

Mário ůpírek, mspirek@med.muni.cz

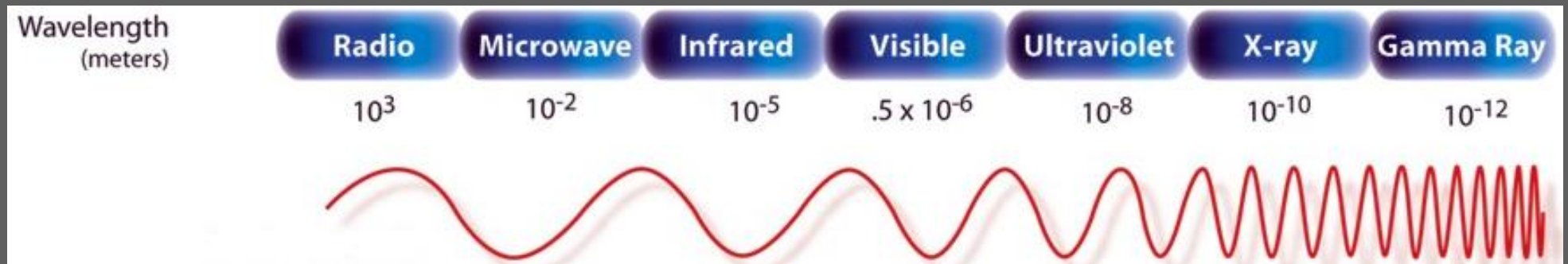


Oprava DNA, homologní rekombinace

Pozkodenie DNA

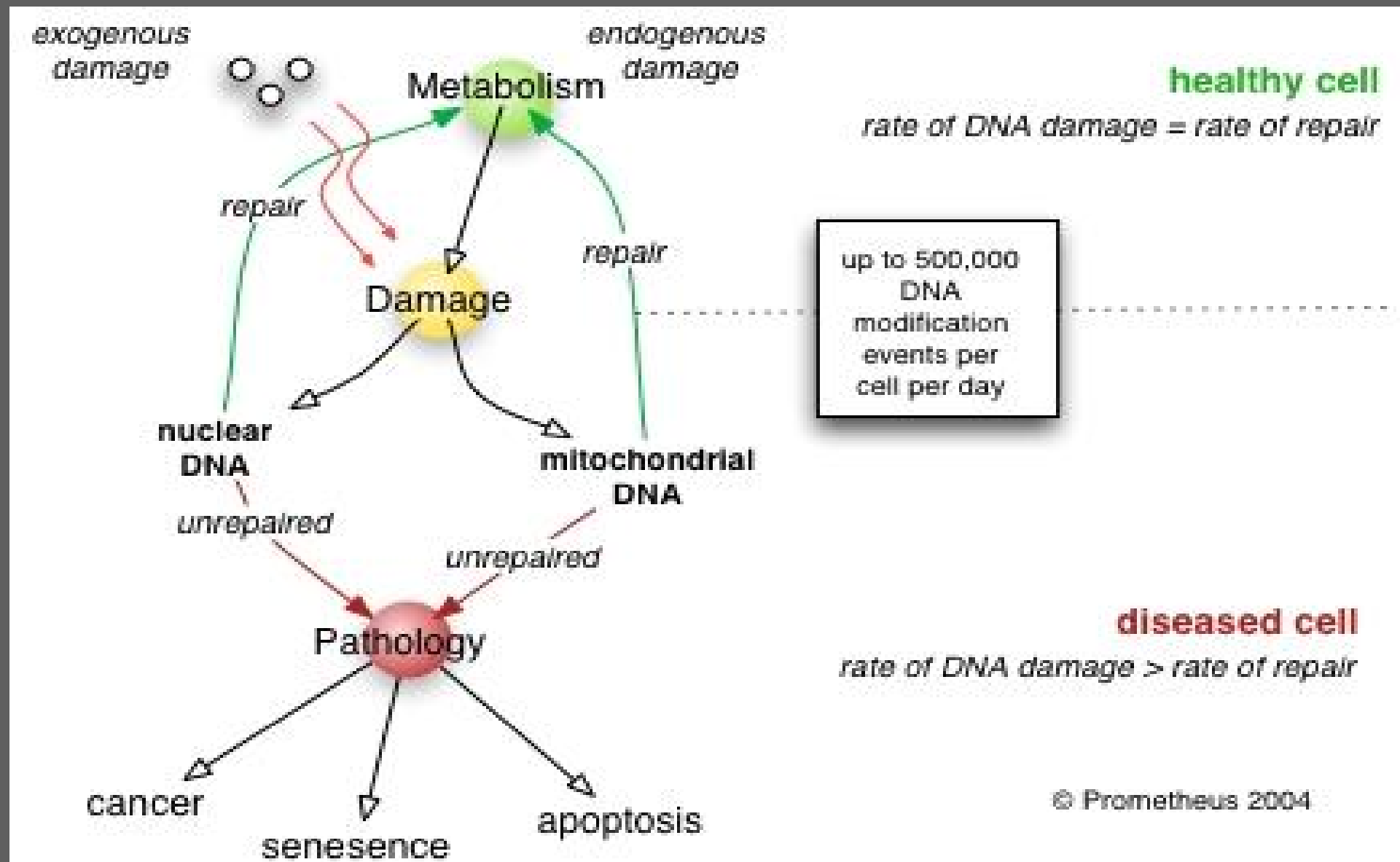
Zdroje poškodenia:

1. endogénne - chyby pri replikácii DNA
 - bukový metabolizmus (kyslíkové radikály)
2. exogénne - UV, röntgenové a gamma žiarenie (ionizujúce žiarenie, rádioterapia)



- mutagénne chemikálie (chemoterapia)
- vírusy

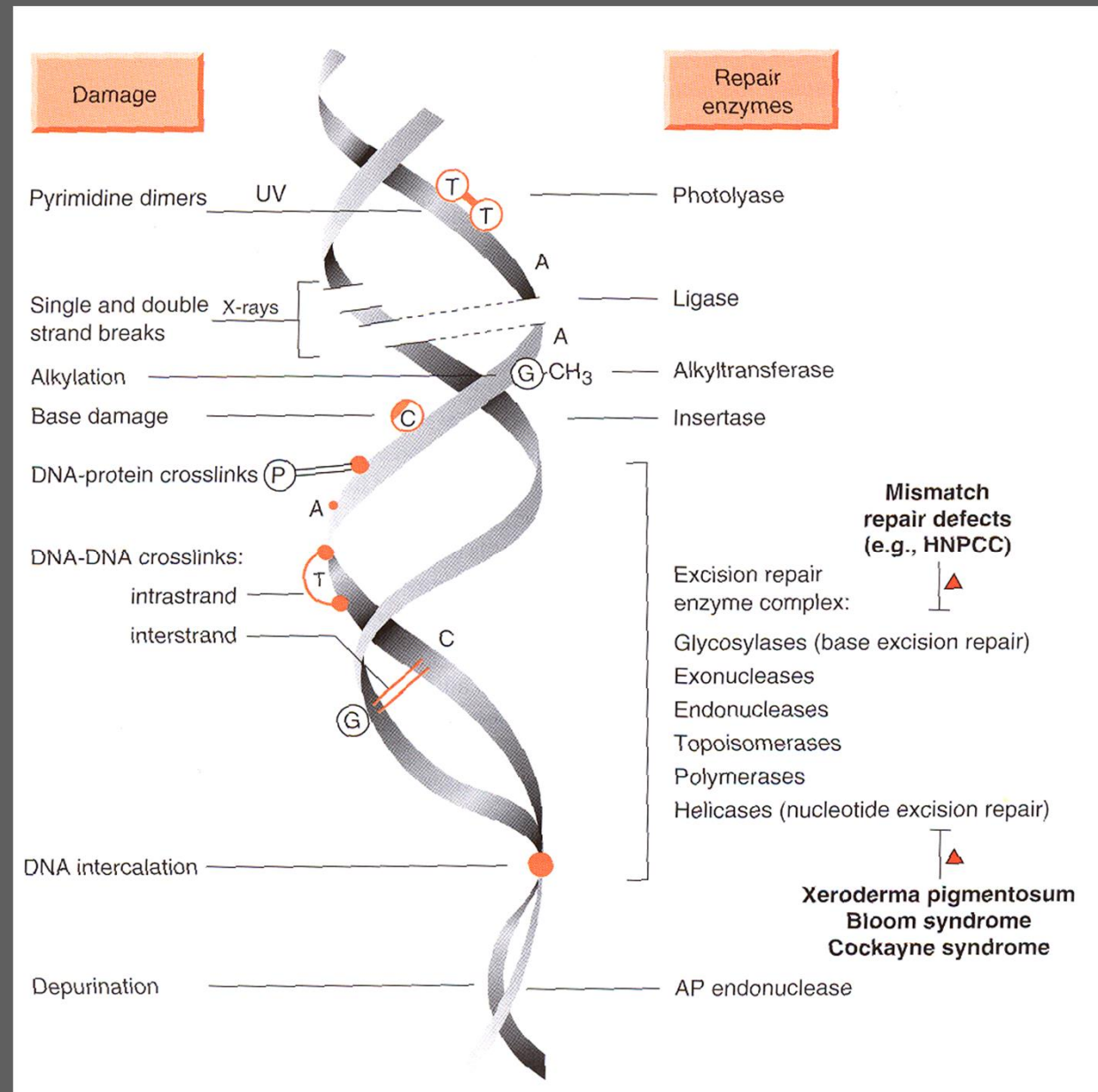
Dôsledky neopravenej DNA



Rozsah poškodenia DNA v bunke

- “ strata bázy
- . 26,000
- “ deaminácia cytozinu
- . 1 000
- “ alkylácia báz
- . 10 000
- “ dimerizácia pyrimidínov
- . 50 000
- “ ssDNA zlomy
- . 100,000

Celkom ~ 500 000
poškození/de /bunku



Mutácie ako zdroj rakoviny

V ľudskom tele za život dochádza k asi 10^{16} bunkových delení

V prostredí bez mutagénov je pravdepodobnosť vzniku mutácie na bunkové delenie a gén 10^{-6} , za život je to 10^{10} mutácií na gén

Typy mutácií:

Génové (bodové) mutácie

Chromozómové (zštruktúrne aberácie)

Genómové (numerické aberácie chromozómov)



DNA opravné dráhy

Direct reversals

Excision repair

- Base Excision Repair (BER)
- Nucleotide Excision Repair (NER)

Mismatch repair (MMR)

- replication errors

Recombinational repair (HR and NHEJ)

- multiple pathways
- double strand breaks and interstrand cross-links

Tolerance mechanisms

- lesion bypass (TLS)
- recombination

DNA-opravné proteínové komplexy

- É Na opravu sú potrebné sú asne rôzne enzymatické aktivity
- É Vzájomnou väzbou enzymaticky aktívnych a adaptorových proteínov vznikajú DNA-opravné komplexy zpecifické k danému poškodeniu DNA
- É Katalytické domény obsiahnuté v opravných komplexoch vedú k zvráteniu DNA poškodení
- É Po oprave sa komplex opäť rozpadá na podjednotky
- É Pri regulácii reverzibilnej formácie komplexov sú dôležité post-translačné modifikácie proteínov (fosforylácia, sumoylácia, ubikvitinácia,...).

Enzýmy opravujúce DNA

Glykozylázy

≠tiepia N-glykozidickú väzbu - odstraňujú poškodené bázy

Nukleázy . exo / endo

≠tiepia fosfodiesterové väzby medzi nukleotidmi DNA.

