

Kapitola 13

Mutace, oprava DNA a rekombinace

OSNOVA KAPITOLY

- ▶ Mutace jako zdroj genetické variability nezbytný pro evoluci
- ▶ Základní charakteristiky vzniku mutací
- ▶ Fenotypové účinky mutací
- ▶ Molekulární podstata mutací
- ▶ Testování chemických látek na mutagenitu: Amesův test
- ▶ Mechanizmy opravy DNA
- ▶ Dědičné choroby u člověka způsobené poruchami opravy DNA
- ▶ Mechanizmy rekombinace DNA



Skupina dětí hrajících si venku. Dítě v bílé kombinéze je postiženo chorobou *Xeroderma pigmentosum*, tj. autozomově recesivním onemocněním, které je charakterizováno hypersenzitivitou ke slunečnímu světlu. Nesmí se vystavovat slunci, aby nedošlo ke vzniku kožních nádorů.

▶ Xeroderma pigmentosum: Porucha opravy DNA u člověka

Byl slunný letní den – takový, jaký by většina dětí trávila nejraději na pláži. Všichni Nathanovi kamarádi měli na sobě krátká trička nebo jen plavky. Když se k nim Nathan chystal připojit, oblékl si dlouhé kalhoty, košili s dlouhými rukávy, na hlavu si pevně nasadil široký klobouk a na tváře a ruce si nanal silnou vrstvu opalovacího krému. Zatímco si jeho kamarádi užívali zábavu ve slunečních paprscích, Nathan žil s neustálým strachem ze slunečního světla; narodil se totiž s dědičnou chorobou *Xeroderma pigmentosum*, autozomově recesivním onemocněním, které postihuje průměrně 1 z 250 000 narozených dětí. Kožní buňky lidí postižených touto chorobou jsou extrémně citlivé k ultrafialovému záření –

složce slunečního světla s vysokou energií. To způsobuje chemické změny v DNA, které vedou nejenom ke vzniku intenzivních pih, ale mohou způsobovat i rakovinu kůže.

Nathanovi kamarádi nemusejí mít ze hry na slunci strach; nejhorší, co jim hrozí, je spálení. Jejich kožní buňky obsahují enzymy, které opravují chyby v DNA způsobené ultrafialovým zářením. Nathan takové štěstí nemá – jeho kožním buňkám jeden z těchto reparačních enzymů potřebných k opravě změn ve struktuře DNA chybí. *Xeroderma pigmentosum* může vzniknout v důsledku dědičných poruch v některém z devíti lidských genů. V současné době je známo více chorob, které jsou způsobené selháním opravných mechanismů DNA po poškození jinými fyzikálními faktory a chemickými látkami.

Životu nebezpečné následky těchto dědičných poruch enzymů, které opravují DNA, dramaticky zvyšují jejich důležitost. Klíčová role DNA v živých organizmech si během evoluce vynutila tvorbu rozmanitých mechanismů, které zajišťují její integritu. Jak uvidíme v této kapitole, živé buňky skutečně obsahují obrovské množství enzymů, které neustále vyhledávají poškozené anebo nesprávně spárované nukleotidy. Pokud je takový pár bází či úsek DNA nalezen, okamžitě je opraven malou armádou enzymů, z nichž každý se vyvinul pro boj se specifickým typem poškození. V této kapitole se podrobněji seznámíme s typy změn, které se vyskytují v DNA, s mechanismy, které tyto chyby opravují, a se souvisejícími procesy rekombinace mezi homologickými molekulami DNA.

► Mutace jako zdroj genetické variability nezbytný pro evoluci

Mutace – dědičné změny genetického materiálu – poskytují nové genetické varianty, které umožňují evoluci organismů.

V předchozích kapitolách jsme ukázali, že podstatou dědičnosti jsou geny, které se během rozmnožování přenášejí z rodičů na potomky, a že dědičná informace je v genech uložena v podobě sekvencí, které jsou tvořeny páry nukleotidů v DNA nebo RNA. Vysvětlili jsme si, jak je genetická informace přesně duplikována během semikonzervativní replikace DNA. Ukázali jsme také, že tato přesná replikace částečně závisí na korekční funkci DNA-polymerázy, která katalyzuje syntézu DNA. Je tedy patrné, že v minulosti se vyvinuly mechanismy, které zajišťují spolehlivý přenos genetické informace nejen z buňky do buňky, ale nakonec i z generace na generaci. Nicméně přes velké množství kontrol a oprav dochází při tomto přenosu k chybám. Takové dědičné změny v genetickém materiálu se nazývají mutace.

Termínem **mutace** se označuje jak (1) změna genetického materiálu, tak i (2) proces, během kterého tato změna vzniká. Organismus, který má v důsledku mutace změněný genotyp, se nazývá **mutant**. Původní historicky širší význam slova mutace označoval jakoukoliv náhlou dědičnou změnu genotypu buňky nebo organismu. Nicméně musíme pečlivě odlišovat změny v genotypu, a tím i ve fenotypu organismu, které jsou výsledkem rekombinačních procesů vytvářejících nové genetické kombinace již dříve existujících genetických variant, od změn způsobených mutacemi vzniklými *de novo*. Oba procesy občas vedou ke vzniku nových fenotypů ve velmi nízkých četnostech. Mutační změny v genotypu organismu zahrnují změny struktury nebo počtu chromozomů (kapitola 6), stejně jako změny na úrovni jednotlivých genů. Mutace ovlivňující jednotlivé geny na

úrovni párů bází se nazývají **bodové mutace**. Patří k nim záměna jednoho páru bází za jiný nebo inserce či delece jednoho nebo více párů bází ve specifickém místě genu. V současné době se termín *mutace* někdy používá v užším slova smyslu – označuje pouze změny ve struktuře jednotlivých genů. V této kapitole se budeme zabývat mutacemi v pojetí právě této užší definice.

Mutace jsou hlavním zdrojem veškeré genetické variability; poskytují prvotní materiál pro evoluci. Rekombinační mechanismy přetvářejí genetickou variabilitu do nových kombinací a přírodní nebo umělá selekce zachovává kombinace nejlépe přizpůsobené stávajícím přírodním podmínkám nebo žádoucí ve šlechtění rostlin a živočichů. Bez mutací by všechny geny existovaly v jedné formě, alely by neexistovaly a nebyla by možná genetická analýza. A co je nejdůležitější, populace organismů by nebyly schopny evoluce a adaptace na změny životního prostředí. Pokud ovšem dochází k mutacím příliš často, mohou takové změny narušit správný přenos genetické informace z generace na generaci. Navíc je většina mutací se snadno detekovatelnými fenotypovými účinky pro organismus škodlivá. Jak se dá předpokládat, rychlost vzniku mutací je ovlivněna zejména genetickými faktory a mechanismy, které regulují úroveň mutací vznikajících vlivem různých podmínek vnějšího prostředí.

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATEK

- Mutace jsou dědičné změny genetického materiálu, které poskytují prvotní materiál pro evoluci.

► Základní charakteristiky vzniku mutací

Mutace se vyskytují u všech organismů, od virů až po člověka. Mohou vznikat spontánně, nebo mohou být indukovány mutagenními látkami. Mutace je obvykle náhodný, neadaptivní proces.

Mutace se vyskytují ve všech genech a setkáváme se s nimi u všech živých organismů. Jsou zdrojem nové genetické variability, která umožňuje adaptaci organismů na změny životního prostředí. Proto mutace byly a jsou nezbytné pro evoluci. Předtím, než budeme probírat specifické fenotypové projevy a mechanismy, kterými různé typy mutací vznikají, ukážeme si některé ze základních vlastností tohoto významného procesu.

MUTACE SOMATICKÉ A GAMETICKÉ

Mutace se může vyskytnout v jakémkoliv buňce v jakémkoliv stadiu vývoje mnohobuněčného organismu. Bezprostřední účinky mutace a její schopnost způsobovat změny fenotypu jsou určeny její dominancí, typem buněk, ve kterých vznikne, a době, ve které se uskuteční v průběhu životního cyklu organismu. U vyšších živočichů jsou buňky germinální



Obr. 13.1 ▶ Původní odrůda jabloně Delicious vznikla somatickou mutací. Následně byla modifikována výběrem z dalších somatických mutací.

(zárodečné) linie, ze kterých vznikají gamety, během počátečních fází vývoje odděleny od ostatních typů buněk (kapitola 2). Všechny ostatní, tj. nezárodečné, typy buněk se pak nazývají somatické. **Gametické mutace** jsou takové mutace, které se vyskytují pouze u buněk zárodečné linie, zatímco **mutace somatické** se vyskytují u buněk somatických. Pokud tedy mutace vznikne v somatické buňce, bude výsledný mutantní fenotyp přítomný pouze u následníků této buňky, mutace se nebude přenášet gametami do potomstva. Jablka odrůdy Delicious (**obr. 13.1**) a pomeranče typu navel (pupíkaté) jsou příkladem mutantního fenotypu, který je podmíněn vznikem mutací v somatických buňkách. Jablka odrůdy Delicious byla poprvé objevena v roce 1881 farmářem Jessie Hiattem z Iowy. Od svého objevení byly vlastnosti této odrůdy dále modifikovány dalšími somatickými mutacemi. Ovocné stromy, u nichž se původní somatická mutace objevila, byly somatické mozaiky. Naštěstí lze odrůdu jabloní Delicious i pomerančovník typu navel snadno množit vegetativně, a tak mnoho dnešních potomků (klonů) získaných ze štěpů a roubů si originální mutace uchovalo.

Jestliže dominantní mutace vznikají v zárodečné linii, jejich účinky se mohou projevit v potomstvu bezprostředně. Pokud jsou mutace recesivní, jejich efekt je často potlačen díky diploidnímu stavu. Gametické mutace mohou vznikat v jakémkoliv stadiu reprodukčního cyklu organismu. Pokud mutace vznikne v gametě, je pravděpodobné, že mutantní alelu bude mít pouze jeden potomek. Jestliže však mutace vznikne v primordiální zárodečné linii varlat nebo vaječnicků, může se mutantní alela dostat i do několika gamet, čímž se zvýší její potenciál pro přetrvávání a přenos v dalších generacích. Díky tomu jsou dominance mutantní alely a stadium reprodukčního cyklu, ve kterém mutace vznikla, hlavními faktory pro určení pravděpodobnosti projevu takové mutace v organismu.

První zaznamenaný výskyt gametické dominantní mutace u hospodářských zvířat pochází z roku 1791, kdy farmář Seth Wright z Charles River v Doveru ve státě Massachusetts objevil ve svém stádu ovcí zvláštního samce s neobvykle krátkými končetinami. Napadlo ho, že by bylo užitečné mít stádo takovýchto krátkonohých ovcí, které by díky svému handicapu nemohly přeskočit nízký kamenný plot oddělující jeho farmu od pozemků souseda. Wright tohoto berana připustil k několika ovcím ze svého stáda, a podařilo se mu získat dvě jehňata s krátkými končetinami. Krátkonohé ovce pak zkrřížil mezi sebou a získal tak novou linii, kde všichni jedinci měli uvedený znak.

MUTACE SPONTÁNNÍ A INDUKOVANÉ

Čím je způsoben vznik nové mutace, například takové, jako u Wrightových krátkonohých ovcí? Nějakou mutagenní látkou ve vnějším prostředí, nebo vnitřními procesy probíhajícími v živých organizmech? **Spontánní mutace** jsou takové mutace, které vznikají bez zjevné vnější příčiny. Mohou být skutečně spontánní, tj. vznikat v důsledku malého množství metabolických poruch v organismu, nebo mohou být vyvolány neznámou látkou přítomnou ve vnějším prostředí. **Indukované mutace** jsou pak takové mutace, které vznikají v organizmech po působení fyzikálních nebo chemických látek s mutagenním účinkem, tj. navozujících změny v DNA (nebo RNA, u některých virů). Takové faktory či látky se označují jako **mutageny**; řadíme k nim například ionizující a ultrafialové záření a velké množství chemických látek.

Často je nemožné prokázat, zdali jednotlivá mutace vznikla spontánně, nebo byla indukována nějakou mutagenní látkou. V tomto případě jsou genetici odkázáni na rozlišení na úrovni populace. Jestliže se v populaci vystavené působení mutagenu zvýší rychlost vzniku mutací stonásobně, pak v průměru 99 z každých 100 mutací přítomných v populaci bude indukováno mutagenem. Vědci pak mohou provést statistické srovnávací analýzy pro výskyt spontánních a indukovaných mutací mezi populacemi vystavenými mutagenu a populacemi kontrolními, které mutagenu vystaveny nebyly.

Spontánní mutace se vyskytují sporadicky, ačkoliv se pozorované četnosti liší gen od genu i mezi jednotlivými organismy. Zjištěné rychlosti vzniku spontánních mutací pro různé geny se u fágů a bakterií pohybují mezi 10^{-8} až 10^{-10} detekovatelných mutací na nukleotidový pár na generaci. U eukaryot se odhady rychlosti vzniku mutací pohybují mezi 10^{-7} až 10^{-9} na nukleotidový pár na generaci (berou se v úvahu pouze geny s přesně definovanou sekvencí). Při porovnávání rychlosti vzniku mutací na nukleotid a na gen se pro kódující oblast průměrného genu obvykle používá délka 1000 párů bází. Rychlost vzniku mutací na gen pak dosahuje hodnot 10^{-4} až 10^{-7} na generaci.

Působení mutagenní látkou může zvyšovat rychlost vzniku mutací o celé řády. Pokud budeme působit na bak-

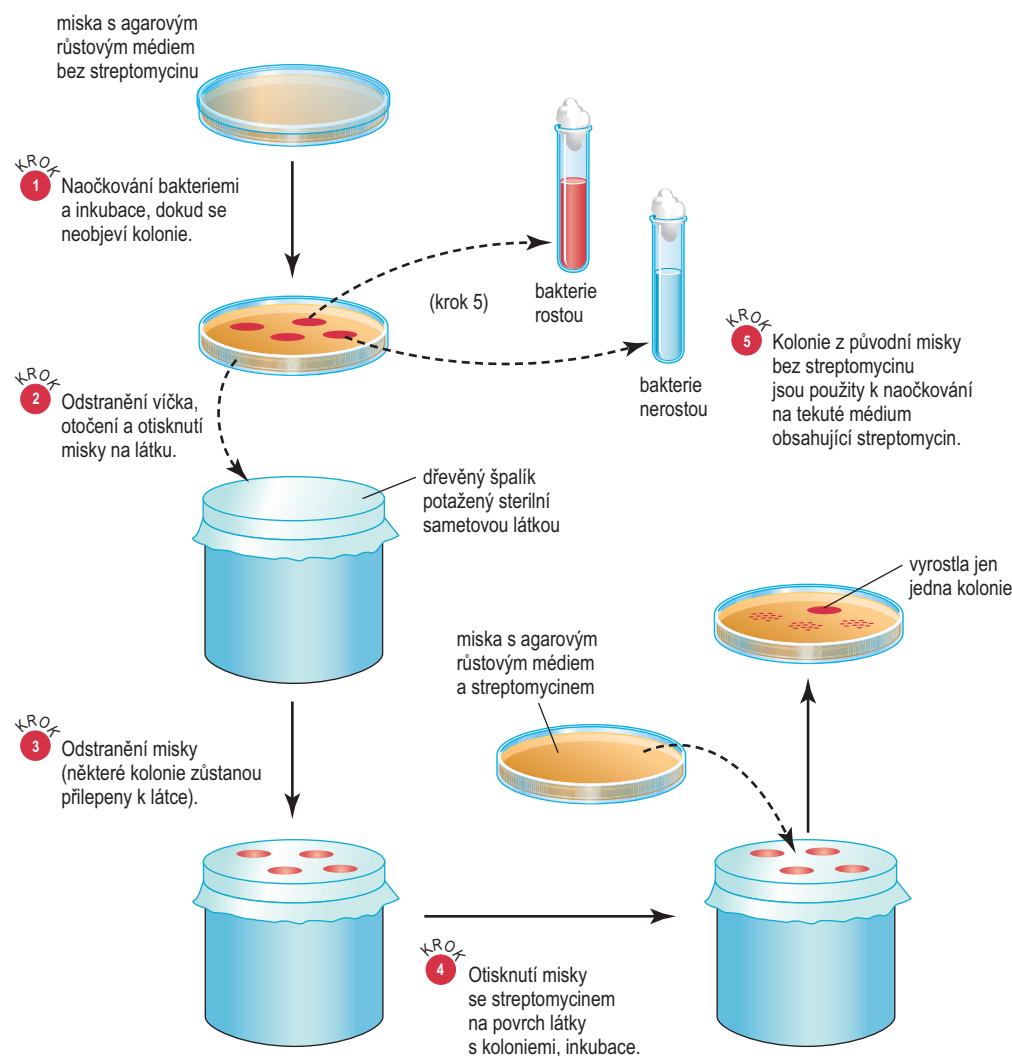
terie a viry silným mutagenem, můžeme zvýšit četnost mutací na gen u těchto organismů o více než jedno procento. To znamená, že více než jedno procento genů ovlivněných organismů bude obsahovat mutaci, nebo jinak řečeno, více než jedno procento řádků nebo bakterií v populaci bude mít mutaci v daném genu.

MUTACE: OBVYKLE NÁHODNÝ A NEADAPTIVNÍ PROCES

Krasy v mnoha městech nejsou citlivé již delší dobu k antikoagulantům, které se tradičně používají jako krysí jed. Mnoho populací mouchy masařky je necitlivých k chlordanu, jedu používanému k jejich likvidaci od roku 1950. Také populace mouchy domácí jsou silně rezistentní k mnoha insekticidům. Stále více a více patogenních mikroorganismů se stává rezistentní i k antibiotikům vyvinutým k jejich potlačení. Zavádění nových pesticidů a antibiotik vytváří pro tyto organismy nové životní podmínky. Jsou známy mutace, které jsou zodpovědné za vznik rezistence vůči těmto látkám; citlivé organismy

zahynou a životaschopní mutanti se množí a vytvářejí nové rezistentní populace. Mnoho takových případů evoluce, ke které došlo díky mutacím a přírodní selekci, je dobře doloženo. Z toho pak vyvstává základní otázka o původu mutací. Je mutace čistě náhodný jev, při kterém vlivy vnějšího prostředí jenom uchovávají preexistující mutace? Nebo mutace vznikají v důsledku působení vlivů vnějšího prostředí? Budeme-li například odřezávat myším ocasy po mnoho po sobě následujících generací, budou se nakonec rodit v takové populaci pouze bezocasé myši? Navzdory domněnkám Jeana Lamarcka a Trofima Lysenka, kteří prosazovali teorii „získaných znaků“ – tj. znaků vznikajících u organismů vlivem faktorů vnějšího prostředí –, zní odpověď ne; myši se pořád budou rodit s ocasy.

V dnešní době je těžké pochopit, jak mohl Lysenko prosazovat lamarckizmus – dědičnost získaných znaků – a přesvědčovat o jeho oprávněnosti představitele výkonné moci v Sovětském svazu od roku 1937 až do roku 1964. Nicméně prokázat neplatnost Lamarckovy teorie nebyl jednoduchý úkol, hlavně v případě mikroorganismů, kde i malé kultury obsahují často miliardy organismů. Jako



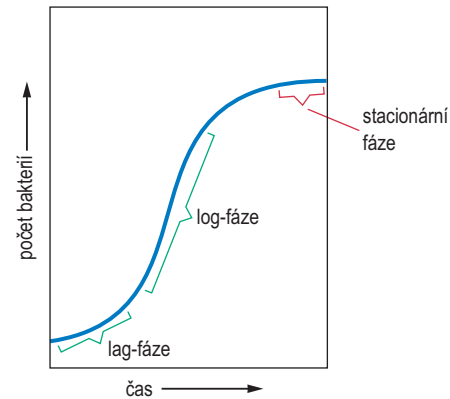
Obr. 13.2 ► Joshua a Ester Lederbergovi použili razítkovací metodu k důkazu náhodného či neřízeného vzniku mutací. Pro zjednodušení jsou zobrazeny pouze čtyři kolonie na každé misce a pouze dvě jsou použity k testování rezistence vůči streptomycinu během kroku č. 5. Ve skutečnosti by měla každá miska obsahovat asi 200 kolonií a k nalezení dostatečného počtu mutantních kolonií by bylo zapotřebí velkého počtu misek.

příklad si představme populaci bakterií *E. coli* rostoucí v prostředí bez streptomycinu. Pokud budou bakterie vystaveny účinku streptomycinu, většina z nich bude tímto antibiotikem usmrcena. Pokud však bude populace dostatečně velká, brzy vznikne kultura vůči streptomycinu rezistentní, tzn. všechny bakterie v ní budou proti tomuto antibiotiku odolné. Selektuje streptomycin pouze vzácné rezistentní mutanty, kteří se v původní populaci vyskytovali v malém procentu případů, nebo mají všechny buňky malou pravděpodobnost vytvořit si rezistenci jako odpověď na přítomnost streptomycinu? Jakým způsobem lze tyto možnosti od sebe rozlišit? Rezistenci ke streptomycinu můžeme detekovat pouze po působení antibiotika na kulturu bakterií. Jak se tedy dá rozlišit, zda rezistentní bakterie jsou přítomny v kultuře již před působením streptomycinu, nebo jsou indukovány jeho přítomností?

V roce 1952 Joshua a Esther Lederbergovi vyvinuli novou velmi důležitou techniku dnes známou jako **razítkovací metoda**. Pomocí této techniky prokázali, že v bakteriální kultuře jsou přítomni mutanti rezistentní vůči antibiotiku ještě před působením antibiotika (**obr. 13.2**). Lederbergovi nejdříve rozředili bakteriální kultury, rozetřeli bakterie na povrch živného polotuhého agarového média v Petriho miskách a inkubovali je tak dlouho, dokud jednotlivé bakterie nevytvorily na povrchu agaru viditelné kolonie. Následně každou misku obrátili a přitiskli ji na sterilní kousek látky připevněné na dřevěném špalíku. Z každé kolonie se otisklo na látku několik buněk. Poté na látku jemně přitiskli sterilní misku s živným agarovým médiem se streptomycinem. Tento razítkovací postup mnohokrát opakovali s miskami obsahujícími asi 200 bakteriálních kolonií. Po inkubaci přes noc se na selekčních miskách (se streptomycinem) vytvořily vzácné rezistentní kolonie bakterií.

Lederbergovi následně testovali schopnost kolonií vyrostlých na neselekčních miskách (bez streptomycinu) růst v médiu obsahujícím streptomycin. Jejich závěry byly jednoznačné. Kolonie, které na selekčních miskách vyrostly, téměř vždy obsahovaly buňky rezistentní vůči streptomycinu, zatímco kolonie, které na selekčních miskách nevyrostly, obsahovaly rezistentní buňky zřídka (**obr. 13.2**).

Pokud se mutace navozující u bakterie rezistenci vůči streptomycinu objeví náhodně v raném stadiu růstu kolonie, rezistentní buňka se bude dále dělit a vytvoří dvě, potom čtyři, potom osm buněk, čímž posléze vznikne velké množství rezistentních bakterií. Pokud tedy vznik mutace představuje náhodný, neadaptivní proces, pak mnoho kolonií, které vyrostly na neselekčních miskách, bude obsahovat více než jednu bakterii rezistentní vůči antibiotiku, a z těch pak mohou vzniknout rezistentní kultury, které vyrostou na selekčním médiu obsahujícím streptomycin. Je-li však vznik mutace adaptivní proces a mutace na streptomycinovou rezistenci vznikají až po vystavení bakterií antibiotiku, potom není příliš pravděpodobné, že by kolonie na neselekčním médiu, ze kterých vznikly rezistentní kolonie na selekčním médiu po procesu „razítkování“, obsahovaly buňky rezistentní vůči streptomycinu.



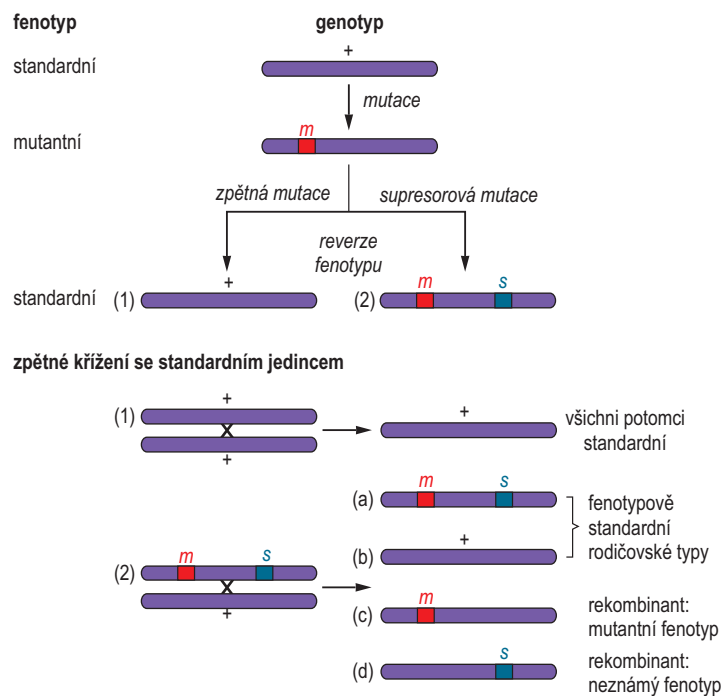
Obr. 13.3 ▶ Růstová křivka bakterií. Po přenosu nerostoucí kultury bakterií na nové živné médium lze pozorovat tři následující stadia růstu: lag-fázi, log-fázi a fázi stacionární. Během lag-fáze bakterie upravují svůj metabolismus pro podmínky výživy na novém médiu. Jakmile je metabolismus přizpůsoben, začínají se bakterie exponenciálně dělit a pokračují do log-fáze. Pokud jedna nebo více složek výživy bakterií začne být limitní, růst se zpomaluje, až se ve stacionární fázi zastaví.

Použitím razítkovací metody Lederbergovi prokázali existenci mutantů rezistentních ke streptomycinu v populaci bakterií ještě před tím, než došlo k působení antibiotika. Jejich výsledky společně s mnoha dalšími experimenty prokázaly, že podmínky vnějšího prostředí neřídí a nezpůsobují genetické změny, tak jak byl přesvědčen Lysenko; prostředí pouze vybírá vzácné preexistující mutace, které vytvářejí fenotypy lépe adaptované na nové vnější prostředí.

ADAPTIVNÍ MUTAGENEZE NEBOLI MUTAGENEZE STACIONÁRNÍ FÁZE U BAKTERIÍ

Adaptivní mutace poskytují selekční výhodu mutantním organismům, pokud rostou v prostředí, ve kterém vznikly. Tvorbu adaptivních mutací u bakterií možná lépe vystihuje název **mutageneze stacionární fáze**, protože vyjadřuje stav, kdy bakterie přestávají růst – vstupují do stacionární fáze – z důvodů nedostatku živin nebo environmentálního stresu, tj. nepříznivých životních podmínek (**obr. 13.3**). Bakterie se během stacionární fáze buď přestávají dělit, nebo umírají ve stejné míře, jako vznikají. Adaptivní mutace u buněk ve stacionární fázi vznikají spolu s ostatními náhodnými mutacemi (neadaptivní mutace); to znamená, že jsou výsledkem zvýšení rychlosti vzniku mutací indukované stresem. Tato zvýšená mutageneze je způsobena indukcí mechanismů chybující opravy DNA (tzv. error-prone DNA repair) (viz oddíl Mechanizmy opravy DNA dále v této kapitole).

