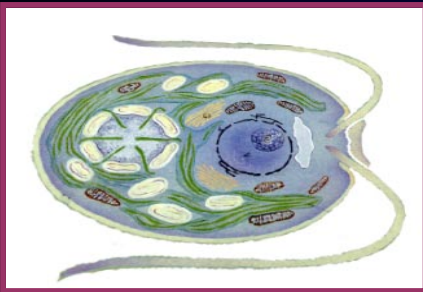
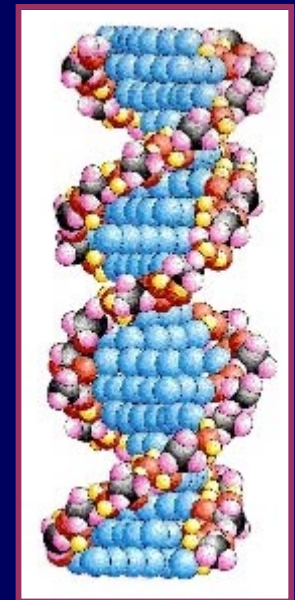


# Analýza reparačne - deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



Andrea Ševčovičová



# Poškodenie DNA

Indukcia DNA poškodenia: endogénne a enviromentálne vplyvy (produkty bunkového metabolizmu, 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 fotoreaktivácia
- Oprava spórových fotoproduktov
- Oprava alkylovaných báz a alkylfosfotriesterov pomocou alkyltransferázy
- Ligácia zlomov reťazcov DNA

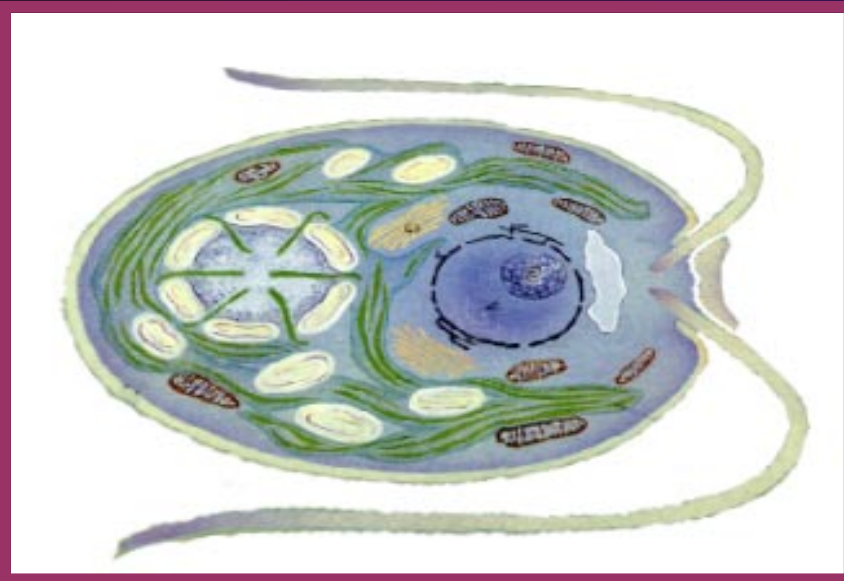
## Excízia DNA poškodenia

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

## Tolerovanie poškodenia DNA

- Obídenie 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*

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

mismatch oprava: *uvs14 ?*

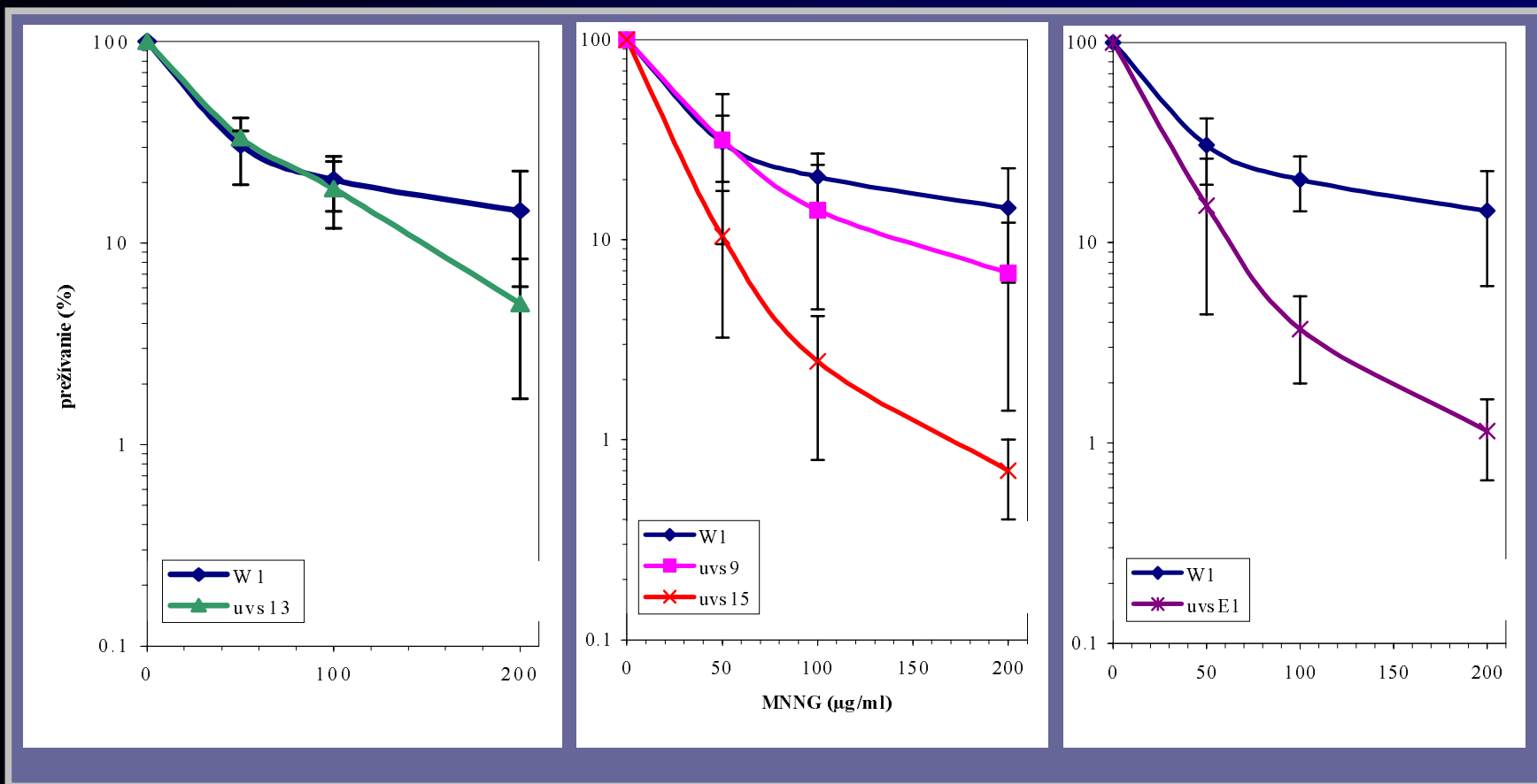
rekombinačná oprava: *uvsE1, uvsE5, uvsE6, uvs10*