Helikázy

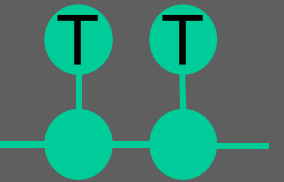
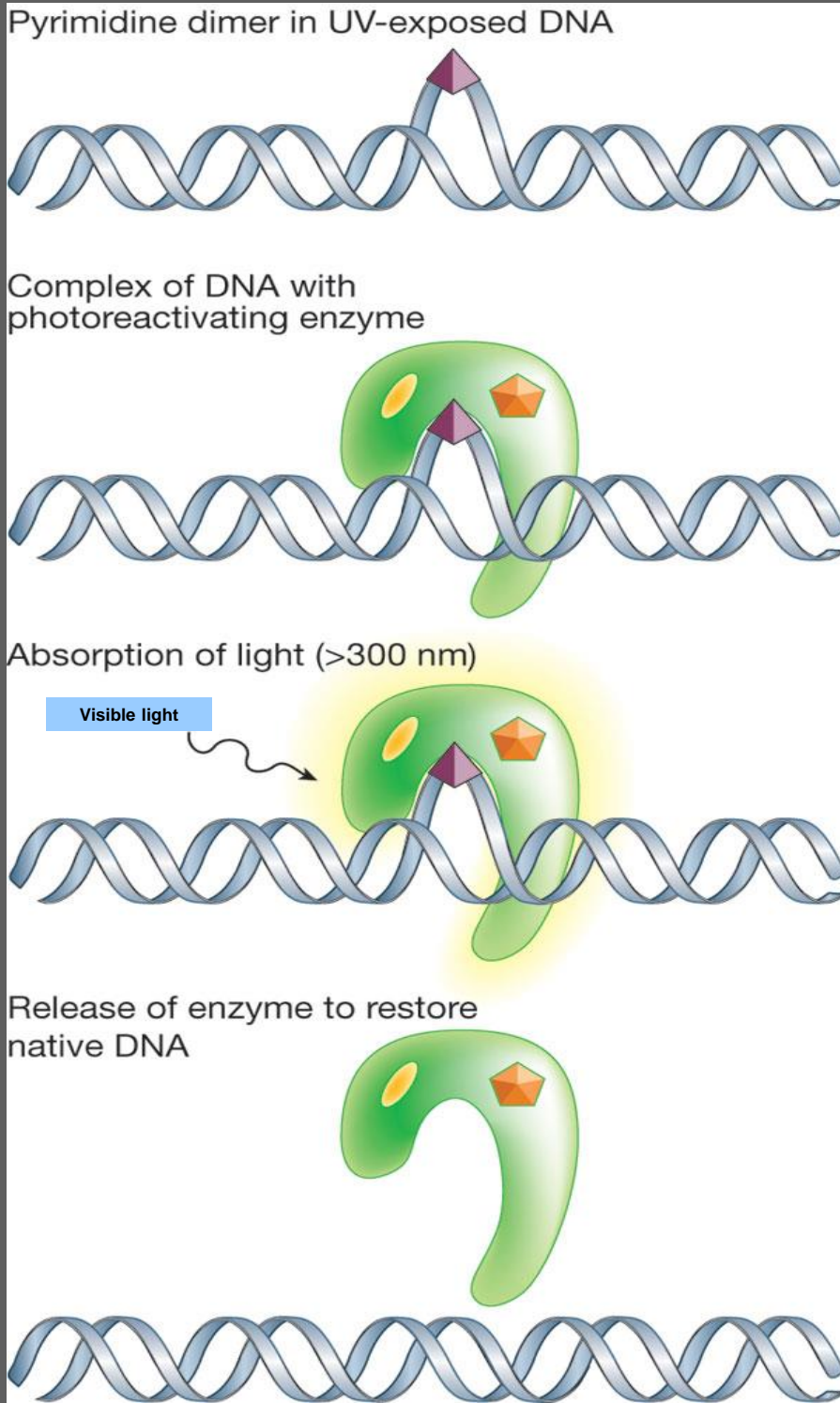
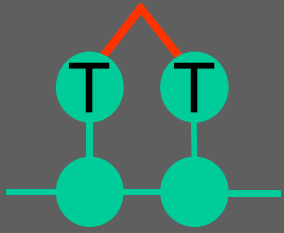
Odštieľujú dve komplementárne vlákna DNA.

Polymerázy

DNA-dependentné nucleotidyltransferázy - Syntetizujú reťazec DNA z nukleotidov.

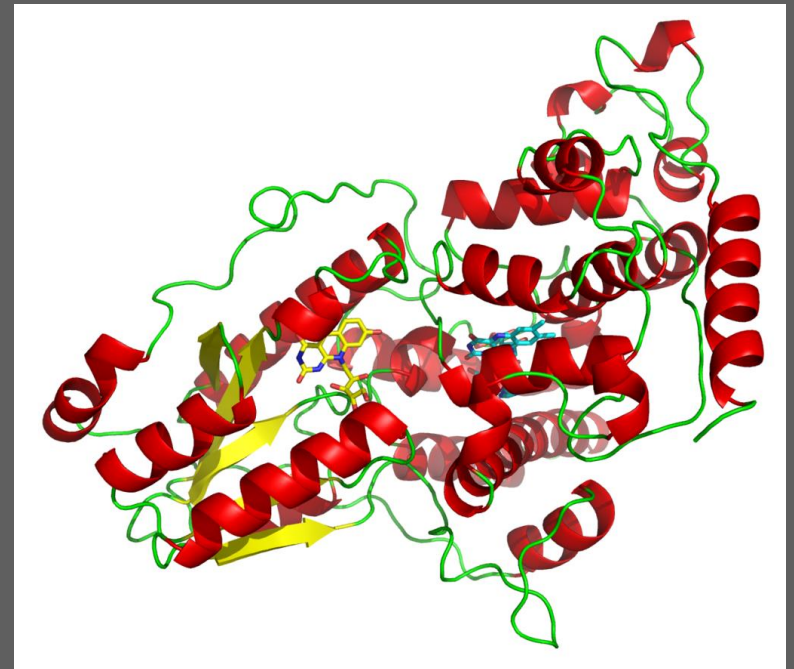
Ligázy

Katalyzujú tvorbu fosfodiesterových väzieb . spájajú dokopy dve vlákna DNA.



Direct reversal priama oprava: fotoreaktivácia

Oprava pyrimidínových dimérov enzýmom fotolyázou s využitím energie svetla



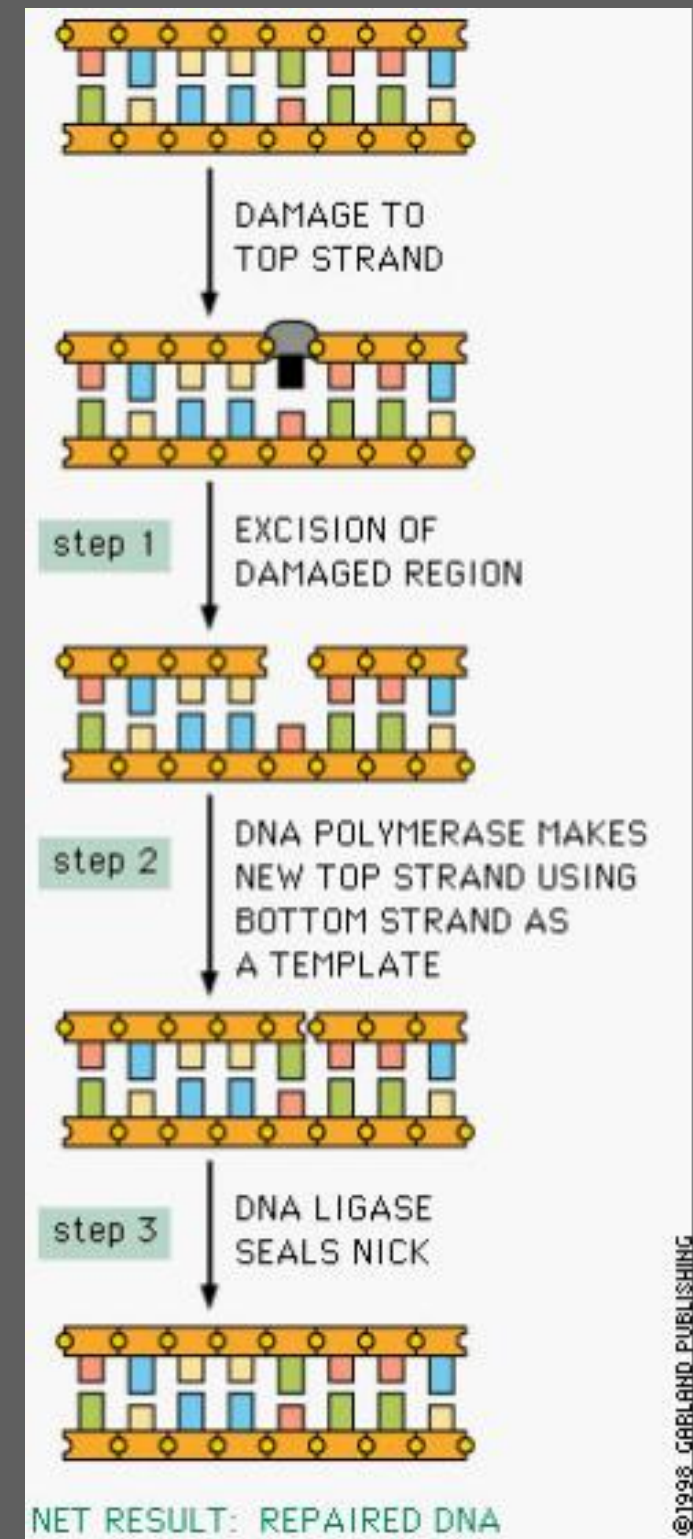
light-harvesting kofaktory:
FADH (žltý) and 8-HDF (modrá)

Base Excision Repair (BER)

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

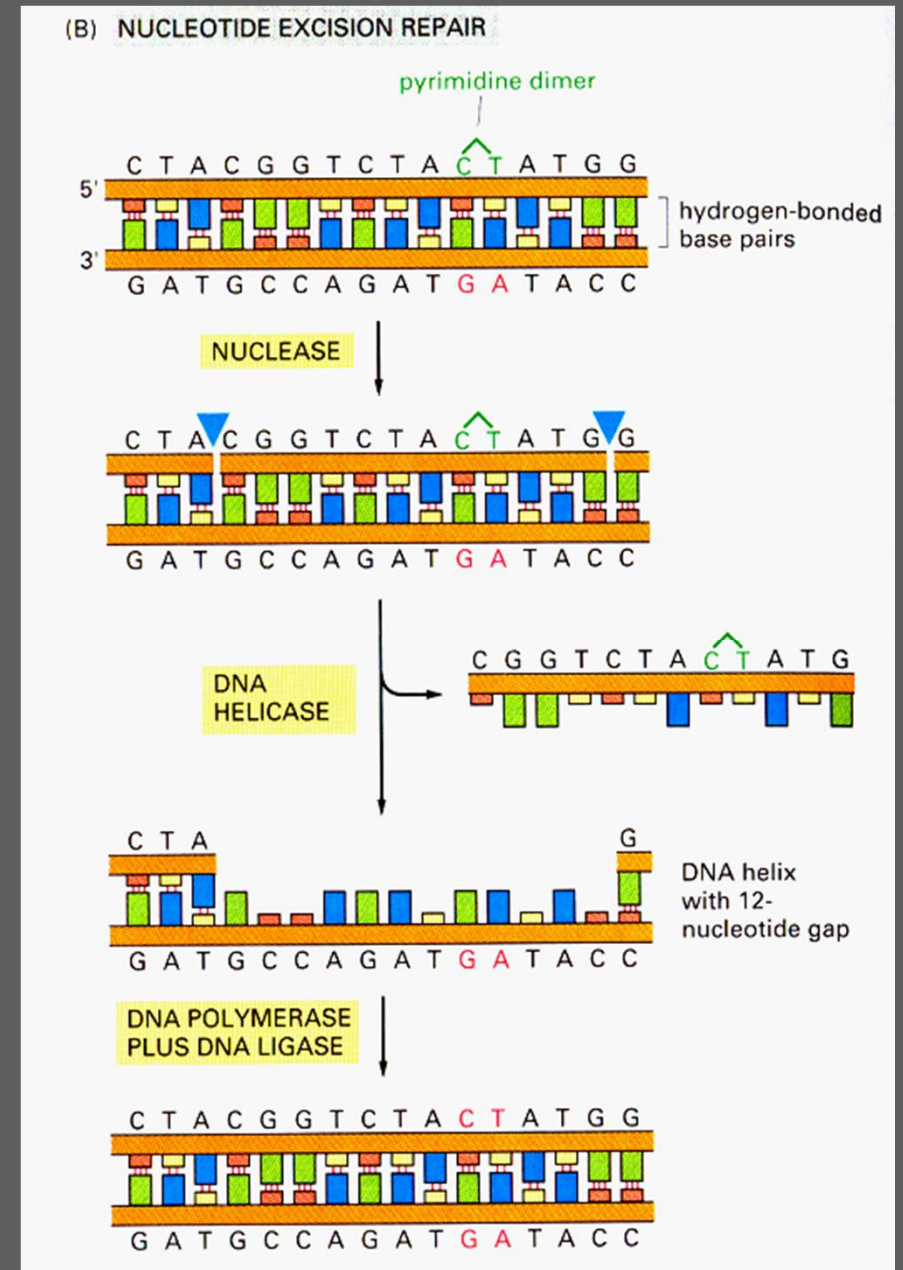
1. Rozoznanie a odstránenie chybného miesta
2. Vyplnenie medzery
3. Spojenie retazcov DNA

