

Mário Špírek (office A7/305, lab. A7/323)

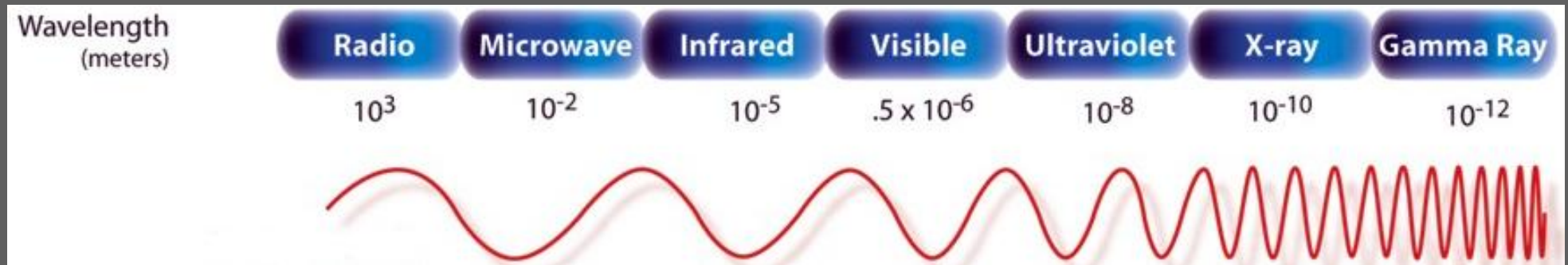


Proteinové komplexy v opravě poškozené DNA

Poškodenie DNA

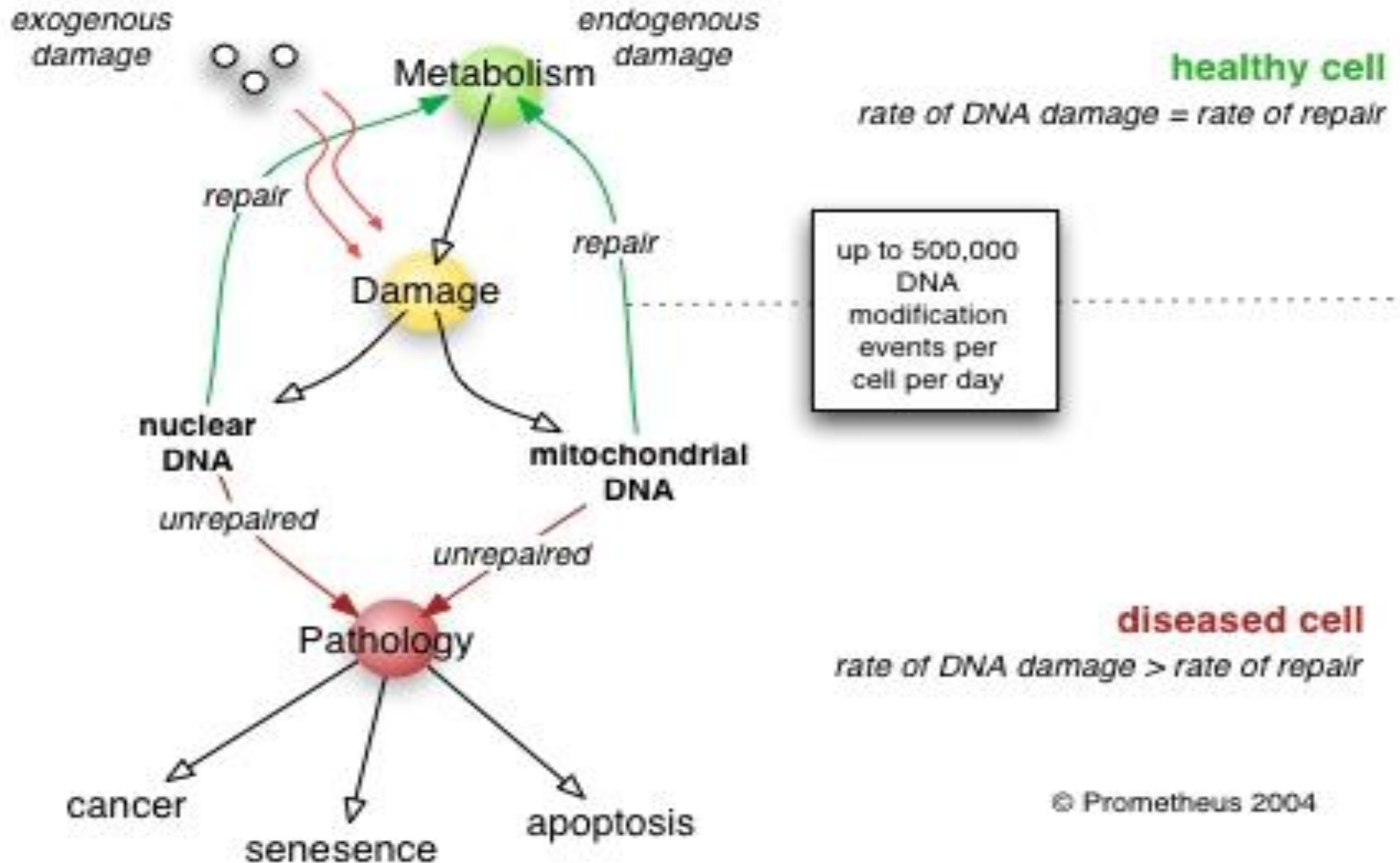
Zdroje poškodenia:

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



- mutagénne chemikálie (chemoterapia)
- vírusy

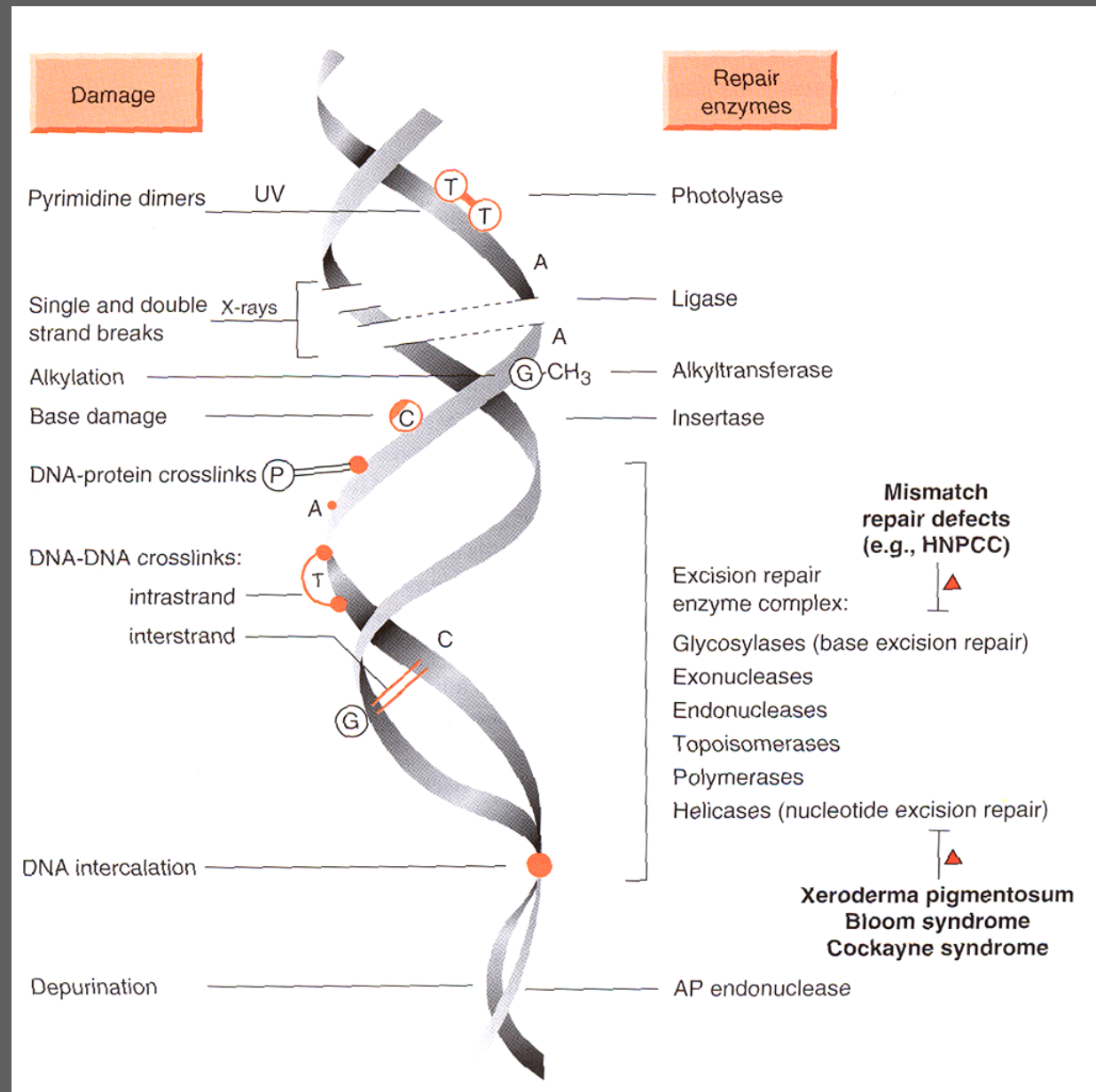
Dôsledky neopravenej DNA



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
poškodení/deň/bunku**



Mutácie ako zdroj rakoviny

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

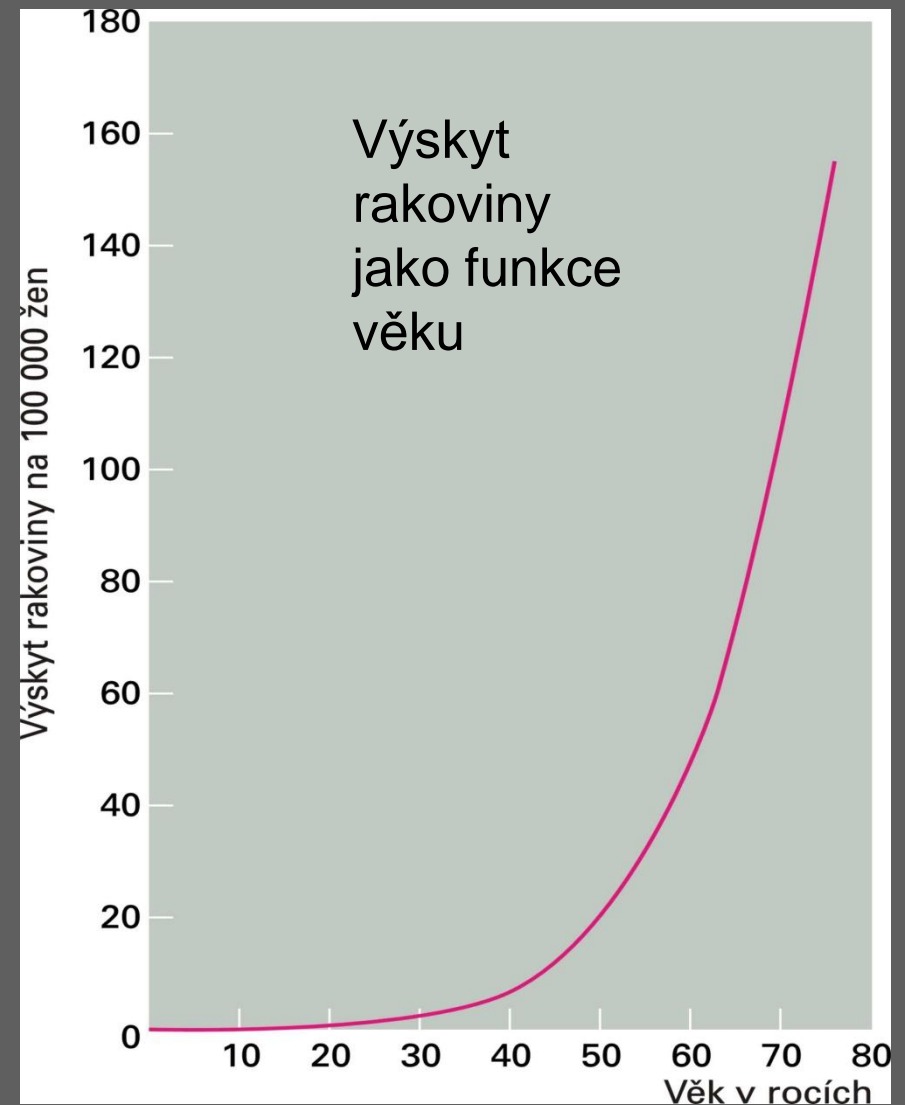
V prostredí bez mutagénov je pravdepodobnosť vzniku mutácie na bunkové delenie a gén 10^{-6} , za život je to 10^{10} mutácií na gén