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*

# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



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

# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*

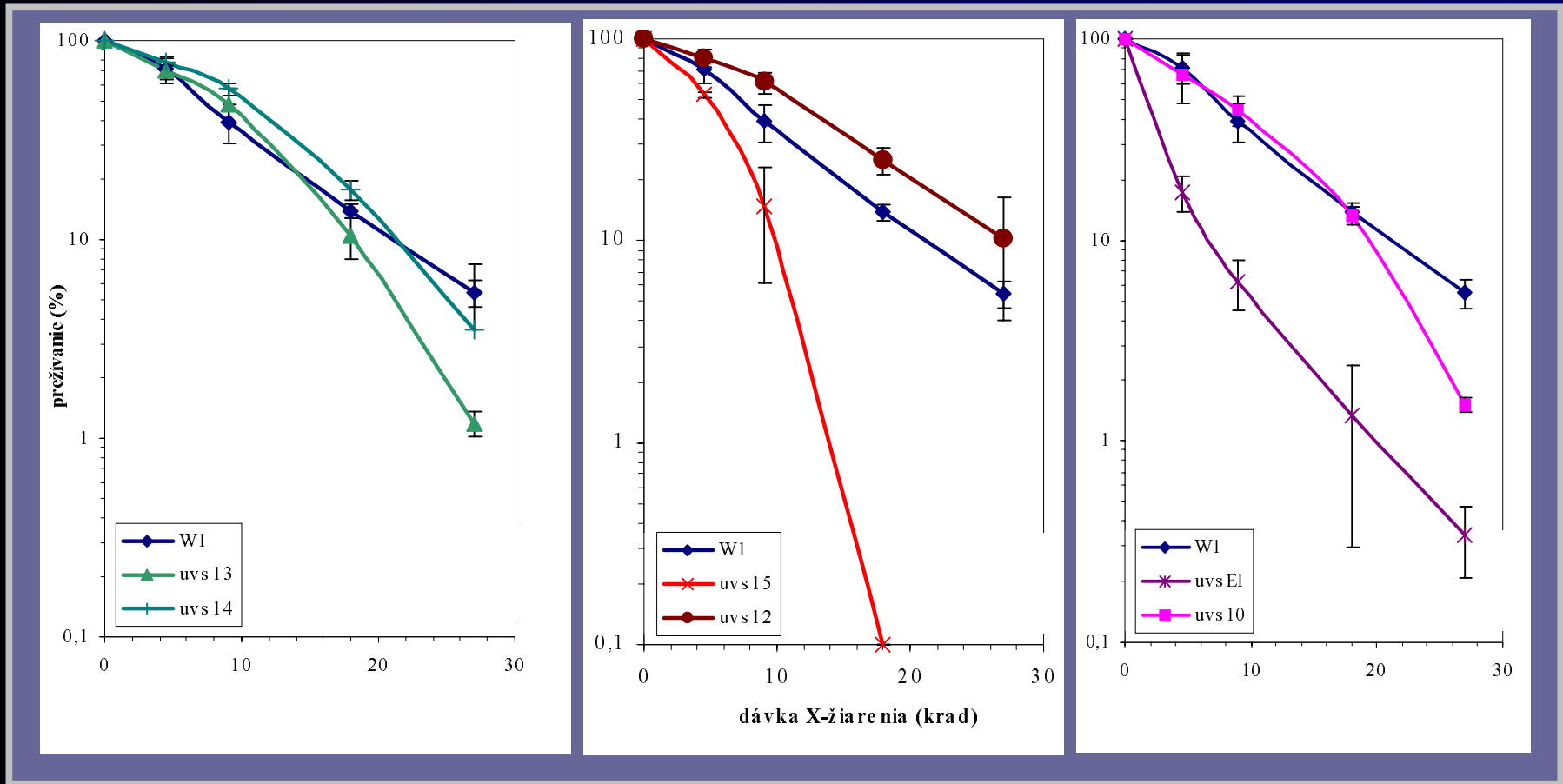
## Mutabilita štandardného a reparačne - deficitných kmeňov *C. reinhardtii* po pôsobení MNNG

