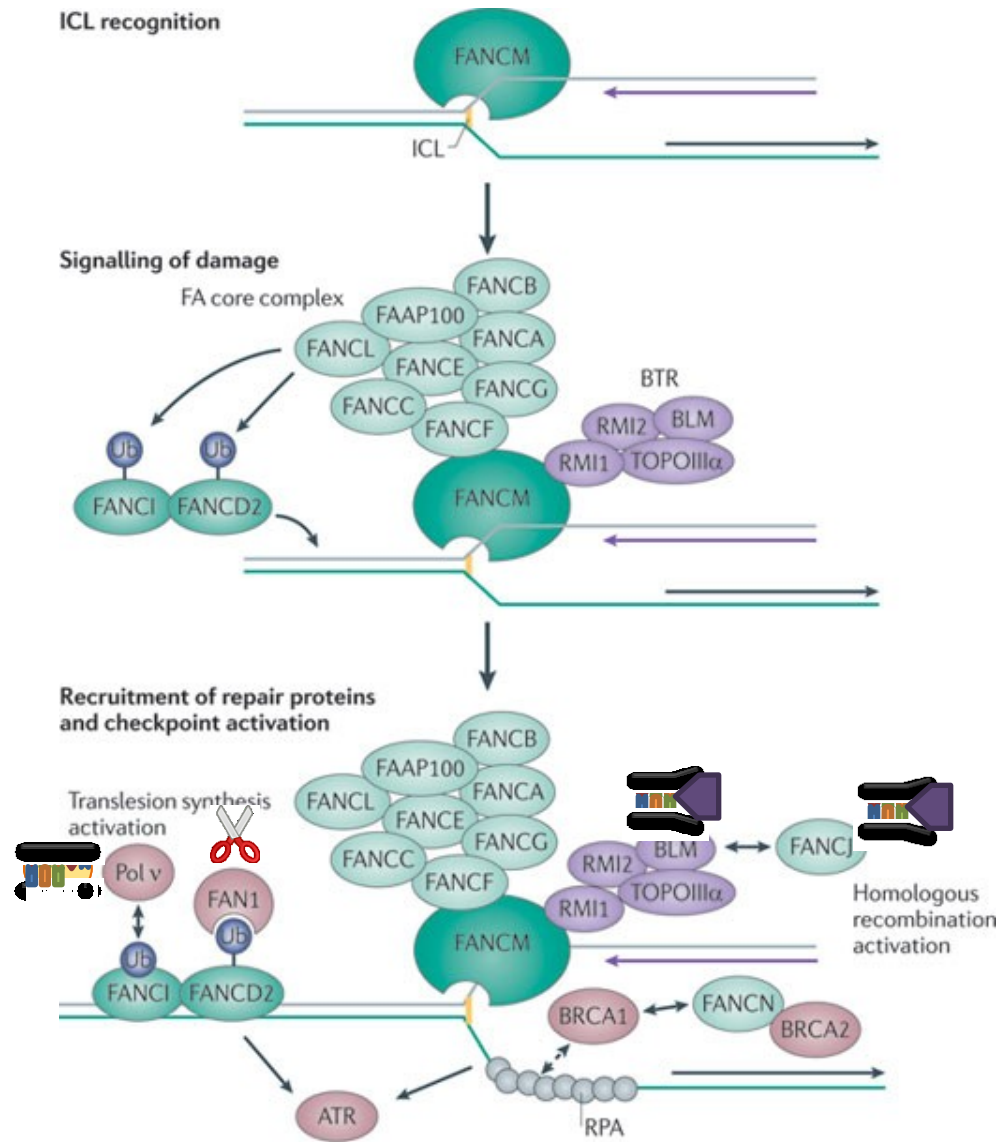
ENZÝMY OPRAVUJÚCE DNA

- Glykozylázy
 - Štiepia N-glykozidickú väzbu - odstraňujú poškodené bázy
- Nukleázy – exo / endo
 - Štiepia fosfodiesterové väzby medzi nukleotidmi DNA.
- Helikázy
 - Oddelujú dve komplementárne vlákna DNA.
- Polymerázy
 - DNA-dependentné nucleotidyltransferázy - Syntetizujú reťazec DNA z nukleotidov.
- Ligázy
 - Katalyzujú tvorbu fosfodiesterových väzieb – spájajú dokopy dve vlákna DNA.



FA (Fanconi Anaemia) pathway

Príklad modulárneho spájania proteínov s rôznou funkciou pri tvorbe DNA opravných komplexov – oprava medzivláknových crosslinkov v DNA



Spôsob opravy DNA

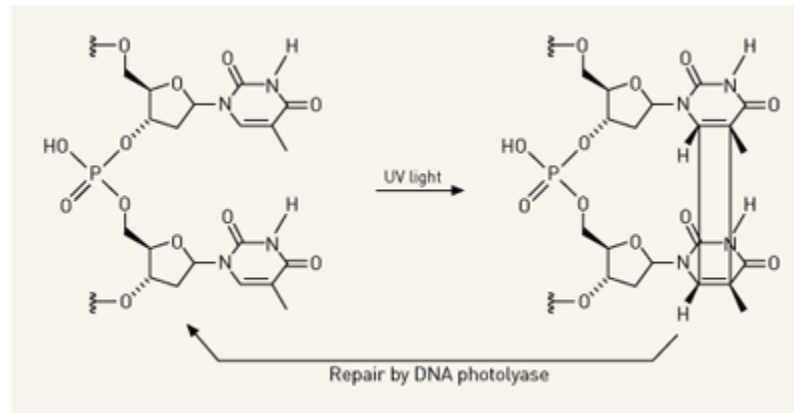
- Templát na opravu:
 - Komplementárne vlákno DNA (ak poškodené len 1 vlákno)
 - Sesterská chromatída (v S, G2 fáze)
 - Homologický chromozóm (v diploidnom stave)
- Ak je templát nedostupný → TLS, NHEJ (chybovosť)
- Postup opravy:
 - 1, rozpoznanie poškodenia
 - 2, privolanie DNA-opravných proteínov – tvorba komplexu
 - 3, oprava DNA

DNA OPRAVNÉ DRÁHY

- Priame zvrátenie
- Oprava jednoreťazcových poškodení – BER, NER, MMR
- Oprava dvojreťazcových zlomov – HR, NHEJ
- Translézna DNA syntéza

Priame zvrátenie (direct reversal)

- Fotoreaktivácia:
pyrimidínové diméry zvráti fotolyáza (energia zo svetla)



- Metyláciu guanínu zvráti metyl-guanín metyl transferáza (MGMT)



