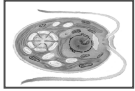


## Analýza reparačne - deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



Andrea Ševčovičová



Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta UK, sevcovicova@fns.uniba.sk

---

---

---

---

---

---

---

---

## Poškodenie DNA

Indukcia DNA poškodenia: endogénne a environmentálne vplyvy (produkty bunkového metabolismu, chemické mutagény, kyslíkové radikály, UV žiarenie, ionizačné žiarenie, atď.)

Účinok na bunku:

- cytotoxický
- mutagénny
- zastavenie bunkového cyklu

Následky:

- karcinogenéza
- stárnutie

---

---

---

---

---

---

---

---

## Odpoveď bunky na poškodenie DNA

### Priama oprava DNA poškodenia

- Enzymatická fotoreaktívácia
- Oprava spórových fotoproduktov
- Oprava alkylovaných báz a alkylfosfotriesterov pomocou alkyltransferázy
- Ligácia zlomov reťazcov DNA

### Excízia DNA poškodenia

- Bázová excízna oprava
- Nukleotidová excízna oprava
- Oprava chybné spárovaných báz

### Tolerovanie poškodenia DNA

- Obídienie poškodeného úseku DNA s vytvorením medzery a rekombinácia
- Translézna syntéza DNA

---

---

---

---

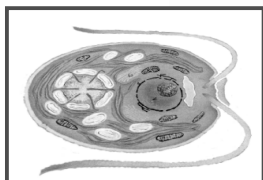
---

---

---

---

**Reparačné mechanizmy**  
**C. reinhardtii**



Na základe citlivosti k UV žiareniu - uvs mutanty.

---

---

---

---

---

---

---

---

**Reparačné mechanizmy**  
**C. reinhardtii**

fotoreaktivácia: *phr1*, *phr2*

excízná oprava: *uvs1*, *uvs6*, *uvs9*, *uvs12*, *uvs15*

mismatch oprava: *uvs14* ?

rekombinačná oprava: *uvsE1*, *uvsE5*, *uvsE6*, *uvs10*

neurčená reparačná dráha: *uvs8*, *uvs11*, *uvs13*,  
*uvsX1*, *uvsX2*

---

---

---

---

---

---

---

---

**Ciele práce**

- Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*
- Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke
- Transformácia jadrového genómu *Chlamydomonas reinhardtii*

---

---

---

---

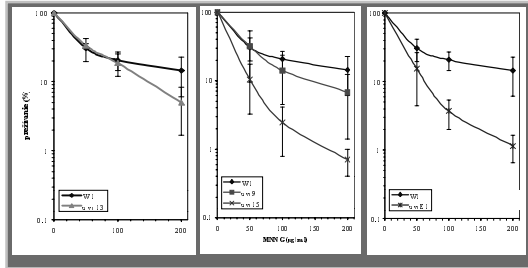
---

---

---

---

**Analyza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii***



Prežívanie štandardného a reparačne-deficitných kmeňov *C. reinhardtii* po pôsobení MNNG

---

---

---

---

---

---

---

---

**Analyza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii***

Mutabilita štandardného a reparačne - deficitných kmeňov *C. reinhardtii* po pôsobení MNNG

Dávka	WT	uvs9	uvsE1	uvs13	uvs15
K	0,385	0	2,03	4,24	0
50	18,6	4,98	6,84	11,5	2,85
100	24,66	3,64	23,92	32,73	1,1
200	42,6	28,32	58,7	60,76	3,3

\* dávka sa udáva v (µg/ml)

---

---

---

---

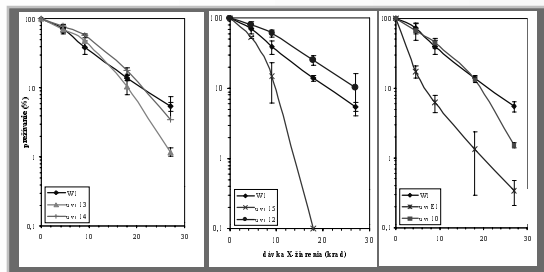
---

---

---

---

**Analyza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii***



Prežívanie štandardného a reparačne-deficitných kmeňov *C. reinhardtii* po pôsobení X-žarenia

Poznámka: 1 Rad = 10<sup>-2</sup> Gy

---

---

---

---

---

---

---

---

Analyza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*

Mutabilita štandardného a reparačne-deficitných kmeňov *C. reinhardtii* po pôsobení X-žiarenia

