

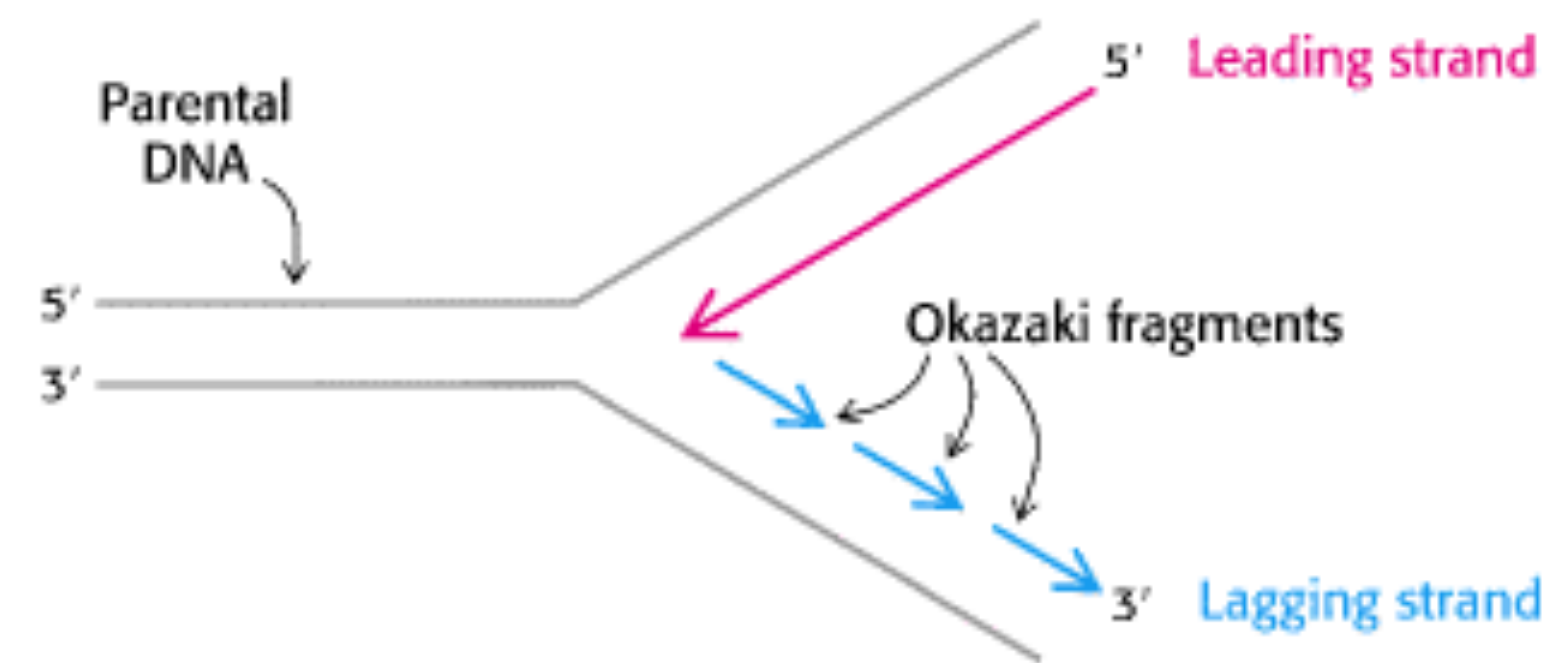
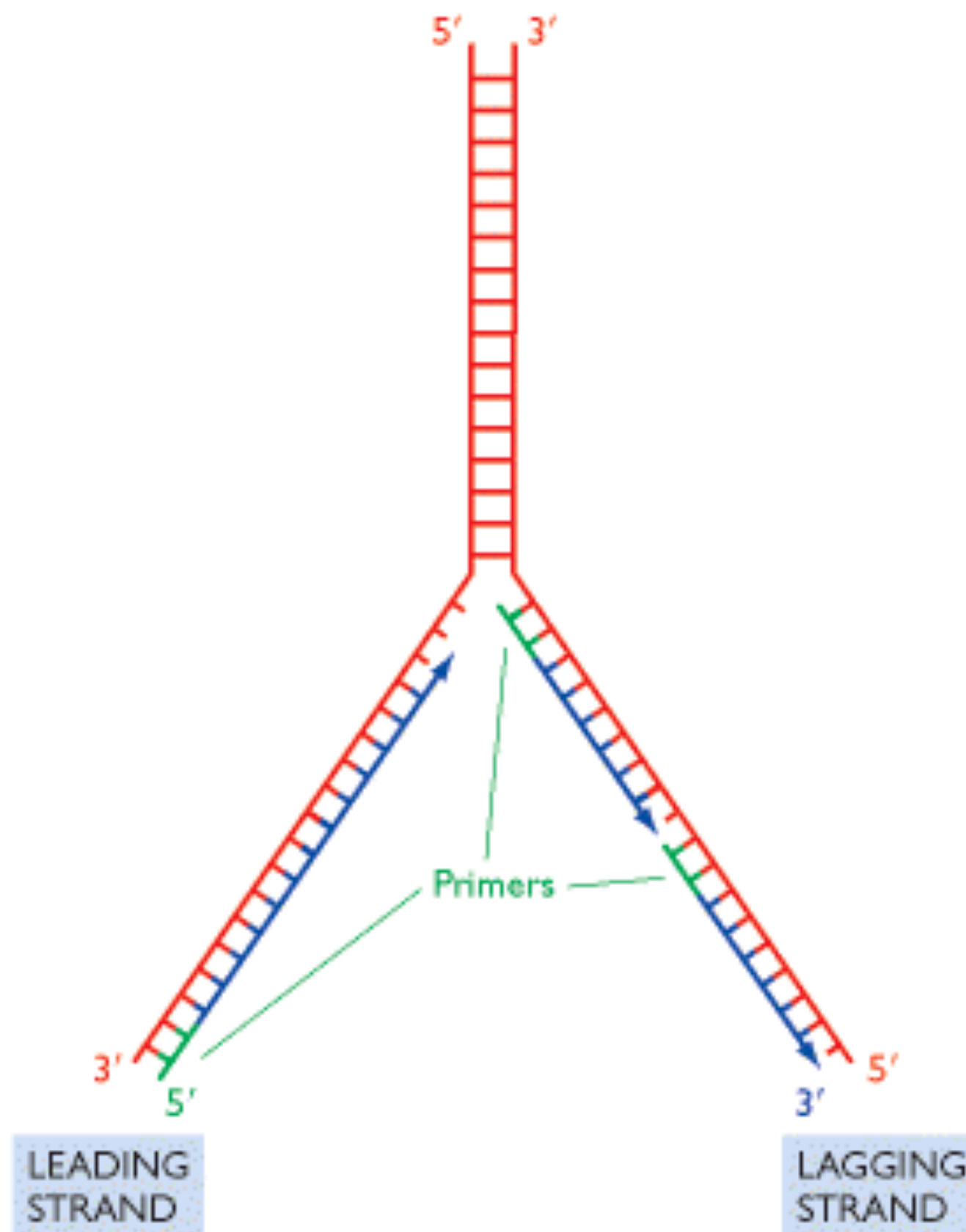
# Biologia molekularna genu

---

Replikacja i stabilność genomu

# Problem nici nieciągłej

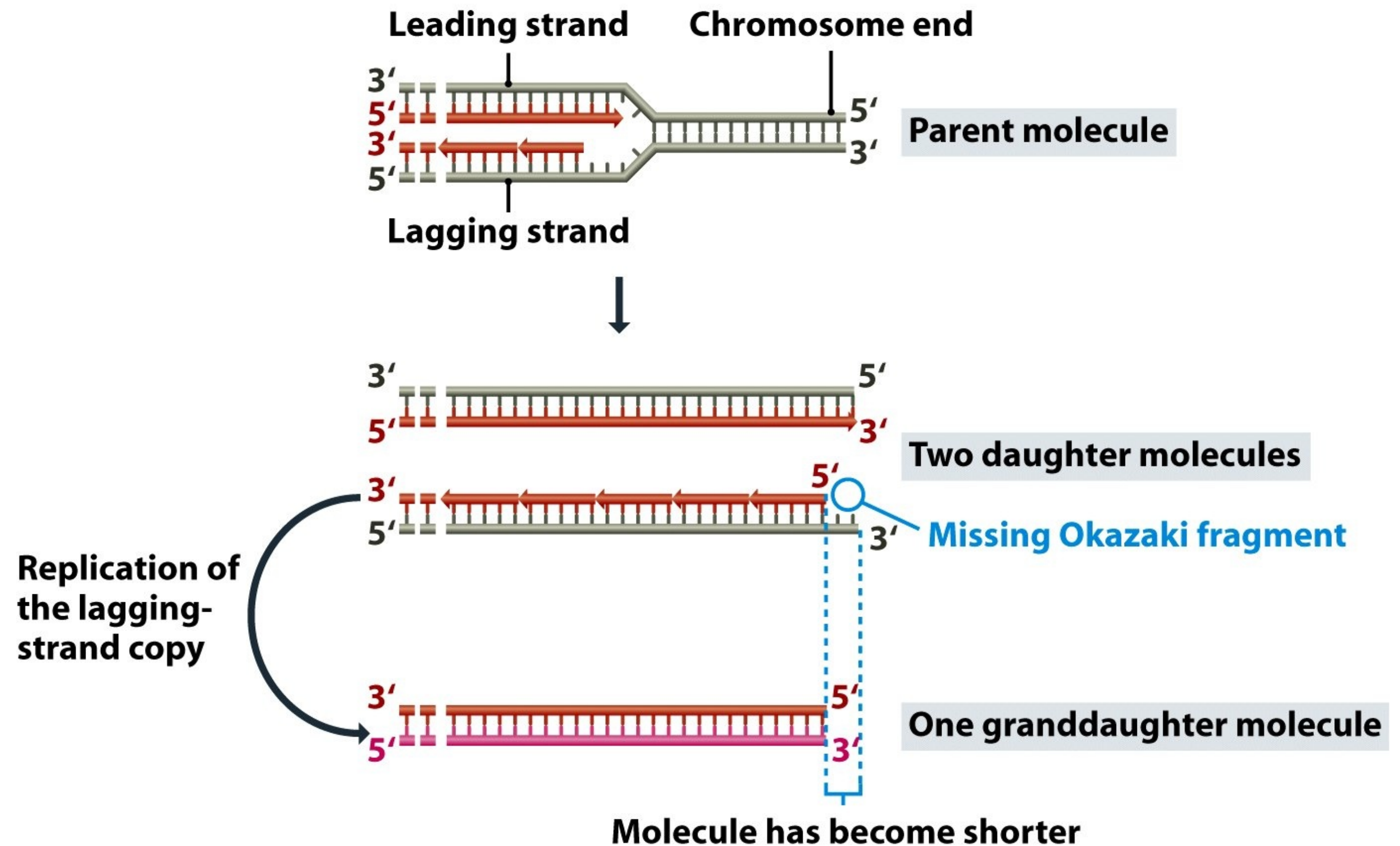
Na nici nieciągłej trzeba co pewien odcinek ponawiać syntezę startera – fragmenty Okazaki



# Problem zakończenia replikacji DNA liniowego

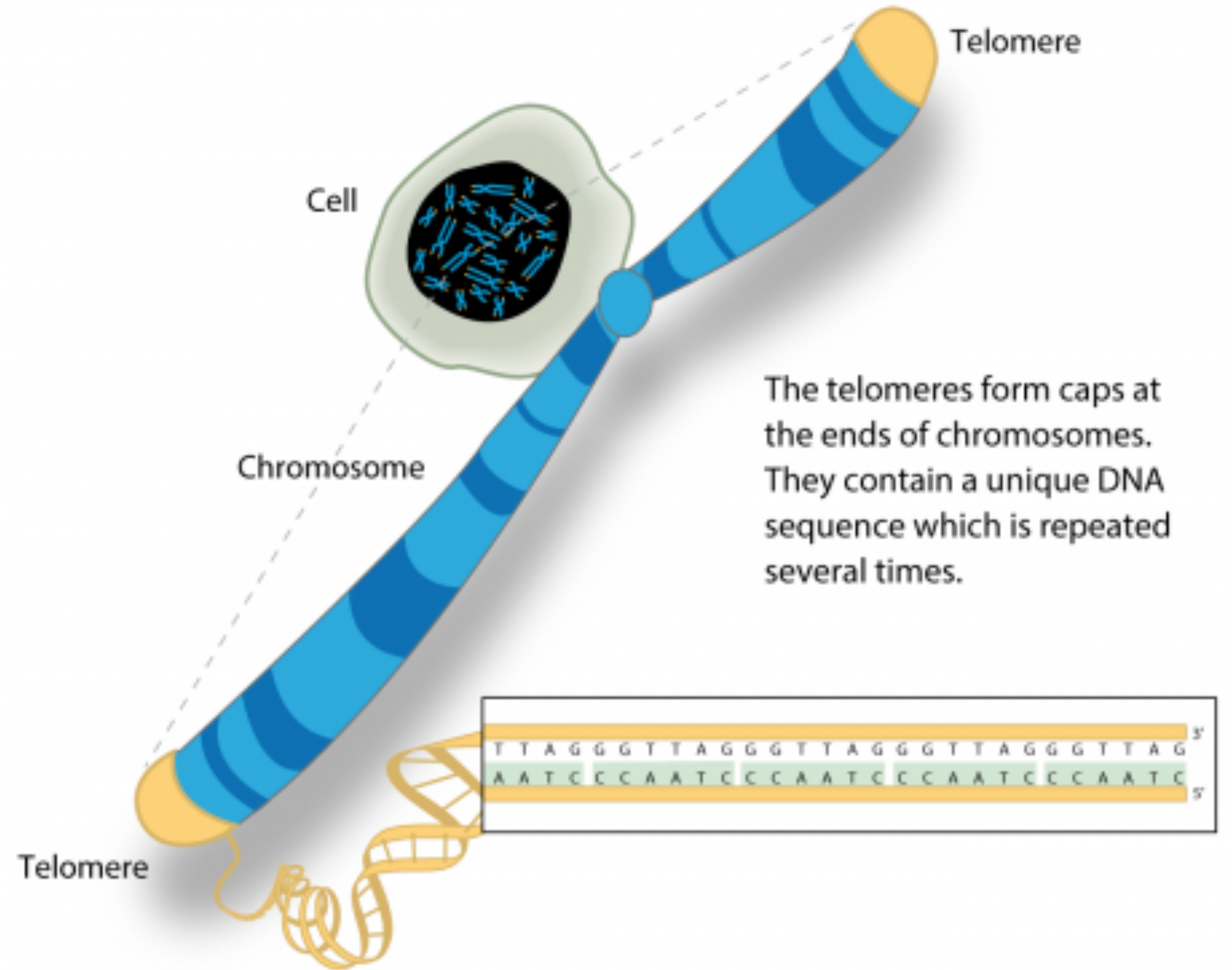
- Na końcu cząsteczki nie ma skąd zacząć nowego fragmentu Okazaki na nici opóźnionej
- Cząsteczka potomna będzie skrócona

## The final Okazaki fragment cannot be primed



# Telomery

- Końce chromosomów (gr. *telos*)
- Sekwencje powtórzone (u człowieka TTAGGG)
  - u człowieka ok. 2500 powtórzeń
- Skracają się przy każdym podziale komórki
  - u człowieka od ~11 kb do ~4 kb
- W niektórych komórkach mogą jednak być odtwarzane dzięki aktywności **telomerazy**



© The Nobel Committee for Physiology or Medicine 2009

Illustration: Annika Röhl

# Telomeraza

- Telomeraza może wydłużać telomery wykorzystując fragment RNA
- Skracanie telomerów ogranicza liczbę podziałów niektórych komórek
- Aktywacja telomerazy związana jest z unieśmiertelnianiem komórek nowotworowych
- Istnieją też alternatywne sposoby wydłużania telomerów
  - oparte na rekombinacji
  - u *D. melanogaster* - retrotranspozony

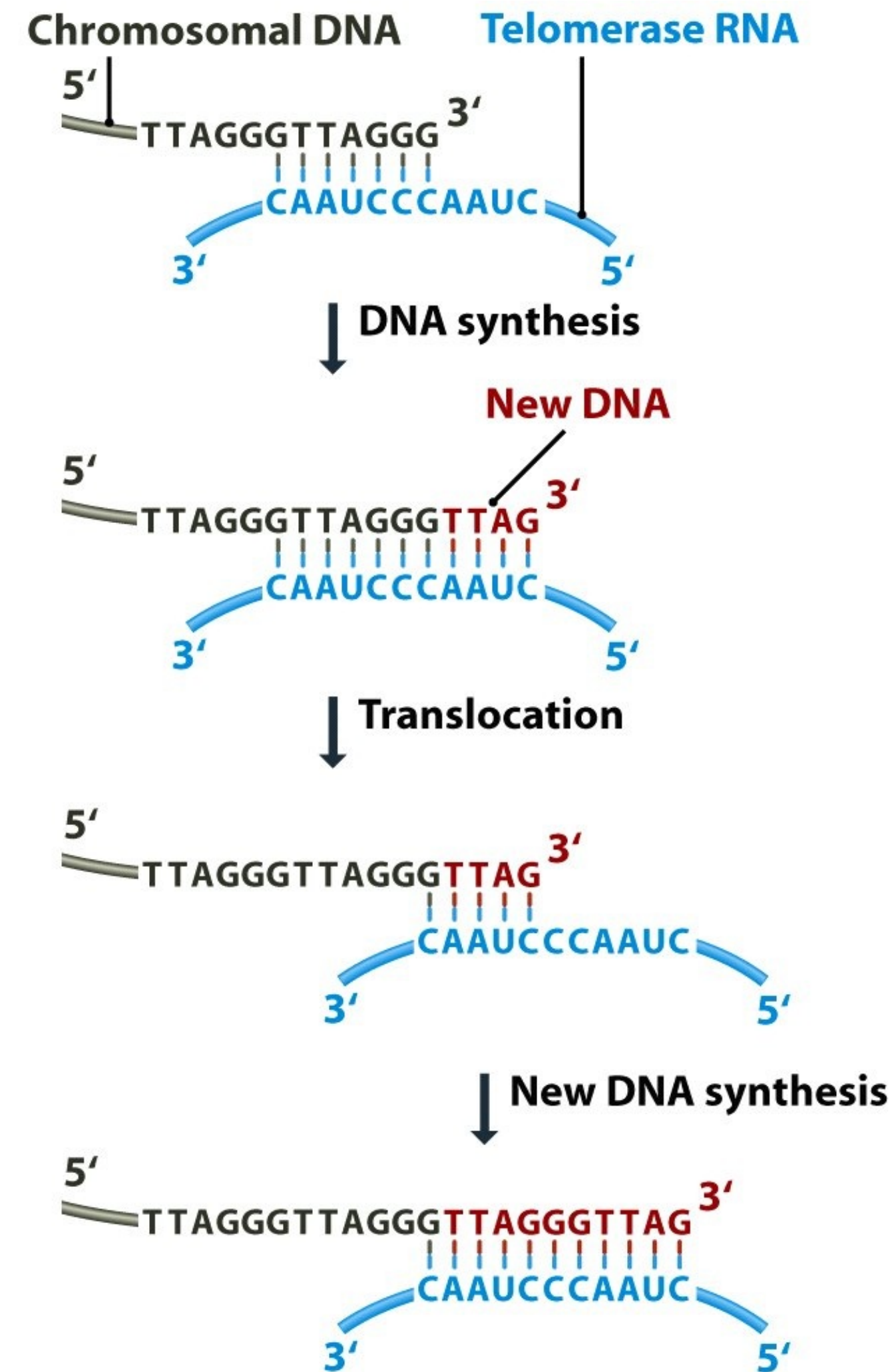


Figure 15-25 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

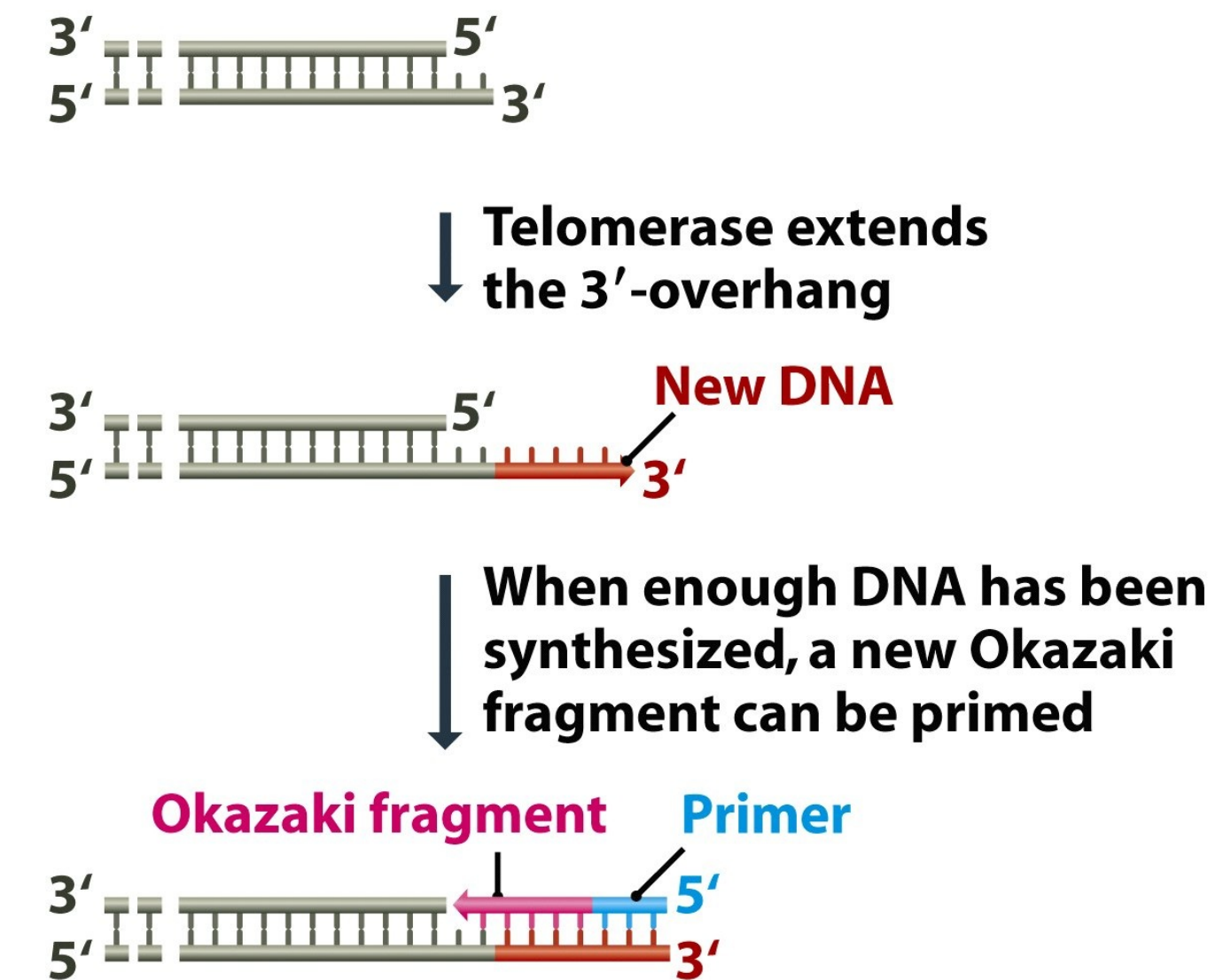
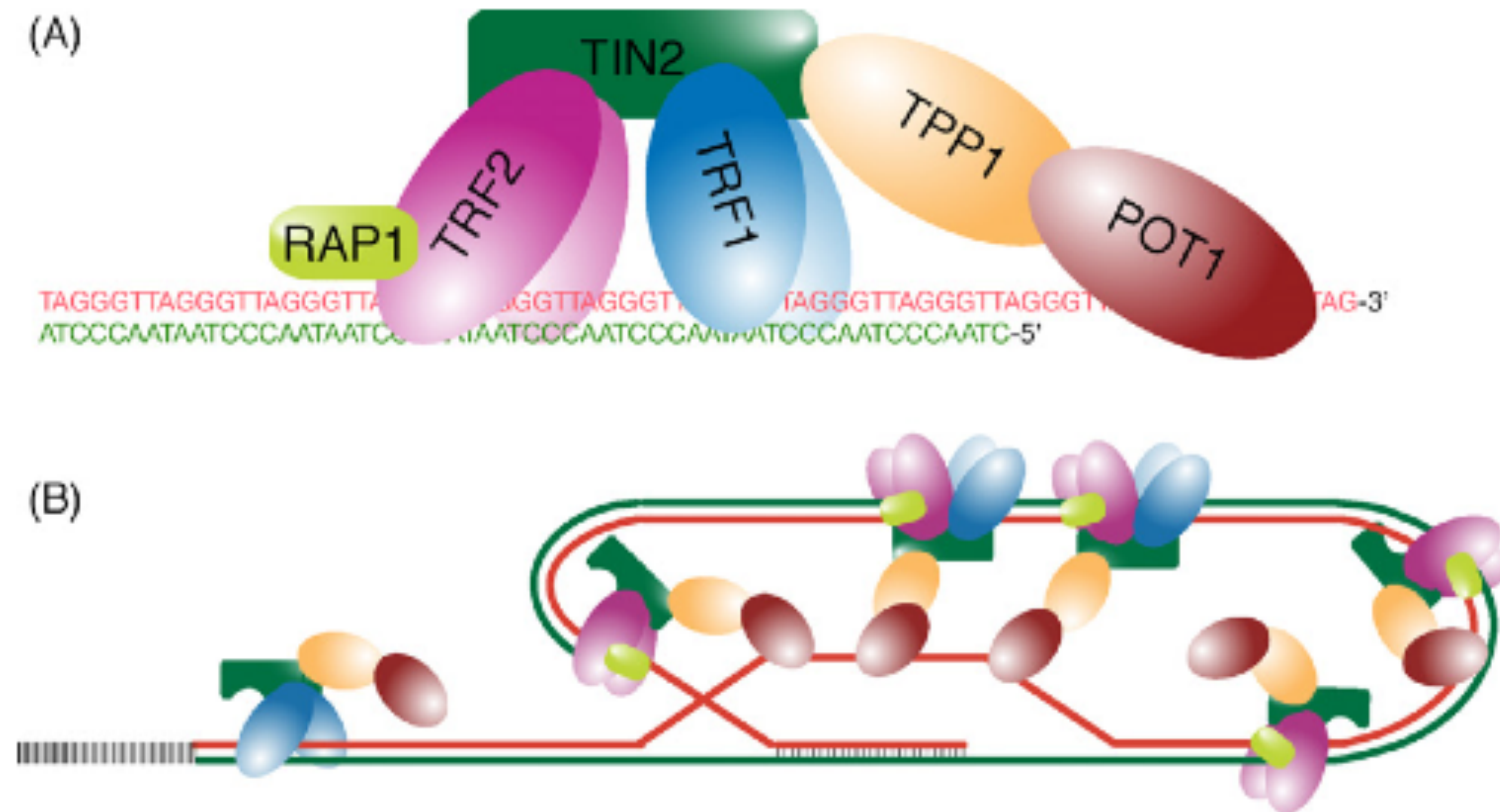


Figure 15-26 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Kompleks chroniący końce chromosomów

- Shelterin (ang. shelter = schronienie)
- Pozbawienie telomerów białek indukuje odpowiedź naprawy uszkodzeń DNA
  - chromosom bez telomeru nieodróżnialny od chromosomu pękniętego
- Druga podstawowa funkcja telomerów - ochrona końców chromosomów przed działaniem systemów naprawy pęknięć dwuniciowych



# Telomery a starzenie

---

- Komórki somatyczne mają ograniczoną liczbę możliwych podziałów – granica Hayflicka
- Komórki linii płciowej (i niektóre macierzyste, aktywowane limfocyty, itp.) dzielą się bez ograniczeń
- Granica Hayflicka związana jest ze skracaniem się telomerów
  - Aktywacja telomerazy wystarcza do unieśmiertelnienia i umożliwienia nieograniczonych podziałów

# Los komórki, która utraciła telomery

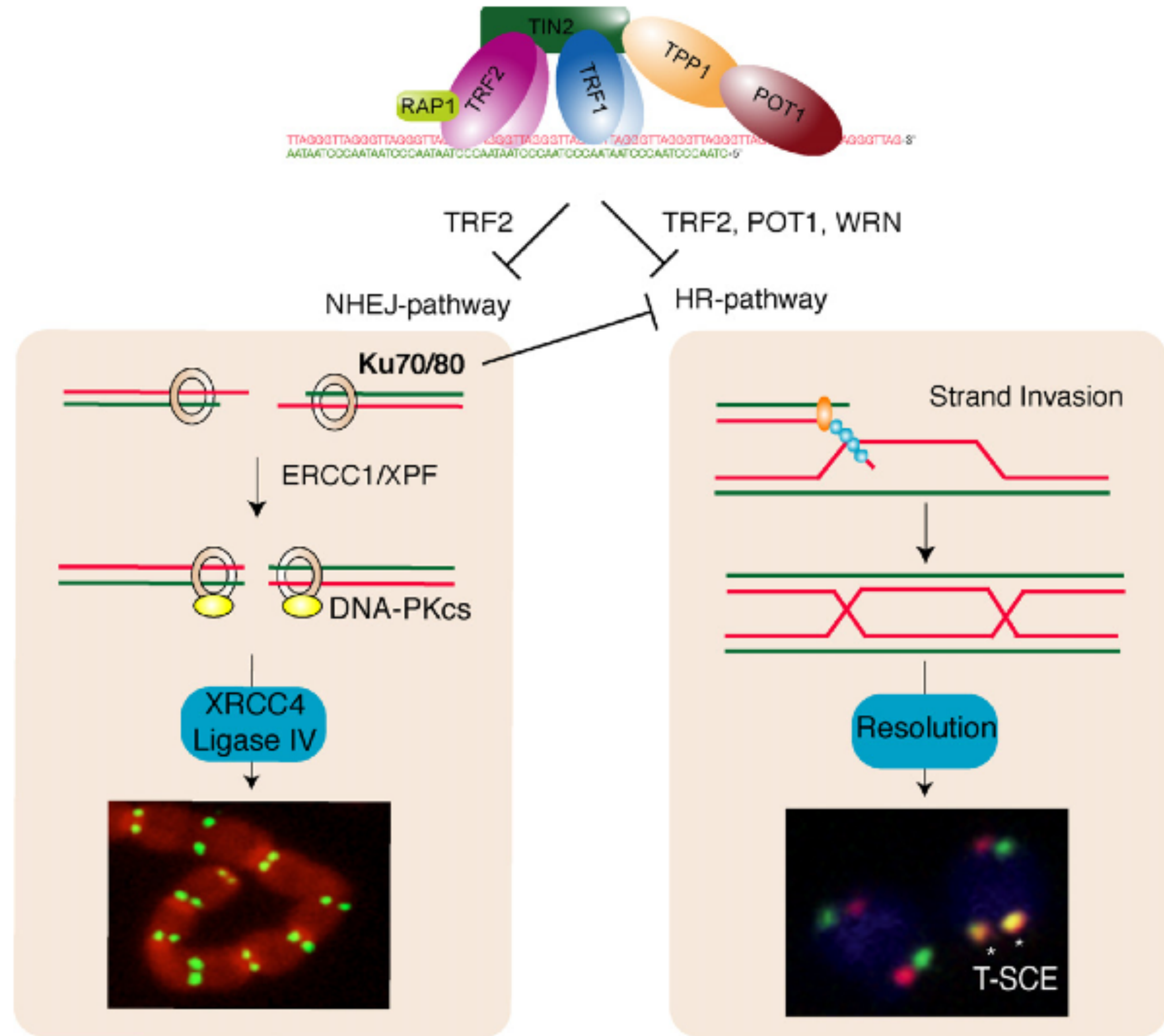
---

- Aktywacja szlaków odpowiedzi na uszkodzenia DNA
- Sygnał uszkodzeń genomowych – zastopowanie cyklu komórkowego (tzw. kryzys replikacyjny)
- Ograniczenie zdolności podziałowej jest ważnym mechanizmem ochronnym
  - Zapobieganie nowotworom
  - Utrzymywanie zróżnicowania klonalnego populacji komórek macierzystych



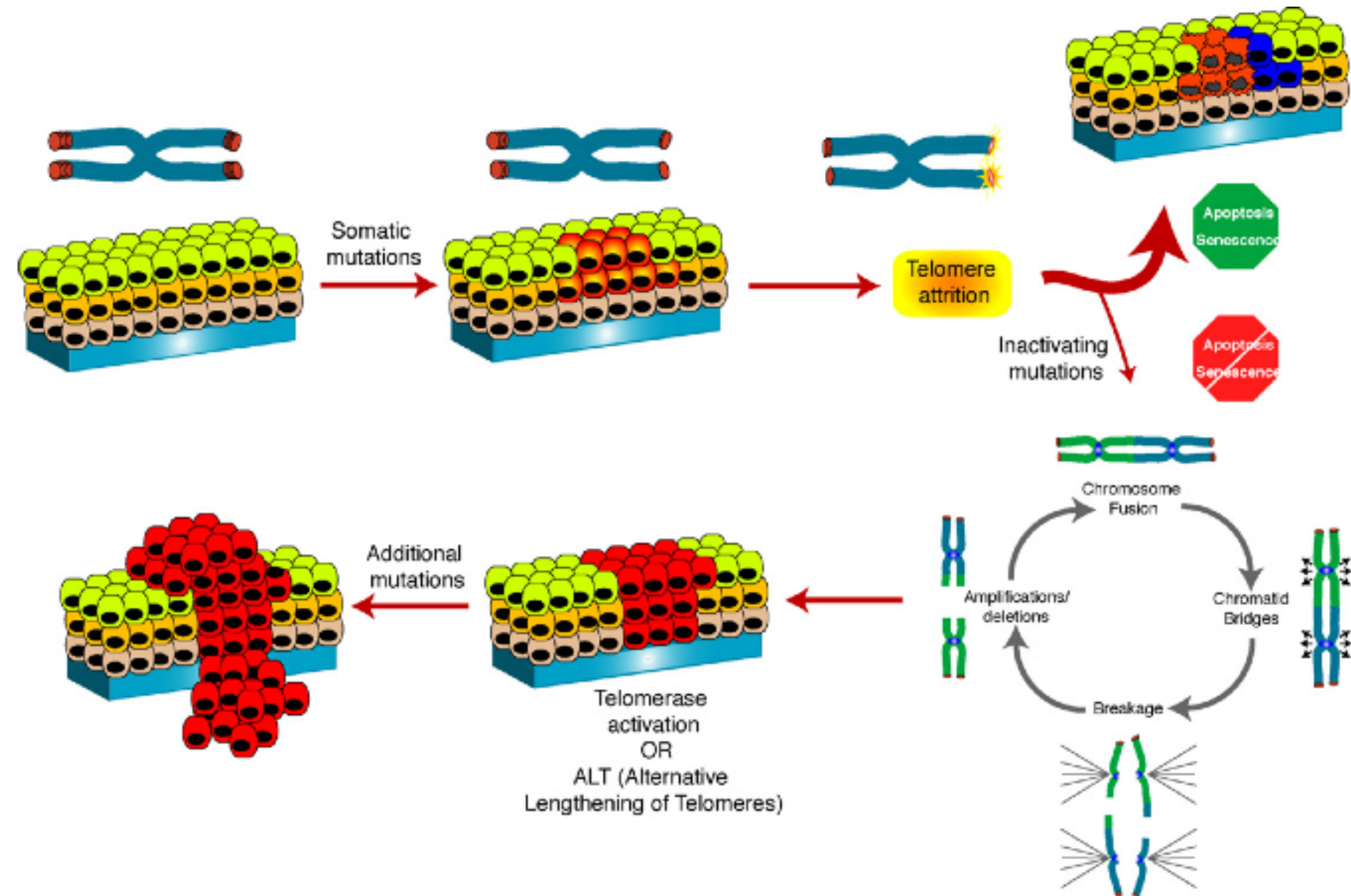
# Telomery a odpowiedź na uszkodzenia DNA