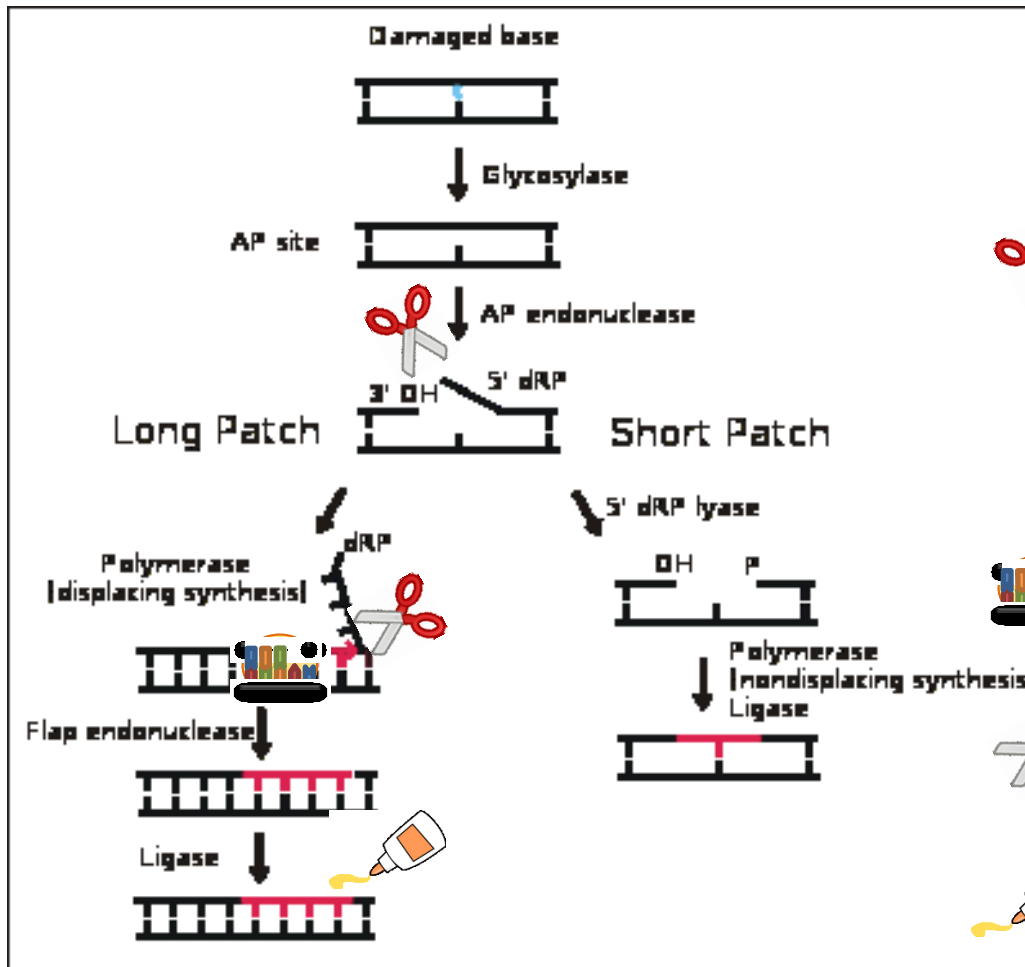
Oprava jednoreťazcových poškodení

- Templát – komplementárny reťazec
- Postup – vyštiepenie poškodených nukleotidov → výmena za nukleotidy komplementárne k nepoškodenému DNA vláknu
- Bázová excízna oprava (BER)
- Nukleotidová excízna oprava (NER)
- Oprava nesprávne zaradených báz (MMR)

Bázová excízna oprava

Base excision repair (BER)

Opravuje menšie poškodenia jednej bázy (oxidácia, alkylácia, deaminácia).

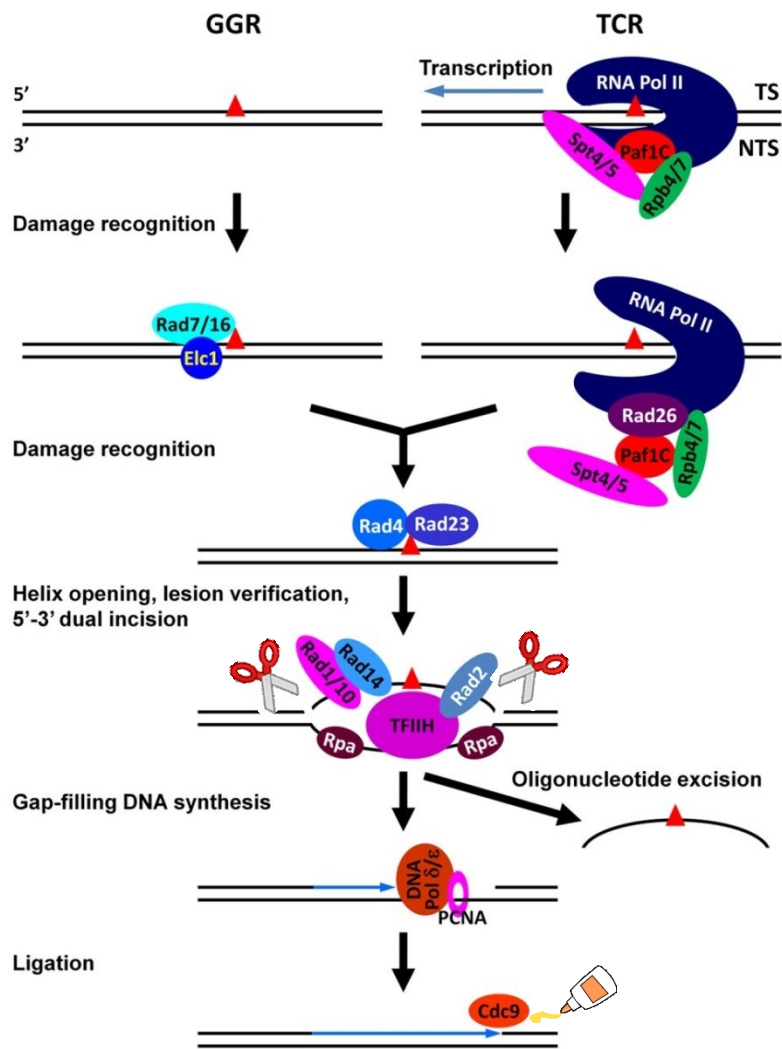


1. Poškodená báza je rozpoznaná a odstránená DNA glykozylázami.
2. Abázické miesto je rozoznané AP endonukleázou (Apn1, Apn2), ktorá rozštípe fosfodiesterickú väzbu – vznikne jednovláknový zlom.
3. Chýbajúca časť je znovu nasyntetizovaná DNA polymerázou (pol δ a pol ϵ).
4. Prípadný 5' previs DNA je odstránený flap endonukleázou Rad27 (FEN1).
5. Nasyntetizovaná DNA je s pôvodnou spojená DNA ligázou.

Nukleotidová excízná oprava

Nucleotide excision repair (NER)

Opravuje väčšie jednoreťazcové poškodenia (pyrimidínové diméry, 6,4 fotoprodukty, crosslinky)



A, globálna genomická (GG-NER)
B, Transkripčne-spriahnutá (TC-NER).

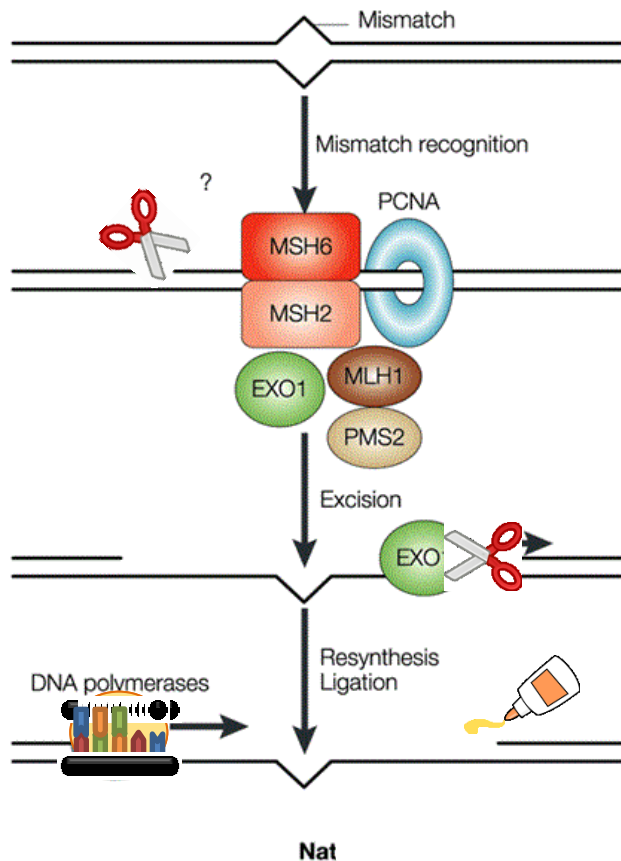


1. Rozpoznanie poškodenia GG \neq TC
2. TFIIH rozpletie DNA (helikáza).
3. Rad2 (XPG) štípe DNA na 3' konci poškodenia, 5' koniec rozštípe Rad1-Rad10 (XPF-ERCC1) komplex (endonukleázy). \rightarrow Dvojité štiepenie uvoľní krátky jednovláknový úsek (25-30 nt) DNA na ktorom sa poškodenie nachádza.
4. DNA polymeráza (δ alebo ϵ) dosyntetizuje chýbajúcu sekvenciu.
5. DNA ligáza Cdc9 (Ligase-I) spojí DNA.

