

Formulár ZK - Záverečná karta projektu

Riešiteľ: Mgr. Miroslav Chovanec, PhD.	Evidenčné číslo projektu: APVV-51-042705
Názov projektu: Ďalšia <i>in vivo</i> charakterizácia mutantných a polymorfných DNA ligáz IV identifikovaných v LIG4 pacientoch	

Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:	Ústav experimentálnej onkológie SAV
Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát):	Division of Reproductive and Child Health, Section of Medical and Molecular Genetics, The Medical School, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, United Kingdom
	Institute Curie, UMR 2027 CNRS/IC - Genotoxicology and Cell Cycle Unit, 26 rue d'Ulm 75248 Paris Cedex 05, France

Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:	žiadne
Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uved'te i publikácie prijaté do tlače): <i>Uvádzajte maximálne päť najvýznamnejších publikácií.</i>	Chovanec, M., Wilson, T. E. (2007) Restricting the ligation step of non-homologous end-joining. <i>DNA Repair</i> , 6 (12): 1890-1893.
	Dudáš, A., Vlasáková, D., Mészárosová, M., Chovanec, M. : Heterologous expression of the human DNA ligase IV/XRCC4/XLF complex in the budding yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . 5 th DNA Repair Meeting, Smolenice, 23. - 27. máj 2008, Slovensko.
	Chovanec, M. : Prečo niektorí ochorejú na rakovinu – úloha defektnej opravy DNA. História, súčasnosť a perspektívy genetiky, Bratislava, 11. - 12. september 2008, Slovensko.
	Chovanec, M. : Gén si pomôže sám, ak mu pomôžeme. Denník Pravda, 18. 8. 2007.
	Chovanec, M. : Oprava DNA: Na čo je to dobré?. Časopis Quark, december 2007.
V čom vidíte uplatnenie výsledkov projektu:	Vzhľadom na problémy, ktoré pri riešení grantu nastali, a ktoré sa ukázali byť neprekonateľné i napriek snahe riešiť ich za cenu výrazných modifikácií cieľov projektu, momentálne uplatnenie projektu vidím len vo zverejnení výsledkov, hoci projekt mal pôvodne ambície priniesť nové poznatky aplikovateľné do oblasti ľudského zdravia. Dosiahnuté výsledky síce sami o sebe majú negatívny charakter, môžu však vedeckej komunite poslúžiť ako cenný zdroj informácií. Napriek neúspechu vytvoriť humanizované kvasinky za účelom získania nových poznatkov o LIG4 syndróme, ochorení súvisiacim s defektom v procese nehomologického spájania koncov DNA (NHEJ), zverejnené detaily našich experimentálnych postupov a výsledkov môžu ľuďom pracujúcim v oblasti NHEJ poslúžiť na pochopenie rozdielov medzi kvasinkovým a ľudským NHEJ, ktoré sa ukázali byť hlavným dôvodom neschopnosti fungovania ľudského NHEJ v kvasinkách.

Charakteristika výsledkov

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - slovensky:

