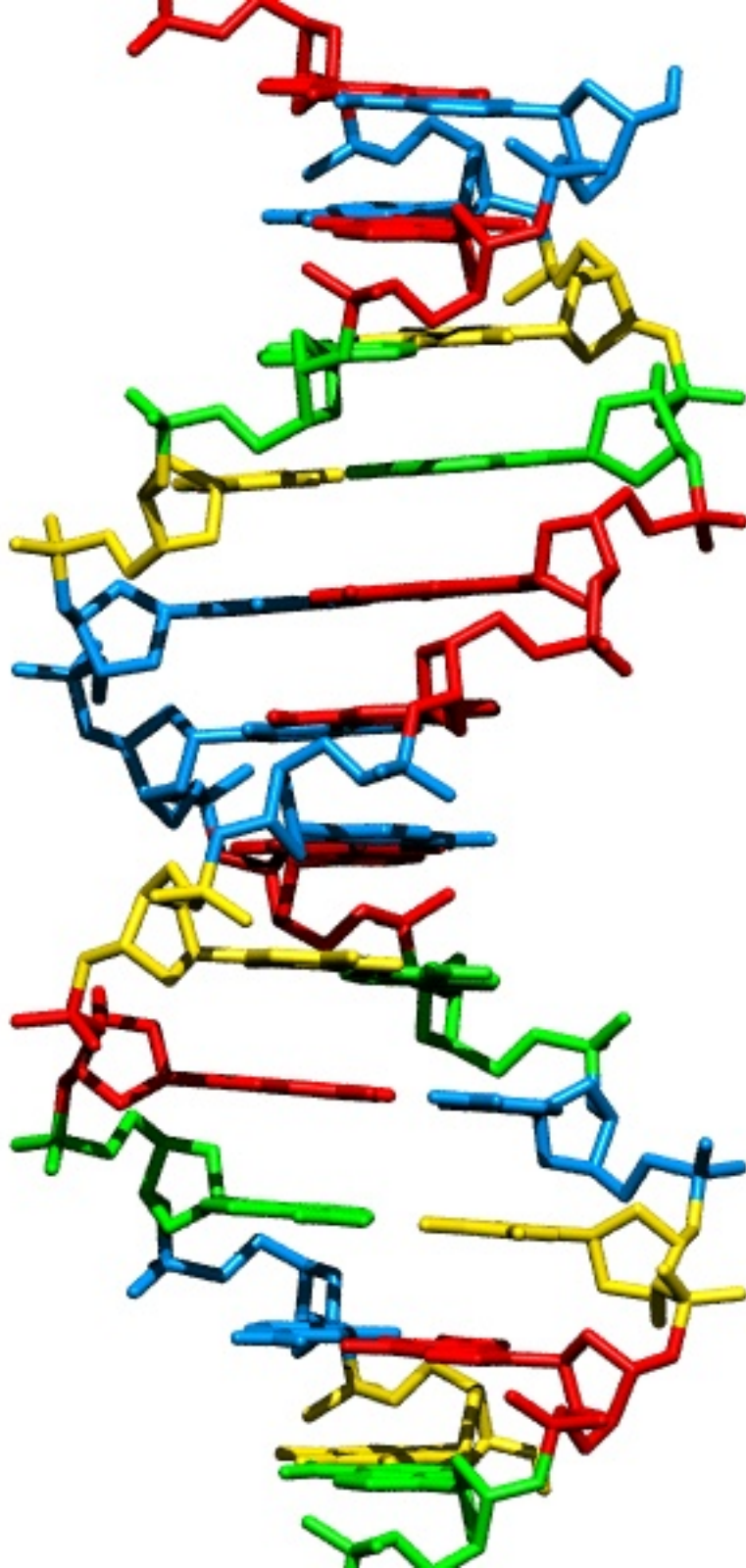


A-PDF MERGER DEMO



Takto sa dokázalo, že zmena v genetickom materiáli /v danom prípade RNA/ sa odráža v aminokyselinovom zložení bielkoviny. Zmena bielkoviny je zapríčinená zmenou v genetickom kóde /mutáciou/.

Iným príkladom je dnes už klasický dôkaz o tom, ako jeden zmenený nukleotid je schopný spôsobiť ďalekosiahle zmeny vo funkcii bielkovinového reťazca hemoglobínu.

Ako je známe, ľudský hemoglobín sa skladá z dvoch α a dvoch β reťazcov. V β reťazci v polohe 6 má normálny hemoglobín A kyselinu glutamovú, hemoglobín S, ktorý spôsobuje mesačkovitú anémiu, má valín a hemoglobín C, ktorý spôsobuje iný typ anémie, má lyzín.

	1	2	3	4	5	6	7	8
HB A	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys
HB S						Val		
HB C						Lys		

Kyselina glutamová je kódovaná týmito tripletmi: GAA, GAG; valín: GUU, GUC, GUA, GUG a lyzín: AAA, AAG. Zámenou jedného nukleotidu môže dôjsť k zámene aminokyseliny nasledovne:

Val	G U A		G U G	Val
	↑		↑	
Glu	G A A	analogicky	G A G	Glu
	↑		↑	
Lys	A A A		A A G	Lys

O tom, že mutácia v jednom nukleotide môže mať veľké dôsledky /ako v práve uvedenom príklade s hemoglobínom/ si môžeme demonštrovať na jednoduchej vete z troj písmenových slov, ktorá znie:

TEN DOM MÁŠ AKO SEN

Zámenou jednej hlásky dostaneme nasledovnú vetu, ktorá úplne mení pôvodný obsah:

TEN DYM MÁŠ AKO SEN.

Pomocou mutácií Benzer so spolupracovníkmi dokázal, že kód je tripletový a neprekrývajúci, lebo napr. už v príklade s hemoglobínom by museli byť v prípade prekryvania zmenené aspoň dve aminokyseliny /ale je len jedna/.

Ďalšie dôkazy prichádzajú s Benzerovými pokusmi s fágom T4. Benzer pracoval s interkalačnými činidlami a indukoval posunové mutácie. Zostaňme pri príkladoch z lingvistiky:

JÁN MAL DOM AKO EVA

Vsunutím jedného nukleotidu dostaneme takúto informáciu:

JÁN NMA LDO MAK OEV A

Každému je jasné, že nemá zmysel. Vsunutím ďalšieho nukleotidu v blízkosti prvej adície tiež nemení nič na nesprávnom čítaní:

JÁN NNM ALD OMA KOE VA

Až vsunutie troch nukleotidov obnovuje správne čítanie genetického kódu za miestom poškodenia /za mutáciou/:

JÁN NNN MAL DOM AKO EVA

Podobne by sme si mohli uviesť príklad s deléciou, pri ktorej strata troch nukleotidov obnovuje správne čítanie informácie.

Treba ešte poznamenať, že DNA nie je po celej dĺžke molekuly rovnako citlivá k mutagénom. Existujú miesta, ktoré mutujú niekoľkonásobne rýchlejšie. Dostali názov horúce miesta /hot spots/. Zároveň sa zistilo, že existujú gény, ktoré ovplyvňujú frekvenciu mutácií v susedných génoch. Tieto gény sa nazývajú mutátory.

A čo indukovaná mutagenéza priniesla praxi?

Na tomto mieste uvedieme len, že sú to vysokoproduktívne kmene mikroorganizmov, nové kultivary kultúrnych rastlín a množstvo línií vhodných na kríženie.

Indukovaná mutagenéza predstavuje dnes efektívny nástroj na štúdium teoretických otázok genetiky a výsledky tohto štúdia a výskumu využíva už v mnohých odvetviach prax. Je to oblasť, v ktorej ide o priame prepojenie vedy s praxou.

Ako priamy príklad si uveďme, že zdokonaľovanie metód detekcie mutácií na rôznych úrovniach /molekulárnej, chromozómovej, bunkovej, organizmálnej, populačnej/ viedlo vedcov k požiadavke, aby všetky chemické látky, ktoré sa dávajú do prevádzky /napr. v medicíne, farmácii, potravinárstve, poľnohospodárstve a v iných odvetviach/ prešli prísny testovacím systémom.

Od januára 1986 testovanie látok vonkajšieho prostredia v SSR nadobudlo legislatívnu podobu.

Legislatíva zahrňuje tri kategórie testov:

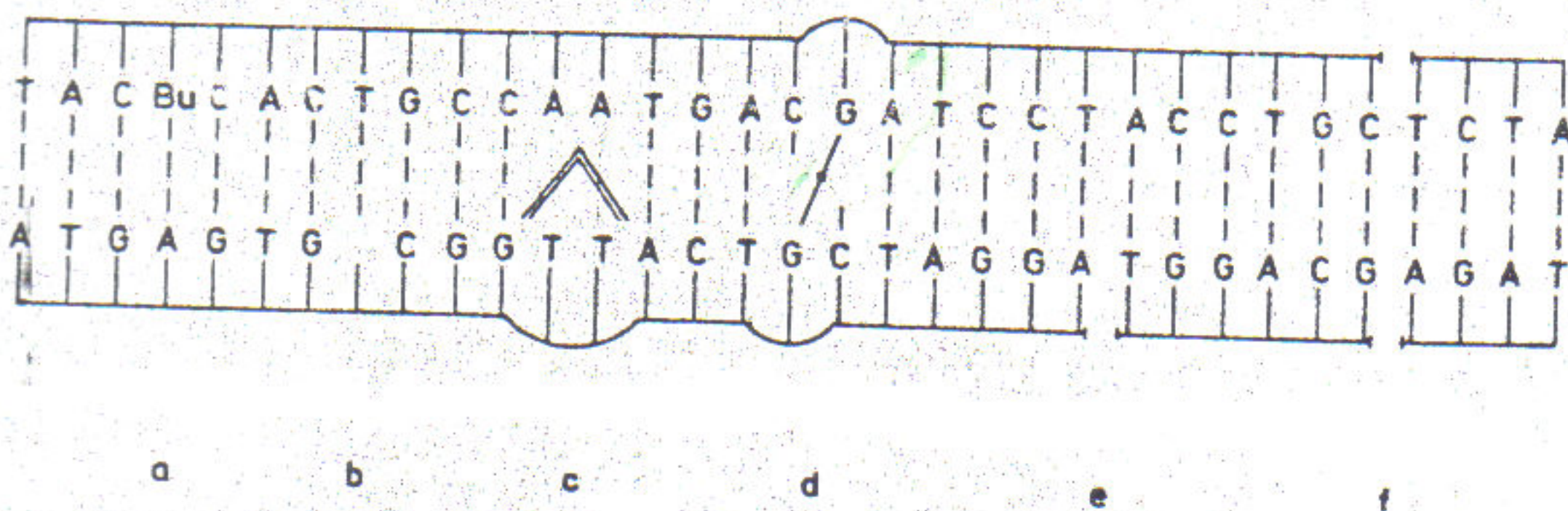
- povinné,
- overovacie a
- doplnkové.

Ich podrobná charakteristika bude zahrnutá v špeciálnej prednáške z mutačného procesu.

14. REPARÁCIE

14.1 REPARAČNÉ MECHANIZMY

Napriek tomu, že DNA ako nosič genetickej informácie je molekula dost stabilná, predsa v nej prebiehajú neustále zmeny. Tieto spočívajú jednak v spontánnom tautomernom prešmyku báz a jednak vtedy, keď je DNA vystavená pôsobeniu vonkajších faktorov - mutagénov. Mutagény spôsobujú na DNA štruktúrne zmeny, ktoré vedú k zmene jej informačného obsahu - k mutáciám alebo dokonca majú za následok smrť organizmu. Typy najčastejších poškodení znázorňuje obr. 55.



- a zabudovanie „falošnej“ bázy
- b strata bázy
- c tvorba dimérov
- d crosslink
- e jednoreťazcový zlom
- f dvojreťazcový zlom

Obr. 55 Schematické znázornenie najčastejších typov poškodení molekuly DNA

V ľudskej somatickej bunke sa nachádza 50 - 100 000 génov. Asi 5000 purínov na bunku a deň sa stráca z DNA v dôsledku tepelného porušenia /termálnej disrupcie/ N-glykozidickej väzby medzi bázou a deoxyribózou. Spontánna deaminácia cytozínu na uracil je príčinou zmeneného párovania báz. Ultrafialové svetlo zo slnka zasa spôsobuje vznik tymínových dimérov. Ak predsa výskyt

spontánnych mutácií nie je príliš veľký, znamená to, že bunka musí mať nejaké mechanizmy, ktoré spôsobujú, že sa očakávaná frekvencia mutácií znižuje. Tieto mechanizmy sa experimentálne potvrdili a zahrňujeme ich pod pojem opravne alebo reparačné procesy.

Prvoradou úlohou opravných procesov je zachovanie integrity molekuly DNA a odovzdanie neporušenej informácie potomstvu. Časove sa môže reparácia odohrávať pred replikáciou, v priebehu replikácie alebo po replikácii.

Vysporiadanie s poškodením môže mať tieto podoby:

Predreplikačnú reparáciu, ktorá zahrňuje:

- reverziu poškodenia,
- odstránenie poškodenia /excíziu/.

Tolerovanie:

- bez opravy,
- obídením /bypassing/.

Poreplikačnú reparáciu:

- rekombináciou,
- SOS-reparáciou.

14.2 PREDREPLIKAČNÁ REPARÁCIA

14.2.1 REVERZIE

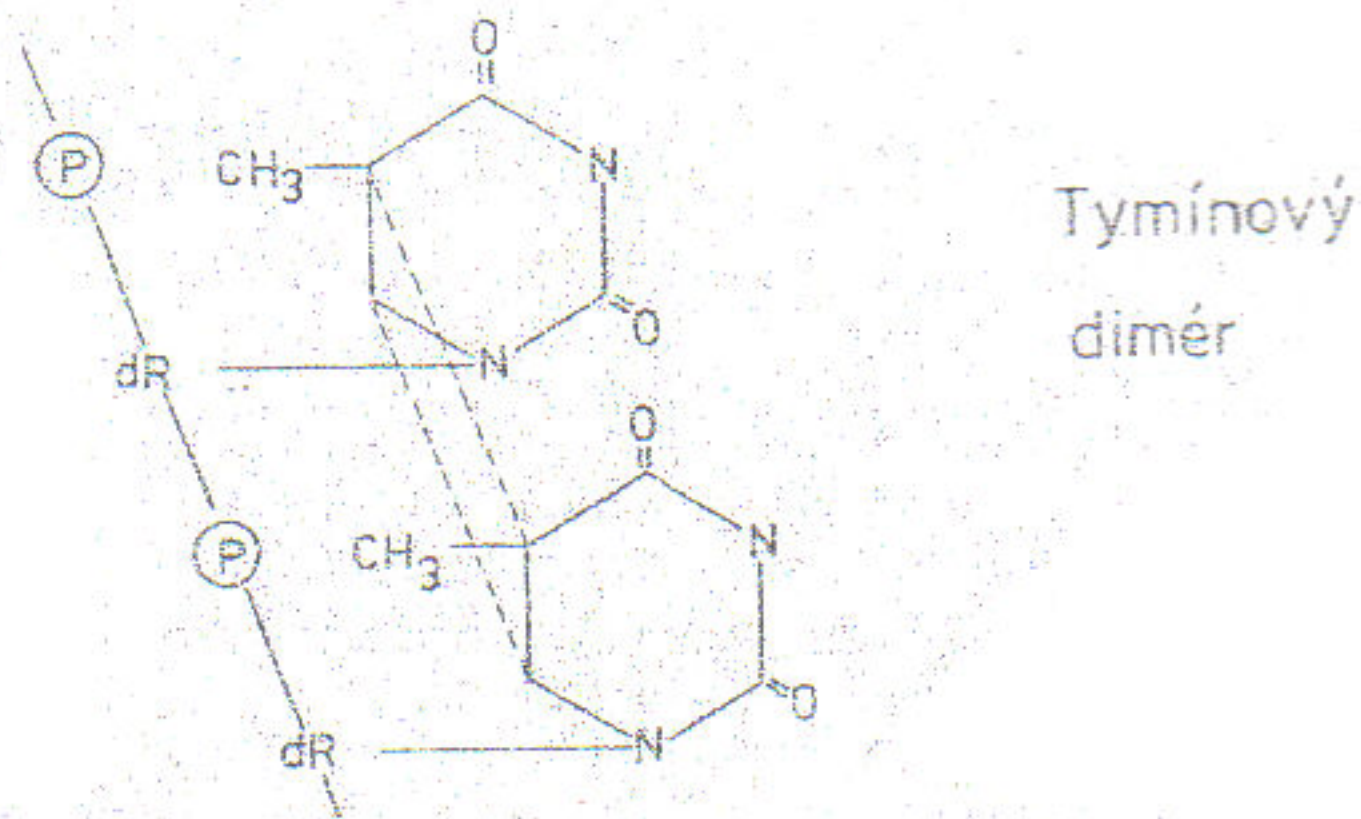
Medzi tento typ opravy počítame:

- fotoreaktiváciu,
- dealkyláciu.

14.2.1.1 Fotoreaktivácia

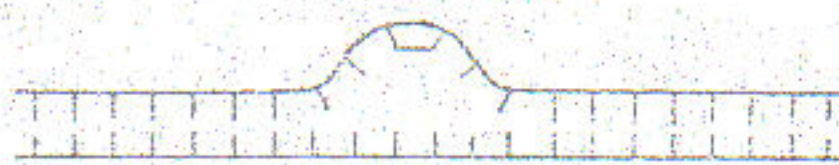
Fotoreaktivácia predstavuje proces monomerizácie dimérov za pôsobenia viditeľného svetla s vlnovou dĺžkou 320-410 nm, ktoré je potrebné na aktiváciu fotoreaktivačného enzýmu. Fotoreaktivačný enzým, stručne nazývaný fotolyáza nasadá na miesto, kde vznikol po pôsobení UV-svetla pyrimidínový dimér /napr. TT - obr. 56/ a svojou aktivitou rozrušuje cyklobutanovú väzbu, čím ho monomerizuje /obr. 57/. Tento typ opravy je veľmi presný. Zistilo sa, že napr. E.coli až 80 % letálnych poškodení po pôsobení UV-svetla sa opravuje uvedeným mechanizmom.

Fotoreaktivácia prebieha pri všetkých organizmoch počnúc od baktérií, cez rastliny, živočíchy až po človeka.



Obr. 56 Tymínový dimér spojený cyklobutanovou väzbou

Pyrimidínový dimér



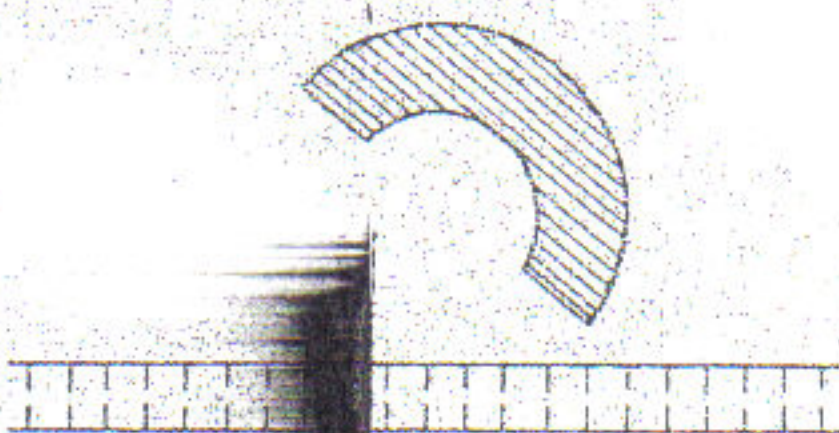
Enzým - DNA



reparácia



uvoľnenie enzýmu



Obr. 57 Fotoreaktivácia

14.2.1.2 Dealkylácia

Dealkylácia sa môže odohrávať spontánne alebo enzýmovo. Enzýmovo pomocou enzýmov dealkyláz, ktoré odstraňujú alkyl-skupiny z dusíkatých báz. Druhá skupina enzýmov, ktorá sa podieľa na dealkylácii, sú transalkylázy. Transalkylázy prenášajú alkylly na proteíny, pre ktoré alkylácia nemá taký vážny

následok ako pre bázy. Pokiaľ pri týchto procesoch dôjde k odtrhnutiu alkylovanej bázy, enzýmy inzertázy sú schopné zaplniť chýbajúcu bázu.

Výsledkom dealkylácie je neporušená materská molekula DNA.

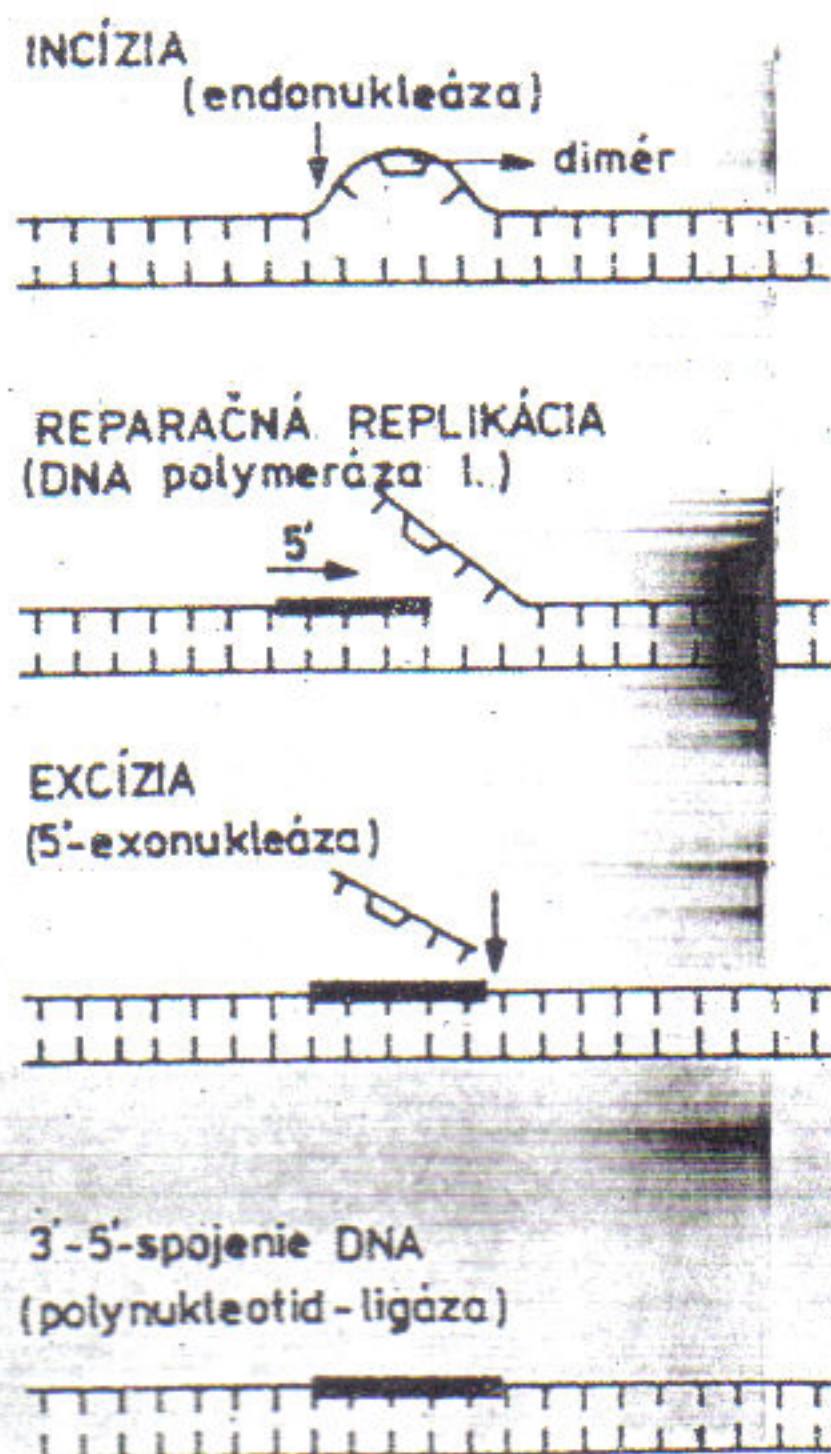
14.2.2 EXCÍZNA REPARÁCIA

14.2.2.1 Nukleotidová excízna reparácia

Predstavuje dnes najpreštudovanejší opravný systém. Prebieha len na dvojreťazcovej DNA. Podmienkou účinnej práce tohto mechanizmu je to, aby oproti chybnému reťazcu bol "dobrý", podľa ktorého sa chyba opraví. Excízna reparácia zahŕňa tieto kroky:

- endonukleáza rozozná chybné miesto a naštípe polynukleotidový reťazec v blízkosti poškodenia,
- exonukleáza odstráni naštípený oligonukleotid /tento krok zabezpečuje exonukleázová aktivita DNA-polymerázy I/,
- DNA-polymeráza I zaplní medzeru podľa druhého reťazca,
- enzým DNA-ligáza spojí reťazce.

Výsledkom je neporušený dvojreťazec tej molekuly, na ktorej sa zmena odohrala /obr. 58/. Treba tu ešte poznamenať, že excízia exonukleázou a re-



Obr. 58 Predreplikačná reparácia /excízny mechanizmus/

inzercia DNA-polymerázou I prebieha simultánne. Pri E.coli reinzerciu úsekov do 30 nukleotidov obstaráva DNA-polymeráza I /short patch reparácia/ a väčších úsekov, okolo 1000 nukleotidov DNA-polymeráza III /long patch-reparácia/

Uvedený typ excíznej opravy sa uplatňuje pri poškodení, ktoré sa týka viac ako jednej bázy /napr. pri tymínových diméroch/.

14.2.2.2 Bázová excízna reparácia

Je ďalší dôležitý spôsob opravy v prípade poškodenia jednej bázy. Odohráva sa pomocou enzýmu DNA-glykozylázy. DNA-glykozylázy sú enzýmy, ktoré rozoznávajú zmenenú bázu a katalyzujú jej hydrolytické odštiepenie z cukru /deoxyribózy/. Produktom pôsobenia uvedených enzýmov je vznik dvojreťazca s chýbajúcou bázou. Nukleázy, ktoré tvoria akési kontrolné molekuly rozoznávajú toto miesto a vyštiepia niekoľko nukleotidov pred a po ňom. Potom DNA polymeráza /analogicky ako pri predchádzajúcom spôsobe/ doplní podľa "dobrého" reťazca chýbajúce nukleotidy a ligáza ich spojí.

V poslednom čase sa nahromadilo veľa poznatkov o bázovo-špecifických endonukleázach, napr. našli sa špecifické enzýmy rozoznávajúce apurinové miesto /apurázy/. Apurázy štiepia väzbu medzi dvoma deoxyribózami. Tie endonukleázy, ktoré pôsobia len na poškodenú molekulu DNA, nazývajú sa korekčné alebo opravné endonukleázy a v literatúre sa označujú ako correndonucleases.

Excízna reparácia /nukleotidové i bázová/ je všeobecný mechanizmus opravy DNA a uplatňuje sa pri všetkých organizmoch.

14.3 TOLEROVANIE POŠKODENIA

14.3.1 TOLEROVANIE BEZ OPRAVY

Experimentálne sa zistilo, že napr. alkylácia báz nemusí vždy viesť ku vzniku mutácií. Existujú dôkazy, že pri E.coli N-7-alkylguanín môže perzistovať v priebehu viacerých generácií bez toho, aby spôsobil akékoľvek zmeny. Vysvetľujeme si to tak, že N-7 poloha nie je miestom pre párovanie báz, a preto /pokiaľ nie je frekvencia alkylácie na N-7 veľmi vysoká/ môže byť táto zmena tolerovaná.

14.3.2 TOLEROVANIE OBÍDENÍM

Iný typ tolerovania je tzv. obídenie /bypassing/. Pri tomto type opravy DNA polymeráza sa nezastavuje na poškodenom materskom reťazci, ale toto poškodenie "obída" jedným z nasledovných spôsobov: buď ide o nekódované pridávanie nukleotidov oproti poškodeniu len "naspamät", napr. pomocou poly A /čo zákonite vedie k mutáciám/, alebo o komplementárnu syntézu pomocou opozitného dcérskeho reťazca ako matrice /pre syntézu tej časti, ktorá leží oproti; je to nemutagénna reparácia/. Ešte je tu možná aj tzv. migrácia reťazcov, pri ktorej sa dcérske reťazce navzájom komplementujú /replicative bypass/.

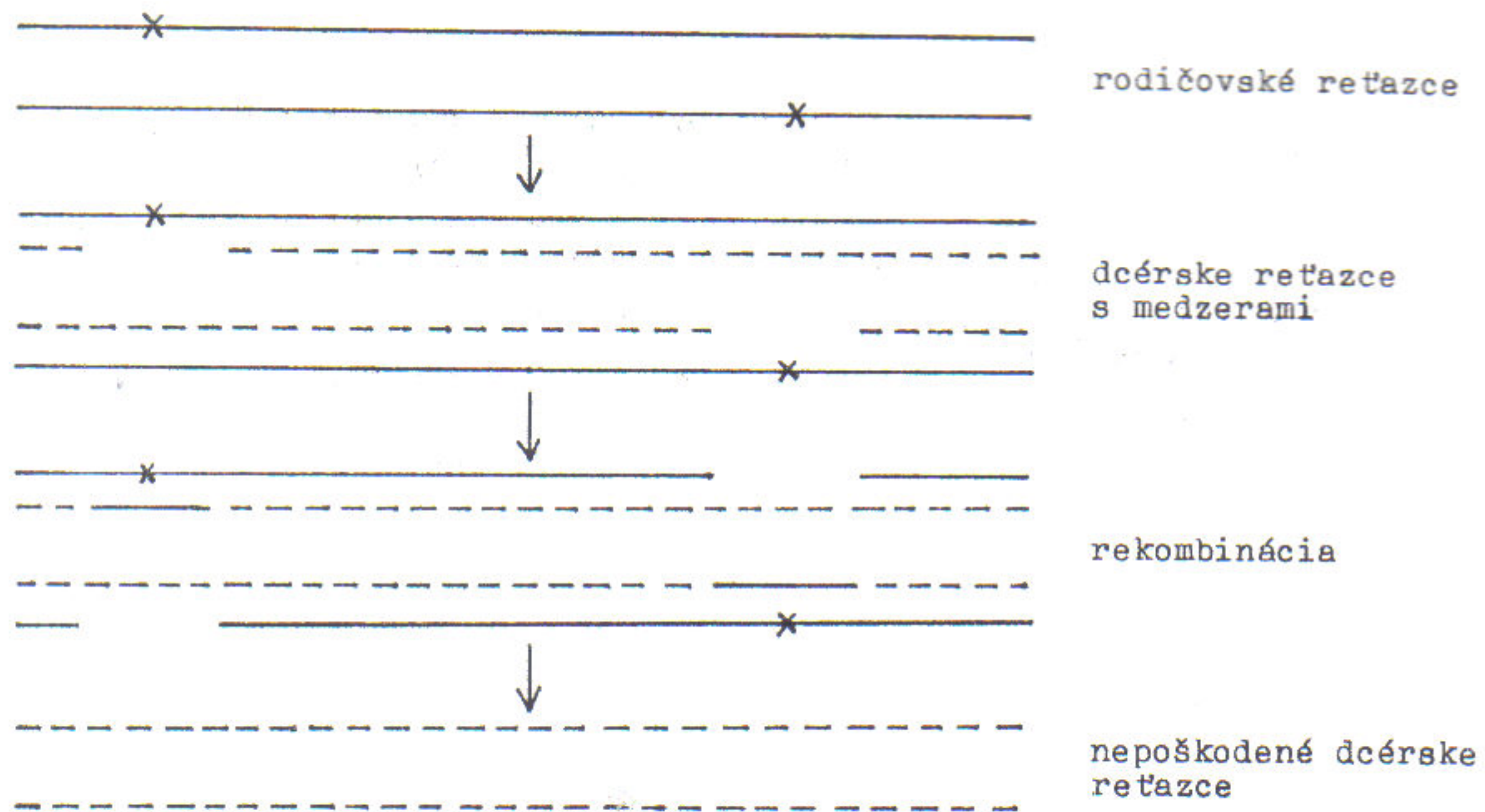
14.4 POREPLIKAČNÁ OPRAVA

Už sme si uviedli, že napr. 80 % pyrimidínových dimérov sa opravuje fotoreaktiváciou, zvyšok excíznou reparáciou. Ak predsa zostane v reťazci DNA čo len jeden dimér, je tento prekážkou pre syntézu DNA v dcérskych reťazcoch. Preto DNA polymeráza niekoľko nukleotidov pred poškodením /dimérom/ zastaví syntézu a zaháji až niekoľko nukleotidov za touto prekážkou /nová iniciácia replikácie/. Vzniknuté medzery sa môžu zaplniť dvoma spôsobmi:

- rekombinačnou reparáciou alebo
- SOS reparáciou.

14.4.1 REKOMBINAČNÁ REPARÁCIA

Reparácia rekombináciou je spôsob opravy /zaplnenia medzery/ dcérskeho reťazca pomocou identického nepoškodeného materského reťazca. Môže sa uplatniť vtedy, ak poškodenia na reťazcoch sú dostatočne vzdialené. Ten reťazec, ktorý poskytne časť nukleotidovej sekvencie /na zaplnenie medzery/ dosyntetizuje sa podľa nepoškodenej matrice vlastného dcérskeho reťazca napr. excíznym mechanizmom.



14.4.2 SOS-REPARÁCIA

Mnohé organizmy /baktérie, cicavce/ majú indukovateľný reparačný mechanizmus nazývaný SOS - reparačný systém, ktorý predstavuje strategicky dôležitý spôsob na prežitie kritických poškodení. Vedie často k mutáciám, najmä vtedy, keď dve poškodenia /napr. diméry/ sú v reťazcoch blízko seba. Najmenej jedno z nich je opravené chybné. SOS - reparácia vyžaduje indukciu proteínov, ktoré sa podieľajú na tomto procese. Preto sa často nazýva aj indukčná SOS oprava. Je to teda typ opravy DNA, ktorý okrem toho, že vyžaduje de novo proteosyntézu, zahájí svoju činnosť až po tzv. "SOS" signáli z poškodenej DNA. Tento typ opravy je za normálnych okolností v štandardnom type bunky reprimovaný.

Pri SOS-reparácii sa často zabudovávajú do DNA "falošné" bázy, lebo SOS-polymeráza s veľkou pravdepodobnosťou nevlastní 3' - 5' exonukleázovú /korekčnú/ aktivitu. Experimentálne sa zistilo, že pre priebeh SOS-reparácie je potrebný produkt *recA* génu, ktorý bol najprv v literatúre označovaný ako X-proteín.

SOS-reparácia sa odohráva potom, keď už prebehla excízna reparácia a predpokladá sa, že je vo väčšine prípadov chybná /error-prone/, na rozdiel od excíznej reparácie, ktorá je väčšinou bezchybná /error-free/. Ale ako sme už uviedli aj chybné opravená DNA pomáha organizmu prežiť, lebo na dvoch reťazcoch neopravené poškodenia vedú s veľkou pravdepodobnosťou k smrti bunky či organizmu.

14.4.3 ZÁVEREČNÁ POZNÁMKA

V systémoch, ktoré sme si doteraz popísali, uplatňovali sa dva hlavné spôsoby opravy poškodenej DNA: také, na ktorých sa zúčastňovali konštitutívne enzýmy, stále prítomné v bunke a tých je väčšina a také, ktoré vyžadujú indukovanú syntézu nových enzýmových aktivít /indukčné opravy/.

Uvedené typy opráv DNA nezahrňujú pochopiteľne všetky možnosti a spôsoby opravy genetickej informácie. Súhrnne možno povedať, že reparačné mechanizmy sú zložité procesy na detailnom poznaní ktorých sa usilovne báda.

14.5 VZŤAH REPARÁCIÍ, MUTÁCIÍ A RAKOVINY

Povedali sme si, že DNA je molekula relatívne stála, ale ak je vystavená mutagénym činiteľom, odohrávajú sa v nej rôzne zmeny. Týmto zmenám hovoríme predmutačné zmeny. Samy osebe ešte nie sú mutáciami, ale sú ich podmienkou. Predmutačné zmeny /napr. alkylovaná báza, dimér a i./ sú opravované buď spontánne /dealkylácia/ alebo niektorým z reparačných mechanizmov, ktoré sme si popísali. Ak reparácia prebehne chybné, vedie s veľkou pravdepodobnosťou ku vzniku mutácie. Bunke sa totiž snaží zachrániť sa za každú cenu a vlastnú existenciu zachraňuje aj za cenu, že radšej zmutuje ako zahynie. Ktosi vtipne definoval mutáciu ako to, čo nestihli napraviť reparačné mechanizmy. A nie je to ďaleko od pravdy.

Aj vznik niektorých druhov zhubných nádorov /rakoviny/ sa pripisuje zlyhaniu, resp. chybnéj práci reparačných systémov. Iniciácia nádoru väzí pravdepodobne v somatickej mutácii. Teda jedna jediná somatická bunka, ktorá niesla neopravené poškodenie a v ďalšom sa vymanila spod regulácie delenia, môže byť príčinou vzniku rakoviny. Nekontrolované, rýchle rozmnožovanie zmutovanej bunky vedie k tvorbe nádoru.

15. CHEMICKÁ SYNTÉZA GÉNU

15.1 SYNTÉZA POLYNUKLEOTIDOV

Umelá syntéza nukleových kyselín, resp. polynukleotidových reťazcov začala sa s úspechom rozvíjať v 50-tych rokoch nášho storočia. Umelé polynukleotidy pomohli vyriešiť problém genetického kódu, pomohli zodpovedať otázku mechanizmu syntézy DNA a osvetliť niektoré kroky proteosyntézy.

Chemickou syntézou polynukleotidov sa zaoberal americký vedec indického pôvodu Har Gabind Khorana. Khorana so spolupracovníkmi vyvinul metódy pre chemickú syntézu polydeoxyribonukleotidov s presnou sekvenciou nukleotidov.

V Khoranovom laboratóriu sa zaoberali syntézou DNA v bezbunkovom systéme za použitia syntetického deoxypolynukleotidu ako matrice /templátu/ pre DNA polymerázu. Výsledky týchto pokusov viedli autorov k intenzívnemu štúdiu proteínovej syntézy in vitro a k štúdiu problémov genetického kódu. Je len pochopiteľné, že najvyšším cieľom, ktorý si autori vytýčili, bola syntéza DNA so špecifickým poradím nukleotidov.

Metóda, ktorú autori použili, musela vychádzať z poznatku, že krátke, chemicky syntetizované polydeoxynukleotidy sú schopné spájať sa do dvojreťazcových komplexov.

Syntéza polynukleotidu začína nukleozidom a pokračuje v smere od 3'-polohy prvého nukleozidu k 5'-polohe ďalšieho nukleozidu. Tieto dve polohy sa spájajú fosfodiesterovou väzbou. Pri tejto syntéze je veľmi dôležité blokovat tie substituenty v molekule cukornatej zložky a bázy /-NH₂, -OH/, ktoré môžu reagovať s fosforylačným činidlom. I napriek veľkému úsiliu bolo veľmi ťažko zosyntetizovať uvedeným spôsobom polynukleotid, ktorý má viac ako 20 monomérov /nukleotidov/. Preto rýdzo chemické syntézy sa obmedzujú na syntézu krátkych úsekov tzv. oligonukleotidov.

15.2 SYNTÉZA GÉNU PRE ALANÍN-tRNA

15.2.1 ÚVODNÁ POZNÁMKA

V dobe, keď sa začala práca na umelej syntéze génu, bola alanín-tRNA jedinou nukleovou kyselinou so známym poradím nukleotidov.

Primárnu štruktúru Ala-tRNA, izolovanej z kvasiniek, stanovil Holley r. 1965 /Holley spotreboval 140 kg kvasníc na izoláciu 1 g čistej alanín-transferovej RNA/. Ala-tRNA pozostávala zo 77 nukleotidov. O rok neskôr skupina akademika Bajeva z Moskvy dešifrovala primárnu štruktúru valín-transferovej RNA, ktorá obsahuje 81 nukleotidov.

Toto však nebol jediný dôvod, prečo sa autori dali do tejto zdĺhavej a namáhavej práce. Rozhodnutie syntetizovať gén bolo podmienené predovšetkým faktom, že sekvencia deoxynukleotidov v géne sa môže priamo odvodiť zo sekvencie ribonukleotidov v tRNA.

15.2.2 PLÁN SYNTÉZY GÉNU

Je známe, že transferované RNA majú významnú úlohu pri biosyntéze bielkovín. Ich dôležitosť zvyšuje fakt, že sa dostávajú do styku jednak s nukleovými kyselinami /mRNA/, jednak s aminokyselinami.

Ako sme už uviedli, pri syntéze génu autori vychádzali z primárnej štruktúry tRNA. V rokoch 1965-1967 zosyntetizovali dva icoso-deoxyribonukleotidy, ktoré obsahovali 20 nukleotidov. Tieto dva reťazce boli čiastočne komplementárne a spoločne sa prekrývali ako to ukazuje schéma:



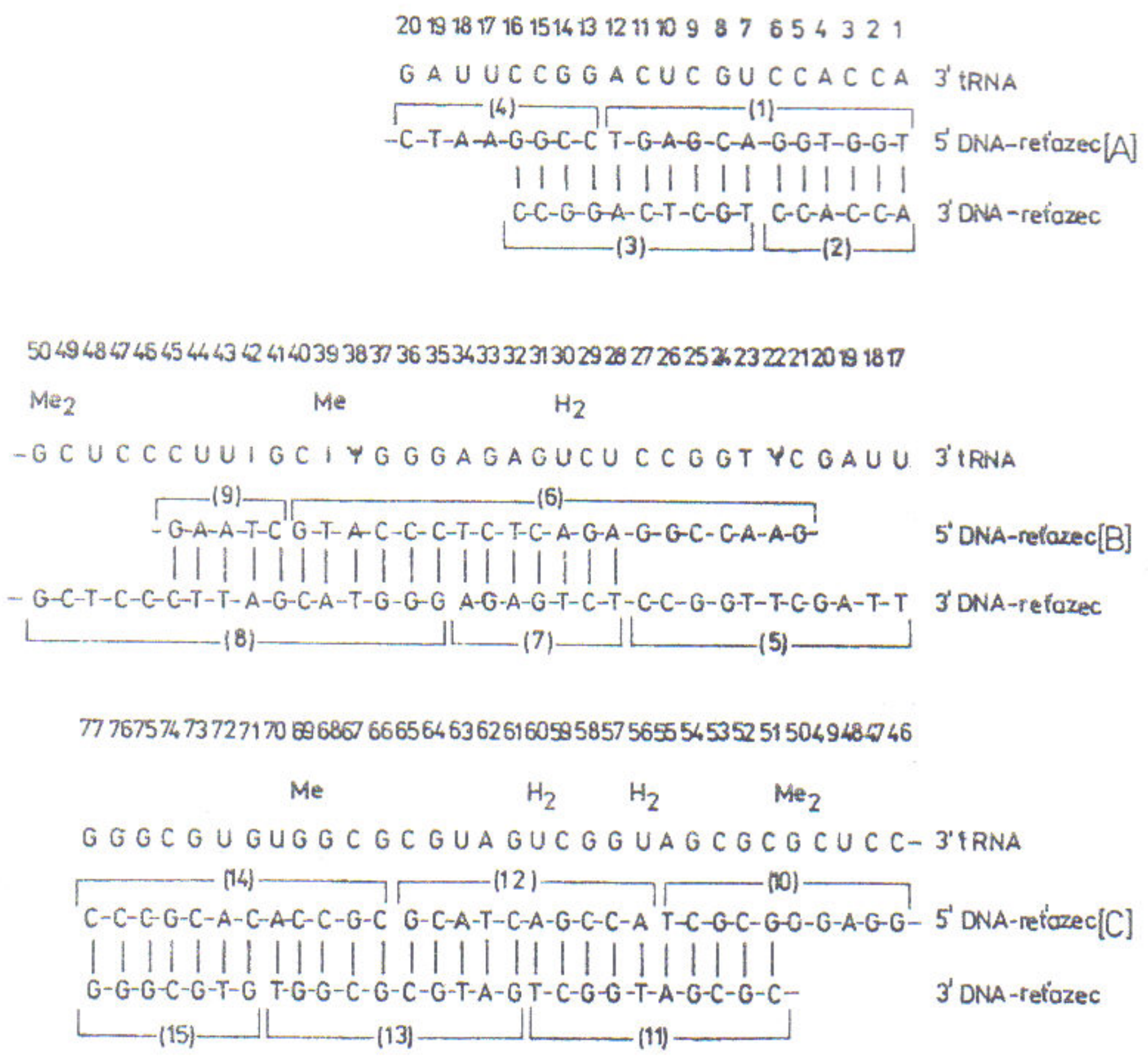
Keď v roku 1967 bola objavená ligáza, enzým, ktorý spája menšie úseky do celistvého reťazca, bolo potrebné definovať minimálnu dĺžku oligonukleotidových reťazcov, ktoré tento enzým je schopný spájať. Výsledky ukázali, že sú to tetranukleotidy.

Uvedené výsledky boli nádejné, a tak pre syntézu DNA si autori vytýčili nasledovný strategický plán, ktorý zahrňoval tieto kroky:

- chemickú syntézu deoxypolynukleotidových segmentov s reťazcom dlhým 8-12 jednotiek s voľnou 3'- a 5'-hydroxylovou skupinou,
- fosforylácia 5'-hydroxylovej skupiny pomocou ATP s použitím polynukleotid-kinázy z fága T4 a

- spojenie príslušných segmentov do dvojreťazcového komplexu pomocou T4-poly-nukleotid-ligázy.

Plán totálnej syntézy génu vychádzal teda z pôvodných dvoch icosanukleo-tidov a autori ho rozvrhli takto: gén rozdelili na 3 časti A, B a C /resp. C'/ a každá táto časť pozostávala z niekoľkých, chemicky syntetizovaných úsekov /segmentov/ - obr. 59.

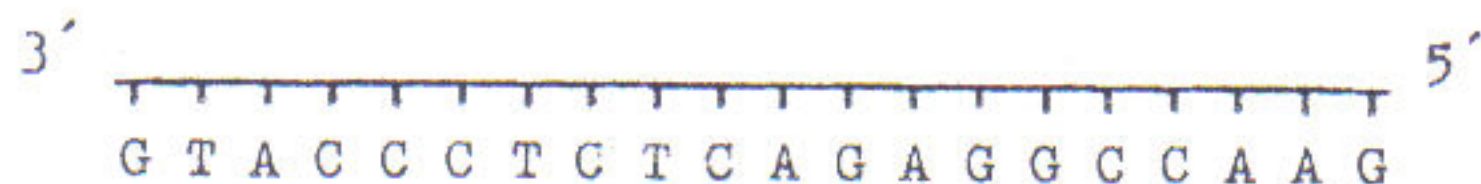


Obr. 59 Syntéza génu pre alanín-tRNA

Prvé segmenty reprezentujú vstupné reťazce želanej DNA, sú komplementárne, antiparalelné s voľnými koncami, ktoré majú 4-5 nukleotidov. Syntéza začína časťou B, potom sa syntetizovala časť A a napokon časť C. Pre vysoký obsah G - C párov bolo nebezpečie samozhlukovania, preto museli navrhnúť alternatívu C', kde sa použili kratšie segmenty a niekedy len tri koncové nukleotidy na spájanie /segment 10 a 11/.

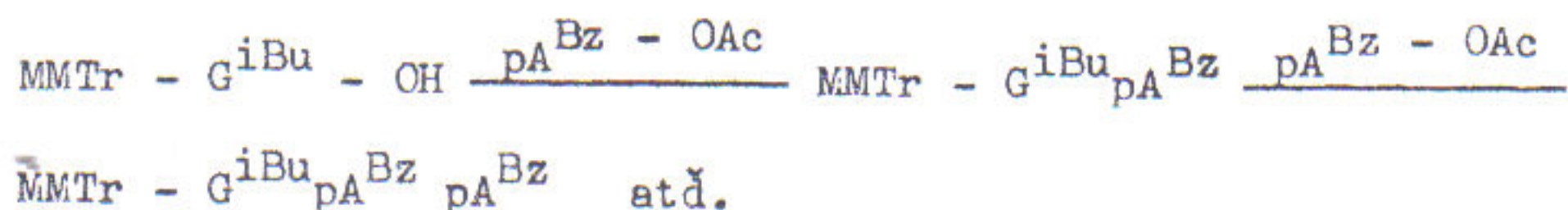
15.2.3 METODOLOGICKÝ POSTUP SYNTÉZY SEGMENTU

Ako príklad metodologického postupu chemickej syntézy segmentov uvedieme si syntézu segmentu 6. Je to jediný icosanukleotid, ktorý bol použitý pri syntéze.



Pri syntéze je nutné používať ochranné skupiny /protektory/, ktoré chránia jednotlivé zložky od nežiadúcich reakcií a sú prítomné počas celej syntézy.

Syntéza sa začína od 5'-hydroxylového konca nukleotidu a prvá fosfodiesterová väzba zahŕňa kondenzáciu medzi protektovaným deoxygnanozín - derivátom, ktorým je N - izobutyryl - 5' - monometoxytrityldeoxygnanozín /MMTrG^{iBu}/ a ďalším protektovaným mononukleotidom: 3' - O - acetyl - N - benzoyldeoxyadenozín - 5' - fosfátom /d-pA^{Bz-OAc}/:



Potom nasledujú kondenzácie medzi skupinami protektovaných di-, tri-, tetra- atď. nukleotidov.

Na každom stupni sa vzniknuté produkty separujú na kontinuálnej ionomničovej chromatografickej kolóne a skúšajú sa na čistotu napr. papierovou chromatografiou. So zväčšovaním dĺžky reťazca výťažky klesajú, nadmieru sa musia používať ochranné bloky a výťažky v konečnom štádiu sú veľmi malé.

Syntéza každého segmentu si vyžaduje dokonale rozvrhnutú prácu s ohľadom na výber vhodných ochranných blokov. Všetky segmenty sa musia precízne vyčistiť najprv v štádiu, keď sú ešte ochranné skupiny naviazané a napokon po odstránení ochranných skupín.

Posledným krokom v purifikácii je čistenie na kolóne s DEAE - celulózu. Čisté segmenty sa môžu uchovávať vo vodných pufrových roztokoch pri - 20 až - 120 °C.

Chemicky zosyntetizované segmenty autori fosforylovali za použitia T4 - polynukleotid - kináz. Fosforylácia je nutná pre enzýmové spojenie reťazcov pomocou ligáz.

15.3 VÝSLEDKY PRÁCE KHORANOVEJ SKUPINY

Analýza syntetického génu pre alanín-tRNA ukázala, že sa skladá zo 77 jednotiek /nukleotidov/ a má dvojreťazcovú štruktúru.

Prvá naliehavá otázka, ktorá sa vynorila potom ako sa zrodil prvý syntetický gén, bola otázka jeho replikácie a funkčnosti vôbec. Transkripcia správneho reťazca pre produkciu tRNA bol ďalší problém, pretože chýbali sekvencie, ktoré slúžia ako signály pre prirodzený štart a stop funkcie na DNA - závislej RNA - polymerázy. Pre Khoranov gén museli byť iniciačné a terminačné procesy transkripcie riadené umele.

Treba sa dotknúť ešte otázky funkčnej aktivity tRNA, transkribovanej z umelého génu. Vieme, že tRNA obsahujú minoritné bázy, ktoré do značnej miery určujú ich špecifickosť. Sú to alkylované, najmä metylované, ale aj inak zmenené bázy. Všetky tieto zmeny sa odohrávajú až po syntéze tRNA.

Pri prepise Khoranovho génu pre alanín - transferovú RNA dostaneme tRNA, ktorá bude obsahovať len 4 základné bázy /A, C, G a U/, znamená to, že takto syntetizovaná tRNA bude reprezentovať len prekursor, a nie funkčnú tRNA. Roku 1976 sa Khoranovi podarilo umelo syntetizovaný gén včleniť do genómu baktérie, kde sa replikoval i transkriboval.

Khorana patrí k tým postavám molekulárnej genetiky, ktoré posunuli jej vývoj výrazne dopredu. Vieme, že Khoranovi s veľkým tímom pracovníkov syntéza génu trvala 4 roky. Dnes existujú prístroje syntetizátory, riadené počítačovou technikou, ktoré urýchľujú syntézu týchto dôležitých genetických jednotiek. Khoranu však budeme vždy považovať za priekopníka v tejto oblasti, ktorý ukázal cestu, ktorou sa má moderná molekulárna genetika uberať. R. 1976 mu bola udelená Nobelova cena.

16. MOLEKULÁRNA GENETIKA AKO ZÁKLAD NOVÝCH SMEROV V BIOTECHNOLÓGII

16.1 ÚVODNÁ POZNÁMKA

Genetické rekombinácie eukaryontov, prokaryontov a vírusov majú spoločný jeden významný faktor: prerušenie a opätovné spojenie molekúl nukleových kyselín.

Rekombinácia má základný význam pre všetky živé organizmy, tvorí jadro genetiky a jej priame využívanie pri krížení rastlín, zvierat i mikroorganizmov prinieslo už významné výsledky v teórii i praxi.

V poslednom desaťročí sa najmä vďaka technickým vymoženostiam výrazne rozšírili experimentálne možnosti biochemickej manipulácie s genetickým materiálom. Nahromadené poznatky molekulárnej genetiky sú založené predovšetkým na práci s plazmidmi a špecifickými nukleázami. Dnes môžeme povedať, že výsledky prác mnohých tímov vedcov na celom svete sa stali základom nových techník, ktoré zhrňujeme pod spoločný názov, genetické manipulácie alebo genetické inžinierstvo.

16.2 ČO JE GENETICKÉ INŽINIERSTVO

Pod pojmom genetické inžinierstvo rozumieme súbor techník a metód, ktorými dosahujeme ciele zmeny organizmov a konštrukcie nových genetických konštitúcií. Zahrňuje manipulácie na úrovni buniek, organel i génov. Cieľom uvedených manipulácií je zostrojenie takých genetických sústav, ktoré by boli užitočné pre človeka a spravidla sa v živej prírode nenachádzajú, alebo len v minimálnom množstve.

16.3 GÉNOVÉ MANIPULÁCIE

Génové manipulácie /nazývané tiež génové inžinierstvo/ zahrňujú také techniky a metódy molekulárnej genetiky, ktoré umožňujú prenos génov rôzneho pôvodu. Ide teda o preklopenie medzidruhových bariér.

Manipulácie na génovej úrovni umožnili predovšetkým dva objavy:

- objav restričných endonukleáz a
- objav plazmidov, ako vektorov cudzorodej genetickej informácie.

16.3.1 RESTRIKČNÉ ENDONUKLEÁZY

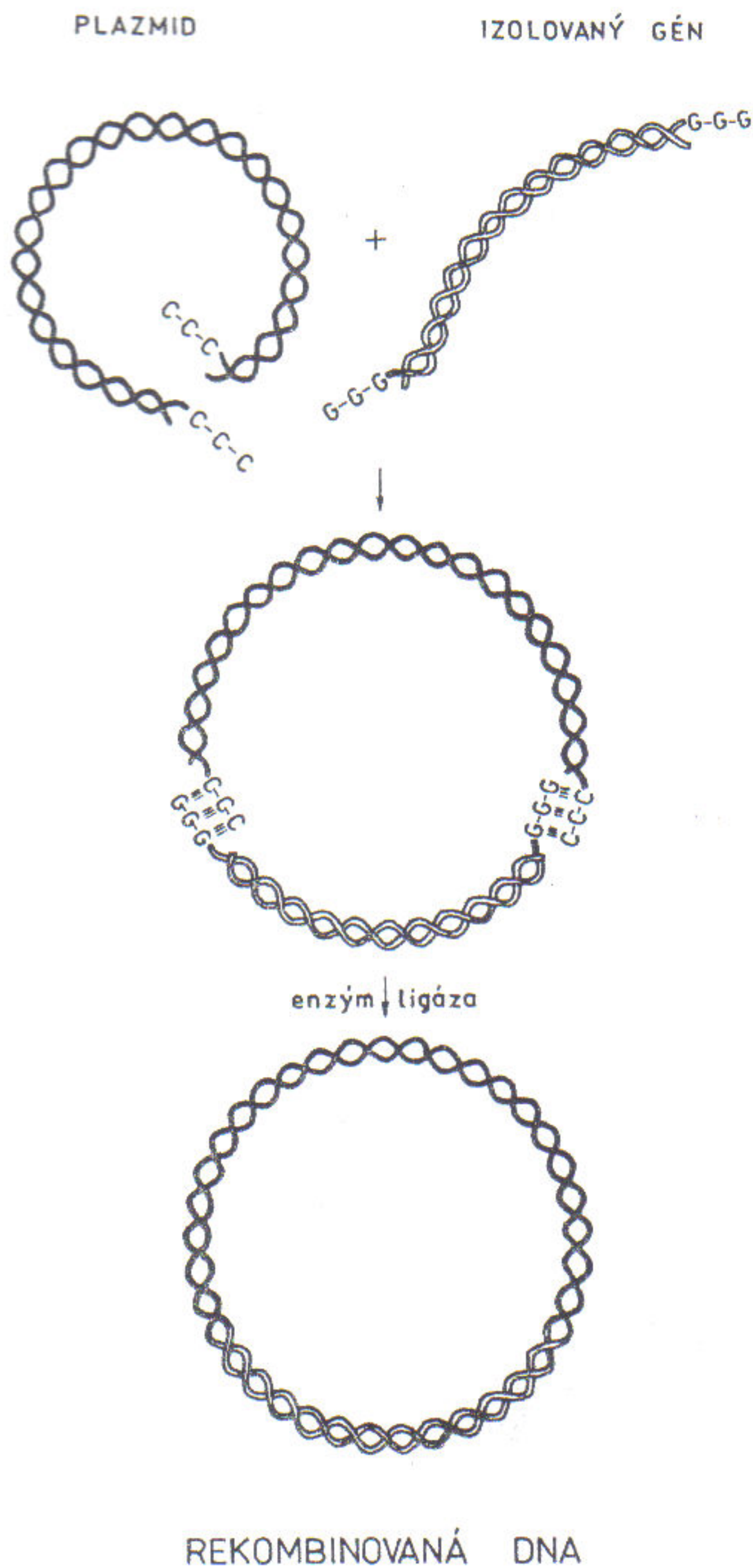
Génové manipulácie sú založené na špecifickej činnosti enzýmov. Z nich prvoradé miesto zaujímajú špecifické endonukleázy - restriktázy. Restriktázy sú enzýmy, ktoré štiepia dvojreťazcovú DNA na určitých miestach s presnou sekvenciou nukleotidov, ktoré navzájom vykazujú palindromovú symetriu /rotačná symetria/.

Tabuľka 9.: Restričné endonukleázy a ich cieľové miesta

Pôvod	Symbol	Cieľová sekvencia
Escherichia coli, plazmid RI	Eco RI	G↓A-A-T-T-C C-T-T-A-A↑G
Haemophilus influenzae Rd	Hind III	A↓A-G-C-T-T T-T-C-G-A↑A
Bacillus amyloliquefaciens H	Bam HI	G↓G-A-T-G-C C-C-T-A-G↑G
Arthrobacter luteus	Alu I	A-G↓C-T T-C↑G-A
Streptomyces aureofaciens IKA	Sau I	C-C↓T-N-A-G-G G-G-A-N-T↑C-C

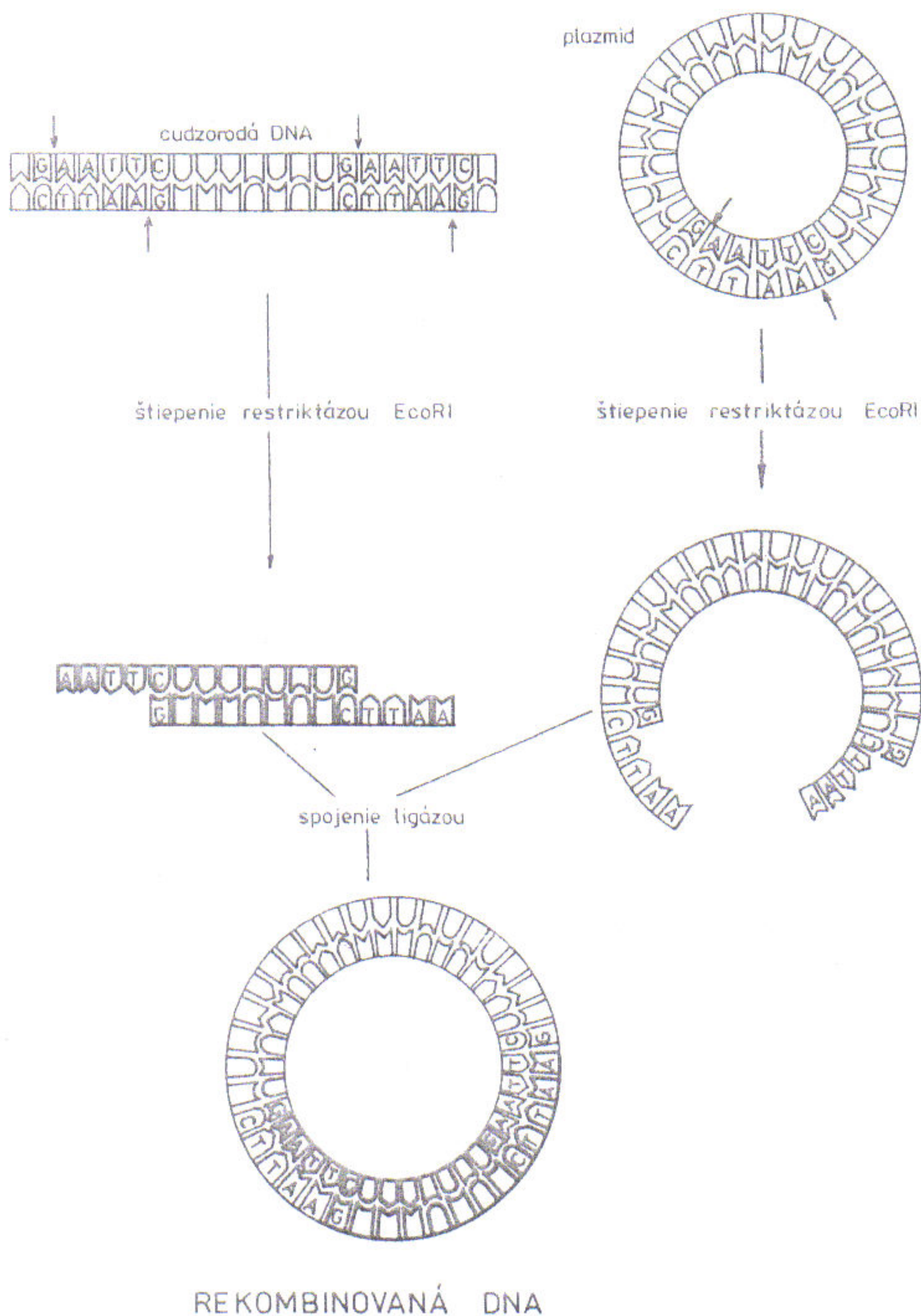
Existujú endonukleázy, ktoré štiepia DNA na časti /restriky/, ktoré majú tzv. tupé konce, iné zasa nechávajú niekoľkonukleotidové tzv. kohézne alebo prilnavé konce /tab. 9/. V prvom prípade sa kohézne konce musia urobiť umele vo forme monotematických úsekov, ktoré sú vzájomne komplementárne /obr.60/.

b:
s
s
d



Obr. 60 Vznik rekombinovanej DNA pomocou linkérov /CCC,GGG/

Výhodnejšie sú enzýmy, ktoré štiepia DNA s určitým posunom o niekoľko báz, a tak vytvárajú už spomínané kohézne konce, ktoré sa ochotne spájajú s komplementárnymi bázami inej molekuly DNA. Takto sa dajú rozštiepiť a po spájaní DNA fragmenty bez akejkoľvek selektivity, teda nezávisle na ich pôvode /obr. 61/.