Kroky 2-3 sú takmer rovnaké u rôznych typov opráv, ale pri prvom kroku sa zúčastujú špecifické protínové komplexy pre danú opravnú dráhu

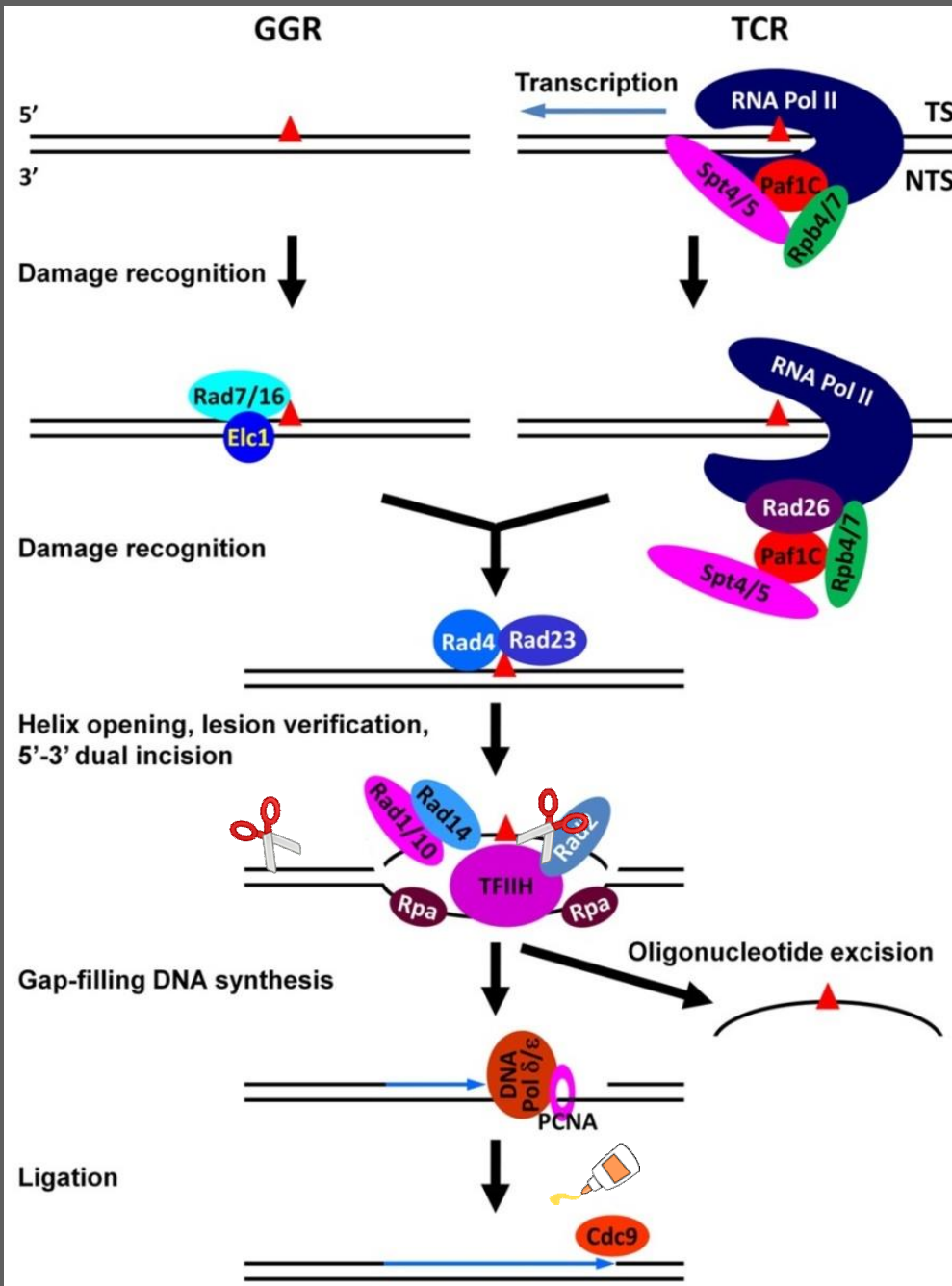


Nucleotide Excision Repair

1. Rozpoznanie proteínovými faktormi
2. Vystrihnutie poškodeného miesta aj s okolím v oboch smeroch (nukleáza).
3. Rozmotanie DNA (DNA-helikáza)
4. Syntéza na základe komplementárneho vlákna
5. Spojenie DNA ligázou



Opravuje vä zle jednore azcové pozkodenia (pyrimidínové diméry, 6,4 fotoprodukty, crosslinky v DNA helixe)



A, globálna genomická (GG-NER)

B, Transkrip ne-spriahnutá (TC-NER).

1. Rozpoznanie pozkodenia GG k TC
2. TFIIH rozpletie DNA (helicáza)
3. Rad2 (XPG) ztiepi DNA na 3´ konci pozkodenia, 5´ koniec rozttiepi Rad1-Rad10 (XPF-ERCC1) komplex (endonukleázy). Dvojité ztiepenie uvo ní krátky jednovláknový úsek (25-30 nt) DNA na ktorom sa pozkodenie nachádza
4. DNA polymeráza (alebo) dosyntetizuje chýbajúcu sekvenciu
5. DNA ligáza Cdc9 (Ligase-I) spojí DNA.

Poruchy NER u ľudí

Xeroderma Pigmentosum

“ Výskyt: 1-4 na milión

“ Genetika: autozomálne recesívne (XPA-G)

“ Nemoc: nemoci kože; malignancia kože; neurologické a abnormality očí



Cockayne-B Syndrome

1 na milión

autozomálne recesívne, gény (XPA, B, D & G)

Zastavený rast, mentálne retardácia, dwarfism, hluchota, atrofie očí, intracranial calcifications; (bez zvýšenia vzniku rakovín)

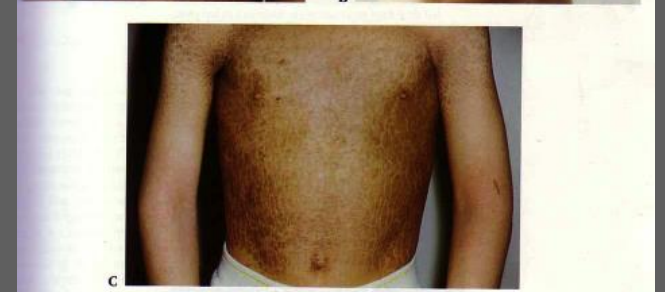


Trichothiodystrophy

1-2 na milión

autozomálne recesívne, (TTDA, XPB a D)

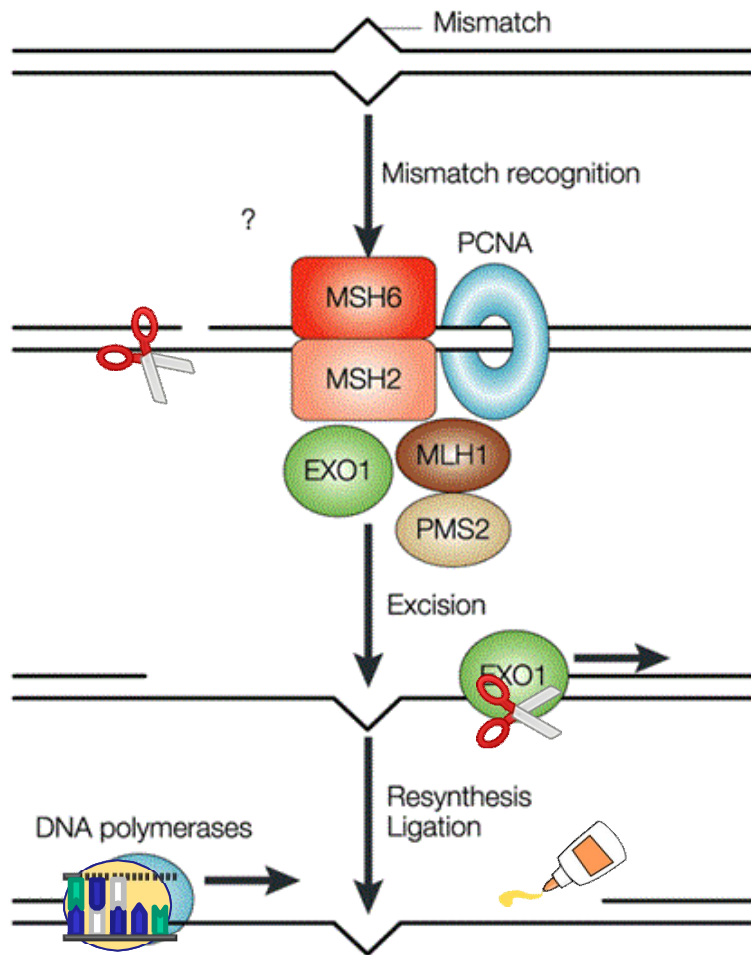
sulfur deficient brittle hair, mental and spomalenie rastu, peculiar face with receding chin, ichthyosis; (bez zvýšenia vzniku rakovín)



Oprava chybného zaradenia báz

Mismatch repair (MMR)

Opravuje nesprávne zaradené bázy pri chybách DNA replikácie a rekombinácie.



Rozoznáva pôvodné a novo nasyntetizované 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 homológy a ztiepia dcérske vlákno (endonukleáza)
3. DNA helikáza rozpletie vlákna
4. Exonukleáza (Exo1, ... ?) rozťiepi dcérske vlákno
5. Vyztiepená DNA je znovu nasyntetizovaná DNA polymerázou a pripojená DNA ligázou.

Oprava dvojre azcových zlomov

Vznik: Indukované radiaciou a chemikáliami
Po as replikácie poškodenej DNA
Slúži k iniciácii meiotickejrekombinácie
Sú as imunitnej odpovedi

Dvojre azcové zlomy DNA sú ve mi záva0ným druhom poškodenia - jediný DSB mô0e vies k smrti bunky alebo preusporiadaniu genómu.

Základné DSB-opravné dráhy:

Homologická rekombinácia (HR)

Vä zinou nevedie k chybám a na opravu pou0íva homologickú sekvenciu ako templát.

Je dominantná v S a G2 fáze (sesterská chromatída), u diploidov (homologický chromozóm).

