ČESKÁ A SLOVENSKÁ FEDERATIVNÍ REPUBLIKA
(19)

FEDERÁLNÍ ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

POPIS OBJEVU K DIPLOMU ČÍS. 69

Přihlášeno: 24 03 86 /PO 15-86/
Právo přednosti od 31 07 72 pro bod 1
/Febs Letters 23, 1972, 325/,
od 31 03 77 pro bod 2
/Photochem. Photobiol.
25, 1977, 259/

Uděleno: 07 12 92

Vydáno: 31 12 92

MDT
576.097.3

Autoři objevu: SEDLIAKOVÁ MILENA doc. MUDr. DrSc., BRATISLAVA,
MAŠEK FRANTIŠEK ing. CSc., BRATISLAVA,
BROZMANOVÁ JELA ing. CSc., BRATISLAVA,
SLEZÁRIKOVÁ VIERA RNDr. CSc., BRATISLAVA

Název objevu: Potlačenie excíznej opravy poškodenej dezoxyribonukleovej kyseliny /DNK/ u modelových buniek Escherichia coli, kmeň B/r ožiarených ultrafialovým svetlom

Předmět objevu:

1. Jav spočívajúci v tom, že u modelových buniek Escherichia coli kmeň B/r, ožiarených ultrafialovým svetlom, excíznu opravu možno potlačiť.
2. Jav podľa bodu 1 spočívajúci v tom, že potlačenie excíznej opravy nevedie k hynutiu buniek, ak majú intaktné uvr gény.

Predmetom objavu je jav spočívajúci v tom, že u modelových buniek Escherichia coli kmeň B/r (ďalej E.coli B/r), ožiarených ultrafialovým svetlom, excíznu opravu možno potlačiť (Febs Letters 23,1972,325) a ďalej jav spočívajúci v tom, že potlačenie excíznej opravy nevedie k hynutiu buniek, ak majú intaktné uvr (ultraviolet resistance) gény (Photochem.Photobiol. 25,1977,259).

Pre dedičnosť je charakteristický vysoký stupeň konzervatívnosti. Pôvodne sa predpokladalo, že látka, ktorá dedičnosť sprostredkuje, nie je vnímavá k vonkajším vplyvom a je v podstate nemenná. Dnes je známe, že nositeľom dedičnej informácie sú nukleové kyseliny, ktoré vďaka svojej štuktúre s vysokým obsahom dvojných väzieb sú značne reaktívne. Nukleové kyseliny sa naustále poškodzujú fyzikálnymi a chemickými faktormi vonkajšieho prostredia. Prenos nezmenenej dedičnej informácie z rodiča na potomstvo by nebol možný, ak by poškodenia neboli priebežne "opravované" a normalizované. Preto existencia systémov, ktoré reparujú poškodenú genetickú informáciu, sa už dávnejšie predpokladala. Exaktné dôkazy však boli prinesené len v posledných tridsiatich rokoch. Dnes vieme, že opravné mechanizmy DNK sú integrálnou súčasťou každej bunky, bez ohľadu na stupeň jej diferenciácie a fylogenetického vývoja.

Tak ako v iných oblastiach molekulárnej genetiky, väčšina poznatkov o oprave DNK sa získala na modelovom organizme E.coli. Ako vhodný spôsob poškodenia poslúžilo ožiarenie ultrafialovými lúčmi, ktoré v molekule DNK vyvoláva špecifické poškodenie, pyrimidinový dimér.

V roku 1964 Setlow a Carrier zistili, že pyrimidinové diméry sú z molekuly DNK odstránené (excidované) enzýmovým opravným systémom (Setlow R.B., Carrier W.L.: Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,51,226 /1964/). Dokázali, že proces pozostáva z troch krokov a to vyštiepenia (excízie) poškodenej časti jednoduchého reťazca, jeho doplnenia (resyntézy) podľa nepoškodeného reťazca protiľahlého a znovuspojenia koncov raťazca starého a novovytvoreného. Proces sa uskutočňuje viacerými enzýmami. Najdôležitejší z nich je špecifická endonukleáza, ktorá poškodenie raťazca rozozná a v jeho blízkosti zavedie zlom do fosfodiesterovej väzby cukrofosfátovej výstuže reťazca. Špecifická endonukleáza je kódovaná uvrA,B,C génmi. Ak v niektorom z týchto génov dôjde k zmene štruktúry (mutácií), endonukleáza prestáva byť funkčná. Bunky s defektnými uvr génmi sa stanú citlivé nielen na ultrafialové ožiarenie, ale aj na niektoré chemikálie, lebo endonukleáza rozozná aj iné poškodenia (Howard-Fladers P., Boyce R.P.: Radiat.Res.suppl.6,156, /1966/).

