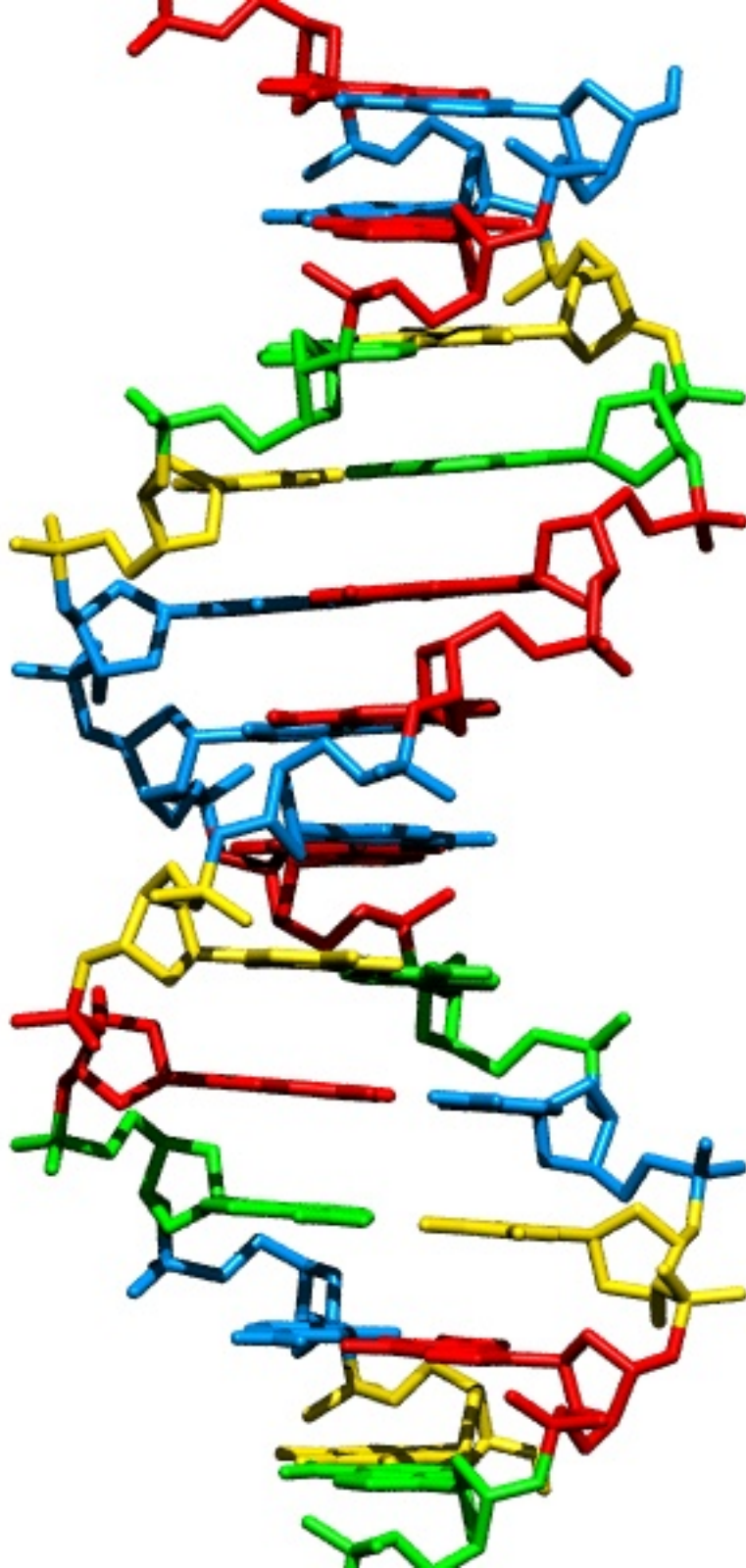


A-PDF MERGER DEMO



11.3 REGULÁCIA NA ÚROVNI TRANSKRIPCIE

Najjednoduchším regulátorom transkripcie je samotná promotorová sekvencia /promótor/. Určuje, koľko génového produktu /prvotného transkriptu/ vznikne za určitý čas. Toto množstvo sa nazýva dávková aktivita promótoru a predstavuje množstvo molekúl mRNA, ktoré sa nasyntetizuje na jednom úseku DNA. Predpokladá sa, že aktivita promótorov v organizme je navzájom koordinovaná. Aj malá zmena štruktúry promótoru môže úplne zablokovať syntézu mRNA. Niekedy zmena vedie k tomu, že sa nenasyntetizuje potrebné množstvo produktu, čo môže mať dôsledky pre životné pochody v bunke.

Už sme si skôr uviedli, že niektoré promótory majú vysokú afinitu k RNA-polymerázam /transkriptázam/, iné menšiu, vždy v závislosti od sekvencie nukleotidov.

11.3.1 SPÔSOBY REGULÁCIE BIOSYNTÉZY BIELKOVÍN BAKTÉRIÍ

Syntéza bielkovín, a z toho vyplýva, že i enzýmov, môže byť regulovaná nasledovne:

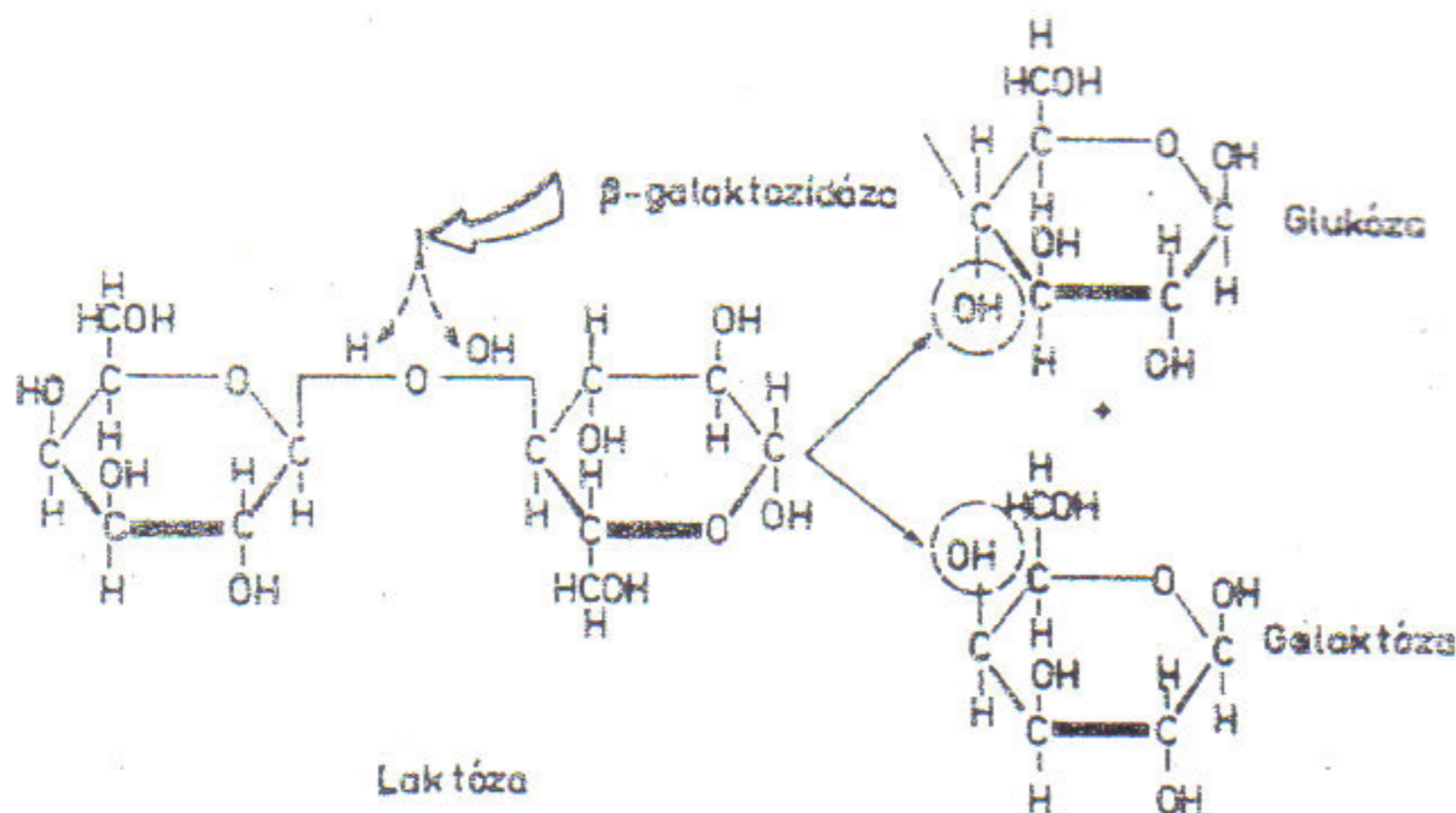
- enzýmovou indukciou,
- enzýmovou represiou,
- katabolickou represiou.

11.3.1.1 Enzýmová indukcia

Bunka *E.coli* využíva ako najefektívnejší zdroj uhlíka glukózu. Ak ju však prenesieme do prostredia, v ktorom jediným zdrojom uhlíka je laktóza, je baktéria schopná po rozložení laktózy zúžitkovat' aj tento cukor. Laktóza je cukor, ktorý sa enzýmom β -galaktozidázou štiepi na galaktózu a glukózu /obr. 47/.

Bunky *E.coli* pri dostatku glukózy obsahujú len asi 5 molekúl β -galaktozidázy. Po prenesení do prostredia s laktózou, za krátky čas /1-2 minúty/ sú schopné nasyntetizovať akolo 5000 molekúl uvedeného enzýmu na bunku. Indukovaná β -galaktozidáza štiepi /hydrolyzuje/ laktózu na produkty, ktoré bakteriálna bunka využíva ako zdroj uhlíka a energie. Ak sa takéto bunky prenesú späť do prostredia, ktoré obsahuje glukózu, syntéza β -galaktozidázy sa zastaví a počet molekúl sa zníži na pôvodnú hodnotu /5 molekúl na bunku/.

β -galaktozidáza teda patrí k indukovateľným enzýmom, ktorý je schopný ponúknuť substrát spracovať na metabolit potrebný pre bunku. Látka /molekula/, ktorá indukuje syntézu takéhoto enzýmu, sa nazýva induktor. Induktor sa pôsobením enzýmu mení na metabolit, ktorý bunka priamo využíva vo svoj prospech.



Obr. 47 Štiepenie laktózy enzýmom β -galaktozidázou na glukózu a galaktózu

Je vhodné ešte uviesť, že ak bunkám *E. coli* pridáme do kultivačného média ktorýkoľvek β -galaktozid /napr. tiogalaktozid, ktorý má miesto kyslíka síru/, potom sa indukuje syntéza nielen β -galaktozidázy, ale aj ďalších dvoch funkčne príbuzných enzýmov β -galaktozid-permeázy a β -tiogalaktozid-acetyltransferázy.

11.3.1.2 Enzýmová represia

Enzýmová represia je jav, pri ktorom sa pôsobením korepresora zastavuje syntéza enzýmov. Enzýmová represia sa týka väčšinou tých enzýmov, ktoré sa zúčastňujú biosyntetických reakcií pre tvorbu aminokyselín.

Ak napríklad dáme do pôdy, v ktorej rastú baktérie, aminokyselinu histidín, po určitom čase zistíme, že enzýmy pre biosyntézu histidínu z buniek rýchle miznú. Histidín je konečným produktom série reakcií, ktoré vedú k jeho syntéze. Preto sa aj uvedený typ inhibície syntézy nazýva represia konečným produktom a vzhľadom na to, že ide vlastne o zabrzdenie syntézy celej skupiny enzýmov, volá sa koordinovaná represia.

11.3.1.3 Katabolická represia

Už sme si povedali, že najvýhodnejším zdrojom uhlíka a energie pre bakteriálne bunky /ale to platí vo všeobecnosti/ je glukóza. V jej neprítomnosti sú baktérie schopné spracovať aj náhradný substrát pomocou indukovaných enzýmov /napr. β -galaktozidáza sa syntetizuje pod vplyvom laktózy alebo alolaktózy/. Keď však pridáme takýmto bunkám do média glukózu, tak budú prednostne využívať glukózu pred laktózou, hoci sa laktóza, ako induktor, v pro-

stredí nachádza. Bunka viac na jej prítomnosť nereaguje, resp. reaguje tým, že zastavuje syntézu β -galaktozidázy a metabolizuje len glukózu.

11.4 OPERÓN - DEFINÍCIA

Doteraz sme hovorili o regulácii na úrovni transkripcie a pri nej zostaneme. Teraz si však urobíme topológiu /umiestnenie/ jednotlivých oblastí, ktoré sa na tejto regulácii zúčastňujú.

Pod pojmom operón rozumieme určitú oblasť DNA, ktorá pozostáva z funkčne diferencovaných úsekov: promótor, operátor a jemu podliehajúce štruktúrne gény. Promótor a operátor sú regulačné oblasti DNA a štruktúrne gény sú oblasti, ktoré nesú informáciu pre syntézu bielkovín /enzýmov/. Pri prokaryontoch sa príslušné štruktúrne gény prepisujú do jednej molekuly mRNA /multigénová mRNA/.

Celý operón podlieha ešte regulačnému génu, a to prostredníctvom bielkoviny, pre ktorú nesie informáciu regulačný gén. Táto bielkovina sa nazýva represor. Represor je schopný viazať sa na operátor. Regulačný gén je umiestnený /obyčajne/ na vzdialenejšom mieste molekuly DNA, teda operón nemusí naň bezprostredne naväzovať.

Stručne možno povedať, že operón je skupina štruktúrnych génov s koordinovanou expresiou podliehajúca rovnakým regulačným lokusom. Na začiatku operónu je operátorová sekvencia, ktorou produkt regulátorového génu - represor riadi činnosť celého operónu.

