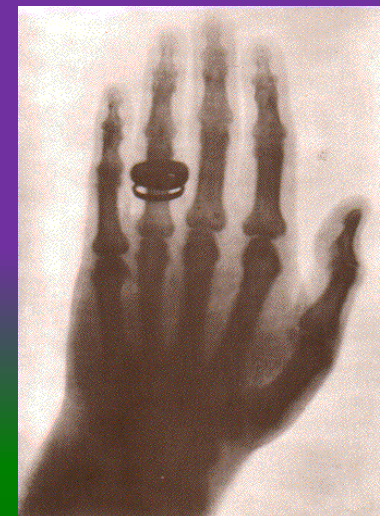


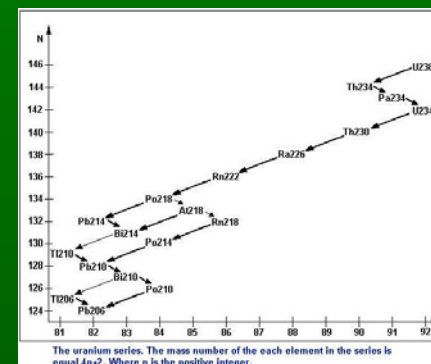
Objev radioaktivního záření

Wilhelm Roentgen 1895 – objev X záření
V listopadu 1895, na Universitě ve Wurzburgu, zkoumal Wilhelm Roentgen světélkující fluorescenční stínítko. Fluorescence v něm byla indukovaná katodovými paprsky, jež vznikaly po dopadu elektronů na katodu ve vakuové trubici (obr. 21). Zjistil, že fluorescence nemizí ani při zaclonění trubice černým papírem a usoudil, že se jedná o neviditelné záření nazvané později paprsky X (Roentgenovy paprsky). Když vložil Roentgen mezi lampu a stínítko ruku, uviděl ke svému velkému překvapení kosti prstů.



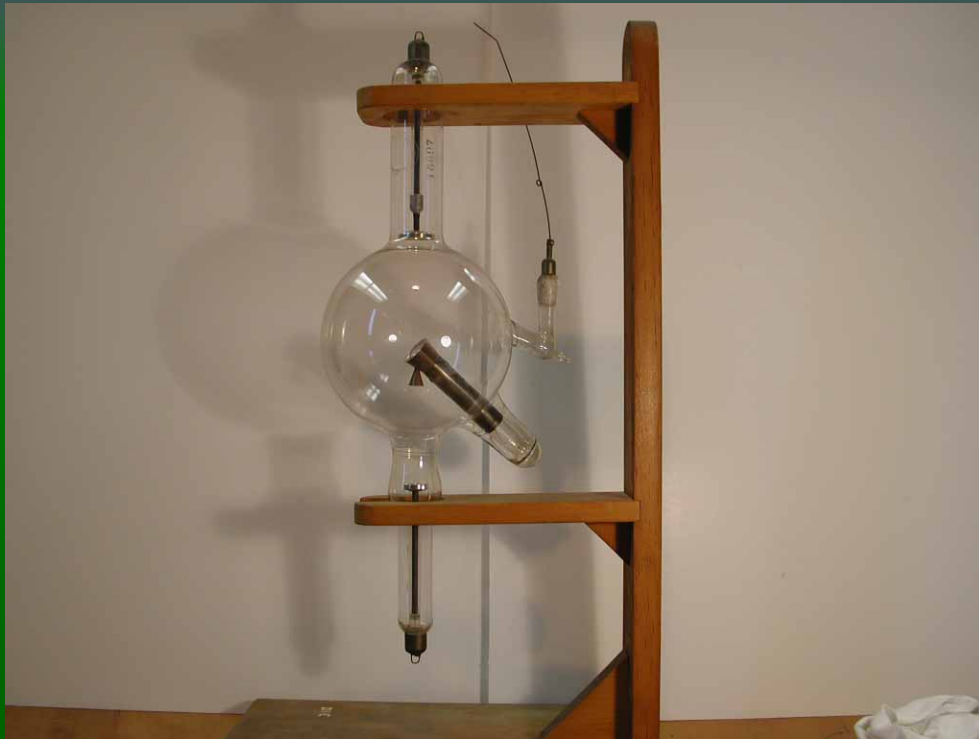
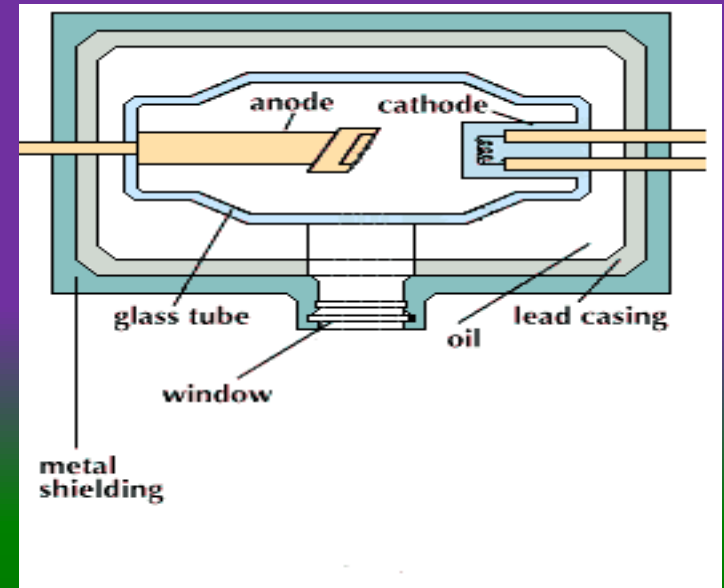
Henri Becquerel 1896 – přírodní radioaktivita,
vystavoval uranovou rudu slunečnímu světlu a
zkoumal luminiscenci

Marie a Pierre Curie – studovali
uranovou rudu a její záření,
objevili radium a polonium



Roentgenovo záření

Vzniká v rentgence při dopadu elektronů na anodu nebo antikatu. Většinou anoda slouží pro vytvoření elektrického pole a vkládá se další elektroda – antikata pro dopad elektronů, kde se tvoří záření.



Dole je anoda, nahoře katoda, uprostřed antikata odkud vychází záření

Druhy záření

Elekromagnetické záření – různé druhy dle vlnové délky,
patří zde γ -záření

Částice – nabitě a neutrální, přírodní radioaktivita α a β

Elekromagnetické záření

- 1) **radiové vlny** – zdrojem jsou elektrické obvody
- 2) **mikrovlny** – magnetron v troubě (rezonance v dutině vyvolaná proudem elektronů)
- 3) **infračervené světlo** – vzbuzené atomy (zahřátím), žárovky, Slunce
- 4) **viditelné světlo** (380-760nm) – buzení atomů na větší energii (teplo, proud elektronů), známé zdroje světla (žárovky, zářivky, výbojky, Slunce apod)
- 5) **ultrafialové záření** – A (320-380 nm), zdroje jsou halogenové výbojky, UV zářivky, Slunce
- 6) **ultrafialové záření** – B (280-320 nm) jako UV A (na Zemi neprojde přes ozonovou vrstvu)
- 7) **ultrafialové záření** – C (<280 nm, do oblasti nm) zdroje – jako UV A, Slunce, může ionizovat
- 8) **záření X** (nm - desetiny pm)– Roentgenová trubice (charakteristické a brzdné), elektronový synchrotron
- 9) **gamma záření** – atomové jádro, vesmírné záření (od pm do setin pm)

Partikulární záření (nabité nebo neutrální částice)

- 1) **Jádra všech prvků** a jejich izotopů (protony, deuterony, atd). Částice mohou mít kladný i záporný náboj (podle počtu elektronů)
- 2) **Elementární částice** – leptony, mesony a baryony

Leptony – elektron a positron, neutrino a antineutrino, miony

Mesony – meson pí, meson K

Baryony – proton, neutron, hadrony

Zdroje záření

Přírodní – terestriální záření (rozpadové řady)
kosmické záření (sluneční a galaktické)

Umělé – reaktory, urychlovače, terapeutické
ozařovače, atomové bomby atd

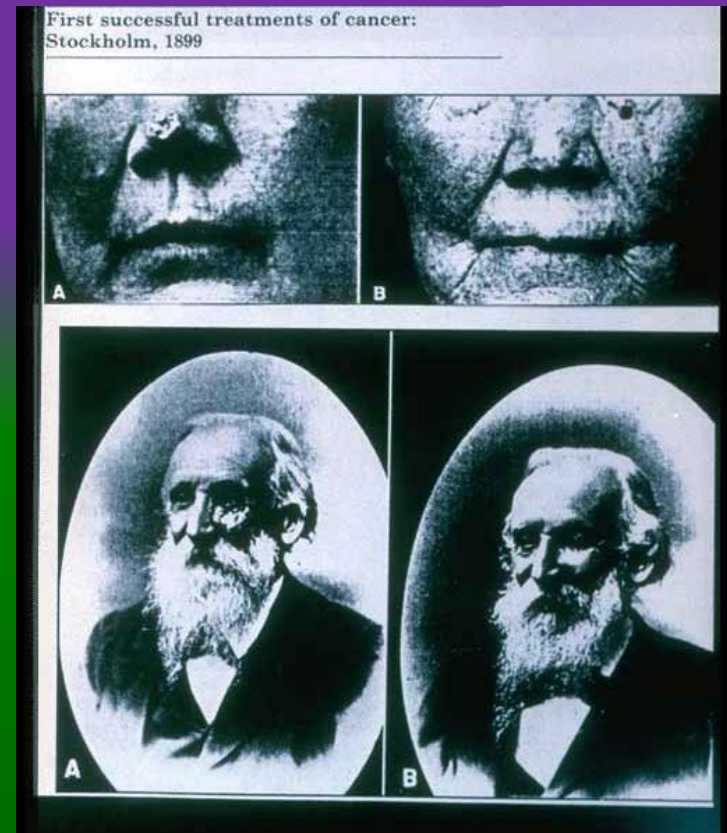
Záření vždy bylo a je **součástí životního prostředí** člověka. Existuje celá řada zdrojů radioaktivního záření a lze je dělit z různých hledisek. Nejčastěji se používá dělení na přírodní a antropogenní zdroje. Mezi přírodní zdroje patří zejména **terestriální záření**, které vzniká většinou z rozpadových řad a **kosmické záření**. Člověk vytvořil mnoho zdrojů záření: od **Roentgenovy lampy, přes reaktory a urychlovače až po terapeutické ozařovače**. V praxi se záření používá v řadě oblastí lidské činnosti jako např. v energetice, výzkumu, medicíně, apod. Popíšeme stručně nejčastější zdroje ionizujícího záření.

Co přineslo záření člověku – léčebná terapie

Prakticky od objevu radioaktivního záření je toto záření využíváno k **léčbě nádorových onemocnění.**

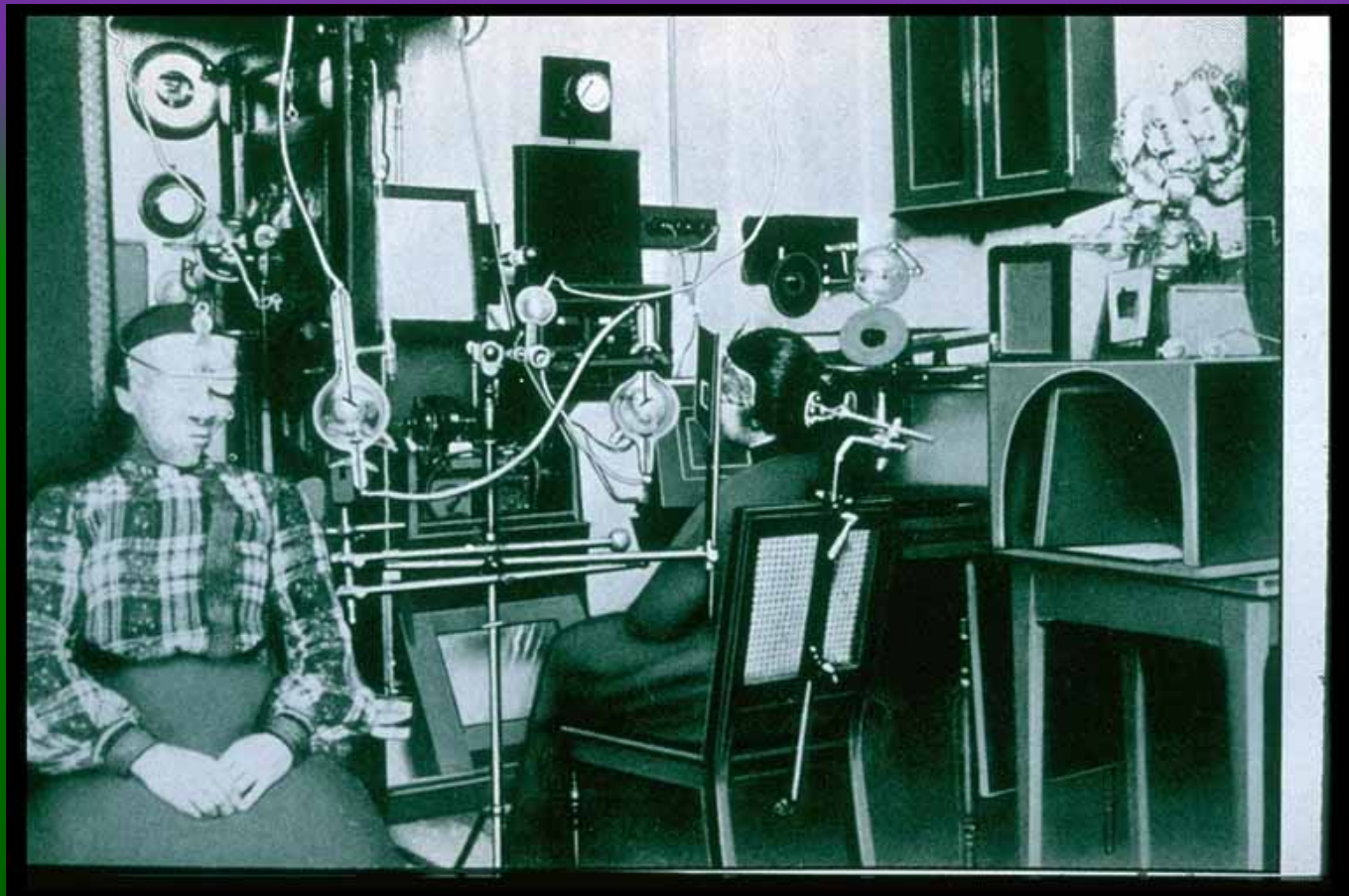
První úspěšná léčba byla uskutečněna u 49-leté pacientky s basaliomem kůže na nose. Pacientka byla ozařována ve více než 100 frakcích, v průběhu 9 měsíců. Poté žila ještě 30 let.

Vespod je pacient, u něhož byl vyléčen spinocelulární karcinom. Mnoho pacientů v té době žaslo nad blahodárným vlivem záření. Nutno zdůraznit, že bez ozařování by většina z nich beznadějně zemřela.



Co přineslo záření člověku – léčebná terapie

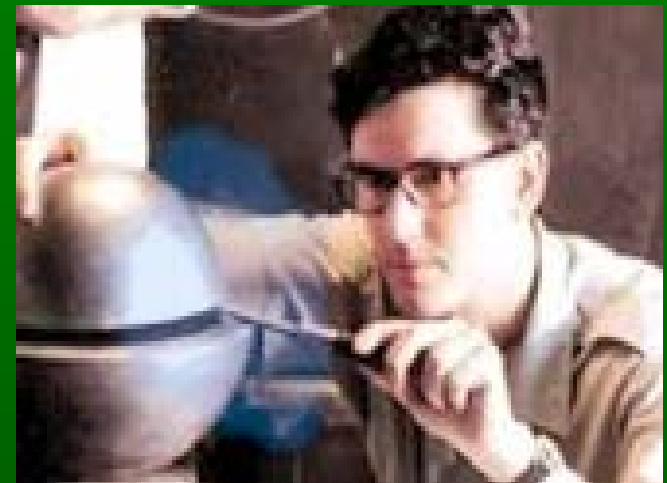
Na začátku 20. století byla terapie zářením prováděná velmi jednoduchým způsobem. Na obrázku je Riederová terapeutická místnost v Mnichově – současně bylo ozařováno několik pacientů. Terapie byla doprovázena jiskrami, praskáním a kouřem, ale byla účinná.