Obr. 61 Vznik rekombinovanej DNA s použitím restriktázy EcoRI, ktorá dáva kohézne konce

16.3.2 VEKTORY CUDZORODEJ DNA

Transformácia buniek, napr. baktérií, fragmentami eukaryontnej DNA sa nedá robiť priamo. Fragменты sa musia najprv pripojiť na malú molekulu DNA, ktorú nazývame nosič alebo vektor. Ešte si uveďme, že bunka, ktorá poskytuje fragment DNA sa nazýva donorová, a ktorá prijíma DNA, sa nazýva akceptorová.

Aké molekuly teda môžu slúžiť ako vektory? Ako má vektor vyzerat'?

Vektorová DNA má byť relatívne malá, ľahko izolovateľná a schopná autonómne sa replikovať vo vhodnom hostiteľovi /napr. baktérii/. V ideálnom prípade by mala obsahovať jediné miesto citlivé na restriktčný enzým. Čo je veľmi dôležité, vektorová molekula DNA by mala kódovať nejaký znak, ktorý sa dá ľahko detegovať /napr. rezistencia proti antibiotiku, schopnosť tvoriť plaky, t.j. lyzovať baktérie a i./.

Uvedeným podmienkam vyhovujú najmä dva typy DNA: bakteriálne plazmidy a DNA bakteriofága λ /lambda/. Majú dvojreťazcové, kruhové, kovalentne uzavreté molekuly DNA, ktoré predstavujú samostatné replikóny nezávislé na replikácii chromozómovej DNA. Plazmidy obyčajne obsahujú gény rezistencie voči antibiotikám a fágové DNA zasa gény pre tvorbu plakov.

Ako vektor sa veľmi často používa plazmid z E.coli označovaný pSC 101, ktorý obsahuje gén pre rezistenciu voči tetracyklínu, čo je znak veľmi výhodný a ľahko zistiteľný. Baktérie, ktoré prijmu tento plazmid, stanú sa rezistentné proti tetracyklínu.

Iný, veľmi frekventovaný plazmid, je pBR 322, ktorý má dva markéry, a to rezistenciu voči tetracyklínu a ampicilínu.

16.3.3 METODICKÝ POSTUP PRI GÉNOVEJ MANIPULÁCII

Najjednoduchší príklad génovej manipulácie bude mať nasledovný postup:

- príprava donorovej DNA. Zahrňuje izoláciu eukaryotickej DNA a jej opracovanie rovnakou endonukleázou, aká sa používa pre vektor. Takto sa získajú komplementárne kohézne konce;
- príprava akceptorovej DNA plazmidu, jej otvorenie endonukleázou. Napr. pre pSC 101 sa používa restriktčný enzým EcoR I izolovaný z E.coli. Plazmid pSC 101 má jediné miesto pre uvedený enzým, ktorý po rozrušení kruhovej molekuly vytvorí kohézne konce komplementárne k donorovej DNA;
- v ďalšom kroku polynukleotid-ligáza kovalentne uzavrie kruhovú molekulu plazmidu, obohatenú o "cudziu" DNA, čím vzniká chiméra DNA;
- napokon sa rekombinovaná molekula DNA vnesie do recipientnej bunky, ktorá tak nadobudne nové genetické znaky.

Je len samozrejmé, že ako recipientné bunky sa využívajú najmä mikroorganizmy vzhľadom na ich vysokú rýchlosť rozmnožovania.

16.3.4 PRÍPRAVA DONOROVEJ DNA

Získavanie donorovej DNA sa robí buď izoláciou DNA po rozštiepení endonukleázami a náhodným výberom, prípadne pomocou tzv. sondy RNA /nazýva sa aj próba RNA/.

Iný, dnes častejší spôsob získavania donorovej DNA, je vo forme komplementárnej DNA /cDNA/. Metodický postup je taký, že sa ako matrica pre syntézu génu použije mRNA pre proteín, ktorého gén chceme klonovať /namnožiť/. Z mRNA pomocou reverznej transkriptázy sa komplementárne odkopíruje genetická informácia vo forme jednoretazcovej DNA /cDNA/. Táto sa potom pomocou DNA-polymerázy zreplikuje, a tak získame dvojretazcový gén /DNA/.

Najnovšie súčasné experimentálne postupy využívajú priamu syntézu oligonukleotidov na základe informácie z bielkoviny. Ak totiž poznáme aminokyselínové zloženie bielkoviny, ktorú chceme namnožiť, môžeme prostredníctvom mRNA navrhnúť poradie deoxynukleotidov pre syntézu génu.

Postup je teda nasledovný:

sekvencia aminokyselín

antikodóny 3'----- 5'

kodóny /mRNA/ 5'----- 3'

kodogénny reťazec /cDNA/ 3'----- 5'

komplementárny reťazec /DNA/ 5'----- 3'

Totálna in vitro syntéza deoxypolynukleotidov /DNA/ má nevýhodu v tom, že musíme počítať s degeneráciou genetického kódu. To znamená, že pokiaľ nevieme s akou preferenciou v in vivo systéme sa jednotlivé kodóny využívajú, musíme urobiť všetky kombinácie, čo situáciu značne komplikuje. Tento problém sa rieši často tak, že sa použije tzv. priemerný kodón.

Je len pochopiteľné, že za vrchol manipulácie na génovej úrovni sa považuje syntéza génu a jeho expresia, napr. pre nejakú užitočnú bielkovinu buď z nutričného hľadiska alebo bielkovinu ako enzým, ktorá by mala katalytickú aktivitu, dôležitú pre prax /napr. na rozloženie plastov a pod./.

Vidíme, že toto sú oblasti, kde výsledky vedeckého výskumu môžu byť nesmierne dôležité pre spoločenskú prax.

16.3.5 NIEKTORÉ PRÍKLADY GÉNOVÝCH MANIPULÁCIÍ

Je známe, že fág λ /lambda/ sa môže v procese lyzogenie viazať na chromozóm baktérie E.coli. Takýmto spôsobom aj "cudzí" gén sa môže zabudovať do bakteriálneho chromozómu.

Ako príklad si uveďme prenos génu pre tvorbu imidazolglycerofosfátdehydrogenázy z kvasiniek do mutantov E.coli, ktoré boli defektné na tento gén. Uvedený enzým sa uplatňuje pri biosyntéze histidínu. Z buniek E.coli auxotrofných na histidín sa po manipulácii stali bunky, schopné syntetizovať túto aminokyselinu /histidín/.

Ďalej sa podarilo pomocou plazmidu ColE 1 preniesť tryptofánový operón z baktériofága do kmeňa E.coli, ktorý bol auxotrofný na tryptofán. Výsledok bol analogický, ako sme uviedli vyššie.

Pri prenosoch cudzích génov ide v podstate o dva typy prenosov:

- intracelulárny, čo je prenos medzi plazmidom a chromozómom a
- intercelulárny, pri ktorom sa jedná o prenos informácie medzi bunkami /napr transformácia pomocou F-faktora/.

Už sme uviedli metódu získavania génov metódou reverznej transkripcie, kedy na základe sekvencie aminokyselín v bielkovine zosyntetizuje sa mRNA a z nej účinkom revertázy sa získa cDNA, ktorá sa komplementárne dosyntetizuje, a napokon ako dvojreťazcový fragment DNA sa naviaže na plazmid.

Takto sa podarilo zosyntetizovať gén pre interferón. Gén pozostával zo 76 segmentov a obsahoval 500 párov báz. Segmenty pri syntéze spájali ligázou. Umelo zosyntetizovaný gén sa podarilo vniešť do baktérií, ktoré produkovali túto bielkovinu /interferón/.

Vzhľadom k faktu, že interferón je druhovo špecifický, nemôže byť univerzálnou ochranou, ako sa prv predpokladalo. Do interferónu sa totiž vkladali neoprávnené nádeje pri liečení rakoviny. Faktom je, že je účinný pri niektorých infekčných ochoreniach.

Takisto sa podarilo do baktérií i kvasiniek vniešť gén pre ľudský inzulín. Pri inzulíne je ďalší problém, že sa syntetizuje ako tzv. proinzulín. Až vyštiepením strednej časti molekuly tejto bielkoviny /časť C/ sa stáva proinzulín funkčnou bielkovinou. Tieto úpravy nedokáže robiť prokaryontná bunka.

Preto pri génových manipuláciách je veľmi dôležité detailné poznanie molekulárnych štruktúr a procesov, lebo len na tomto základe možno dosiahnuť pokrok a podrobiť tieto procesy do tej miery, aby slúžili človeku.

16.4 ZÁVEREČNÁ POZNÁMKA

Všeobecne možno povedať, že súčasné obdobie možno charakterizovať ako doteraz najbúrlivejšie obdobie rozvoja molekulárnej genetiky. Interdisciplinárne metódy práce /biochemické, biofyzikálne a i./ boli základom pre vznik nových techník v molekulárnej genetike /hybridizácia nukleových kyselín, ďalej metódy na určenie primárnej štruktúry bielkovín a nukleových kyselín - sekvenovanie a i./.

Medzi najdôležitejšie míľniky treba uviesť objav spätnej transkripcie pomocou enzýmu spätnej transkriptázy /revertázy/, ktorý objasnil infekciu onkovírusov spätnou transkripciou RNA \rightarrow DNA /r. 1970 Temin a Baltimore/.

V tom istom roku molekulárna genetika bola obohatená o ďalší úžasný objav - objav sekvenčne špecifických restriktáz /Smith, 1970/. Ich uplatnenie pre fyzikálne mapovanie DNA /Nathans/ ako aj pre objasnenie restriktčne-modi-

fikačných systémov /Arber/ má nenahraditeľný význam nielen pre molekulárnu genetiku, ale pre genetiku vôbec. Na základe uvedených objavov sa mohlo pristúpiť ku konštrukcii bunkových hybridómov /Millstein, Köhler, 1975/, ktoré sú schopné produkovať monoklonálne protilátky.

Ak sme povedali, že v súčasnosti sme svedkami búrlivého rozvoja molekulárnej biológie a najmä molekulárnej genetiky, musíme tu zdôrazniť, že je to obdobie, ktoré otvorilo cestu k objasneniu štruktúry a expresie prokaryotických a najmä eukaryotických génov. Ďalej bola objasnená posttranskripčná a posttranslačná úprava primárnych produktov transkripcie a translácie.

Za objav prvoradého významu musíme považovať aj objav mozaikovej štruktúry eukaryotických génov, ktoré sa skladajú z informačných úsekov /exónov/ a neinformačných úsekov /intrónov/. Treba tu zdôrazniť, že pri zostrihu /splicing/ môže sa zmeniť pôvodné poradie genetických informácií - pôvodných exónov /kasetové gény/.

Nemenej významný bol dôkaz o existencii a špeciálnych vlastnostiach primárnej štruktúry transpozónov, inzerčných elementov /prítomných v plazmidoch a v eukaryotických bunkách/, ktoré zodpovedajú za možnú nestabilitu genetického materiálu. Bolo dokázané, že aj onkovírusy majú vlastnosti transpozónov.