11.4.1 INDUKČNO-REPRESNÝ MODEL PRÁCE OPERÓNU

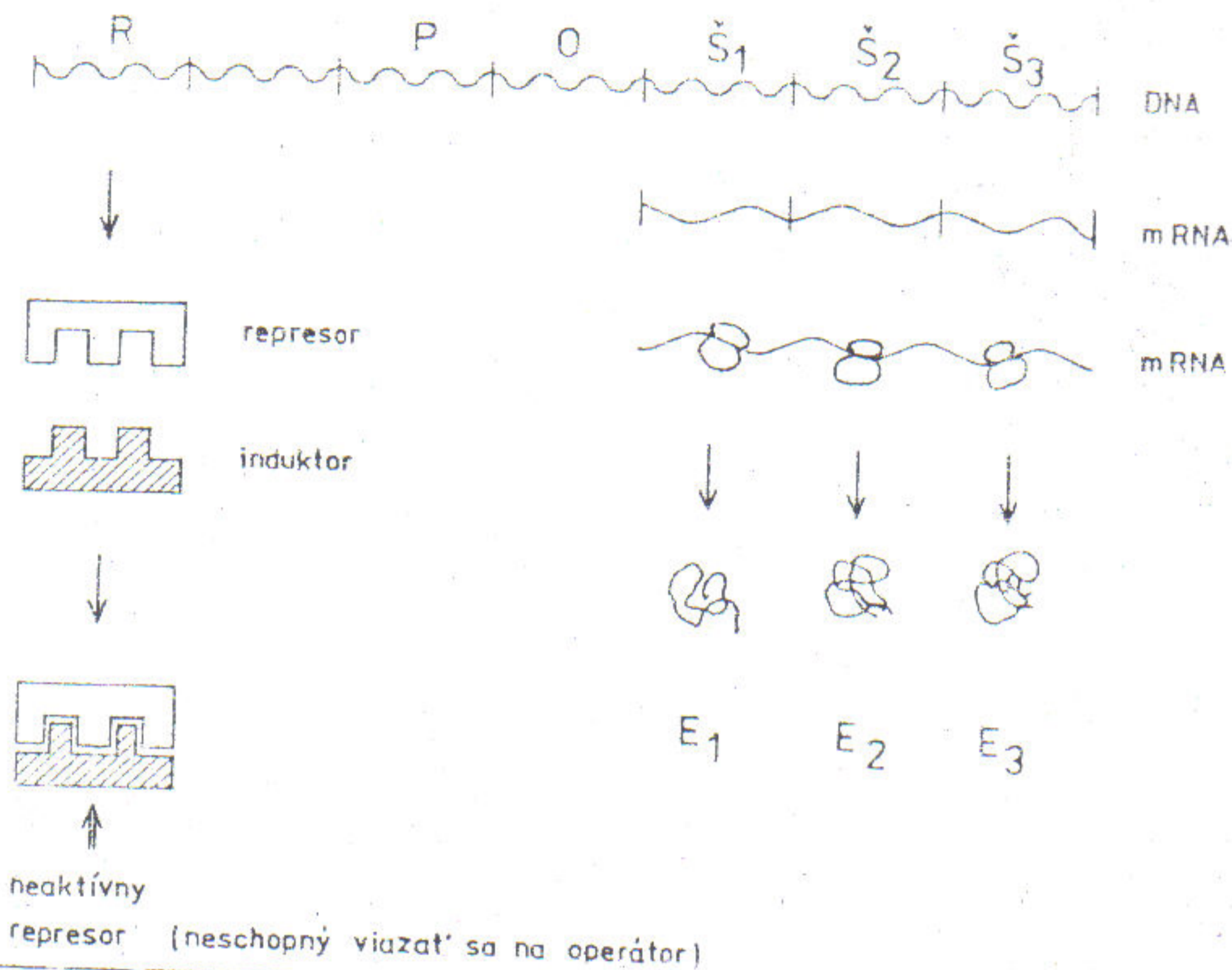
Model indukčno-represného systému práce operónu ešte r. 1961 navrhli Jacob a Monod. V princípe platí dodnes /obr. 48/.

Gén regulátor produkuje represor, ktorý reaguje s príslušnými efektormi. Môžu to byť nízkomolekulové látky, napr. aminokyseliny.

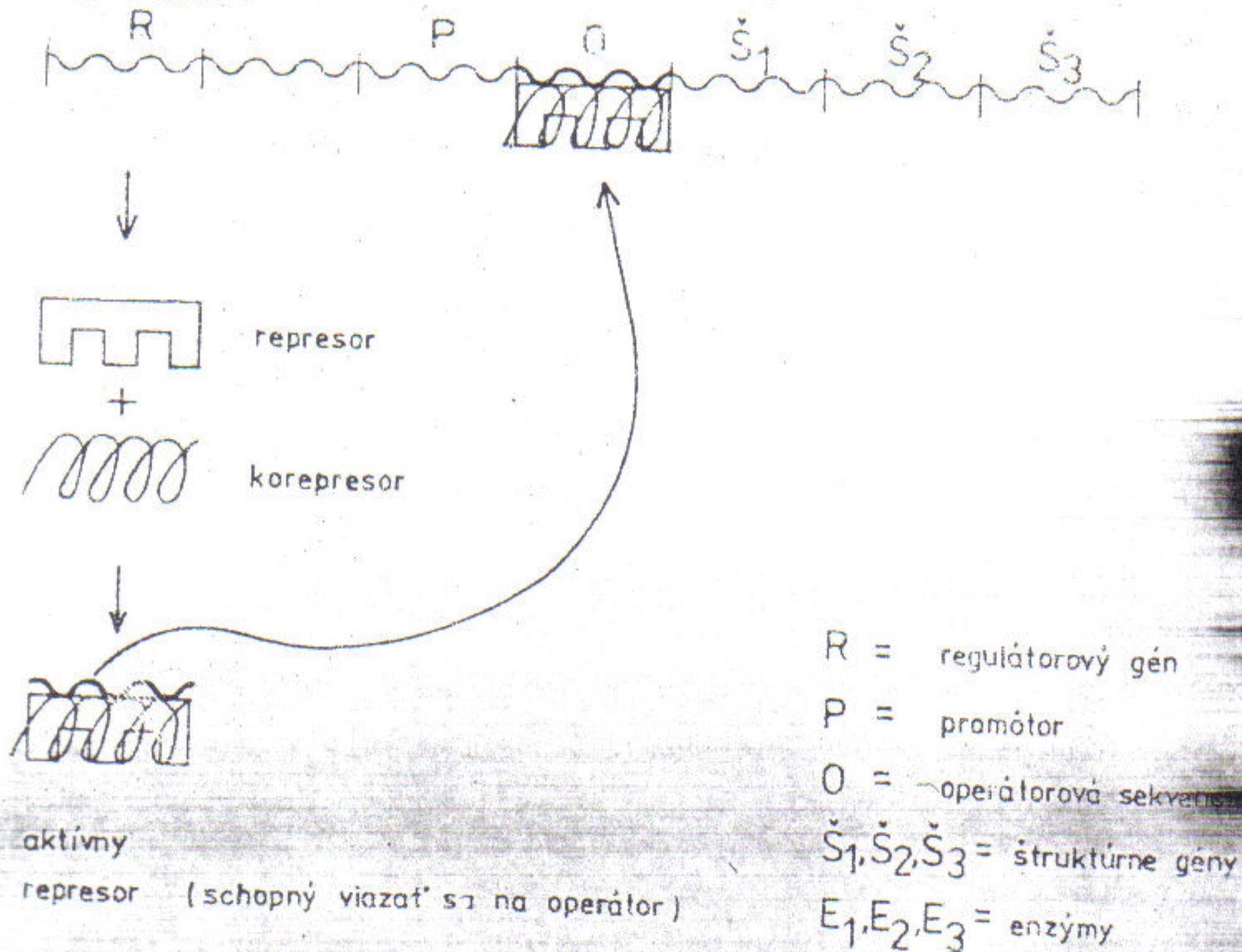
Pri represii efektor sa nazýva korepresor. Korepresor zmení štruktúru represora tak, že je schopný naviazať sa na operátor, čím sa znemožní transkripcia všetkých štruktúrnych génov daného operónu. Represor viazaný na operátor blokuje posun RNA - polymerázy z promótoru, čím dochádza k zastaveniu transkripcie.

Pri indukcii sa represor stretne s takým efektorom, ktorý sa naň naviaže a inaktivuje ho tak, že je neschopný spojiť sa s operátorom. Takýto efektor sa nazýva induktor. /Operátor nie je blokovaný a syntéza mRNA na štruktúrnych génoch môže bežať./

INDUKCIA



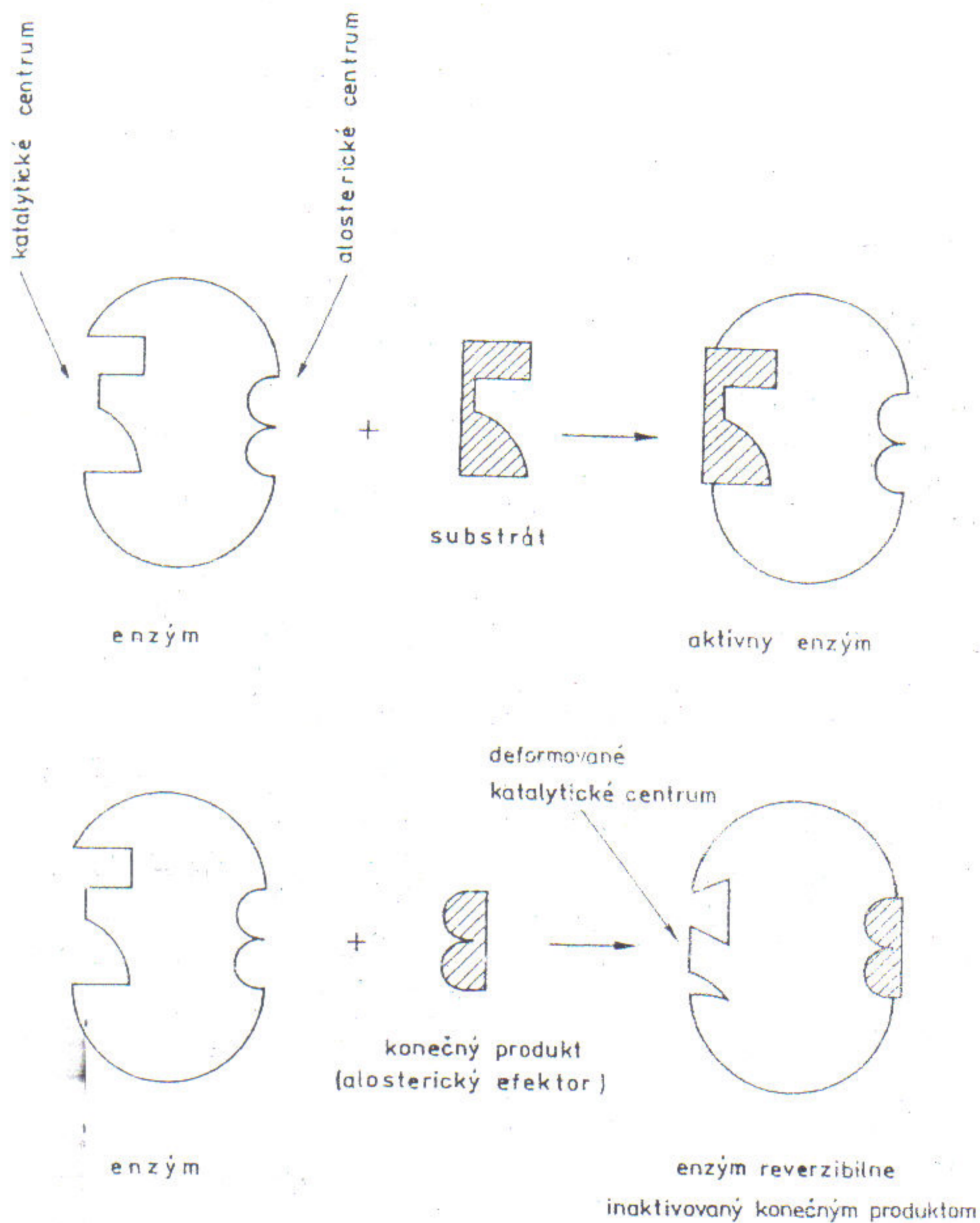
REPRESIA



aktívny repressor (schopný viazať sa na operátor)

- R = regulátorový gén
- P = promótor
- O = operátorová sekvencia
- Š₁, Š₂, Š₃ = štruktúrne gény
- E₁, E₂, E₃ = enzýmy

Obr. 48 Schéma indukcie a represie

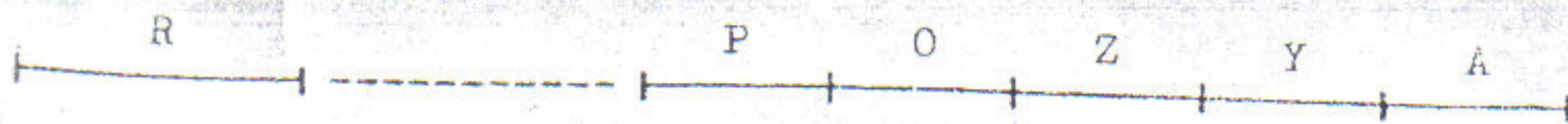


Obr. 49 Alosterická inhibícia

11.4.2.1.2 Negatívna kontrola enzýmovej indukcie a represie

Tento typ regulácie si ozrejníme na dnes už klasickom príklade laktózo-
vého operónu /lac operón/.

Laktózový operón sa skladá z regulačného génu, promótoru, operátora a
troch štruktúrnych génov: Z pre syntézu β -galaktozidázy, Y pre β -galaktozid-
-permeázu a gén A, ktorý kóduje enzým transacetylázu.



Uvedené tri enzýmy sú indukovateľné. Indukujú sa laktózou, ktorá sa pôsobením β -galaktozidázy štiepi na galaktózu a glukózu /pozri obr. 47/. Bezprostredným induktorom však nie je laktóza, ale alolaktóza, ktorá vzniká za účasti β -galaktozidázy ešte skôr, ako sa laktóza rozštiepi na galaktózu a glukózu. Alolaktóza sa spája s represorom, a tým ho inaktivuje.

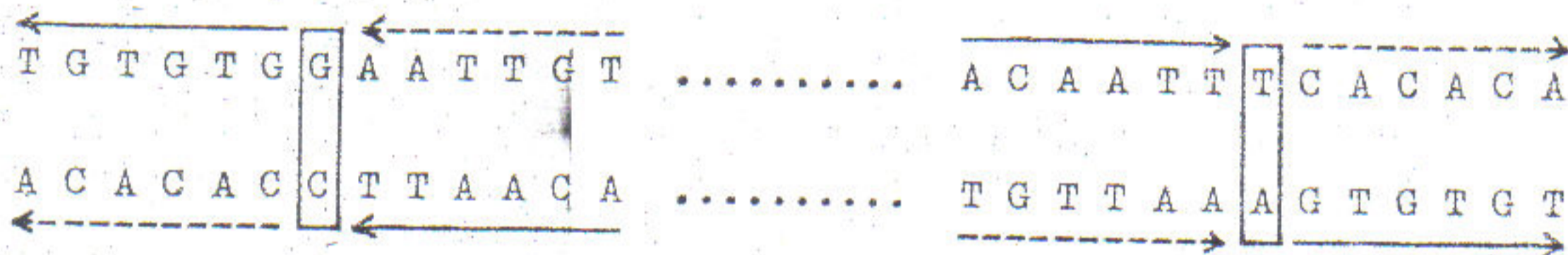
Ako induktor môžeme použiť aj tiogalaktozid /napr. izopropyltiogalaktozid IPTG/, ktorý aj in vitro vykazuje silnú väzbu na lac-represor.