Škodlivé účinky záření

Experimenty se zářením. Kromě léčebných účinků se brzo přišlo na to, že záření může člověku velmi vážně ublížit. Sama Marie Curie na svou práci se zářením doplatila. Již v roce 1920 pocítovala silnou únavnost a závratě. V roce 1930 onemocněla nevléčitelnou anémií a 4 roky poté zemřela v horském sanatoriu, kde byla léčená. Vzhledem k neviditelnosti záření však mnozí dlouho nechápali jeho škodlivost nebo ji brali na lehkou váhu.

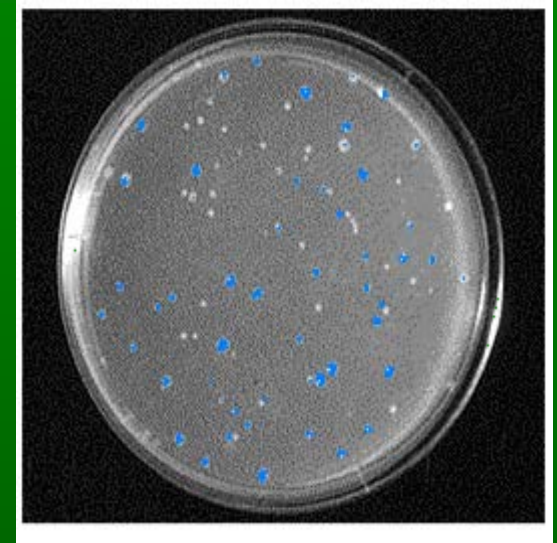
Tak v období studené války došlo k řadě případů **zneužití záření** a jak v Rusku, tak v USA. Dokumentuje to zpráva D.O.E. „Human Radiation Experiments“. Tak např. byl v průběhu 2 let podávána 829 ženám plutoniový koktejl s komentářem typu – budete se cítit lépe. Fyzici mnohdy pracovali s nadšením bez ohledu na své zdraví i zdraví jiných. Tak např. dr. Slotin zemřel po experimentování se dvěma hemisférami plutonia, které ručně posunoval k sobě dokud neucítil atomovou reakci. Když mu sjel šroubovák, reakce přešla v intenzívní záři a Slotin oddělil obě hemisféry ručně od sebe. Zemřel po 9 dnech.



Vznik bodových mutací po ozáření

Přímé a zpětné mutace. U přímých mutací dochází ke ztrátě funkčního proteinu v důsledku změny genetického kódu. Tyto mutace lze detekovat na vhodných půdách, např. mutace $lac^+ \rightarrow lac^-$ lze detekovat na půdě s tetrazoliem, mutace v $lacI$ genu (což je represor lac systému) lze detekovat na půdě s X-galem, což je substrát pro β -galaktosidázu. Defekt v $lacI$ genu vede ke vzniku konstitutivní mutace a syntéze galaktosidázy i bez přítomnosti laktózy. X-gal způsobuje modré zbarvení mutovaných buněk. Tato metoda je vhodná pro detekci malého počtu mutací, neboť modré kolonie jsou vidět na pozadí velkého počtu bílých kolonií. Při pozorování pod mikroskopem lze detekovat několik mutovaných kolonií na 10^5 normálních (bílých) kolonií.

U zpětných mutací se používají půdy, na kterých původní buňky nerostou (např. pro bakterie s defektem v syntéze histidinu se použije minimální půda bez histidinu. Protože pro fixaci mutací je potřeba, aby se buňky alespoň několikrát podělily, přidává se nepatrné množství aminokyseliny.



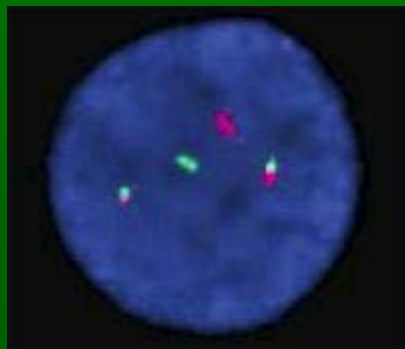
Vznik aberací po ozáření

Detekce aberací (standardní experiment):

- 1) izolace lymfocytů (odběr od donora, centrifugace a separace na ficolu, příprava na ozařování)
- 2) resuspendování do média, stimulace k dělení, kultivace 48-72 h, zastavení cyklu colcemidem, hypotonický roztok, fixace kyselinou octovou a metanolem, kapání na vymražené sklíčko, BUdR – lze odlišit první mitózu (světlá a tmavá část chromatidy)
- 3) barvení (Giemsa nebo FISH) pozorování pod mikroskopem, vyhledání mitóz a jejich vyhodnocení

Na obrázku je příklad aberace typické pro záření – **dicentrik** se dvěma páry fragmentů.

Dole – translokace v interfázi.



Účinek záření na organismy

Rozlišujeme **deterministické účinky** – existuje práh, velké dávky, rychlý nástup

Stochastické účinky – bezprahovost, malé dávky, pozdní efekt

Účinek záření na tkáň lze vysvětlit přežitím kmenových buněk tkáně (určitá reakce tkáně odpovídá určité hodnotě přežití). Podobně účinek záření na úrovni organismu **lze redukovat na poškození určité tkáně, tedy opět na přežití buněk.**

Akutní nemoc z ozáření – rozlišujeme tři formy podle velikosti dávky a podle příznaků: - dřevňová forma (poškození krvetvorby)

- gastrointestinální forma (poškození střevního epitelu)
- neurovaskulární forma (poškození cév mozku)

Stochastické účinky zahrnují **kancerogenní působení záření** a **genetické účinky** (vliv záření na zárodečné buňky a plod).

Stochastické účinky záření na organismy

Karcinogeneze – zdroje informace jsou experimentální zvířata, transformace buněk, ozářená populace lidí (náhodně, v uranových dolech, v domcích s radonem, po Černobyli, po bombardování Hirošimy a Nagasaki).

Zhoubné nádory jsou charakterizovány:

- transformaci buněk, které nereagují na kontrolní mechanismy regulující růst
- schopností invazivního růstu
- tvorbou metastáz

Vznik nádorů – uznávaná je tzv. klonální teorie, kdy nádor vzniká z jediné buňky, jež změní své genetické vlastnosti tak, že má růstovou výhodu a vytvoří klon. V něm dojde k další mutaci atd. tak, až se odblokují reakce na okolní kontrolní signály a dojde ke nekontrolovanému dělení.

Ve prospěch **jednobuněčné teorie** svědčí – podobnost nádorových buněk co se týče enzymatické a genetické výbavy, přítomnost imunoglobulinů. V průběhu progresu nádoru dochází ke vzniku dalších subklonů s odlišnou genetickou výbavou.

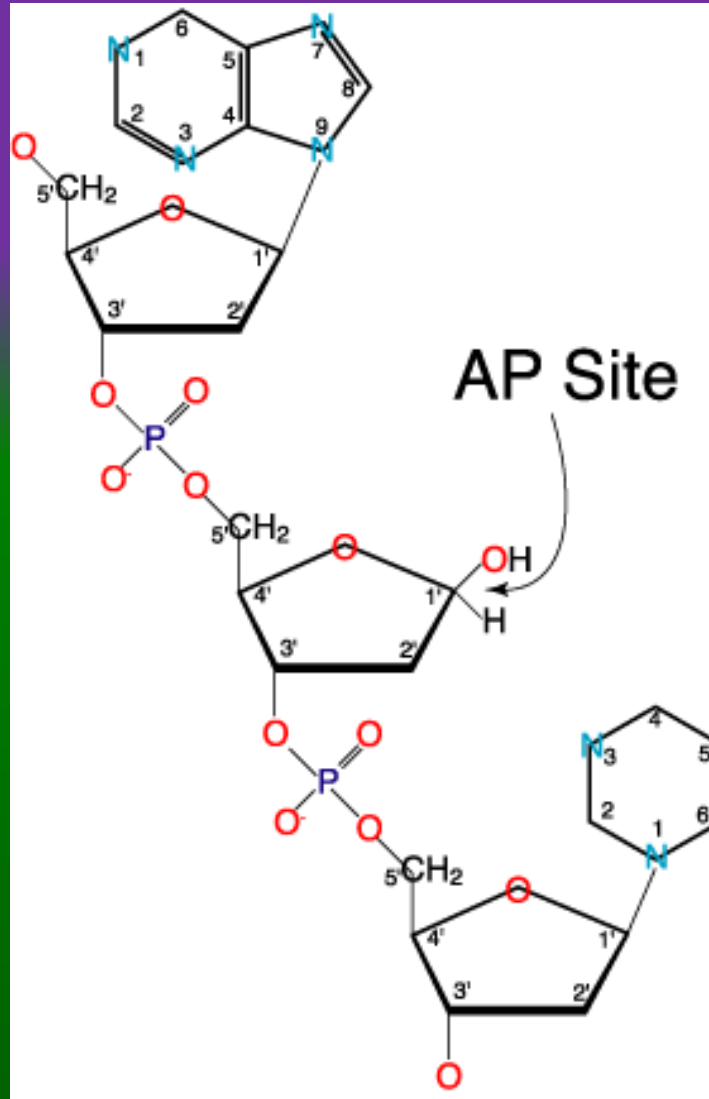
Radiolýza DNA – detekce zlomů v DNA

Jednou 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.

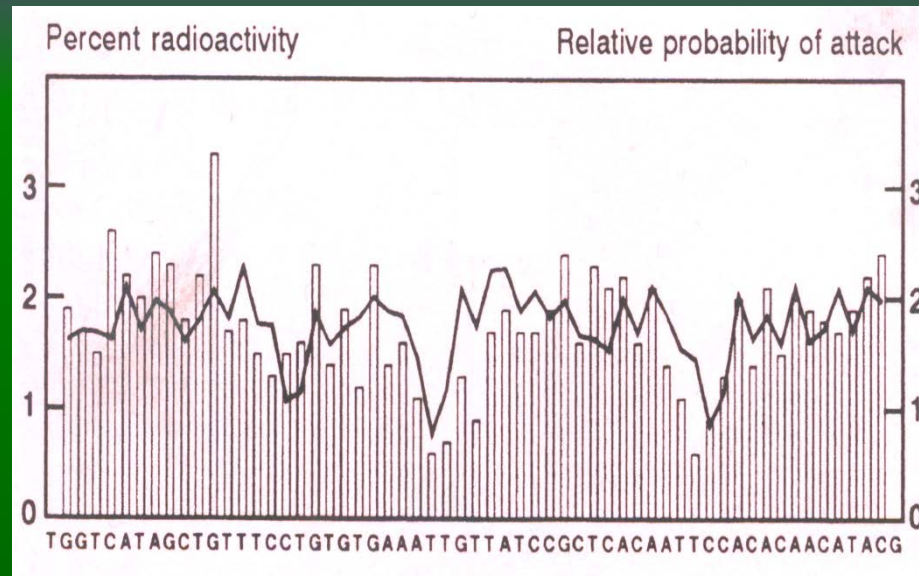
Typy poškození bází

Ztráta báze



Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

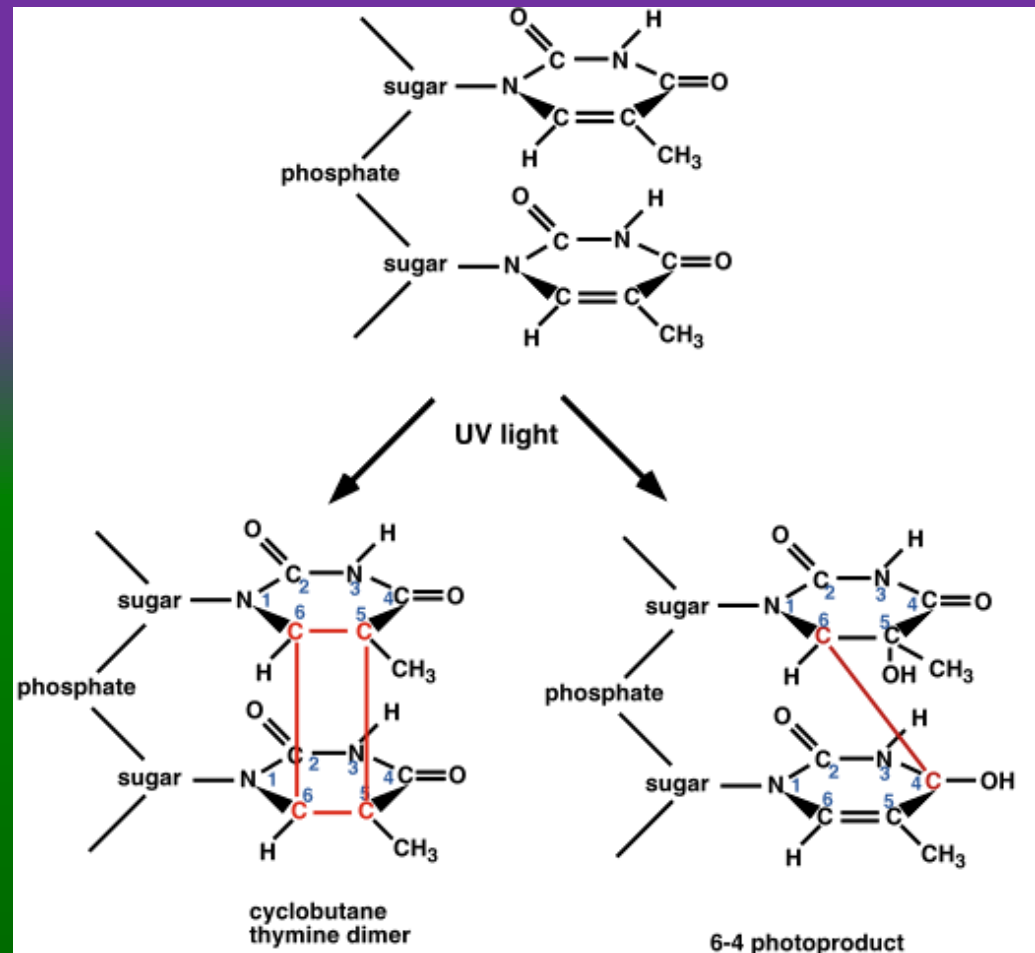
Závislost pravd. vzniku zlomu na sekvenci DNA – byl ozařován fragment DNA a analyzována produkce zlomů v daném místě. Pravděpodobnosti závisí na typu nuleotidů – v blízkosti TTG, TTC jsou minima. Křivka představuje teoretický výpočet.



Poškození DNA působením UV-zářením

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 replikace nebo zastavení replikace**. Proto se vyvinuly systémy reparace těchto poškození. Protože na Zemi žijeme v přítomnosti UV-zářením, vyvinula se řada systémů pro reparaci poškození způsobených tímto zářením.



Systemy opravy DNA

DNA je na rozdíl od proteinů, lipidů a sacharidů **unikátní molekula** v buňce. Molekuly, kterých je mnoho se mohou při poškození prostě zaměnit. Udržet DNA v originálním stavu je pro buňku jedna z hlavních úloh. Proto **existuje řada opravných mechanismů DNA.**

DNA je, na rozdíl od RNA, relativně stabilní molekula; je však vystavena mnoha poškozujícím vlivům:

- 1) **Teplota** – denaturace DNA, deaminace bází, ztráta bází glykosylickou hydrolýzou
- 2) **UV záření** – vznikají pyrimidinové dimery, 6-4 fotoprodukty
- 3) **Ionizující záření** – poškození bází, jejich fragmentace, zlomy
- 4) **Chemické modifikace** – indukují velký počet různých poškození v genomu

Oprava DNA byla první prozkoumána u *E. coli*. Byly testovány různé mutanty *E. coli* a bylo studováno působení **UV záření a vliv těchto mutací na opravné mechanismy.**

Nukleotidová excisní oprava

Excisní oprava pyrimidinových dimerů se uskutečňuje působením **uvrABC systému**.

Komplex uvrAuvrB skenuje DNA a vyhledává dimery.

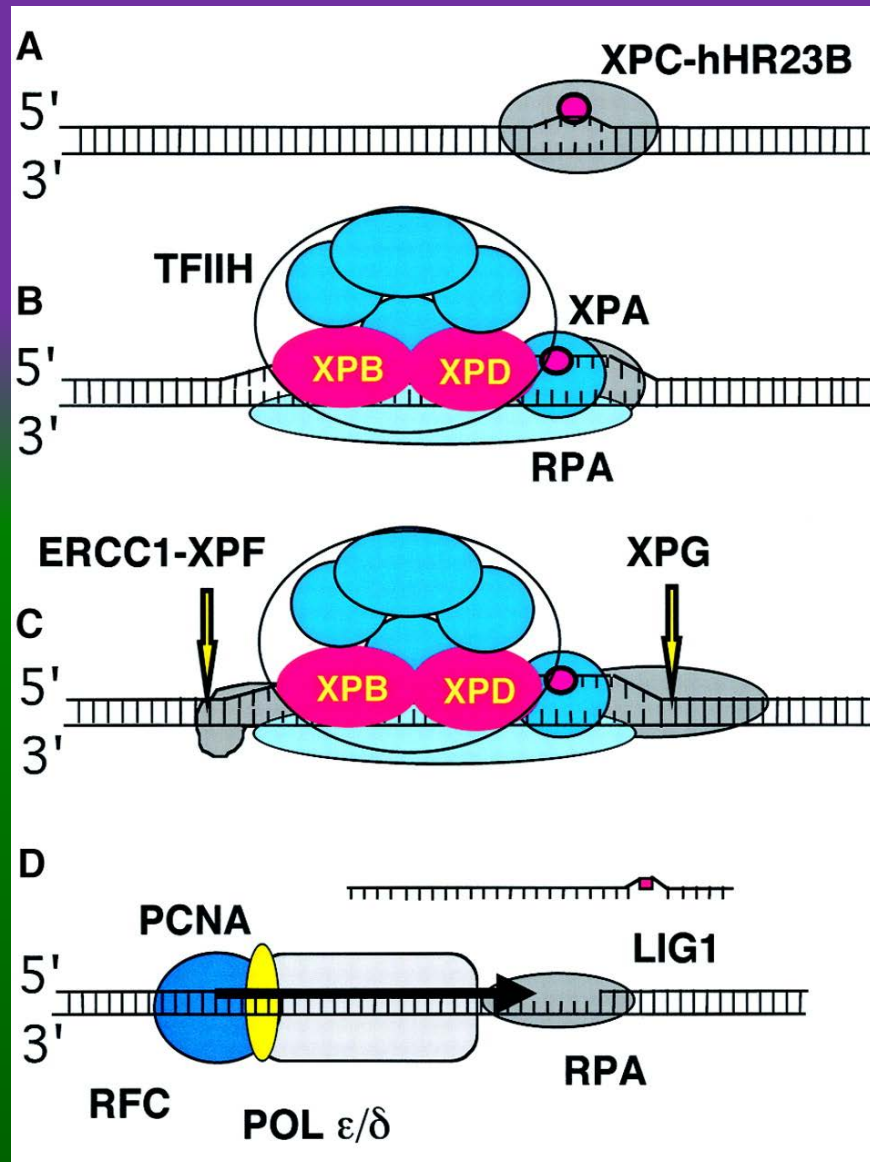
Při jejich nalezení dochází k odpojení uvrA proteinu) a k připojení uvrC. Je reakce závislá na ATP.

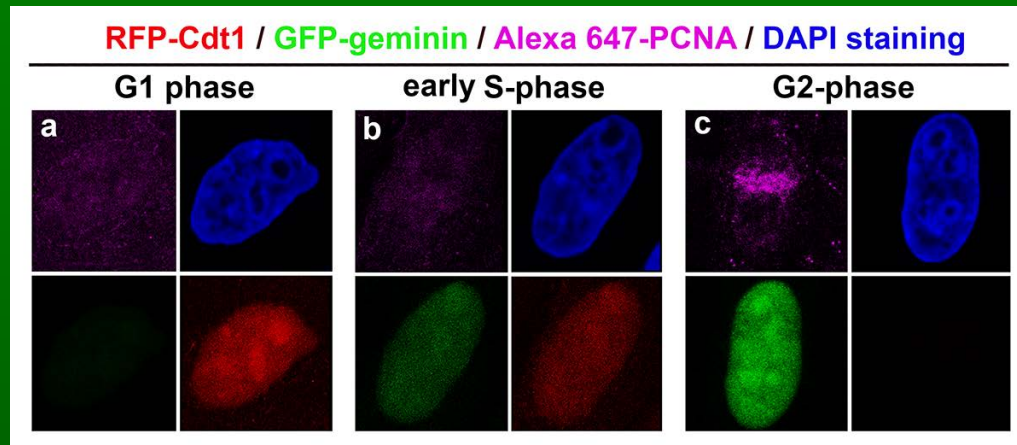
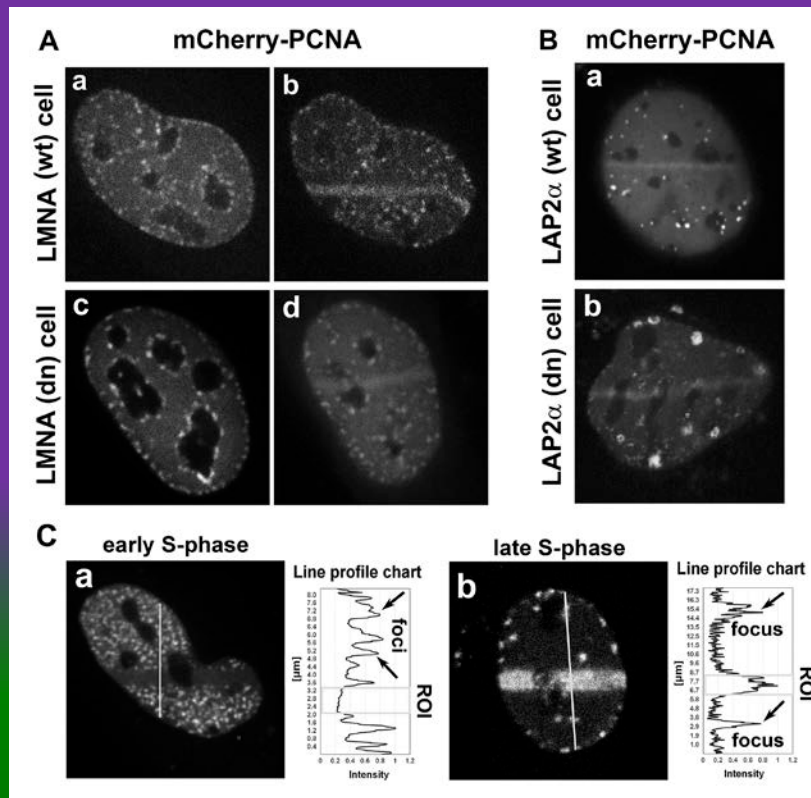
Tento komplex (**uvrBuvrC**) **štípne páteř DNA** v blízkosti dimeru.

Část řetězce je odstraněna uvrD proteinem – **helikázou II** za dodání energie z ATP

Další krok opravného mechanismu se uskuteční jako **prostá syntéza DNA za pomoci** polymerázy a ligázy.

Nukleotidová excisní oprava u člověka





Bázové excizní opravy (BER)

Dochází k odstranění poškozených bazí (nikoliv nukleotidů), kdy se nejprve hydrolyzuje N-glykosylická vazba mezi deoxyrobozou a cukrem a pak se odstraní báze DNA glykosylazou.

Vzniká AP místo (apurinové nebo apyrimidinové), které se opraví endonukleázou (štípe páteř DNA v blízkosti AP místa) a dRpázou (deoxyribofosfodiesterazou).

Vloží se nukleotid polymerázou a páteř se spojí ligázou.

DNA glykosylázy:

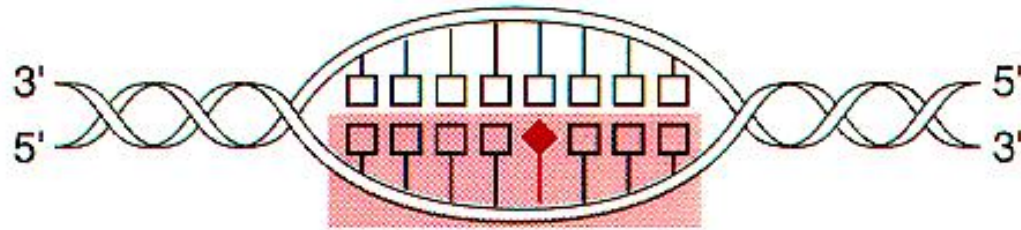
-Malé 20-30 kD, velmi specifické (např. uracil, hypoxantin, 3-metyladenin, hydroxymetyluracil apod), záření vyvolává např. 4,6-diamino-5-FAPY (formamidopyrimidin), který odstraňuje enzym genu fpg (30 KD). Hydroxymethyluracil vzniká rovněž působením záření nebo jiných oxidačních činidel

AP endonukleázy:

- Štípou fosfodiesterickou vazbu 3' nebo 5' od AP místa (podle toho existují 4 druhy endonukleáz (štípou buď na 3' straně nebo 5' straně od AP a vzniká 3'OH + 5'PO₄, 3'PO₄ + 5'OH).

- Dále jsou různé druhy endonukleáz, např. endo IV – mutanti citliví k alkylujícím činidlům (mitomycin C, bleomycin), endo V – degraduje DNA s uracilem, u člověka existují také AP endonukleázy

BASE EXCISION REPAIR

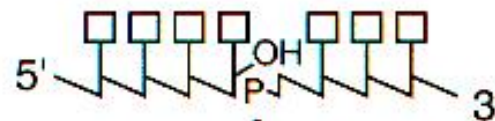


DNA glycosylase ↓ ①

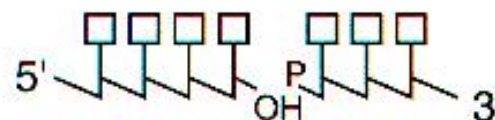


Free base excised

5' AP endonuclease ↓ ②

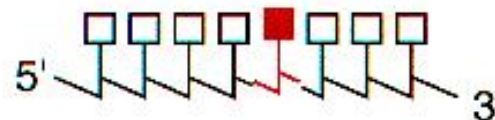


dRpase ↓ ③



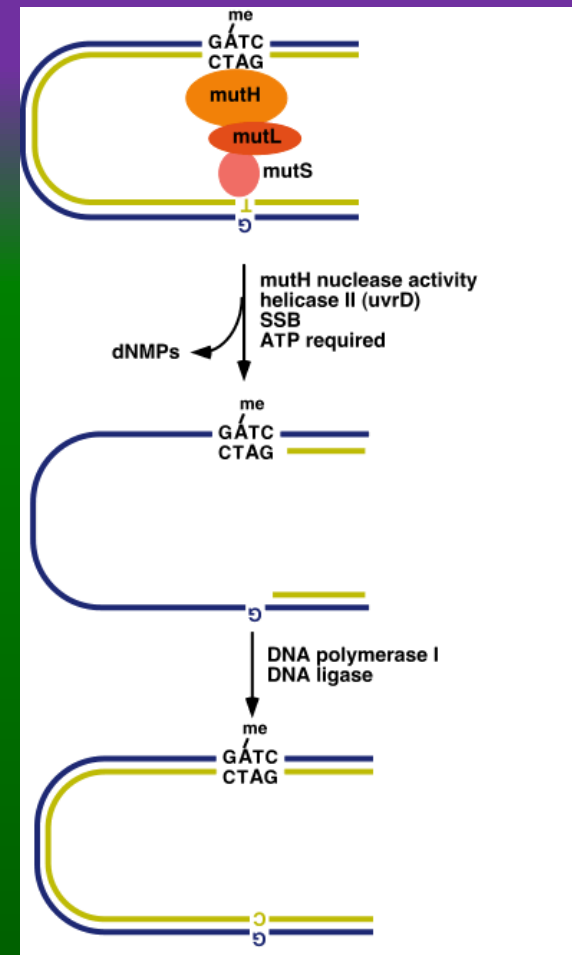
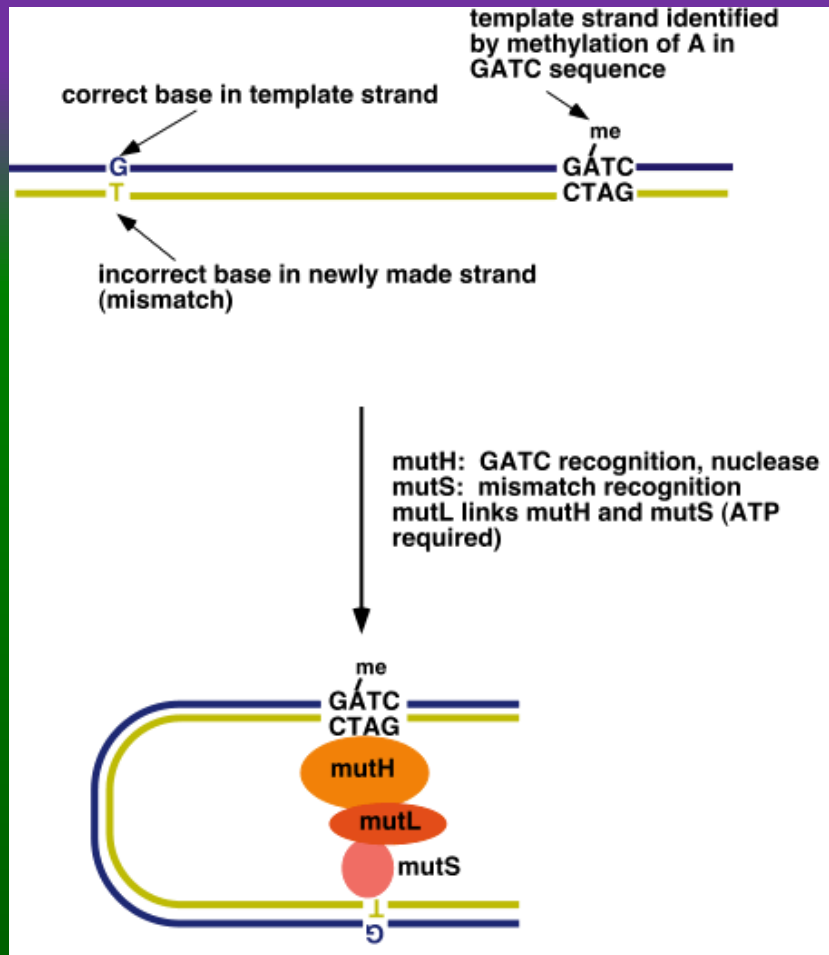
+ P-OH

DNA polymerase + DNA ligase ↓ ④



Mismatch repair

Po replikaci se při chybně vloženém nukleotidu oprava děje tzv. „mismatch repair“ s využitím genů mutHLS. mutH se váže na GATC sekvenci s metylovaným A – tím se pozná starý řetězec DNA, mutS se váže na nespárované místo. MutL spojí mutH a mutS a dojde k vyštěpení řetězce za pomoci helikázy (uvrD).



NHEJ reparace - DSBs

Proteiny, které se účastní:

DNA ligáza IV – kooperuje s XRCC4 na spojení konců po jejich patřičném opracování

XRCC4 - analog LIF1 genu u kvasinek – spojení konců

XRCC5 – analog HDF2 u kvasinek – označuje se nyní jako Ku80 – spolupracuje s Ku70 nasedá na konce a spojuje je

XRCC6 – analog HDF1, označuje se Ku 70, je velmi hojný tvoří heterodimer s Ku80, nasedá na konce a rozplétá částečně konce.

XRCC7 – DNA protein kináza – aktivuje Artemis

ARTEMIS – nukleáza regulovaná PKCs, připravuje konce pro ligázu.

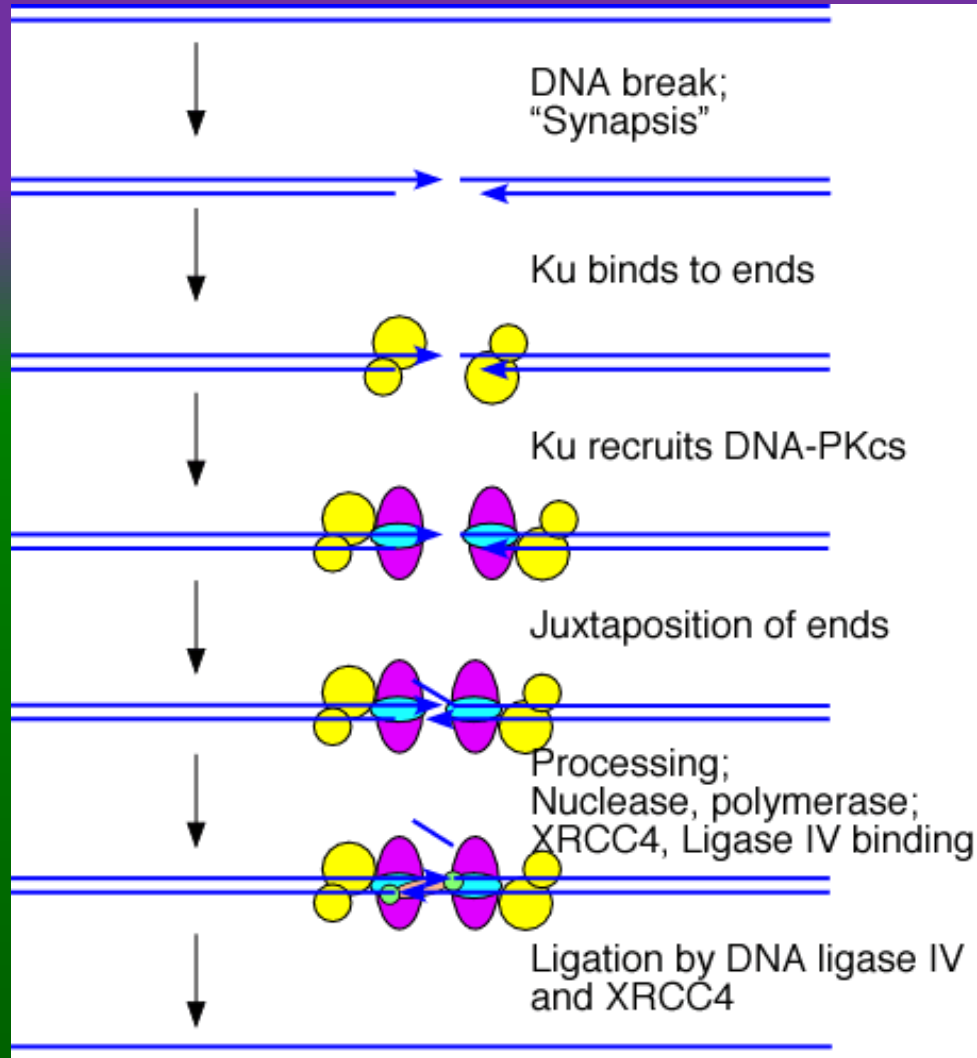
Mechanismus NHEJ:

Oba zlomy jsou podrženy pohromadě v tzv. synapsi následujícím způsobem:

- 1) Ku proteiny nasednou na konce zlomů a interagují mezi sebou (tj. drží konce u sebe)
- 2) Ku aktivují protein kinázu PKCs, která interaguje s ARTEMIS endonukleázou a aktivuje ji, aby upravila konce DNA
- 3) Po úpravě se konce spojí – účastní se DNA ligáze IV a XRCC4 protein.

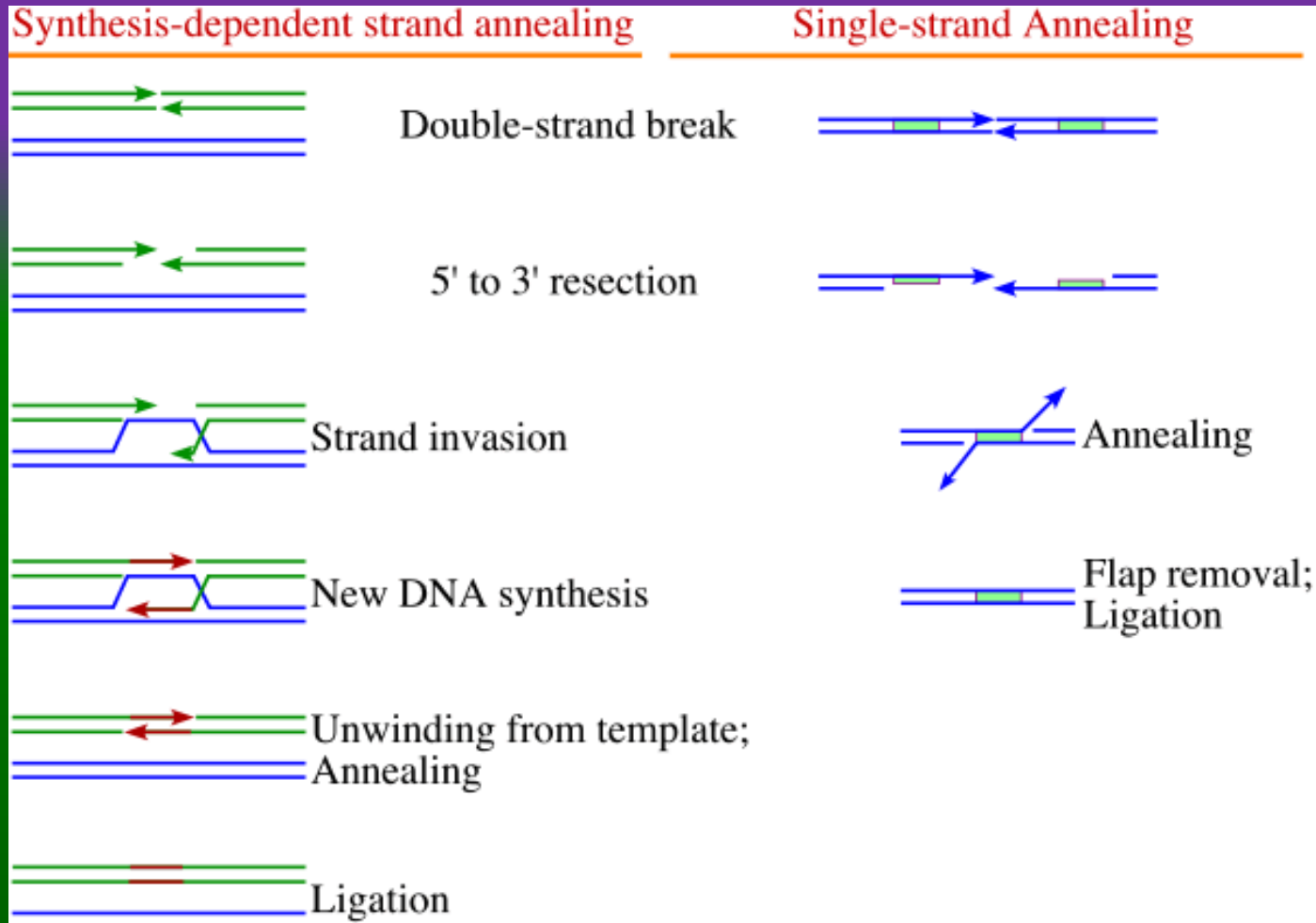
NHEJ reparace

Oba zlomy jsou podrženy pohromadě v tzv. synapsi následujícím způsobem:



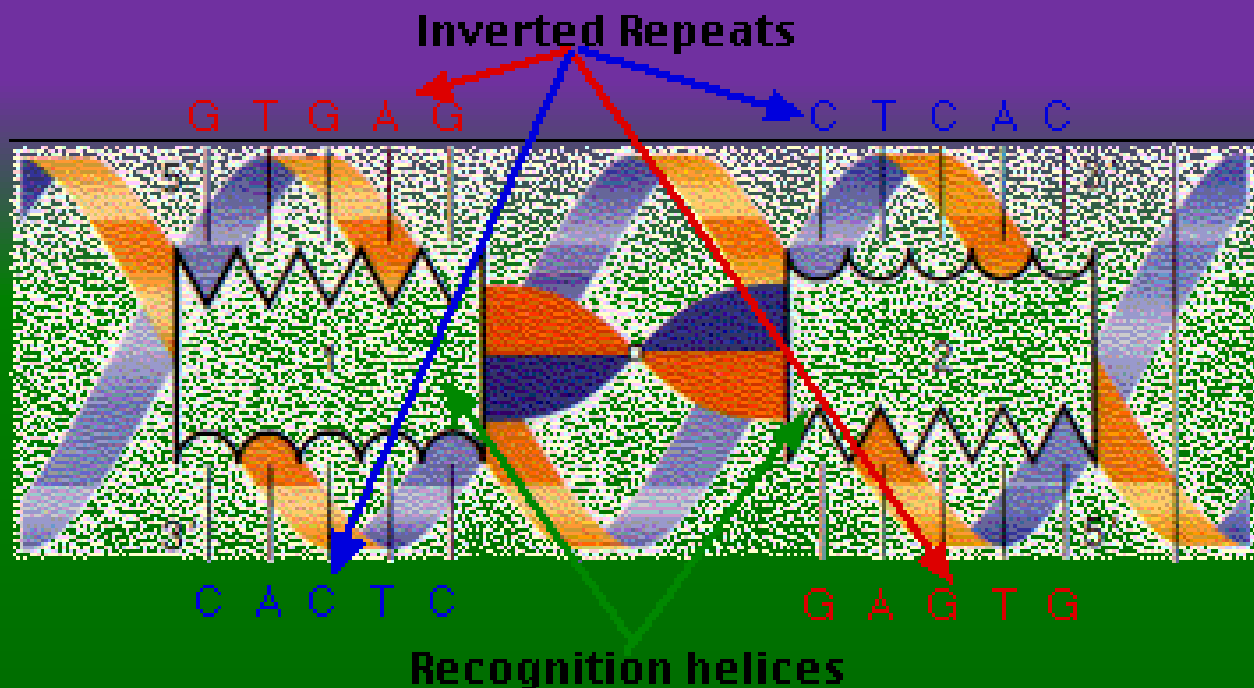
Homologní rekombinace u lidských buněk

Existují dva dobře dokumentované procesy – SDSA a SSA

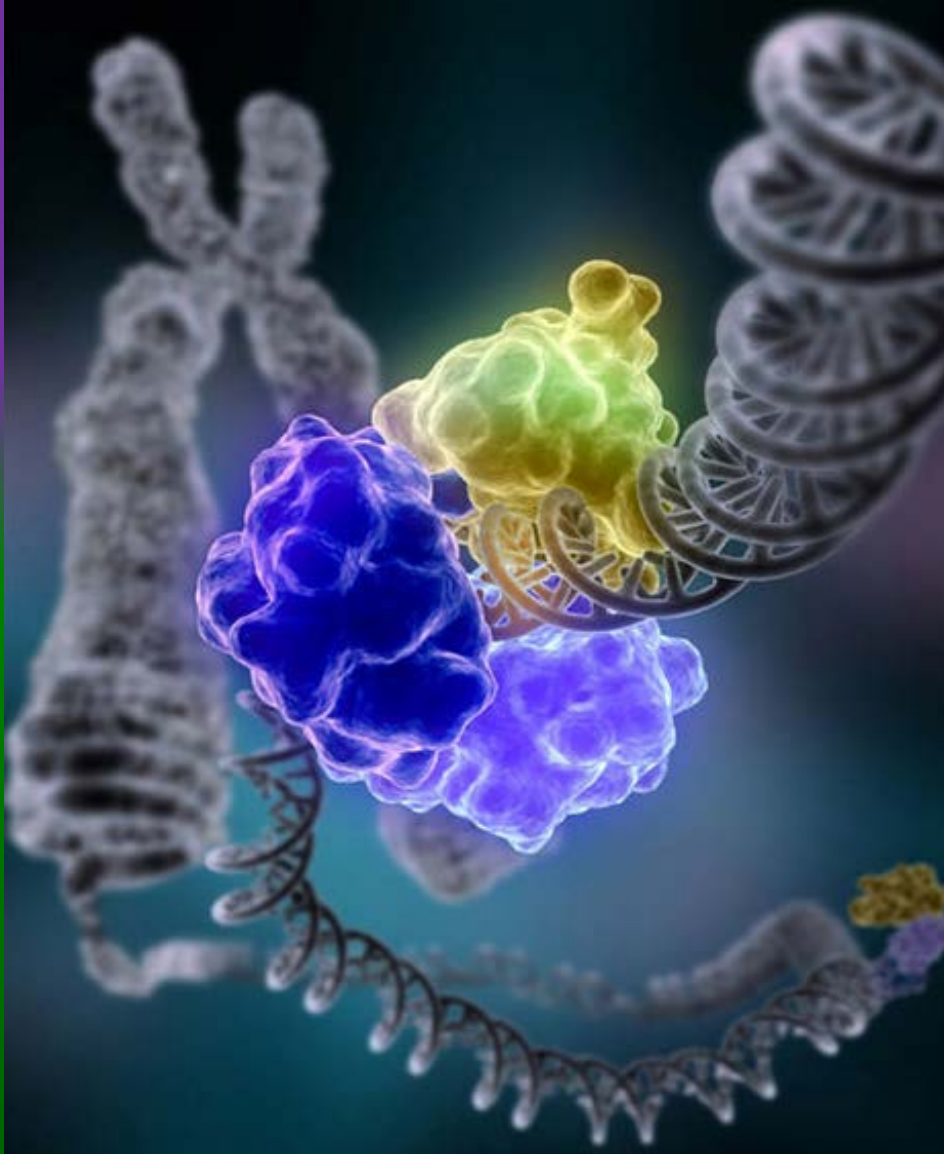


Homologní rekombinace

Rekombinační reparace může nastat tam, kde je k dispozici homologní DNA (MRN protein komplex a RAD50/RAD51)



DNA repair



Single-strand damage

- ❖ Base excision repair (**BER**), which repairs damage to a single base caused by oxidation, alkylation, hydrolysis, or deamination.
- ❖ Nucleotide excision repair (**NER**), which recognizes bulky, helix-distorting lesions such as pyrimidine dimers and 6,4 photoproducts.
- ❖ Mismatch repair (**MMR**), which corrects errors of DNA replication and recombination that result in mispaired (but undamaged) nucleotides.

Double-strand breaks

- ❖ non-homologous end joining (**NHEJ**)
- ❖ microhomology-mediated end joining (**MMEJ**)
- ❖ homologous recombination (**HR**)

Repair of DSBs

Box 1 | The two main types of double-stranded DNA-break repair

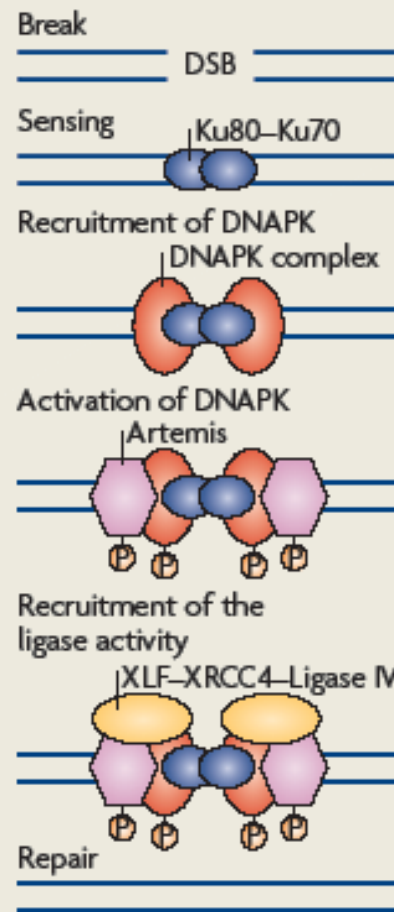
Non-homologous end joining

A DNA lesion (a double-stranded DNA break (DSB)) is sensed by the Ku80–Ku70 heterodimer, which in turn recruits the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit DNAPKcs, resulting in assembly of the DNAPK complex and activation of its kinase activity (see the figure; left panel). Increasing evidence suggests that DNAPK functions as a regulatory component of non-homologous end joining (NHEJ), potentially facilitating and regulating the processing of DNA ends. DNAPK also increases the recruitment of XRCC4, DNA ligase IV, XLF and Artemis, which carry out the final rejoining reaction.

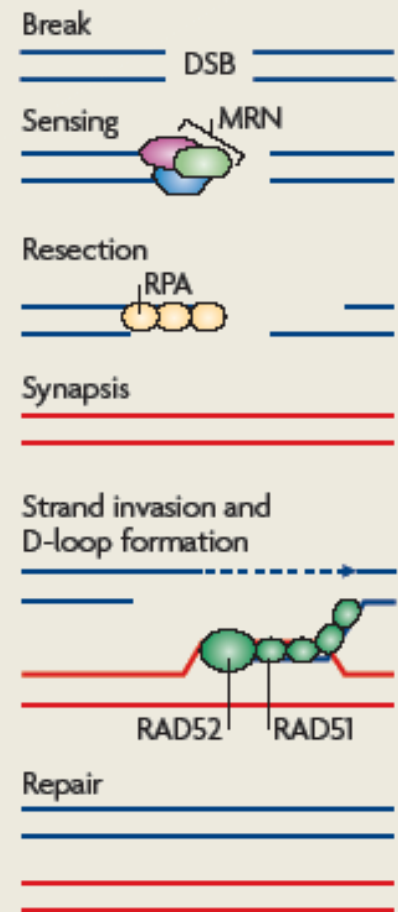
Homologous recombination repair

A DNA lesion is recognized by the MRN (MRE11–RAD50–NBS1) complex, which is recruited to the DSB to generate single-stranded DNA by resection (see the figure; right panel). The single-stranded ends are bound by replication protein A (RPA), RAD51 and RAD52 and can subsequently invade the homologous template, creating a D-loop and a Holliday junction, to prime DNA synthesis and to copy and ultimately restore genetic information that was disrupted by the DSB.

Non-homologous end joining



Homologous recombination



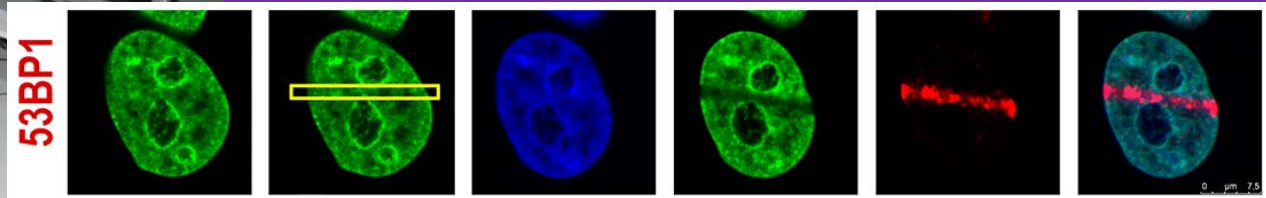
G1

S/G2

DNA repair studies



GFP-H2A DNA GFP-H2A 53BP1 overlay



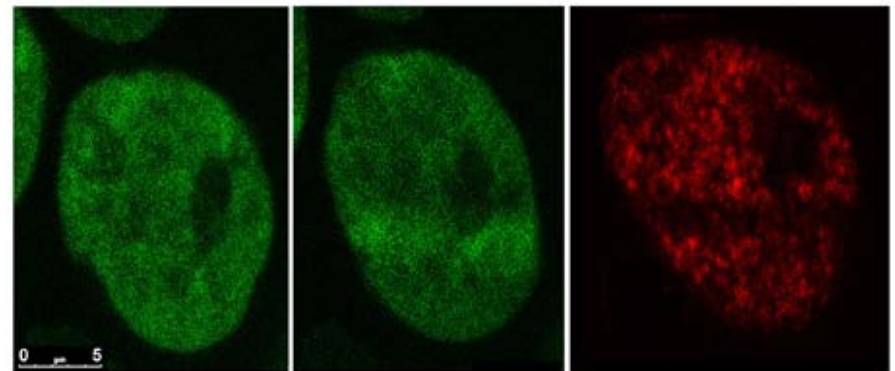
GFP-Oct4

H3K9 Ac

UV irradiat.

after irradiat.

CONTROL



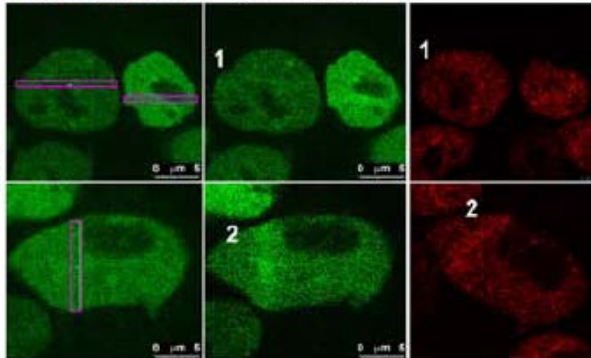
GFP-Oct4

HDAC1

irradiated ROI

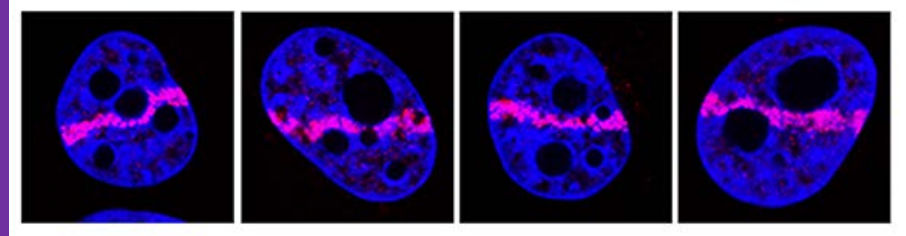
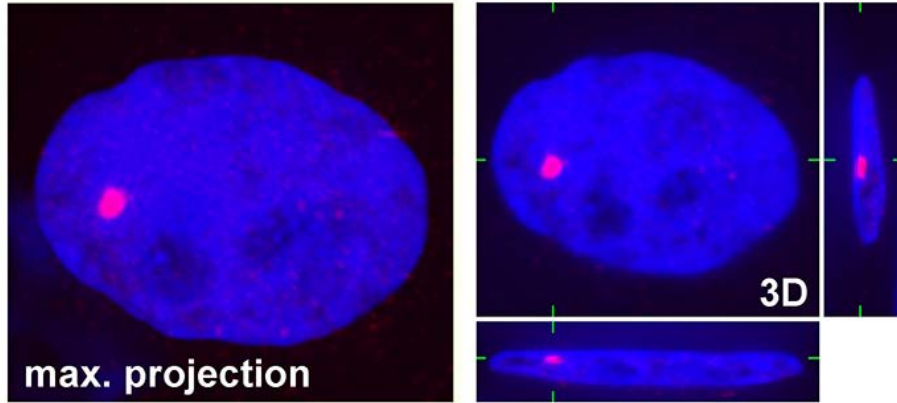
after irradiat.

TSA



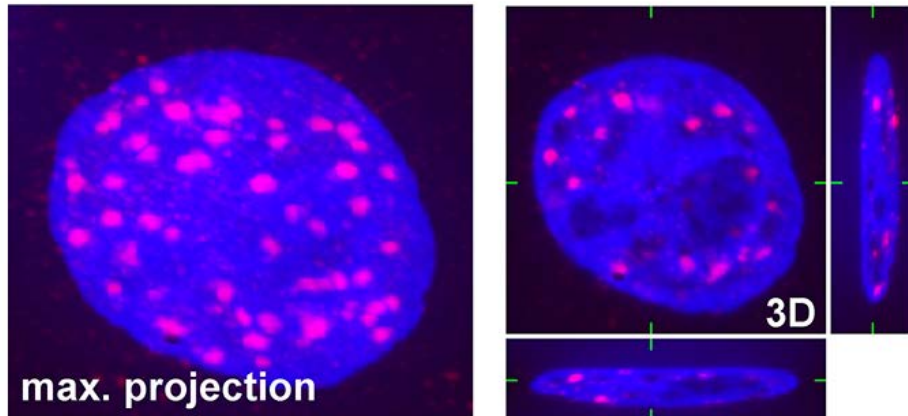
53BP1 in various types of DNA lesions

spontaneous DNA lesion

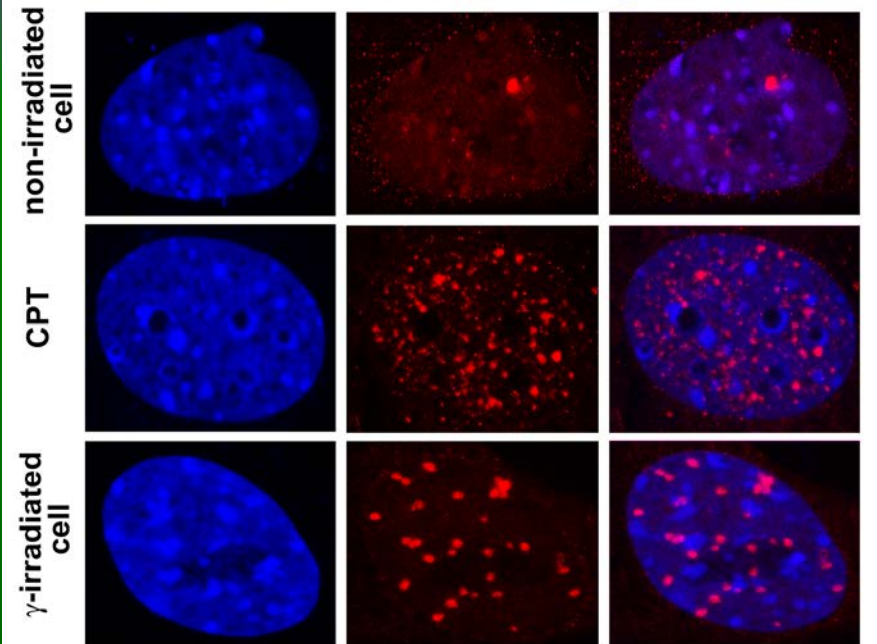


UV-induced DSB sites

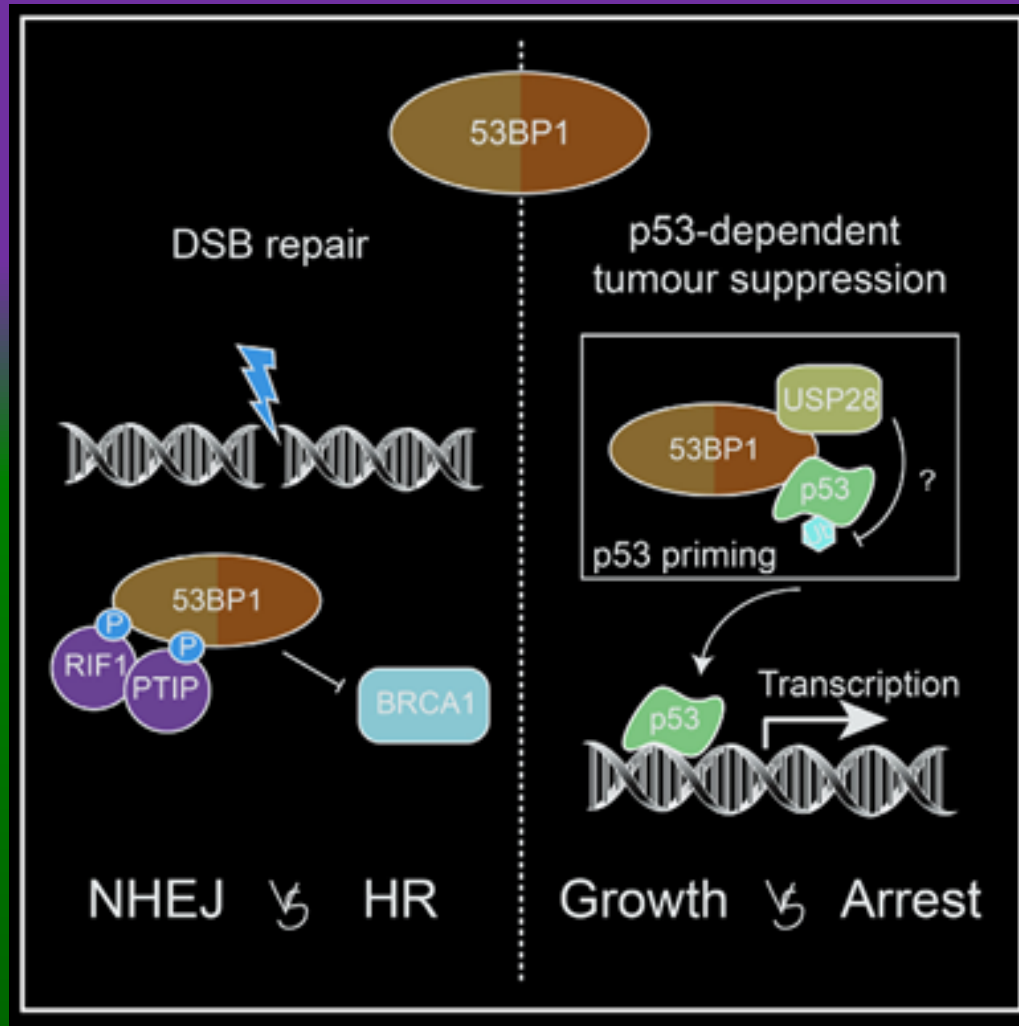
IRIF



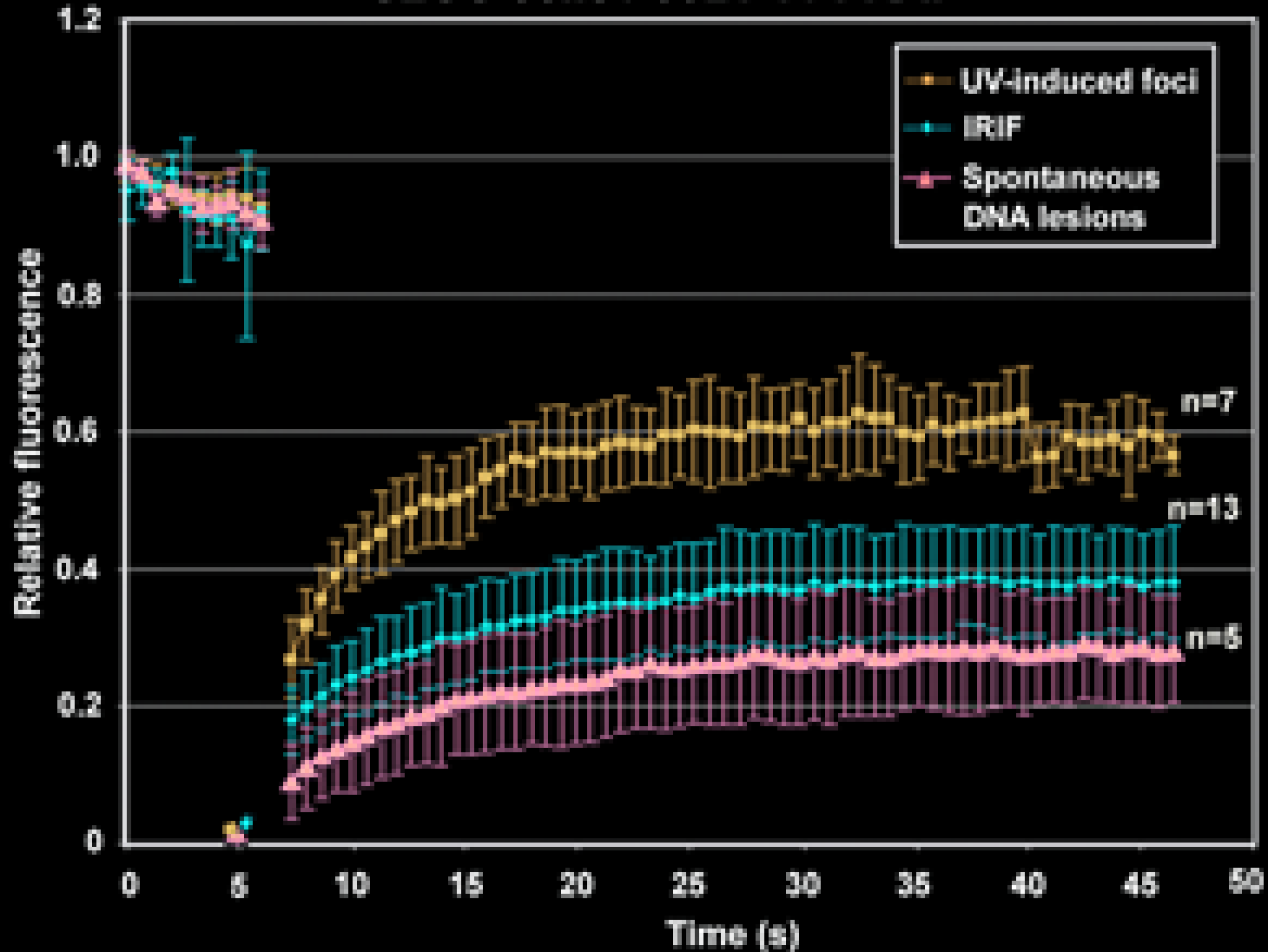
53BP1/DAPI staining

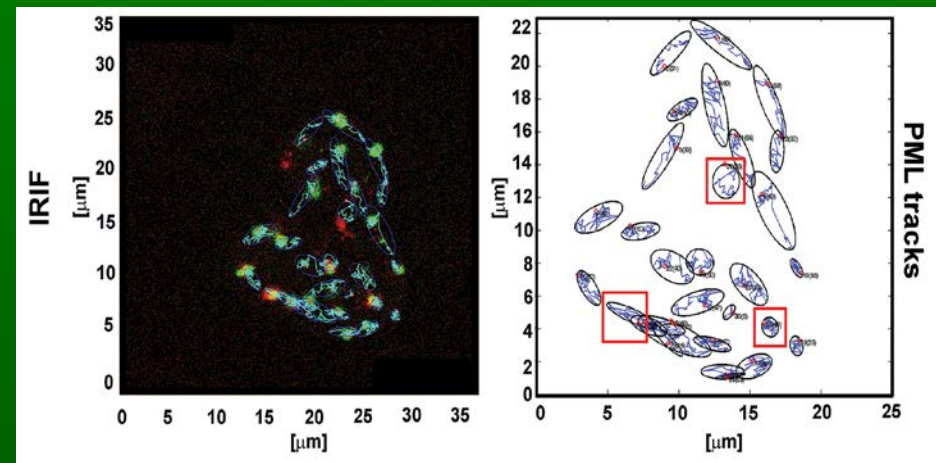
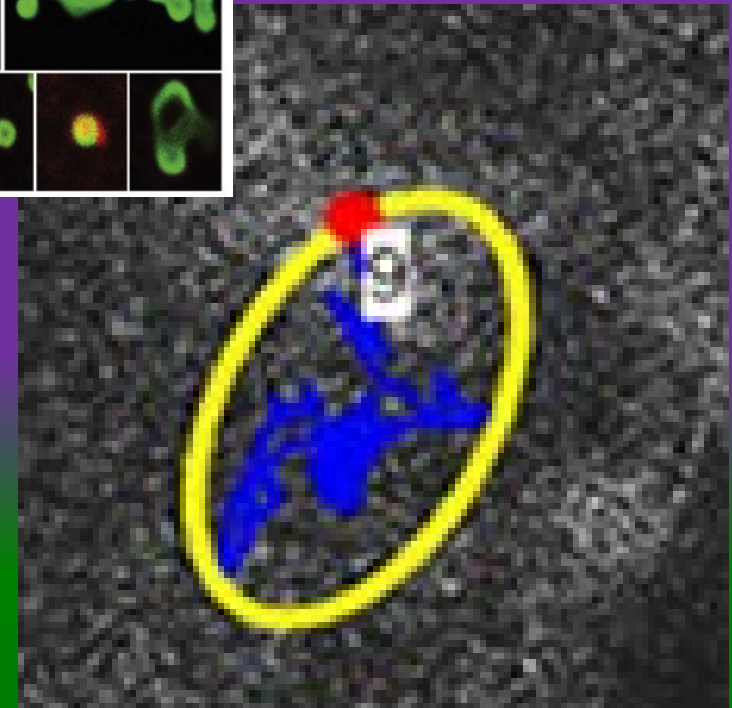
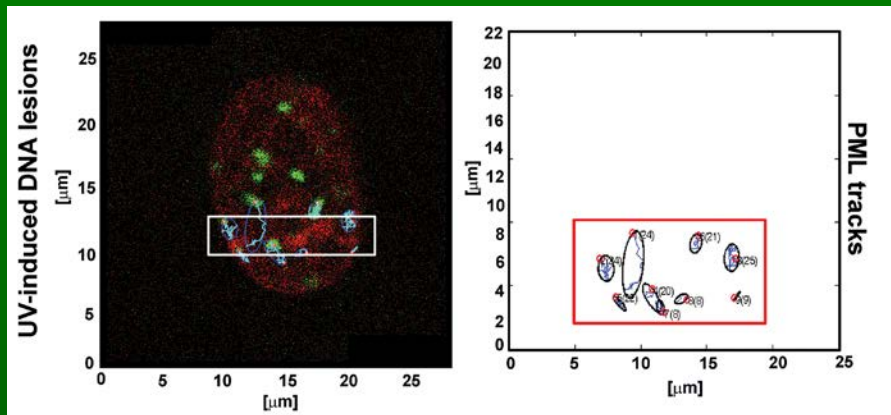
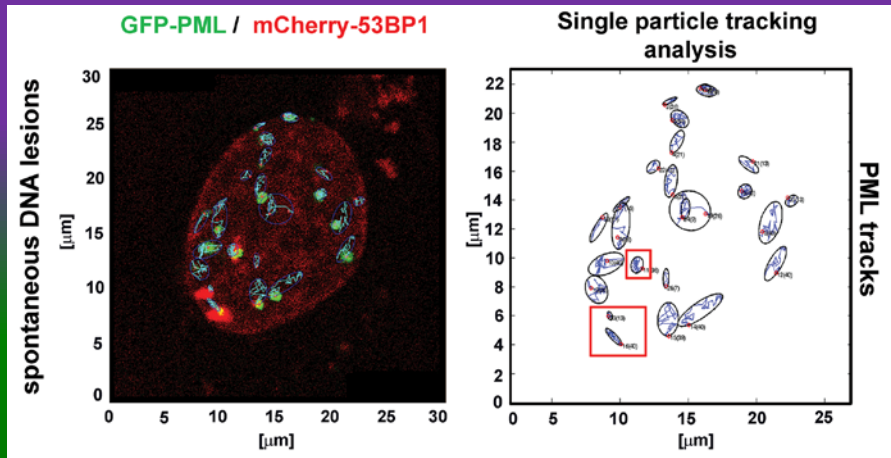
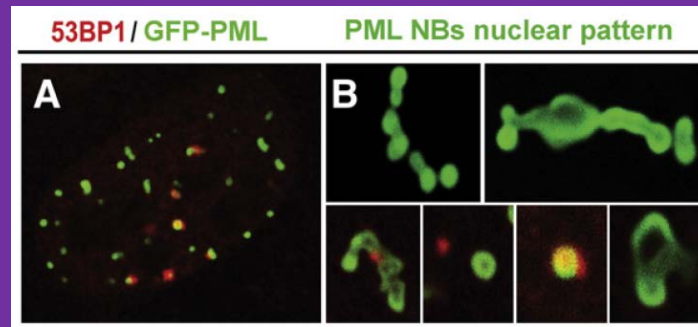
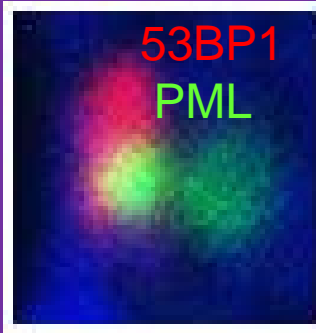


Study 1: Functions of the 53BP1 protein: compartmentalization of DNA repair foci

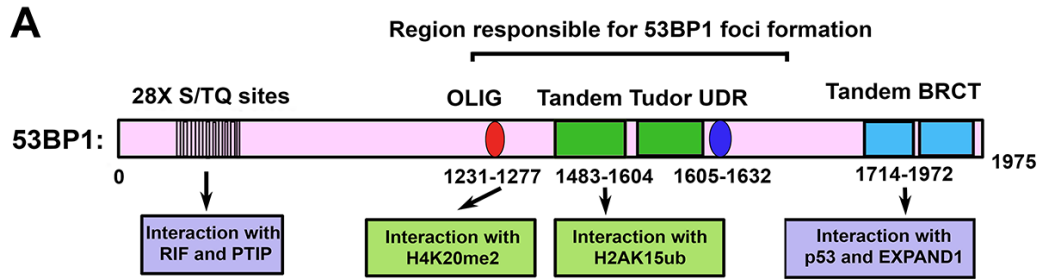


U2OS cells / 53BP1 / FRAP

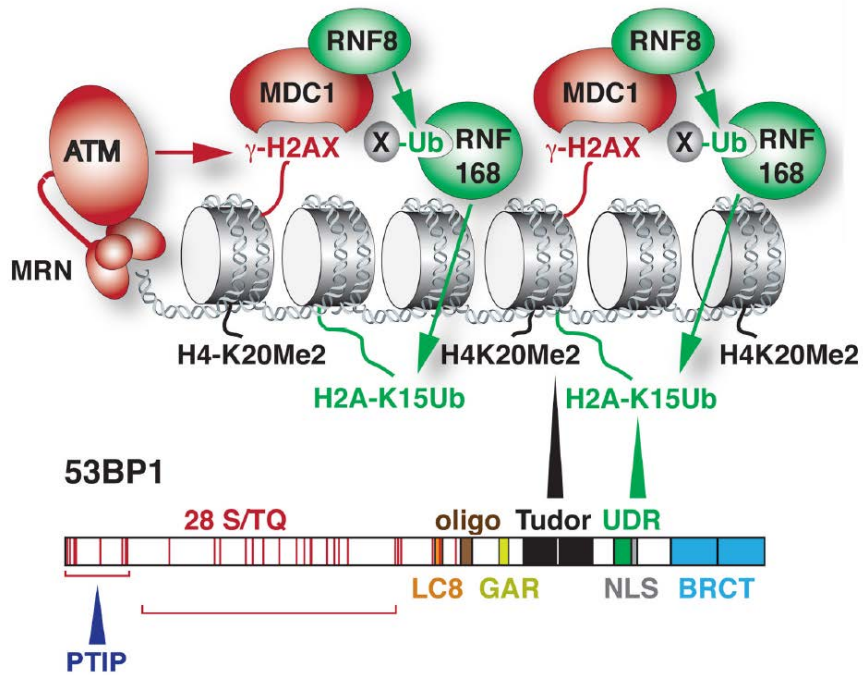
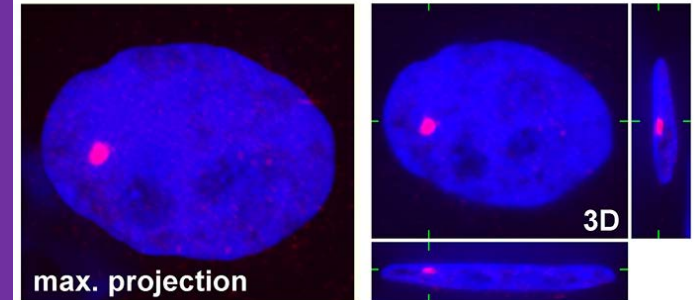




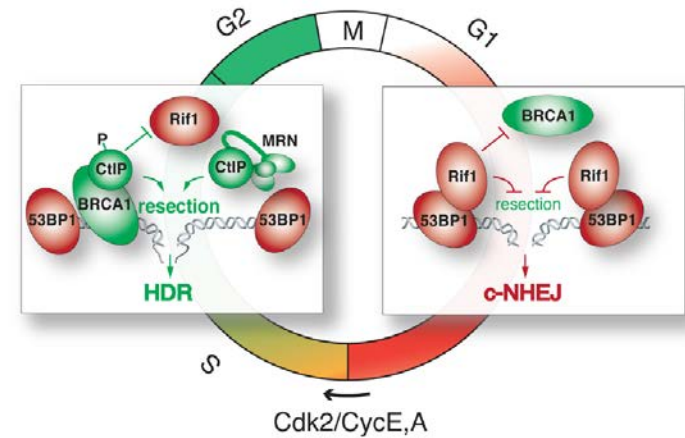
Experiments: Veronika Foltánková
and Dmitry V. Sorokin

