

Poškození genomu na molekulární úrovni

- 1) Typy poškození DNA
- 2) Vznik zlomů
- 3) Poškození bází
- 4) Poškození DNA UV-zářením (thyminove dimery) a jeho důsledky
- 5) Modelování vzniku zlomů DNA

Typy poškození DNA

Rozlišujeme následující typy poškození DNA:

1) jednoduché zlomy DNA (SSB)

2) dvojitý zlomy DNA (DSB)

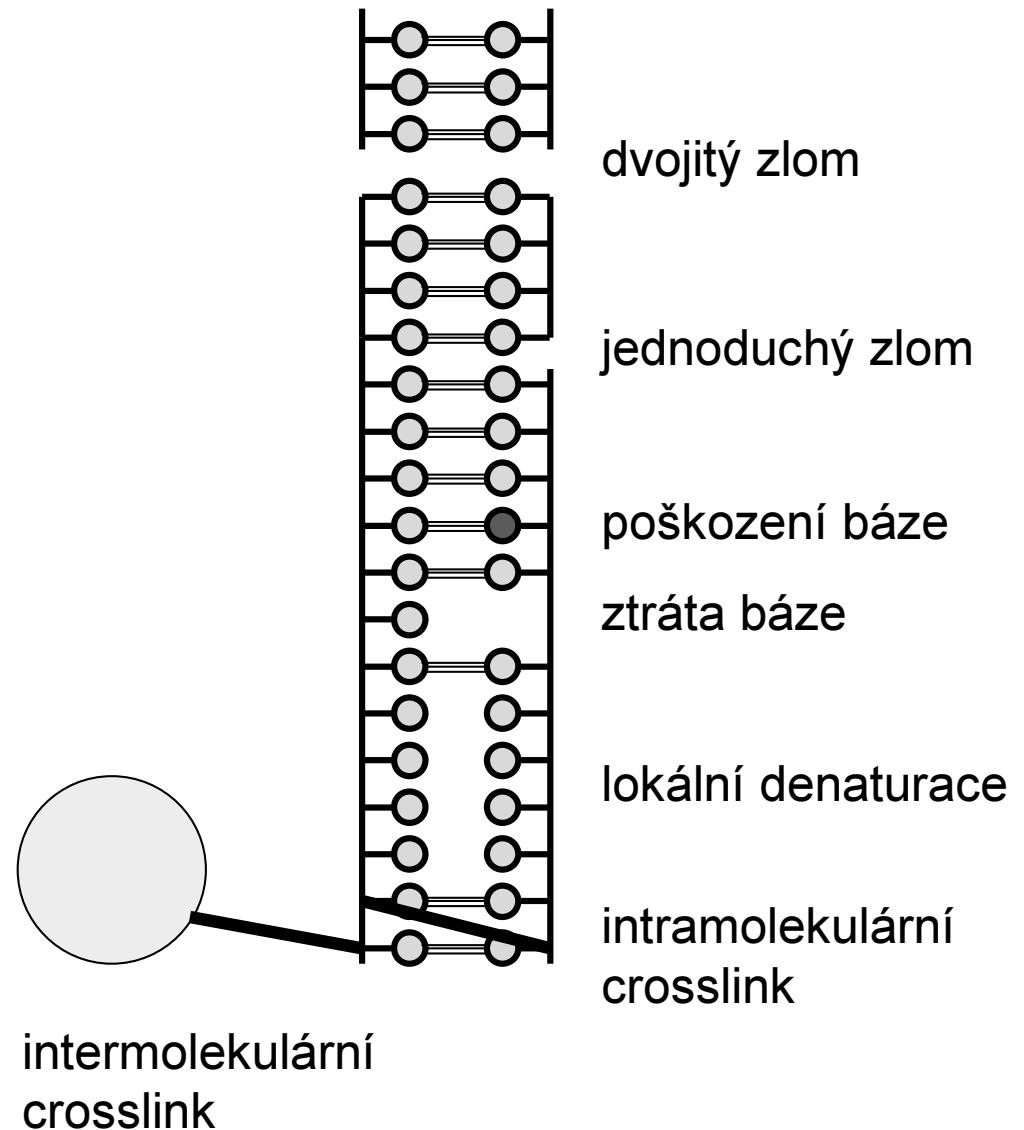
3) poškození báze

4) ztráta báze

5) lokální denaturace

6) intramolekulární crosslink

7) intermolekulární crosslink



Poškození DNA - zlomy

Tyto typy poškození se vzájemně nevylučují a často vznikají společně (např. zlomy mohou být doprovázeny poškozením bazí, oblastmi lokální denaturace apod.). Četnost vzniku těchto poškození závisí na podmínkách. Za nejdůležitější jsou považovány dvojité zlomy DNA.

1) jednoduché zlomy DNA – jsou zlomy mezi cukrem a fosfátovou skupinou v jednom řetězci.

Mechanismus vzniku SSB: zřejmě existuje více mechanismů; OH radikály interagují z 20% přímo s cukrem v DNA a z 80% s bázemi, kde rozrušují dvojné vazby a způsobují vznik radikálů bazí. Tyto radikály se přenášejí do 4-té polohy na pentoze, což uvolní fosfátovou skupinu.

2) dvojité zlomy DNA – dva SSB proti sobě, mechanismu může být různý. V roztoku to mohou být dva náhodně vzniklé SSB proti sobě; v buňce to je spíše důsledek přímého průchodu částice v blízkosti obou řetězců DNA, kdy okolí stopy vzniká řada radikálů, které zasáhnou oba řetězce.

Poškození DNA

Jednoduché zlomy DNA vznikají řadou procesů, často přenesením radikálu báze do 4-té pozice pentózy.

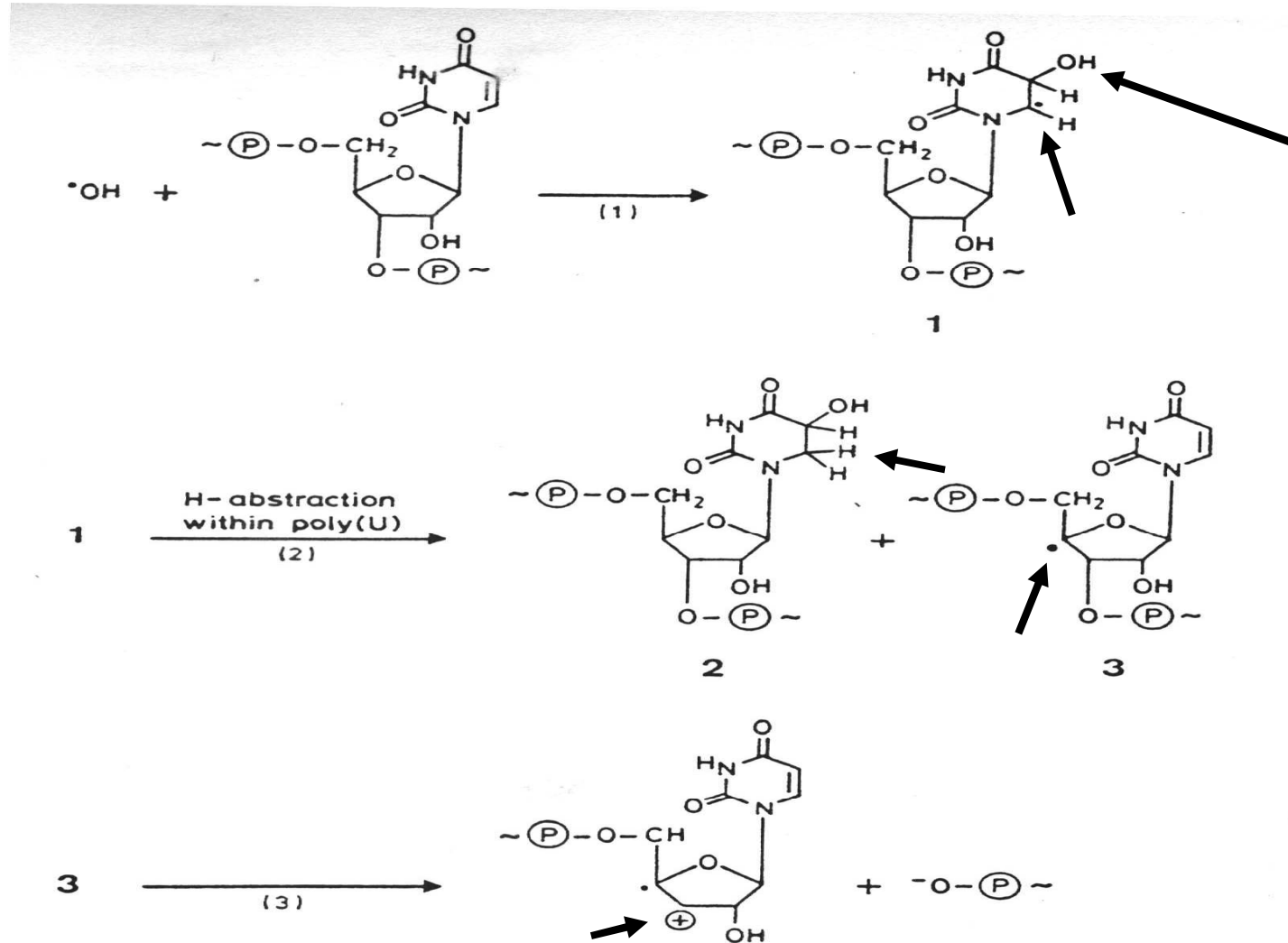
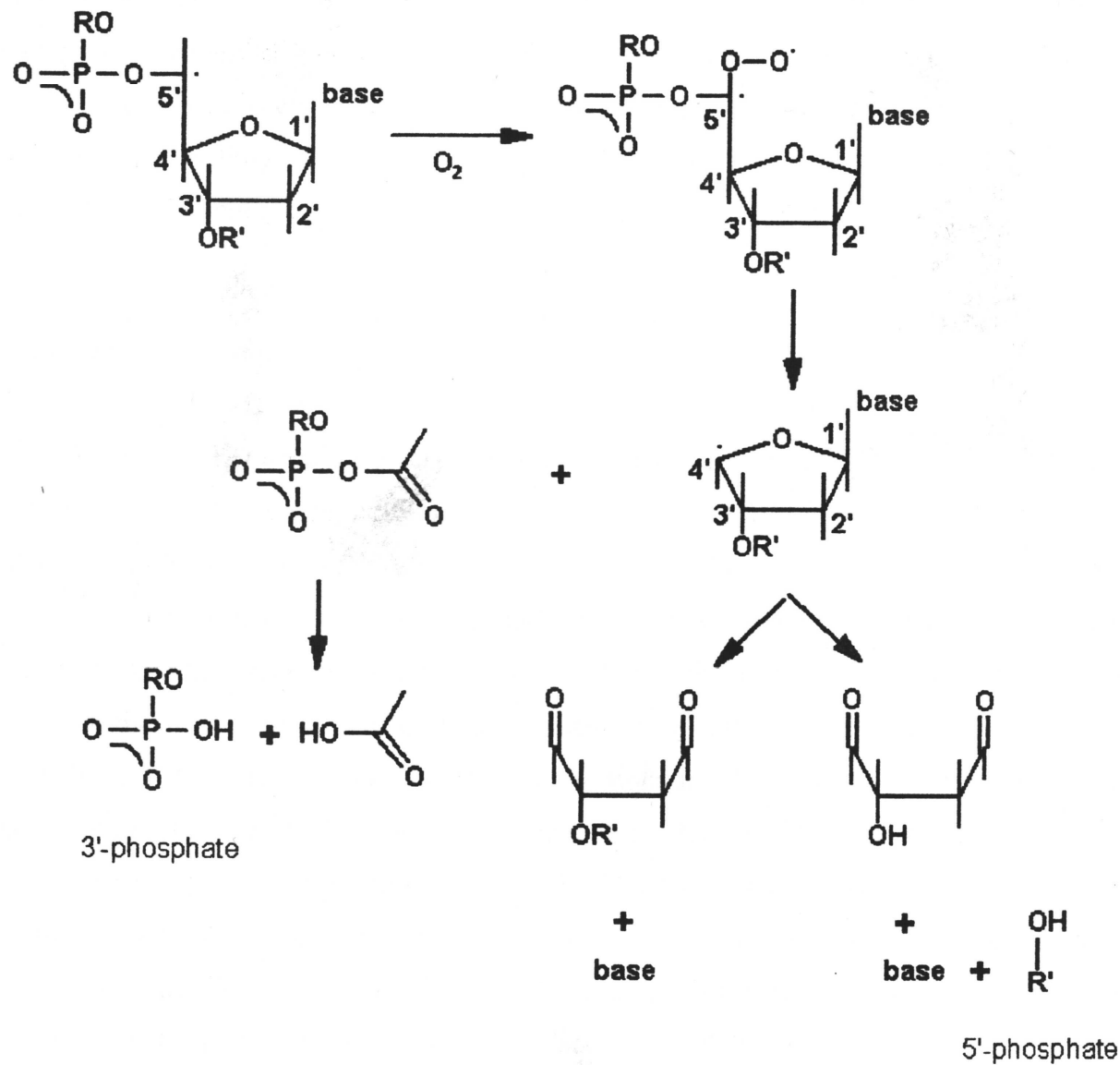