Keďže dvojvláknové zlomy DNA (DSB) iniciujú procesy, ktoré vedú k mutagenéze, karcinogénne a smrti, za účelom udržania stability genómu a bunkovej viability je nevyhnutná ich oprava. Jedným z dvoch hlavných mechanizmov opravy DSB je nehomologické spájanie koncov DNA (NHEJ). Kľúčovým komponentom NHEJ je proteín DNA ligáza IV, ktorá sprostredkováva posledný krok tejto opravnej dráhy, a to znovuspojenie zlomených koncov DNA. Hypomorfne mutácie v géne pre DNA ligázu IV (*LIG4*) sú u ľudí asociované so vzácnym autozomálnym dedičným ochorením – *LIG4* syndrómom. Cieľom tohto projektu bolo ďalej charakterizovať všetky mutantné a dve asociované polymorfne zmeny nájdené v *LIG4* géne u *LIG4* pacientov v podmienkach *in vivo*. V dôsledku nedostatku citlivých *in vivo* metód v cicavčích bunkách sme toto plánovali urobiť cez heterológnu expresiu ľudskej DNA ligázy IV a jej interakčných partnerov, proteínov XRCC4 a XLF, v kvasinkách postrádajúcich ich homológy, proteíny Dnl4, Lif1 a Nej1. Mal byť študovaný vplyv mutantných a polymorfnych DNA ligáz IV na účinnosť a presnosť opravy DSB mechanizmom NHEJ, ako aj ich vplyv na udržiavanie stability genómu. V rozpore s očakávaním sme zistili, že kvasinkové bunky, v ktorých bol ich Dnl4/Lif1/Nej1 komplex nahradený ľudským komplexom DNA ligáza IV/XRCC4/XLF (LXX), boli defektné v NHEJ, čo naznačovalo, že ľudský komplex nebol schopný ligačného kroku NHEJ v kvasinkách. Preto bol vložený do kvasiniek ďalší ľudský NHEJ komplex, a to KU70/80, ktorý pôsobí pred samotným LXX komplexom. Stále však boli kvasinkové bunky majúce Dnl4/Lif1/Nej1 a KU70/80 komplexy nahradené ich ľudskými protáškami defektné v NHEJ, čo naznačovalo existenciu ďalšieho faktora spôsobujúceho NHEJ deficienciu v kvasinkách humanizovaných LXX a KU70/80 komplexmi. V ďalšom kroku sme sa v kvasinkách snažili, hoci neúspešne, exprimovať katalytickú podjednotku DNA-závislej proteín kinázy (DNA-PKcs) za účelom kompletizácie ľudskej NHEJ dráhy v tomto organizme. Nakoniec sme kvasinkám odstránili aj Mre11/Rad50/Xrs2 komplex, ktorý je považovaný za funkčný homológ DNA-PKcs, avšak ani toto neobnovilo NHEJ proficienciu kvasiniek humanizovaných základnými komponentmi ľudského NHEJ.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - anglicky:

Since DNA double-strand breaks (DSB) can initiate processes leading to mutagenesis, tumorigenesis and death, their repair is essential to maintain genome stability and cell viability. Non-homologous end-joining (NHEJ) is one of the two main pathways responsible for repairing DSB. The key player in NHEJ is the DNA ligase IV protein, which mediates a final step of this repair pathway – ligation of the broken DNA ends. Hypomorphic mutations in the DNA ligase IV gene (*LIG4*) in humans were found to be associated with a rare autosomal hereditary disorder, *LIG4* syndrome. The aim of this project was to further characterize all mutant and two associated polymorphic changes found in *LIG4* patients *in vivo*. Due to a lack of sensitive *in vivo* assays in mammals, this was supposed to be achieved by heterologous expression of the human DNA ligase IV and its interacting partners, XRCC4 and XLF, in yeasts lacking counterparts of these proteins, Dnl4, Lif1 and Nej1, respectively. The impact of the mutant and polymorphic DNA ligase IV proteins on efficiency and accuracy of DSB repair by NHEJ as well as on maintaining of genome integrity was planned to be examined. Unexpectedly, yeast cells having their Dnl4/Lif1/Nej1 complex replaced with the human DNA ligase IV/XRCC4/XLF (LXX) complex displayed NHEJ defective phenotype, indicating that the human complex was not able to execute a ligation step of NHEJ in yeast. Therefore, additional human NHEJ complex, KU70/80, acting upstream of the LXX complex was put in yeast to provide this complex with upstream acting interacting complex from the same species. Yet, yeast cells having both Dnl4/Lif1/Nej1 and KU70/80 complexes replaced with their human counterparts displayed NHEJ defective phenotype, suggesting existence of additional factor causing NHEJ deficiency of the LXX and KU70/80-humanized yeast. Next, DNA-PKcs, a catalytic subunit of DNA-PK, was unsuccessfully attempted to be expressed in yeast to restore the core human NHEJ pathway in this organism. Finally, the Mre11/Rad50/Xrs2 complex, a likely functional homologue of DNA-PKcs, was removed from yeast but this, however, did not restore NHEJ proficiency of the core NHEJ pathway-humanized yeast.

Podpisom záverečnej karty riešiteľ vyjadruje svoj súhlas so zverejnením údajov v nej uvedených.

Podpis zodp. riešiteľa:

Dátum:

Podpis štatutárneho zástupcu:

Pečiatka: