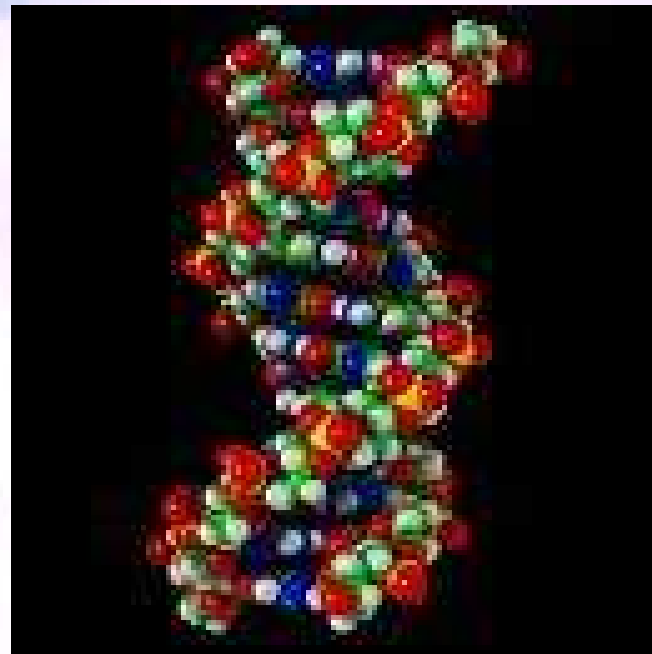




Reparace DNA

DNA damage

- Genom všech organismů je každodenně poškozován mnoha **faktory vnějšího prostředí a produkty vlastního metabolismu. V lidské buňce** vzniká v důsledku toho denně asi **100 000** poškození DNA
- **endogenní procesy**
- **exogenní procesy**



Modifikace DNA po účinku mutagenů

Modifikace DNA.

Při reakcích mutagenů, resp. jejich elektrofilních produktů s DNA vzniká celá řada různých modifikací, které lze zhruba rozdělit na :

- 1. modifikace bází**
- 2. ztráty bází**
- 3. modifikace fosfátů a deoxyribozy**
- 4. štěpení vazeb mezi deoxyribozou a fosfáty za vzniku zlomů (jednovláknových či dvouvláknových)**
- 5. křížové vazby mezi DNA**
- 6. křížové vazby mezi DNA a proteiny**

Četnosti poškození DNA v jedné buňce za den

- **50 000 jednořetězcových zlomů DNA**
 - **10 000 depurinací**
 - **600 deaminací**
 - **2000 oxidační lézí**
 - **5000 alkylací**
 - **10 dvouřetězcových zlomů**
-

Mutageny a mutace

- **Primární změny molekuly DNA vznikající důsledkem působení endogenních i exogenních faktorů (mutagenů) ještě nemusí vést ke vzniku mutací – pouze I. etapa !!!**
 - **Reparační mechanismy mohou realizaci mutace zabránit, event. vznik mutace stimulovat !!!**
 - Prof Kondo 1969 – model molekulárního vzniku mutací – mutace jsou důsledkem chyb při reparaci
-

Vznik indukovaných mutací je několikastupňový proces !!!

A) proniknutí mutagenu do buňky

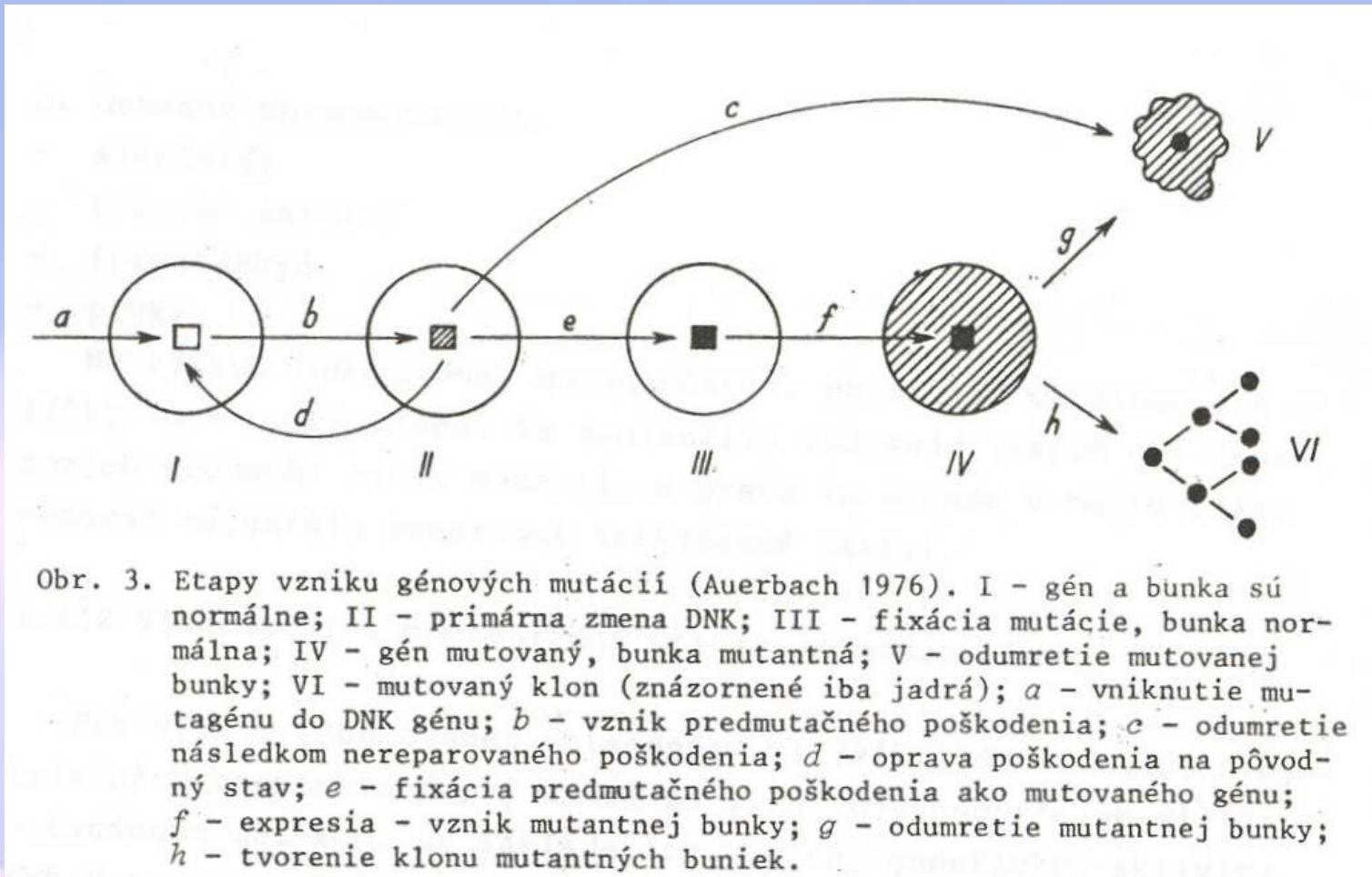
B) zásah jádra, vznik modifikací DNA

Obrana buňky – působení antimutagenů + reparace DNA

Molekulární mechanismus vzniku mutací.

1. *Změna ve struktuře DNA (vznik modifikací)* → replikace ?
2. *Vznik metastabilního předmutačního stavu*
3. *Aktivace reparačních mechanismů* - možnost bezchybné reparaace - původní stav
4. *Fixace předmutační změny* (chybná reparaace, absence reparaace)
5. *Vznik samotné mutace*
6. *Vyjádření mutace*

Molekulární mechanismus vzniku mutací



Reparace DNA - souhrn

A. Reverze poškození DNA

1. Enzymatická fotoreaktivace.
2. Reparace 0⁶-alkylguaninu.
3. Ligace zlomů
4. Reparace inzercí purinů.

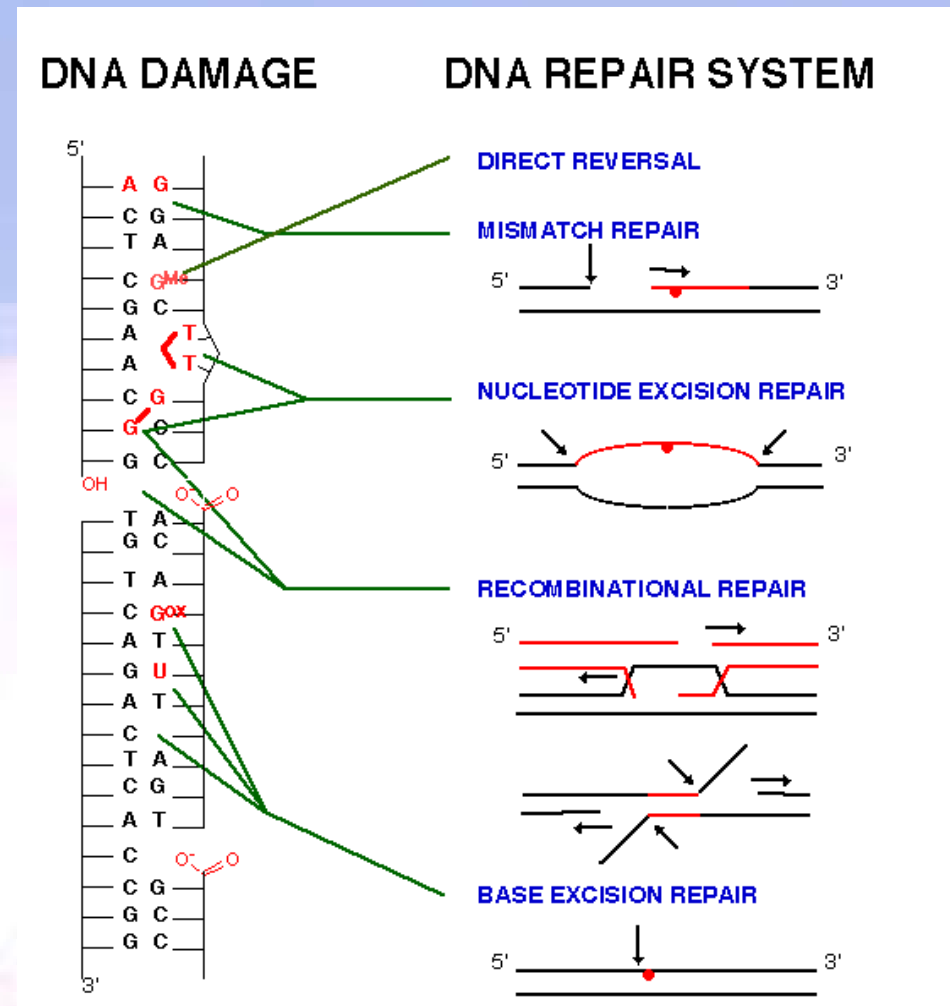
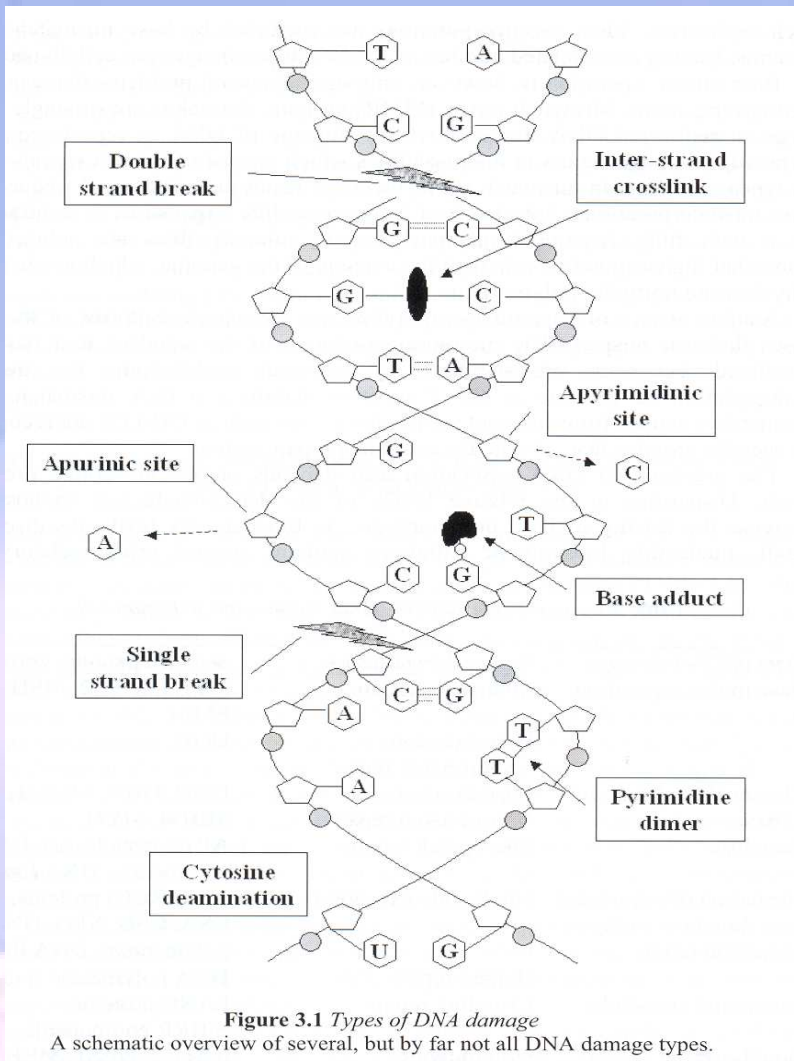
B. Excize poškození DNA.

1. Excize zprostředkovaná DNA glykosylázami (s účastí nebo bez účasti AP endonukleáz) - base excision repair
2. Excize zprostředkovaná přímým působením endonukleáz na poškozenou DNA -nukleotide excision repair, mismatch excision repair

C. Tolerance poškození DNA.

1. Replikační překročení poškozeného templátu s vytvářením mezer.
2. Transléze poškození DNA.

Poškození a reparace DNA – přehled mechanismů



Reparace DNA

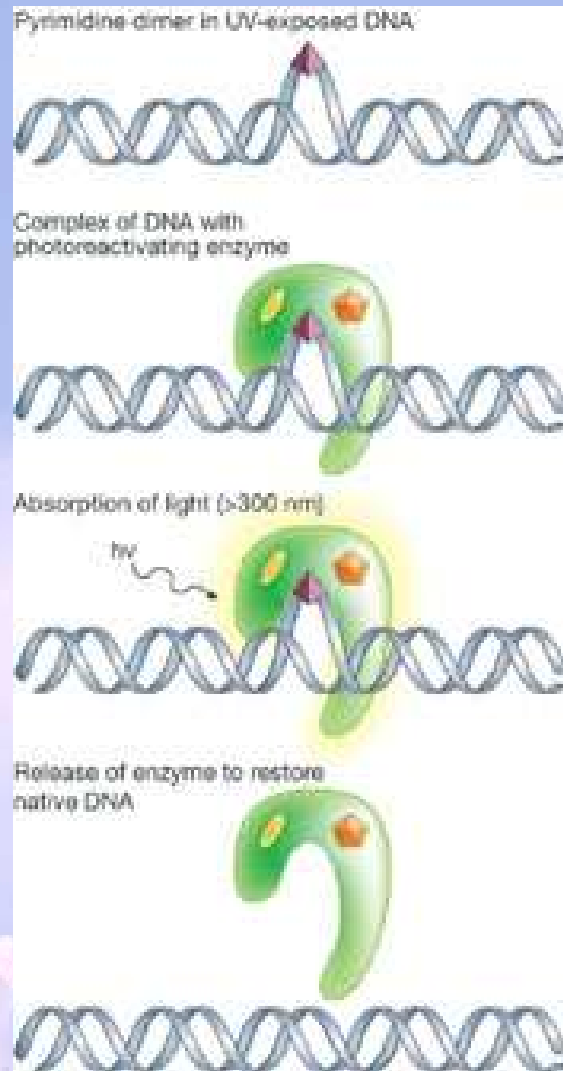
- **monoenzymatické systémy** (např. fotoreaktivace)
 - **polyenzymatické systémy** (např. excizní reparace)

 - **konstitutivní mechanismy**
 - **inducibilní mechanismy**

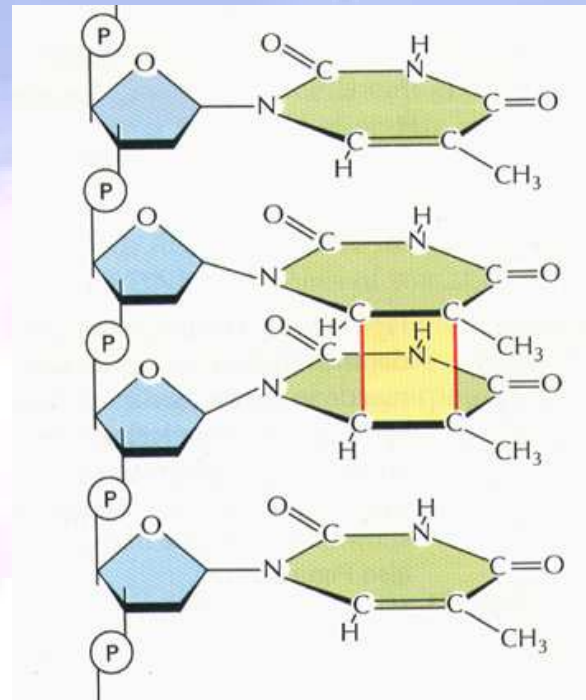
 - **error-free** (bezchybná reparace)
 - **error-prone** (mutagenní reparace)
-

Reverze poškození DNA

Enzymatická fotoreaktivace (1940 – Albert Kelner – *Streptomyces griseus*)



Monoenzymatická reverze pyrimidinových dimérů katalyzovaná enzymem **fotolyáza** a světelným kvantem (300-600 nm)



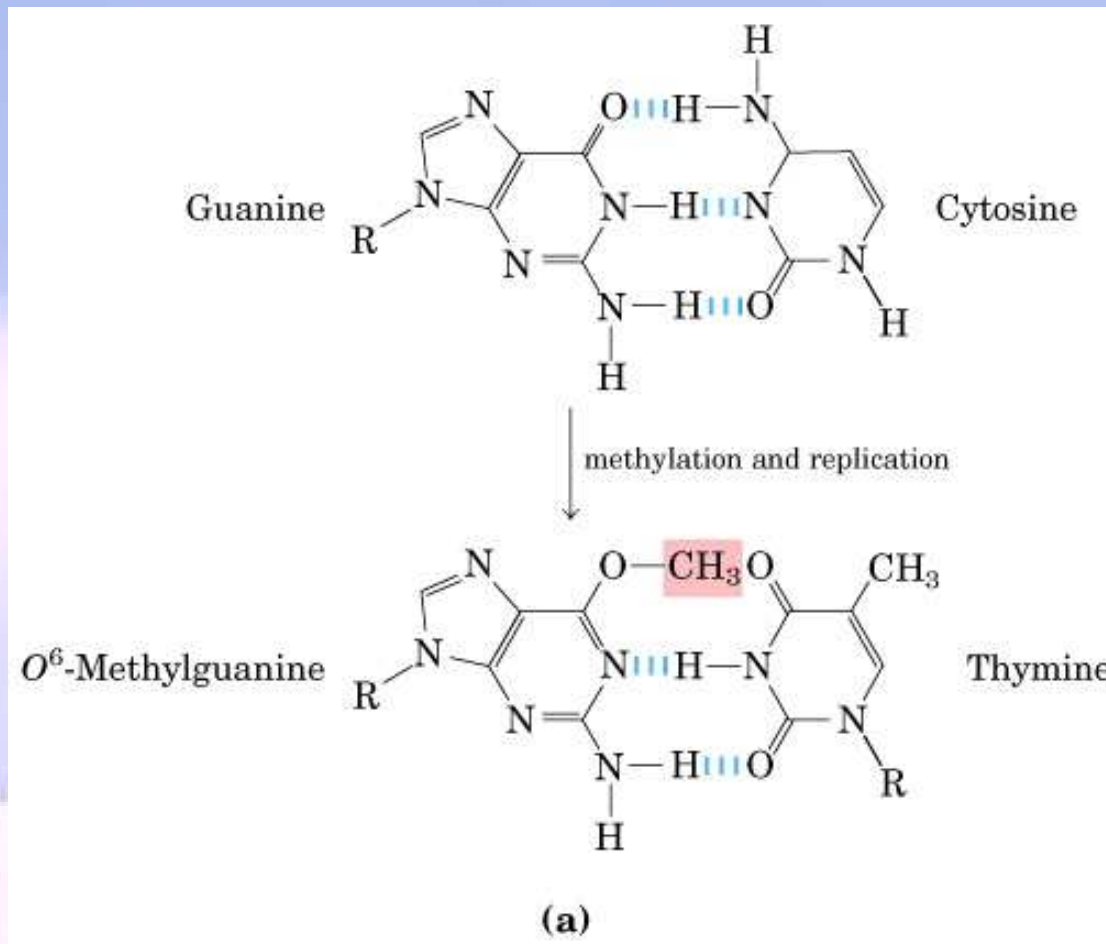
Baktérie, nižší eukaryota, hmyz, rostliny

u savců chybí !!!

Fotolyázy hmyzu a vyšších rostlin = i 6'-4' fotoprodukty !

Reparace O⁶-alkylguaninu

Reparace O⁶-alkylguaninu – „ada“ protein



Adaptivní odpověď vůči působení alkylačních látek (1970 John Cairns)

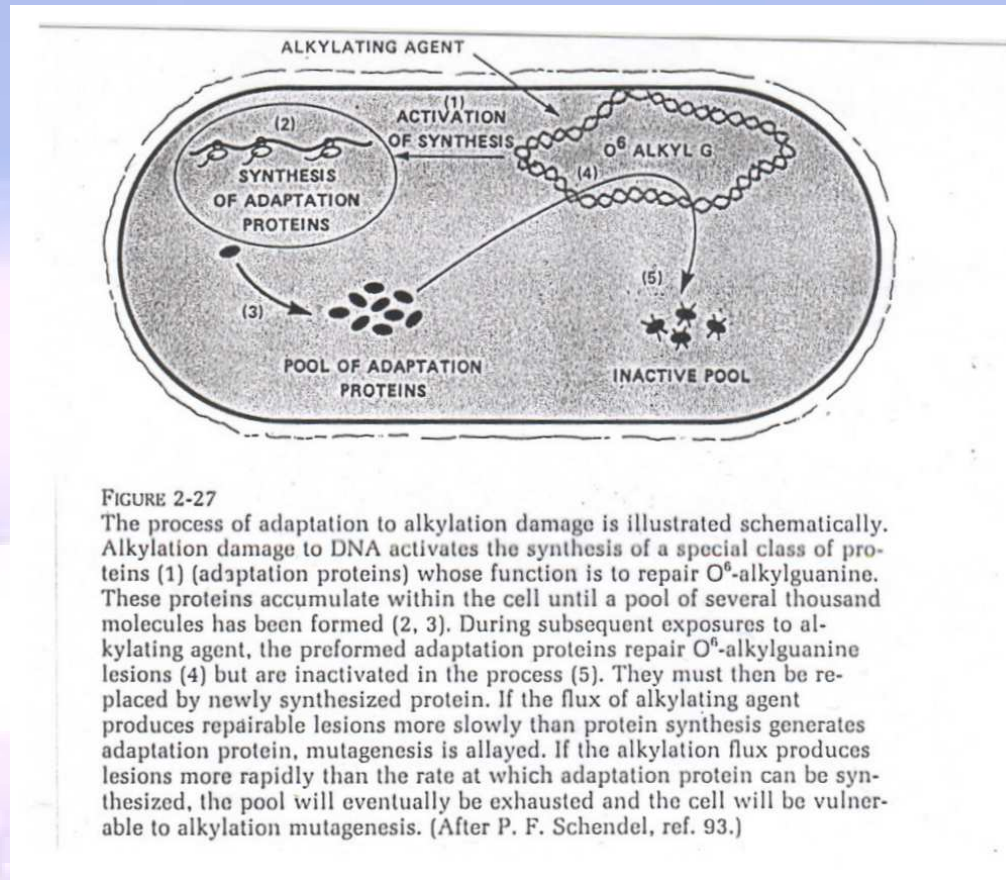
Nízká dávka



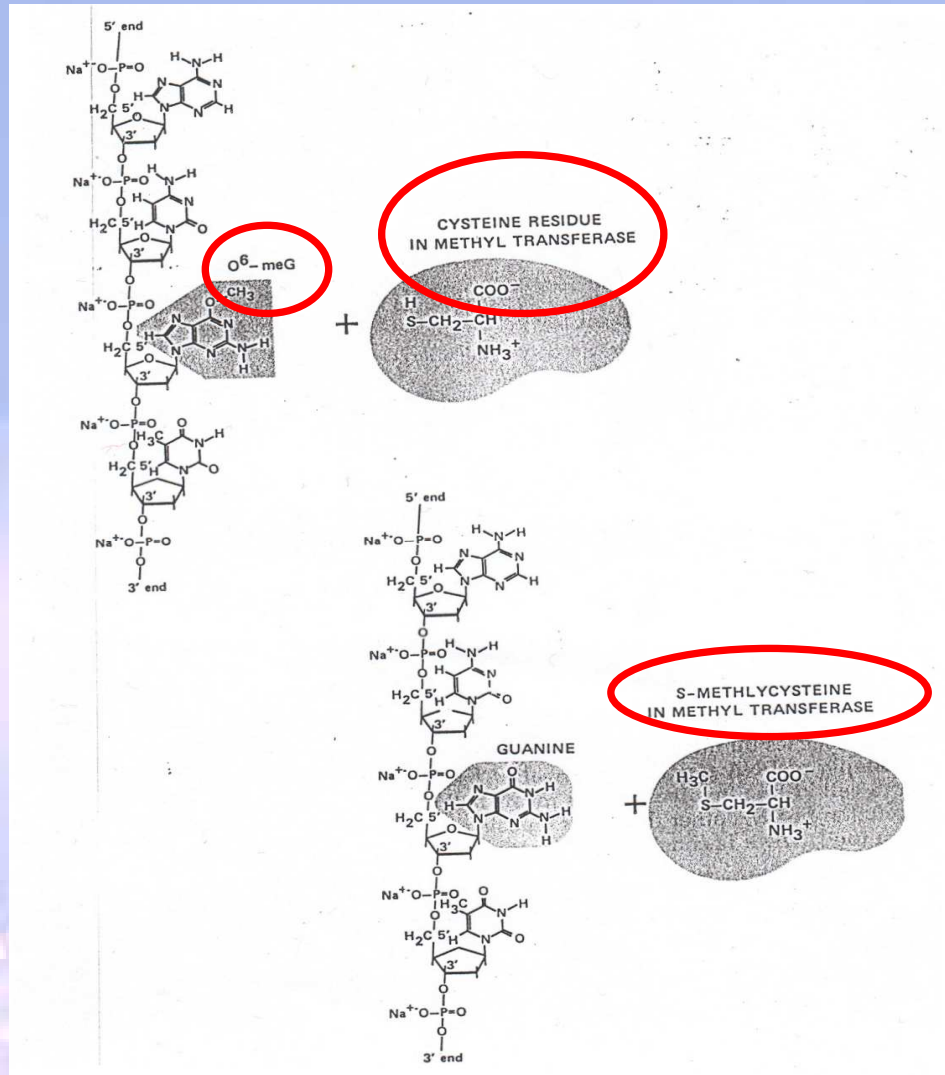
vysoká dávka - lepší přežívání



Akumulace adaptačních proteinů



Činnost O⁶-metylguanin-DNA-metyltransfázy u *E. coli* (ada protein)



Po vystavení buněk *E. coli* metylačním látkám se jejich DNA **metyluje** na O⁶-guaninu, O⁴-tyminu a fosfátových zbytcích

Ada-protein katalyzuje přenos metylových skupin z fosfotriesterů na Cys-69 a z O⁶-alkylguaninu a O⁴-alkyltyminu na Cys-321

Alkylace Cys-69 vede ke konformačním změnám proteinů a přeměňuje jej na **silný aktivátor transkripce**

Zvýšená koncentrace Ada-proteinu a produktu jiných genů má za následek **zesílení opravy DNA !!!**

Reparace jednořetězcových zlomů v DNA

2-4 Repair of Single-Strand Breaks by Direct Rejoining: A Further Example of DNA Repair by Reversal of Damage

Agents that promote the hydrolysis of phosphodiester bonds in duplex DNA are discussed in Chapter 1. Primary among these are ionizing radiation such as X rays. The repair of DNA strand breaks in *E. coli* requires DNA synthetic and/or recombinative events in the majority of cases, since such repair does not occur in mutants defective in these functions (182). However, in vitro, some fraction of single-strand breaks in DNA produced by ionizing radiation under anoxic conditions is repaired by simple rejoining of the ends (183), and such repair may be considered an example of the direct reversal of DNA damage. In these in vitro reactions the incubation of irradiated DNA with the enzyme *polynucleotide ligase* results in the loss of a fraction of the total DNA strand breaks as measured by sedimentation velocity in alkaline sucrose gradients (183). Polynucleotide ligase is a highly specific enzyme that is ubiquitous in its distribution and plays a role in most known biochemical pathways that require the rejoining of strand breaks in DNA (184, 185). A detailed discussion of this enzyme is presented in Section 5-5, where we shall consider the rejoining of newly synthesized DNA to extant DNA during the process of excision repair. The enzyme from *E. coli* has an absolute requirement for NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) and for Mg^{2+} as cofactors (184, 185). All DNA ligases require free ends in duplex DNA, with no missing nucleotides at the site of the break, and the presence of adjacent 3'-OH and 5'-P termini (185) (Fig. 2-29). Thus only strand breaks with these particular characteristics produced by DNA damage are subject to repair by direct reversal.

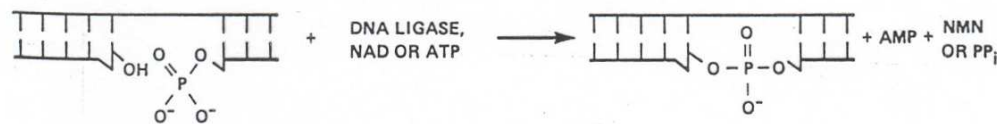
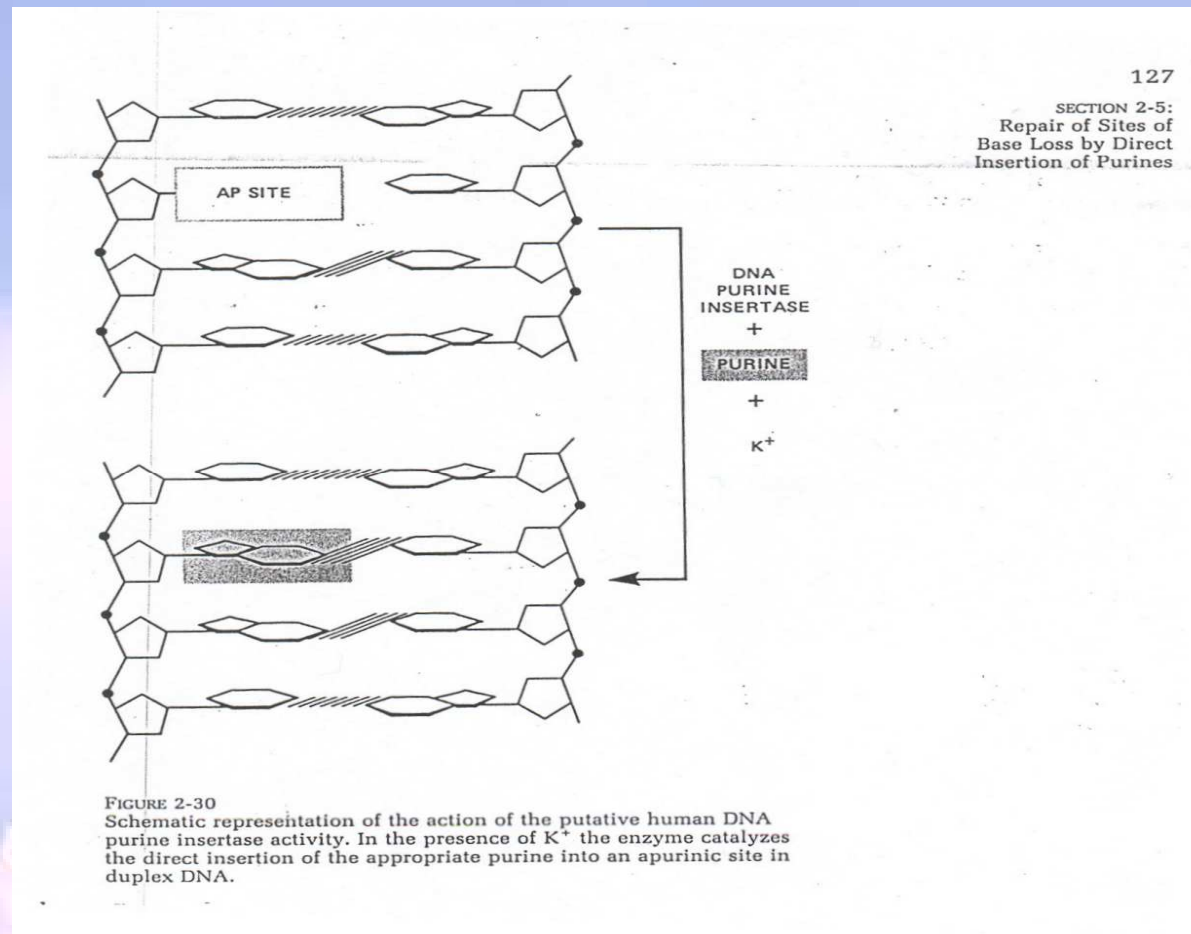


FIGURE 2-29
DNA ligase catalyzes the joining of strand breaks that contain juxtaposed 3'-OH and 5'-P termini in DNA. The enzyme from *E. coli* requires NAD as a cofactor and forms NMN plus AMP. The enzyme encoded by phage T4 requires ATP and forms PPi plus AMP. (NMN, nicotinamide mononucleotide). (From I. R. Lehman, ref. 184.)

Reparace AP míst inzercí purínů

Depurinace/depyrimidinace - AP místa - **puríninzertáza**



Reverze poškození DNA - souhrn.

Reverze poškození DNA představuje přímý způsob reparace DNA vyskytující se jak u prokaryotních tak i eukaryotních organismů, který se vyznačuje těmito obecnými charakteristikami:

- 1) Každá z výše uvedených reakcí (fotoreaktivace, reparace O⁶-alkylguaninu, ligace zlomů a inserce purínů) je zprostředkována produkty jednoho genu, což představuje vysoce ekonomické využití genetické informace.
- 2) Reverzní způsob reparace poškozené DNA je kineticky mnohem výhodnější v porovnání s jinými biochemickými reakcemi vyžadujícími několik následných kroků (např. excizní reparace).
- 3) Obecně se předpokládá, že mechanismy reverze představují bezchybný způsob reparace (error-free) vzhledem k jejich vysoce specifickému účinku.