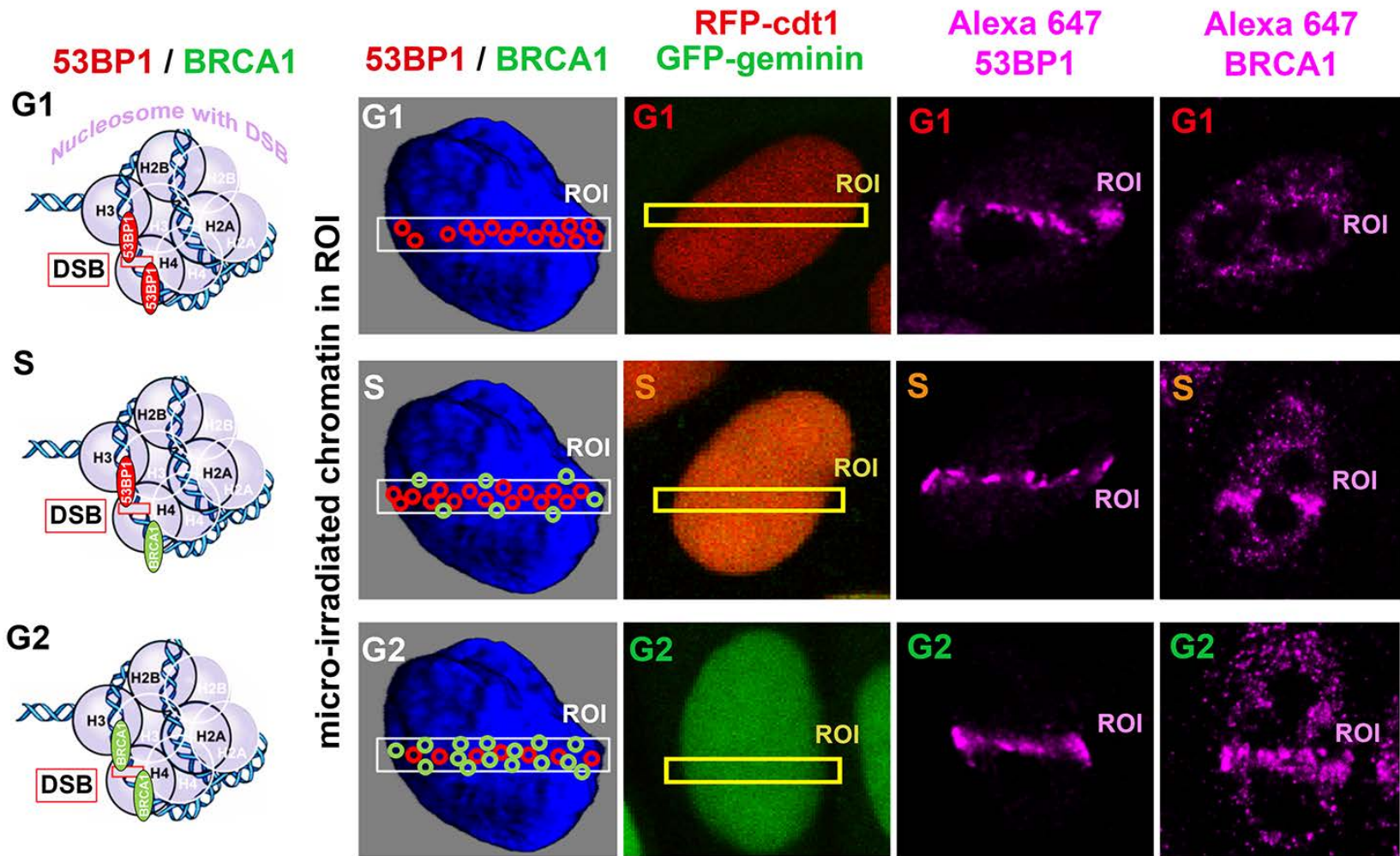


spontaneous DNA lesion



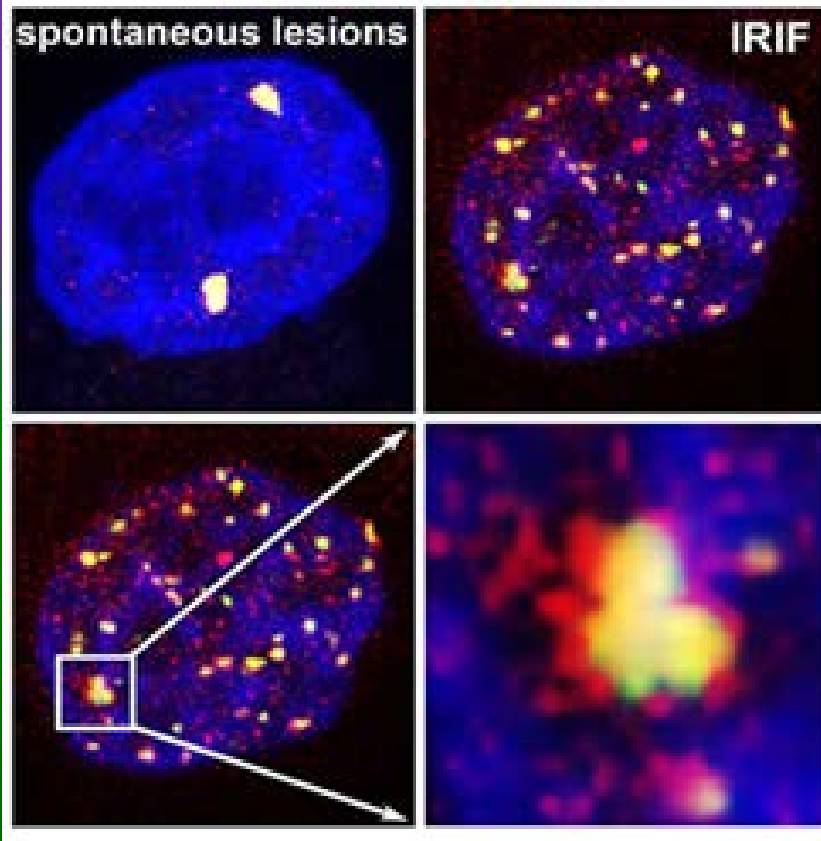
Zimmermann and de Lange



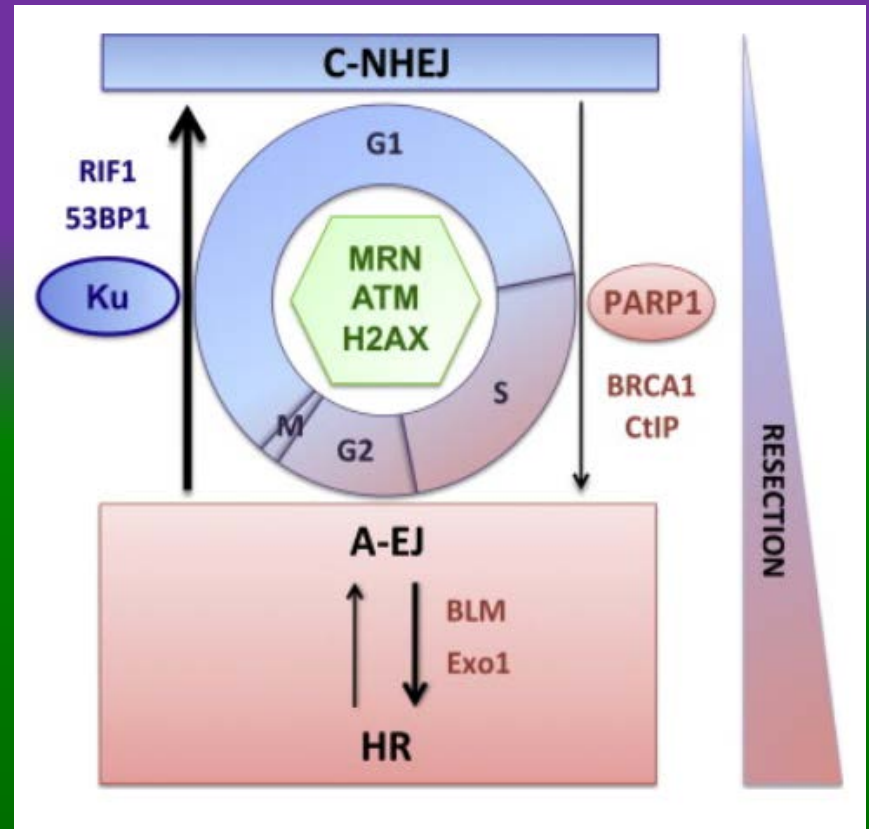


Experiments: Jana Suchánková

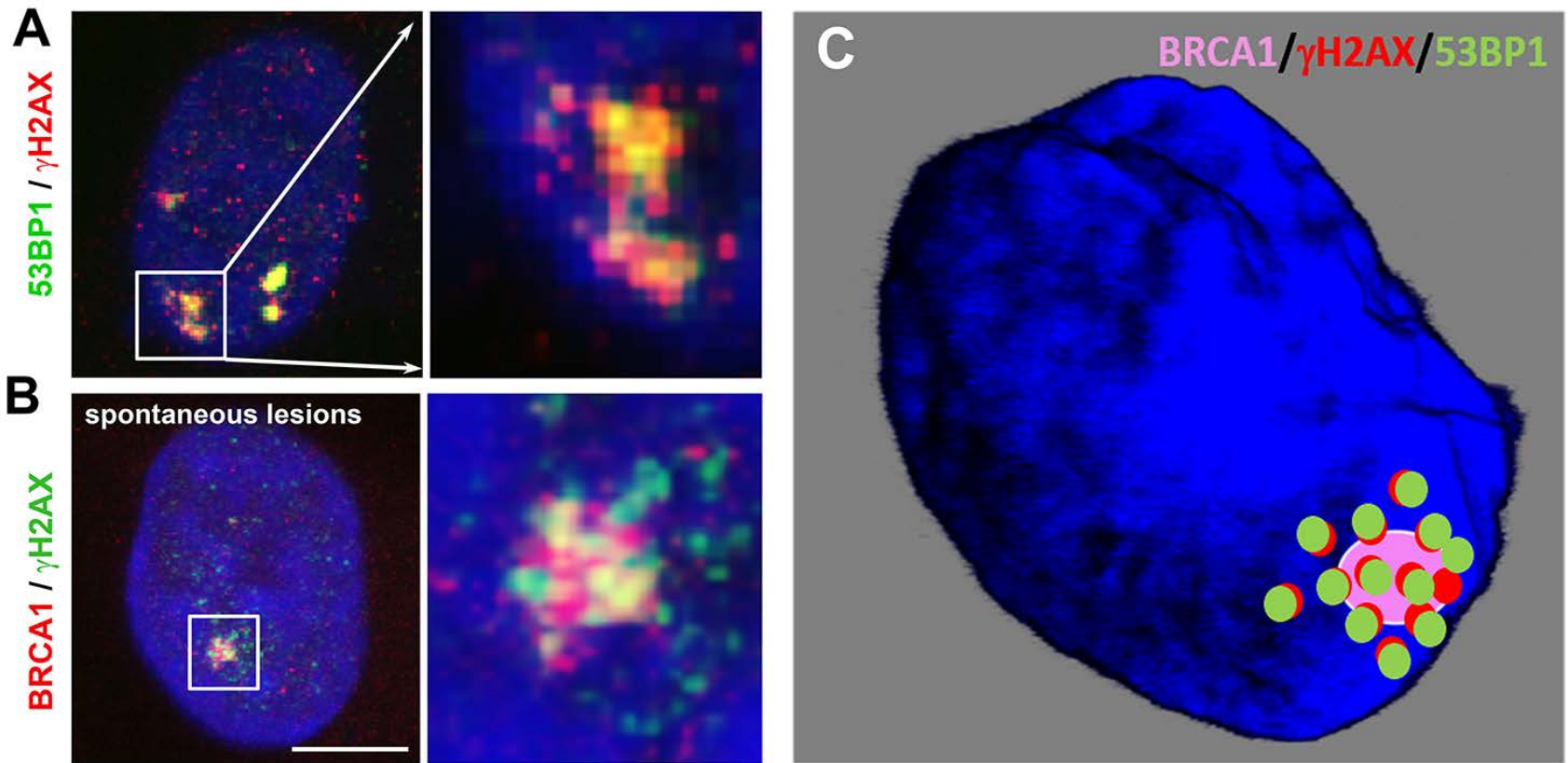
53BP1 / BRCA 1



Suchánková et al. (2017)

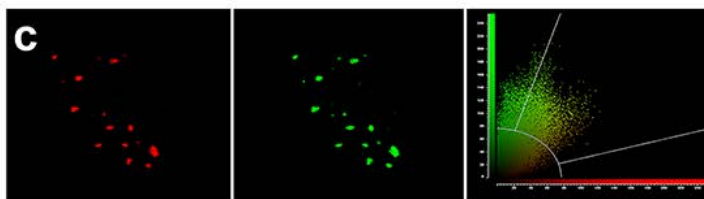
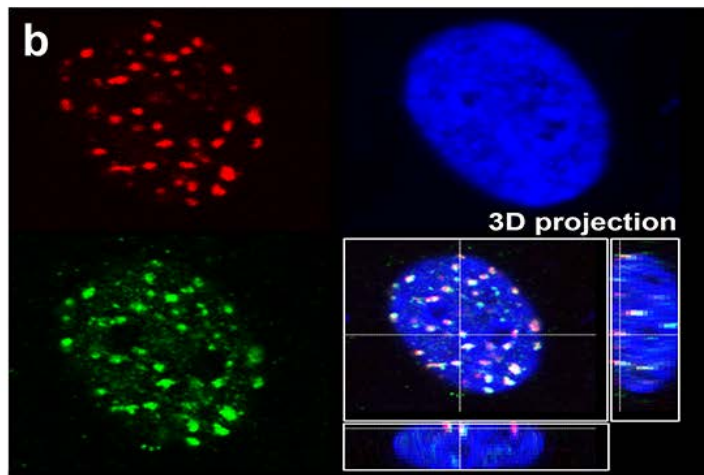
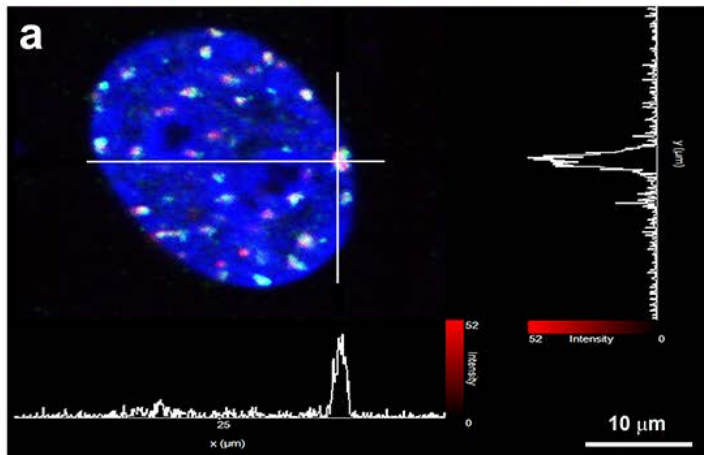


Study 1: Compartmentalization of DNA repair foci



Experiments: Soňa Legartová

MDC1/53BP1/DAPI staining

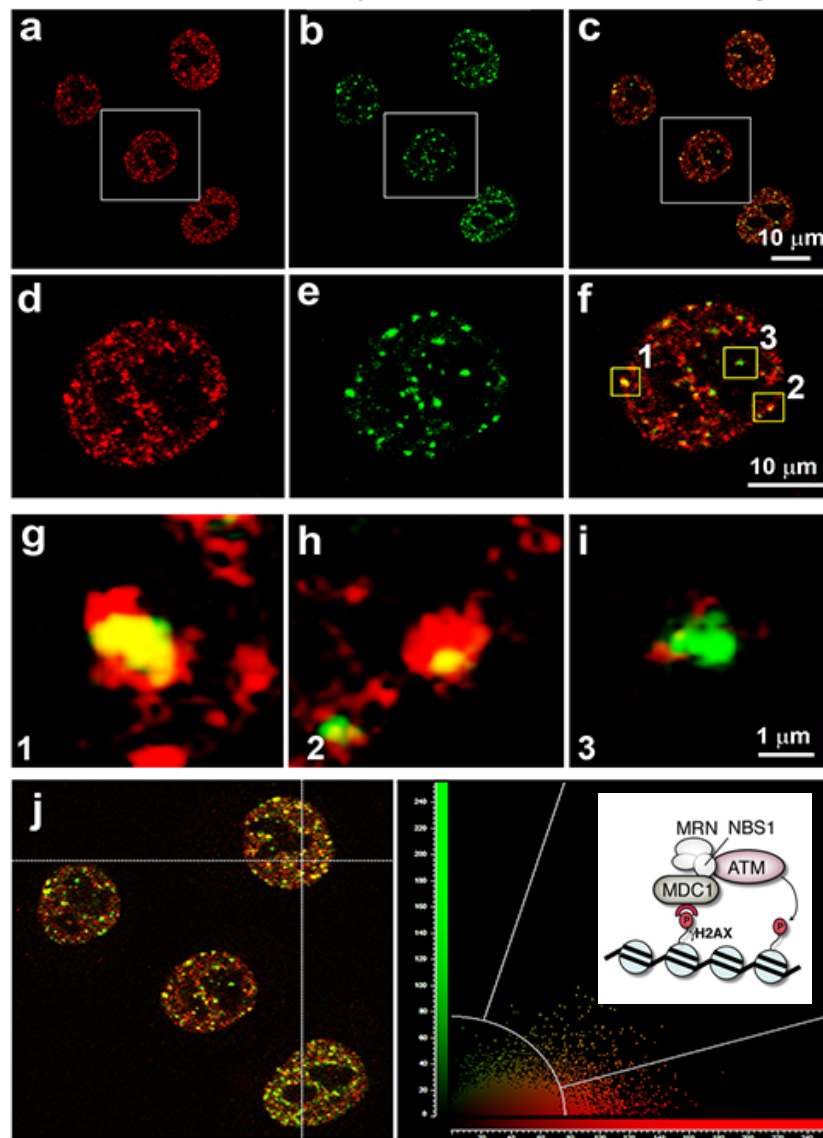


γ-irradiated cell

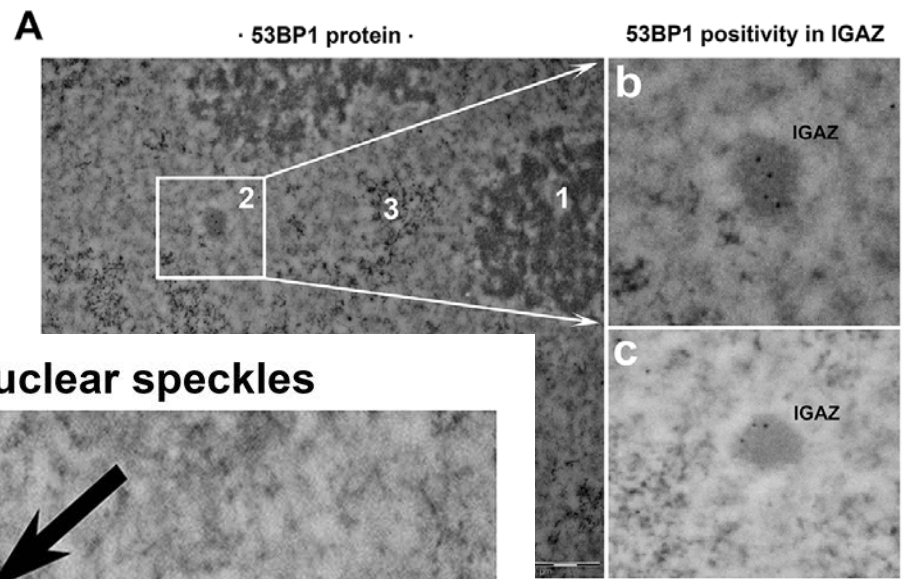
MDC1

γH2AX

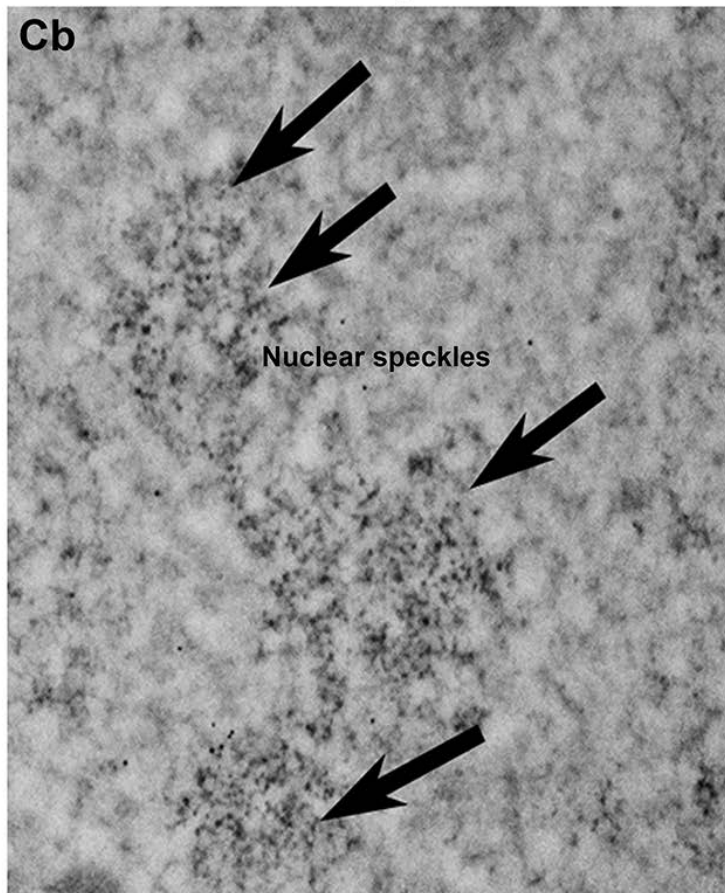
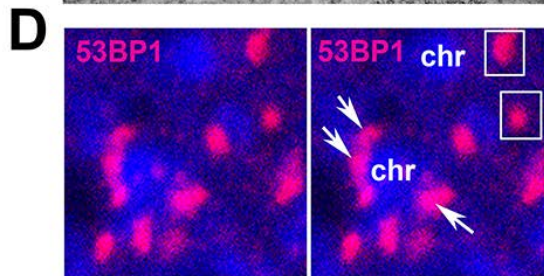
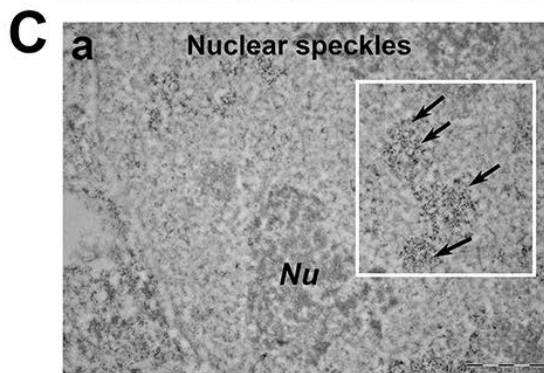
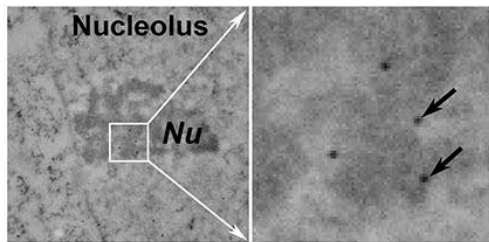
overlay