Dávka	W1	UvsE1	Uvs10	Uvs12	Uvs13	Uvs14	Uvs15
K	0,5	1,15	1,15	0,4	0,52	4,21	0
4,5	4,6	37,9	20,06	0	5,8	11,86	0
9	4,8	100,88	13,06	0,5	11,23	11,42	0
18	2,5	37,3	7,5	0,5	7,95	5,35	0
27	0	3,04	2,33	0	4,85	3,6	0

\* dávka sa udáva v krad

Poznámka: 1 Rad = 10<sup>-2</sup> Gy

---

---

---

---

---

---

---

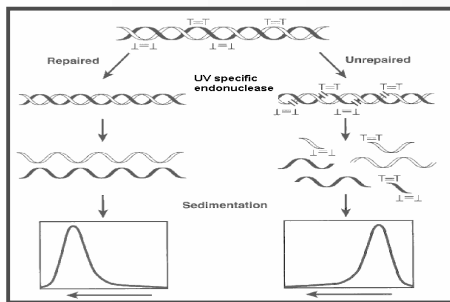
---

---

---

Analyza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*

Molekulárna analýza vyštiepovania pyrimidínových dimérov




---

---

---

---

---

---

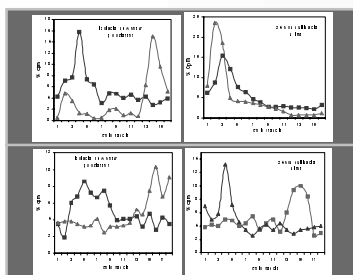
---

---

---

---

Analyza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



štandardný kmeň W1

excízne-deficitný kmeň Uvs9

Izolácia DNA ihneď po ožiarení

24 hod. kultivácia v tme

Legenda: bez UV endonukleázy s UV endonukleázou

---

---

---

---

---

---

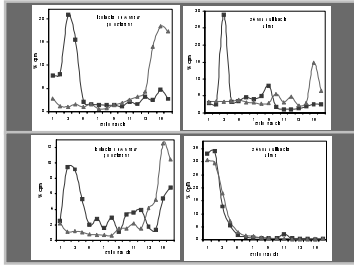
---

---

---

---

Analyza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



kmeň *uvs12*

kmeň *uvs13*

Izolácia DNA hneď po ožiarení

24 hod. kultivácia v tme

Legenda:  
bez UV endonukleázy  
s UV endonuklázou

---

---

---

---

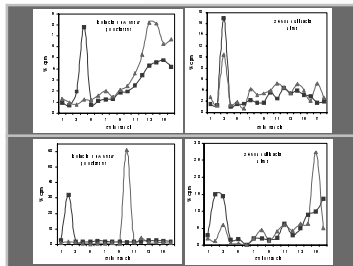
---

---

---

---

Analyza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



kmeň *uvs14*

kmeň *uvs15*

Izolácia DNA hneď po ožiarení

24 hod. kultivácia v tme

Legenda:  
bez UV endonukleázy  
s UV endonuklázou

---

---

---

---

---

---

---

---

Analyza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*

**Genetická analýza**

Križenie	Tetrádová analýza	Analýza zygót	Záver
<i>uvs1 x uvs9</i>	+		+
<i>uvs1 x uvs12</i>	+	+	+
<i>uvs1 x uvs15</i>	+	+	+
<i>uvs1 x uvs351</i>	+		+
<i>uvs1 x uvs371</i>	-	-	-
<i>uvs9 x uvs12</i>	+		+
<i>uvs9 x uvs15</i>	+	+	+
<i>uvs9 x uvs351</i>	-	-	-
<i>uvs12 x uvs15</i>	+	+	+
<i>uvs12 x uvs351</i>	+		+
<i>uvs15 x uvs351</i>	+	+	+
<i>uvs15 x uvs371</i>	+	+	+
<i>uvs351 x uvs371</i>	+		+

V tejto skupine mutantov s poruchou excíznej opravy ide o 4 samostatné gény určujúce citlivosť k UV žiareniu.

---

---

---

---

---

---

---

---

## Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke

### *uvs11*

- zvýšená citlivosť k UV a MNNG v porovnaní so štandardným kmeňom, zvýšená mutabilita
- pri mikroskopickom hodnotení prežívania po pôsobení UV-žiarenia vykazoval významné zvýšenie frekvencie buniek odumierajúcich po jednom alebo viacerých deleniach v porovnaní s ostatnými kmeňmi
- podobnosť s *rad9* mutáciou pri *S. cerevisiae*