Typy mutácií:

Génové (bodové) mutácie

Chromozómové (štruktúrne 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

- Na opravu sú potrebné súčasne rôzne enzymatické aktivity
- Vzájomnou väzbou enzymaticky aktívnych a adaptorových proteínov vznikajú DNA-opravné komplexy špecifické k danému poškodeniu DNA
- Katalytické domény obsiahnuté v opravných komplexoch vedú k zvráteniu DNA poškodení
- 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

Odd'elujú dve komplementárne vlákna DNA.

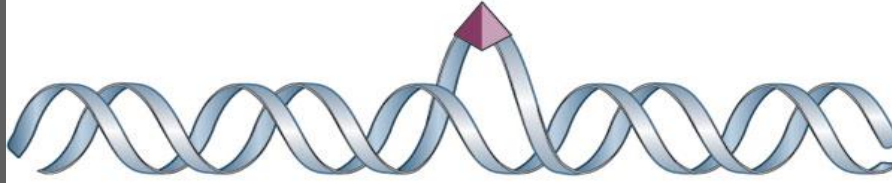
Polymerázy

DNA-dependentné nucleotidyltransferázy - Syntetizujú reťazec DNA z nukleotidov.

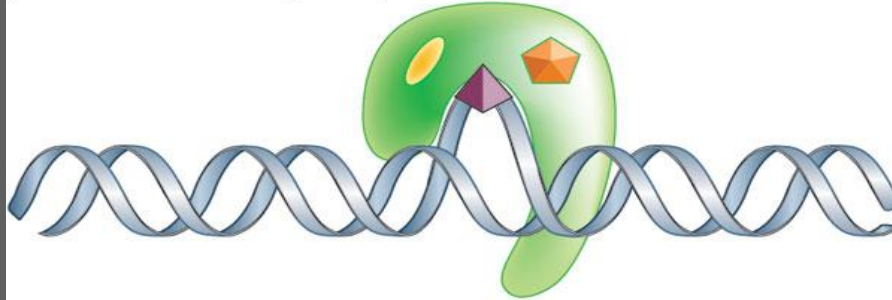
Ligázy

Katalyzujú tvorbu fosfodiesterových väzieb – spájajú dokopy dve vlákna DNA.

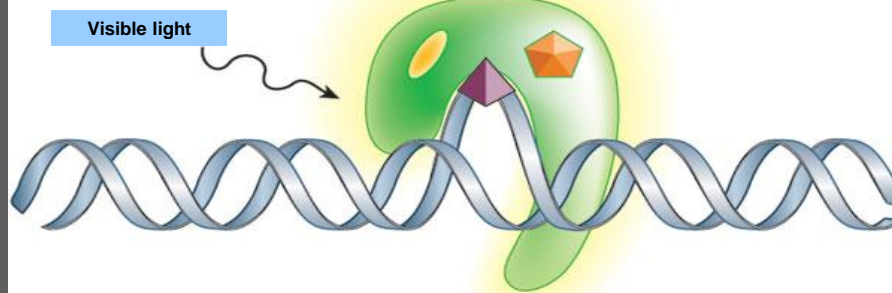
Pyrimidine dimer in UV-exposed DNA



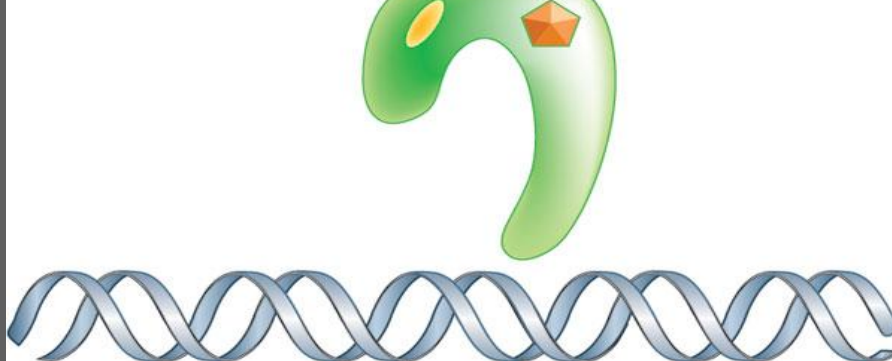
Complex of DNA with photoreactivating enzyme



Absorption of light (>300 nm)

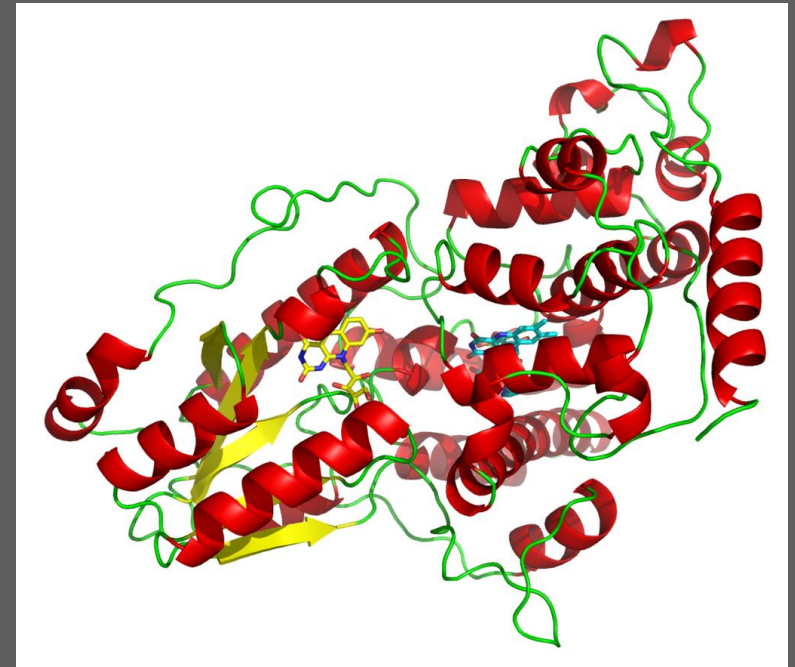


Release of enzyme to restore native DNA



Direct reversal priama oprava: fotoreaktivácia

- Nedochoádza k štiepeniu fosfodiesterových väzieb kostry DNA
- Oprava pyrimidínových dimérov enzýmom fotolyázou s využitím energie svetla



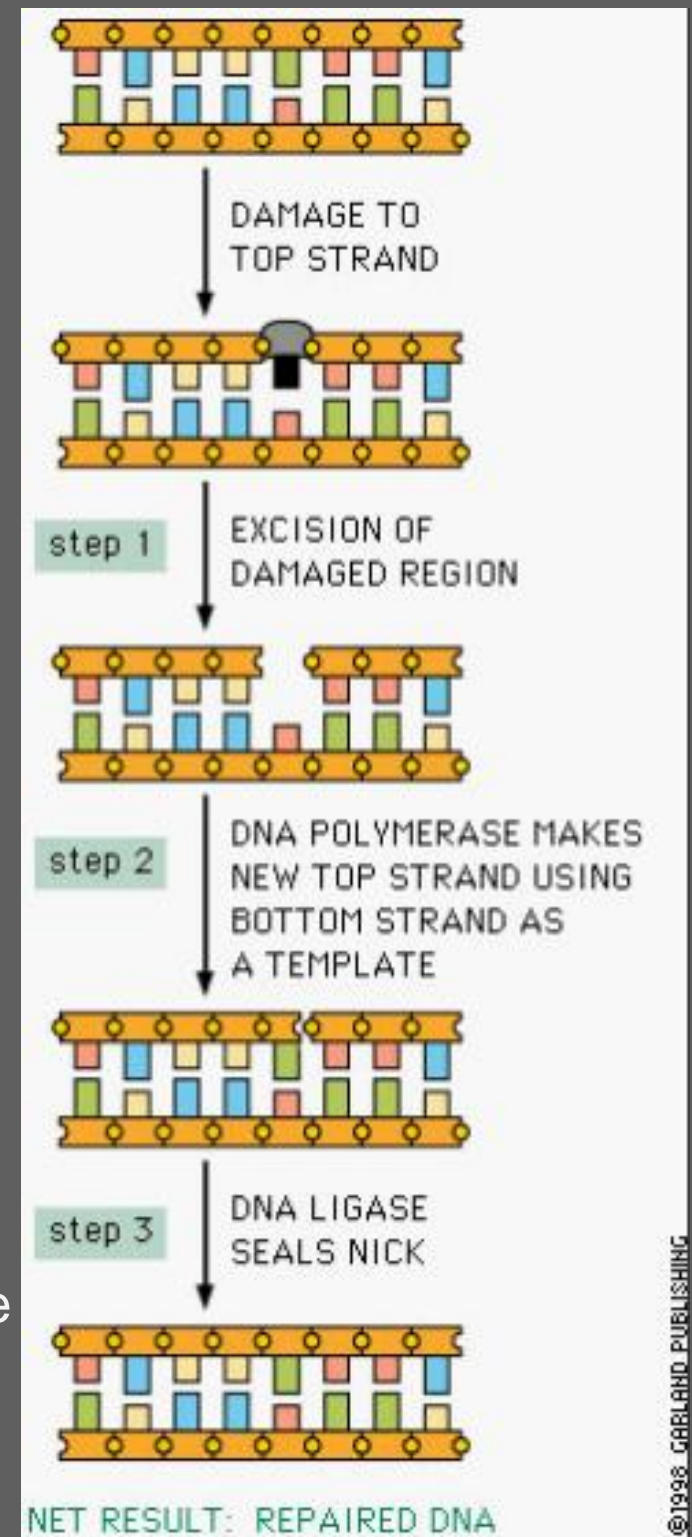
light-harvesting kofaktory:
FADH⁻ (žltý) and 8-HDF (modrá)

Base Excision Repair (BER)

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

- 1. Rozoznanie (DNA glykozylázy, OGG1) a odstránenie chybného miesta (Endonukleázy, APEX1 a APEX2)**
- 2. Procesing koncov DNA (polynucleotide kinase-phosphatase, PNKP) a vyplnenie medzery (polymeráza Pol β)**
- 3. Spojenie reťazcov DNA (DNA ligáza III)**