- Kompleks shelterin hamuje odpowiedź na pęknięcia DNA
- Chromosomy bez telomerów stają się substratami dla szlaków naprawy pęknięć dwuniciowych (DSBR)
- Prowadzi to do rearanżacji genomu



# Telomery a nowotwory

- W komórkach z defektywnym szlakiem odpowiedzi na uszkodzenia DNA (np. defekty p53) komórki ze skróconymi (lub uszkodzonymi) telomerami wciąż się dzielą
- Efektem są rearanżacje chromosomów (fuzje, translokacje)
- W komórkach nowotworowych ponowna aktywacja telomerazy



# Telomery a starzenie

- U drożdży defekt telomerazy – ustanie podziałów po kilku pokoleniach
- U roślin, bezkręgowców i myszy – podobnie (defekt po kilku pokoleniach)
- U człowieka – nawet częściowa utrata telomerazy (heterozygota) powoduje poważne defekty:
  - niedokrwistość
  - defekty układu odpornościowego
  - zwłóknienie płuc

## Telomerase complex

### hTERT mutations:

AD DC:	BMF:
P721R	G202A
K902N	C412T
R979W	G682D
F1127L	G694A
	T726M
	A772G

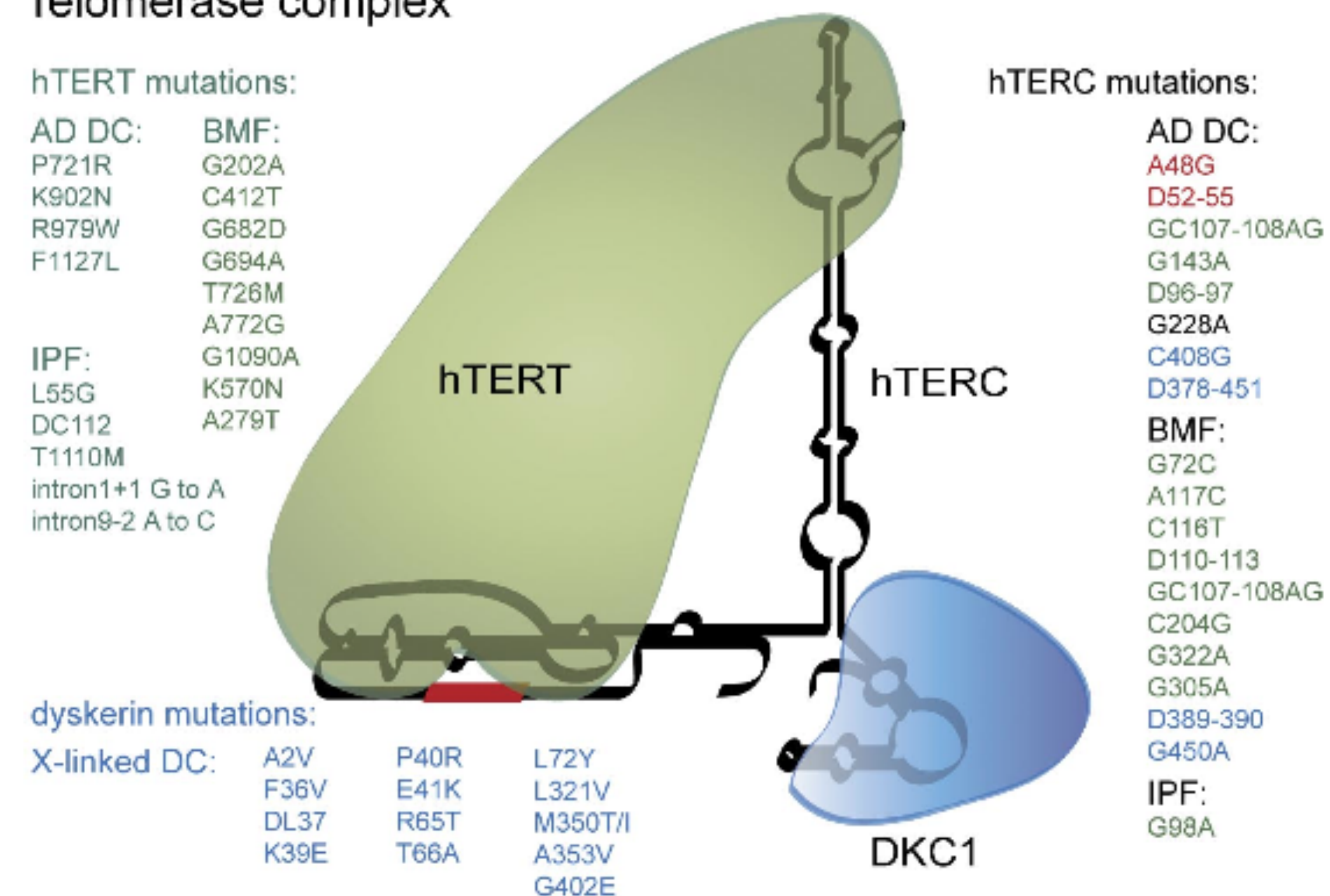
IPF:	G1090A
L55G	K570N
DC112	A279T
T1110M	
intron1+1 G to A	
intron9-2 A to C	

### dyskerin mutations:

X-linked DC:	A2V	P40R	L72Y
	F36V	E41K	L321V
	DL37	R65T	M350T/I
	K39E	T66A	A353V
			G402E

### hTERC mutations:

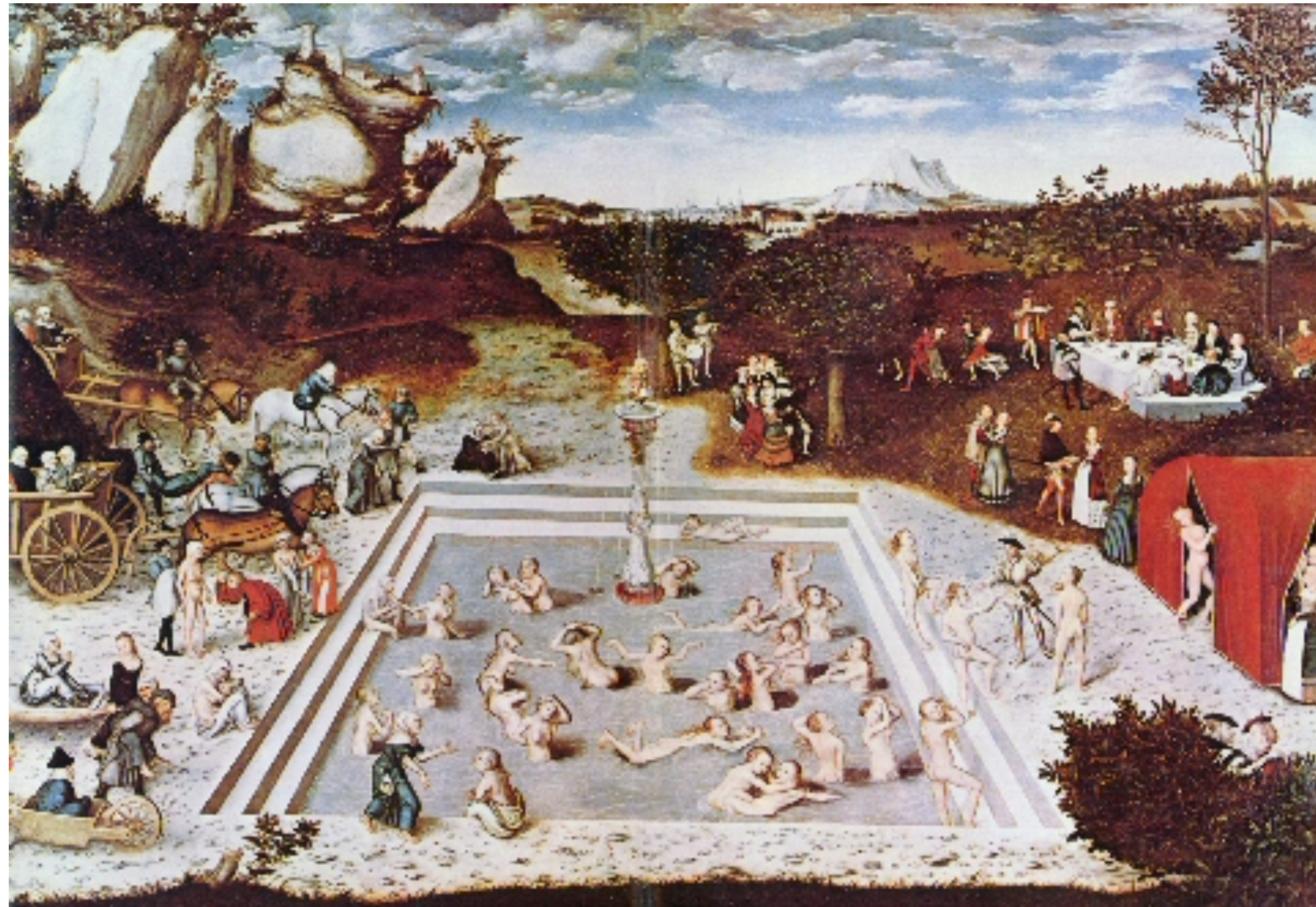
AD DC:
A48G
D52-55
GC107-108AG
G143A
D96-97
G228A
C408G
D378-451
BMF:
G72C
A117C
C116T
D110-113
GC107-108AG
C204G
G322A
G305A
D389-390
G450A
IPF:
G98A



# Co nam może dać telomeraza

---

- Wieczna młodość??
- Leki przeciwnowotworowe?



# Wieczna młodość?

---

- Starzenie się komórek somatycznych, nie dzielących się (np. układ nerwowy) – nie zależy od telomerów
- Telomery odgrywają rolę w starzeniu się komórek macierzystych i komórek układu odpornościowego
- Skracanie telomerów jest ważnym mechanizmem przeciwnowotworowym
- Systemy podtrzymujące stabilność DNA komórek somatycznych nie są lepsze, niż jest to absolutnie niezbędne (teoria “*disposable soma*”)

# “Magiczna” telomeraza



So now you know why RENEUE™ is such a paradigm-shifting product. It delivers the exact enzymes that degrade past your 25th birthday. It's just like bringing a dying plant back to life with just some water and fertilizer. **RENEUE™ is the "water and fertilizer that your cells need to flourish."**

## "But is it easy to use?"

**Yes! RENEUE™ is available as a 30-milliliter (30cc), single-dose liquid.** This single vial of RENEUE™ represents a **"full-body cellular reset" for a full-grown adult.** RENEUE™ is taken orally every 6 months. You can drink the product right from the bottle, or mix it into your favorite beverage. **It doesn't get easier than that!**

(RENEUE™ is sold as a dietary supplement only, and is not sold to treat, prevent, diagnose, or cure any diseases or illnesses. Please consult a physician before taking this or any dietary supplement. If you are pregnant or nursing you should be aware that RENEUE™ contains grain alcohol to extend shelf life--equivalent to drinking 1 shot of 80-proof alcohol. )

JAN  
MARINI  
SKIN RESEARCH®

[Where To Buy](#) : [About Jan Marini](#) : [Skin Care Management System](#) : [Products](#) : [News](#) : [Testimonials](#) : [Contact Us](#)

**AGE INTERVENTION®**  
Regeneration Booster  
Reset Your Cells' Aging Clock!

- Overview •
- Face Cream •
- Face Serum •
- Hands •
- Eye Cream •
- Regeneration Booster •

The Science of Topical Telomerase Enzyme Therapy

A clock that regulates aging.

Your appearance follows that same genetic lifespan is determined by telomerase. Telomerase de...

RéVive.  
RESEARCH. RENEWAL. RESULTS.™

## PEAU MAGNIFIQUE

**Peau Magnifique Resets Your Skin's Aging Clock...**

Peau Magnifique. Big words for even bigger results in bio-engineered skincare. RéVive continues to push the envelope further from the scalpel to the test tube. Peau Magnifique resets your skin's "aging clock" by a minimum of five years. Telomerase converts resting adult stem cells to newly minted skin cells, i.e. recruits youth. The results are incredible and life changing.

What you will immediately notice is; Increased glow with a more robust appearance. A smoother, more even skin tone. Will reduce redness and inflammation.

Long-term you will have: Stimulated generation of new skin cells. Firmer skin with a 45% reduction in wrinkles. Increased long-term skin clarity.

**The Peau Magnifique will be presented in our limited edition luxury gift box.**

**Complimentary Revive Deluxe Travel Set with your order**

**9 Bonus Awards**

**Reference: RV-401-PM**

**£875.00**

**Exportable Info**

Select Currency:



# “Magiczna moc telomerazy” c.d.

STRONA GŁÓWNA > KOSMETYKI > PRZECIWMARSZCZKOWA KURACJA Z TELOMERAMI W TLE

## Przeciwmarszczkowa kuracja z telomerami w tle

09-03-2010



zmien rozmiar tekstu **A<sup>+</sup>** **A<sup>-</sup>**

**Dr Irena Eris wprowadza na rynek nową linię kosmetyków dla dojrzałych kobiet. Seria Telomeric wykorzystuje mechanizmy działania telomerów w procesie redukcji zmarszczek i widocznego odmładzania skóry.**

Telomery - z greckiego telos „koniec” + meros „część” - to specyficzne czapeczki znajdujące się na końcach chromosomów, które chronią DNA przed uszkodzeniami. Bez nich chromosomy ulegałyby skracaniu przy każdym kolejnym podziale komórki. Wraz z każdym podziałem telomery ulegają skróceniu - są więc swoistym zegarem molekularnym odmierzającym, ile razy komórka może się podzielić. Gdy telomery ulegają skróceniu, komórki się starzeją.

Odkrycie mechanizmu działania telomerów zostało uhonorowane Nagrodą Nobla 2009 w dziedzinie fizjologii i medycyny. Badania nad telomerami przyczyniły się do bliższego poznania mechanizmów starzenia się organizmu, nowotworzenia, niektórych chorób dziedzicznych. Teraz odkrycie to znalazło także swoje zastosowanie w kosmetyce. Aktywny składnik kosmetyków z nowej linii - Telomeric, ma utrzymywać telomery w dobrym stanie, a przez to opóźnić wejście w fazę starzenia fibroblastów.



Seria TELOMERIC polecana jest kobietom po 60 roku życia. Według producenta kosmetyki zapewnią sprężyste, wyraziste kontury twarzy oraz jednolity kolor skóry, bez bruzd, rumienia, rozszerzonych porów i przebarwień.

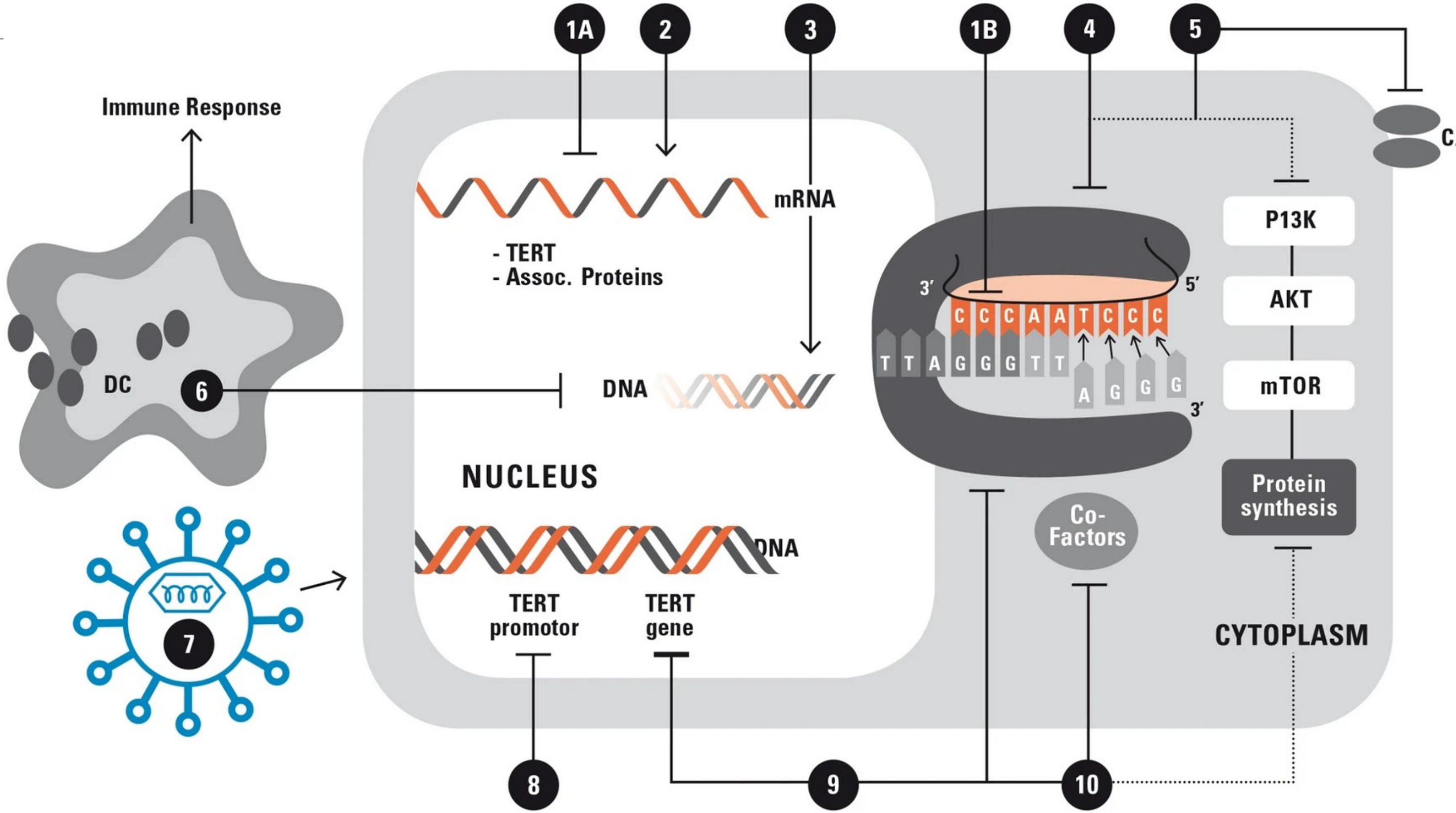
OPRAC.: SENIOR.PL

Zastrzeżenia odpowiedzialności

POWIADOM ZNAJOMEGO DODAJ LINK WERSJA DO DRUKU KANAŁ RSS

# Terapie przeciwnowotworowe

- Telomeraza jest aktywna w >90 nowotworów
- Inhibitory telomerazy







## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009

"for the discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase"



Photo: Gerbil, Licensed by Attribution Share Alike 3.0

**Elizabeth H. Blackburn**

🕒 1/3 of the prize

USA

University of California  
San Francisco, CA, USA



Photo: Gerbil, Licensed by Attribution Share Alike 3.0

**Carol W. Greider**

🕒 1/3 of the prize

USA

Johns Hopkins University  
School of Medicine  
Baltimore, MD, USA



Photo: Jussi Pulkkonen

**Jack W. Szostak**

🕒 1/3 of the prize

USA

Harvard Medical School;  
Massachusetts General  
Hospital  
Boston, MA, USA;  
Howard Hughes Medical  
Institute

# Stabilność genomu

---

Mutageneza i naprawa DNA. Rekombinacja.

# Literatura

---

- Brown, rozdział 16
- Allison, rozdział 7

# Dokładność replikacji

---

- Systemy replikacyjne współczesnych organizmów są bardzo dokładne
- Żadna replikacja nie może być pozbawiona błędów
  - nieskończona dokładność wymaga nieskończonej energii
- Zmienność informacji genetycznej jest nieuchronna
  - podstawa procesu ewolucji

# Zmiany genomu

---

- Wielkoskalowe
  - Zmiany liczby i struktury chromosomów, w tym duplikacje całych genomów
  - Dotyczą dużej liczby genów, fenotyp plejotropowy
- Mutacje
  - Dotyczą jednego, bądź niewielkiej liczby genów

# Powstawanie mutacji - teorie

---

- **Spontaniczne**

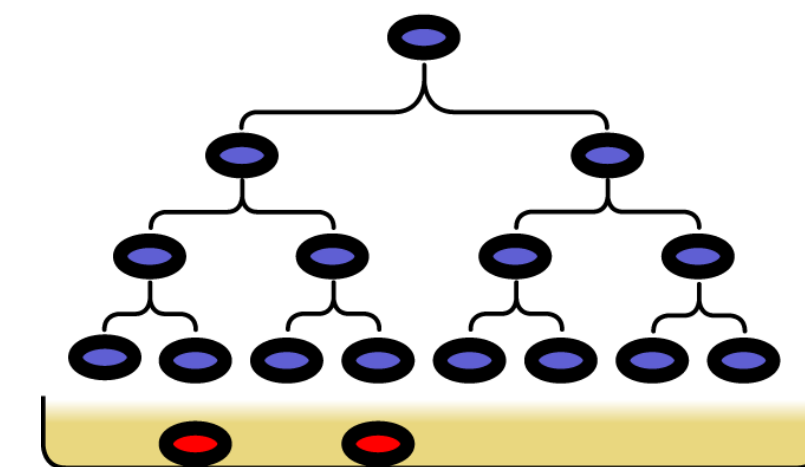
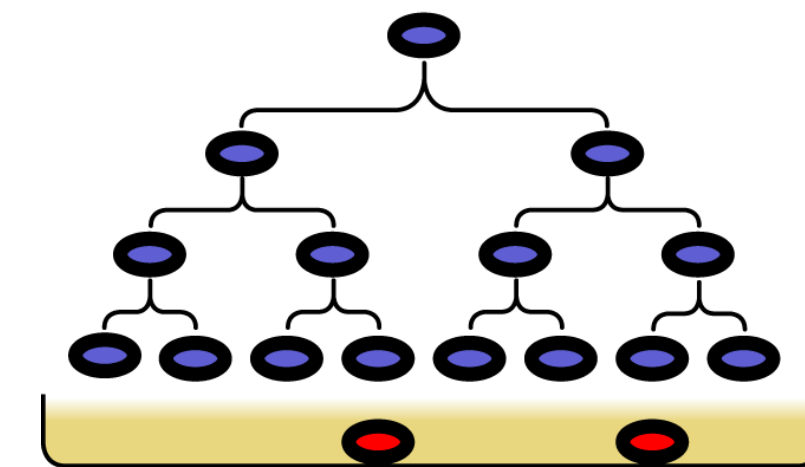
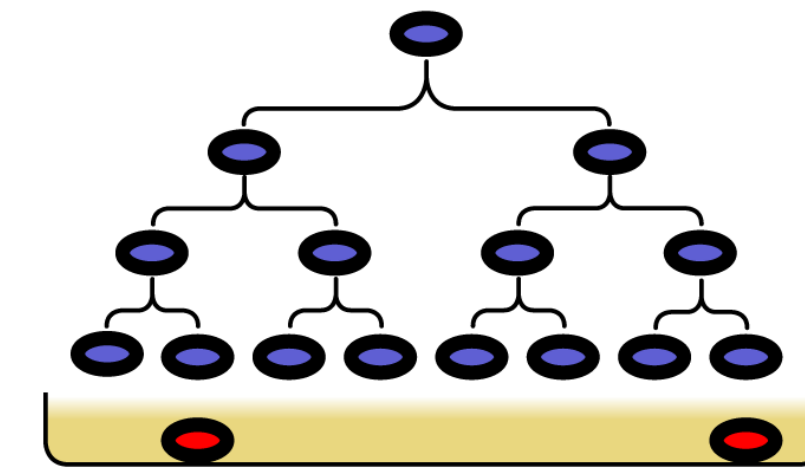
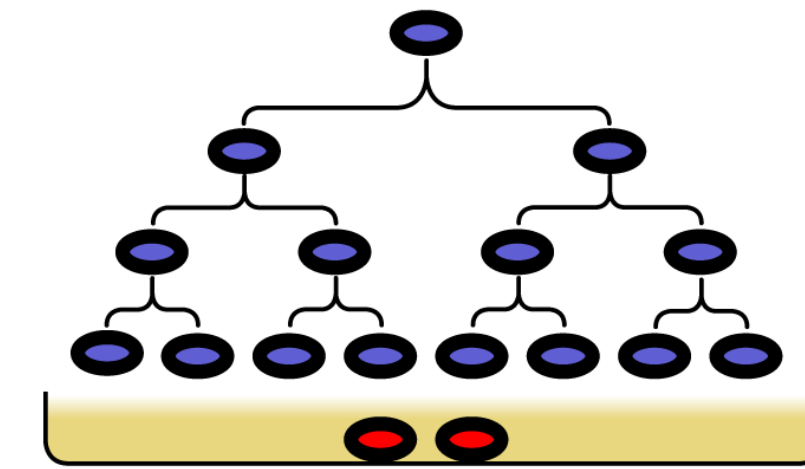
- powstają przypadkowo, środowisko może wpływać na częstość (np. mutageny) mutacji, ale nie na to, w którym genie zachodzą

- **Indukowane**

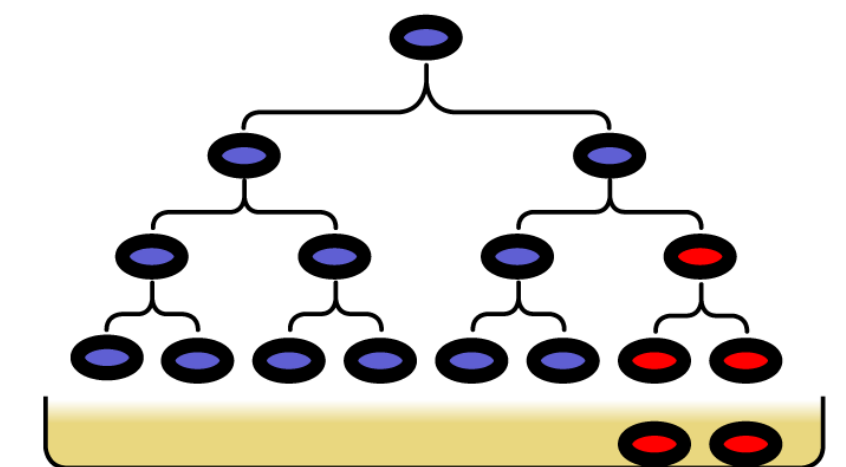
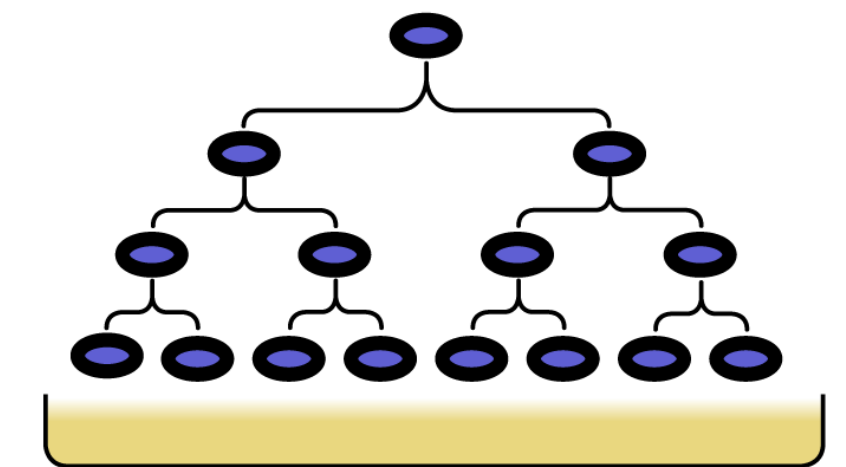
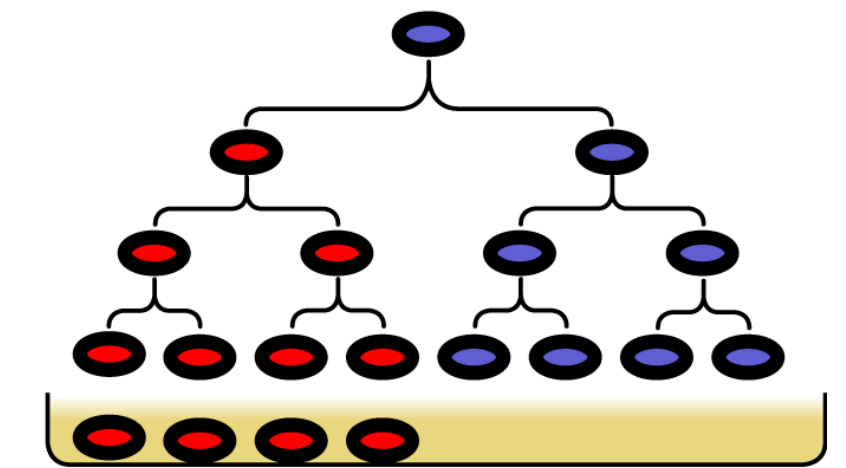
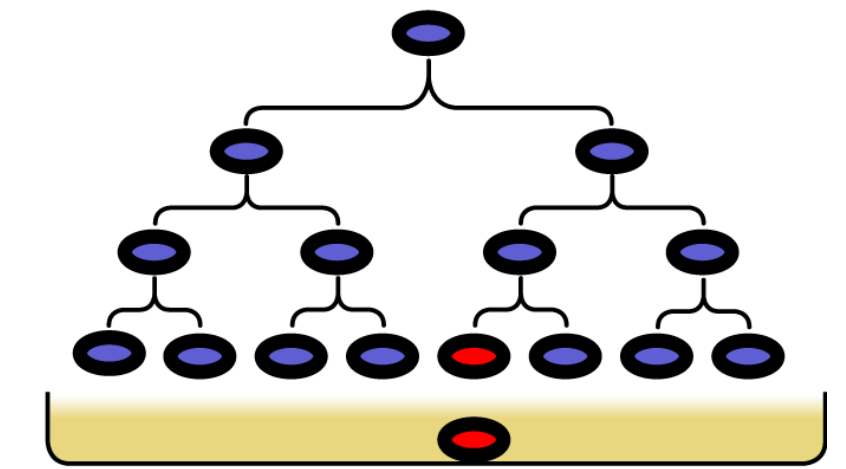
- powstają w konkretnym genie w odpowiedzi na czynnik selekcyjny

# Test fluktuacyjny

- Pojawianie się mutantów *E. coli* opornych na faga T1
- Jeżeli pojawiają się w odpowiedzi na kontakt z fagiem, to fluktuacje liczby opornych kolonii z każdej hodowli będą niewielkie
- Jeżeli pojawiają się spontanicznie, to liczba opornych kolonii będzie zmienna, zależnie od tego, kiedy w hodowli pojawił się mutant

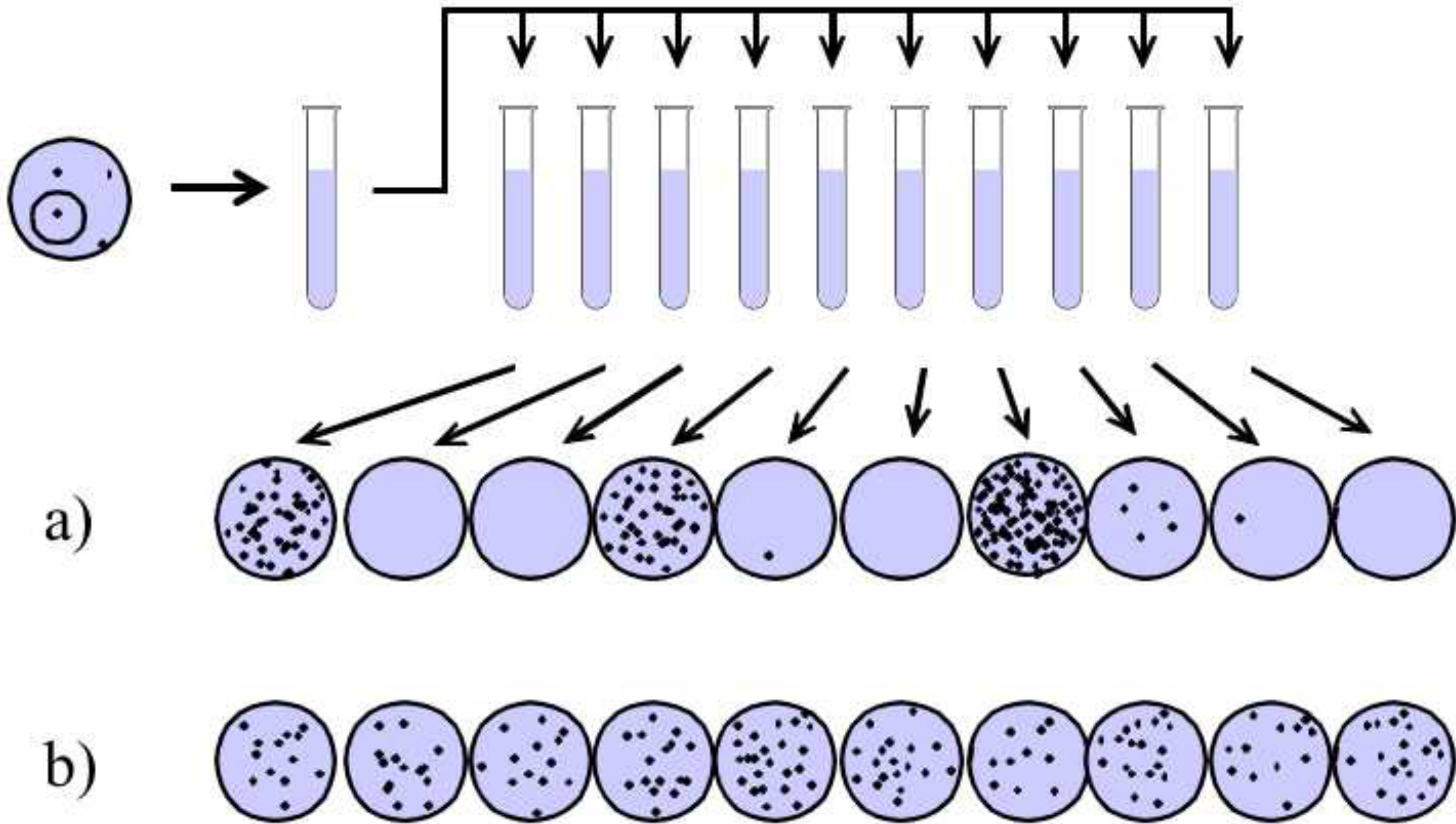


indukowane



spontaniczne

# Test fluktuacyjny



spontaniczne

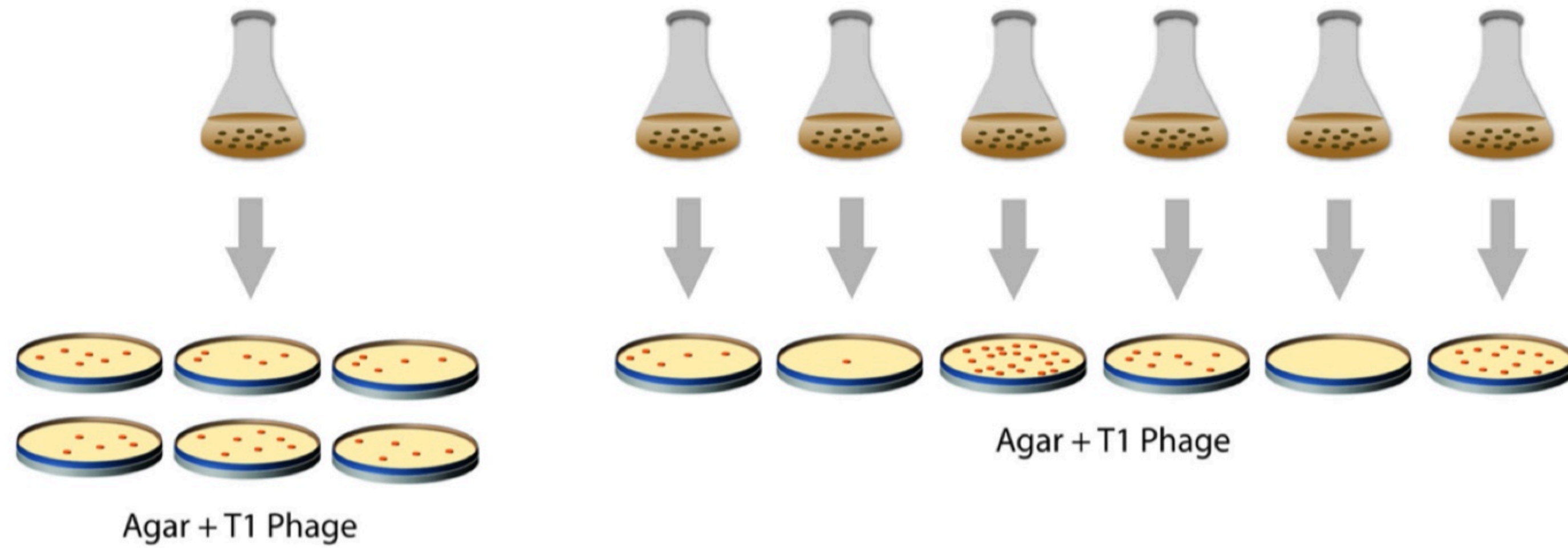
a)

indukowane

b)