---

---

---

---

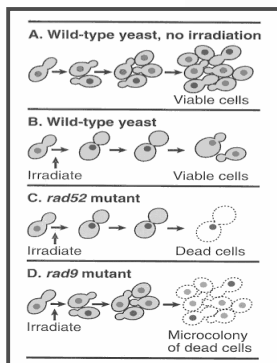
---

---

---

---

### Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke



- wt**
- po ovplyvnení X-žarením bunky zastavia bunkový cyklus - čas na opravu DNA poškodení
- rad9**
- po ovplyvnení X-žarením bunky pokračujú v delení a po niekoľkých deleniach odumierajú
  - po zastavení bunkového cyklu pomocou MBC vykazovali prežívanie na úrovni štandardného kmeňa
  - esenciálny pre zastavenie bunkového cyklu v G2 fáze

---

---

---

---

---

---

---

---

### Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke

- Zistiť pravdepodobnú úlohu *UVS11* génu v regulácii a jeho vplyv na opravné procesy v bunke.
- Sledovať možnú analógiu funkcie *RAD9* génu pri kvasinkách *S. cerevisiae* a *UVS11* génu pri riasach *C. reinhardtii*.

---

---

---

---

---

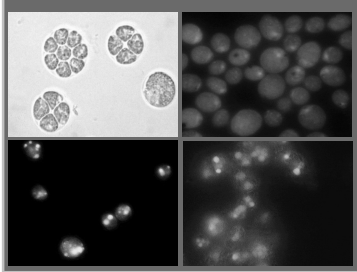
---

---

---

**Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke**

bunky štandardného kmeňa na konci bunkového cyklu pred uvoľnením z materskej bunkovej steny      bunky zafarbené fluorochrómom DAPI



bunky ovplyvnené MBC v skorjej rastovej fáze      bunky s rôznym počtomjadier, prídanie MBC v neskorjej rastovej fáze

Vplyv MBC na zastavenie bunkového cyklu riasy *C. reinhardtii*

---

---

---

---

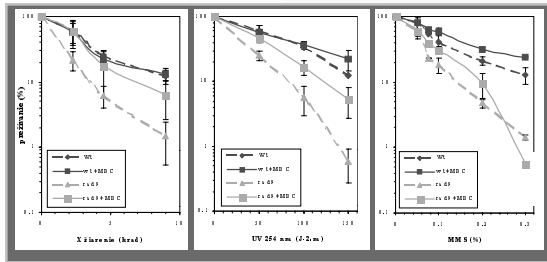
---

---

---

---

**Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke**



Prežítvanie štandardného a *rad9* kmeňa *S.cerevisiae* po pôsobení UV-, X-žiarenia a MMS s a bez MBC

Poznámka: 1 Rad = 10<sup>-2</sup> Gy

---

---

---

---

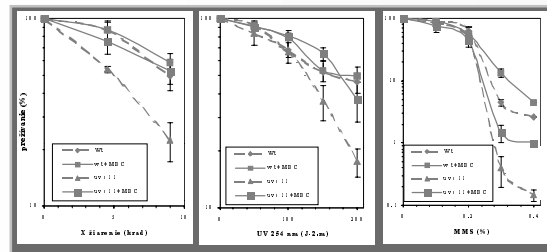
---

---

---

---

**Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke**



Prežítvanie štandardného a *uvs11* mutanta *C.reinhardtii* po pôsobení UV-, X-žiarenia a MMS s a bez MBC

Poznámka: 1 Rad = 10<sup>-2</sup> Gy

---

---

---

---

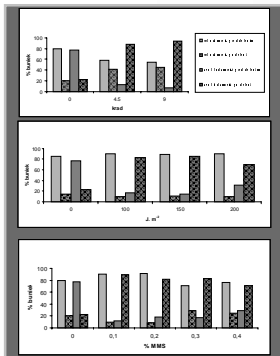
---

---

---

---

**Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke**



Pomer počtu buniek odumretých pred delením k počtu buniek, ktoré sa pred odumretím aspoň jedenkrát rozdelia po pôsobení UV-, X-žiarenia a MMS

---

---

---

---

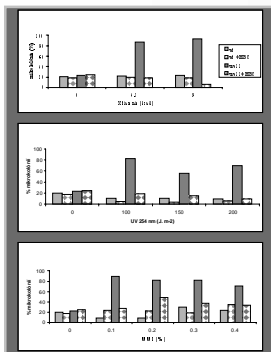
---

---

---

---

**Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke**



Vplyv MBC na počet mikrokolónií štandardného kmeňa a *uvs11* mutanta po pôsobení UV-, X-žiarenia a MMS

---

---

---

---

---

---

---

---

**Transformácia jadrového genómu *C. reinhardtii***

Podmienka pre napredovanie štúdia v oblasti reparačných mechanizmov *C. reinhardtii*

Tri metódy na zavedenie DNA do jadra *C. reinhardtii*:

1. Bombardovanie
2. Elektroporácia
3. Pretrepávanie v prítomnosti polyetylénglykolu a sklenených guľičiek

---

---

---

---

---

---

---

---



**Transformácia jadrového genómu**  
***C. reinhardtii***

Plazmid: pArg7.8  
Transformované kmene: *cw15arg7.8*  
*arg7.8*  
Odstránenie bunkovej steny: pomocou  
gametického lytického enzýmu autolyzínu

---

---

---

---

---

---

---

---

**Transformácia jadrového genómu**  
***C. reinhardtii***

Sledovali sme vplyv nasledovných  
parametrov na úspešnosť transformácie:

- čistota plazmidovej DNA
- molekulová hmotnosť polyetylénglykolu
- typ sklenených guľčiek
- genotyp recipientného kmeňa
- čas ovplyvnenia.

---

---

---

---

---

---

---

---

**Transformácia jadrového genómu**  
**kmeňa *cw15arg7.8***

<i>pDNA</i>	sklenené guľčiky	PEG6000 Účinnosť transformácie (x 10 <sup>-6</sup> )	PEG8000 Účinnosť transformácie (x 10 <sup>-6</sup> )
I	1.	0,35	6,8
	2.	1,7	0,73
II	1.	1,7	15,9
	2.	1,05	2,9
III	1.	-	0,6

---

---

---

---

---

---

---

---

## Transformácia jadrového genómu kmeňa *arg7.8*

sklenené guličky	pDNA	PEG8000 Účinnosť transformácie (x 10 <sup>-6</sup> )
1.	I	1,16
	II	0,23
	III	0,12

---

---

---

---

---

---

---

---

## Závery

- všetky testované reparačne-deficitné kmene sú citlivejšie na pôsobenie MNNG v porovnaní so štandardným kmeňom
- zvýšená citlivosť k MNNG pri mutantovi *uvsE1* s poruchou rekombinačnej reparačnej dráhy naznačila, že rekombinačný reparačný mechanizmus hrá úlohu pri oprave porúch spôsobených týmto alkylačným agensom
- pri kmeňoch *uvs9* a *uvs15*, s poruchou excíznej opravy, sme zistili zníženú frekvenciu mutácií vedúcich k streptomycínovej rezistencii indukovaných MNNG v porovnaní so štandardným kmeňom. Pozorované zníženie mutability týchto kmeňov naznačuje čiastočnú odlišnosť vo vzťahu k presnosti opravy po pôsobení MNNG medzi fotoautotrofnými a heterotrofnými organizmami

---

---

---

---

---

---

---

---

- väčšina testovaných reparačne-deficitných mutantov je citlivejšia na pôsobenie X-žiarenia ako štandardný kmeň
- znížené prežívanie a zvýšené frekvencie mutácií po pôsobení X-žiarenia oproti štandardnému kmeňu pri kmeni *uvsE1* naznačuje, že pri riasach *C. reinhardtii* hrá rekombinačná reparačná dráha dôležitú úlohu pri odstraňovaní poškodenia indukovaného X-žiarením a že táto reparačná dráha je presná (error-free)
- najcitlivejší testovaný kmeň *uvs15* vykazuje podobnosť s *rad6* mutantom *S. cerevisiae* s rozhodujúcou úlohou v mutagénnej epistatickej skupine
- molekulárna analýza potvrdila poruchu vo vyštiepovaní pyrimidínových dimérov pri kmeňoch *uvs15* a *uvs12*, pri kmeňoch *uvs13* a *uvs14* nebola potvrdená porucha vo vyštiepovaní pyrimidínových dimérov

---

---

---

---

---

---

---

---

- výsledky molekulárnej a mutačnej analýzy naznačili, že pri kmeni *uvs15* by mohlo ísť o mutáciu v géne s pleiotropným účinkom
- z výsledkov genetickej analýzy vyplýva, že v rámci skupiny mutantov s poruchou excíznej opravy ide pravdepodobne o 4 rôzne gény určujúce citlivosť k UV žiareniu
- dokázali sme zvýšenú citlivosť *uvs11* mutanta *C. reinhardtii* na pôsobenie UV-, X-žiarenia a MMS
- dokázali sme, že zastavenie bunkového cyklu pomocou MBC vedie k zvýšeniu prežívania a k zníženiu počtu mikrokolónii pri *uvs11* mutantovi rias *C. reinhardtii* po pôsobení UV, X-žiarenia a MMS