Ústrednou molekulou je tu represor ako produkt regulačného génu. Lac-represor je bielkovina, ktorá sa skladá zo štyroch rovnakých podjednotiek s m.h. 38 000. Represor po spojení s korepresorom viaže sa na špecifických miestach svojho povrchu s operátorom, čím blokuje transkripciu štruktúrnych génov, t.j. syntézu mRNA - to je **enzýmová represia**.

Pri **enzýmovej indukcii** môžu nastať dve alternatívy:

- ak bol represor na DNA - operátor naviazaný, opustí ho na podnet tiogalaktozidu. Často pritom dochádza ku konformačnej zmene represorových molekúl;
- alebo sa induktor /tiogalaktozid/ priamo naviaže na represor ako produkt regulačného génu a inaktivuje ho tak, že nie je schopný naviazať sa na operátor. Dochádza k indukcii enzýmov.

Treba tu ešte zdôrazniť, že lac-promótor a lac-operátor sa čiastočne prekrývajú a v týchto miestach sa nachádzajú špecificky usporiadané nukleotidy, ktoré vykazujú tzv. rotačnú symetriu - palindrom



Na palindromoch dochádza k špecifickej interakcii medzi bielkovinami a nukleotidovou sekvenciou DNA. **Otázka špecifického rozoznávania bázovej sekvencie bielkovinami patrí k najpálčivejším problémom molekulárnej genetiky.**

Ešte by sme chceli uviesť, že represorové molekuly sa podobajú svojimi vlastnosťami enzýmom, ktoré sú brzdené konečným produktom. Majú tiež dve väzbové miesta, z ktorých jedno sa viaže špecifickým spôsobom s DNA-operátorovou sekvenciou a druhé sa stretáva s príslušným efektorom /induktorom alebo korepresorom/. Efektor po spojení s represorom spôsobuje jeho konformačnú zmenu, ktorá rezultuje alebo v indukciu alebo represiu enzýmov. Preto môžeme hovoriť o alosterickej indukcii a represii.

Následky enzýmovej represie sú úplne podobné tým, ktoré prebiehajú pri zabrzdení konečným produktom na úrovni enzýmu /spätaná väzba/. Rozdiel spočíva v tom, že v druhom prípade sa už existujúci /nasyntetizovaný/ enzým re-

verz
mov

pria
nečn

niť

tézu

pot
be
sor
pre
tzu
vač

verzibilne inaktivuje. Pri enzýmovej represii je brzdená nová tvorba enzýmov na úrovni transkripcie.

Enzýmová indukcia a represia sú regulačné zásahy, ktoré sa uskutočňujú priamo na genetickom materiáli. Substráty bývajú obyčajne induktormi a konečné produkty korepresormi.

Oba mechanizmy, t.j. spätná väzba a represia môžu spolupôsobiť a umožniť tak kooperatívnu reguláciu anabolických procesov.

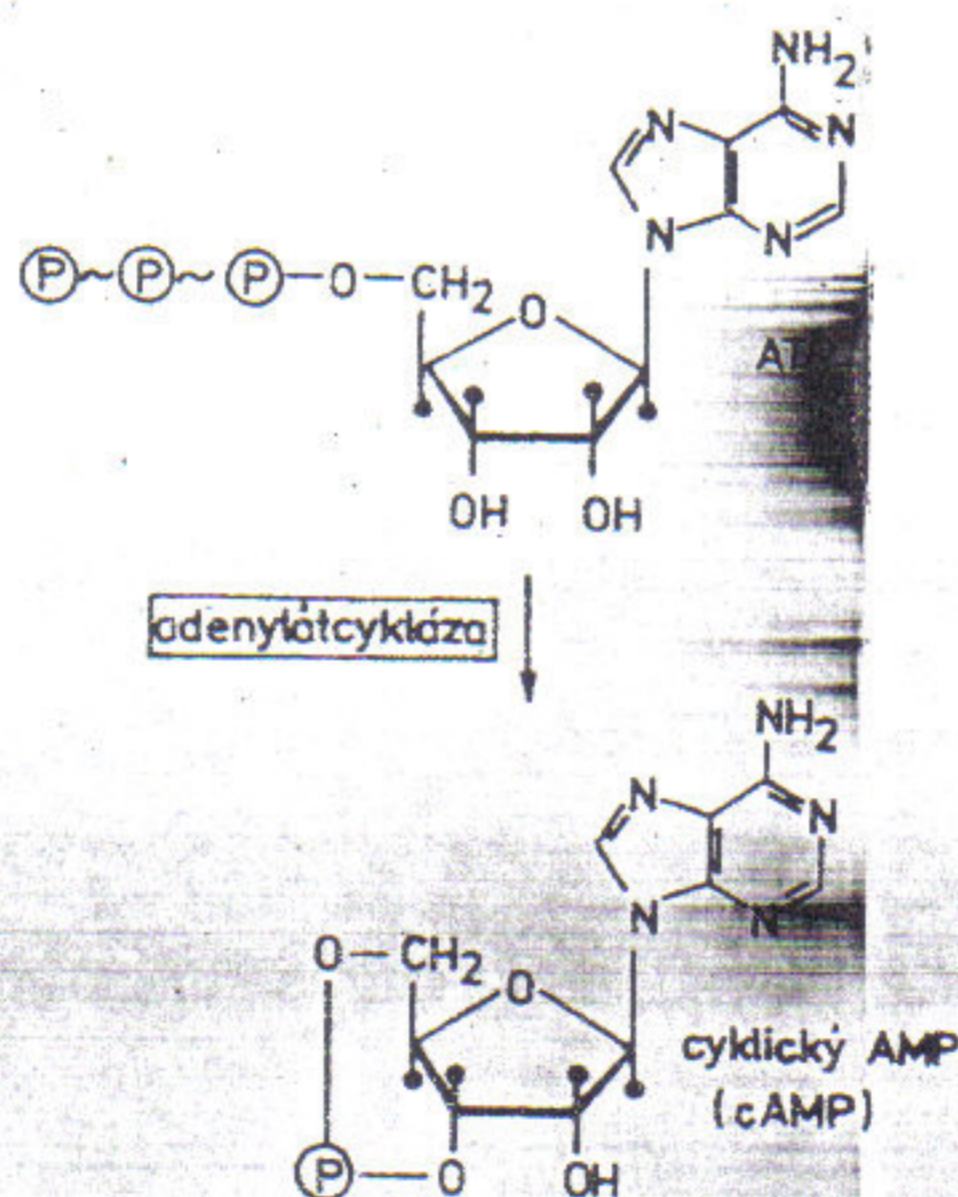
Podľa Jacoba a Monoda pri indukcii nejedná sa o priamu stimuláciu syntézy, ale o uvoľnenie bloku, čím sa umožní priebeh syntetizačných pochodov.

1.4.2.2 Pozitívna kontrola lac-operónu

Najprv sa predpokladalo, že na to, aby bol lac-operón v činnosti, je potrebná len negatívna regulácia, teda, že stačí, aby induktor zabránil väzbe represora na operátor, prípadne, aby sa operátor odblokoval /aby sa represor odpútal z operátora/. Zistilo sa však, že i v prítomnosti induktora musí pre transkripciu lac-operónu byť v bunke, okrem cyklického AMP /cAMP/, ešte tzv. CAP-bielkovina /catabolite activator protein/, ktorá sa nazýva aj aktivačná bielkovina, či aktivačný proteín.

CAP-proteín pôsobí v dvoch stupňoch:

- cyklický AMP - obr. 50 /ktorý je vlastne mierou hladovania bunky a tvorí sa z ATP vtedy, keď bunka má nedostatok glukózy pomocou enzýmu adenylcyklázy/ viaže sa na CAP bielkovinu, čím vytvára špecifický komplex cAMP-CAP;



Obr. 50 Tvorba cyklického adenzínmonofosfátu /cAMP/

- v druhom stupni sa komplex cAMP-CAP spojí s promotorom v špecifickej oblasti /CAP-väzbové miesto, v ktorom je palindromová symetria/. Komplex cAMP-CAP stimuluje transkripciu tým, že denaturuje CAP-miesto na promotore, ktoré je tesne vedľa väzbového miesta pre RNA-polymerázu. Uvedený komplex teda umožňuje RNA-polymeráze naviazať sa na DNA, čím v zmysle pozitívnej kontroly stimuluje transkripciu lac-operónu.

K úplnému vyjadreniu laktózového operónu je teda nutné jednak uvoľnenie represora z operátora a v ďalšom kroku stimulačný účinok komplexu cAMP-CAP na špecifické miesto promotora.

Z uvedeného vyplýva, že lac-operón môže byť regulovaný negatívne i pozitívne. CAP je pozitívny regulačný element všetkých operónov senzitívnych na glukózu.

Záverom treba zdôrazniť, že negatívna kontrola sa zväčša uplatňuje pri enzýmovej indukcii a represii a pozitívna kontrola pri katabolickej represii.

11.5 REGULÁCIA NA ÚROVNI TRANSLÁCIE

Tento typ regulácie je oveľa menej preštudovaný ako regulácia na úrovni transkripcie. Vyplýva to prirodzene zo skutočnosti, že translačný proces je nesmierne zložitý a participuje na ňom množstvo molekúl /odhaduje sa, že asi 100 typov molekúl/.

Prvý problém, ktorý je pálčivý najmä pri eukaryotoch, je výber mRNA pre transláciu z tzv. dlho pretrvávajúcich mRNA /long - live mRNA/. Embryá vyšších organizmov /napr. rastlín/ sú vybavené mRNA, ktoré fungujú hneď v prvých hodinách procesu klíčenia a dávajú tzv. rané proteíny. Pri živočíchoch sa zistilo, že regulačnú funkciu preberá tcrRNA.

Ďalší problém je ochrana mRNA pred ribonukleázami. Čiže sa, že špecifické modifikácie /napr. metylácia vo vnútorných oblastiach mRNA a jej väzba na bielkoviny /informozóm/ chráni mRNA pred degradáciou, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť, že sa budú translatovať.

Účinnosť proteosyntézy v nemalej miere súvisí s využitím mRNA zložitým translačným aparátom. Informácia v mRNA má jednotkovú štruktúru a lineárne usporiadanie. Jedna jednotka, to je vlastne 1 kodón /tričet nukleotidov/, ktorý špecifikuje príslušnú aminokyselinu. Expresia mRNA pri translácii je správna len vtedy, keď sa čítanie odohráva v správnej fáze. Posun čítacieho rámca dopredu či dozadu o 1-2 nukleotidy znamená syntézu bielkoviny so zmeneným zmyslom /alebo úplne nefunkčnej bielkoviny/.

Ďalej je známe, že genetický kód je degenerovaný a že pre 1 aminokyselinu máme viac tzv. izotransferových tRNA. Zistilo sa, že translácia je naj

účinnejšia vtedy, ak výsledná interakcia medzi kodónom a antikodónom nastáva ani s maximálnou ani s minimálnou silou, ale vtedy, ak interakčná energia má priemerný charakter. Treba si uvedomiť, že spojenie kodón - antikodón tvorí špecifický, ale prechodný komplex, ktorý sa musí nielen rýchle vytvoriť, ale aj v priebehu translácie rýchle rozpojiť a silná interakcia by vlastne transláciu spomaľovala. Mediátorová RNA /mRNA/ teda obsahuje nielen informáciu určujúcu aminokyselinovú sekvenciu, ale aj účinnosť translácie výberom kódových slov alebo charakterom iniciačných signálov.

Ďalší dôležitý mechanizmus je ten, ktorý reguluje biosyntézu samotného translačného aparátu. Keď si uvedomíme, že napr. bunka E.coli sa každých 20 minút rozmnoží, znamená to, že musí za tento čas nazhromaždiť dostatočné množstvo všetkých komponentov /DNA, RNA, bielkoviny/ pre dcérske bunky. Predpokladá sa, že takmer polovicu všetkej energie spotrebuje baktéria na výstavbu translačného aparátu, v ktorom okrem enzýmov a proteínových faktorov limitujúcim prvkom sú ribozómy.

Záverom treba ešte uviesť, že v súčasnosti sa študujú jednotlivé kroky proteosyntézy a jej regulácia pomocou špecifických antibiotík, ktoré sú schopné inhibovať jednotlivé stupne proteosyntézy, a tak sa môžu detegovať špecifické produkty týchto krokov.

11.6 REGULÁCIA NA TRANSLAČNO-TRANSKRIPČNEJ ÚROVNI

Pre hospodárne využitie energie je potrebné, aby rozsah syntézy rRNA a ribozómových bielkovín bol dokonale zladený. Ako regulačné faktory tu vystupujú neobvyklé nukleotidy: guanozín-5'-difosfát-3'-difosfát /ppGpp/ a guanozín-5'-trifosfát-4'-difosfát /pppGpp/. V prípade, že sa z nejakých dôvodov spomalí proteosyntéza ribozómových bielkovín, spomalí sa aj transkripcia génov pre ribozómovú RNA. Tento jav nazývame stringentná odzva /prísne následná/.

Najčastejšou príčinou spomalenej syntézy ribozómových bielkovín je nedostatok niektorej aminokyseliny. Pri nedostatku určitej aminokyseliny dôjde k hromadeniu jej tRNA v neaminoacylovannej forme. Ak sa táto koncentrácia zvýši na 50 % /za normálnych okolností aminoacylovaná tRNA predstavuje okolo 80 % a neaminoacylovaná len asi 20 %/, potom takáto neaminoacylovaná tRNA sa môže naviazať na dekódované miesto mRNA na ribozóme /A miesto/. Tým sa nielen zastaví proteosyntéza, ale sa zároveň aktivuje tzv. stringentný faktor /m.h. 80 000/, ktorý je viazaný na ribozóm. Stringentný faktor spustí výrobu ppGpp a pppGpp z GDP a GTP prenosom pyrofosfátu z ATP.

Vzniknuté tetra-fosfáty a penta-fosfáty guanozínu viažu sa na RNA polymerázu a menia jej špecifickú afinitu k promótorom. Tým sa transkripcia gé-

nov pre ribozómové RNA výrazne zníži. Tento špecifický typ inhibície transkripcie necháva ostatné gény nedotknuté.

Predpokladá sa, že mechanizmus stringentnej odozvy sa uplatňuje i v opačnom prípade, teda vtedy, keď sa zníži množstvo rRNA vo vzťahu k bielkovinám. V tomto smere je uvedený mechanizmus však menej účinný. Účinok ppGpp je v hrubých rysoch analogický s účinkom cAMP, lebo ppGpp okrem toho, že inhibuje väzbu RNA-polymerázy na promótor, môže pri zastavení proteosyntézy z dôvodov nedostatku určitej aminokyseliny aktivovať expresiu "katabolických" operónov. To vedie k obnove dostatočnej zásoby /pool - púlu/ všetkých aminokyselín. V tomto prípade by účinok ppGpp bol zrovnateľný s cAMP. Treba zdôrazniť, že tieto úvahy ešte potrebujú ďalšie experimentálne overenie.

pri

fág

jeh

vá

sa

vor

z

Φ

IN

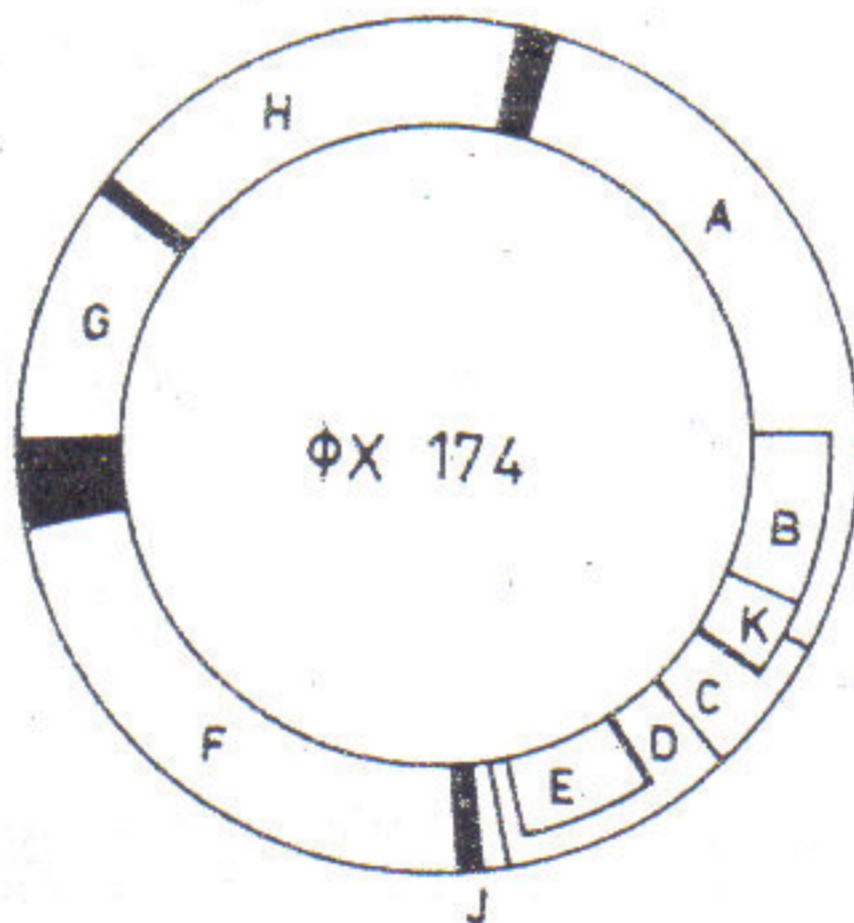
ve

12. NIEKTORÉ VÝNIMKY Z PRAVIDIEL GENETICKÉHO KÓDU A PROTEOSYNTÉZY

12.1 PREKRÝVANIE GENETICKÉHO KÓDU

Stará múdrosť hovorí, že výnimka potvrdzuje pravidlo. Zdá sa, že ani princípy molekulárnej genetiky tieto výnimky neobišli.

Zistilo sa a sú na to experimentálne dôkazy, že napr. génové produkty fága $\phi X 174$ /obr. 51/, ktorý ako vieme, má jednoreťazcovú DNA, sú väčšie ako jeho kódovacia kapacita. Z toho vyplýva, že genetická informácia oplýva ešte väčšou ekonomikou, na akú sme zvyknutí pri bežnom, lineárnom čítaní. Aj tu sa síce linearita zachováva, ale porušuje sa princíp neprekrývania. Teda hovoríme, že $\phi X 174$ má prekrývajúce gény.



Obr. 51 Schéma fága $\phi X 174$

Konkrétne to vyzerá tak, že $\phi X 174$ má 10 génov A, B, C, D, E, F, G, H, J a K, z nich dva kompletne ležia vo vnútri druhého, gén B v gène A a gén E v gène D.

Treba ešte uviesť, že r. 1977 pomocou sekvenčnej analýzy sa pri fágu $\phi X 174$ urobila jedna z prvých analýz primárnej štruktúry DNA. Zistilo sa, že DNA tohto fága obsahuje 5375 nukleotidov, z ktorých len 217 sa nachádza v sekvenciách, ktoré nekódujú žiadnu bielkovinu a celý genóm má mimoriadne ekono-

mickú organizáciu, ako sme si to vyššie uviedli. Aj tento experimentálne zistený fakt poukazuje na úžasnú kódovaciu schopnosť genetickej informácie, a to len kombináciou štyroch prvkov!

12.2 NEUNIVERZÁLNY GENETICKÝ KÓD

V predchádzajúcom texte v kapitole o genetickom kóde, sme si medzi vlastnosťami genetického kódu zdôraznili, že je v podstate univerzálny. Znamená to, že väčšina kodónov platí pre všetky organizmy. Zaradenie určitej aminokyseliny do polypeptidového reťazca určujú tie isté triplety počnúc od fágov, baktérií cez rastliny, živočíchy až po človeka.

V posledných rokoch sa zistilo, že napr. pri mitochondriách neplatí bezvýhradne univerzálnosť genetického kódu. V nasledovnej tabuľke si uvedieme odlišnosti mitochondriálneho kódu od univerzálne platného kódu.

Tabuľka 7.: Porovnávanie univerzálneho a mitochondriálneho kódu
/N - ľubovoľný nukleotid/

Kodón /y/	Univerzálny kód	Mitochondriálny kód		
		Cicavce	Kvasinky	Neurospora
UGA	STOP	Trp	Trp	Trp
CUN	Leu	Leu	Thr	Leu
AUA, AUG	Ile	Met	Ile	Ile
AGA, AGG	Arg	STOP	Arg	Arg

12.3 NERIBOZÓMOVÁ SYNTÉZA PEPTIDOV

V poslednom čase sa zistilo, že nízkomolekulárne peptidy sa môžu syntetizovať bez mRNA a ribozómov len pomocou enzýmov, ktoré spôsobujú aktiváciu karboxylovej skupiny jednej aminokyseliny a špecifické pripojenie na akceptorovú amino-skupinu druhej aminokyseliny. Autori tohto názoru udávajú, že v *Bacillus subtilis* sa takto môže syntetizovať peptid zložený z 5 aminokyselín a nazvali ho subtilín.

Treba tu však zdôrazniť, že uvedené výnimky prekryvania genetického kódu, neuniverzálnosti genetického kódu a neribozómovej syntézy peptidov nepierajú všeobecne platné princípy molekulárnej genetiky, ale poukazujú na fakt, že životne dôležité procesy aj v tých najjednoduchších systémoch sú veľmi zložité a neprebiehajú vždy len podľa známych pravidiel.

ne zis-
e, a to

vlast-
ená to,
yseli-
bak-

í bez-
eme

a

nte-
íciu
ep-
že
yse-

13. MUTÁCIE

13.1 DEFINÍCIA NIEKTORÝCH POJMOV

Existuje niekoľko variantov výkladu pojmu mutácia počnúc od de Vriesovej, ktorý r. 1903 tento názov zaviedol pre náhlu neusmernenú zmenu cez definíciu mutácie ako zmenu genotypu, ktorá nie je spôsobená segregáciou ani rekombináciou až k novej, úplne stručnej definícii, ku ktorej sa prikláňa dnes väčšina autorov a tá znie: mutácia je taká zmena genetickej informácie, ktorá sa dedí /Knippers/.

Ešte si uvedieme návrh definície mutácie terminologickej komisie, ktorá je nasledovná:

Mutácia je zmena v nukleotidovej sekvencii genómu, ktorá spočíva v substitúcii, delécii alebo inzercii.

Pod pojmom mutabilita rozumieme schopnosť nukleotidovej sekvencie /v širšom zmysle slova aj organizmu/ mutovať. Organizmus, ktorý nesie zmenu v genetickej informácii, sa nazýva mutant. Pravdepodobnosť, s ktorou vznikne mutácia v určitej jednotke /napr. v jednej generácii/ je mutačná rýchlosť. Frekvencia mutácií zasa udáva množstvo mutácií na jednotku, ktorú si zvolíme za základ /napr. jedna replikácia, jedna bunka, jedna generácia a pod./.

K mutáciám nedochádza zámernou činnosťou organizmu, ale prebiehajú v prírode spontánne a ich charakter je náhodný. I napriek tomu, že frekvencia spontánnych mutácií je veľmi nízka /odhaduje sa na 10^{-5} - 10^{-10} na bunku/ sú mutácie najdôležitejším substrátom evolúcie. Mutácie vedú k rozšíreniu genotypového spektra a prebiehajú pri všetkých živých organizmoch bez výnimky.

13.2 ROZDELENIE MUTÁCIÍ

M Prvé triedenie mutácií, ktoré sa nám ponúka, je rozdelenie na spontánne a indukované.

Spontánne mutácie sú také, ktoré vznikajú v organizme, v prírode alebo v in vitro systéme bez zásahu človeka /ale nie bez príčiny/.

Indukované mutácie vznikajú pri zámernom získavaní mutantov rôznymi induktormi - fyzikálnymi, chemickými a biologickými faktormi.

Faktory, ktoré sa využívajú na indukciu mutácií, sa nazývajú mutagény.

Müller r. 1927 použil ako prvý rtg lúče na indukciu mutácií drozofily. Odvtedy sa rtg lúče, ale aj mnohé iné fyzikálne a chemické faktory používajú na indukciu mutácií najrôznejších organizmov. Umelá indukcia mutácií bola natoľko unikátnym objavom, že síce neskoro, ale predsa bola odmenená Nobelovou cenou, ktorú dostal Müller r. 1946.

Ďalšie rozdelenie mutácií je podľa veľkosti genetickej informácie, ktorú postihujú na:

- génové /bodové/,
- chromozómové,
- genómové mutácie.

Génová, resp. bodová mutácia je dedičná zmena v jednom gène. Môže postihnúť jeden nukleotid alebo niekoľko nukleotidov toho istého génu, pričom nedochádza k zmene poradia a polohy génov.

Chromozómové mutácie nazývajú sa často chromozómové aberácie. Postihujú väčšie úseky DNA, menia počet a polohu génov a týkajú sa štruktúry chromozómov. Typy chromozómových aberácií sú dnes dobre definované a sú predmetom štúdií špeciálnej disciplíny - cytogenetiky. My si len ako príklad uvedieme najfrekvencovanejšie z nich:

- deficiencia - strata koncovej časti chromozómu,
- delécia - strata vnútornej časti chromozómu,
- inverzia - otočenie určitej časti chromozómu o 180° ,
- translokácia - premiestnenie časti chromozómu na iný chromozóm,
- duplikácia - zdvojenie určitej časti chromozómu.

Pri chromozómových mutáciách, ako vidíme, ide o zmenu poradia i polohy génov.

Genómové mutácie sú také zmeny, ktoré sa týkajú celých chromozómov alebo dokonca celých genómov. Vedú buď k strate alebo nadobudnutiu celých chromozómov v dôsledku nondisjunkcie /aneuploidia, euploidia/ alebo zmnoženiu celého genómu /polyploidia/.

Mutácie delíme ďalej na:

- gametické a
- somatické.

Gametické mutácie vznikajú buď v samotnej gaméte, alebo v bunkách, z ktorých sa pohlavné bunky diferencujú. V oboch prípadoch zygota, a tým aj vznikajúci jedinec bude obsahovať mutantnú alelu.

Somatické mutácie sú také zmeny genetického materiálu, ktoré vznikajú v somatických bunkách. Mutantnú alelu obsahujú len tie časti pletív alebo tkanív, ktoré vznikli delením mutantnej bunky.

Podľa vplyvu na životaschopnosť rozdeľujeme mutácie na:

- vitálne,
- semiletálne,
- letálne.

Vitálne sú tie, ktoré nemajú nepriaznivý vplyv na životaschopnosť organizmu.

Semiletálne mutácie sú také, ktoré nespôsobujú smrť, ale nositeľ takejto alely je v nevýhode oproti normálnemu jedincovi /napr. skôr zomiera/.

Letálne mutácie sú také zmeny, ktoré vedú k deštrukcii DNA a napokon k smrti. Za letálne však považujeme aj také mutácie, ktoré nevedú k okamžitej smrti zygoty, ale spôsobujú úhyn jedinca v neskoršom štádiu ontogenézy, ale pred jeho reprodukciou.

Pokračujeme v delení mutácií. Ďalšie delenie je na:

- dominantné a
- recesívne.

Dominantné mutácie najčastejšie predstavujú získanie vlastnosti /dominantnej alely/.

Recesívne mutácie reprezentujú zmenu dominantnej alely na recesívnu. Na tomto mieste je vhodné uviesť, že napr. pri drozofile sa recesívne mutácie vyskytujú 100-krát častejšie ako dominantné. Recesívne ďalej môžu byť ešte vitálne alebo letálne.

S tým súvisia aj:

- priame a
- spätné mutácie.

Priame mutácie sú tie, pri ktorých sa štandardný fenotyp mení na mutantný.

Spätné mutácie sú tie, pri ktorých sa tento mutantný fenotyp mení na štandardný. Toto sa môže udiť buď:

- priamou spätnou mutáciou, keď sa zmena odohrá v tom istom gène, alebo
- supresorovou mutáciou, t.j. keď štandardný fenotyp sa obnovuje pomocou mutácie v inom ako zmutovanom gène.

A napokon môžeme mutácie na molekulárnej úrovni rozdeliť na:

- neutrálne,
- missens mutácie a
- nonsense mutácie.

Neutrálne mutácie sú také, pri ktorých sa nemení zmysel informácie /napr. sa zmena odohrá v rámci degenerácie genetického kódu/.

Missens mutácie /s pozmeneným zmyslom/; sú to také mutácie, pri ktorých sa mení informácia /napr. syntetizuje sa polypeptid s čiastočne zmenenou funkciou/.

Nonsens mutácie /mutácie bez zmysle/ zahrňujú zmeny, pri ktorých sa normálny kodón mení na stop kodón. Syntéza polypeptidu sa predčasne ukončuje a vzniká úplne neaktívny produkt.

A napokon si uvedieme ešte niekoľko typov mutácií, s ktorými sa možno v literatúre stretnúť.

Auxotrofné sú také mutácie, ktoré zapríčiňujú neschopnosť organizmu syntetizovať nejakú potrebnú látku, napr. aminokyselinu. Auxotrofný mutant prežíva len vtedy, ak mu do prostredia dáme v dostatočnom množstve látku, ktorú si nevie syntetizovať. V opačnom prípade hynie.