# Test fluktuacyjny



*Axioms* **2023**, 12, 280

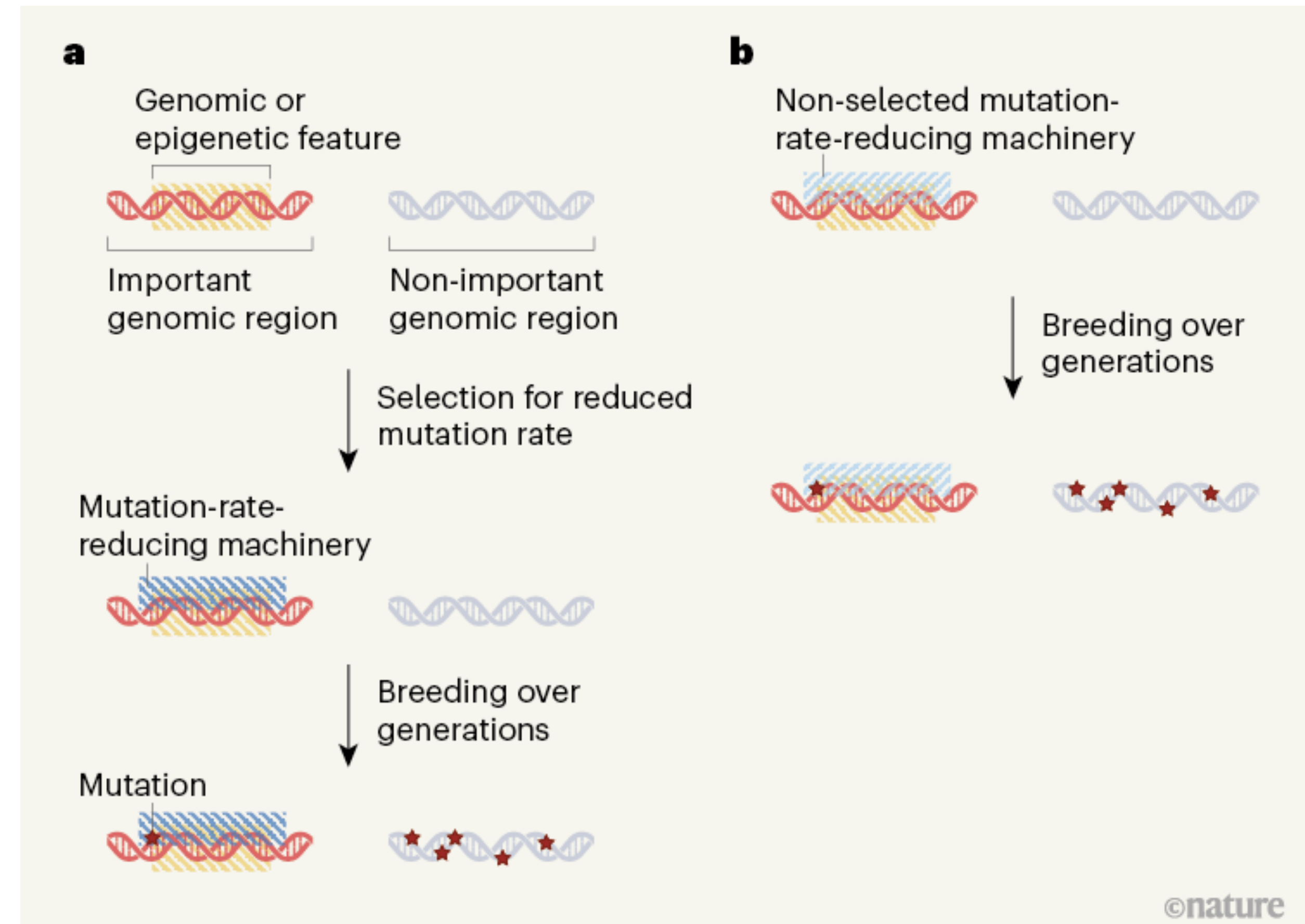
Number of T1-Resistant Bacteria		
Sample No.	Same Culture (Control)	Different Cultures
1	14	6
2	15	5
3	13	10
4	21	8
5	15	24
6	14	13
7	26	165
8	16	15
9	20	6
10	13	10
Mean	16.7	26.2
Variance	15.0	2178.0

Source: After Luria and Delbrück (1943).

Luria & Delbrück, 1943

# Losowość mutacji

- Losowość mutacji nie oznacza, że zachodzą zawsze z tą samą częstością i prawdopodobieństwem
- Monroe et al. (2022) - w ważniejszych obszarach genomu *Arabidopsis* mutacje powstają rzadziej
- Zwiększenie częstości mutacji w odpowiedzi na uszkodzenia (np. system SOS)
- Nie zmienia fundamentalnych wniosków z doświadczenia Lurii i Delbrücka - zmieniać może się częstość mutacji, ale nie to **jakie** mutacje zachodzą



Nature 602, 38-39 (2022)

# Poziom molekularny DNA

---

- Podstawienia (substytucje)
- Delecje i insercje
- Rearanżacje na dużą skalę

# Substytucje

- Tranzycje: zmiana nukleotydu purynowego w inny purynowy lub pirymidynowego w inny pirymidynowy
- Transwersje: zmiana nukleotydu purynowego w pirymidynowy lub pirymidynowego w purynowy
- Tranzycje zachodzą w naturze częściej od transwersji (średnio 2 do 15 x)
  - mimo tego, że możliwych transwersji jest teoretycznie więcej

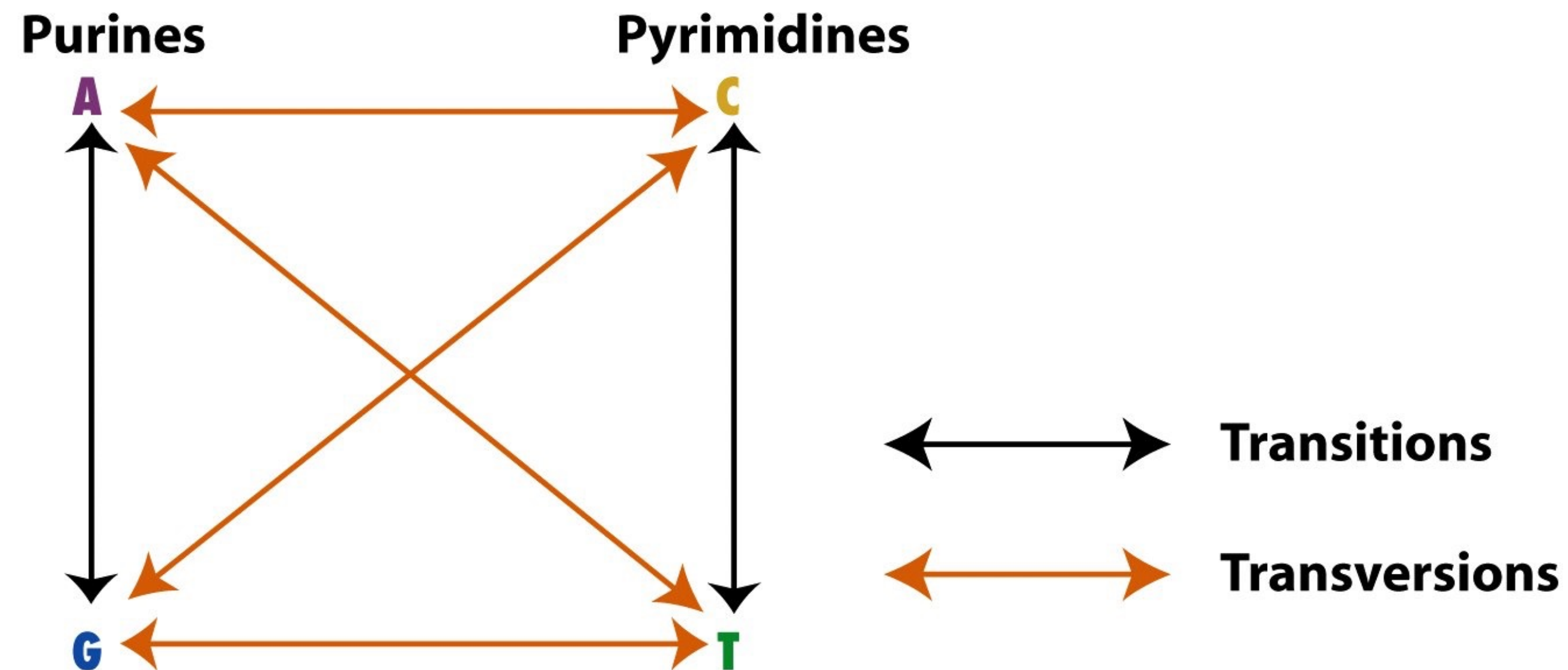


Figure 5-4 Evolutionary Analysis, 4/e  
© 2007 Pearson Prentice Hall, Inc.

# Mutacja

---

- Trwała, przekazywana przy replikacji zmiana sekwencji nukleotydowej w materiale genetycznym
- Nie każde uszkodzenie DNA jest mutacją – staje się nią dopiero po utrwaleniu i przekazaniu do cząsteczki (lub cząsteczek) potomnych

# Mutacja i naprawa

## A mutation

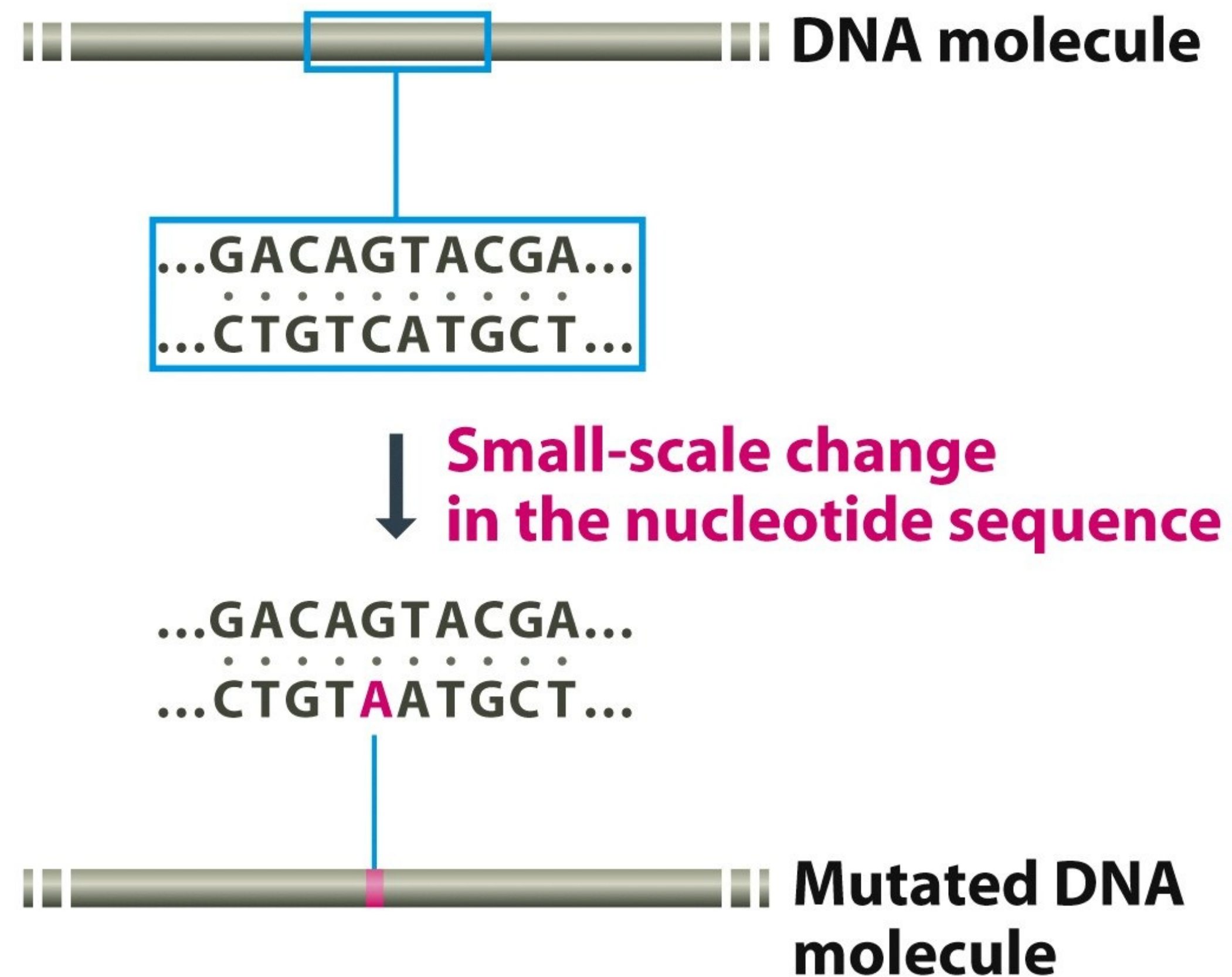


Figure 16-1a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## DNA repair

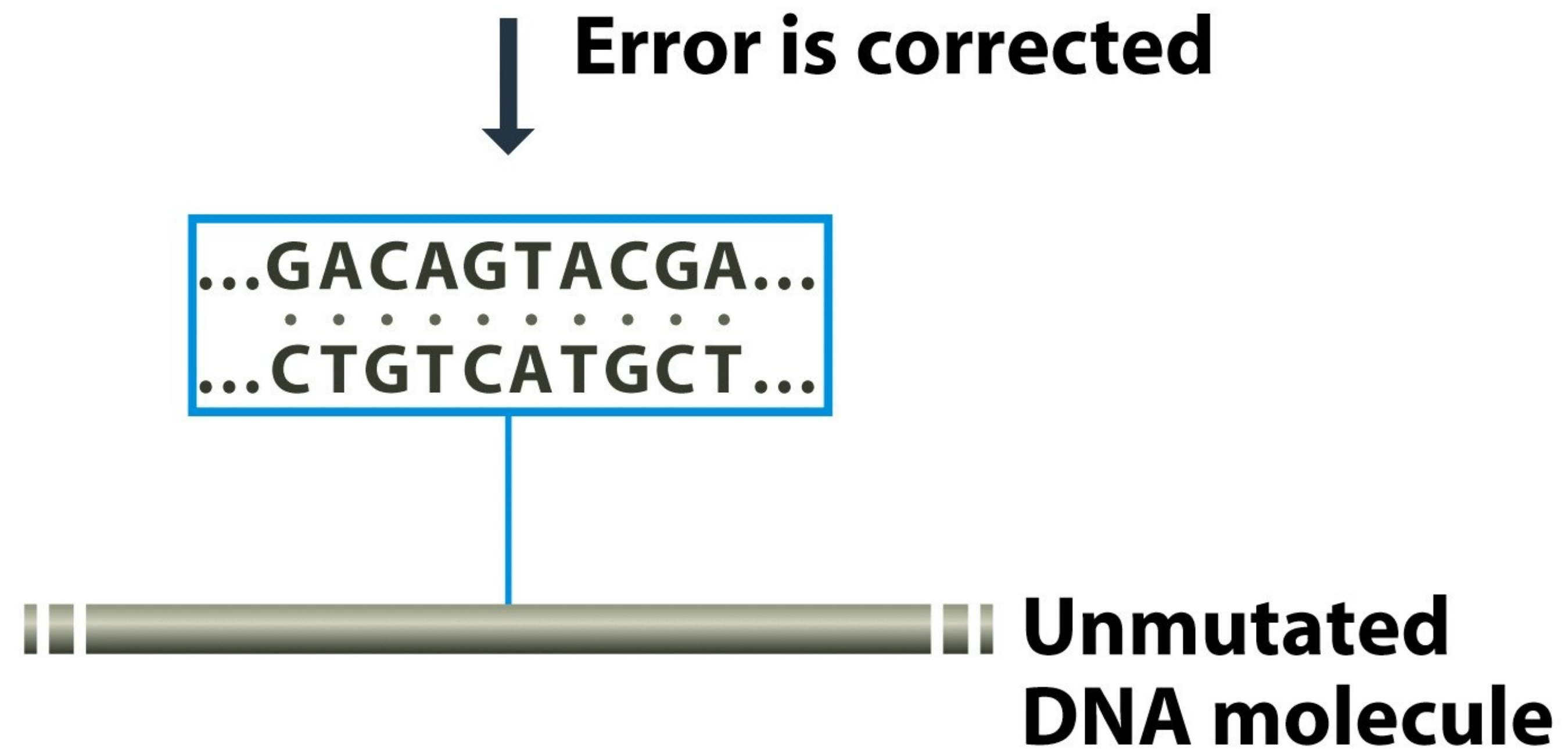
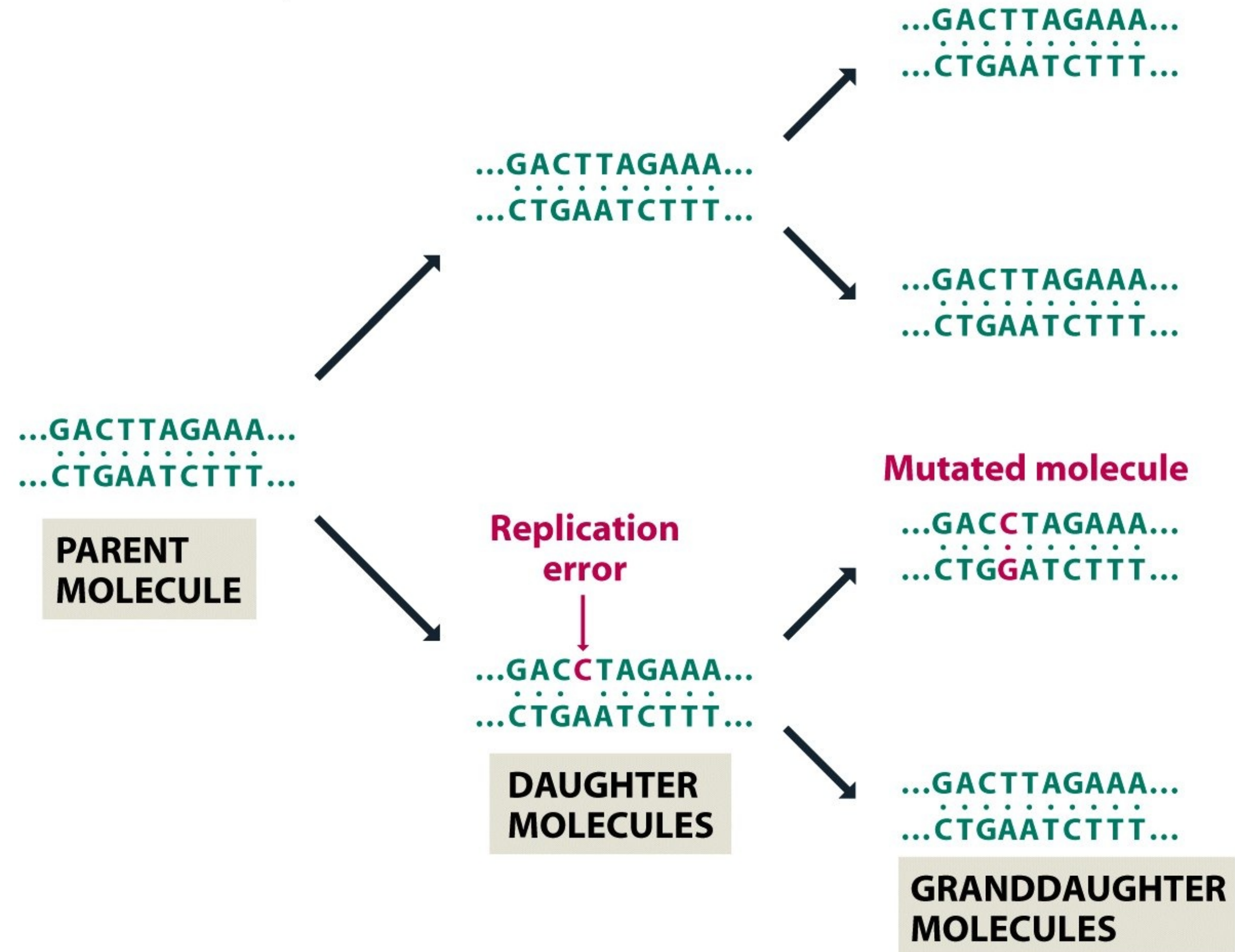


Figure 16-1b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Replikacja utrwała zmiany

## An error in replication



# Przyczyny mutacji

---

- Mutacje spontaniczne
  - Nieuniknione błędy podczas replikacji
- Mutacje indukowane
  - Błędy w wyniku działania czynników uszkadzających DNA lub zaburzających replikację – mutagenów
- Podział nie jest ścisły – mechanizmy nieraz są podobne, wiele mutagenów zwiększa częstość błędów o mechanizmie takim, jak przy mutacjach spontanicznych



# Dokładność replikacji

- Specyficzność parowania nukleotydów nie jest zbyt wysoka (~3%)
- Mechanizm **selekcji nukleotydów** polimerazy: na 3 etapach:
  - wiązanie nukleotydu z polimerazą
  - przenoszenie do centrum aktywnego
  - dołączanie do 3' końca syntetyzowanego łańcucha
- Mechanizm **korekcji błędów**:
  - Aktywność egzonukleazy 3'-5'
  - Usuwanie niewłaściwie wstawionego nukleotydu
  - Zasada konkurencji między aktywnością polimerazy a egzonukleazy

## Nucleotide selection

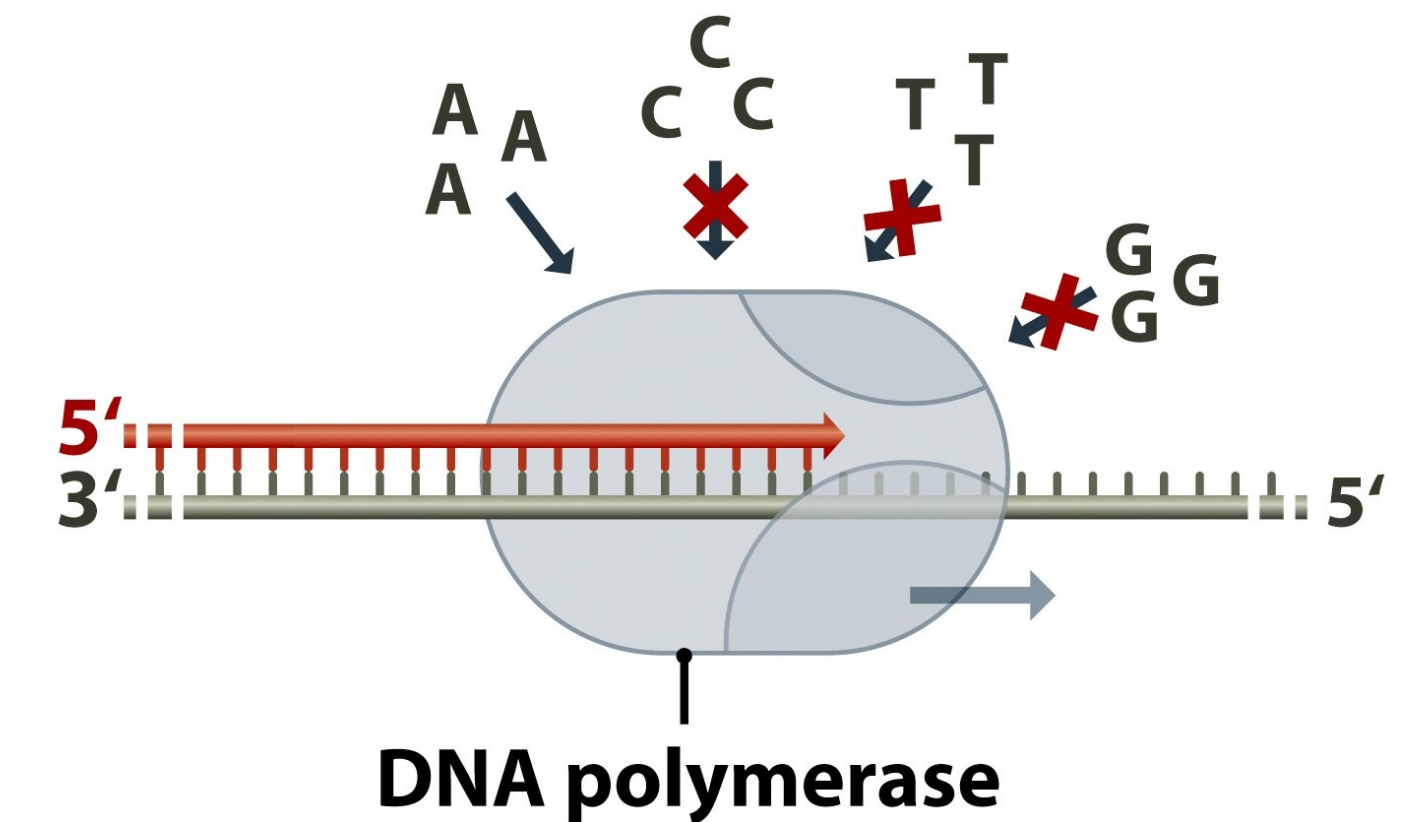
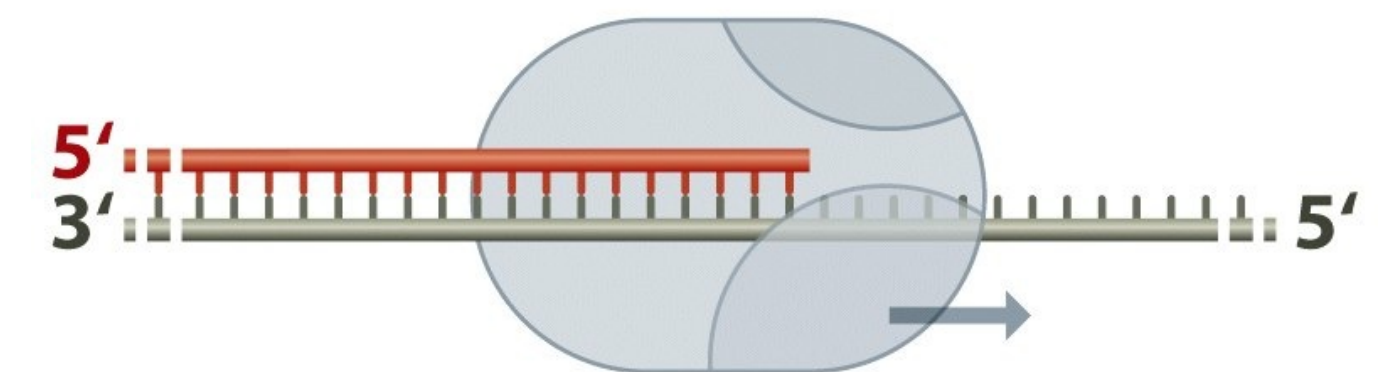
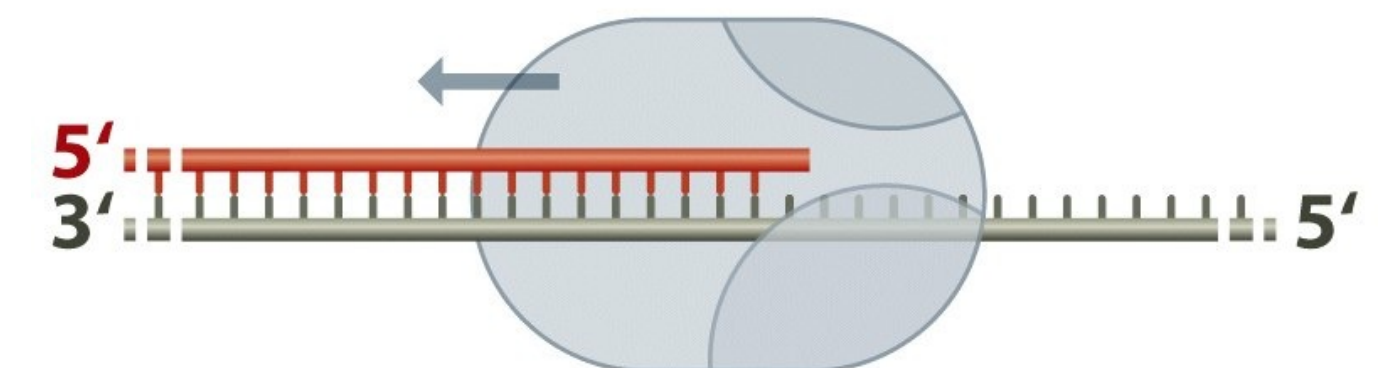


Figure 16-3a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## "Proofreading"



Last nucleotide is  
base-paired  
**POLYMERASE WINS**



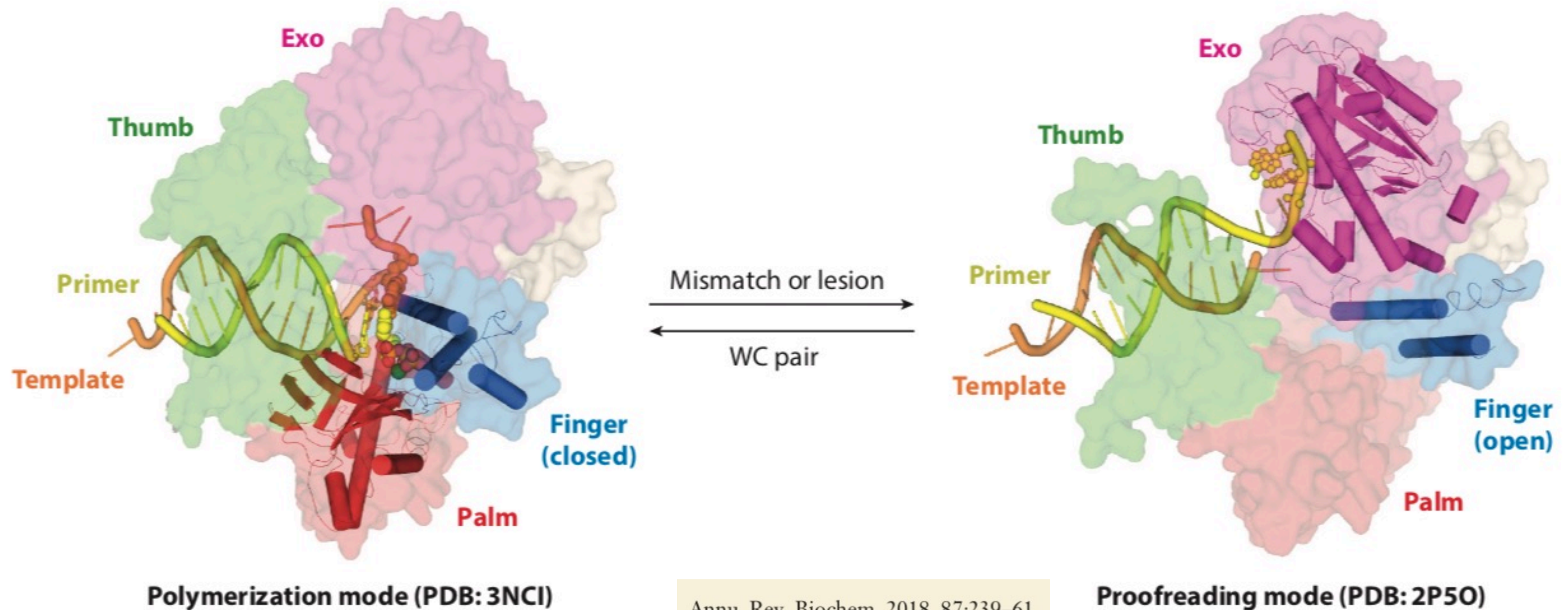
Last nucleotide is not  
base-paired  
**EXONUCLEASE WINS**

Figure 16-3b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Dokładność replikacji

- Mechanizm **korekcji błędów**:
- Zasada konkurencji między aktywnością polimerazy a egzonukleazy

**c**



# Dokładność replikacji

---

- Ostatecznie polimeraza jest bardzo dokładnym enzymem
- Częstość błędów  $10^{-7}$  -  $10^{-8}$  wstawianych nukleotydów
- Dalsze zwiększenie dokładności: systemy naprawcze

## **a** Error rate of DNA synthesis



# Mutacje spontaniczne – tautomeria zasad

- Zasady azotowe występują w formach tautomerycznych keto i enol (T, G, U) oraz amino i imino (A, C)
- Dominuje forma ketonowa (lub aminowa) i ona daje właściwe parowanie
- Rzadszy tautomer enolowy/iminowy może dać niewłaściwe parowanie
- Powoduje podstawienia typu tranzycji