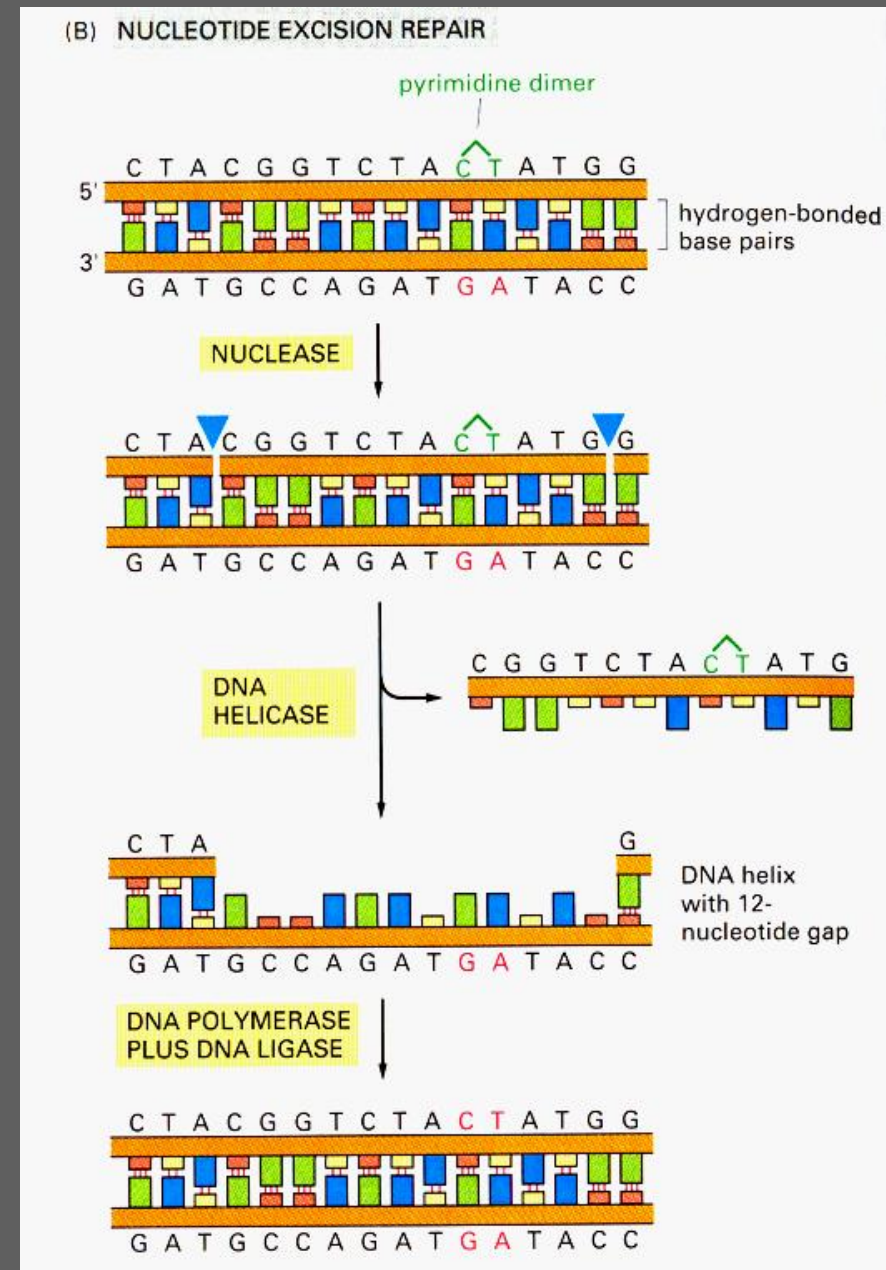
Kroky 2-3 sú takmer rovnaké u rôznych typov opráv, ale pri prvom kroku sa zúčastňujú špecifické protínové komplexy pre danú opravnú dráhu



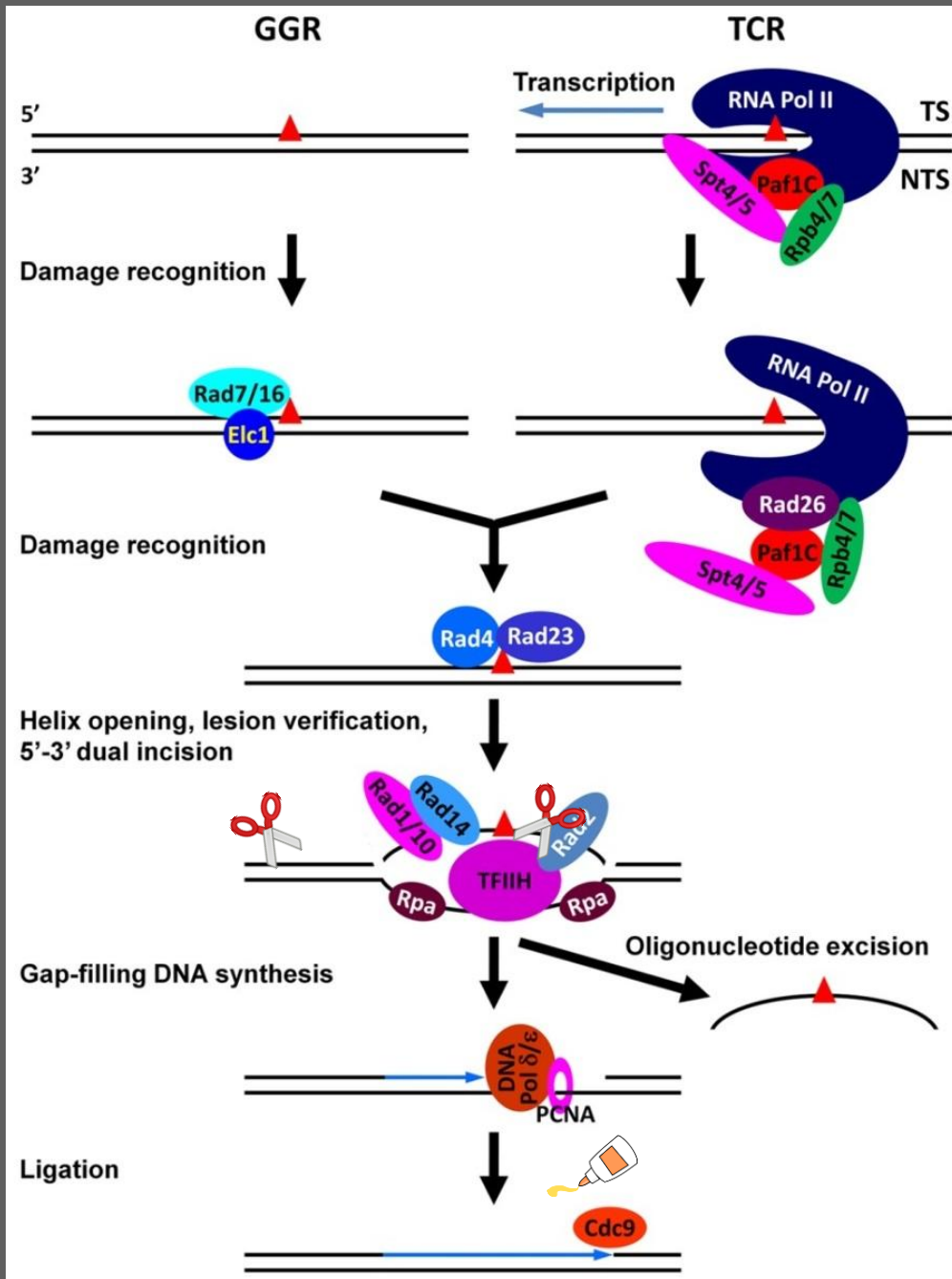
Nucleotide Excision Repair

Opravuje veľké poškodenia nukleotidov (UV žiarenie)

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 väčšie jednoreťazcové poškodenia (pyrimidínové diméry, 6,4 fotoprodukty, crosslinky v DNA helixe)



NER u kvasiniek:

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

1. Rozpoznanie poškodenia GG ≠ TC
2. TFIIH rozpletie DNA (helikáza)
3. Rad2 (XPG u ľudí) štípe DNA na 3' konci poškodenia, 5' koniec rozštípe Rad1-Rad10 (XPF-ERCC1) komplex (endonukleázy). → Dvojité štípenie 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.

Poruchy NER u ľudí

Xeroderma Pigmentosum

- Výskyt: 1-4 na milión
- Genetika: autozomalne recesívne (XPA-G)
- Nemoc: nemoci kože; malignancia kože; neurologické a abnormality očí



Cockayne's Syndrome

1 na milión

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

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

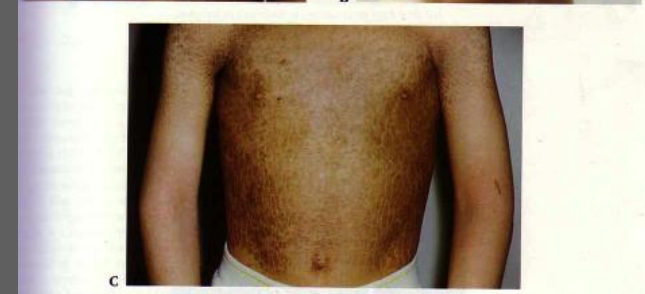


Trichothiodystrophy

1-2 na milión

autozomálne recesívne, (TTDA, XPB a D)

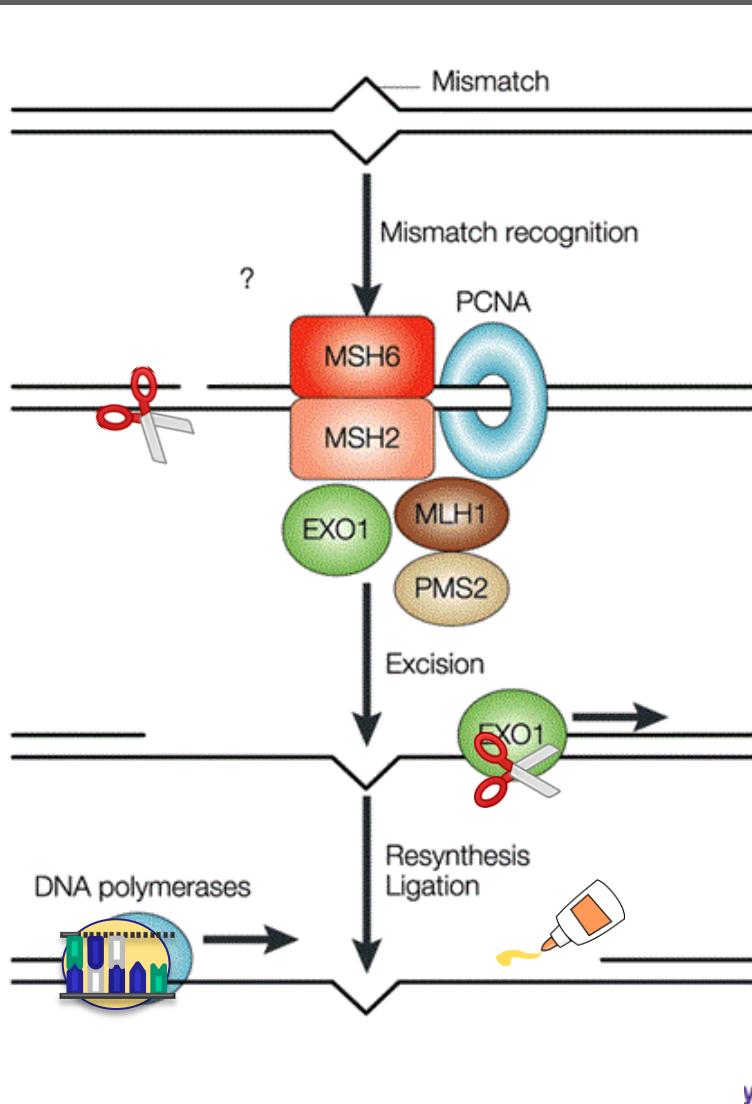
sulfur deficient brittle hair, mental and spomalenie rastu, peculiar face with receding chin, ichthyosis; (bez zvýšenia vzniku rakovín)



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. Bakteriálne 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 štiepia dcérske vlákno (MutH endonukleáza u bakterií)
3. DNA helikáza rozpletie vlákna
4. Exonukleáza (Exo1, ... ?) rozštiepi dcérske vlákno
5. Vyštiepená DNA je znovu nasyntetizovaná DNA polymerázou a pripojená DNA ligázou.