Figure 6.9. Suggested pathway for strand break formation in polyuridylic acid (from VON SONNTAG 1987, with permission)

Poškození DNA

Jednoduché zlomy DNA. Vznik zlomů z radikálu na 5-té pozici pentózy.



Stanovení zlomů DNA

SSB a DSB se dají snadno prokázat sedimentačními technikami. Tato jednoduchá metoda není bez komplikací, neboť velká molekula DNA je velmi fragilní a zlomy lze nadělat manipulací. To vymezuje použitelnost této technologie na větší dávky záření – takové, které jsou při ozařování buňky mimo fyziologickou oblast.

Pro měření SSB se DNA denaturuje alkalickým prostředím, což ovšem způsobuje vznik dodatečných zlomů, které nejsou detekovány, jestliže se denaturuje např. teplem. Tyto dodatečné zlomy, které vznikají z některých typů poškození bazí se nazývají „alkali labile sites“ (als), tj. místa nestálá v zásaditém prostředí. Počet těchto zlomů je asi 30% z celkového počtu SSB.

Prakticky lze měření provést v gradientu sacharózy (5-20% gradient), kde na jeho povrch se dá DNA značená izotopem v alkalickém prostředí. Po centrifugaci rozkapeme gradient na frakce a změříme aktivitu v jednotlivých frakcích např. v β -spektrometru. Tím dostaneme rozdělení aktivity podél gradientu. Kalibrací stanovíme pro daný fragment DNA polohu v gradientu. Z rozdělení pak můžeme spočítat střední molekulární hmotnost. Lze snadno prokázat, že střední molekulární hmotnost klesá s rostoucí dávkou záření jak pro roztoky tak v buňkách.

Stanovení zlomů DNA

Další metodou měření SSB a DSB je elektroforéza. Jednoduché je použít kruhovou DNA, která má velkou pohyblivost v elektrickém poli. Vznikem SSB dojde k relaxaci a pohyblivost se podstatně zmenší. Vnesení DSB do kruhové molekuly vede ke vzniku molekuly lineární a k dalšímu zmenšení pohyblivosti. Tyto tři formy DNA se dají snadno oddělit sedimentací nebo elektroforézou.

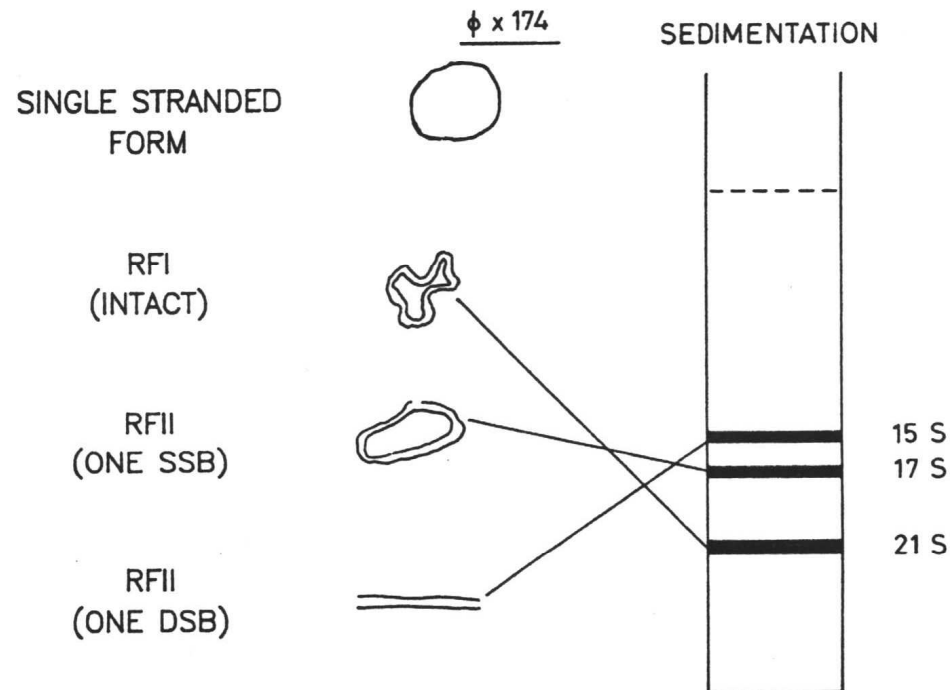


Figure 6.10. Phage ϕ X174 as test object for the determination of strand breaks (see text). Sedimentation coefficients are also given for reference (see textbooks of biochemistry)

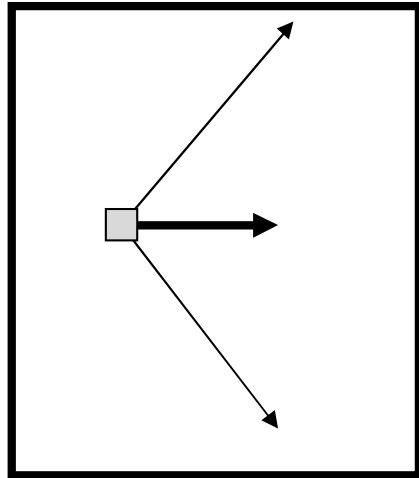
Stanovení zlomů DNA

Další metodou je „unwinding technika“, která využívá řízené denaturace DNA v zásaditém prostředí, kdy při přesně stanoveném pH a změřené době dojde k oddělení určitého úseku dvoušroubovice. Čím více bude zlomů v DNA, tím rychleji dojde k úplné denaturaci všech molekul. Měří se nakonec frakce dvojřetězové DNA použitím vhodné barvičky. Tato metoda je citlivější než sedimentační technika a umožňuje pracovat s dávkami blízkými „fyziologickým“. Metoda vyžaduje pečlivou kalibraci.

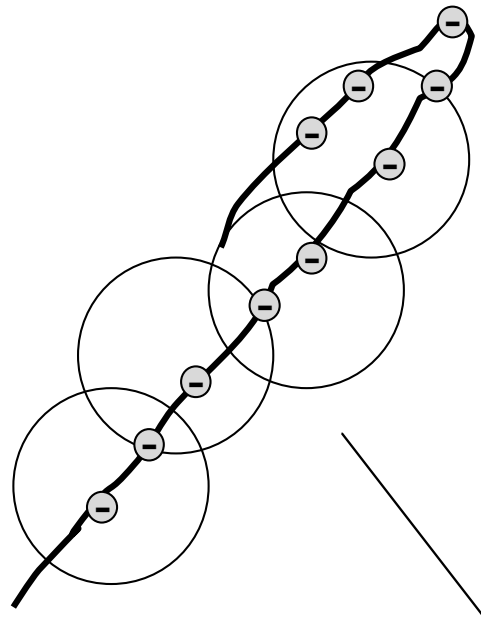
Další metodou pro měření DSB je pulsní elektroforéza, do které byly vkládány velké naděje. U pulsní elektroforézy se střídá elektrické pole pod určitým tupým úhlem a lze programově řídit jak velikost pole, tak úhel a dobu pulsů napětí. Molekuly DNA se v gelu nejprve orientují a teprve poté se začnou pohybovat. Při změně orientace napětí dochází k re-orientaci, která zabere určitý čas, jenž je větší pro větší molekuly.

Pulsní elektroforéza

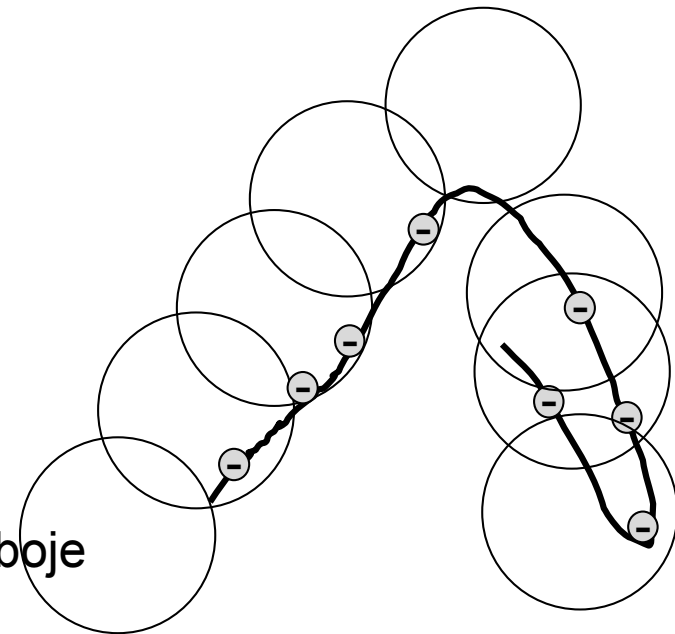
Rozhodující pro výsledek, tj. polohu molekuly na gelu, je proto rychlost reorientace a nikoliv pohyblivost. Tímto způsobem lze oddělit šetrně velké molekuly až několik Mbp (celý genom *E. coli*).