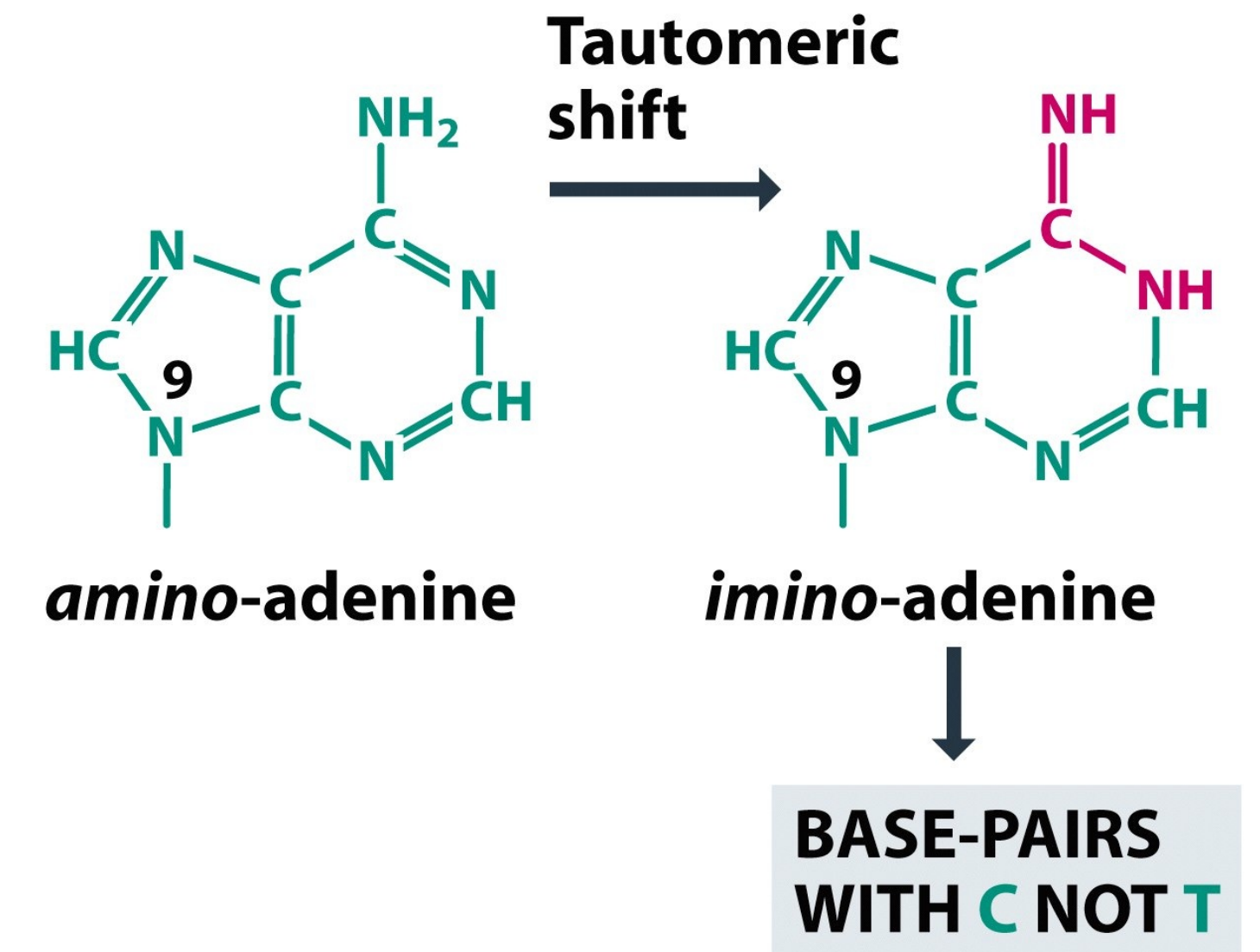


Figure 16-4 part 2 of 3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

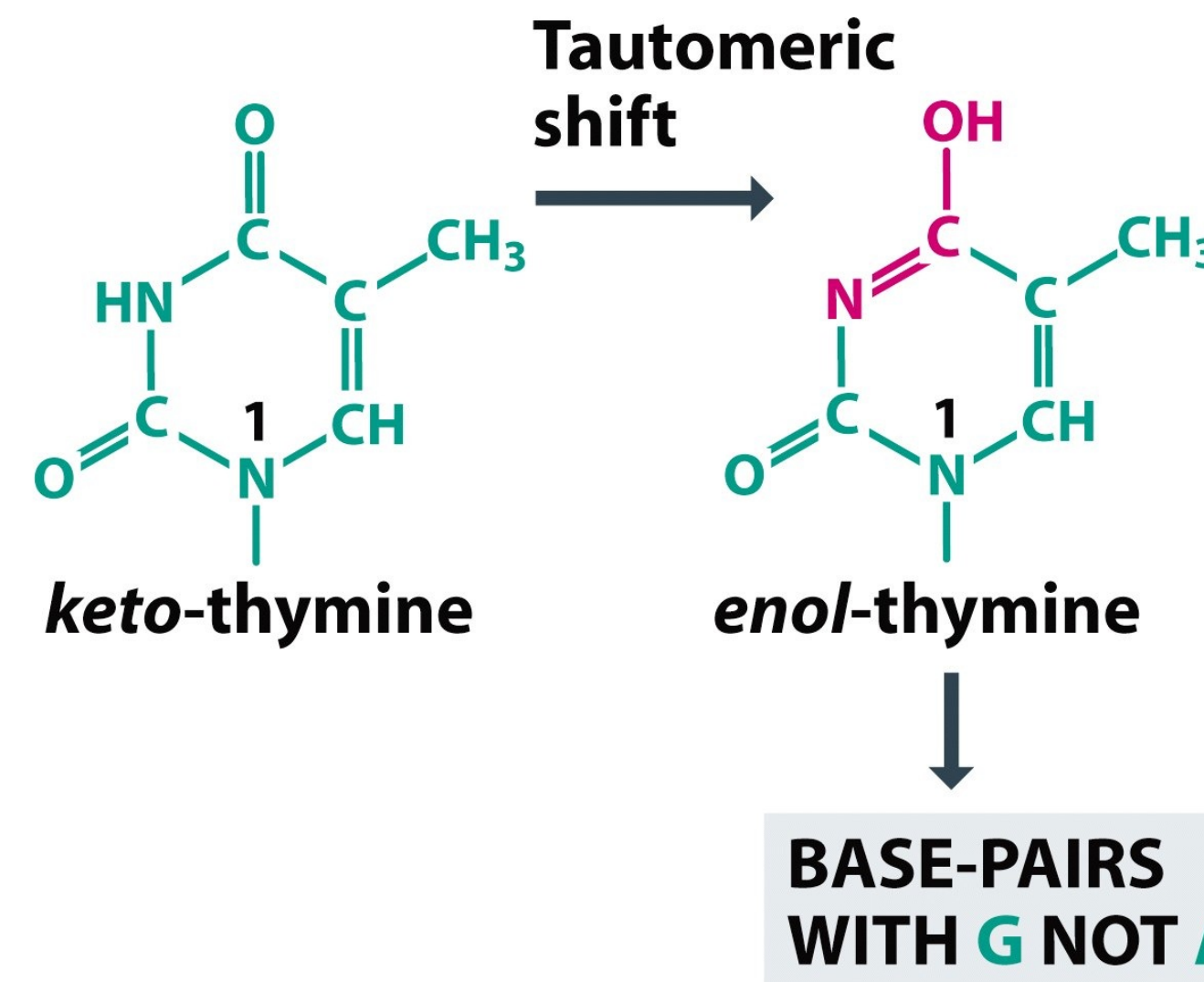


Figure 16-4 part 1 of 3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

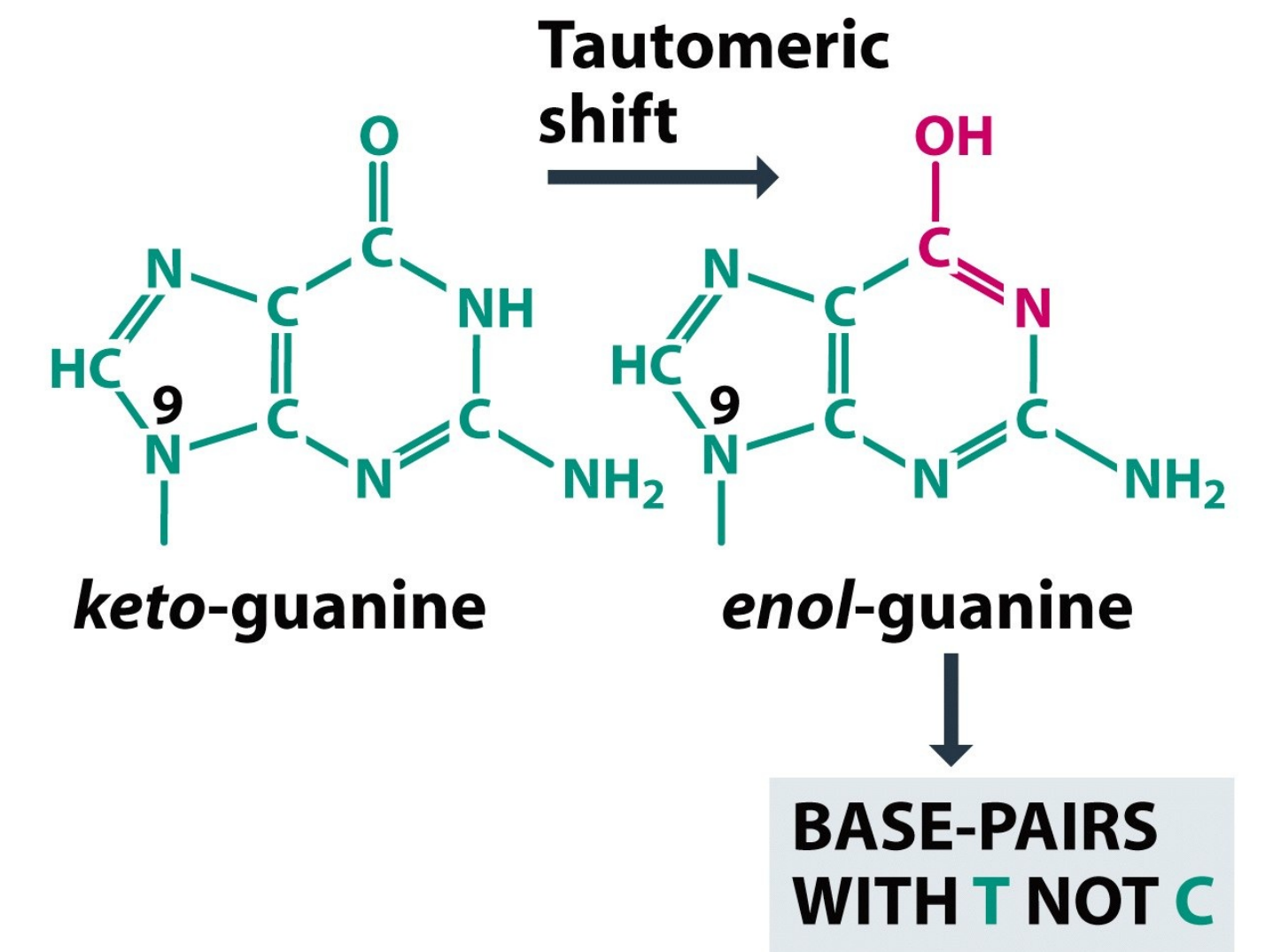


Figure 16-4 part 3 of 3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Poślizg replikacji

- Przesunięcie nici matrycowej i potomnej o jedną (lub więcej) jednostkę (zachowane parowanie)
- Częsty w sekwencjach powtórzonych, powoduje insercje i delecje
- Wysoce zmienne sekwencje mikrosatelitarne
- Wykorzystywane jako markery w badaniach populacyjnych, kryminalistycznych itp.

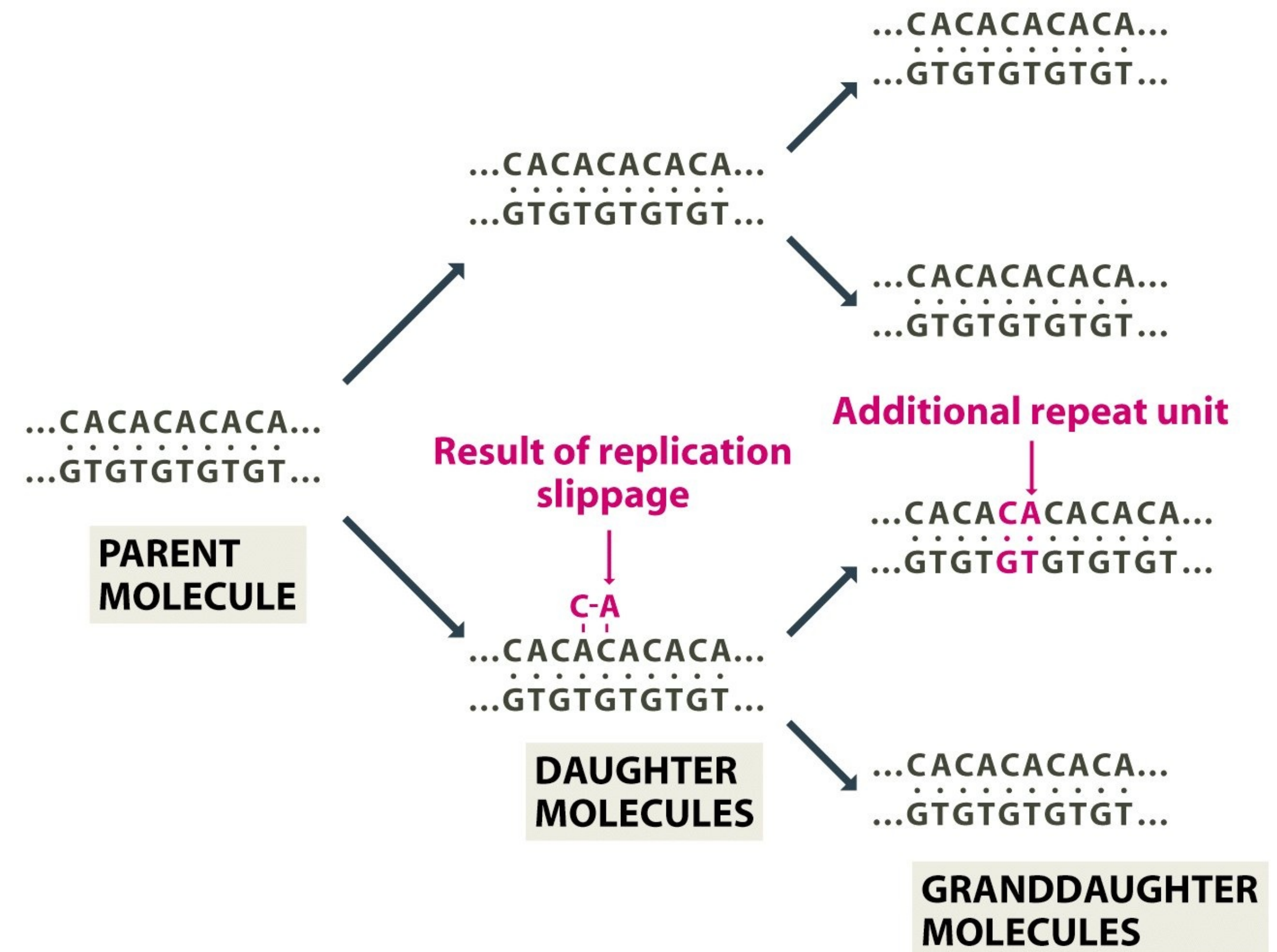


Figure 16-5 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Ekspansje trójkowe

---

- Wydłużanie serii powtórzeń trójnukleotydowych
- Mechanizm złożony: możliwe zaburzenia naprawy DNA z wycinaniem
- Przyczyna szeregu chorób genetycznych
- Niekiedy efekt antycypacji:
  - liczba powtórzeń rośnie z pokolenia na pokolenie, aż osiągnie wartość krytyczną
  - fenotyp w każdym kolejnym pokoleniu coraz cięższy

# Przykłady chorób związanych z ekspansją powtórzeń

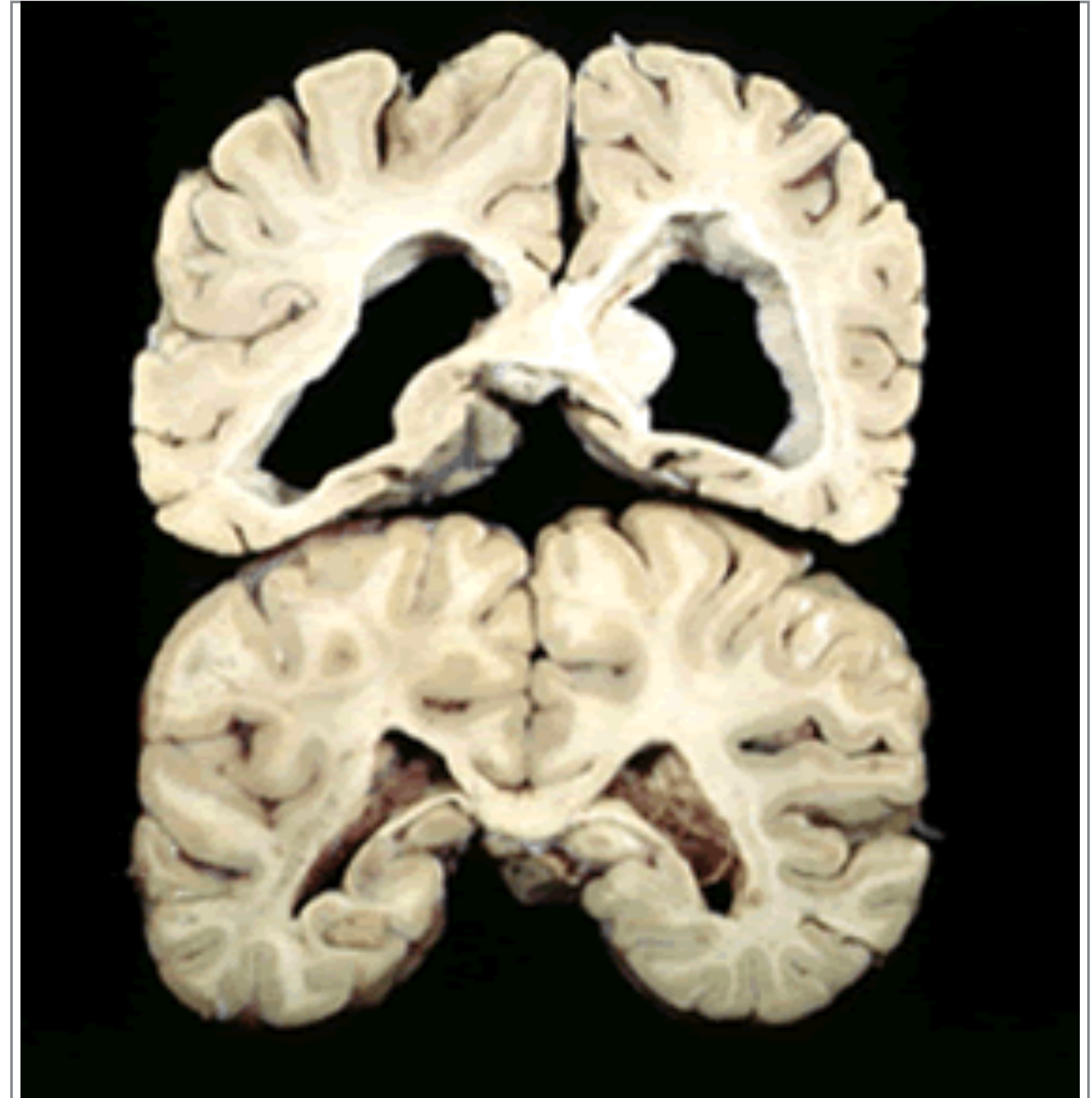
---

- Zespół kruchego chromosomu X
  - norma (CAG)<sub>6-35</sub>, chorzy (CAG)<sub>>60</sub>
  - w sekwencji liderowej genu *FMR1*
- Choroba Huntingtona
  - norma (CAG)<sub>6-35</sub>, chorzy (CAG)<sub>36-121</sub>
  - w sekwencji kodującej genu *HTT*, trakt poliglutaminowy
  - cecha dominująca, agregacja białka
- Ataksja Friedreicha
  - norma (CTG)<sub>5-37</sub>, chorzy (CTG)<sub>40-200</sub>
  - w intronie genu *FXN*, zaburza splicing, obniżony poziom białka

# Choroba Huntingtona

---

- Postępująca degeneracja tkanki mózgu
- Pierwsze objawy zwykle w wieku 35-45 lat
- Zaburzenia behawioralne, zaburzenia ruchu (płásawica), postępująca ciężka demencja
- Oczekiwany czas życia - ~20 lat od pojawienia się objawów



**The human brain, showing the impact of HD on brain structure in the basal ganglia region of a person with HD (top) and a normal brain (bottom).**

<http://kobiljak.msu.edu>



# Mutageny

---

- Chemiczne
  - analogi zasad – błędnie wykorzystywane jako substraty
  - reagujące bezpośrednio z DNA – np. czynniki alkilujące, deaminujące, interkalujące, tworzące addukty
  - działające pośrednio – np. zwiększające produkcję reaktywnych form tlenu (nadtlenki, rodniki) w komórce
  - działające na polimerazę – np. jony  $Mn^{2+}$  (zamiast  $Mg^{2+}$ ) jako kofaktory polimerazy  $\gamma$  powodują wzrost częstości błędów
- Fizyczne
  - Np. UV, promieniowanie jonizujące, temperatura
- Biologiczne
  - Wirusy i ruchome elementy genetyczne integrujące się do genomu

# Mutagen chemiczny - przykład

- 5-bromouracyl
- analog tyminy, ale równowaga przesunięta w stronę formy enolowej, tworzącej pary z G

## Base pairing with 5-bromouracil

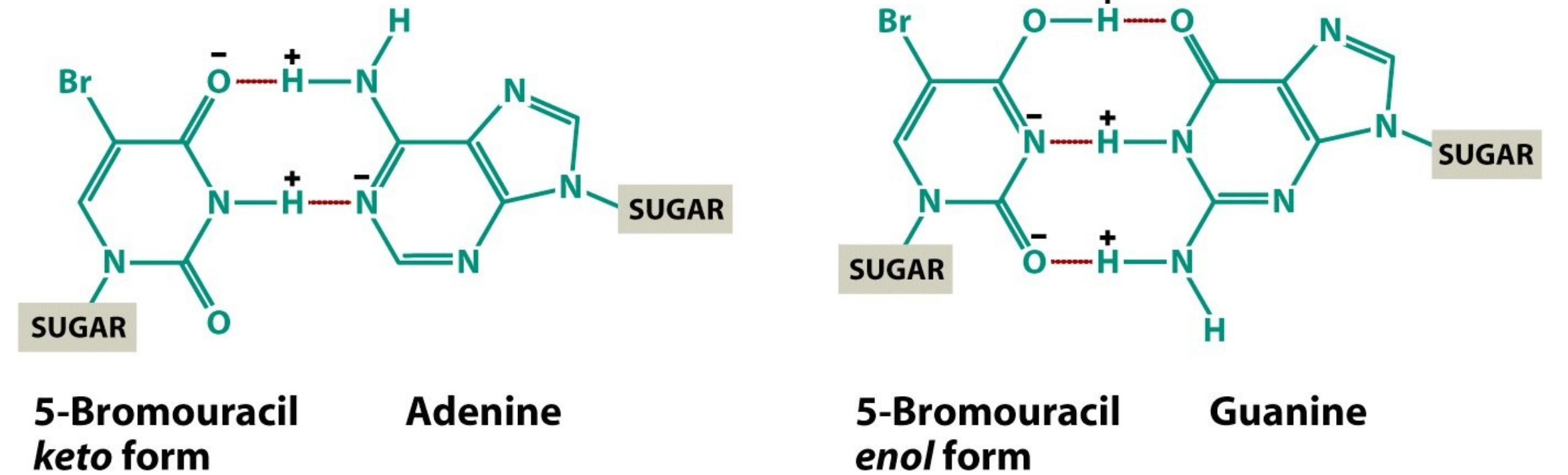


Figure 16-6b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## The mutagenic effect of 5-bromouracil

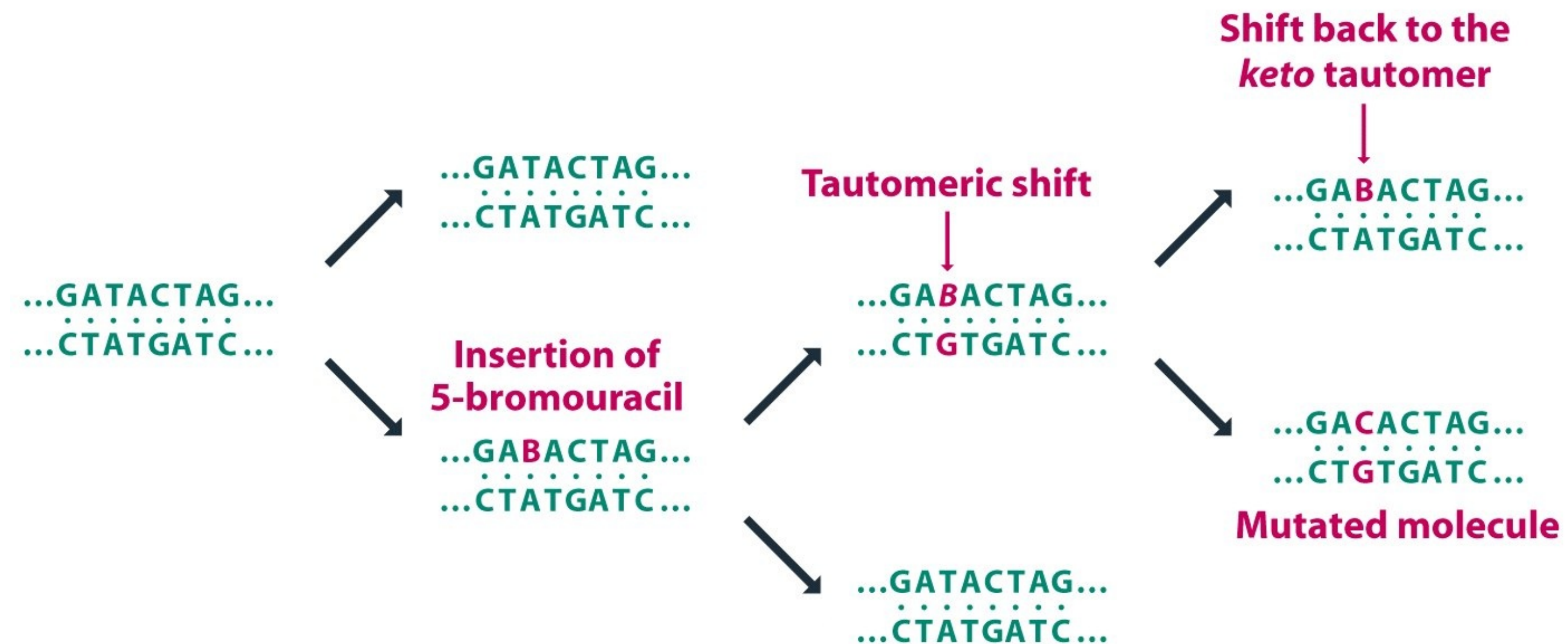


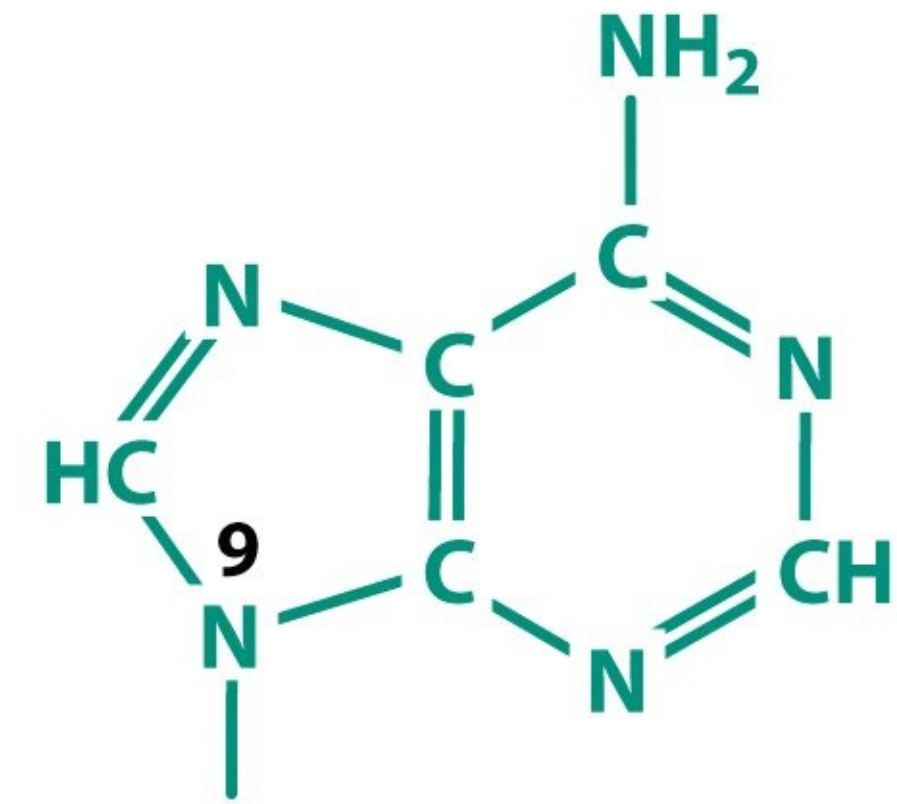
Figure 16-6c Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Mutageny chemiczne uszkadzające DNA

---

- EMS (metanosulfonian etylu)
  - alkiluje zasady azotowe
- Czynniki deaminujące (kwas azotawy, dwusiarczyn sodowy)
  - Deaminacja adeniny daje hipoksantynę: paruje z C zamiast T
- Węglowodory policykliczne

**Adenine**



↓ **Deamination**

**Hypoxanthine**

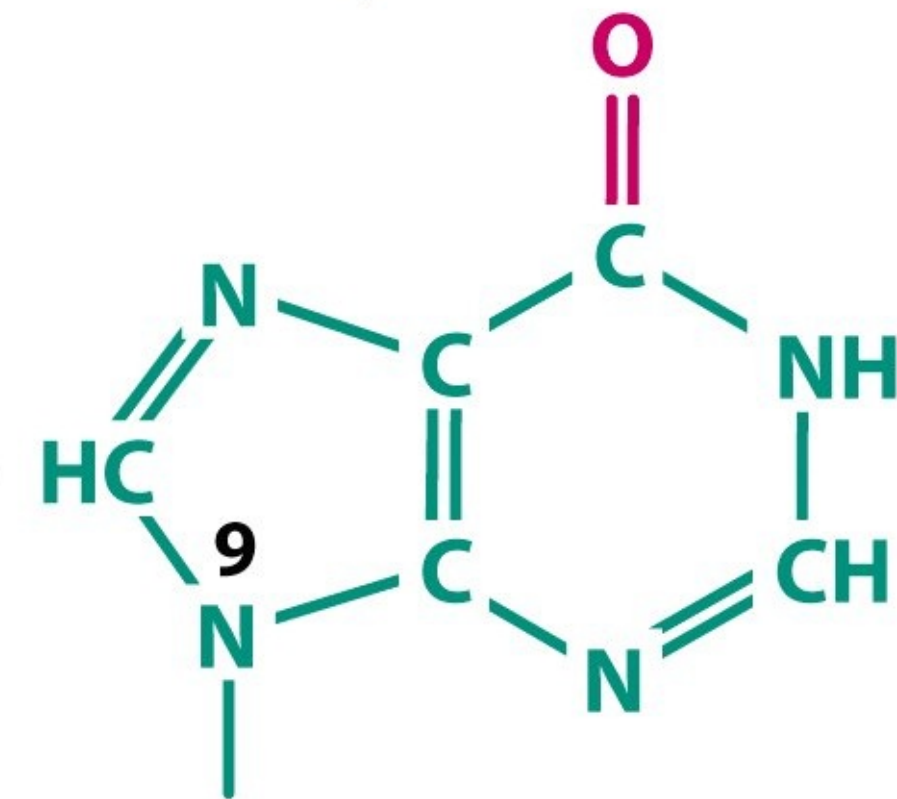


Figure 16-7 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Czynniki interkalujące

- Płaskie cząsteczki, wciskają się między pary zasad, zmieniają skok helisy – najczęściej insercje
- np. bromek etydyny, akryflawiny
- silniejsze działanie na niewielkie cząsteczki koliste (plazmidy, mtDNA)

## Ethidium bromide

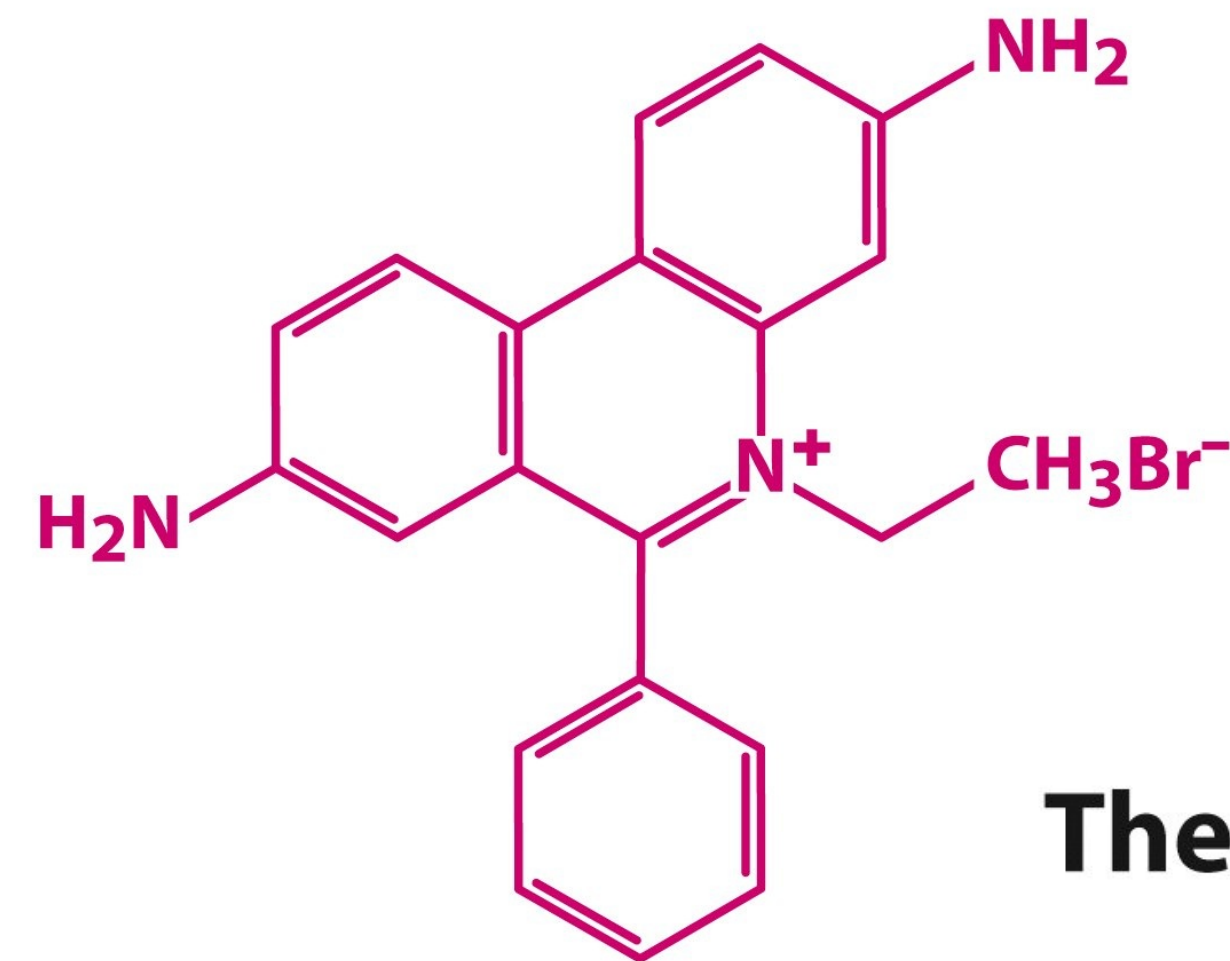


Figure 16-8a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## The mutagenic effect