Nahromadenie poznatkov o vektorových molekulách umožnilo v súčasnosti zabezpečiť pre génové manipulácie dostatočne veľký arzenál vektorových molekúl DNA ako sú plazmidy, vírusy a fágy. Vypracovali sa a stále sa zdokonaľujú techniky ich úpravy in vitro, pomocou ktorých je možné prekročiť medzidruhové bariéry, vytvárať nové génové kombinácie a ich prostredníctvom získať dedične zmenené nové organizmy.

Za vrchol poznatkov súčasného obdobia, ktoré sa označuje za éru génových manipulácií, rekombinácie DNA, či génového inžinierstva, možno považovať automatizovanú programovú syntézu eukaryotického génu.

Tento fakt otvára možnosti konštrukcie takých génov, ktoré sa v prírode nevyskytujú. Pred ľudstvom sa tu otvárajú nové horizonty. Perspektíva človeka - tvorca a konšuktéra nových organizmov však oprávnene vyvoláva aj obavy, či obidobne, ako pri jadrovej energii, nedôjde k zneužitiu poznatkov súčasnej genetiky. Preto sa vedci na celom svete musia usilovať, aby veda aj vo svojej praktickej aplikácii slúžila len pokroku a rozkvetu ľudstva na celom svete.

17. EVOLÚCIA NUKLEOVÝCH KYSELÍN A BIELKOVÍN

17.1 VŠEOBECNÁ CHARAKTERISTIKA EVOLÚCIE A ŽIVÉHO SYSTÉMU

Pod pojmom evolúcia rozumieme dlhodobý proces vzniku a vývoja živých systémov.

Za živý systém považujeme takú jednotku, ktorá má schopnosť autoreprodukcie a výmeny látok a energie /metabolizmus/. Všetky živé systémy obsahujú nukleové kyseliny a bielkoviny. Nukleové kyseliny sa vyznačujú tým, že sú schopné autoreprodukcie, t.j. na základe vlastnej genetickej informácie sú schopné vytvárať identické kópie. Nukleové kyseliny sa však dokážu nielen autoreplikovať, ale informáciu zakódovanú v sekvencii nukleotidov aj odovzdávať. Prenos genetickej informácie vyúsťuje v syntézu bielkovín /proteosyntézu/. Bielkoviny ako katalyzátory /enzýmy/ zúčastňujú sa na všetkých dôležitých syntetizačných procesoch /autoreprodukcia, proteosyntéza a i./ i na celkovom metabolizme živého systému.

Živý systém má schopnosť výmeny látok a energie s okolitým prostredím, a preto hovoríme, že je to otvorený systém. Charakteristika živého systému musí zahrňovať aj túto vlastnosť, preto komplexná charakteristika živého systému bude nasledovná:

Živý systém je otvorený nukleoproteínový systém, ktorý sa vyznačuje autoreprodukciou, metabolizmom /výmenou látok a energií/, individuálnym vývinom a druhovým vývojom.

V procese evolúcie nadobúdali živé systémy aj ďalšie vlastnosti /napr. autoregulačný mechanizmus/, tieto však nepatria k základným atribútom živých systémov.

Ak chápeme teda živý systém ako systém schopný autoreprodukcie a metabolizmu, potom tieto vlastnosti sú základnými znakmi života, t.j. biologickej formy pohybu hmoty.

Živý systém má svoju kvalitu a štruktúru a zároveň špecifické interakcie medzi zložkami systému. Vzhľadom k tomu, že sa nejedná o statické rozloženie prvkov v systéme /nukleové kyseliny a bielkoviny/ hovoríme, že štruktúra ži-

vého systému je dynamická. Štruktúry živých systémov, tak ako ich poznáme dnes, sa vyvíjali postupne v procese, ktorý sa nazýva evolúcia. Evolúcia živých systémov má dve hlavné etapy a rozdeľuje sa na:

chemickú evolúciu a
biologickú evolúciu.

17.2 CHEMICKÁ ETAPA EVOLÚCIE

Pod pojmom chemická etapa evolúcie rozumieme proces vzniku zložitých molekúl z atómov cez jednoduché anorganické a organické molekuly. Vyvrcholením tohto procesu je vznik prvotných informačných molekúl a ich usporiadanie do protobiontov. Z informačných molekúl s veľkou pravdepodobnosťou najskôr vznikla RNA a až neskôr DNA. Vzájomná závislosť a koordinovaná syntéza DNA, RNA a bielkovín vznikla až v neskoršom štádiu evolúcie.

Chemická etapa evolúcie zahŕňa teda tieto etapy:

- vznik informačných molekúl /aminokyselín, nukleotidov a kondenzačných činidiel ako aj vznik informačných makromolekúl z aminokyselín a nukleotidov za spolupôsobenia kondenzačných činidiel/,
- prechod od prvotných informačných makromolekúl k protobiontom /prvobunky/.

17.2.1 VZNIK INFORMAČNÝCH MAKROMOLEKÚL

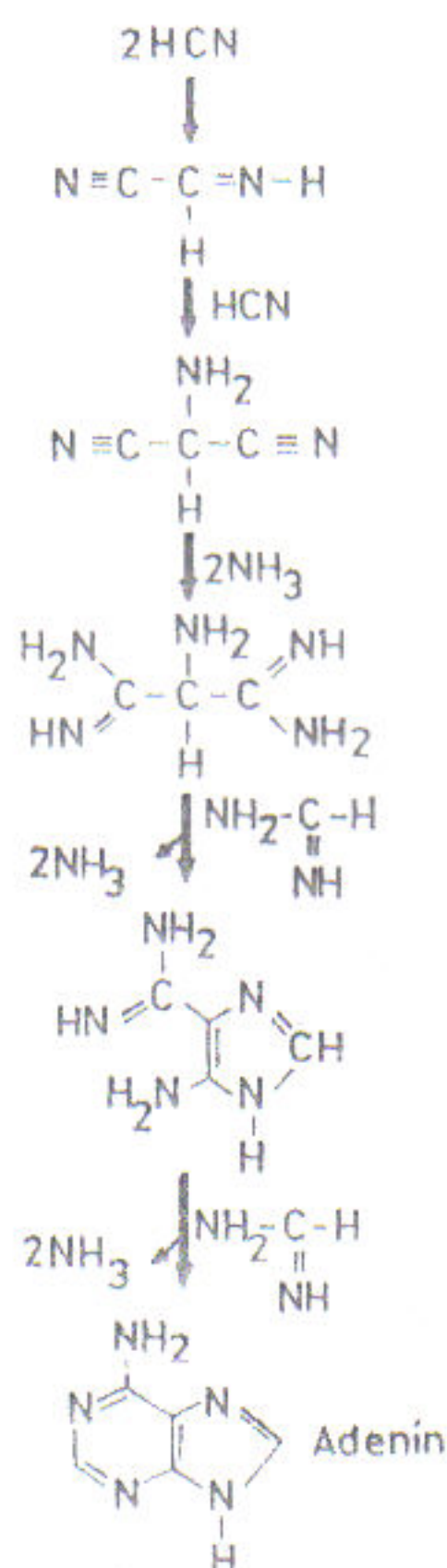
17.2.1.1 Vznik aminokyselín a nukleotidov

Základnou zlúčeninou, z ktorej sa syntetizujú organické zlúčeniny, je kyanovodík. Môže vzniknúť týmito reakciami:

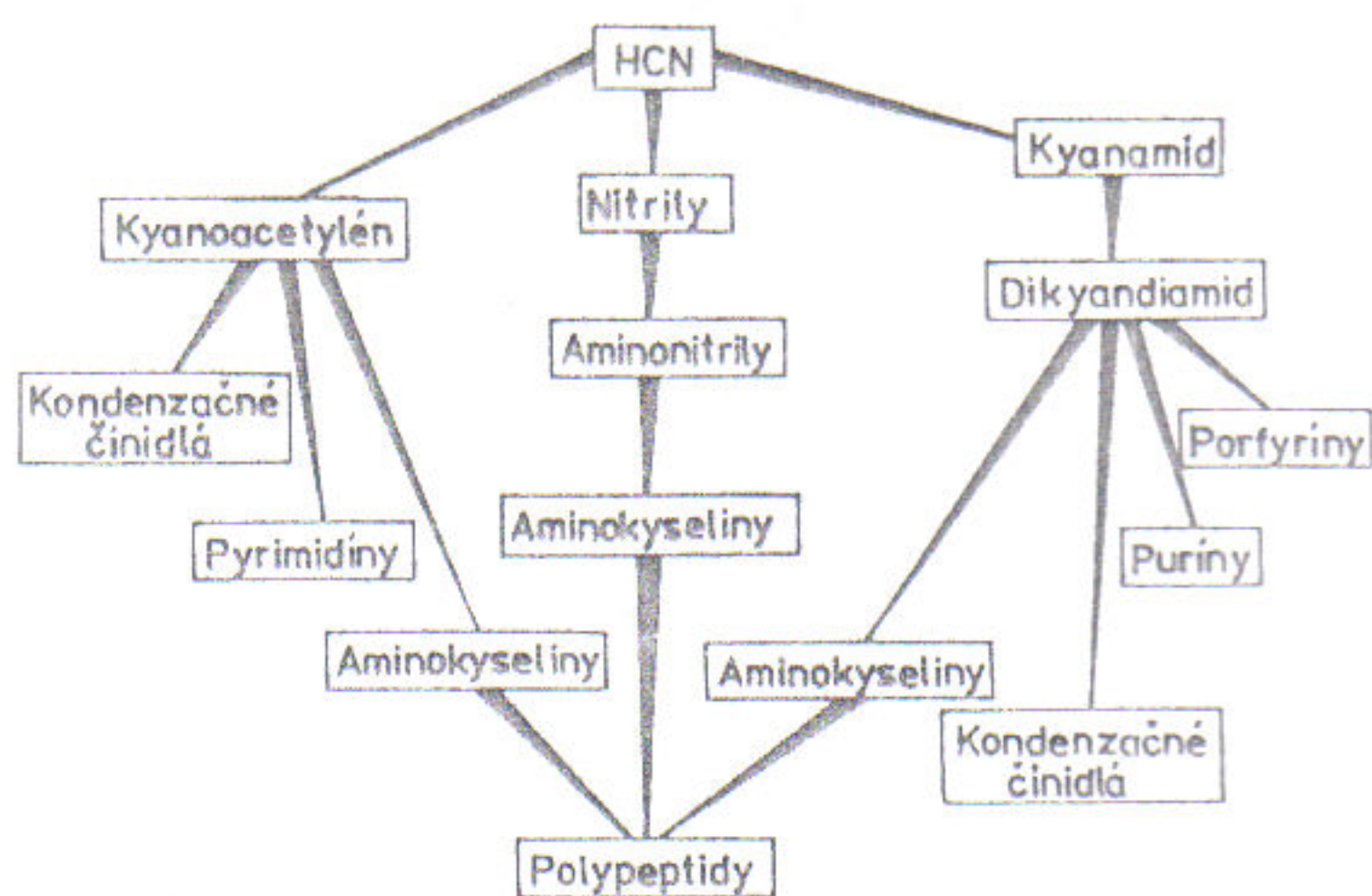


Uvedené reakcie mohli byť iniciované teplom zo sopečnej činnosti, ultrafialovým žiarením zo Slnka alebo elektrickými výbojmi, ktoré zapríčiňovali atmosferické búrkové blesky.

Z kyanovodíka ako východiskovej molekuly v podmienkach, ktoré simulujú primitívne abiotické prostredie, vznikajú látky /kyanoacetylén, kyanamid a nitrily/, ktoré boli prekurzormi základných stavebných kameňov živej hmoty /obr. 62 a 63/.



Obr. 62 Schéma vzniku dusíkatých báz z kyanovodíka /HCN/



Obr. 63 Schéma vzniku polypeptidu z kyanovodíka /HCN/

17.2.1.2 Vznik kondenzačných činidiel

Látky s kondenzačnými vlastnosťami /napr. dicyklohexylkarbodiimid/ vznikali súčasne so vznikom aminokyselín, nukleotidov a iných jednoduchých orga-

nických látok. Existencia kondenzačných činidiel bola nutnou podmienkou pre kondenzáciu aminokyselín a nukleotidov a vznik polymérnych zlúčenín z uvedených monomérov vo forme bielkovín a nukleových kyselín. Pri kondenzácii vznikali kovalentné väzby /pričom sa vylučovala voda/, medzi aminokyselinami za tvorby prvotných bielkovín /proteinoidov/ a medzi nukleotidmi za tvorby prvotných nukleových kyselín /s najväčšou pravdepodobnosťou RNA/. Funkcia kondenzačných činidiel spočíva v odnímaní vody z reagujúcich molekúl.

Iný spôsob vzniku polymérov /napr. polypeptidov/ vyžadoval vysokú teplotu /130° - 180 °C/.

V evolúcii oba spôsoby boli možné.

