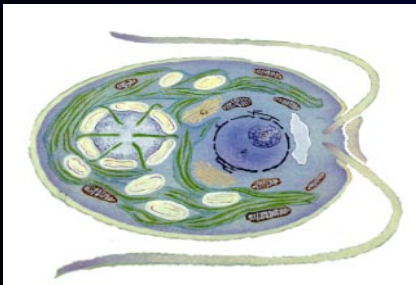
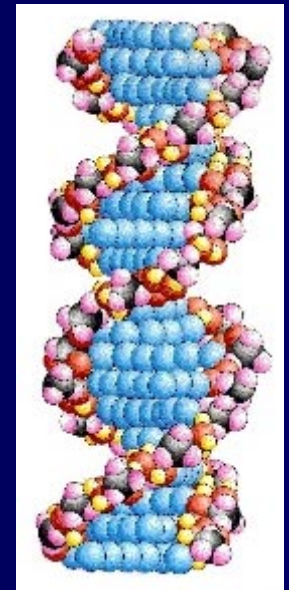


# Analýza reparačno - deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



Andrea Ševčovičová



# Obsah

## Odpoveď bunky na poškodenie DNA-prehľad mechanizmov

- Priama oprava DNA poškodenia
- Excízia DNA poškodenia
- Tolerovanie poškodenia DNA

## Výsledky práce

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

---

*Výsledky boli dosiahnuté v spolupráci s:  
Vlček, Podstavková, Miadoková, Slaninová, Nagyová,*

# 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

# Priama oprava DNA poškodenia

1. Native DNA



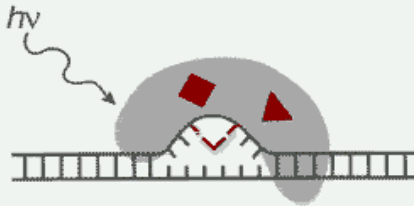
2. Pyrimidine dimer in UV DNA



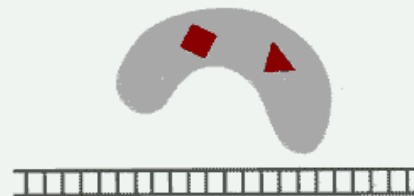
3. Complex of DNA with photoreactivating enzyme



4. Absorption of light (>300nm)



5. Release of enzyme to restore native DNA



## Fotoreaktivácia

Fotoreaktivácia je jednokrokovým opravným procesom, pri ktorom enzým fotolyáza katalyzuje na svetle závislú opravu pyrimidínových dimérov

## Priama oprava DNA poškodenia

### Oprava alkylovaných báz a alkylfosfotriesterov pomocou alkyltransferázy

Alkylované bázy a alkylfosfotriestery môžu byť v jednom kroku opravené alkyltransferázami prenesením alkyl skupiny na cysteínové zvyšky vlastnej molekuly. Naviazaním alkyl skupiny na molekulu enzýmu dochádza k jeho inaktivácii.

### Oprava spórových fotoproduktov

Pri *B. subtilis* sú 5-tyminyly-5-6-dihydrotymíny opravované lyázou.

# Priama oprava DNA poškodenia

---

## Ligácia zlomov

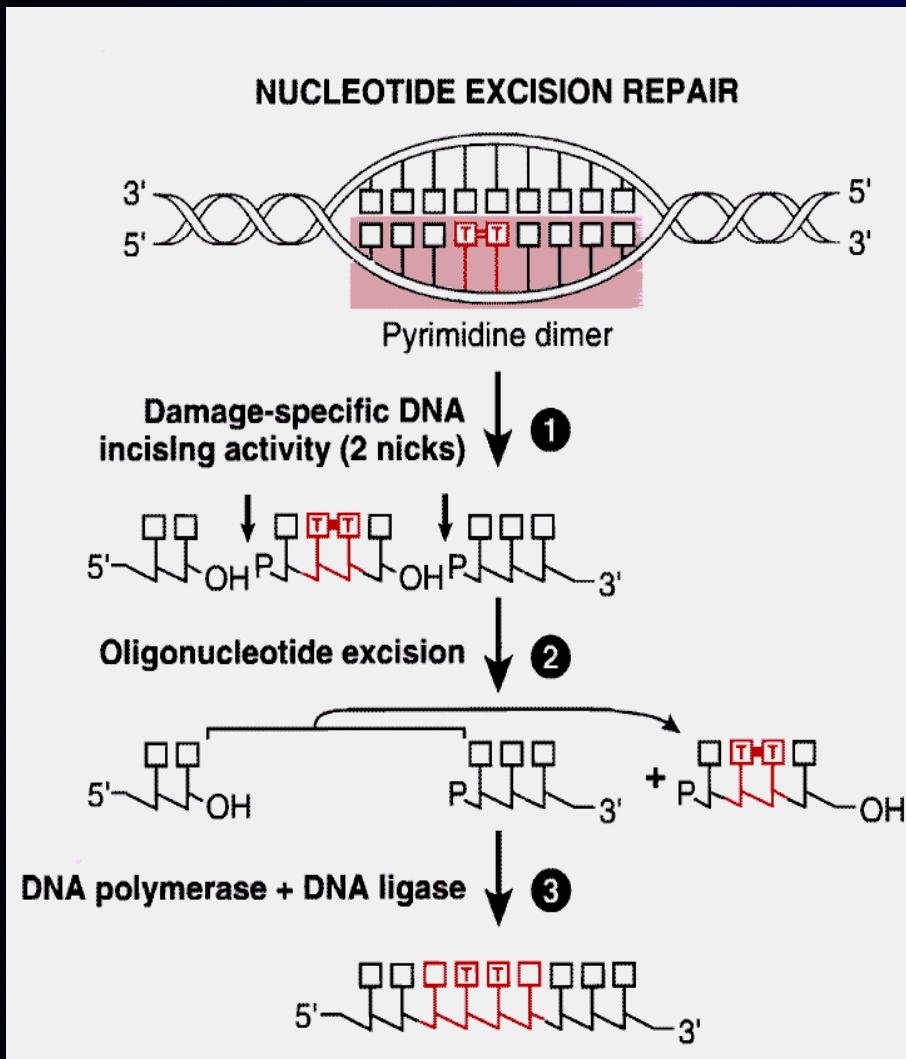
Zlomy vzniknuté hydrolýzou fosfodiesterových väzieb dvojreťazcovej DNA po pôsobení rôznych agensov zabezpečujú DNA ligázy.

**Podmienka:** prítomnosť priľahlých 3' OH a 5' P koncov

# Excízia DNA poškodenia

- najrozšírenejší a doposiaľ najlepšie preštudovaný mechanizmus opravy DNA poškodení
- je schopná opravovať najširšie spektrum poškodení, ktoré boli vyvolané UV žiarením a niektorými chemickými agensami
- oprava monoalkylátov (**bázová excízna oprava - BER**)
- oprava rozsiahlejších poškodení (**nukleotidová excízna oprava - NER**)
- oprava chybné spárovaných báz vzniknutých počas replikácie DNA (**„mismatch“ oprava**)

## Nukleotidová excízna oprava



### 5 krokov:

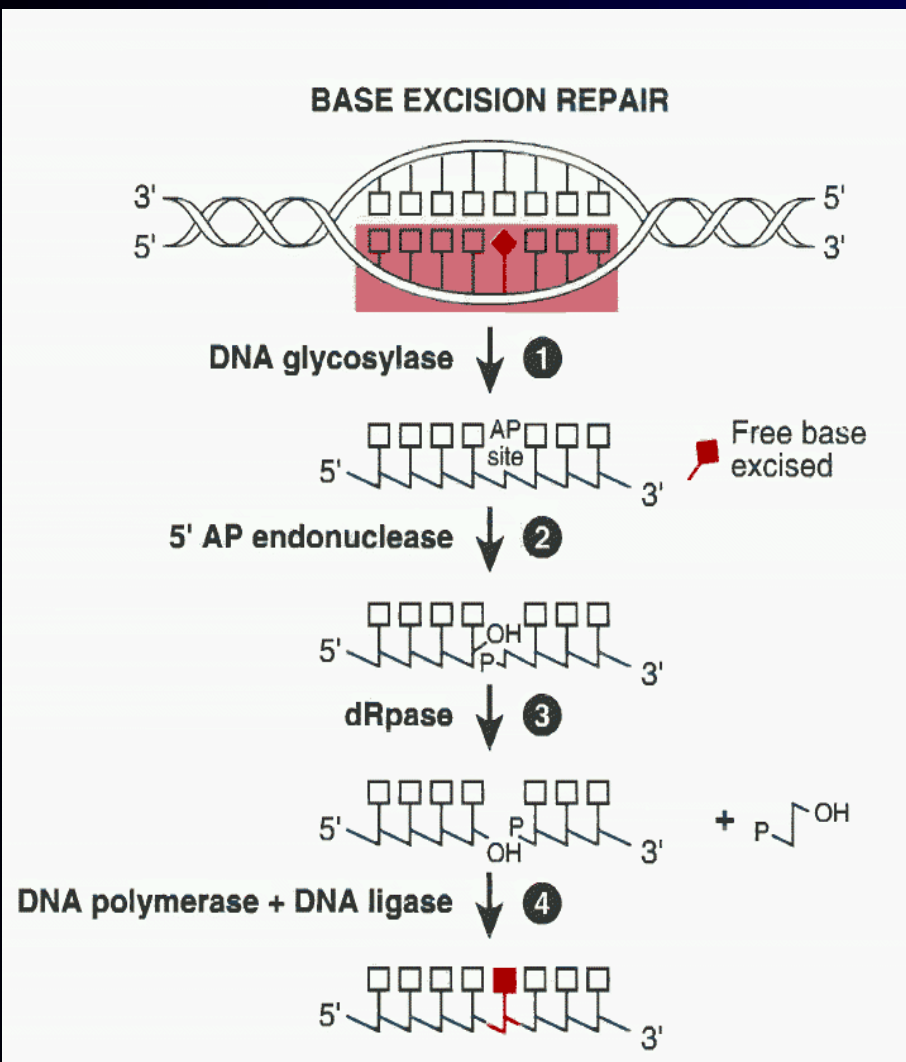
1. rozpoznanie poškodenia
2. incízia
3. vyštiepenie poškodenia
4. reparačná syntéza
5. ligácia