Směr pole se mění pod velkým úhlem



Molekula DNA se proplétá v pórech, kde je tažená silou odpovídající jejímu náboji



Při reorientaci se část náboje efektivně nevyužívá.

Pulsní elektroforéza

Výsledky měření a jejich interpretace. Byly měřeny např. zlomy indukované zářením u *E. coli* nebo *B. subtilis* na celých genomech, kterými jsou kruhové molekuly DNA. Výsledek elektroforézy vypadal takto – určitá linie odpovídala původní DNA (zůstala na původním místě vzhledem k ukotvení na buněčné struktury), další maximum odpovídalo jednořetězcové DNA. Třetí maximum bylo široké a odpovídalo molekulám rozbitým na drobnější kousky.

Jednoduše lze odvodit, že při náhodném vzniku DSB v molekule DNA musí mezi množstvím DNA v jednotlivých oblastech elektroforeogramu platit určité vztahy.

Pro řídkce ionizující záření bude při středním počtu zlomů

$$n = a \cdot D$$

pravděpodobnost, že k žádnému nedošlo

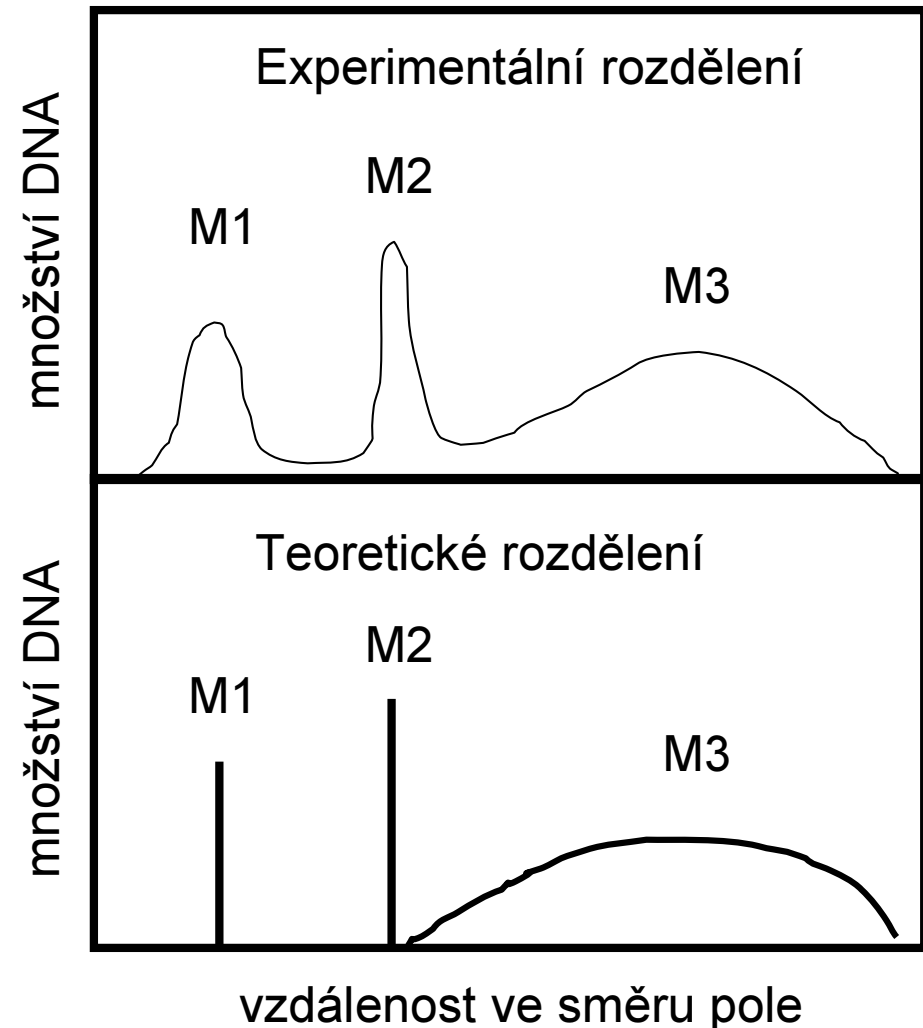
$$\exp(-n)$$

a pravděpodobnost že došlo právě k jednomu bude

$$n \exp(-n)$$

Zbytek do 1 bude připadat na spojitou část rozdělení v pravé části obrázku.

Množství DNA pod maximy lze určit integrací a porovnat s rovnicemi.



Ostatní poškození DNA

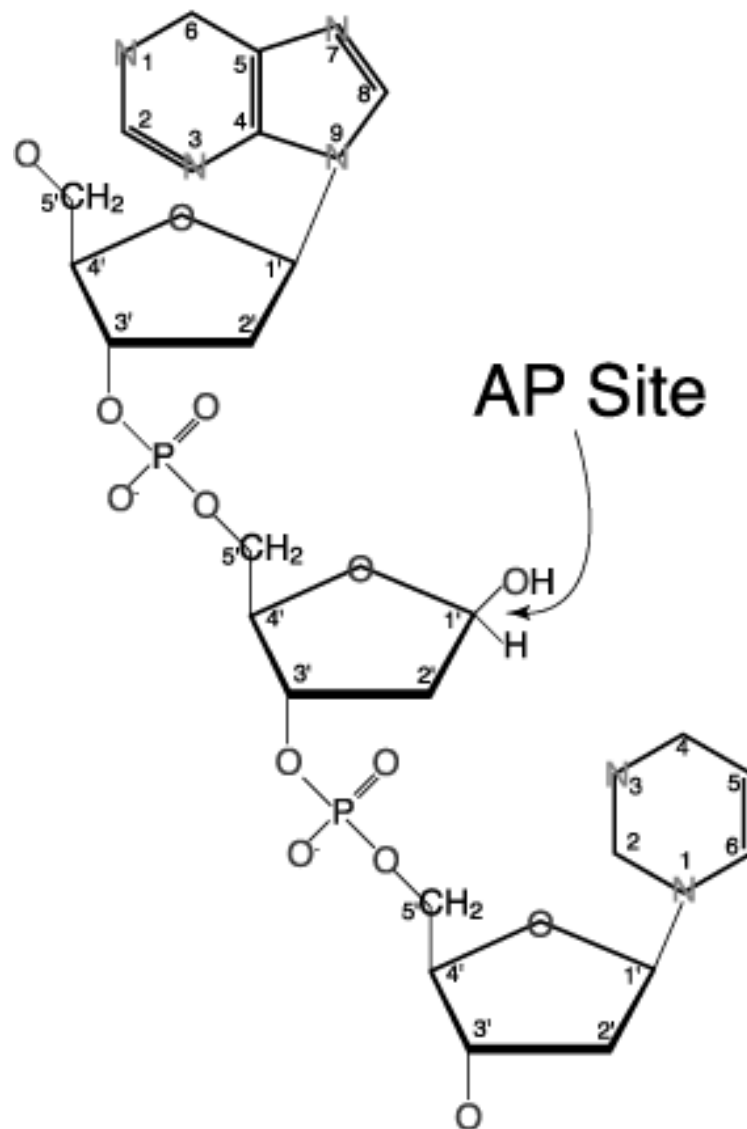
Poškození bazí a ztráta bazí se pozoruje jako úbytek absorbance při 265nm, což je poněkud hrubá metoda. Byly popsány určité typy poškození bazí (např. u thyminu 30 druhů změn); jejich biologické následky však nejsou známy a nepřičítá se jim velký význam. Poškození bazí se v buňce reparuje excizní reparací, čímž se tato poškození mění na SSB. Proto lze po určité době pozorovat nárůst počtu SSB po ozáření.

Denaturované oblasti způsobují naopak při malých dávkách mutagenu určitý nárůst absorpce při 265 nm. Tyto oblasti lze prokázat na denaturačních křivkách nebo pomocí enzymů specifických pro single-strandovou DNA. Denaturace provází většinu z uvedených typů poškození, a proto je G poměrně velká (7-14)

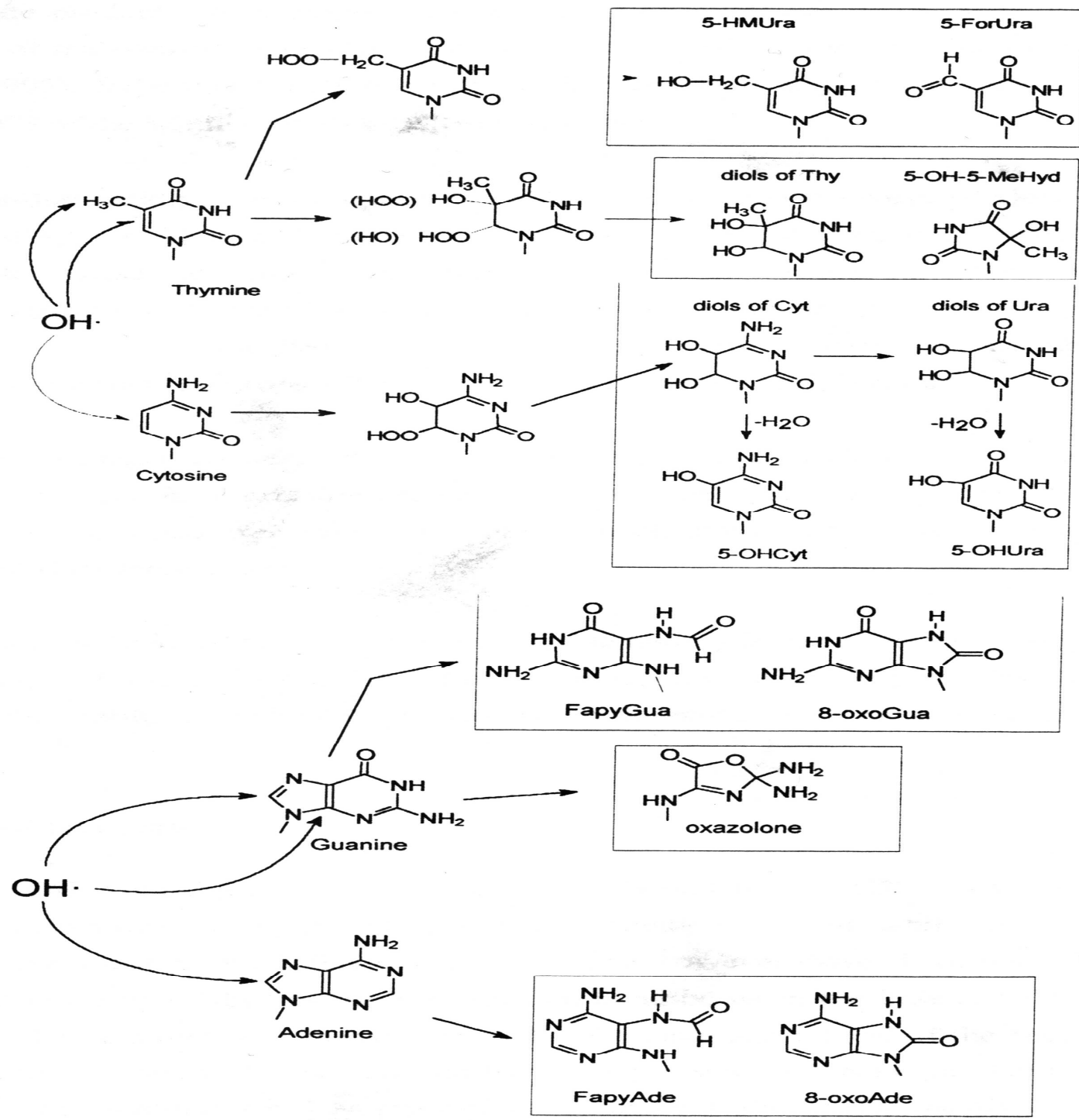
Crosslinky – nejsou dobře prozkoumány. Intramolekulární crosslinky vedou k podstatným změnám v denaturačních křivkách a zvyšují rychlost sedimentace. Crosslinky s proteiny způsobují obtížnou extrakci z buněk – toho lze využít při fixaci DNA.

