

5 MUTÁCIA DNA

Základnou požiadavkou na nositeľa genetickej informácie v živom systéme, molekulu DNA, je stabilita jej štruktúry. Nemennosť sekvencie reťazca DNA počas existencie bunky a tiež aj jej presná reprodukcia pri replikácii umožňuje v procesoch transkripcie a translácie tvorbu biologicky aktívnych bielkovín, ktoré zabezpečujú plnú funkčnosť bunky. Napriek tomu, že štruktúra reťazca DNA je relatívne stabilná, dochádza v ňom k zmenám v sekvencii báz a takúto zmenu nazývame **mutácia**.

Pokiaľ sa zmena uskutoční v oblasti štruktúrneho génu, transkript pozmeneného génu do mediátorovej RNA bude obsahovať pozmenený triplet. Pri syntéze novej bielkoviny môžu nastať nasledovné situácie:

- a) Nový triplet bude kódovať tú istú aminokyselinu (genetický kód je degenerovaný). V štruktúre bielkoviny sa takáto mutácia neprejaví.
- b) Nový triplet kóduje inú aminokyselinu, avšak táto zmena sekvencie v polypeptidovom reťazci výraznejšie neovplyvní jej biologickú aktivitu. Takáto mutácia napriek zmene primárnej štruktúry bielkoviny výraznejšie nemení funkčnosť bunky.
- c) Nový triplet kóduje novú aminokyselinu na takom mieste polypeptidového reťazca, že to spôsobí stratu biologickej aktivity bielkoviny. Môže ísť napr. o zmenu aminokyseliny v aktívnom centre enzýmu, vo väzbovom mieste receptora a pod. Takáto mutácia vedie k strate aktivity bielkoviny, čo často významne ovplyvní funkciu celej bunky.

Mutácia, ktorá spôsobuje, že produkt mutovaného génu je nefunkčný, je mutáciou škodlivou. Na druhej strane existujú mutácie, kde zmena štruktúry génu umožňuje tvorbu takých bielkovín, ktoré môžu v určitých špecifických podmienkach zlepšiť funkčnosť živého systému. Takéto mutácie sú základom fylogenetického vývoja, umožnili vznik nových druhov živých systémov a ich prispôbenie sa novovznikajúcim životným podmienkam. Mutácia je zmena v genetickom materiáli bunky, pri ktorej sa mení poradie nukleotidov v reťazci DNA. Najčastejšie ide o zmenu jedného nukleotidu (v dvojzávitnici DNA o zmenu nukleotidového páru) a takejto mutácii hovoríme **bodová mutácia**. Môže nastať substitúciou jedného páru nukleotidov iným, ďalej to môže byť vsunutie (inzercia) nového páru, alebo odstránenie (delecia) páru nukleotidov v reťazci DNA. Najčastejšie sa bodová mutácia uskutočňuje substitúciou.

5.1 Mutácia môže nastať spontánne alebo účinkom mutagénu

Existuje viacero príčin, ktoré spôsobujú vznik mutácií. Vo všeobecnosti môžeme mutácie rozdeliť na **spontánne** a **indukované**.

Spontánne mutácie môžu vzniknúť:

- a) Omylom v procese replikácie reťazca DNA. Keďže schopnosť DNA-polymerázy presne kopírovať reťazec materskej DNA je vysoká, takéto omyly majú frekvenciu výskytu $1:10^8$ až $1:10^{11}$ replikovaných párov báz.
- b) Depurináciou alebo depyrimidináciou reťazca. Dochádza k hydrolytickému štiepeniu N-glykozidovej väzby medzi bázou a deoxyribózou v reťazci DNA. Vznikajú tzv. **apurínové** alebo **apirimidínové** miesta (AP miesto). Pri replikácii takto poškodenej DNA sa oproti AP miestu môže replikovať iný nukleotid ako by mal byť podľa pôvodného nukleotidu. Najčastejšie sa oproti AP miestu replikuje dAMP.

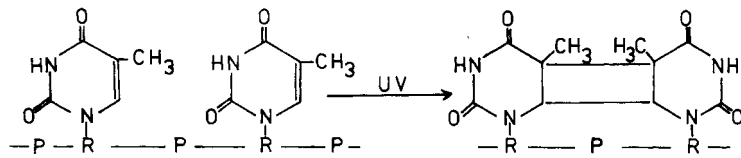
- c) Deamináciou báz. Bázy, ktoré obsahujú $-NH_2$ skupinu, adenín, guanín a cytozín, sa môžu spontánne deaminovať za vzniku hypoxantínu, xantínu a uracilu. Uracil potom pri replikácii kóduje v novom reťazci adenín (pôvodný cytozín kóduje guanín).
- d) Oxidáciou báz voľnými radikálmi. Voľné kyslíkové radikály, hlavne hydroxylový radikál, poškodzujú bázy adenín a guanín štiepením imidazolového jadra za vzniku pyrimidínových derivátov. Pri replikácii takto poškodeného reťazca dochádza k zmene pôvodnej sekvencie v reťazci novej DNA.