### 2 dráhy:

globálna genómová oprava  
a preferenčná oprava  
transkribovaných reťazcov



## Bázová excízna oprava

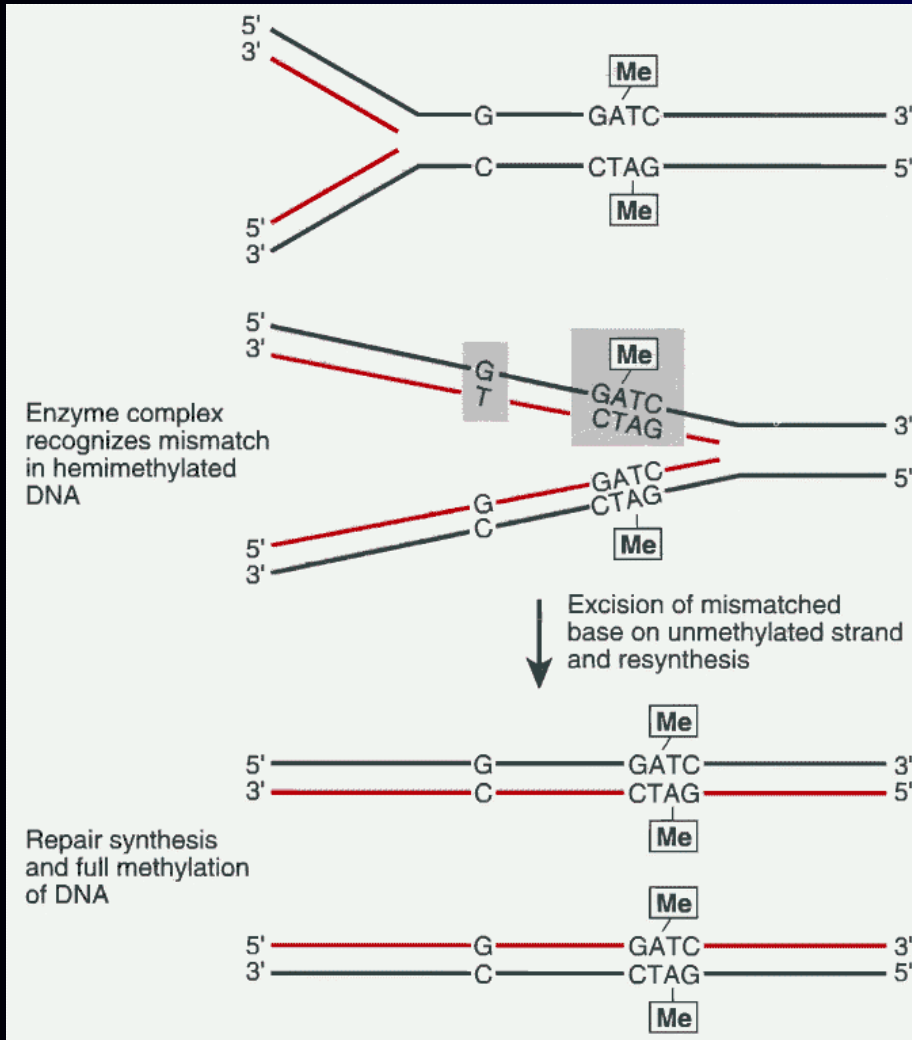


Typy poškodení:

modifikované bázy,  
apurínové a  
apyrimidínové miesta a  
jednoreťazcové zlomy

# Excízia DNA poškodenia

## “Mismatch” oprava



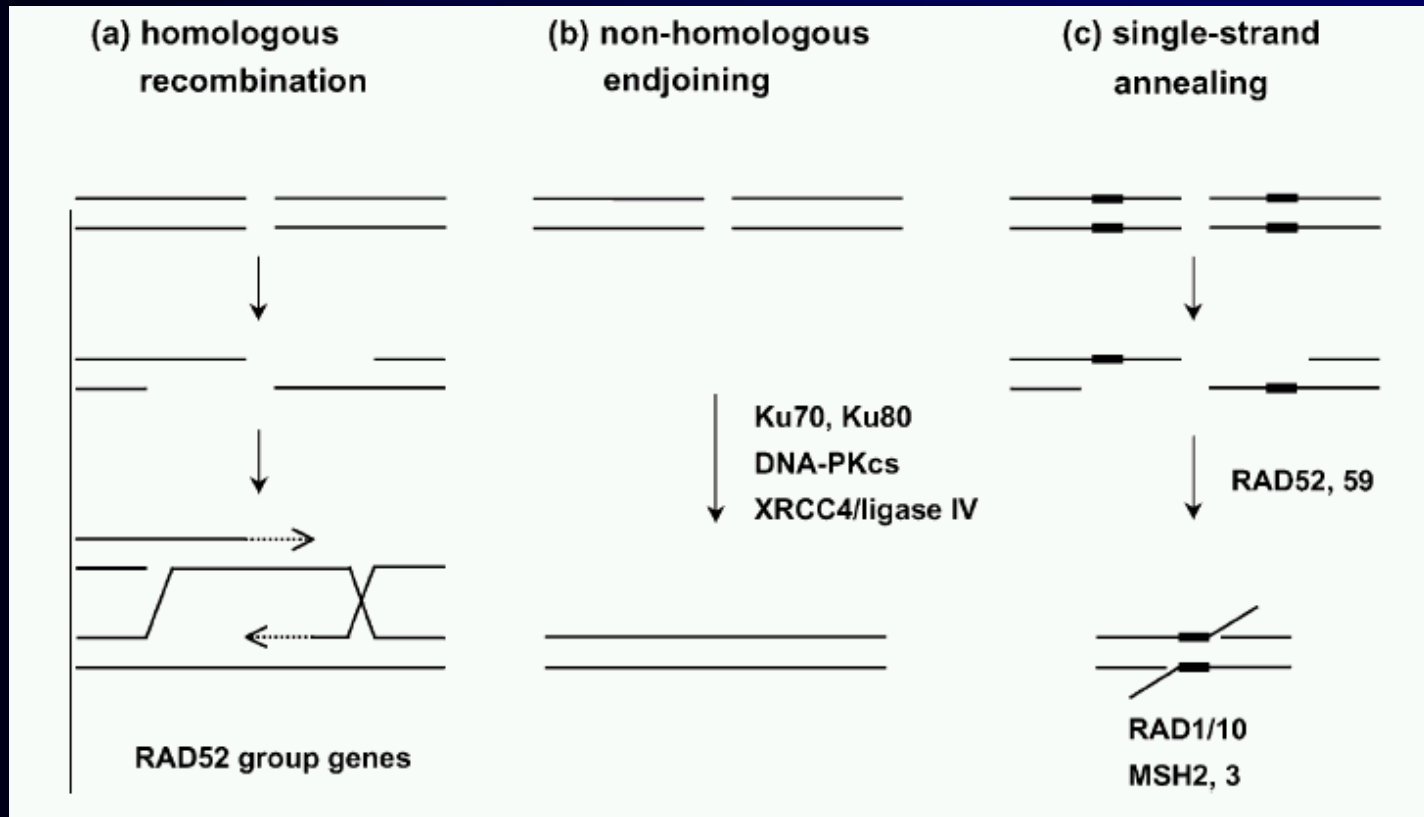
Rozpoznanie  
novosyntetizovaného  
reťazca:

metylácia materského  
reťazca v GATC  
sekvenciách

# Tolerovanie poškodenia DNA

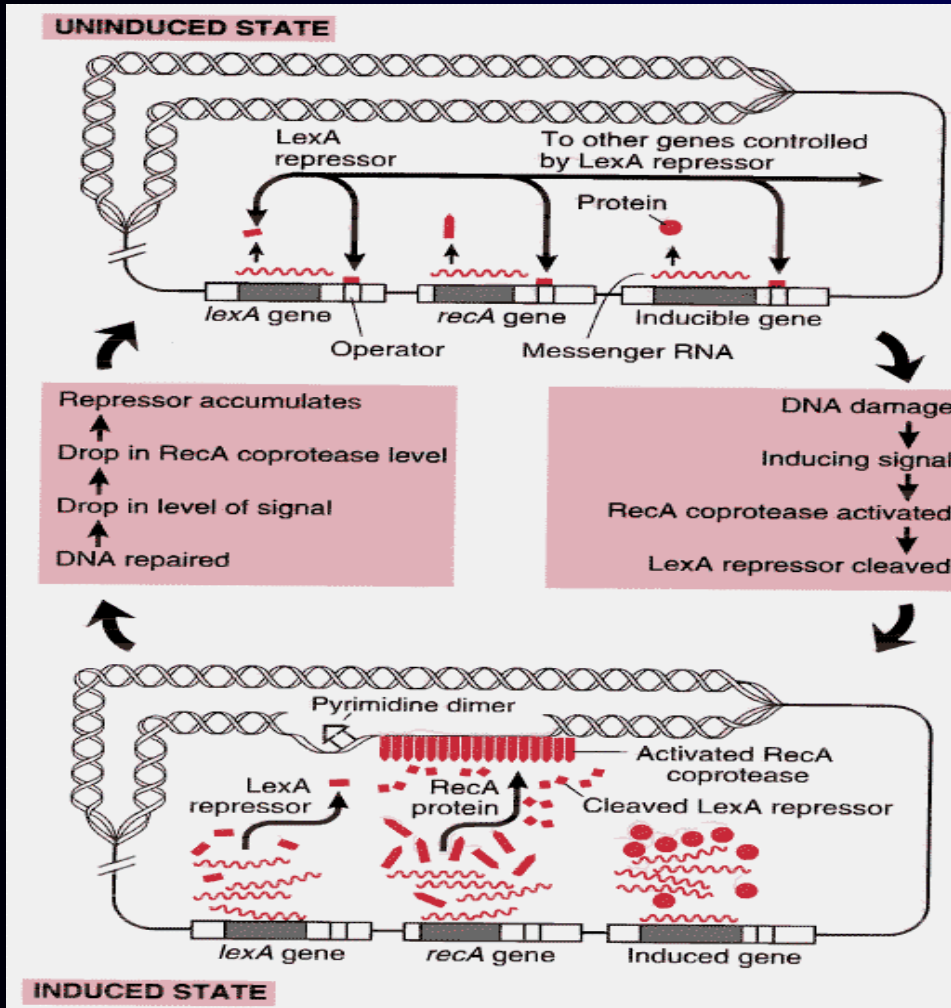
Mechanizmy, pri ktorých samotné poškodenie zostáva neopravené, ale bunka je vďaka nim schopná dokončiť replikáciu a poškodenie DNA môže byť následne opravené excíznou opravou.

## Rekombinačná oprava



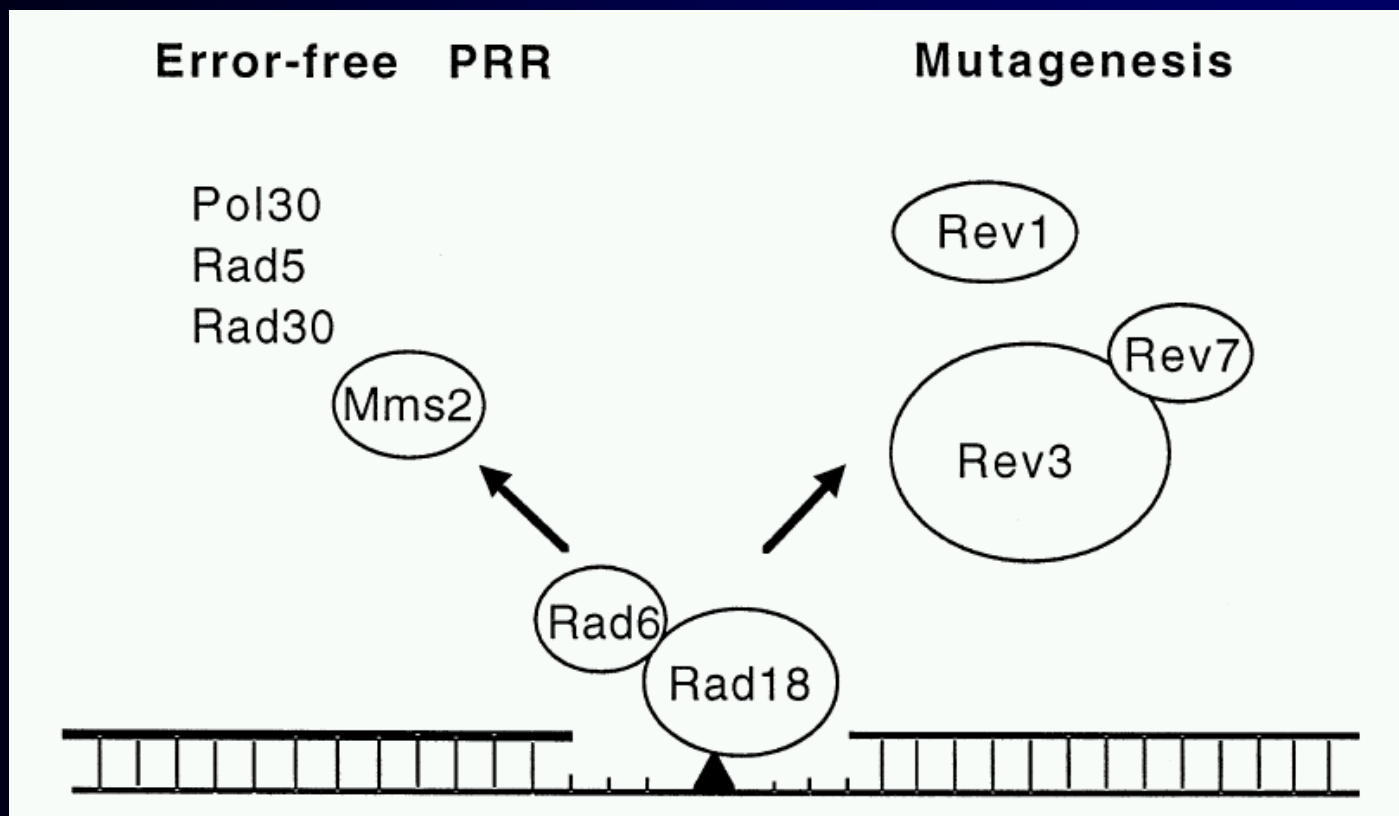
Schématické znázornenie mechanizmov zúčastňujúcich sa opravy dvojreťazcových zlomov pri eukaryotoch.

## Translázna syntéza DNA



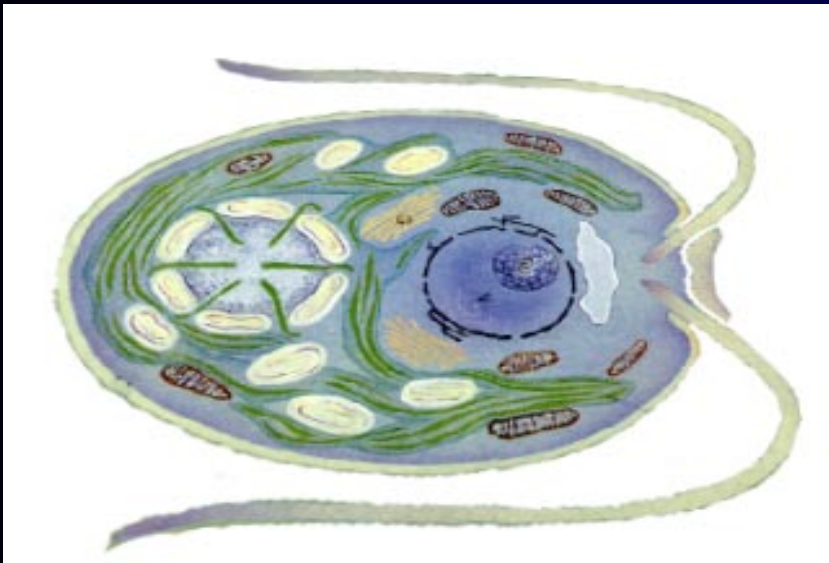
SOS systém pri *E. coli*, riadený génmi *recA* a *lexA*, ktorý je spojený so zvýšenou frekvenciou mutácií a je známy aj ako mutagénna alebo error-prone oprava

## Translázna syntéza DNA



Predpokladaný model dvoch alternatívnych subdráh *RAD6* reparačnej dráhy pri *S. cerevisiae*

# Reparačné mechanizmy *C. reinhardtii*



Na základe citlivosti k UV žiareniu- **uvs mutanty**, predbežne zaradené do dvoch skupín:

1. excízne
2. neexcízne

# Reparačné mechanizmy *C. reinhardtii*

fotoreaktivácia: *phr1, phr2*

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

mismatch oprava: *uvs14 ?*

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

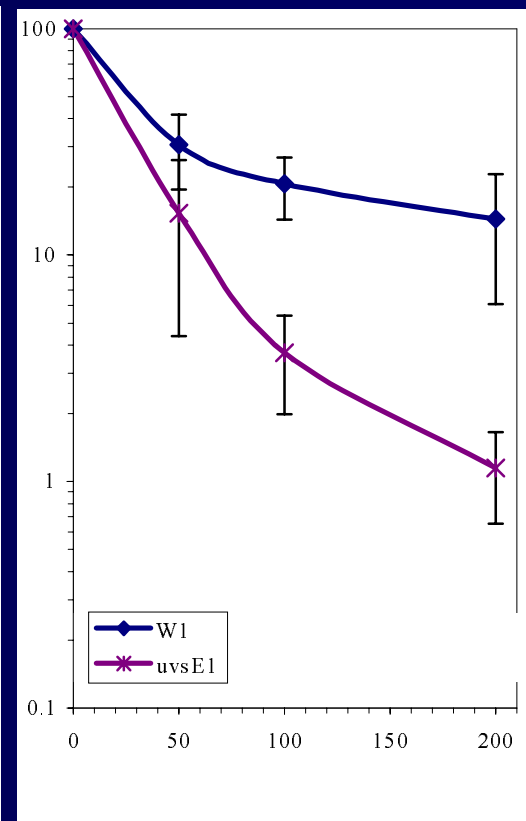
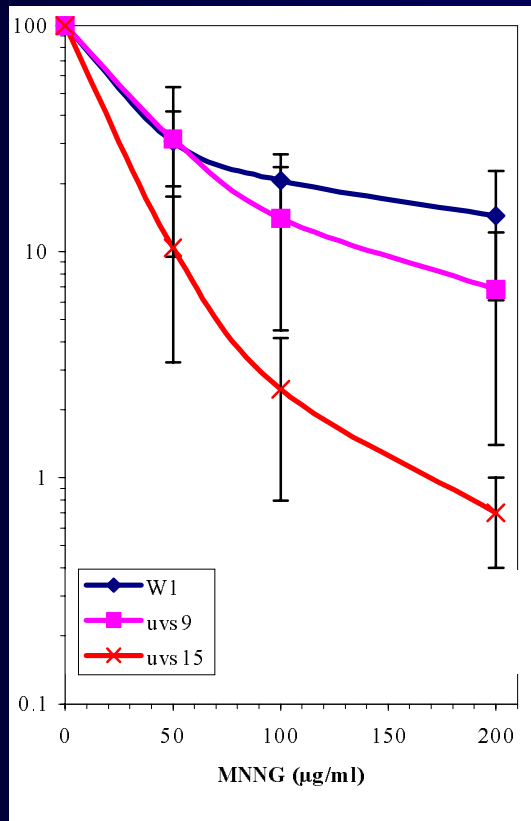
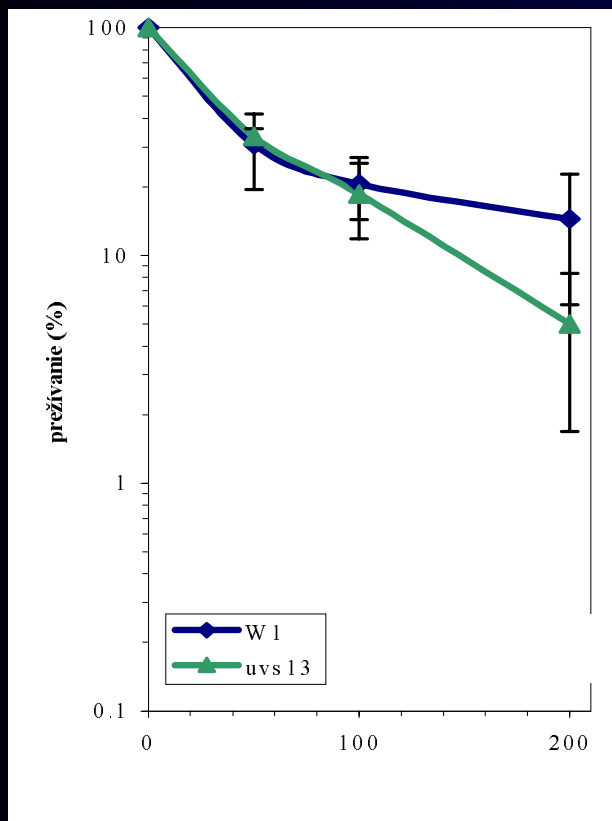
neurčená reparačná dráha: *uvs8, uvs11, uvs13*



# Ciele práce

**molekulárna, mutačná a genetická analýza  
reparačne-deficitných mutantov *C. reinhardtii*  
izolovaných na Katedre genetiky PriF UK**

# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



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

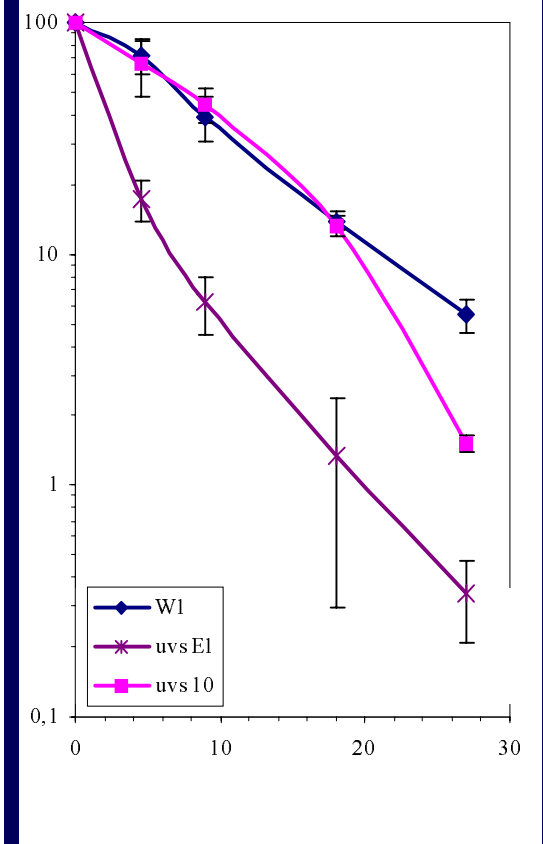
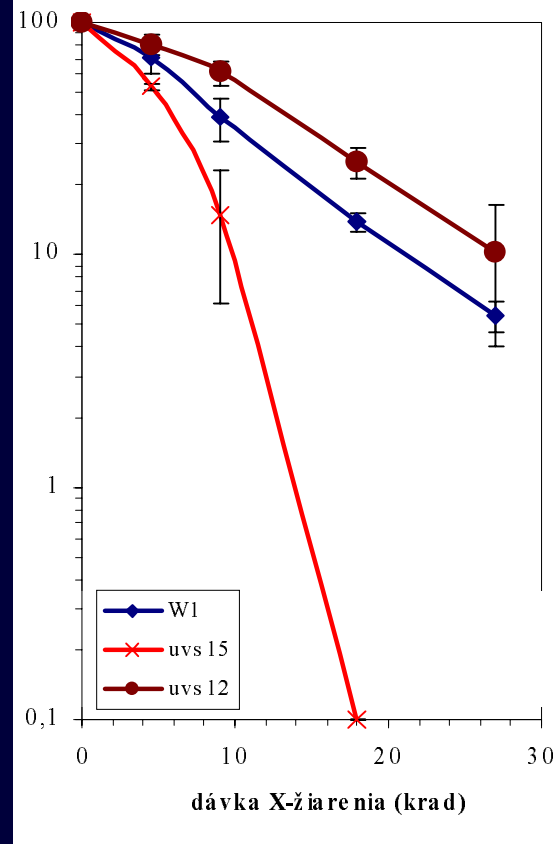
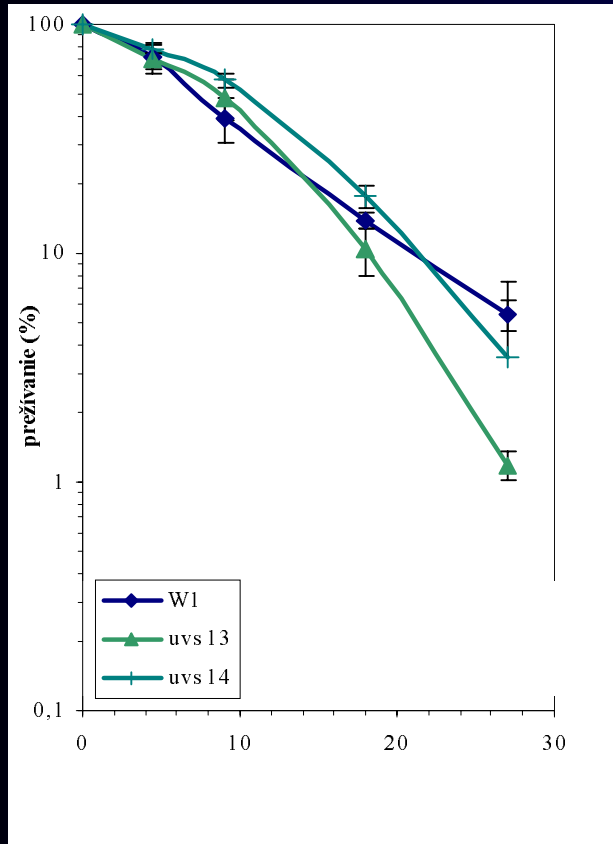
# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*