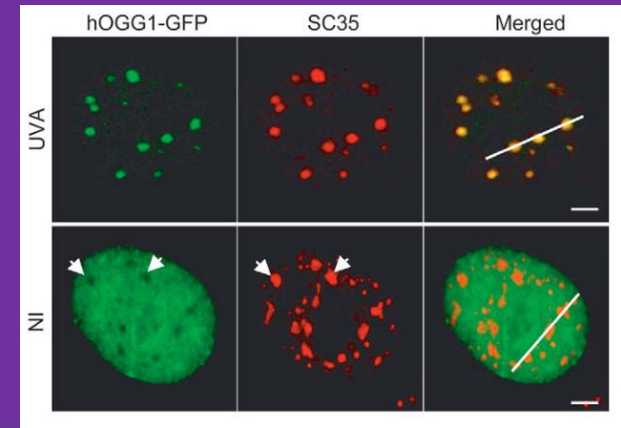
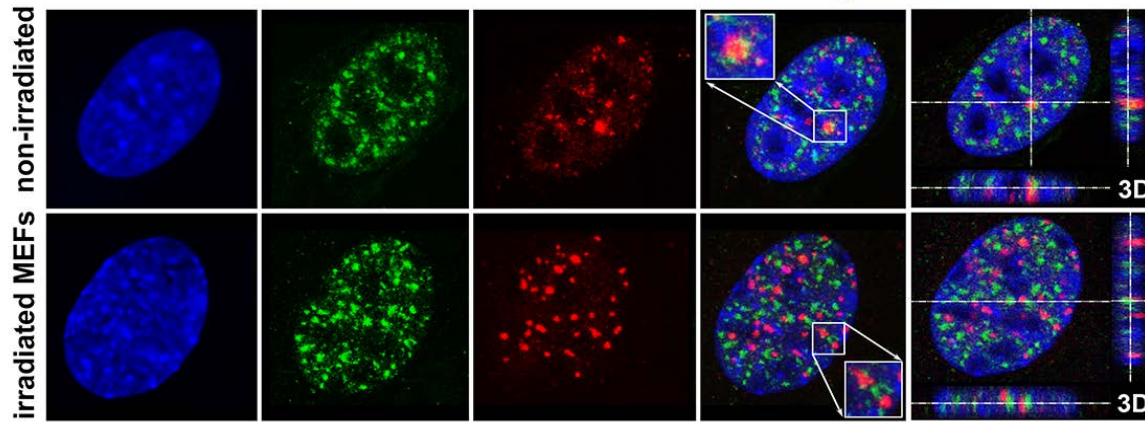
γ-irradiated cells



B 53BP1 in nucleolus and nuclear speckles



SC35 / 53BP1 / DNA staining

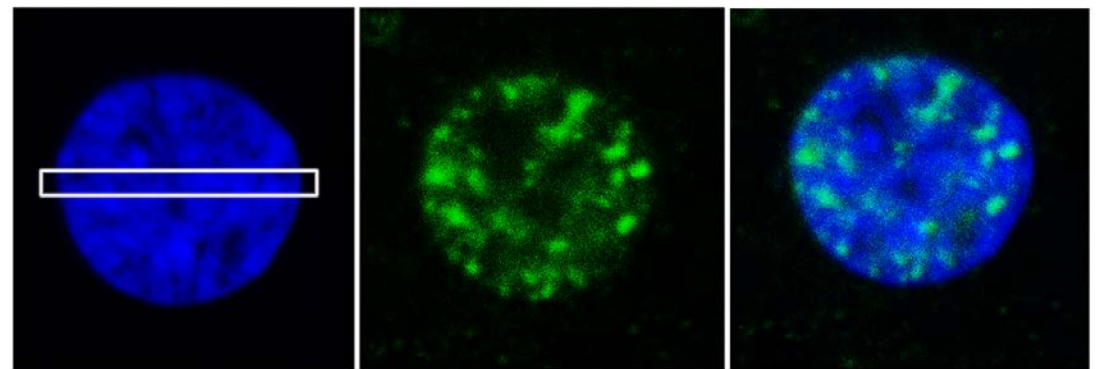


Campalans et al., JCB (2007): The DNA glycosylase hOGG1 initiates base excision repair (BER) of oxidised purines in cellular DNA.

hOGG1 forms foci co-localizing with the nuclear speckles.

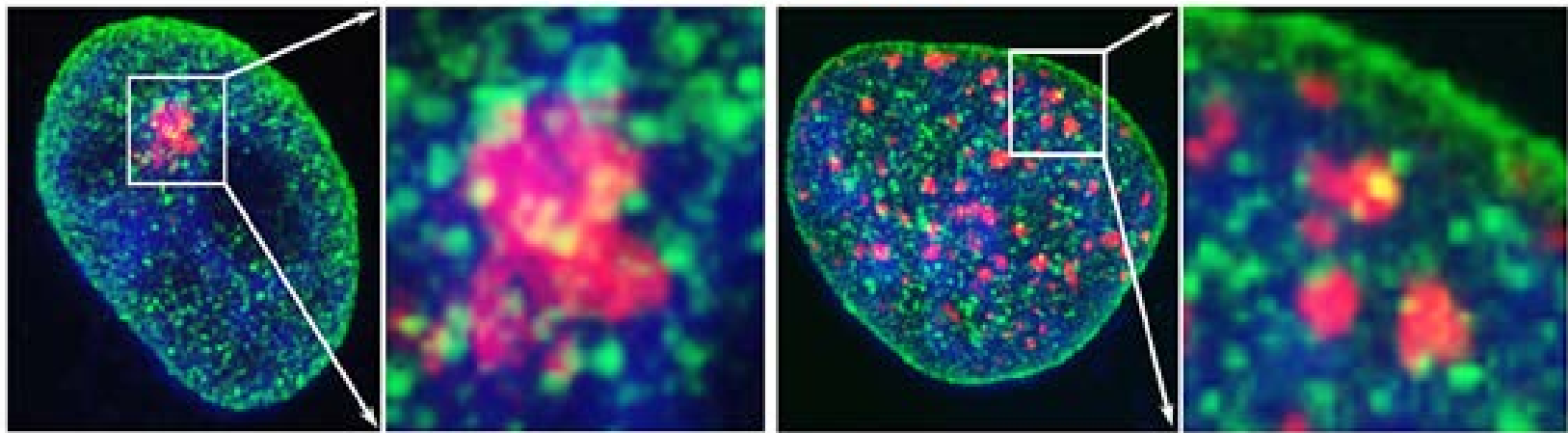
The recruitment of DNA repair proteins to nuclear speckles after oxidative stress implicates that nuclear speckles take a part in the cellular stress response.

SC35 / DNA



Study 2: A-type lamins and DNA repair

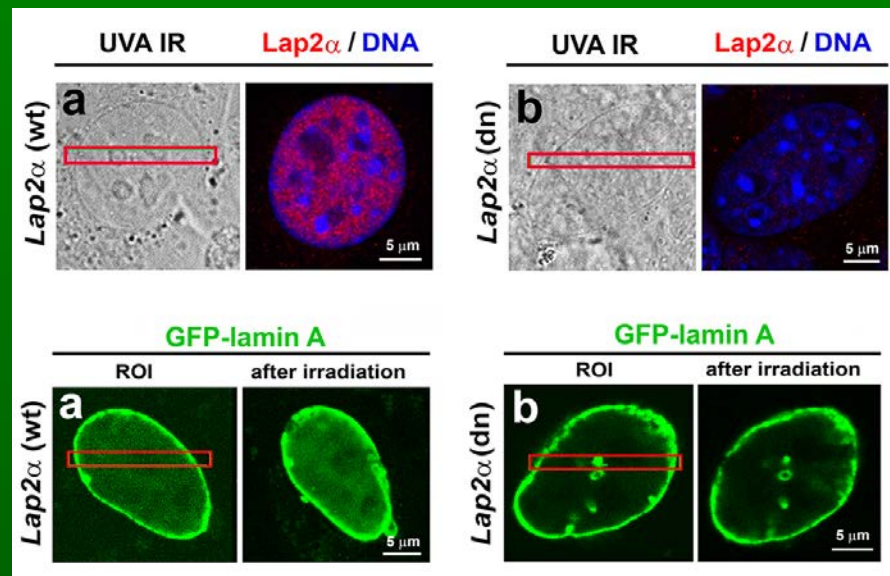
lamins A/C / 53BP1

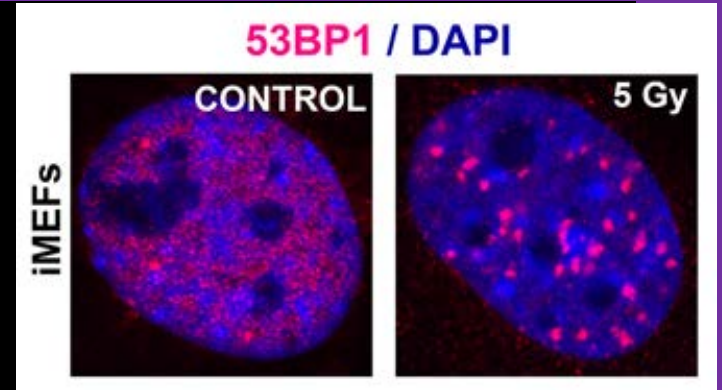
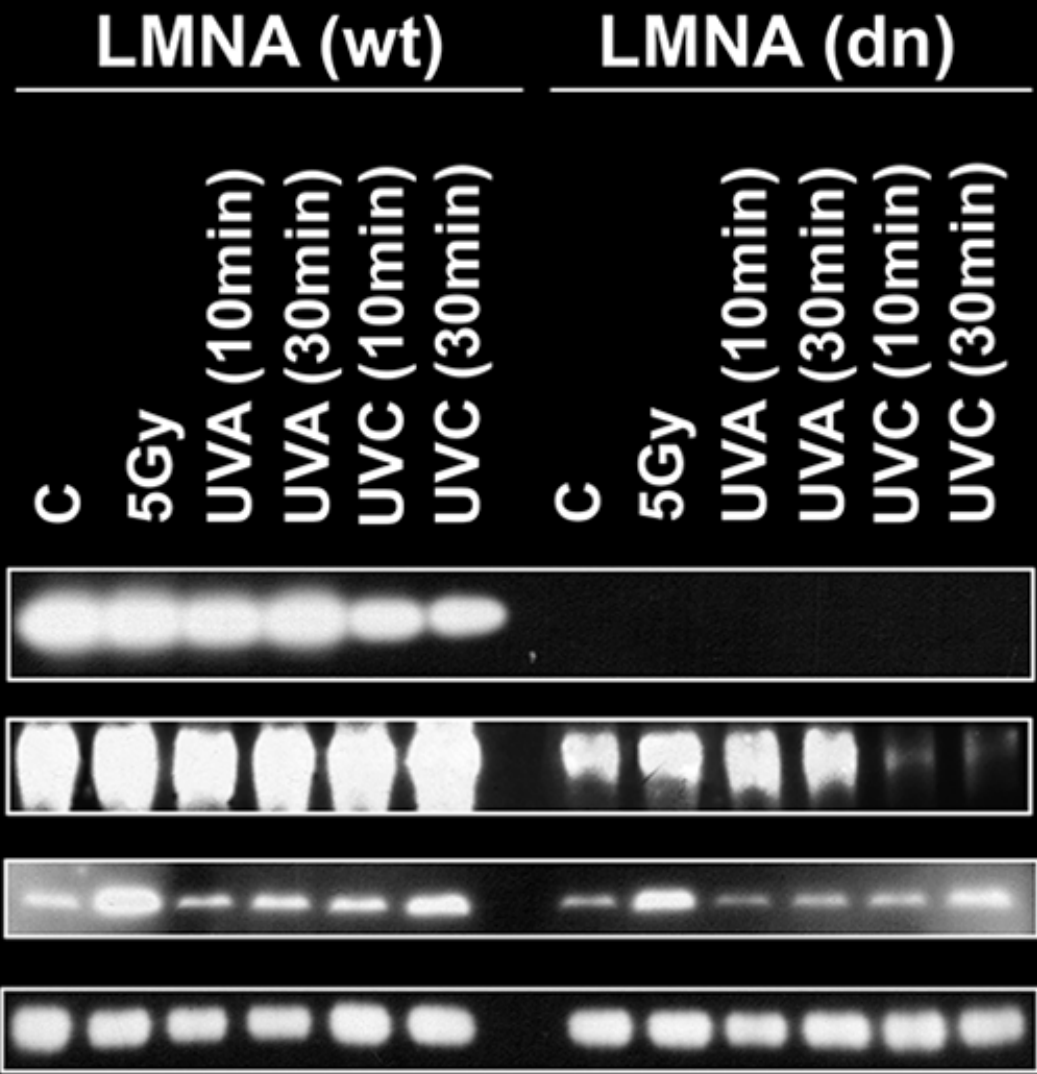


spontaneous DNA repair foci

γ -irradiation induced foci

Experiments: Petra Sehnalová





Lamin A (76kDa)

53BP1 (250 kDa)

γ H2AX (17kDa)

α -tubulin (55kDa)

Nobelovu cenu dostali chemici za objasnění opravy DNA na molekulární úrovni



zdroj: lastoriavariscritta.it

Stockholm | Letos třetí udělenou Nobelovu cenu – tentokrát v oboru chemie si odnáší trio vědců za objasnění opravy DNA na molekulární úrovni. Thomas Lindahl, Paul Modrich a Aziz Sancar světu dokázali, že DNA se...

může působením různých vlivů rozkládat. Její rozklad potom může vést například k rakovině. Vědci následně zmapovali i mechanismus, kterým buňky poškozenou DNA opravují. Objev

vědeckého tria tak prohloubil znalosti „lidského fungování“ a v budoucnosti možná povede i k léčbě zákeřných nemocí.

Sedmasátiiletý Thomas Lindahl je emeritním ředitelem střediska pro výzkum rakoviny v Británii. Devětašedesátiletý Paul Modrich je profesorem na univerzitě v americkém Durhamu. Taktéž devětašedesátiletý Aziz Sancar je univerzitním profesorem v USA. Má ale i Turecké občanství.

Dosud bylo uděleno v oboru chemie celkem 106 Nobelových cen. Během dvou světových válek se ocenění neudělovalo. V 63 případech cenu získal jen jeden laureát. Mezi oceněnými byly i čtyři ženy. Britský biochemik Frederick Sander, získal Nobelovu cenu za chemii dokonce dvakrát. Tři ocenění si samozřejmě kromě nesmazatelného zapsání do „chemických dějin“ odnesou i finanční odměnu ve výši 23 milionů korun.