Měli bychom zdůraznit, že pojem „adaptivní“ neznamená specifický typ mutace, která zlepšuje růst za daného environmentálního stresu a která by byla tímto stresem přednostně indukována, to by byla „řízená mutace“, pro kterou nemáme důkaz. „Adaptivní“ znamená spíše, že některé mutace, které poskytují selekční výhodu bakteriím díky účinné odpovědi na stres, vznikají společně s mnoha



Obr. 13.4 ► Obnovení původního standardního fenotypu organismu se může uskutečnit pomocí (1) zpětné nebo (2) supresorové mutace (pro jednoduchost znázorněno na stejném chromozomu). Některé mutace mohou revertovat na standardní fenotyp oběma mechanismy. Revertanti obou typů se dají rozlišit zpětným křížením s původním standardním jedincem. Pokud vznikla zpětná mutace, všechno potomstvo zpětného křížení bude mít standardní fenotyp. Při vzniku supresorové mutace budou mít někteří potomci zpětného křížení mutantní fenotyp.

dalšími neadaptivními mutacemi. Skutečně jsou popsány případy adaptivní mutagenese či mutagenese stacionární fáze u několika druhů bakterií. Nejlépe byl tento fenomén popsán u druhů *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*. Ani u těchto dvou druhů však není mutagenese stacionární fáze univerzální, protože se vyskytuje pouze u některých kmenů těchto druhů. V jedné studii bylo zkoumáno 787 kmenů *E. coli* izolovaných z velmi rozdílných přírodních podmínek po celém světě. Když byly jednotlivé kmeny testovány na mutagenesi stacionární fáze během sedmidenního hladovění, určitý stupeň mutagenese stacionární fáze se projevil u 80 % z nich. Nicméně četnosti indukovaných mutací se velice lišily kmen od kmene.

Pokud bakterie, jako například *E. coli*, z důvodů hladovění nebo jiných nepříznivých životních podmínek vstoupí do stacionární fáze, dochází k indukci mechanismu chybné opravy DNA označované jako SOS odpověď (viz Mechanismy opravy DNA). V rámci SOS odpovědi se aktivují geny kódující proteiny zapojené do procesů metabolismu DNA – replikace, rekombinace a opravy DNA. Některé z indukovaných proteinů se podílejí na opravě poškozené DNA pomocí rekombinace; jiné působí jako chybné (error-prone) DNA-polymerázy (IV a V u *E. coli*), které umožňují replikaci přes poškozené segmenty DNA, a tím i vznik mutací. Ačkoliv mechanismus SOS odpovědi zjevně odpovídá za některé mutace stacionární fáze, současné studie prokázaly přítomnost takovýchto mutací i u bakteriálních kmenů, kterým základní komponenty systému SOS odpovědi chybí. I jiné práce prokázaly existenci vícenásobných drah mutagenese stacionární fáze.

V současnosti již můžeme učinit závěr, že adaptivní mutagenese nebo mutagenese stacionární fáze je u bakterií

široce rozšířená a přispívá k jejich schopnosti adaptace na různé životní podmínky. Nicméně molekulární mechanismus, jakým mutagenese stacionární fáze vzniká, vyžaduje další výzkumy, stejně jako otázka výskytu tohoto fenoménu u dalších druhů. Přestože již existují důkazy o výskytu mutagenese stacionární fáze u kvasinek a o přítomnosti chybných, tj. error-prone DNA-polymeráz u eukaryot, možnost výskytu podobných procesů u vyšších eukaryot zůstává zatím neprozkoumána.

MUTACE: REVERZIBILNÍ PROCES

Jak jsme si již dříve ukázali, mutace standardního genu může způsobit vznik mutantní alely, která vede k abnormálnímu fenotypu. Mutantní alela však může mutovat zpět na formu, která obnovuje standardní fenotyp. To znamená, že mutace je reverzibilní proces.

Mutace standardního genu do formy, která je příčinou mutantního fenotypu, se nazývá *přímá mutace*. Rozlišení mutantního a standardního fenotypu je někdy dosti subjektivní, jelikož oba mohou představovat dva sice odlišné, avšak normální fenotypy. Jako příklad může sloužit barva očí u člověka: Genetici považují alely pro hnědou i modrou barvu za standardní, pokud se však populace bude skládat téměř výhradně z hnědookých jedinců, pak je možné alelu pro modré zbarvení očí považovat za mutantní. Pokud druhá mutace obnovuje původní fenotyp, který byl předchozí mutací změněn, pak se takový proces označuje jako **reverze** neboli **reverzní mutace**. Reverze může probíhat dvěma způsoby: (1) pomocí **zpětné mutace** – tj. druhé mutace vzniklé ve stejném místě genu jako původní mutace –, která obnovuje původní sekvenci nukleotidů, nebo

(2) vznikem **supresorové mutace**, tj. druhé mutace, která se nachází v jiné oblasti genomu, ale svým působením vyrovnává efekt první mutace (**obr. 13.4**). Zpětná mutace obnovuje původní nukleotidovou sekvenci standardního genu, zatímco supresorová mutace ne. Supresorová mutace se může nacházet v různých oblastech stejného genu jako mutace původní, ale i v jiných genech nebo na jiných chromozomech. Některé mutace primárně revertují pomocí zpětných mutací, zatímco jiné revertují téměř výhradně prostřednictvím mutací supresorových. V genetických studiích se často rozlišují tyto dvě možnosti na základě zpětného křížení mezi fenotypovým revertantem a původním standardním organizmem. Pokud byl standardní fenotyp obnoven pomocí supresorové mutace, původní mutace bude v potomstvu neustále přítomna a lze ji odlišit od supresorové mutace pomocí rekombinace (**obr. 13.4**). Jestliže byl standardní fenotyp obnoven zpětnou mutací, všichni potomci po zpětném křížení budou mít standardní fenotyp.

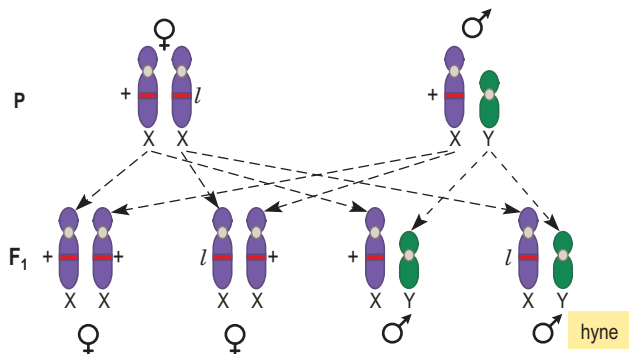
NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATKY

- ▶ Mutace se vyskytují jak v zárodečných, tak i somatických buňkách, avšak do potomstva se přenášejí pouze mutace v buňkách zárodečných.
- ▶ Mutace mohou vznikat spontánně, nebo mohou být indukovány mutagenními látkami v prostředí.
- ▶ Mutace je obvykle neadaptivní proces, při kterém jsou podmínkami prostředí vybráni jedinci s preexistujícími, náhodně vzniklými mutacemi.
- ▶ Adaptivní mutageneze neboli mutageneze stacionární fáze se vyskytuje u bakterií, které byly vystaveny stresovým podmínkám, jako je například nedostatek živin.
- ▶ Obnovení standardního fenotypu u mutantního organismu je důsledkem zpětné nebo supresorové mutace.

Fenotypové účinky mutací

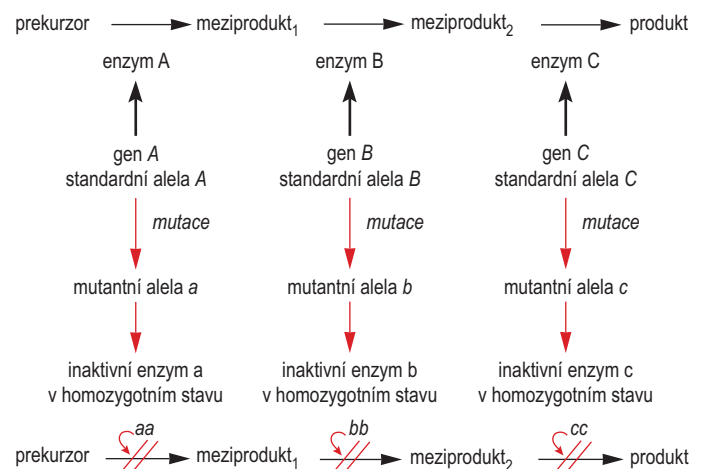
Účinky mutací na fenotyp sahají od nepozorovatelných změn až po letalitu.

Účinky mutací na fenotyp sahají od nepatrných změn detekovatelných pouze speciálními genetickými nebo biochemickými metodami přes výrazné změny v morfologii až po letalitu. Gen je tvořen sekvencí nukleotidových párů, která obvykle kóduje specifický polypeptid. Jakákoliv mutace vzniklá uvnitř daného genu vytvoří novou alelu tohoto genu. Geny obsahující mutace bez fenotypového projevu nebo s minimálními účinky, které mohou být detekovány pouze pomocí speciálních technik, se nazývají **izoalely**. Jiné mutace vytvářejí **nulové alely**, což znamená, že produkty mutovaných genů nejsou funkční, popřípadě se vůbec netvoří. Pokud se mutace tohoto typu vyskytnou v genech potřebných pro růst a vývoj organismu, pak jedinci homozygotní pro tuto mutaci nepřežijí. Takové mutace se pak označují jako **recesivně letální**.

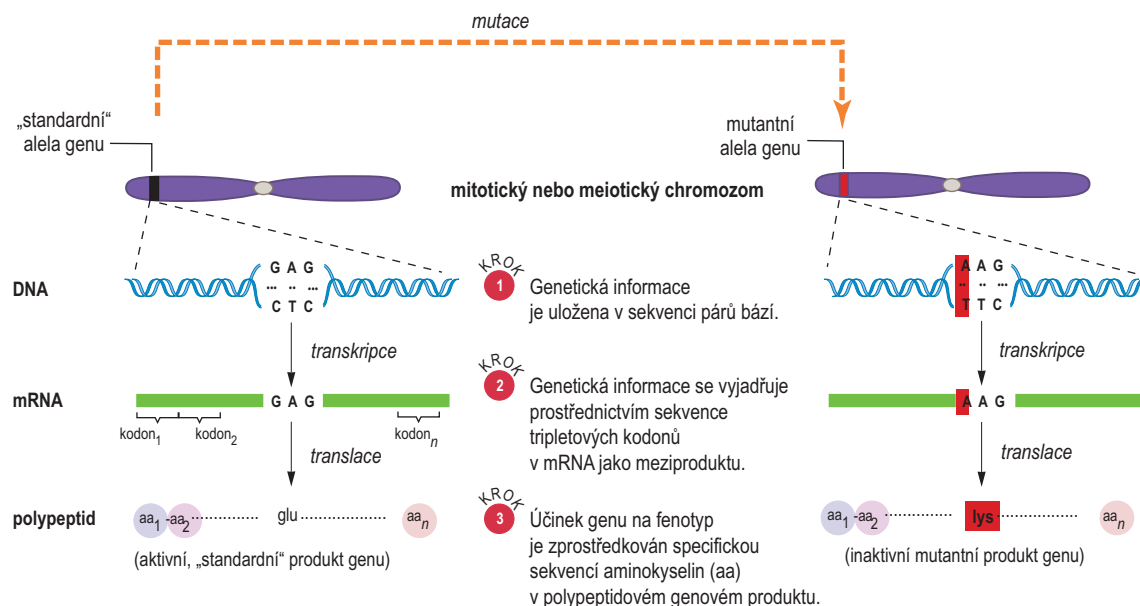


Obr. 13.5 ▶ Změna v poměru pohlaví způsobená X-vázanou recesivní letální mutací. Samičky heterozygotní pro X-vázanou recesivní letální mutaci budou tvořit samičí a samčí potomstvo v poměru 2 : 1.

Mutace mohou být recesivní nebo dominantní. U monoploidních organismů, jako například u některých virů či bakterií, mohou být jak recesivní, tak i dominantní mutace rozpoznány podle vlivu na fenotyp organismu, u kterého se vyskytují. U diploidních organismů, jako například u drozofily a u člověka, povedou recesivní mutace ke změně feno-



Obr. 13.6 ▶ Recesivní mutantní alely často způsobují zablokování metabolických drah. Dráhy se mohou skládat pouze z několika kroků, tak jako je vyobrazeno zde, mohou však být i velmi komplikované. Standardní alela každého genu obvykle kóduje funkční enzym katalyzující příslušnou reakci. Většina mutací standardních genů vede k tvorbě pozmeněných forem enzymů se sníženou nebo vůbec žádnou aktivitou. V homozygotním stavu pak tyto mutantní alely způsobují v důsledku nedostatku enzymatické aktivity zablokování (#) příslušné metabolické dráhy.



Obr. 13.7 ► Přehled mutačního procesu a exprese standardní a mutantní alely. Mutace mění sekvence nukleotidových párů v genech, které pak mění sekvence aminokyselin v polypeptidových řetězcích kódovaných těmito geny. Pár bází G:C (vlevo nahoře) byl mutací změněn na pár A:T (vpravo nahoře). Tato mutace změní jeden kodon v mRNA z CAG na AAG a jednu aminokyselinu v polypeptidovém produktu z kyseliny glutamové (glu) na lyzin (lys). Taková záměna často vede k nefunkčním genovým produktům.

typu pouze tehdy, pokud budou přítomny v homozygotním stavu. U diploidních organismů proto většinu recesivních mutací nemůžeme v okamžiku jejich vzniku rozpoznat, protože budou přítomny v heterozygotním stavu. Výjimku tvoří X-vázané recesivní mutace; ty se projevují v hemizygotním stavu u organismů s heterogametickým pohlavím (například u mužů či u samečků drosofil nebo u samic ptáků). X-vázané recesivní letální mutace mění poměr pohlaví potomků, protože hemizygotní jedinci s takovou letální mutací nepřežívají (**obr. 13.5**).

MUTACE S FENOTYPOVÝMI ÚČINKY: OBVYKLE ŠKODLIVÉ A RECESIVNÍ

Většina z tisíců mutací, které genetici odhalili a prostudovali, jsou škodlivé mutace recesivního typu. Tento závěr se dá očekávat, pokud vezmeme v úvahu známá fakta o genetickém řízení metabolismu a technikách schopných mutace identifikovat. Jak jsme se dozvěděli v kapitole 11, podstatou metabolismu je kaskáda chemických reakcí, při níž je každý krok katalyzován specifickým enzymem kódovaným jedním nebo více geny. Mutace v těchto genech často vedou k blokádam různých metabolických drah (**obr. 13.6**). Tyto blokády vznikají díky tomu, že změny v párování bází v sekvencích genů často způsobují změny v sekvencích aminokyselin v polypeptidových řetězcích (**obr. 13.7**), které mohou vyústit ve vznik nefunkčních produktů (**obr. 13.6**). A právě to jsou nejčastěji pozorované účinky snadno

detekovatelných mutací. Jestliže máme standardní alelu, která kóduje aktivní enzym, a mutantní alelu kódující méně aktivní nebo nefunkční enzym, je zjevné, proč většina pozorovaných mutací bývá recesivních. Pokud buňka obsahuje aktivní i neaktivní formu daného enzymu, bude aktivní forma obvykle katalyzovat reakci dostatečně. Proto bude alela zodpovědná za aktivní produkt dominantní a mutantní alela kódující neaktivní produkt bude recesivní (kapitola 4).

Díky tomu, že genetický kód je degenerovaný (kapitola 12), mnoho mutací na fenotyp organismu nemá vliv. Takové mutace se označují jako **mutace neutrální**. Proč tedy většina mutací s fenotypově rozpoznatelnými účinky vede ke snížení, nebo až zástavě aktivity genových produktů? Uvědomme si, že standardní alela genu kódujícího standardní enzym nebo strukturní protein byla pro optimální aktivitu vyselektována v průběhu evoluce. Proto se v důsledku mutací, způsobených náhodnými změnami ve vysoce adaptované sekvenci aminokyselin, budou tvořit obvykle méně aktivní nebo zcela neaktivní produkty. Analogii si můžeme představit v nějakém složitém, pečlivě navrženém zařízení, jako je například počítač nebo auto. Pokud náhodně modifikujeme základní komponenty, pravděpodobně nebude stroj pracovat stejně efektivně jako před změnou. Tento pohled na mutace a na interakce mezi standardními a mutantními alelami dobře odpovídá pozorování, že většina mutací s rozeznatelným fenotypovými účinky jsou mutace recesivní a škodlivé.

ÚČINKY MUTACÍ V GENECH KÓDUJÍCÍCH GLOBINU U ČLOVĚKA

Mutace v genech zodpovědných za tvorbu hemoglobinu u člověka jsou názorným příkladem škodlivých účinků mutací. V kapitolách 1 a 12 jsme se seznámili se strukturou hemoglobinu a negativními dopady jedné z hemoglobinových variant, srpkovité anémie. Připomeneme si, že hlavní forma molekuly hemoglobinu u dospělých (hemoglobin A) se skládá ze dvou identických **alfa** (α) a dvou identických **beta** (β) řetězců. Každý α -polypeptid je tvořen specifickou sekvencí 141 aminokyselin, zatímco strukturu β -řetězců tvoří 146 aminokyselin. Podobnost mezi sekvencemi aminokyselin těchto řetězců (a tím i mezi strukturálními geny, které tyto řetězce kódují) je považována za důkaz vývoje obou řetězců ze společného předka.

V lidských populacích bylo popsáno mnoho variant hemoglobinu dospělých, některé s různými fenotypovými projevy. Mnoho těchto variant bylo původně nalezeno díky změně jejich elektroforetického chování (pohyb v elektrickém poli v důsledku změny náboje – viz kapitola 9). Varianty hemoglobinu jsou výborným příkladem působení mutací na strukturu a funkci genů a jejich produktů a navíc ukázkou projevu takových mutací ve fenotypu postižených jedinců.

Když byly popsány a porovnány sekvence aminokyselin β -řetězců hemoglobinu A a hemoglobinu pacientů se srpkovitou anémií (hemoglobin S), ukázalo se, že hemoglobin S se liší od hemoglobinu A pouze jedinou aminokyselinou. Šestá aminokyselina od N-konce β -řetězce hemoglobinu A je negativně nabitá kyselina glutamová, zatímco u hemoglobinu S je na tomto místě valin (v neutrálním pH bez náboje). α -řetězce jsou u hemoglobinu A i hemoglobinu S identické. Záměna jedné aminokyseliny za jinou v jednom polypeptidovém řetězci tak může mít závažné účinky na fenotyp.

V případě hemoglobinu S substituce valinu za kyselinu glutamovou na šesté pozici β -řetězce umožňuje tvorbu nové vazby, která mění konformaci proteinu a vede k agregaci hemoglobinových molekul. Tato změna způsobuje velmi abnormální (srpkovitý) tvar červených krvinek. Mutační změna alely HBB^A , která vedla ke vzniku alely HBB^S , byla substituce nukleotidového páru T:A za A:T, s tyminem v přepisovaném řetězci v prvním případě a adeninem ve druhém případě (viz obr. 1.9). Tato substituce páru bází ve směru A:T \rightarrow T:A byla nejdříve předpovězena na základě údajů o sekvenci aminokyselin a informací o kodonech těchto aminokyselin, později byla ověřena i pomocí sekvencování alel HBB^A a HBB^S .

V současné době je známo více než 100 hemoglobinových variant s různými změnami v sekvenci aminokyselin v β -řetězci (viz Genomika na webu na konci této kapitoly). Většina z nich se liší od normálního β -řetězce hemoglobinu A záměnou jedné aminokyseliny, u některých jsou substituovány aminokyseliny dvě. Bylo nalezeno také mnoho variant α -řetězců.

Příklady hemoglobinu dokazují, že mutace je proces, při kterém změny ve struktuře genu, často pouze v jednom nebo několika párech bází, mohou způsobovat změny v sekvenci aminokyselin polypeptidového genového produktu. Tyto modifikace ve struktuře proteinu následně způsobují změny ve fenotypu, které rozeznáváme jako mutace.

MUTACE U ČLOVĚKA: BLOKÁDY METABOLICKÝCH DRAH

V kapitole 4 jsme řešili genetické řízení metabolických drah, ve kterých je každý krok katalyzován enzymem kódovaným jedním nebo více geny. Pokud v těchto genech vzniknou mutace, často způsobují zablokování metabolických drah (viz obr. 13.6), což vede k abnormálním fenotypům. Model takto řízeného metabolismu je stejný pro všechny živé organizmy včetně člověka (viz Zaostřeno na: Tay-Sachsova choroba, dětská tragédie).

Účinky mutací na lidský metabolismus si můžeme demonstrovat na jakékoli virtuální metabolické dráze. Obzvláště dobrým příkladem je metabolismus aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrozinu, neboť některé dřívější studie odhalily mutace způsobující zablokování těchto metabolických drah (viz Milníky genetiky: Garrodovy výzkumy vrozených poruch metabolismu, kapitola 4). Fenylalanin a tyrozin jsou esenciální aminokyseliny potřebné pro syntézu proteinů. U člověka se tyto aminokyseliny nesyntetizují *de novo*, tak jako například u mikroorganismů, a proto se musí obě tyto aminokyseliny získávat z bílkovin obsažených v potravě.

Nejlépe prozkoumanou dědičnou poruchou fenylalanin-tyrozinového metabolismu je fenylketonurie, autozomově recesivní onemocnění, jehož příčinou je nepřítomnost enzymu fenylalaninhydroxylázy, který přeměňuje fenylalanin na tyrozin. U novorozenců postižených fenylketonurií musí být dodržována přísná dieta s minimálním obsahem fenylalaninu, jinak se u nich může vyvinout závažná mentální retardace (viz Milníky genetiky, kapitola 4). První dědičná porucha fenylalanin-tyrozinové metabolické dráhy studovaná u lidí byla alkaptonurie, která je způsobena autozomově recesivní mutací inaktivující enzym homogentizát oxidázu. Alkaptonurie hraje důležitou roli v evoluci pojetí genu (viz Milníky genetiky, kapitola 4).

Mutace v genech kódujících enzymy pro katabolismus tyrozinu jsou příčinou dvou dalších autozomově recesivních chorob. Tyrozinóza je způsobena nedostatkem enzymu tyrozintransaminázy, u tyrozinémie chybí enzym 4-hydroxyfenylpyruvát oxidáza. Oba enzymy rozkládají tyrozin na CO_2 a H_2O . Tyrozinóza je velmi vzácná, zatím bylo prostudováno pouze několik případů. Jedinci postižení touto chorobou mají zvýšenou hladinu tyrozinu v krvi a moči a projevuje se u nich i široké spektrum vrozených abnormalit. Charakteristickými znaky tyrozinémie jsou zvýšené hladiny jak tyrozinu, tak i 4-hydroxyfenylpyruvát oxidázy v krvi a moči. Většina novorozenců s tyrozinémií umírá v průběhu šesti měsíců od porodu na selhání jater.



▶ ZAOSTŘENO NA: Tay-Sachsova choroba, dětská tragédie

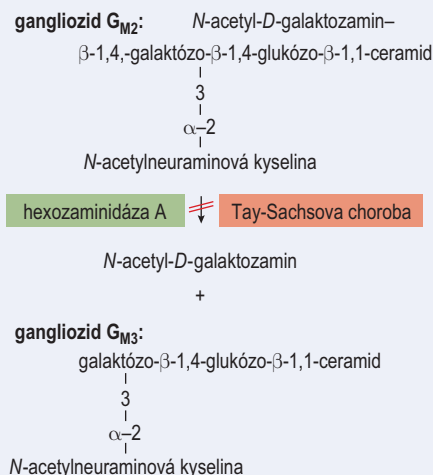
Tay-Sachsova choroba je mezi všemi lidskými dědičnými chorobami považována za jednu z nejtragičtějších. Novorozenci homozygotní v mutantním genu zodpovědném za toto onemocnění jsou při porodu normální. Avšak během několika měsíců začnou hypersenzitivně reagovat na hlasité zvuky a na sítnici oka se vytvoří červená skvrna. Tyto rané symptomy onemocnění často uniknou rodičům i lékařům. Ve věku šesti měsíců až jednoho roku dochází u dětí postižených Tay-Sachsovou chorobou k postupné neurologické degeneraci, která se rychle rozvine v mentální retardaci. Dalšími průvodními jevy pak bývá slepota, hluchota a celková ztráta kontroly tělesných funkcí. Během dvou let jsou děti zcela neschopny pohybu a rozvíjejí se u nich chronické infekce dýchacích cest. Obvykle umírají během třetího až čtvrtého roku života.

Přestože je znám molekulární defekt zodpovědný za Tay-Sachsovu chorobu, v současnosti žádná efektivní léčba tohoto onemocnění neexistuje. Jediným pozitivem Tay-Sachsovy choroby je její vzácný výskyt ve většině populací. Výjimku však tvoří středoevropská větev Židů, tzv. Aškenázové a jejich potomci. Tay-Sachsova choroba v této populaci postihuje v průměru 1 z 3600 narozených dětí a každý 30. dospělý v této populaci je heterozygotním přenašečem mutantní alely. Pokud dva jedinci z této populace uzavřou sňatek, je pravděpodobnost, že oba dva ponесou mutantní alelu, asi 1 : 1000 ($0,033 \times 0,033$), a pokud jsou oba dva přenašeči této mutace, pak v průměru jedna čtvrtina jejich potomků budou homozygoti v mutovaném genu a rozvine se u nich Tay-Sachsova choroba.

Za mutace způsobující Tay-Sachsovu chorobu je zodpovědný gen *HEXA*, který kóduje enzym hexozaminidázu-A. Tento enzym štěpí komplex lipidů zvaný gangliozid G_{M2} na menší gangliozid (G_{M3}) a *N*-acetyl-*D*-galaktozamin, jak je znázorněno na **obr. 1**.

Funkcí komplexu gangliozid G_{M2} je chránit nervové buňky, izolovat je od vzruchů v okolních buňkách, a tím urychlovat přenos nervových impulzů. Absence enzymu štěpícího gangliozid G_{M2} způsobuje akumulaci tohoto komplexu na povrchu nervových buněk, takže tyto buňky jsou pak doslova udušeny. Nahromadění komplexu lipidů na neuronech blokuje jejich funkce, což vede k poškození nervového systému a následně paralýze.

Přestože Tay-Sachsova choroba byla popsána Warrenem Tayem už v roce 1881 a její biochemická podstata je známa více než 20 let, efektivní léčba tohoto tragického onemocnění stále neexistuje. Zatímco některé dědičné poruchy se dají léčit pomocí enzymové



Obr. 1 ▶ Metabolický defekt způsobující u lidí Tay-Sachsovu chorobu.

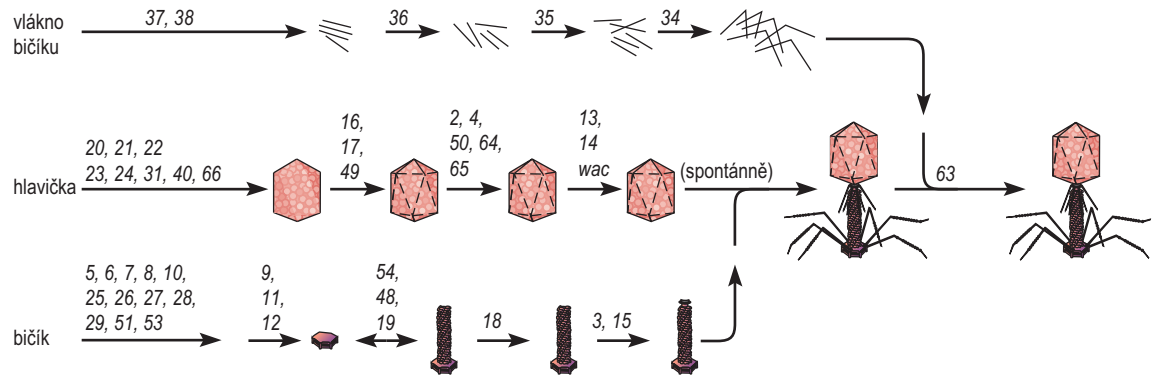
terapie (= dodáváním chybějícího enzymu pacientům), tento postup není pro Tay-Sachsovu chorobu účinný, protože enzym nepronikne bariérou oddělující mozkové buňky od oběhového systému. V současnosti není možné použít ani techniku genové terapie somatických buněk, která poskytuje pacientům funkční kopie poškozených genů (kapitola 16), protože zatím neexistuje vhodná metoda pro vnášení genů do neuronů. Dodnes nebylo přesně popsáno, které nervové buňky jsou zodpovědné za neurologickou degeneraci vyskytující se u dětí s touto chorobou.