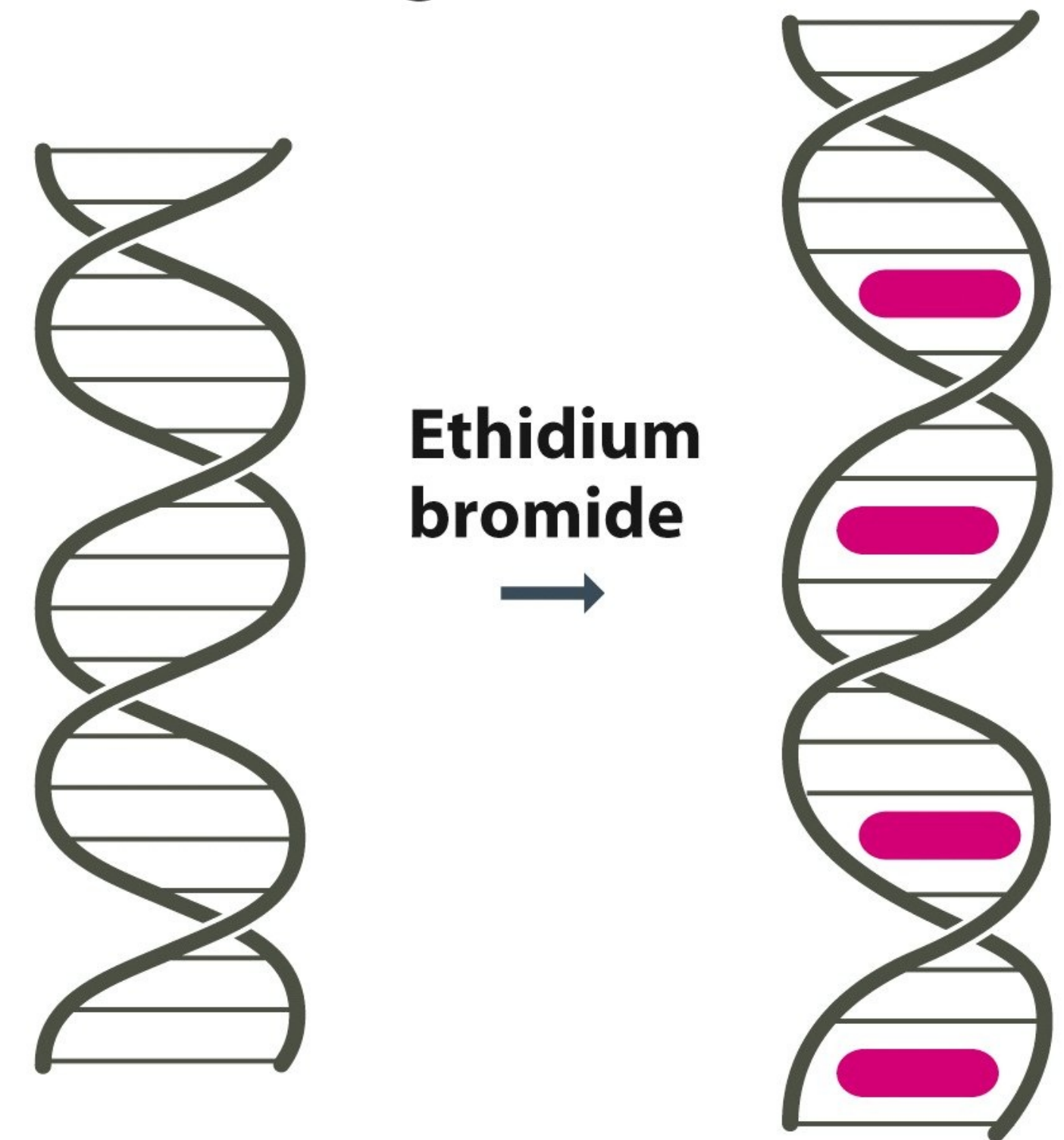


Figure 16-8b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Działanie UV

- Powstają fotoprodukty – np. dimery cyklobutyłowe sąsiadujących zasad (najczęściej T-T), uszkodzenia 6-4

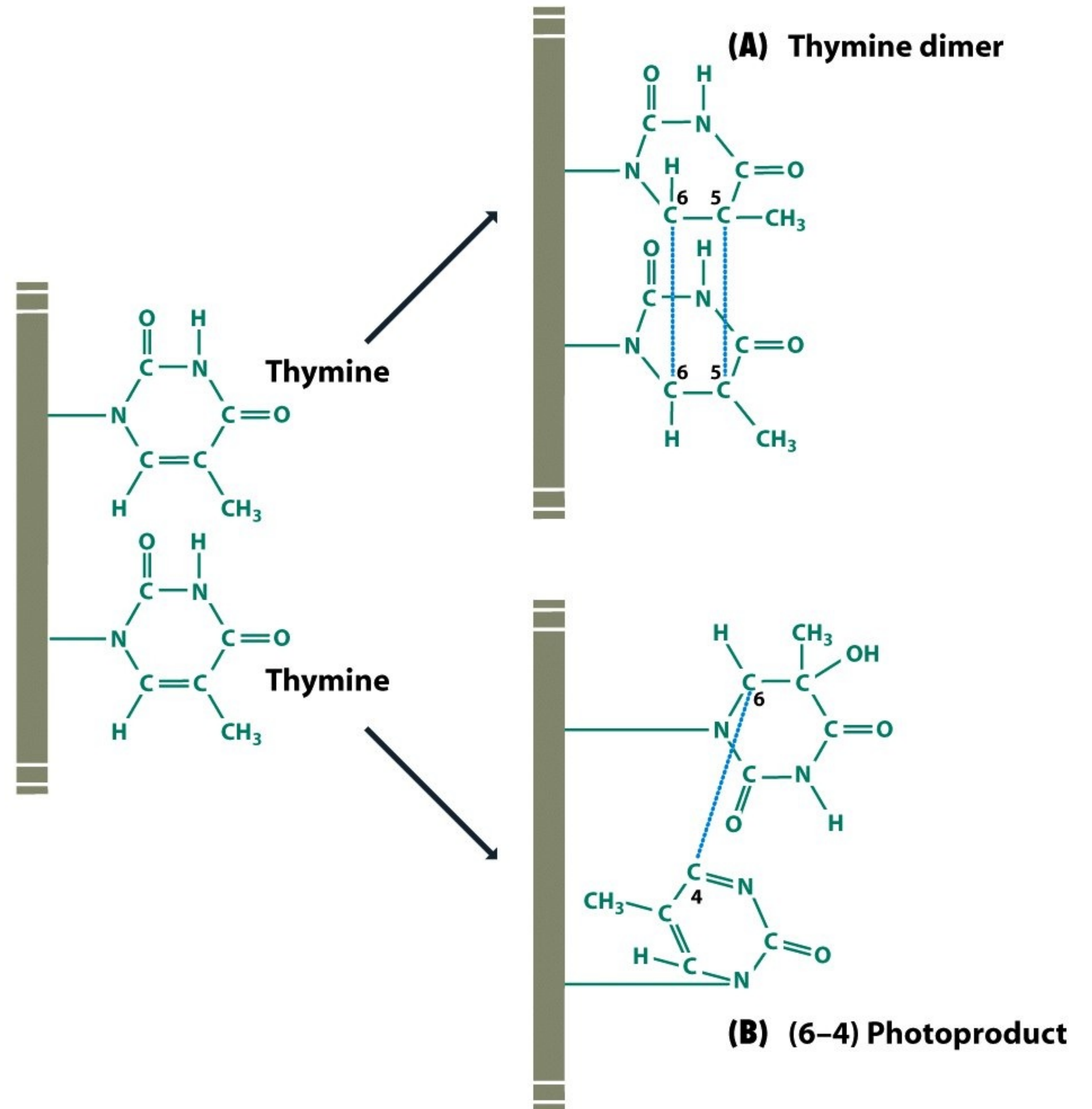
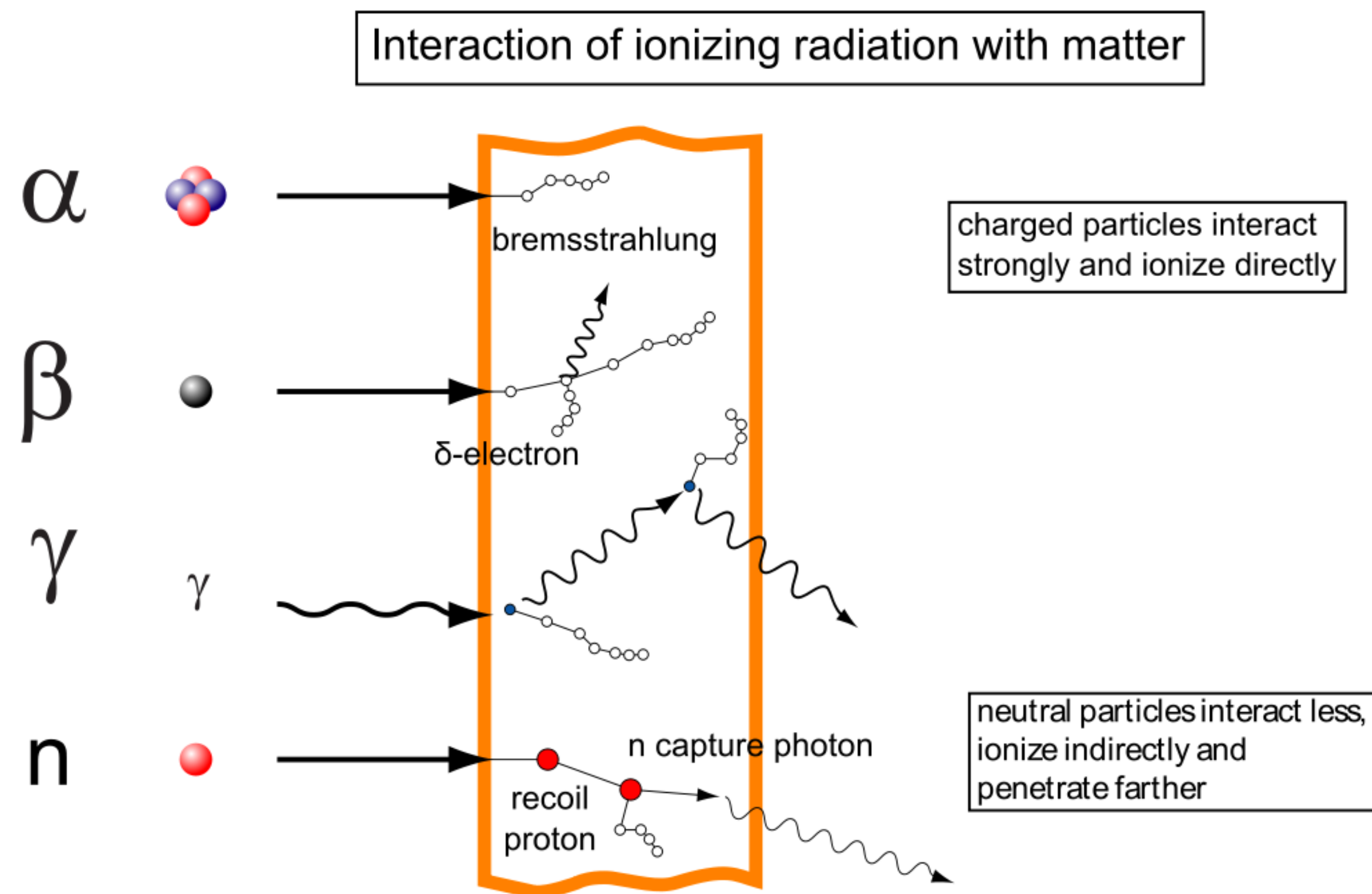


Figure 16-9 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Promieniowanie jonizujące

- Główny efekt: pęknięcia dwuniciowe (DSB)
- Efekt bezpośredni
- Efekt pośredni: wolne rodniki tworzone pod wpływem interakcji promieniowania (np. z wodą)



# Naprawa DNA

---

- U *E. coli* częstość błędów polimerazy 1:10<sup>7</sup> wstawianych nukleotydów
- Ogólna częstość błędów przy replikacji: 1:10<sup>9</sup> – 1:10<sup>10</sup> wstawianych nukleotydów
- Za zmniejszenie częstości błędów replikacji o 2-3 rzędy wielkości odpowiadają systemy naprawy DNA

# Systemy naprawy DNA

---

- Naprawa bezpośrednia (DR)
- Naprawa przez wycinanie i resyntezę (ER)
  - Naprawa przez wycinanie zasad (BER)
  - Naprawa przez wycinanie nukleotydów (NER)
  - Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)
- Naprawa pęknięć dwuniciowych (DSBR)
  - system łączenia końców niehomologicznych (NHEJ)
  - rekombinacja homologiczna (HR)

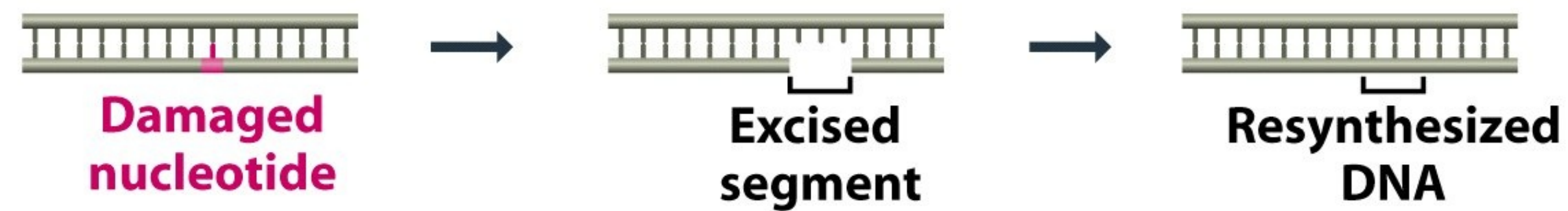


# Systemy naprawy DNA

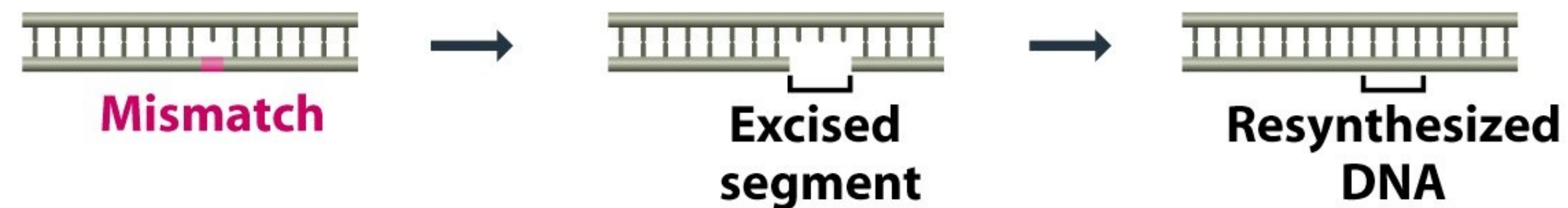
## (A) Direct repair



## (B) Excision repair



## (C) Mismatch repair



## (D) Nonhomologous end-joining



# Naprawa bezpośrednia

---

- Naprawa pęknięć jednoniciowych przez ligazę
- Odwrócenie reakcji alkilacji
  - np. MGMT (metylotransferaza O<sup>6</sup>-metyloguanino DNA) – usuwa grupy alkilowe z atomu 6 guaniny
- Fotoreaktywacja dimerów cyklobutylovych
  - fotoliza DNA
    - Występuje u mikroorganizmów i wielu zwierząt, ale brak u ssaków łożyskowych, w tym u człowieka (jej rolę przejmuje system NER – tzw. naprawa ciemna)
- Wspólna cecha – bez resyntezy DNA (udziału polimeraz)

# Naprawa przez wycinanie zasad (BER)

- Usunięcie uszkodzonej zasady azotowej przez specyficzną glikozydazę DNA
- Powstaje miejsce AP (apurynowe/ apirymidynowe) - bez zasady azotowej
- Endonukleaza AP oraz fosfodiesteraza usuwają resztkę nukleotydu
- Luka wypełniana jest przez polimerazę

## Removal of a damaged base by DNA glycosylase

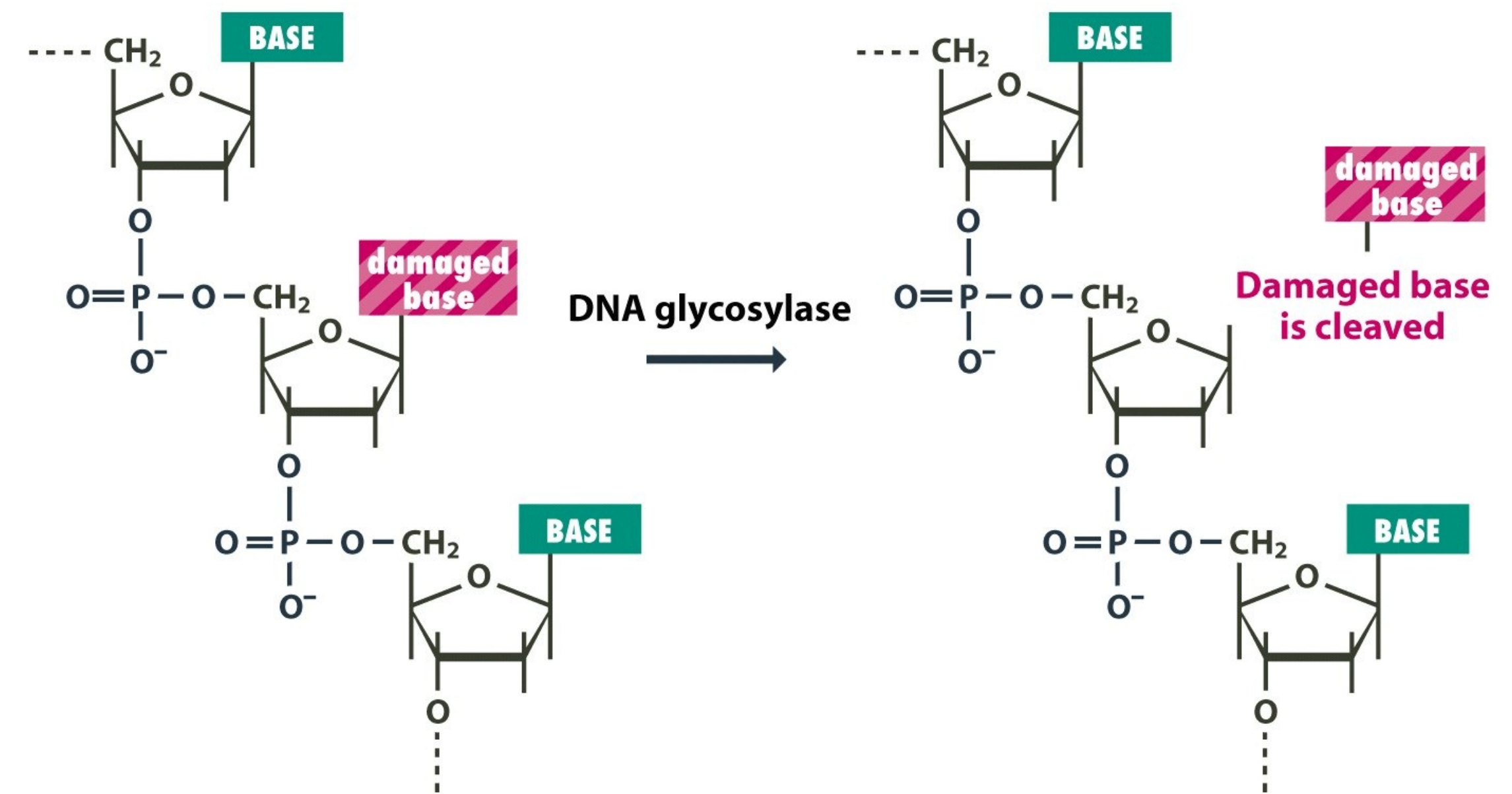


Figure 16-22a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## Outline of the pathway

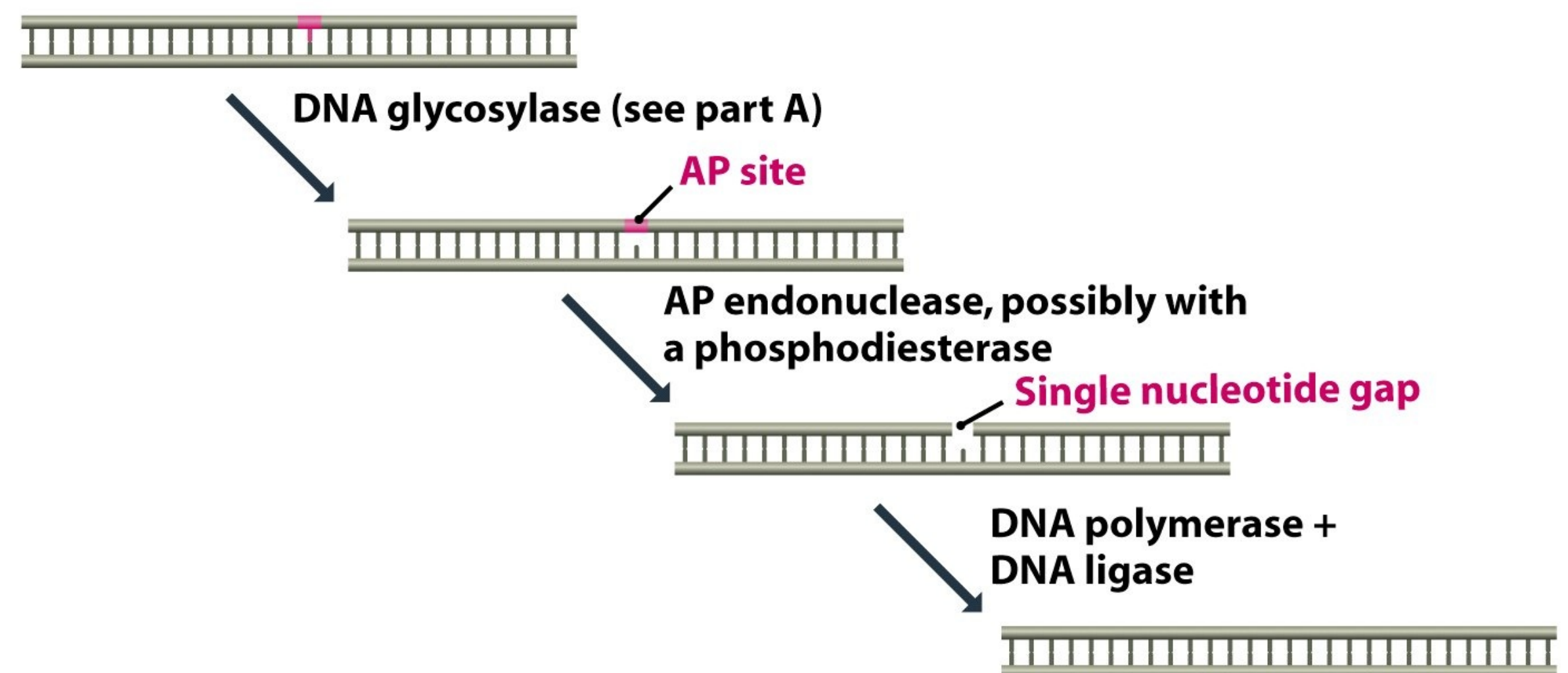


Figure 16-22b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

## Glikozydazy – przykłady (ssaki)

---

Glikozydaza DNA	Specyficzność
MBD4	Uracyl
MPG	Etenoadenina, hipoksantyna, 3-metyloadenina
NTH1	Glikol cytozynowy, dihydrouracyl, formamidopirymidyna, glikol tyminowy
OGG1	Formamidopirymidyna, 8-oksoguanina
SMUG1	Uracyl
TDG	Etenocytozyna, uracyl
UNG	Uracyl, 5-hydroksyuracyl

Tabela jest tylko przykładem – nie uczyć się na pamięć!

# Naprawa przez wycinanie nukleotydów (NER)

- Uszkodzenia zaburzające strukturę podwójnej helisy
- U bakterii dwa systemy
  - krótkich łań (wycinane ~12 nt)
  - długich łań (wycinane ~ 2 kb)
- U Eukaryota
  - wycinane ~25-30 nt

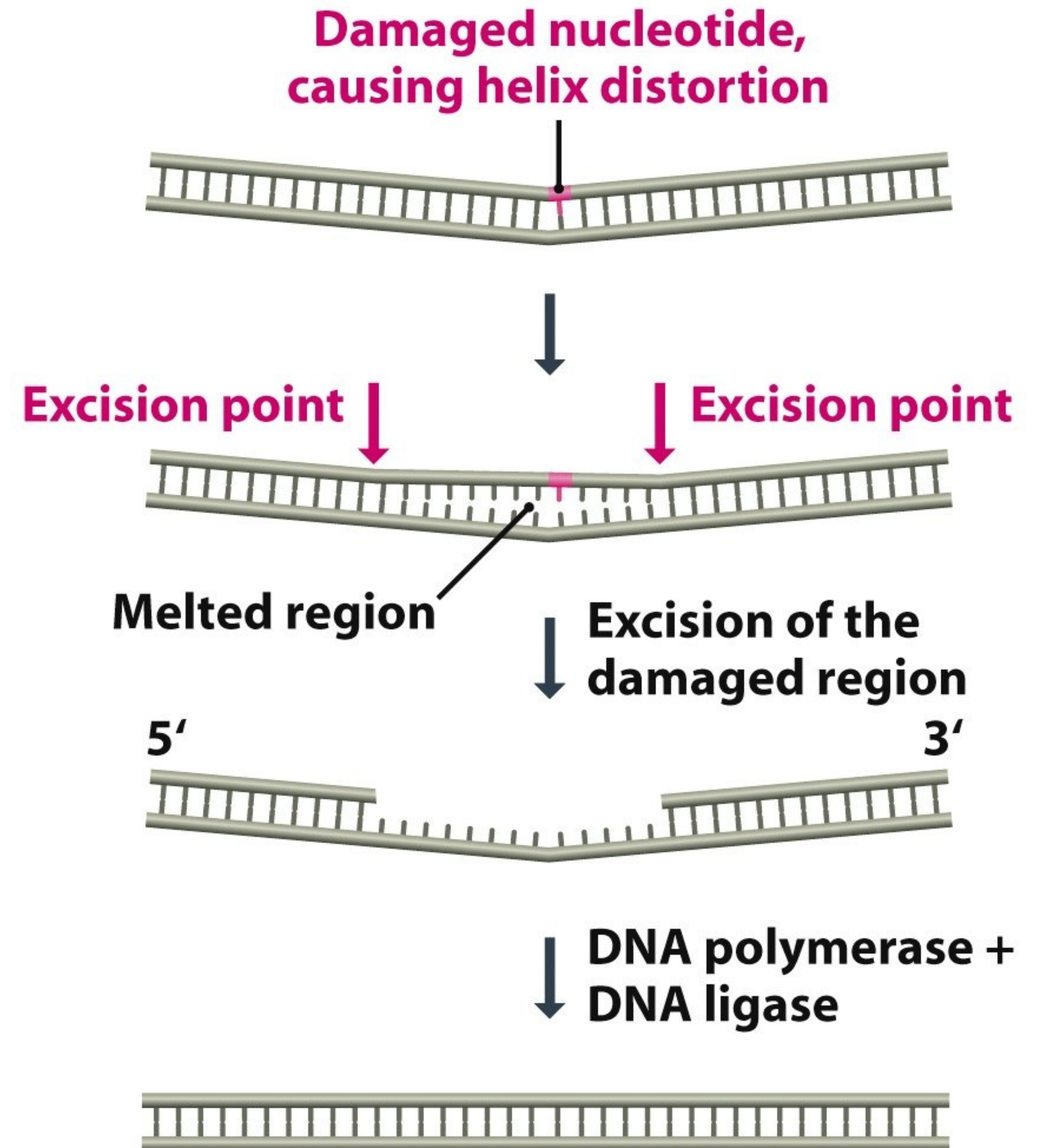


Figure 16-24 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Rodzaje NER u Eukaryota

---

- Globalna genomowa NER (GG-NER)
  - rozpoznawane i naprawiane uszkodzenia w obszarach nietranskrybowanych i transkrybowanych
  - uszkodzenia rozpoznawane przez białka DDB (*DNA-damage binding*) i XPC-RAD23B
- NER sprzężona z transkrypcją (TC-NER)
  - naprawa w obszarach transkrybowanych jest szybsza i wydajniejsza, niż w nieaktywnych
  - wykrywane zatrzymanie transkrypcji w miejscu uszkodzenia
  - TFIIH uczestniczy w rozpoznaniu uszkodzenia i nacięciu DNA

# Xeroderma pigmentosum

---

- Skóra pergaminowata i barwnikowa
- Choroba autosomalna recesywna związana z mutacjami genów kodujących białka systemu NER (8 grup complementacji)
- Około 1:1 000 000 (USA, Europa) do 1:250 000
- Defekt GG-NER
- U człowieka to NER odpowiada za naprawę fotoproduktów
- Działanie światła słonecznego wywołuje liczne przebarwienia i nowotwory skóry (ryzyko wzrasta do 10 000 razy)
- Nie ma lekarstwa – pacjenci muszą całkowicie unikać światła słonecznego



# Zespół Cockayne'a

---

- Defekt naprawy TC-NER
- Mutacje genów ERCC6 i ERCC8
- Choroba autosomalna recesywna, częstość ~1:200 000
- zahamowanie wzrostu
- niepełnosprawność intelektualna, małogłowie
- progeria
- Inna choroba związana z defektem TC-NER: trichotiodystrofia (~1:1 000 000)





# Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)

---

- W odróżnieniu od DR, BER i NER nie dotyczy uszkodzeń w DNA, tylko błędów replikacji – wstawionych niewłaściwych nukleotydów (np. błędy wynikające z tautomerii zasad)
- Rozpoznawane zaburzenie podwójnej helisy, błędny nukleotyd wraz z otoczeniem (nawet do 1 kb) usuwany, po czym polimeraza uzupełnia lukę
- Problem: jak rozpoznać, która nić jest rodzicielska (i ma właściwy nukleotyd), a która potomna (z błędem)

# Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)

- U bakterii nić rodzicielska jest metylowana
- U Eukaryota metylacja też może mieć znaczenie (u ssaków, u drożdży już nie), ale są inne mechanizmy (sprzężenie z replikacją, białka naznaczające nić rodzicielską)