Auxotrofné mutanty pôsobením mutagénov sa môžu zmeniť na prototrofné organizmy, ktoré majú schopnosť syntetizovať si všetky potrebné látky pre život z jednoduchých zdrojov uhlíka, napr. z glukózy a anorganických solí.

V poslednom čase bola objavená zvláštna kategória génových mutácií tzv. termosenzitivné mutácie. Sú charakteristické tým, že sa prejavujú len pri určitej teplote /pri nepermissívnej teplote/, zatiaľ čo pri inej teplote /permissívnej/ sa mutácia neprejaví. Príčina spočíva v tom, že proteín, ktorý je produktom mutovaného génu, je termolabilný, t. j. pri zvýšení teploty na nepermissívnu, je afunkčný. Termosenzitivné mutácie, ktoré postihujú metabolické procesy, stávajú sa dôležitým nástrojom pri štúdiu génovej determinácie týchto procesov, lebo jednoduchou zmenou teploty je možné sledovať a detegovať normálny a mutantný fenotyp.

Okrem mutácií v štruktúrnych génoch môžu sa mutácie vyskytovať aj v regulačných génoch a regulačných sekvenciách.

Mutácia regulátorového génu môže mať charakter konštitutívny alebo supresorový. Konštitutívna mutácia regulátorového génu zmení štruktúru represora tak, že sa nemôže naviazať na operátor. Preto je príslušný operón trvale de-reprimovaný, transkripcia sa a syntetizujú sa enzýmy bez ohľadu na potrebu bunky. Supresorový typ vedie zasa k situácii, keď sa represor trvale viaže na operátor, dôsledkom čoho je vyradenie daného operónu z činnosti.

Mutácie v promotóre neumožňujú transkripciu operónu vôbec.

Mutácie v operátorovej sekvencii, naopak, spôsobujú jej stálu, konštitutívnu transkripciu, pretože sa na ňu nemôže viazať aktívny represor.

Uvedené rozdelenie mutácií na jednotlivé skupiny nevyčerpáva všetky možnosti delenia mutácií na rôznych úrovniach organizmov. Napr. neuviedli sme delenie na makromutácie a mikromutácie, pri ktorých prvá skupina zahrňuje mutácie rozoznateľné na jednej rastline a mikromutácie rozoznateľné v populácii alebo jadrové a mimojadrové /plastomové a mitochondriálne mutácie/. Uviedli sme len všeobecne platné skupiny, ktoré sa dajú aplikovať na väčšinu organizmov.



13.3 GÉNOVÉ MUTÁCIE - MOLEKULÁRNA PODSTATA

Génové mutácie pre svoj "mini" rozmer nazývajú sa aj bodové. Niektorí autori za pravé mutácie uznávajú len bodové mutácie a možno i preto sa im v odbornej literatúre a experimentálnej praxi venuje najväčšia pozornosť.

Podľa najnovších názorov pri vzniku mutácií zmeny na molekulárnej úrovni sú trojakého typu:

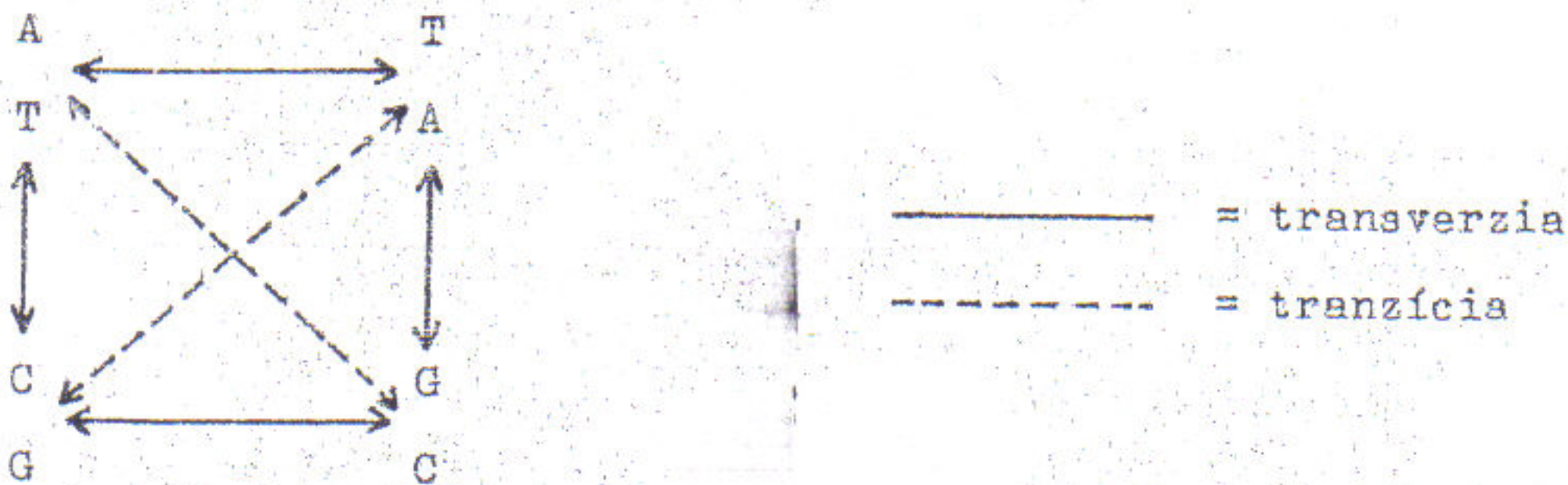
- substitúcia,
- delécia a
- inzercia.

Substitúcie zahrňujú dve samostatné kategórie:

- tranzície, ktoré reprezentujú zámenu purínu za purín alebo pyrimidínu za pyrimidín. Z toho vyplýva, že purín-pyrimidínová orientácia v nukleovej kyseline sa zachováva /AT ↔ GC, TA ↔ CG/;

- transverzie, pri ktorých dochádza k zámene purínu za pyrimidín a opačne, teda purín-pyrimidínová orientácia sa porušuje /AT ↔ TA, AT ↔ CG, GC ↔ CG, GC ↔ TA/.

Schematicky si tranzíciu a transverziu môžeme znázorniť nasledovne:



Tranzície a transverzie v kódogénom vlákne sa odrážajú v kodónoch mRNA a môžu viesť k neutrálnym /nazývaným aj tichým/ mutáciám, ďalej k mutáciám so zmeneným zmyslom, s chybným zmyslom alebo k mutáciám bez zmyslu.

Delécie predstavujú mutácie, pri ktorých sa jedná o stratu jedného alebo viac nukleotidov z nukleotidovej sekvencie.

Inzercie sú opakom delécií - tu ide o vsunutie /adíciu/ jedného alebo viac nukleotidov.

Delécia alebo inzercia nukleotidov DNA vedie k takej zmene mRNA, ktorá spôsobuje posun čítania genetického kódu pri proteosyntéze, čo sa prejavuje na aminokyselinovej sekvencii v bielkovine. Nazývajú sa preto aj posunové alebo tzv. frame-shift mutácie.

Poznanie molekulárneho mechanizmu génových mutácií prispelo k objasneniu mnohých dôležitých problémov molekulárnej genetiky, najmä potom, keď sa mutácie dali indukovať umele a keď sa zdokonalili metódy ich detekcie.

13.4 INDUKCIA MUTÁCIÍ

Už sme si uviedli, že mutácie možno indukovať rôznymi fyzikálnymi a chemickými faktormi, ktoré nazývame mutagény. Mutagény definujeme ako faktory, ktoré zvyšujú frekvenciu mutácií. Mutácie indukované mutagénmi nie sú v podstate odlišné od spontánnych mutácií. Rozdiel je len vo frekvencii /čistote výskytu/.

Najstarším mutagénom boli röntgenové lúče /r. 1927 Müller/. Odvtedy tisíce látok sa použili na indukciu mutácií pri rôznych objektoch.

13.4.1 FYZIKÁLNE MUTAGÉNY

Z fyzikálnych mutagénov sa najčastejšie na indukciu mutácií používa ultrafialové svetlo /UF alebo UV - svetlo/ a ionizačné žiarenie.

13.4.1.1 Neionizačné žiarenie

UV-svetlo je typ neionizačného žiarenia, ktoré je absorbované molekulami a nie atómami /v tom je rozdiel od ionizačného žiarenia/. V bunke najcitlivejšie na UV-svetlo sú nukleové kyseliny, resp. ich purínové a najmä pyrimidínové bázy. Sú to zlúčeniny obsahujúce konjugované dvojité väzby, ktoré sú terčom pri pôsobení UV-svetla. K maximálnej absorpcii dochádza pri vlnovej dĺžke okolo 260 nm. Žiarenie tejto vlnovej dĺžky nezapríčiňuje ionizáciu /kvantová energia sa udáva na 4,67 eV, t.j. je menšia ako 5 eV, ktoré sú potrebné pre ionizáciu/. Ide tu o tzv. excitáciu atómov, t.j. preskok elektrónov na energeticky vyššie atomárne orbity. Aj excitáciou dochádza k zvýšenej reaktivite molekúl. UV-svetlo sa uplatňuje ako mutagén v tenkých vrstvách najmä pri mikroorganizmoch, menej pri vyšších rastlinách a živočíchoch.

Nepriamy efekt žiarenia spočíva v jeho pôsobení na molekuly vody, pričom dochádza ku vzniku radikálov, H^{\bullet} OH^{\bullet} HO_2^{\bullet} /peroxyl/. Radikály sú účinné akceptory elektrónov, majú oxidačné vlastnosti /pričom samy sa redukujú/. Za prítomnosti kyslíka vznikajú radikály HO_2^{\bullet} a z nich peroxid vodíka a iné organické peroxidy, ktoré sú silné oxidačné činidlá.

Môžeme povedať, že nepriamy efekt žiarenia sa realizuje cez oxidačné procesy v organizme.

Priamy efekt UV-svetla na molekulárnej úrovni sa realizuje zmenami na DNA. Na UV-svetlo zo stavebných kameňov DNA sú najcitlivejšie purínové a pyrimidínové bázy. Pyrimidínové bázy sú rádiosenzitívnejšie ako purínové a z pyrimidínových báz najcitlivejší je tymín. /Guanín je zasa citlivejší na pôsobenie niektorých chemických látok./

Výskumy dokazujú, že UV žiarenie spôsobuje vznik dimérov. Napr. tymínový dimér je typickým produktom UV žiarenia. Vytvára sa medzi dvoma susednými tymínmi, zrušením dvojných väzieb a vytvorením cyklobutanového kruhu. Toto spojenie je veľmi pevné, preto tymínové diméry možno aj experimentálne dokázať.

13.4.1.2 Ionizačné žiarenie

Medzi mutagénne účinné žiarenie patrí ionizačné žiarenie. Pôsobí tak, že vyráža elektróny z atomárnych orbitov. Tak vznikajú pozitívne nabité častice /katióny/ a voľné elektróny. Voľné elektróny reagujú s inými neionizovanými atómami, čím vznikajú anióny - záporne nabité častice.

Ionizáciou sa stávajú molekuly, resp. ich súčasti vysoko reaktívne. Chemické reakcie, ktoré ionizácia zapríčiňuje, prejavujú sa buď smrťou bunky, alebo rezultujú ako mutácie.

Zo skupiny ionizačného žiarenia sa pre indukciu mutácií najčastejšie používa X-žiarenie /rtg - žiarenie/, ďalej γ žiarenie, zdrojom ktorého je ^{60}Co .

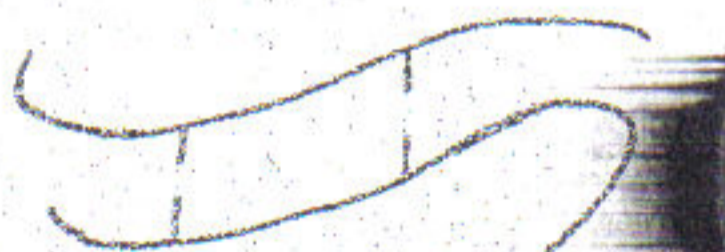
Žiarenie β /elektróny/ je svojím efektom podobné elektromagnetickému žiareniu /UV-svetlo, X-lúče a γ -lúče/.

Protóny a α -lúče majú pre svoju relatívne vysokú hmotu a elektrický náboj malú penetračnú schopnosť. Vysokú penetračnú schopnosť majú neutróny.

Ionizačné žiarenie spôsobuje chemické zmeny v molekulách DNA. Následkom chemických zmien môžu nastať v molekulách nukleových kyselín štruktúrne zmeny, ktoré spôsobujú zmenu ich funkcie. V mieste ionizácie sa dajú zistiť nové väzby tzv. križové väzby /crosslinky/. Tieto môžu byť buď intramolekulárne /a/ alebo intermolekulárne /b/.



a



b

Vodíkové väzby patria medzi slabé väzby, a preto sú prvé, ktoré sa účinkom žiarenia rozrušujú. Ďalej môže dôjsť k zlomu v jednom alebo oboch reťazcoch.

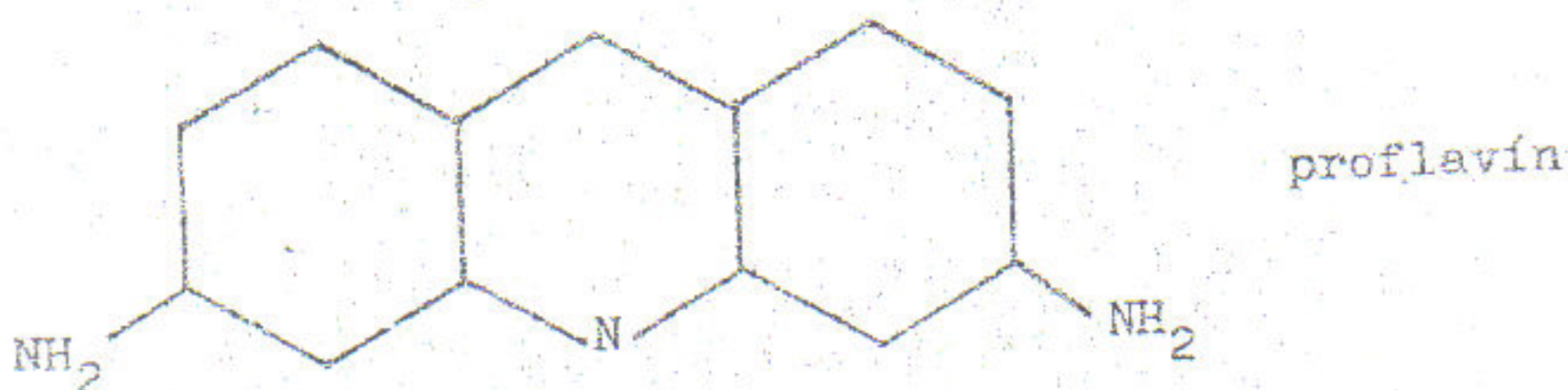
V prítomnosti kyslíka sa môže koniec zlomu spojiť s kyslíkom a tým sa stáva neschopným spojiť sa s roztrhnutým reťazcom. Pri dvojitom zlome vznikajú fragmenty DNA. Reaktívne konce fragmentov jednej molekuly môžu sa spájať s reaktívnymi koncami druhej molekuly, takže vznikajú nové spojenia a nové sekvenčné usporiadania v molekule DNA.