Prenatálně můžeme Tay-Sachsovu chorobu odhalovat pomocí amniocentézy (kapitola 6) a tato technika se také široce využívá. Nedávno byl vyvinut citlivý test DNA, který vědcům umožňuje detekovat mutantní gen způsobující Tay-Sachsovu chorobu na základě DNA izolované z jediné buňky (kapitola 17). Tento test se provádí při oplození *in vitro* a je založen na screeningu embrya tvořeného osmi buňkami. Pro test DNA se použije pouze jedna buňka, zbylých sedm se normálně vyvíjí v embryo, které je pak implantováno do dělohy matky. Implantována jsou pouze taková embrya, která jsou v testu normální, tj. nejsou homozygotní pro smrtelný gen Tay-Sachsovy choroby. Tato metoda (nazývaná preimplantační genetická diagnostika – pozn. překl.) umožňuje rodičům, kteří jsou oba přenašeči mutantní alely, mít děti, aniž by se museli obávat, že se narodí s Tay-Sachsovou chorobou.

Albinismus, porucha způsobena absencí pigmentace kůže, vlasů a očí, je důsledkem mutací blokujících přeměnu tyrozinu na tmavý pigment melanin (viz Milníky genetiky, kapitola 4). Jedna z variant albinismu je způsobena absencí enzymu tyrozinázy, který katalyzuje první krok syntézy melaninu z tyrozinu. Ostatní typy albinismu jsou způsobeny zablokováním některého z dalších kroků přeměny tyrozinu na melanin. Albinismus se dědí jako autozomově recesivní

znak; heterozygoti mají obvykle normální úroveň pigmentace. Proto dva jedinci postižení albinismem, kteří mají mutace v různých genech, budou mít děti s normální pigmentací.

Studium jedné metabolické dráhy, fenylnalanin-tyrozinového metabolismu, tak odhalilo pět různých dědičných chorob, které jsou způsobeny mutacemi v genech řídících jednotlivé kroky této dráhy. Podobné příklady genetické



Obr. 13.8 ▶ Zjednodušené schéma morfogeneze bakteriofága T4. Hlavička, bičičk a vlákna bičičku jsou utvářeny oddělenými drahami a poté jsou ve finálních stádiích morfogeneze spojeny. Sekvence počátečních fází tvorby hlavičky a bičičku jsou již známy, avšak zde jsou kvůli stručnosti a přehlednosti vynechány.

kontroly metabolismu můžeme získat zkoumáním jakékoliv jiné metabolické dráhy u člověka.

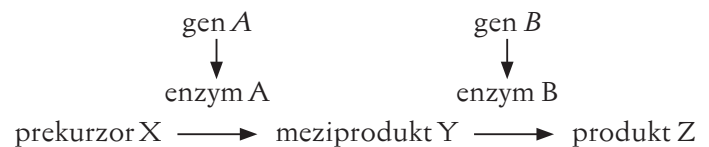
PODMÍNĚNĚ LETÁLNÍ MUTACE JAKO EFEKTIVNÍ NÁSTROJ GENETICKÝCH STUDIÍ

Ze všech mutací – od izoalel až k letálním mutacím – jsou z hlediska genetických studií nejužitečnější **podmíněně letátní mutace**. Tyto mutace jsou (1) letátní v jednom, tzv. *restriktivním prostředí*, ale jsou (2) slučitelné se životem v jiném, tzv. *permissivním prostředí*. Podmíněně letátní mutace umožňují genetikům identifikovat a studovat mutace esenciálních (životně důležitých) genů, které vedou k úplné ztrátě aktivity genového produktu i u haploidních organismů. Mutanti nesoucí podmíněně letátní mutace se mohou množit v permissivních podmínkách a informace o funkčních produktech genu lze odvodit z následků neschopnosti jejich růstu v restriktivním prostředí. Podmíněně letátní mutace byly a jsou využívány k analýzám širokého spektra biologických procesů od embryonálního vývoje až po fotosyntézu.

Podmíněně letátní mutanty můžeme rozdělit podle fenotypových projevů do tří hlavních skupin na (1) auxotrofní mutanty, (2) teplotně senzitivní mutanty a (3) supresor-senzitivní mutanty. **Auxotrofní** mutanti jsou takoví, kteří nemohou syntetizovat některé základní metabolity (aminokyseliny, puriny, pyrimidiny, vitamíny atd.), na rozdíl od standardních neboli *prototrofních* organismů stejného druhu. Auxotrofní mutanti rostou a rozmnožují se jen tehdy, pokud je v růstovém médiu obsažen určitý metabolit (permissivní prostředí); když metabolit v médiu chybí, tyto organismy nebudou růst (restriktivní prostředí). **Teplotně senzitivní mutanti** se budou množit a růst pouze za určitých teplotních podmínek, a ne za jiných. Většina teplotně senzitivních mutantů je citlivá na teplo, nicméně je známo i několik mutantů citlivých na chlad. Citlivost na teplotu obvykle vzniká v důsledku zvýšené teplotní nebo chladové nestability produktu mutantního genu – například enzymu –

který je aktivní při nízké teplotě, ale částečně nebo úplně neaktivní při teplotách vyšších. Občas je citlivá k teplotě pouze syntéza produktu, jakmile je produkt mutantního genu nasyntetizován, může být stejně stabilní jako produkt genu standardního. **Supresor-senzitivní mutanti** jsou životaschopní, pokud je přítomen další genetický faktor – supresor, ale nepřežívají, pokud supresor chybí. Supresorový gen může kompenzovat nebo napravit poruchu ve fenotypu způsobenou supresor-senzitivní mutací, nebo může způsobit, že genový produkt změněný mutací nebude nezbytný. S jednou skupinou supresor-senzitivních mutací, mutacemi *amber*, jsme se již setkali v kapitole 12.

Pojďme se nyní blíže seznámit s tím, jak lze podmíněně letátní mutace využít pro zkoumání biologických procesů – lépe řečeno pro analýzu jejich jednotlivých částí či kroků. Představme si jednoduchou biosyntetickou dráhu:



Meziprodukt Y vzniká z prekurzoru X reakcí katalyzovanou enzymem A kódovaným genem A. Meziprodukt Y však může být rychle přeměněn enzymem B, produktem genu B, na výsledný produkt Z. Pokud se tak stane, meziprodukt Y je přítomen jen v malém množství a v krátkém časovém úseku, a je proto těžké ho izolovat a charakterizovat. Avšak jestliže u mutantního organismu vznikla mutace v genu B, a enzym B je díky takové mutaci neaktivní nebo se vůbec nevytváří, může se meziprodukt Y hromadit v mnohem vyšších koncentracích, což usnadňuje jeho izolaci a další charakterizaci. Podobným způsobem nám může pomoci mutace genu A při identifikaci prekurzoru X. Tímto způsobem se často analyzují kaskády jednotlivých kroků dané metabolické dráhy.

Morfogeneze u živých organismů probíhá po částech postupným přidáváním proteinů k makromolekulárním

strukturám, které tvoří finální trojrozměrné konformace. Posloupnost přidávání proteinů se dá často určit díky mutantním organizmům, které mají poruchy v genech kódujících proteiny zapojené do procesů morfogeneze. Protože vhodná mutace může eliminovat aktivitu jednoho polypeptidu, poskytují mutace účinný nástroj, kterým lze provést analýzu komplexních biologických procesů – tj. rozdělit procesy na jejich jednotlivé části, a usnadnit tak jejich další výzkum.

Vědecký potenciál mutační analýzy biologických procesů lze elegantně dokumentovat na výzkumu Roberta Edgara, Jonathana Kinga, Williama Wooda a kolegů, kteří vyřešili kompletní morfogenetickou dráhu bakteriofága T4. Tohoto složitého procesu se účastní produkty asi 50 genů z celkového počtu zhruba 200 genů tvořících genom fága T4. Každý z genů kóduje strukturální protein viru nebo enzym katalyzující jeden nebo více kroků v morfogenetické dráze. Kompletní morfogenetickou dráhu fága T4 popsali Edgar, King, Wood a spolupracovníci tak, že (1) izolovali mutantní kmeny fága T4 s teplotně senzitivními a supresor-senzitivními podmíněně letálními mutacemi v každém z přibližně 50 genů a (2) užili elektronovou mikroskopii a biochemické techniky pro analýzu struktur, které se hromadily při pěstování mutantních kmenů v restriktivním prostředí (**obr. 13.8**).

Pomocí mutačních studií bylo úspěšně analyzováno mnoho dalších biologických procesů. U rostlin byla například tímto způsobem vysvětlena kaskáda přenosu elektronů během fotosyntézy a u bakterií dráha fixace dusíku. V současné době vnáší mutační analýzy nové pohledy do procesů diferenciaci a vývoje u vyšších rostlin a u živočichů (kapitola 21). Vědci také používají mutace k analýze chování a učení u drozofily. V podstatě lze mutační analýzu použít k prozkoumání jakéhokoliv biologického procesu. Jelikož u každého genu může být mutací navozen nefunkční stav, je použití mutační analýzy biologických procesů limitováno pouze schopností vědců najít vhodné typy mutací pro konkrétní účely.

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATKY

- Účinky mutací na fenotyp živých organismů sahají od minimálních změn až po letalitu.
- Většina mutací působí na fenotyp prostřednictvím změny sekvence aminokyselin v polypeptidech, primárních produktech genů.
- Mutantní polypeptidy způsobují zablokování metabolických drah.
- Podmíněně letální mutace jsou účinným nástrojem pro analýzu biologických procesů.

► Molekulární podstata mutací

Mutace mění nukleotidovou sekvenci genů různými způsoby, například záměnou jednoho páru bází za jiný nebo delecí či insercí jednoho či několika párů bází.

Když Watson a Crick popsali dvoušroubovicovou strukturu DNA a navrhli semikonzervativní způsob její replikace, který je založen na specifickém párování bází zajišťujícím přesný přenos genetické informace z generace na generaci, navrhli také mechanismus, který vysvětluje vznik spontánních mutací. Watson a Crick poukázali na to, že struktury bází v DNA nejsou statické. Vodíkové atomy mohou přecházet z jedné pozice purinu nebo pyrimidinu na jinou pozici – například z aminoskupiny na dusíkatý kruh. Takovéto chemické změny se označují jako **tautomerní přesmyky**. Ačkoliv jsou tautomerní přesmyky vzácné, mohou mít důležitý význam v metabolismu DNA, protože některé z nich mění způsob párování bází. Struktury nukleotidů, které byly uvedeny v kapitole 9, představují běžné, stabilní formy, při nichž se adenin vždy páruje s tyminem a guanin vždy s cytozinem. Tyto stabilní ketoformy tyminu a guaninu a aminoformy adeninu a cytozinu mohou občas prodělat tautomerní přesmyky, které vedou k méně stabilním enol- a iminofórmám a naopak (**obr. 13.9**). Předpokládá se, že báze existují v jejich méně stabilních tautomerních formách pouze krátkou dobu. Nicméně pokud bude báze existovat v této formě v okamžiku replikace nebo při začleňování do nově vznikajícího řetězce DNA, může

vzniknout mutace. Pokud se báze vyskytují v jejich nestabilních imino- nebo enolformách, vytváří páry bází adenin-cytozin a guanin-tymín (**obr. 13.10a**). Toto párování povede po dalším cyklu replikace, při němž dojde k oddělení chybně spárovaných bází, k záměně párů bází A:T za G:C nebo G:C za A:T (**obr. 13.10b**).

Mutace vznikající v důsledku tautomerních přesmyků bází v DNA způsobují záměnu purinového nukleotidu v jednom řetězci za jiný purinový a záměnu pyrimidinového nukleotidu v protilehlém řetězci za jiný pyrimidinový. Taková záměna páru bází se označuje jako **tranzice**. Záměna purinového nukleotidu za pyrimidinový a naopak pyrimidinového za purinový se označuje jako **transverze**. Pro každý pár bází existují tři možné typy substitucí – jedna tranzice a dvě transverze. Celkově jsou tedy možné čtyři různé tranzice a osm různých transverzí (**obr. 13.11a**). Dalším typem bodových mutací jsou inserce nebo delece jednoho nebo více párů bází. Mutace způsobené insercemi nebo delecemi se souhrnně označují jako **posunové mutace**, protože mění čtecí rámec všech tripletů v genu (triplety DNA určují kodony v mRNA a aminokyseliny v polypeptidovém produktu genů) od místa, ve kterém mutace vznikla (**obr. 13.11b**).

Všechny tři typy bodových mutací – tranzice, transverze a posunové mutace – nacházíme u mutací, které vznikají spontánně. Je překvapivé, že velký podíl spontánních mutací, které byly prostudovány, tvoří spíše inserce a delece jednoho páru bází než záměny párů bází. Tyto posunové mutace vedou totiž téměř vždy k syntéze nefunkčních genových produktů.

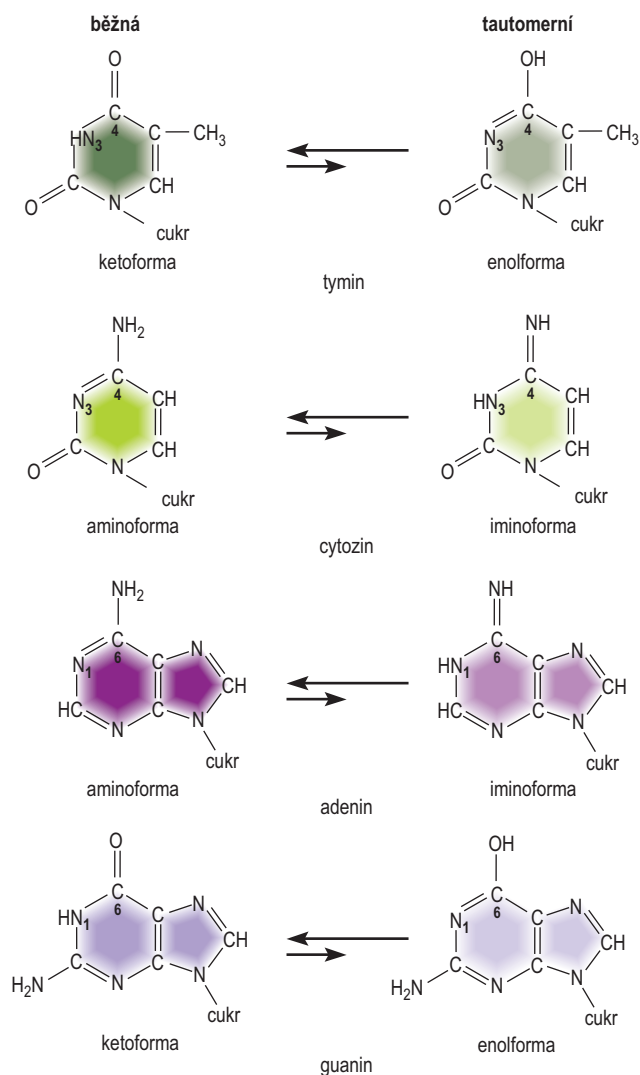
Ačkoliv zbývá ještě spousta věcí, které je třeba objasnit z hlediska příčin, molekulárních mechanismů a četnosti spontánních mutací, tři hlavní faktory ovlivňující vznik těchto mutací jsou známy: (1) přesnost mechanismu replikace DNA, (2) účinnost mechanismů podílejících se na opravě poškozené DNA a (3) míra expozice mutagením látkám přítomným v prostředí. Bylo prokázáno, že poruchy v replikačním aparátu nebo v opravných mechanismech, které jsou pod genetickou kontrolou, vedou vždy k velkému zvýšení rychlosti vzniku mutací.

INDUKOVANÉ MUTACE

Mnoho přirozeně se vyskytujících mutací odhalili a studovali genetici již dávno. Avšak teprve v roce 1927, když Hermann J. Muller objevil schopnost paprsků X indukovat mutace u drozofily, se genetika dramaticky změnila. Možnost vyvolávat mutace otevřela dveře zcela novému přístupu v genetické analýze. Genetici nyní mohli indukovat mutace v genech, které je zajímají, a pak studovat účinky chybějících genových produktů. Mullerův promyšlený důkaz indukce mutací na chromozomu X u drozofily pomocí paprsků X popisujeme v části Milníky genetiky: Mullerův důkaz, že paprsky X jsou mutagenní. Za svůj objev získal Muller v roce 1946 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Následný výzkum prokázal, že paprsky X jsou mutagenní také u jiných organismů a že mutagenní účinky mají i další činitele – fyzikální faktory, chemické sloučeniny a transponovatelné genetické elementy.

Paprsky X vyvolávají v živých tkáních celou řadu změn. Z těchto důvodů poskytují mutace indukované X-zářením jen málo informací o molekulárním mechanismu, který je odpovědný za jejich vznik. K lepšímu pochopení vzniku mutací na molekulární úrovni vedl až objev chemických mutagenů se specifickými účinky na DNA.

První chemickou látkou, u které byl prokázán mutagenní účinek, byl hořčičný plyn (označovaný také jako yperit). Mutagenní účinky hořčičného plynu objevila Charlotte Auerbachová se svými spolupracovníky v průběhu druhé světové války. Z obavy, aby nebyl hořčičný plyn využit jako chemická zbraň, byly tyto výsledky britskou vládou zatajeny. Do konce války tak Auerbachová a její spolupracovníci nemohli své výsledky ani publikovat, ani o nich hovořit s jinými genetiky. Látky, které tehdy studovala, jsou příkladem velké třídy chemických mutagenů, které mohou přenášet své alkylové skupiny (CH_3^- , CH_3CH_2^- atd.) na báze v DNA, a nazývají se proto alkylační látky. Obdobně jako paprsky X, i hořčičný plyn však vyvolává v DNA mnoho



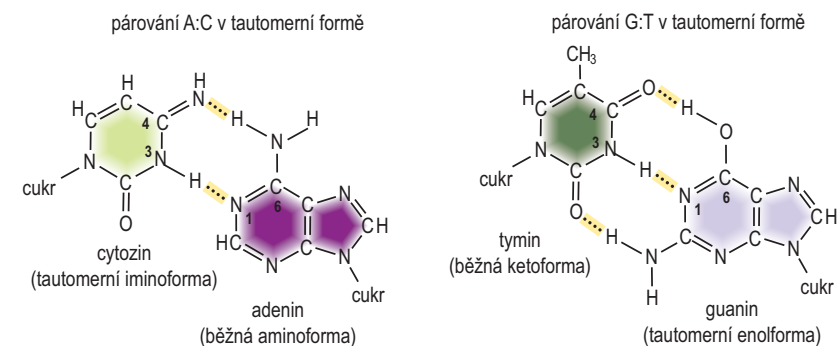
Obr. 13.9 ▶ Tautomerní formy čtyř běžných bází v DNA. Přesmyky vodíkových atomů mezi pozicemi číslo 3 a 4 u pyrimidinů a mezi pozicemi číslo 1 a 6 u purinů mění jejich párovací schopnosti.

změn. V 50. letech byly objeveny chemické mutageny se specifickými účinky na DNA (**obr. 13.12**).

MUTACE INDUKOVANÉ CHEMICKÝMI LÁTKAMI

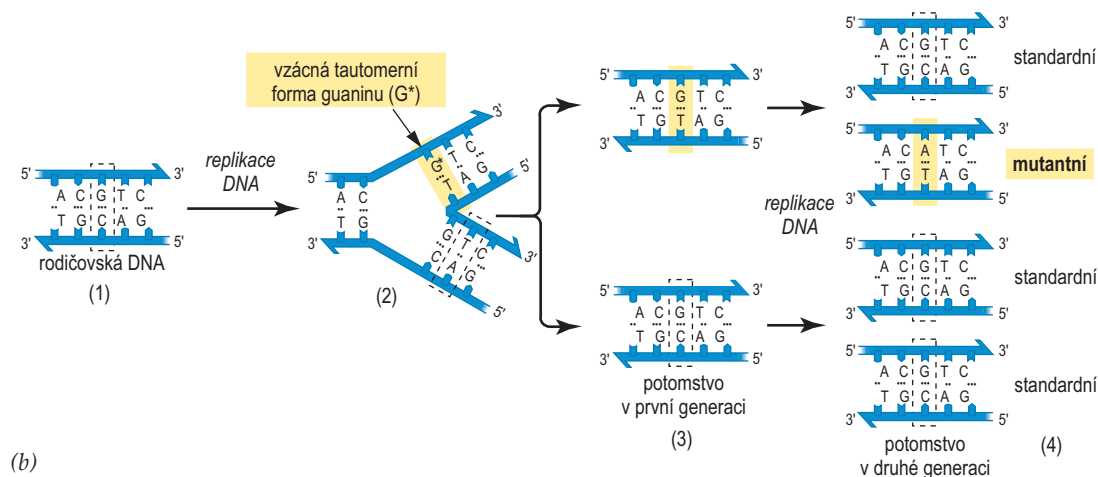
Chemické mutageny můžeme rozdělit na dvě skupiny: (1) látky, které vyvolávají mutace jak při replikaci, tak i v nereplikující se DNA, mezi něž patří například alkylační látky nebo kyselina dusitá; (2) látky, které vyvolávají mutace pouze při replikaci DNA, kam řadíme například analogy purinových nebo pyrimidinových bází, jejichž struktura je podobná normálním bázím v DNA. Tyto analogy bází musí být v průběhu replikace začleněny do řetězců DNA namísto normálních bází, aby se projevily jejich mutagenní účinky. Do druhé skupiny mutagenů řadíme také akridinová barviva,

vodíkové vazby mezi páry A:C a G:T, které se vytvářejí, pokud je cytozin a guanin ve svých tautomerních imino- a enolformách



(a)

mechanismus vzniku mutací v DNA v důsledku tautomerních přesmyků



(b)

Obr. 13.10 ► Účinky tautomerních přesmyků v nukleotidech DNA na (a) párování a (b) vznik mutací. Neobvyklé párování bází typu A:C a G:T znázorněné na obrázku (a) vzniká také v případě, že tymin a adenin jsou ve svých nestabilních enol- a iminoformách. (b) Guanin (1) prodělává tautomerní přesmyk za vzniku nestabilní enolformy (G^*) v průběhu replikace DNA (2). V enolformě se guanin páruje s tyminem (2). Během následující replikace (3 až 4) se guanin vrací do své stabilnější ketoformy. Tymin zařazený oproti enolformě guaninu (2) vede v dalším cyklu replikace k začlenění adeninu (3 až 4). Výsledkem těchto dějů je záměna páru bází z G:C na A:T.

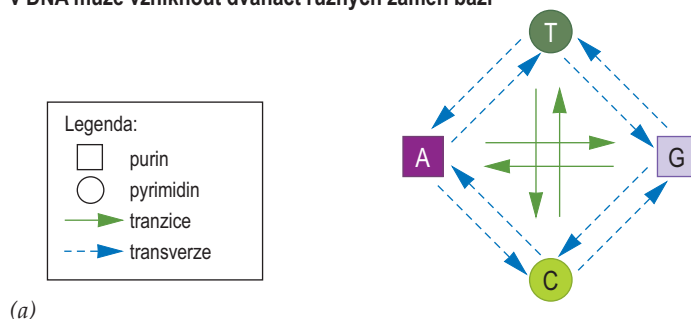
kteřá se vmezeřují do DNA, čímž zvyšují pravděpodobnost replikačních chyb.

Mutagenní **analogy bází** jsou strukturně podobné normálním bázím a jsou začleňovány do DNA během replikace. Jejich struktura se však dostatečně odlišuje od normálních bází v DNA, což při replikaci zvyšuje četnost chybného párování, a tím i vzniku mutací. Dva nejběžnější používané analogy jsou 5-bromuracil a 2-aminopurin. Pyrimidin 5-bromuracil je analogem tyminu; umístění bromu v pozici 5 je podobné umístění metylové (CH_3^-) skupiny v pozici 5 u tyminu. Brom v této pozici však může měnit rozložení náboje, což zvyšuje četnost tautomerních přesmyků (viz **obr. 13.9**). Ve stabilnější ketoformě se 5-bromuracil páruje s adeninem. Pokud dojde k tautomernímu přesmyku do enolformy, páruje se 5-bromuracil

s guaninem (**obr. 13.13**). Mutagenní účinek 5-bromuracilu je tedy stejný, jako je tomu v případě tautomerních přesmyků u normálních bází (viz **obr. 13.10b**), jmenovitě u tranzicí.

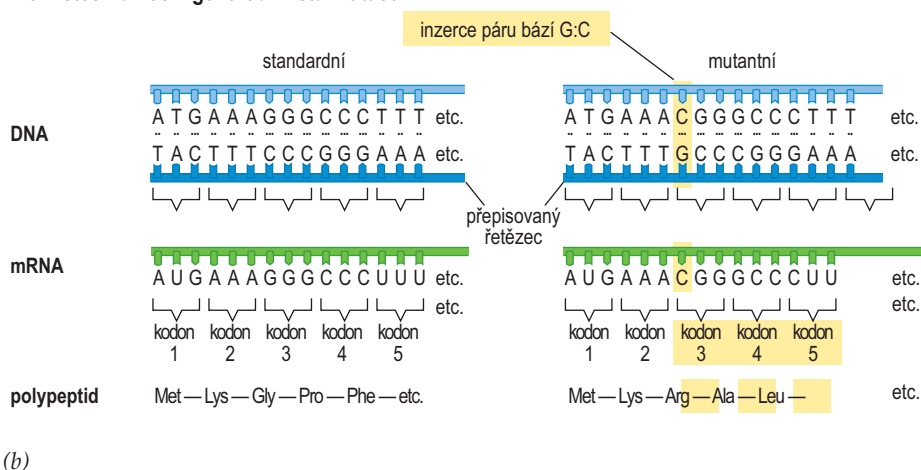
Pokud se 5-bromuracil vyskytuje v okamžiku jeho včleňování do vznikajícího řetězce DNA ve vzácnější enolformě jako nukleozidtrifosfát, začleňuje se oproti guaninu přítomnému v matricovém řetězci, čímž indukuje tranzici ve směru G:C \rightarrow A:T (**obr. 13.14a**). Jestliže se 5-bromuracil začleňuje ve stabilnější ketoformě oproti adeninu (místo tyminu) a potom dojde při následující replikaci k tautomernímu přesmyku na enolformu, indukuje tranzici ve směru A:T \rightarrow G:C (**obr. 13.14b**). Můžeme tedy říci, že 5-bromuracil indukuje tranzice oběma směry A:T \leftrightarrow G:C. Významným důsledkem těchto obousměrných tranzicí vyvolaných 5-bromuracilem je to, že mutace indukované

v DNA může vzniknout dvanáct různých záměn bází



(a)

inzerce nebo delece jednoho nebo dvou párů bází mění čtecí rámec v genu od místa mutace



(b)

Obr. 13.11 ▶ Typy bodových mutací, které vznikají v DNA: (a) záměna bází a (b) posunové mutace. (a) Záměny (substitute) bází zahrnují čtyři tranzice (výměnu purinu za jiný purin a pyrimidinu za jiný pyrimidin; zelené šipky) a osm transverzí (výměnu purinu za pyrimidin a pyrimidinu za purin; modré šipky). (b) Mutantní gen (nahore vpravo) vznikl v důsledku inzerce jednoho páru bází C:G mezi šestý a sedmý pár standardního genu (nahore vlevo). Tato inzerce mění čtecí rámec v části genu za místem mutace ve vztahu ke směru transkripce a translace (zleva doprava, jak je znázorněno). Posun čtecího rámce změní všechny kodony v mRNA, a tudíž i všechny aminokyseliny v polypeptidu kódované tripletly bází od místa mutace.