Indukované mutácie vznikajú pôsobením tzv. **mutagénov**. Mutagénom môže byť fyzikálny faktor, najčastejšie žiarenie s veľkou energiou, alebo chemická látka schopná reagovať s bázami reťazca DNA.

Mutácie spôsobované žiarením môžu vyvolávať:

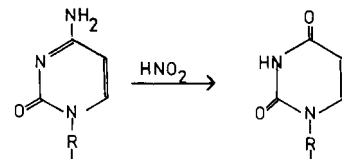
- a) Vysokoenergetické žiarenie ako je röntgenové alebo radioaktívne žiarenie (hlavne γ -zložka). Účinkom tohto žiarenia dochádza buď priamo k ionizácii báz, alebo k tvorbe hydroxylových radikálov z vody. Tie potom reagujú s bázami reťazca DNA a menia ich štruktúru. γ -žiarenie spôsobuje aj štiepenie N-glykozidovej i fosfodiesterovej väzby v reťazci DNA.

- b) Ultrafialové žiarenie (UV). Jeho energia je síce nižšia ako energia röntgenového žiarenia, ale je pohlcovaná štruktúrami s dvojitými väzbami. V reťazci DNA spôsobuje tvorbu tymínových dimérov spojením dvoch susedných tymínov ich cyklizáciou (obr.63). Takýto dimér potom bráni replikácii i transkripcii.



Obr.63 Vznik tymínového diméru účinkom ultrafialového žiarenia v reťazci DNA

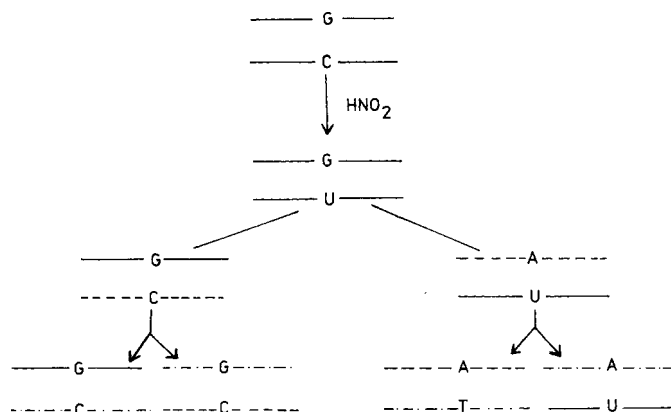
Chemické látky, schopné vyvolať mutáciu, sa v prírode nachádzajú v značnom množstve. Niektoré sú súčasťou biosféry, do ktorej sa dostávajú ako odpadové produkty výrobných procesov, ďalej ako súčasť prostriedkov pri ochrane poľnohospodárskych plodín. Aj vysoké koncentrácie dusíkatých hnojív vedú k nadmernej tvorbe hydroxylamínov a kyseliny dusitej. Pôvodcov mutácií treba hľadať napr. aj v cigaretovom dyme, výfukových plynoch áut a pod.



Obr.64 Premena cytozínovej bázy na uracil pôsobením kyseliny dusitej

Látky podľa mechanizmu mutagénneho účinku môžeme rozdeliť na:

- a) Látky spôsobujúce deamináciu báz. Sú to predoštokým kyselina dusitá, hydrogénsiričitanový anión, formaldehyd. Kyselina dusitá reaguje s $-NH_2$ skupinou bázy ako s primárnym amínom za vzniku hydroxyderivátu a N_2 (obr.64). Z adenínu tak vzniká hypoxantín, z guanínu xantín a cytozínu uracil. Zmena napr. cytozínu na uracil vedie pri následných replikáciách k výraznej premene sekvencie v reťazci dcérskych DNA (obr.65). Z obrázku je vidieť, že po dvojitupňovej replikácii budú mať v mieste mutácie dva zo štyroch nových reťazcov DNA pozmenené nukleotidy.