Oprava dvojreťazcových zlomov

Vznik: Indukované radiáciou a chemikáliami
Počas replikácie poškodenej DNA
Slúži k iniciácii meiotickejrekombinácie
Súčasť imunitnej odpovedi

Dvojreťazcové zlomy DNA sú veľmi závažným druhom poškodenia - jediný DSB môže viesť k smrti bunky alebo preusporiadaniu genómu.

Základné DSB-opravné dráhy:

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).

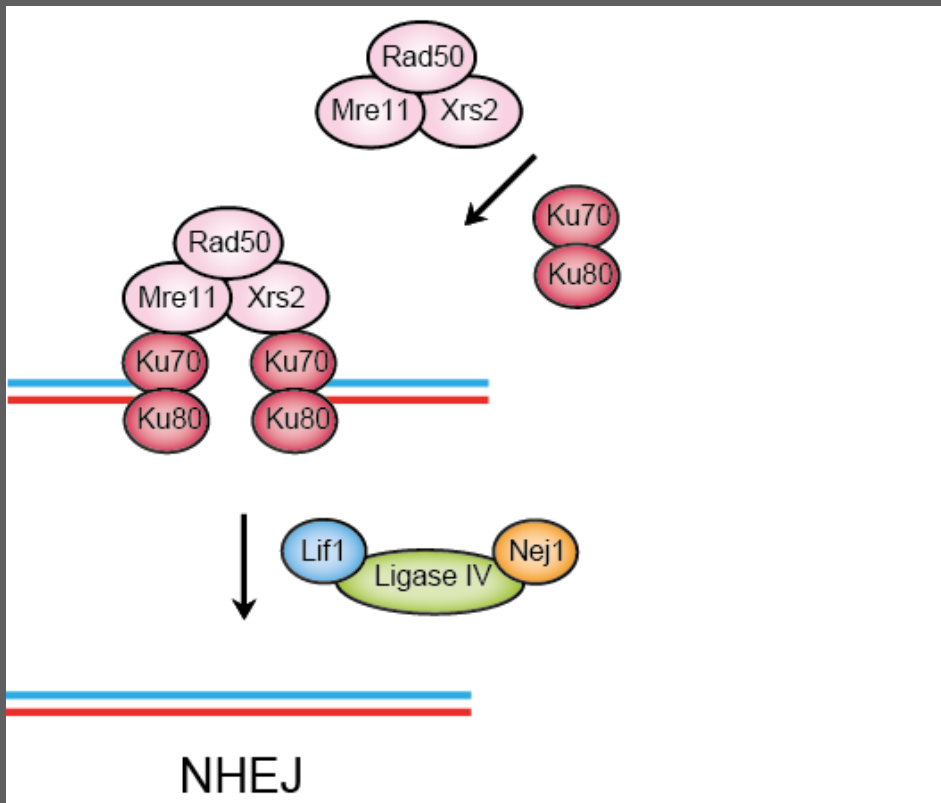
Nehomologické spájanie koncov (NHEJ)

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)

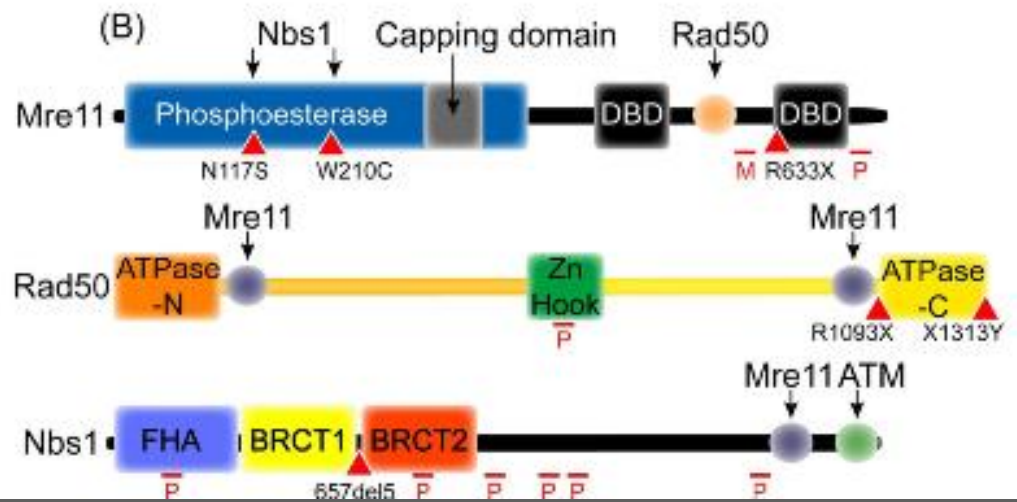
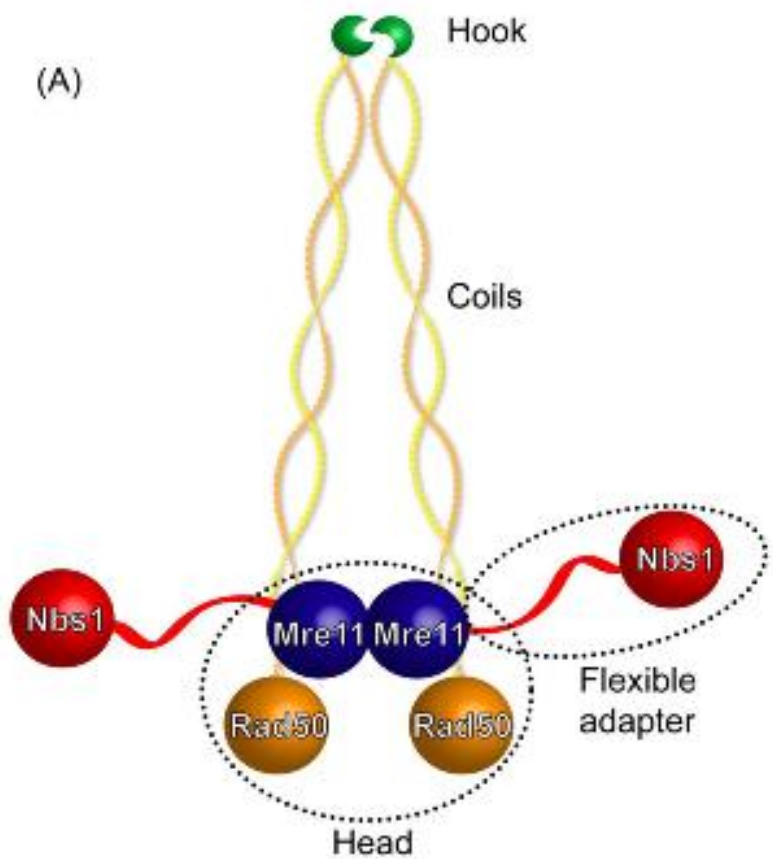


NHEJ u kvasiniek. Upravené z Altmannová *et al.*,
Biomolecules, 2012

1. Väzba MRX (Mre11-Rad50-Xrs2 (NBS1 u ľudí) 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

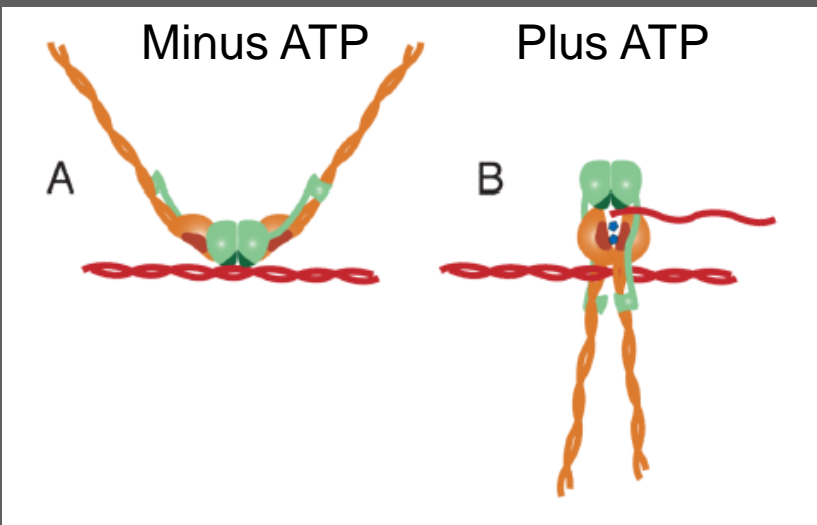
pri oprave nekompatibilných koncov väčšinou dochádza k deléciám alebo inzerciami, vznikajú chyby –error prone

Mre11-Rad50-Xrs2(Nbs1) komplex (MRX, MRN) : heterohexamer



- Červené trojuholníky predstavujú miesta mutácií spojených s ľudskými chorobami
- M – metylácie
- P – DNA poškodením indukované fosforylácie