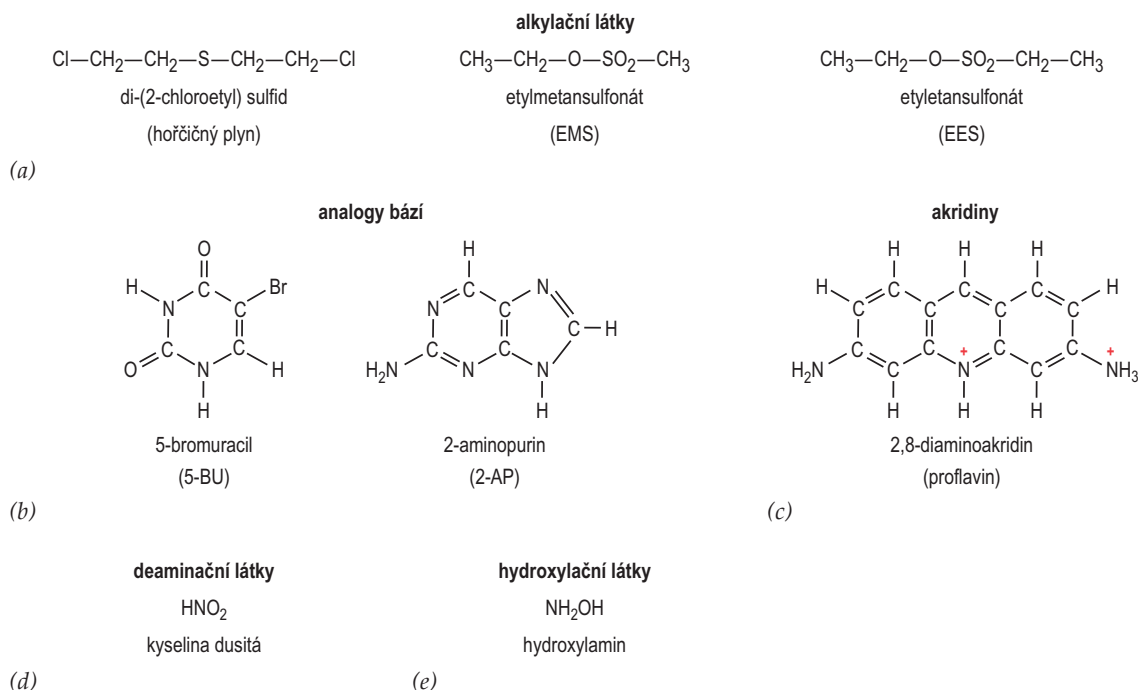
vané tímto tyminovým analogem lze pomocí 5-bromuracilu převádět na mutace zpětné, tj. na standardní typy. Podobným způsobem účinkuje i 2-aminopurin, při včleňování do DNA však nahrazuje adenin nebo guanin.

Kyselina dusitá (HNO₂) je silný mutagen, který působí jak při replikaci, tak na nereplikující se DNA. Kyselina dusitá způsobuje oxidativní deaminaci aminoskupin u adeninu, guaninu a cytozinu. Tato reakce převádí aminoskupiny na ketoskupiny a mění vlastnosti vodíkové vazby modifikovaných bází (**obr. 13.15**). Adenin se deaminací mění na hypoxantin, který se páruje s cytozinem místo s tyminem. Cytozin se deaminuje na uracil, který se páruje s adeninem namísto guaninu. Deaminací guaninu vzniká xantin, avšak xantin – stejně jako guanin – se páruje s cytozinem. Deaminace guaninu tedy není mutagenní. Protože deaminace adeninu způsobuje tranzice ve směru A:T → G:C a deaminace cytozinu způsobuje tranzice ve směru G:C → A:T, celkově můžeme říci, že kyselina dusitá indukuje tranzice v obou směrech, A:T ↔ G:C (viz Zaostřeno na problém: Stanovení změn v pořadí aminokyselin po účinku chemických mutagenů). Důsledkem této skutečnosti je, že u mutací indukovaných kyselinou dusitou můžeme stejnou kyselinou indukovat také mutace zpětné, tj. standardní typy.

Akridinová barviva, jako je proflavin (viz **obr. 13.12c**), akridinová oranž a celá řada příbuzných sloučenin, představují silné mutageny, které vyvolávají posunové

mutace (viz **obr. 13.11b**). Pozitivně nabitě akridiny se vyznačují schopností včleňovat se mezi báze DNA (**obr. 13.16**). Toto včlenění (označované někdy jako interkalace) zvyšuje pevnost a mění konformaci dvoušroubovice, což způsobuje její prohýbání nebo zkroucení. Pokud se molekuly DNA s vmezeřenými akridiny replikují, dochází k delecím či adicím jednoho či více párů bází. Jak lze očekávat, tyto malé adice a delece obvykle o velikosti jednoho páru bází, způsobují změnu čtecího rámce, která postihuje část genu za mutačním místem (**obr. 13.11b**). Mutace indukované akridinovými barvivy proto obvykle způsobují vznik nefunkčních genových produktů.

Alkylační látky jsou chemické sloučeniny, které vnášejí do jiných molekul alkylovou skupinu. Příkladem může být hořčičný plyn (yperit) nebo alkylsulfáty, jako jsou metyl- a etylmetansulfonát (MMS a EMS) (viz **obr. 13.12a**), chemické látky, které vyvolávají v DNA celou řadu změn. Alkylační látky mohou indukovat všechny typy mutací, včetně tranzic, transverzí, posunových mutací, a jsou dokonce schopny indukovat i chromozomové aberace, jejichž relativní četnost závisí na reaktivitě použité látky. Jeden mechanismus mutageny vyvolaný alkylačními látkami zahrnuje přenos metylové či etylové skupiny na báze v DNA, což způsobuje změnu v párování bází. Například EMS způsobuje etylaci bází v DNA na pozicích 7-N a 6-O. Pokud takto vznikne 7-etylguanin, páruje se s tyminem, což

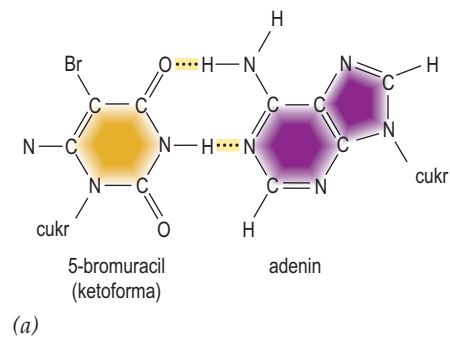


Obr. 13.12 ► Některé silné chemické mutageny.

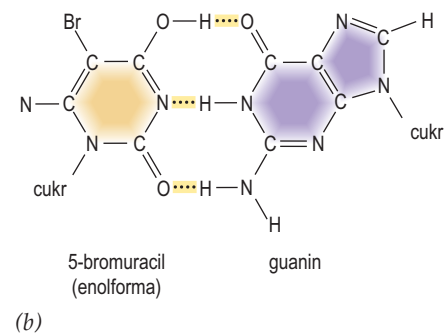
vede k tranzicím ve směru G:C → A:T. Jiné produkty alky-lace bází aktivují mechanismy chybné opravy DNA (error-prone), jejichž důsledkem mohou být tranzice, transverze nebo posunové mutace. Další typy alkylačních látek, zejména tzv. dvojfunkční alkylační látky (obsahující dvě reaktivní alkylové skupiny) vytvářejí křížové vazby mezi řetězci nebo molekulami DNA a indukují tak chromozomové zlomy, ze kterých vznikají různé typy chromozomových aberací (kapitola 6). Celkově se však u alkylačních látek setkáváme s méně specifickými mutagenními účinky, než tomu bylo u analogů bází, kyseliny dusité nebo u akridinových barviv.

Na rozdíl od většiny alkylačních látek má výrazně specifický mutagenní účinek jiná sloučenina, a to **hydroxylační látka** hydroxylamin (NH_2OH). Tato sloučenina indukují tranzice pouze ve směru G:C → A:T. Pokud je DNA vystavena účinku hydroxylaminu, dochází u cytozinu k hydroxylaci aminoskupiny. Vzniklý hydroxylaminocytosin se páruje s adeninem, což vede ke vzniku tranzicí ve směru G:C → A:T. Vzhledem ke své specifitě je hydroxylamin velmi užitečný při klasifikaci jednotlivých typů tranzičních mutací. Při reverzích tranzičních mutací na standardní typ pomocí kyseliny dusité nebo analogů bází můžeme mutace podle jejich schopnosti reverze hydroxylaminem rozdělit na dvě skupiny. (1) Mutace, které mají pár bází A:T v mutovaném místě, nebudou revertovány hydroxylaminem. (2) Mutace s párem bází G:C v mutovaném místě budou revertovány hydroxylaminem. Pomocí hydroxylaminu můžeme tedy zjistit, zdali při vzniku specifické mutace šlo o tranzici ve směru A:T → G:C, nebo G:C → A:T.

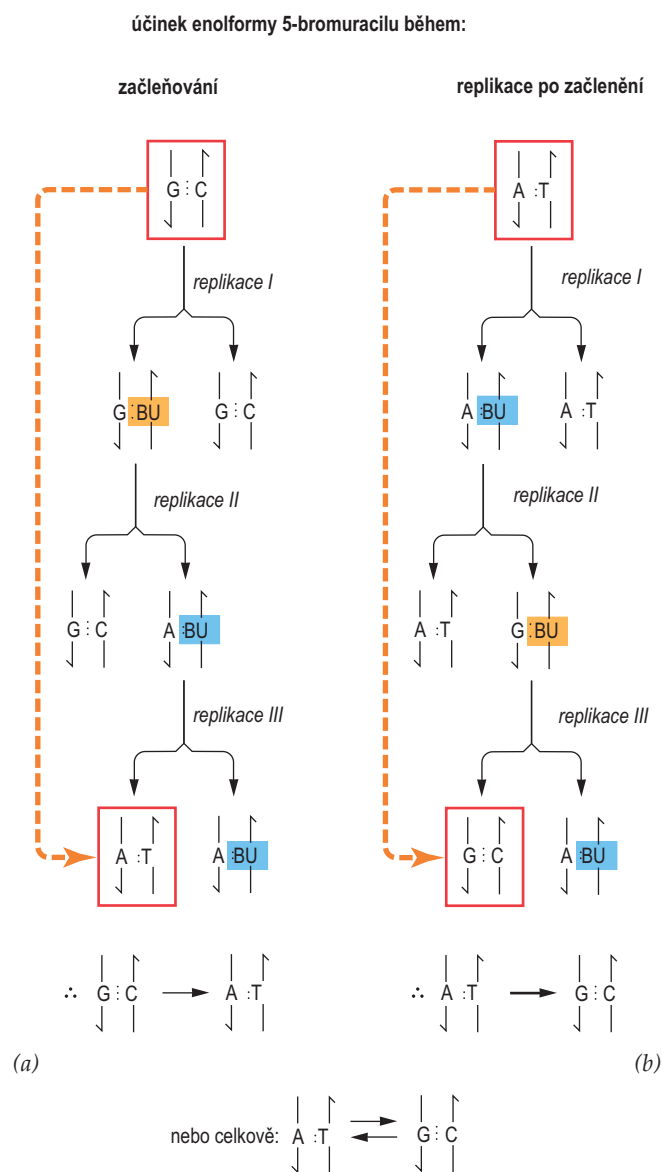
5-bromuracil: párování s adeninem



5-bromuracil: párování s guaninem



Obr. 13.13 ► Párování mezi 5-bromuracilem a (a) adeninem nebo (b) guaninem.



Obr. 13.14 ▶ Mutagenní účinky 5-bromuracilu. (a) Pokud se 5-bromuracil vyskytuje při začleňování do DNA ve své vzácnější enolformě (oranžová), indukuje tranzice G:C → A:T. (b) Pokud je 5-bromuracil začleňován do DNA ve své běžnější ketoformě (modrá) a v průběhu následující replikace dojde k přesmyku na enolformu, vyvolává tranzice A:T → G:C. 5-bromuracil tedy může indukovat tranzice oběma směry, A:T ↔ G:C.

MUTACE INDUKOVANÉ ZÁŘENÍM

Část elektromagnetického spektra (**obr. 13.17**), jehož vlnové délky jsou kratší a energie je větší než u světla viditelného, můžeme rozdělit na **ionizující záření** (například paprsky X, záření gama a kosmické záření) a na **neionizující záření** (ultrafialové světlo). Ionizující záření má vysokou energii, a je proto užitečné pro lékařskou diagnostiku, neboť je schopno pronikat živými tkáněmi do velké hloubky. Při těchto interakcích s hmotou naráží záření o vysoké energii do atomů a způsobuje uvolnění elektronů, čímž vznikají

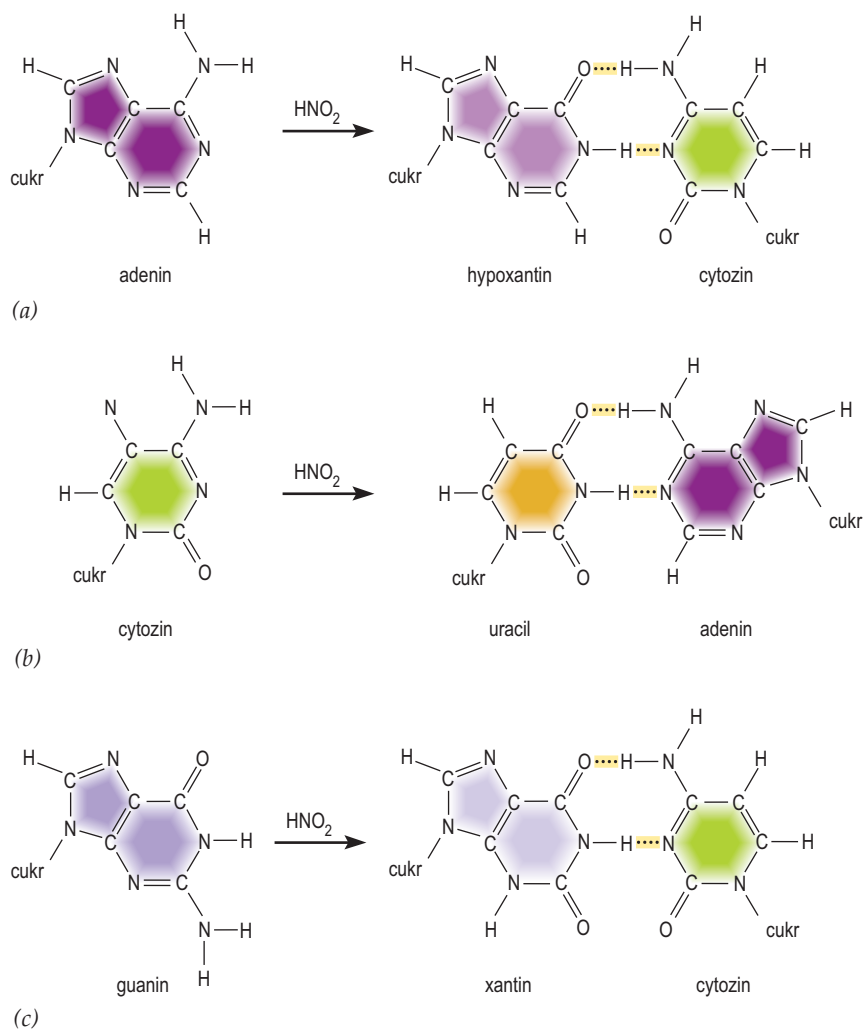
pozitivně nabitě radikály a ionty. Tyto ionty se postupně srážejí s jinými molekulami a způsobují uvolnění dalších elektronů. Jak postupuje záření živými tkáněmi, vzniká podél dráhy záření s vysokou energií kužel iontů. Tento proces ionizace může být vyvolán speciálními přístroji, které produkují paprsky X, protony a neutrony, nebo může vzniknout účinkem alfa, beta a gama záření, které se uvolňují z některých radioaktivních izotopů, jako jsou například ^{32}P , ^{35}S nebo uran-238 používaný v jaderných reaktorech.

Ultrafialové záření má nižší energii než záření ionizující a u rostlin a živočichů proniká pouze do svrchní vrstvy buněk a nezpůsobuje ionizace. Energie ultrafialového záření je zachycována atomy, čímž jejich elektrony přecházejí na vyšší energetické hladiny, tj. do stavu označovaného jako *excitace*. Molekuly obsahující atomy ve formě iontů nebo v excitovaném stavu jsou mnohem více reaktivní, než molekuly s atomy v jejich normálních stabilních stavech. Tato zvýšená reaktivita atomů, jež se nacházejí v molekulách DNA, je odpovědná za většinu mutagenních účinků ionizujícího a ultrafialového záření.

Expozice X-záření a jiným typům ionizujícího záření byly dříve uváděny v jednotkách **rentgenech (r)**, které vyjadřují počet ionizací na jednotku objemu za standardních podmínek. Jednotka jeden rentgen představuje ionizující záření, které produkuje v jednom cm^3 vzduchu při 0°C a tlaku 760 mm rtuťového sloupce celkově $2,083 \times 10^9$ iontových párů (pro absorbovanou dávku záření D, tj. množství energie pohlcené v jednotce hmoty, se dnes používá jednotka gray, Gy – pozn. překl.). Je třeba poznamenat, že dávka záření nezahrnuje časové měřítko. Stejnou dávku můžeme získat dlouhodobým ozařováním při nízké intenzitě nebo ozářením provedeným v krátkém čase, ale s vysokou intenzitou. Tato skutečnost je důležitá, neboť ve většině prací je četnost indukovaných bodových mutací přímo úměrná dávce záření (**obr. 13.18**). Tak například ozáření spermií drozofily paprsky X způsobí přibližně 3procentní zvýšení rychlosti vzniku mutací na každé zvýšení dávky o 1000 r. Tato lineární závislost ukazuje, že indukce mutací po ozáření paprsky X má jednozásahovou kinetiku, což znamená, že každá mutace vzniká z jednoho ionizačního jevu. Jinými slovy, za standardních podmínek povede každá ionizace s určitou pravděpodobností ke vzniku mutace.

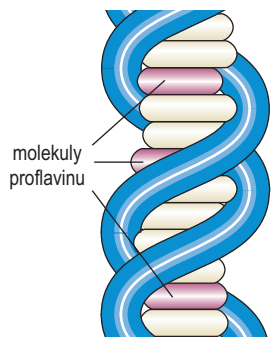
Jaká je bezpečná dávka ionizujícího záření? Výroba a použití nukleárních zbraní stejně jako některé havárie jaderných zařízení vedly k obavám z expozice ionizujícímu záření. Lineární závislost mezi rychlostí vzniku mutací a dávkou záření naznačuje, že neexistuje bezpečná úroveň ozáření. Výzkumy prokázaly, že čím je dávka záření vyšší, tím větší je rychlost vzniku mutací, čím je dávka záření nižší, tím je tato rychlost nižší. I velmi malé dávky záření mají tedy nízkou, avšak určitou schopnost vyvolávat mutace.

U drozofily bylo prokázáno, že chronické ozařování spermií (nízké intenzity záření aplikované po dlouhou dobu) je z hlediska indukce mutací stejně účinné jako ozáření akutní (stejná dávka záření aplikovaná s vysokou



Obr. 13.15 ► Kyselina dusitá indukuje mutace prostřednictvím oxidativní deaminace bází v DNA. Kyselina dusitá deaminuje (a) adenin na hypoxantín, tím způsobuje tranzice A:T → G:C; (b) cytozin na uracil, tím způsobuje tranzice G:C → A:T; a (c) guanin na xantín, který není mutagenní. Společné účinky kyseliny dusité na adenin a cytozin vysvětlují její schopnost vyvolávat tranzice v obou směrech A:T ↔ G:C.

intenzitou během krátké doby). Naproti tomu u myši indukuje chronické ozařování menší počet mutací než stejná dávka akutního ozáření. Je zajímavé, že pokud byly myši ozařovány přerušovanými dávkami záření, byla mutační četnost mírně nižší, než když byly ozářeny stejnou dávkou záření aplikovanou v jedné souvislé dávce. Předpokládá se, že tyto rozdílné odpovědi na účinky chronického ozařování



Obr. 13.16 ► Interkalace proflavinu do dvoušroubovice DNA. Výzkumy pomocí difrakce paprsky X prokázaly, že tato pozitivně nabitá akridinová barviva se vmezeřují mezi páry bází.

pozorované u drozofily a savců vyplývají z rozdílných schopností těchto druhů opravovat poškození DNA indukované zářením. Ve spermatogoniích a oocytech savců mohou existovat opravné mechanismy, které nemusí být funkční ve spermích u drozofily. Nicméně je nutné zdůraznit, že všechny tyto pokusy s ozařováním indukovaly mutace jak u drozofily, tak u savců, i když s různou účinností.

Ionizující záření také indukuje velké změny ve struktuře chromozomů, jako jsou delece, duplikace, inverze a translokace (kapitola 6). Tyto chromozomové aberace jsou důsledkem zlomů na chromozomech způsobených zářením. Ke svému vzniku vyžadují většinou dva chromozomové zlomy, proto tyto změny vykazují spíše dvouzásahovou kinetiku než jednozásahovou, se kterou se setkáváme u bodových mutací.

Ultrafialové (UV) záření nemá dostatečnou energii, aby indukovalo ionizace. Je však snadno pohlcováno mnoha organickými molekulami, například puriny a pyrimidiny v DNA, které se tak dostávají do reaktivnějšího nebo excitovaného stavu. UV záření proniká do tkání jen málo. U mnohobuněčných organismů je proto vystavena účinkům UV záření pouze epidermální vrstva buněk. Ultrafialové



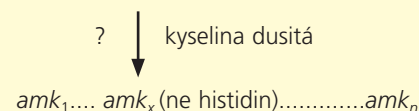
▶ ZAOSTŘENO NA PROBLÉM

Stanovení změn v pořadí aminokyselin po účinku chemických mutagenů

ZADÁNÍ

V tab. 12.1 jsou uvedeny základní vlastnosti genetického kódu. Jak je znázorněno na obr. 13.15, chemická látka kyselina dusitá deaminuje adenin, cytozin a guanin (adenin → hypoxantin, který se páruje s cytozinem; cytozin → uracil, který se páruje s adeninem; a guanin → xantin, který se páruje s cytozinem). Pokud budete působit kyselinou dusitou na populaci nereplikujících se virů tabákové mozaiky (TMV), očekávali byste, že kyselina dusitá může vyvolat mutace, které mohou způsobit záměnu histidinu ve standardním polypeptidu za jiné aminokyseliny?

To znamená, polypeptid: $amk_1 \dots \text{histidin} \dots amk_n$



Pokud ano, o jaké aminokyseliny půjde a jakým(i) mechanismem (my) se záměna uskuteční? Pokud ne, proč?

FAKTA A VÝCHODISKA

1. Genetická informace TMV je uložena v jednořetězcové RNA, která je ekvivalentní mRNA.
2. Genomová RNA TMV se replikuje podobně jako DNA, tj. pomocí komplementárního dvouřetězcového meziproductu vytvořeného na základě párování bází.
3. Ačkoliv se viry tabákové mozaiky v době působení kyselinou dusitou nereplikují, dojde po infekci tabákových listů k jejich

replikaci, což umožní zjistit, zda byly, či nebyly mutace uvedeného typu působením kyseliny dusité indukovány.

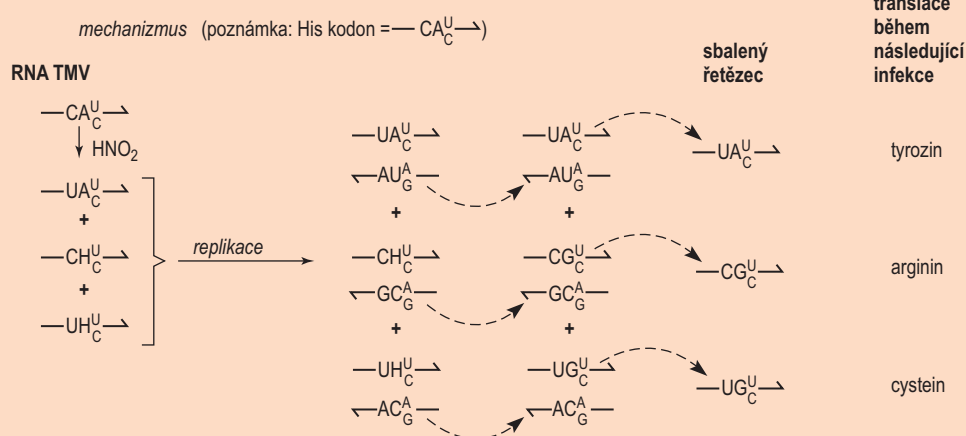
4. Histidinové kodony jsou CAU a CAC. Proto genom TMV (RNA) obsahuje jednu z těchto sekvencí ve všech místech určujících histidin v polypeptidech kódovaných TMV.

5. Potenciálními cíli mutace indukované kyselinou dusitou jsou adeniny a cytoziny v genomu TMV.

ROZBOR A ŘEŠENÍ

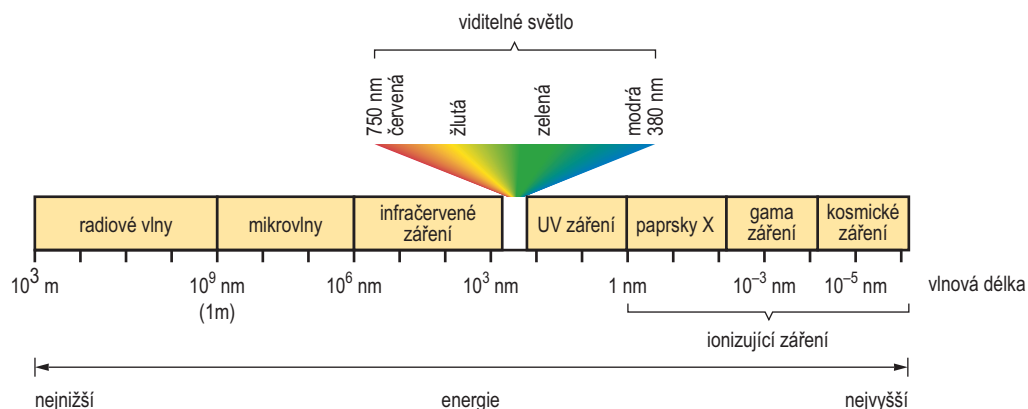
Pokud kyselina dusitá deaminuje adenin a cytozin, vzniká hypoxantin a uracil. Během následující replikace modifikovaných molekul RNA TMV se hypoxantin páruje s cytozinem a uracil se páruje s adeninem. V důsledku toho se některé z A a C v RNA TMV změň na G a U. V genomu TMV, vzniklém semikonzervativní

replikací virové DNA vystavené působení mutagenu, povedou deaminace těchto bází ke vzniku kodonů pro tyrozin, arginin a cystein. Mutagenese pomocí kyseliny dusité tedy povede k nahrazení některých histidinů ve standardních proteinech TMV za tyroziny, argininy a cysteiny v mutantních proteinech, jak je uvedeno v následujícím schématu.

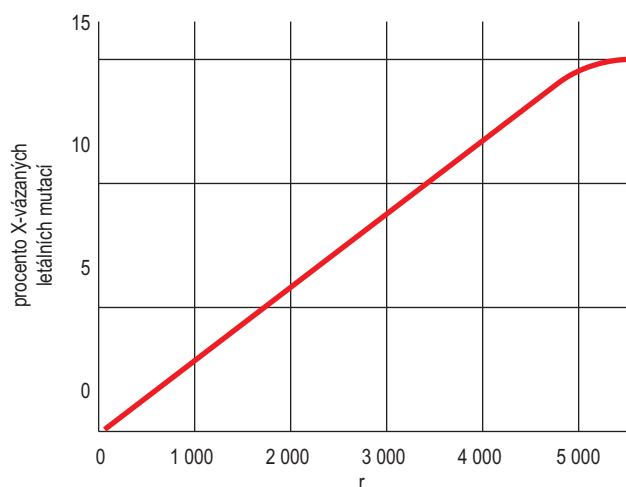


záření je však silným mutagenem u jednobuněčných organismů. Báze v DNA mají maximum absorpce při vlnové délce 254 nm. Největší mutagenní účinky pozorujeme právě při 254 nm, z čehož vyplývá, že mutační proces vyvolaný UV

zářením je přímo zprostředkován absorpcí UV světla puriny a pyrimidiny. Studie *in vitro* prokázaly, že pyrimidiny pohlčují toto záření při vlnové délce 254 nm maximálně, a tím se stávají velmi reaktivními. Existují dva hlavní produkty, které



Obr. 13.17 ► Elektromagnetické spektrum.

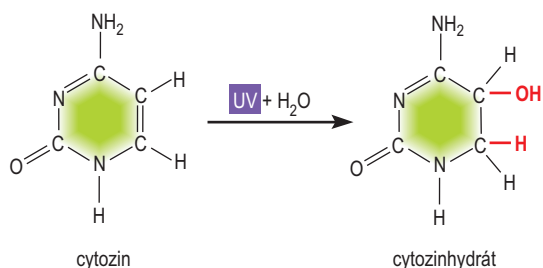


Obr. 13.18 ► Vztah mezi radiační dávkou a četností mutací u drozofily.