Dávka	W1	uvs9	uvsE1	uvs13	uvs15
<b>K</b>	0,385	0	2,03	4,24	0
<b>50</b>	18,6	4,98	6,84	11,5	2,85
<b>100</b>	24,66	3,64	23,92	32,73	1,1
<b>200</b>	42,6	28,32	58,7	60,76	3,3

\* dávka sa udáva v ( $\mu\text{g/ml}$ )



# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



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

Poznámka: 1 Rad =  $10^{-2}$  Gy

# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*

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

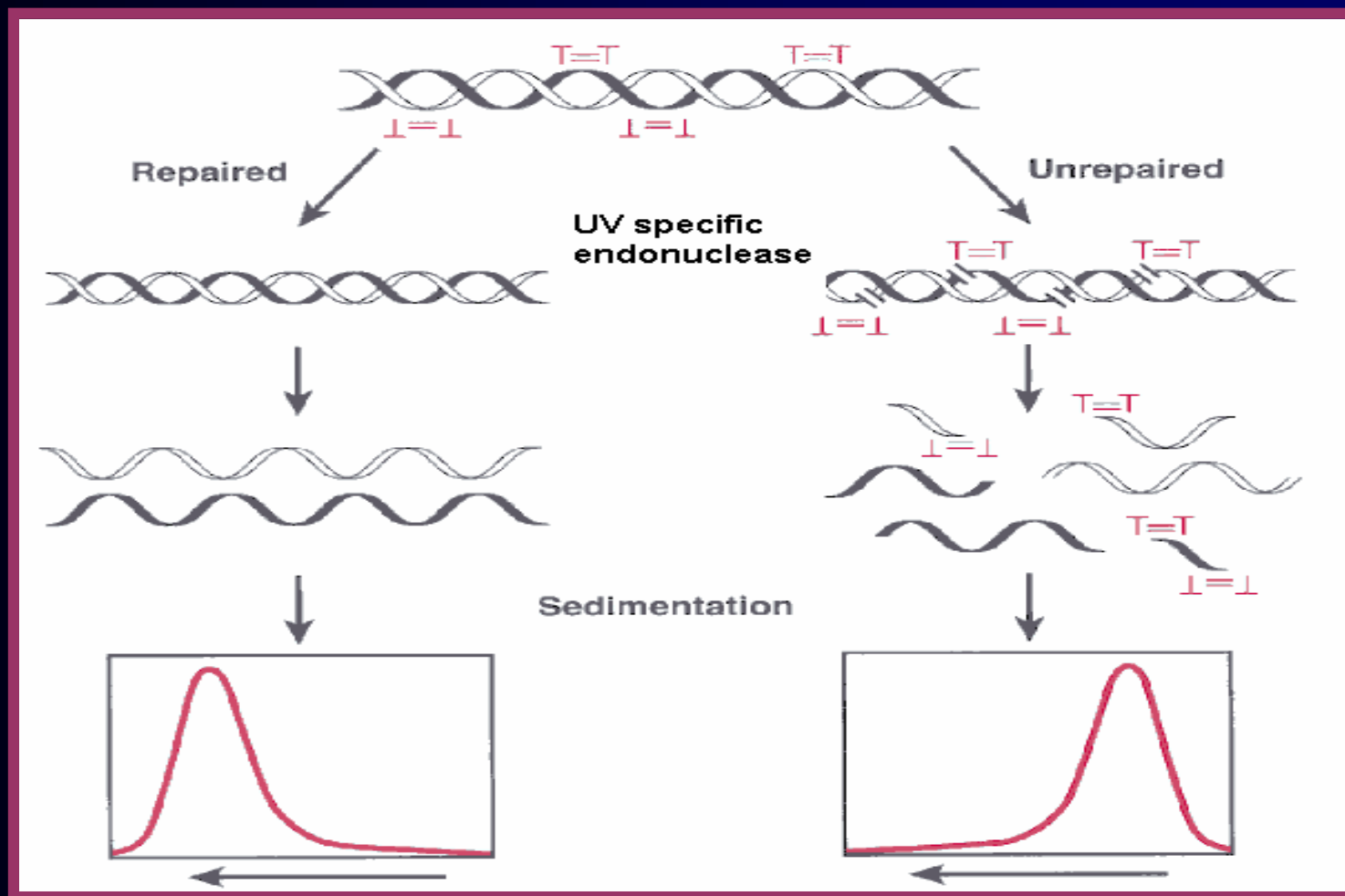
Dávka	W1	uv <sub>s</sub> E1	uv <sub>s</sub> 10	uv <sub>s</sub> 12	uv <sub>s</sub> 13	uv <sub>s</sub> 14	uv <sub>s</sub> 15
<b>K</b>	0,5	1,15	1,15	0,4	0,52	4,21	0
<b>4,5</b>	4,6	37,9	20,06	0	5,8	11,86	0
<b>9</b>	4,8	100,88	13,06	0,5	11,23	11,42	0
<b>18</b>	2,5	37,3	7,5	0,5	7,95	5,35	0
<b>27</b>	0	3,04	2,33	0	4,85	3,6	0

\* dávka sa udáva v krad

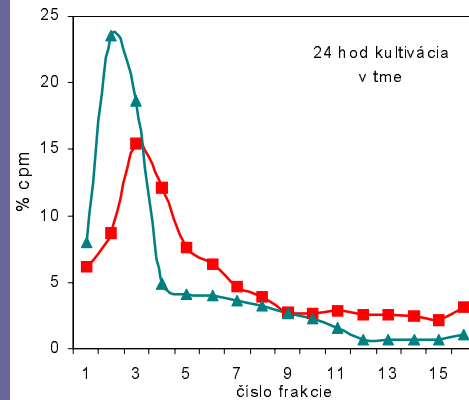
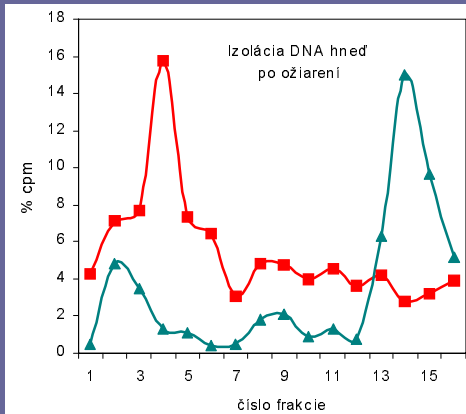
Poznámka: 1 Rad = 10<sup>-2</sup> Gy

# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*

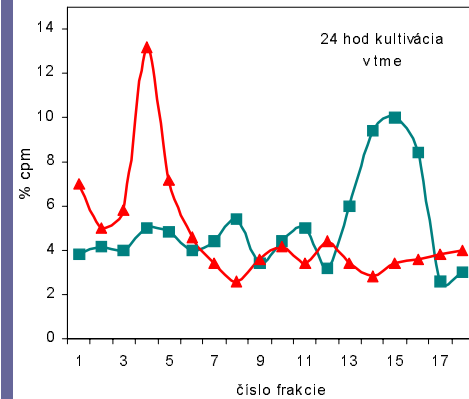
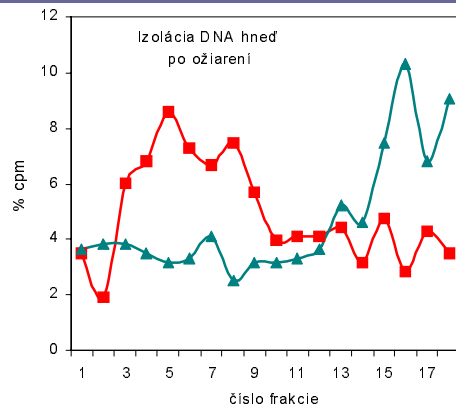
## Molekulárna analýza vyštiepovania pyrimidínových dimérov



# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



štandardný  
kmeň *W1*



excízne-deficitný  
kmeň *uvs9*

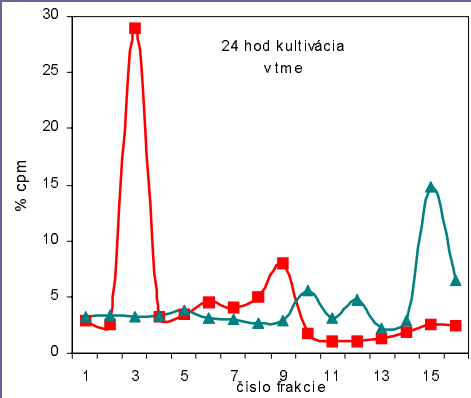
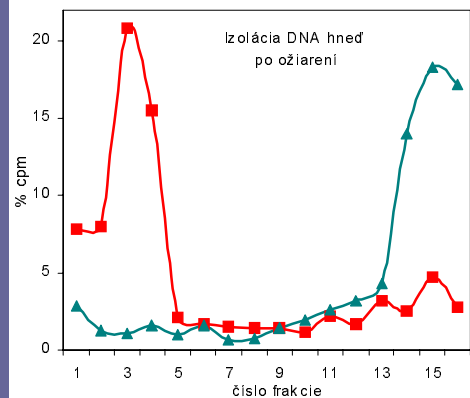
Izolácia DNA hneď  
po ožiarení

24 hod. kultivácia  
v tme

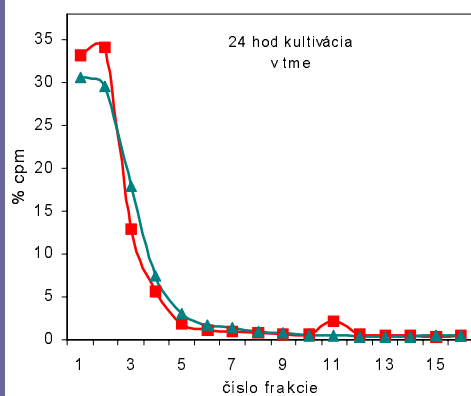
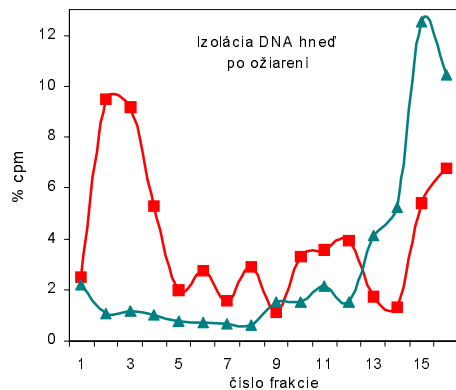
Legenda:

bez UV endonukleázy  
s UV endonukleázou

# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



kmeň *uvs12*



kmeň *uvs13*

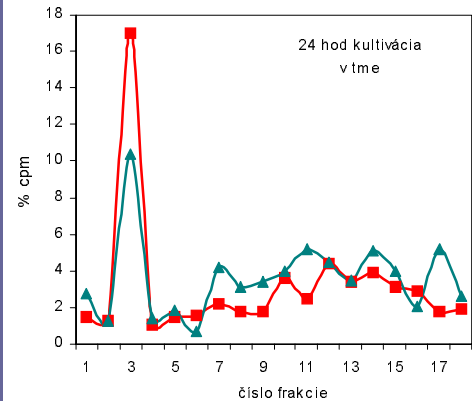
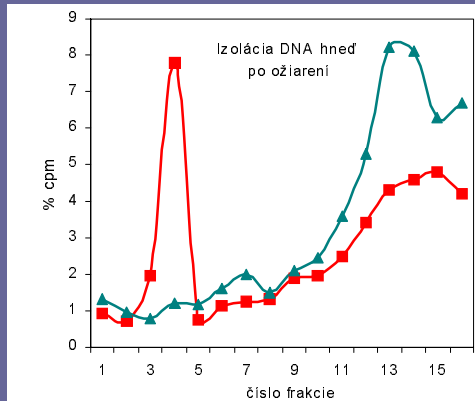
Izolácia DNA hneď po ožiarení