Poškození bazí

Ztráta báze –v řadě případů může dojít ke ztátě bazí.



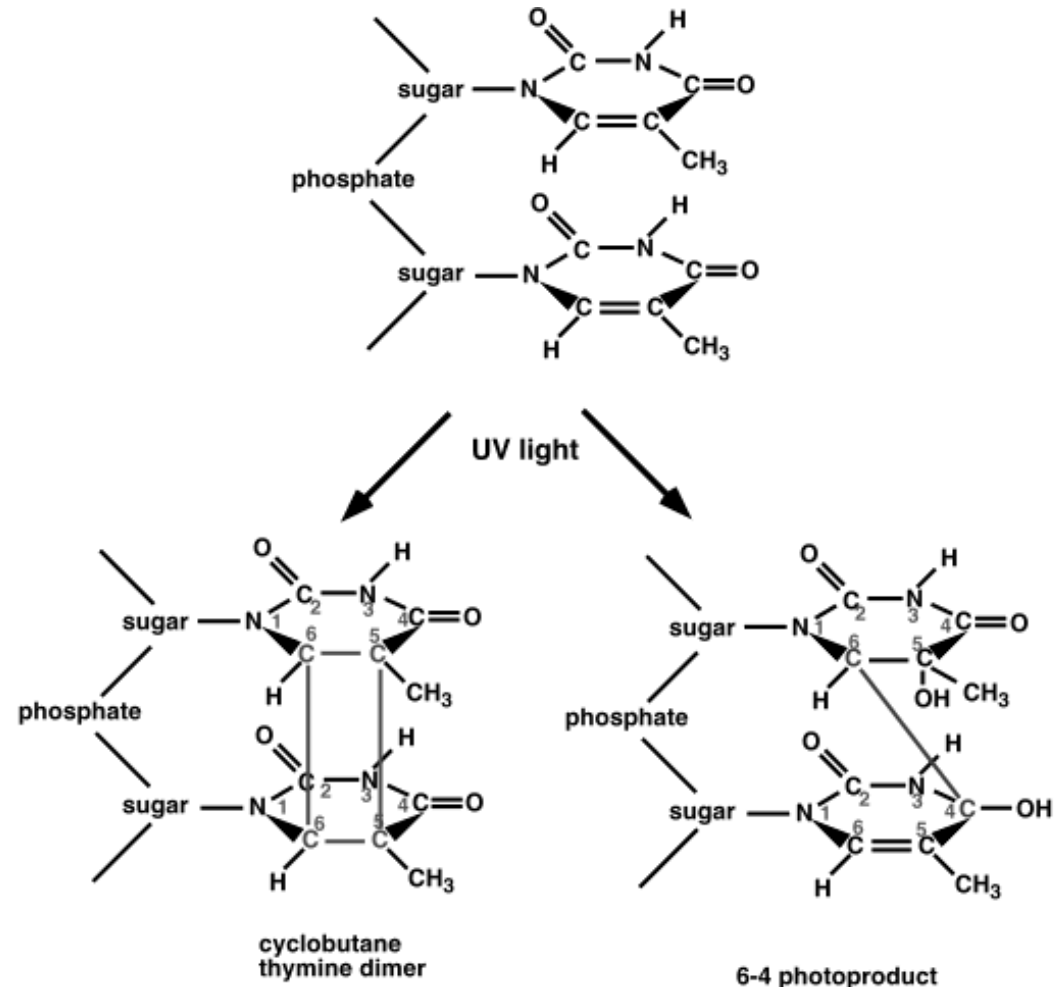
intermediate
exception
Murphy
radical



Poškození DNA působením UV-záření

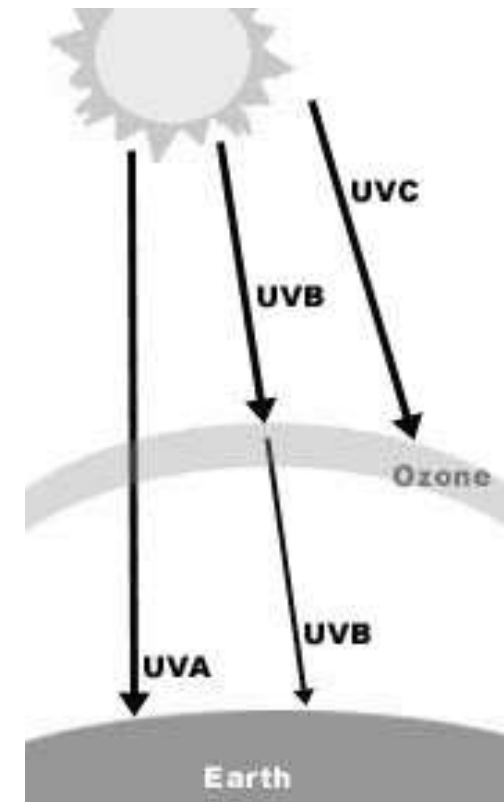
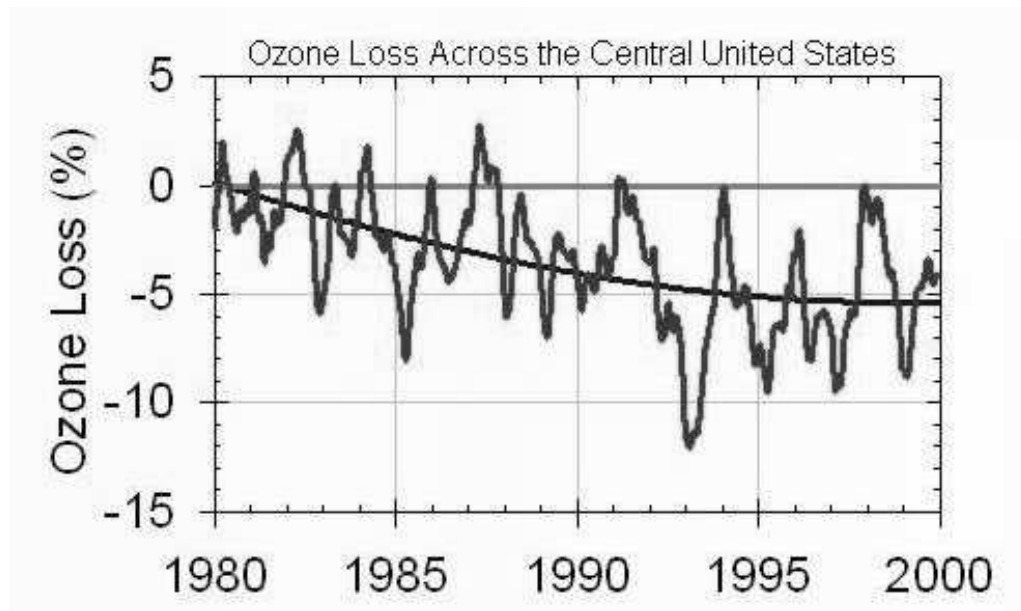
Působením UV záření dochází ke vzniku dimerů a 6-4 fotoproduktů. Kovalentní vazba vzniká mezi sousedními pyrimidiny, nejčastěji jsou to thyminy.

Oba typy poškození mohou způsobovat špatné párování při replikaci nebo zastavení replikace. Proto se vyvinuly systémy reparace těchto poškození. Protože na Zemi žijeme v přítomnosti UV-záření, vyvinula se řada systémů pro reparaci poškození způsobených tímto zářením.



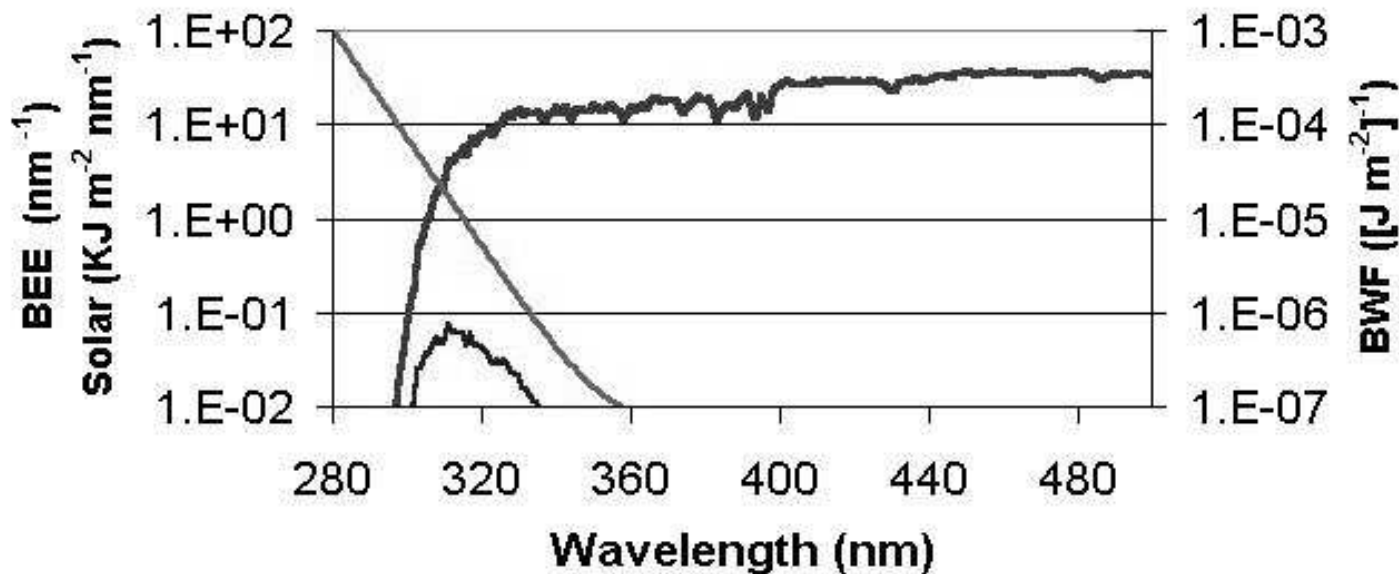
Ultrafialové záření – UV B na povrchu Země

- 1) ultrafialové záření – A (320-380 nm), zdroje jsou halogenové výbojky, UV zářivky, Slunce
- 2) ultrafialové záření – B (280-320 nm) jako UV A (na Zemi neprojde přes ozonovou vrstvu)
- 3) ultrafialové záření – C (<280 nm, do oblasti nm) zdroje – jako UV A, Slunce, může ionizovat



Proč je poškození ozonové vrstvy nebezpečné

Poškození libovolného organismu UV zářením závisí na dávce a vlnové délce. Modrá křivka udává závislost množství solárního UV na vlnové délce, zelená křivka je biologická váhová funkce (množství poškození na jednotku dávky). Součin těchto dvou funkcí pak dává závislost biologické účinnosti na vlnové délce (pro sluneční záření). Integrál červené křivky pak představuje stupeň poškození. Malá změna v oblasti UVB (280-320 nm) vyvolá prudkou změnu stupně poškození.