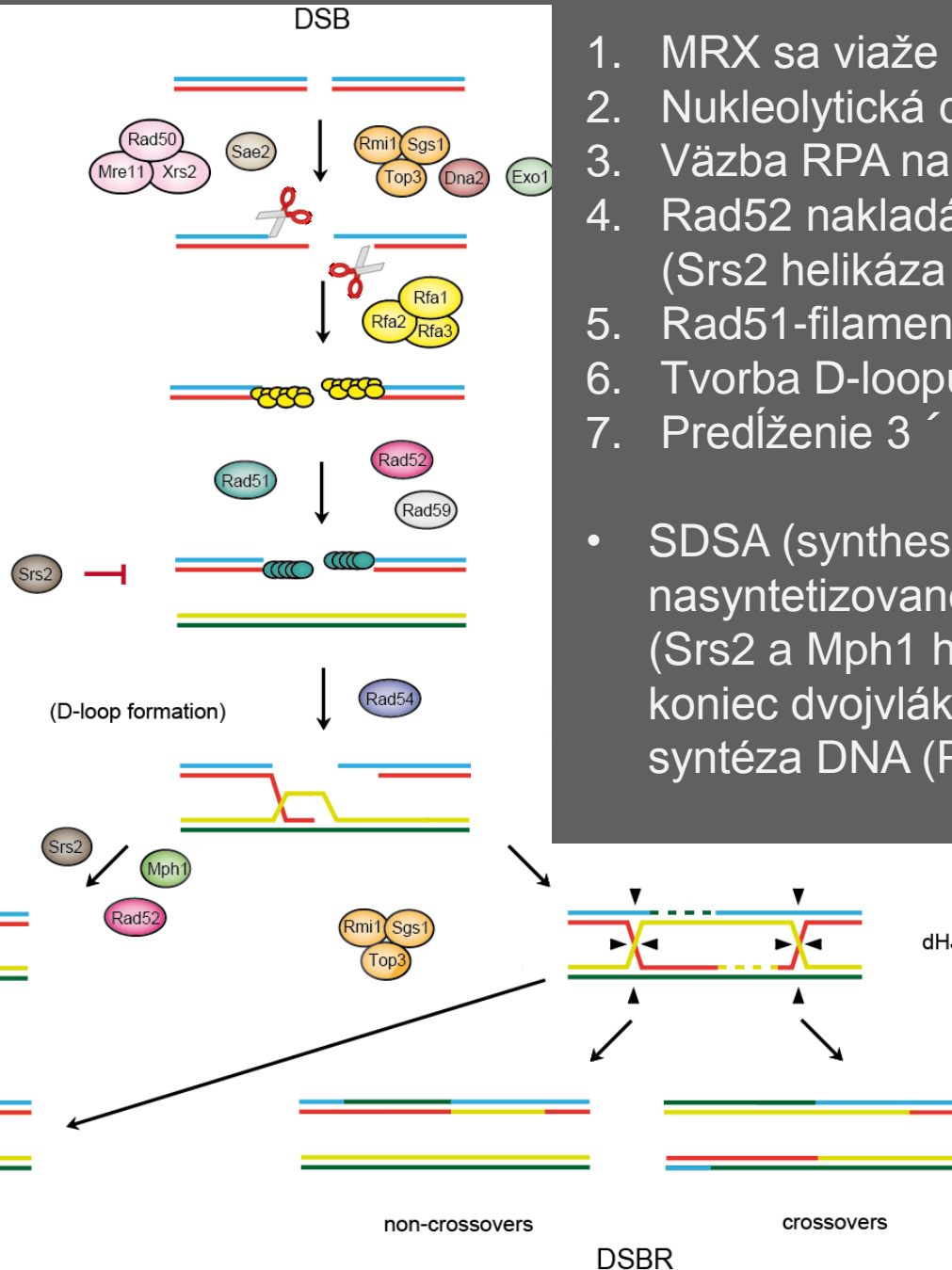
Williams *et al.*, *DNA Repair*, 2010



- Po naviazaní ATP dochádza k dimerizácii ATPzových domén Rad50 a následnej zmene z otvoreného komplexu na zatvorený

Wyman *et al.*, *DNA Repair*, 2011

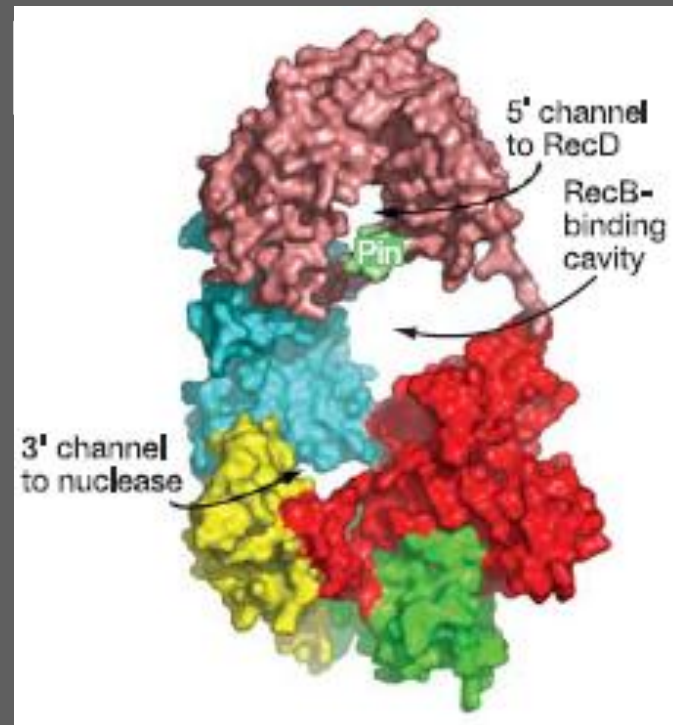
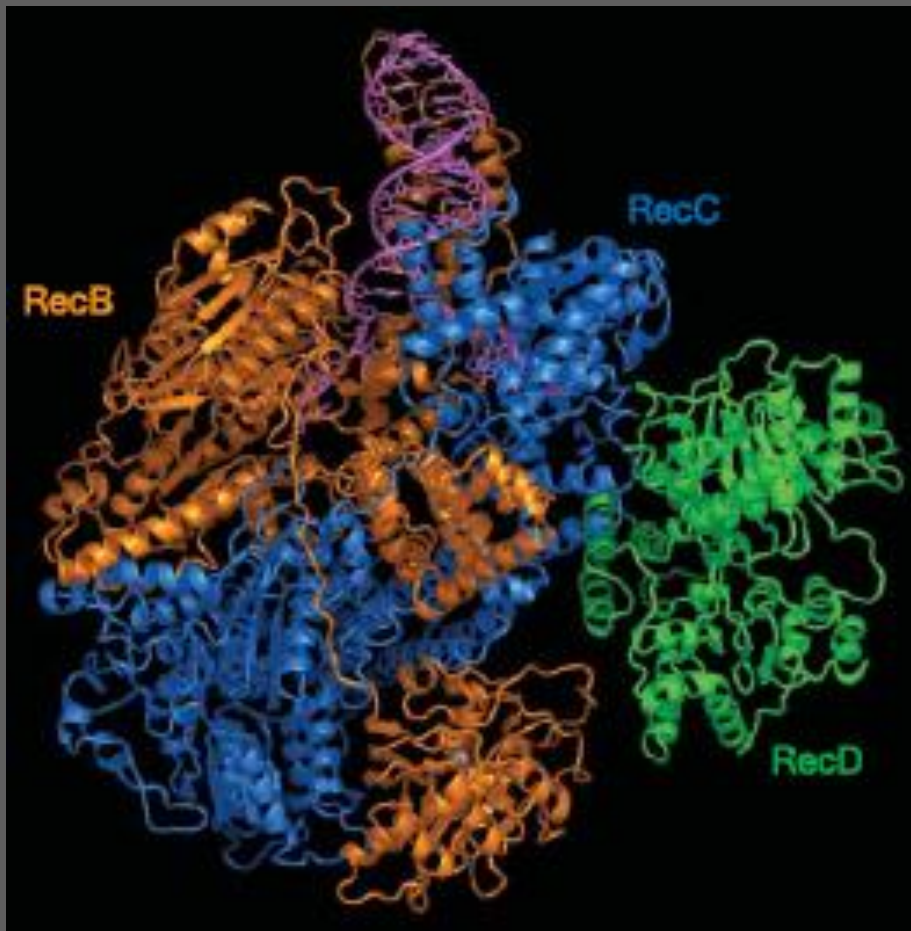
Homologická rekombinácia



1. MRX sa viaže na zlomené konce DNA.
 2. Nukleolytická degradácii 5' reťazcov.
 3. Väzba RPA na 3' jednovláknové 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 dvojitvláknového 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).