Vytvorila sa predstava, že excízia poškodení je základným a najvýznamnejším opravným mechanizmom (viď prehľadné referáty: Setlow R.B. v knihe: Regulation of Nucleic Acids and Protein Bioxynthesis. Amsterdam, Elsevier 1967, 51-62; Witkin E.M.:Ann.Rev.Microbiol. 23, 487, /1969/). To sa javilo plne v súlade so skutečnosťou, že diméry sú z DNK kvantitatívne odstránené behom jednej až dvoch hodín po ožiarení, ako aj s hore spomenutou skutočnosťou, že bunky s defektnými uvr génmi strácajú schopnosť excidovať diméry a stanú sa citlivé ku škodlivým faktorom.

Pracovníci oddelenia molekulárnej genetiky SAV sa od jeho vzniku v roku 1963 zaoberali otázkou, ako možno ovplyvniť rezistenciu buniek k žiareniu. Sústredili sa na možné zvýšenie rezistencie zásahom do metabolizmu buniek a vysvetlenie spôsobu jeho účinku. Pri týchto štúdiách získali výsledky, ktoré nezodpovedali predstave o prvoradom význame excíznej opravy. Bolo známe, že prechodným zabrzdením syntézy bielkovín pred ožiarením buniek sa výrazne zvýši ich rezistencia, takže prežívajú so 100-500 násobne vyššou frekvenciou. Predpokladalo sa, že za týchto podmienok dochádza k vystupňovaniu, resp. optimalizácii opravy vyštiepením (viď prehľadný referát Hanawalt P.C.: Photochem.Photobiol. 5,1,/1966/). Hoci tento názor nebol experimentálne podložený, všeobecne sa akceptoval. Preto prekvapilo zistenie, že ani jeden z krokov excíznej opravy, t.j. odstránenie dimérov (Sedliaková M., Mašek F., Bernátová Ľ.: Photochem.Photobiol. 14, 597, /1971/), reparačná syntéza (Sedliaková M., Billen D., Bruns L.: Photochem.Photobiol. 11, 309, /1970/), alebo obnovenie kontinuity reťazca (Sedliaková M., Bugán J.: Neoplasma, 20, 261, /1973/) sa v daných podmienkach nestimulujú. Naopak, v prípade jedného kmeňa E.coli bola excízia poškodení zjavne redukovaná pri 500-násobne zvýšenom prežití buniek. To viedlo autorov objavu k hypotéze, že excízna oprava je len jednou z viacerých opravných funkcií uvr génov, takže bunky s funkčnými uvr génmi majú možnosť použiť alternatívne opravné dráhy. Tento predpoklad aj experimentálne dokázali.

Ako autori objavu zistili, deprivácia na tymín aplikovaná počas 2 hodín pred ožiarením spôsobí, že pyrimidínové diméry sa po ožiarení neexcidujú. To samo o sebe neprekvapuje. Keďže tymínová deprivácia vedie k hynutiu buniek, inhibícia excíznej opravy by mohla byť dôsledkom ich metabolickej inaktivácie. Preto sa následne eliminoval nepriaznivý efekt tymínovej deprivácie súčasnou depriváciou na esenciálne aminokyseliny. Za týchto podmienok nedochádzalo k hynutiu buniek, avšak excízna oprava bola naďalej potlačená (Febs Letters, 23, 1972, 326). Autori prvýkrát pozorovali tento jav u modelových buniek E.coli B/r. Neskôr ho dokázali u ďalších zbierkových kmeňov, menovite E.coli K12 a E.coli 15 (Biochim.Biophys.Acta, 349, 1974, 442).

V ďalších experimentoch sa porovnala schopnosť tolerovať neexcidované diméry u buniek s intaktnými a defektnými uvr génmi. Množstvo neexcidovaných dimérov sa stanovilo rádiochromatograficky. Zistilo sa, že pri rovnakom množstve neexcidovaných dimérov prežívajú bunky, ktoré majú intaktné uvr gény s 10 krát vyššou účinnosťou, ako bunky s uvr génmi defektnými (Photochem.Photobiol. 25, 1977, 259).

Podstatou objavu je odhalenie novej kvality bunky, ktorá svedčí o dvojakej úlohe uvr génov v oprave poškodených molekúl DNK. Zistenie bolo prvýkrát zverejnené v roku 1972 na VI. Medzinárodnom fotobiologickom kongrese v Bochum. Vzhľadom na jeho neočakávanosť boli výsledky v roku 1973 overované (a v plnom rozsahu potvrdené) v Národnom laboratóriu Oak Ridge, USA. Experimenty robil A. Johnoston.

Predmet objavu sa stal podkladom pre bádateľský výskum v oblasti opravných procesov DNK. Na jeho základe bol podaný "in vi-

vo" dôkaz o novom spôsobe opravy poškodených molekúl DNK.

Štúdium opravných procesov je súčasťou rozsiahleho výskumu ochrany životného prostredia, ktorý smeruje k zachovaniu neporušeného genofondu človeka a všetkých žijúcich druhov. Čím presnejšie poznáme mechanizmy poškodenia dedičnej hmoty a spôsob, akým sa s ním organizmy vysporiadajú, tým presnejšie vieme stanoviť rizikovosť daného faktoru životnoho prostredia. Preto má základný výskum danej oblasti medicínsky, všeobecno-biologický a v konečnom dôsledku aj ekonomický dosah.