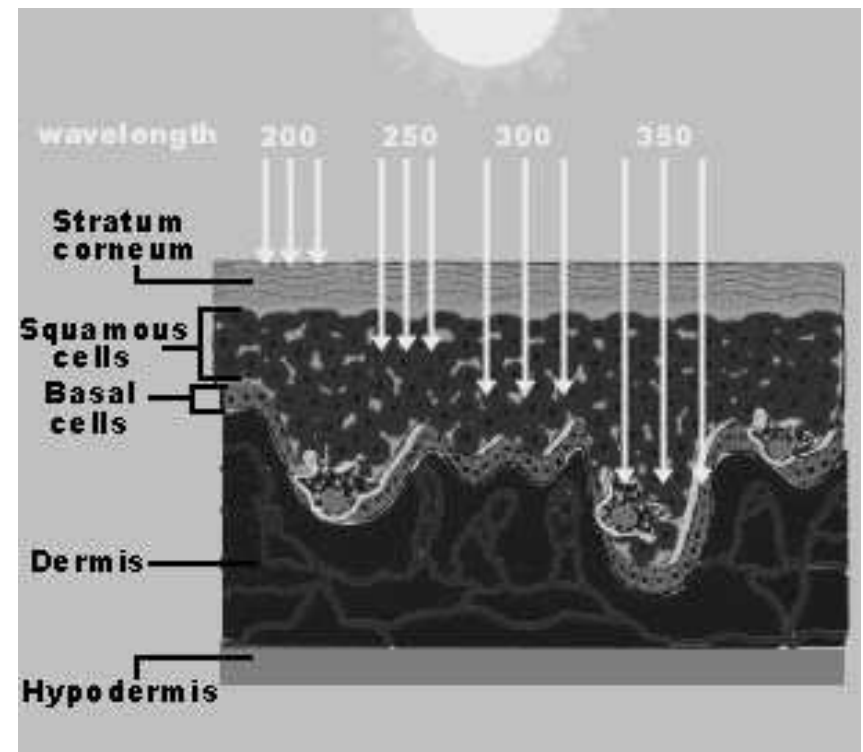
Opalování

Znědnutí kůže nebo zčervenání – obojí je poškození kůže způsobené UV zářením, ale jsou to odlišné procesy způsobené různými druhy UV záření.

UV A proniká hlouběji do kůže a může způsobit zhnědnutí bez červenání.

Naproti tomu UV B způsobuje hlavně zčervenání. Poškození dláždicového epitelu (squamous cells) způsobuje vznik spinocelulárního karcinomu.

Melanin absorbuje oba typy záření a redukuje tak poškození bazálních buněk a dláždicového epitelu.



Opalování

Zčervenání je způsobeno poškozením krevního řečiště na povrchu kůže, které způsobuje jejich natékání. Zčervenání se objeví po několika minutách při silné expozici a pokračuje 24-72 hodin.

Těžké poškození kůže vede k nekrotickým změnám, které zanechávají trvalé poškození kůže

Opakovaně opalovaná kůže se stává atrofickou, vrásčitou, stařeckou.

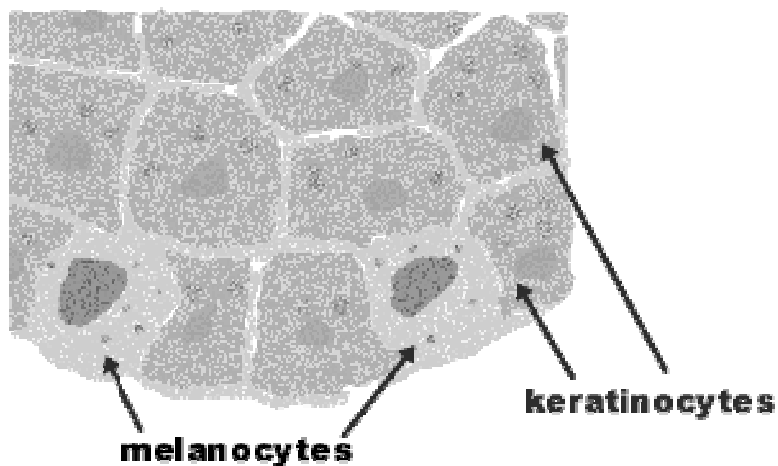
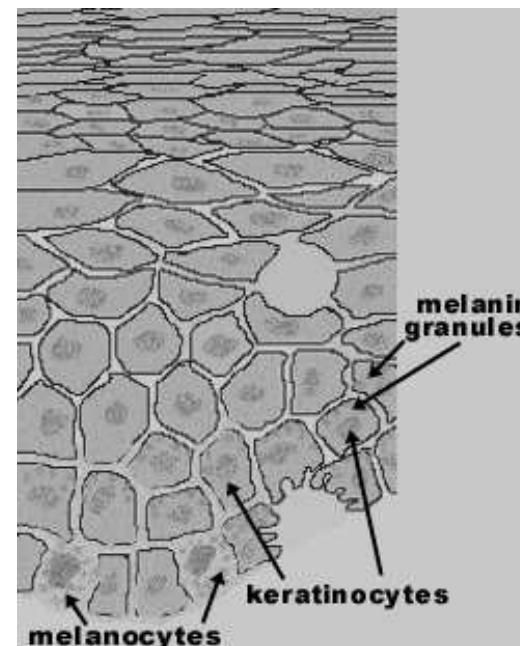
Riziko vzniku rakoviny je větší

- pro delší dobu opalování,
- pro světlejší kůži,
- při opalování v soláriích.

Mechanismus zhnědnutí kůže

Je obranná reakce na poškození kůže.

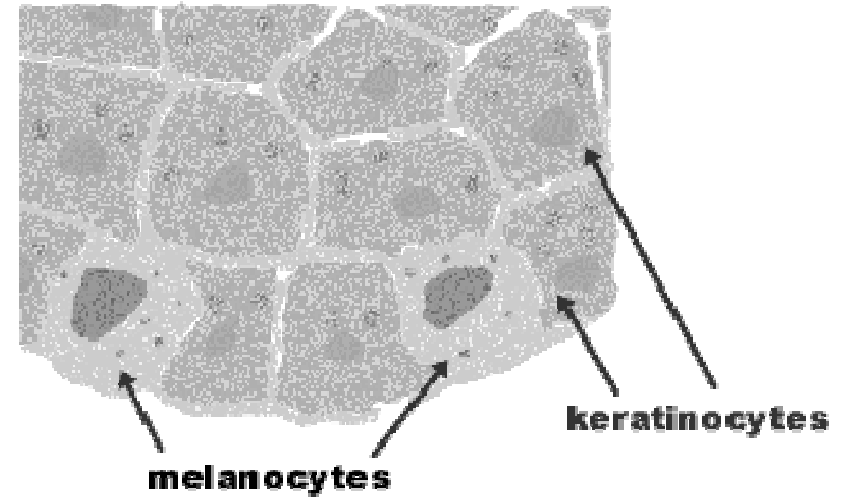
- Melaninové granule blízko povrchu kůže jsou oxidovány UVA a zhnědnou



- 2) Melanocyty hlouběji v kůži jsou stimulovány a produkují nový melanin. Nové granule jsou přeneseny do keratinocytů ve vrchních vrstvách. Jsou umístěny ve vnějších částech buněk nad jádrem.

Mechanismus zhnědnutí kůže

- 3) Melanocyty se dělí a vzniká více buněk produkujících melanin – zhruba 5-7 dní po prvotním ozáření



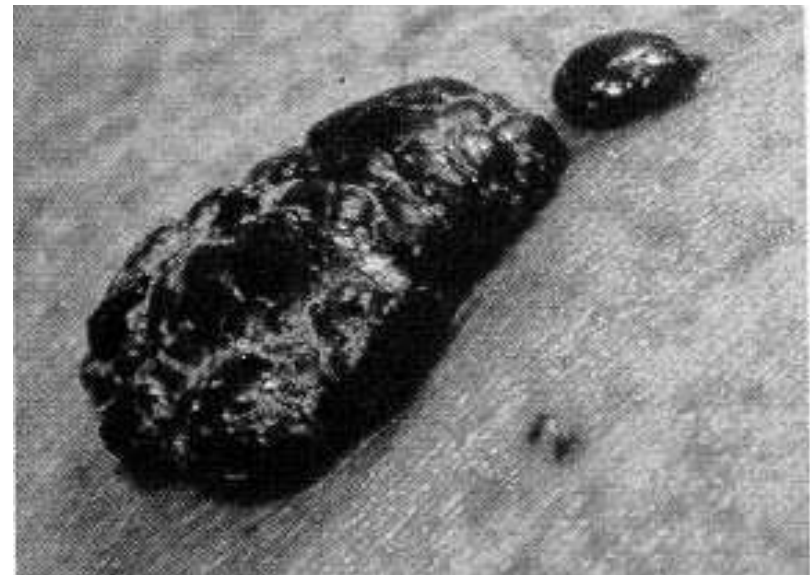
Zhoubný melanoblastom

Je nejzávažnějším zhoubným nádorem kůže, v USA vzniká 44 tis. případů ročně a 7300 úmrtí každý rok (4% kožních nádorů). Má se za to, že poškození kůže opalováním v raném dětství má za následek vznik melanomu v dospělosti.