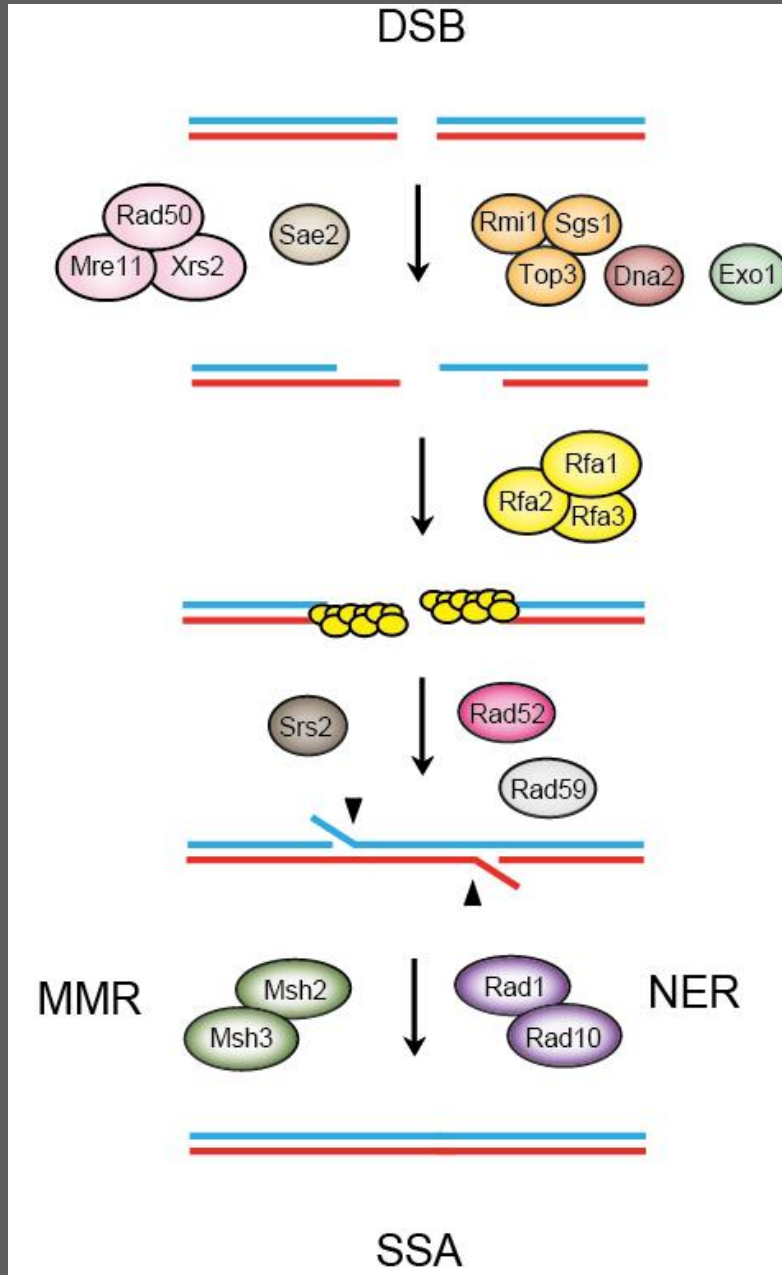
RecBCD komplex - baktérie



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

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

Single strand annealing



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

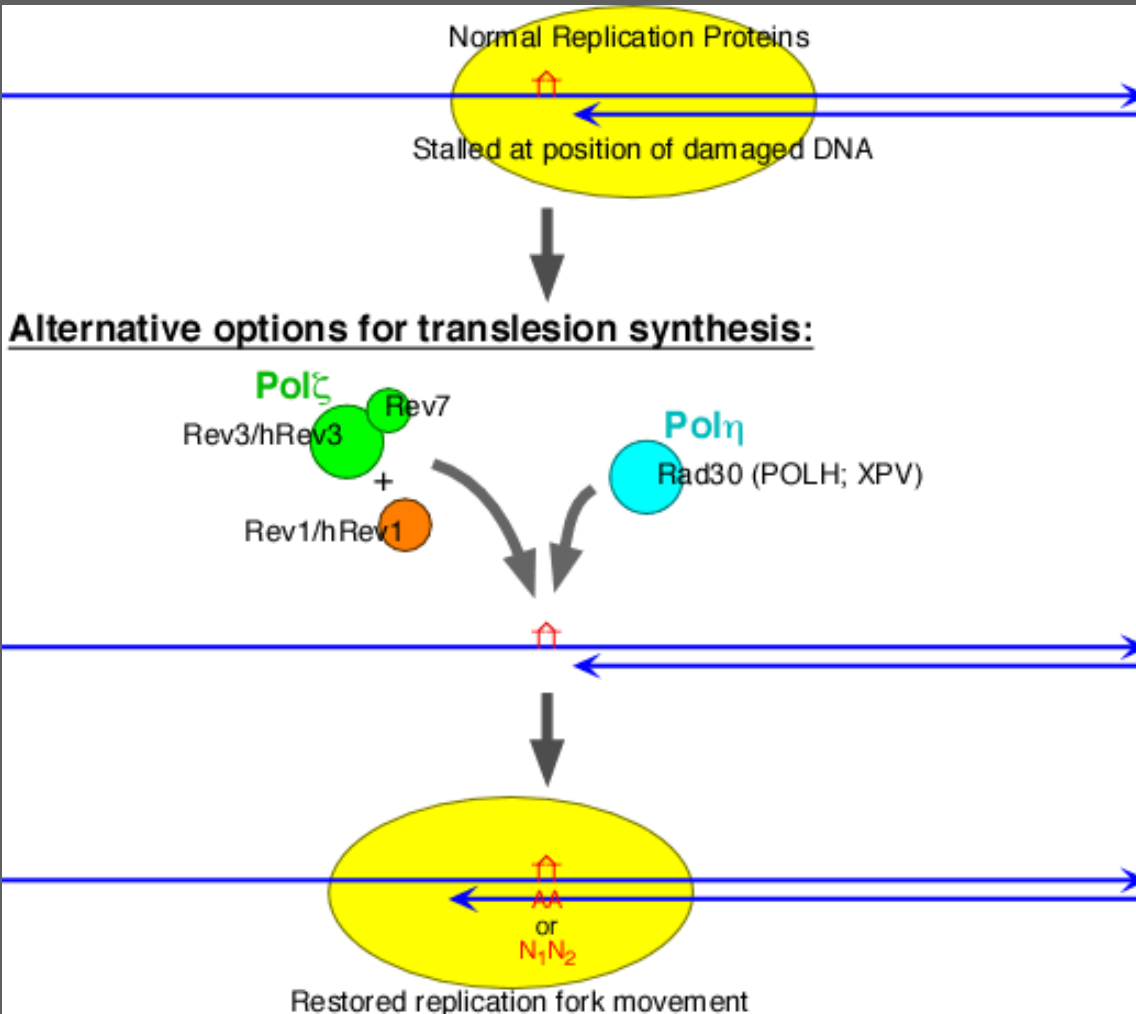
1. Resekcia 5' vlákna na koncoch zlomenej DNA ako u **HR**.
2. Priame nasadenie jednovláknových 3' reťazcov, (Rad52 a Rad59)
3. Nehomologické sekvencie na koncoch sú odstránené Rad1-Rad10 endonukleázou - **NER**. Štiepenie je stimulované **MMR** proteínmi Msh2-Msh3.
4. Syntéza DNA a ligácia.

- 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



1. Dlhodobé zablokovanie replikačnej vidlice vedie k smrti bunky.
2. Replikácia poškodenej DNA vytvorí sesterskú chromátidu 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 (ζ , Rev1).

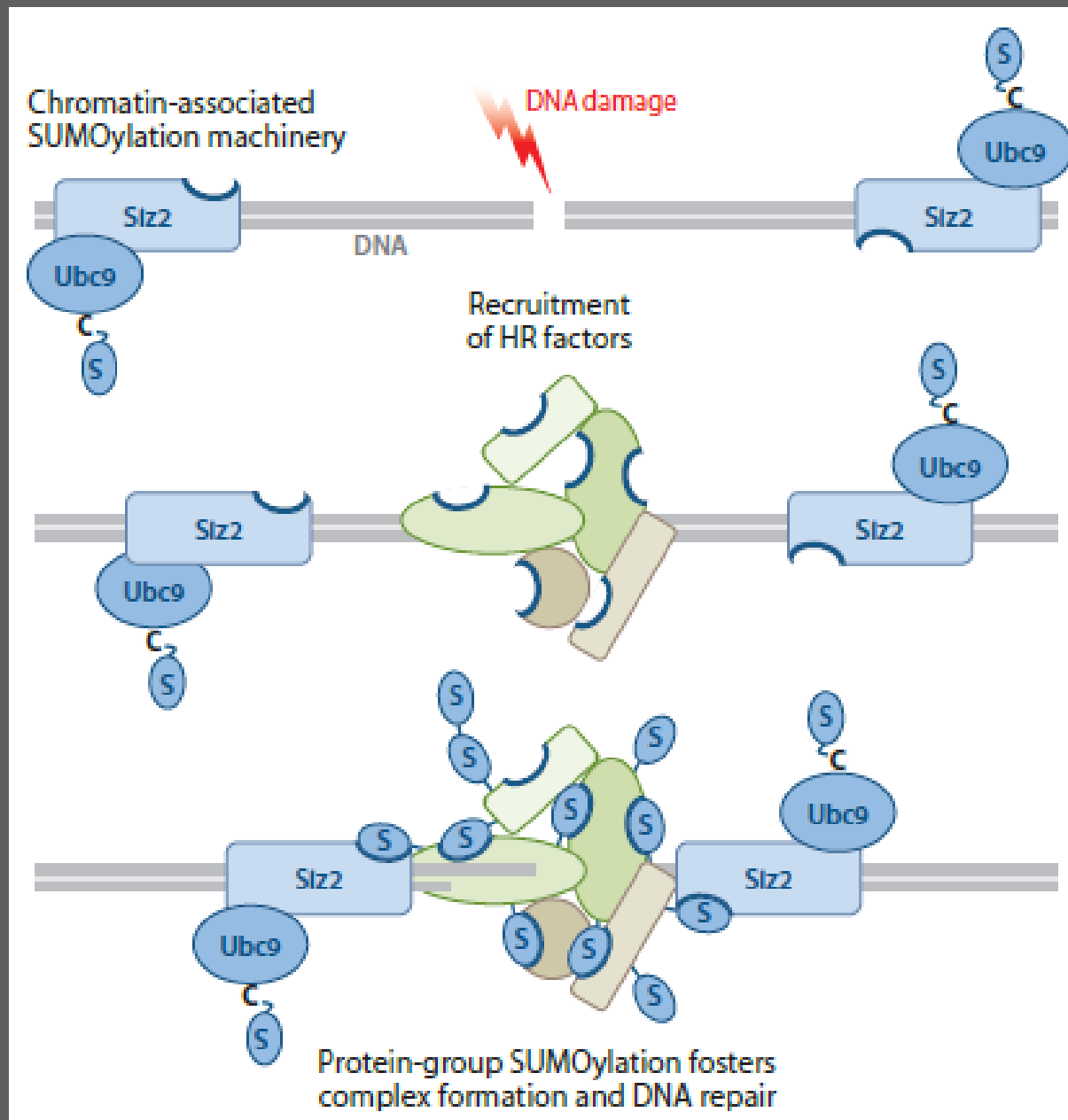
Poškodenie DNA indukuje sumoyláciu DNA-opravných proteínov

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

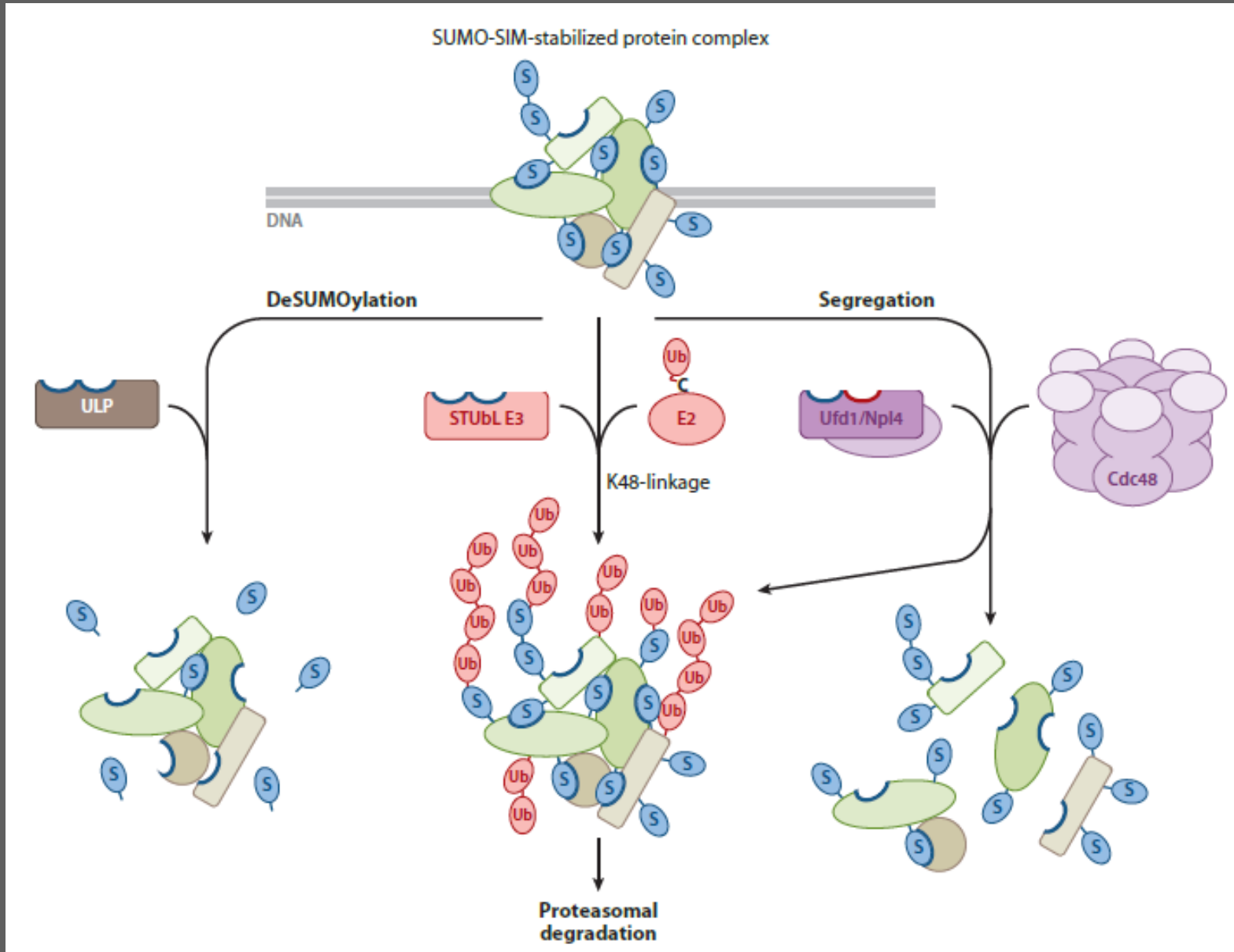
| Process | Sumoylated Proteins |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Replication | <i>Dpb11</i> , 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.