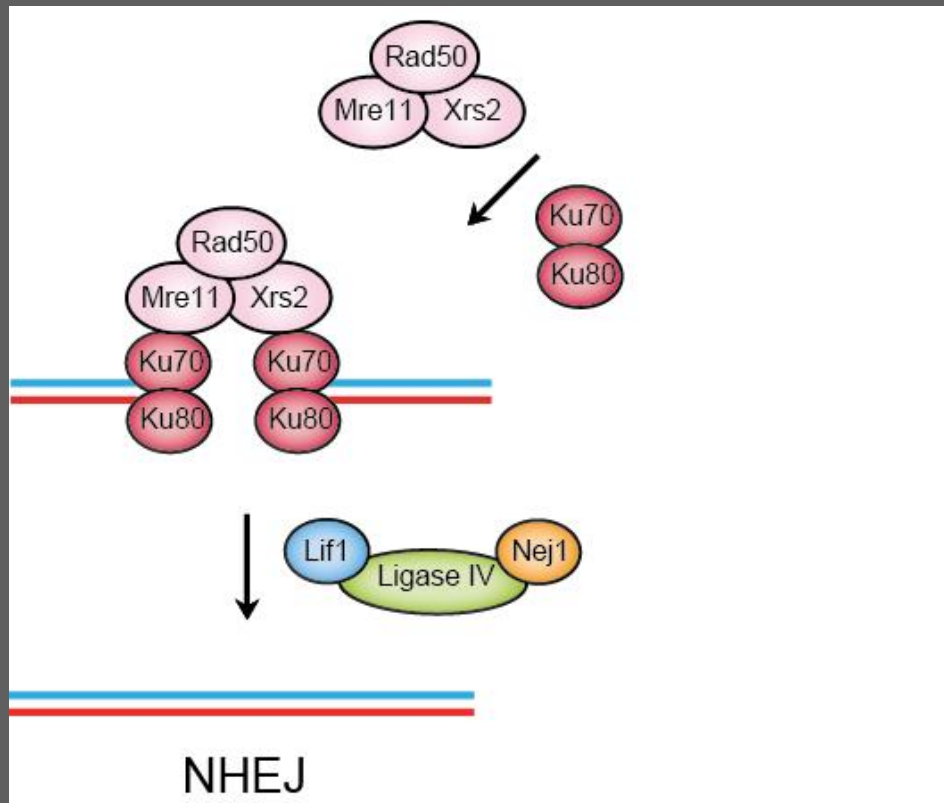
Nehomologické spájanie koncov (NHEJ)

Priamo spája zlomené konce dokopy, asto vedie k strate genetickej informácie.

Dôle0itá hlavne v G1 fáze u haploidov.

Nehomologické spájanie koncov

Non-homologous end joining (NHEJ)



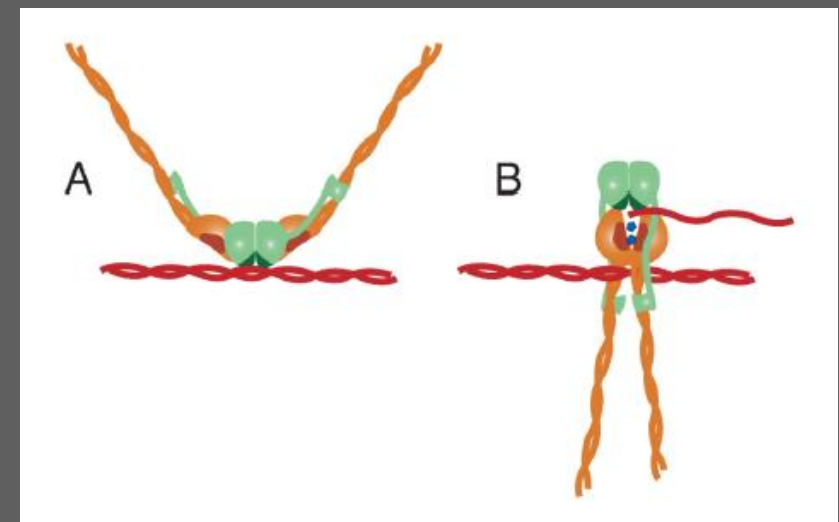
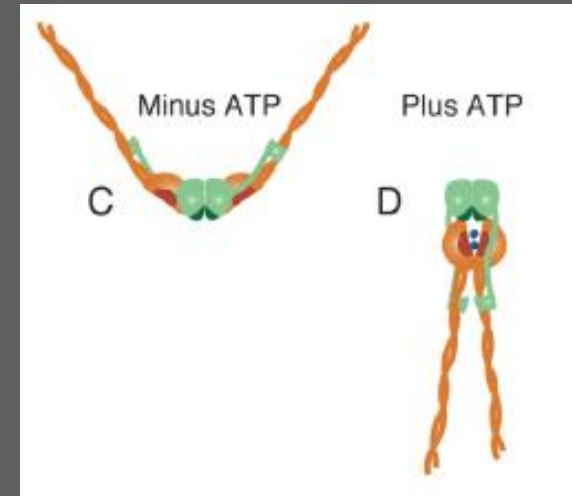
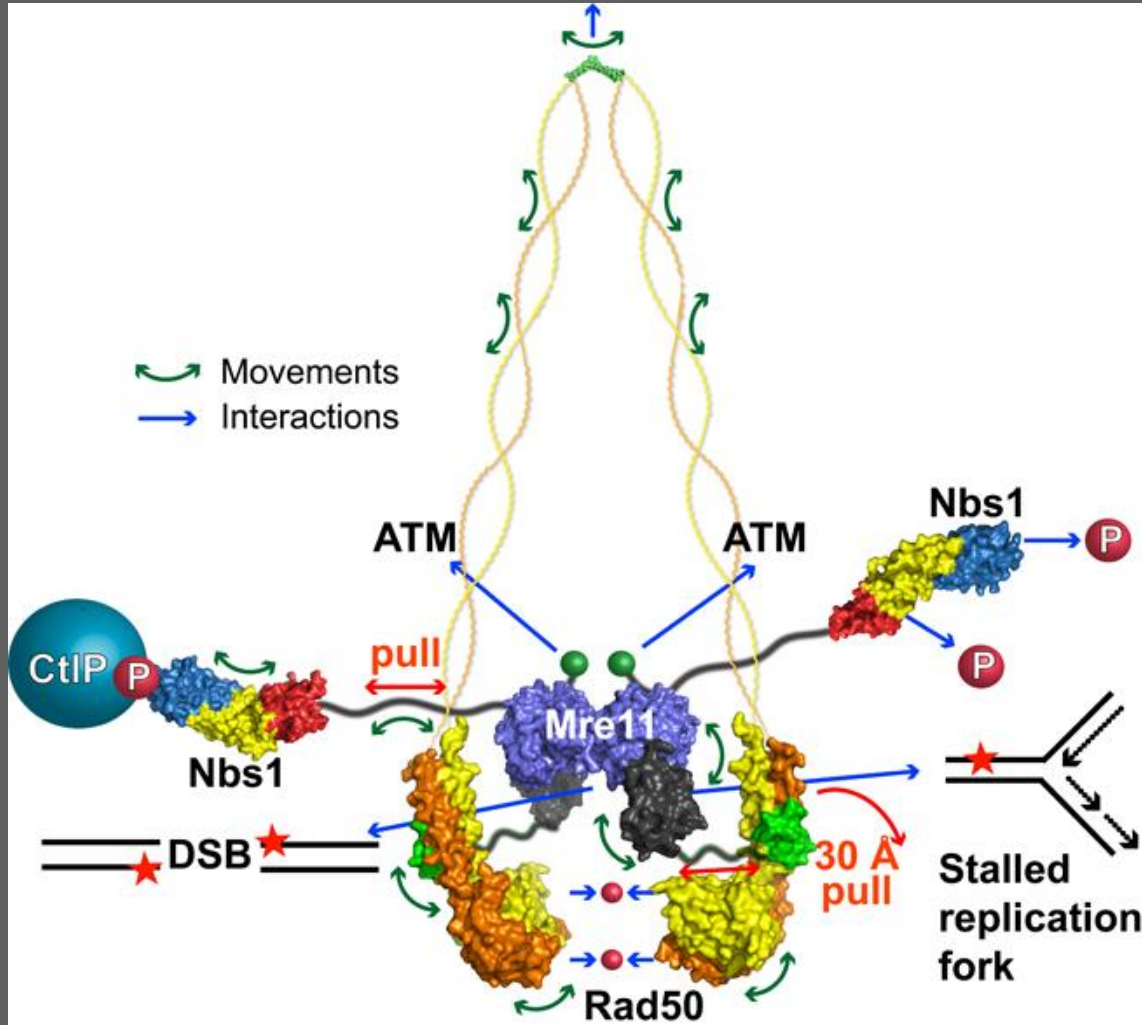
Upravené z Altmannová *et al.*, *Biomolecules*, 2012

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

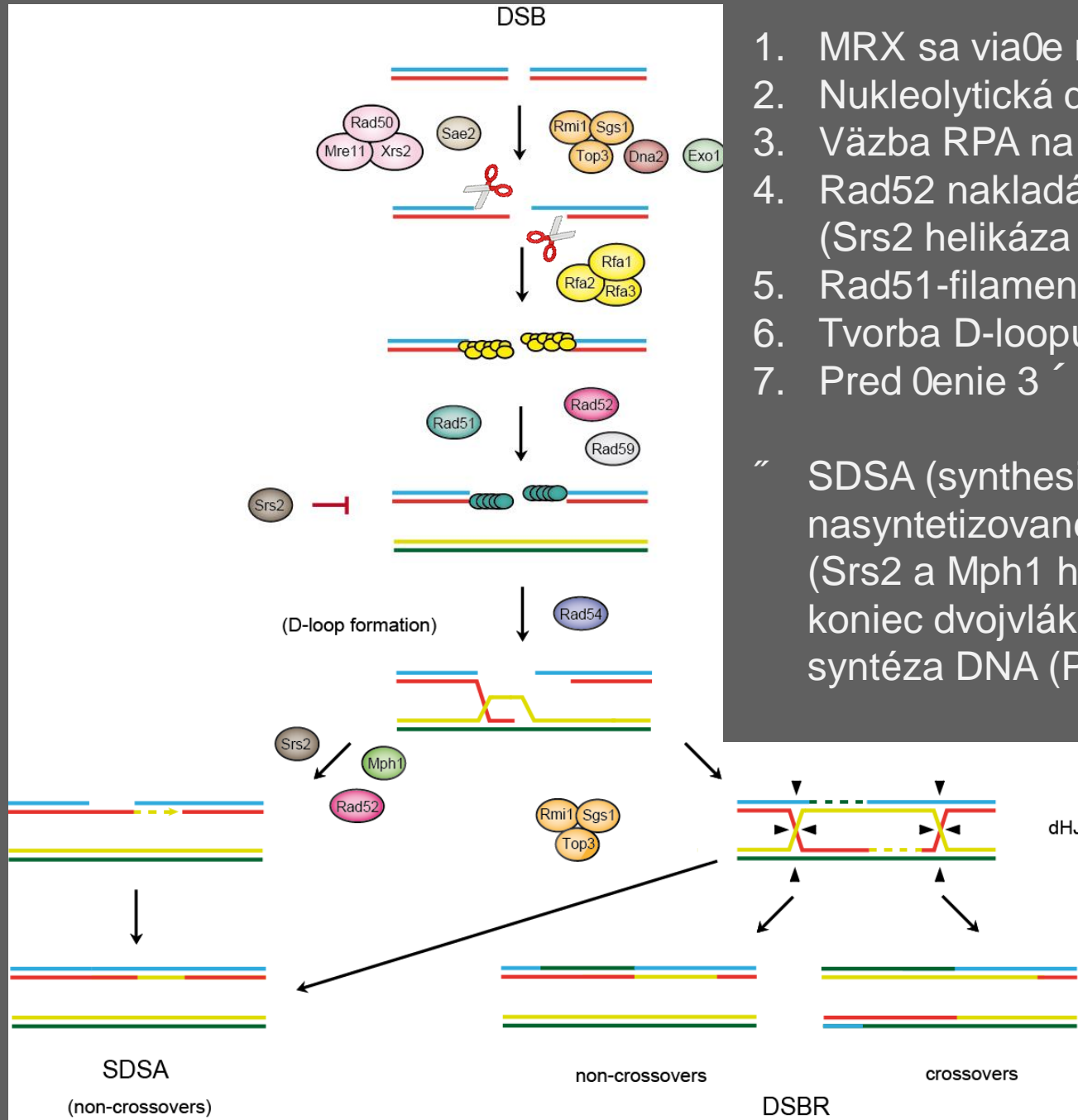
pri oprave nekompatibilných koncov vä zinou dochádza k deléciám alebo inzerciam, vznikajú chyby . error prone

Mre11-Rad50-Xrs2(Nbs1) komplex

rozdielna väzba na DNA v závislosti od väzby ATP



Homologická rekombinácia

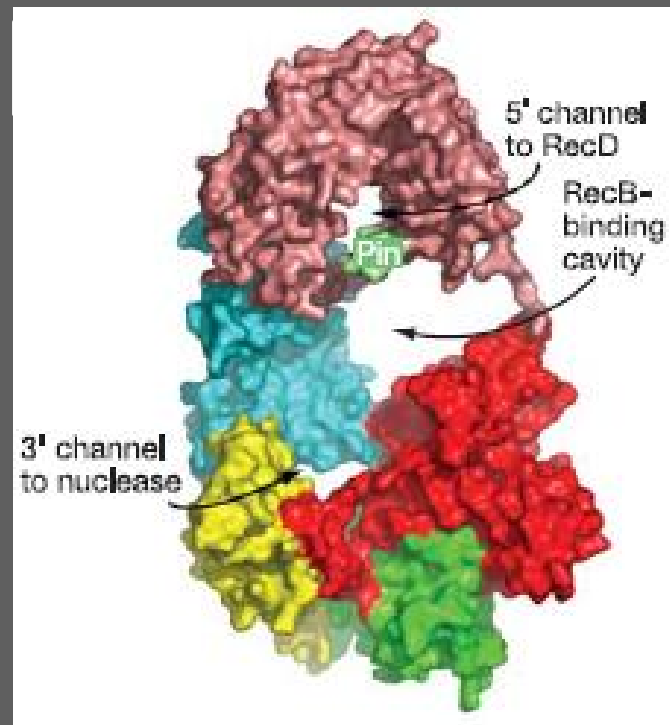
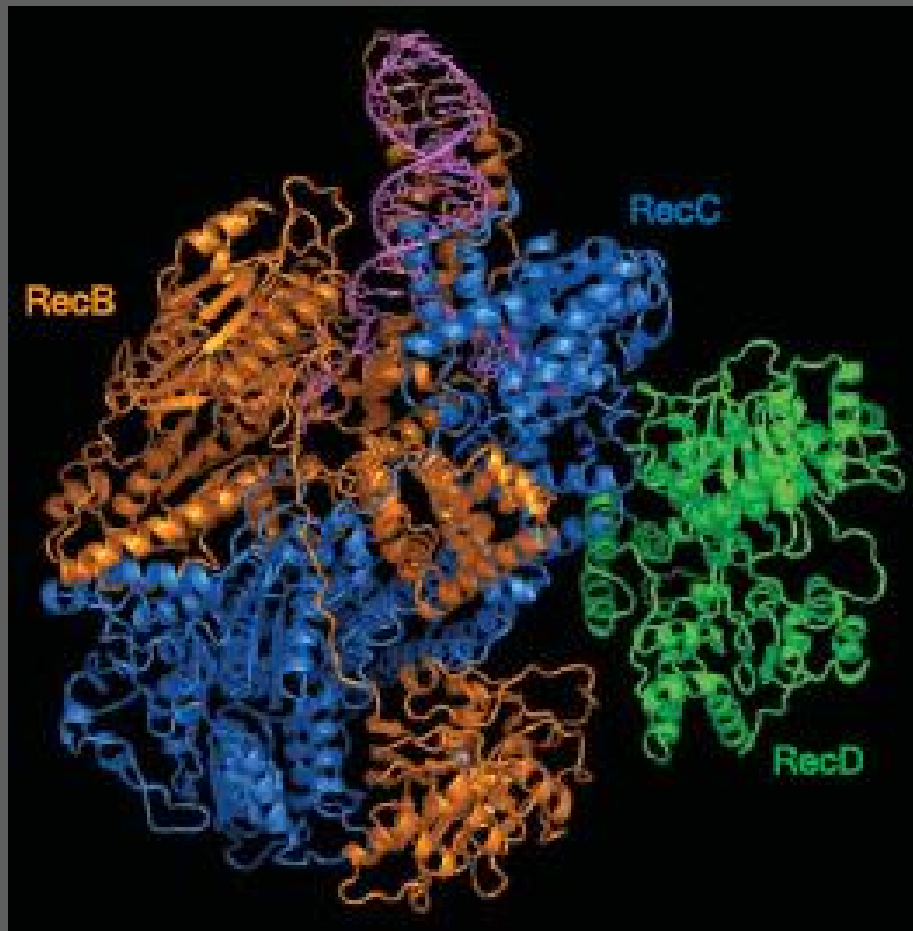


1. MRX sa viaže na zlomené konce DNA.
2. Nukleolytická degradácia 5' koncov.
3. Väzba RPA na 3' jednolákové konce
4. Rad52 nakladá Rad51 rekombinázu na ssDNA (Srs2 helikáza odstraňuje Rad51).
5. Rad51-filament hľadá homologickú DNA (Rad54).
6. Tvorba D-loopu
7. Predčistenie 3' konca filamentu (DNA polymeráza)

SDSA (synthesis dependent strand annealing)- novo nasyntetizované 3' vlákno je vytlačené z D-loopu (Srs2 a Mph1 helikázy) a nasadne naspäť na druhý koniec dvojlákového zlomu (Rad52). Nasleduje syntéza DNA (Pol) a ligácia.

DSBR (double strand break repair) - tvorba double Holliday Junction - rozrušený Sgs1-Top3-Rmi1 alebo rozštípený endonukleázami (Mus81-Mms4, Slx1-Slx4, Rad1-Rad10, Yen1).

RecBCD komplex - baktérie



Singleton *et al.*, *Nature*, 2004

- É Multifunkčný enzýmový komplex ktorý u baktérií spracováva konce dvojvláknového zlomu v DNA
- É Helikázovou aktivitou rozplieta dvojvláknovú DNA
- É Nukleázovou aktivitou vlákna ztiepi
- É Stimuluje väzbu RecA rekombinázy na 3' jednovláknovú DNA

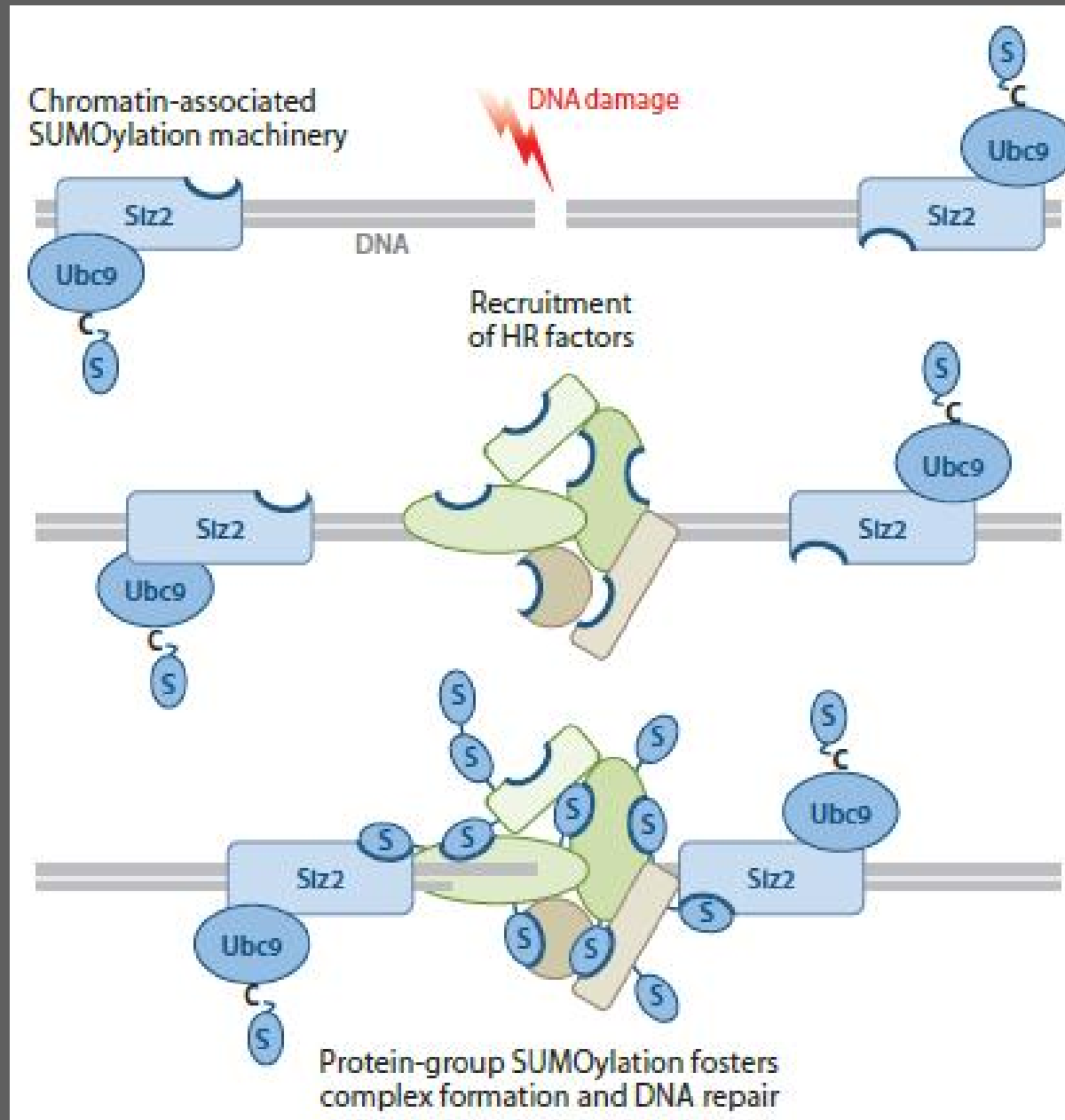
Pozkodenie DNA indukuje sumoyláciu DNA-opravných proteínov