Crosslinky môžu vzniknúť aj medzi DNA a bielkovinami, čo má často letálny efekt.

13.4.2 CHEMICKÉ MUTAGÉNY

13.4.2.1 Akridíny

Medzi najvýznamnejšie chemické mutagény patria bázické farbivá akridínového typu /napr. proflavín/. Spôsobujú posunové mutácie, lebo sú schopné včleňovať sa do molekuly DNA. Ich štruktúra sa podobá štruktúre purín-pyrimidínovej, a čo do veľkosti je schopná vsunúť sa práve do medzery medzi dve susedné bázy /interkalácia/.



Akridíny pôsobia najmä na replikujúcu sa DNA. Spôsobujú inzercie, delécie a pôsobia i na enzýmové systémy. Spôsobujú zmeny vedúce k posunu v čítaní genetického kódu, t.j. posunové, resp. frameshift mutácie.

13.4.2.2 Antimetabolity

Najznámejšie antimetabolity sú zo skupiny analógov báz. Účinok analógov báz spočíva v tom, že sú schopné zastupovať normálnu bázu, napr. 5-brómuracil /5-BrU/ je analógom tymínu. V normálnej keto-forme sa páruje s adenínom /ako tymín/. Pri prešmyku na enol-formu sa páruje s guanínom, čím spôsobuje tranzičné zmeny.

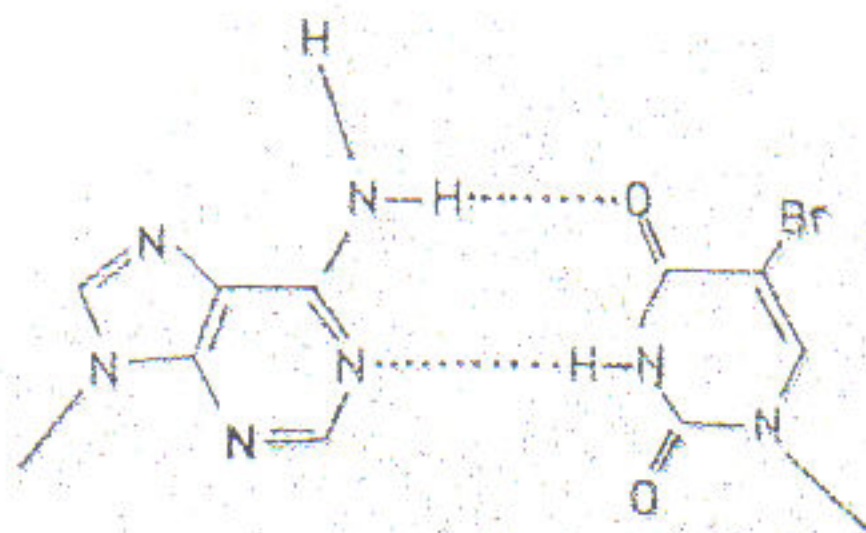
Obdobne 2-aminopurín /2-AP/ ako analóg adenínu sa páruje dvoma H-väzbami s tymínom, ale v zriedkavej imino-forme sa môže dvoma vodíkovými väzbami párovať s cytozínom. Vzácnne sa 2-AP páruje s cytozínom aj jednou vodíkovou väzbou /obr. 52/.

Treba tu poznamenať, že tautomeria báz, ktorá sa normálne odohráva v DNA je príčinou spontánnych mutácií typu a transverzie.

13.4.2.3 Kyselina dusitá

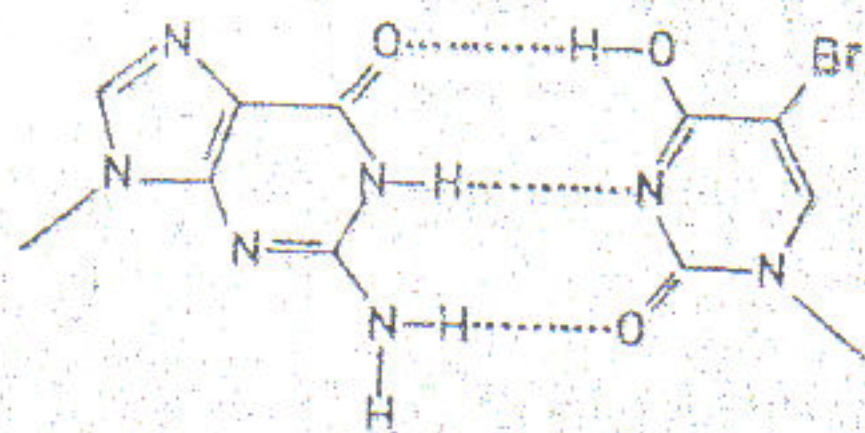
Pôsobením kyseliny dusitej na dusíkaté bázy nastáva ich deaminácia:

- adenín mení sa na hypoxantín /HX/,
- cytozín na uracil a
- guanín na xantín /X/ - obr. 53.



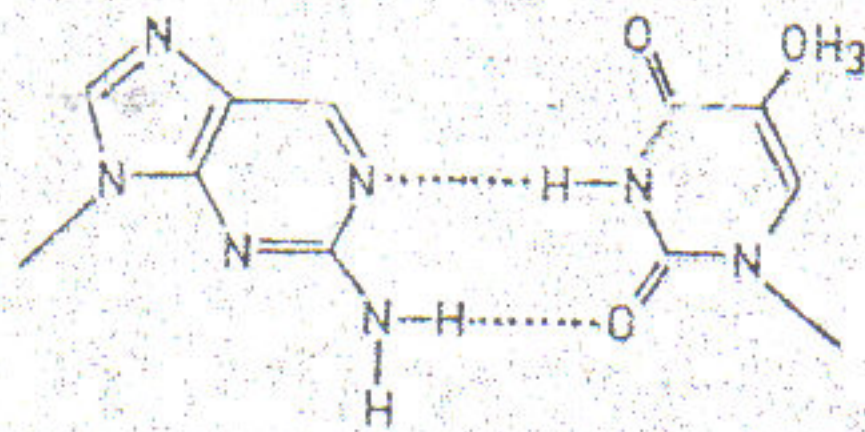
ADENÍN

5-BRÔMURACIL (keto-forma)
(analóg tymínu)



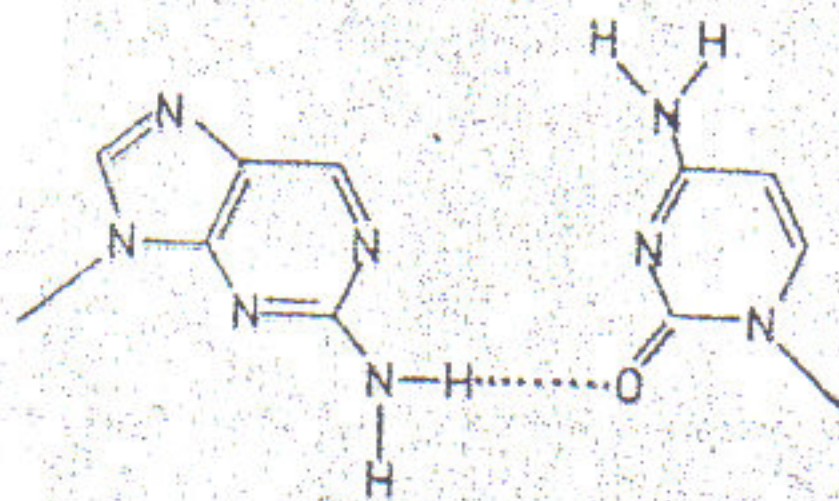
GUANÍN

5-BRÔMURACIL (enol-forma)



2-AMINOPURÍN
(analóg adenínu)