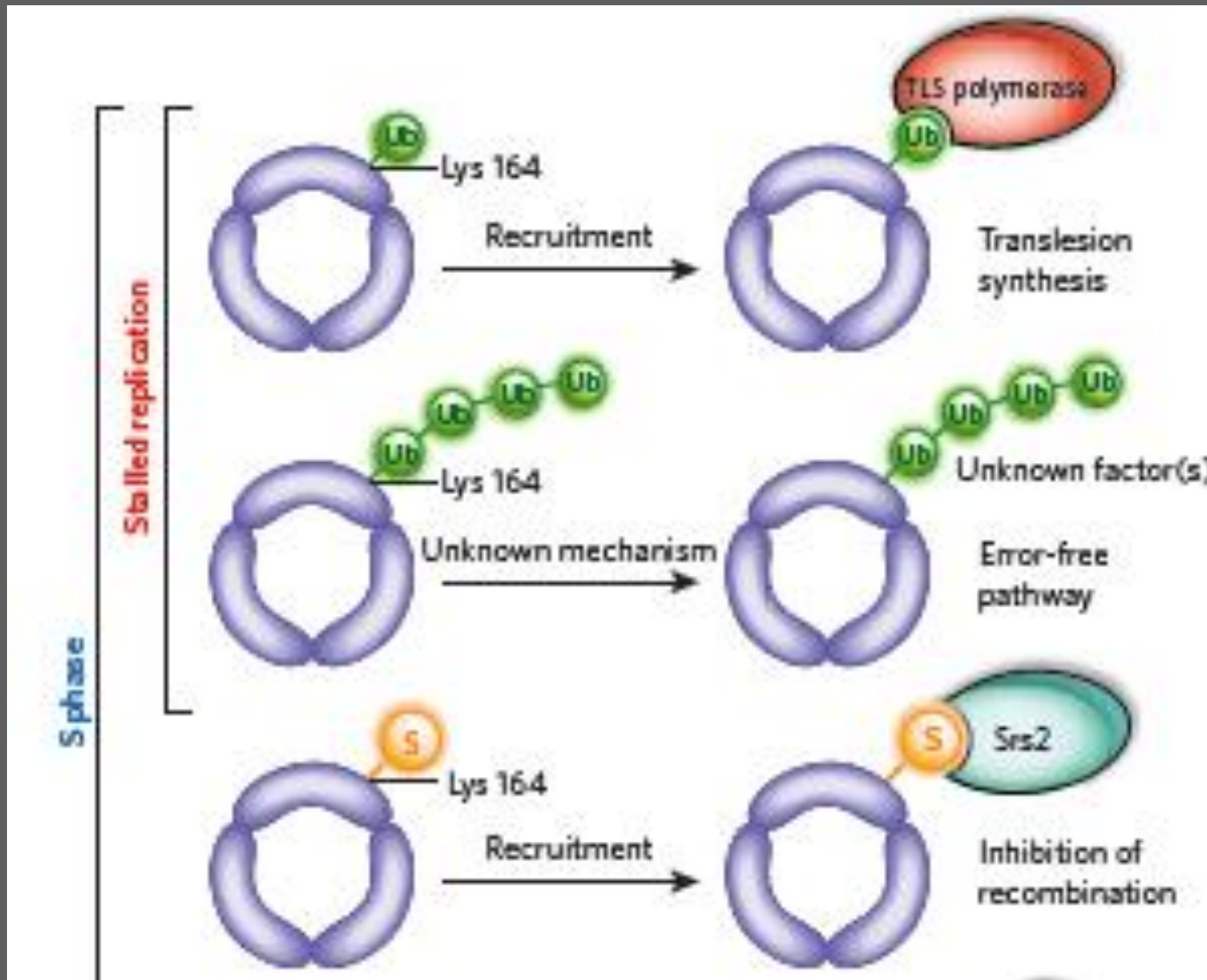
SUMO stabilizuje DNA-opravné komplexy (HR)



Následný rozpad komplexů stabilizovaných pomocí SUMO-SIM interakcí



Regulácia tvorby DNA opravných komplexov pomocou PTMs posttranslačných modifikácií proteínov



PCNA

Proliferating cell nuclear antigen

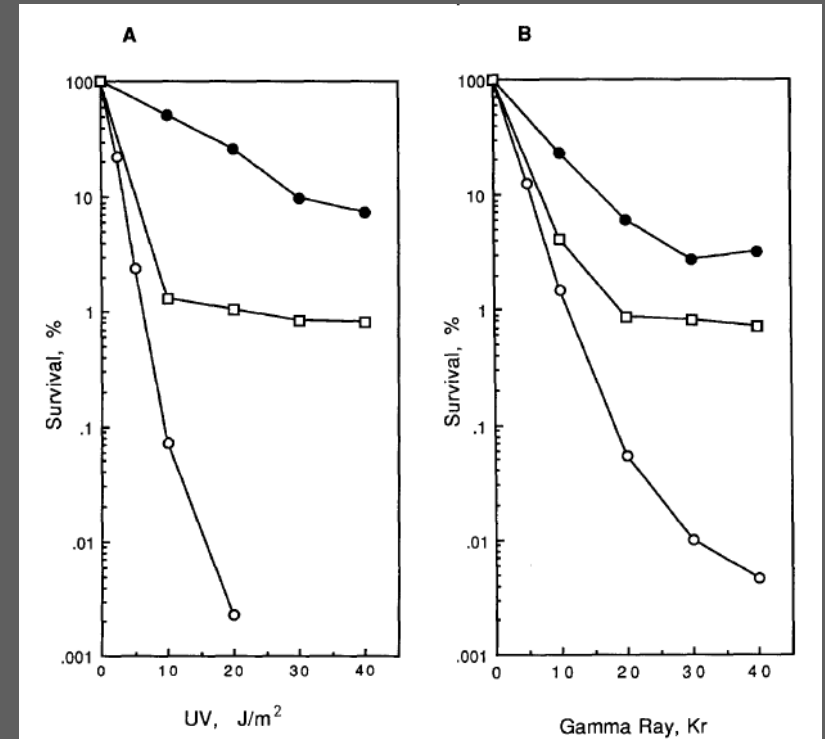
Nakladá DNA polymerázu na DNA a viaže ďalšie proteíny pri DNA oprave a replikácii

Metódy štúdia DNA opravných mechanizmov

Genetická analýza mutantov a ich vzťahov

Analýza citlivosti mutantov na látky spôsobujúce špecifické poškodenie DNA

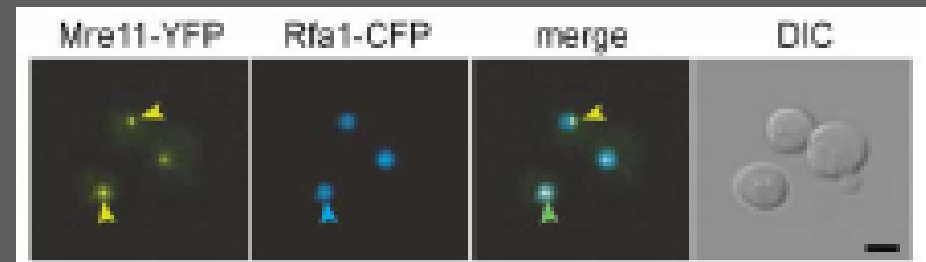
Eseje využívajúce úpravu DNA



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

Fluorescenčná mikroskopia

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



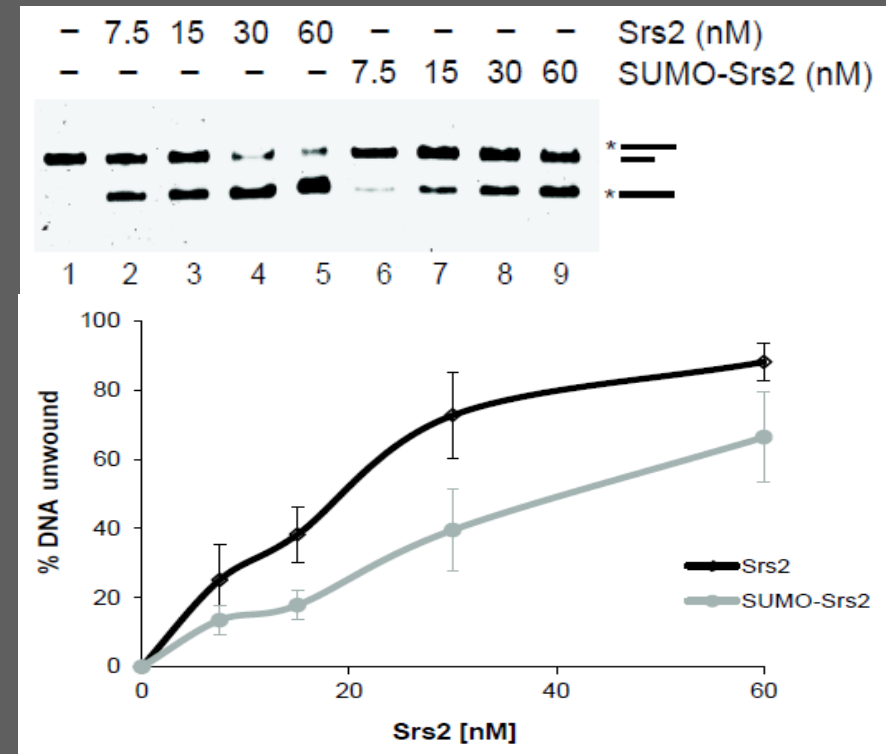
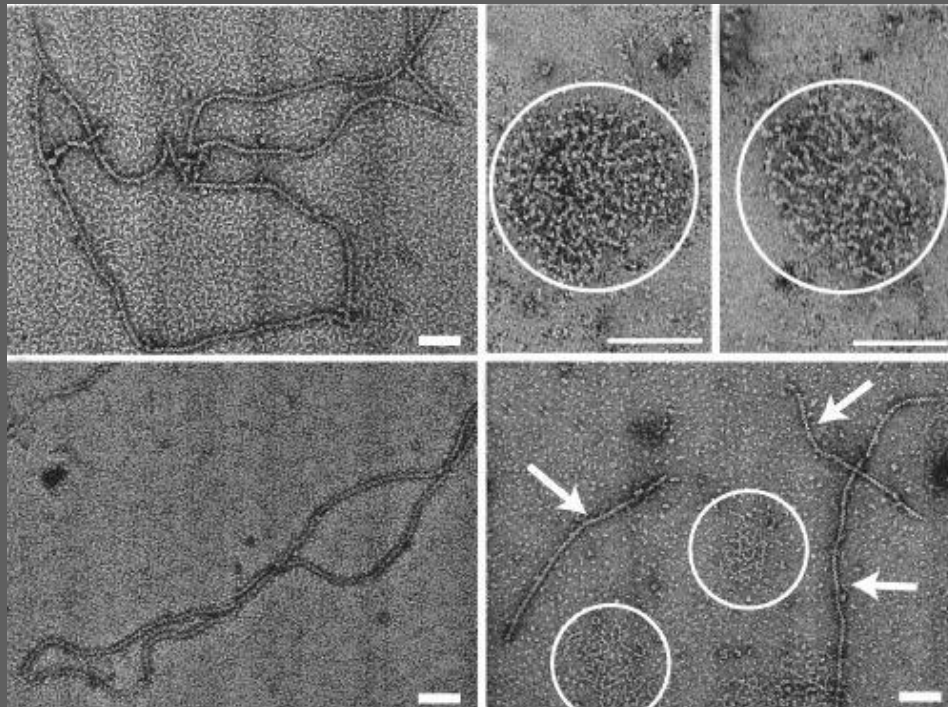
Lisby *et al.*, *Cell*, 2004

Metódy štúdia DNA opravných mechanizmov

- *in vitro* metódy
- Analýza biochemickej aktivity
 - Väzba na DNA
 - Nukleázová esej
 - Helikázová esej
 - Polymerázová esej