Oprava chybného zaradenia báz

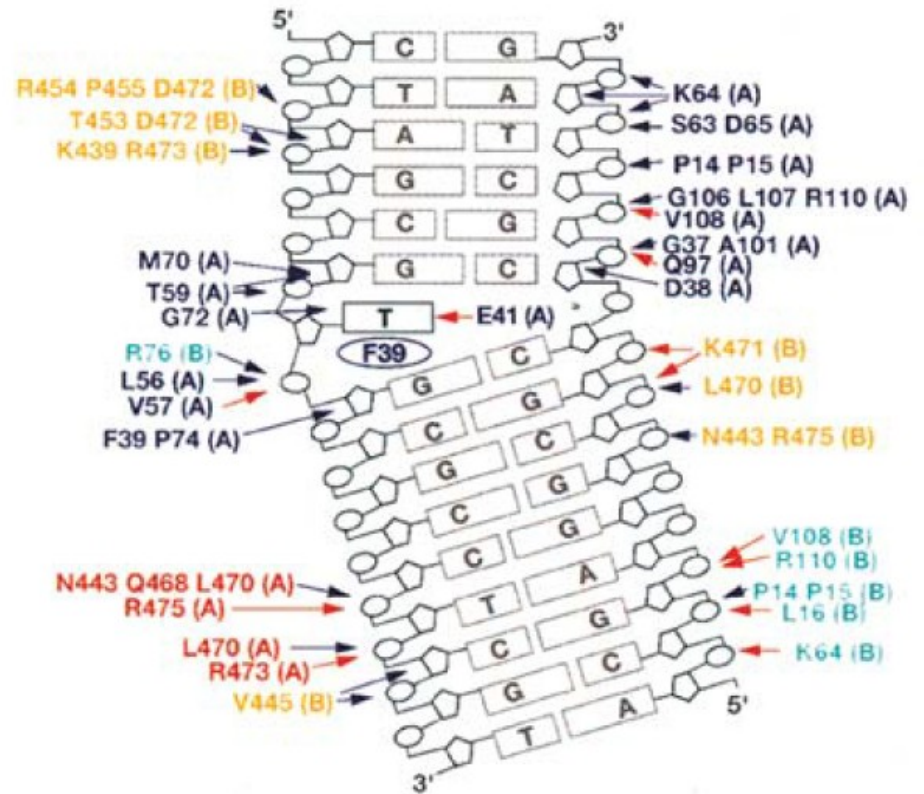
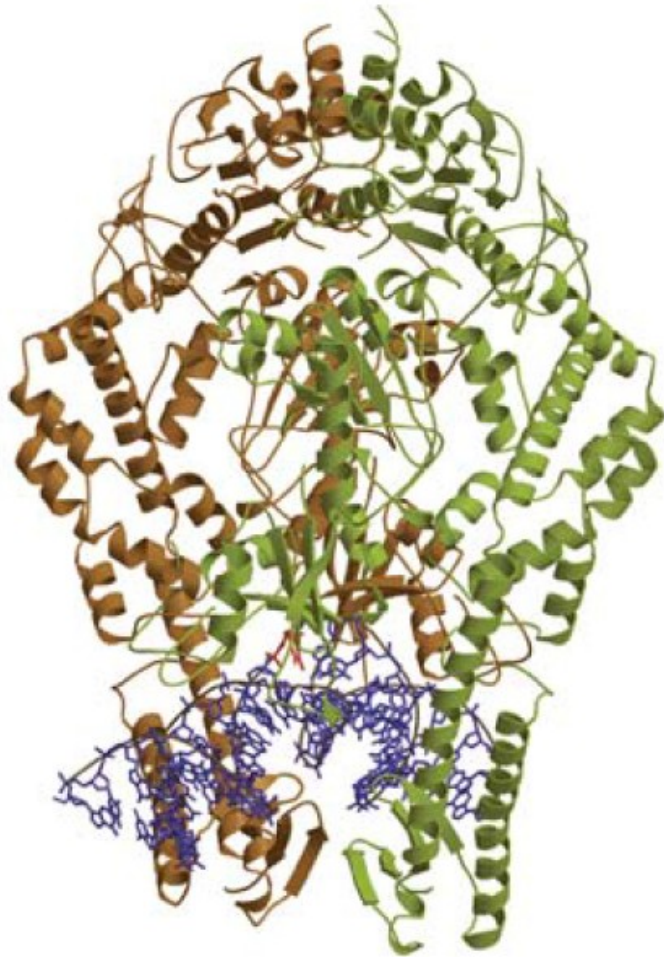
Mismatch repair (MMR)

Opravuje nesprávne zaradené bázy pri chybách DNA replikácie a rekombinácie.



- Rozoznáva pôvodné a novo nasyntetyzované vlákno DNA a špecificky opravuje chyby v dcérskom vlákne.
1. MutS homológy (Msh2/Msh3, Msh2/Msh6) rozoznávajú nesprávne zaradené bázy a ohýbajú DNA v mieste poškodenia.
 2. MutL homológy (Mlh1/Pms2) sa viažu na MutS h. a štípe dcérske vlákno (endonukleáza).
 3. DNA helikáza rozpletie vlákna.
 4. Exonukleáza (Exo1, ... ?) rozštípe dcérske vlákno.
 5. Vyštiepená DNA je znovu nasyntetizovaná DNA polymerázou a pripojená DNA ligázou.

MMR – rozoznanie DNA - MutS



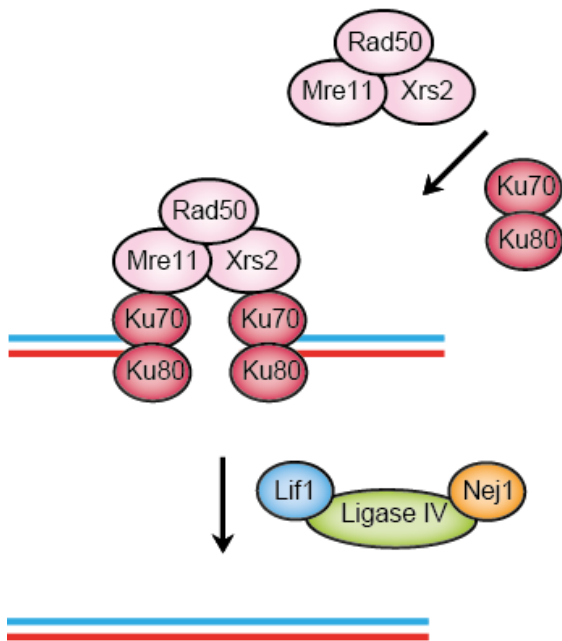
Oprava dvojreťazcových zlomov

- Dvojreťazcové zlomy DNA sú veľmi závažným druhom poškodenia - jediný DSB môže viesť k smrti bunky alebo preusporiadaniu genómu.
- Základné DSB-opravné dráhy
 1. Homologická rekombinácia (HR)
 - Väčšinou nevedie k chybám a na opravu používa homologickú sekvenciu ako templát.
 - Je dominantná v S a G2 fáze (sesterská chromatída), u diploidov (homologický chromozóm).
 2. Nehomologické spájanie koncov (NHEJ)
 - Priamo spája zlomené konce dokopy, často vedie k strate genetickej informácie.
 - Dôležitá hlavne v G1 fáze u haploidov.

Nehomologické spájanie koncov

Non-homologous end joining (NHEJ)

1. Väzba MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) komplexu, Ku heterodiméru (Yku70-Yku80) na zlomené konce DNA
2. Privolanie DNA ligázy IV (Dnl4) a jej pomocných proteínov Lif1 a Nej1.
3. Hľadanie komplementarity medzi prevismi dvoch koncov DNA.
4. Úprava koncov - syntéza DNA (Pol4 DNA polymeráza)
5. Religácia koncov