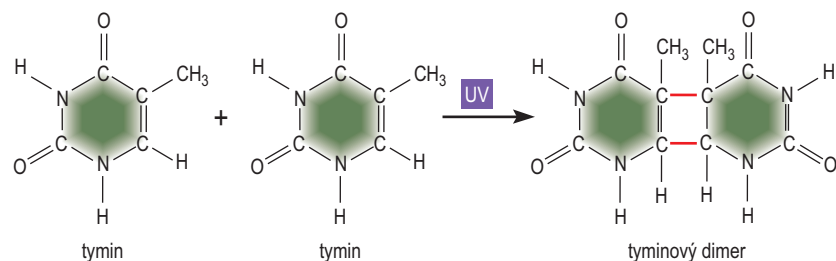
vznikají v důsledku absorpce UV záření pyrimidiny (tymin a cytozin), a to pyrimidinové hydráty a pyrimidinové dimery (**obr. 13.19**). Tyminové dimery způsobují mutace dvěma způsoby. (1) Dimery porušují strukturu dvoušroubovice DNA a překážejí ve správné replikaci DNA. (2) V průběhu buněčných procesů, které opravují některé poruchy v DNA, například tyminové dimery indukované UV zářením, mohou vznikat v DNA chyby (viz oddíl Mechanizmy opravy DNA v další části této kapitoly).

MUTACE INDUKOVANÉ TRANSPONOVATELNÝMI GENETICKÝMI ELEMENTY

Živé organismy obsahují pozoruhodné oblasti DNA, které se mohou přemísťovat z jednoho místa v genomu na jiné. Tyto **transpozony** neboli transponovatelné genetické elementy jsou probírány v kapitole 18. V důsledku inserce transpozonu do genu se geny stávají často nefunkčními (**obr. 13.20**). Pokud gen kóduje nějaký důležitý produkt, je pravděpodobné, že vznikne mutantní fenotyp. Genetici již vědí, že mnoho klasických mutantů kukuřice, drozofily,



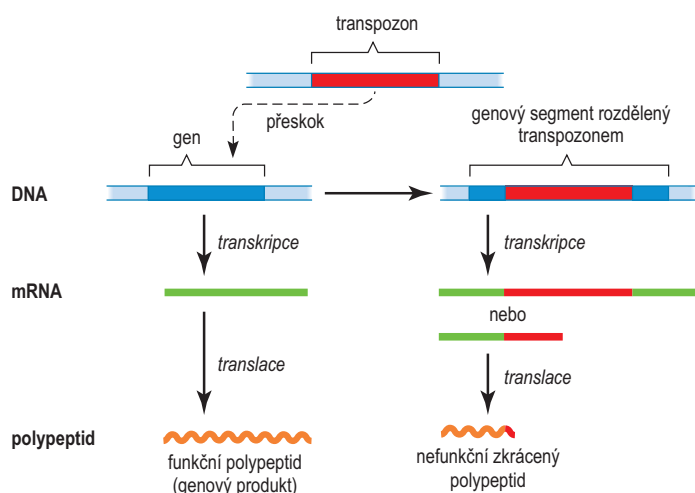
(a)



(b)

Obr. 13.19 ► Pyrimidinové fotoprodukty UV ozáření.

(a) Hydrolýza cytozinu na hydratovanou formu může způsobovat chybné párování bází během replikace. (b) Spojením dvou sousedících tyminových molekul vznikají tyminové dimery, které blokují replikaci DNA.



Obr. 13.20 ▶ Mechanismus vzniku mutace indukované transpozonem. V důsledku inserce transponovatelného genetického elementu do standardního genu se gen obvykle stává nefunkčním (vpravo).

E. coli a jiných organismů vzniklo právě insercí transponovatelných genetických elementů do důležitých genů (viz **obr. 13.21**). Tak například jak Mendelova alela *wrinkled* (svraštělá semena) u hrachu (kapitola 3), tak i první mutace u drozofily způsobující bílou barvu očí (*w¹*) byly způsobeny insercí transponovatelných elementů. Další podrobnosti o mechanismech, kterými se transpozony přemísťují, a o procesech, jimiž vyvolávají mutace, uvádíme v kapitole 18.

EXPANDUJÍCÍ TRINUKLEOTIDOVÉ REPETICE A DĚDIČNÉ CHOROBY U ČLOVĚKA

Se všemi typy mutací, které jsme uváděli v předcházejících oddílech této kapitoly, se můžeme setkat také u člověka. Zde navíc existuje další typ mutací, který je úzce spojen s lidskými chorobami. Opakující se sekvence o velikosti jednoho až šesti párů bází jsou známy jako **jednoduché tandemové repetice**. Takové repetice jsou rozptýleny po celém lidském genomu. Repetice o velikosti tří nukleoti-

dových párů, **trinukleotidové repetice**, mohou zvyšovat počet opakování (tzn. dochází k jejich expanzi) a způsobovat závažné dědičné choroby u člověka. Celkově bylo nalezeno několik trinukleotidů, u kterých může dojít ke zvýšení počtu kopií. Tak například expanze trinukleotidové repetice CGG v místě *FRAXA* na chromozomu X je odpovědná za vznik syndromu fragilního X, nejběžnější formy dědičné mentální retardace u lidí. Normální chromozom X obsahuje v místě *FRAXA* od 6 do 50 kopií repetice CGG. Mutantní chromozom X má však v tomto místě více než 1000 kopií tandemové repetice CGG (viz Milníky genetiky: Trinukleotidové repetice a onemocnění člověka, kapitola 17).

Trinukleotidové repetice CAG a GTC souvisejí s několika dědičnými neurologickými chorobami, jako je Huntingtonova choroba, myotonická dystrofie, Kennedyho choroba, dentatorubrální pallidoluyšiální atrofie, Machado-Josephova choroba a spinocerebrální ataxie. U všech těchto neurologických onemocnění koreluje závažnost choroby s počtem opakování trinukleotidových repeticí – čím větší je počet kopií, tím závažnější jsou symptomy nemoci. Expandované trinukleotidy asociované s těmito chorobami jsou navíc nestabilní v somatických buňkách i mezi generacemi. Tato nestabilita způsobuje jev označovaný jako *anticipace* – jak se počet opakování trinukleotidů zvyšuje, nemoc se vyvíjí v následujících generacích ve stále mladším věku a má závažnější následky. Mechanismus trinukleotidové expanze není znám.

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATKY

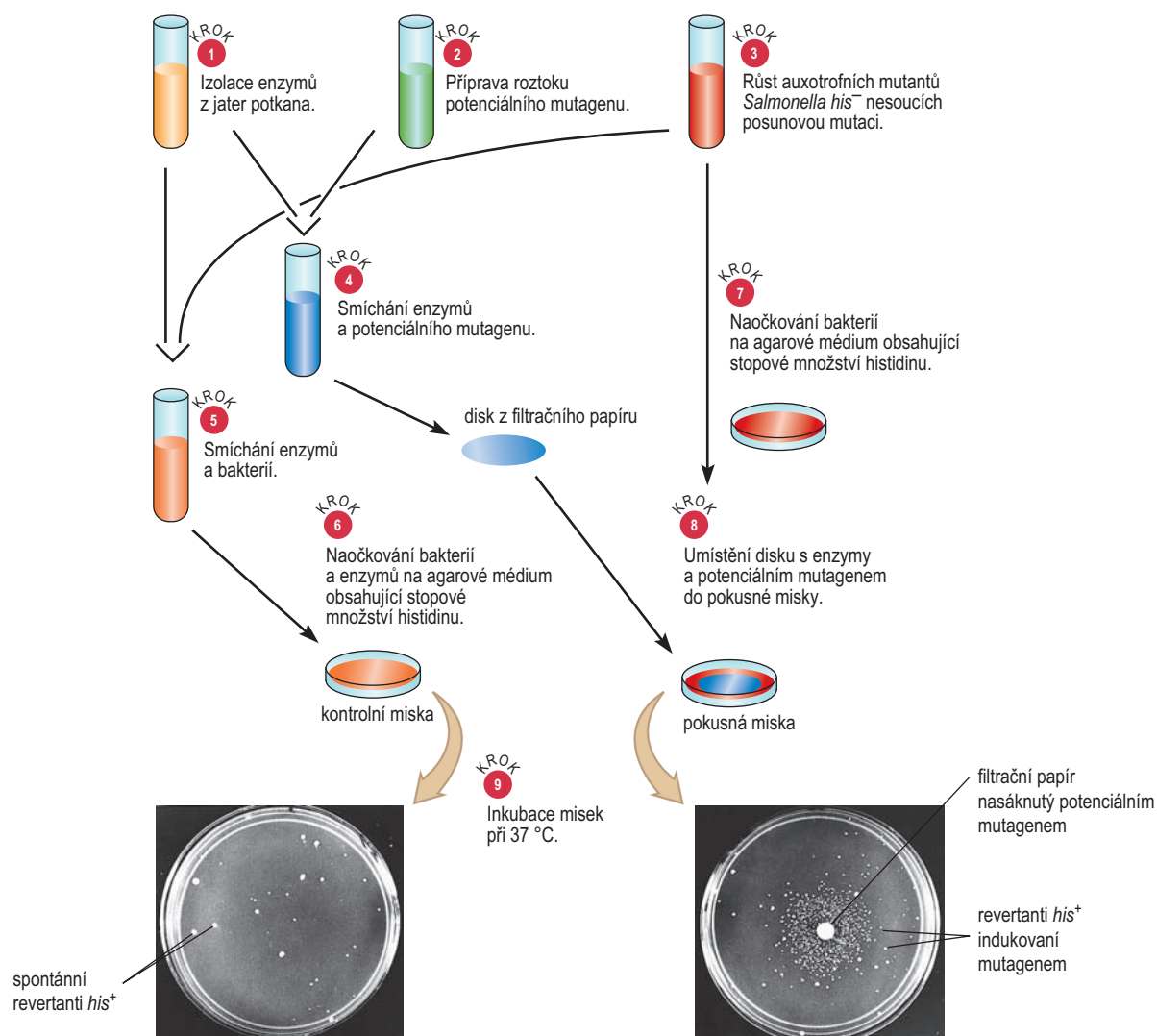
- ▶ Mutace jsou indukovány chemickými látkami, ionizujícím zářením, ultrafialovým světlem a endogenními transponovatelnými genetickými elementy.
- ▶ Existují tři typy bodových mutací: (1) tranzice – substituce purinu za purin nebo pyrimidinu za pyrimidin; (2) transverze – substituce purinu za pyrimidin anebo pyrimidinu za purin; (3) posunové mutace – inserce nebo delece jednoho nebo dvou nukleotidových párů, které mění čtecí rámec v genu za místem mutace.
- ▶ Několik dědičných lidských chorob je způsobeno expanzí trinukleotidových repeticí.

▶ Testování chemických látek na mutagenitu: Amesův test

Amesův test je jednoduchá a levná metoda používaná k identifikaci mutagenních látek.

Mutagenní látky jsou také **karcinogeny**; látky, které mohou vyvolávat vznik nádorů. Víme, že společnou charakteristikou stovek nádorů je to, že maligní buňky pokračují v dělení i poté, kdy by se v normálních buňkách mělo buněčné dělení zastavit. Buněčné dělení, stejně jako jiné biologické procesy, je řízeno geneticky. Specifické geny

kódují produkty, které řídí buněčné dělení jako odpověď na intracelulární, intercelulární a environmentální signály. Pokud tyto geny mutují do nefunkčního stavu, může dojít k nekontrolovanému buněčnému dělení. Všichni si samozřejmě přejeme, abychom se vyhnuli expozici mutagenním a karcinogenním látkám. Nicméně naše technologická



Obr. 13.21 ► Amesův test na mutagenitu. Médium v každé Petriho misce obsahuje stopové množství histidinu a známý počet buněk *his⁻* specifického „testovacího kmene“ *Salmonella typhimurium* nesoucího posunovou mutaci. Kontrolní miska vlevo slouží k odhadu četnosti spontánních revertantů testovacího kmene. Pokusná miska vpravo ukazuje četnost revertantů indukovaných potenciálním mutagenem, v tomto případě byl použit karcinogen 2-aminofluoren.

společnost závisí na extenzivním používání chemických látek jak v průmyslu, tak i v zemědělství. Ve světě jsou každým rokem produkovány stovky nových chemikálií a z těchto důvodů je nezbytné, aby byla před jejich širším užitím dostatečně prověřena jejich mutagenita a karcinogenita.

Tradičně se karcinogenita chemických látek testuje na hlodavcích, obvykle na právě narozených myších. Tyto studie spočívají v podávání testované substance ve formě potravy nebo injekčně a následném zkoumání zvířat z hlediska vzniku nádorů. Testy mutagenity byly dlouho prováděny podobným způsobem. Protože je však vznik mutace jevem, který se vyskytuje s nízkou četností, a protože udržování velké populace myší je nákladnou záležitostí, byly tyto testy relativně málo citlivé, což znamená, že nízké hodnoty mutagenity nemohly být detekovány.

V 60. letech 20. století vyvinuli Bruce Ames a jeho kolegové citlivou techniku, která umožňuje rychle a relativně levně identifikovat mutagenitu velkého počtu chemických látek. Ames a jeho spolupracovníci vytvořili auxotrofní kmeny bakterie *Salmonella typhimurium* s různými typy mutací – tranzicemi, transverzemi a posunovými mutacemi – v genech pro biosyntézu aminokyseliny histidinu. Následně sledovali reverzi těchto auxotrofních mutantů na prototrofní typy, a to tak, že inkubovali známý počet mutantních bakterií v médiu bez histidinu a zaznamenávali počet kolonií vytvořených prototrofními revertanty. Některé chemikálie jsou mutagenní pouze při replikaci DNA, proto přidali do média i malé množství histidinu – postačující k tomu, aby proběhlo několik buněčných dělení, ale neumožňující tvorbu viditelných kolonií. Mutagenitu

chemické látky určovali srovnáním četnosti revertovaných kolonií, které vznikly po vystavení bakterií testované látky, s četností spontánních revertantů vzniklých u kontrolních bakterií (**obr. 13.21**). U testované látky sledovali autoři také schopnost indukovat různé typy mutací, a to využitím sady testovacích kmenů, které nesly různé typy mutací – jeden kmen měl tranzici, jiný posunovou mutaci atd.

V průběhu několika let, kdy byly testovány tisíce různých chemikálií, Ames a jeho kolegové pozorovali více než 90procentní korelaci mezi mutagenitou a karcinogenitou testovaných látek. Zpočátku objevili i několik silných karcinogenů, které při použití testovacích kmenů nebyly mutagenní. Následně však zjistili, že mnoho těchto karcinogenů je v eukaryotických buňkách metabolizováno za vzniku silných mutagenních derivátů. Aby se pokusili detekovat mutagenitu metabolických derivátů vzniklých z testované látky, Ames a jeho spolupracovníci přidali k testovacímu systému extrakt z jater potkanů. Toto propojení aktivního systému založeného na extraktu z jater potkanů s bakteriálním testem na mutagenitu podstatně rozšířilo

využití celého testovacího systému. Tak například dusičnany nejsou samy o sobě mutagenní a karcinogenní. Nicméně v eukaryotických buňkách jsou dusičnany konvertovány na nitrozaminy, které jsou vysoce mutagenní a karcinogenní. Amesovy testy na mutagenitu prokázaly přítomnost mutagenů, které vyvolávají posunové mutace, také u několika složek chemicky frakcionovaných kondenzátů cigaretového kouře. V některých případech byla pro průkaz mutagenity nutná aktivace pomocí jaterního extraktu, v jiných případech aktivace nutná nebyla. Dnes představuje Amesův test rychlou, levnou a citlivou metodu sloužící k testování mutagenity chemických látek. Protože mutagenní chemické látky jsou zároveň karcinogeny, může být Amesův test používán i k identifikaci chemikálií, u nichž existuje vysoká pravděpodobnost, že jsou karcinogenní.

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATEK

- Bruce Ames a spolupracovníci vyvinuli levnou a citlivou metodu používanou k testování mutagenity chemických látek s využitím histidinových auxotrofních mutantů *Salmonella*.

► Mechanizmy opravy DNA

Živé organismy obsahují mnoho enzymů, které vyhledávají poškození v DNA, a pokud je poškození nalezeno, iniciují opravné procesy.

Rozmanitost opravných (reparačních) mechanismů, které se vyvinuly u organismů od bakterií až po člověka, je dokladem důležitosti udržování mutací na přijatelné úrovni. Například u *E. coli* existuje pět dobře prozkoumaných mechanismů zaměřených na opravy poškození v DNA: (1) oprava závislá na světle neboli fotoreaktivace, (2) excizní oprava, (3) oprava chybného párování řízená metylací (mismatch repair), (4) postreplikační oprava a (5) chybující (error-prone) oprava (SOS odpověď). Mimoto známe alespoň dva různé typy excizní opravy a víme, že kaskáda excizní opravy může být iniciována několika různými enzymy, z nichž každý reaguje na specifický typ poškození v DNA. Zdá se, že u savců existují všechny typy opravných mechanismů jako u *E. coli*, s výjimkou fotoreaktivace. To však příliš nevádí, protože většina savčích buněk není vystavena světle.

Význam mechanismů opravy DNA z hlediska lidského zdraví je zřejmý. Dědičné choroby jako xeroderma pigmentosum, o které jsme psali v úvodu této kapitoly, živě dokumentují vážné důsledky defektů při opravě DNA. Některé z těchto dědičných chorob probereme v další části této kapitoly.

FOTOREAKTIVACE

Oprava závislá na světle neboli **fotoreaktivace** DNA se u bakterií uskutečňuje pomocí enzymu **DNA-fotolyázy**, který je aktivován viditelným světlem. Pokud je DNA vystavena

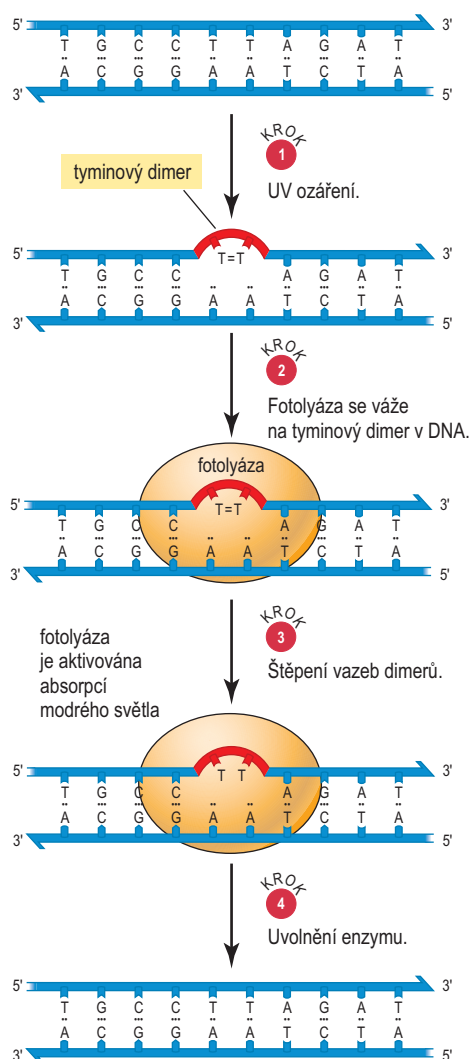
ultrafialovému světlu, vznikají v důsledku kovalentních křížových vazeb mezi dvěma sousedními thyminovými molekulami specifické thyminové dimery (viz **obr. 13.19b**). DNA-fotolyáza tyto dimery rozpoznává, naváže se na ně a s využitím světelné energie kovalentní křížové vazby rozštěpí (**obr. 13.22**). Fotolyáza se naváže na thyminové dimery v DNA ve tmě, avšak nemůže katalyzovat štěpení vazeb spojujících thyminové molekuly bez aktivace energií pocházející z viditelného světla, zejména z modré oblasti světelného spektra. Kromě toho je fotolyáza také schopna štěpit cytozinové dimery a cytozin-thyminové dimery. Pokud tedy používáme k indukci mutací u bakterií ultrafialové světlo, ozářené buňky je zapotřebí po několik generací pěstovat ve tmě, aby byla četnost mutací co největší.

EXCIZNÍ OPRAVA

Excizní oprava poškozené DNA sestává nejméně ze tří základních kroků. V 1. kroku enzym DNA-endonukleáza nebo enzymový komplex obsahující endonukleázu rozezná poškozenou bázi (nebo báze) v DNA, naváže se na ni a vyštěpí ji. Ve 2. kroku enzym DNA-polymeráza zaplní mezeru s využitím nepoškozeného komplementárního řetězce DNA jako matrice. Ve 3. kroku enzym DNA-ligáza spojí zlomy ponechané DNA-polymerázou, čímž dokončí celý opravný proces. Rozeznáváme dva hlavní typy excizní opravy: **bázová excizní oprava** odstraňuje abnormální nebo chemicky modifikované báze z DNA, zatímco **nukleotidová**

excizní oprava odstraňuje rozsáhlejší defekty v DNA, jako například tyminové dimery. Oba mechanismy excizní opravy jsou účinné ve tmě a oba jsou velice podobné u *E. coli* a u člověka.

Bázová excizní oprava (**obr. 13.23**) je zahájena činností některého zeskupiny enzymů nazývaných DNA-glykozylázy, které jsou schopny rozpoznat abnormální báze v DNA. Každá glykozyláza rozeznává jen určitou formu poškození bází v DNA, například deaminovanou bázi, bázi poškozenou kyslíkem atd. (krok 2). Glykozylázy štěpí glykozidovou vazbu mezi poškozenou bází a 2-deoxyribozou, čímž vytváří v DNA apurinová nebo apyrimidinová místa (AP-místa) s odstraněnými bázemi (krok 3). AP-místa jsou rozeznávána enzymy označovanými jako AP-endo-nukleázy, které působí společně s fosfodiesterázami a vyštěpují v těchto místech cukr-fosfátové skupiny (krok 4). Následně DNA-polymeráza nahradí chybějící nukleotid podle specifikace komplementárního řetězce (krok 5) a DNA-ligáza spojí zlomy (krok 6).



Obr. 13.22 ► Štěpení křížových vazeb tyminového dimeru pomocí fotolyázy, která je aktivována světlem. Šipky označují opačnou polaritu komplementárních řetězců DNA.

Nukleotidová excizní oprava odstraňuje z DNA větší typy poškození, jako jsou tyminové dimery či báze s navázanými velkými chemickými skupinami. Při tomto typu opravy nejprve vznikají pomocí aktivity specifické endonukleázy zářezy z obou stran poškozeného nukleotidu(ů), a následně dochází k vyštěpení oligonukleotidového fragmentu obsahujícího poškozenou bázi (báze). Tato zvláštní nukleáza se označuje jako **excinukleáza**, aby byla odlišitelná od endonukleáz a exonukleáz, které se účastní metabolismu DNA.

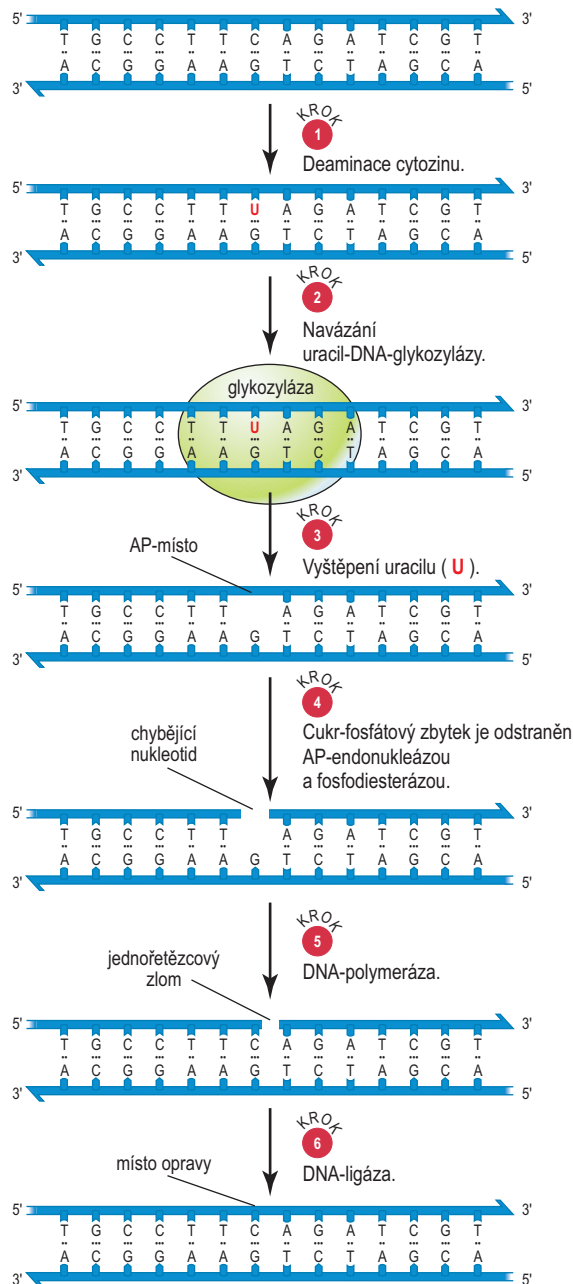
Schéma nukleotidové excizní opravy u *E. coli* je znázorněno na **obr. 13.24**. U *E. coli* je excinukleázová aktivita zprostředkována produkty tří genů, *uvrA*, *uvrB* a *uvrC* (označení *uvr* vzniklo z počátků anglických slov *UV repair*). Nejprve trimetrický protein obsahující dva polypeptidy UvrA a jeden polypeptid UvrB rozezná poškození v DNA, naváže se na ně a s využitím energie získané z ATP způsobí v poškozeném místě ohyb. Následně se dimer UvrA uvolní a na komplex UvrB/DNA se naváže protein UvrC. V dalším kroku rozštěpí protein UvrB pátoú fosfodiesterovou vazbu od místa poškozeného nukleotidu(ů) na 3'-místě a protein UvrC hydrolyzuje osmou fosfodiesterovou vazbu od místa poškození na 5'-místě. DNA-helikáza II, produkt genu *uvrD*, následně uvolní vyštěpený dodekamer. Během posledních dvou kroků této kaskády zaplní DNA-polymeráza I mezeru a DNA-ligáza spojí zbylé zlomy v molekule DNA.

Nukleotidová excizní oprava u člověka probíhá podobně jako u *E. coli*, ale účastní se jí asi čtyřikrát více proteinů. Excinukleázovou aktivitu u člověka zprostředkuje 15 polypeptidů. Poškozený nukleotid(y) je nejprve rozeznáván proteinem XPA (z počátků slov *xeroderma pigmentosum protein A*), který se na něj naváže, a tím aktivuje další proteiny potřebné pro excinukleázovou aktivitu. U člověka má vyštěpený oligomer délku 24 až 32 nukleotidů v porovnání s dodekamerem odstraňovaným u *E. coli*. Následně je mezera zaplněna buď DNA-polymerázou δ , nebo ϵ , a celý proces dokončuje DNA-ligáza.

DALŠÍ MECHANIZMY OPRAVY DNA

Výzkumy mechanismů opravy DNA, které byly provedeny v několika posledních letech, prokázaly existenci celé řady opravných enzymů, které v DNA nepřetržitě vyhledávají různé typy poškození počínaje tyminovými dimery indukovanými ultrafialovým světlem až k modifikacím příliš rozmanitým a početným, než aby je zde bylo možno popsat. Nové výsledky ukázaly, že významnou úlohu v různých procesech opravy DNA mají některé dříve neznámé DNA-polymerázy. Detailní popis těchto významných procesů opravy DNA přesahuje rámec tohoto textu; nicméně jejich význam je nedocenitelný. Co je důležitější pro přežití druhu než udržení integrity vlastní genetické informace?