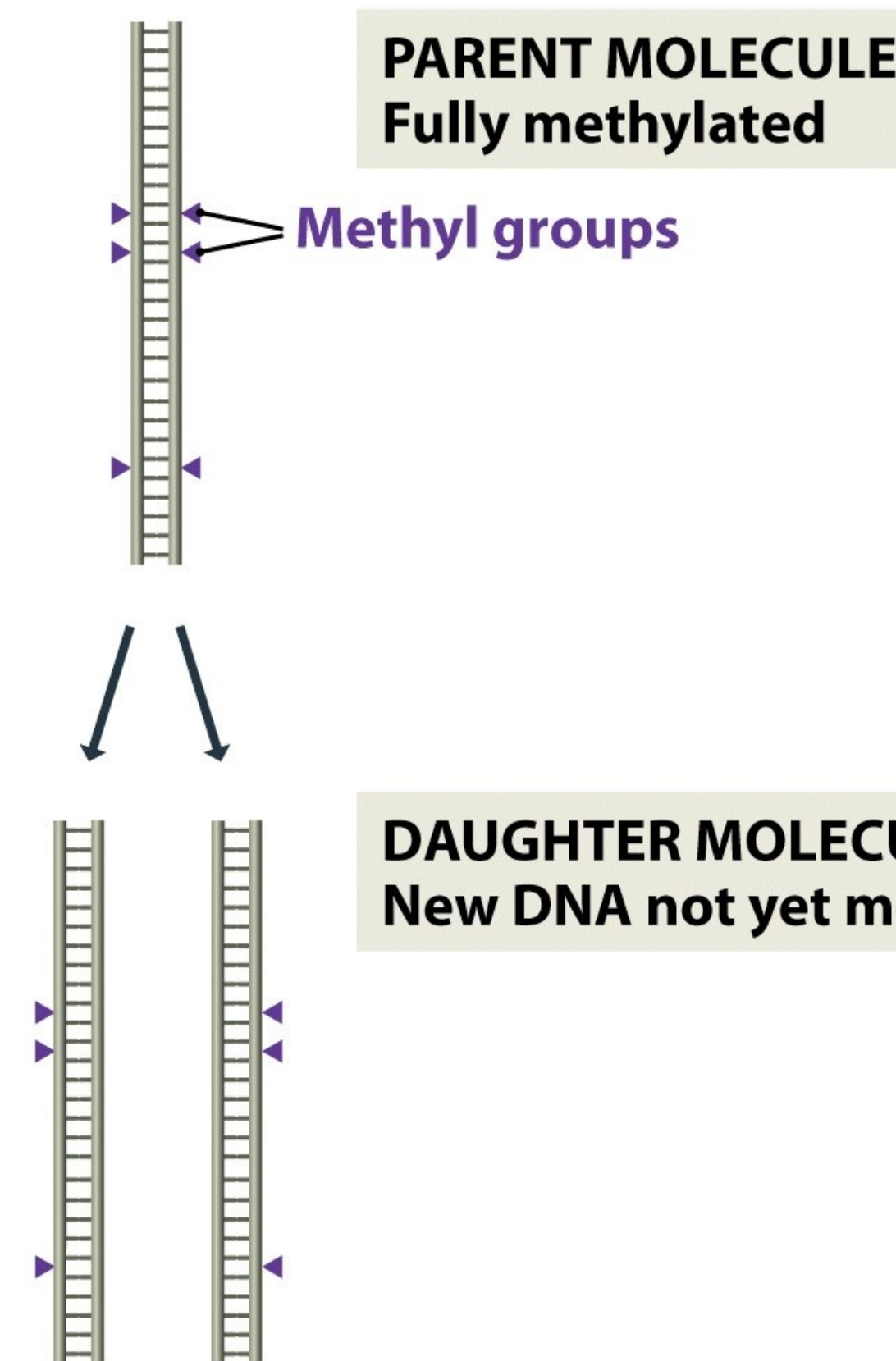


Figure 16-25 part 1 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

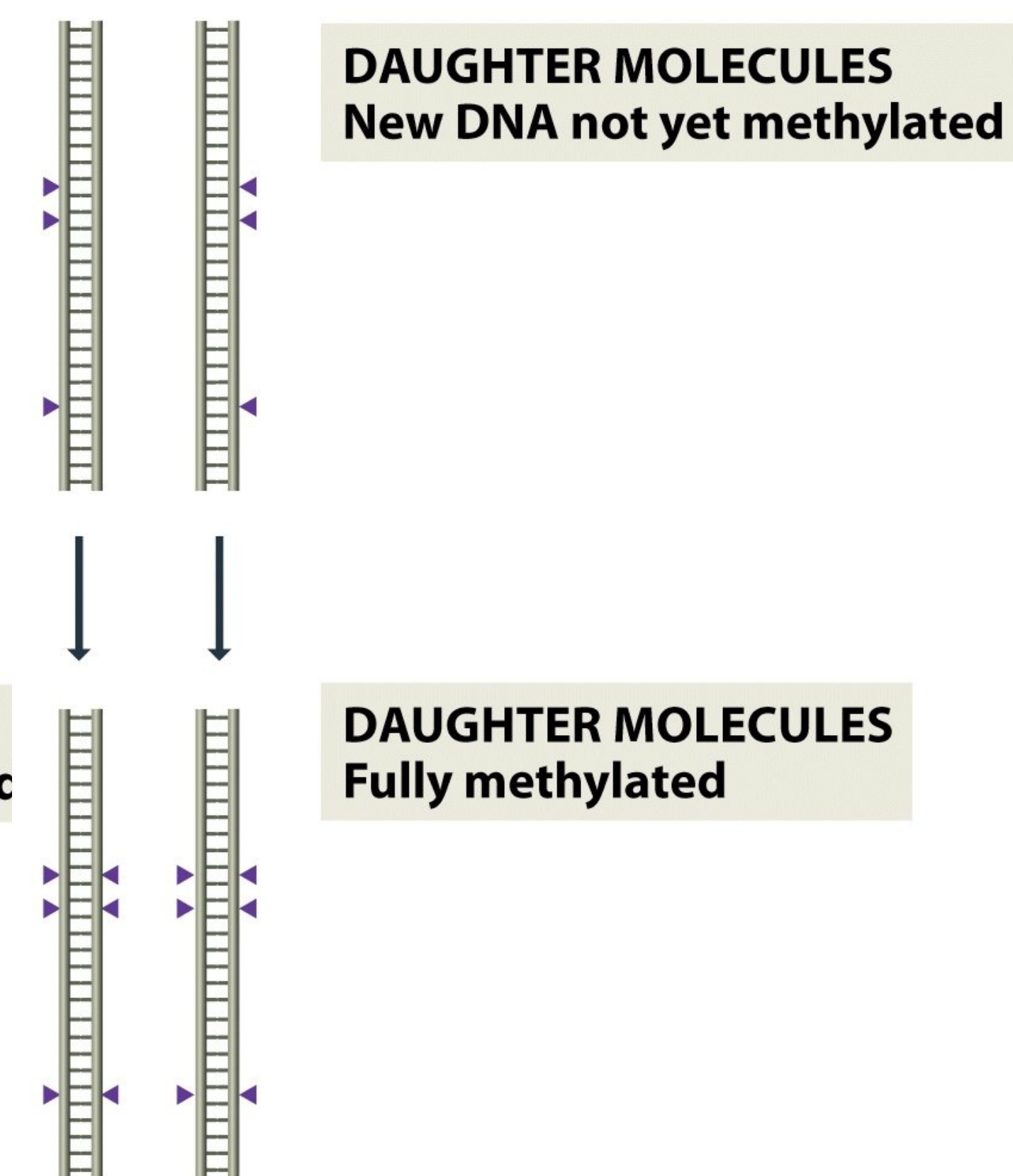
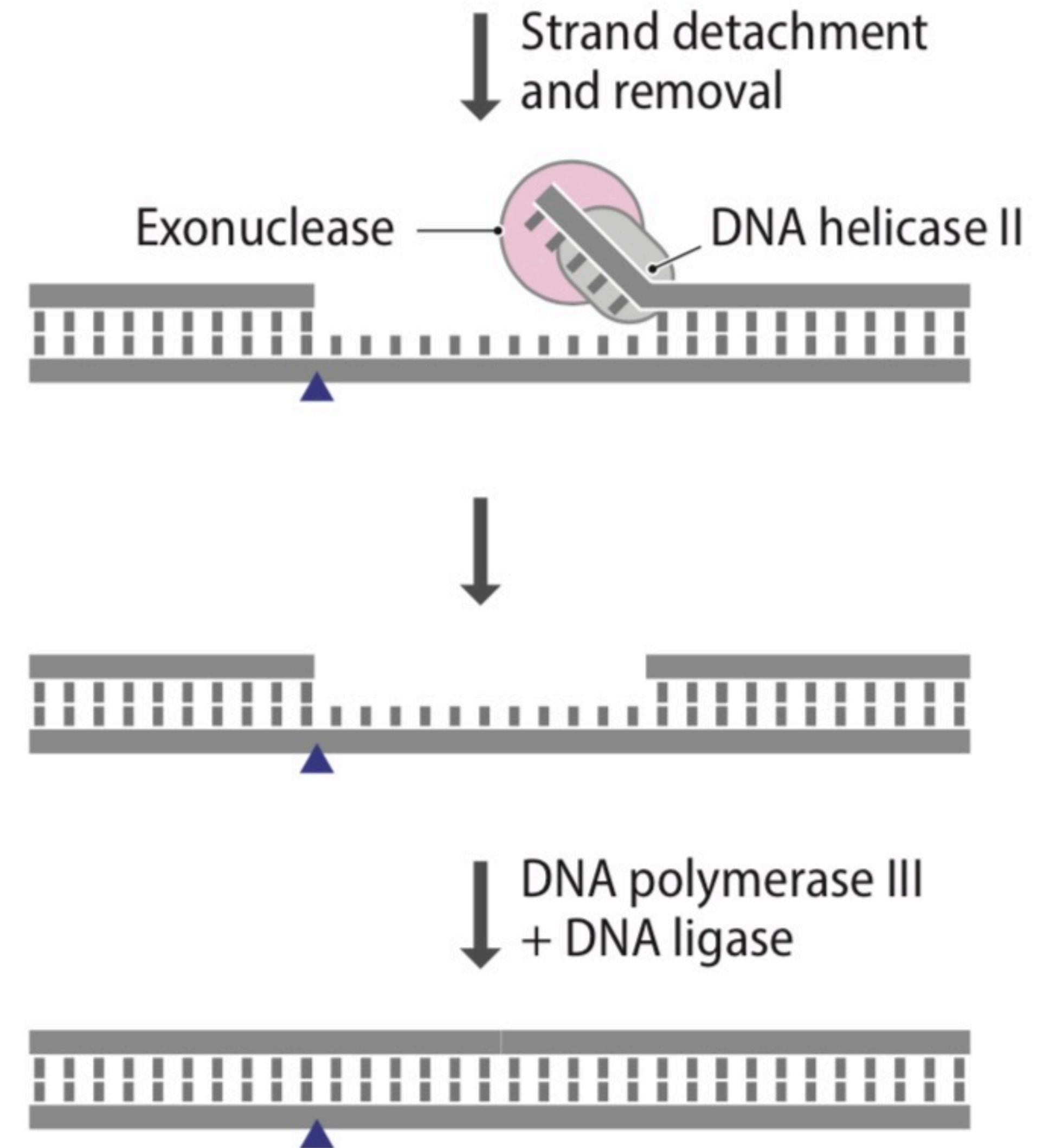
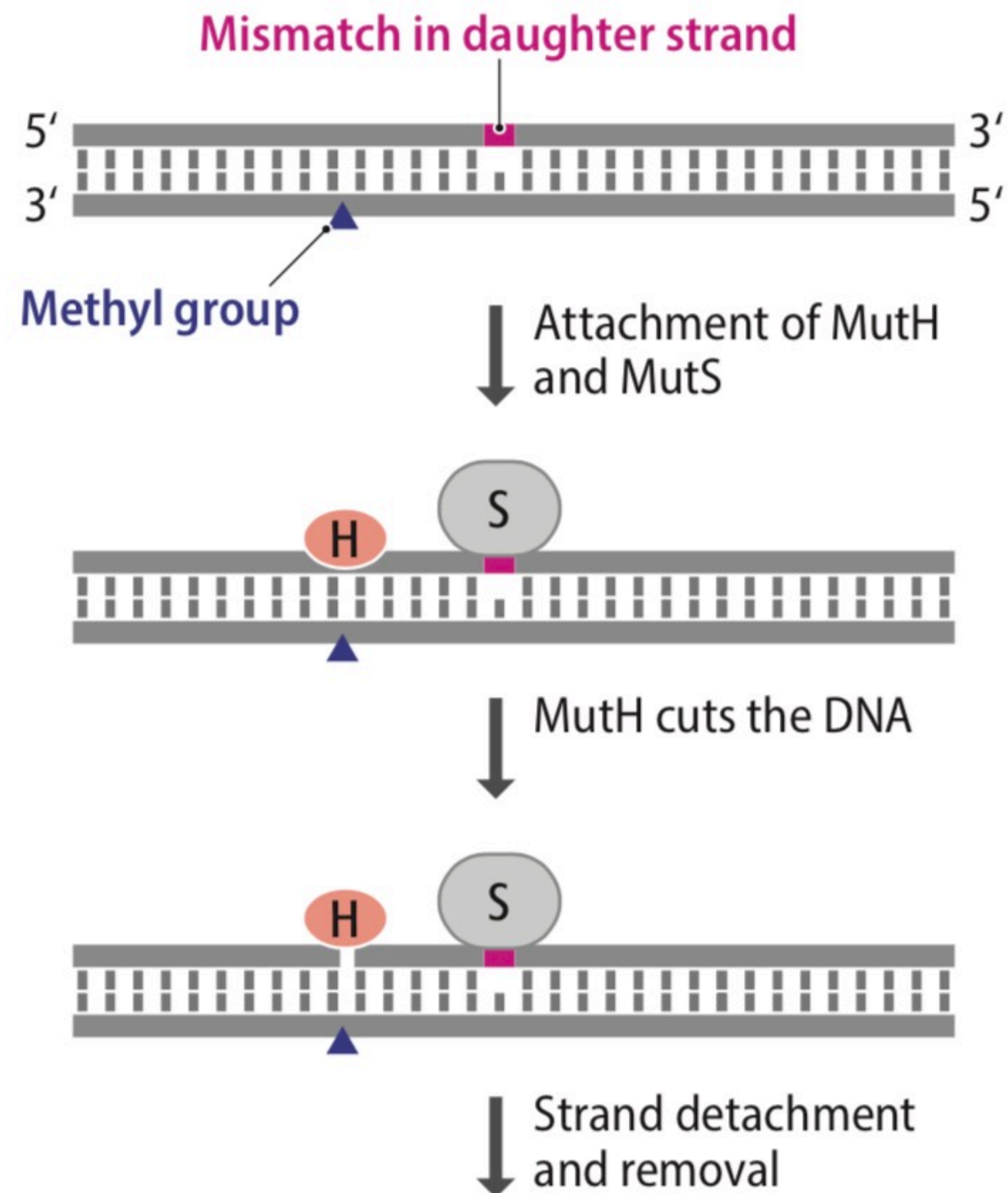


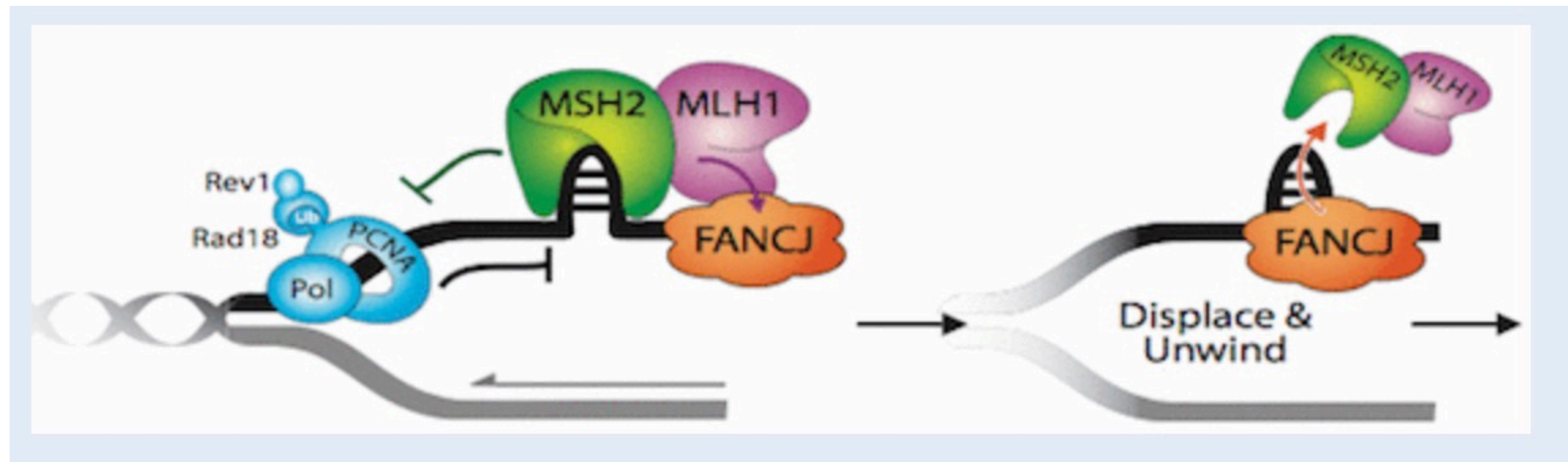
Figure 16-25 part 2 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)



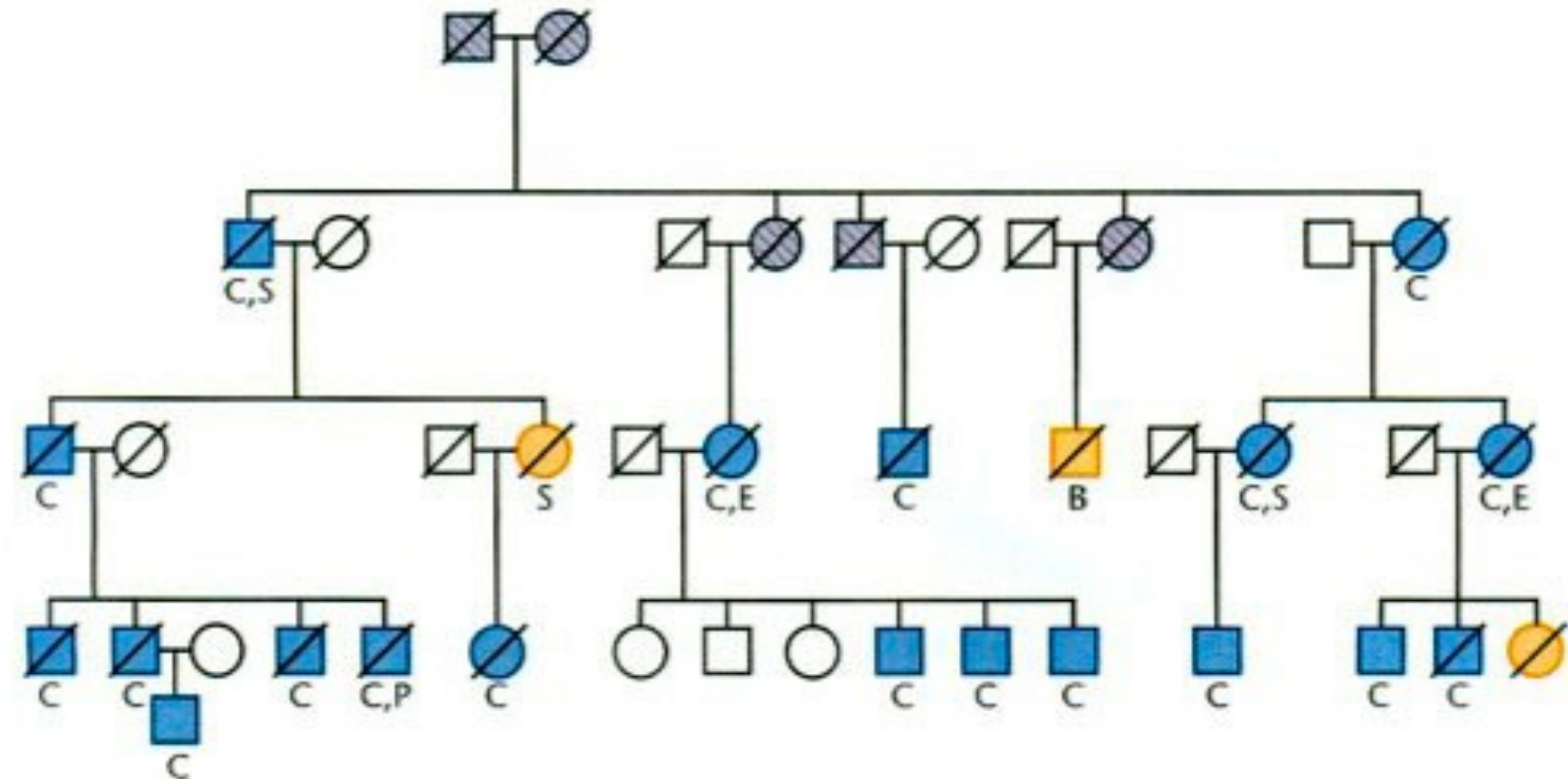
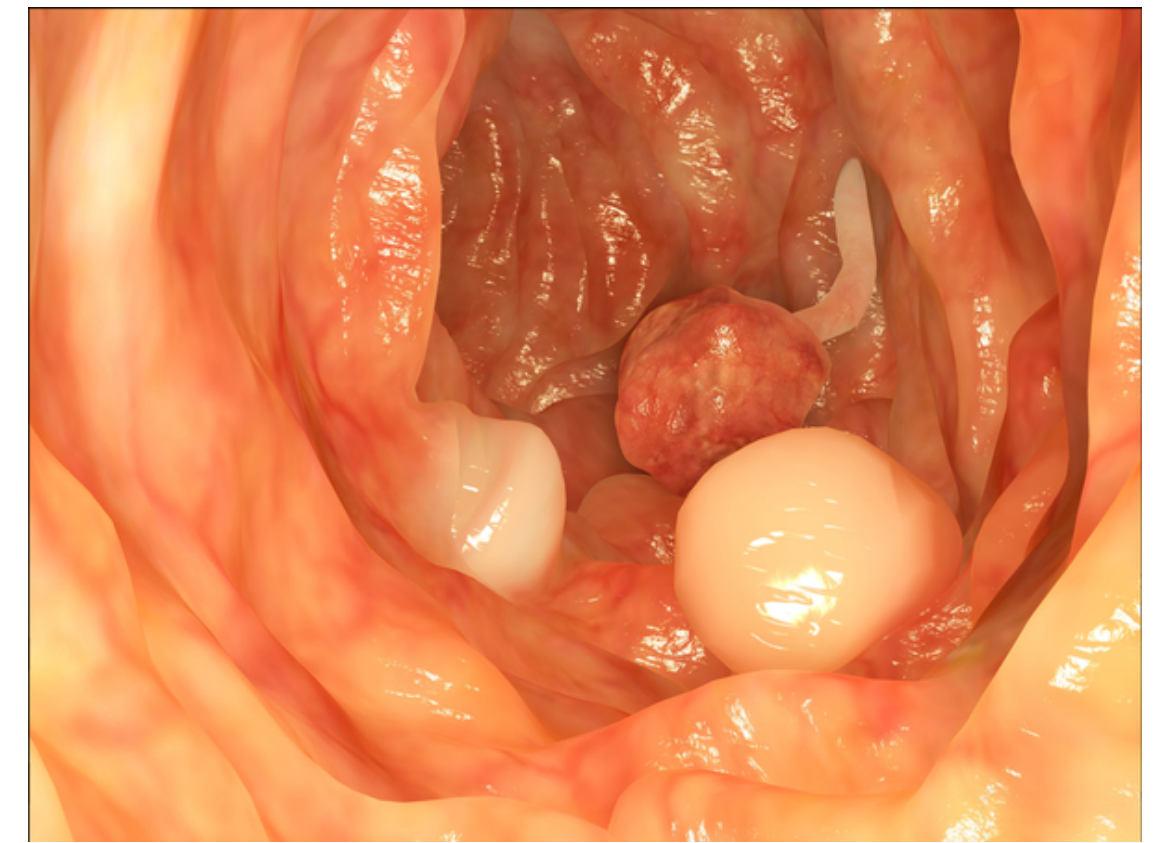
# MMR i wiązania krzyżowe wewnątrz DNA

- Białka szlaku MMR biorą też udział w naprawie wiązań krzyżowych w DNA (wiązań kowalencyjnych w obrębie tej samej nici)
- Defekt - niedokrwistość Fanconiego



# HNPPCC

- Dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością (HNPPCC), zespół Lyncha
- 5% wszystkich raków jelita grubego
- Mutacje utraty funkcji różnych genów (6) związanych z naprawą DNA, najczęściej systemem MMR



## Nobel 2015 (chemia)

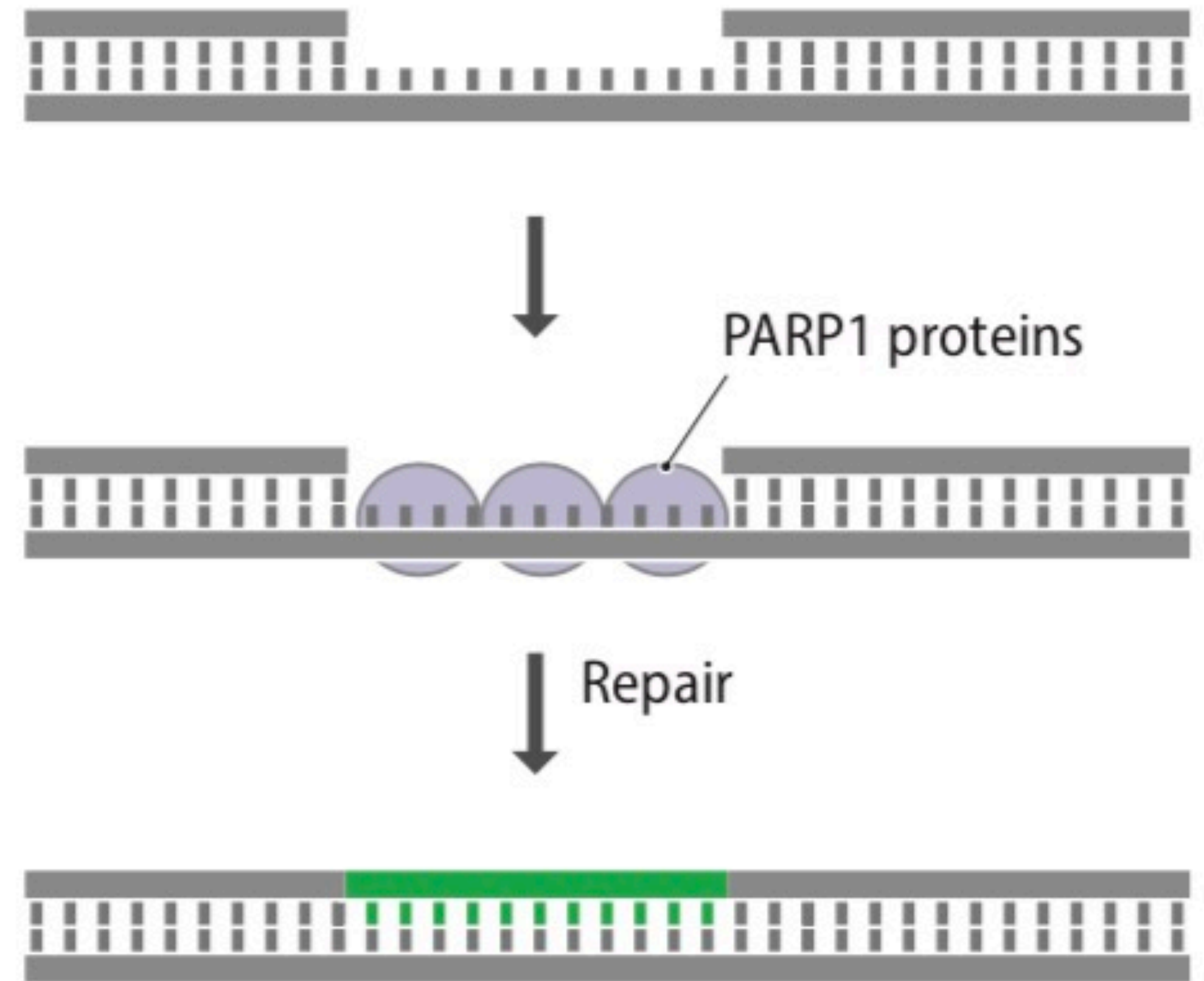
---

- Tomas Lindahl, za opisanie mechanizmu BER
- Aziz Sanjar, za opisanie mechanizmu NER
- Paul Modrich, za opisanie mechanizmu MMR



# Naprawa pęknięć DNA

- Pęknięcia w jednej nici są łatwe do naprawienia: polimeraza + ligaza. Białka PARP chronią jednoniciowe fragmenty przed dalszą degradacją
- Pęknięcia dwuniciowe są trudniejsze do naprawienia
  - Powstają np. w wyniku działania promieniowania jonizującego
  - Blokują replikację, nienaprawione mogą doprowadzić do utraty dużych fragmentów chromosomu podczas podziału



**Figure 16.19** Single-strand break repair.

# Naprawa pęknięć dwuniciowych

---

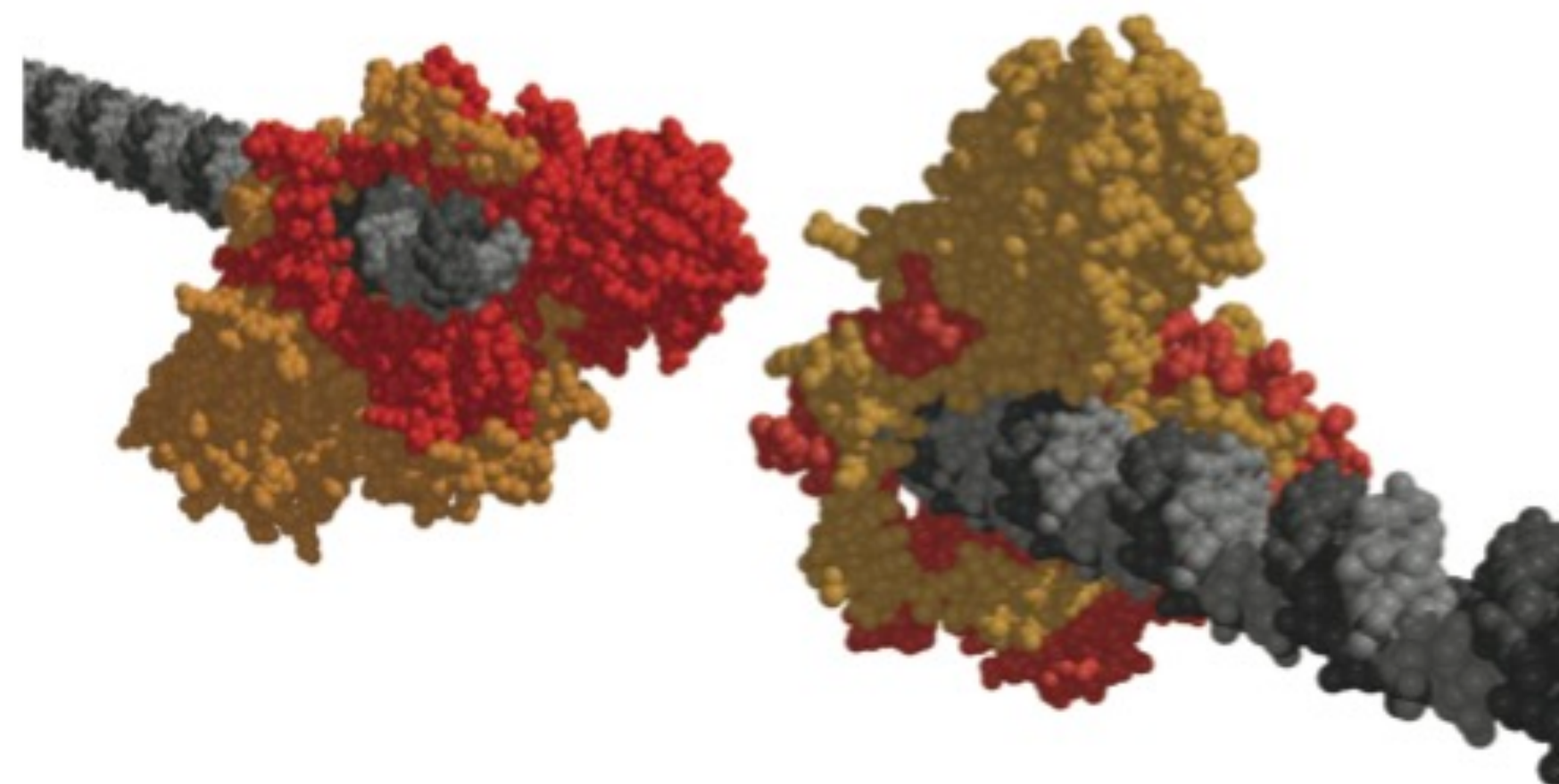
- DSBR (*double-strand break repair*)
- Dwa mechanizmy:
  - Rekombinacja homologiczna. Główny mechanizm naprawy DSB u bakterii i niższych eukariontów
  - Łączenie końców niehomologicznych. Częste u wielokomórkowych eukariontów, ale spotykane też w innych organizmach



# Łączenie końców niehomologicznych

- Non-homologous end joining (NHEJ)
- Występuje u Eukaryota, uproszczony wariant też u bakterii
- Nie wszystkie organizmy eukariotyczne mają kompletny (z DNA-PK) system NHEJ, co wiąże się z różną stabilnością genomu

(B) Ku proteins bound to DNA



## The nonhomologous end-joining repair process

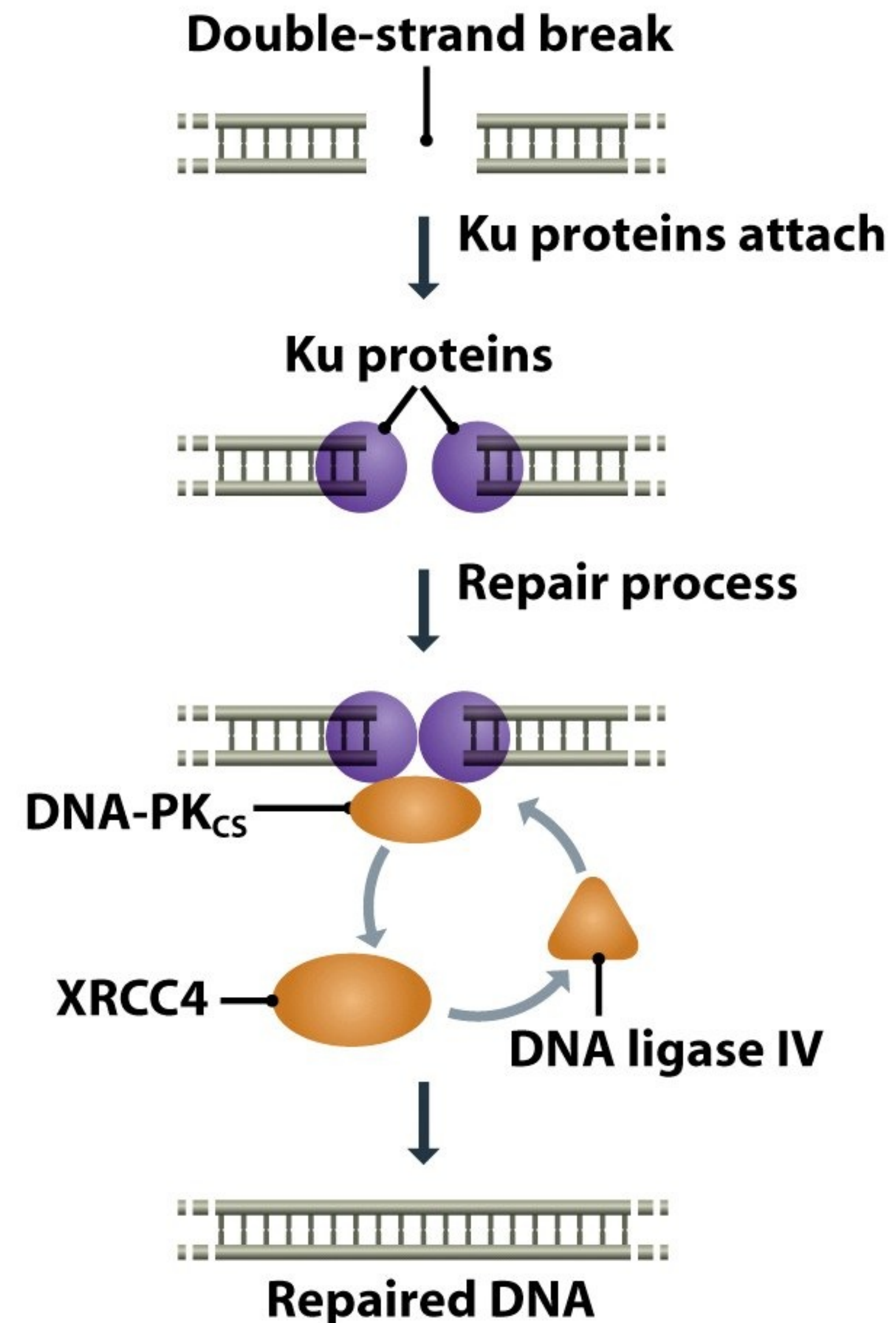


Figure 16-28a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Rekombinacja

# Literatura

---

- Brown, rozdział 17
- Allison, rozdział 7

# Rekombinacja

---

- Procesy pęknięcia i ponownego łączenia łańcuchów nukleotydowych
  - Opisana w związku z *crossing-over*
  - Pierwotna funkcja – **naprawa** pęknięć nici po replikacji, odblokowywanie widełek replikacyjnych
  - *Crossing-over* utrzymuje eukariotyczne chromosomy homologiczne razem – ułatwia segregację
  - Bardzo ważna funkcja dla zapewnienia ewolucyjnej dynamiki genomu w procesach płciowych (wtórna)

# Rekombinacja a płęć

---

- Rekombinacja (*crossing-over*) jest waźna dla procesów płciowych
- Ale nie jest to jej pierwotna funkcja
- Mechanizm starszy i bardziej rozpowszechniony, niź płęć
- Pierwotna i głuwna funkcja - DSBR

# Rekombinacja homologiczna

- Rekombinacja homologiczna (ogólna)
  - zachodzi między fragmentami DNA o znacznej homologii
  - pomiędzy dwiema cząsteczkami lub w obrębie jednej
  - crossing-over, naprawa DNA