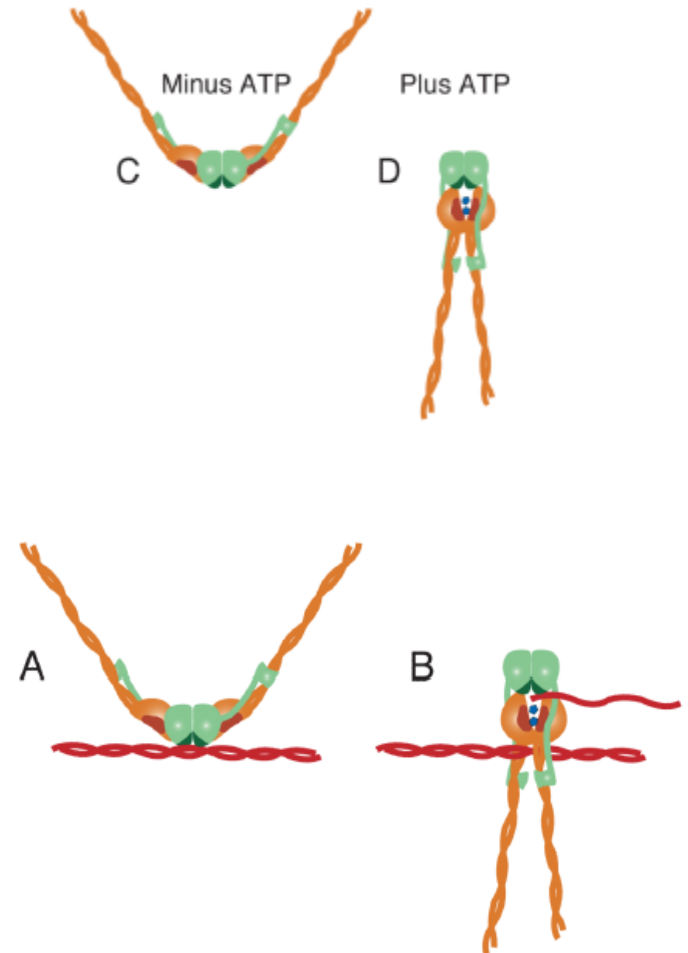
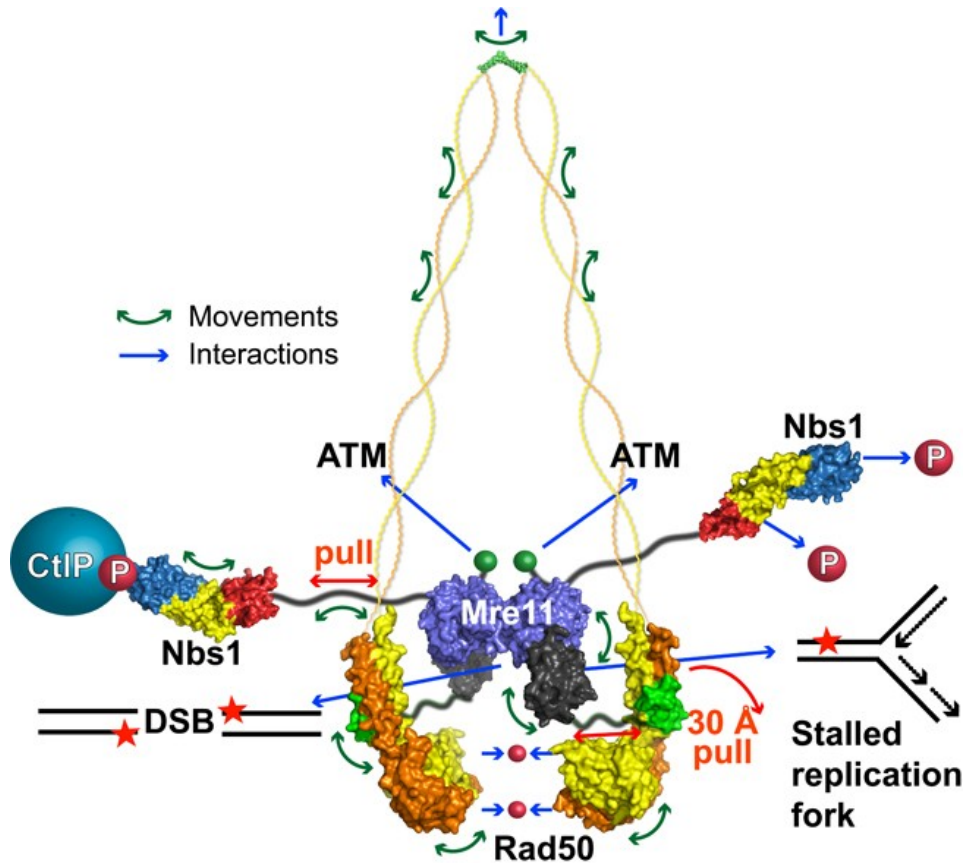


NHEJ

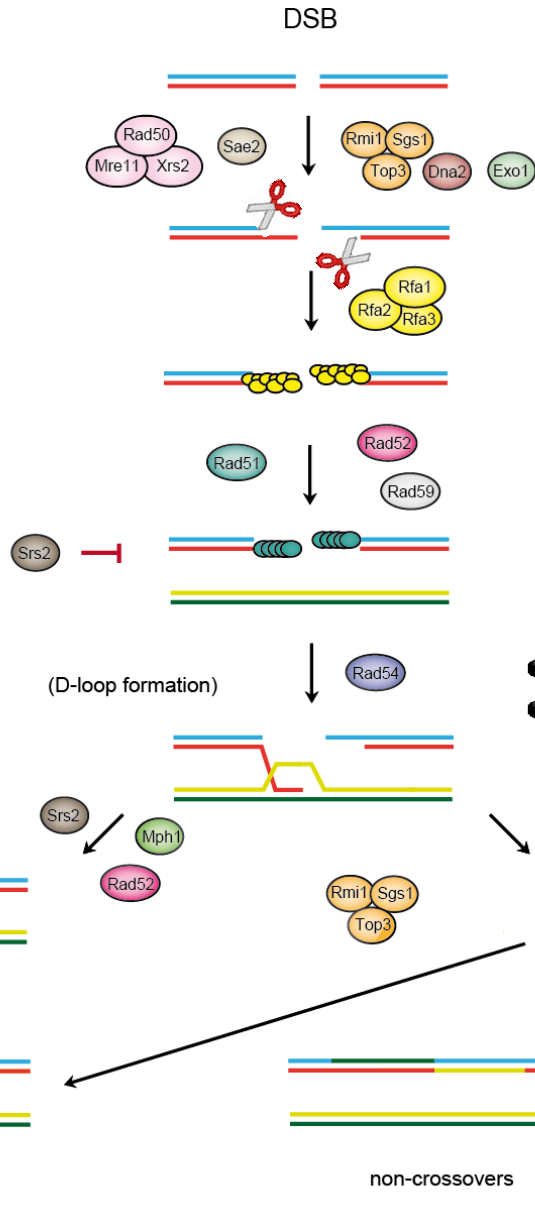
- pri oprave nekompatibilných koncov väčšinou dochádza k deléciám alebo inzerciam.

Mre11-Rad50-Xrs2(Nbs1) komplex

rozdielna väzba na DNA v závislosti od väzby ATP

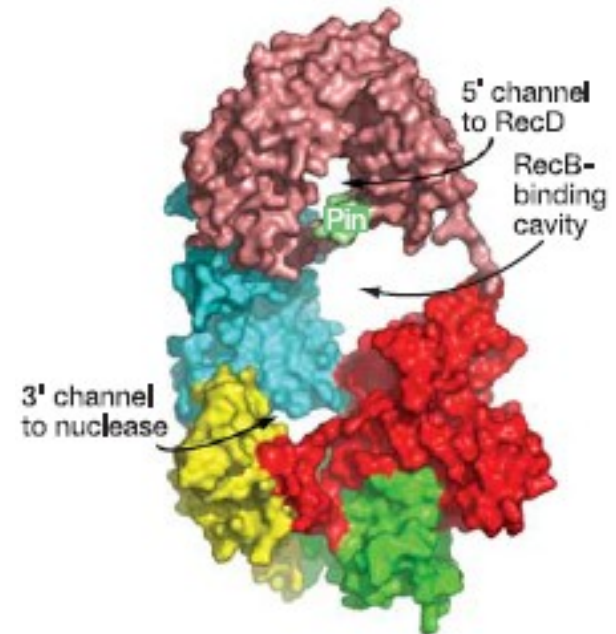
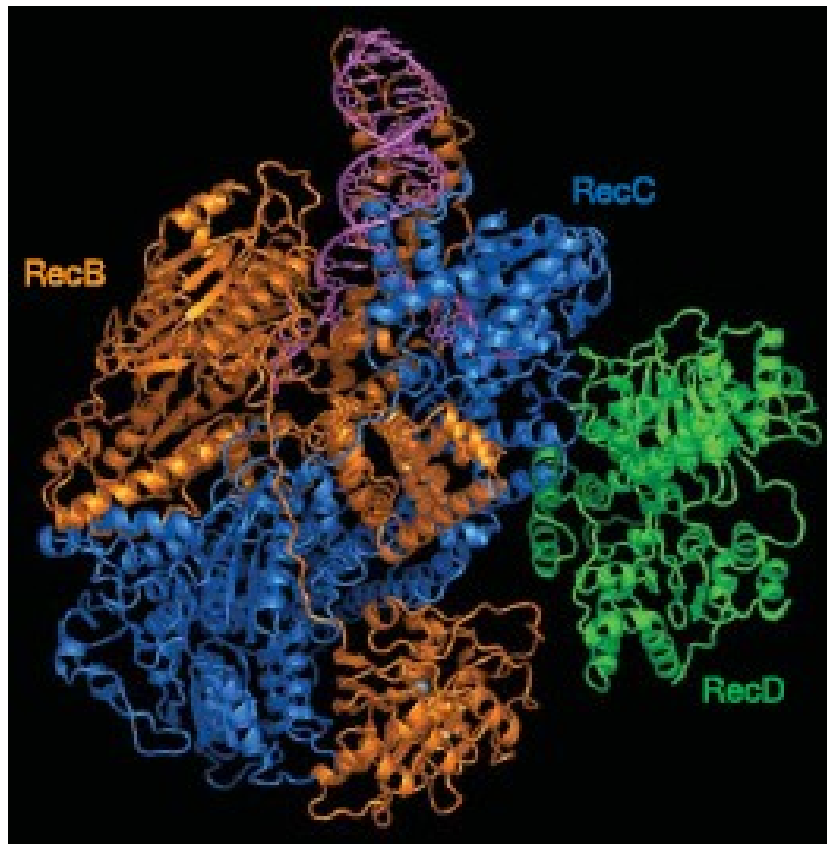