Excizní reparace – vyštěpení poškození

- **bázová excizní oprava** (base excision repair BER) - vyštěpení modifikované báze (např. modifikované báze, oxidativní poškození, AP místa, jednořetězcové zlomy)
 - **nukleotidová excizní oprava** (nukleotide excision repair NER) – vyštěpení až 30 nukleotidů (CPD, křížové vazby)
 - **mismatch repair**
-

Bázová excizní reparace (BER)

Bázová excizní reparace:

(v každé buňce těla asi 20 000 x denně)

1. Rozpoznání poškození DNA specifickou glykozyázou – vznik AP míst
2. Napadení AP místa 5´ specifickou AP endonukleázou – zlom s 5´ fosfátovým koncovým zbytkem
3. 5´ fosfátový koncový zbytek je vyštěpen DNA-deoxyribosfodiesterázou (dRpáza)
4. Výsledná jednonukleotidová mezera se zaplní opravnou syntézou, která je dokončena DNA-ligázou

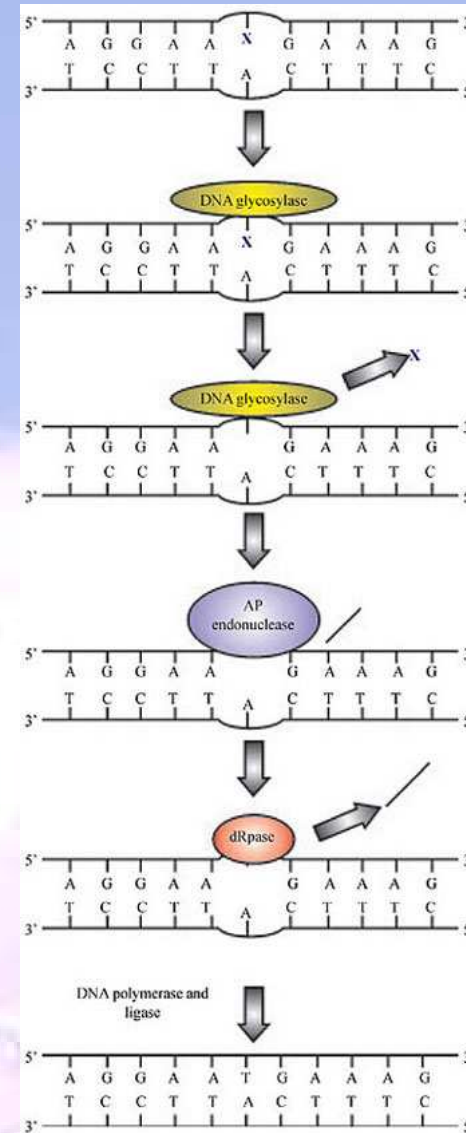


Figure 1. Schematic representation of base excision repair. Base damage (represented as N) is recognized and removed by specific DNA glycosylases (in yellow), generating an AP site. AP endonuclease (shown in blue) then hydrolyses the phosphodiester bond immediately 5' or 3' to each AP site and the *o*-se-phosphate backbone is removed from DNA through the action of dRpase (in red). Finally, the resulting single nucleotide gap is filled by the action of DNA polymerase, and a ligase seals the repaired strand. dRpase = deoxyribosephosphodiesterase.

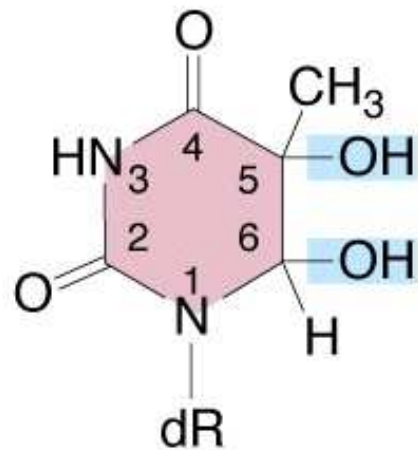
Typy DNA glykozyláz

TABLE 3-3
DNA glycosylases

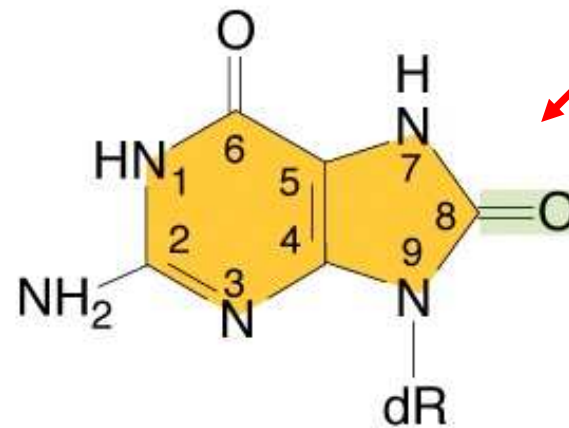
Enzyme	Substrate	Products
Ura DNA glycosylase	DNA containing uracil	Uracil + apyrimidinic sites
Hx DNA glycosylase	DNA containing hypoxanthine	Hypoxanthine + apurinic sites
3-mA DNA glycosylase I	DNA containing 3-methyladenine	3-Methyladenine + apurinic sites
3-mA DNA glycosylase II	DNA containing 3-methyladenine, 7-methylguanine or 3-methylguanine	3-Methyladenine, 7-methylguanine or 3-methyladenine + apurinic sites
FaPy DNA glycosylase	DNA containing formamido-pyrimidine moieties	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-N-methyl-formamidopyrimidine + apurinic sites
5,6-HT DNA glycosylase	DNA containing 5,6-hydrated thymine moieties	5,6-Dihydroxydihydrothymine or 5,6 dihydrothymine + apyrimidinic sites
Urea DNA glycosylase	DNA containing urea moieties	Urea + apyrimidinic sites
PD DNA glycosylase	DNA containing pyrimidine dimers	Pyrimidine dimers in DNA with hydrolyzed 5' glycosyl bonds + apyrimidinic sites

Oxidativní poškození DNA

Oxoguanin glykosyláza 1 (OGG1) – odstraňuje



Thymidine glycol



8-Oxo-7-hydrodeoxyguanosine
(8-oxodG)

Bázová excizní reparace - příklad

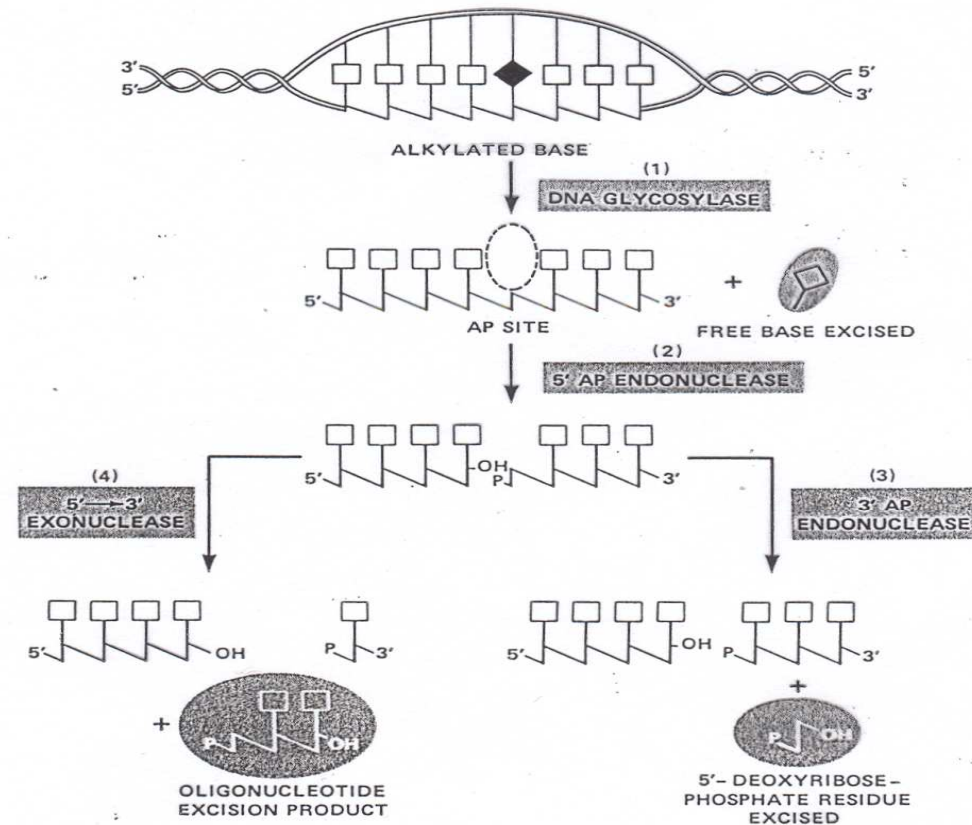
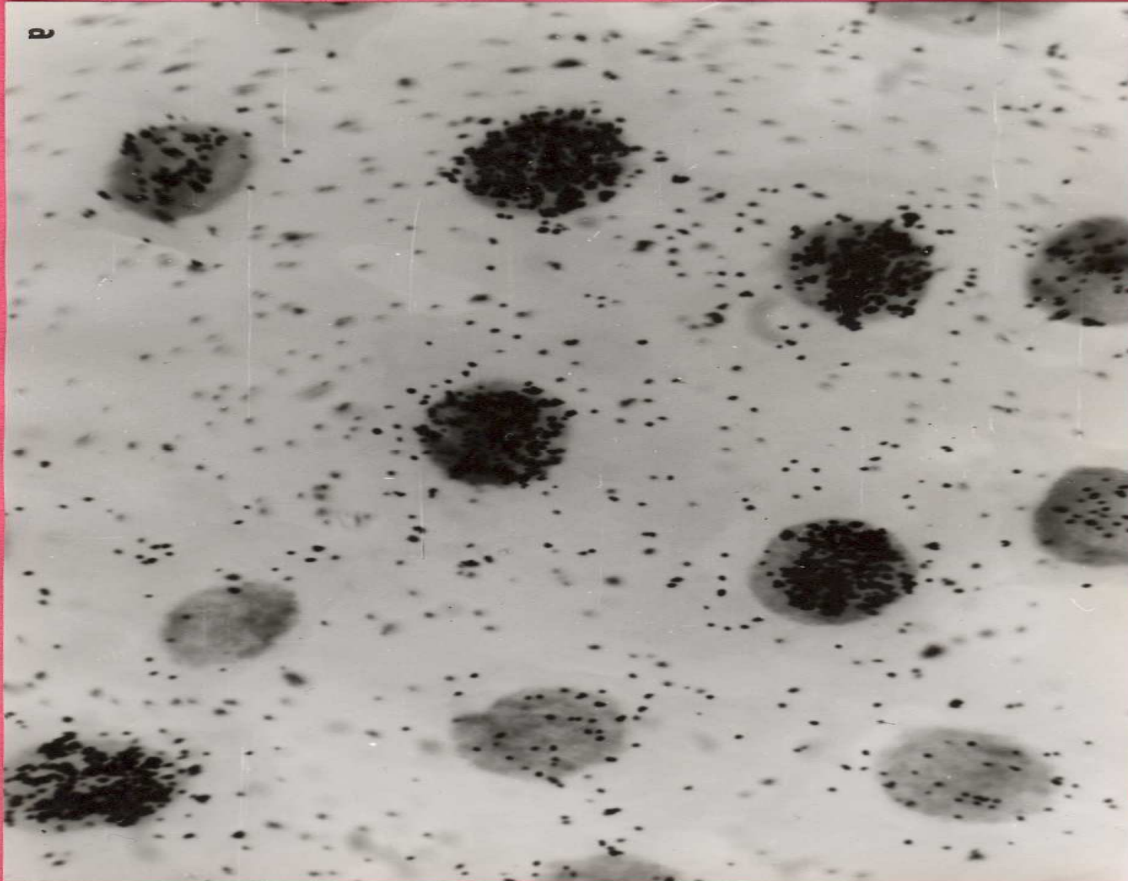


FIGURE 3-1
Schematic representations of excision repair of DNA are shown in this figure and in Figures 3-2, 3-3 and 3-4. In each of these figures the relevant region of only one of the two DNA strands is shown. Some forms of base damage in duplex DNA (e.g., alkylations at certain positions) are recognized by specific DNA glycosylases that catalyze excision of the base (1), leaving apurinic or apyrimidinic (AP) sites in the DNA. When such sites are attacked by 5'-acting AP endonucleases (2), the resulting 5'-terminal deoxyribose-phosphate moieties can be excised by the action of either a 3' AP endonuclease (3) or a 5' → 3' exonuclease (4), leaving gaps in the affected strands.

Opravná (reparační) syntéza DNA – včleňování nukleotidů do DNA mimo S fázi – důkaz reparace DNA



Použití ³H-dTh
autoradiografie

Neprogramovaná
syntéza DNA
polymeráza β

Short patch BER: excize 1 nukleotidu

Long patch BER: excize 2-6 nukleotidů

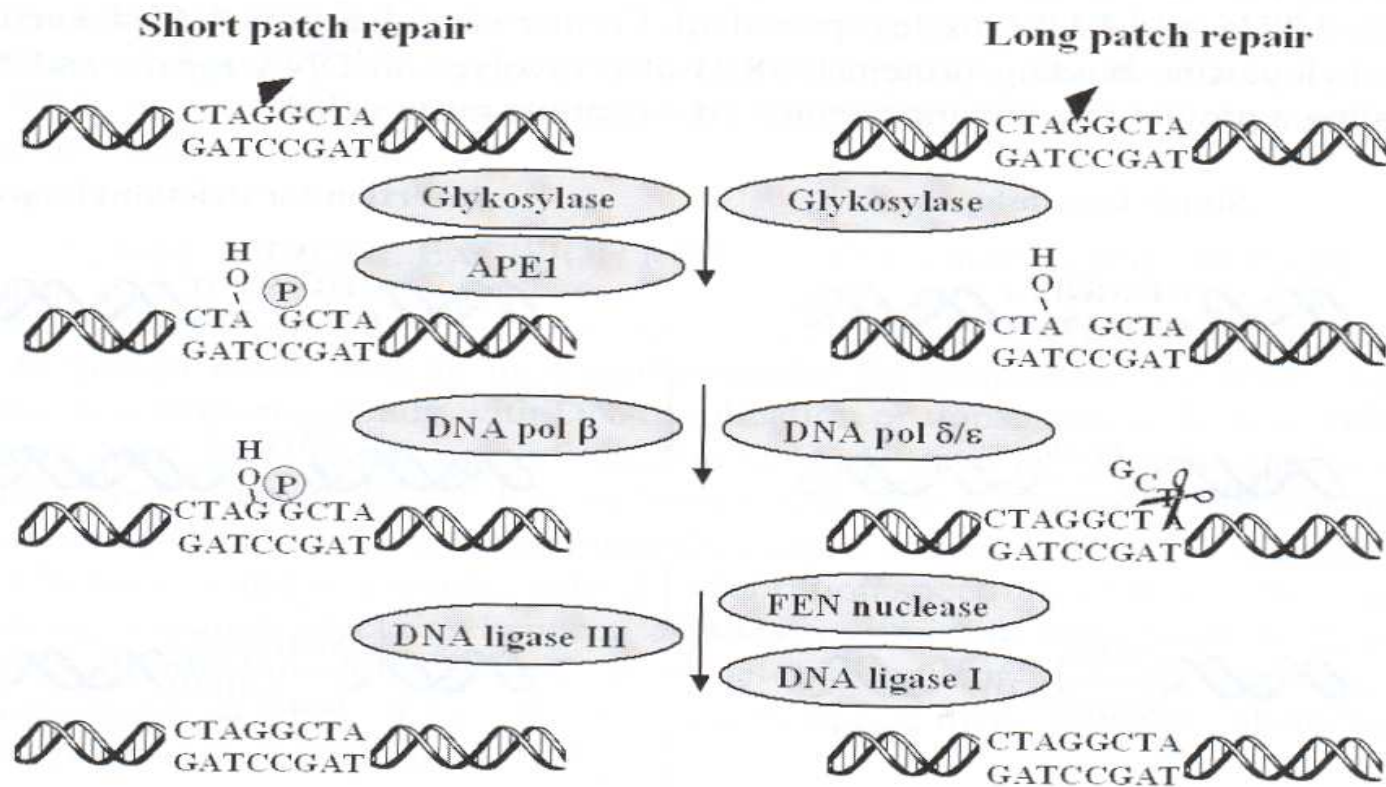


Figure 3.3 Short-patch vs. long-patch DNA repair

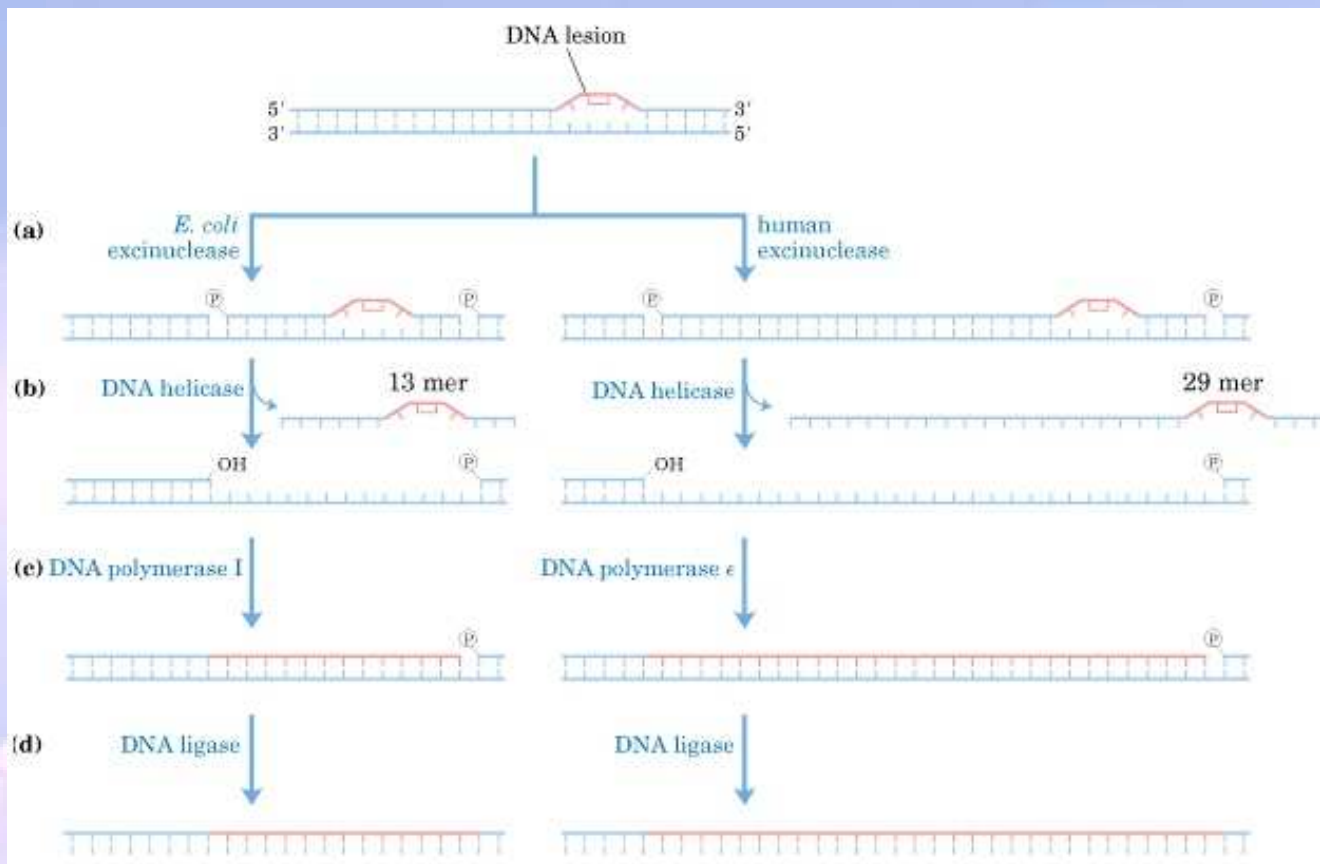
Damaged DNA bases (symbolized by the G with the triangle) can be replaced by short patch (left) or long patch (right) repair employing the indicated enzymes (in the order indicated from top to bottom). Long patch repair is preferred or necessary if deoxyribose is as well damaged and/or a phosphate is lacking.