24 hod. kultivácia v tme

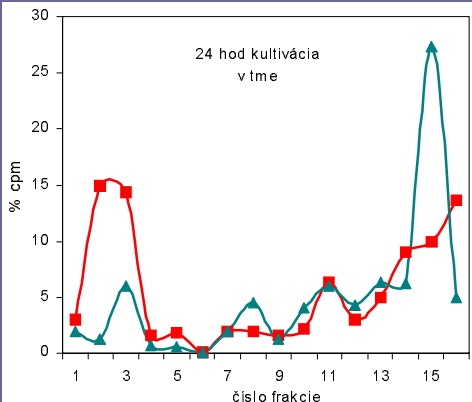
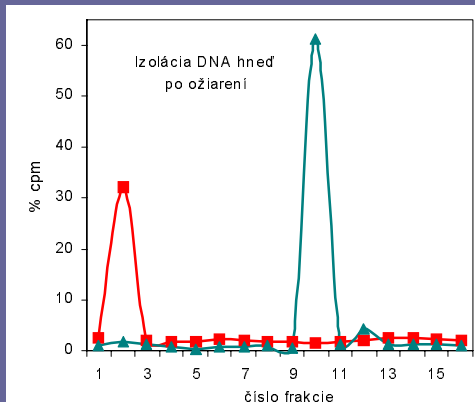
Legenda:

bez UV endonukleázy  
s UV endonukleázou

# Analýza 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

# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*

## Genetická analýza

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

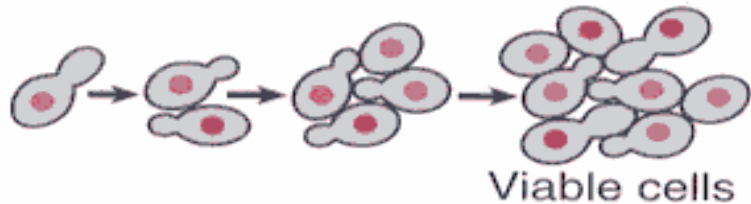
## *uvs11*

- 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*

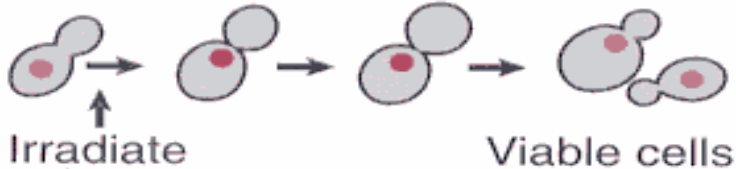


## Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke

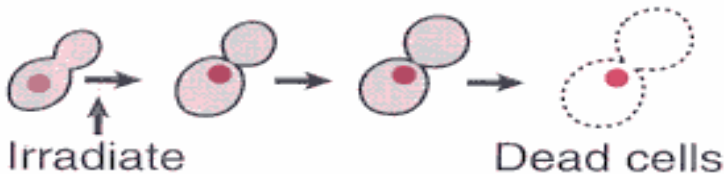
### A. Wild-type yeast, no irradiation



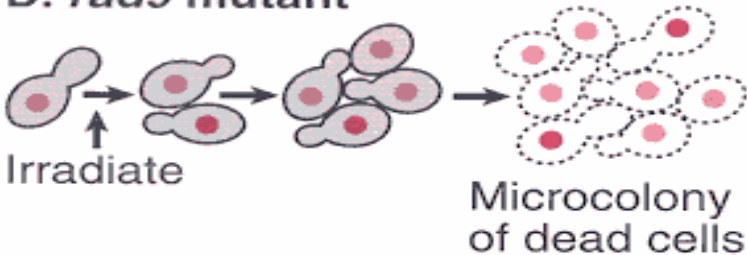
### B. Wild-type yeast



### C. *rad52* mutant



### D. *rad9* mutant



*wt*

- po ovplyvnení X-žiarením bunky zastavia bunkový cyklus - čas na opravu DNA poškodení

*rad9*

- po ovplyvnení X-žiarením 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**