Homologická rekombinácia (Homologous recombination - HR)



1. MRX sa viaže na zlomené konce DNA.
 2. Nukleolytická degradácii 5' reťazcov.
 3. Vázba RPA na 3' jednoláknové konce
 4. Rad52 nakladá Rad51 rekombinázu na ssDNA (Srs2 helikáza odstraňuje Rad51).
 5. Rad51-filament hľadá homologickú DNA (Rad54).
 6. Tvorba D-loopu
 7. Predĺženie 3' konca filamentu (DNA polymeráza δ)
- SDSA (synthesis dependent strand annealing)- novo nasyntetizované 3' vlákno je vytlačené z D-loopu (Srs2 a Mph1 helikázy) a nasadne naspäť na druhý koniec dvojláknového zlomu (Rad52). Nasleduje syntéza DNA (Pol δ) a ligácia.
 - DSBR (double strand break repair) – tvorba double Holliday Junction - rozrušený Sgs1-Top3-Rmi alebo rozštiepený endonukleázami (Mus81-Mms4, Slx1-Slx4, Rad1-Rad10, Yen1).

RecBCD komplex - baktérie



- Multifunkčný enzýmový komplex ktorý u baktérií spracováva konce dvojláknového zlomu v DNA
- Helikázovou aktivitou rozplieťa dvojláknovú DNA
- Nukleázovou aktivitou vlákna štiepi
- Stimuluje väzbu RecA rekombinázy na 3' jednoláknovú DNA

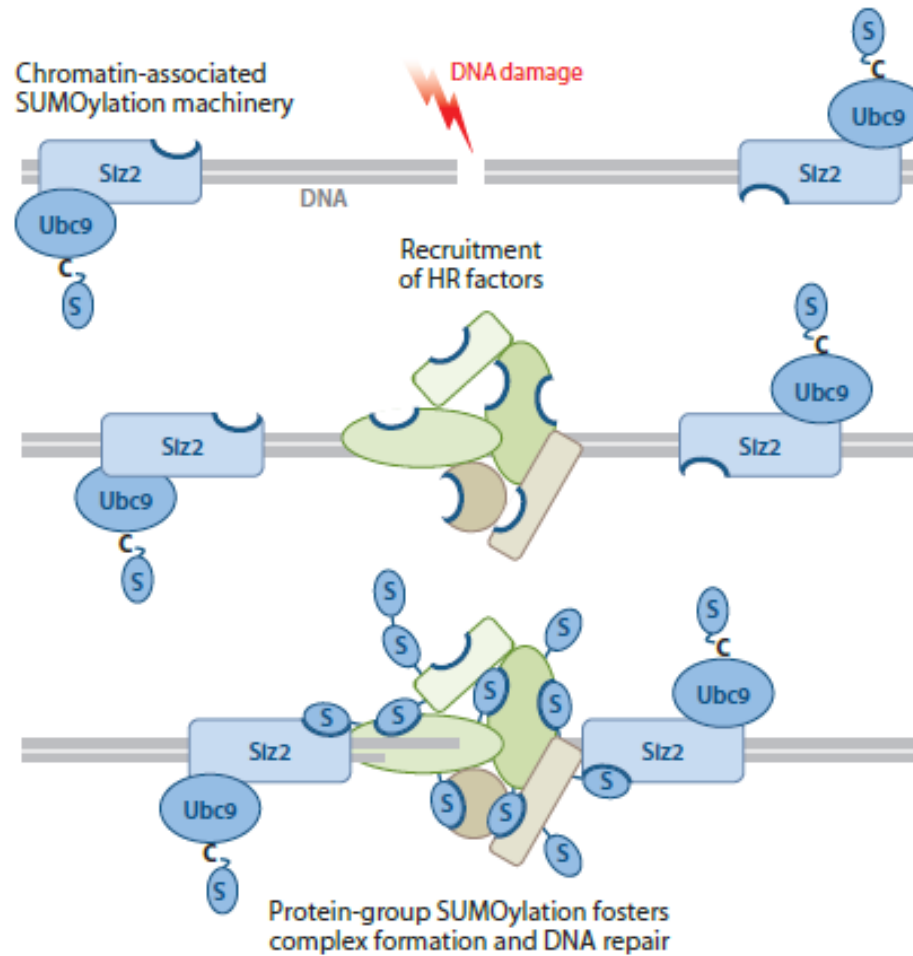
Poškodenie DNA indukuje sumoyláciu DNA-opravných proteínov

Sumoylation Targets among Proteins Involved in DNA Replication, Repair, and the DNA Damage Response That Were Identified in This Study