V kapitole 10 jsme vysvětlili mechanismus, kterým prostřednictvím 3' → 5'-exonukleázové aktivity DNA-polymerázy probíhá tzv. korektura DNA-řetězců během jejich



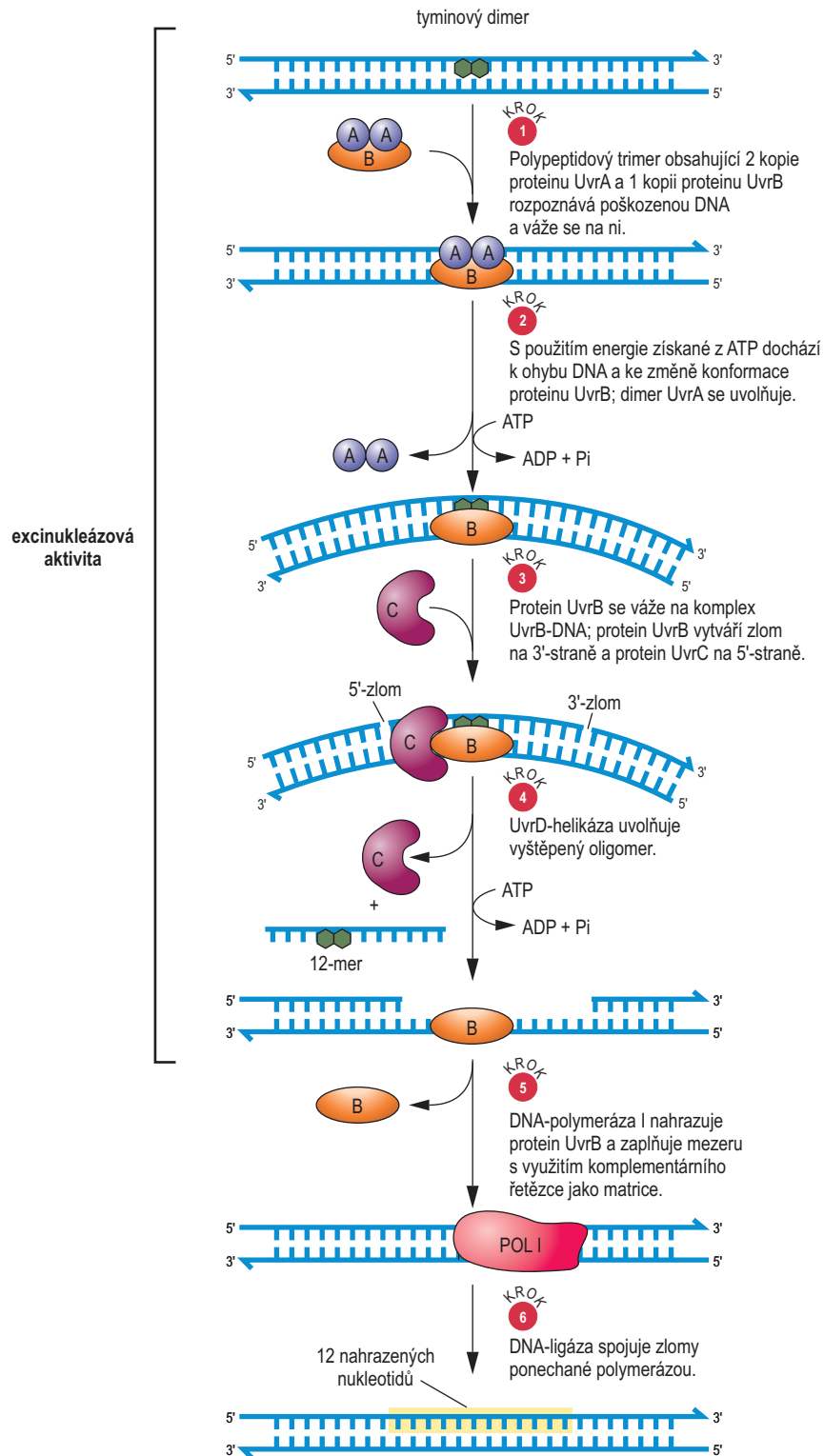
Obr. 13.23 ▶ Oprava DNA pomocí bázev excizní opravy. Bázev excizní oprava může být zahájena činností jakékoli z několika různých DNA-glykozyáz. Na uvedeném příkladě zahajuje opravný proces uracil-DNA-glykozyláza.

syntézy, což umožňuje odstranit chybně zařazený nukleotid z 3'-konce rostoucího řetězce. Další mechanismus post-replikační opravy DNA, **oprava chybného párování bází řízená metylací** (mismatch repair), představuje pojistku této replikační korektury, neboť opravuje chybně zařazené nukleotidy, které zůstaly v DNA po replikaci. Chybné párování často postihuje čtyři normální báze v DNA. Tak například T se může chybně párovat s G. Protože jak T, tak i G jsou normální složky DNA, systém opravy chybného párování potřebuje nějak rozlišit, zdali T nebo G je správně

zařazená báze na daném místě. Opravný systém rozpozná tuto skutečnost na základě identifikace matricového řetězce, který obsahuje původní nukleotidovou sekvenci, a nově syntetizovaného řetězce, který obsahuje chybně vloženou bázi (chybu). U bakterií se toto rozlišení děje na základě metylace jednoho z řetězců replikované DNA. U *E. coli* je A v sekvencích GATC následně po jejich syntéze metylován. Po určitou dobu je tak matricový řetězec metylovaný, zatímco nově syntetizovaný řetězec je dosud nemethylovaný. Tento rozdíl v metylaci využívá systém opravy chybného párování, který z nově vzniklého řetězce vyštepí nesprávně zařazený nukleotid a nahradí jej správným nukleotidem s využitím metylovaného řetězce DNA jako matrice.

U *E. coli* je oprava chybného párování řízená metylací zprostředkována produkty čtyř genů, *mutH*, *mutL*, *mutS* a *mutU* (= *uvrD*). Protein MutS rozeznává nesprávný pár, váže se na něj a iniciuje opravný proces. Následně se k tomuto komplexu připojují proteiny MutH a MutL. Protein MutH se vyznačuje vůči sekvenci GATC *specifickou endonukleázovou aktivitou*, kterou tuto sekvenci štěpí v nemethylovaném řetězci v místech, kde se nachází v hemimethylovaném (to je z poloviny metylovaném) stavu (tj. je metylována jen na jenom řetězci). Ke štěpení dochází buď ve směru 5', nebo 3' vzhledem k chybnému páru bází a může být od něj vzdáleno 1000 nukleotidových párů nebo i více. Následné odstranění úseků s chybnou bází vyžaduje proteiny MutS, MutL, DNA-helikázu II (MutU) a vhodnou exonukleázu. Jestliže vzniká zářez v sekvenci GATC na 5'-straně, je vyžadována exonukleáza působící ve směru 5' → 3', jako je například exonukleáza VII z *E. coli*. Pokud vzniká zářez na 3'-straně, je nutná exonukleázová aktivita působící ve směru 3' → 5', jako je tomu například u exonukleázy I z *E. coli*. Jakmile excizní proces odstraní chybně zařazený pár z nemethylovaného řetězce, DNA-polymeráza III zaplní velkou – až 1000 bp – mezeru a DNA-ligáza spojí zlomy.

Homology proteinů MutS a MutL, které jsou přítomny u *E. coli*, se vyskytují také u hub, u rostlin a u savců – což je známka toho, že podobný mechanismus opravy řízené metylací existuje též u eukaryot. Konkrétně byla oprava chybného párování řízená metylací prokázána *in vitro* s použitím jaderného extraktu získaného z lidských buněk. Zdá se tedy, že tento typ opravy je univerzálním nebo téměř univerzálním mechanismem ochrany genetické informace uchovávané v dvouřetězcové DNA. Fotoreaktivace, excizní oprava a oprava chybného párování řízená metylací může být u *E. coli* eliminována mutacemi v genech *phr* (z anglického slova *photoreactivation*), *uvr* a *mut*. U mutantů, kteří postrádají více než jeden z těchto opravných mechanismů, je funkční ještě další systém opravy DNA, a to systém postreplikační opravy. Pokud se polymeráza III setká s tyminovým dimerem v matricovém řetězci, její postup bude blokována. DNA-polymeráza pak obnoví syntézu DNA v některém místě za dimerem, čímž vzniknou mezery v dceřiném řetězci v místě oproti dimeru v matricovém řetězci. V tomto bodě dojde ke ztrátě původní nukleotidové



Obr. 13.24 ▶ Oprava DNA pomocí nukleotidové excizní opravy u *E. coli*. Pro excinukleázovou (excizní nukleáza) aktivitu jsou nezbytné produkty tří genů – *uvrA*, *uvrB* a *uvrC*. Nukleotidová excizní oprava u člověka probíhá podobně, účastní se jí ale mnohem více proteinů a vyštěpený oligomer má délku 24 až 32 nukleotidů.

sekvence v obou řetězcích nové dvoušroubovice. Poškozená molekula DNA je opravena procesem závislým na rekombinaci, který je u *E. coli* zprostředkován produktem genu *recA*. Protein *RecA*, který je nutný pro homologickou rekombinaci, stimuluje výměnu jednořetězcových úseků mezi homologickými dvoušroubovicemi. V průběhu post-

replikační opravy se protein *RecA* váže na jednořetězcové úseky v mezerách a zprostředkovává párování s homologickými segmenty sesterské dvoušroubovice. Mezera oproti dimeru je poté zaplněna homologickým řetězcem pocházejícím ze sesterské molekuly DNA. Mezera vzniklá v sesterské dvoušroubovici je zaplněna DNA-polymerázou a zlomy

jsou spojeny pomocí DNA-ligázy. Tyminový dimer sice zůstává v matricovém řetězci dceřiné molekuly DNA, avšak komplementární řetězec je nyní intaktní. Pokud není tyminový dimer odstraněn pomocí nukleotidové excizní opravy, musí se tato postreplikační oprava opakovat po každém cyklu replikace DNA.

Mechanismy opravy DNA, které zde byly doposud popisovány, jsou poměrně přesné. Nicméně pokud je DNA u *E. coli* silně poškozena mutagenními faktory, jako například UV zářením, buňky, ve snaze přežít, přistupují k drastickým krokům. Je u nich indukována tzv. **SOS odpověď**, během které je syntetizována celá baterie DNA-opravných, rekombinačních a replikačních proteinů. Dva z těchto proteinů, jež jsou kódovány geny *umuC* a *umuD* (z anglických slov *UV mutable*), tvoří podjednotky polymerázy V, tj. enzymu, který katalyzuje replikaci DNA v poškozených oblastech chromozomu – tj. v místech, kde je blokována replikace pomocí DNA-polymerázy III. DNA-polymeráza V umožňuje pokračování replikace přes poškozené segmenty matricového řetězce, třebaže nukleotidové sekvence v poškozeném úseku nemusí být replikovány zcela přesně. Tento *mechanismus chybující opravy* (error-prone repair) sice eliminuje mezery vzniklé v nově syntetizovaných řetězcích oproti poškozeným nukleotidům v matricových řetězcích, avšak zvyšuje přitom četnost replikačních chyb.

Mechanismus, kterým je indukována SOS odpověď v důsledku poškození v DNA, byl prozkoumán do značných podrobností. Přitom bylo zjištěno, že SOS odpověď řídí dva klíčové regulátorové proteiny – LexA a RecA. Oba tyto proteiny jsou syntetizovány v malém množství i v buňce s nepoškozenou DNA. V tomto stavu se LexA váže na oblasti

v DNA, které regulují transkripci genů, jež jsou indukovány SOS odpovědí, a udržuje jejich expresi na nízké úrovni. Pokud jsou buňky vystaveny ultrafialovému záření nebo jiným látkám, které způsobují poškození v DNA, váže se protein RecA na jednořetězcové úseky v DNA, které vznikají v důsledku neschopnosti DNA-polymerázy III replikovat poškozené oblasti. Interakce RecA-proteinu s poškozenou DNA vede k aktivaci RecA-proteinu, který následně způsobuje inaktivaci LexA v důsledku jeho vlastního štěpení. Když je LexA-protein inaktivní, vzrůstá úroveň exprese SOS genů – jako jsou geny *recA*, *lexA*, *umuC*, *umuD* a jiné –, a tím dochází k aktivaci celého systému chybující opravy.

Zdá se, že SOS odpověď je poněkud zoufalým a riskantním pokusem, jak se vyhnout letálním účinkům vyplývajícím z těžce poškozené DNA. Pokud je chybující oprava v činnosti, mutace vznikají velmi rychle.

Současné výzkumy mechanismů opravy DNA naznačují, že zůstává ještě mnoho dalších opravných mechanismů, které je třeba prozkoumat. V průběhu několika uplynulých let bylo charakterizováno několik nových DNA-polymeráz, které mají rozmanitou úlohu při opravě DNA. Výsledky těchto studií naznačují, že se musíme ještě hodně učit o mechanismech, které udržují integritu naší genetické informace.

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATKY

- ▶ K ochraně integrity genetické informace se u živých organismů vyvinuly rozmanité systémy opravy DNA.
- ▶ Každá opravná dráha opravuje specifický typ poškození DNA.

▶ Dědičné choroby u člověka způsobené poruchami opravy DNA

Několik dědičných chorob u člověka je důsledkem poruch v mechanismech opravy DNA.

Jak jsme uvedli na začátku této kapitoly, jedinci postižení chorobou xeroderma pigmentosum (XP) jsou extrémně citliví k slunečnímu záření. Pokud jsou tito pacienti vystaveni slunečnímu světlu, vznikají u nich s vysokou četností nádory kůže (**obr. 13.25**). Buňky jedinců s XP mají poruchu v opravě poškození DNA vyvolaném UV zářením, jako jsou například tyminové dimery. Onemocnění XP může vzniknout jako důsledek defektů v jakémkoliv z alespoň osmi různých genů. Produkty sedmi z těchto genů, *XPA*, *XPB*, *XPC*, *XPD*, *XPE*, *XPF* a *XPB*, jsou potřebné pro nukleotidovou excizní opravu (**tab. 13.1**). Když byly tyto proteiny purifikovány, zjistilo se, že jsou nezbytné z hlediska excinukleázové aktivity. Protože však excinukleázová aktivita

u člověka vyžaduje přítomnost 15 polypeptidů, seznam genů *XP* se v budoucnosti pravděpodobně ještě rozšíří. Důsledkem poruchy v nukleotidové excizní reparaci jsou i dvě další lidské choroby, Cocaynovův syndrom a trichothiodystrofie. Jedinci s Cocaynovým syndromem vykazují opožděný růst a poruchy mentálních schopností, avšak nemají vyšší výskyt nádorů kůže. Pacienti s trichothiodystrofií mají krátké končetiny, lomivé vlasy, šupinatou pokožku a trpí těžkou psychomotorickou retardací. Jedinci s Cocaynovým syndromem nebo trichothiodystrofií mají poruchu určitého typu excizní opravy, který je spjat s transkripcí. Podrobnosti o tomto opravném procesu spojeném s transkripcí nejsou ještě dostatečně prostudovány.



Obr. 13.25 ► Fenotypové účinky dědičné choroby *Xeroderma pigmentosum*. U jedinců postižených tímto autozomově recesivním onemocněním způsobuje sluneční světlo častý vznik kožních nádorů.

Kromě poškození kožních buněk jsou pro některé jedince s XP typické také neurologické abnormality, které vznikají jako důsledek předčasného odumření nervových buněk. Tento účinek na jinak velmi dlouho žijící nervové buňky může přinést nový pohled na příčiny stárnutí. Podle jedné z teorií vzniká stárnutí v důsledku hromadění somatických mutací. Pokud by tomu tak bylo, očekávali bychom, že porušený opravný systém proces stárnutí urychlí, jako se děje v případě nervových buněk u pacientů s XP. Nicméně v současné době je důkazů o vztahu somatických mutací a stárnutí k dispozici stále málo.

Ataxia-telangiectasia, Fanconiho anémie, Bloomův syndrom, Wernerův syndrom, Rothmundův-Thomsonův syndrom a Nijmegen breakage syndrom je šest dalších dědičných chorob u člověka, které souvisejí se známými poruchami metabolismu DNA. Všechny šest chorob vykazuje autozomově recesivní dědičnost a doprovází je vysoké riziko vzniku malignit, zejména leukémie v případě ataxie-telangiectasie a Fanconiho anémie. Buňky pacientů postižených ataxií-telangiectasií jsou abnormálně citlivé k ionizujícímu záření, což naznačuje, že mají poruchu v opravě poškození DNA indukovaného zářením. Buňky jedinců s Fanconiho anémií nemají schopnost odstraňovat meziřetězcové křížové vazby, které vznikají například po působení antibiotika mitomycinu C. U jedinců s Bloomovým syndromem a Nijmegen breakage syndromem nacházíme vysokou četnost chromozomových zlomů, které vedou ke vzniku chromozomových aberací (kapitola 6) a sesterských chromatidových výměn. Ataxia-telangiectasia je způsobena poruchami v kináze podílející se na kontrole buněčného cyklu a Bloomův syndrom, Wernerův syndrom a Rothmundův-Thomsonův syndrom jsou způsobeny poruchami specifických DNA-helikáz (příslušníci rodiny helikáz RecQ). V **tab. 13.1** jsou uvedeny některé nejznámější lidské choroby vzniklé v důsledku dědičné poruchy v mechanismech oprav DNA. Důkaz, že počátek dědičného nepolypózního kolorektálního karcinomu souvisí s poruchou opravy chybně zařazené báze v DNA řízené metylací (mismatch repair), naznačuje, že podobné defekty v jiných mechanismech opravy DNA mohou být příčinou specifických typů lidských nádorů (kapitola 22).

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATKY

- Význam mechanismů opravy DNA přesvědčivě dokumentuje existence dědičných chorob u člověka, které vznikají v důsledku poruch při opravě DNA.
- Určité typy nádorů souvisí s poruchami mechanismů opravy DNA.

► Mechanizmy rekombinace DNA

Rekombinace mezi homologickými molekulami DNA je zprostředkována aktivitou mnoha enzymů, které štěpí a rozmotávají DNA, stimulují vzájemné prostupování řetězců mezi dvoušroubovicemi, opravují a spojují řetězce DNA.

V kapitole 7 jsme popsali hlavní rysy rekombinace mezi homologickými chromozomy, avšak neuváděli jsme molekulární podrobnosti tohoto procesu. Protože mnoho genových produktů podílejících se na reparaci poškozené DNA se účastní také rekombinace mezi homologickými chromozomy nebo crossing-overu, podíváme se nyní podrobněji na některé molekulární aspekty tohoto významného procesu. Rekombinace obvykle, možná vždy, zahrnuje i opravnou

syntézu DNA. Z tohoto důvodu platí mnoho informací z předchozích oddílů též pro mechanismus rekombinace.

U eukaryot je crossing-over spjat s tvorbou synaptonemálního komplexu, který vzniká během profáze prvního meiotického dělení. Tato struktura se skládá především z proteinů a RNA. Z neznámých důvodů se crossing-over vyskytuje jen velmi vzácně u samečků drozofily. (Crossing-over se jinak vyskytuje u obou pohlaví většiny druhů; to, že

► Tab. 13.1

Dědičné nemoci u člověka způsobené poruchami opravy DNA

dědičné onemocnění	gen	chromozom	funkce produktu	hlavní příznaky
1. xeroderma pigmentosum	<i>XPA</i>	9	protein rozpoznávající poškození DNA	citlivost k UV záření, předčasný vznik nádorů kůže neurologické poruchy
	<i>XPB</i>	2	3' → 5' helikáza	
	<i>XPC</i>	3	protein rozpoznávající poškození DNA	
	<i>XPD</i>	19	5' → 3' helikáza	
	<i>XPE</i>	11	protein rozpoznávající poškození DNA	
	<i>XPF</i>	16	nukleáza, 3' štěpení	
	<i>XPG</i>	13	nukleáza, 5' štěpení	
2. Cockaynův syndrom	<i>CSA</i>	5	protein excizní opravy DNA	citlivost k UV záření, neurologické a vývojové poruchy, předčasná stárnutí
	<i>CSB</i>	10	protein excizní opravy DNA	
3. trichothiodystrofie	<i>TTDA</i>	6	bazální transkripční faktor IIIH	citlivost k UV záření, neurologické poruchy, mentální retardace
4. ataxia-telangiectasia	<i>ATM</i>	11	serin/treoninová kináza	citlivost k ionizujícímu záření, chromozomová nestabilita, předčasná progresivní neurodegenerace, vznik nádorů
5. Fanconiho anémie	<i>FA</i> (8 genů, <i>A-H</i> , na 5 různých chromozomech)			citlivost k látkám tvořícím v DNA křížové vazby chromozomová nestabilita, vznik nádorů
6. Bloomův syndrom	<i>BLM</i>	15	BLM RecQ helikáza	chromozomová nestabilita, mentální retardace, vznik nádorů
7. Wernerův syndrom	<i>WRN</i>	8	WRN RecQ helikáza	chromozomová nestabilita, progresivní neurodegenerace, vznik nádorů
8. Rothmundův-Thomsonův syndrom	<i>RECQL4</i>	8	RecQ helikáza L4	chromozomová nestabilita, mentální retardace, vznik nádorů
9. Nijmegen breakage syndrom	<i>NBS1</i>	8	protein rozpoznávající dvouřetězcový zlom v DNA	chromozomová nestabilita, mikrocefalie (malá lebka), vznik nádorů

téměř chybí u heterogametického pohlaví, je zvláštnost drozofily a několika málo jiných druhů.) Je zajímavé, že u drozofily v průběhu prvního meiotického dělení při spermatogenezi synaptonemální komplex nevzniká. Nadto, mutace v genu *c3G* u drozofily blokuje jak crossing-over, tak tvorbu synaptonemálního komplexu u samiček. Zdá se tedy, že crossing-over a vznik synaptonemálního komplexu jsou úzce spojeny. V průběhu tvorby synaptonemálního komplexu probíhá v malé míře i syntéza DNA, která je patrně součástí synapse a crossing-overu.

REKOMBINACE: ŠTĚPENÍ A ZNOVUSPOJENÍ MOLEKUL DNA

V kapitole 7 jsme probírali pokus Creightonové a McClintockové dokazující, že crossing-over je způsoben zlomy v rodičovských chromozomech a znovuspojením

jejich částí za vzniku nových kombinací. Důkazy o tom, že při rekombinaci vznikají zlomy a dochází ke znovuspojení, byly získány také pomocí autoradiografie i dalších technik. I když jsou hlavní rysy mechanismu rekombinace nyní dobře prostudovány, některé specifické podrobnosti zbývá ještě objasnit.

Mnoho poznatků o molekulární podstatě crossing-overu přinesly studie *rekombinačně-deficientních mutantů E. coli* a *S. cerevisiae*. Biochemické analýzy těchto mutantů prokázaly, že postrádají různé enzymy a jiné proteiny nezbytné pro rekombinaci. Výsledky genetických a biochemických studií tak poskytly poměrně ucelený obraz mechanismu rekombinace na molekulární úrovni.

Mnoho současných oblíbených modelů crossing-overu bylo odvozeno od modelu, který v roce 1964 navrhl Robin Holliday. Hollidayův model poprvé nejlépe vysvětlil většinu dostupných genetických údajů mechanismem zahrnujícím



► MILNÍKY GENETIKY: Mullerův důkaz, že paprsky X jsou mutagenní

Kolem roku 1880 pozoroval Hugo de Vries náhlý vznik nových fenotypů u pupalky dvouleté, která rostla v jeho pokusné zahradě. Tyto neobvyklé rostliny nazval „sporty“ (sports) a dal jim latinská jména, neboť se domníval, že jsou to nové druhy. Aby popsal původ těchto nových druhů, zavedl de Vries v roce 1901 termín *mutace*.¹ Jak se ukázalo později, de Vriesovy „sporty“ byly výsledkem velkých změn ve struktuře chromozomů – translokací (viz kapitola 6).

Nové fenotypy vznikající v důsledku mutací byly popsány a pozorovány jako dědičné změny mnoha šlechtitelů rostlin již dříve. Nicméně teprve práce na drozofile v laboratoři Thomase Hunta Morgana přinesla jasné důkazy o účincích nových mutantních alel. První kvantitativní měření mutační četnosti provedli v roce 1919 Hermann J. Muller a Edgar Altenburg.² Tito badatelé studovali četnost X-vázaných letálních mutací u drozofily. Zásadní průlom v mutačním výzkumu nastal v roce 1927, kdy Muller prokázal, že působením paprsků X na spermie drozofily se prudce zvyšuje četnost X-vázaných letálních mutací.³ (Paprsky X jsou formou elektromagnetického záření s kratší vlnovou délkou a větší energií než je viditelné světlo; viz **obr. 13.17**.) Mullerova studie byla prvním důkazem, že mutace může být indukována nějakým vnějším faktorem. Za tento významný objev obdržel Muller v roce 1946 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.

Mullerův nezpochybnitelný důkaz mutagenity paprsků X byl umožněn tím, že vyvinul jednoduchou a přesnou techniku k průkazu letálních mutací na chromozomu X u drozofily. Tato technika, nazývaná **metoda CIB**, využívá heterozygotní samičky s jedním normálním chromozomem X a druhým změněným chromozomem X – **chromozomem CIB** –, jež Muller zkonstruoval specificky pro tento pokus.

Chromozom *CIB* má tři podstatné složky. (1) *C* znamená potlačení crossing-overu a souvisí s dlouhou inverzí, která u heterozygotních samiček potlačuje rekombinaci mezi chromozomem *CIB* a strukturálně normálním chromozomem X. Tato inverze nezabraňuje vzniku

crossing-overu mezi dvěma homologickými chromozomy, avšak způsobuje, že potomstvo s rekombinovaným chromozomem X vytvořeným crossing-overem není životaschopné v důsledku duplikací a deficiencí (viz kapitola 6). (2) *I* znamená přítomnost recesivní letální mutace na chromozomu *CIB*. Homozygotní samičky a hemizygotní samečci, kteří nesou tuto X-vázanou letální mutaci, nejsou životaschopní. (3) *B* označuje mutaci, která způsobuje fenotyp očí Bar, tj. stav, při kterém jsou velké složené oči standardních jedinců redukovány na úzké oči ve tvaru proužku. Alela *B* je částečně dominantní, proto lze samičky heterozygotní pro chromozom *CIB* snadno identifikovat. Jak recesivně letální mutace (*I*), tak i mutace ve tvaru očí Bar (*B*) jsou umístěny uvnitř invertovaného segmentu na chromozomu *CIB*.

Muller ozařoval samečky a křížil je se samičkami *CIB* (**obr. 1**). V potomstvu tohoto křížení měly všechny samičky se zúženými očima chromozom *CIB* zděděný od matky a ozářený chromozom X od otce. Protože u sameček byla ozářena celá populace reprodukčních buněk, každá samička se zúženými očima nesla potenciálně mutovaný chromozom X. Následně byly samičky se zúženými očima jednotlivě kříženy (v jednotlivých kulturách) se standardními samečkami. Pokud ozářený chromozom X u samiček se zúženými očima obsahoval získanou X-vázanou letální mutaci, v potomstvu tohoto křížení byly pouze samičky. Samečci hemizygotní pro chromozom *CIB* zahynou, neboť tento chromozom nese recesivní letální alelu (*I*). Navíc, samečci hemizygotní pro ozářený chromozom X také hynou, pokud na tomto chromozomu vznikne ozářením recesivní letální alela. Křížení samiček se zúženými očima (*CIB*), které nesou ozářený chromozom X, v němž naopak nebyla indukována letální mutace, povede ke vzniku samičího a samčího potomstva v poměru 2:1 (zahynou pouze samečci s chromozomem *CIB*). S pomocí metody *CIB* je detekce nově vzniklých recesivních letálních X-vázaných mutací jednoznačná a bezchybná; tento test neobsahuje nic složitějšího než hodnocení přítomnosti či nepřítomnosti samčího potomstva. Na základě této techniky Muller prokázal až 150násobné zvýšení četnosti X-vázaných letálních mutací po ozáření sameček drozofily paprsky X.

Po Mullerových pionýrských pokusech s drozofilou prokázali brzy i jiní badatelé, že paprsky X jsou mutagenní u jiných organizmů včetně

¹ de Vries, H. 1901. *Die Mutationstheorie*, Vol. 1, Viet, Leipzig.

