

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Název diplomové práce:

**Oprava oxidativního poškození DNA u buněk
čínského křečička deficientních v nukleotidové
excizní reparaci DNA**

Vypracovala: Lada Strejčková

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Příbrami dne 5. května 2008

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Rudolfu Štětinovi, CSc. za odborné vedení při zpracování této práce, cenné připomínky a náměty. Dále bych chtěla poděkovat i všem ostatním z katedry biologických a lékařských věd za všestrannou pomoc.

Lada Strejčková

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL	7
3. SOUHRN	8
ABSTRACT.....	9
4. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
4.1. POŠKOZENÍ DNA	10
4.1.1. <i>Mutagenní faktory.....</i>	<i>11</i>
4.1.2. <i>Oxidativní poškození DNA.....</i>	<i>12</i>
4.1.2.1. Oxidační činitele	12
4.1.2.2. Funkce volných radikálů ve zdravém organismu	15
4.1.2.3. Následky oxidace DNA	16
4.1.3. <i>Poškození DNA vlivem záření.....</i>	<i>19</i>
4.2. MECHANISMY OCHRANY PŘED NÁSLEDKY POŠKOZENÍ DNA	22
4.2.1. <i>Antioxidační systémy.....</i>	<i>22</i>
4.2.2. <i>Opravy poškozené DNA.....</i>	<i>24</i>
4.2.2.1. Chyby v DNA	24
4.2.2.2. Způsoby opravy DNA.....	24
4.2. BUNĚČNÉ LINIE	33
4.3. MECHANISMY DETEKCE POŠKOZENÍ, KOMETOVÝ TEST	34
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
5.1. POUŽITÝ MATERIÁL	37
5.1.1. <i>Tkáňové kultury.....</i>	<i>37</i>
5.1.2. <i>Pomůcky a přístroje.....</i>	<i>37</i>
5.1.3. <i>Použité chemikálie</i>	<i>38</i>
5.2. PRACOVNÍ POSTUP	38
5.2.1. <i>Příprava testovaných látek, roztoků činidel</i>	<i>38</i>
5.2.2. <i>Příprava buněk – kultivace, vysévání na misky, ovlivnění testovanými látkami</i>	<i>40</i>
5.2.3. <i>Příprava sklíček, nanesení ovlivněných buněk na sklíčka</i>	<i>40</i>
5.2.4. <i>Lýza buněk</i>	<i>41</i>
5.2.5. <i>Ovlivnění buněk endonukleázou III (endo III) / formamidopyrimidin-DNA-glykosylázou (FPG).....</i>	<i>41</i>
5.2.6. <i>Alkalické rozplétání DNA</i>	<i>42</i>
5.2.7. <i>Elektroforéza.....</i>	<i>42</i>
5.2.8. <i>Neutralizace</i>	<i>42</i>
5.2.9. <i>Barvení.....</i>	<i>42</i>
5.2.10. <i>Hodnocení sklíček - zjištění poškození buněčné DNA</i>	<i>42</i>
6. VÝSLEDKY	44
6.1. REPARACE POŠKOZENÍ INDUKOVANÉHO U BUNĚK AA8 PŮSOBENÍM H ₂ O ₂	44
6.1.1. <i>Reparace zlomů (SSB)</i>	<i>44</i>
6.1.2. <i>Reparace endo III míst.....</i>	<i>46</i>
6.1.3. <i>Reparace FPG míst.....</i>	<i>47</i>
6.2. REPARACE POŠKOZENÍ INDUKOVANÉHO U BUNĚK UV-20 PŮSOBENÍM H ₂ O ₂ ...	48

6.2.1.	<i>Reparace zlomů (SSB)</i>	48
6.2.2.	<i>Reparace endo III míst</i>	49
6.2.3.	<i>Reparace FPG míst</i>	50
7.	DISKUZE	52
8.	ZÁVĚR	55
	SEZNAM LITERATURY	56
	PŘÍLOHA – VÝSLEDKOVÉ TABULKY	59

1. ÚVOD

Člověk je neustále v přímém či nepřímém kontaktu s mnohými toxickými látkami. Jak stále více studií potvrzuje, řada z nich může specificky působit na molekulu DNA a zapříčinit tak změnu genetické informace buňky. Tyto změny mohou ovlivnit metabolické či jiné procesy v somatických buňkách, zvyšují též možnost nádorového bujení. Nebezpečí těchto mutagenních látek však plyne i pro další generace, na které jsou tyto změny v DNA přenášeny. U potomků pak mohou být mimo jiné příčinou nej-
různějších vývojových vad.

Studium mechanismu působení mutagenních či potenciálně mutagenních látek, stejně jako studium mechanismu oprav jimi indukovaných poškození je proto nutností.

2. CÍL

Je známo, že mechanismy nukleotidové excizní reparace se podílejí na opravě poškození způsobeného vlivem UV záření. Jeho působení na DNA se projevuje tvorbou tyminových dimerů, ale také nepřímo oxidací bází.

V této diplomové práci jsme se snažili zjistit, zda buňky deficientní v nukleotidové excizní reparaci jsou schopny opravovat poškození indukované pouze oxidativním činitelem, a to peroxidem vodíku. K tomuto účelu jsme použili metodu kometového testu z důvodu její rychlosti a citlivosti, jejíž výhodou je navíc možnost stanovit poškození na úrovni jedné buňky.

3. SOUHRN

Jedním z mechanismů oprav DNA poškozené vlivem vnějších činitelů je nukleotidová excizní reparace (NER). Ta hraje roli především při odstraňování následků způsobených UV zářením. Poškozené báze se ve formě pyrimidinových dimerů enzymaticky vyštěpují z DNA jako součást oligonukleotidů. Působení UV světla na DNA se však projevuje též nepřímo, a to oxidací bází. V našem experimentu jsme se snažili zjistit, zda buňky deficientní v nukleotidové excizní reparaci jsou schopny opravovat poškození indukované pouze oxidativním činitelem.

Stanovovali jsme velikost poškození DNA v buňkách *in vitro* a schopnost jejich reparace po ovlivnění roztokem peroxidu vodíku o různé koncentraci. K experimentům jsme použili buněčné linie křečička čínského, a to rodičovské buňky AA8 a od nich odvozené buňky UV-20, které jsou defektní v genu ERCC1. Tento gen se podílí na tvorbě nukleáz účastnících se nukleotidové excizní reparace.

Ke stanovení jsme použili metodu alkalického kometového testu, jejíž základem je alkalická gelová elektroforéza. Princip této metody spočívá v detekci zlomů, které vznikají v poškozených alkalilabilních místech. Hodnotili jsme počet jednořetězcových zlomů DNA. Detekovali jsme buď zlomy indukované samotným peroxidem vodíku (SSB), nebo zlomy vzniklé po působení enzymu, který v DNA specificky rozpoznává místa, kde došlo vlivem peroxidu k oxidaci báze. Jednalo se o enzym endonukleáza III, štěpící DNA v místech oxidovaného pyrimidinu (endo III místa), a enzym formamidopyrimidin-DNA-glykosyláza, štěpící DNA v místech oxidovaného purinu (FPG místa).

Na základě našich pokusů jsme zjistili, že jak buňky AA8, tak i deficientní UV-20 jsou schopny opravovat oxidativní poškození. Oba typy buněk vykazovaly k peroxidu vodíku srovnatelnou citlivost. Došli jsme proto k závěru, že defekt v mechanismu nukleotidové excizní reparace DNA nemá vliv na schopnost těchto buněk opravovat poškození zapříčiněné oxidativním činitelem.

ABSTRACT

Nucleotide excision repair (NER) is one of the mechanisms of how to repair DNA damaged by the external influences. First of all, it plays the role when removing the results caused by UV radiation. The damaged bases in the form of pyrimidine dimers are enzymatically splitted out from DNA as part of oligonucleotides. The effect of the UV light on DNA is however manifested also indirectly, by oxidation of the bases. In our experiment we tried to find out whether the cells deficient in nucleotide excision repair are able to repair the damages induced only by oxidative agent.

We stated the extent of DNA damages in the cells in vitro and the ability of their reparation after treatment with the dilution of hydrogen peroxide in different concentrations. During the experiments we used the cell lines of a Chinese hamster, namely the parental cell line AA8 and their derivative UV-20, which is defective in gene ERCC1. This gene takes part in creation of nucleases participating in NER.

For measuring of DNA lesions we used the method of alkaline comet assay, the basis of which is alkaline single-cell gel electrophoresis. The principle of this method consists in the detection of DNA strand breaks originating in the damaged alkali-labile sites. We evaluated the number of DNA single-strand breaks. We detected either the breaks induced by hydrogen peroxide alone (SSB) or the breaks incurred by enzyme, which specifically recognises DNA sites, where hydrogen peroxide caused the oxidation of the base. The agent were enzyme endonuclease III splitting DNA in the sites of oxidized pyrimidine (endo III sites) and enzyme formamidopyrimidin-DNA-glykosylase splitting DNA in the sites of oxidized purine (FPG sites).

On the basis of our experiments we have found out that both the cells AA8, and the deficient cells UV-20 are able to repair oxidative damage. Both types of cells manifested comparable sensitivity in relation to hydrogen peroxide. Therefore, we have come to the conclusion that the defect in the mechanism of NER have no influence on the abilities of these cells to repair damages caused by the oxidative agent.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1. Poškození DNA

V jakékoliv paměťové struktuře dochází v důsledku náhodných vlivů k určitému znehodnocování informace. To platí i pro paměť genetickou, uloženou v DNA. Šum v genetické informaci se označuje jako mutace, proces vzniku mutací jako mutageneze (*Nečas, 2000*).

Mutace mohou měnit informační obsah genomu na třech organizačních úrovních. Podle toho rozlišujeme mutace genové, chromozomové a genomové. Genová mutace mění informaci nesenou genem. Existují tři základní způsoby jejich vzniku – substituce (záměna nukleotidů), inserce (včlenění nukleotidů) a delece (ztráta nukleotidů). Chromozomové mutace vycházejí ze strukturní změny chromozomu. Jejich nejčastější příčinou jsou zlomy chromozomů, tj. přerušení kontinuity DNA řetězce. Genomová mutace znamená změnu počtu chromozomů. U chromozomových a genomových mutací nemusí být změněna struktura genu (*Nečas, 2000*).

Mutace vznikající bez zjevného působení mutagenu se nazývají mutace spontánní. Termín „spontánní“ však může někdy naznačovat pouze fakt, že zatím nebyl identifikován konkrétní činitel životního prostředí, který dané poškození způsobuje (*Friedberg, 1995*). Mezi tyto spontánní mutace je řazen především vznik tautomerních forem či deaminace bází (*Rosypal, 2000*). Při „tautomerním šiftu“ přechází báze DNA na své strukturní izomery (např. dusíkové atomy pyrimidinových a purinových kruhů mohou z amino-formy $-NH_2$ přecházet na imino-formu $-NH-$, u guaninu či tyminu může častější ketoforma $C=O$ přejít na neobvyklou enolformu $C-OH$). Deaminací bází, které obsahují exocyklickou $-NH_2$ skupinu (adenin, guanin, cytozin), vzniká hypoxantin, xantin nebo uracil (*Rosypal, 2000*). Pokud se báze nachází v neobvyklé formě během replikace DNA, může dojít ke špatnému párování, a tím i zařazení nesprávné báze v nově vznikajícím řetězci a vzniku mutace (*Nečas, 2000*).

4.1.1. Mutagenní faktory

Mutace vznikající působením určitých mutagenních faktorů jsou mutace indukované. Naprostá většina mutagenů jsou současně kancerogeny, tj. vyvolávají nádorovou transformaci buněk. Rozlišujeme faktory fyzikální a chemické.

➤ Chemické mutageny

Chemické mutageny poškozují strukturu DNA v důsledku své chemické reaktivity. Hlavními mutageny jsou:

- Alkylační činidla (yperit, dimetylsulfát atd.), která poškozují DNA předáním své alkylové skupiny;
- Silná oxidační činidla (organické i anorganické peroxidy aj.);
- Činidla desaminující (např. dusitany);
- Činidla interkalární (např. akridiny), tj. látky, jejichž molekuly se vsouvají mezi páry bází v DNA;
- Aromatické aminy (benzidin, naftylamin);
- Azobarviva a triazenová barviva;
- Hydralazin, urethan aj.;

Některé látky působí na DNA nepřímo, označují se proto obecně jako nepřímo působící mutageny. DNA poškozují např. tím, že narušují její replikaci (kationty manganu, niklu, antibiotika mitomycin, aktinomycin). Jiné látky se stávají mutagenními činnostmi buněčných enzymů, např. polycyklické aromatické uhlovodíky, mykotoxiny, nenasyčené mastné kyseliny atd. (*Nečas, 2000*).

➤ Fyzikální mutageny

Z fyzikálních faktorů je velmi účinné záření, a to jak ionizující (především paprsky X a γ , protony, neutrony a elektrony o vysokém obsahu energie), tak neionizující záření (ultrafialové paprsky). Stupeň poškození DNA je úměrný absorbované dávce záření (*Nečas, 2000*).

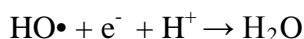
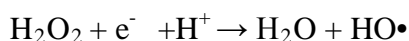
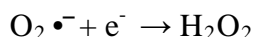
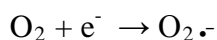
4.1.2. Oxidativní poškození DNA

4.1.2.1. Oxidační činitelé

Oxidativní poškození je vyvoláno působením reaktivních forem kyslíku a dusíku. Řada z těchto forem má značný fyziologický význam.

Reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS) vznikají běžně v organismu při čtyřelektronové redukci atmosférického kyslíku na dvě molekuly vody. Tato reakce je nezbytná pro aerobní způsob života. Probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií, v aktivním centru enzymu cytochromoxidázy. Tyto reaktivní sloučeniny pohotově reagují s různými biologickými strukturami, včetně nukleových kyselin. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany či signálními molekulami buněčné regulace. Ve vazbě s enzymem není ani nejméně reaktivní forma kyslíku - hydroxylový radikál HO• - škodlivá. Volná částice je však nejjedovatější známou látkou, neboť ve tkáni se okamžitě slučuje s téměř jakoukoliv sousední molekulou, nebo z ní vytrhne elektron a aktivuje ji. Je hlavním činitelem vyvolávajícím oxidativní poškození DNA.

Některé z těchto reaktivních sloučenin jsou volné radikály (látky s nepárovým elektronem v orbitálu), ostatní jsou molekuly s párovými elektrony (mimo jiné též peroxid vodíku), z kterých volné radikály teprve vznikají, a to buď redukcí (přidáním jednoho elektronu k normální molekule), oxidací (ztrátou jednoho elektronu), nebo homolytickým štěpením kovalentní vazby (každý fragment získá pak jeden nepárový elektron). Poslední uvedený způsob vyžaduje hodně energie, např. vysokou teplotu, UV nebo ionizační záření (*Štípek, 2000*).



Obrázek 1 - čtyřelektronová redukce atmosférického kyslíku (*Štípek, 2000*).

- **Superoxid ($O_2 \cdot^-$)**

Má oxidační i redukční účinky. Podléhá dizmutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé, takže superoxid se vlastně zároveň oxiduje i redukuje a produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku:



Reakce je v organismech ještě urychlována enzymem superoxidodismutázou (Štípek, 2000).

- **Peroxid vodíku (H_2O_2)**

Zdroje H_2O_2

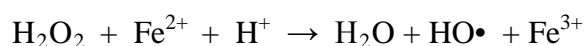
Peroxid vodíku vzniká ve tkáni hlavně dizmutací superoxidu. Je však též tvořen přímo, dvouelektronovou redukcí molekulárního kyslíku, a to působením oxidáz, jako je monoaminoxidáza, glutathionoxidáza a xantinoxidáza.

Xantinoxidáza a xantindehydrogenáza jsou dvě formy téhož enzymu, xantinoxidoreduktázy. Ta je nejvíce aktivní v játrech, ve střevní sliznici, v mléčné žláze, může se uvolnit z orgánů a zachytit na luminárním povrchu malých cév a kapilár. Ve tkáni za fyziologických podmínek převažuje dehydrogenázová forma, D-forma. Odnímá elektrony z různých substrátů a předává je na NAD^+ , který je redukován. Za patologických podmínek se D-forma konvertuje na O-formu (xantinoxidázu). Ta není schopna vázat NAD^+ a nasbírané elektrony předá na molekulární kyslík, z něhož vznikne superoxid nebo peroxid vodíku (jedno- nebo dvouelektronová redukce kyslíku).

Dalším zdrojem H_2O_2 jsou peroxizomy, které používají molekulární kyslík k oxidaci různých organických substrátů a produkují přitom H_2O_2 . Příkladem může být klíčový enzym β -oxidace mastných kyselin acyl-koenzym A-oxidáza (Štípek, 2000).

Reakce H_2O_2

Reakce samotného peroxidu vodíku s biomolekulami jsou poměrně pomalé, avšak v přítomnosti tranzitních kovů (dvojmocné železo Fe^{2+} nebo jednomocná měď Cu^+) dochází pohotově k jeho redukcí:



Touto železem katalyzovanou tzv. Fentonovou reakcí vzniká vysoce toxický radikál $\text{HO}\cdot$, který v živé hmotě okamžitě reaguje s okolními biomolekulami. Jde o extrémně silné oxidační činidlo, atakující a hydroxylující též báze nukleových kyselin.

Po Fentonově reakci pak superoxid $\text{O}_2\cdot^-$ (vzniklý redukcí O_2 v prvním kroku) redukuje trojmocné železo zpět na dvojmocné, takže je regenerováno pro další katalýzu. Tranzitní kovy se významně účastní vzniku ROS, jen pokud nejsou vázány v bezpečných deponitních formách (železo ve feritinu či transferinu, měď v ceruloplazminu). Bezpečné uložení a tím inaktivace tranzitních kovů je nezbytné k tomu, aby byl čas odstranit superoxid z tkáně superoxiddizmutázou a peroxid vodíku katalázou a peroxidázou. Tyto enzymy jsou součástí antioxidačního systému organismu (*Štípek, 2000*).

- **Neenzymové zdroje ROS**

Kromě enzymové redukce respiračního řetězce mitochondrií se molekulární kyslík v buňkách redukuje na ROS řadou exogenních a endogenních malých molekul, které na kyslík přenášejí elektrony z různých reduktáz. Takovými molekulami jsou např. chinonová antibiotika adriamycin a daunomycin. Jsou redukována NADPH-cytochrom-P-450-reduktázou na odpovídající semichinony, které pak předávají elektrony na kyslík. Tato antibiotika sice ničí nádorové buňky vznikajícím superoxidem, avšak zároveň se hromadí v organismu a poškozují normální buňky. Odtud pochází jejich kardiotoxicita. Podobným způsobem je vysvětlena toxicita herbicidu paraquat, poškozující plicní tkáň. Bleomycin je antibiotikum užívané jako kancerostatikum, neboť se váže (interkaluje) do DNA a zároveň vytváří komplex se železem, které katalyzuje vznik superoxidu, peroxidu a hydroxylového radikálu. Antimitotický účinek je dosažen radikálovou destrukcí okolní DNA (*Štípek, 2000*).

4.1.2.2. Funkce volných radikálů ve zdravém organismu

Reaktivní formy kyslíku jsou důležité celkem na třech úrovních:

- Jako nástroje oxidáz a oxigenáz

Prostřednictvím cytochromoxidázy - enzymu dýchacího řetězce – je kyslík redukován, čímž se uvolní energie důležitá pro syntézu ATP. Monooxygenázy aktivují kyslík v endoplazmatickém retikulu jater nebo v mitochondriích nadledviny. Dioxygen O_2 je redukován třemi elektrony na úroveň hydroxylového radikálu, který je použit k hydroxylaci řady endo- i exogenních látek včetně léků (fenylalanin, steroidy, aminy, aromatické uhlovodíky). Tato hydroxylace je také významnou reakcí při syntéze cholesterolu a při jeho přeměně na žlučové kyseliny. Xenobiotika se po hydroxylaci mohou konjugovat s hydrofilními látkami, stanou se rozpustnější a snadněji se vyloučí z těla. Aktivní formy kyslíku se účastní také degradace tryptofanu a mnoha dalších reakcí (Štípek, 2000).

- Jako účinná zbraň fagocytů proti bakteriím a cizím strukturám

Neutrofilní leukocyty a mikrořágy používají reaktivní sloučeniny kyslíku k odstraňování zbytků mrtvých buněk a k zabíjení bakterií. Jejich plazmatická membrána je vybavena enzymovým komplexem NADPH-oxidázou. Tento komplex se po pohlcení cizí částice aktivuje a redukuje dioxygen na superoxid. Takto aktivované buňky zvýší spotřebu kyslíku (respirační vzplanutí), nikoliv však činností mitochondrií. Vznikající superoxid se pohotově mění na peroxid vodíku. Kyselé prostředí, které ve fagozomu obstarává membránová protonová pumpa, podporuje uvolnění iontů železa z jeho bezpečných zásob, takže jsou k dispozici pro Fentonovu reakci a tvorbu hydroxylového radikálu (Štípek, 2000).

- Jako signální molekuly

Prostřednictvím buněčné molekulární informační sítě ovlivňují reaktivní sloučeniny kyslíku (jako sekundární poslové, kteří se po aktivaci primárními posly tvoří v cytosolu buňky) aktivitu enzymů, expresi genů a tím i životní program buňky (intenzitu metabolických cest, proliferaci, diferenciaci, nástup apoptózy). Oproti masivní

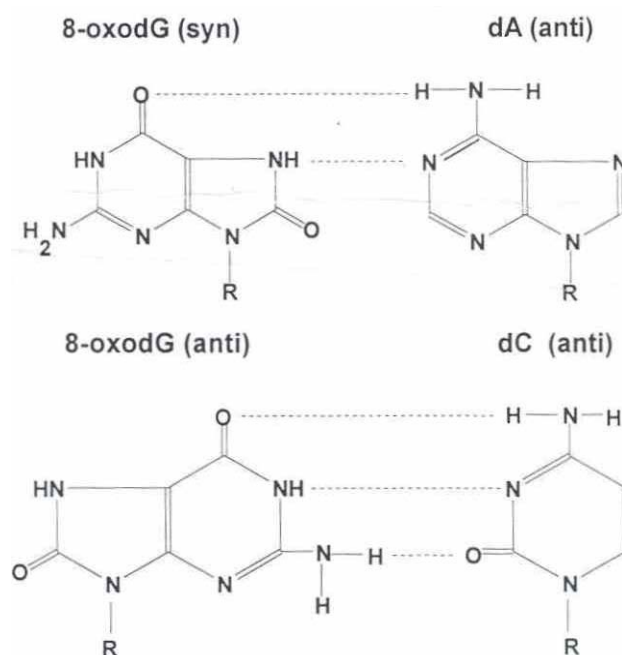
produkci ROS v rámci imunitní ochrany se však jedná o indukci nízkých koncentrací (Štípek, 2000).

4.1.2.3. Následky oxidace DNA

- **Změna genetické informace**

Stejně jako lipidy a proteiny také deoxyribonukleové kyseliny jsou poškozovány především hydroxylovým radikálem $\text{HO}\cdot$. Jeho působením na DNA dochází primárně k vyjmutí vodíkového atomu z deoxyribózy za vzniku malondialdehydu a dalších produktů, což vede k destrukci sacharidu a přerušení řetězce (Štípek, 2000).

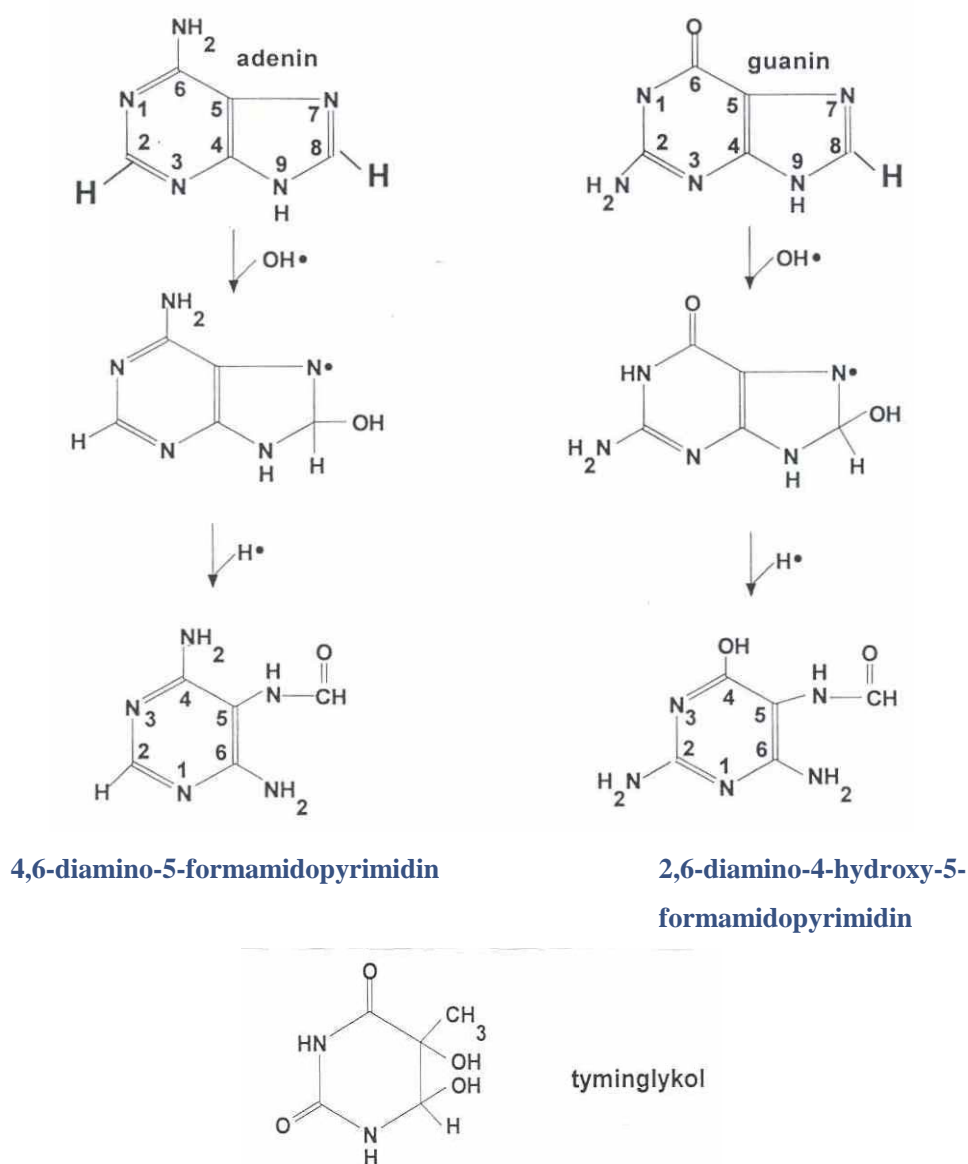
$\text{HO}\cdot$ je dále schopen připojit se k purinovým a pyrimidinovým bázím, a tak je změnit na hydroxyderiváty a oxoderiváty (Štípek, 2000). Pro vznik mutací je nejvýznamnější 8-oxoguanin (8-OxodG). Tento produkt se tvoří v živočišných a rostlinných buňkách i spontánně bez působení mutagenních faktorů a je příčinou spontánního poškození DNA. Během replikace se může proti jednomu 8-OxodG v matricovém řetězci zařadit nukleotid s cytozinem nebo také, a to přednostně, nukleotid s adeninem. Jde tedy o transverzi GC na AT. Špatně zařazený 8-OxodG není během korektury rozeznáván exonukleázou (Rosypal, 2000).



Obrázek 2 – 8-oxodeoxyguanozin a jeho párování (Rosypal, 2000).

Reakcí $\bullet\text{OH}$ s adeninem vzniká 8-hydroxyadenin, otevřením purinového kruhu pak 4,6-diamino-5-formamidopyrimidin; reakce s guaninem vede až k tvorbě 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidinu. Také tyto produkty poškozují DNA, mechanismus tohoto poškození však není zatím objasněn (*Rosypal, 2000*).

Z derivátů pyrimidinových bází je častý 5-hydroxycytozin a analogický derivát uracilu, dále 5,6-dihydroxytymin (tyminglykol-Tg), který pravděpodobně zastavuje v buňkách replikaci DNA (*Rosypal, 2000*).



Obrázek 3 – Produkty oxidace: působení hydroxylového radikálu na adenin a guanin, struktura tyminglykolu (*Rosypal, 2000*).

Následkem takových změn dochází k chybnému párování bází při replikaci DNA a zavedení chyby do genetické informace. Poškození DNA se pak projeví apoptózou, mutagenezí, karcinogenezí a stárnutím (*Štípek, 2000*).

Mitochondrie jsou díky dýchacímu řetězci jedním z nejvydatnějších zdrojů ROS v organismu. Mitochondriální DNA je navíc zřejmě prokaryotického původu, nemá proto introny ani histony, a je tak velmi citlivá k oxidačnímu poškození. Proto počáteční stupně signální cesty, startující apoptózu, jsou lokalizovány právě v mitochondriích. Membránové póry otevřené oxidačním stresem zavínají pokles membránového potenciálu mitochondrií, což je jedna ze základních fází apoptózy. Uvolnění cytochromu c z intermembránového prostoru a následná aktivace kaspáz je základním dějem apoptózy, která je vlastně považována za mechanismus, kterým se organismus zbavuje nebezpečných buněk produkujících ROS (*Štípek, 2000*).

Apoptóza navozená poškozením jaderné DNA probíhá jinak. Na zlomy v řetězci DNA se naváže poly(ADP)ribózapolymeráza (PARP). Současně je indukována syntéza transkripčního faktoru p53, který se jako produkt supresorového genu přesune do jádra, aby zastavil buněčný cyklus. V tomto stádiu se signální mechanismy buňky rozhodují, zda DNA opravit, nebo spíše aktivovat kaskádu cysteinových proteáz, která odstraní PARP a spustí apoptózu. Pokud se buňka rozhodne k opravám DNA, PARP sama sebe modifikuje (poly(ADP)ribozylace). Oddělí se od DNA a poly(ADP) se odbourá. Do procesu vstoupí reparační enzymový systém, který zlom opraví. Proces je však tak energeticky náročný, že může skončit nekrotickou smrtí buňky (*Štípek, 2000*).

- **Poškození enzymových komplexů a buněčné signalizace**

Poškození DNA je biochemickým podkladem pro modifikace různých buněčných funkcí včetně změn aktivity enzymů a enzymových systémů, poruch transportních membránových funkcí a změn molekulární buněčné signalizace. HO• mění aktivitu enzymů také tím, že uvolňuje železo z enzymových center (*Štípek, 2000*).

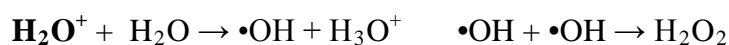
4.1.3. Poškození DNA vlivem záření

➤ Ionizující záření

Toto záření působí na atomy vodíku sestávající z protonu a elektronu. Působí buď přímo na DNA, nebo způsobuje radiolýzu vody:



Následujícími reakcemi se pak tvoří relativně stabilní reaktanty $\bullet\text{OH}$, O_2^- , H_2O_2 :



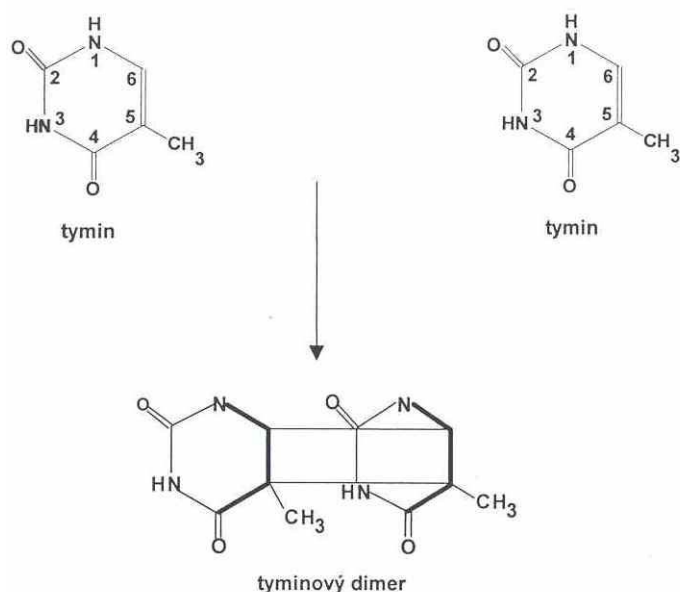
Asi 65% poškození je způsobeno hydroxylovým radikálem $\bullet\text{OH}$ a 35% přímou ionizací. $\bullet\text{OH}$ napadá dvojně vazby bází mezi C5=C6. Přímý účinek ionizujícího záření vede k vypuzení elektronu z nenasycené vazby C5=C6 a výsledný kationtový radikál pak dále reaguje s hydroxylovým iontem. Proto přímé a nepřímé radiační účinky vedou ke stejným produktům. Dochází k tvorbě křížových vazeb (kovalentní vazby mezi protilehlými nukleotidy) nebo ke zlomům v jednom či obou komplementárních řetězcích. Za aerobních podmínek vedou další reakce DNA s O_2 ke vzniku hydroxyderivátů či oxoderivátů pyrimidinových a purinových bází (*Rosypal, 2000*).

➤ UV záření

Ozáření DNA UV světlem vede ke specifitějšímu účinku než ionizujícím zářením, neboť pohlcovat UV paprsky mohou jen molekuly, v nichž jsou dvojně vazby. Podle vlnové délky se UV světlo dělí na UVC (200 – 290 nm), UVB (290 – 320 nm) a UVA (320 – 400 nm). Molekulárními terči pro UV jsou především nukleové kyseliny, lipidy a bílkoviny (*Štípek, 2000*).

Báze nukleových kyselin mají maximum absorpce v oblasti 260 – 280 nm (UVC), paprsky v této oblasti proto vykazují přímý účinek na nukleové kyseliny. V molekule DNA dochází k dimerizaci dvou sousedních pyrimidinových molekul na-

cházejících se na stejném polynukleotidovém řetězci. V dimeru jsou molekuly thyminu spojeny cyklobutanovým kruhem, který se vytvoří aktivací konjugované vazby mezi C5 a C6 sousedících molekul thyminu. Tyto thyminové dimery jsou chemicky stabilní, a nejsou-li odstraněny, jsou letální, neboť překáží v replikaci a transkripci (Rosypal, 2000). Další produkt účinku UVC světla na DNA je dimer thyminu a cytozinu. Tento dimer se tvoří kovalentní vazbou mezi C6 thyminu a C4 sousedního cytozinu a označuje se jako TC (6-4) - produkt (Rosypal, 2000).

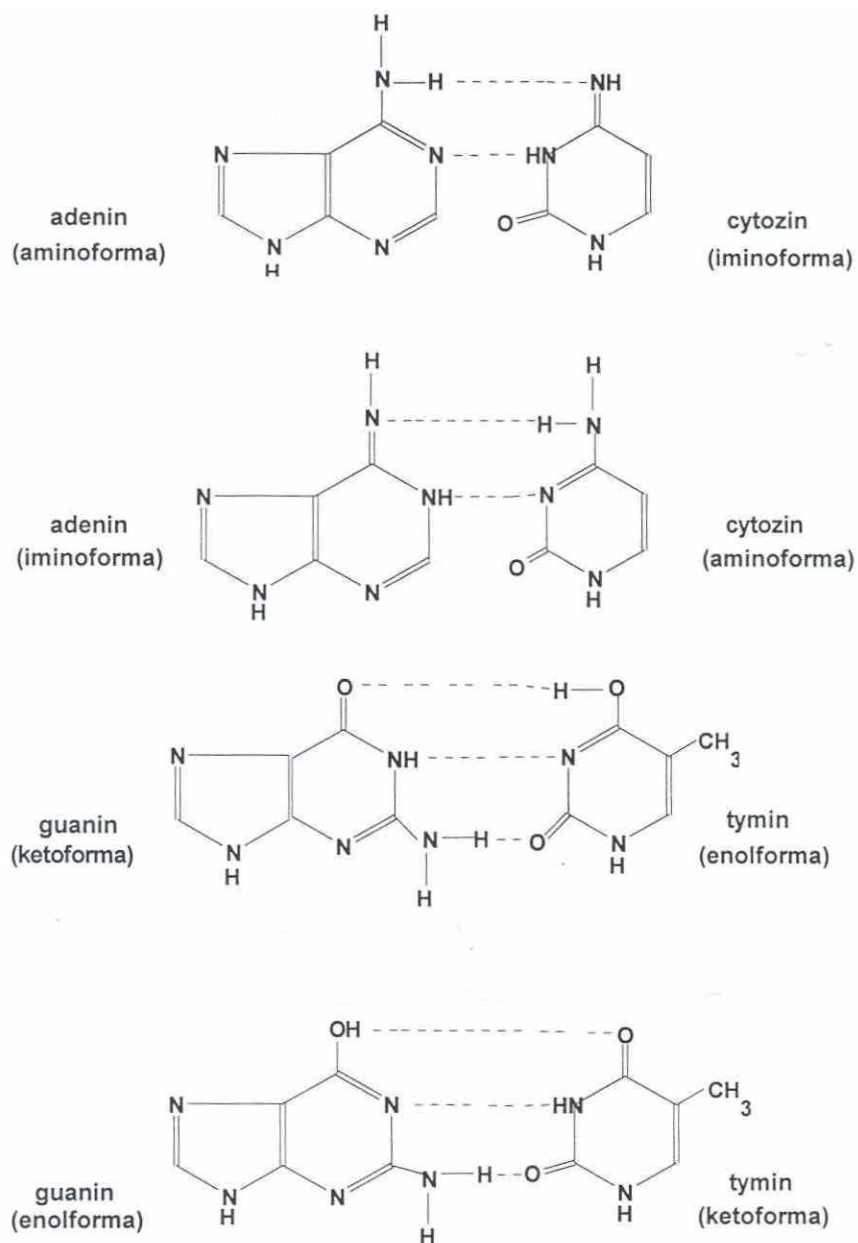


Obrázek 4 – Vznik thyminového dimeru (Rosypal, 2000).

UVA fotony DNA nepohlcuje a poškození DNA nastává nepřímou, nejčastěji cestou fotosenzibilizace porfyriny a flaviny, které interakcí s kyslíkem produkují ROS, jež pak sekundárně poškozují DNA. Fotony UVB se mohou uplatnit přímým i nepřímým mechanismem. Výsledkem jsou zlomy řetězců a modifikace dusíkatých bází, z nichž nejběžnější je tvorba 8-hydroxyguaninu (Štípek, 2000).

Je pravděpodobné, že UV záření přispívá ke vzniku excitovaných stavů v molekulách bází, takže pak elektrony v těchto molekulách přecházejí snadněji do nestabilních tautomerních forem (párování každého pyrimidinu a purinu závisí na atomech v poloze 1 a 6 purinového a 3 a 4 pyrimidinového kruhu; stabilní tautomery se párují A-T, C-G, nestabilní tautomery vytvoří páry A-C, G-T). Tímto způsobem zvyšuje

je pravděpodobně UV záření frekvenci spontánních mutací. Zvýšení mutačních rychlostí relativně velkými dávkami UV světla je způsobeno náhodnými chybami v zařazování nukleotidů, které vznikají během excizních oprav (Rosypal, 2000).



Obrázek 5 – Párování bází v nestabilních tautomerních formách (Rosypal, 2000).

4.2. Mechanismy ochrany před následky poškození DNA

Organismus používá celkem tři možné způsoby ochrany před následky zapříčiněnými reaktivními metabolity:

- a) Zabránění tvorby nadměrného množství reaktivních forem kyslíku, např. regulací aktivity enzymů, které je tvoří, nebo vychytáním tranzitních kovů z reaktivních pozic (transferin, feritin). Tento způsob je nejběžnější.
- b) Zachycení a odstranění radikálů, které se již vytvořily, a to buď pomocí enzymů nebo látek dávajících s ROS stálejší a tudíž méně toxické produkty.
- c) Využití reparačních mechanismů poškozených biomolekul (např. fosfolipázy odstraňují poškozené mastné kyseliny z fosfolipidů, oxidačně modifikované proteiny se rozkládají proteolyticky, zvláštní reparační enzymy opravují poškozenou DNA) (Štípek, 2000).

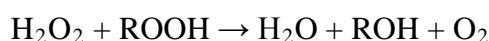
První dva uvedené způsoby se uskutečňují pomocí antioxidantních systémů.

4.2.1. Antioxidační systémy

Enzymové antioxidační systémy

Součástí antioxidantního systému jsou:

- Superoxiddizmutáza – dizmutace superoxidu na dioxygen a H_2O_2
- Glutathionperoxidázy – rozklad hydroperoxidů z mastných kyselin a fosfolipidů, aktivní i v dizmutaci H_2O_2
- Glutathiontransferázy – katalýza konjugačních reakcí
- Kataláza – dizmutace H_2O_2 na dioxygen a vodu a katalýza peroxidázových reakcí
typu:



(Štípek, 2000)

Vysokomolekulární endogenní antioxidanty (neenzymové)

Řada proteinů je schopna vázat přechodné prvky (železo, měď) a měnit jejich oxidoredukční vlastnosti tak, že tyto prvky přestanou katalyzovat radikálové reakce. Mezi antioxidanty můžeme zařadit např.:

- Transferin - pevně váže železo ve formě Fe(III), a tím ho zbavuje možnosti vstoupit do Fentonovy reakce.
- Feritin – působí feroxidázovou aktivitou, která uskladněné železo udržuje v oxidovaném stavu, dokud ho odtud neuvolní silně redukující látka (askorbát).
- Ceruloplazmin – váže měď podstatnou pro feroxidázovou aktivitu tohoto proteinu, oxiduje železo na trojmocné.
- Metalothioneiny – prostřednictvím síry chelatují ionty kovů (hrají zřejmě významnou roli v buněčném jádře) (*Štípek, 2000*).

Nízkomolekulární endogenní antioxidanty (neenzymové)

Tato skupina zahrnuje např.:

- Askorbát - redukuje Fe(III) na Fe(II) a Cu(II) na Cu(I), antioxidantní účinek spočívá v redukcí radikálů $O_2 \cdot^-$, $HO_2 \cdot$, $HO \cdot$ atd., regeneruje nejspíš i tokoferylový radikál. Při těchto reakcích ztrácí elektron a mění se na askorbylový radikál, který je mnohem méně reaktivní než vyjmenované radikály.
- Alfa-tokoferol (důležitý spíše při peroxidaci lipidů).
- Glutathion – odstraňuje ROS, udržuje v redukované formě sulfhydrylové skupiny proteinů, cysteinu, koenzymu A a regeneruje tokoferol a askorbát. Při reakcích se oxiduje na glutathiondisulfid.
- Melatonin – vychytává hydroxylové radikály.
- Kyselina močová – vychytává $RO \cdot$, váže železo a měď do formy, která nepodporuje radikálové reakce.
- Karotenoidy, kyselina lipoová aj. (*Štípek, 2000*).

4.2.2. Opravy poškozené DNA

V živých soustavách se vyvinuly mechanismy, kterými se úplně nebo do jisté míry opravuje poškozená DNA. K opravám dochází enzymovým odstraněním chyb v DNA, které vznikly během replikace, rekombinace nebo působením vnějších vlivů.

4.2.2.1. Chyby v DNA

- Chybné párování – zařazení nekomplementárního nukleotidu při replikaci DNA.
- Mezera v DNA – trhlina o rozsahu jednoho nebo více nukleotidů uvnitř jednoho polynukleotidového řetězce dsDNA. Proces zaplňování mezery v DNA nukleotidy podle matricového nepoškozeného řetězce, který je katalyzován DNA-polymerázou a ligázou, se označuje jako opravná syntéza.
- Zlom – přerušení fosfodiesterové vazby mezi dvěma sousedními nukleotidy v nukleové kyselině způsobené endonukleázami.
 - Jednořetězcový – zlom v jednom polynukleotidovém řetězci dsDNA
 - Dvouřetězcový – zlom v obou řetězcích DNA
 - Posunutý – vznikají štěpením obou řetězců DNA na různých, ale blízkých místech
 - Zarovnané zlomy – na protilehlých místech

(Rosypal, 2000)

4.2.2.2. Způsoby opravy DNA

Představa o různých způsobech opravy DNA vyplynula ze studií E. coli, proto se jedná především o výsledky v rámci těchto studií. Rozlišujeme tři typy oprav, a to úplnou, excizní a tolerantní.

Úplná oprava

Jedná se o opravu na původní stav DNA fotoreaktivací či opravou alkylovaného O⁶guaninu, O⁴tyminu a alkylfosfotriesterů.

a) Fotoreaktivace DNA

- Přímá fotoreaktivace

Spočívá ve štěpení tyminových dimerů fotolyázou, enzymem, který se aktivuje světlem o vlnové délce 340 – 400 nm. Je to jediný mechanismus, kterým se opravuje DNA při viditelném světle a který probíhá v jednom enzymovém stupni. Pro svou relativní jednoduchost se vyznačuje nejmenší pravděpodobností způsobit chyby při opravě DNA. Působí specificky jen na tyminové dimery a závisí přímo na vlnové délce světla. Štěpení tyminových dimerů fotolyázou se uskutečňuje přes 5,10-metylentetrahydrofolát, který přijímá energii slunečního světla a přenáší elektrony na FAD, jehož redukovaná forma FADH₂ poskytuje elektrony pro štěpení cyklobutanových kruhů. Tím se obnovuje původní stav DNA. Také eukaryota obsahují fotolyázu jako složku opravného systému. K fotoreaktivaci dochází také na RNA, která byla poškozena UV světlem (*Rosypal, 2000*).

- Senzitivizovaná fotoreaktivace

Při tomto způsobu dochází ke štěpení tyminových dimerů nezávisle na fotolyáze. Uskutečňuje se přenosem elektronů z excitovaného indolového kruhu tryptofanu na dimer, který se pak monomerizuje (*Rosypal, 2000*).

- Nepřímá fotoreaktivace

Bylo zjištěno, že mutanty *E. coli*, které mají inaktivní fotolyázu, přežívají, když po vystavení UV světlu vyvolávajícímu tvorbu tyminových dimerů jsou následně ozářeny při vlnové délce 334 nm. Světlo této vlnové délky nevede k monomerizaci tyminových dimerů, ale nepřímo inaktivuje molekuly tRNA tím, že v nich vyvolává tvorbu křížových vazeb. To vede k dočasnému zastavení růstu a dělení těchto kurantních buněk, což pak umožňuje excizní opravu, ještě než se začne DNA replikovat (*Rosypal, 2000*).

b) Oprava alkylovaného O⁶ guaninu, O⁴ thyminu a alkylfosfotriesterů

Jedná se o adaptaci na poškození alkylačními látkami, které reagují s DNA za tvorby alkylovaných produktů, jež se vyznačují chybným párováním. Alkylová skupina je při této opravě ze změněné báze enzymaticky odstraněna.

Chybné páry mohou být u *E. coli* úplně opraveny, jestliže se buňky vystaví delší dobu nízkým koncentracím alkylačních látek (*Rosypal, 2000*).

Excizní opravy

Jedná se o vyštěpení poškozeného místa z DNA. Uskutečňuje se bázovou či nukleotidovou excizní opravou nebo opravou chybného párování.

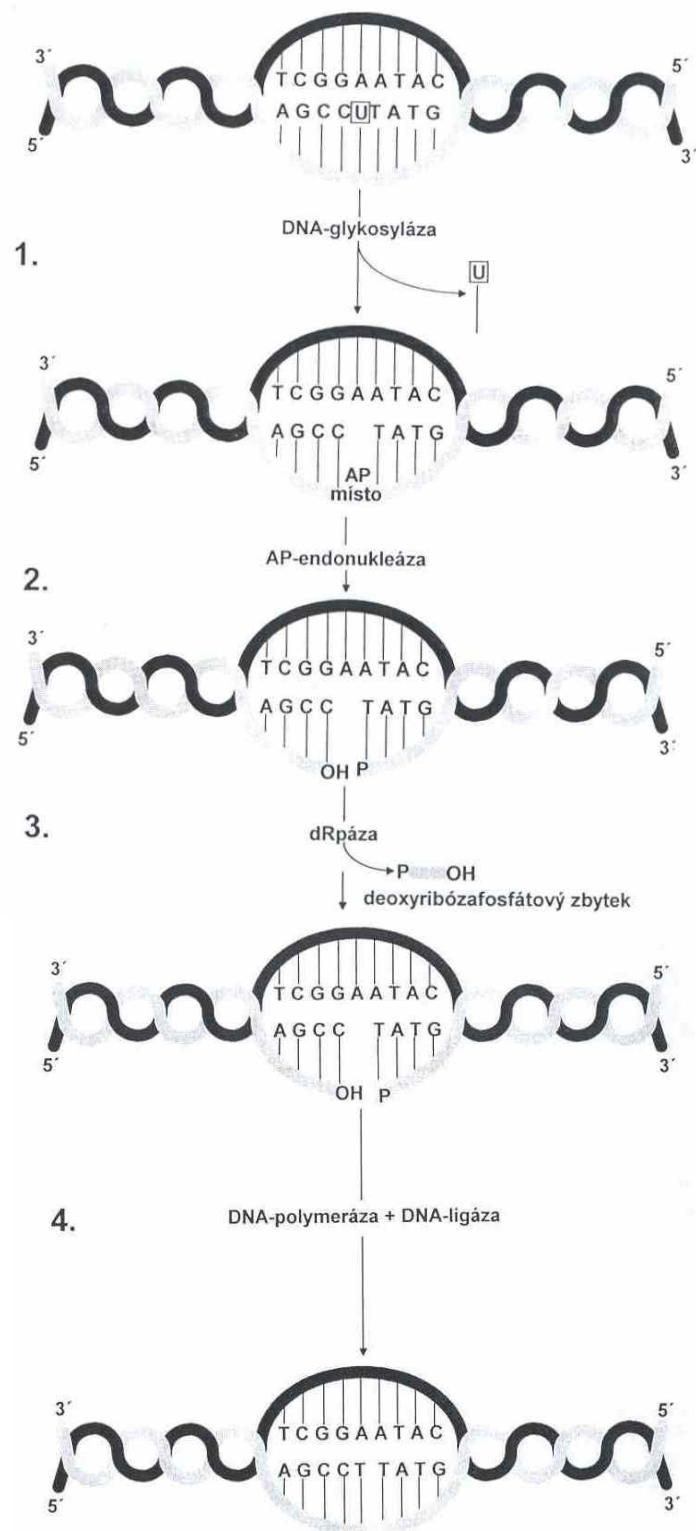
a) Bázová excizní reparace (BER)

Chemicky modifikované nebo nevhodné báze (např. uracil inkorporovaný do DNA během replikace) se při tomto typu opravy vyštěpují jako volné báze. Proces je zahájen enzymy označovanými jako DNA-glykosylázy, které katalyzují hydrolýzu N-glykosidových vazeb spojujících báze s páteří DNA. Většina běžně známých DNA-glykosyláz byla izolována z *E. coli* a vyskytuje se i v eukaryotech. Jsou to malé proteiny působící bez kofaktorů. Počátečním výsledkem jejich působení je jiný typ poškození DNA – apurinové / apyrimidinové místo (AP-místo). Toto místo je pak dále specificky rozeznáváno a štěpeno.

Průběh bázové excizní reparace (viz. Obrázek 6):

1. Báze je specificky rozeznána DNA-glykosylázou katalyzující hydrolýzu N-glykosidové vazby, vzniká AP-místo.
2. Napadení AP-místa 5'-AP-endonukleázou, v řetězci vzniká zlom s 5'-deoxyribózafosfátovým koncovým zbytkem.
3. 5'-deoxyribózafosfátový koncový zbytek je vyštěpen DNA-deoxyribofosfodiesterázou (dRpáza).

4. Výsledná jednonukleotidová mezera se zaplní vložení komplementárního nukleotidu k matricovému za katalýzy DNA-polymerázou. Opravná syntéza je pak dokončena DNA-ligázou (Rosypal, 2000).



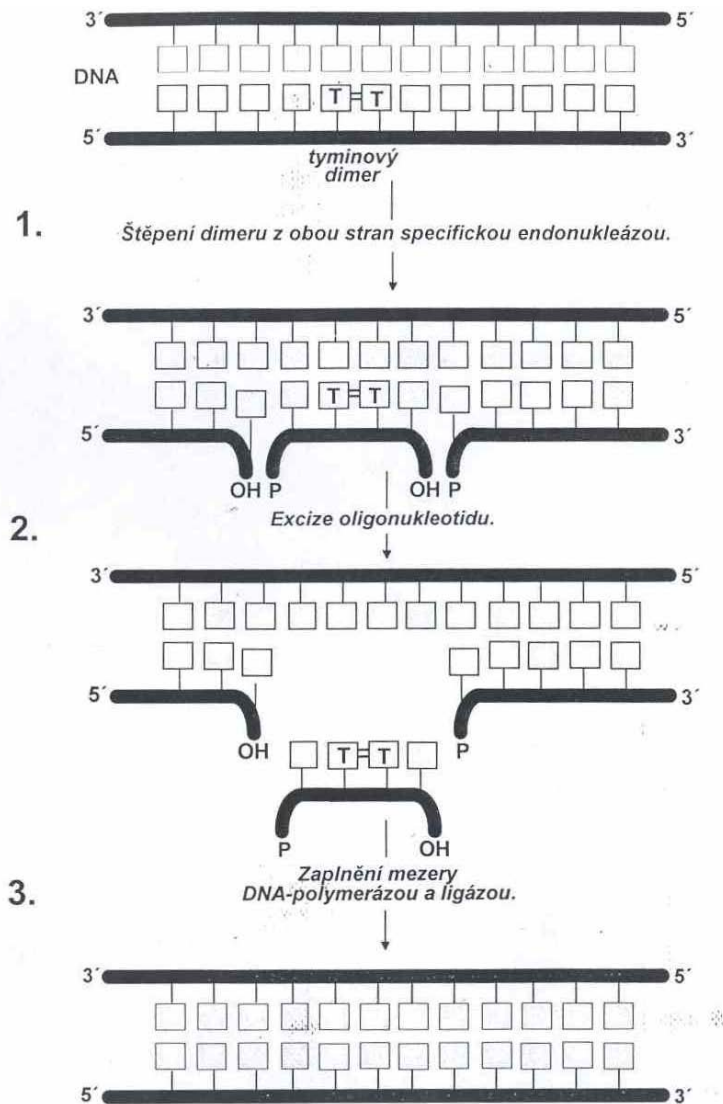
Obrázek 6 – Schéma bázev excizní opravy (Rosypal, 2000).

b) Nukleotidová excizní reparace (NER)

Proces, kterým se UV světlem poškozené báze ve formě pyrimidinových dimerů a jiných fotoproduktů enzymaticky vyštěpí z DNA jako součást oligonukleotidů.

Průběh nukleotidové excizní reparace (viz. Obrázek 7):

1. Pyrimidinový dimer je vyštěpen specifickou endonukleázou jako součást oligonukleotidového fragmentu.
2. Fragment se uvolní.
3. Vzniklá mezera je zaplněna pomocí opravné syntézy za katalýzy DNA-polymerázou a DNA-ligázou (Rosypal, 2000).



Obrázek 7 – Schéma nukleotidové excizní reparace (Rosypal, 2000).

c) Oprava chybného párování

- Korektura chybného párování DNA-polymerázou III

Tímto způsobem je opravováno chybné zařazování bází během replikace (pravděpodobnost takové chyby je 10^{-6} na gen). DNA-polymeráza III rozezná chybný pár, odstraní z něj svou 3'-5'-exonukleázovou funkcí nesprávný nukleotid a nahradí jej správným (*Rosypal, 2000*).

- Posun jednořetězcového zlomu

Proces postupného napojování nukleotidů na 3'- konec, který ohraničuje v DNA jednořetězcový zlom z jedné strany, a odbourávání nukleotidů z 5'- konce, který tento zlom ohraničuje z druhé strany. Zlom se tak posouvá ve směru napojování nukleotidů. Proces katalyzován DNA-polymerázou I (*Rosypal, 2000*).

- Reparace chybného páru bází řízená metylací

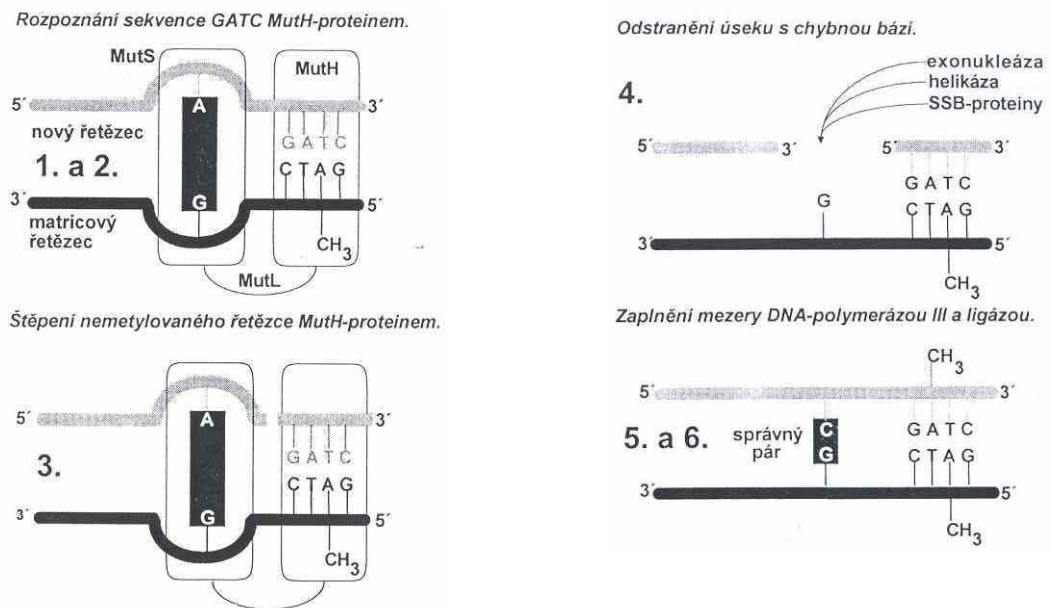
Při replikaci tak velkého počtu nukleotidů však i přes uvedené korekční mechanismy k chybám dochází. Chybný pár zapříčiní v dvoušroubovici místní deformaci. Na matricovém řetězci je báze správná, na dceřiném chybná. Specifický reparační systém (tzv. mismatch systém) musí oba řetězce odlišit a dceřiný opravit (*Rosypal, 2000*). Jedním z rozpoznávacích mechanismů je schopnost tohoto reparačního systému odlišit vlákno metylované (tj. původní) od nově syntetizovaného, které metylováno není (*Nečas, 2000*).

Průběh (viz Obrázek 8):

1. V nově syntetizovaném řetězci se nachází sekvence GATC, v matricovém komplementární protějšek CTAG, v němž je adenin metylován enzymem (Dam-metylázou).
2. MutS-protein rozezná v dvoušroubovici nesprávný pár.

3. MutH-protein pak rozezná nemetylovanou sekvenci GATC a od tohoto místa štěpí řetězec, ve kterém se tato sekvence nachází. Ta může být vzdálena i několik tisíc nukleotidů od chybného páru.
4. Exonukleáza v kooperaci s helikázou a SSB-proteiny odstraní postupně v nemetylovaném řetězci úsek DNA až k chybnému páru, kde se nesprávně zařazený nukleotid vyštěpí.
5. Vzniklá mezera je zaplněna nukleotidy pomocí DNA-polymerázyIII.
6. Opravená molekula dsDNA je pak zmetylována i v dceřiném řetězci.

Uvedené proteiny byly dokázány i u člověka. Mutace genů kódujících tyto proteiny zvyšují riziko rakoviny (*Rosypal, 2000*).



Obrázek 8 – Oprava chybného párování řízená metylací (*Rosypal, 2000*).

Tolerantní opravy

Jedná se o obnovu funkce DNA, aniž by z ní bylo odstraněno původní poškození. Při této opravě se poškození v matrici, uskutečněné zlomy a rekombinací, obchází replikací.

a) SOS – odpověď

Jedná se o koordinovanou syntézu enzymů a činnost odpovídajících opravných mechanismů indukované poškozením DNA. Tato oprava je dobře prostudována u *E. coli*.

Průběh:

1. LexA-protein je represorem asi 20 genů (tzv.SOS-genů), v neindukovaném stavu se syntetizuje v malém množství.
2. Při poškození DNA (např. vznikem pyrimidinových dimerů blízko replikační vidlice) se aktivuje recA-protein vazbou na jednořetězcové úseky za dimery.
3. Interakce aktivního recA-proteinu s LexA-represorem vede ke štěpení represoru, geny regulované tímto represorem jsou aktivovány (dereprimovány) a mohou produkovat enzymy účastnící se opravných mechanismů.
4. Po vymizení indukčního signálu (opravou jednořetězcových mezer) množství aktivního recA-proteinu klesne, jeho interakce s LexA-represorem skončí, represor se hromadí a jím regulované geny jsou opět deaktivovány (reprimovány) (*Rosypal, 2000*).

Indukovatelné geny (geny regulované tímto represorem) produkují např. tyto proteiny:

- UvrA-protein – váže se na DNA ozářenou UV světlem.
- UvrB- protein – v komplexu s UvrA-proteinem má helikázovou funkci.
- UvrC-protein - v komplexu s UvrB-proteinem působí jako endonukleáza.
- UvrD-protein – působí jako 3'-5'- helikáza.

Uvedené proteiny jsou složkami pochodů při nukleotidové excizní opravě (*Rosypal, 2000*).

b) Oprava mezer v dceřiném řetězci

Tato oprava se často označuje jako postreplikační. Toto označení však není přesné, neboť jde o toleranci původního poškození v matricovém řetězci DNA, nikoliv o jeho opravu. Opravují se pouze mezery v dceřiném řetězci, které vznikají jako důsledek poškození.

Při replikaci matricového řetězce poškozeného např. thyminovým dimerem vzniká proti dimeru v dceřiném řetězci mezera. Ta je zaplněna homologickým řetězcem DNA jiné molekuly dsDNA (v té je pak vzniklý jednořetězcový úsek doplněn komplementárně volnými nukleotidy). Vytváří se tak překřížení, které se označuje jako Hollidayův spoj (jedná se obecně o spojení dvou molekul dsDNA překřížením homologických DNA-řetězců, ke kterému dochází též při rekombinaci). Hollidayův spoj je v konečné fázi zrušen a dochází k tvorbě jedné dsDNA bez dimeru a jedné dsDNA zahrnující původní řetězec s dimerem (*Rosypal, 2000*).

4.2. Buněčné linie

Jedním z používaných modelů pro testování toxicity látek in vitro jsou buněčné linie pocházející z ovarii čínského křečička (CHO - Chinese hamster ovary). Jsou rozděleny do skupin podle toho, které konkrétní buněčné linie je tvoří (rodičovské buňky, např. AA8). Od nich jsou odvozeny mutantní linie různě senzitivní k UV-záření. Tato citlivost je způsobena defektem v genech ERCC (excision repair cross-complementing) kódujících enzymy, které se podílejí na nukleotidové excizní reparaci (NER) – důležité opravě DNA poškozené právě UV světlem (*Hayashi et al., 1998*).

Mezi tyto mutantní linie patří i UV-20. Tyto buňky jsou defektní v genu ERCC1. Tento gen se podílí na tvorbě nukleáz účastnících se nukleotidové excizní reparace. ERCC1 byl první savčí NER gen, který byl klonován (*Westerveld et al., 1984*). V komplexu s ERCC4 kóduje polypeptidy v nukleáze, která je odpovědná za rozštěpení řetězce DNA (5' konec) v místě poškození. Ke studiu následků deficiencie ERCC1 v celém živočišném systému byl použit genový targeting k inaktivaci tohoto genu (*Selfridge et al., 1992*).

Defekty v genech ERCC jsou též příčinou dědičných chorob. Xeroderma pigmentosum (XP) je heterogenní skupina autosomálně recesivních onemocnění (incidence 1 na 70 000) charakterizovaná přecitlivělostí na ultrafialové záření, jejíž následkem je vznik kožních nádorů na odkrytých částech kůže. Z nich se pak vytváří malignity. Podle přesné lokalizace enzymatické poruchy rozlišujeme několik typů tohoto onemocnění (XP-A, B, C, D, E, F, G). Dalšími onemocněními s defekty v ERCC jsou trichothiodystrofie TTD (metabolická porucha charakterizovaná sníženým obsahem síry ve vlasech) a Cockayneho syndrom CS (autosomálně recesivní onemocnění s poškozením posttranskripční opravy DNA) (*Malina, 1999*).

4.3. Mechanismy detekce poškození, kometový test

Kometový test je jednou z metod detekce poškození DNA, jejíž základem je alkalická gelová elektroforéza. Název byl odvozen podle charakteristického zobrazení ve tvaru komety – hlava komety je tvořena nepoškozenou DNA, její ohon DNA poškozenou. Atraktivita této metody spočívá v mnoha ohledech – je rychlá, jednoduchá, spolehlivá, citlivá a také relativně levná. Dalším půvabným rysem je i rozmezí její aplikace – od výzkumu fyzikálně chemického chování DNA přes studie buněčných odpovědí na její poškození až k monitorování poškození DNA v lidské populaci, tedy od molekulárních až k epidemiologickým studiím (*Collins et al., 1997*).

Základním principem této metody je s vysokou pravděpodobností relaxace nadšroubovicového vinutí. Existuje i koncept alkalického rozvinutí DNA, mnohé důkazy však podporují spíše prvně zmíněný „smyčkový model“. Uspořádání DNA ve formě superhelixu bylo objeveno Cookem (1976), který také zjistil, že po ozáření DNA se nadšroubovicové uspořádání uvolnilo a smyčky, které i po tomto ovlivnění zůstaly zachovány, vytvořily „halo“ efekt kolem jádra. Analogicky tedy můžeme předpokládat, že též kometový ohon je tvořen relaxovanými smyčkami a že množství smyček v ohonu vypovídá o počtu zlomů v DNA. Z toho vyplývá, že s rozsahem poškození koreluje intenzita ohonu. Délka ohonu je pravděpodobně dána délkou smyček (*Collins et al., 1997*).

Původní metoda, ze které kometový test vychází, je založena na elektroforéze v neutrálním pH. Jak neutrální, tak alkalické prostředí umožňuje detekovat nízký stupeň poškození. Srovnatelná citlivost obou verzí tak mimo jiného podporuje princip relaxace nadšroubovice, dokazuje, že alkalické rozplétání není zásadním krokem v odhalování poškození. Metody se však liší svým znázorněním. Za alkalických podmínek je ohon mnohem zřetelněji odlišen od hlavy komety, což poukazuje na nedostatek neutrální metody odhalit účinky při vyšších dávkách genotoxinů. Maximální množství DNA uvolněné do ohonu je za těchto podmínek totiž jen kolem 25%, zatímco v zásaditém pH může dosáhnout 90% nebo i více (*Collins et al., 1997*).

Kometový test detekuje zlomy jak dvouřetězcové, tak jednořetězcové. Mnoho genotoxických látek nevytváří zlomy přímo – tvoří však AP-místa, která jsou

alkalilabilní, a ta se pak mohou přeměnit na zlomy při vysokém pH, stejně jako v zásaditém elektroforetickém roztoku při kometovém testu (*Collins et al., 1997*).

Zlomy jsou přechodně přítomny i při excizní opravě (bázové / nukleotidové) poškozené DNA. Vysoká četnost zlomů nám tak může indikovat nejen vysoký stupeň poškození, ale i probíhající, dobře fungující opravné procesy. Této skutečnosti, tedy mechanismů buněčné opravy, lze využít i k cílené produkci zlomů – a tím odhalit nebo zesílit účinky genotoxinů. Tato modifikace kometového testu enormně zvyšuje rozsah, citlivost i specifiku metody. DNA je po lýze buněk ovlivněna specifickou reparační endonukleázou, která indukuje zlomy v místě poškození. V principu každé poškození, pro které existuje opravná endonukleáza, může být detekována touto cestou (*Collins et al., 1997*).

Mezi enzymy používané k modifikaci této metody patří např. endonukleáza III, formamidopyrimidin-DNA-glykosyláza (FPG) či uvrABC.

- endonukleáza III

V buňce se podílí na nukleotidové excizní reparaci. Má celkem dvě enzymatické funkce: působí jako DNA-glykosyláza, která odstraňuje oxidované pyrimidiny z DNA, a dále jako AP-endonukleáza, která konvertuje vzniklá apyrimidinová místa na jednořetězcové zlomy DNA. Právě této schopnosti lze využít v experimentech.

Endonukleáza III je 4Fe – 4S protein. Je tvořen dvěma doménami přibližně stejné velikosti. Jednu z nich tvoří svazek 6 antiparalelních helixů, druhá sestává ze shluku [4Fe – 4S] a 4 α -helixů. Jedna strana proteinu má značný kladný elektrostatický potenciál a je pravděpodobně místem vazby s poškozenou DNA (*Voet, 1995*).

- formamidopyrimidin-DNA-glykosyláza (FPG)

Enzym iniciující v jádře bázovou excizní reparaci. Má též i endonukleázovou funkci. Rozpoznává a odstraňuje oxidované puriny (hl. 8-OH-gua) z poškozené DNA. Tento protein obsahuje tři strukturální domény: N-terminální katalytickou doménu, centrální modul H2TH a C-terminální zinkové prsty. K vystřížení chybné

báze dochází mechanismem nukleofilní substituce na C1' N-terminálním prolinem, další reakce vyústí až k úplnému vyjmutí báze z DNA, čímž vzniká tzv. AP-místo (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR012319>).

- uvrABC – rozpoznává rozsáhlá poškození

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Použitý materiál

5.1.1. Tkáňové kultury

K experimentům jsme použili buněčné linie ovarií čínského křečička – AA8 a UV-20. Buňky byly kultivovány v médiu MEM alfa doplněném o 10 % fetálního telecího séra a směs antibiotik, pasážovány trypsinizací 2 x týdně v poměru 1 : 5.

5.1.2. Pomůcky a přístroje

- skleněné zkumavky, kádinky, Petriho misky
- automatické pipety (HTL, Polsko)
- podložní a krycí sklíčka
- lednice 175 R (Calex)
- centrifuga Z 400 K (Hermle, Německo)
- CO₂ inkubátor (Shellab , USA)
- magnetická míchačka s ohřevem MSH basic (Yellow line, Německo)
- elektroforetický tank
- skleněné kyvety
- ependorfky
- počítač
- fluorescenční mikroskop Eclapse E400, zvětšení 20x / 0.50 (NIKON, Japonsko)
- UV lampa Philips UV-C, zářivka typ TUV 15W/G15T8
- kamera (CCD Kamera COHU 4910)
- program Lucia (Laboratory Imaging Praha)
- statistický program Sigma-stat

5.1.3. Použité chemikálie

- Agaróza (Sigma, St.Louis, USA)
- BSA – bovinní sérový albumin (Sigma, St.Louis, USA)
- EDTA (Lachema, Brno, ČR)
- Endonukleáza III, FPG (Ústav Experimentální Botaniky AVČR)
- Ethidium bromid 95% (Sigma Aldrich, Německo)
- H₂O₂ (Peroxides s.r.o, ČR)
- HEPES p.a (N – (2 – hydroxyetyl) – piperazin – N' – 2 – etansulfonová kyselina) (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- HCl p.a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- Chelaton II p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- KCl p.a. (Lachema, Brno, ČR)
- KOH p.a. (Lachema, Brno, ČR)
- Methanol (Kulich, Hradec Králové)
- MEM alfa (Biotech, Praha) (kultivační médium)
- NaCl p.a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- NaOH p.a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- PBS – Phosphate buffered saline tablets (Sigma, St. Louis, USA)
- Tris p.a. ((hydroxymetyl)-aminometan) (Penta, Chrudim, ČR)
- Triton X-100 (Laboratories, Anglie)
- Trypsin (Biotech, Praha)

5.2. Pracovní postup

5.2.1. Příprava testovaných látek, roztoků činidel

Všechny roztoky jsme připravovali vždy čerstvé a uchovávali v lednici.

Agaróza

- na potahování sklíček: 1% roztok – 1g ve 100ml destilované vody
- standardní – HMP – spodní: 1% roztok – 100mg do 10ml PBS
- nízkotuhnoucí – LMP – vrchní s buňkami: 1% roztok – 100mg do 10ml PBS

Lyzační roztok (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris ; pH 10,0)

Příprava: 146,1g NaCl, 29,225g EDTA, 1,2114g Tris do 1000ml destilované vody,
pH jsme upravili přidáním koncentrovaného roztoku NaOH,
před použitím jsme přidali 1% Triton X-100: 1ml do 100ml roztoku.

Roztok pro alkalické rozplétání DNA a elektroforézu (300mM NaOH, 1mM EDTA)

Příprava: 18g NaOH, 3ml 0,5M EDTA do 1500ml destilované vody.

0,5M EDTA

Příprava: 14,612g EDTA do 100ml destilované vody.

Neutralizační roztok (0,4M Tris; pH 7,5)

Příprava: 48,456g do 1000ml destilované vody,
pH jsme upravili přidáním koncentrované HCl.

Endonukleáza III (endo III)

Příprava: zásobní roztok enzymu jsme zředili 100 x.

Endo III pufr pH 8,0

Složení: 40mM HEPES

(N – (2 – hydroxyetyl) – piperazin – N' – 2 – etansulfonová kyselina)

0,1M KCl

0,5mM EDTA

0,2mg/ml BSA (bovinní sérový albumin)

Příprava: 953mg HEPES, 745,5 mg KCl, 146mg 0,5M EDTA do 100ml destilované
vody, pH jsme upravili přidáním KOH.

PBS

Složení: 80,0g NaCl, 2,0g KCl, 28,98g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 2,0g KH₂PO₄ v 1000ml
destilované vody

Roztok ethidium bromidu (EB) (20 μ g/ml)

Příprava: 2mg EB jsme rozpustili v 5ml destilované vody, z tohoto roztoku jsme pak odebrali 250 μ l do 5ml destilované vody.

Roztok H₂O₂

Příprava: 50 μ l koncentrovaného H₂O₂ (10 M) bylo přidáno k 5 ml PBS (100mM) (v ledu) a dále ředěno ve vychlazeném PBS na koncentrace použité v pokusu. H₂O₂ byl ředěn bezprostředně před jeho přidáním na misky s buňkami.

5.2.2. Příprava buněk – kultivace, vysévání na misky, ovlivnění testovanými látkami

Na každou misku jsme vyseli přibližně 200 tisíc buněk. Z misek na ledové plotně bylo odsáto médium a dále na misky pipetován roztok peroxidu vodíku různé koncentrace, který jsme nechali působit po dobu 5 minut. Po odsátí roztoku H₂O₂ jsme na misku přidali čerstvé kultivační médium a buňky dále inkubovali při 37° C 30 nebo 60 minut. Poté jsme buňky nanесли na sklíčka s agarózou.

5.2.3. Příprava sklíček, nanesení ovlivněných buněk na sklíčka

- Potahování sklíček

Agarózu na potahování sklíček jsme rozvařili tak, aby byl roztok homogenní. V horké agaróze jsme pak namáčeli sklíčka, jejichž spodní stranu jsme vždy otřeli. Postupovali jsme co nejrychleji, aby agaróza netuhla a dělala na sklíčku tenký film. Po ztuhnutí agarózy jsme dali sklíčka do sušárny a vysušili při 60°C.

- Příprava spodní vrstvy agarózy na sklíčku (před pokusem)

Na potažené a očíslované sklíčko jsme napipetovali 8 μ l rozvařené HMP agarózy, ihned přikryli krycím sklíčkem a dali chladit na misku s ledem, aby

agaróza ztuhla. Krycí sklička jsme stáhli plynulým pohybem až těsně předtím, než jsme nanесли vrchní vrstvu agarózy s buňkami.

- Vyjmutí ovlivněných buněk z misek

Z misek jsme odsáli medium, opláchli je jednou PBS a nalili na buňky trypsin. Po 2 minutách jsme trypsin odsáli a podle počtu narostlých buněk nepipetovali PBS. Buňky jsme pak resuspendovali špičkou a dali do ependorfky.

- Příprava vrchní vrstvy agarózy (s buňkami)

Aspoň 20 minut před smícháním s buňkami jsme postavili rozvařenou LMP agarózu do lázně 37°C. 85 µl LMP agarózy jsme pak přidali k buňkám, promíchali špičkou a pipetovali na podložní skličko s jednou vrstvou HMP agarózy. Ihned jsme přikryli krycím skličkem a dali ztuhnout na misku s ledem.

5.2.4. Lyza buněk

Lyzační roztok jsme připravili s předstihem, aby se stihnul vychladit, před pokusem jsme k němu přidali 1% Triton X – 100 rozmíchaný na míchačce a dali zpět do lednice. Ihned po ztuhnutí agarózy na skličkách jsme stáhli krycí sklička, podložní sklička s buňkami jsme dali do kyvety a zalili lyzačním roztokem. Kyvetu se skličky jsme poté dali na 1 hodinu do lednice (popř. i na delší dobu – podle zkušeností nedochází tímto k ovlivnění výsledku).

5.2.5. Ovlivnění buněk endonukleázou III (endo III) / formamido-pyrimidin-DNA-glykosylázou (FPG)

Tento krok jsme provedli pouze u pokusů, kdy jsme chtěli vyhodnotit počet endo III míst / FPG míst.

Po lyze jsme sklička promyli v kyvetě 3x endo III pufr (použit pro oba enzymy) při 4°C, pufr jsme nechali působit vždy 5 minut. Potom jsme na buňky nepipetovali 30 µl roztoku enzymu endo III / FPG, přikryli krycím skličkem a inkubovali ve vlhku 45 minut při 37°C. Poté jsme přendali sklička do elektroforetického tanku.

5.2.6. Alkalické rozplétání DNA

Pufř pro elektroforézu jsme připravili vždy čerstvý před každým pokusem a dále ho chladit do ledu. Po vychlazení jsme nalili asi 1,5 l pufru do tanku v lednici (nastavena alespoň na 4°C), aby byl před vložením sklíček studený. Sklíčka jsme pak umístili do tanku číslem vpravo a nechali v lednici 40 minut – tento čas na rozdíl od lýzy je důležité dodržet.

5.2.7. Elektroforéza

Po uplynutí 40 minut jsme zapnuli elektrický zdroj - nastaven na 25 V a zhruba 300 mA, hodnotu elektrického proudu jsme doladili odebráním, nebo přidáním pufru stříkačkou. Takto jsme buňky ponechali 30 minut.

5.2.8. Neutralizace

Sklíčka jsme po skončení elektroforézy přendali z tanku do kyvety a 3x propláchli vychlazeným neutralizačním roztokem, který jsme nechali pokaždé působit 5 minut. Poté jsme ještě ke sklíčkům nalili na 5 minut destilovanou vodou.

5.2.9. Barvení

Sklíčka jsme barvili těsně před hodnocením (pokud jsme nehodnotili ihned po neutralizaci, ponořili jsme sklíčka před barvením na chvíli do destilované vody, aby se agaróza navlhčila). Na sklíčka jsme napipetovali 20 µl roztoku EB a přikryli krycím sklíčkem.

5.2.10. Hodnocení sklíček

Buňky jsme pozorovali prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu. Obraz z něj byl přenášen kamerou na obrazovku počítače, kde pomocí programu Lucia (program počítačové obrazové analýzy) bylo možné buňky dále upravovat a hodnotit.

Vycházeli jsme z předpokladu, že množství poškozené DNA (počet zlomů DNA) koreluje s množstvím DNA uvolněné z jádra. Nepoškozené buňky byly proto v mikroskopu patrné jako kruhové body, poškozené buňky vytvářely tzv. komety. Rozsáhlost poškození jsme pak hodnotili podle poměru procenta DNA, která v jádře zůstala (tvoří „hlavu komety“), a procenta DNA, která se z jádra uvolnila („ohon komety“).

Na každém sklíčku jsme hodnotili 30 buněk. Pro hodnocení poškození jsme použili parametr % DNA v ohonu komety, popř. z něj vypočítaný počet jednořetězcových zlomů DNA, který jsme získali vynásobením % DNA v ohonu komety experimentálně získaným koeficientem 0,042:

$$\text{Zlomy} / 10^9 \text{ daltonů} = \% \text{ DNA v ohonu komety} \times 0,042$$

Výsledky jsme vyjádřili prostřednictvím grafu, kde jsme % DNA v ohonu, popř. z něj vyjádřený počet zlomů vztáhli na dávku testované látky a dobu jejího působení. Statistickou významnost rozdílu mezi počtem zlomů DNA u dvou sledovaných skupin byl ověřován Mann-Whitney testem.

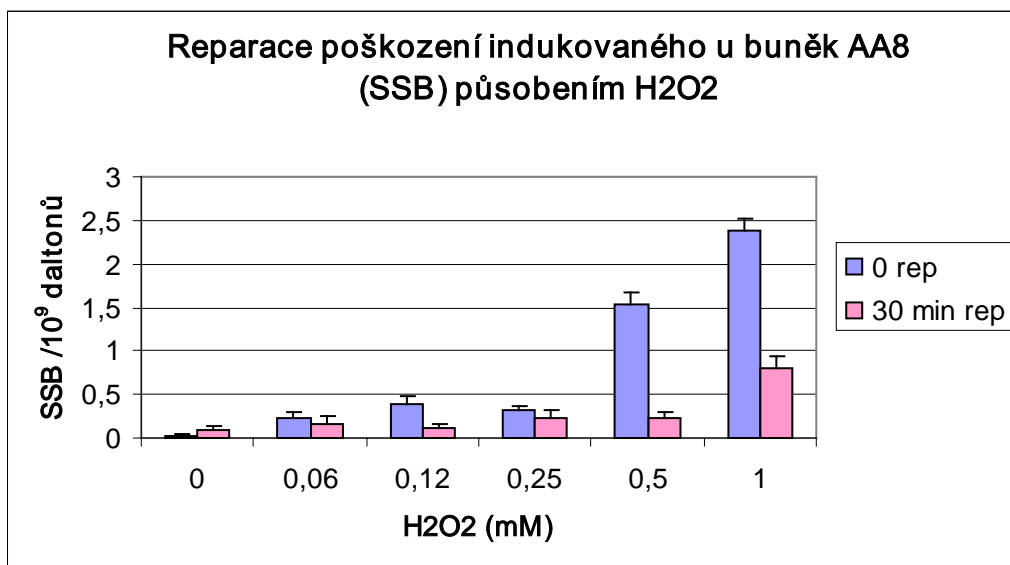
6. Výsledky

6.1. Reparace poškození indukovaného u buněk AA8 působením H₂O₂

6.1.1. Reparace zlomů (SSB)

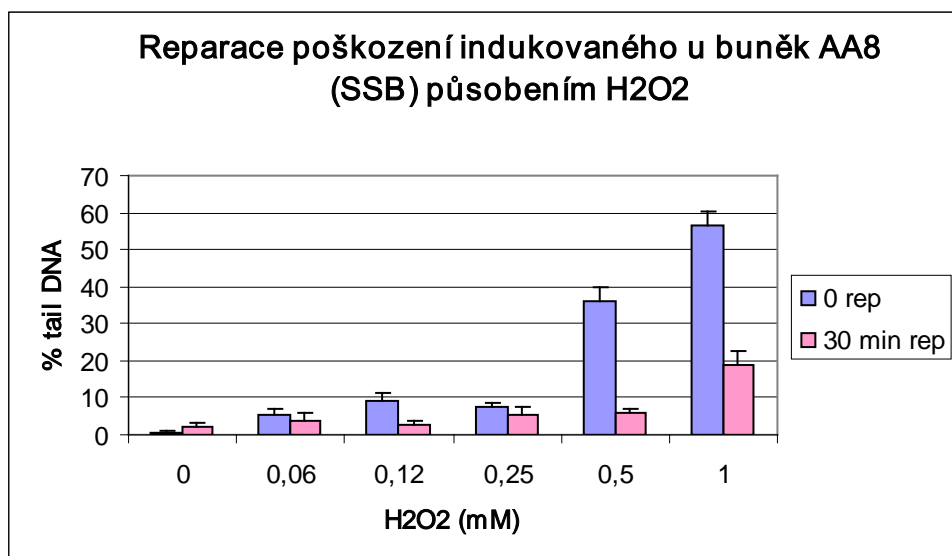
Buňky AA8 jsme ovlivňovali roztokem peroxidu vodíku o vzrůstající koncentraci (0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1,0 mM). Kontrolní buňky jsme ovlivnili pouze čistým PBS (0 mM H₂O₂). Buňky jsme dále zpracovávali buď ihned po aplikaci látky, to znamená bez možnosti reparace (hodnocení v čase 0), nebo po 30 minutách (30-minutová reparace). Velikost poškození je vyjádřena počtem jednořetězcových zlomů vztažených na 10⁹ daltonů (Graf 1, Tabulka 1 viz. Příloha).

Se vzrůstající koncentrací roztoku peroxidu jsme pozorovali nárůst zlomů. Ty jsou však rychle opravovány, tudíž po 30 minutách jejich počet významně poklesl. Už při koncentraci 0,06 mM se množství zlomů zvýšilo oproti kontrole z 0,03 na 0,23 / 10⁹ daltonů, po 30-minutové reparaci jsme zaznamenali pokles na 0,15 / 10⁹ daltonů. Při koncentraci 0,12 mM byl počet zlomů 0,38 / 10⁹ daltonů, po 30 minutách už jen 0,12 / 10⁹ daltonů. Při 0,25 mM jsme naměřili přibližně stejné hodnoty jako u předchozí koncentrace, a to 0,33 / 10⁹ daltonů. Reparace však nebyla natolik účinná, množství zlomů kleslo jen na 0,23 / 10⁹ daltonů. Při 0,5 mM se pak počet zlomů markantně zvýšil na 1,52 / 10⁹ daltonů. Po reparaci došlo k výrazné eliminaci poškození na 0,24 / 10⁹ daltonů. Při 1,0 mM došlo k dalšímu nárůstu zlomů až na 2,38 / 10⁹ daltonů, po reparaci se stav snížil na 0,80 / 10⁹ daltonů.



Graf 1

Graf 2 (Tabulka 2 viz. Příloha) vychází ze stejného měření jako graf předchozí, pouze velikost poškození je zde vyjádřena pomocí procentuálního množství DNA v ohonu pro znázornění celkového rozsahu poškození. Množství zlomů 0,03 / 10⁹ daltonů naměřené u kontrolních buněk v čase 0 (Graf 1) představuje 0,79 % DNA v ohonu. Maximální naměřené poškození 2,38 SSB / 10⁹ daltonů (při 1mM H₂O₂, v čase 0, Graf 1) odpovídá 56,60 % DNA v ohonu.

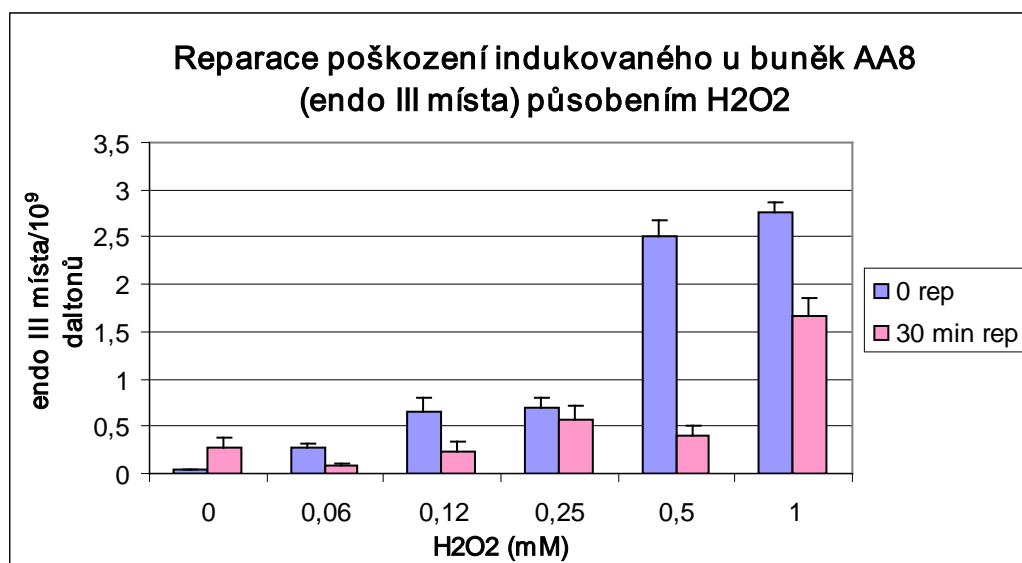


Graf 2

6.1.2. Reparace endo III míst

Buňky AA8 jsme ovlivňovali peroxidem vodíku o vzrůstající koncentraci (0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1,0 mM). Kontrolní buňky jsme ovlivnili pouze čistým PBS (0 mM H₂O₂). Buňky jsme dále zpracovávali buď ihned po aplikaci látky (hodnocení v čase 0) nebo po 30 minutách (30-minutová reparace). Po proběhlé lýze buněk jsme je ovlivnili enzymem endo III, který poškození zvýraznil tím, že zlomy vznikaly též v poškozených místech DNA senzitivních pro tento enzym (oxidované pyrimidiny, apyrimidinová místa). Dále jsme sklíčka zpracovali podle běžného postupu. Velikost poškození je vyjádřena počtem endo III míst vztažených na 10⁹ daltonů (Graf 3, Tabulka 3 viz. Příloha).

Se vzrůstající koncentrací roztoku peroxidu jsme pozorovali zvyšující se počet endo III míst, po 30 minutách byla patrná jejich oprava. Při koncentraci 0,06 mM se množství zlomů zvýšilo oproti kontrole z 0,03 na 0,27 / 10⁹ daltonů, po 30-minutové reparaci jsme zaznamenali pokles na 0,09 / 10⁹ daltonů. Při koncentraci 0,12 mM jsme naměřili 0,66, po 30 minutách už jen 0,23 / 10⁹ daltonů. Dále při 0,25 mM se počet zlomů snížil z původně naměřených 0,70 na 0,56 / 10⁹ daltonů. Při 0,5 mM došlo k neúčinnější opravě, stejně jako u buněk, které jsme enzymem endo III neovlivnili (Graf 1); počet zlomů se při této koncentraci snížil z 2,50 až na 0,41 / 10⁹ daltonů. Při 1,0 mM klesalo množství zlomů po reparaci z 2,38 na 0,80 / 10⁹ daltonů.



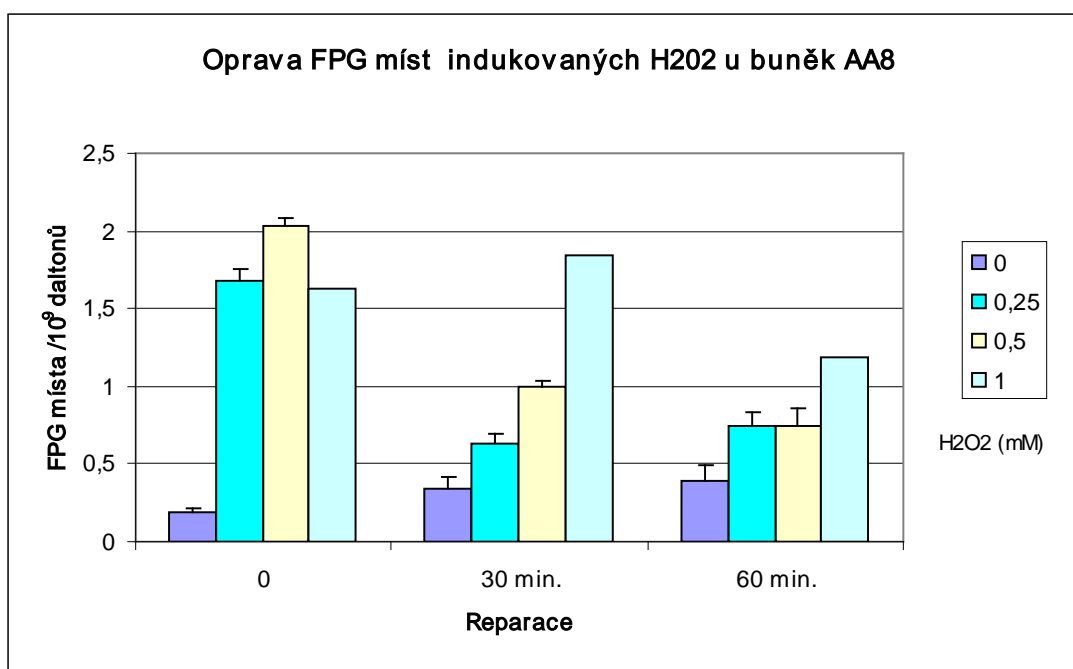
Graf 3

6.1.3. **Reparace FPG míst**

Buňky AA8 jsme ovlivňovali peroxidem vodíku o vzrůstající koncentraci (0,25; 0,5; 1,0 mM). Kontrolní buňky jsme ovlivnili pouze čistým PBS (0 mM H₂O₂). Buňky jsme zpracovávali buď ihned po aplikaci látky (hodnocení v čase 0), po 30 minutách (30-minutová reparace), nebo po 60 minutách od aplikace látky (60-minutová reparace). Po proběhlé lýze buněk jsme je ovlivnili enzymem FPG, který poškození zvýraznil tím, že indukoval zlomy i v poškozených místech DNA senzitivních k tomuto enzymu (8-oxoguanin, apurinní místa). Dále jsme sklíčka zpracovali podle běžného postupu. Velikost poškození je vyjádřena množstvím FPG míst / 10⁹ daltonů (Graf 4, Tabulka 4 viz. Příloha).

U buněk zpracovávaných ihned po aplikaci roztoku peroxidu se s jeho vzrůstající koncentrací zvyšoval počet FPG míst. U buněk zpracovaných s časovou prodlevou (30 nebo 60 minut od aplikace peroxidu) došlo k opravám těchto míst. Při koncentraci 0,25 mM se počet zlomů oproti kontrole výrazně zvýšil z 0,20 na 1,69 / 10⁹ daltonů, po 30-minutové reparaci klesl na 0,63/10⁹ daltonů, po 60 minutové reparaci byl patrný mírný vzestup na 0,75 / 10⁹ daltonů. Při koncentraci 0,5 mM klesal počet zlomů postupně z hodnoty 2,04 / 10⁹ daltonů (v čase 0) na 1,00 / 10⁹ daltonů po 30-minutové reparaci, po 60-minutové reparaci až na 0,74 / 10⁹ daltonů.

Při koncentraci peroxidu 1mM byl pozorován v čase 0 menší počet zlomů než při nižších koncentracích (1,64 / 10⁹ daltonů). Peroxid však nadále indukoval poškození i u buněk zpracovávaných po 30 minutách od jeho aplikace (zvýšení na 1,85 / 10⁹ daltonů). Přesto poškození při této koncentraci dosáhlo nižší hodnoty než poškození naměřené při 0,5 mM H₂O₂ v čase 0. Teprve u buněk zpracovaných po 60 minutách od aplikace 1mM peroxidu došlo k reparaci poškození (snížení na 1,19 / 10⁹ daltonů).



Graf 4

6.2. Reparace poškození indukovaného u buněk UV-20 působením H₂O₂

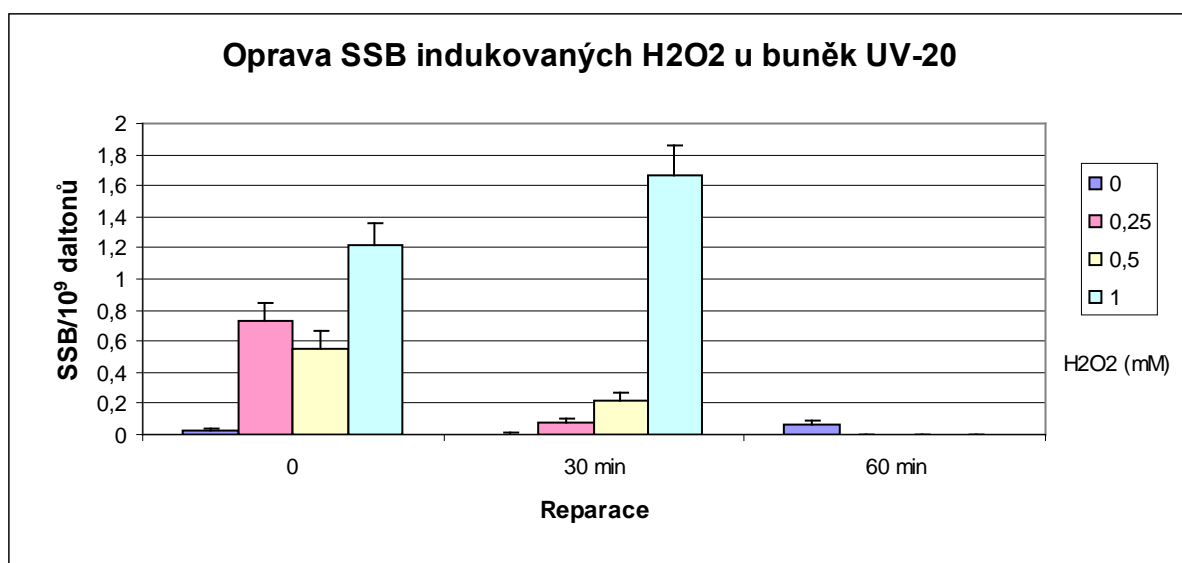
6.2.1. Reparace zlomů (SSB)

Buňky UV-20 jsme ovlivňovali roztokem peroxidu vodíku o vzrůstající koncentraci (0,25; 0,5; 1,0 mM). Kontrolní buňky jsme ovlivnili pouze čistým PBS (0 mM H₂O₂). Buňky jsme dále zpracovávali buď ihned po aplikaci látky, to znamená bez možnosti reparace (hodnocení v čase 0), po 30 minutách (30-minutová reparace) nebo po 60 minutách (60-minutová reparace). Velikost poškození je vyjádřena počtem jednořetězcových zlomů vztažených na 10⁹ daltonů (Graf 5, Tabulka 5 viz. Příloha).

U buněk zpracovaných ihned po aplikaci peroxidu (hodnocení v čase 0) jsme při koncentraci 0,25 mM zaznamenali nárůst počtu zlomů oproti kontrole z 0,02 na 0,73 / 10⁹ daltonů. S použitím 0,5 mM peroxidu však bylo množství zlomů nižší – 0,55 / 10⁹ daltonů. Dále při 1 mM se poškození oproti předchozím koncentracím zvýšilo na 1,21 SSB / 10⁹ daltonů.

Po 30 minutách reparace se u dvou nejnižších koncentrací peroxidu velikost poškození snížila. Při 0,25 mM klesl počet zlomů na $0,07 / 10^9$ daltonů, při 0,5 mM pouze na $0,22 / 10^9$ daltonů – reparace poškození způsobeného při této koncentraci byla tedy méně účinná. Při 1 mM však množství zlomů i po 30 minutách od aplikace peroxidu nadále stouvalo, a to na hodnotu $1,66 / 10^9$ daltonů.

Po 60 minutách od aplikace peroxidu byly téměř všechny zlomy DNA způsobené všemi jeho hodnocenými koncentracemi opraveny.



Graf 5

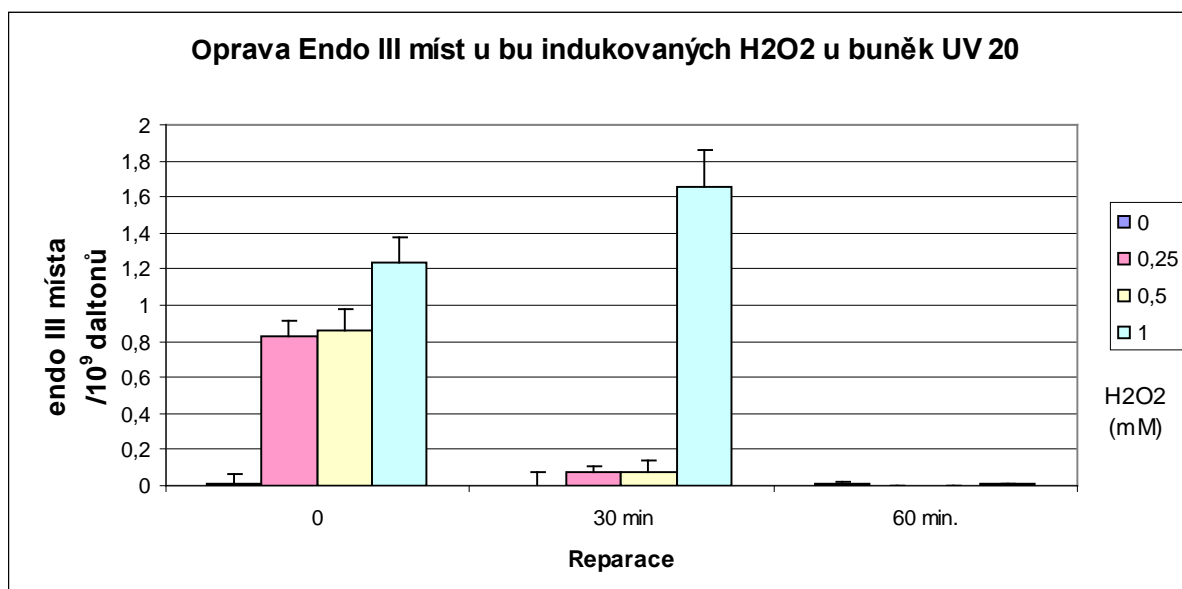
6.2.2. Reparace endo III míst

Buňky UV-20 jsme ovlivňovali roztokem peroxidu vodíku o vzrůstající koncentraci (0,25; 0,5; 1,0 mM). Kontrolní buňky jsme ovlivnili pouze čistým PBS (0 mM H₂O₂). Buňky jsme dále zpracovávali buď ihned po aplikaci látky (hodnocení v čase 0), po 30 minutách (30-minutová reparace) nebo po 60 minutách (60-minutová reparace). Po proběhlé lýze buněk jsme je ovlivnili enzymem endo III, který poškození zvýraznil tím, že zlomy vznikaly též v poškozených místech DNA senzitivních pro tento enzym (oxidované pyrimidiny, apyrimidinová místa). Dále jsme sklíčka zpracovali podle běžného postupu. Velikost poškození je vyjádřena počtem endo III míst vztažených na 10^9 daltonů (Graf 6, Tabulka 6 viz. Příloha).

U buněk zpracovaných ihned po aplikaci peroxidu (hodnocení v čase 0) jsme při 0,25 mM zaznamenali nárůst počtu zlomů oproti kontrole z 0,01 na 0,82 / 10⁹ daltonů. S použitím vyšších koncentrací peroxidu se množství endo III míst dále zvyšovalo – při 0,5 mM na 0,86 / 10⁹ daltonů, při 1 mM na 1,23 / 10⁹ daltonů.

Po 30 minutách reparace se u dvou nejnižších koncentrací peroxidu velikost poškození snížila téměř na stejnou hodnotu - při 0,25 mM klesl počet zlomů na 0,080 / 10⁹ daltonů, při 0,5 mM na 0,077 / 10⁹ daltonů. Při 1 mM však množství zlomů i po 30 minutách od aplikace peroxidu nadále stoupalo, a to na hodnotu 1,65 / 10⁹ daltonů.

Po 60 minutách od aplikace peroxidu byly téměř všechny zlomy DNA způsobené všemi jeho hodnocenými koncentracemi opraveny.



Graf 6

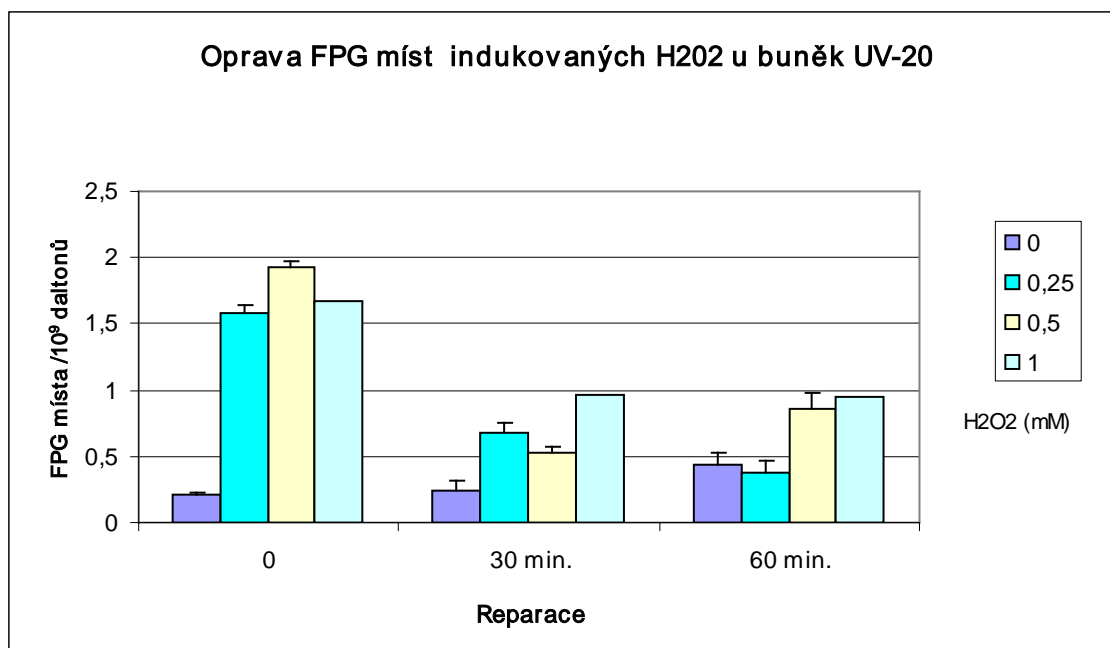
6.2.3. Reparace FPG míst

Buňky UV-20 jsme ovlivňovali roztokem peroxidu vodíku o vzrůstající koncentraci (0,25; 0,5; 1,0 mM). Kontrolní buňky jsme ovlivnili pouze čistým PBS (0 mM H₂O₂). Buňky jsme dále zpracovávali buď ihned po aplikaci látky (hodnocení v čase 0), po 30 minutách (30-minutová reparace) nebo po 60 minutách (60-minutová reparace). Po proběhlé lýze buněk jsme je ovlivnili enzymem FPG, který poškození

zvýraznil tím, že indukoval zlomy i v poškozených místech DNA senzitivních k tomuto enzymu (8-oxoguanin, apurinní místa). Dále jsme sklíčka zpracovali podle běžného postupu. Velikost poškození je vyjádřena množstvím FPG míst / 10^9 daltonů (Graf 7, Tabulka 7 viz. Příloha).

U buněk zpracovaných ihned po aplikaci peroxidu (hodnocení v čase 0) při 0,25 mM počet zlomů oproti kontrole výrazně stoupl, a to z 0,21 na 1,58 / 10^9 daltonů. S použitím 0,5 mM peroxidu se množství FPG míst dále zvyšovalo až na 1,93 / 10^9 daltonů. Při 1 mM peroxidu bylo množství zlomů ve srovnání s předchozí koncentrací o něco nižší – 1,23 / 10^9 daltonů.

U buněk zpracovaných s časovou prodlevou byla patrná oprava poškozených míst. Při 0,25 mM klesl počet zlomů po 30 minutách na 0,68 / 10^9 daltonů, po 60 minutách na 0,38 / 10^9 daltonů. Při 0,5 mM byl počet zlomů po 30-minutové reparaci ještě nižší - 0,52 / 10^9 daltonů; po 60 minutách však byla reparace o něco méně účinná – 0,86 FPG míst / 10^9 daltonů. Po ovlivnění 1 mM peroxidem klesalo množství zlomů nejpomaleji – po 30 minutách na 0,96 / 10^9 daltonů, po 60 minutách na 0,95 / 10^9 daltonů.



Graf 7

7. Diskuze

V této práci jsme hodnotili schopnost opravy oxidativního poškození DNA indukovaného peroxidem vodíku u linie buněk čínského křečička AA8 a od nich odvozených mutantních buněk UV-20. Buňky UV-20 mají mutaci v genu ERCC1.

Již dříve Melton et al. (1998) studovali důsledky deficiencie v genu ERCC1. Zjistili, že u primárních fibroblastů izolovaných z ERCC1-deficientních myších embryí nejsou po ovlivnění UV zářením patrné známky nukleotidové excizní reparační. Podobná hypersenzitivita k UV záření byla též pozorována u primárních embryonálních fibroblastů izolovaných z ERCC1 knokautovaných myší (tzn. myší, u kterých byl tento gen vyřazen z činnosti) a myší, u kterých byl zkrácen C-terminální konec genu ERCC1 (Weeda et al., 1997). Velmi podobné výsledky pak byly zjištěny i u ERCC1-deficientních ovariálních buněk křečička čínského 43-3B (Melton et al., 1998).

Defekty v genech ERCC byly identifikovány též u lidí jako příčina některých dědičných chorob, např. xerodermy pigmentosum (XP). Toto onemocnění je charakterizováno výraznou fotosenzitivitou vedoucí k atrofii kůže a později vzniku maligních nádorů různého typu (Kaposi, 1883). Bylo zjištěno, že patogenetickým podkladem XP je právě porucha excizního mechanismu opravy UV zářením poškozených pyrimidinových dimerů při defektu endonukleáz (Cleaver, 1968). Tato porucha byla prokázána u více buněčných linií – u keratinocytů, fibroblastů, lymfocytů, jaterních buněk i u nádorových buněk bazaliomu (Lehman, 1990).

Defekt přímo v genu ERCC1 zatím nebyl zjištěn jako příčina žádné lidské nemoci, prokázána však byla nezbytnost tohoto genu pro NER in vitro (Selfridge et al., 1992).

Nexø et al. (1998) studovali opravu DNA a schopnost přežití ovariálních buněk křečička čínského (AA8) a od nich odvozených buněk, mutantních v genech ERCC, po expozici chemickým činidelům způsobujícím metylaci bází – dimetylsulfátu (DMS) a metylnitrosouree (MNU). Použili různé buněčné linie lišící se schopností opravovat poškození DNA indukované UV zářením (Thomson et al., 1980), a to buňky UV-5 (defektní v ERCC2, který kóduje při NER nezbytnou helikázu), UV-20 (defektní v ERCC1) a UV-41 (defektní v ERCC4, který v komplexu s ERCC1 kóduje nukleázu

účastníci se NER) (*Wood et al., 1996, Sancar et al., 1996*). Bylo zjištěno, že mutantní buňky vykazují k MNU i DMS ve srovnání s rodičovskými buňkami AA8 podobnou citlivost. Tento fakt sice jednoznačně nevyločil možnost, že NER nehraje žádnou roli v opravě metylačního poškození DNA, ale dokázal, že v případě určité účasti NER při této opravě existuje jiný reparační systém, který funkci NER přebírá v momentě, kdy je blokována. Bylo tedy dokázáno, že mechanismy NER nejsou při opravě poškození těmito metylačními činiteli esenciální (*Nexø et al., 1998*).

V této práci jsme zjistili, že při hodnocení zlomů (SSB) u buněk AA8 rostla velikost poškození se zvyšující se koncentrací peroxidu, po 30 minutách bylo indukované poškození zčásti opraveno. Nejlépe tyto buňky opravovaly poškození způsobené 0,5 mM peroxidem. U buněk UV-20 došlo po 30 minutách též k opravám zlomů, nejučinnější reparaci jsme však zaznamenali při 0,25 mM. Po aplikaci 1 mM peroxidu se ale u nich, narozdíl od AA8, poškození i po 30 minutách nadále zvětšovalo, po 60 minutách ovšem výrazně pokleslo, stejně jako u UV-20 ovlivněných nižšími koncentracemi peroxidu, u kterých byly po 60 minutách téměř všechny zlomy opraveny.

Při použití endo III jsme zaznamenali u buněk větší počet zlomů, tzv. endo III míst, než v experimentech, kde jsme tento enzym vynechali. Chování obou typů buněk ale bylo podobné jako při hodnocení SSB. U buněk AA8 došlo po 30 minutách u všech měřených koncentrací ke snížení počtu endo III míst, nejučinnější opravu jsme zaznamenali, stejně jako v předešlém případě, po ovlivnění 0,5 mM peroxidem. U buněk UV-20 došlo po 30 minutách též k reparaci poškození; pouze po aplikaci 1 mM peroxidu došlo ke snížení počtu endo III míst až po 60 minutách.

Při použití formamidopyrimidin-DNA-glykosylázy došlo u obou typů buněk po 30 minutách též ke snížení počtu FPG míst; jinak se chovaly pouze AA8 ovlivněné 1 mM peroxidem - počet FPG míst se u nich nadále zvyšoval. U AA8 i UV-20 hodnocených po 60 minutách inkubace peroxidem docházelo též k reparaci poškození, avšak už ne tak významné jako v experimentech s endo III, kde byla velikost poškození v tomto čase téměř nulová.

Je důležité zmínit, že v experimentech dochází kromě poškození indukovaného oxidativním činitelem zcela určitě i ke změnám v integritě DNA. Tento fakt je zřetelný u kontrolních buněk, které vykazují též určitou míru poškození, přestože peroxidem vodíku ovlivněny nebyly. Počet zlomů DNA u těchto buněk je ovlivněn

kultivačními podmínkami, růstovou fází buněk, změnou jejich metabolické aktivity během jejich ovlivňování PBS za chladu, výměnou média apod. Na opravě zlomů se tak může podílet několik typů reparačních mechanismů. Použitím enzymů endo III a FPG je však možné poškození způsobené vnějšími vlivy a poškození indukované navzájem odlišit. Počet FPG míst / endo III míst je totiž, oproti počtu SSB (hodnocení bez použití enzymů), navýšen pouze o zlomy indukované výše zmíněnými enzymy. Tím, že endo III i FPG specificky rozpoznávají pouze oxidativně poškozená místa DNA, můžeme s největší pravděpodobností říct, že tento přírůstek zahrnuje výhradně zlomy, které vznikly na základě oxidativního poškození.

Z našich experimentů vyplývá, že jak buňky AA8, tak i deficientní UV-20 jsou schopny opravovat oxidativní poškození. Oba typy buněk vykazovaly k peroxidu vodíku srovnatelnou citlivost. Přesto nemůžeme vyloučit, že se u těchto buněčných linií mechanismy nukleotidové excizní reparace (NER) na opravě oxidativního poškození nepodílejí. Ale i v případě účasti NER při opravě tohoto typu poškození patrně tyto mechanismy nehrají klíčovou úlohu.

8. ZÁVĚR

Na základě našich pokusů jsme došli k závěru, že defekt buněk křeččíka čínského v mechanismu nukleotidové excizní reparace, důležité při opravě poškození DNA způsobeného UV zářením, nemá vliv na schopnost těchto buněk opravovat poškození zapříčiněné oxidativním činidlem.

SEZNAM LITERATURY

1. Cleaver, J. E.; Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum, *Nature*, 218, 1968, 652-656
2. Collins, A.R., Dobson, V.L., Dušinská, M., Kennedy, G., Štětina, R.; The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research* 375 (1997) 183–193.
3. Friedberg, E.C., Walker, G. C., Siede, W.; DNA repair and mutagenesis, Washington : ASM Press, 1995, 115-119, 203, 344
4. Hayashi, T., Takao, M., Tahala, K., Yasui A.; ERCC1 mutations in UV-sensitive Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, *Mutat. Res.* 407 (1998) 269–276.
5. Kaposi, M.; Xeroderma pigmentosum, *Ann. Dermatol. Syphilol.*, 4, 1883, 29-38
6. Lehman, A. R., Dean, S. W.; Cancer-prone human disorders with defects in DNA repair. In: *Handbook in Experimental Pharmacology*, vo. 94/II, Cooper, C. S. et al., Eds. Springer (Berlin), 1990, 7278
7. Malina, L. *Fotodermatózy*. 1. vyd. Praha, Maxdorf, 1999, 58-61, 79-80
8. Melton, D.W., Ketchen, A.M., Núñez, F., Bonatti-Abbondandolo, S., Abbondandolo, A., Squires, S., Johnson, R. T.; Cells from ERCC1-deficient mice show increased genome instability and a reduced frequency of S-phase-dependent illegitimate chromosome exchange but a normal frequency of homologous recombination, *Journal of Cell Science* 111 (1998) 395-404.
9. Nečas Oldřich a kol.: *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, H&H, 2000, s. 140-145, 306

10. Nexø, B. A., Dybdahl, M., Damgaard, J., Olsen, L. S., Møller, P., Wassermann, K.; Proficient deoxyribonucleic acid repair of methylation damage in hamster ERCC-gene mutants, *Mutat. Res.* 407 (1998) 261–268.
11. Rosypal Stanislav: Úvod do molekulární biologie, 3.díl, Brno 2000, kap. 10 (732-770), kap. 13 (805-820)
12. Sancar, A.; DNA excision repair, *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 43–81. (převzato z Nexø et al.,1998)
13. Selfridge, J., Pow, A. M., McWhir, J., Magin, T. M. and Melton, D. W.; Gene targeting using a mouse *HPRT* minigene/*HPRT*-deficient embryonic stem cell system: inactivation of the mouse *ERCC1* gene, *Somatic Cell Mol. Gen.* 18 (1992) 325-336. (převzato z Melton et al. 1998)
14. Štípek Stanislav a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci, Grada 2000, 21-27, 41-81, 207-212
15. Thompson, L.H., Rubin, J.S., Cleaver, J.E., Whitmore, G.F., Brookman, K.; A screening method for isolating repair-deficient mutants of CHO cells, *Somatic Cell Genet.* 6 (1980) 391–405. (převzato z Nexø et al.,1998)
16. Voet, D. – Voetová, J. G.: *Biochemie*. Praha, Victoria Publishing a. s., 1995, s.104, 109-111.
17. Weeda, G., Donker, I., de Wit, J., Morreau, H., Janssens, R., Vissers, C.J., Nigg, A., van Steeg, H., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J. H. J.; Disruption of mouse *ERCC1* results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Curr. Biol.* 7 (1997) 427-439. (převzato z Melton et al. 1998)
18. Westerveld, A., Hoeijmakers, J. H. J., van Duin M., de Wit, J., Odijk. H., Pastink, A. et al.; Molecular cloning of a human DNA repair gene, *Nature* 310 (1984) 425-429. (převzato z Melton et al. 1998)

19. Wood, R. D.; DNA repair in eukaryotes, *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 135-167.
(převzato z Nexø et al.,1998)

20. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR012319>; InterPro: IPR01231 Formamidopyrimidine-DNA glycosylase, catalytic,; Fromme J.C., Banerjee A. , Verdine G.L.; DNA glycosylase recognition and catalysis. ,*Curr. Opin. Struct. Biol.* 14 43-49 2004 [PubMed: 15102448] (22.3.2008)

PŘÍLOHA – Výsledkové tabulky

Tabulka 1: Reparace SSB indukovaných působením H₂O₂ u buněk AA8

H ₂ O ₂ (mM)	SSB (10 ⁻⁹ daltonů) (střední hodnota)		Standardní chyba	
	0 min. reparace	30 min rep.	0 min. rep.	30 min. rep.
0	0,033362	0,094850	0,008229	0,036177
0,06	0,235424	0,152642	0,051920	0,105903
0,12	0,382004	0,123396	0,100798	0,034856
0,25	0,326606	0,231714	0,042388	0,077981
0,5	1,524082	0,238280	0,154582	0,055835
1	2,377018	0,801290	0,149704	0,143947

Tabulka 2: Reparace SSB indukovaných působením H₂O₂ u buněk AA8

(velikost poškození vyjádřena v % DNA v ohonu komety)

H ₂ O ₂ (mM)	% tail DNA (střední hodnota)		Standardní chyba	
	0 min. reparace	30 min rep.	0 min. rep.	30 min. rep.
0	0,794333	2,258333	0,195927	0,861366
0,06	5,605333	3,634333	1,236201	2,521493
0,12	9,095333	2,938002	2,399967	0,829912
0,25	7,776333	5,517001	1,009250	1,856690
0,5	36,28767	5,673333	3,680540	1,329413
1	56,59567	19,07833	3,564395	3,427315

Tabulka 3: Reparace endo III míst indukovaných působením H₂O₂ u buněk AA8

H ₂ O ₂ (mM)	Endo III (10-9daltonů) (střední hodnota)		Standardní chyba	
	0 min. reparace	30 min. rep.	0 min. rep.	30 min. rep.
0	0,033012	0,275422	0,008878	0,108032
0,06	0,270354	0,091798	0,043136	0,011586
0,12	0,656656	0,231210	0,149130	0,113964
0,25	0,697158	0,561232	0,106293	0,161047
0,5	2,501128	0,408674	0,174832	0,099365
1	2,760884	1,657670	0,106391	0,203899

Tabulka 4: Reparace FPG míst indukovaných působením H₂O₂ u buněk AA8

H ₂ O ₂ (mM)	FPG (10-9daltonů) (střední hodnota)			Standardní chyba		
	0 min. rep.	30 min. rep.	60 min. rep.	0 min. rep.	30 min. rep.	60 min. rep.
0	0,195608	0,335356	0,396592	0,021066	0,069147	0,044228
0,25	1,685530	0,633766	0,750638	0,077162	0,064731	0,041125
0,5	2,036916	1,000062	0,740502	0,092030	0,083926	0,116279
1	1,634570	1,849568	1,185702	0,09463	0,129704	0,158438

Tabulka 5: Reparace SSB indukovaných působením H₂O₂ u buněk UV-20

H ₂ O ₂ (mM)	SSB (10-9daltonů) (střední hodnota)			Standardní chyba		
	0 min. rep.	30 min. rep.	60 min. rep.	0 min. rep.	30 min. rep.	60 min. rep.
0	0,021616	0,005278	0,057764	0,005487	0,001848	0,018721
0,25	0,727356	0,070630	0,000070	0,147221	0,027681	0,000023
0,5	0,553476	0,216580	0,000546	0,138963	0,096483	0,000124
1	1,213473	1,660862	0,000280	0,171632	0,191646	0,000076

Tabulka 6: Reparace endo III míst indukovaných působením H₂O₂ u buněk UV-20

H ₂ O ₂ (mM)	Endo III (10 ⁻⁹ daltonů) (střední hodnota)			Standardní chyba		
	0 min. rep.	30 min. rep.	60 min. rep.	0 min. rep.	30 min. rep.	60 min. rep.
0	0,005740	0,000168	0,011004	0,048712	0,077391	0,007452
0,25	0,824768	0,080080	0,000098	0,134978	0,025464	0,000311
0,5	0,861336	0,077140	0,000112	0,151843	0,067342	0,000274
1	1,232002	1,651090	0,007154	0,179324	0,195648	0,004782

Tabulka 7: Reparace FPG míst indukovaných působením H₂O₂ u buněk UV-20

H ₂ O ₂ (mM)	FPG (10 ⁻⁹ daltonů) (střední hodnota)			Standardní chyba		
	0 min. rep.	30 min. rep.	60 min. rep.	0 min. rep.	30 min. rep.	60 min. rep.
0	0,209664	0,238420	0,435764	0,047081	0,060069	0,044211
0,25	1,575896	0,682430	0,376348	0,088088	0,089539	0,042968
0,5	1,933232	0,528178	0,863226	0,096586	0,064623	0,064803
1	1,668674	0,957880	0,946554	0,075076	0,097081	0,132779