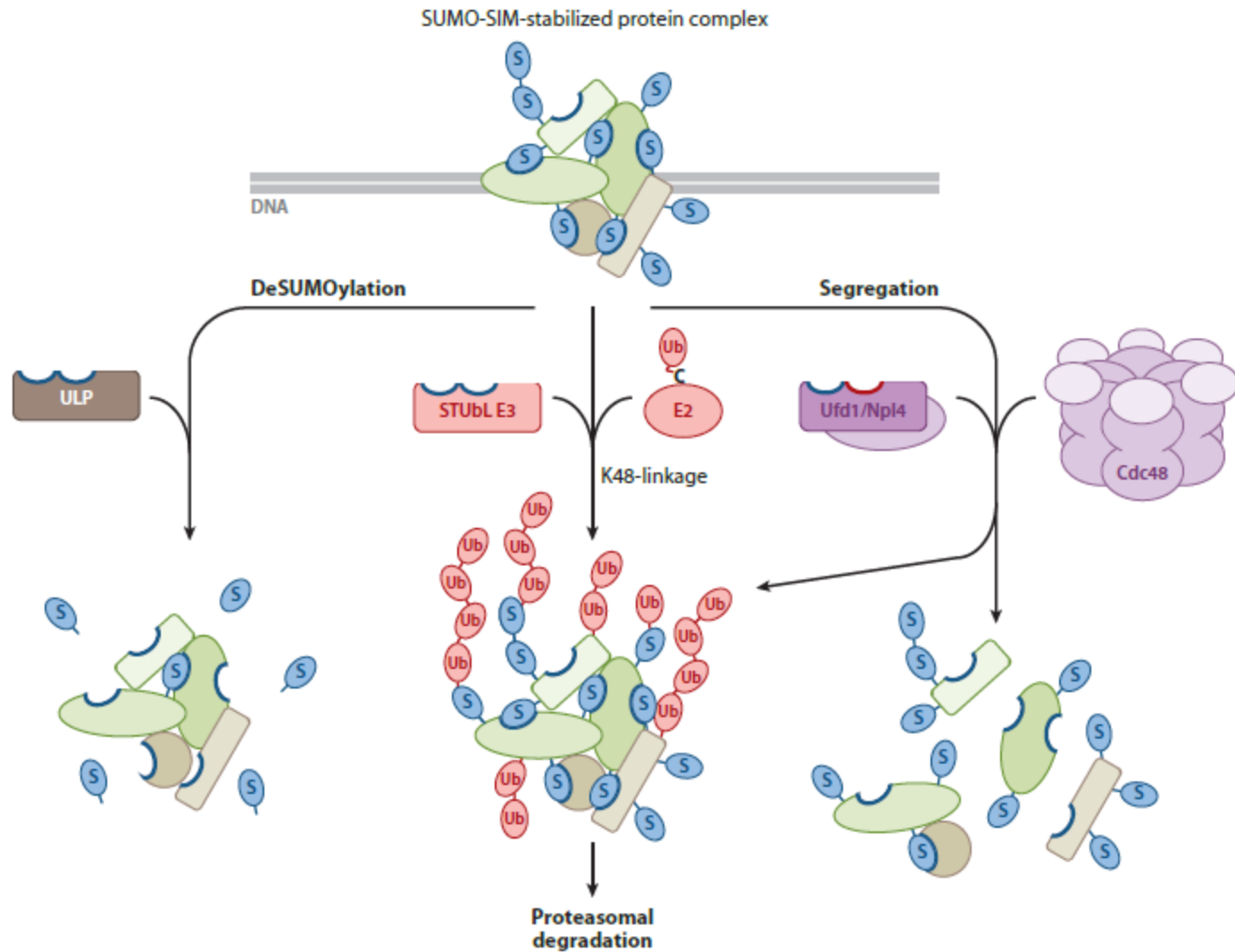
Process	Sumoylated Proteins
Replication	<i>Dpb11</i> , <i>Mcm2</i> , <u><i>Mcm4</i></u> , <i>Mcm5</i> , <u><i>Mcm6</i></u> , <i>Mgs1</i> , <i>Orc2</i> , <i>Orc4</i> , <i>Orc6</i> , <u><i>Pif1</i></u> , <u><i>Pol1</i></u> , <i>Pol2</i> , <i>Pol12</i> , <i>Pol32</i> , <i>Pri1</i> , <i>Pri2</i> , <u><i>Rad27</i></u> , <i>Rfc2</i> , <i>Rfc3</i> , <u><i>Rtt107</i></u> , <u><i>Slx4</i></u> (<i>Abf1</i> , <i>Orc3</i> , <i>Pob3</i> , <i>Rfc1</i> , <i>Tof2</i> , <i>Top1</i> , <i>Top2</i>)
Recombinational repair	<u><i>Mre11</i></u> , <i>Pso2</i> , <i>Rad50</i> , <u><i>Sae2</i></u> , <i>Saw1</i> , <i>Smc6</i> , <u><i>Xrs2</i></u> , <i>Yen1</i> (<i>Rad52</i> , <i>Rad59</i> , <u><i>Rfa1</i></u> , <u><i>Rfa2</i></u> , <i>Sqs1</i> , <i>Smc5</i> , <i>Srs2</i>)
NHEJ	<i>Lif1</i> (<i>Yku70</i> , <i>Yku80</i>)
Postreplicative repair	<i>Rad5</i> (<i>Pol30</i>)
Base excision repair	<i>Apn1</i> , <i>Mag1</i> , <i>Ogg1</i> (<i>Ntg1</i>)
Nucleotide excision repair	<i>Rad1</i> , <i>Rad2</i> , <i>Rad3</i> , <i>Rad4</i> , <i>Rad7</i> , <i>Rad25</i> , <i>Ssl1</i> , <i>Tfb2</i> (<i>Rad16</i>)
Mismatch repair	<u><i>Mlh1</i></u> , <i>Msh3</i> , <u><i>Msh6</i></u> , <i>Pms1</i>
Checkpoint signaling	<u><i>Ddc1</i></u> , <u><i>Dun1</i></u>

Proteins that were previously found to be sumoylated are in parentheses. Italic: sumoylation is induced by MMS. Bold: human homologs are sumoylated (Golebiowski et al., 2009). Underline: phosphorylated by checkpoint kinases (See Table S1). Note that several proteins function in multiple processes but are assigned to one category for simplicity.

SUMO stabilizuje DNA-opravné komplexy (HR)

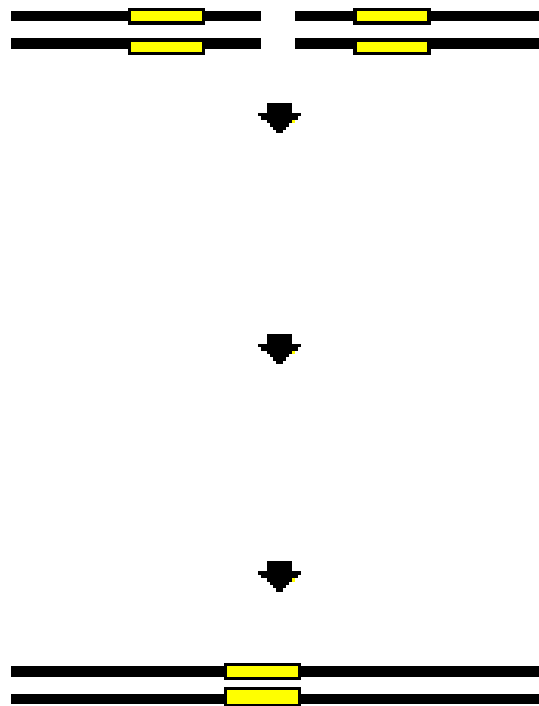


Následný rozpad komplexů stabilizovaných pomocí SUMO-SIM interakcí

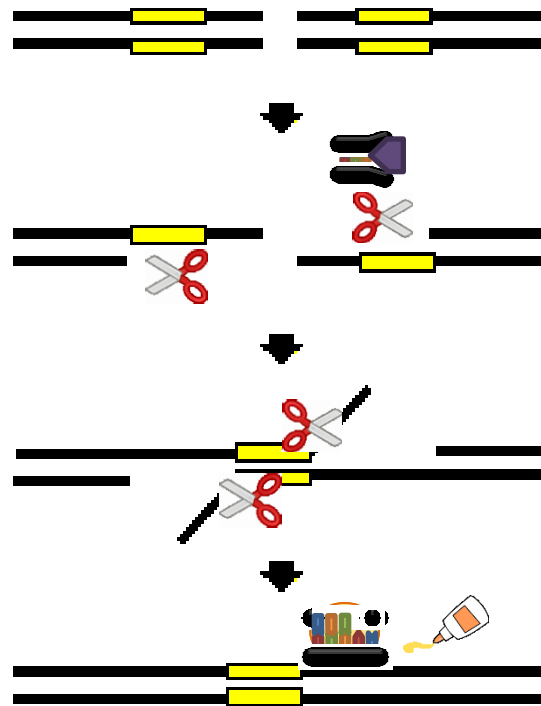


Prelínanie opravných dráh - SSA

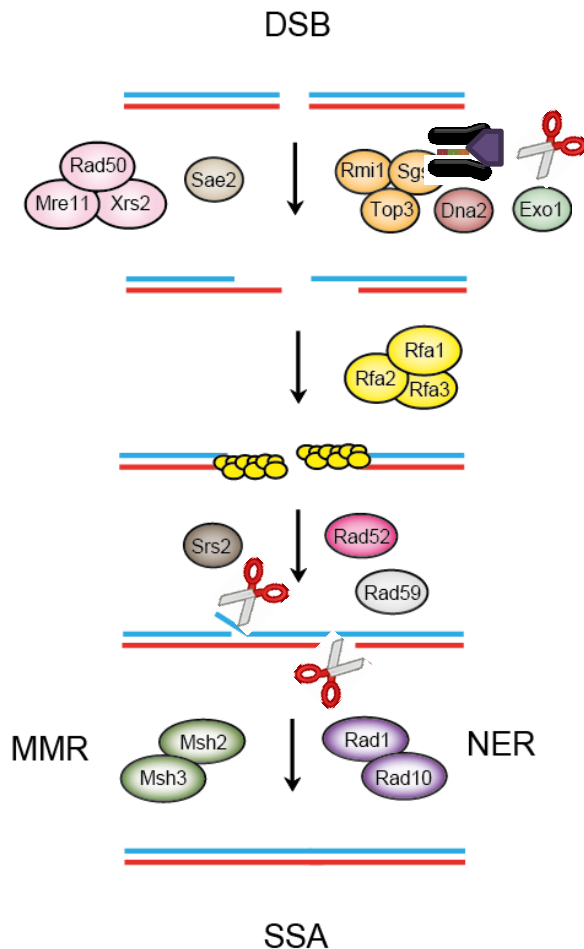
- Single-strand annealing (SSA) prebieha ak dôjde k zlomu v mieste dlhších repetícií DNA
- Na základe komplementarity dochádza k väzbe medzi dvoma reťazcami obsahujúcimi susedné repetície
- SSA vždy vedie k delícii DNA sekvencie ohraničenej repetíciami
- Ako prebieha