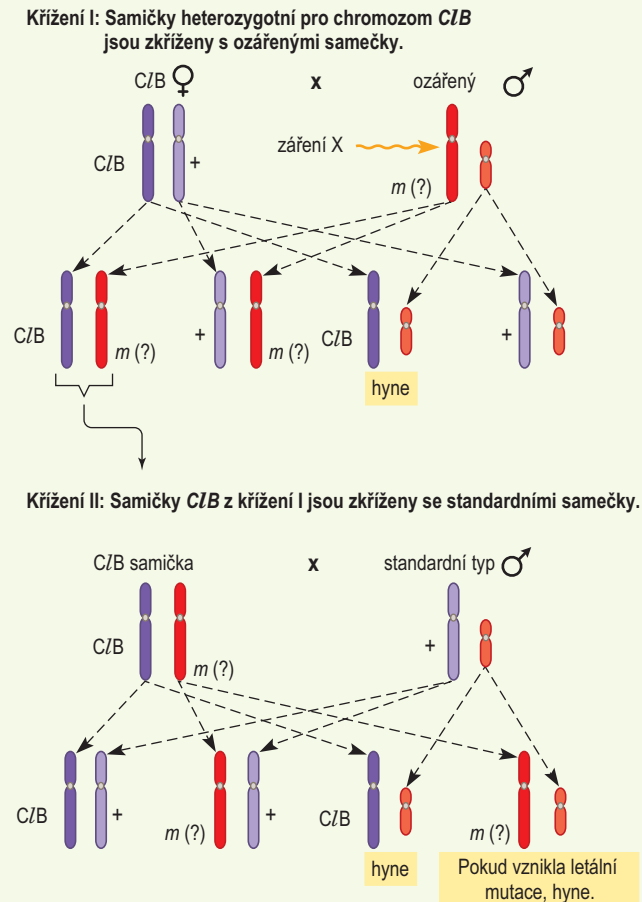
² Muller, H. J., and E. Altenburg. 1919. The rate of change of hereditary factors in *Drosophila*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 17: 10–14.

³ Muller, H. J. 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science* 66: 84–87.

zlomů, znovuspojení a opravu molekul DNA. Aktualizovaná verze Hollidayova modelu rekombinace je znázorněna na **obr. 13.26**. Tento mechanismus, stejně jako mnoho jiných, začíná vytvořením jednořetězcových zlomů vlivem endonukleáz v paralelních řetězcích v každé ze dvou rodičovských molekul DNA (vznik zlomů). Následně jsou jednořetězcové segmenty z jedné strany každého zářezu vytěsněny a vyměňují se s jejich komplementárními řetězci, a to za pomoci DNA-helikázy a proteinů vázajících se na jednořetězce. Helikázy odvinují oba řetězce DNA v oblas-

tech přilehlých k jednořetězcovým zářezům. U *E. coli* existuje komplex *RecBCD*, který má jak endonukleázovou aktivitu způsobující v DNA jednořetězcové zlomy, tak i DNA-helikázovou aktivitu, která odvinuje komplementární řetězce DNA v oblasti přilehlé ke každému zářezu.

Oba přemístěné řetězce si potom vymění párovací partnery (matrici) a párují se s neporušenými komplementárními řetězci homologických chromozomů. Tento proces je zprostředkováván určitými proteiny, jako je například protein *RecA* u *E. coli*. Proteiny *RecA* již byly charakterizovány



Obr. 1 ▶ Technika *CIB* použitá Mullerem k průkazu X-vázaných recesivních letálních mutací u drozofily. Pokud bude v ozářeném chromozomu X přítomna recesivní letální mutace, v potomstvu křížení II vzniknou pouze samičky. Pokud v ozářeném chromozomu X nevznikla recesivní letální mutace, jednu třetinu potomstva v křížení II budou tvořit samečci. Průkaz letálních mutací tedy spočívá pouze v hodnocení přítomnosti či nepřítomnosti samečků v potomstvu křížení II.

rostlin, dalších živočichů a mikrobů. Kromě toho bylo brzy zjištěno, že i další typy elektromagnetického záření s vysokou energií a také mnoho chemických látek jsou potenciálními mutageny. Tato schopnost indukovat mutace v genech nesmírně přispěla k rozvoji genetiky. Umožnila vědcům vyvolávat mutace v jednotlivých genech a vyřazovat jejich funkce. Na základě studia mutantních organismů byly získány informace o funkci genového produktu u standardního typu. Tento přístup – mutační analýza biologických procesů – se osvědčil jako účinný nástroj při poznání mnoha biologických procesů.

OTÁZKY K DISKUZÍ

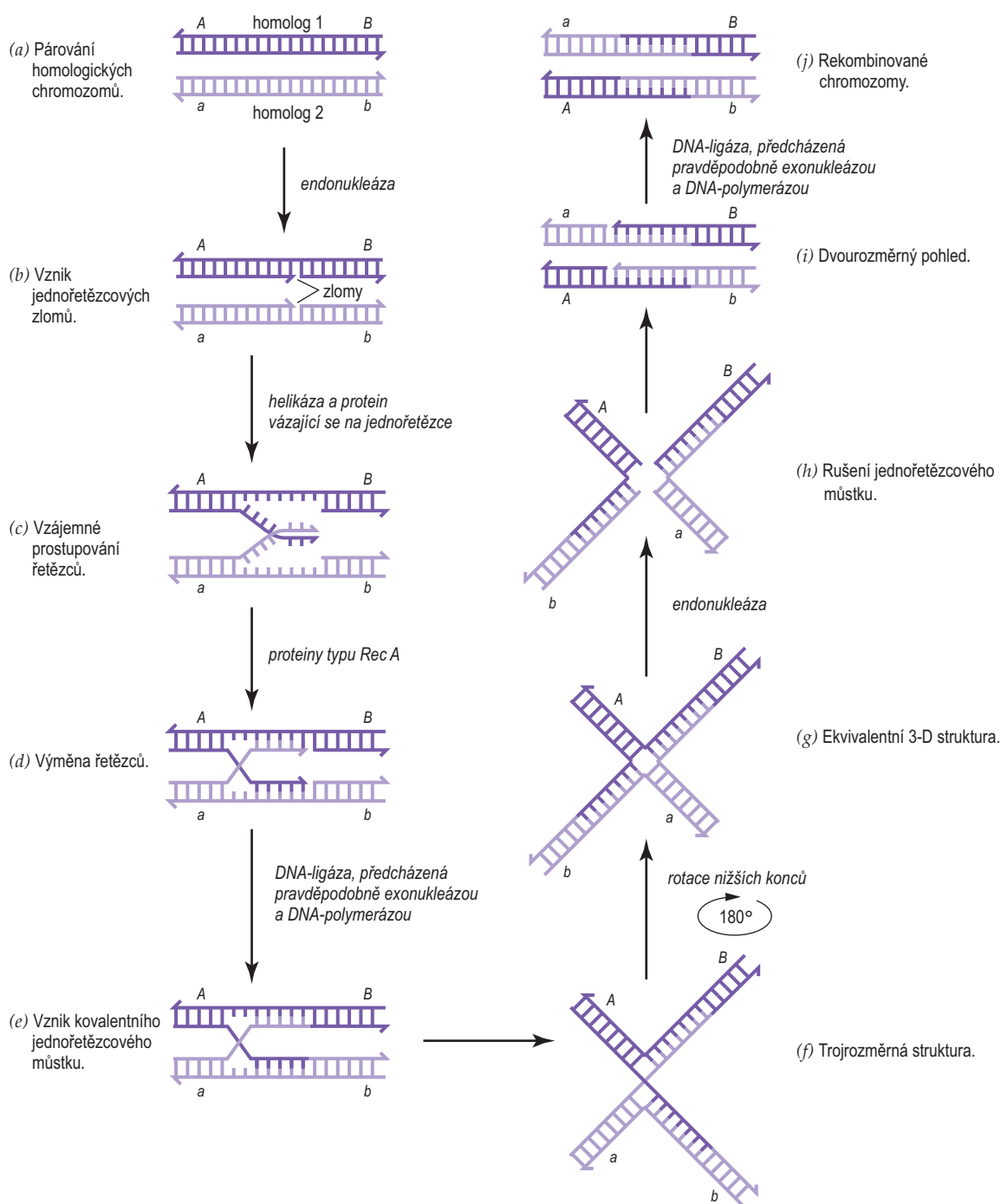
1. Muller prokázal, že paprsky X vyvolávají mutace u drozofily. Následující výzkumy v mnoha laboratořích potvrdily, že paprsky X jsou mutagenní u všech organismů, včetně člověka. Mimoto představují paprsky X i významný diagnostický nástroj v medicíně a v zubním lékařství. Pokud je prováděno diagnostické ozařování, lékařský personál vám poskytne olovenou zástěru, aby nedošlo k ozáření reprodukčních buněk v těle. To je ochrání a zmenší pravděpodobnost vzniku nových mutací, které by mohly být přeneseny na potomky. Nicméně paprsky X indukují mutace i v somatických buňkách a některá z těchto mutací může zvýšit pravděpodobnost následného vzniku rakoviny. Jaká nařízení se vztahují k využívání paprsků X pro diagnostické účely? Jaké skutečnosti by měly být zvažovány při stanovení těchto pravidel?
2. Kromě paprsků X jsou vysoce mutagenní i jiné typy záření s vysokou energií, jako například gama záření, kosmické záření a částice vzniklé rozpadem radioaktivních látek používaných v jaderných zbraních a při jaderných reakcích. V roce 1986 se potenciální nebezpečí jaderných reaktorů stalo realitou, když explodovala jaderná elektrárna v blízkosti Černobylu na Ukrajině a zamořila okolní krajinu. Ačkoli jsou jaderné reaktory významným ekonomickým zdrojem elektřiny, potenciální možnost nehod, podobných jako byla v Černobylu, zůstává. Jaká jsou pro a proti z hlediska využívání jaderných reaktorů pro výrobu ekonomicky výhodné a „ekologicky přátelské“ energie?

u mnoha druhů, a to jak prokaryotických, tak i eukaryotických. Protein RecA a jeho homology katalyzují *asimilaci jednořetězců DNA*, tj. proces, při kterém dochází k nahrazení jednoho řetězce dvouřetězcové molekuly DNA homologickým řetězcem jiné molekuly. Proteiny typu RecA katalyzují reciproké výměny jednořetězcových úseků mezi dvěma dvouřetězcovými molekulami DNA ve dvou krocích. V prvním kroku je jeden řetězec jedné dvouřetězcové molekuly asimilován druhou homologickou dvouřetězcovou molekulou, přičemž nahradí identický nebo homologický

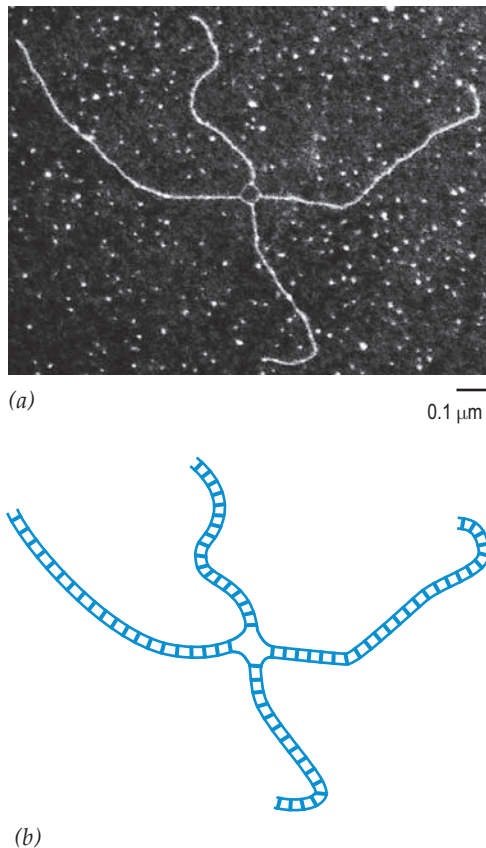
řetězec a páruje se s komplementárním řetězcem. Ve druhém kroku je nahrazený řetězec podobně asimilován první dvouřetězcovou molekulou DNA. RecA-protein katalyzuje tyto výměny tím, že se váže na nespárovaný řetězec DNA, napomáhá vyhledávat homologickou sekvenci v DNA, a jakmile je homologická dvouřetězcová molekula nalezena, provede nahrazení jednoho řetězce nespárovaným řetězcem. Pokud již existují komplementární sekvence ve formě jednořetězcových úseků, zvyšuje přítomnost proteinu RecA rychlost denaturace více než 50krát.

Rozštěpené řetězce se potom kovalentně spojí za vzniku nových kombinací pomocí DNA-ligázy (zvouspojení). Pokud nevznikly původní zlomy ve dvou řetězcích v přesně stejném místě obou homologů, je nutné určité přizpůsobení před tím, než ligáza katalyzuje zvouspojení. Toto přizpůsobení zahrnuje vyštěpení nukleotidů pomocí exonukleázy a opravnou syntézu zprostředkovanou DNA-polymerázou. Posloupnost jednotlivých kroků, kterou

jsme zde popsali, vytváří při rekombinaci strukturu ve tvaru X označovanou jako *chi-struktura*. Ta byla pozorována pomocí elektronového mikroskopu u několika druhů (**obr. 13.27**). Chi-struktury jsou rozloženy pomocí enzymaticky katalyzovaného zlomu a zvouspojení komplementárních řetězců DNA, čímž vznikají dvě rekombinované molekuly DNA. U *E. coli* může být chi-struktura rozložena buď pomocí produktu genu *recG*, nebo genu *ruvC* (z anglic-



Obr. 13.26 ► Mechanismus rekombinace mezi homologickými molekulami DNA. Znázorněné schéma je založeno na modelu, který původně navrhl v roce 1964 Robin Holliday.



Obr. 13.27 ▶ Snímek z elektronového mikroskopu (a) a schéma (b) rekombinačního meziproduktu ve tvaru X neboli chi-struktury.

kých slov repair of UV-induced damage). Každý z těchto genů kóduje endonukleázu, která katalyzuje štěpení řetězců v chi-struktuře (viz **obr. 13.26**).

Značné množství důkazů naznačuje, že k homologické rekombinaci může dojít více než jedním mechanismem – pravděpodobně několika různými mechanismy. U *S. cerevisiae* bylo zjištěno, že konce molekul DNA, které byly vytvořené dvouřetězcovými zlomy, jsou velmi rekombinogenní. Tento fakt a některé další skutečnosti naznačují, že rekombinace u kvasinek často zahrnuje dvouřetězcový zlom v jedné rodičovské dvoušroubovici. Proto v roce 1983 navrhli Jack Szostak, Franklin Stahl a kolegové pro vysvětlení crossing-overu *model dvouřetězcového zlomu*. Podle tohoto modelu je rekombinace založená na dvouřetězcovém zlomu, který vznikl v jedné z rodičovských dvoušroubovic, a nikoliv na jednořetězcových zlomech, jak předpokládá Hollidayův model. Tento počáteční zlom se následně rozšíří a vytvoří mezery v obou řetězcích. Dva jednořetězcové konce vzniklé v dvouřetězcové mezeře této dvoušroubovice postupně naruší nepoškozenou dvoušroubovici a nahradí v určité oblasti segmenty v homologickém řetězci. Vzniklé mezery jsou potom zaplněny pomocí opravné syntézy DNA. Tímto procesem vzniknou dva homologické chromozomy spojené dvěma jednořetězcovými můstky. Tyto můstky jsou potom zrušeny pomocí endonukleázového štěpení, stejně jako

v případě Hollidayova modelu. Jak model dvouřetězcového zlomu, tak i Hollidayův model výborně vysvětlují vznik chromozomů, u kterých došlo k rekombinaci genetických markerů vymezujících oblast, v níž se vyskytl crossing-over.

GENOVÁ KONVERZE: OPRAVNÁ SYNTÉZA DNA SPOJENÁ S REKOMBINACÍ

Až do této chvíle jsme hovořili pouze o mechanismech rekombinace, které lze vysvětlit zlomy v homologických chromatidách a následnými reciprokými výměnami jejich částí. Tetrádová analýza u askomycet však odhalila, že genetická výměna nemusí být vždy reciproká. Tak například provedeme-li křížení mezi dvěma těsně vázanými mutacemi u neurospory a následně analyzujeme vřecka obsahující standardní typ rekombinantů, zjišťujeme, že tato vřecka často neobsahují reciproké dvojnásobně mutantní rekombinanty.

Uvažujme křížení se dvěma těsně vázanými mutacemi, m_1 a m_2 . Po křížení $m_1 m_2^+$ s $m_1^+ m_2$ pozorujeme vřecka následujících typů:

- dvojice spor 1: $m_1^+ m_2$
- dvojice spor 2: $m_1^+ m_2^+$
- dvojice spor 3: $m_1 m_2^+$
- dvojice spor 4: $m_1 m_2$

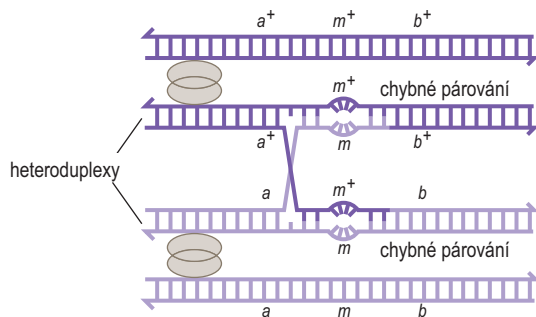
Z výsledků je patrné, že ve vřecku jsou přítomné spory standardního typu $m_1^+ m_2^+$, avšak dvojnásobně mutantní spory typu $m_1 m_2$ ve vřecku chybí. Reciprokou rekombinací by však měl vzniknout chromozom $m_1 m_2$, kdykoliv vzniká chromozom $m_1^+ m_2^+$. V tomto vřecku je však poměr $m_2^+ : m_2$ 3 : 1, a ne 2 : 2, jak bychom očekávali. Zdá se, jako by jedna z alel m_2 „konvertovala“ do alelové formy m_2^+ . Tento typ nereciproké rekombinace se nazývá **genová konverze**. Můžeme si představit, že genová konverze je důsledkem mutace, vyskytuje se však s vyšší četností než odpovídající mutační jevy, vždycky vytváří alelu přítomnou na homologickém chromozomu, a ne alelu novou a je korelována asi v 50 procentech případů s reciprokou rekombinací sledovaných markerů. Poslední pozorování jasně ukazují, že genová konverze je důsledkem jevů, které vznikají během crossing-overu. Dnes se předpokládá, že genová konverze je výsledkem opravné syntézy DNA související se zlomy, vyštěpením a znovuspojením, k nimž dochází v průběhu crossing-overu.

U těsně vázaných markerů se genová konverze vyskytuje častěji než reciproká rekombinace. V jedné studii provedené v genu *his1* u kvasinek vykazovalo konverzi genů 980 z 1081 vřecek obsahujících rekombinanty his^+ , zatímco pouze u 101 z nich se projevila klasická reciproká rekombinace.

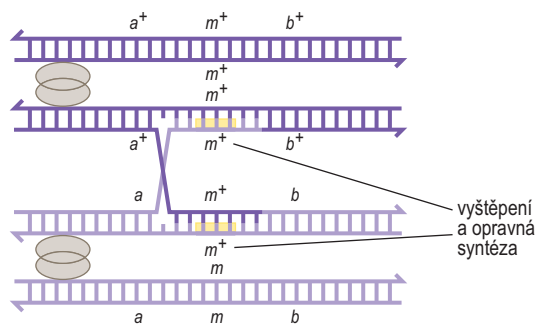
Nejpozoruhodnějším rysem genové konverze je to, že není udržován vstupní poměr alel 1 : 1. To může být snadno vysvětleno tím, že krátké segmenty rodičovské DNA jsou degradovány a následně resyntetizovány s využitím maticových řetězců DNA nesoucích jinou alelu. Vezmeme-li

v úvahu mechanismus excizní opravy probraný dříve v této kapitole, tak Hollidayův model crossing-overu vhodně vysvětluje genovou konverzi genetických markerů umístěných v bezprostředním okolí místa crossing-overu. Na **obr. 13.26d-i** je znázorněn segment DNA mezi lokusy *A* a *B*, kde jsou spárovány komplementární řetězce DNA ze dvou homologických chromozomů. Pokud se třetí pár alel umístěný uvnitř tohoto segmentu bude rozcházet v místě překřížení, vznikne v těchto dvou dvoušroubovicích chybné párování. Molekuly DNA, které se vyznačují neúplnou komplementaritou nebo obsahují různé alely ve dvou protilehlých řetězcích dvoušroubovice, označujeme jako **heteroduplexní**. Takové heteroduplexní molekuly vznikají jako meziproducty v procesu rekombinace.

Pokud pozměníme **obr. 13.26e** tak, aby obsahoval třetí pár alel, a přidáme dvě další chromatidy, měly by mít tetrády následující složení:

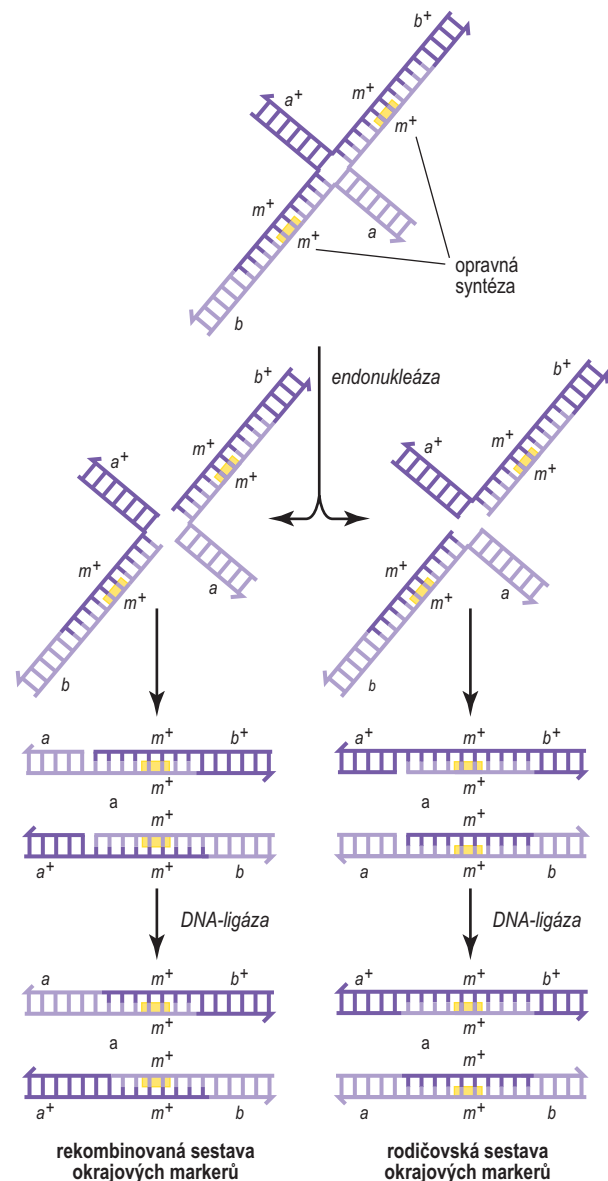


Jestliže budou chybně spárované báze opraveny excizní opravou (viz **obr. 13.24**), při které jsou řetězce *m* vyštěpeny a resyntetizovány s využitím komplementárních řetězců *m+* jako matrice, vzniknou následující tetrády:



V důsledku semikonzervativní replikace DNA během následujícího mitotického dělení vznikne vřečko, které bude obsahovat šest askospor *m+* a dvě askospory *m*, poměr genové konverze bude 3 : 1.

Předpokládejme ale, že před mitotickým dělením je ve výše popsané tetradě opravena pouze jedna ze dvou chybně spárovaných oblastí. V takovémto případě v důsledku semikonzervativní replikace zbývajících heteroduplexů vznikne jeden homoduplex *m+*, jeden homoduplex *m* a vzniklé vřečko bude obsahovat askospory v poměru 5*m+* : 3*m*. Takové poměry genové konverze se skutečně vyskytují. Vyplyvají z postmeiotické (mitotické) segregace neopravených heteroduplexů.



Obr. 13.28 ► Vznik buď rekombinovaných (vlevo dole), nebo rodičovských (vpravo dole) sestav sledovaných markerů ve spojení s genovou konverzí. Rekombinační meziproduct znázorněný v horní části obrázku je shodný s tím, který je uveden na **obr. 13.26g**, avšak obsahuje chybně opravené chromatidy tetrády uvedené v textu. Tato tetráda produkuje vřečko vykazující genovou konverzi 3*m+*:1*m*. Štěpením jednořetězcového můstku ve vertikální rovině (vlevo) vznikne rekombinovaná (*a+ b* a *a b+*) sestava markerů, zatímco štěpení v horizontální rovině povede k rodičovské (*a+ b+* a *a b*) sestavě markerů.

Genová konverze je spojená s reciprokou rekombinací sledovaných markerů přibližně v 50 procentech případů. Tuto korelaci názorně vysvětluje Hollidayův model rekombinace znázorněný na **obr. 13.26**. Pokud dvě rekombinované chromatidy znázorněné tetradě zakreslíme tak, jak je uvedeno na **obr. 13.26g**, můžeme spojení genové konverze s reciprokou rekombinací sledovaných markerů snadno vysvětlit (**obr. 13.28**). Aby byl rekombinační proces

dokončen, musí být jednořetězcový můstek spojující dvě chromatidy zrušen endonukleolytickým štěpením. Toto štěpení může proběhnout buď horizontálně, nebo vertikálně v chi-struktuře znázorněné na **obr. 13.28**. Vertikálním štěpením vznikne vřeco vykazující jak genovou konverzi, tak reciprokou rekombinaci sledovaných markerů. Horizontální štěpení vytvoří vřeco vykazující genovou konverzi a rodičovskou kombinaci příslušných markerů. Takže pokud ke štěpení ve vertikální rovině dojde v polovině případů a v horizontální rovině také v polovině případů, bude genová konverze doprovázena reciprokou rekombinací příslušných markerů asi v 50 procentech, jak se ukázalo.

► Cvičení

OBJASNĚNÍ ZÁKLADŮ GENETICKÉ ANALÝZY

1. Objasněte úlohu mutace v evoluci. Mohly by se živé organizmy vyvíjet bez přítomnosti mutací?

Odpověď: Ne. Mutace je prvořadým a zásadním krokem v evolučním procesu; je hlavním zdrojem veškeré nové genetické variability. Rekombinační mechanismy produkují nové kombinace této genetické variability a přírodní (nebo umělá) selekce uchová ty kombinace, které dávají vznik organismům nejlépe adaptovaným na prostředí, ve kterém žijí. Jednoduše řečeno, bez mutace není evoluce.

2. Uvažujte krátký segment standardního genu s následující sekvencí:



Transkripcí tohoto genového segmentu získáme následující nukleotidovou sekvenci v mRNA:



a translací této mRNA vznikne sekvence aminokyselin

metionin-serin-alanin-tryptofan-glycin

Pokud dojde u daného genu k záměně jednoho páru bází, při které se v pozici 7 změní G:C na A:T, jaký účinek bude mít taková mutace na polypeptid vytvářený tímto genem?

Odpověď: mRNA kódovaná genovým segmentem s mutací bude vypadat takto:



a bude kódovat následující sekvenci aminokyselin:

metionin-serin-treonin-tryptofan-glycin

Povšimněte si, že třetí aminokyselina mutantního polypeptidu je treonin namísto alaninu přítomného v polypeptidu standardním. Záměna jednoho páru bází tak povede, tak jako u většiny jednonukleotidových substitucí, k záměně jedné aminokyseliny v polypeptidovém řetězci kódované daným genem.

3. Pokud záměna jednoho párů bází, tak jak je popsána ve cvičení 2, změní pár G:C v pozici 12 na A:T, jaký účinek bude mít taková mutace na polypeptid vytvářený tímto genem?

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATKY

- Crossing-over probíhá prostřednictvím zlomů v homologických molekulách DNA a znovuspojením jejich částí za vzniku nových kombinací.
- Pokud jsou genetické markery těsně vázány, často dochází k nereciproké rekombinaci neboli genové konverzi, která vede k segregačnímu poměru alel 3 : 1.
- Genová konverze vzniká v důsledku opravné syntézy DNA, ke které dochází v průběhu rekombinačního procesu.

Odpověď: Výsledná sekvence mRNA bude vypadat takto:



Na čtvrté pozici se změnil kodon pro tryptofan UGG na kodon UGA, tj. na jeden ze tří terminačních kodonů. Díky tomu bude mutantní polypeptid ukončen předčasně a výsledný protein bude pozměněn, respektive zkrácen.

4. Pokud bude pár bází A:T vložen mezi páry 6 a 7 v segmentu genu uvedeného v úloze 2, jaký účinek bude mít tato změna na polypeptid daného genu?