## Homologous recombination

### Between different molecules

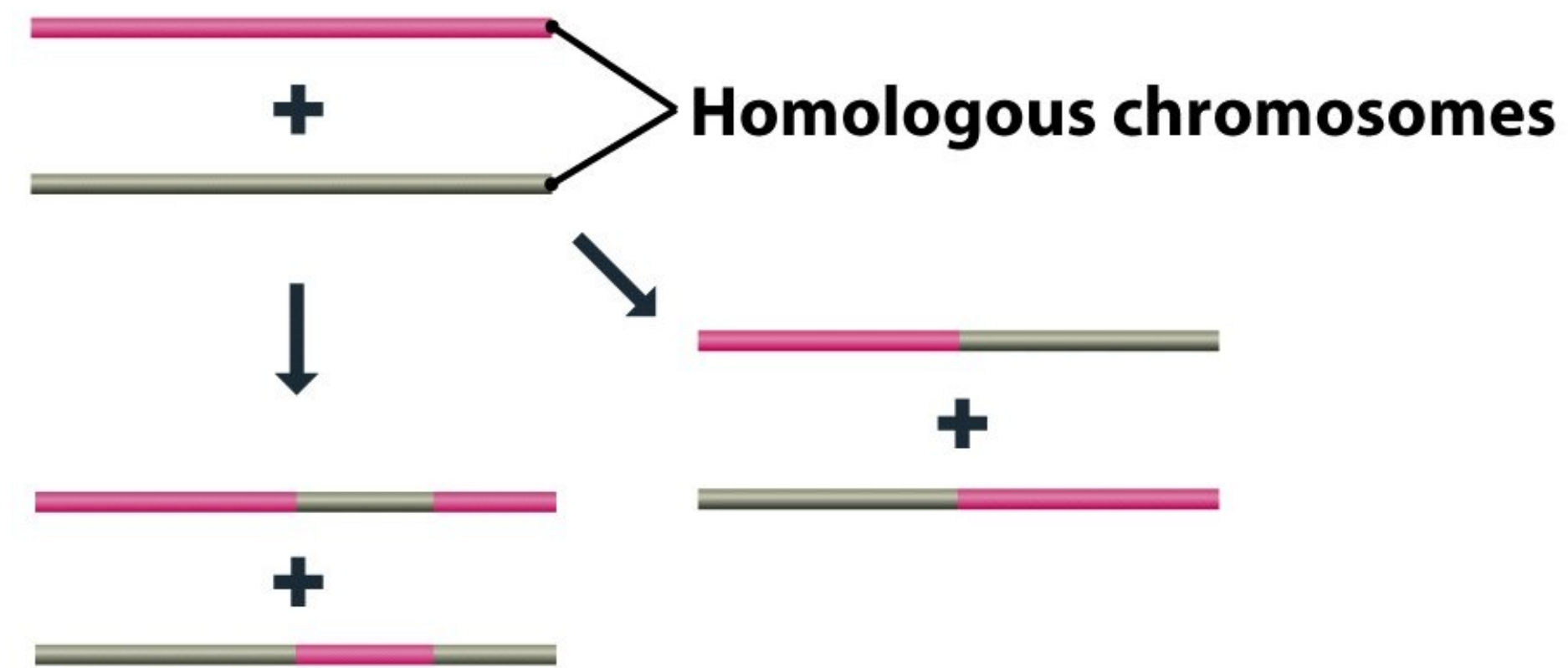
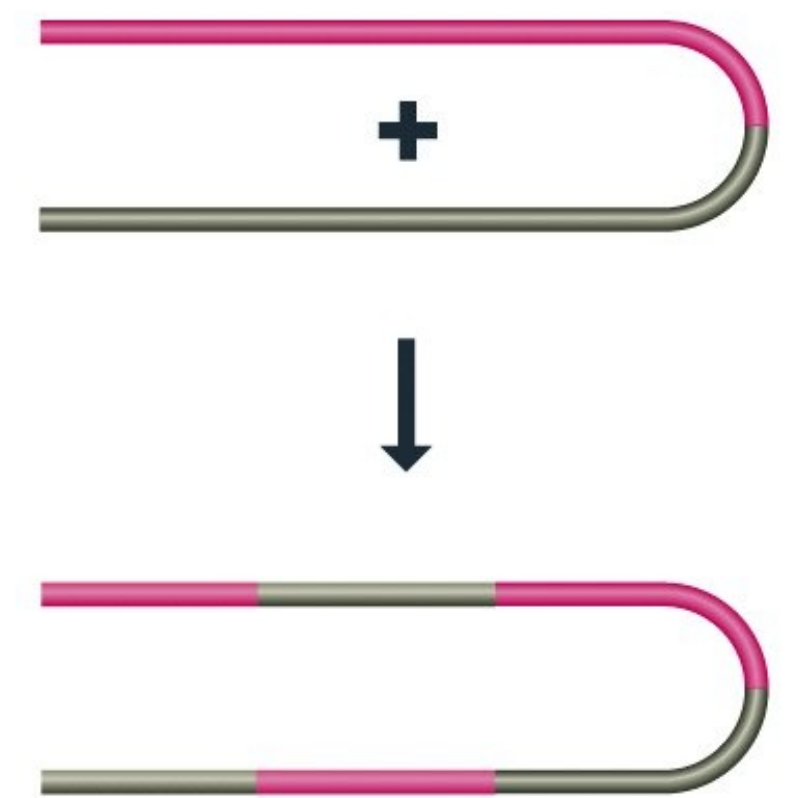


Figure 17-1a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

### Within a single molecule



# Rekombinacja umiejscowiona

- Zachodzi między cząsteczkami mającymi jedynie krótki obszar homologii
- Regulowana przez specyficzne enzymy
- Np. integracja genomów fagowych

## Site-specific recombination

**Short region of homology**

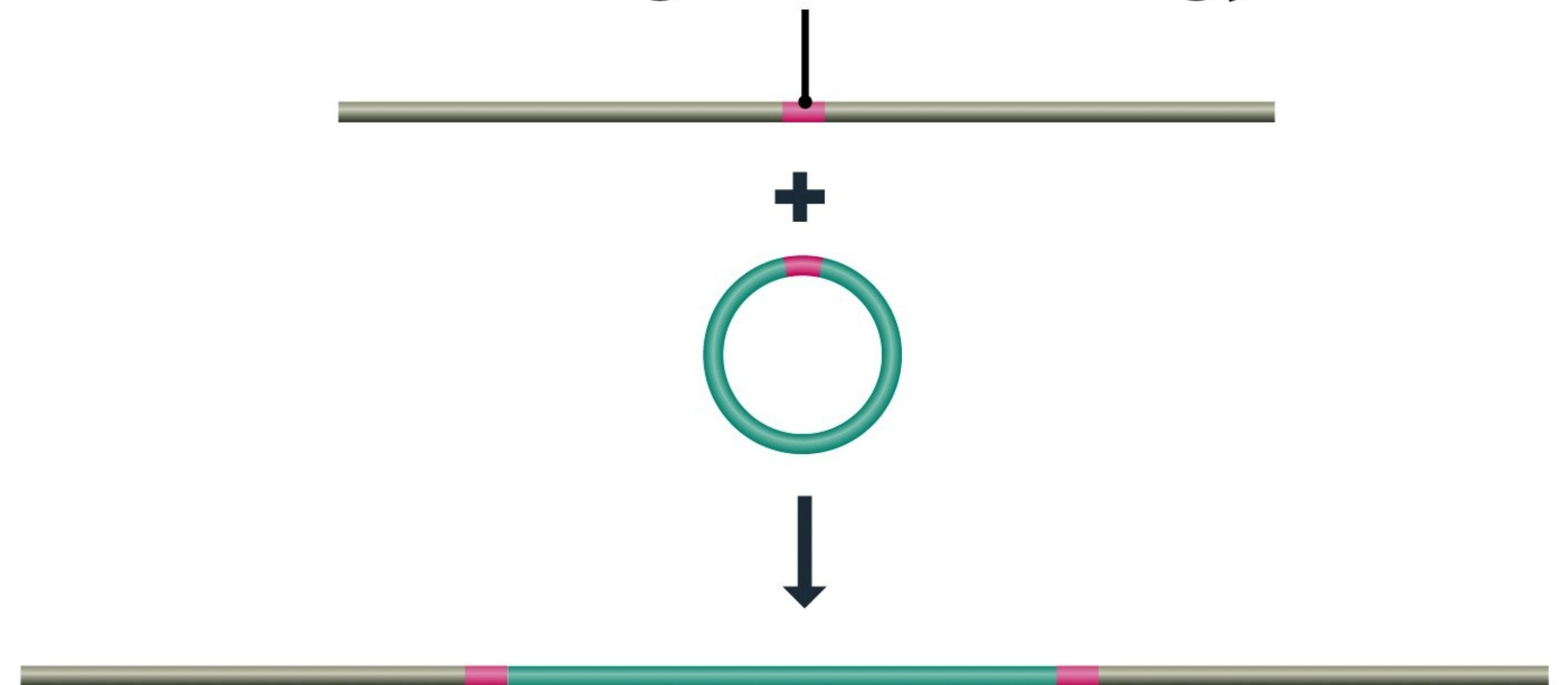


Figure 17-1b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Rekombinacja umiejscowiona

---

- Przykłady
  - Integracja faga (np.  $\lambda$ ) do genomu
  - Wykorzystywana przez ruchome elementy genetyczne (transpozony, wirusy, niektóre introny)
  - Specyficzne enzymy – rekombinazy (np. integraza  $\lambda$ ) o aktywności endonukleaz
  - Wykorzystywana w inżynierii genetycznej (system rekombinazy Cre, sekwencje Lox)
    - Delecje warunkowe
    - Usuwanie markerów selekcyjnych



# Modele rekombinacji homologicznej

- Holliday
- Meselson-Radding

## The Meselson-Radding modification

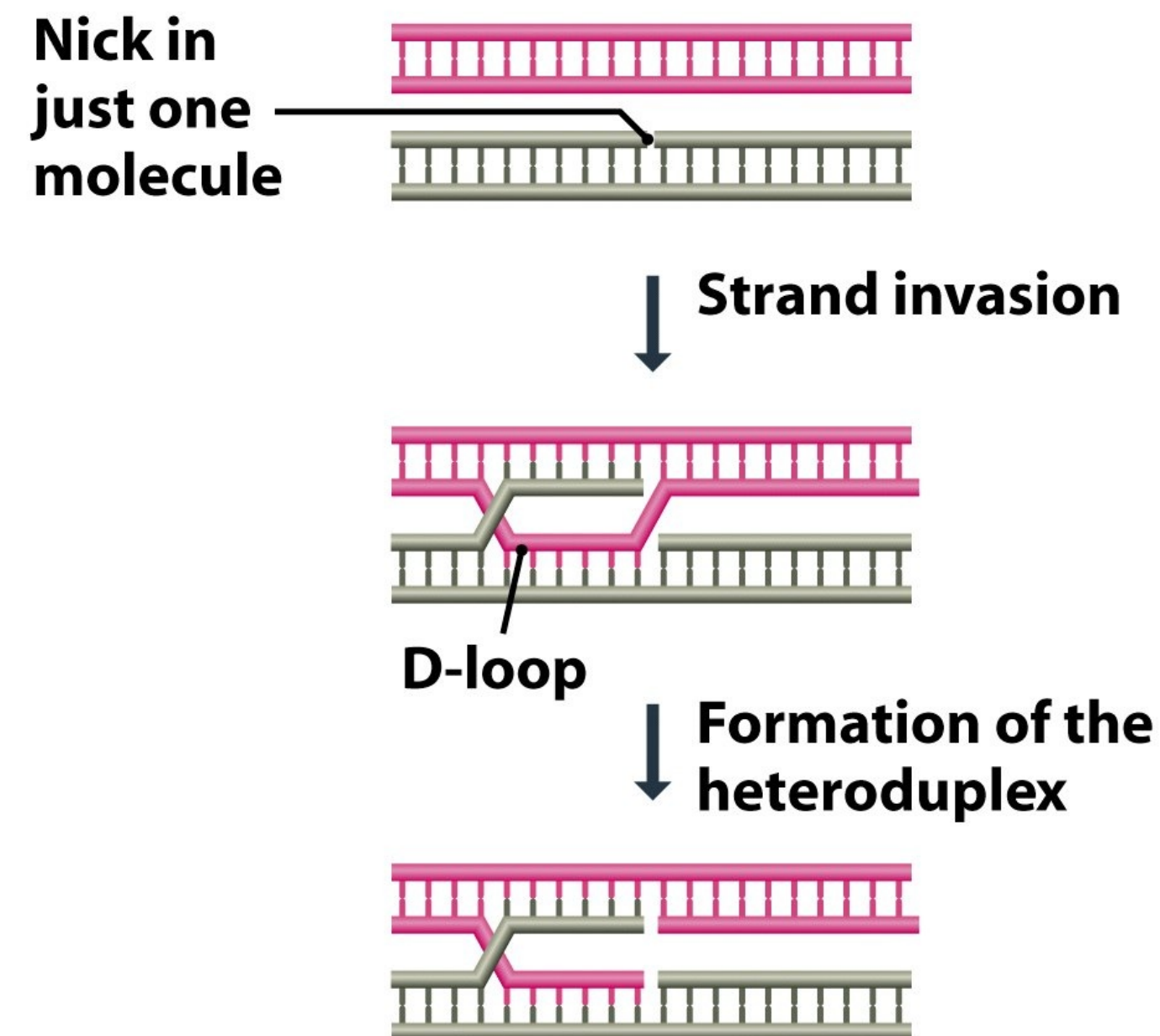


Figure 17-3b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

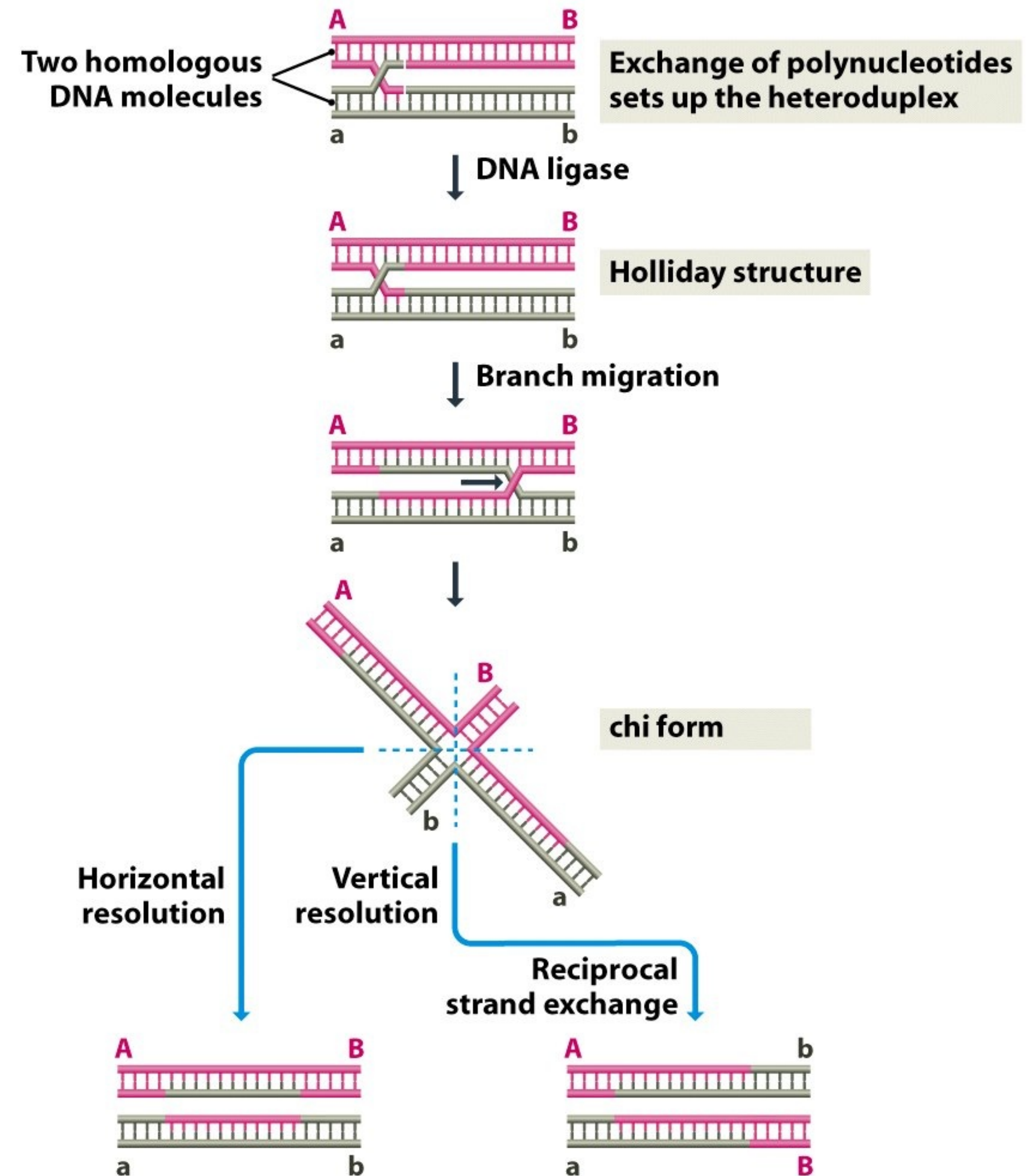


Figure 17-2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Konwersja genu

- Zmiana allelu w trakcie mejozy.
- Zmienia rozkład w krzyżówce z 2:2 na 3:1.
- Nie da się wyjaśnić w modelu Hollidaya.

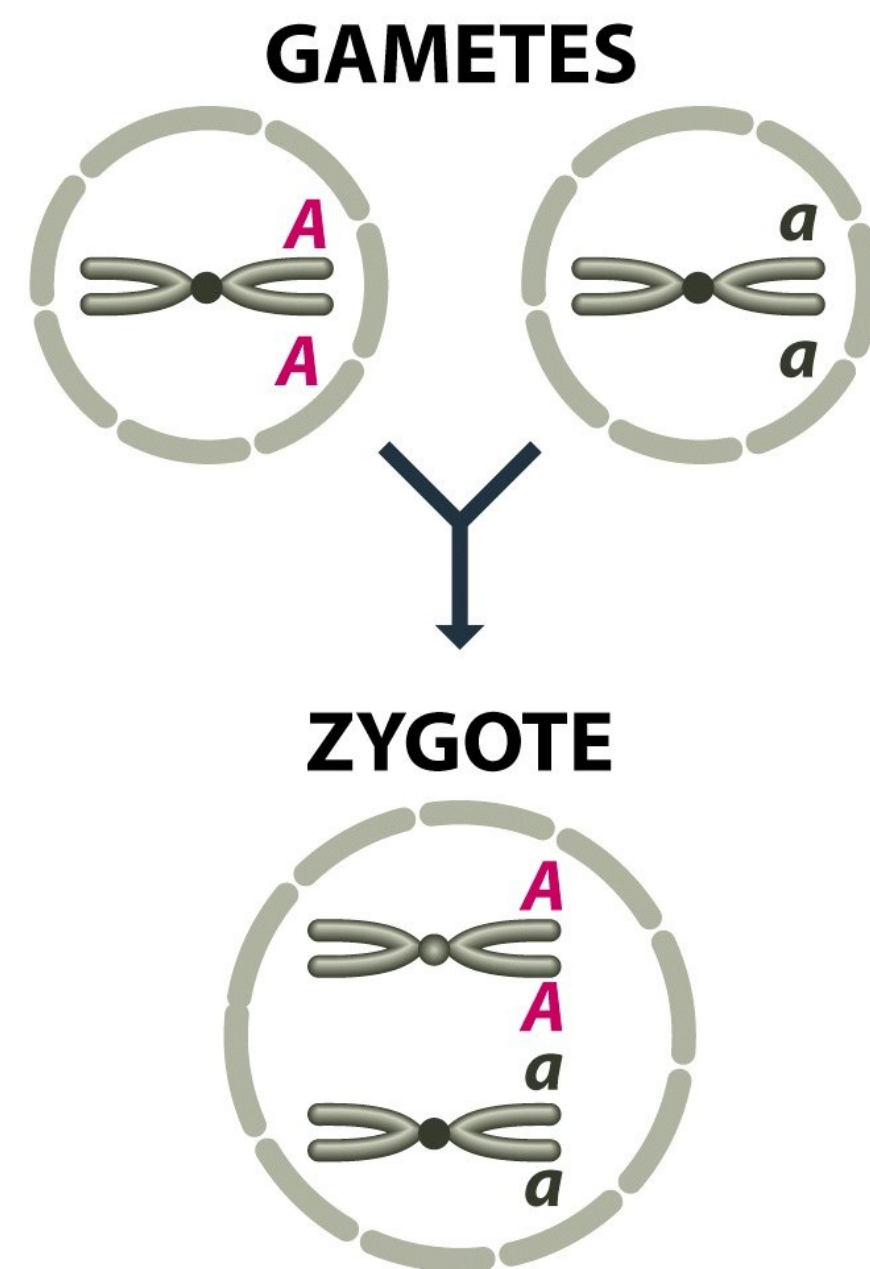


Figure 17-4 part 1 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

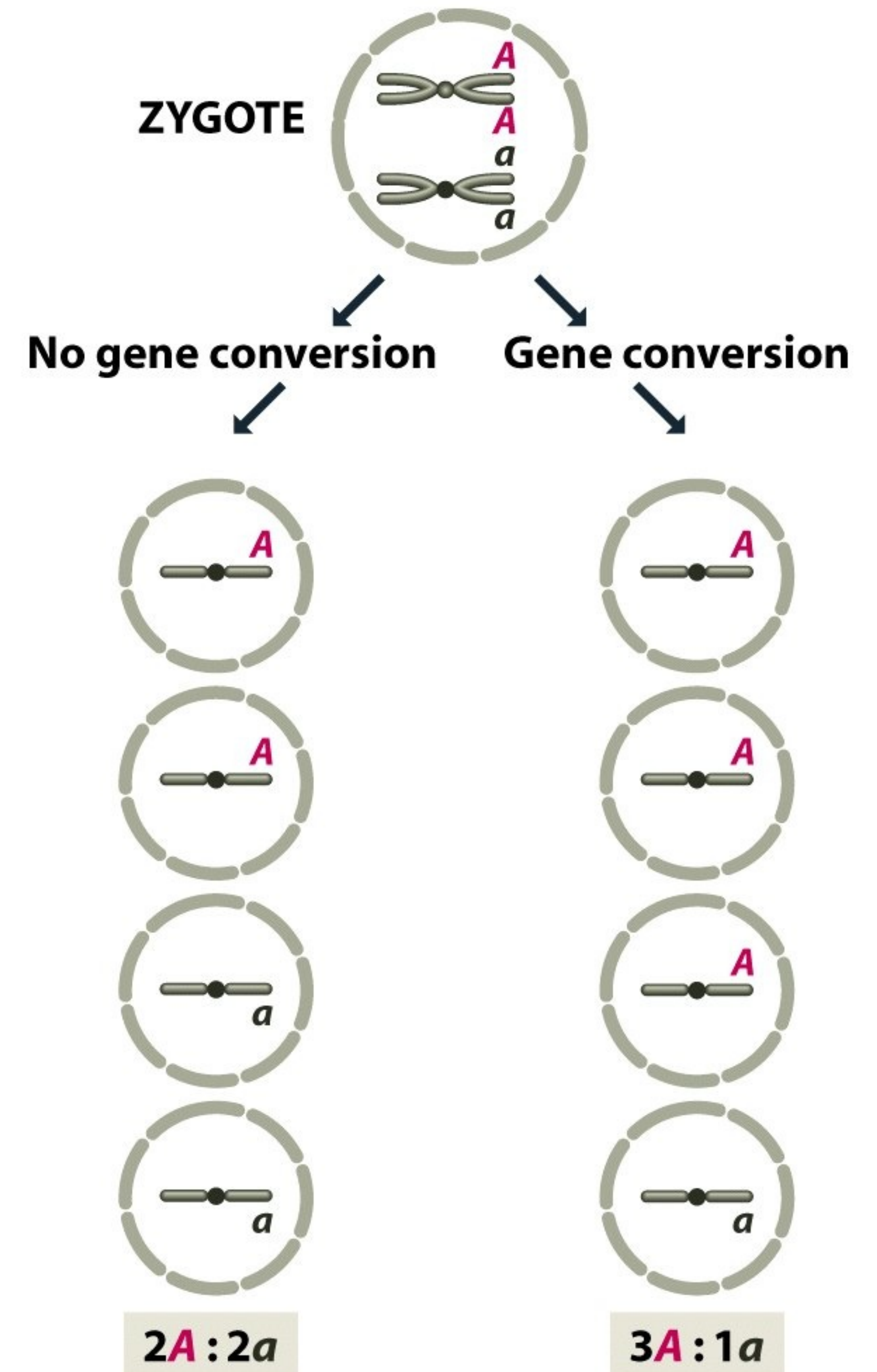
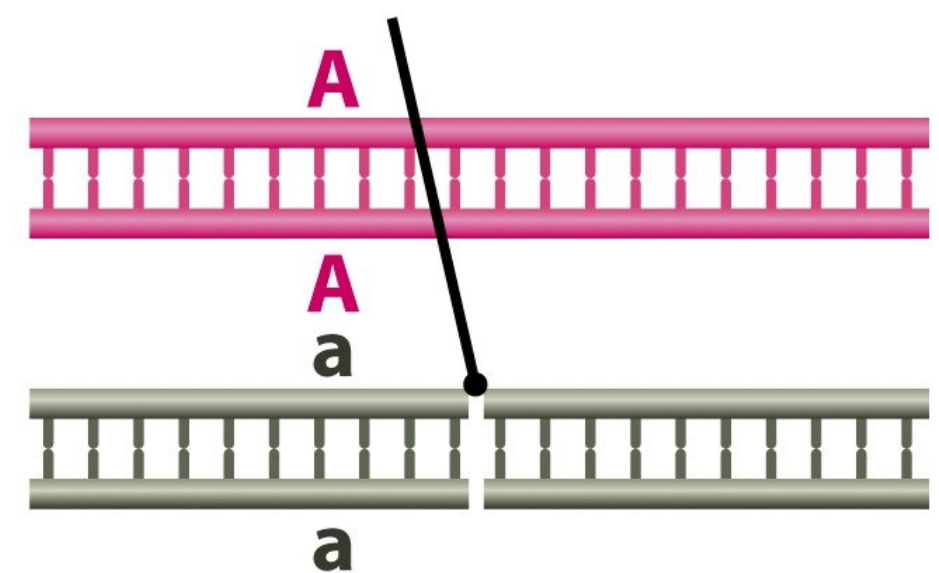


Figure 17-4 part 2 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Model pęknięć dwuniciowych

## Double-strand cut



Exonuclease trims the cut strands

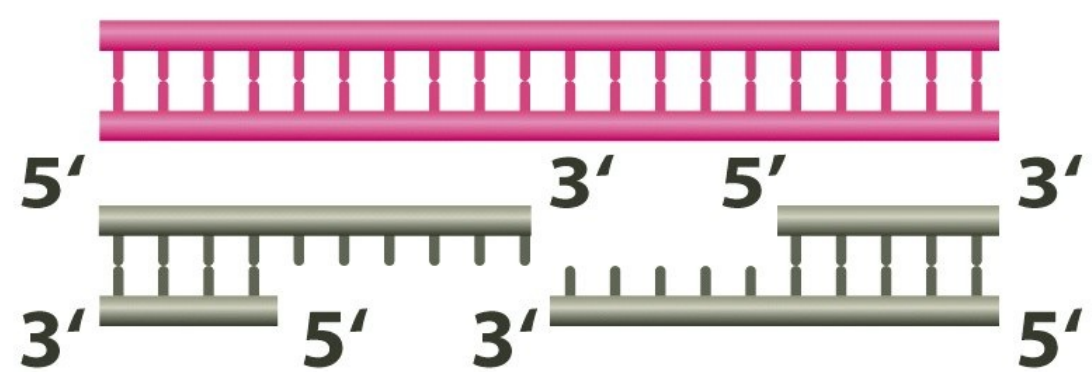
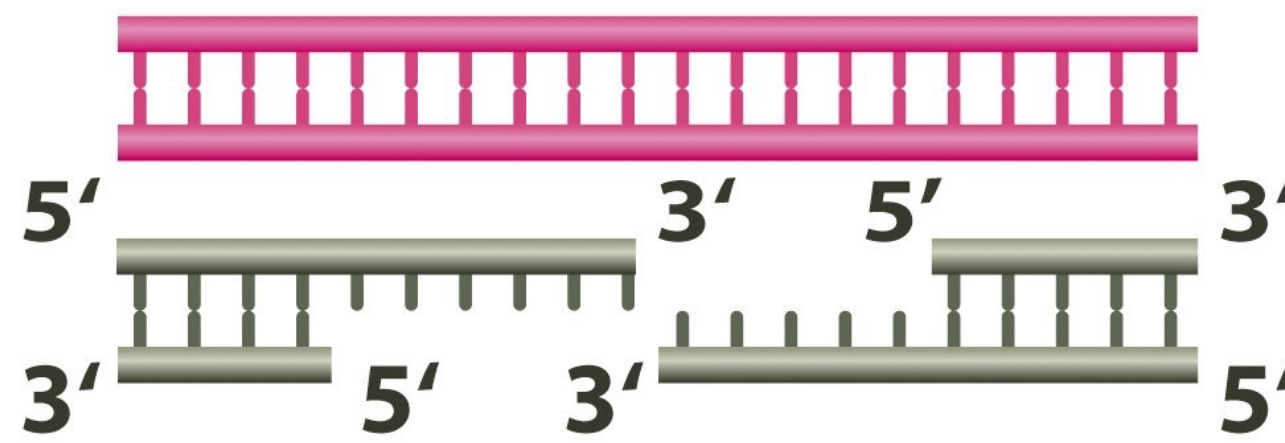


Figure 17-5 part 1 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



Strand invasion

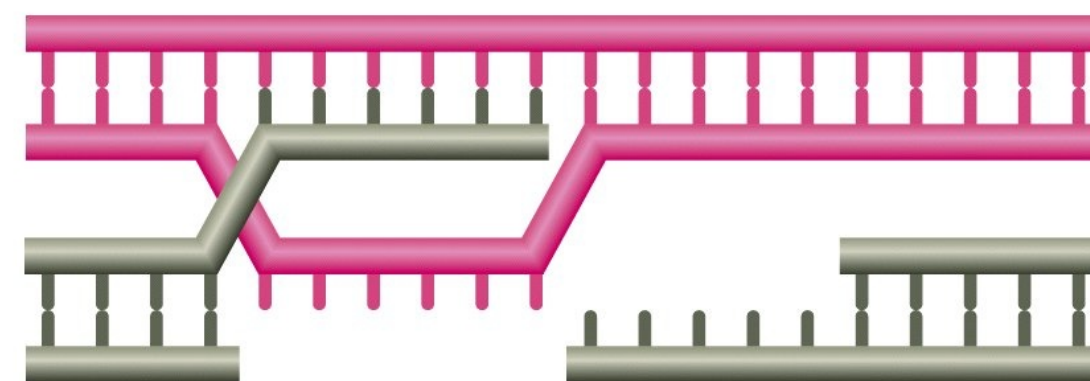
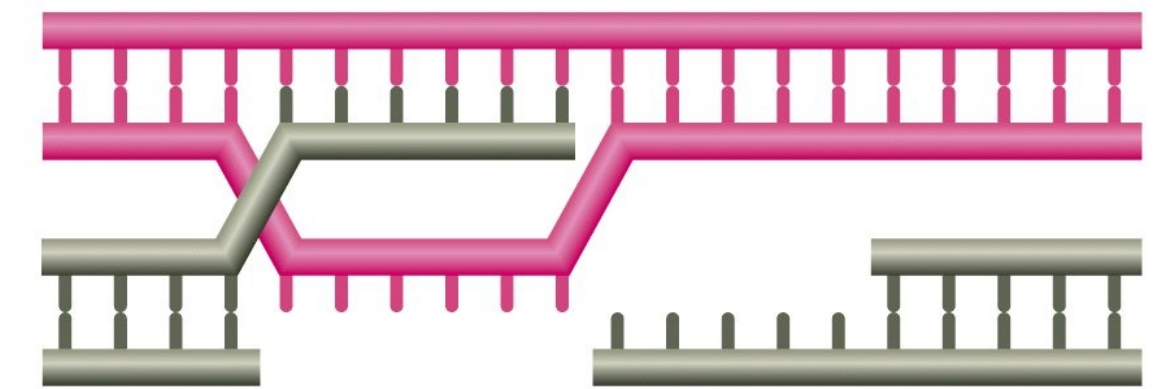


Figure 17-5 part 2 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



Strand extension

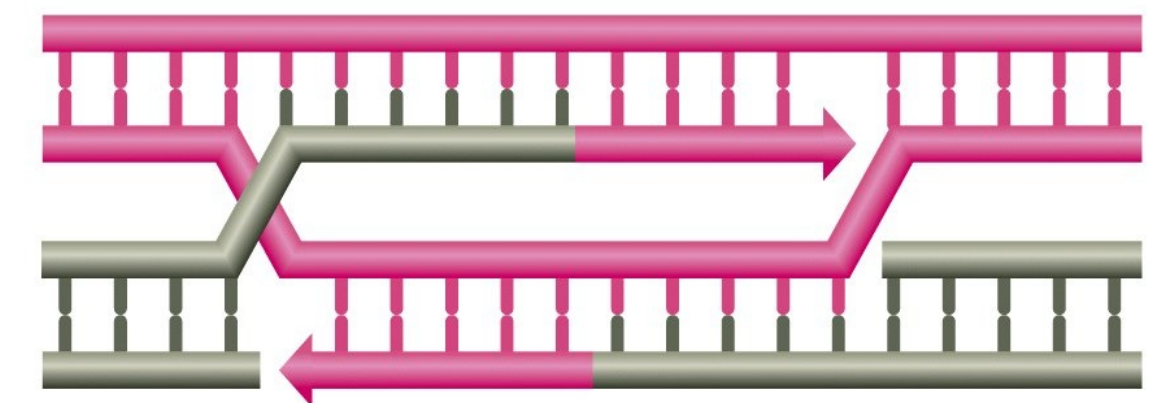
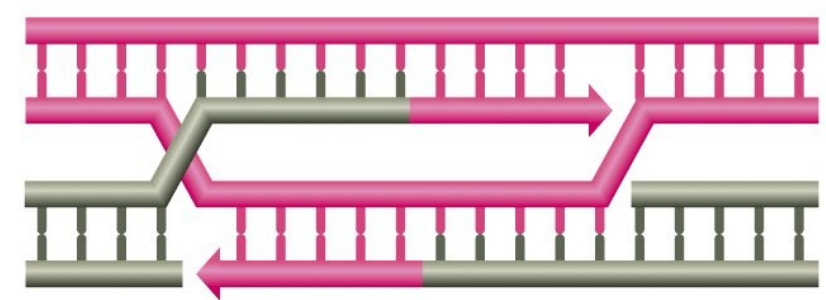
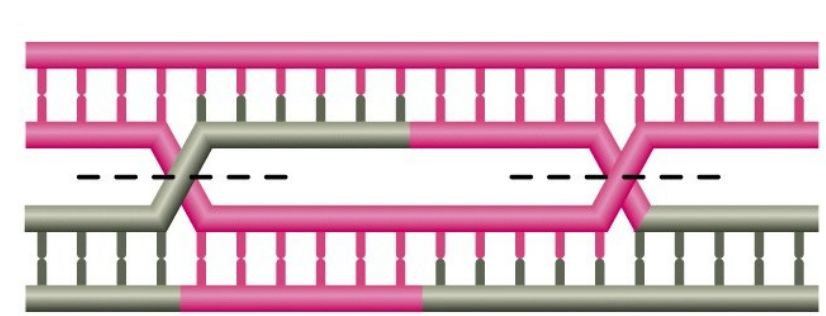


Figure 17-5 part 3 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Model pęknięć dwuniciowych