Prelínanie opravných dráh - SSA



Prelínanie opravných dráh - SSA

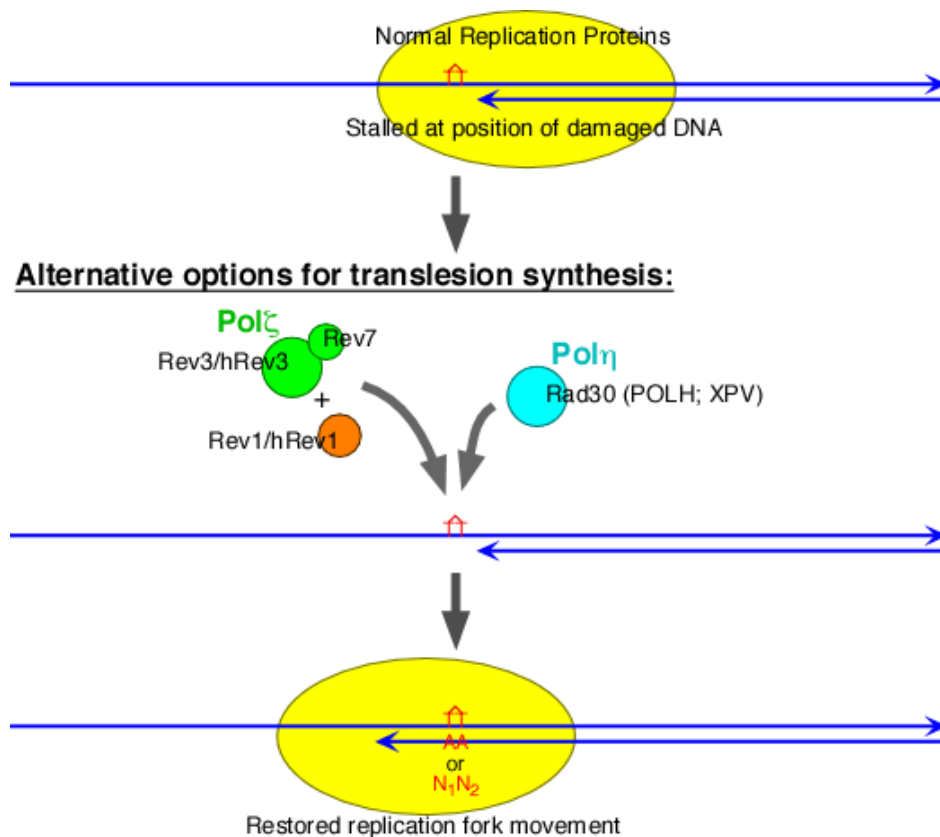


- Single-strand annealing (SSA) prebieha ak dôjde k zlomu v mieste dlhších repetícií DNA (rDNA)
1. Resekcia 5' vlákna na koncoch zlomenej DNA ako u **HR**.
 2. Priame nasadnutie jednovláknových 3' reťazcov, (Rad52 a Rad59)
 3. Nehomologické sekvencie na koncoch sú odstránené Rad1-Rad10 endonukleázou - **NER**. Štiepenie je stimulované **MMR** proteínmi Msh2-Msh3.
 4. Syntéza DNA a ligácia.
- SSA vždy vedie k delícii DNA sekvencie ohraničenej repetíciou - je mutagénna.

Translázna DNA syntéza

Translesion synthesis (TLS)

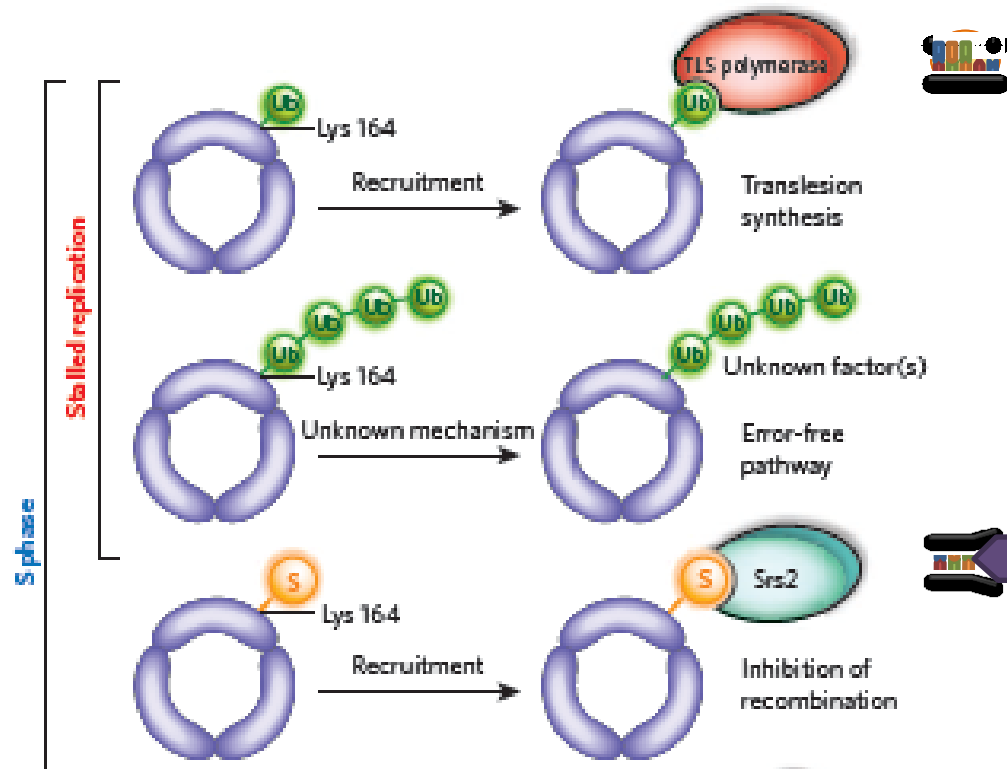
- Proces umožňujúci toleranciu poškodenej DNA.
- Postupujúca replikačná vidlica narazí na neopraviteľné poškodenie DNA → v syntéze treba pokračovať lebo:



1. Dlhodobé zablokovanie replikačnej vidlice vedie k smrti bunky.
 2. Replikácia poškodenej DNA vytvorí sesterskú chromatídu ktorá môže byť využitá ako templát pre opravu HR.
- Štandardné DNA polymerázy (δ , ϵ) sú nahradené transláznyimi polymerázami, ktoré vedia vložiť bázy aj oproti poškodeným nukleotidom (pyrimidínové diméry, abázické miesto, oxidovaná, deaminovaná báza).
 - Niektoré TLS polymerázy zaraďujú správne bázy oproti špecifickým poškodeniam (Pol η), iné často zaraďujú nesprávne bázy (ξ , Rev1).