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

<i>Dávka</i>	<i>W1</i>	<i>uvs9</i>	<i>uvsE1</i>	<i>uvs13</i>	<i>uvs15</i>
<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	17,21
<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*



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

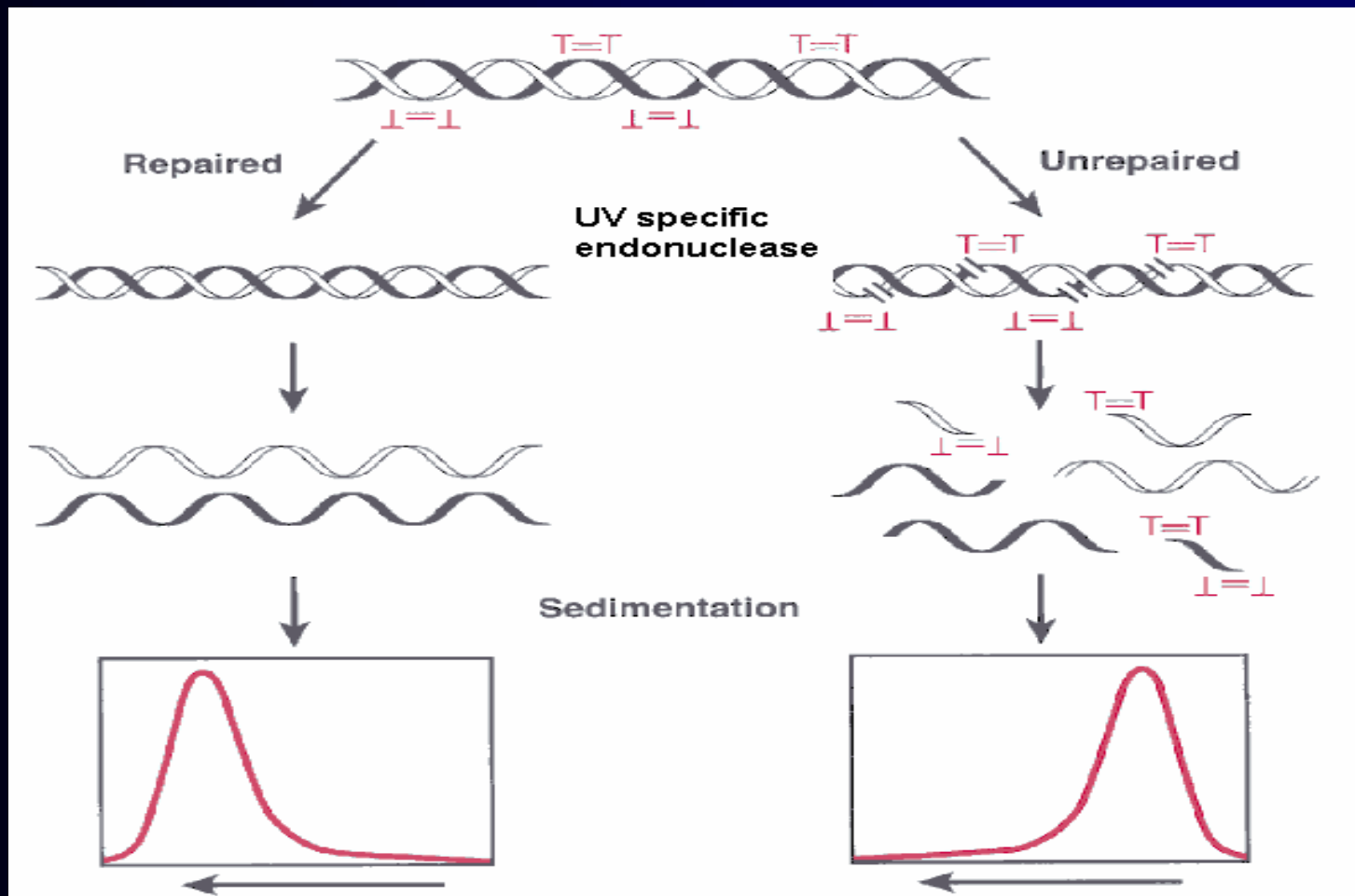
# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*

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

Dávka W1	<i>uvrE1</i>	<i>uvr10</i>	<i>uvr12</i>	<i>uvr13</i>	<i>uvr14</i>	<i>uvr15</i>	
<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

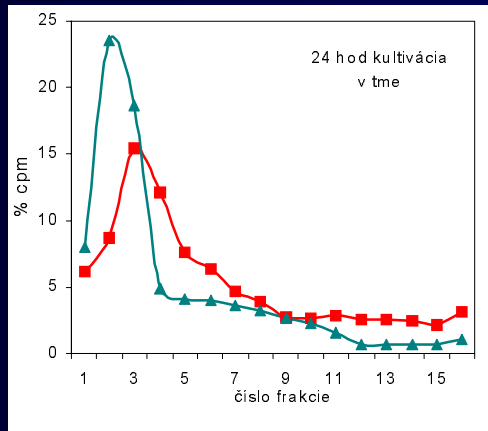
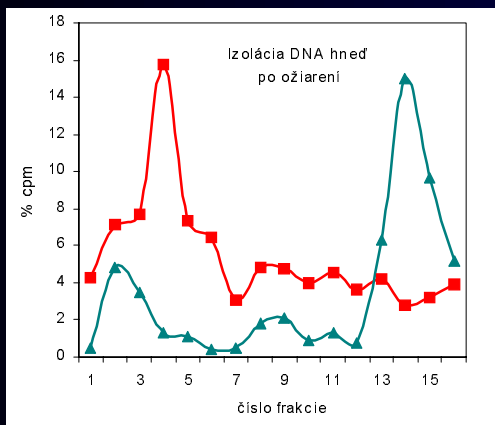
\* dávka sa udáva v krad

# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*

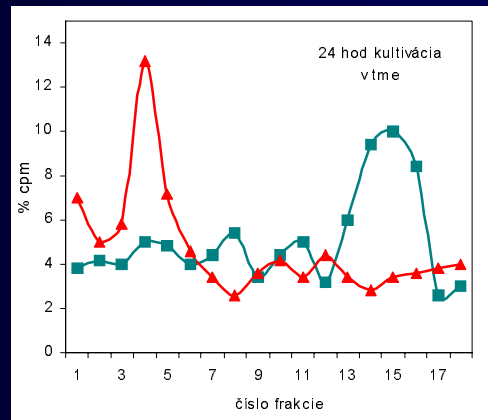
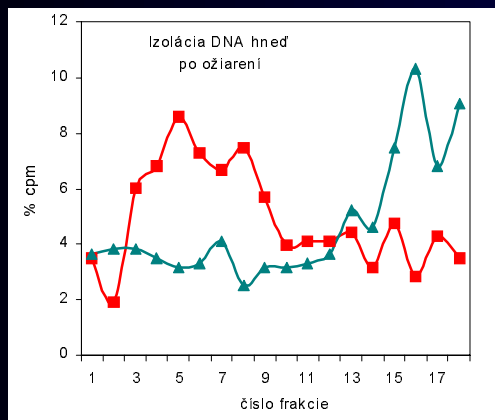


**Molekulárna analýza vyštiepovania pyrimidínových dimérov**

# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



štandardný  
kmeň *W1*



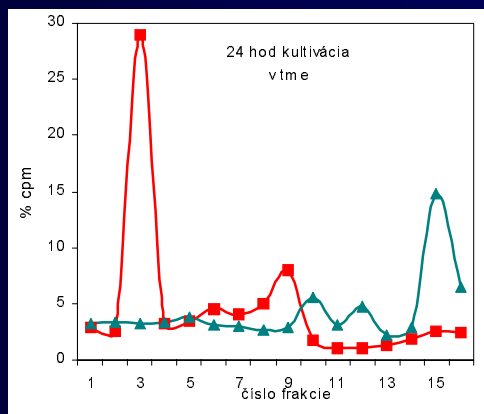
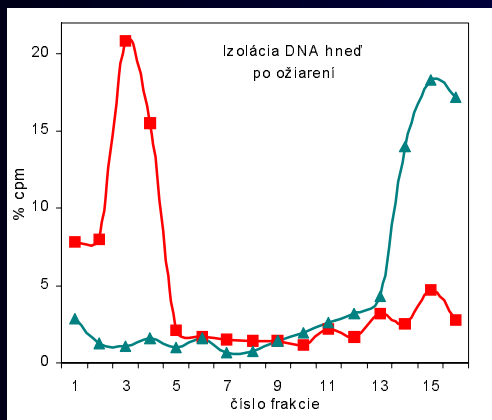
excízne-deficitný  
kmeň *uvs9*