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

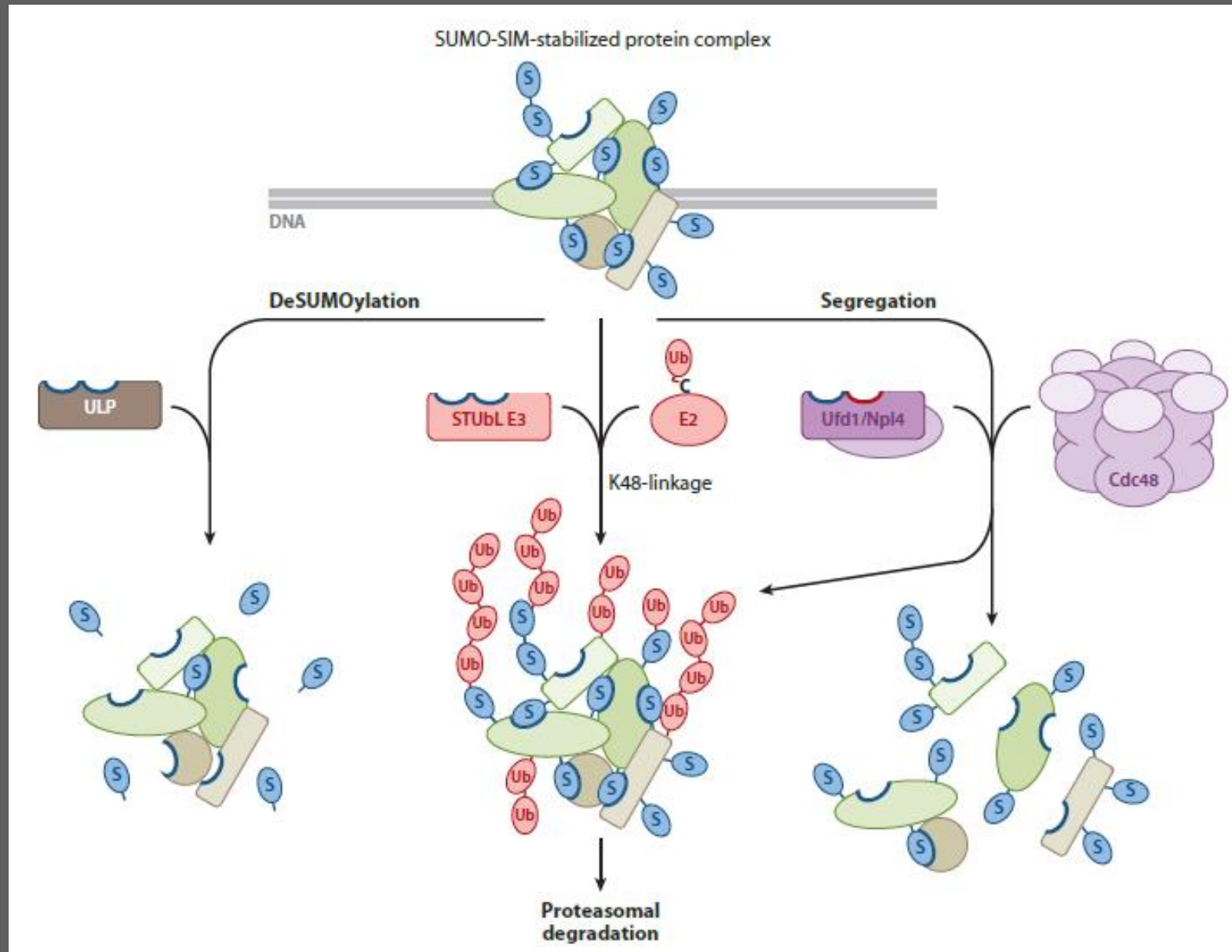
Process	Sumoylated Proteins
Replication	<i>Dpb11</i> , Mcm2 , <u>Mcm4</u> , Mcm5, <u>Mcm6</u> , <i>Mgs1</i> , <i>Orc2</i> , <i>Orc4</i> , <i>Orc6</i> , <u>Pif1</u> , <u>Pol1</u> , Pol2, Pol12, Pol32, <i>Pri1</i> , <i>Pri2</i> , Rad27 , <i>Rfc2</i> , <i>Rfc3</i> , <u>Rtt107</u> , <u>Slx4</u> (Abf1 , <i>Orc3</i> , <i>Pob3</i> , <i>Rfc1</i> , <i>Tof2</i> , <i>Top1</i> , <i>Top2</i>)
Recombinational repair	<u>Mre11</u> , <i>Pso2</i> , <i>Rad50</i> , <u>Sae2</u> , <i>Saw1</i> , <i>Smc6</i> , <u>Xrs2</u> , <i>Yen1</i> (<i>Rad52</i> , <i>Rad59</i> , <u>Rfa1</u> , <u>Rfa2</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> (Rad16)
Mismatch repair	<u>Mlh1</u> , <i>Msh3</i> , <u>Msh6</u> , <i>Pms1</i>
Checkpoint signaling	<u>Ddc1</u> , <u>Dun1</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.

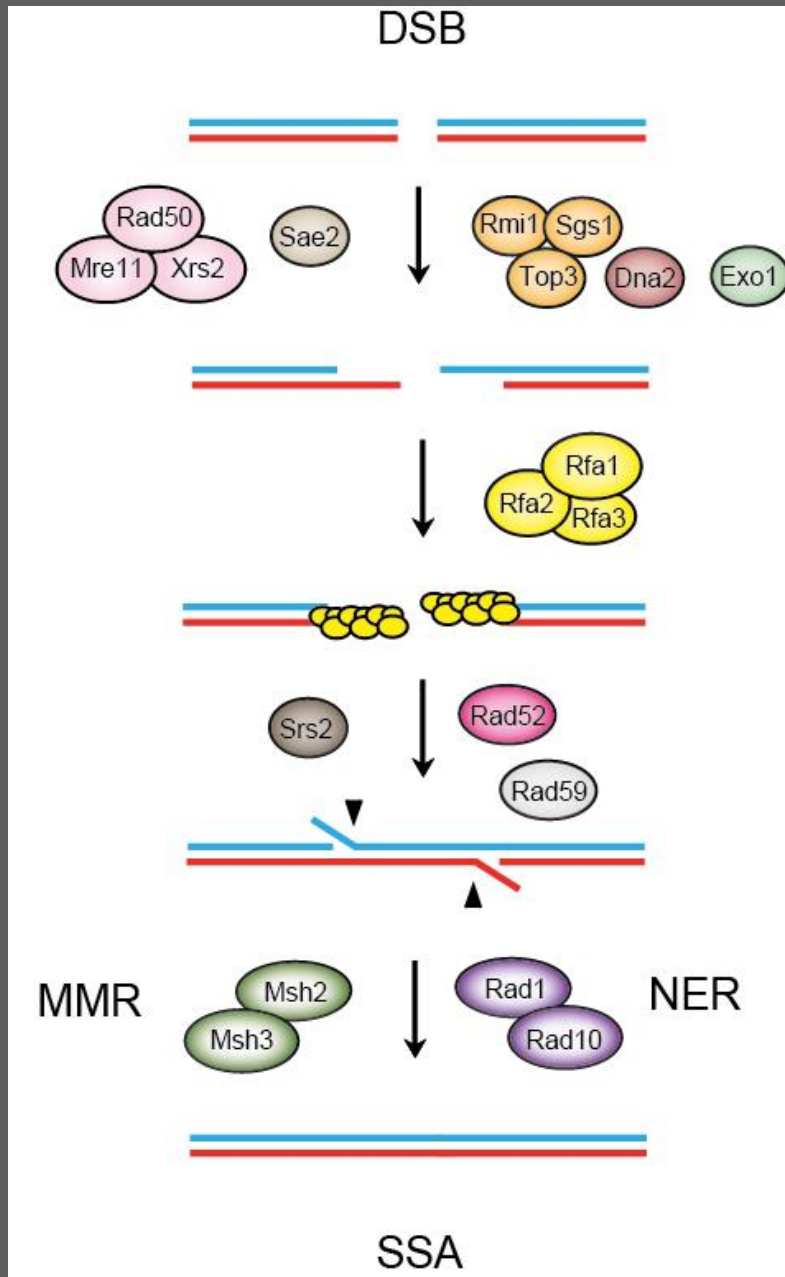
SUMO stabilizuje DNA-opravné komplexy (HR)



Následný rozpad komplexů stabilizovaných pomocí SUMO-SIM interakcí



Single strand annealing



“ Single-strand annealing (SSA) prebieha ak dôjde k zlomu v mieste dlhých repetícií DNA (rDNA)

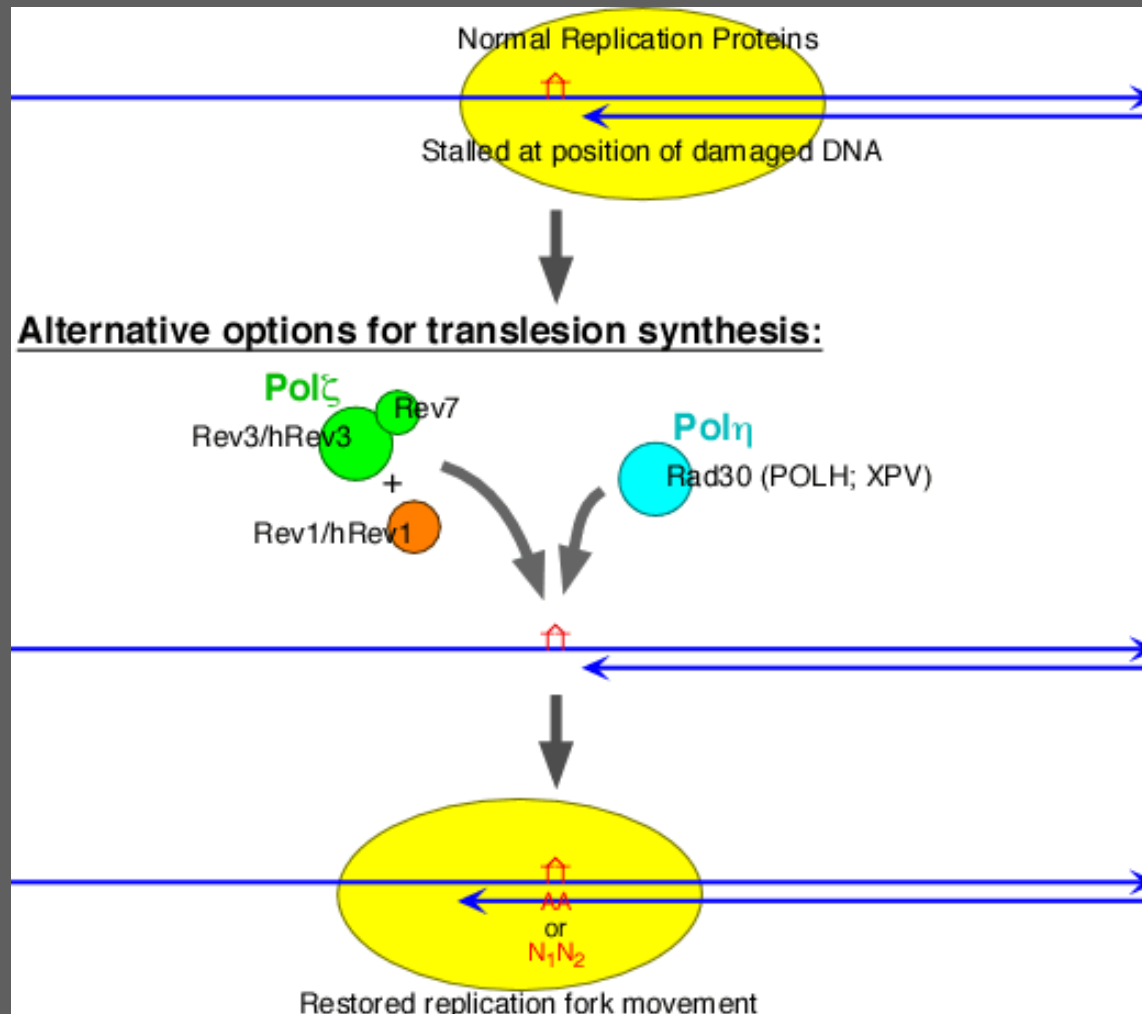
1. Resekcia 5'vlákna na koncoch zlomenej DNA ako u **HR**.
2. Priame nasadenie jednovláknových 3' re azcov, (Rad52 a Rad59)
3. Nehomologické sekvencie na koncoch sú odstránené Rad1-Rad10 endonukleázou - **NER**. Ľtiepenie je stimulované **MMR** proteínmi Msh2-Msh3.
4. Syntéza DNA a ligácia.