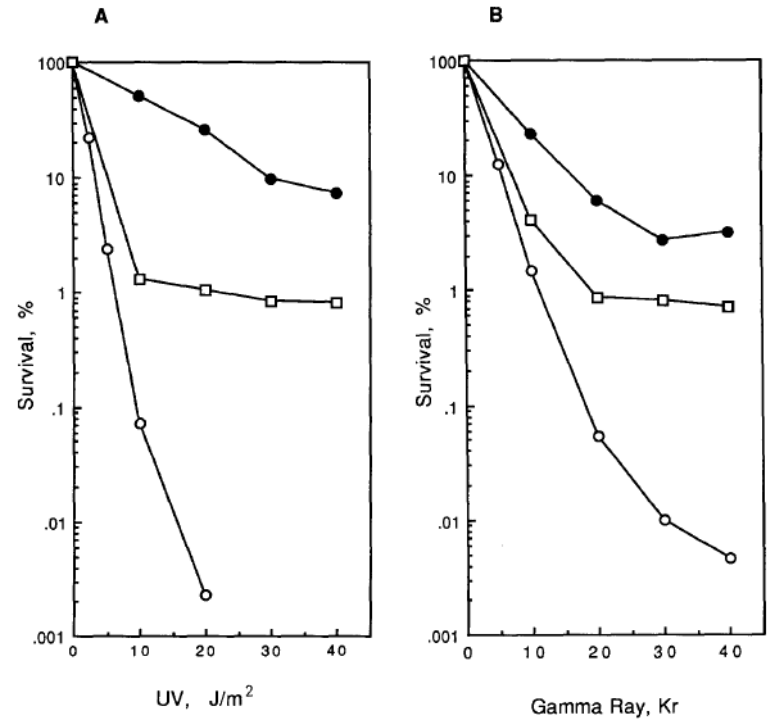
Translézna DNA syntéza

regulácia tvorby DNA opravných komplexov pomocou PTMs

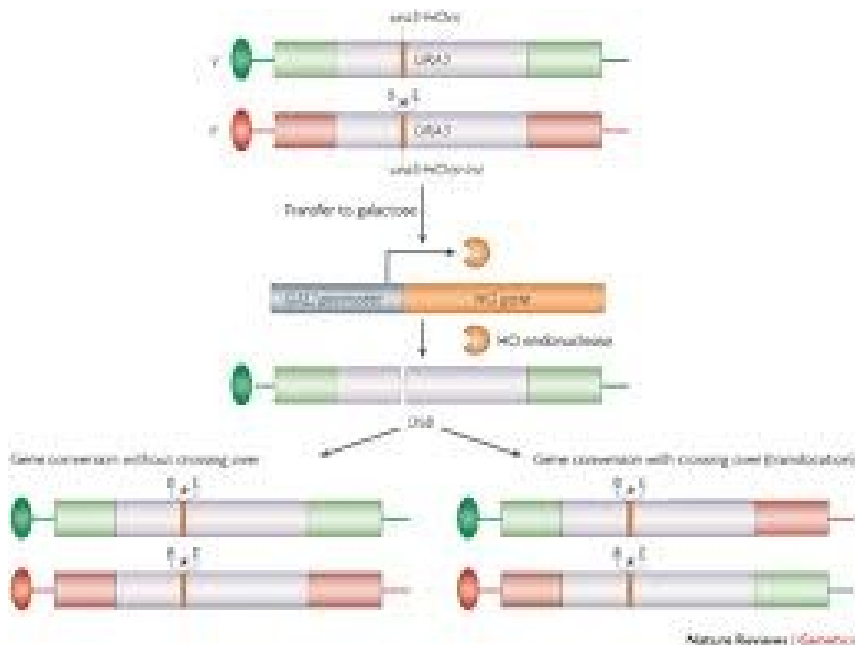


Metódy štúdia DNA opravných mechanizmov

- Genetická analýza mutantov a ich vzťahov
 - Analýza citlivosti mutantov na látky spôsobujúce špecifické poškodenie DNA
 - Eseje využívajúce úpravu DNA



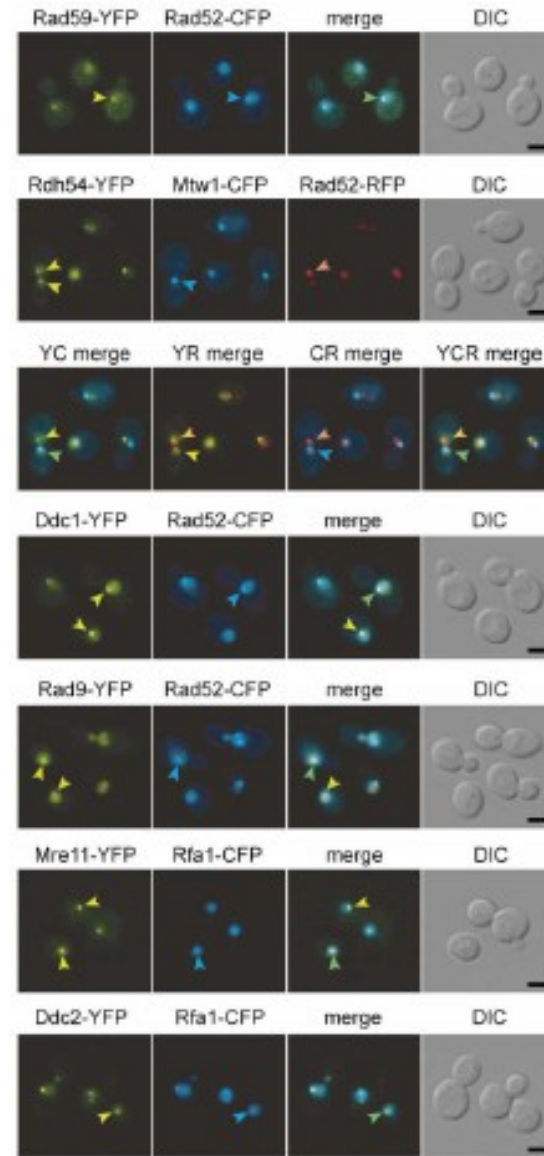
Schiestl *et al.*, *Genetics*, 1990



Barzel & Kupiec, *Nat. Rev. Gen.*, 2008

Metódy štúdia DNA opravných mechanizmov

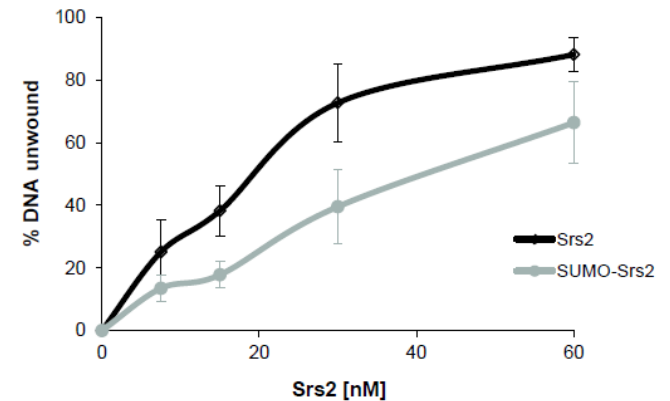
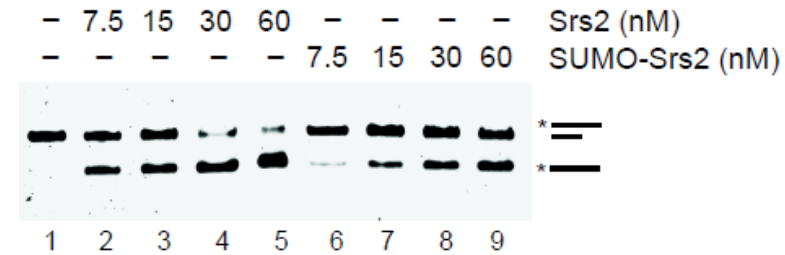
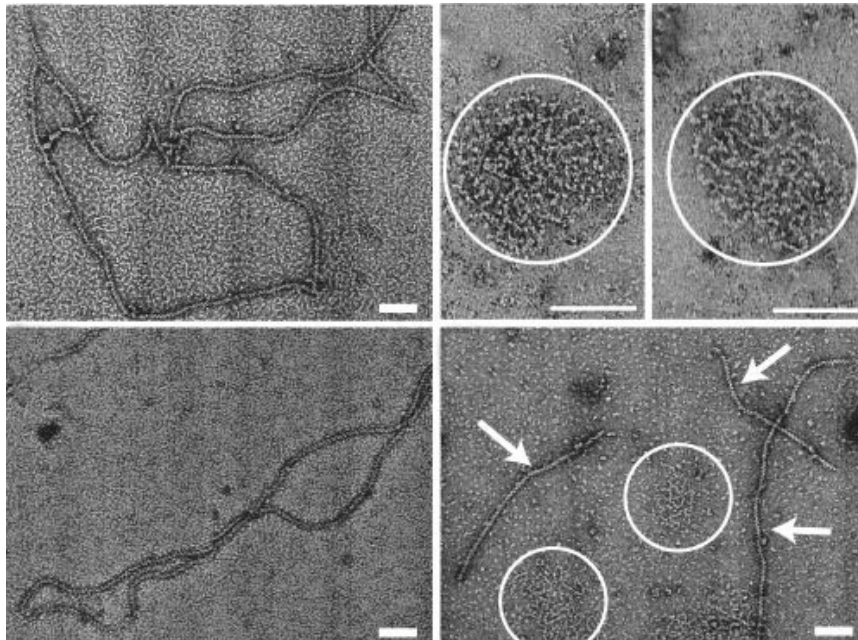
- Fluorescenčná mikroskopia
– analýza (ko)lokalizácie
DNA opravných proteínov v bunke,
ich časovej následnosti



Metódy štúdia DNA opravných mechanizmov

- *in vitro* metódy

- Analýza biochemickej aktivity
 - Väzba na DNA
 - Nukleázová esej
 - Helikázová esej
 - Polymerázová esej
- Rekonštrukcia opravných mechanizmov
- Elektrónová mikroskopia



Kolesár, unpublished

Krejci *et al.*, *Nature*, 2003