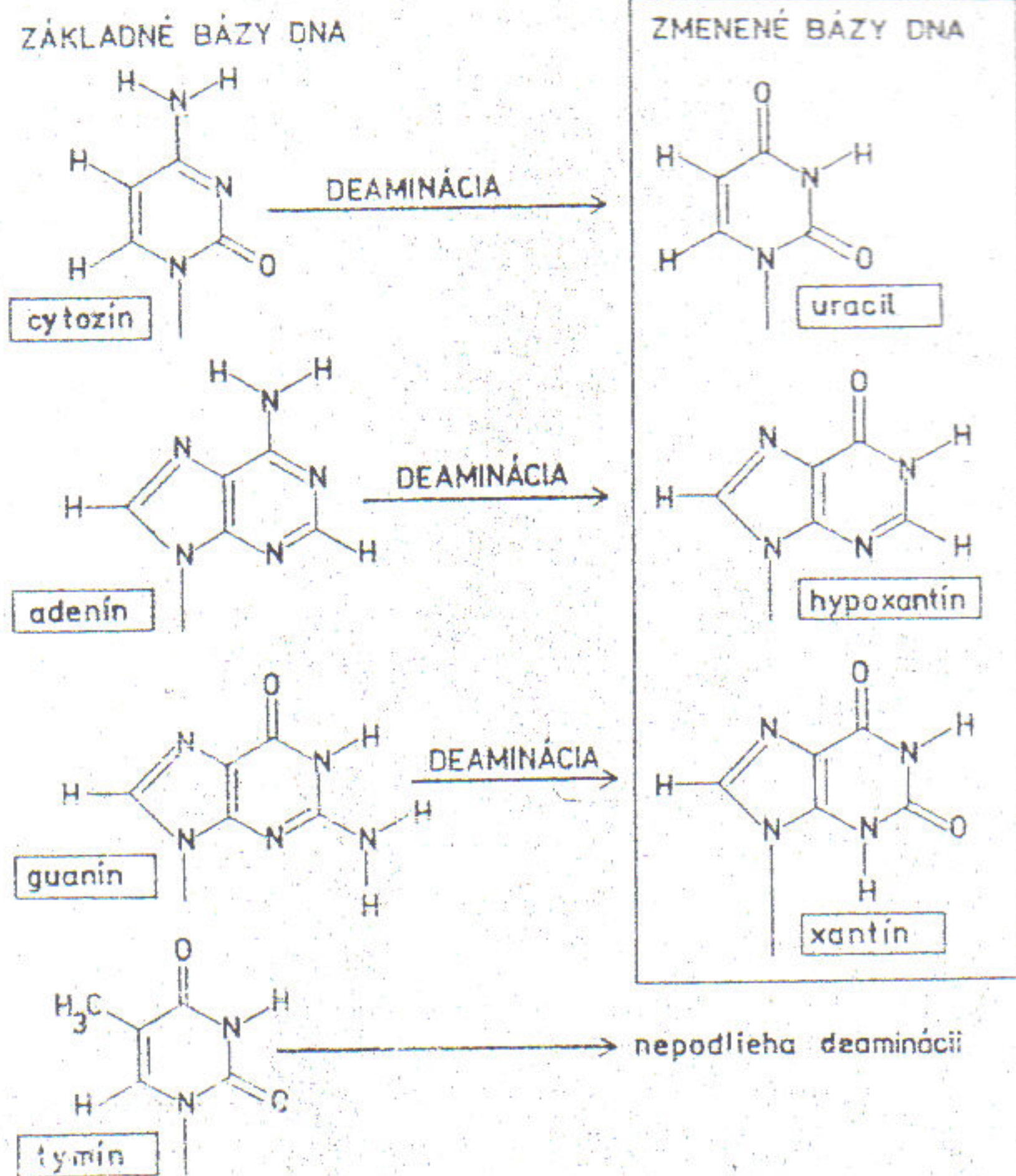
TYMÍN



2-AMINOPURÍN

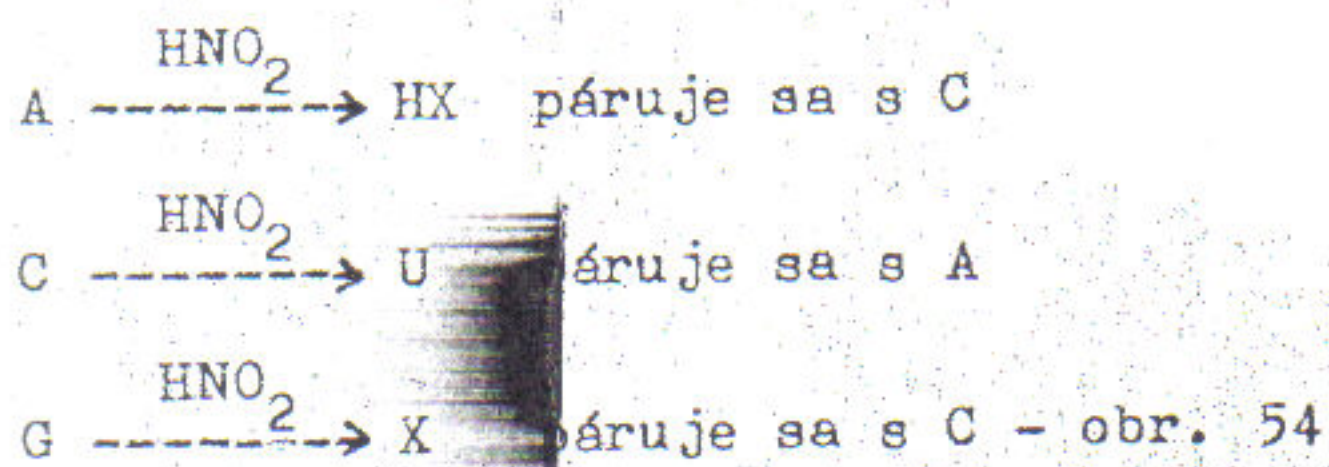
CYTOZÍN

Obr. 52 Párovanie 5-brômuracilu a 2-aminopurínu



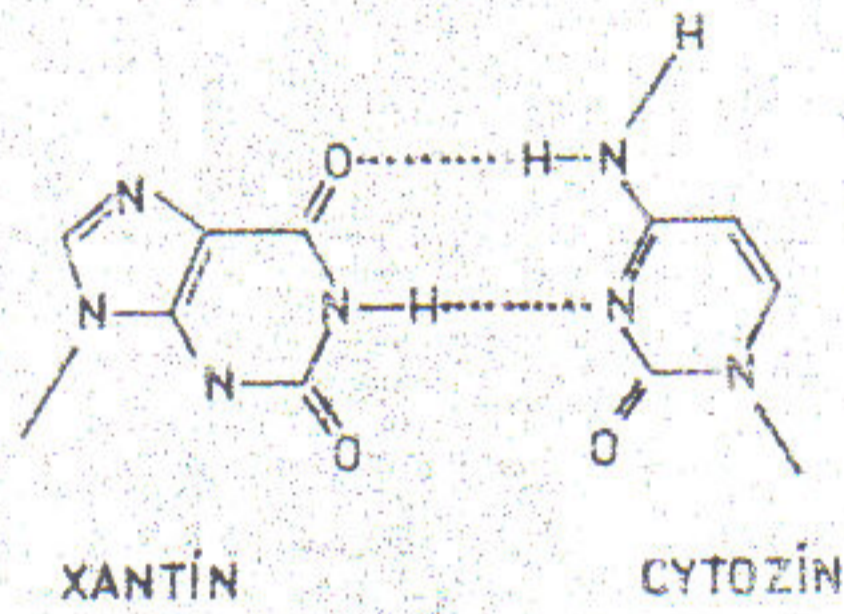
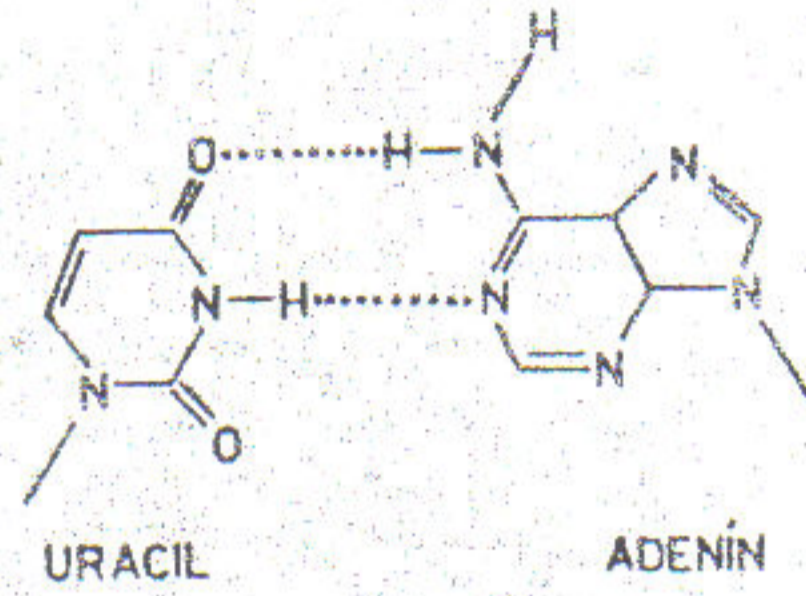
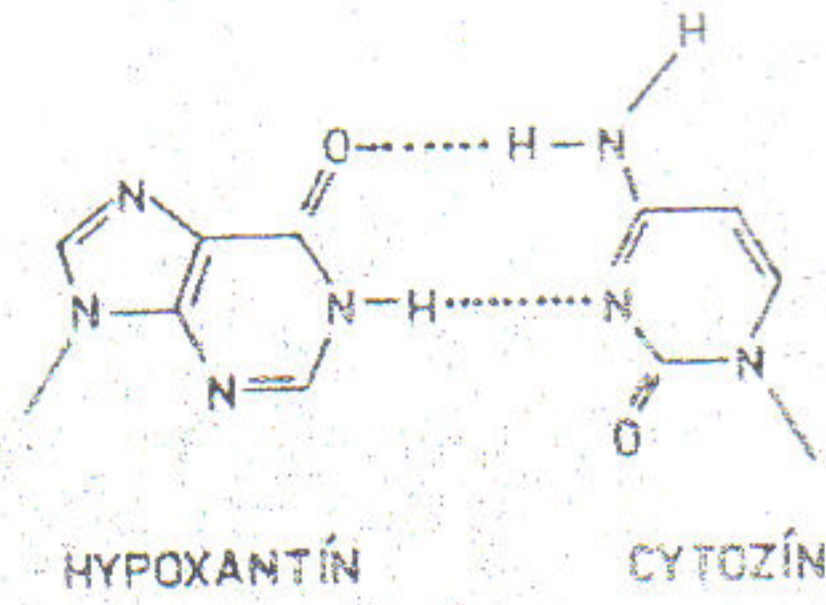
Obr. 53 Deaminácia dusíkatých báz pôsobením kyseliny dusitej /HNO₂/

Uvedené zmeny vedú k zmenenej párovacej schopnosti a k tranzičným zmenám:

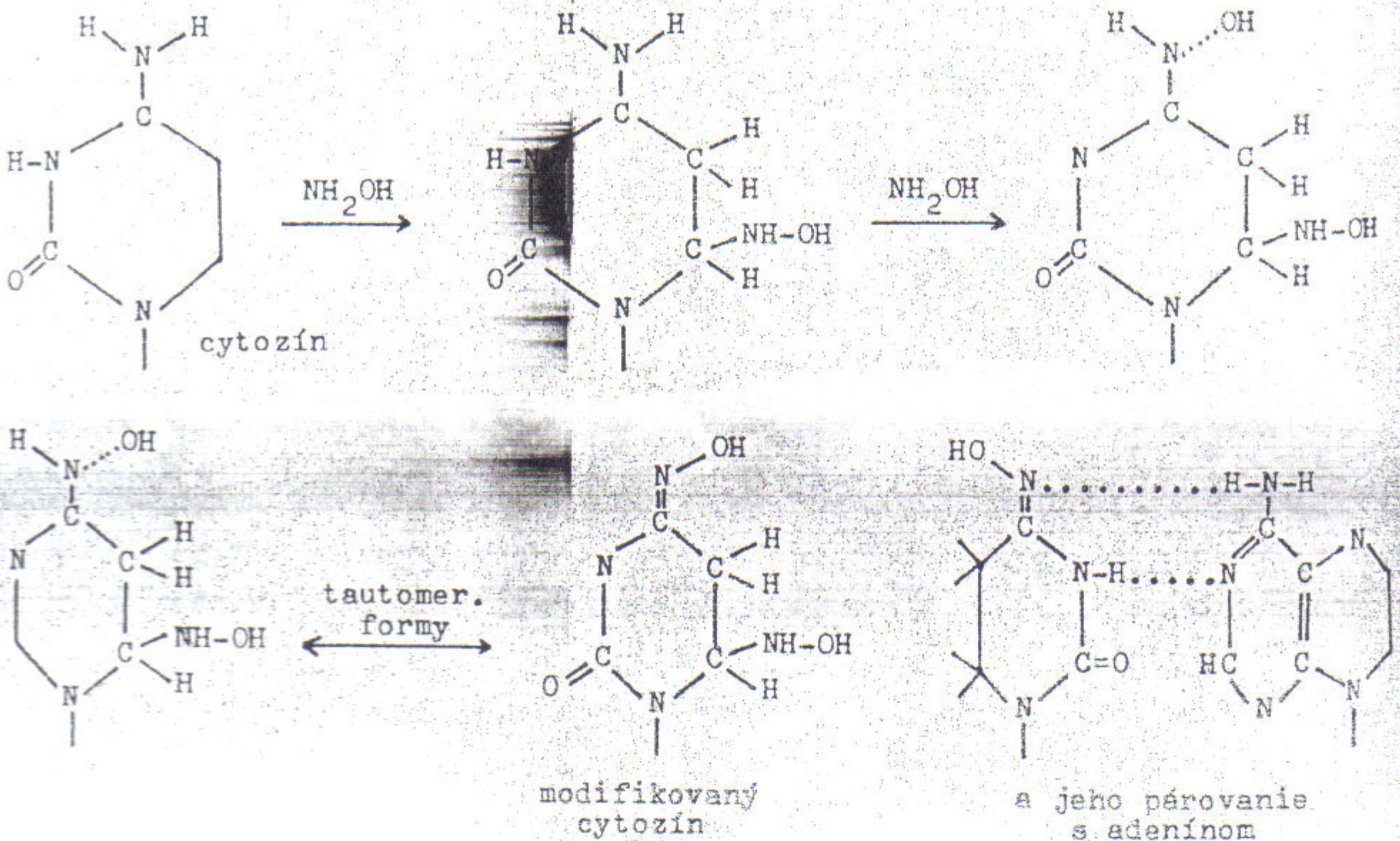


13.4.2.4 Hydroxylamín

Reaguje najmä s cytozínom a aminuje ho v polohe C-6. Modifikovaný C sa páruje s A, čím spôsobuje tranzičiu GC \rightarrow AT.



Obr. 54 Párovanie deaminovaných báz



13.4.2.5 Alkylačné látky

Tvorí najbohatšiu zastúpenú skupinu chemických mutagénov. Patria sem okrem iných: dimetylsulfát /DMS/, dietylsulfát /DES/, etylmetansulfonát /EMS/, ďalej alkylnitrozomochoviny: metylnitrozomochovina /MNM/, etylnitrozomochovina /ENM/, metylnitrozoguanidín /MNG/ a mnohé ďalšie.

Charakteristickou vlastnosťou tejto skupiny látok je, že prenášajú na DNA alkylové skupiny. Z dusíkatých báz najcitlivejší je guanín, ktorý sa najčastejšie alkyluje v polohe N-7. Takto alkylovaný guanín sa môže chybné párovať s tymínom, čo vedie k tranzíčnej zmene.

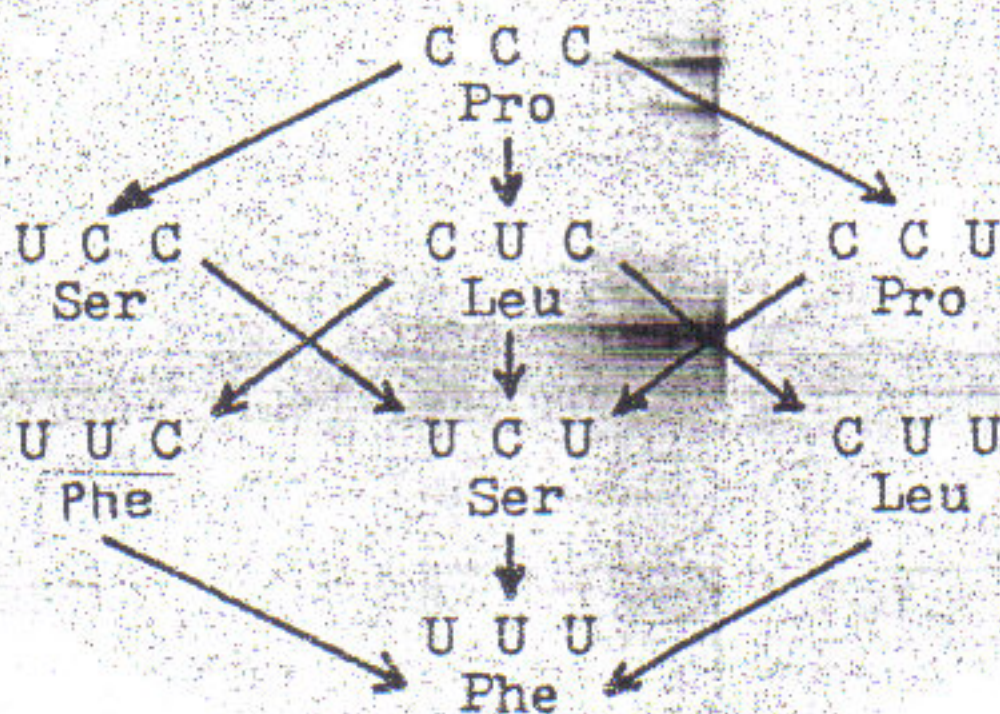
Treba tu poznamenať, že alkylovaný guanín v polohe N-7 môže byť aj tolerovaný vo forme tzv. predmutačnej zmeny a nemusí vždy viesť k chybnému párovaniu /nie je párovacou polohou/.

Väčší dôsledok pre DNA ako alkylácia N-7 má alkylácia polohy O-6, lebo je to párovacia pozícia. Účinok alkylačných látok závisí od rýchlosti dealkylácie, ktorá prebieha jednak spontánne a jednak s účasťou enzýmov v rámci reparačných procesov.

13.5 VÝZNAM INDUKCIE MUTÁCIÍ

Indukované mutácie majú mnohoraký význam pri riešení teoretických otázok molekulárnej genetiky a napokon mnohé výsledky dnes už našli praktické uplatnenie. Spomeňme len niektoré.

V procese indukovanej mutagenézy na vírus tabakovej mozaiky /VTM/, ktorý má RNA sa pôsobilo deaminačným činidlom kyselinou dusitou. Deaminované bázy kodovali iné aminokyseliny v bielkovinovom obale. Dnes vieme, že každá bielkovinová jednotka VTM sa skladá zo 158 aminokyselín a poznáme aj ich sekvenciu. Zámenou báz následne vznikla aj zámena aminokyselín v bielkovinovom reťazci napr. postupnou deamináciou triplettu CCC, môže dôjsť k zámene aminokyselín nasledovne:



Táto schéma prešla do povedomia ako tzv. centrálne dogma molekulárnej biológie. Vyjadruje skutočnosť, že genetická informácia môže prechádzať z nukleovej kyseliny do nukleovej kyseliny, ale nemôže prechádzať z bielkoviny do nukleovej kyseliny.