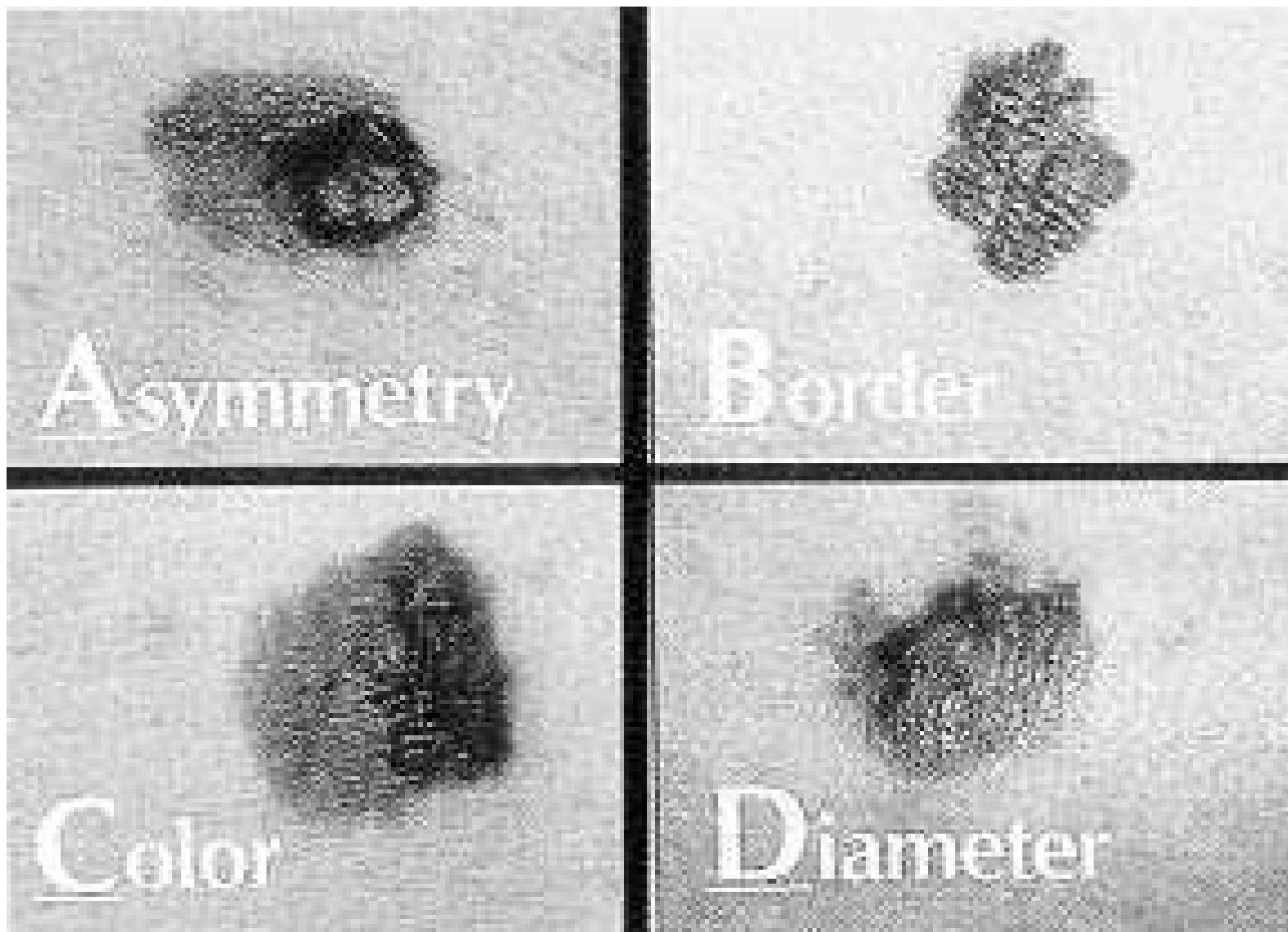
Varovné příznaky:

Melanom je tvořen melanocyty a může vzniknout z nebo v okolí znamínka nebo také úplně mimo. Je proto třeba sledovat počet a stav znamínek na těle. Nejčastěji vzniká na zádech a nohách u žen, na zádech u mužů. Je třeba si všimnout:

- a) změny ve velikosti a barvě znamínek obecně
- b) změny ve velikosti a barvě tmavších částí (hrbolků, uzlíků, skvrn)
- c) šupinatění, hnisání, krvácení, změny v hrbolcích nebo uzlinkách
- d) změny v citlivosti, svědění, bolest



Zhoubný melanoblastom



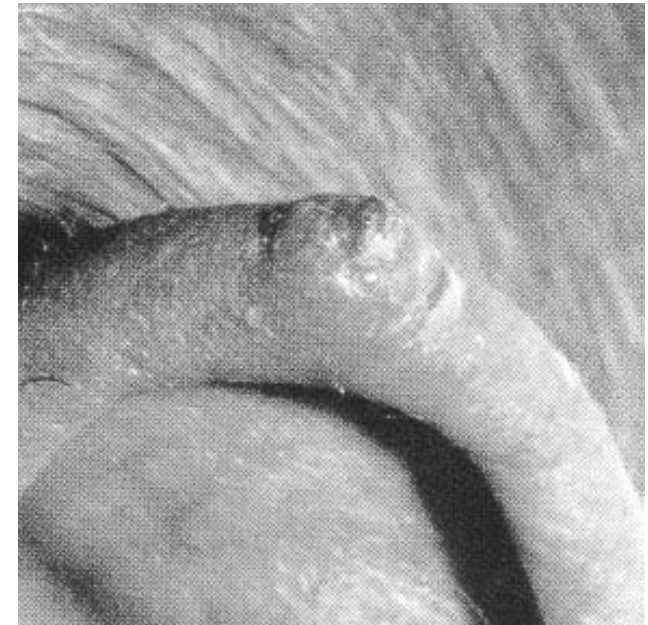
Další zhoubné nádory kůže

Basaliom – je nejčastější (80% kožních nádorů), objevuje se jako malý masitý hrbolek na krku nebo na hlavě, neroste rychle a metastazuje zřídka, může proniknout pod kůži do kostí a způsobit těžké místní poškození tkání. Postihuje častěji osoby se světlou barvou kůže

Karcinom – 16% kožních nádorů, na kůži se vyskytuje obvykle spinocelulární karcinom, světlá kůže je opět častěji postižená, metastazuje. Objevuje se ve formě červených nebo růžových šupinatých uzlíků. Uprostřed může vznikat hnis.

Obvykle se objevuje na rtech, vnější straně rukou, okrajích uší a dalších oblastech exponovaných slunečnímu záření.

Pravděpodobnosti vyléčení je 95% u těchto typů nádorů, 80% úmrtí je na melanom.



Modelování vzniku zlomů DNA

Modelování DNA – existují modely struktury DNA, které umožňují stanovit přístupná místa. Je několik přístupů – lze určit tzv. Van der Waalsův povrch a „dostupný povrch“ (nemusí být shodné).

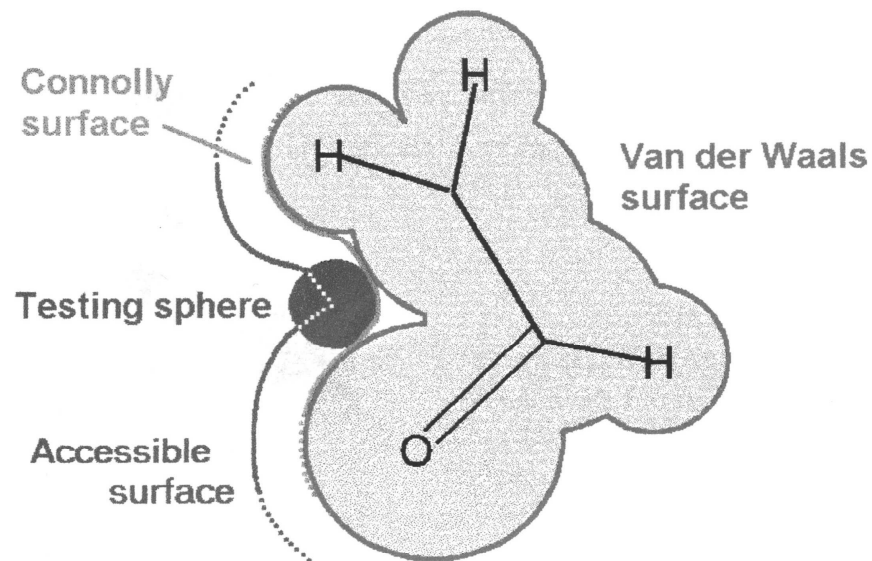
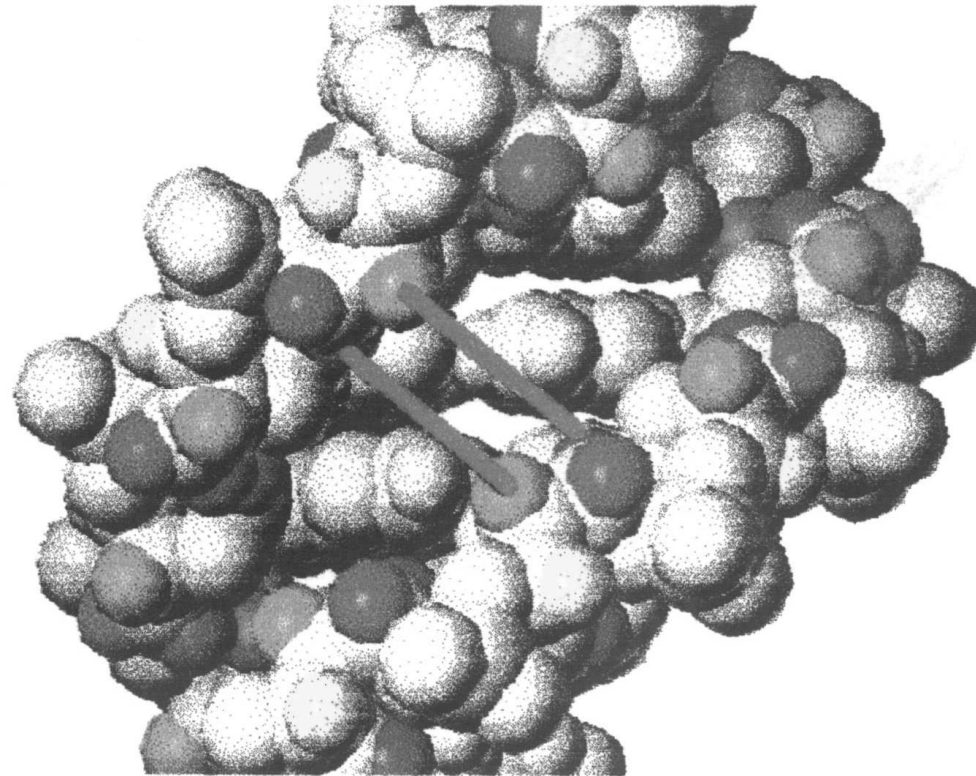


Figure 2.6: Different types of molecular surfaces (drawn after <http://scsg9.unige.ch/fln/eng/partie1b.html#a2>).