Izolácia DNA hneď  
po ožiarení

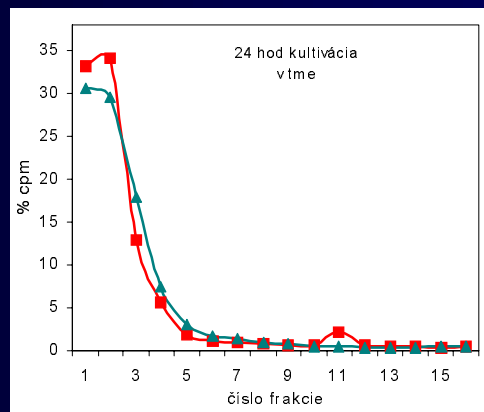
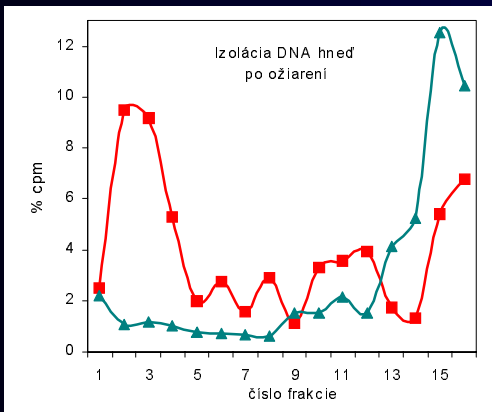
24 hod. kultivácia  
v tme

Legenda:  
bez UV endonukleázy  
s UV endonuklázou

# Analýza reparačne-deficitných mutantov *Chlamydomonas reinhardtii*



kmeň *uvs12*



kmeň *uvs13*

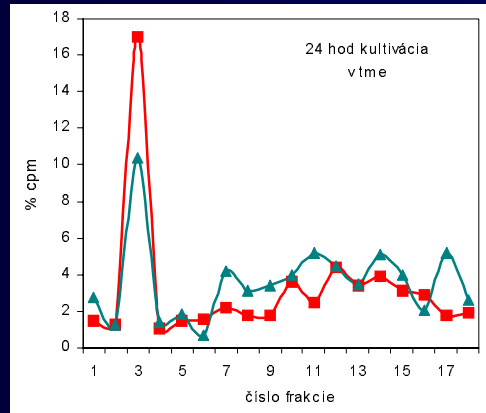
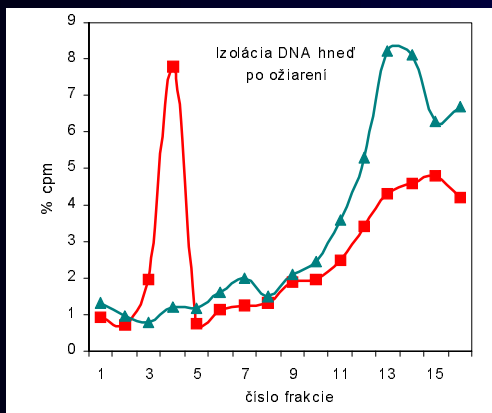
Izolácia DNA hneď po ožiarení

24 hod. kultivácia v tme

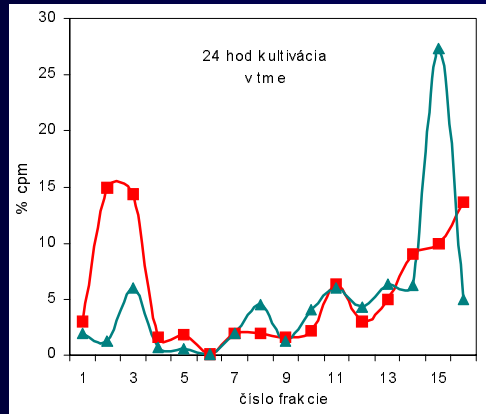
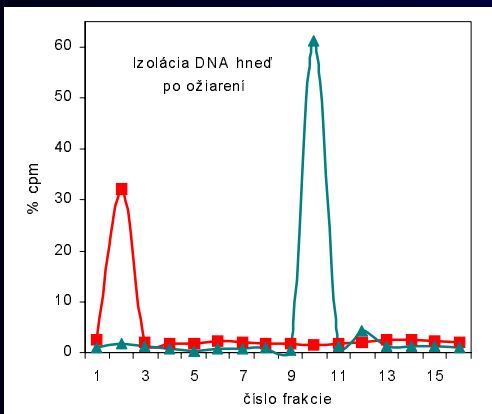
Legenda:  
bez UV endonukleázy  
s UV endonukleázou



# 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.

# Zhrnutie analýzy

- všetky **testované reparačne-deficitné kmene sú citlivejšie** na pôsobenie MNNG v porovnaní so štandardným kmeňom
- **zvýšená citlivosť k MNNG** pri mutantovi **uvvE1** s poruchou rekombinačnej reparačnej dráhy naznačila, že rekombinačný reparačný mechanizmus hrá úlohu pri oprave porúch spôsobených týmto alkylačným agensom
- pri kmeňoch **uvv9** a **uvv15**, 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 **uvrE1** 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)
- kmeň **uvr14** vykazuje znaky mutantov **s narušenou „mismatch“ korekciou** (zvýšená spontánna mutabilita), najcitlivejší testovaný kmeň **uvr15** 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 analyzovaných mutantov ide pravdepodobne o 4 rôzne gény určujúce citlivosť k UV žiareniu.

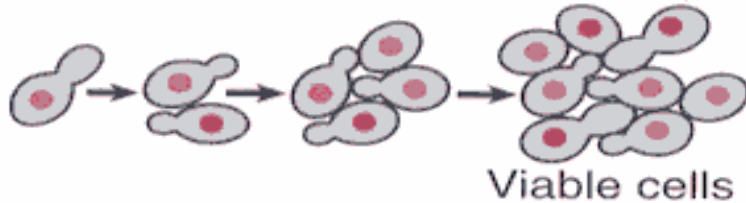
# Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke

## *uvr11*

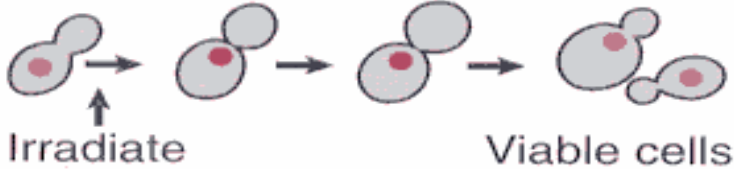
- zvýšená citlivosť k UV a MNNG v porovnaní so štandardným kmeňom, zvýšená mutabilita
- pri mikroskopickom hodnotení prežívania po pôsobení UV-žiarenia vykazoval významné zvýšenie frekvencie buniek odumierajúcich po jednom alebo viacerých deleniach v porovnaní s ostatnými kmeňmi
- podobnosť s *rad9*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

## Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke

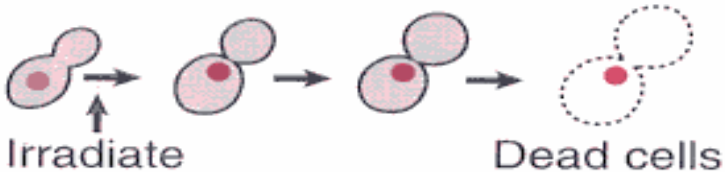
### A. Wild-type yeast, no irradiation



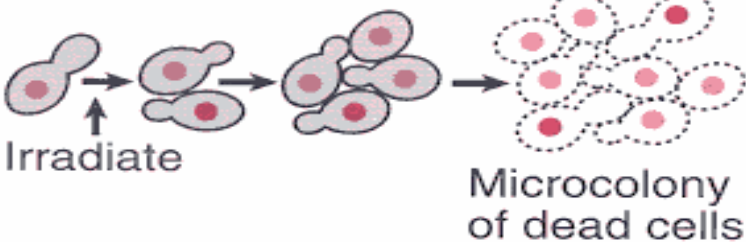
### B. Wild-type yeast



### 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**

## Ciele práce

- 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*.