Nukleotidová excizní reparace (NER)

E. coli: geny *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *kvasinky*: geny RAD

Člověk: XP-A, XP-B, XP-D proteiny

Jednotlivé kroky NER (*E. coli*)



- rozpoznání poškození na základě deformace DNA (*uvrA*, *uvrB*)
- incize (*uvrC*)
- degradace (*uvrD*)
- polymerizace
- ligace

Typy nukleotidové excizní opravy

- **globální genomová oprava**

(pomalejší, eliminuje poškození ze všech částí genomu)

- **transkripčně vázaná oprava**

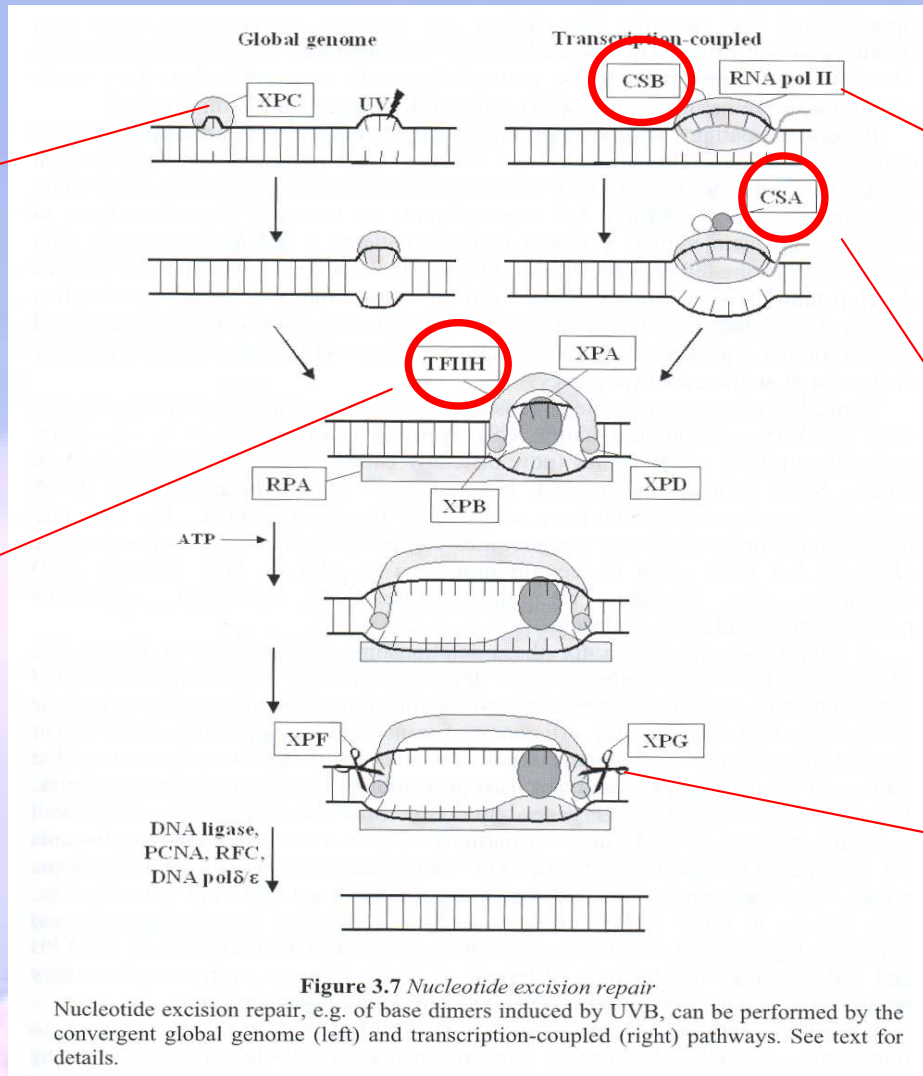
(rychlá, oprava aktivně transkribovaných genů – léze v DNA bránící **transkribci RNA polymerázou II**)

PREFERENČNÍ REPARACE !!!

Globální genomová oprava a transkripčně vázaná oprava

rozpoznání poškození

rozvolnění
dvouřetězcové DNA
transkripční faktor
IIH



omezená na oblasti genomu transkribované pomocí RNA polymerázy II

rozpoznání poškození

aktivace reparačního komplexu THFII

rozpoznávací proteiny

endonukleázy

Preferenční reparace – rychlejší odstraňování CPD z přepisovaného řetězce DNA

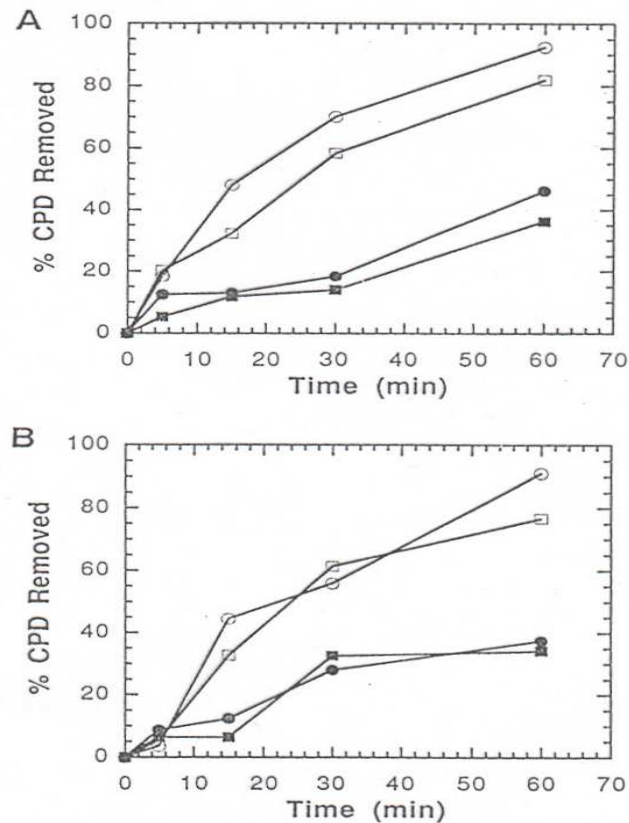
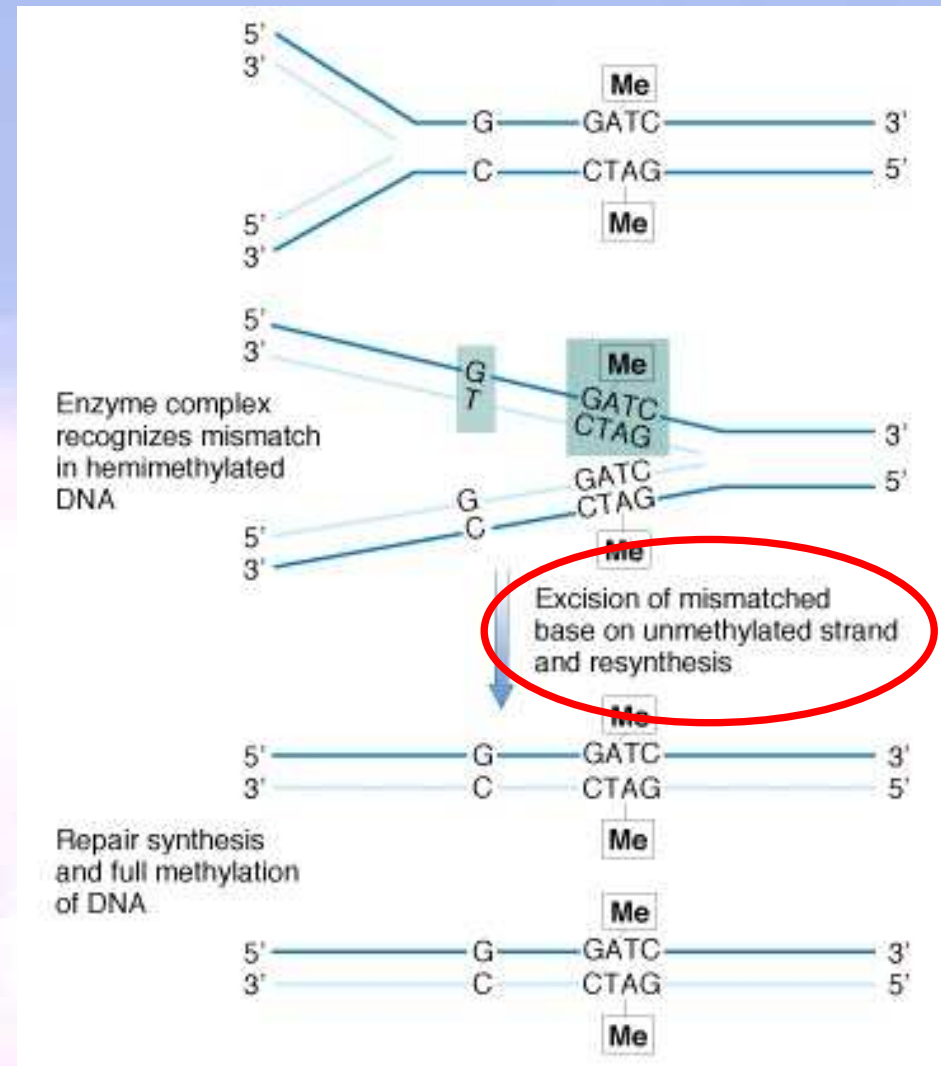
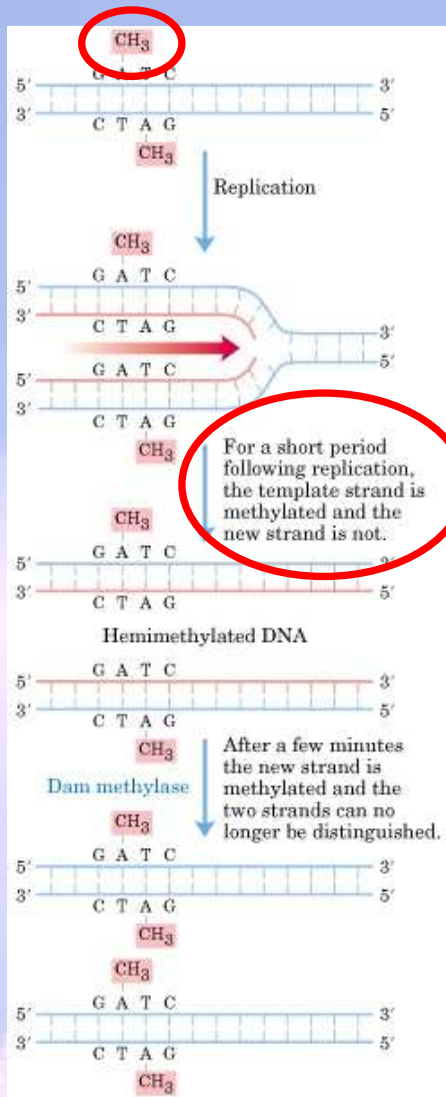
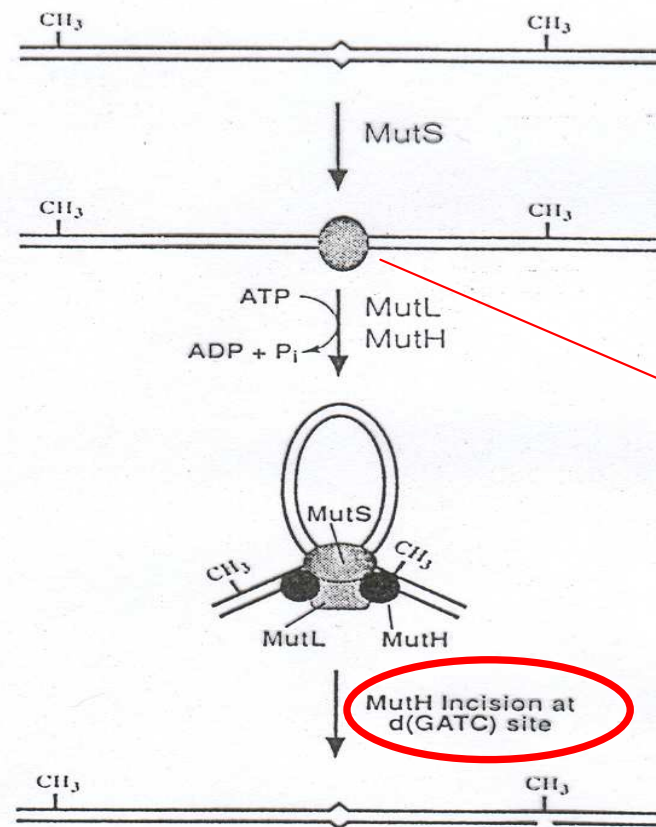


FIG. 2. Time course for removal of CPDs from the transcribed and nontranscribed strands of *RPB2* in the chromosome and plasmid. Exponentially growing cultures of YSH10 (A) and YSH11 (B) at 24°C were UV irradiated (30 J/m²) and incubated in growth medium for the times indicated. Repair was determined from the measured incidences of CPDs in the restriction fragments. □, Transcribed strand, chromosome; ■, nontranscribed strand, chromosome; ○, transcribed strand, plasmid; ●, nontranscribed strand, plasmid.

Mismatch array-oprava chybně zařazené báze



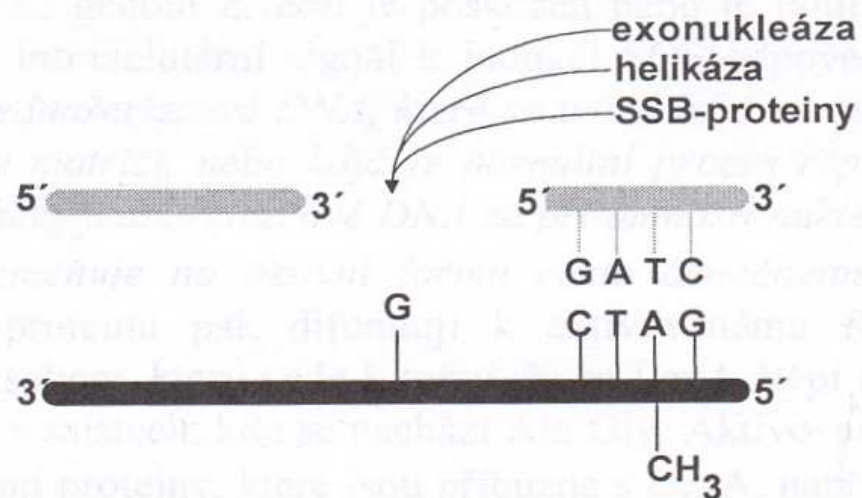
Mismatch repair – proteiny mutS, mutH a mutL (E. coli)



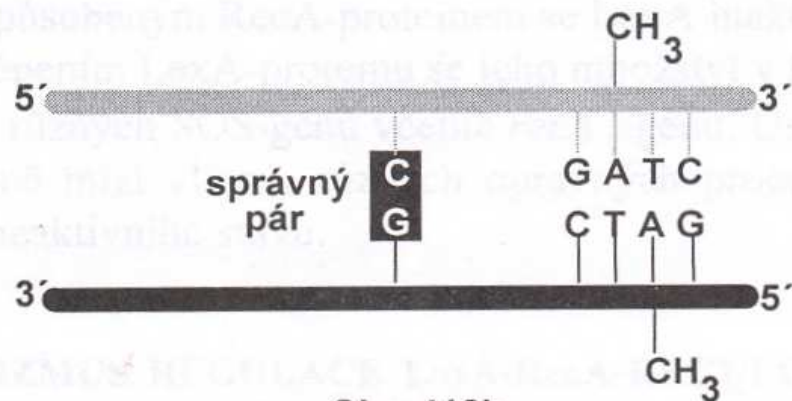
identifikace poškození
nasedají na špatně
zařazenou bázi

Figure 1 Model for initiation of methyl-directed mismatch repair. As discussed in the scheme is based on in vitro properties of the MutH, MutL, and MutS proteins. Since stoichiometry and protein-protein interaction are not understood, those shown are for illustration only.

Odstranění úseku s chybnou bází.