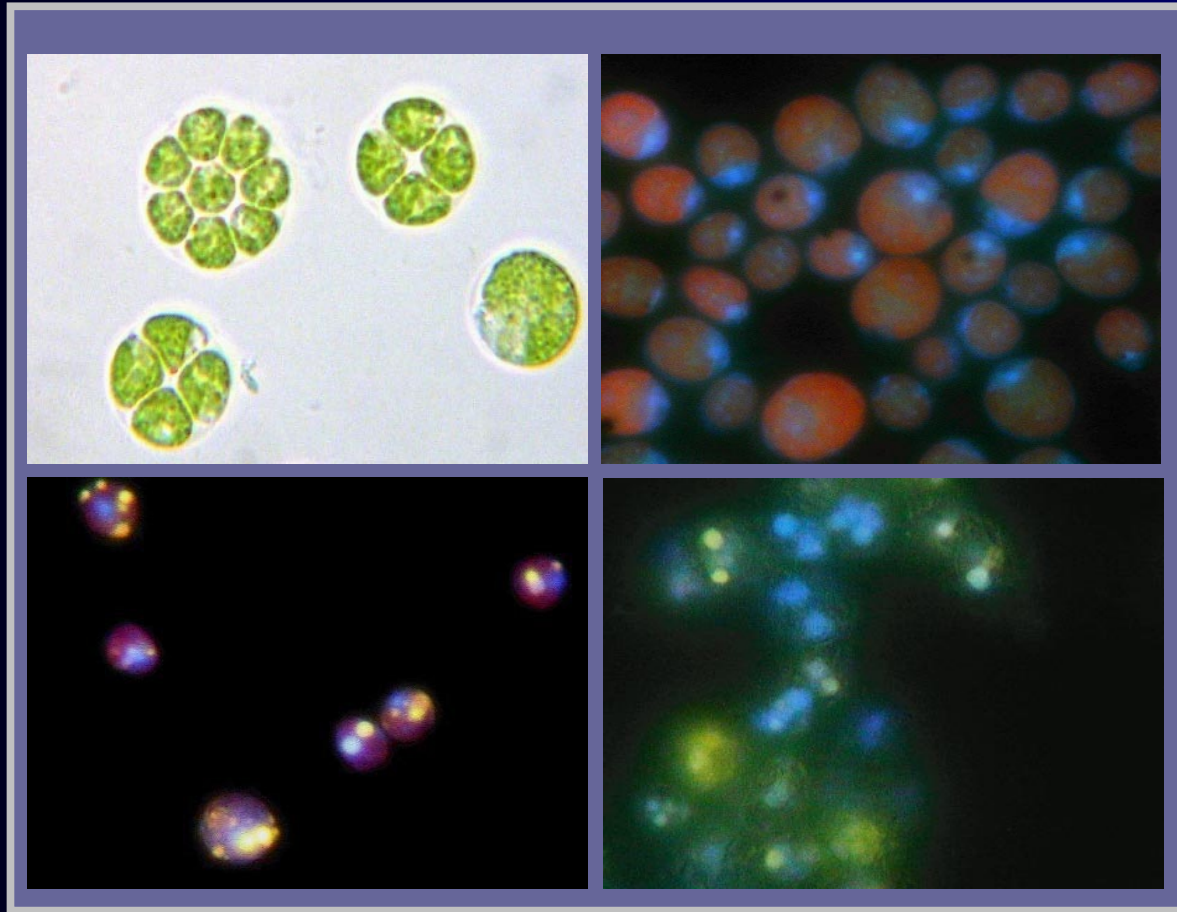
## Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke

- 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

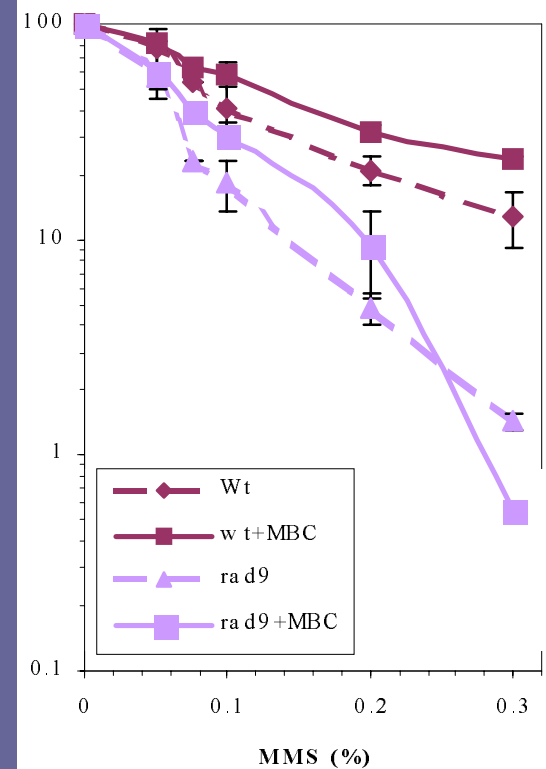
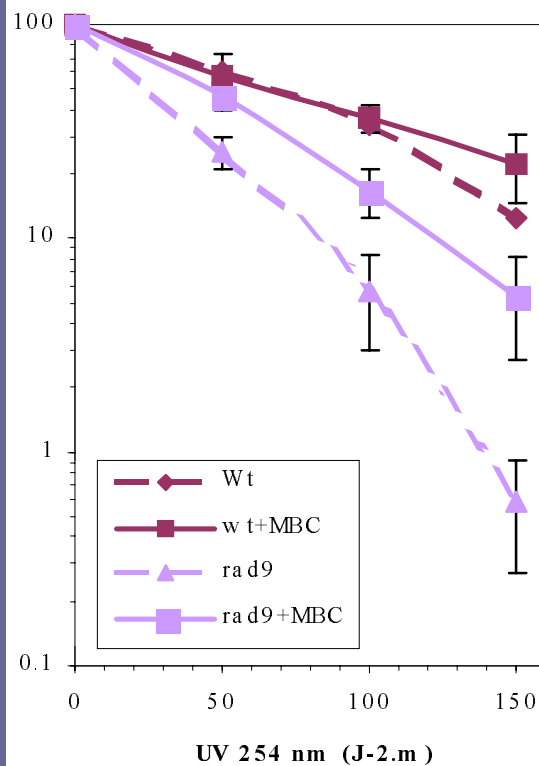
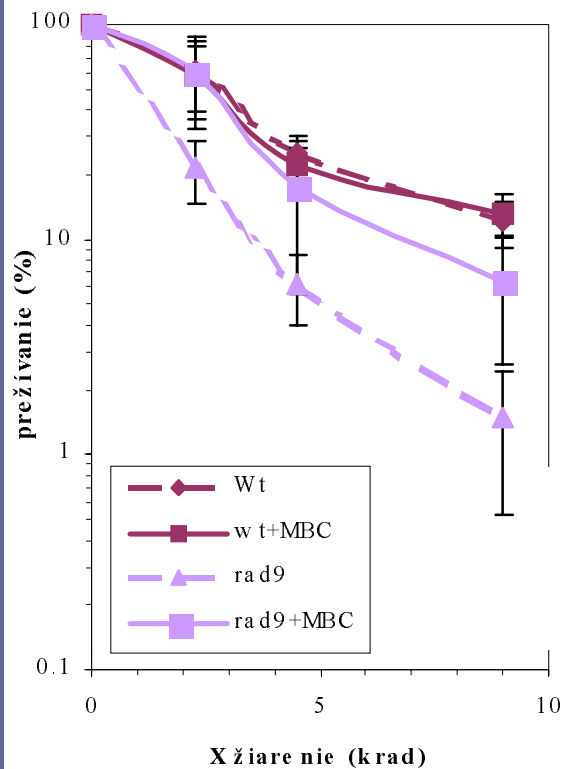