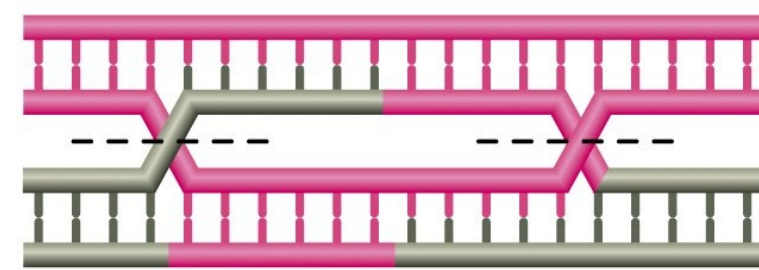


↓  
**Ligase joins up the gaps**



**Heteroduplex with two Holliday junctions**

Figure 17-5 part 4 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



**Heteroduplex with two Holliday junctions**

↓  
**Cleavage of the Holliday junctions**

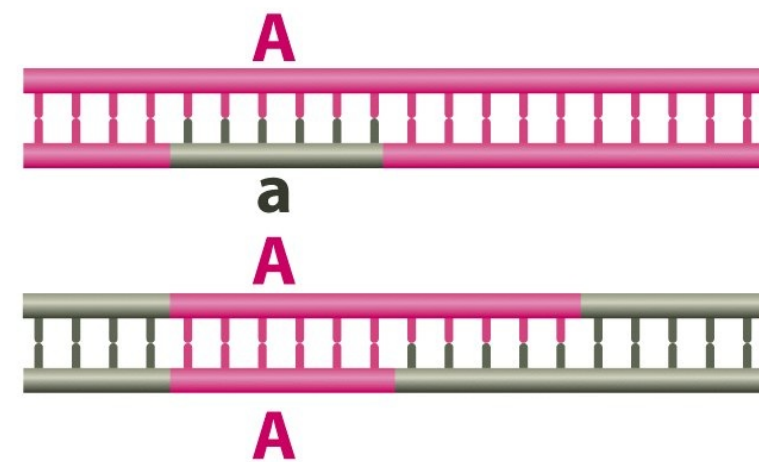
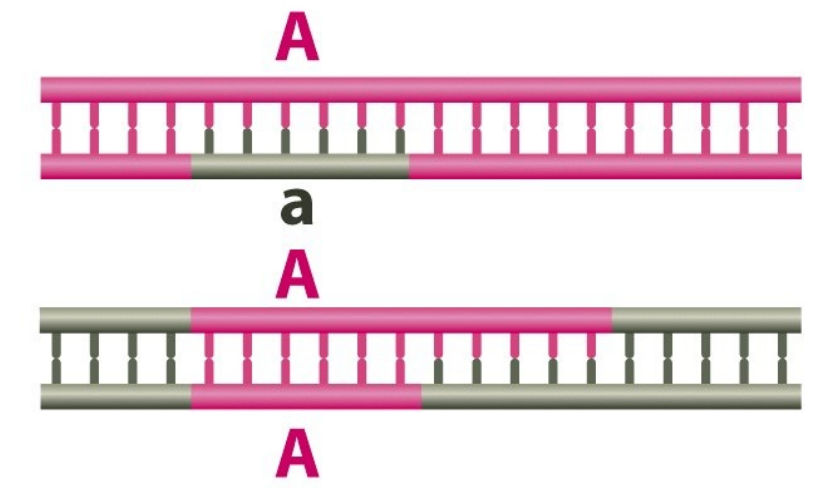


Figure 17-5 part 5 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



↓  
**Mismatch repair**

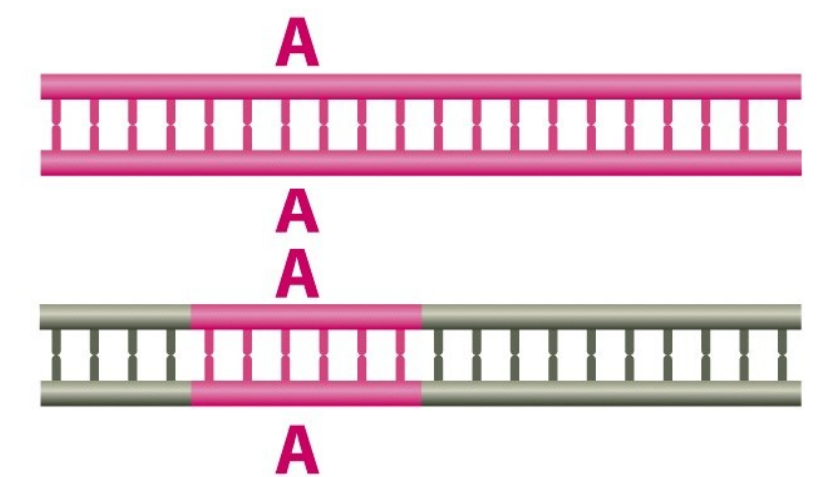
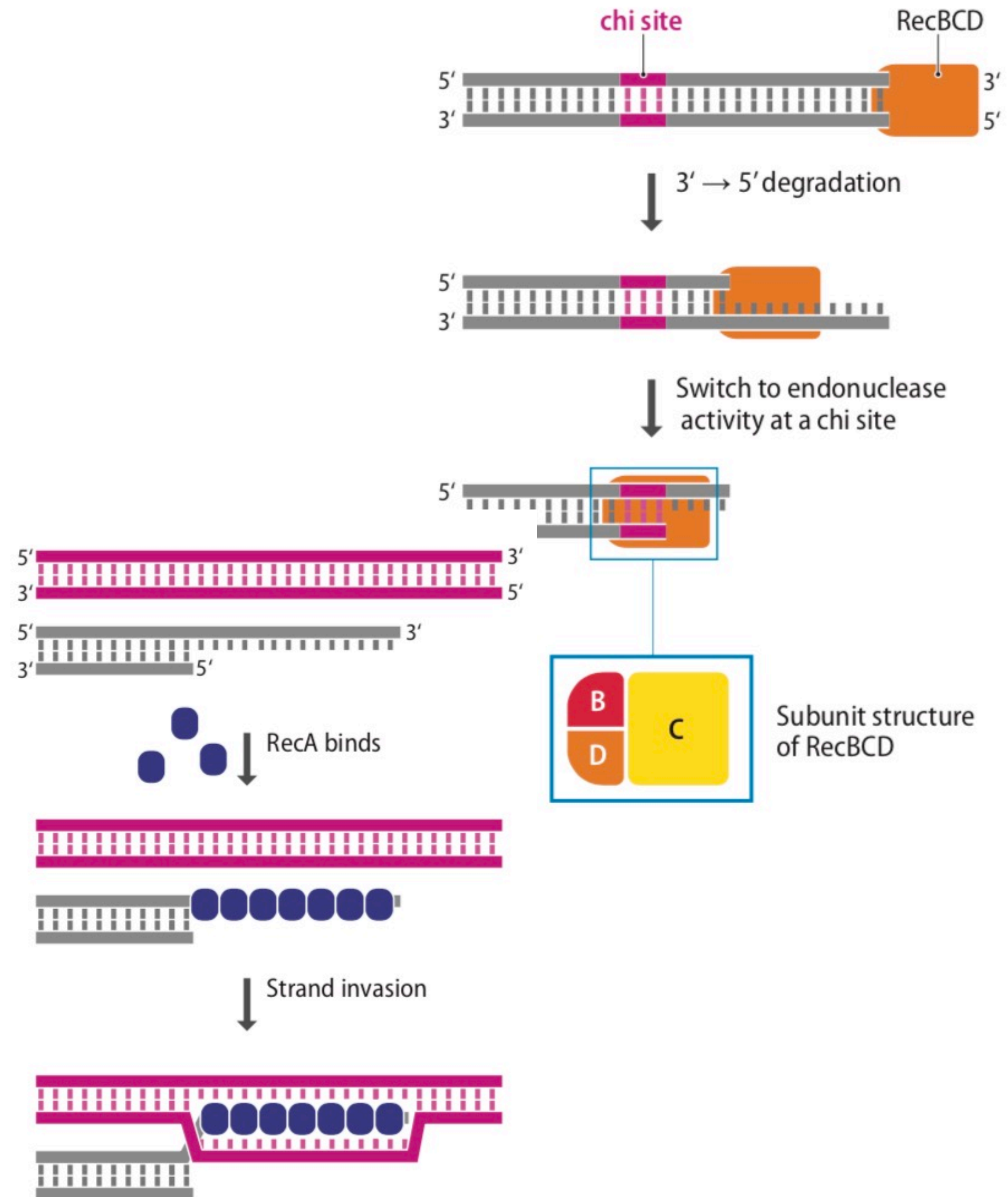


Figure 17-5 part 6 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

- Konwersja genu przez MMR
- Możliwe jest wiele sposobów rozcięcia podwójnej struktury Hollidaya, dających wymianę nici, brak wymiany, konwersję itp

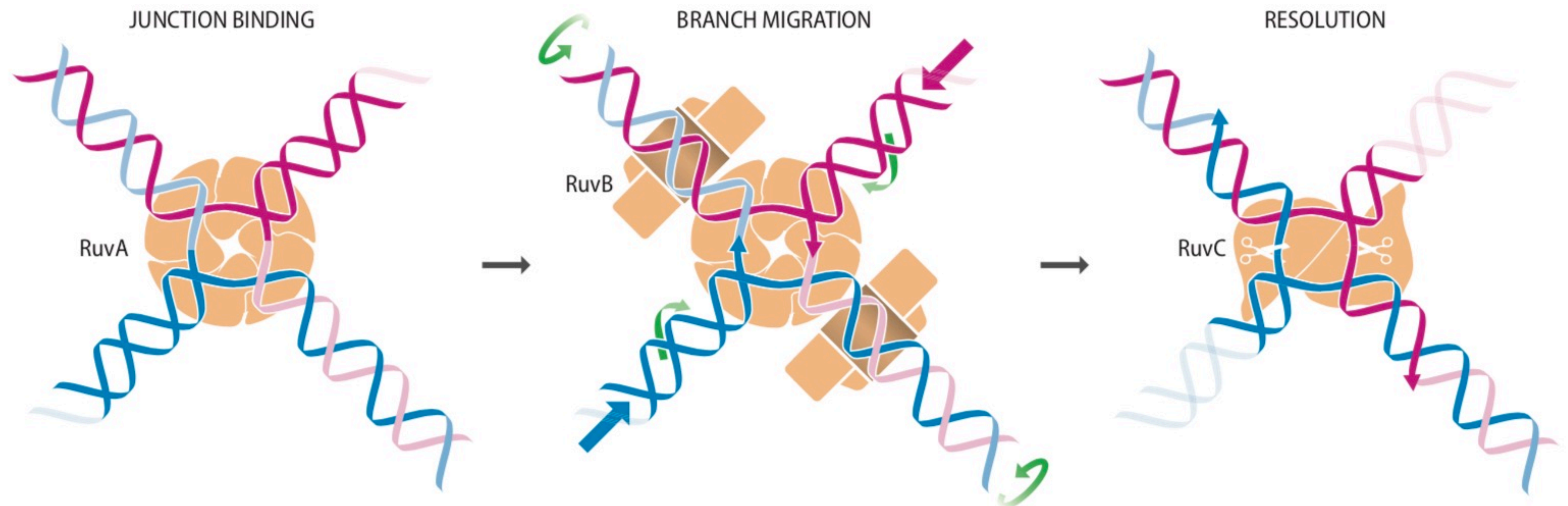
# Maszyneria rekombinacyjna

- Wiele różnych wariantów, niektóre enzymy zachowane od bakterii do ssaków, inne specyficzne
- Kompleks **RecBCD** – tworzy dwuniciową cząsteczkę z wolnym jednoniciowym końcem. Helikaza + nukleaza
  - inny warianty: RecFOR
- RecA wiąże jednoniciowe obszary DNA
- u Eukaryota: białka Rad (np. Rad51 - odpowiednik RecA)



# Maszyneria rekombinacyjna

- Migracja rozgałęzienia i rozcięcie struktury Hollidaya - białka Ruv (resolwazy)
- Resolwazy eukariotyczne: Gen1/Yen1 (rodzina nukleaz Rad1/XPG)



# Naprawa pęknięć przez rekombinację

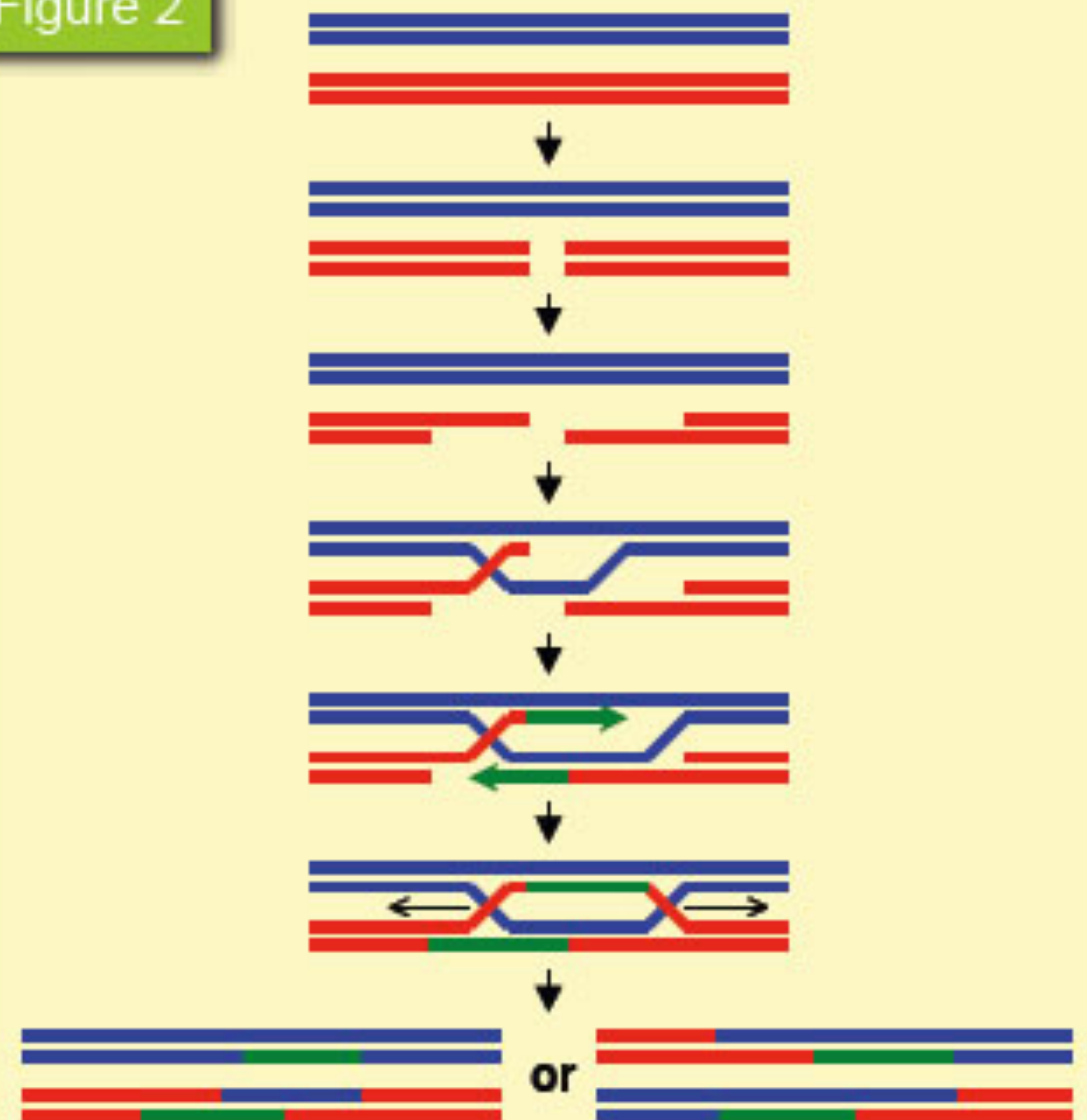
---

- **Postreplikacyjna** - w fazie stacjonarnej
- **Replikacyjna** - zapobieganie kolapsowi replikacji przy pęknięciach matrycy
  - Gdy maszyneria widełek replikacyjnych napotka miejsca z uszkodzeniami DNA, w nici potomnej powstaje luka. Replikacja często się zatrzymuje (kolaps widełek replikacyjnych)
  - Naprawa polega na wykorzystaniu nieuszkodzonej cząsteczki potomnej do uratowania replikacji
- **Główna i pierwotna funkcja rekombinacji**

# Naprawa pęknięć dwuniciowych przez rekombinację

- Pęknięcia dwuniciowe często powodowane są przez promieniowanie jonizujące
- Mutanty defektywne w rekombinacji – większa wrażliwość na promieniowanie (mutanty *rad* drożdży)

Figure 2

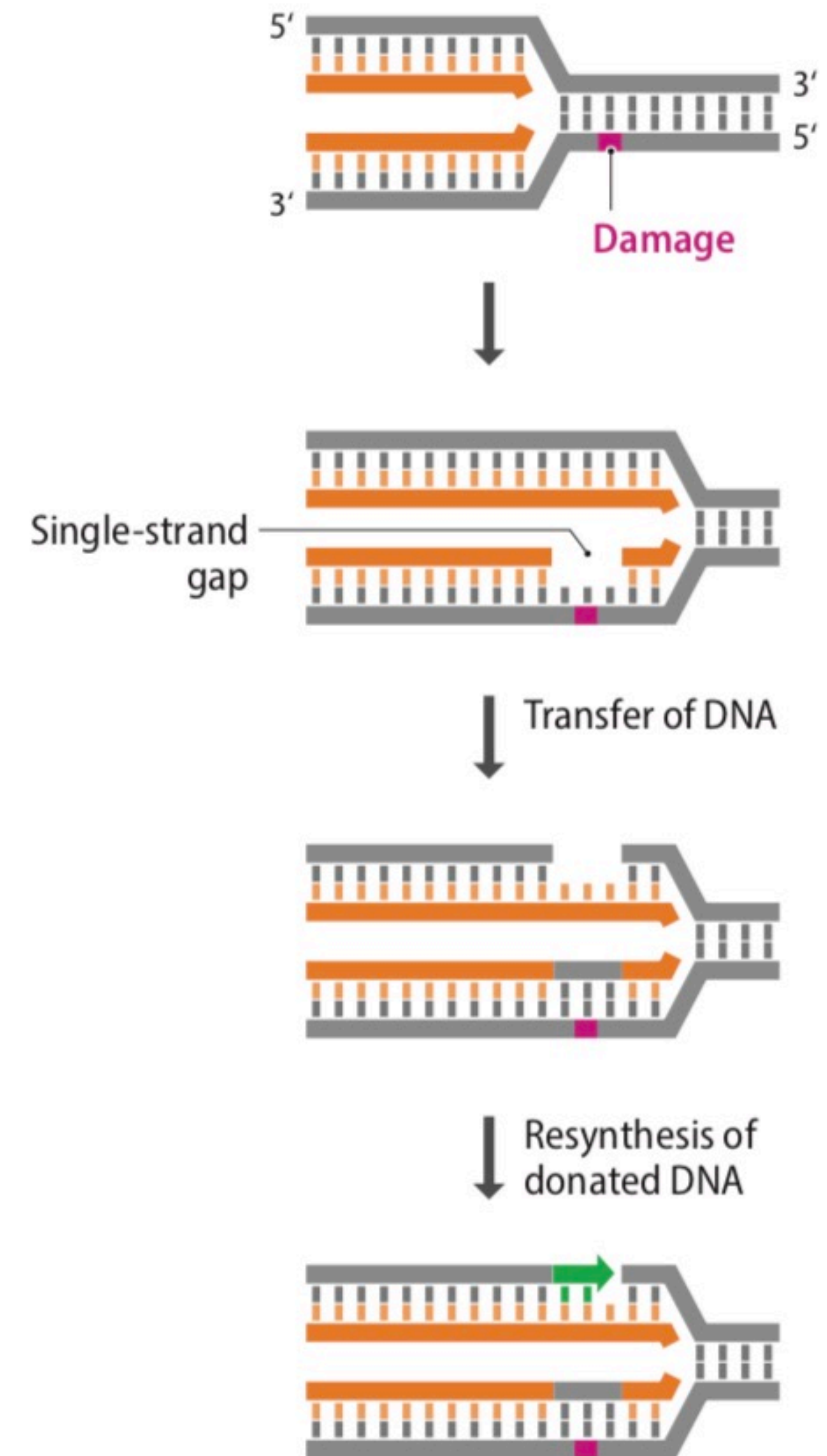


**Homologous Recombination  
(HR)**



# Rekombinacja a uszkodzenia DNA

- Uszkodzenia powodujące powstanie pęknięć jednoniciowych w nici potomnej
- U bakterii - system RecFOR



# Naprawa przez rekombinację - replikacyjna

- Próba replikacji pękniętej nici – kolaps widełek

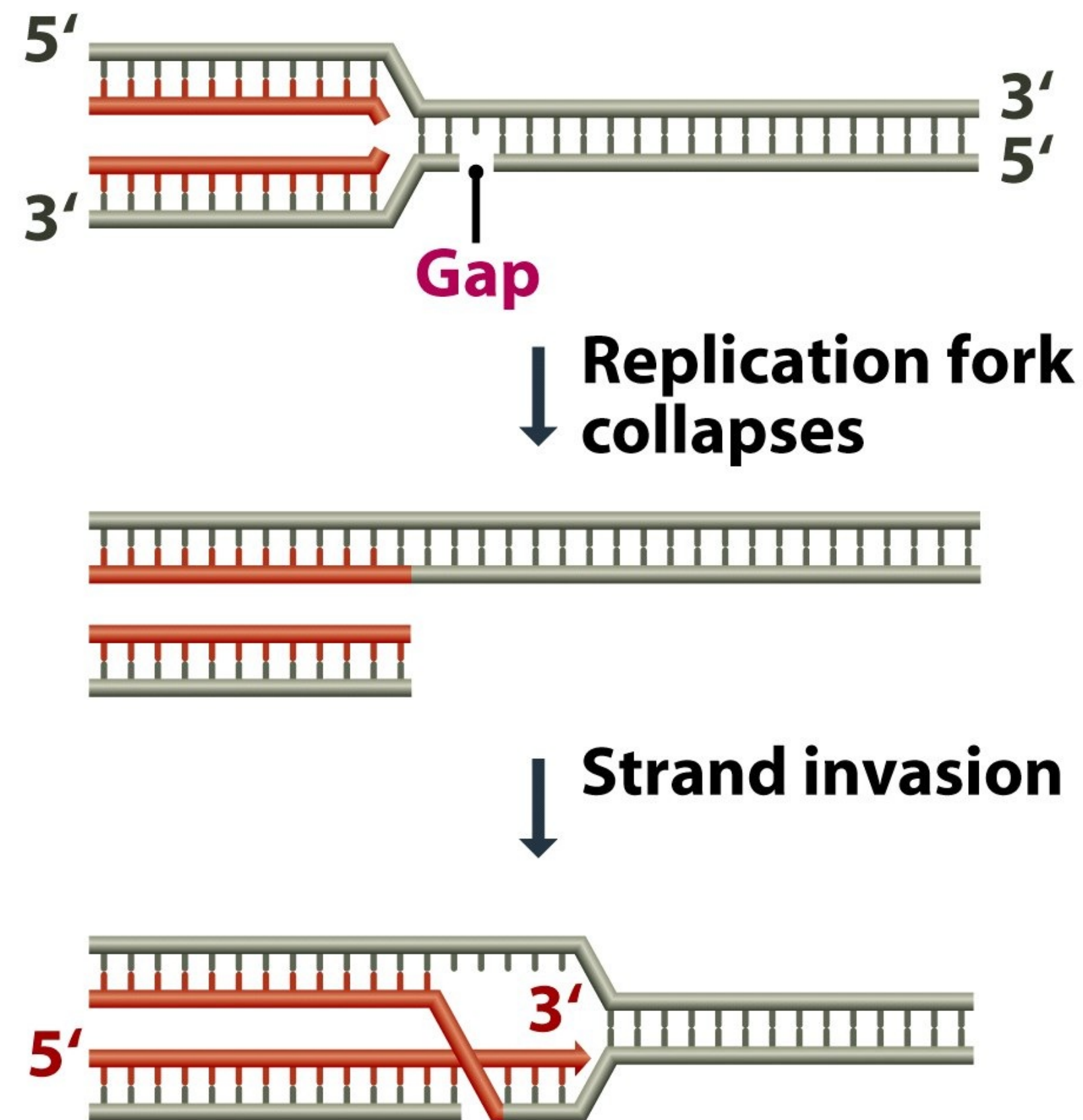


Figure 17-11 part 1 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

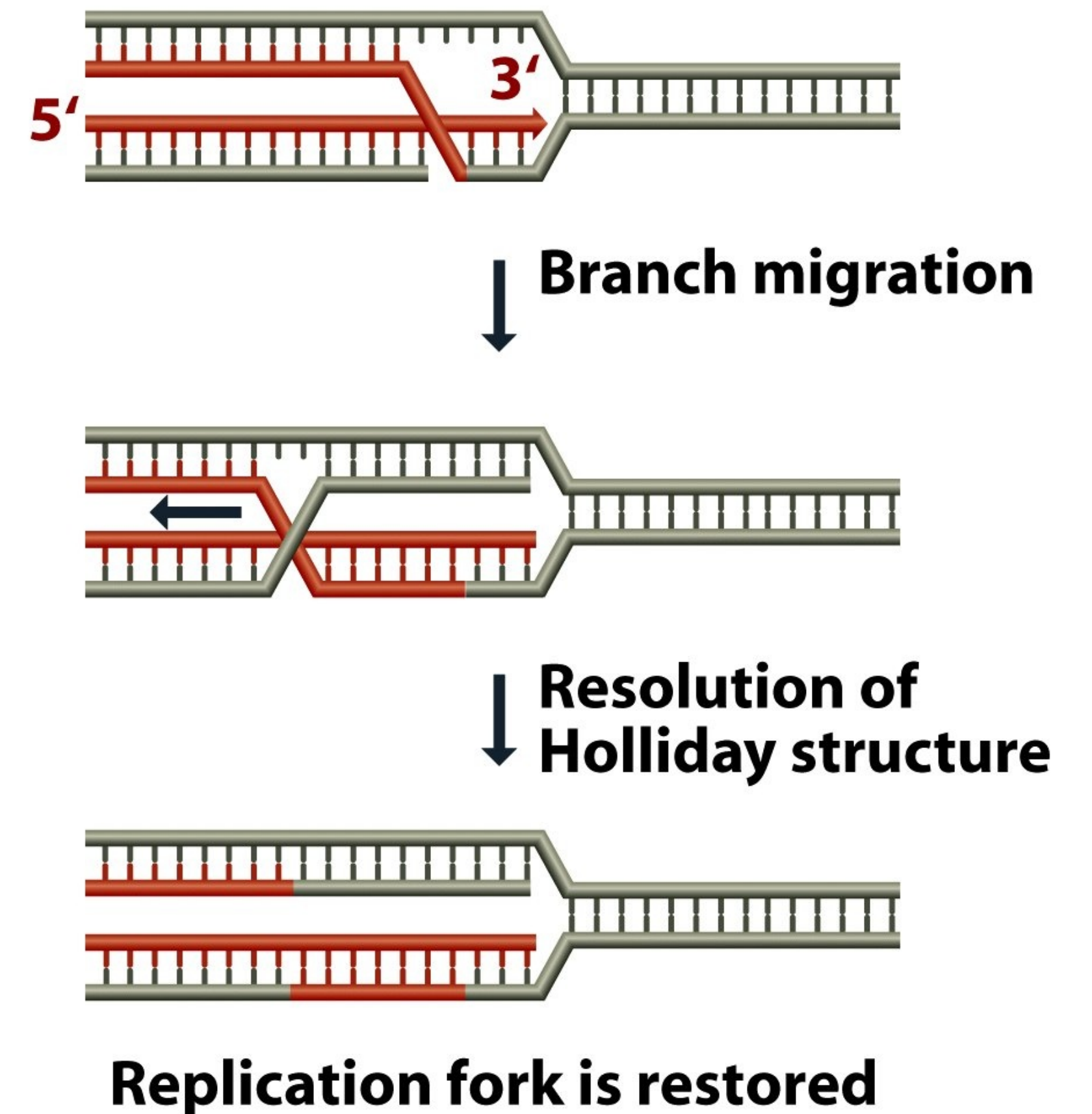


Figure 17-11 part 2 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

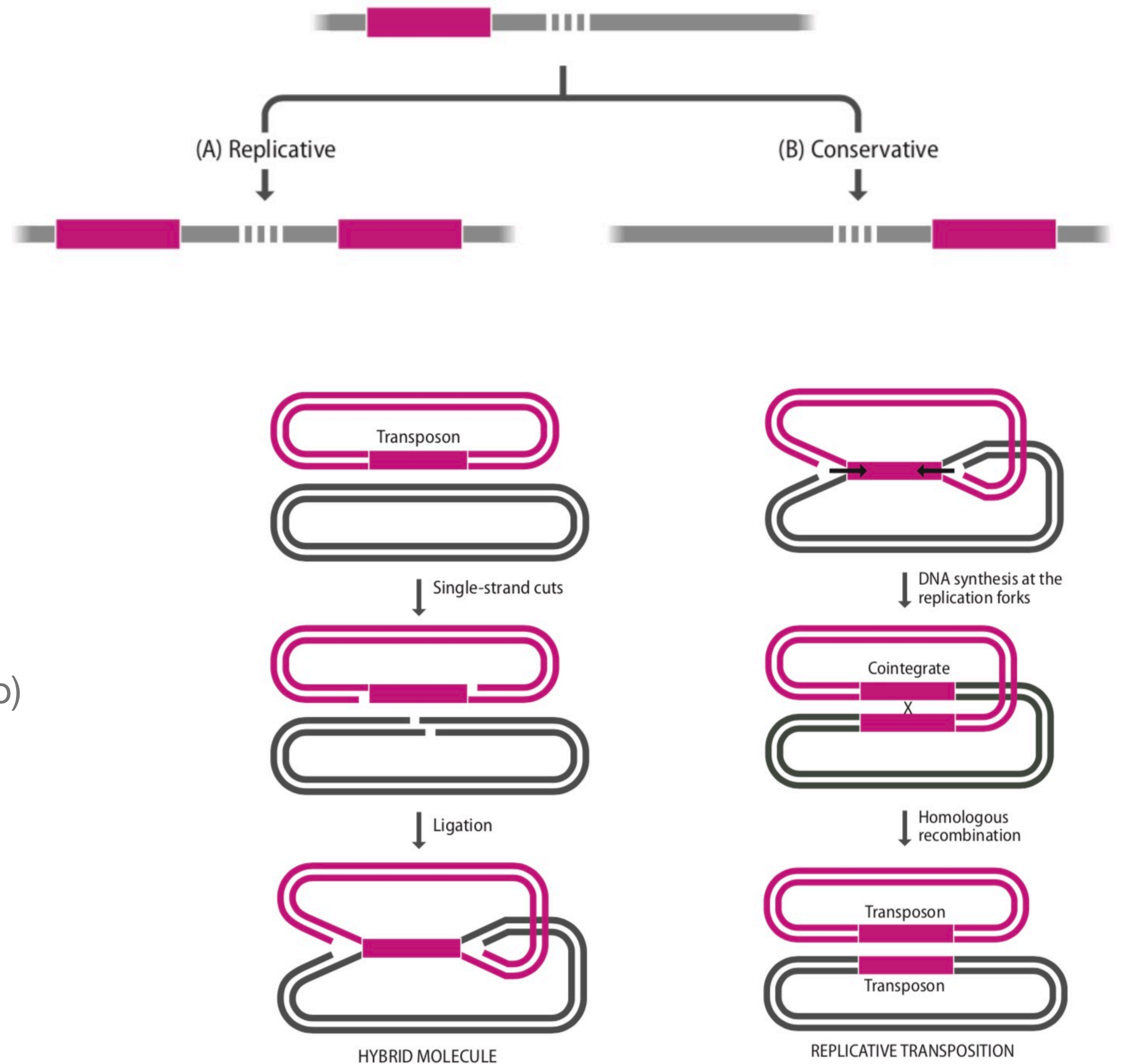
# Funkcje rekombinacji

---

- Naprawa pęknięć i utrzymywanie widełek replikacyjnych – najstarsza i podstawowa funkcja
- Pomaga w parowaniu chromosomów homologicznych – u Eukaryota
- Generuje różnorodność genotypów w rozmnażaniu płciowym (Eukaryota) – funkcja wtórna

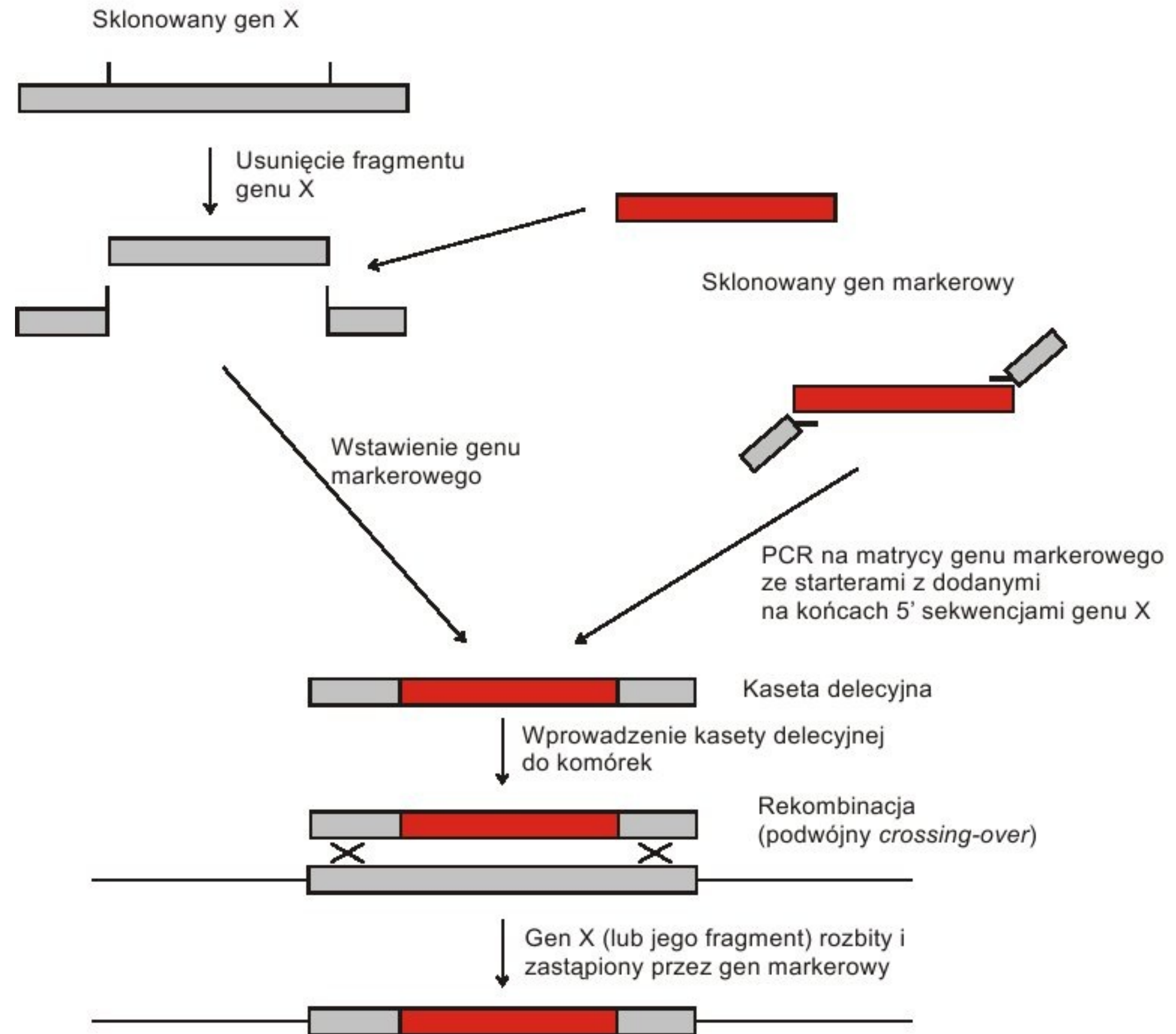
# Transpozycja

- Różnorodne mechanizmy
- Ruchome elementy genetyczne, np.
  - transpozony
  - niektóre wirusy/fagi
  - elementy insercyjne
  - niektóre introny (typu prokariotycznego)
- Rekombinacja wykorzystywana do wstawienia w nowe miejsce genomu



# Rekombinacja i inżynieria genetyczna

- Wprowadzenie do komórki liniowej cząsteczki DNA - wolne końce, sygnał do rekombinacji



# Rekombinacja i inżynieria genetyczna

- CRISPR/Cas9 - przecięcie DNA przez Cas9 indukuje naprawę DSBR
- NHEJ jeżeli nie ma donora - powstaje delecja
- częstość ~5%, ale jeżeli nie powstanie, to Cas9 znowu tnie
- HR jeżeli jest donor