Medzi uvedenými tromi typmi biomakromolekúl by sumárne mohli existovať tieto smery prenosov:

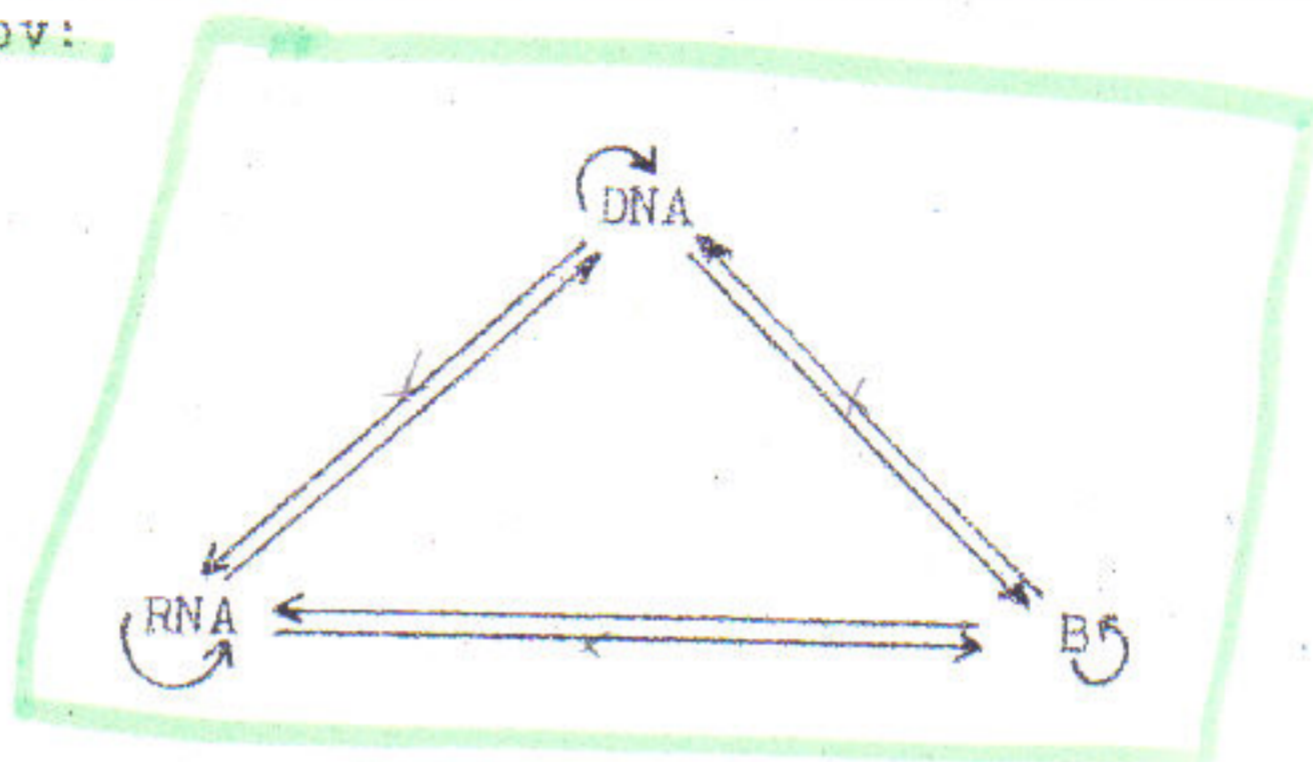
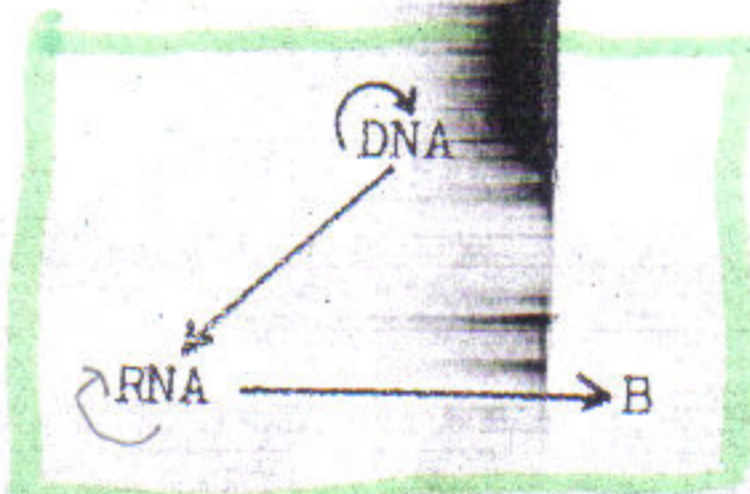


Schéma zahrňuje nasledovné procesy prenosu informácie:

- DNA → DNA
- DNA → RNA
- RNA → B
- RNA → RNA
- RNA → DNA
- DNA → B
- B → B
- B → RNA
- B → DNA

V období formulovania "centrálnej dogmy" boli známe len prvé tri smery prenosov: DNA - DNA, t.j. reduplikácia DNA, ďalej DNA - RNA, t.j. transkripcia a RNA - B, t.j. translácia. Situáciu vystihuje redukovaná schéma:



- alternatívne

Neskôr boli objavené RNA vírusy /R 17, VTM, Qβ a i./, pri ktorých jednorozčtová RNA predstavuje samotný genetický materiál, to znamená, že sú primárnymi nositeľmi genetickej informácie a replikujú sa pomocou enzýmu RNA-replikázy. Z toho vyplýva, že schéma centrálnej dogmy sa obohatila o smer RNA - RNA.

Roku 1970 Temin a Baltimore publikovali výsledky experimentov, v ktorých dokázali existenciu prenosu informácie z RNA vírusu do DNA hostiteľskej bunky.

- 20 -

Tento dovtedy neznámy smer prenosu genetickej informácie sa realizuje pomocou špecifického enzýmu reverznej transkriptázy, stručne nazývanej revertázy. Je to DNA - polymeráza, ktorá syntetizuje DNA na matrici RNA. Je to teda na RNA závislá DNA - polymeráza. Ide tu o prenos informácie z RNA onkogénnych vírusov do chromozómu hostiteľa. V hostiteľovi potom tento vírus existuje vo forme tzv. provírusu. Takto sa chová, napr. Rousov sarkómový vírus a iné onkogénne vírusy. Máme teda ďalší, experimentálne dokázaný smer prenosu informácie, a to RNA - DNA.

Roku 1966 Naora a r. 1967 Gamov v pokusoch in vitro dokázali, že je možný prenos informácie z DNA na bielkoviny. Uvedení autori predpokladajú, že jeden reťazec slúži ako zdroj informácie /matrica/ a druhý ako mediátorová RNA. Ďalšie experimenty však uvedený predpoklad nepotvrdili. Otázka naďalej zostáva otvorená, ale zdá sa pravdepodobné, že sa tento smer prenosu nereali-
zuje ani vo výnimočných prípadoch.

Doposiaľ nie je nič známe o prenosoch genetickej informácie v smere od bielkovín /B - B, B - RNA, B - DNA/.

Treba na tomto mieste však pripomenúť, že v súčasnosti v in vitro systéme dokážu experimentátori na základe primárnej štruktúry bielkoviny odvodiť sekvenciu nukleotidov v mediátorovej RNA, ktorá môže byť matricou pre syntézu tzv. cDNA, t.j. reťazec komplementárny k mRNA. A napokon táto cDNA slúži ako matrica na dosyntetizovanie druhého reťazca DNA. Zdôrazňujeme však, že tieto experimenty nepotvrdzujú, že by tok informácie prebiehal od bielkovín. Zdá sa, že tento smer by bol pre bunku ešte energeticky náročnejší, ako proteosyntéza v smere DNA - RNA - B.

Ako sme už uviedli, v čase formulovania centrálnej dogmy boli známe len prvé tri smery prenosov /DNA - DNA, DNA - RNA a RNA - B/. Neskôr boli objavené RNA vírusy, ktoré majú genetický materiál RNA. Teda v čase, keď bola centrálna dogma vyslovená, prvé tri prenosy sa považovali za dokázané, ďalšie tri prenosy za zriedkavé alebo nedokázané a posledné tri prenosy za nepravdepodobné.

Vývoj ukázal, že prenosy RNA - RNA, RNA - DNA sú experimentálne dokázateľné, hoci sú zriedkavé. Z hľadiska súčasného stavu poznania prenosov genetickej informácie, môžeme tieto rozdeliť do troch kategórií:

I. Všeobecné prenosy:

DNA → DNA

DNA → RNA

RNA → B

t.j. prenosy, ktoré možno pozorovať vo všetkých bunkách /s výnimkami, ktoré sme si uviedli/.

II. Špeciálne prenosy:

RNA \dashrightarrow RNA

RNA \dashrightarrow DNA

DNA \dashrightarrow B /?/

t.j. prenosy, ktoré sa vyskytujú zriedkavo.

III. Neznáme prenosy:

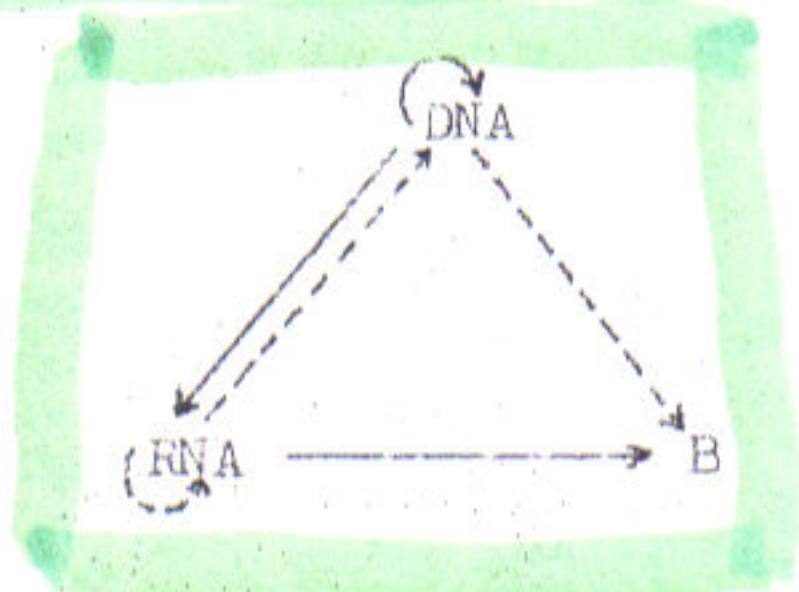
B \dashrightarrow B

B \dashrightarrow RNA

B \dashrightarrow DNA

t.j. prenosy doteraz nedokázané.

Schematické znázornenie potom vyzerá nasledovne:



kde všeobecne platné prenosy /I/ sú označené plnou čiarou a špeciálne prenosy /II/ prerušovanou čiarou.

Je možné, že v budúcnosti zaradíme prenosy RNA - RNA a RNA - DNA do prvej skupiny a označíme ich v schéme plnou čiarou.

Z uvedeného stručného pohľadu na problém je zrejmé, že k hodnoteniu "centrálnej dogmy" treba pristupovať kriticky a že vyplňovanie medzier v jej schéme je logickým dôsledkom vývoja vedy a platnosti poučky dialektiky, že neexistujú veci nepoznateľné, len nepoznané.

11. REGULÁCIA PROTEOSYNTÉZY

11.1 STRUČNÁ DEFINÍCIA POJMU GÉN

Skôr, ako si ozrejmime regulačné mechanizmy, bude vhodné, ak si objasníme aspoň v stručnosti pojem gén.

Existuje veľa definícií génu, podľa toho, za akú jednotku ho považujeme /môže byť jednotkou mutácie, rekombinácie alebo funkcie/. V našej úvahe sa obmedzíme na gén, ako na funkčnú jednotku a pokúsime sa nájsť vhodnú a stručnú definíciu, napr. takúto:

- gén je úsek na molekule DNA, ktorý nesie informáciu pre produkciu funkčnej molekuly RNA. Tieto RNA môžu byť mRNA, tRNA, rRNA alebo iné typy RNA. Sú to všetko produkty priamej transkripcie informácie z matrice DNA do RNA.

mRNA môže ďalej slúžiť ako matrica pre syntézu bielkovín. V tomto prípade úsekom na DNA hovoríme štruktúrne gény, lebo kódujú primárnu štruktúru polypeptidu ako translačného produktu.

Okrem toho existujú v DNA ešte regulačné gény, a to dvojakého typu. Také, ktoré majú informáciu pre bielkovinové produkty /napr. regulačný gén, ktorý produkuje represorovú bielkovinu/ a také, ktoré nedávajú bielkovinový produkt /promotor, operátor, presnejšie operátorová sekvencia/.

V najnovšom návrhu molekulárnogenetickej terminológie sa gén definuje takto:

Gén je úsek polynukleotidového reťazca DNA alebo RNA, ktorý plní regulačnú alebo štruktúrnú funkciu; kóduje primárnu štruktúru polypeptidu ako translačného produktu alebo sa prepisuje do primárnej štruktúry tRNA alebo rRNA, prípadne ďalších typov RNA, ktoré nie sú určené na transláciu /nízko-molekulárne RNA/.

11.2 REGULAČNÉ MECHANIZMY

Je všeobecne známe, že živé organizmy majú väčšiu kapacitu /väčšiu objem genetickej informácie, ako sa v určitom časovom úseku realizuje. Predpokladá sa, že dokonca len 10 % všetkej genetickej informácie sa v danom okamihu prepisuje do aktívneho produktu /rRNA, tRNA alebo mRNA a bielkovín/. Hovoríme, že činnosť génov je pod kontrolou a je regulovaná mechanizmami, ktoré nazývame regulačné.

11.2.1 REGULÁCIA SYNTÉZY ENZÝMOV

Už v najjednoduchších systémoch, akými sú baktérie, sú gény "zapínané" a "vypínané" podľa potrieb bakteriálnej bunky.

Baktéria E.coli obsahuje asi 2000 génov, ktoré nefungujú naraz, ale v časovej postupnosti a v závislosti na potrebách bunky a na prostredí, v ktorom sa nachádza. Ak totiž dáme baktérii do média, v ktorom žije, určitú aminokyselinu /napr. histidín/, bolo by pre ňu veľmi neekonomické, aby "vyrábala" enzýmy pre jej syntézu. Opačne zasa, substrát, ktorý ponúkame bakteriálnej bunke, v prípade potreby /ak je v núdzi/, zúžitkuje takým spôsobom, že si začne syntetizovať enzýmy, ktoré dokážu daný substrát rozložiť na také súčasti, ktoré sú pre ňu prijateľné /využiteľné/. Hovoríme, že bunka vie regulovať svoj vlastný metabolizmus. Z toho vyplýva, že genetická informácia má nielen autoreplikačnú, ale aj autoregulačnú schopnosť.

Regulačné mechanizmy vedú k tomu, že sa realizuje taká metabolická dráha, ktorá je v danom okamihu pre bunku najvýhodnejšia.

Pravda, nie všetky bielkoviny /enzýmy/ podliehajú takejto regulácii. V bunke existujú dva typy enzýmov:

- konštitutívne, ktoré sa tvoria nezávisle na potrebe bunky, nezávisle od prostredia a v konštantnom množstve /napr. enzýmy glykolýzy/ a
- indukovateľné, ktoré sa vyskytujú v bunke vo veľmi nízkej koncentrácii. V prítomnosti špecifického substrátu /induktora/ sa ich koncentrácia mnohonásobne zvýši najmä v tých prípadoch, ak je uvedený substrát zdrojom uhľohľadka /napr. β -galaktozidáza v prítomnosti laktózy ako induktora/.

Regulácia syntézy bielkovín sa realizuje na rôznych úrovniach: na úrovni transkripcie i translácie. Existujú rozdiely v regulácii pri prokaryotoch a eukaryotoch, ale vzhľadom na známy fakt, že poznatky o regulačných systémoch pri prokaryotoch sú väčšie, ukážeme si v hrubých rysoch, ako fungujú regulačné mechanizmy pri E.coli. Detailnejšie poznatky z regulácie prokaryotov a eukaryotov budú predmetom špeciálnych prednášok.

Rýchlosť proteosyntézy je kritickým parametrom, určujúcim typ bunkových procesov. V baktériách je riadená predovšetkým na úrovni transkripcie.