bunky ovplyvnené MBC v skorej rastovej fáze

bunky s rôznym počtom jadier,  
pridanie MBC v neskorej rastovej fáze

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

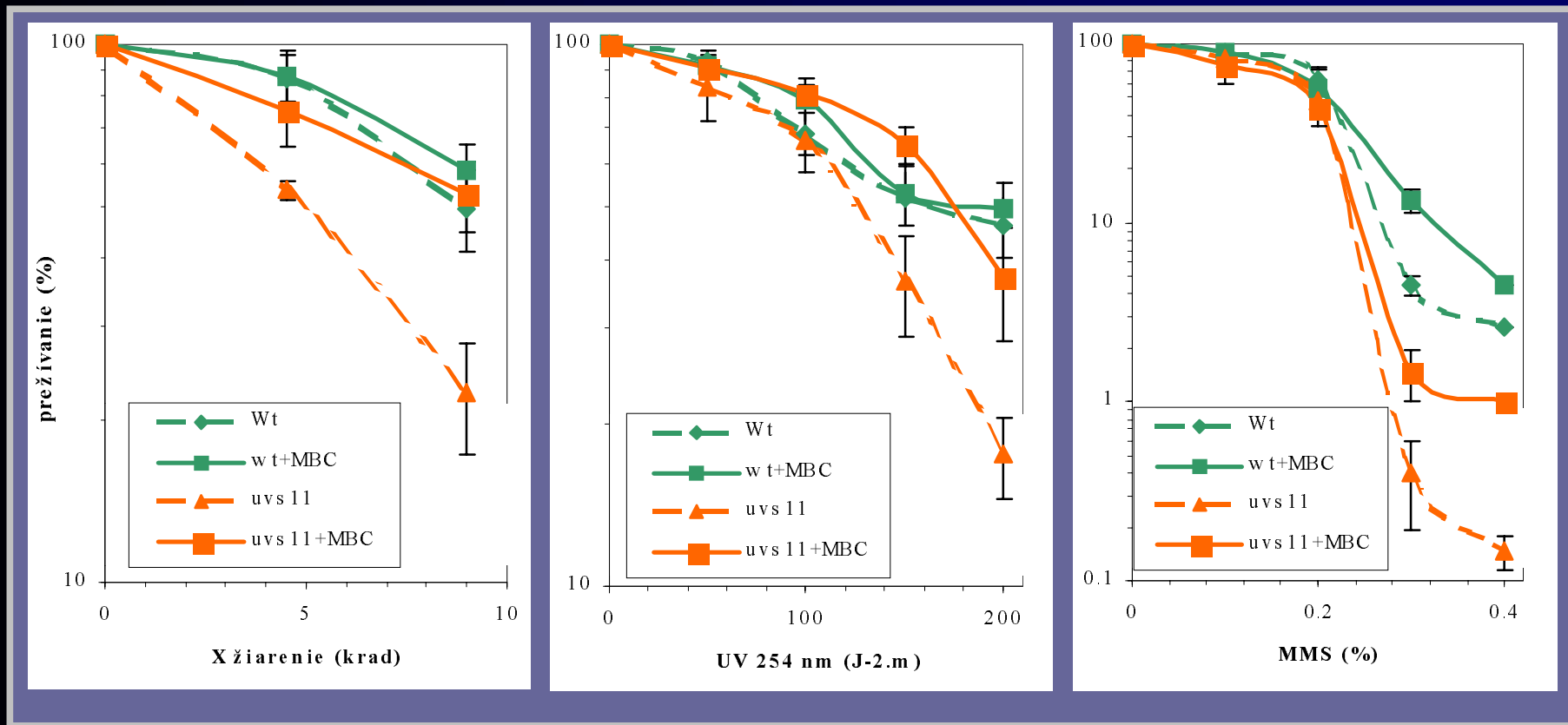
# Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke



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

Poznámka: 1 Rad =  $10^{-2}$  Gy

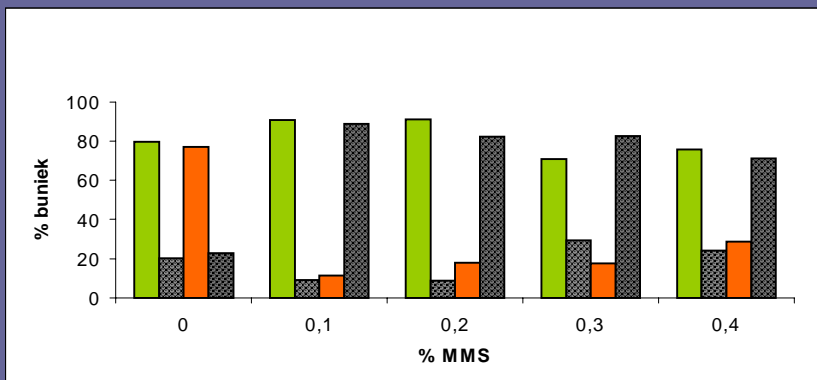
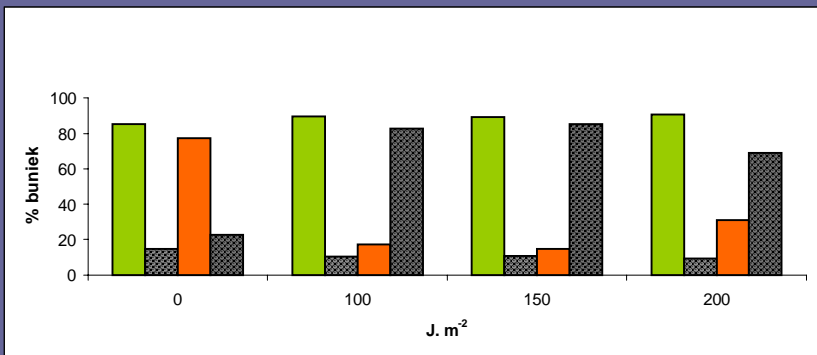
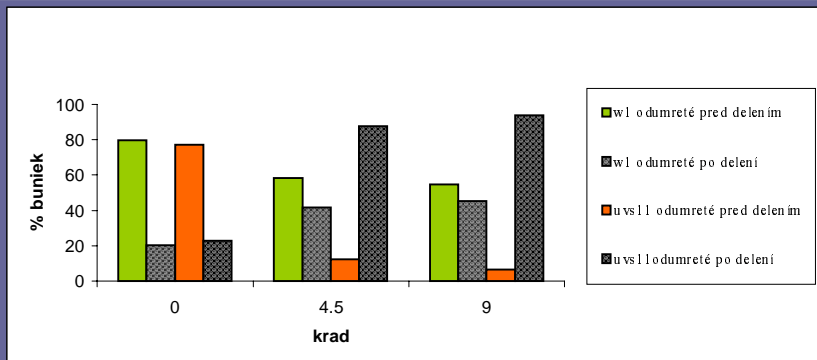
# Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke



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

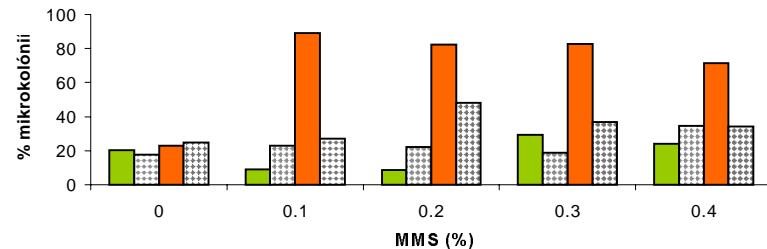
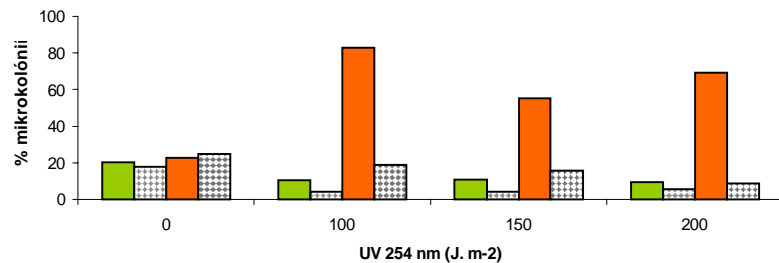
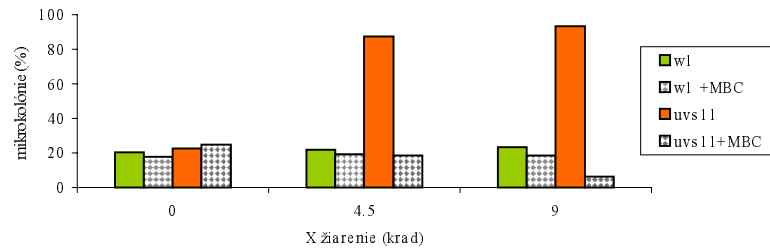
Poznámka: 1 Rad =  $10^{-2}$  Gy

# 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 mikrokolónii 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  
sklených guľčiek



# 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 sklených guľčiek
- genotyp recipientného kmeňa
- čas ovplyvnenia.

# Transformácia jadrového genómu kmeňa cw15arg7.8

<i>pDNA</i>	sklenené guličky	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*

<i>sklenené guličky</i>	<i>pDNA</i>	<b>PEG8000</b> 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 **uvrE1** s poruchou rekombinačnej reparačnej dráhy naznačila, že rekombinačný reparačný mechanizmus hrá úlohu pri oprave porúch spôsobených týmto alkylačným agensom
- pri kmeňoch **uvr9** a **uvr15**, 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 pleiotrofným 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 mutanta **arg7cw15** *C. reinhardtii* plazmidom **pARG7.8** nesúcim funkčný gén pre arginínsukcinátlyázu metódou využívajúcou sklené 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 vplýva viacero parametrov: čistota plazmidovej DNA, koncentrácia a molekulová hmotnosť polyetylénglykolu, 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 prepojenie 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	<i>W1</i>	<i>uvrE1</i>	<i>uvr10</i>	<i>uvr12</i>	<i>uvr13</i>	<i>uvr14</i>	<i>uvr15</i>
K	0,5 ± 0,4	1,15 ± 0,76	1,15 ± 0,9	0,4 ± 0,63	0,52 ± 0,5	4,21 ± 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).