Polyméry mohli vzniknúť tiež na povrchu niektorých minerálov, napr. montmorillonitu, ktorý umožňuje kondenzačné reakcie. Tvorila sa tak dlhé polypeptidy z aminokyselín vo vysokom výťažku.

Najpravdepodobnejší je však priebeh kondenzačných reakcií za účasti polyfosfátov a ich esterov, ktoré predstavujú najdôležitejšie biologické kondenzačné činidlá. Vznik polyfosfátov za abiotických podmienok je pomerne jednoduchý proces. Polyfosfáty hrajú z biologického hľadiska veľmi dôležitú úlohu. Reagujú veľmi pomaly s vodou a sú termodynamicky nestabilné. Vytvárajú sa za miernych podmienok: zahriatím ortofosfátu s močovinou a NH_4^+ .

Polyfosfáty môžeme považovať za predchodcov ATP. Účinkom polyfosfátov alebo ich esterov vznikali peptidy, polynukleotidy, ale aj ATP z adenínu, ribózy a fosfátu.

17.2.1.3 Vznik nukleových kyselín

Prvé oligonukleotidy a polynukleotidy ako sme už uviedli, sa vytvárali za prítomnosti kondenzačných činidiel. Polyfosfáty pôsobia napríklad tak, že zo zmesi nukleozidov a polyfosfátov /zahriatím alebo ožiarením ultrafialovým svetlom/ vytvorí sa zmes nukleotidov. Za prítomnosti kondenzačných činidiel /polyfosfátov/ sa pri 50 °C - 65 °C tvoria oligonukleotidy. V danom prípade polyfosfáty pôsobia ako kondenzačné činidlá i ako donory fosfátových skupín.

Treba ešte zdôrazniť, že komplementárne párovanie báz ako ho poznáme dnes /A-T, C-G a A-U/ sa aj v najjednoduchších systémoch odohráva spontánne, a to tak pri voľných bázach, ako aj pri nukleozidoch či nukleotidoch. Tento fakt podporuje názor, že jednoduché polynukleotidy mohli slúžiť ako matrica pre neenzýmovú syntézu komplementárneho polynukleotidu za prítomnosti kondenzačného činidla. Je zaujímavé, že napr. pri polyribonukleotidoch sa uplatňovala väzba 2' - 5' a nie 3' - 5'. Selekcia väzby 3' - 5' pre oba typy nukleových kyselín sa odohrala neskôr, pravdepodobne až vtedy, keď na tvorbe tejto väzby sa začali zúčastňovať enzýmy.

17.2.1.4 Vznik prvotných bielkovín /proteínoidov/

Polypeptidom podobné polyméry nazývame proteínoidy. Proteínoidy vznikajú z aminokyselín pri zahrievaní, pôsobením elektrických výbojov alebo činnosťou kondenzačných látok /napr. polyfosfátových esterov/. Prvotné polypeptidy neobsahovali všetkých 20 aminokyselín ako súčasné proteíny, ale len 18.

V bielkovinách biologických sústav sa nachádzajú takmer výhradne L-aminokyseliny. Podľa súčasných názorov tento typ aminokyselín bol vybraný náhodne /rovnako to mohli byť aj D-aminokyseliny/. Z hľadiska štruktúry bielkovín však bolo nutné, aby to bola rovnaká forma. Striedanie D- a L-formy nedovoľuje vytvoriť stabilný alfa - helix bielkovín. Ako vieme, sterické usporiadanie substituentov v aminokyselinách je dôležité pre štruktúru a v konečných dôsledkoch aj funkciu bielkoviny.

17.2.1.5 Záverová poznámka

Zhrňujúc vyššie uvedené, môžeme povedať, že všetky hlavné komponenty pre zostavenie živej hmoty mohli vzniknúť jednoduchým vývojom organických zlúčenín vplyvom energie.

Dosiaľ najstarší organický materiál sa našiel v geologických vrstvách starých 3,5 miliárd rokov v Južnej Afrike. Tieto usadeniny obsahovali: izoprenoidy, porfyríny, puríny a pyrimidíny. Je zaujímavé, že v uvedených usadeninách sa našli mikrofosílie s priemerom 0,6 μm , ktoré pripomínajú dnešné baktérie.

17.3 BIOLOGICKÁ ETAPA EVOLÚCIE

Vyvrcholením chemickej etapy evolúcie bol vznik prvotného živého systému, ktorý dnes označujeme ako protobiont. Pohyb vývoja od protobiontov k človeku označujeme ako biologická evolúcia, niekedy tiež fylogenetický vývoj.

17.3.1 TEÓRIA VZNIKU PROTOBIONTOV

Na základe dnešných znalostí protobiont /alebo prabunka/ musel obsahovať prvky potrebné pre reprodukciu /autoreprodukciu/ a musel v ňom prebiehať jednoduchý metabolizmus.

Podľa súčasných názorov, ktoré nie sú jednotné, vznik protobiontov z informačných makromolekúl /bielkovín a nukleových kyselín/ mohol vzniknúť na viacerých základoch. Existujú štyri základné teórie vzniku protobiontov:

- koacervátová teória /Oparinova teória/,
- mikrosférová teória /Foxova teória/,
- génová teória /Millerova teória/,
- teória koacervát v koacerváte.

17.3.1.1 Koacervátová teória

Autorom tejto teórie je Oparin. Koacerváciou rozumieme rozdelenie koloidného roztoku na dve fázy, ktoré sa líšia koncentráciou polyméru. Niektoré koacerváty obsahovali polynukleotidy, iné polypeptidy. Náhodnou vzájomnou reakciou sa obohacovali a priberali do svojej "kvapky" ďalšie molekuly, čím narastali a vyznačovali sa jednoduchým metabolizmom. Takýmto spôsobom sa vytvorili aj koacerváty obsahujúce chlorofyl /zelené farbivo/. Boli to koacerváty s primitívnym fotosyntetickým mechanizmom.

17.3.1.2 Mikrosférová teória

Mikrosféry vznikajú spontánne; sú to samosyntetizujúce štruktúry podobné bunkám. Vyznačujú sa dvojvrstevnou štruktúrou, ktorá sa podobá prírodným membránam. Mikrosféry neobsahujú lipidy, obsahujú však aminokyseliny s nepolárnymi zvyškami, ktoré imitujú lipidy tak, že vytvárajú bariéru funkčne príbuznú s lipidovou membránou. Dôležitou vlastnosťou tejto prvotnej membrány je semipermeabilita. Pri mikrosférach hovoríme už o primitívnych katalytických aktivitách, formuje sa tu vzťah medzi proteinoidmi a polynukleotidovými komplexmi, ktorý vyúsťuje do počiatkov genetického kódu.

17.3.1.3 Génová teória

Génová teória vychádza z predpokladu, že prvotné informačné polymérne molekuly boli nukleové kyseliny /pravdepodobne RNA/. Tieto nukleové kyseliny sa vyznačovali schopnosťou replikácie, ďalej boli schopné kódovať bielkoviny a mutovať. Táto teória predpokladá, že katalyzátory /vo forme enzýmov/ a ohraničujúce membrány sa vyvíjali neskôr.

Génová teória vychádza z predpokladu, že polynukleotidy môžu slúžiť ako matrica aj v neprítomnosti enzýmov /bielkovín/. Komplementárny polynukleotid sa vytvára pomocou kondenzačného činidla. Katalytickú funkciu vykonávajú polyfosfáty ako predchodcovia ATP. Ďalej sa polynukleotidy vyznačujú mutabilitou. Mutačná zmena je základ evolúcie.

Podľa Millerovej génovej hypotézy, hlavným a rozhodujúcim predpokladom pre vznik života bola syntéza génu za abiotických podmienok. Tento predpoklad spĺňa jedine nukleová kyselina, lebo ako sme už uviedli: môže sa replikovať,

duje bielkoviny a podlieha mutáciám. Génová teória však nevysvetľuje vznik genetického kódu a zložitého proteosyntetického aparátu.

17.3.1.4 Teória koacervátu v koacerváte

Táto teória vychádza z predpokladu, že prvotné koacerváty boli len protredím, v ktorom vznikali prvé molekuly nukleových kyselín, ktoré boli schopné replikovať sa. Okolo nich sa ako druhotné koacerváty, t.j. koacerváty v koacerváte zhlučovali molekuly bielkovín, ktoré vznikali za spolupôsobenia nukleových kyselín. Primárnu štruktúru týchto bielkovín určovali nukleové kyseliny. Druhotný koacervát teda mal už schopnosť prenášať genetickú informáciu a stal sa východiskom pre vývoj protobiontov.

Ďalší vývoj smeroval k ohraničeniu protobiontov membránami, ktoré s najväčšou pravdepodobnosťou boli len jednovrstevné. Obsahovali len bielkoviny a rozdiel od súčasných trojvrstevných membrán /lipidy ohraničené bielkovinovou dvojvrstvou/.

Záverom treba povedať, že primitívny živý systém /protobiont/ sa vyznačoval autoreprodukciami a jednoduchým metabolizmom. Aby sa však mohol reprodukovovať, musel sa vyznačovať genetickým kódom. Vo všeobecnosti musíme povedať, že neexistuje žiadna teória, ktorá by uspokojivo vysvetľovala vznik tejto základnej vlastnosti živého systému.

S najväčšou pravdepodobnosťou paralelne vznikali a vyvíjali sa nukleové kyseliny a bielkoviny, a na určitom stupni vývoja prevzali bielkoviny katalytickú funkciu a stali sa závislé na nukleových kyselinách /kódovanie/.

TRNAVSKÁ UNIVERZITA
UNIVERZITNÁ KNIEŽKA
Hodopisník 73
918 43 TRNAVA

pravo- i ľavotočivá dvojšpirála. Experimentálne dokázali, že v jednoduchom kryštáli polynukleotidov /DNA/ majú reťazce pravotočivé i ľavotočivé segmenty.

Pri SBS modeli, obdobne ako pri Watson-Crickovej dvojšpirále, ide o zoskupenie nukleotidov ako základných stavebných jednotiek do polynukleotidových reťazcov, tak isto je tu párovanie báz na princípe komplementarity, reťazce sú antiparalelné. Rozdiel je v tom, že SBS model má tvar sinusovej krivky, pri ktorej reťazce majú aj ľavotočivú orientáciu. Autori si nenárokujú na absolútne prijatie nového modelu DNA, ale podávajú ho ako alternatívnu konformáciu k pravotočivej dvojšpirále. Podľa ich názoru takto usporiadaná DNA by mohla lepšie plniť svoju dvojjedinú funkciu: odovzdávať informáciu dcérskym molekulám a prostredníctvom ribonukleových kyselín realizovať genetickú informáciu v podobe syntézy bielkovín, predovšetkým enzýmov.

Treba na záver ešte poznamenať, že najnovšie výskumy potvrdzujú, že aj v natívnej DNA sa nachádza určitá časť DNA, ktorá má ľavotočivú orientáciu; nazýva sa Z-DNA. Avšak ani tieto skutočnosti nevyvrátili Watson-Crickov model dvojjazvitnice DNA; skôr poukázali na fakt, že DNA je molekula, ktorá má zložitú štruktúru, ktorá môže vykazovať štruktúrnu heterogénnosť.

5.5 TERCIÁRNA ŠTRUKTÚRA DNA

5.5.1 TERCIÁRNA ŠTRUKTÚRA DNA PROKARYONTOV

Terciárnou štruktúrou DNA pri prokaryotoch je priestorové usporiadanie kruhovej dvojšpirály DNA chromozómu do nadšpirálovej štruktúry, ktoré nazývame superhelix. Znamená to, že kovalentne uzavretá kruhová dvojšpirála DNA sa vlastne otočí okolo seba a to buď pravotočivým spôsobom - DNA pozitívne superšpiralizovaná, alebo ľavotočivým spôsobom, kedy sa stáva negatívne superšpiralizovaná. Uzavreté kruhové molekuly s rovnakou terciárnou štruktúrou, ktoré sa líšia stupňom superšpiralizácie predstavujú topologické izoméry.

Okrem dvojreťazcovej bunkovej DNA, ktorá sa nazýva aj CCC DNA /covalently closed circle DNA/, niektoré vírusy majú jednoreťazcovú kruhovú DNA /napr. vírus Φ X 174/. Podrobnejšie si o nej povieme pri replikácii DNA. Na tomto mieste uvedieme, že jednoreťazcové molekuly DNA nemajú pochopiteľne komplementárne párovanie báz a teda pomer A : T a C : G nie je rovnaký. Tak napr. pri Φ X 174 sa zistilo, že má toto zastúpenie báz: 24,6 % A; 18,5 % T; 32,6 % G a 24,1 % C. Niektoré typy prokaryotickej DNA sú na obr. 23.