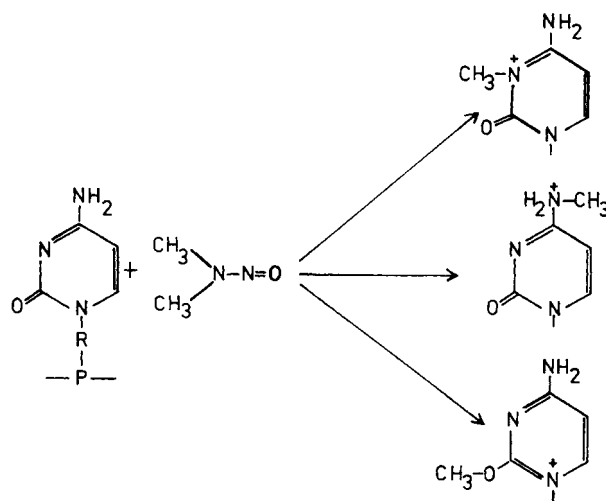


Obr.65 Schematické znázornenie vzniku chybných reťazcov DNA pri replikácii reťazca s pozmenenou bázou (zámena cytozínu uracilom). Čiarkovane sú označené nové reťazce DNA v prvej generácii, bodkočiarkovane v druhej generácii dcérskych buniek

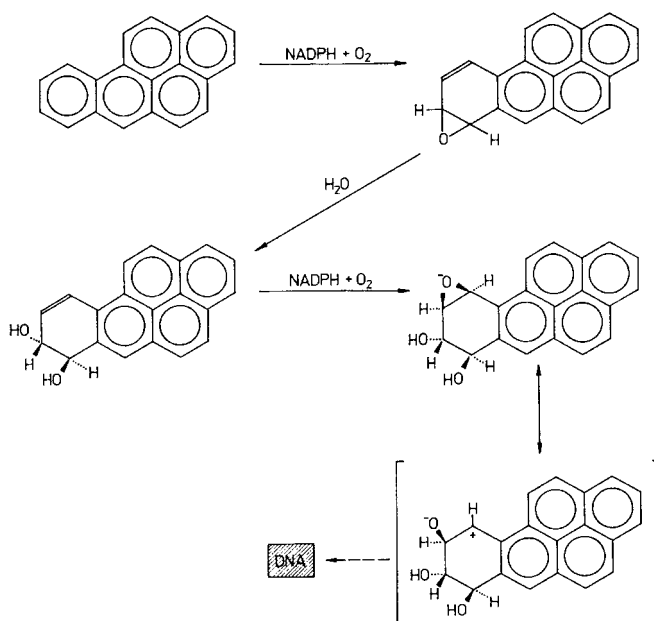
b) Látky, ktoré pôsobia ako alkylačné činidlá. Sú to predovšetkým nitrozozlúčeniny a alkylačné činidlá. Nitrozozlúčeniny pôsobia ako promutagény, v bunke sa metylujú a stávajú sa z nich silné metylačné činidlá dusíkatých báz (obr.66). Metylovaná báza stráca schopnosť vytvárať vodíkové mostíky medzi bázami, čo vedie k chybám pri replikácii.

c) Látky pôsobiace ako elektrofilné činidlá. Sú to vysokoúčinné mutagény, často sa vyznačujú značnou kancerogenitou. Vznikajú napr. z aromatických uhlíkov, ktoré sa tvoria pri spaľovaní pevných látok. Samotné látky spôsobujú ako promutagény. V organizme sú ako cudzorodé látky oxidované mikrozómovým oxidoredukčným systémom za vzniku aktívnych mutagénov. Takýmto príkladom je napr. **benzpyrén**. Je to kondenzovaný aromatický uhlíkový, nachádzajúci sa napr. aj v cigaretovom dyme. Pôsobením monooxygenázového systému sa oxiduje za vzniku 9,10-epoxy-7,8-dihydro-7,8-dihydroxybenzopyrénu (obr.67). Tento derivát ľahko vytvára mezoménu formu – karbanión, ktorý je silným karcinogénom. Kancerogenita týchto látok je založená na tom, že ako silné elektrofilné činidlá sa viažu na bázy v reťazci DNA a významne ovplyvňujú procesy replikácie i transkripcie.

Veľmi silným hepatokarcinogénom sú **aflatoxíny**. Produkujú ich plesne, ktoré kontaminujú potraviny. Aktivujú sa monooxygenázovým systémom mikrozómov v hepatocytoch, kde z nich vznikajú cez epoxidy oxoderiváty. Tie reagujú hlavne s guanínom.



Obr.66 Formy metylácie cytidínu v reťazci DNA metylovanými derivátmi nitrozoamínov



Obr.67 Premena promutagénu benzopyrénu na aktívny mutagén 9,10-epoxy-7,8-dihydro-7,8-dihydroxybenzopyrén účinkom monooxygenázového systému