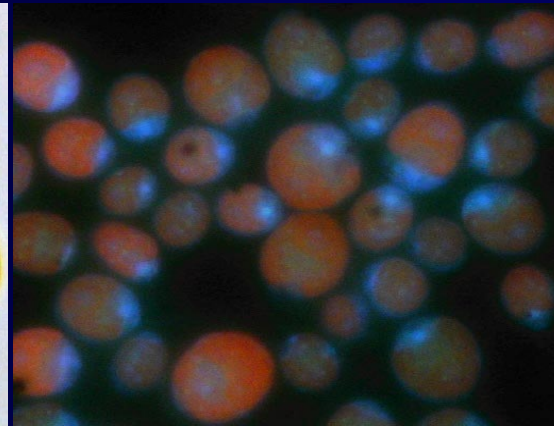


## Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke

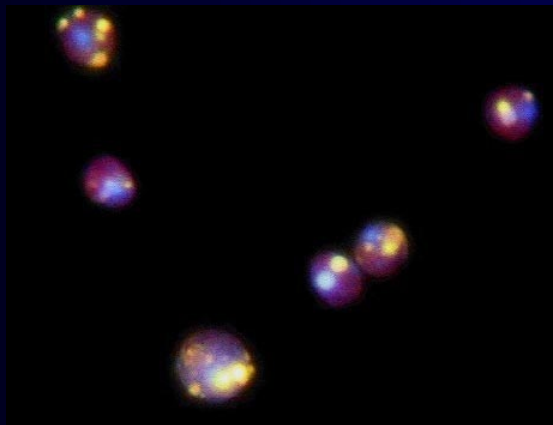
bunky štandardného kmeňa na konci bunkového cyklu pred uvoľnením z materskej bunkovej steny



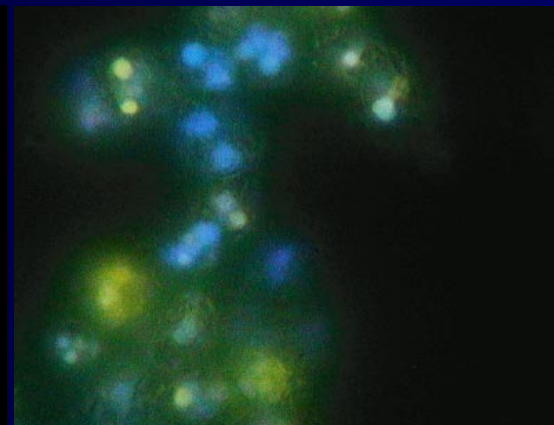
bunky zafarbené fluorochrómom DAPI



bunky ovplyvnené MBC v skorej rastovej fáze

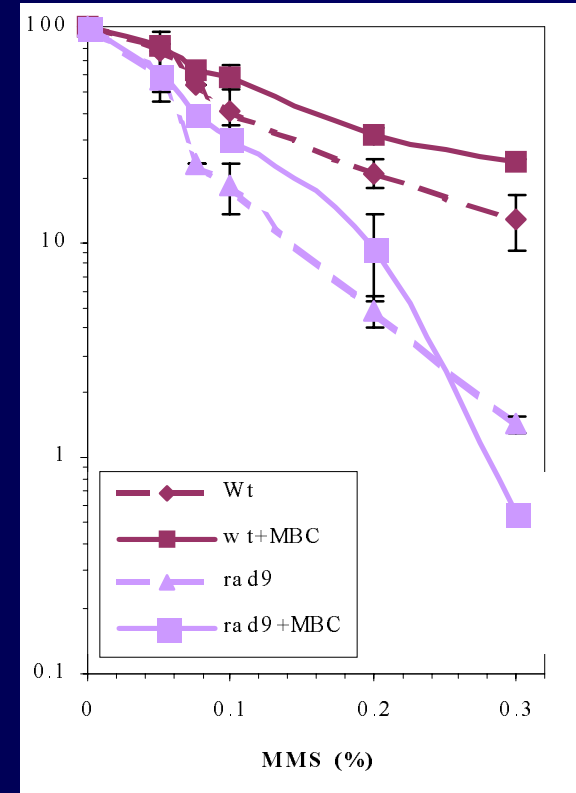
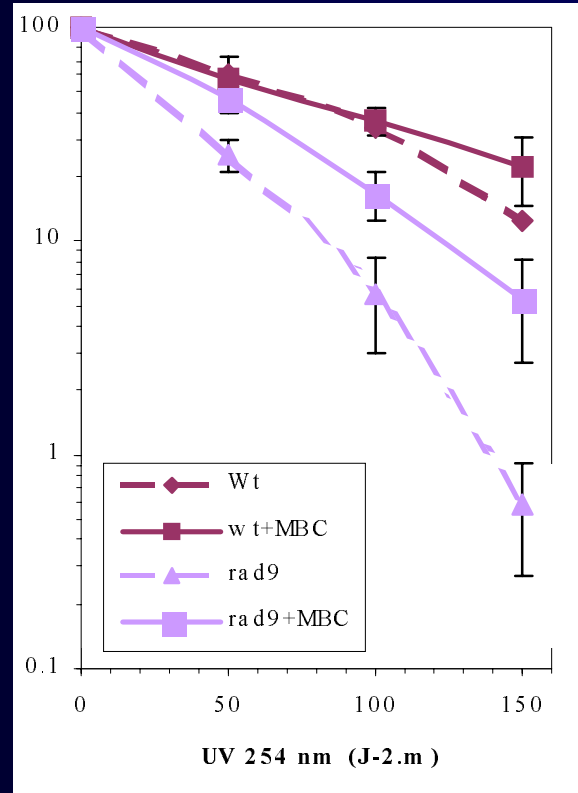
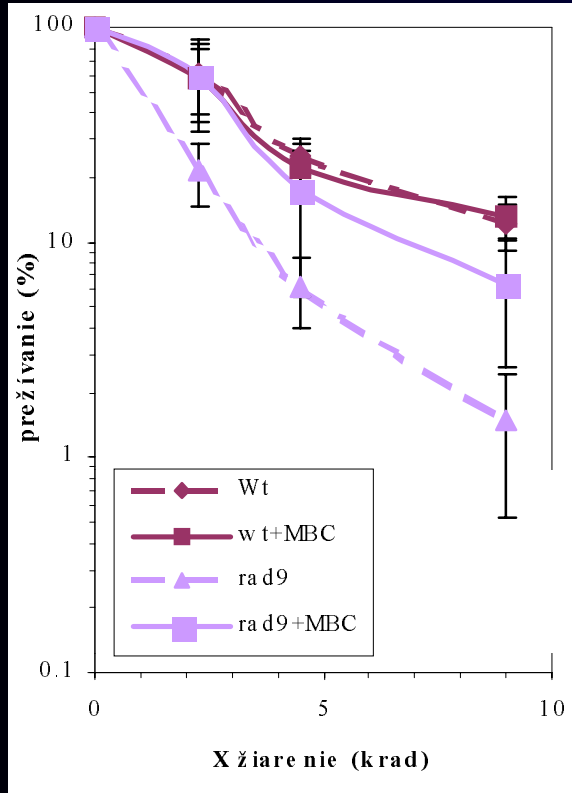


bunky s rôznym počtom jadier, pridanie MBC v neskej rastovej fáze



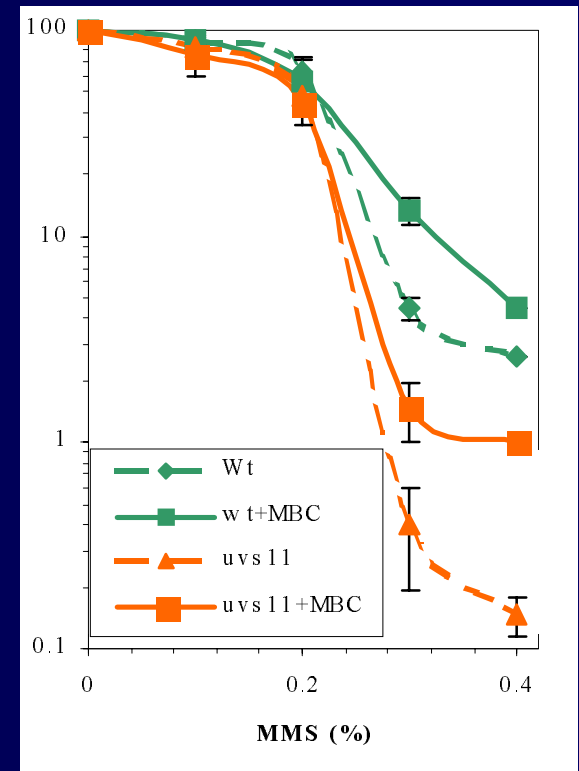
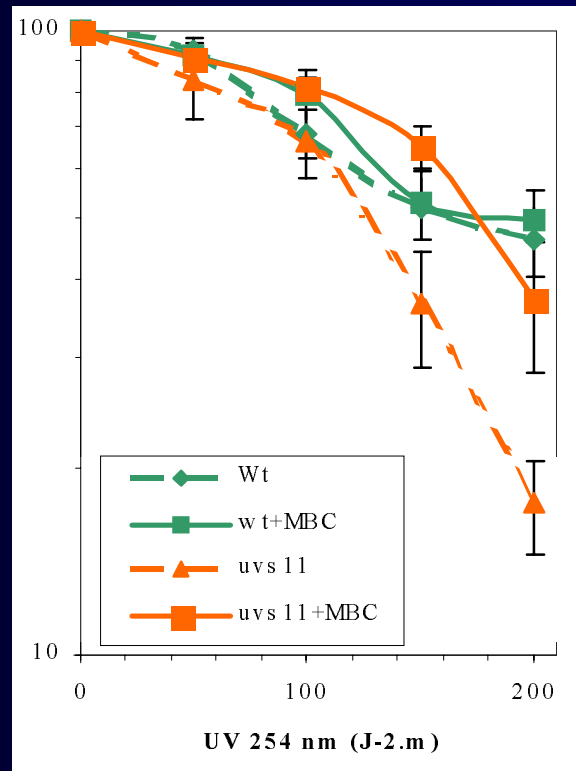
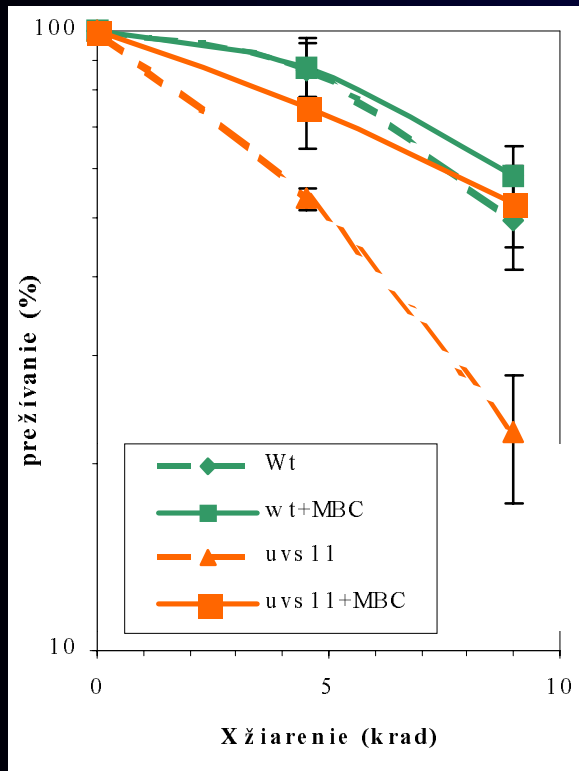
**Vplyv MBC na zastavenie bunkového cyklu riasy *C. reinhardtii***

# Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke



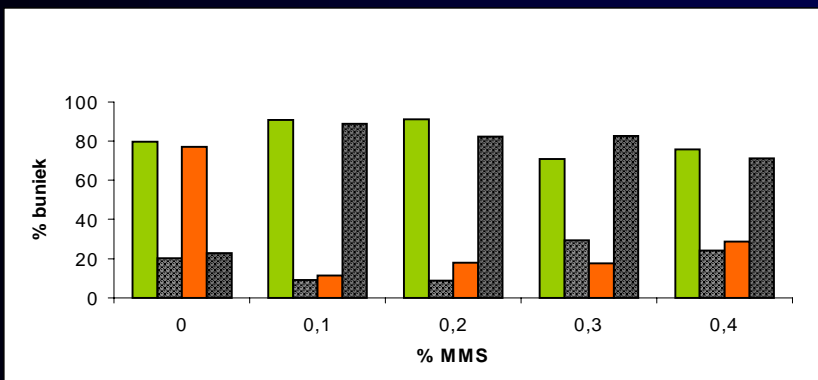
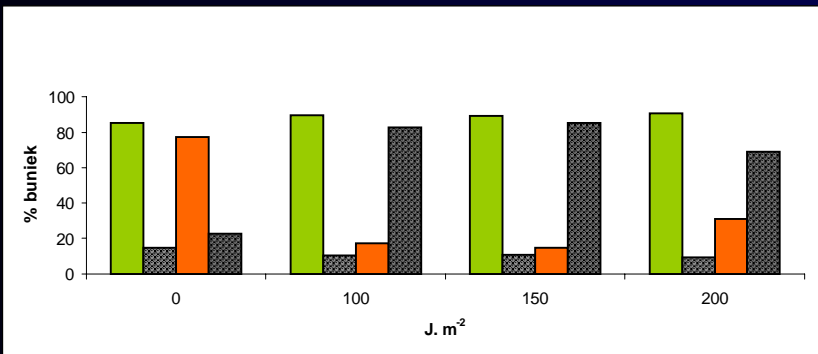
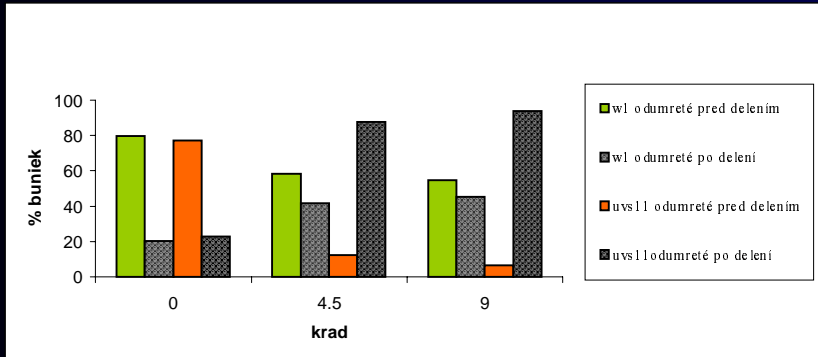
Prežívacie štandardného a *rad9* kmeňa *S.cerevisiae* po pôsobení UV-, X-žiarenia a MMS s a bez MBC

# Prepojenie opravy DNA s inými procesmi v bunke



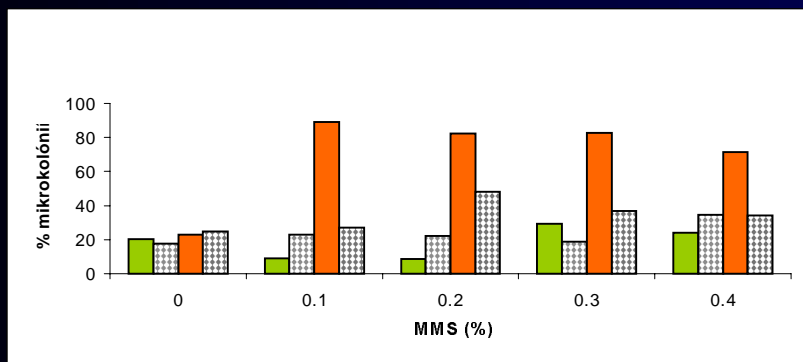
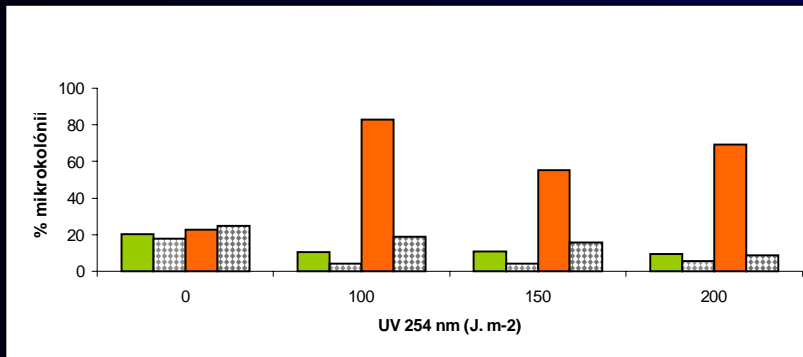
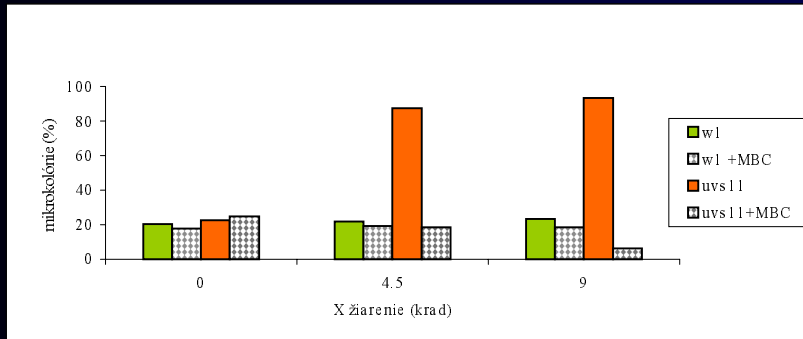
Prežívania štandardného a *uvs11* mutanta *C.reinhardtii* po pôsobení UV-, X-žiarenia a MMS s a bez MBC

# 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

# Závery

- dokázali sme **zvýšenú citlivosť** *uvs11* mutanta *C. reinhardtii* a potvrdili sme **zvýšenú citlivosť** *rad9* mutanta *S.cerevisiae* na pôsobenie UV-, X- žiarenia a MMS
- dokázali sme, že **zastavenie bunkového cyklu** pomocou MBC vedie k **zvýšeniu prežívania** pri *rad9* mutantovi kvasiniek *S. cerevisiae*, rovnako ako pri *uvs11* mutantovi rias *C. reinhardtii* po pôsobení UV, X-žiarenia a MMS
- dokázali sme, že **zastavenie bunkového cyklu** *C.reinhardtii* pomocou MBC vedie, analogicky s kvasinkami, k **zníženiu počtu mikrokolónii**.

# Transformácia jadrového genómu *C. reinhardtii*

- podmienka pre napredovanie štúdia v oblasti  
reparačných mechanizmov *C. reinhardtii*

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

1. Bombardovanie

2. Elektroporácia

3. Pretrepávanie v prítomnosti polyetylénglykolu a  
sklených 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 sklených guľičiek
- 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>	PEG8000 Účinnosť transformácie
1.	I	1,16
	II	0,23
	III	0,12

# Závery

- 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.