“ SSA v0dy 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

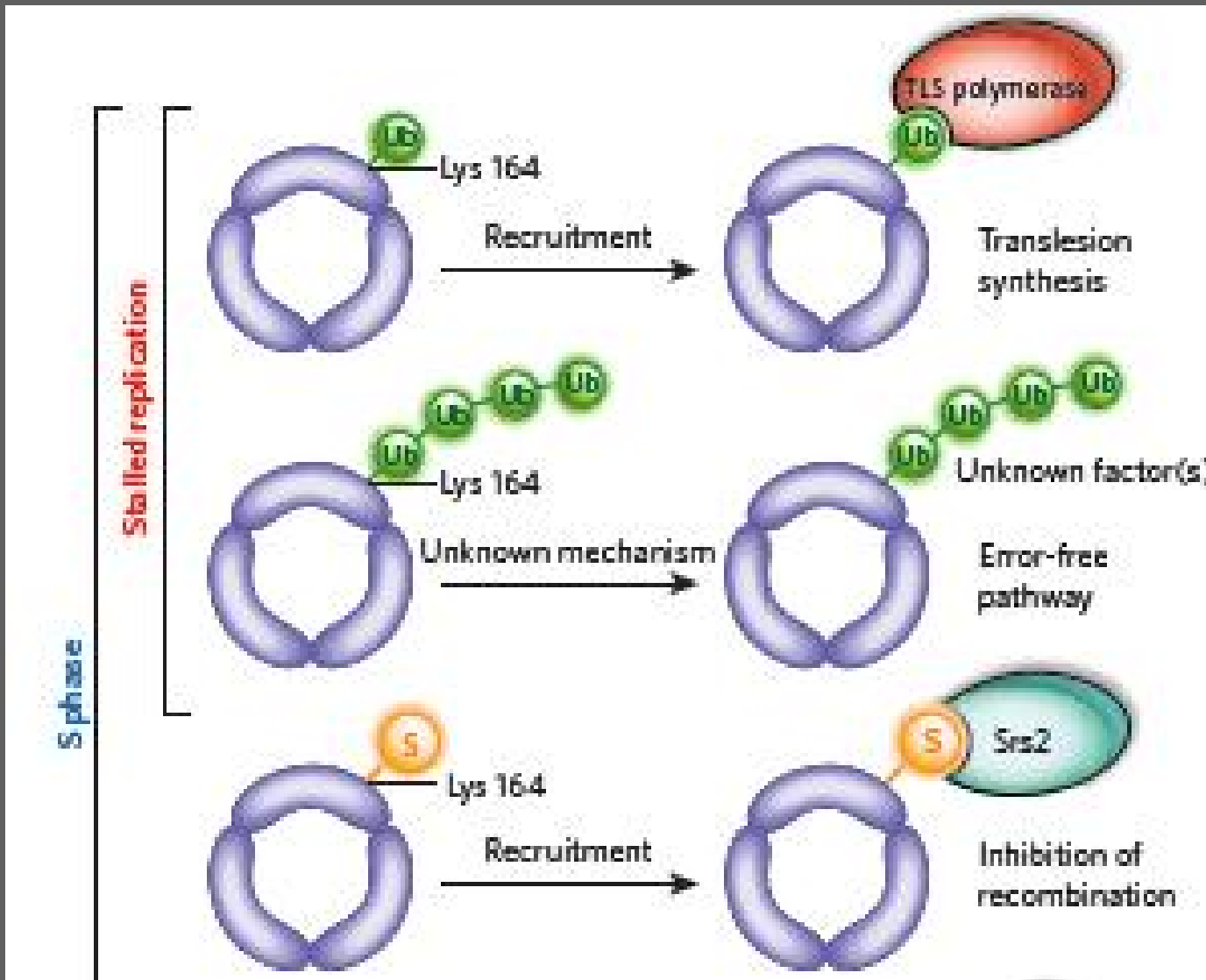


1. Dlhodobé zablokovanie replikačnej vidlice vedie k smrti bunky.
2. Replikácia poškodenej DNA vytvorí sesterskú chromatídu ktorá môže byť využitá ako templát pre opravu HR.

“ Štandardné DNA polymerázy (Pol δ , Pol ϵ) sú nahradené translázными polymerázami, ktoré vedia vložiť bázy aj oproti poškodeným nukleotidom (pyrimidínové diméry, abázické miesto, oxidovaná, deaminovaná báza).

“ Niektoré TLS polymerázy zaručia správne bázy oproti špecifickým poškodeniam (Pol η), iné často zaručia nesprávne bázy (Pol ζ , Rev1/hRev1)

Regulácia tvorby DNA opravných komplexov pomocou PTMs posttranslačných modifikácií proteínov



PCNA

Proliferating cell nuclear antigen

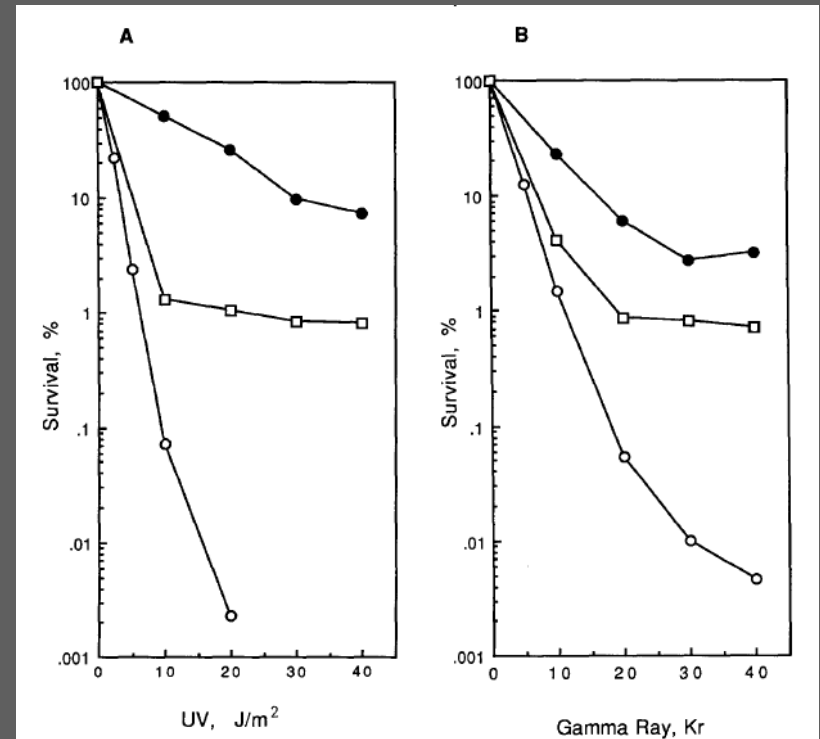
Nakladá DNA polymerázu na DNA a viaže ďalšie proteíny pokiaľ ide o DNA opravu, replikáciu

Metódy štúdia DNA opravných mechanizmov

Genetická analýza mutantov a ich vzťahov

Analýza citlivosti mutantov na látky spôsobujúce špecifické poškodenie DNA

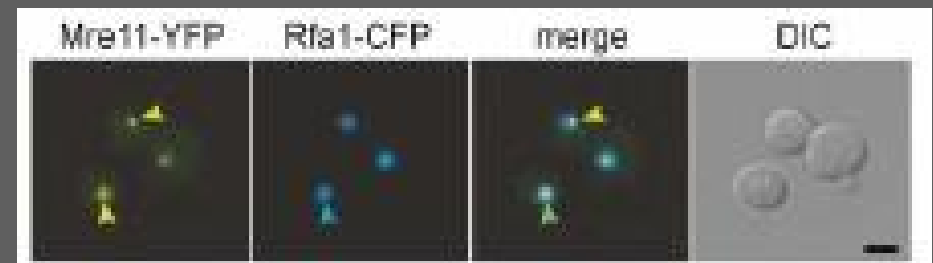
Eseje využívajúce úpravu DNA



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

Fluorescenčná mikroskopia

analýza (ko)lokalizácie DNA opravných proteínov v bunke, ich časovej následnosti



Lisby *et al.*, *Cell*, 2004

Metódy štúdia DNA opravných mechanizmov

É *in vitro* metódy

É Analýza biochemickej aktivity

É Väzba na DNA

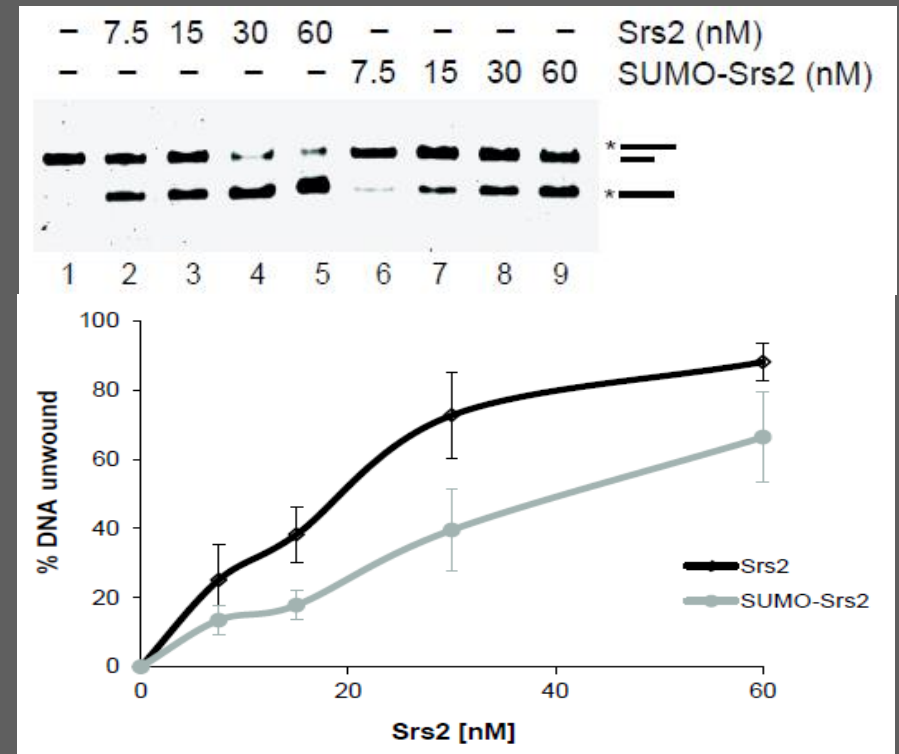
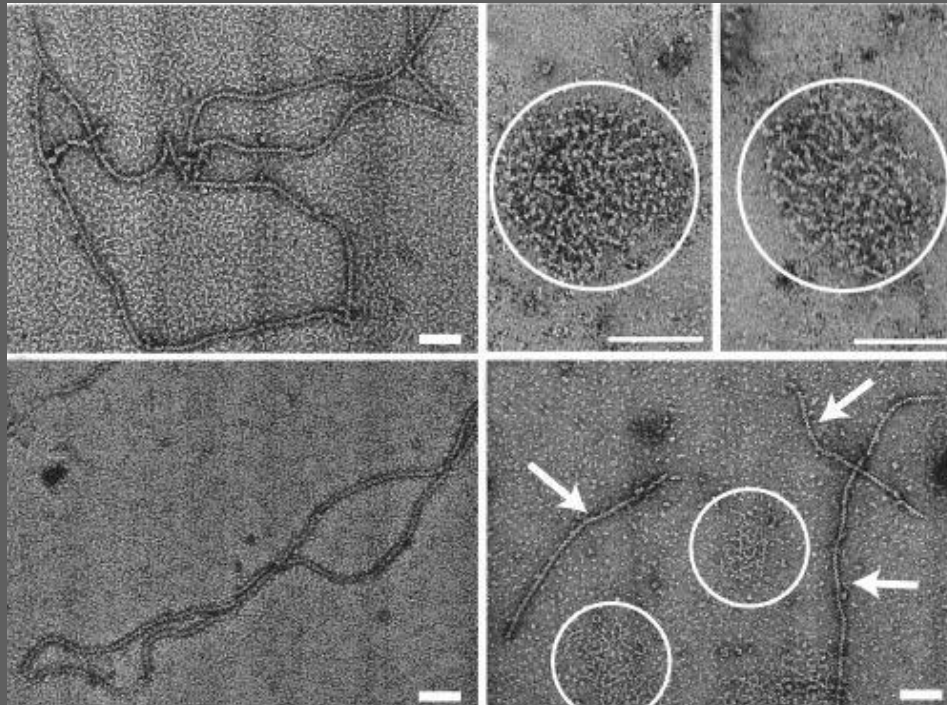
É Nukleázová esej