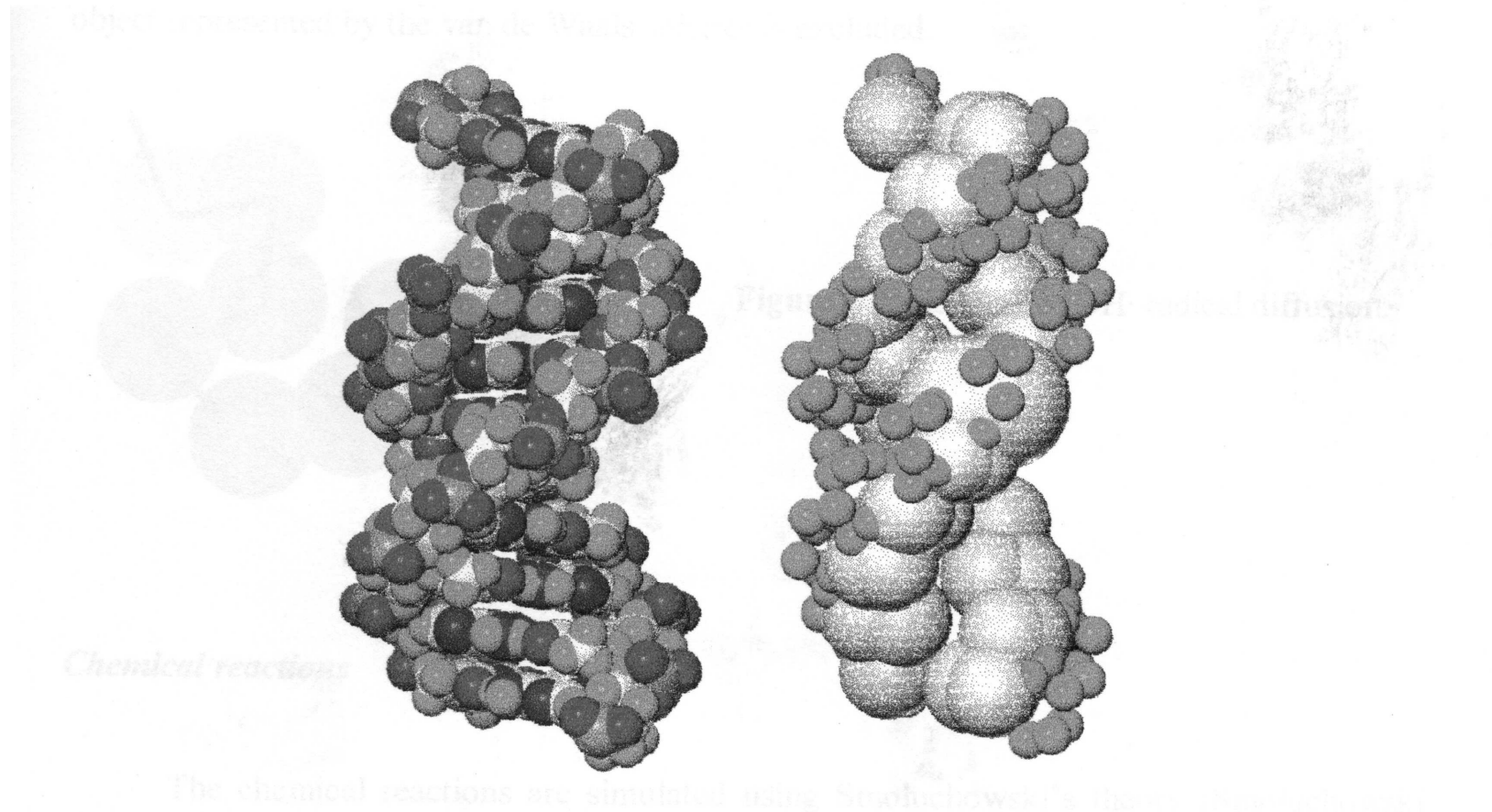
Výpočet produkce zlomů DNA

Modelování DNA – na obrázku jsou znázorněny atomy H4', H5'1 a H5'2 jako zelená, žlutá a fialová – je vidět jejich přístupnost v úzkém žlábků DNA



Výpočet produkce zlomů DNA

Modelování DNA – na obrázku je van de Waalsův model (vlevo) a model s reakčními sférami (vpravo), v němž jsou poloměry úměrné reakčním rychlostem.



Výpočet produkce zlomů DNA

Modelování působení OH radikálu na DNA – na obrázku DNA a pohybující se radikál, který ji zasáhne.

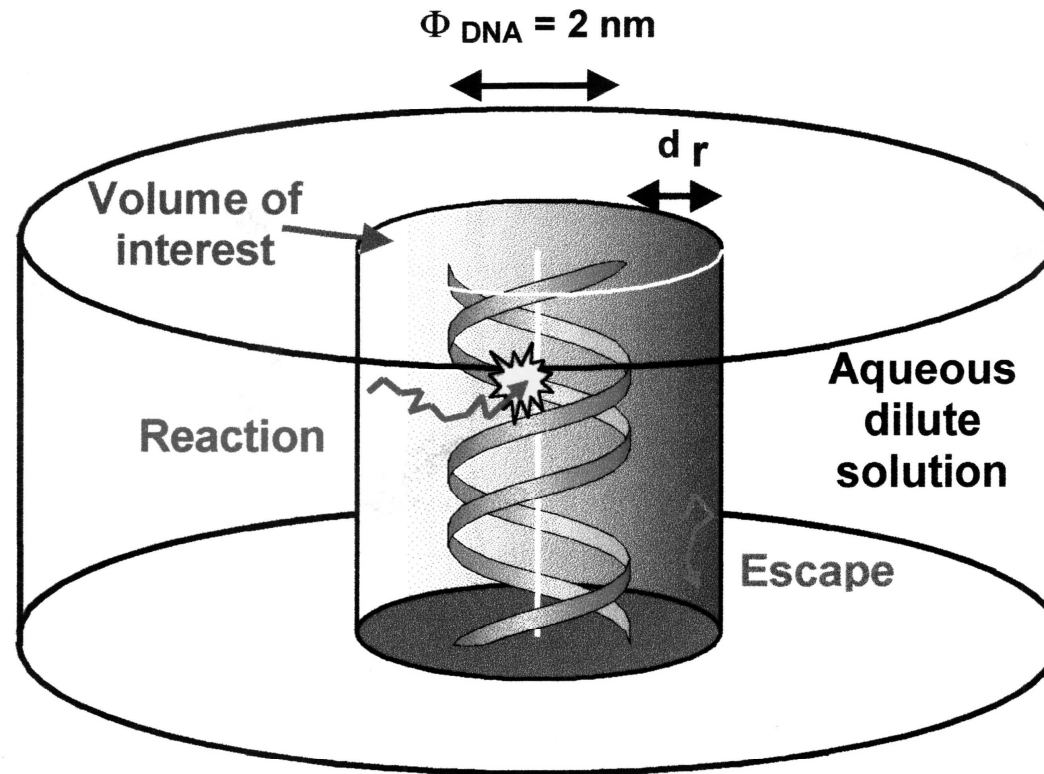
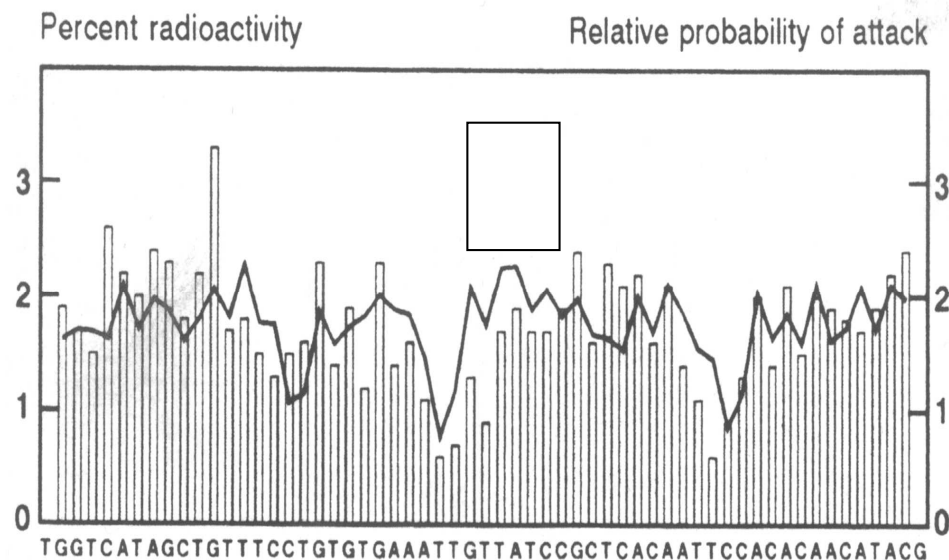


Figure 2.10: Scheme describing the theoretical model RADACK.

Výpočet produkce zlomů DNA

Závislost pravd. vzniku zlomu na složení DNA –fragment DNA a analyzována produkce zlomů v daném místě. Pravděpodobnosti závisí na složení – v blízkosti TTG, TTC jsou minima. Křivka představuje teoretický výpočet.



Výpočet produkce zlomů DNA

Vznik zlomů DNA v tetraplexech – vlevo je struktura DNA vytvářející tetraplex, vpravo je pravděpodobnost vzniku zlomů podél DNA (experiment a teoretická předpověď).

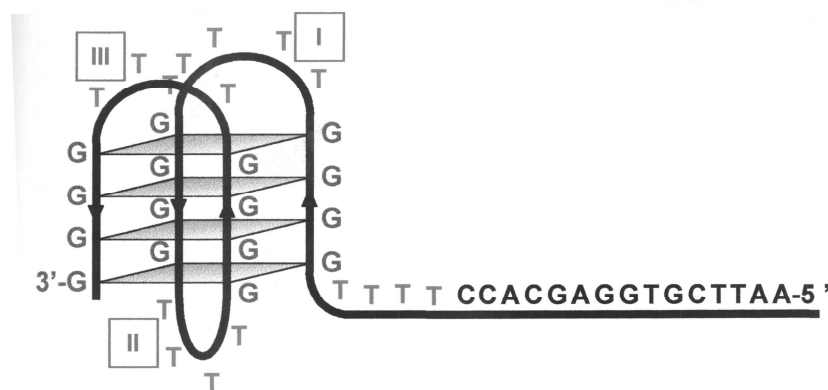


Figure 3.9: Schematic drawing of the unimolecular oligonucleotide with the $(G_4T_4)_4$ sequence in quadruple helix structure (Tartier *et al.* 1998).