Odpověď: Nukleotidová sekvence mRNA určená uvedeným mutantním genovým segmentem bude vypadat takto:



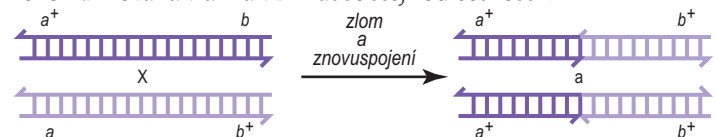
a polypeptid vzniklý z mutované mRNA bude:

metionin-serin-serin-metionin-glycin

změněná sekvence aminokyselin

Inzerce páru bází změní čtecí rámec v mRNA (trinukleotidy jsou čteny jako kodony) od místa vzniku mutace. Výsledkem je, že všechny následné aminokyseliny od místa inzerce budou změněny a vzniklý protein bude abnormální (obvykle nefunkční). V mnoha případech vzniká v důsledku inzerce v rámci normálního čtecího rámce pro translaci terminační kodon, což způsobuje tvorbu zkráceného polypeptidu.

5. Pokud dojde u dvou molekul DNA zobrazených na spodním obrázku, kde šipky představují 3'-konce každého vlákna, ke crossing-overu mechanismem zlomu a znovuspojení, budou obě rekombinovaná vlákna vznikat se stejnou četností?



Odpověď: Ne. Během rekombinace mohou být spojena pouze vlákna DNA se stejnou polaritou. Druhé rekombinované vlákno se nebude tvořit.

► **Ověření znalostí****POUŽITÍ RŮZNÝCH POJETÍ A PŘÍSTUPŮ**

1. Charles Yanofsky izoloval velké množství auxotrofních mutantů *E. coli*, kteří rostli pouze na médiu obsahujícím tryptofan. Jak mohli být tyto mutanti identifikováni? Pokud specifický auxotrofní mutant vznikl v důsledku mutace indukované kyselinou dusitou, může být revertován zpět do prototrofního stavu po působení 5-bromuracilu (5-BU)?

Odpověď: Kultura mutovaných bakterií může růst jen na médiu obsahujícím tryptofan, jen tak mohou žádoucí mutanti přežít a množit se. Bakterie by poté měly být naředěny a přeočkovány na agarozové médium s tryptofanem a inkubovány, dokud nevzniknou viditelné kolonie. Tyto kolonie jsou přeneseny na misky bez tryptofanu pomocí razítkovací metody vyvinuté Lederbergovými (viz **obr. 13.2**). Požadovaní tryptofanoví auxotrofní mutanti porostou na miskách obsahujících tryptofan, ale ne na orazítkovaných miskách bez tryptofanu. Protože po působení kyseliny dusité i 5-BU vznikají tranziční mutace v obou směrech, tj. A:T ↔ G:C, jakákoli mutace indukovaná kyselinou dusitou by měla být po působení 5-BU revertována.

2. Předpokládejte, že jste nedávno objevili nový druh bakterie a nazvali ho *Escherichia mutaphilium*. Během posledního roku jste u tohoto druhu studovali gen *mutA* a jeho polypeptidový produkt, enzym trinukleotidmutagenázu. U *E. mutaphilium* byl prokázán téměř univerzální genetický kód a podobné chování jako u *Escherichia coli* ve všech dalších ohledech platných pro molekulární genetiku.

Šestá aminokyselina od amino-konce standardní trinukleotidmutagenázy je histidin a standardní gen *mutA* má sekvenci trinukleotidů



v pozici odpovídající šesté aminokyselině genového produktu. Charakterizováno bylo také sedm nezávisle izolovaných mutantů vykazujících záměny jednoho páru bází uvnitř tohoto tripletu. Navíc byly všechny tyto mutantní trinukleotidmutagenázy purifikovány a byla zjištěna jejich sekvence.

Mutanti *mutA1*, *mutA2* a *mutA3* mezi sebou nemohou navzájem rekombinovat, ale rekombinují se zbývajícími čtyřmi mutanty (*mutA4*, *mutA5*, *mutA6* a *mutA7*), což vede ke vzniku rekombinantů standardního typu. Podobně mutanti *A4*, *A5* a *A6* nebudou rekombinovat mezi sebou, avšak budou vytvářet standardní rekombinanty po křížení s každým ze čtyř zbývajících mutantů. Křížením mezi *mutA1* a *mutA7* získáme téměř dvakrát více standardních rekombinantů než při křížení mezi *mutA6* a *mutA7*.

Mutanti *A1* a *A6* mohou revertovat na standardní typ po působení 5-bromuracilu (5-BU), zatímco mutanti *A2*, *A3*, *A4*, *A5* a *A7* nikoliv. Mutanti *A2* a *A4* rostou na minimálním médiu pomalu, zatímco mutanti *A3* a *A5* nesou nulové mutace (vytvářejí zcela inaktivní genový produkt) a nejsou na minimálním médiu schopni růstu. Tento rozdíl byl použit pro vyhledávání mutačních událostí vedoucích ke změně genotypů *mutA3* a *mutA5* na genotypy *mutA2* a *mutA4*. Mutanti *A3* a *A5* mohou po působení 5-bromuracilu nebo

hydroxylaminu mutovat na *A2*, respektive *A4*. Avšak mutant *A3* nemůže mutovat na *A4*, *A5* nebo *A2* ani jedním z uvedených mutagenů.

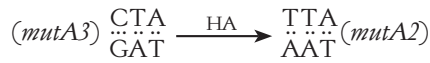
Použijte výše uvedené informace a vlastnosti genetického kódu (**tab. 12.1**) a rozhodněte, které mutantní alely určují mutantní polypeptid každé ze sedmi aminokyselinových substitucí v pozici 6 trinukleotidmutagenázy. Své rozhodnutí zdůvodněte.

Odpověď: Z uvedených údajů lze vyvodit následující závěry:

- Standardní kodon pro His musí být na základě sekvence párů bází daného genu CAU.
- Kodony sedmi aminokyselin nalezené v pozici 6 u mutantních polypeptidů musí spojit s CAU záměna jedné báze, neboť všichni mutanti byli získáni ze standardního polypeptidu substitucí jediného páru bází. Degenerace genetického kódu tedy pro určení specifického kodonu nemá význam.
- Díky povaze genetického kódu – zvláště jeho degeneraci na třetí (3') pozici každého kodonu – jsou v důsledku jednonukleotidových substitucí (způsobených záměnami jednoho páru bází v DNA) možné tři substituce aminokyselin na první a druhé pozici (5'-báze a prostřední báze), ale jen jedna možná záměna aminokyseliny způsobená jednonukleotidovou substitucí v pozici 3 (3'-báze kodonu). Pro usnadnění výkladu budeme označovat nukleotidové pozice v tripletu jako pozici 1 (odpovídající 5'-bázi kodonu), pozici 2 (prostřední nukleotidový pár) a pozici 3 (odpovídající 3'-bázi v mRNA kodonu).
- Protože mutanti *A1*, *A2* a *A3* se nemohou mezi sebou navzájem rekombinovat, museli vzniknout záměnou páru bází stejného tripletu buď v pozici 1, nebo v pozici 2. To stejné platí i pro *A4*, *A5* a *A6*. Protože mutant *A7* se rekombinuje se zbylými šesti mutantními alelami, musel vzniknout záměnou jednoho páru bází v pozici 3, která vedla k záměně aminokyseliny.
- Jedinou aminokyselinou s kodony odvozenými od kodonu His CAU záměnou jednoho páru bází na třetí pozici je Gln (kodony CAA a CAG). Proto musí mít polypeptid mutantu *mutA7* v pozici 6 aminokyselinu glutamin.
- Jelikož *mutA7* (záměna na třetí pozici) dává téměř dvojnásobný počet rekombinantů standardního typu při křížení s *mutA1* než při křížení s *mutA6*, musí být substituce u *mutA1* v pozici 1 a substituce u *mutA6* v pozici 2. S přihlédnutím k bodu d) vyplývá, že substituce u *A2* a *A3* je v pozici 1 a substituce u *A4* a *A5* v pozici 2.
- Protože *mutA1* a *mutA6* mohou po působení 5-BU revertovat na standardní typ, musely být odvozeny od tripletu nukleotidových párů kódujících His tranzičními mutacemi – to znamená:



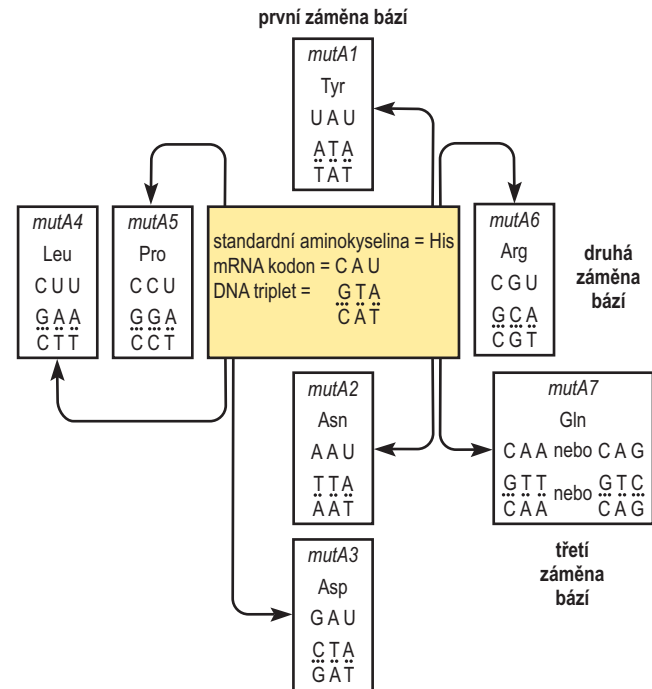
h) Protože po účinku hydroxylaminu *mutA3* a *mutA5* mutují na *mutA2* a *mutA4*, musel mutant *A3* vzniknout z mutantu *A2* a mutant *A5* z mutantu *A4*, a to specificky prostřednictvím tranzicí G:C → A:T – to znamená:



a



Na základě souhrnu výše uvedených dedukcí můžeme určit vzájemné vztahy mezi aminokyselinami, kodony a triplety nukleotidových párů, které jsou přítomny v příslušném místě u polypeptidů trinukleotidmutagenázy, molekul mRNA a genů sedmi různých mutantů:



► Otázky a úlohy

K HLUBŠÍMU POCHOPENÍ A ROZVÍJENÍ ANALYTICKÝCH SCHOPNOSTÍ

13.1 Označte následující typy bodových mutací v DNA nebo RNA jako (1) tranzice, (2) transverze, (3) posun čtecího rámce. (a) A na G; (b) C na T; (c) C na G; (d) T na A; (e) UAU ACC UAU na UAU AAC CUA; (f) UUG CUA AUA na UUG CUG AUA.

13.2 Jaký bude poměr transverzí k tranzicím ze všech možných mutací měnících smysl kodonu v segmentu DNA kódujícím aminokyselinu tryptofan, pokud budou vznikat všechny záměny jednotlivých páru bází se stejnou četností?

13.3 Po ozáření drozofil se u nich předpokládá vznik letálních i viditelných mutací. Navrhněte metodu pro detekci (a) X-vázaných letálních a (b) X-vázaných viditelných mutací u ozářených drozofil.

13.4 Jakým způsobem mohou být u bakterií detekovány mutace zodpovědné za rezistenci vůči antibiotikům? Jak lze rozlišit, zda určité antibiotikum mutace způsobuje, nebo pouze prokazuje mutace již přítomné ve zkoumaných organizmech?

13.5 Publikované hodnoty rychlosti vzniku mutací u člověka jsou celkově vyšší než u bakterií. Znamená to, že jednotlivé lidské geny mutují častěji než geny u bakterií? Vysvětlete.

13.6 Střevní polypóza u člověka (prekancerózní stav) je v některých rodinách determinována jedním dominantním genem. Mezi potomky ženy, která zemřela na rakovinu tlustého střeva, zemřelo 10 lidí na stejný typ rakoviny a 6 lidí má diagnostikovanu

střevní polypózu. Všichni ostatní příbuzní této rodiny byli pečlivě vyšetřeni, avšak žádný další výskyt nemoci nebyl zaznamenán. Navrhněte vysvětlení původu defektního genu.

13.7 Juvenilní muskulární dystrofie u člověka je podmíněna X-vázaným recesivním genem. V jedné rozsáhlé studii bylo v populaci 800 000 lidí nalezeno 32 případů tohoto onemocnění. Vědci si byli jisti, že našli všechny případy, které byly v dostatečně rozvinutém stadiu, aby je bylo možno rozpoznat. Symptomy choroby se projevily pouze u mužů. Většina z nich zemřela v raném věku a nikdo se nedožil více než 21 let. Obvykle se choroba vyskytla pouze u jednoho člena rodiny, výjimečně se však vyskytly v rodině dva nebo i tři případy onemocnění. Navrhněte vysvětlení pro sporadický výskyt choroby a pro tendenci genu přetrvávat v populaci.

13.8 Plody vzniklé díky somatickým mutacím, jako například jablka Delicious a pomeranče typu navel, najdeme velmi často v jablonořích sadech a citrusových hájích. U zvířat jsou však znaky vzniklé somatickou mutací poměrně vzácné. Proč?

13.9 Pokud by se ve stádu vyskytla krátkonohá ovce, navrhněte experiment, kterým by bylo možné rozlišit, zda se jedná o mutaci, nebo zda je příčinou vliv prostředí. Pokud by byla krátkonohost způsobena mutací, jak lze rozlišit, zda je tato mutace dominantní, nebo recesivní?

13.10 Jak mohou enzymy, jako například DNA-polymeráza, fungovat jako mutátory i antimutátory genů (mutantní geny, které zvyšují nebo snižují rychlost vzniku mutací)?

13.11 Jak by mohla být spontánní rychlost vzniku mutací optimalizována přírodním výběrem?

13.12 Mutátorový gen u kukuřice Dt zvyšuje rychlost, při které gen pro bezbarvý aleuron (a) mutuje na dominantní alelu (A) způsobující zbarvení aleuronu. Když bylo provedeno reciproké křížení (tj. mateřská rostlina $dt/dt, a/a \times Dt/Dt, A/A$ a mateřská rostlina $Dt/Dt, A/A \times dt/dt, a/a$), objevovalo se po křížení s mateřskou rostlinou Dt/Dt třikrát více zbarvených teček na zrno než v reciprokém křížení. Vysvětlete tyto výsledky.

13.13 Jediná mutace blokuje konverzi fenylalaninu na tyrozin. (a) Je možné považovat mutantní gen za pleiotropní? (b) Vysvětlete.

13.14 Jak lze rozlišit normální hemoglobin (hemoglobin A) od hemoglobinu S?

13.15 Pokud je CTT tripletem v DNA (přepisované vlákno DNA) určujícím glutamovou kyselinu, jaké změny v tripletech bází DNA a mRNA by mohly zodpovídat za valin a lizin v pozici 6 β -globinového řetězce?

13.16 Genom bakteriofága T4 obsahuje odhadem 50 procent A:T a 50 procent G:C párů bází. Analog bází 2-aminopurin indukuje záměny párů bází ve směru A:T \rightarrow G:C a G:C \rightarrow A:T mechanismem tautomerních přesmyků. Hydroxylamin je mutagenní chemická látka, která specificky reaguje s cytozinem a indukuje pouze substituce ve směru G:C \rightarrow A:T. Pokud by u bakteriofága T4 po působení 2-aminopurinem vzniklo velké množství nezávislých mutací, jaké procento zpětných mutací indukujících standardní genotyp můžeme očekávat po působení hydroxylaminem?

13.17 Předpokládejme, že se α -i β -globinový řetězec vyvinuly ze společného předka. Jakým mechanismem můžeme vysvětlit rozdíly, kterými se dnes tyto dva řetězce odlišují? Jaké změny v kodonech DNA a mRNA by zodpovídaly za změny aminokyselin v odpovídajících pozicích na obou řetězcích?

13.18 U určitého kmene bakterií všechny buňky obvykle hynou, pokud médium obsahuje určitou koncentraci streptomycinu. U tohoto kmene existují mutace navozující rezistenci ke streptomycinu. Mutanti rezistentní ke streptomycinu jsou dvojího typu: někteří mohou žít za i bez přítomnosti streptomycinu, a jiní naopak nemohou bez přítomnosti antibiotika v médiu přežít. Navrhněte pro daný kmen bakterií citlivých ke streptomycinu experimentální postup, pomocí kterého by bylo možné vytvořit oba typy kmenů rezistentních ke streptomycinu.

13.19 Jeden kmen drozofily byl ozářen paprsky X celkovou dávkou 1000 rentgenů (r). Ozáření paprsky X zvýšilo rychlost vzniku mutací ve specifickém genu o 2%. Jaké procentuální zvýšení rychlosti vzniku mutací lze očekávat, pokud by byl tento kmen drozofily ozářen dávkami paprsků X o hodnotách 1500 r, 2000 r a 3000 r?

13.20 Proč se četnost chromozomových zlomů indukovaných paprsky X liší v závislosti na velikosti celkové dávky, a nikoli v závislosti na době, po kterou je dávka podávána?

13.21 Reaktor se přehřívá a produkuje radioaktivní tritium (H^3), radioaktivní jód (I^{131}) a radioaktivní xenon (Xn^{133}). Proč

bychom se měli více obávat radioaktivního jódu než jiných radioaktivních izotopů?

13.22 Jedna osoba byla při nehodě ozářena paprsky X jednorázovou dávkou 50 rentgenů (r). Jiná osoba byla ozářena 20krát jednotlivými dávkami 5 r. Neuvažujte vliv intenzity záření a zkuste odhadnout, jaký poměrný počet mutací lze u každé osoby očekávat.

13.23 Bylo provedeno křížení kmenů *Neurospora crassa* mezi párovacím typem (A) s genotypem $x^+ m^+ z$ a typem (a) s genotypem $x m z^+$. Geny x , m a z jsou těsně vázány a na chromozomu leží v pořadí $x-m-z$. Vřecco vzniklé z tohoto křížení obsahuje dvě kopie („identická dvojčata“) každého ze čtyř produktů meiózy. Pokud v genotypu těchto čtyř produktů došlo ke genové konverzi v lokusu m a reciproké rekombinaci mezi lokusy x a z , jak by mohly genotypy těchto čtyř produktů vypadat? Do závorek napište genotypy čtyř haploidních produktů meiózy ve vřecku vykazujícím genovou konverzi v lokusu m a reciprokou rekombinaci sledovaných markerů (lokus x a z).

dvojice spor v asku

1–2	3–4	5–6	7–8
()	()	()	()

13.24 Jakým způsobem indukuje kyselina dusitá mutace? Jaké specifické změny v DNA a mRNA můžeme předpokládat po působení kyseliny dusité na viry?

13.25 Indukuje kyselina dusitá častěji mutace typu tranzice, nebo transverze?

13.26 Testujete mutagenitu tří nových pesticidů pomocí Amesova testu. Byly použity dva kmeny *bis*⁻, jeden s posunem čtecího rámce a druhý s tranziční mutací, které daly tyto výsledky (počet kolonií revertantů):

kmen 1	tranziční mutant kontrola (bez chemikálie)	tranziční mutant + chemikálie	tranziční mutant + chemikálie + enzymy krysích jater
pesticid 1	21	180	19
pesticid 2	18	19	17
pesticid 3	25	265	270

kmen 2	mutant s posunem čtecího rámce kontrola (bez chemikálie)	mutant s posunem čtecího rámce + chemikálie	mutant s posunem čtecího rámce + chemikálie + enzymy krysích jater
pesticid 1	5	4	5
pesticid 2	7	5	93
pesticid 3	6	9	7

Pokud některý pesticid indukuje mutace, o jaký typ mutací se jedná?

13.27 Jak se liší mutagenní účinky 5-bromuracilu od kyseliny dusité?

13.28 Sydney Brenner a A. O. W. Stretton zjistili, že nesmyslné mutace neukončí syntézu polypeptidu bakteriofága T4 kódovaného genem *rII*, pokud jsou tyto mutace umístěny uvnitř úseku sekvence DNA, v němž na jednom konci vznikla jednonukleotidová inserce a na druhém konci jednonukleotidová delece. Jak můžeme tyto nálezy vysvětlit?

13.29 Seymour Benzer a Ernst Freese porovnávali spontánní mutace a mutace indukované 5-bromuracilem v genu *rII* bakteriofága T4; mutagen zvyšoval rychlost vzniku mutací ($rII^+ \rightarrow rII$) více než stonásobně v porovnání se vznikem spontánních mutací. Téměř všichni (98 procent) mutanti vznikli po aplikaci 5-bromuracilu mohli být po opětovném působení tohoto mutagenu revertovány zpět na standardní typ ($rII \rightarrow rII^+$). U spontánních mutantů však revertovalo zpět na standardní typ pouze 14 procent. Objasněte příčiny těchto výsledků.

13.30 Jak mohou změny v DNA indukované akridinem vyústit v tvorbu inaktivních proteinů?

Pro řešení následujících úloh použijte známé kodony přiřazené k aminokyselinám uvedené v kapitole 12.

13.31 Mutace v genech kódujících α a β podjednotky hemoglobinu způsobují onemocnění krve, jako jsou například talasemie nebo srpkovitá anémie. Představte si, že jste v Číně našli rodinu, ve které někteří členové trpí novou genetickou formou anémie. Sekvencí normální a mutantní DNA nematrickového řetězce jsou následující:

normální 5'-ACGTTATGCCGTACTGCCAGCTAACT-
GCTAAAGAACAATTA.....-3'

mutantní 5'-ACGTTATGCCCGTACTGCCAGCTAACT-
GCTAAAGAACAATTA.....-3'

- Jaký typ mutace se vyskytuje u mutantního hemoglobinového genu?
- Jaké kodony jsou v překládané části (úseku) mRNA přepisovány z normálního a mutovaného genu?
- Jaké jsou sekvence aminokyselin normálních a mutantních polypeptidů?

13.32 Genetická informace bakteriofága MS2 je uložena v RNA. Jeho chromozom je podobný polygenní molekule mRNA organismů, jež mají svou genetickou informaci uloženou v DNA. Minichromozom bakteriofága MS2 kóduje 4 polypeptidy (tj. obsahuje 4 geny). Jeden z těchto čtyř genů kóduje obalový protein MS2 dlouhý 129 aminokyselin. Celá nukleotidová sekvence RNA bakteriofága MS2 je známa. Kodon 112 obalového proteinu je CUA a určuje aminokyselinu leucin. Pokud jste působili na replikující se populaci bakteriofága MS2 mutagenem 5-bromuracilem, jaké substituce aminokyselin lze předpokládat v pozici 112 obalového proteinu MS2 (tj. Leu \rightarrow jiná aminokyselina)? (Pozn. Bakteriofág MS2 používá pro replikaci RNA komplementární vláknice RNA a párování bází stejně jako DNA.)

13.33 Budou se různé záměny aminokyselin indukované 5-bromuracilem v kodonu 112 obalového proteinu, který jste zkoumali v otázce 13.32, vyskytovat se stejnou četností? Pokud ano, proč? Pokud ne, proč? Případně, která záměna či skupina záměn bude častější?

13.34 Mohou vznikat mutace u nereplikujících se bakteriofágů T4 po působení 5-bromuracilu?

13.35 Představte si, že kyselina dusitá deaminuje adenin, cytozin a guanin (adenin \rightarrow hypoxantin, který se páruje s cytozinem, cytozin \rightarrow uracil, který se páruje s adeninem, a guanin \rightarrow xantin, který se páruje s cytozinem). Dá se předpokládat, že kyselina dusitá bude indukovat nějaké mutace, které povedou k záměně glycinového zbytku za jinou aminokyselinu u standardního polypeptidu (např. glycin \rightarrow jiná aminokyselina), pokud bychom působili mutagenem na suspenzi zralého (nedělicího se) bakteriofága T4? (Pozn. Po působení mutagenu na fágovou suspenzi je kyselina dusitá odstraněna. Tímto fágem následně infikujeme buňky *E. coli*, aby se projevíly indukované mutace.) Pokud ano, jakým mechanismem? Pokud ne, proč?

13.36 Vezměte v úvahu povahu genetického kódu, informace o fágu MS2, známé z příkladu 13.32, a informace, které jste získali o kyselině dusité v příkladu 13.35. Mohli byste odhadnout, zda kyselina dusitá bude indukovat nějaké mutace, které by mohly zapříčinit substituce aminokyselin typu glycin \rightarrow jiná aminokyselina, pokud bychom působili mutagenem na suspenzi zralého (nereplikujícího se) bakteriofága MS2? Pokud ano, jakým mechanismem, a pokud ne, proč?

13.37 Očekávali byste, že kyselina dusitá indukuje s vyšší četností substituci Tyr \rightarrow Ser, nebo Tyr \rightarrow Cys? Proč?

13.38 U které z následujících substitucí aminokyselin byste předpokládali, že bude indukována 5-bromuracilem s nejvyšší četností? (a) Met \rightarrow Leu, (b) Met \rightarrow Thr, (c) Lys \rightarrow Thr, (d) Lys \rightarrow Gln, (e) Pro \rightarrow Arg, nebo (f) Pro \rightarrow Gln? Proč?

13.39 Standardní sekvence části proteinu je:

NH₂-Trp-Trp-Trp-Met-Arg-Glu-Trp-Thr-Met

Každý mutant v následující tabulce se liší od standardní sekvence v jediné bodové mutaci. Využijte tuto informaci pro stanovení sekvence mRNA kódující standardní polypeptid. Pokud lze najít více jak jednu možnost, uveďte je všechny

mutant	sekvence aminokyselin polypeptidů
1	Trp-Trp-Trp Met
2	Trp-Trp-Trp-Met-Arg-Asp-Trp-Thr-Met
3	Trp-Trp-Trp-Met-Arg-Lys-Trp-Thr-Met
4	Trp-Trp-Trp-Met-Arg-Glu-Trp-Met-Met

13.40 Akridinová barviva, jako například proflavin, indukují primárně jednonukleotidové adice nebo delece. Předpokládejme, že standardní nukleotidová sekvence genu v mRNA je

5'-AUGCCCUUUGGAAAGGUUCCCUAA-3'

Předpokládejme také, že je v tomto genu indukována mutace proflavinem a že následně je proflavinem indukován revertant této mutace, který vznikl v jiném místě stejného genu v důsledku supresorové mutace. Pokud aminokyselinová sekvence polypeptidu kódovaná tímto genem u revertanta (dvojitého mutantu) vypadá takto

NH₂-Met-Pro-Phe-Gly-Glu-Arg-Phe-Pro-COOH

jaká by mohla být nejpravděpodobnější nukleotidová sekvence mRNA tohoto genu u revertanta (dvojitého mutantu)?

► Genomika na webu

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Srpkovitá anémie je způsobena záměnou jednoho páru bází v β -řetězci lidského globinového genu. Tato mutace mění ve zralém polypeptidu šestou aminokyselinu z glutamové kyseliny na valin (viz **obr. 1.9**). Tato jediná záměna aminokyseliny však způsobuje všechny symptomy této nepříjemné a často smrtelné choroby.

1. Jaké další mutace lidského β -globinového genu změní kyselinu glutamovou v pozici 6 na nějakou jinou? Jak se tyto další varianty nazývají? Existují β -globinové varianty se substitucí aminokyseliny v pozici 6 a jinou substitucí aminokyseliny v jiném místě polypeptidu?

2. Prolin se nachází u normálního lidského hemoglobinu v pozici 5. Jaké substituce aminokyselin se vyskytují v této pozici u mutantních lidských β -globinů? Co třeba glutamová kyselina v pozici 7? Existují mutace měnící tuto aminokyselinu za jinou?

3. Umnoha ze 146 nukleotidových tripletů lidského β -globinu (určujících kodony mRNA) byly zjištěny mutace. U kolika z těchto tripletů vznikla mutace, která způsobila v daném polypeptidu substituci aminokyseliny?

4. Které geny jsou lokalizovány vedle β -globinového genu na lidském chromozomu 11? Jakou funkci mají delta-, gama A-, gama G- a epsilon-globinové geny? Má nějaký význam jejich uspořádání na chromozomu?

Nápověda: Na serveru NCBI prohledejte všechny databáze s dotazem „beta-globinové varianty“. Začněte hledat výsledky v OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), klikněte na HBB (online symbol pro lidský β -globinový gen) na levé liště, klikněte na HbVar a objeví se vám seznam všech lidských variant β -globinu uspořádaných podle data, klikněte zpět na stránku HBB a otevřete odkaz „Gene map“, kde se objeví seznam dalších genů HBB.