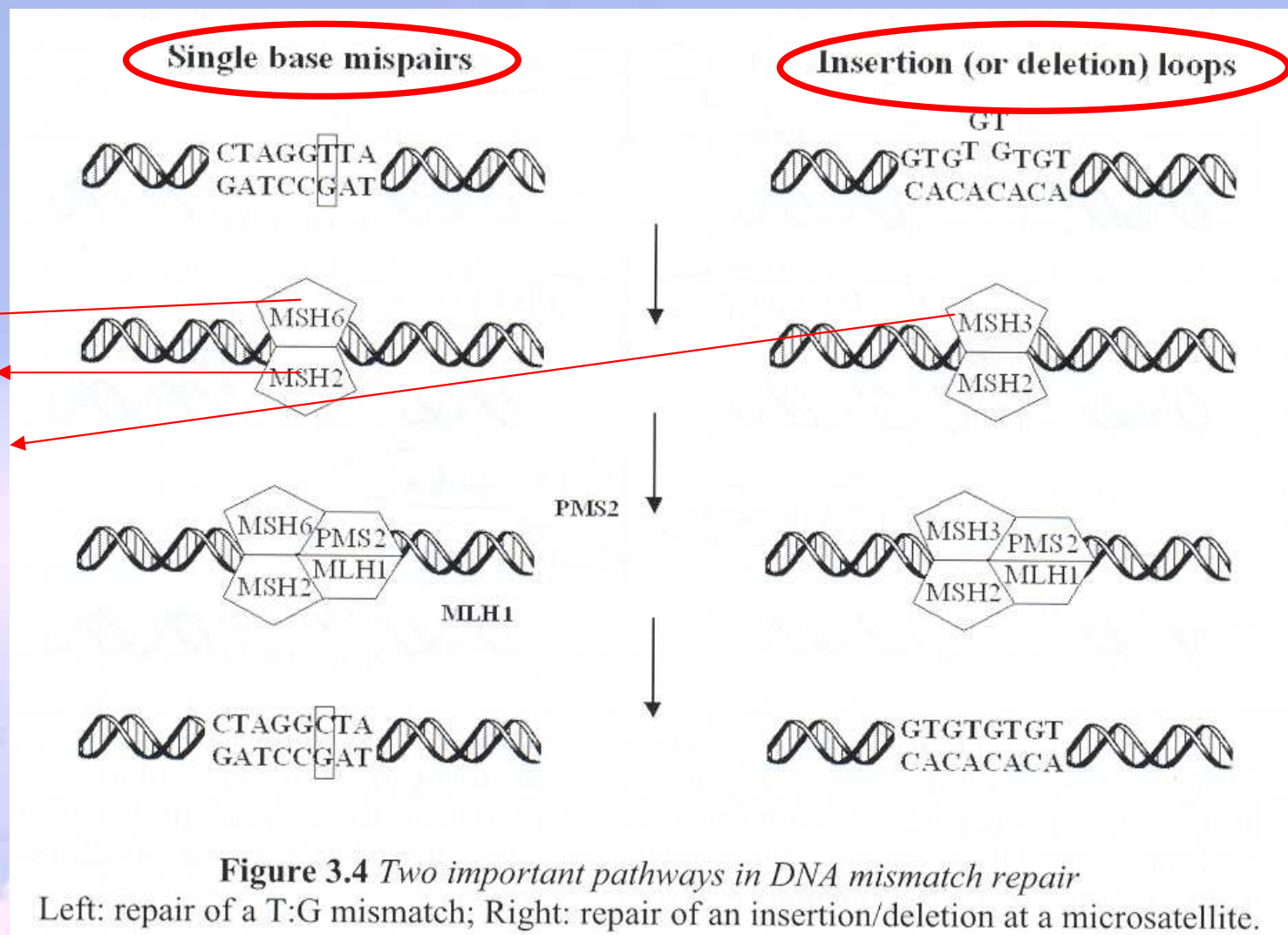
Zaplnění mezery DNA-polymerázou III a ligázou.



Obr. 412b
Oprava chybného párování
(řízená metylací)

Mismatch reparace – odstraňuje nejen chybné báze ale i inserce a delece

Homology
MutS v savčích
buňkách



Mismatch reparace

- **Mutace v genech MSH2 a MLH1 u člověka - častá u HNPCC -**

„hereditary non-polyposis colorectal cancer !!!

- **predispozice k nádorům střev**
-

Tolerance poškození DNA

- přítomnost CPD v DNA – dočasná blokáda replikace – replikace pokračuje – vznik mezer v dceřiném řetězci
 - DNA léze nejsou odstraněny – jde o toleranci poškození v matricovém řetězci - opravuje se **důsledek poškození**
 - oprava mezer v dceřinném řetězci – **postreplikační reparace (vyžaduje homologní sesterskou chromatidu)**
 - **transléze poškození – SOS reparace**
-

Postreplikační reparace – význam recA proteinu

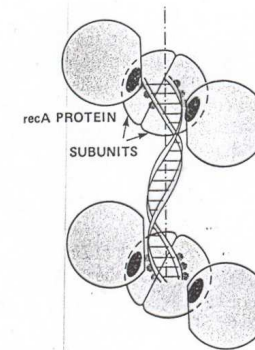
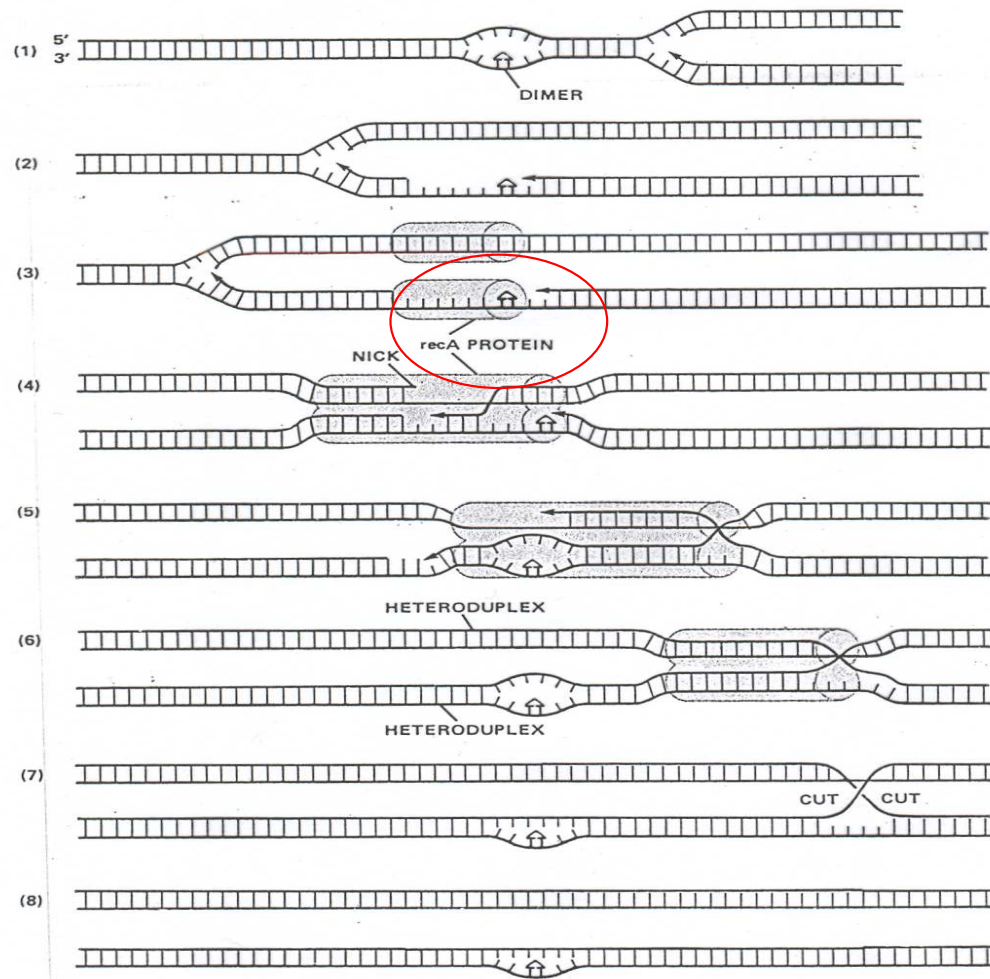


FIGURE 7-23
A sectional view of a recA protein fiber surrounding a DNA duplex. Each monomer is thought possibly to have binding sites for two to three bases on each strand (three are shown here with small colored circles), as well as two protein binding sites (colored ovoids) and a site for ATP (not shown). The DNA chain is shown to be extended to approximately 18 bp per helical turn (see Fig. 7-22). (From P. Howard-Flanders and S. C. West, ref. 55.)

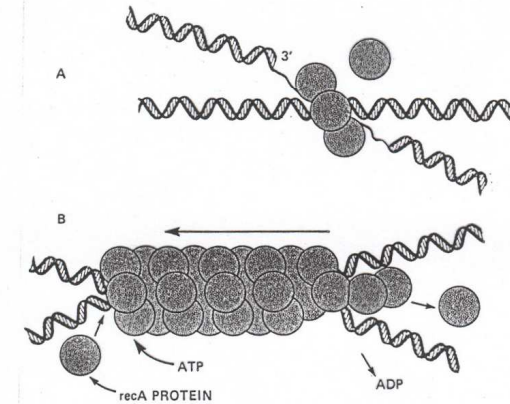


FIGURE 7-24
Diagrammatic representation of recA protein bound to DNA during genetic recombination. A few monomers binding head to tail on a single-strand gap may promote initial contacts between single-strand and duplex regions of DNA (A). Once homologous contacts between the single-strand and the duplex are made, more recA monomers bind head to tail, extending the complex toward the left (arrow) (B). ATP hydrolysis may occur at the tail end (right), where recA protein could undergo allosteric changes that lead to its dissociation. (From P. Howard-Flanders and S. C. West, ref. 55.)

Postreplikační reparace

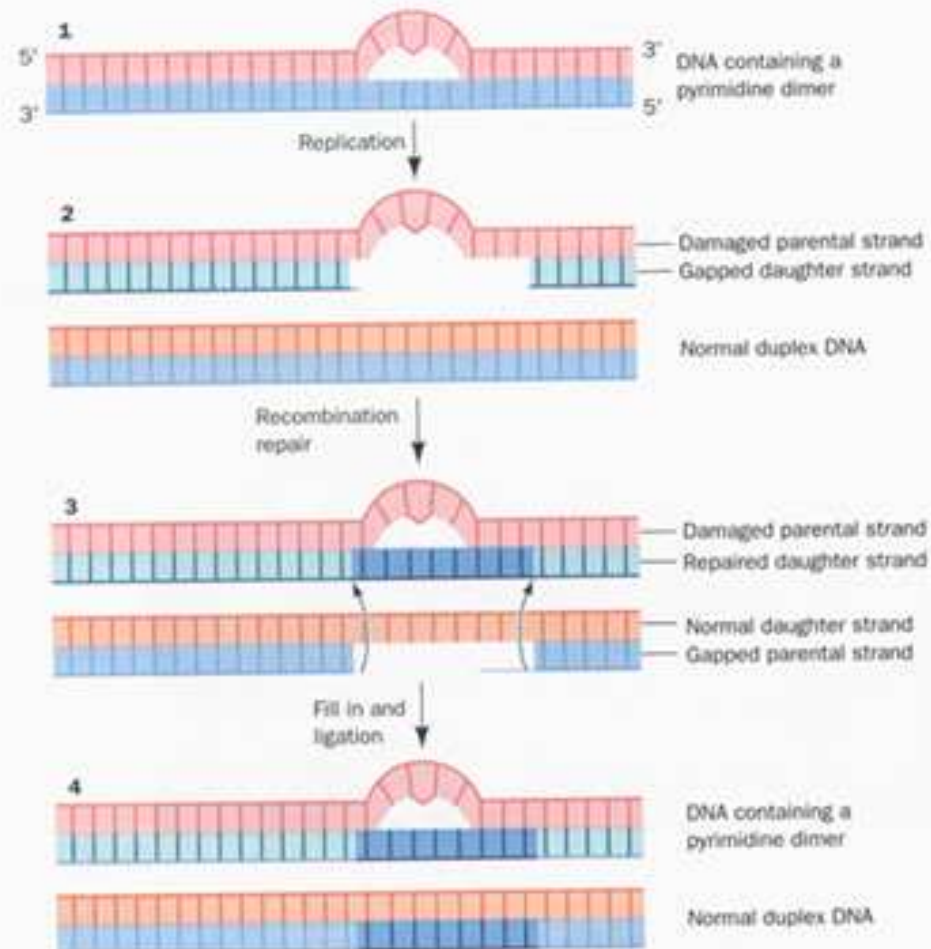
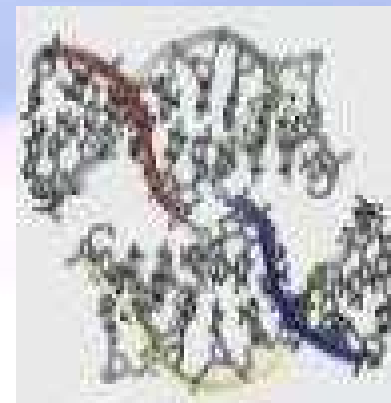
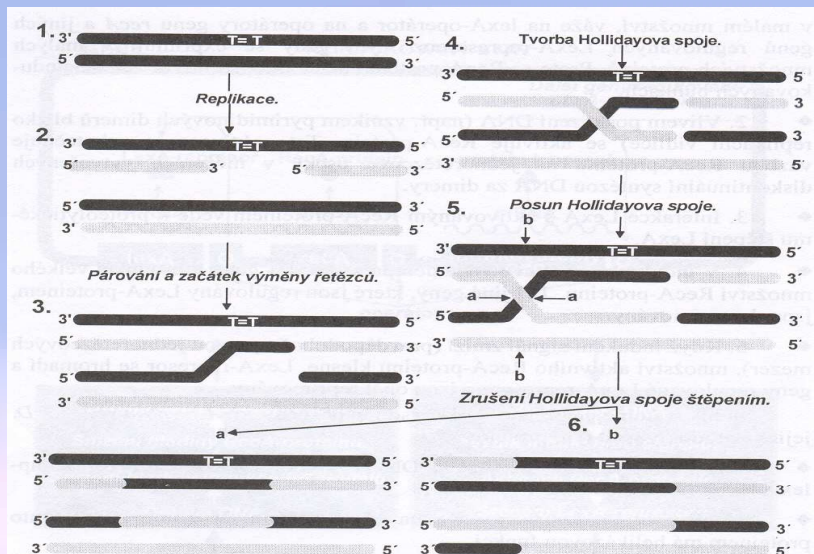
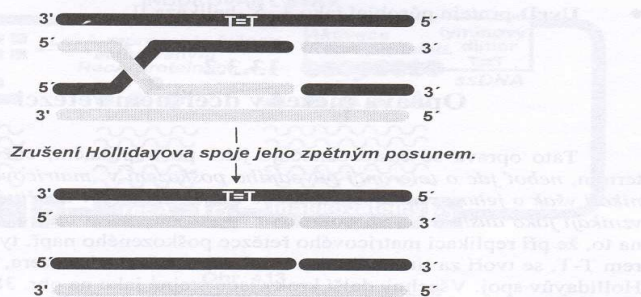


FIGURE 31-41. In recombination repair, the gap in a newly synthesized DNA strand opposite a damage site is filled by the corresponding segment from its sister duplex.

Oprava mezer v dceřinném řetězci DNA- rekombinační reparace



Obr. 414
Schéma opravy mezer v dceřinném řetězci



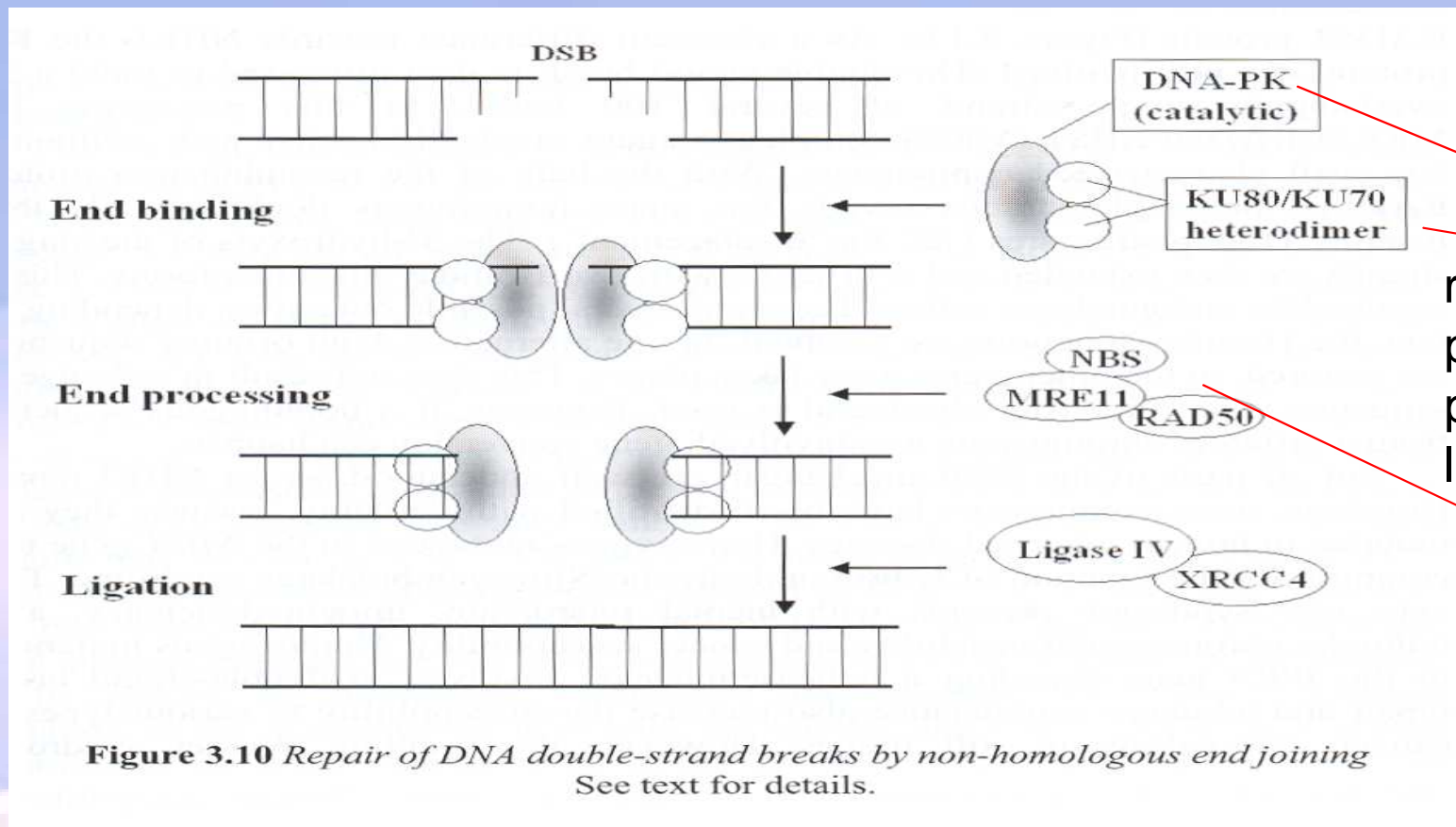
Obr. 415
Převrácený posun Hollidayova spoje