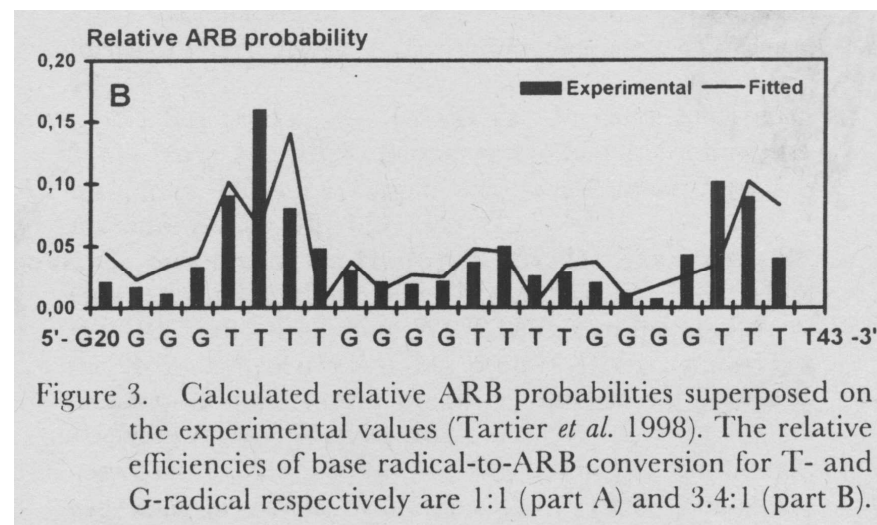
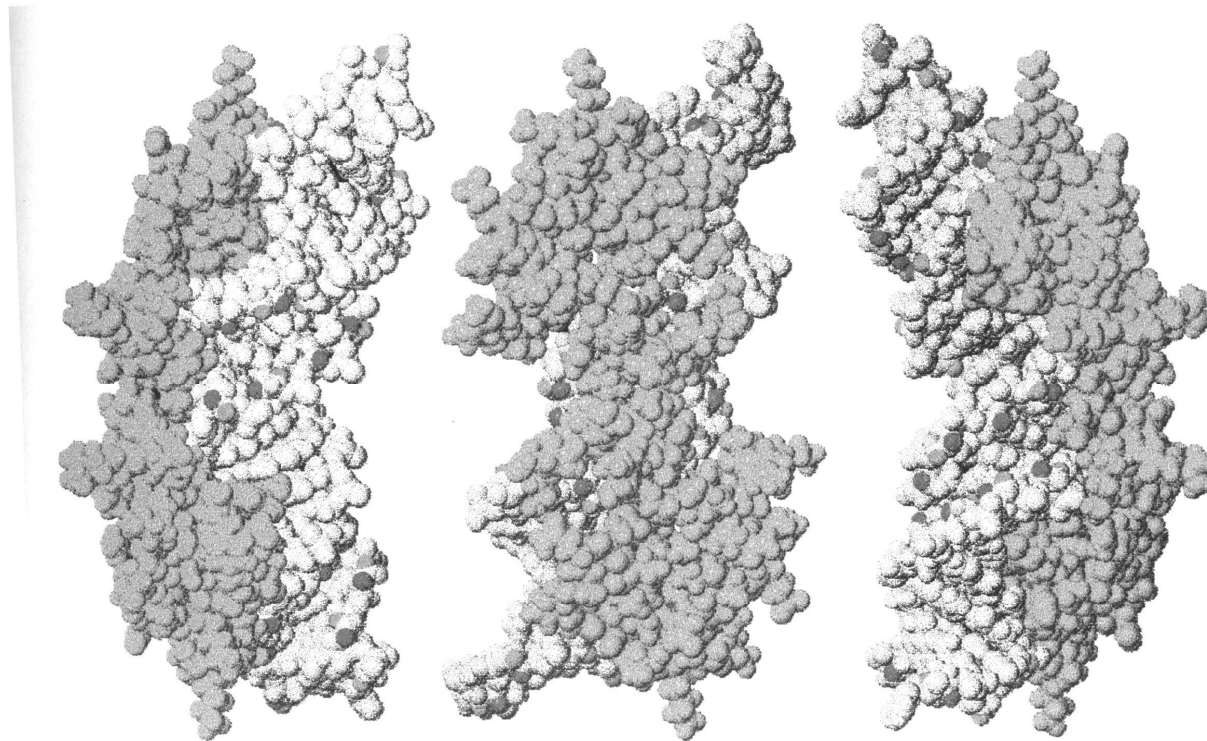


Figure 3. Calculated relative ARB probabilities superposed on the experimental values (Tartier *et al.* 1998). The relative efficiencies of base radical-to-ARB conversion for T- and G-radical respectively are 1:1 (part A) and 3.4:1 (part B).

Výpočet produkce zlomů DNA

Vznik zlomů DNA v komplexu s proteinem – na obrázku je část řetězce DNA v komplexu s lac represorem, jsou zde opět znázorněny atomy vodíku v polohách H4 a H5.



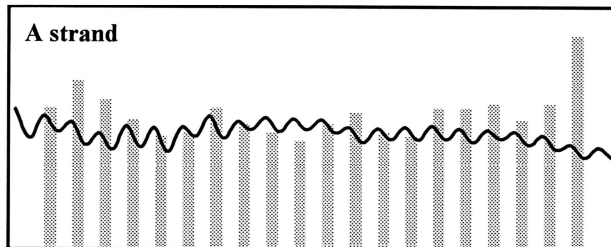
Výpočet produkce zlomů DNA

Vznik zlomů DNA v komplexu s proteinem – vznik zlomů pro volnou DNA a DNA s represorem (vpravo). Je vidět, že s represorem jsou pravděpodobnosti značně odlišné.

FSB

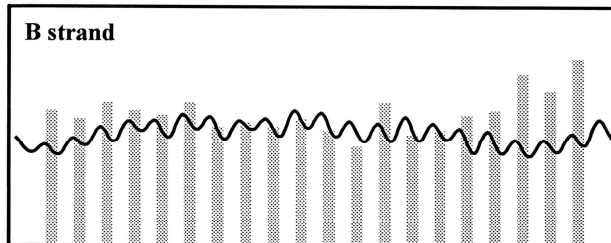
Naked DNA

G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T



G A A T T G T G A G C G C T C A C A A T T

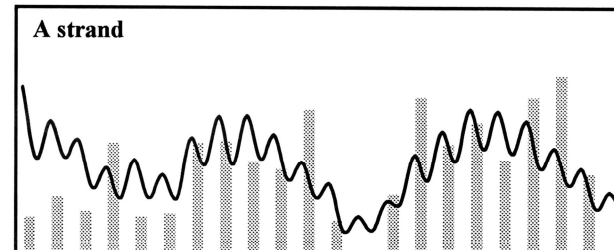
C T T A A C A C T C G C G A G T G T T A A



C T T A A C A C T C G C C T A T T G T T A A

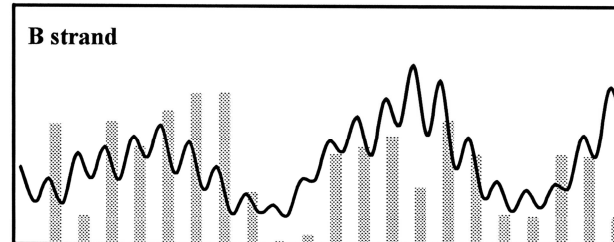
DNA-protein complex

G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T



G A A T T G T G A G C G C T C A C A A T T

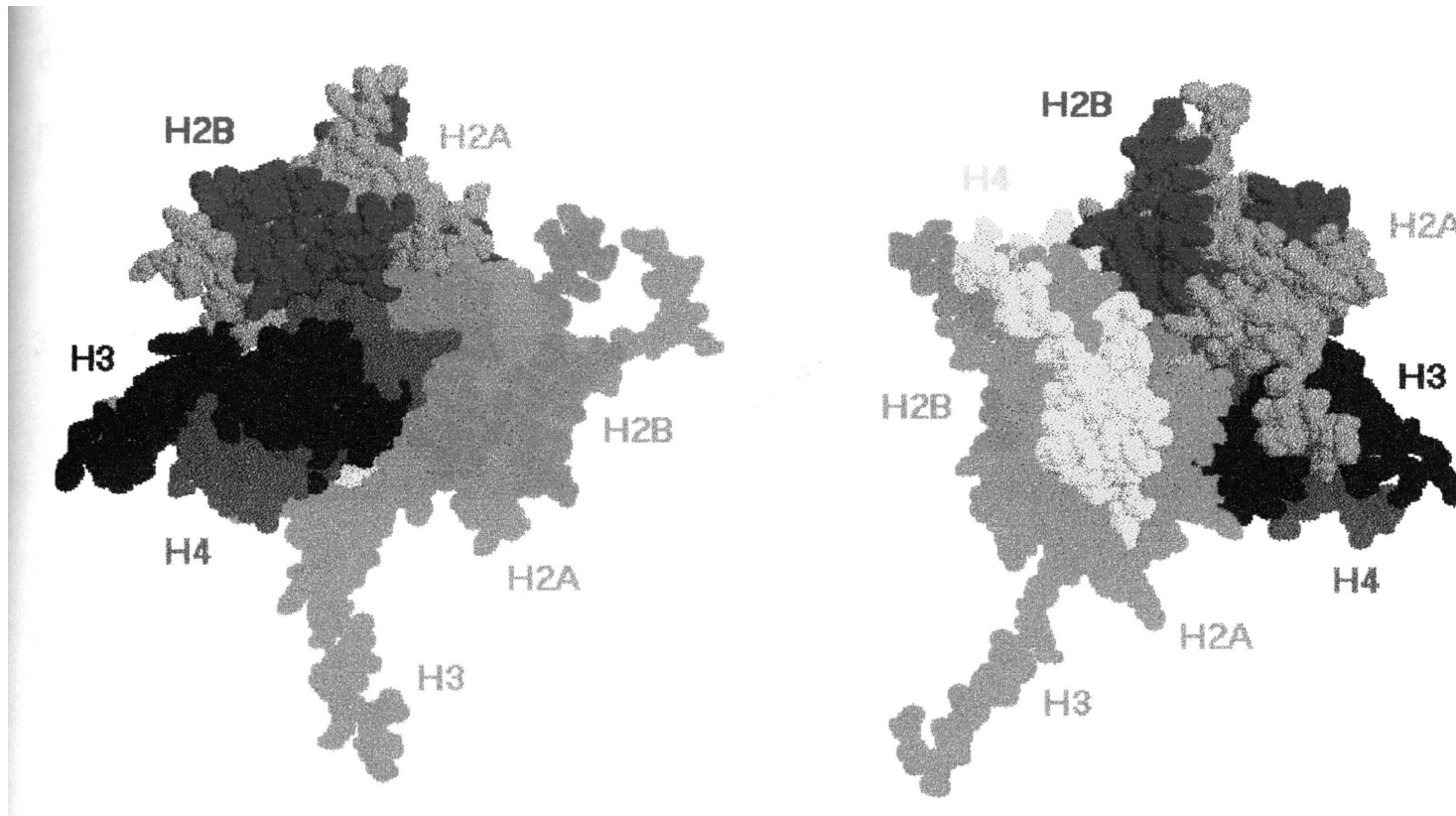
C T T A A C A C T C G C G A G T G T T A A



C T T A A C A C T C G C C T A T T G T T A A

Výpočet produkce zlomů DNA

Vznik zlomů DNA v komplexu s histony (nukleosomy) – na obrázku jsou dva pohledy na oktamer histonů.



Výpočet produkce zlomů DNA

Vznik zlomů DNA v komplexu s histony (nukleosomy) – produkce zlomů závisí na přítomnosti nukleosomů. Teorie a experiment jsou ale poněkud posunuty.