É Helikázová esej

É Polymerázová esej

Rekonstrukcia opravných mechanizmov

Elektrónová mikroskopia



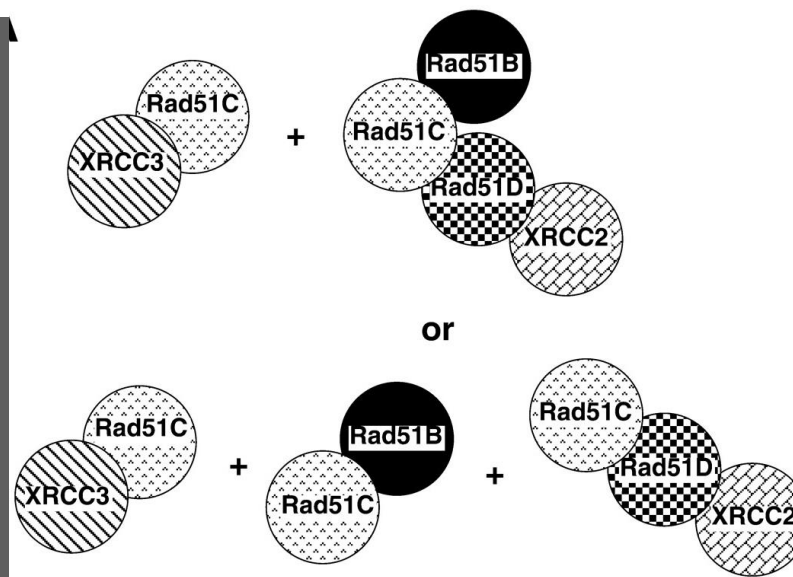
Kolesár, unpublished

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

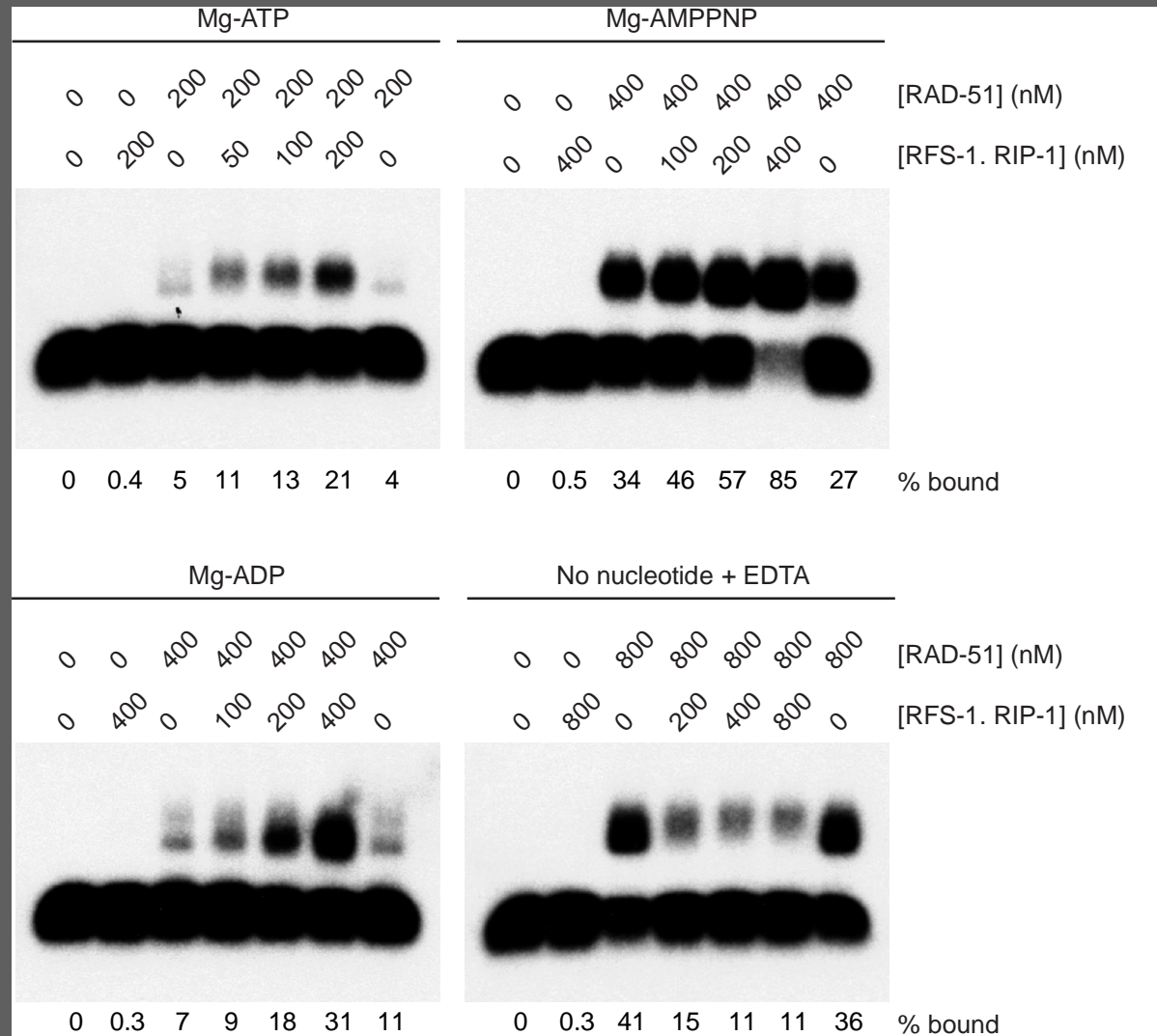
Pre o ýtudujeme udské rekombinázy?

Table 2. List of diseases linked to or associated with either recombination mediators or their interacting partners, synthetic lethality interactions are also shown (216,291,292)

Genes	Syndromes/disorders	Cancers	Synthetic lethality
BRCA1	–	Breast, prostate, ovarian cancer	PARP1
BRCA2	Fanconi anaemia (FANCD1)	Breast, prostate, ovarian cancer	PARP1, RAD52
RAD54B	–	Colon cancer, non-Hodgkin lymphoma	PARP1, FEN1
RAD51B	–	Lipoma, uterine leiomyoma	PARP1
RAD51C	Fanconi anaemia (FANCO)	Breast, ovarian cancer	–
BLM	Bloom	–	–
WRN	Werner	–	–
RECQL4	Rothmund–Thomson	–	–
p53	Li–Fraumeni	Breast, pancreatic, lung cancer, etc.	–
FANCM	Fanconi anaemia (FANCM)	–	–
PALB2	Fanconi anaemia (FANCN)	Breast, pancreatic cancer	–
Potential associations with diseases			
RAD51	–	Breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers	–
DMC1	Infertility	–	–
XRCC2	–	Breast cancer	–
XRCC3	–	Basal cell carcinoma, malignant melanoma, bladder cancer, breast cancer	RAD52
RAD51D	–	Breast cancer	–
DSS1	Split hand/split foot malformation	Skin squamous cell carcinoma	–

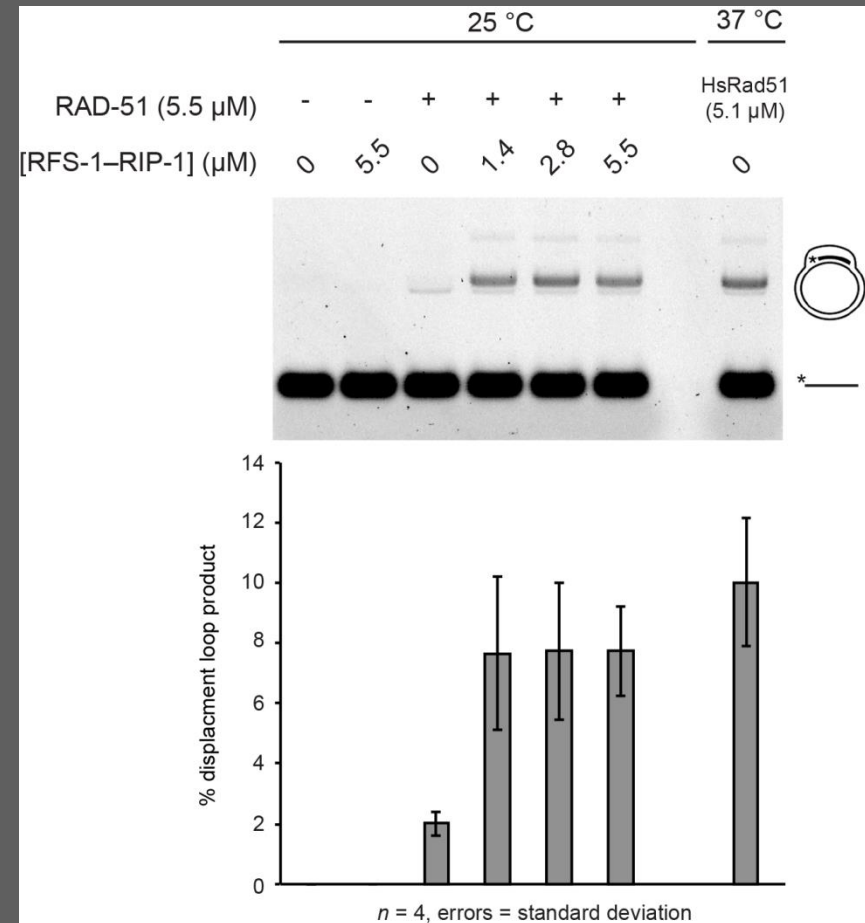
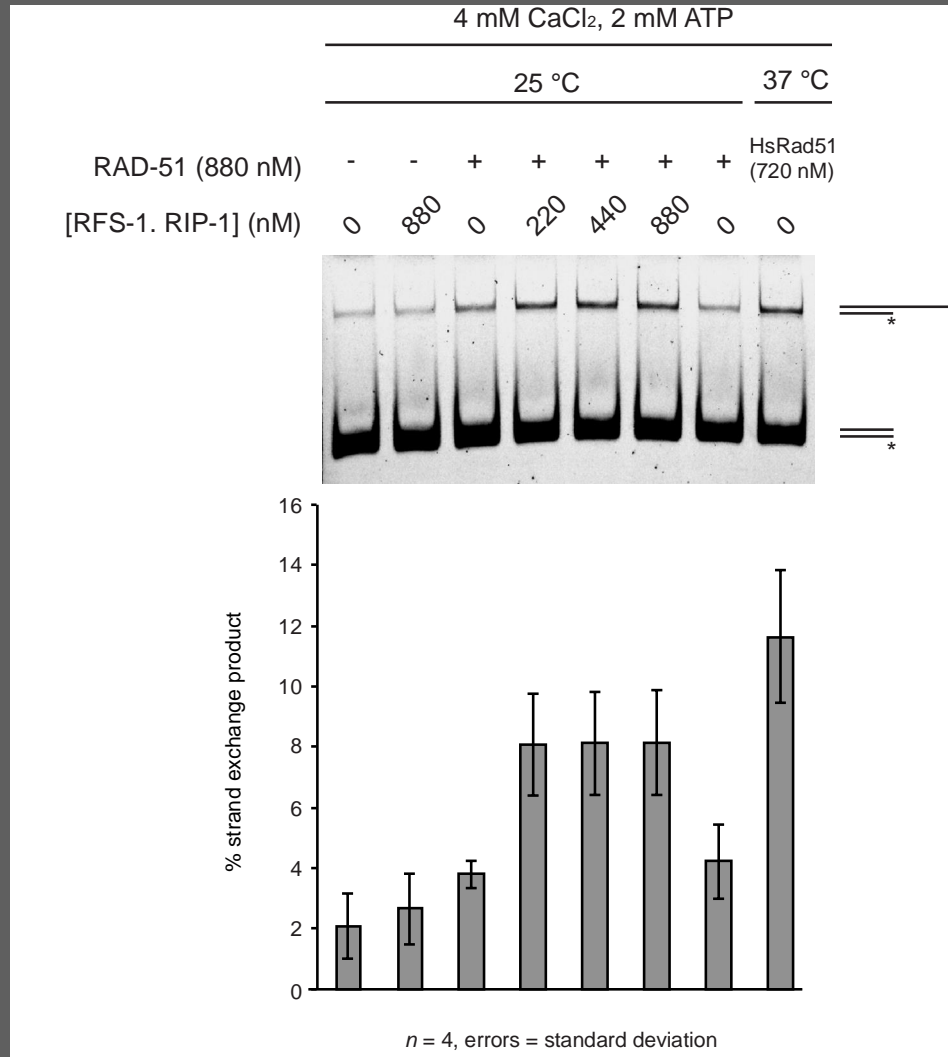


EMSA of RAD-51-ssDNA complexes \pm RFS-1-RIP-1



For a fixed concentration of RAD-51 in the presence of nucleotide and magnesium, more molecules of radiolabelled DNA display retarded migration due to the formation of DNA-protein complexes in the presence of RFS-1-RIP-1.

RFS-1-RIP-1 stimulates RAD-51 recombinase activity



Preliminary EM data suggest that RFS-1-RIP-1 complex remodels the Rad51 filaments to shorter ones