Reparace dvouřetězcových zlomů v DNA

- dvouřetězcové zlomy – exogenní vlivy (záření) nebo endogenní (tvorba T-buněčných receptorů nebo immunoglobulinových genů)
 - rekombinační oprava
 1. **homologická rekombinace (HR)** – poškozený úsek DNA získá genetickou informaci z nepoškozeného homologu (např. sesterská chromatida nebo z homologického chromozomu: error-prone - možnost vzniku duplikace, delece, translokace)
 2. **nehomologická oprava tzv. „end-joining“**, jde o spojení dvou DSB bez výrazné potřeby sekvenční homologie mezi konci DNA (NHEJ) – převládá v savčích buňkách
-

Reparace dvouřetězcových zlomů DNA nehomologní opravou (G₁ fáze)

Častý způsob reparace u člověka !!! Není nutná sekvenční homologie

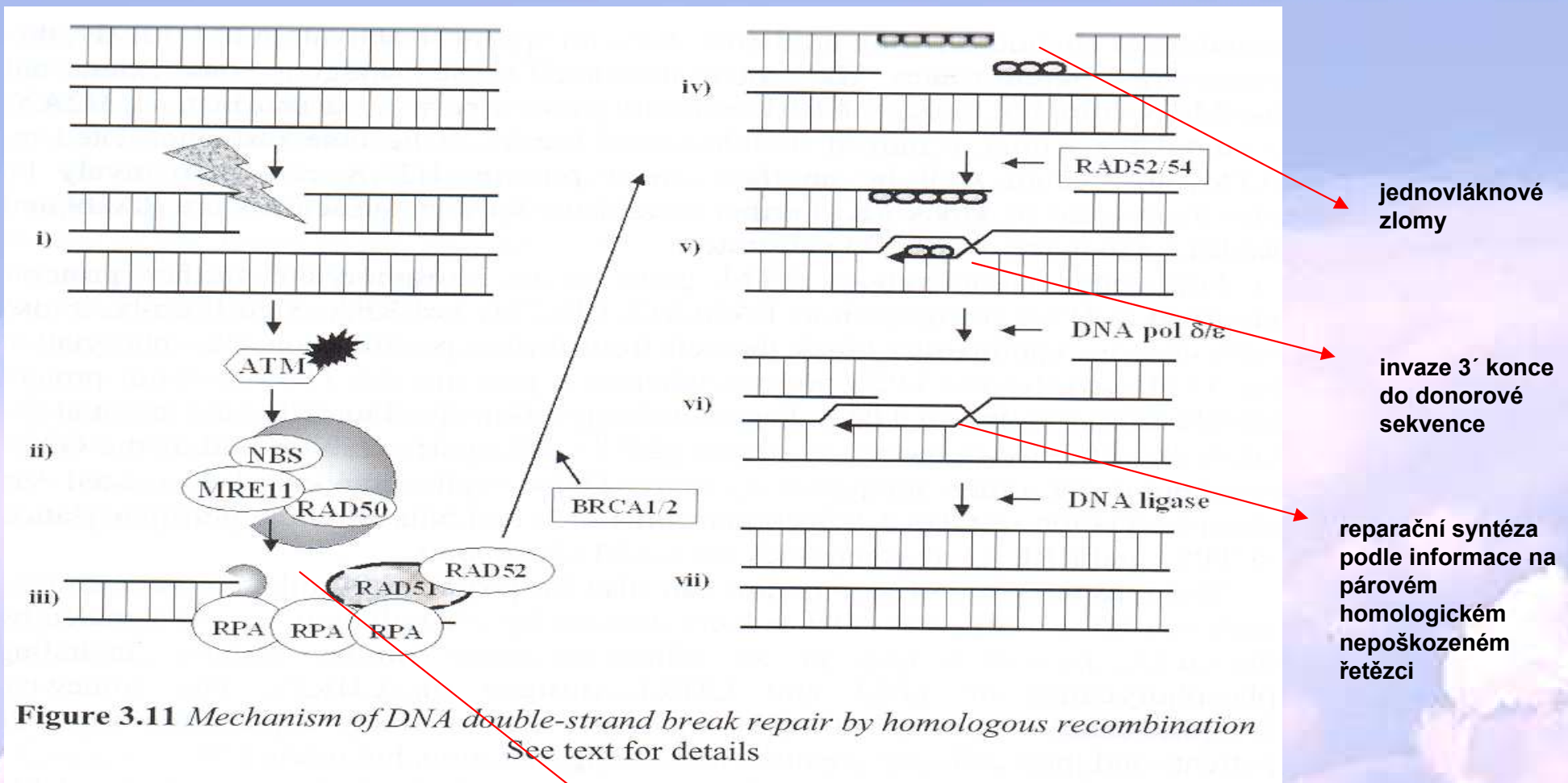


rozpoznání poškození a přiblížení pro ligaci

ochrana před nelegitimní rekombinací, úprava konců

vznik delecí !!!

Reparace dvouřetězcových zlomů DNA homologní rekombinace (G₂ fáze)



Reparace křížových vazeb – FANC proteiny

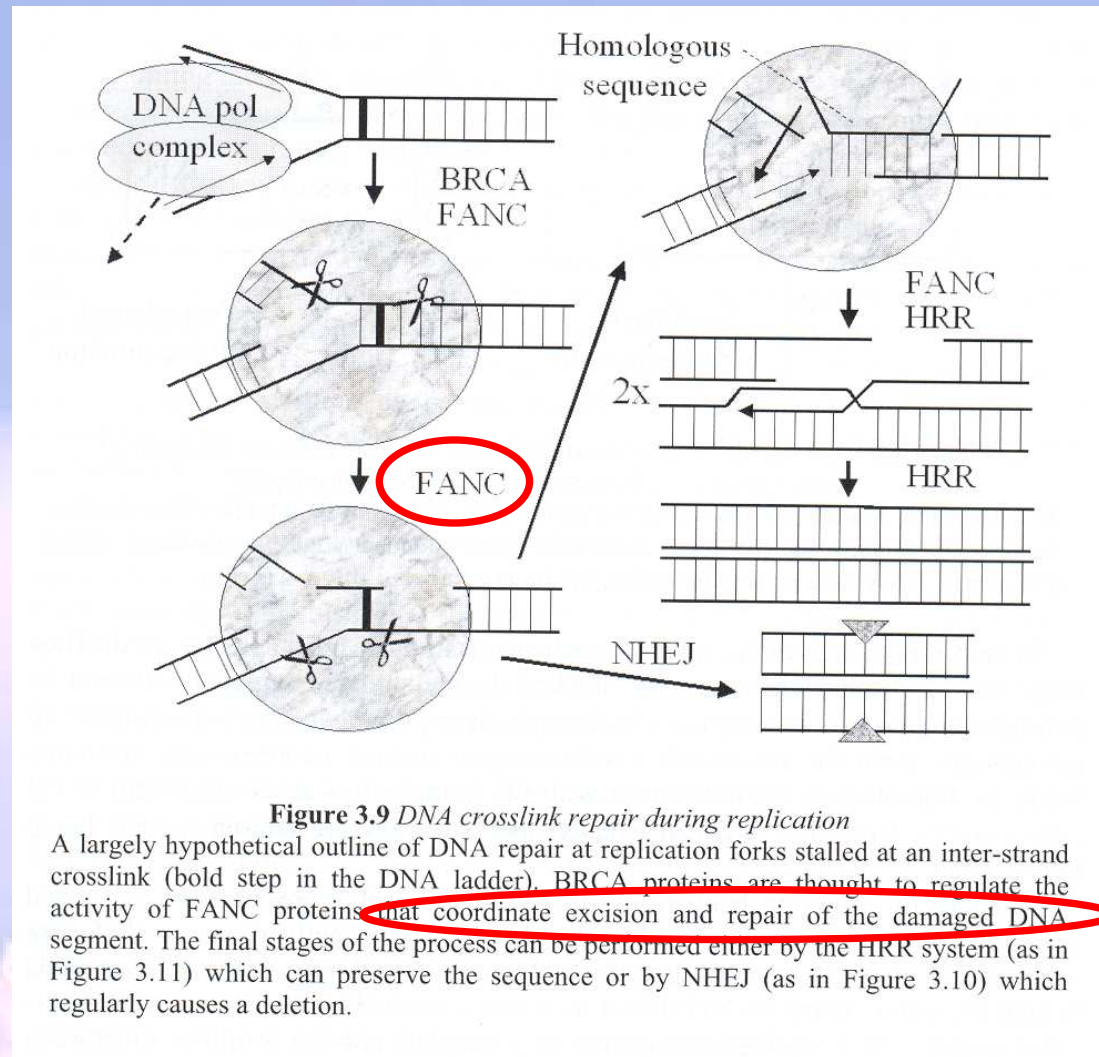


Figure 3.9 DNA crosslink repair during replication

A largely hypothetical outline of DNA repair at replication forks stalled at an inter-strand crosslink (bold step in the DNA ladder). BRCA proteins are thought to regulate the activity of FANC proteins that coordinate excision and repair of the damaged DNA segment. The final stages of the process can be performed either by the HRR system (as in Figure 3.11) which can preserve the sequence or by NHEJ (as in Figure 3.10) which regularly causes a deletion.

Syntéza DNA přes poškození

- důležitý buněčný mechanismus, který umožňuje překonat blok v replikaci způsobený poškozením DNA
 - inducibilní typ opravy DNA, kterým se buňky vyhýbají **letálnímu účinku** některých poškození
 - **error-prone reparace !!!**
-

SOS reparace

(koordinovaná syntéza enzymů a činnost reparačních mechanismů indukovaná poškozením DNA)

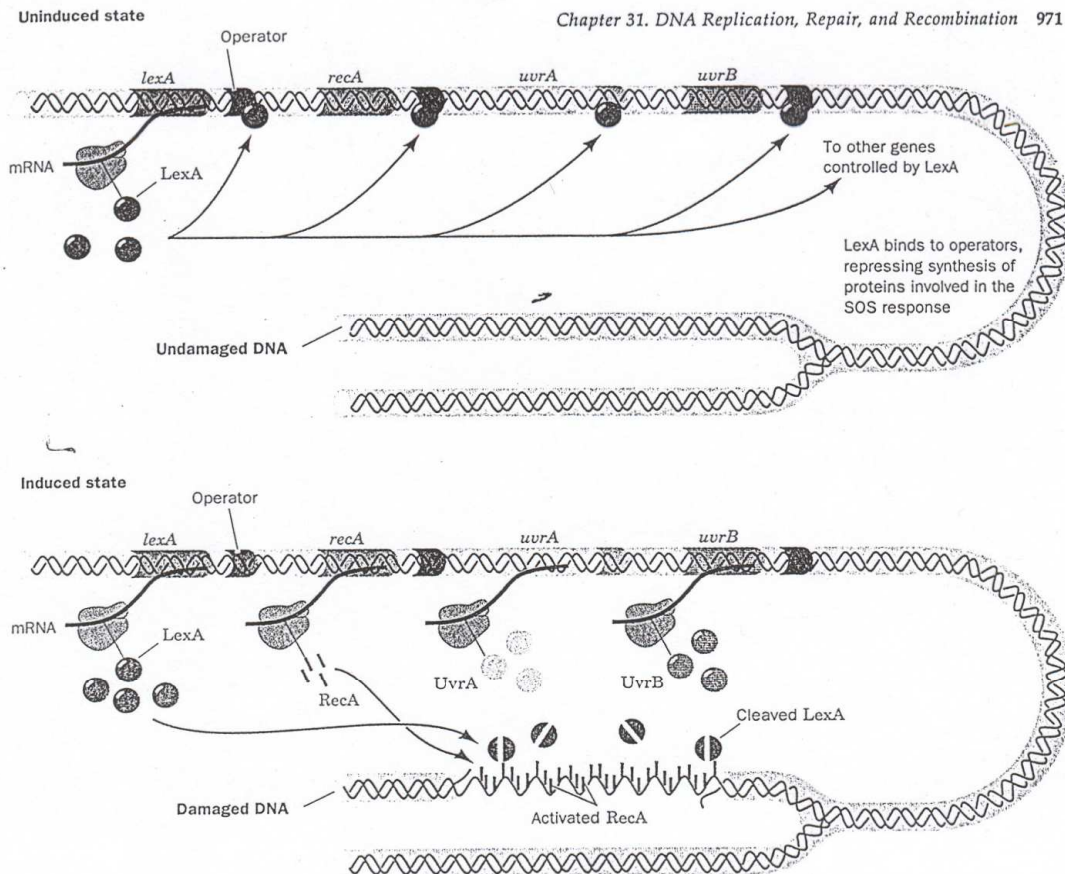


Figure 31-32
In a cell with undamaged DNA (above), LexA largely represses the synthesis of LexA, RecA, RecBCD, UvrABC, and other proteins involved in the SOS response. When

there has been extensive DNA damage (below), RecA is activated, by binding to the resulting single-stranded DNA to stimulate LexA self-cleavage. The consequent synthesis of the SOS proteins results in the repair of the DNA damage.

SOS reparace

LexA protein se

v malém množství, váže na *lexA*-operátor a na operátory genu *recA* a jiných genů regulovaných LexA-represorem. Tyto geny se exprimují v malých množstvích proteinů. Proto se RecA-protein nachází konstitutivně též v neindukovaných buňkách.

- ◆ 2. Vlivem poškození DNA (např. vznikem pyrimidinových dimerů blízko replikační vidlice) se aktivuje RecA-protein. Tato aktivace se uskutečňuje vazbou RecA-proteinu na jednořetězcové úseky v mezerách vytvořených diskontinuální syntézou DNA za dimery.
- ◆ 3. Interakce LexA s aktivovaným RecA-proteinem vede k proteolytickému štěpení LexA.
- ◆ 4. V indukovaném stavu vede dereprese *recA*⁺- genu k produkci velkého množství RecA-proteinu. Též jiné geny, které jsou regulovány LexA-proteinem, jsou dereprimovány.
- ◆ 5. Když indukční signál zmizí (pravděpodobně opravou jednořetězcových mezer), množství aktivního RecA-proteinu klesne, LexA-represor se hromadí a geny regulované LexA-represorem jsou opět reprimovány.

Indukovatelné geny na obr. 413 jsou např. geny *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, jejichž produkty jsou tyto proteiny:

- ◆ **UvrA-protein**, který se váže na DNA ozářenou UV-světlem; tvoří komplex s UvrB-proteinem.
- ◆ **UvrB-protein**, který se váže na UvrA-protein. V komplexu s tímto proteinem má helikázovou funkci.
- ◆ **UvrC-protein** působící v komplexu s UvrB-proteinem jako endonukleáza.
- ◆ **UvrD-protein** působící jako 3'-5'-helikáza II.

Inducibilní reparace

Inducibilní enzymy zprostředkovávající adaptivní odpověď.

E. coli

3 - MeA - glykosyláza II (gen alkA)

Odstraňuje: 3 - MeA, 3 - EtA, 3 - MeG, O²- MeC, O²- MeT

O⁶ - MeG - DNA methyltransferáza (gen ada)

Odstraňuje: O⁶ - MeG, O⁴ - MeT, O- MetP

Klastogenní adaptace indukovaná nízkými dávkami ionizujícího záření - aberace (*Vicia faba*)

of DNA replication. This class of clastogens comprises ionizing radiations, β -rays from ^3H -labelled deoxynucleotides and some polypeptide antibiotics, e.g., bleomycin.

The intention of the present work was to find out whether or not S-phase-independent agents are able to trigger clastogenic adaptation. For this purpose the aberration yields after conditioning and challenge treatments with X-rays and bleomycin were studied. Both agents proved to be able to trigger clastogenic adaptation.

Material and methods

Primary root-tip meristems of seedlings of the reconstructed *Vicia faba* karyotype ACB (cf. Michaelis and Rieger, 1971; Döbel et al., 1978) were used for clastogen treatment.

X-Rays were delivered by a 'Tu.R.' T250 X-ray unit at a rate of 0.75 Gy/min at 20 mA, 200 kV and a total filtration equivalent to 0.5 mm Al + 0.5 mm Cu. At all exposures, the focus-sample distance was 42.5 cm with a field size of 20 × 24 cm. Root tips were X-rayed at room temperature with a conditioning dose of 0.06 Gy (6 rad) and a challenge dose of 0.6 Gy (60 rad), with an interval of 2 h. Bleomycin sulphate was administered at 0.1 mg/l for 1 h (conditioning) and 10 mg/l for 1 h (challenge dose), again with an interval of 2 h between the two treatments.

After clastogen treatment, roots were exposed to 0.05% colchicine (2 h) after various recovery times (see legends), fixed with ethanol/glacial acetic acid 3:1, and chromosome preparations were made according to the Feulgen method. For each recovery time at least 100 metaphases (from 2 slides) of the first cell cycle after interphase treatment were inspected for the presence of the following types of chromatid aberrations: isochromatid breaks, duplication and intercalary deletions, chromatid

Results

(1) Clastogenic adaptation after X-ray treatment

Fig. 1 shows the frequencies of metaphases with X-ray-induced chromatid aberrations as a function of recovery time. Exposure of root-tip meristems to the conditioning dose of 0.06 Gy (curve 1) resulted in rather low aberration frequencies with a maximum of 4.4% at 3 h and 6 h recovery time, respectively. Application of the challenge dose of 0.6 Gy yielded an aberration maximum of 26.3% at 3 h recovery time. When the test material was first X-rayed with the conditioning dose (0.06 Gy) and, 2 h later, with the challenge dose (0.6 Gy), the yield of challenge dose-induced chromatid aberra-

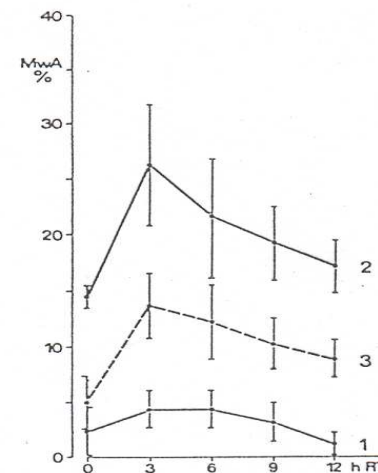


Fig. 1. Reduction of the yield of metaphases with chromatid aberrations (MWA) by conditioning treatment with a low dose of X-rays (0.06 Gy) prior to challenging with X-rays (0.6 Gy). Curve 1: 0.06 Gy. Curve 2: 0.6 Gy. Curve 3: 0.06 Gy, and 2 h later, 0.6 Gy. RT: recovery time in h after challenge treatment.

Klastogenní adaptace indukovaná nízkými dávkami ionizujícího záření - mikrojádra (Vicia faba)

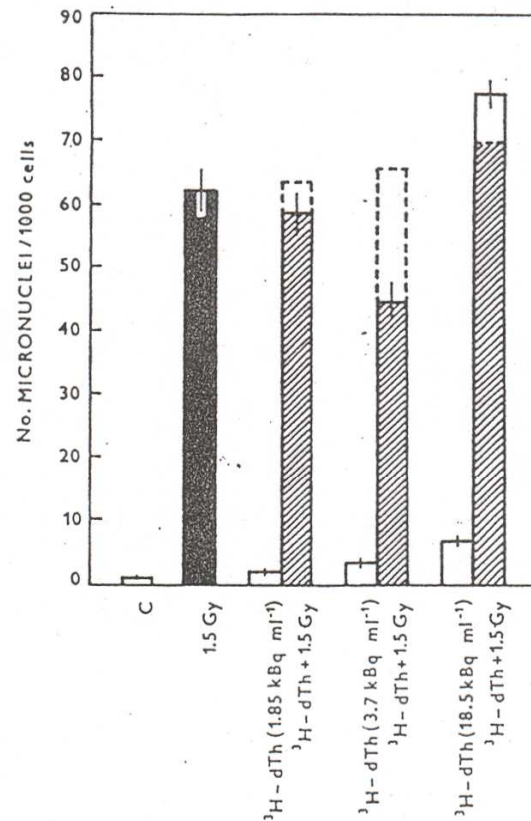
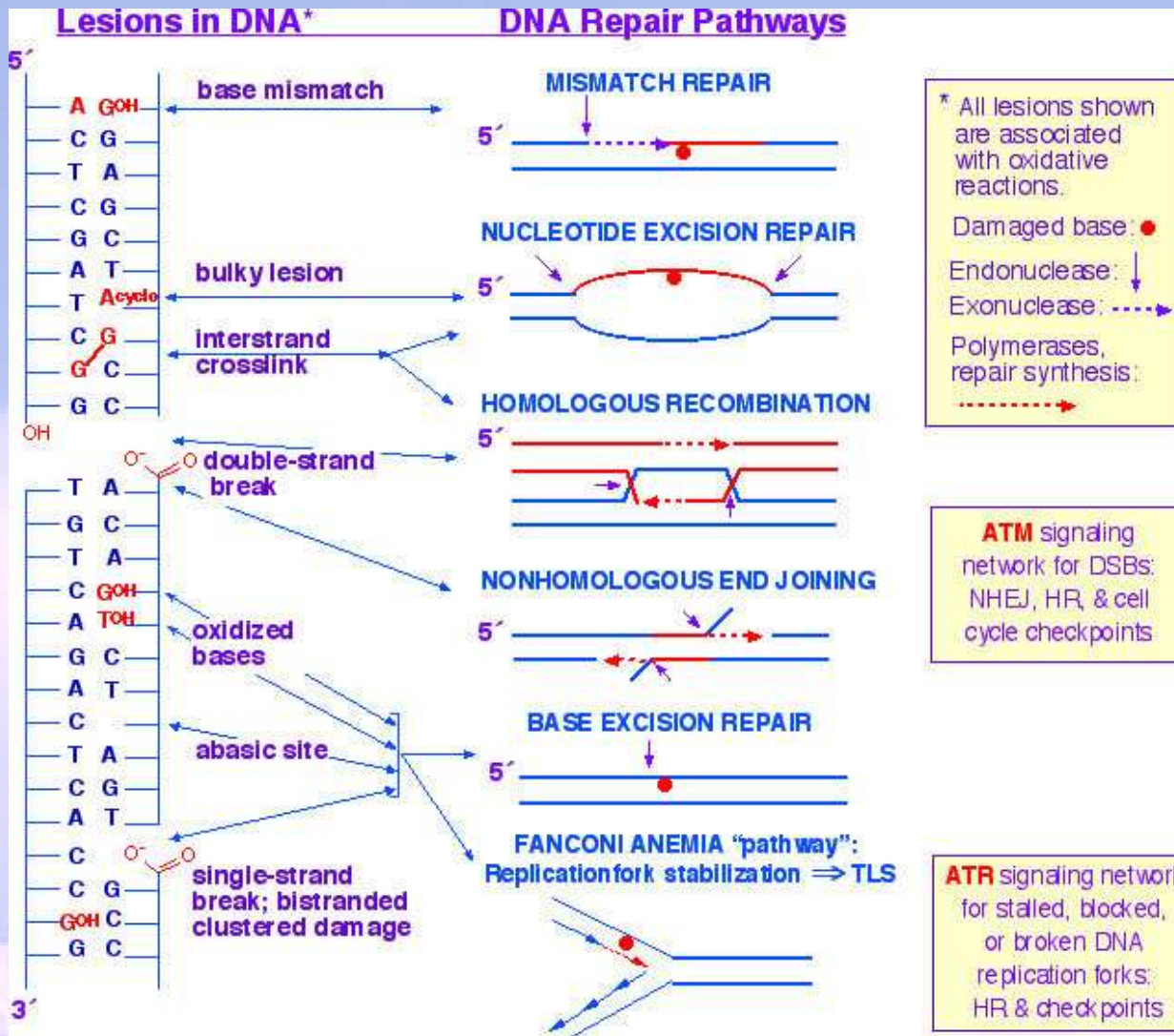
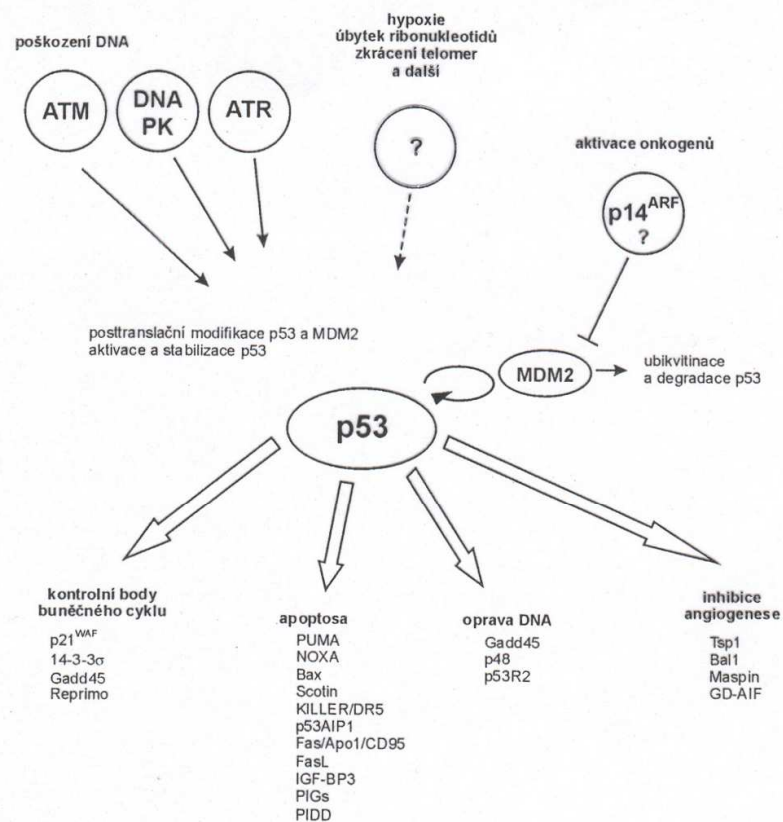


Fig. 2. The induction of micronuclei after a 24 h pretreatment with $^3\text{H-dTh}$ and subsequent gamma-irradiation with a dose of 1.5 Gy in *Vicia faba* root tip cells. Dotted lines show the yields expected on the basis of additive effects of $^3\text{H-dTh}$ and gamma-rays.

Mechanismy reparace některých typů DNA lézí



Reparace DNA a gen p53



Obr. 1. Funkce proteinu p53. p53 je klíčovým bodem složité signální sítě, ve kterém se setkávají a integrují různé intracelulární a extracelulární signály. Buněčný stres vyvolává signály, které vedou k modifikaci p53 a jeho negativního regulátoru MDM2. Stabilizovaný a aktivovaný protein p53 pak aktivuje transkripci řady genů, jejichž produkty vedou k zastavení buněčného cyklu, indukci apoptosy, opravám DNA a inhibici angiogeneze (podle Vogelstein *et al.* 2000).

Inhibitory repair DNA

74

ANDREW R. S. COLLINS AND ROBERT T. JOHNSON

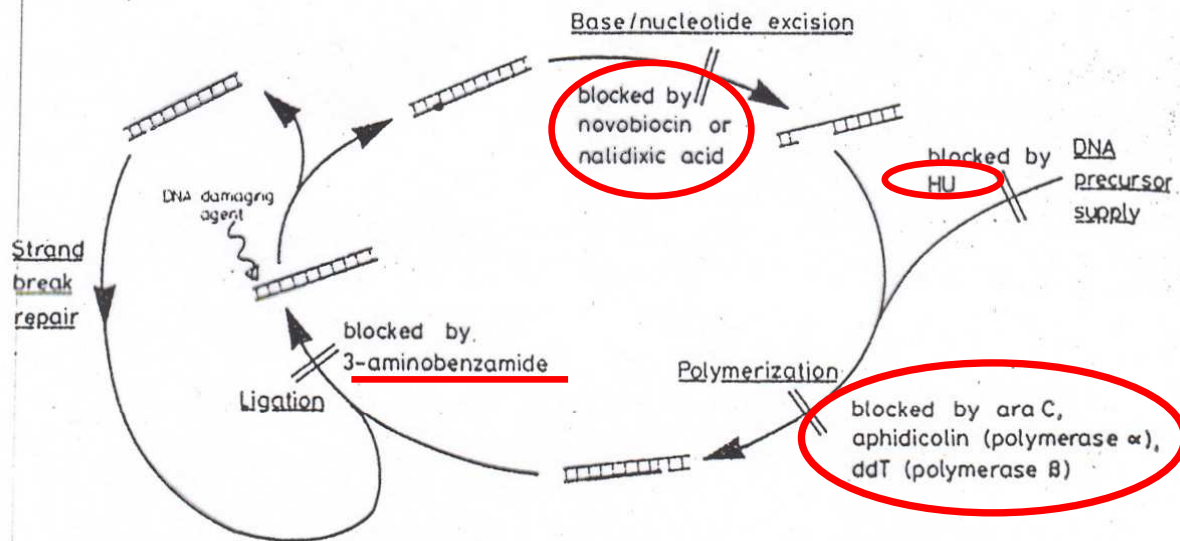


FIG. 1. A simplified scheme illustrating repair of DNA lesions and showing sites of action of typical inhibitory agents. Base excision repair involves enzymatic or spontaneous removal of damaged base leaving an apurinic/aprimidinic (AP) site which is attacked by an AP endonuclease, followed by an exonuclease; the consequent gap is filled by DNA polymerase and the repair patch sealed into preexisting DNA by polynucleotide ligase. Nucleotide excision repair follows a similar route after the incision by a lesion-specific endonuclease (e.g., UV endonuclease at the site of cyclobutane pyrimidine dimers resulting from UV irradiation). The size of the repair patch tends to reflect the nature of the lesion. Simple strand breaks may be repaired in a single step by polynucleotide ligase. The extent of inhibition of these various steps by a given agent will depend on such factors as type of lesion, cell type, and state of growth, as discussed in the text. [For further details of repair mechanisms, see the review by Hanawalt *et al.* (1979).]

Poruchy reparačních systémů

- zvýšený výskyt malignit
 - přecitlivělost vůči látkám poškozujícím DNA
 - přecitlivělost vůči UV-záření
 - onemocnění nervového systému
 - některé poruchy imunitního systému
-

Nemoci způsobené poruchami reparace DNA

table 11.9

Some DNA Replication and Repair Disorders

Disorder	Frequency	Defect
Ataxia telangiectasis	1/40,000	Deficiency in kinase that controls the cell cycle
Bloom syndrome (two types)	100 cases since 1950	DNA ligase is inactive or heat sensitive, slowing replication
Fanconi anemia (several types)	As high as 1/22,000 in some populations	Deficient excision repair
Hereditary nonpolyposis colon cancer	1/200	Deficient mismatch repair
Werner syndrome (a progeria)	3/1,000,000	Deficient helicase
Xeroderma pigmentosum (nine types)	1/250,000	Deficient excision repair
Trichothiodystrophy (five or more types)	Fewer than 100 cases	Deficient excision repair

Nemoci způsobené poruchami reparace DNA



a.



b.

figure 11.15

DNA repair disorders. (a) Trichothiodystrophy (a form called Cockayne syndrome) causes a child to appear aged. Excision repair fails. (b) The marks on this child's face are a result of sun exposure. He is highly sensitive because he has inherited xeroderma pigmentosum (XP), also an impairment of excision repair. The large lesion on his chin is a skin cancer.

Vrozené defekty DNA reparace a predispozice k nádorům

Table 3.2. Inherited defects in DNA repair and predisposition to cancer

<i>Syndrome</i>	<i>Mode of inheritance</i>	<i>Repair system affected</i>	<i>Gene(s) involved</i>	<i>Tissue with increased cancer risk</i>
Xeroderma pigmentosum	recessive	nucleotide excision repair	XPA-G (<i>ERCC1-7</i>) genes, others	skin
Cockayne	recessive	transcription-coupled nucleotide excision repair	<i>CSA, CSB</i>	no significant increase
Ataxia telangiectasia	recessive	strand-break repair	<i>ATM</i>	multiple
Fanconi anemia	recessive	crosslink repair	<i>FANC</i> genes, <i>BRCA2</i>	hematopoietic system, others
Nijmegen breakage	recessive	strand break repair	<i>NBS</i>	hematopoietic system
Bloom	recessive	strand-break repair (HRR?)	<i>BLM</i>	multiple
Werner	recessive	strand-break repair (NHEJ?)	<i>WRN</i>	multiple
Hereditary breast cancer	dominant	homologous recombination repair	<i>BRCA1, BRCA2, others (?)</i>	breast, ovary
Hereditary non-polyposis carcinoma coli	dominant	mismatch repair	<i>MSH2, MLH1, PMS2, others</i>	colon, endometrium, stomach, others

18. Ataxia teleangiectasia

18

(Louis-Bar syndrome, Syllabův-Hennerův syndrom)

Diagnostická kritéria: Kožní a spojivkové teleangiektázie • Cerebelární ataxie • Imunodeficiencie • Chromozomální fragilita • Zvýšená hladina alfa-fetoproteinu v séru

Klinické projevy:

Hlava: „Maskovitý“ obličej • Strabismus, fixační nystagmus.

Kůže: Kožní a spojivkové (okulokutánní) symetrické teleangiektázie - na kůži obličej ve tvaru motýla, v krajině ušních boltců a očních koutků • Hyperpigmentace i hypopigmentace (skvrny barvy „bílé kávy“), vitiligo, předčasné šedivění • Kožní infekce, ekzémy, atrofické kožní změny, snížená vrstva podkožního tuku.

Nervový systém: Progresivní cerebelární ataxie, abazie, choreoatetóza, intenční tremor • Monotonní skandovaná řeč.

Imunitní systém: Porucha buněčné imunity, snížené hodnoty imunoglobulinů (IgA, IgE, IgM) • Hypoplazie thymu, hypoplazie tonzil, lymfopenie • Recidivující infekce • Sklon k malignitě (kůže a lymforetikulární systém).

Laboratorní nálezy: Chromozomální fragilita (zvýšený počet zlomů a přestaveb - přestavby mezi chromozómy 7 a 14) • Snížená odpověď na stimulaci lymfocytů fytohemaglutininem, zvýšená radiosenzitivita. Zvýšená hladina alfa-fetoproteinu v séru.

Jiné: Endokrinní poruchy (dysfunkce hypofýzy, hypogonadismus, diabetes mellitus) • Dystrofizace • Mentální retardace • Malý vzrůst • Opožděný kostní věk.

Manifestace klinických projevů je různá. Ataxie se manifestuje asi ve 2. roce života, teleangiaktázie mezi 2. - 5. rokem, mentální deficit je zřetelný asi kolem 10. roku života. Postižení je letální.

Diferenciální diagnostika: Seemanov syndrom II (155), Friedreichova ataxie, hepatolentikulární degenerace.

Genetika: Dědičnost autosomálně recesivního typu (McK:*208900). Lokalizace genu: 11q22-q23.

Prenatální diagnostika: Chromozomální vyšetření a určení hladiny alfa-fetoproteinu v plodové vodě.

První popis a výskyt: Syndrom byl poprvé popsán Syllabou a Hennerem v roce 1926. Popis Louis-Barové je až z roku 1941. Označení ataxia telangiectasia uvedli Boderová a Sedgwick v roce 1958. Výskyt mezi novorozenci 1:30 000 - 1:100 000.

Literatura:

Fiorilli, M., Businco, L., Pandolfi, F., Paganelli, R., Russo, G., Aiuti, F.: Heterogeneity of immunological abnormalities in ataxia-teleangiectasia. *J. Clin. Immunol.* 3, 1983, 135-141. • Jaspers, N. G. J., Gatti, R. A., Baan, C., Linssen, P. C. M. L., Bootsma, D.: Genetic complementation analysis of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome: a survey of 50 patients. *Cytogenet. Cell Genet.* 49, 1988, 259-263. • Schwartz, S., Flannery, D. B., Cohen, M. M.: Tests appropriate for the prenatal diagnosis of ataxia telangiectasia. *Prenat. Diagn.* 5, 1985, 9-14.



Obr. 18.1, 18.2. Děvčátko, stáří 14 1/2 roku. Snížená vrstva podkožního tuku, flekní deformity končetin, deformace hrudní a bederní páteře. Hypomimie, oboustranné spojivkové teleangiektázie.

23. Bloomův syndrom

23

(Bloom-German syndrome, Congenital telangiectatic erythema)

Diagnostická kritéria: Teleangiektatický erytém • Fotosenzitivita • Malý vzrůst • Chromozomální fragilita (instabilita)

Klinické projevy:

Hlava: Mikrocefalie, akrocefalie (i dolichocefalie), úzký obličej (hypoplazie lícních kostí) • Krátký nos • Nepravidelná dentice, klenuté patro, ustupující dolní čelist • Prominující ušní boltce.

Skelet: Luxace kyčlí, pes equinovarus, syndaktylie, klinodaktylie, nadpočetné prsty • Malý vzrůst (prenatální i postnatální růstová retardace).

Kůže: Teleangiektatický erytém (nos, tváře, rty, uši, předloktí, dorza rukou) • Fotosenzitivita, cheilitis actinica bullosa • Nepravidelné pigmentace, skvrny barvy „bílé kávy“ • Atrofické i ichtyotické kožní změny • Hypertrichóza.

Genetika: Hypospadias, hypoplasie mláček, hypoplasie prsů, Leyteriochismus, atavita

Laboratorní nálezy: Chromozomální fragilita (zvýšený počet chromozomálních zlomů a přestaveb, zvýšený počet chromatidových výměn), porucha reparace DNA (snížená aktivita DNA ligázy) • Snížení imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM).

Jiné: Sklon k respiračním, infekčním onemocněním • Zvýšený výskyt leukémií, lymfomů, solidních tumorů (nádory jazyka, hrtanu, plic, jícnu, tlustého střeva, dělohy, prsních žlaz, kožní tumory) • Vysoký (infantilní) hlas • Mentální retardace.

Kožní změny se manifestují nejčastěji až po oslunění, zcela výjimečně již u novorozence.

Diferenciální diagnostika: Cockayneův syndrom (26), Dubowitzův syndrom (40), Dyskeratosis congenita (42), Progeria (138), Rothmundův-Thompsonův syndrom (148). Syndromy s chromozomální instabilitou.

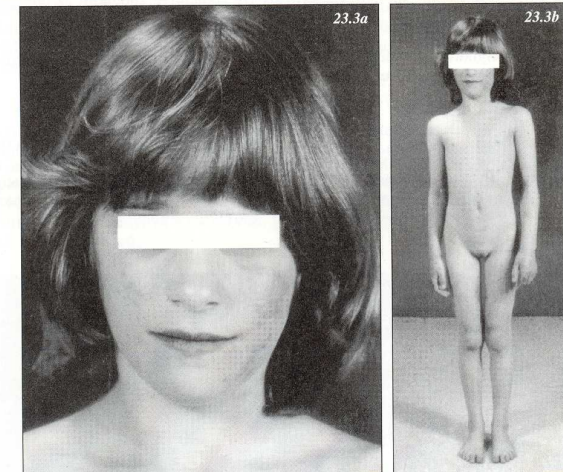
Genetika: Dědičnost autosomálně recesivního typu (McK:*210900).

Prenatální diagnostika: Ultrazvuk (růstová retardace), karyotyp plodu (chromozomální instabilita).

První popis a výskyt: Syndrom popsal Bloom v roce 1954. German a spolupracovníci demonstrovali v roce 1965 chromozomální změny a sklon k malignímu bujení. Relativně častý výskyt v židovské populaci. Registrováno více než 130 jedinců.

Literatura:

German, J., Takebe, H.: Bloom's syndrome. XIV. The disorder in Japan. Clin. Genet. 35, 1989, 93-110. • Hustinx, T. W. J., Ter Haar, B. G. A., Scheres, J.M. J. C., Rutten, F. J., Weemaes, C. M. R., Hoop, R. L. E., Janssen, A. H.: Bloom's syndrome in two Dutch families. Clin. Genet. 12, 1977, 85-96. • Sperling, K., Goll, U., Kunze, J., Ludtke, E. K., Tolksdorf, M., Obe, G.: Cytogenetic investigations in a new case of Bloom's syndrome. Hum. Genet. 31, 1976, 47-52.



[53]

Obr. 23.1. Dívka, stáří 4 1/2 roku. Typické kožní změny na kůži obličeje. • Obr. 23.2. Chlapec, stáří 12 roků. Suchá kůže s četnými teleangiektázemi na kůži obličeje. • Obr. 23.3.a, b. Dívka, stáří 8 roků. Malý vzrůst, změny na kůži obličeje.

173. Xeroderma pigmentosum

173

(Atrophoderma pigmentosum, Lentigo maligna)

Diagnostická kritéria: Fotosenzitivita • Hyperpigmentace • Teleangiektázie • Aktinické kožní nádory

Klinické projevy:

Hlava: Nadměrné slzení, záněty spojivek, záněty očních víček, ektropium, entropium, záněty a ulcerace rohovky, fotofobie • Defektní dentice.

Kůže: Fotosenzitivita a následné kožní změny: erytém, vezikulobulózní exantém, nepravidelná ložiska hyperpigmentace a depigmentace, atrofické kožní změny, teleangiektázie, hyperkeratózy. Nejcitlivější je kůže obličeje (oči, rty). Změny na kůži jsou patrné zprvu na nekrytých místech, později i v jiných lokalizacích • Aktinické kožní i jiné nádory (spinozellulární karcinomy, maligní melanomy, keratoakantomy, fibrosarkomy, angiomy, angiosarkomy). Fotofobie je patrna od narození, kožní změny většinou po první expozici slunci. Většina postižených umírá do 20. roku života. Dnes je známo již 9 typů xeroderma pigmentosum, které je možno odlišit na buněčné úrovni. Existují formy těžké, časné začínající s mentální retardací, ale i formy s pozdější manifestací, normálním intelektem a lehkým průběhem.

Diferenciální diagnostika: Cockayneův syndrom (26), Dyskeratosis congenita (42), Rothmundův-Thompsonův syndrom (148), Sanctisův-Cacchioneho syndrom.

Genetika: Dědičnost autosomálně recesivního typu (McK: *278700). Lokalizace genu: 9q34.1.

Prenatální diagnostika: Defekt spočívá na úrovni mechanismů reparace DNA a lze testovat prenatálně v tkáňových kulturách.

První popis a výskyt: Xeroderma pigmentosum poprvé popsali Hebra a Kaposi v roce 1874. Výskyt v rozmezí 1:100 000 - 1:250 000. V Japonsku 1:40 000.

Literatura:

Pawsey, S. A., Magnus, I.A., Ramsay, C. A., Benson, P. F., Giannelli, F.: Clinical, genetic and DNA repair on a consecutive series of patients with xeroderma pigmentosum. Q. J. Med. 48, 1979, 179-210. • Stefanini, M., Keijzer, W., Dalpra, L., Elli, R., Porro, M. N., Nicoletti, B., Nuzzo, F.: Differences in the levels of UV repair and in clinical symptoms in two sibs affected by xeroderma pigmentosum. Hum. Genet. 54, 1980, 177-182. • Welshimer, K., Swift, M.: Congenital malformations and developmental disabilities in ataxia-teleangiectasia, Fanconi anemia, and xeroderma pigmentosum families. Am. J. Hum. Genet. 34, 1982, 781-793.

Obr. 173.1, 173.2. Chlapec, stáří 12 roků. Nepravidelné skvrnitě hyperpigmentace a depigmentace s maximem na obličeji, na krku a horní části hrudníku, četné hyperkeratózy, atrofické kožní změny, tumorózní změny na bradě a na ušním boltci (spinozellulární karcinom). • Obr. 173.3. Muž, stáří 30 roků. Ložiska hyperpigmentace a depigmentace, atrofické kožní změny a hyperkeratózy s maximem změn na obličeji. • Obr. 173.4. Chlapec, stáří 12 roků. Tumorózní změny na kůži obličeje.



Obrázek C.29 Kožní a oční příznaky xeroderma pigmentosum. Zaznamenejte pihovité hyperpigmentace a verukózní léze na kůži a spojivce. (S laskavým svolením M. L. Levy, Baylor College of Medicine and Texas Children's Hospital Houston.)

mu je způsobována mutacemi v dílčích dráhách nukleotidové excizní opravy při reparaci spojené s transkripcí. XP i Cockayneův syndrom byly rozděleny do 10 biochemických komplementárních skupin: každá skupina je omezena mutací různých komponent nukleotidové excizní opravy nebo postreplicační reparace (tabulka).

Redukovaná nebo chybějící kapacita globální genomové opravy nebo postreplicační reparace vede k nahromadění mutací uvnitř buněk. Kožní neoplazmata u pacientů s XP mají vyšší hladinu mutací onkogenů a nádorových supresorových genů než nádory v obecné populaci. Zdá se, že tyto mutace jsou vysoce UV-specifické.

Fenotyp a jeho vývoj, průběh choroby

První příznaky se u pacientů s XP projevují v průběhu 1. a 2. roku, třebaže asi u 5 % pacientů choroba začíná po 14. roce. Počáteční příznaky jsou obvykle snadné spálení na slunci, akutní fotosenzitivita, pihovatost a fotofobie. Stále poškozování kůže vede k jejímu předčasnému stárnutí (ztenčení, vrásčitost, sluneční pihy, telangiektázie) premaligním aktinickým keratózám a benigním i maligním tumorům (obr. C.29). Téměř 45 % pacientů má bazaliomy nebo skvamózní karcinomy, u 5 % se projevily melanomy. 90 % kožních karcinomů se nachází na kůži exponované UV záření – obličej, krk, hlava a špička jazyka. Před zavedením preventivních opatření byl průměrný věk manifestace kožních nádorů 8 let, tedy o 50 let dříve než v ostatní populaci, a frekvence nádorů byla více než 1000krát vyšší než v populaci.

Kromě kožních příznaků má 60–90 % pacientů oční problémy, které zahrnují fotofobii, konjunktivitidu, blefaritidu, ektropium a nádory. Rovněž zde korespondují projevy s místy největší expozice k UV.

U asi 18 % pacientů se projeví neuronální degenerace.

Příznaky jsou neurosenzorická sluchová porucha, mentální retardace, spasticita, hyporeflexie až areflexie, segmentální demyelinizace, ataxie, choreoathetóza a supranukleární oftalmoplegie. Závažnost neurologických příznaků obvykle koreluje se závažností poruchy reparace nukleotidové excize. Neurodegenerace může být důsledkem neschopnosti opravit poškozenou DNA endogenně vznikajícími kyslíkovými volnými radikály.

Reparace nukleotidových excizí také opravuje DNA poškozenou mnoha chemickými karcinogeny, jako jsou cigaretový kouř, přepálený tuk v potravě a cisplatin. V důsledku toho mají pacienti 10 až 20krát zvýšenou incidenci vnitřních nádorů, jako jsou tumory mozku, plic, žaludku nebo leukémie.

Pacienti s XP mají zkrácenou délku života: bez preventivní ochrany před UV zářením je jejich život o 30 let kratší než osob bez XP. Molekulární melanom a skvamózní kožní karcinomy jsou nejčastější příčinou úmrtí.

Péče

Potvrzení diagnózy XP spočívá na funkčních testech reparace DNA a UV senzitivity, které se provádí v kožních fibroblastech. Identifikace odpovědné mutace není vzhledem k řadě komplementárních skupin, odpovědných genů a přemnoha mutací dostupná.

Péče o pacienty s XP představuje přísnou ochranu před UV zářením ochrannými oděvy, fyzikálními i chemickými slunečními clonami, masťmi, pečlivým sledováním a sledováním kožních malignit. Žádné léky nejsou dostupné.

Dědičnost a genetická prognóza

XP je autozomálně recesivní choroba, a proto mnoho pacientů má negativní rodinnou anamnézu. Rodiče mají pro další reprodukci 25% riziko postižení dalších dětí. Prenatální diagnostika je dostupná využitím funkčních testů DNA reparace a UV senzitivity v kultivovaných amniocytech nebo buňkách choria.

Otázky k diskusi

1. Definujte komplementární skupiny a vysvětlete jejich využití pro definování biochemické podstaty chorob.
2. Porovnejte podobnosti a rozdíly XP a Cockayneova syndromu. Proč není Cockayneův syndrom provázen zvýšeným rizikem malignit?
3. Pacienti s XP mají defekt kožní buněčné imunity. Jak může senzitivita pacientů s XP k UV záření vysvětlit jejich imunodeficienci? Jak přispívá imunodeficiencie ke sklonu k nádorům?
4. Wernerův syndrom, Bloomův syndrom, XP, ataxie telangiectasia a Fanconiho anémie jsou dědičné choroby genomové instability. Jaký je molekulární mechanismus každé z těchto chorob? Jaké typy genomické instability jsou spojeny s každou z těchto chorob?

Odkaz

De Boer J, Hoesjmakers JHJ Nucleotide excision repair and human syndromes. Carcinogenesis 2000;21: 453-460.

26. Cockayneův syndrom

26

(Neill-Dingwall syndrome, Progeria-like syndrome)

Diagnostická kritéria: Mikrocefalie • Senilní facies • Retinitis pigmentosa • Kloubní kontraktury • Disproporcionální malý vzrůst • Fotosenzitivita

Klinické projevy:

Hlava: Mikrocefalie, senilní facies • Úzký a zahnutý nos • Anomálie slzného ústrojí, enftalmus, dystrofie rohovky, korneální opacity, katarakta, nystagmus, retinitis pigmentosa, atrofie optiku • Kariézní chrup, předčasná ztráta trvalého chrupu, klenuté patro • Nízko nasedající a dysplastické ušní boltce.

Skelet: Zesílená lebeční klenba, anomálie obratlů, kyfoskolióza, krátký trup (relativně dlouhé končetiny) • Flekční deformity končetin, kloubní kontraktury, krátké metakarpy, krátké metatarzy a falangy • Osteoporóza • Disproporcionální malý vzrůst.

Kůže (adnexa): Fotosenzitivita, dermatitis, motýlový exantém, kožní atrofie (lipoatrofie) • Řídké vlasy, předčasné šedivění.

Nervový systém: Ataxie, intenční tremor, choreoatetóza, intrakraniální kalcifikace • Těžká mentální retardace.

Jiné: Hepatosplenomegalie • Nefropatie • Kryptorchismus • Porucha sluchu • „Hrubý“ hlas.

Klinické symptomy se manifestují mezi 2.- 4. rokem života, progredující symptomatologie, letální průběh. Jedinci s prenatální symptomatologií se někdy také označují jako Cockayneův syndrom II (B).

Diferenciální diagnostika: Bloomův syndrom (23), Progeria (138), Rothmundův-Thompsonův syndrom (148), Xeroderma pigmentosum (173).

Genetika: Dědičnost autosomálně recesivního typu (McK: * 216400). Zvýšená buněčná senzitivita k UV záření, defekty v procesu reparace DNA.

Prenatální diagnostika: Citlivost amniových buněk k UV záření.

První popis a výskyt: Syndrom poprvé popsal Cockayne v roce 1936. Popsáno více než 60 jedinců.

Literatura:

Alton, D. J., McDonald, P., Reilly, B. J.: Cockayne's syndrome. A report of three cases. *Radiology* 102, 1972, 403-406. • Jaeken, J., Klocker, H., Schwaiger, H., Bellmann, R., Hirsch-Kauffmann, M., Schweiger, M.: Clinical and biochemical studies in three patients with severe early infantile Cockayne syndrome. *Hum. Genet.* 83, 1989, 339-346. • Proops, R., Taylor, A. M. R., Insley, J.: A clinical study of a family with Cockayne's syndrome. *J. Med. Genet.* 18, 1981, 288-293. • Schmickel, R. D., Chu, E. H. Y., Trosko, J. E., Chang, C. C.: Cockayne syndrome: a cellular sensitivity to ultraviolet light. *Pediatrics* 60, 1977, 135-139.



Obr. 26.1. Děvčátko, stáří 12 1/2 roku. Charakteristický výraz obličeje: úzký a zahnutý nos, nízko nasedající dysplastické ušní boltce. • Obr. 26.2. Chlapec, stáří 15 1/2 roku. Výraz obličeje připomíná dívku na obr. 26.1.

Mutace a rakovina

**V lidském těle za život –
10¹⁶ buněčných dělení
V prostředí bez mutagenu je
10⁻⁶ pravděpodobnost
vzniku mutace na buněčné
dělení a gen, takže za
život 10¹⁰ mutací na
každý gen.**

**!?!Otázka není proč
rakovina vzniká, ale proč
vzniká tak málo často?!?**

**Výskyt rakoviny jako funkce věku !!!
1 mutace nestačí; většina mutací je opravena**