Rekonštrukcia opravných mechanizmov

Elektrónová mikroskopia



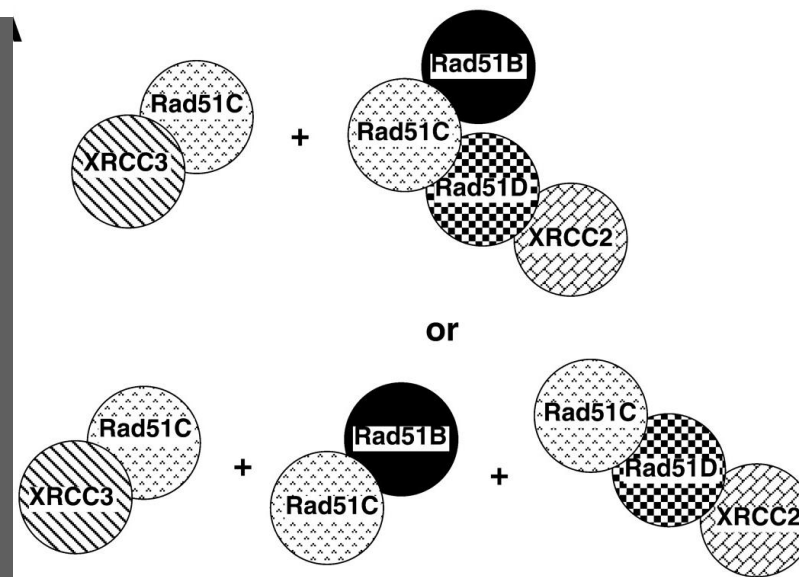
Kolesár, unpublished

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

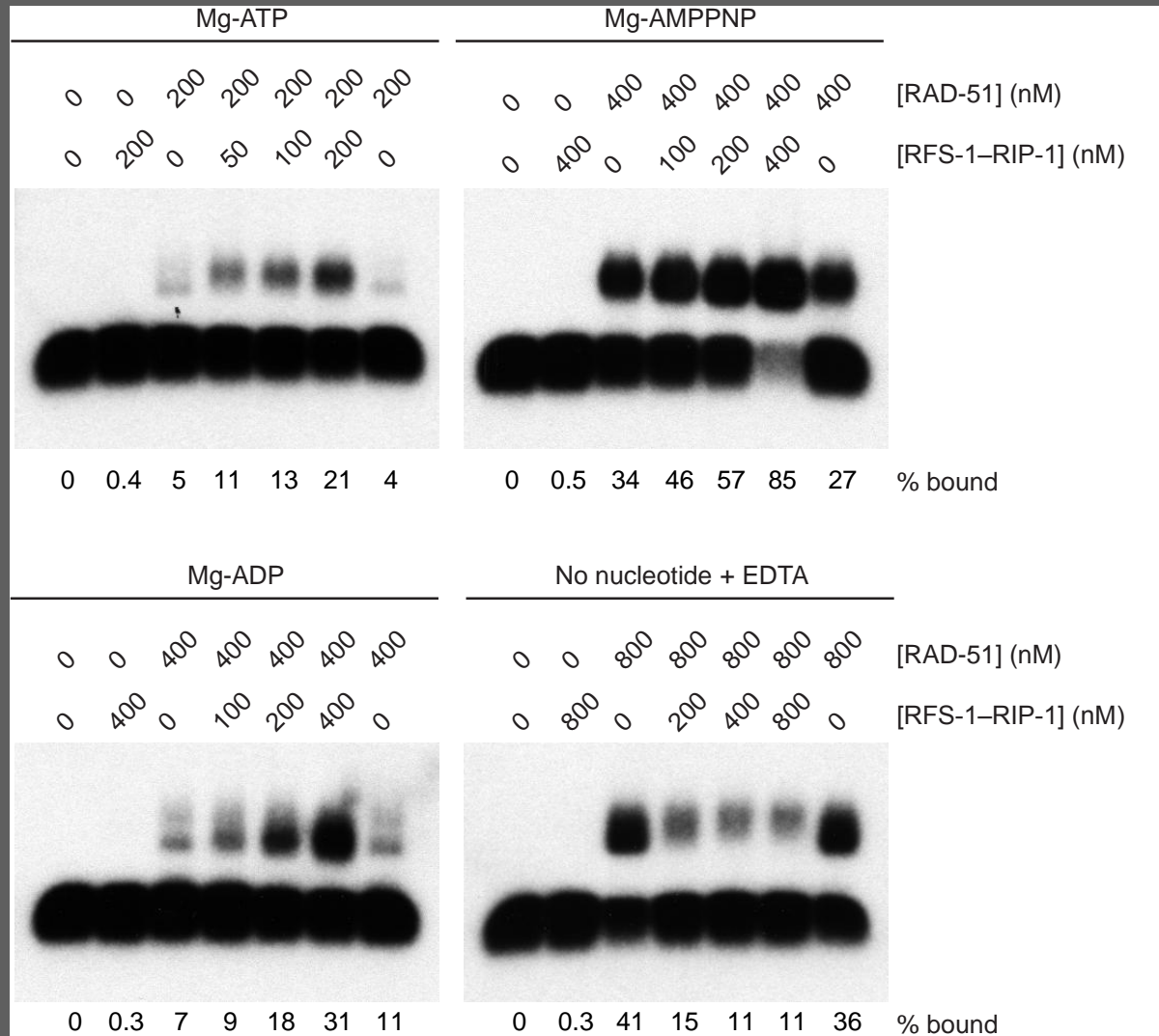
Prečo študujeme ľudské rekombinázy?

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 | – |

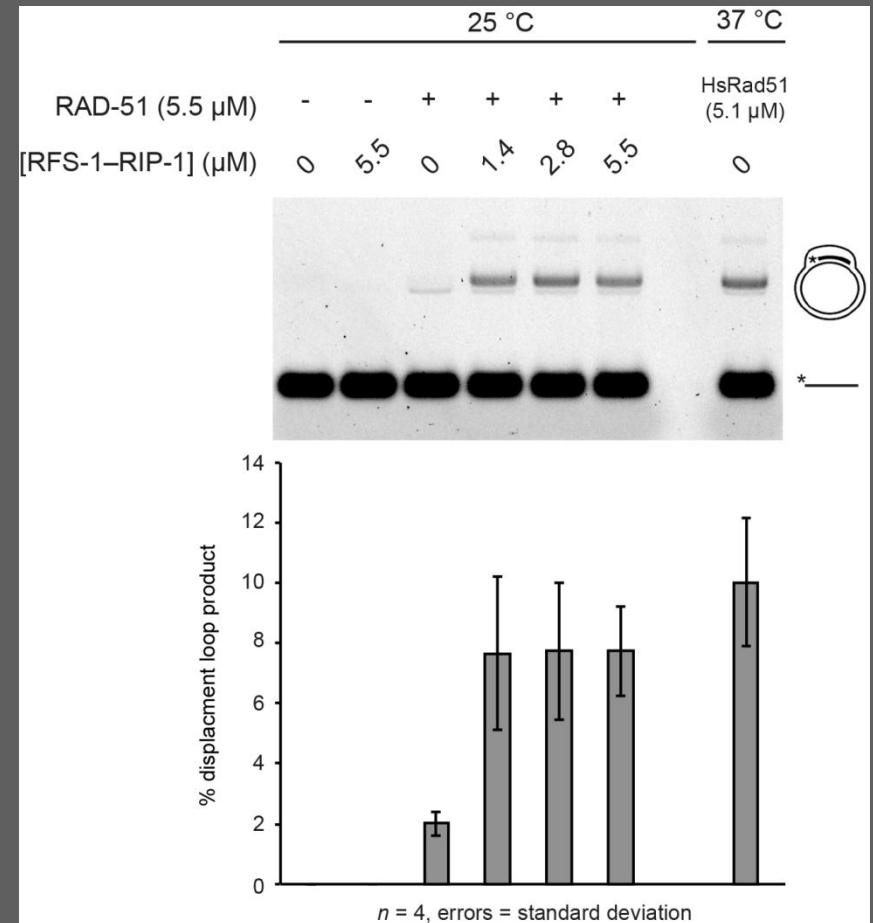
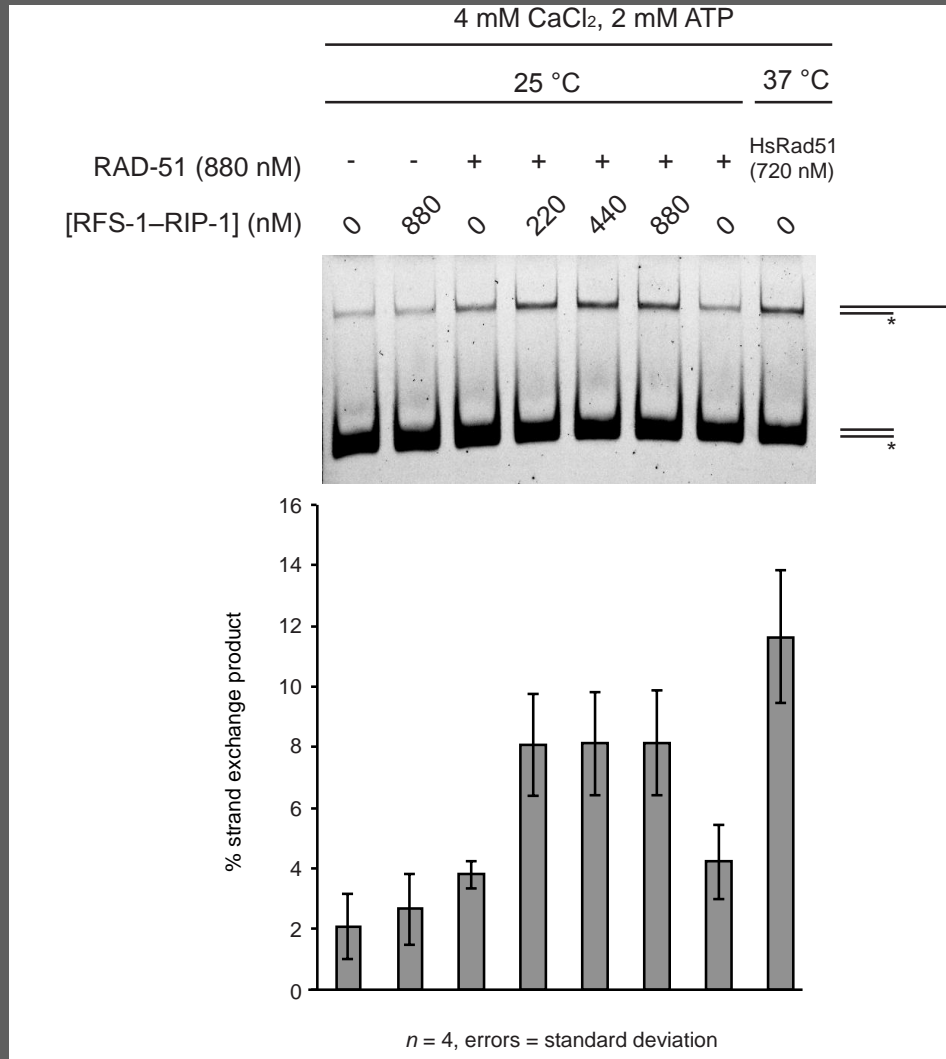


EMSA of RAD-51-ssDNA complexes \pm RFS-1-RIP-1



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