---

---

---

---

---

---

---

---

- Uskutočnili sme transformáciu jadrového genómu dvojitého mutantu *arg7cw15 C. reinhardtii* plazmidom pARG7.8 nesúcim funkčný gén pre arginínsukcinátlyázu metódou využívajúcou sklenené guľičky a PEG. Dosiahli sme účinnosť transformácie v rozmedzí  $0,35 \times 10^{-6}$  až  $15,9 \times 10^{-6}$ /bunku.
- Pri kmeni *cc51 C. reinhardtii* sme dosiahli účinnosť transformácie v rozmedzí  $0,12 \times 10^{-6}$  až  $1,16 \times 10^{-6}$ /bunku.
- Zistili sme, že na účinnosť transformácie vplyva viacero parametrov: čistota plazmidovej DNA, koncentrácia a molekulová hmotnosť polyetylén glykolu, genotyp recipientného kmeňa, čas ovplyvnenia.

---

---

---

---

---

---

---

---

## Pod'akovanie

Práca vznikla pod vedením Prof. RNDr. Daniela Vlčka, DrSc., v spolupráci s:

- Oddelenie molekulárnej genetiky ÚEO SAV
- Slovenský metrologický ústav v Bratislave
- Oddelenie molekulárnej biológie Univerzity v Ženeve

Moje osobitné pod'akovanie patrí kolektívu pracovníkov Katedry genetiky Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave.

---

---

---

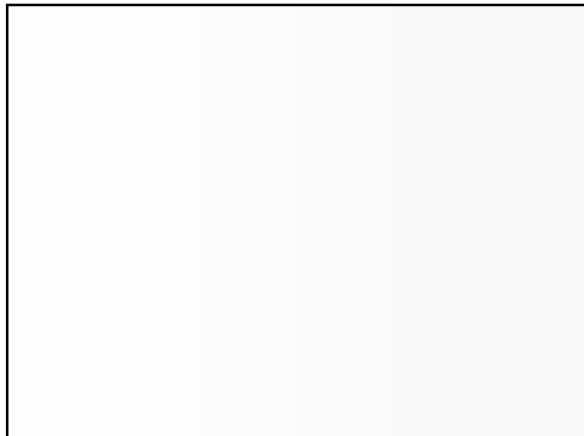
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---

### NHEJ - priame spojenie zlomov

- vyžaduje len malú (2-20 bp) alebo žiadnu sekvenčnú homológiu na DNA koncoch
- môže byť error-free aj error-prone
- prevláda pri oprave DSBs u cicavcov, kde sa na nej zúčastňuje DNA ligáza IV a s ňou asociovaný proteín XRCC1 a 3 podjednotky na DNA závislého proteín-kinázového komplexu (DNA-PK) -Ku70 (XRCC6), Ku80 (XRCC5) a katalytická podjednotka DNA-PKcs (XRCC7)

**Princíp:** DNA-PK sa viaže na konce DNA a stimuluje DNA-ligázovú aktivitu komplexu DNA-ligáza IV-XRCC4

pri kvasinkách:

HDF1 (yKu70p), HDF2 (yKu80p) - komplex zodpovedný za preporenie DNA koncov

RAD50, MRE11, XRS2 - komplex zodpovedný za nukleolytický processing DNA koncov

DNL4 - homológ ľudskej DNA ligázy IV SIR2, SIR3, SIR4

---

---

---

---

---

---

---

---

### Mutabilita štandardného a reparačne-deficitných kmeňov *C. reinhardtii* po pôsobení X-žiarenia

Dávka / kmeň	W1	uvsE1	uvs10	uvs12	uvs13	uvs14	uvs15
K	0,5 ± 0,4	1,15 ± 0,76	1,15 ± 0,9	0,4 ± 0,63	0,52 ± 0,5	4,2 ± 3,35	0 ± 0
4,5	4,6 ± 2,66	37,9 ± 26,73	20,06 ± 13,86	0 ± 0	5,8 ± 5,2	11,86 ± 5,01	0 ± 0
9	4,8 ± 1,98	100,88 ± 53,1	13,06 ± 7,18	0,5 ± 1,15	11,23 ± 4,8	11,42 ± 6,98	0 ± 0
18	2,5 ± 1,16	37,3 ± 18,27	7,5 ± 3,81	0,5 ± 0,93	7,95 ± 6,7	5,35 ± 4,03	0 ± 0
27	0 ± 0	3,04 ± 6,5	2,33 ± 1,68	0 ± 0	4,85 ± 5,25	3,6 ± 3,49	0 ± 0

Frekvencia priamych mutácií vedúcich k rezistencii na streptomycín pri reparačne-deficitných kmeňoch *C. reinhardtii* po pôsobení X-žiarenia (počet mutantov na milión prežívajúcich buniek).

---

---

---

---

---

---

---

---