6 REPARÁCIA POŠKODENÉHO REŤAZCA DNA

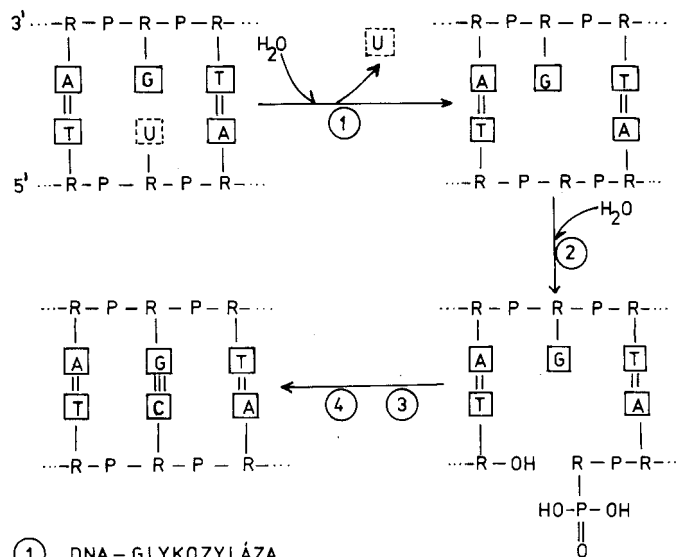
Všetky typy buniek obsahujú enzýmy, ktoré majú schopnosť reparovať poškodený reťazec DNA. Väčšina z nich sú indukčibilné enzýmy, ktoré bunka produkuje po nejakom signále informujúcom o prítomnosti mutagénu alebo o poškodení reťazca DNA.

Najrozšírenejší reparačný enzým je **DNA-glykozyláza**, ktorý je schopný rozpoznať pozmenenú bázu a štíepiť N-glykozidovú väzbu, ktorou je báza viazaná na deoxyribózu (obr.68).

Týmto sa vytvorí AP miesto, ktoré je schopná rozpoznať tzv. **AP-endo-nukleáza**. Tento enzým rozštíepi fosfodiesterovú väzbu reťazca DNA v mieste chýbajúcej bázy a **exonukleáza** odštíepi niekoľko nukleotidov. DNA-polymeráza I doplní chýbajúce nukleotidy a DNA-ligáza spojí obidva konce reťazca.

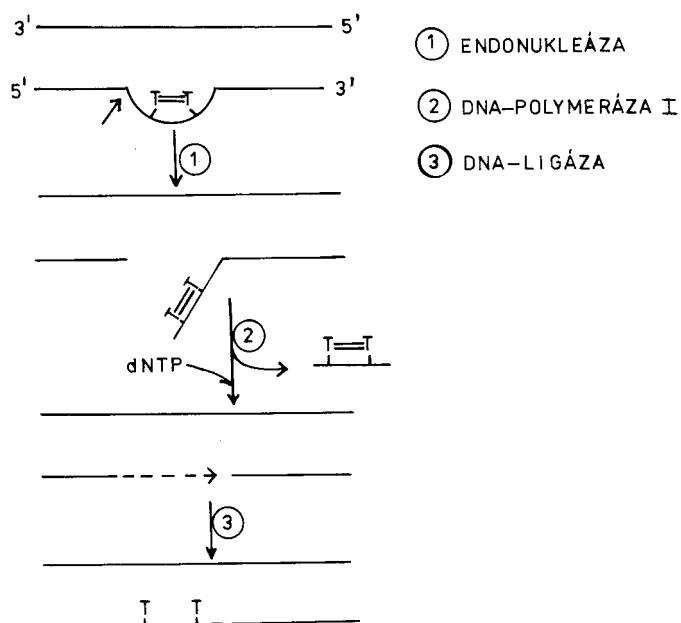
Reparácia úseku DNA, poškodeného vytvorením tymínového diméru, nastáva dvojakým spôsobom. Prvý sa uskutočňuje účinkom enzýmu **fotolyáza**. Tento enzým sa nadviaže na dimér, účinkom svetla je fotoaktivovaný a štíepi väzby medzi tymínovými bázami diméru. Druhý reparačný systém obsahuje **špecifickú endonukleázu**, ktorá v mieste diméru prestrihne reťazec DNA. Účinkom polymerázy I sa odštíepi krátky oligomér vrátane tymínového diméru a ten istý enzým doplní medzeru pripojením chýbajúcich nukleotidov (obr.69).

Porucha tohto reparačného systému podmieňuje vznik ochorenia **xeroderma pigmentosum**, ktoré charakterizuje extrémna citlivosť na slnečné svetlo a zvýšený výskyt rakoviny kože. Zapríčiňuje ho chýbanie špecifickej endonukleázy, ktorá štíepi reťazec DNA v mieste diméru, následkom čoho nenastáva reparácia poškodeného reťazca DNA.



- ① DNA - GLYKOZYLÁZA
- ② AP - ENDONUKLEÁZA
- ③ DNA - POLYMERÁZA I
- ④ DNA - LIGÁZA

Obr.68 Reparácia reťazca DNA poškodeného premenou cytozínu na uracil



Obr.69 Reparácia reťazca DNA poškodeného vytvorením tymínového diméru

