

## MUTACE A REPARAČNÍ MECHANISMY

### Mutace

Mutace jsou náhodné změny v genetickém materiálu. Jsou jednou z příčin genetické různorodosti organismů rostlinné i živočišné říše. Mutace jsou stálé dědičné změny, podmiňují nové vlastnosti. Mohou to být změny na úrovni genů, chromosomů, genomu. Proces mutací z hlediska populační genetiky budeme pokládat za proces, který se opakuje s určitou relativní četností v určitém lokusu. Četnost mutací se označuje jako **mutační intenzita (nebo také mutační rychlost)** a znamená počet mutací na lokus a gametu, tzn. generaci.

Pokud k mutacím dojde v **zárodečných buňkách**, podílejí se na vzniku genetické variability organismů (viz dále). **Selekčně pozitivními mutacemi** může docházet ke **zlepšení stávající funkce genu**. Mutace selekčně negativní mohou být naopak příčinou vzniku dědičných chorob.

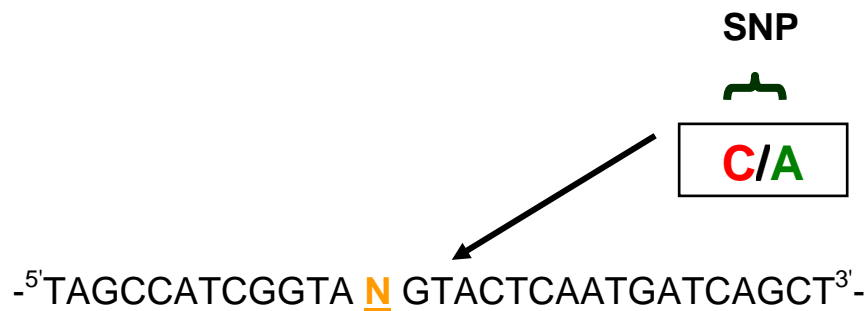
Mutace, které vzniknou postnatálně v somatické buňce se uplatňují pouze u jedince, který mutaci získal. Nepředávají se do další generace.

Jestliže v populaci dochází současně ke vzniku mutací a selekci proti mutované alele, může při vyrovnání působení těchto dvou protichůdných procesů dojít k relativně rovnovážnému stavu frekvence alel, který udržuje populační polymorfismus (viz Populační genetiky).

**Polymorfismus** znamená současnou existenci dvou, i více, alternativních genotypů v populaci. Locus je polymorfní, jestliže se vzácnější alela v populaci vyskytuje s frekvencí 0.01 a vyšší.

### Jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphisms – SNP)

V 99.9 % sekvence DNA se lidé od sebe vzájemně neliší. **Ze zbývajících 0.1% rozdílu tvoří SNP přes 80 %**. Projekt definování lidského genomu nyní pokračuje mj. identifikací miliónů SNP, které jsou shromažďovány ve veřejně přístupných databázích. **Možnost typizace mnoha set tisíc SNP v jednom vzorku pomocí DNA čipů (viz Metody molekulární genetiky) by měla usnadnit identifikaci alel, zodpovědných za řadu onemocnění a i za případné rozdíly v účinnosti farmak u jednotlivých pacientů se shodným onemocněním.**



Dvouvláknová DNA



### Vliv mutací na organismus

Rozdělení mutací z evolučního hlediska je založeno na vlivu přírodního výběru na nositele mutací. Jestliže dojde k mutaci, která změní např. kvalitu proteinu, teprve přirozený výběr rozhodne, zda je tato změna pro organismus užitečná nebo nežádoucí.

### Rozdělení mutací podle vlivu na nositele mutace

- a) **Mutace selekčně výhodné** zvyšují reprodukční schopnost daného genotypu vůči ostatním genotypům.
- b) **Neutrální** neovlivňují reprodukční schopnost nositele mutace.
- c) **Mutace selekčně nevýhodné** mohou vést k poruše až ztrátě funkce genu, snižují reprodukční schopnost nositelů mutace.
- d) **Mutace letální** jsou buď příčinou smrti jedince (plodu) nebo vedou pouze ke ztrátě schopnosti se reprodukovat.

**Většina mutací je selekčně neutrálních. Neprojeví se ve fenotypu** a jedince z hlediska přírodního výběru neovlivňují. Takové mutace mohou například změnit zastoupení několika aminokyselin v proteinu (enzymu), ale ve srovnání s nemutovanou formou genu to jeho aktivitu nemění.

**Selekčně negativních mutací je více než výhodných (pozitivních).** Skutečnost, že **část mutací má** pro své nositele **škodlivé důsledky**, vyplývá z toho, že vyvolá-li mutace zásadní změnu funkce daného genu, pak **ztráta původní funkce je** v daném prostředí **obvykle obtížně slučitelná s přežitím.**

### Vznik mutací

Podle vzniku dělíme **mutace** na (i) **spontánní** a (ii) **indukované.**

(i) Mutační rychlost **spontánních mutací** (tedy takových, jejichž příčinu neumíme přesně určit; spontánní = samovolné) je u člověka přibližně  $10^{-5}$ - $10^{-7}$ . Pokud jsou udávané vyšší hodnoty, jsou pravděpodobně zkresleny výběrem těch genů, u kterých dochází k mutacím častěji. Mezi **spontánní mutace** patří například **nesprávné zařazení nukleotidů v průběhu replikace DNA.** Během evoluce došlo k **nastavení schopnosti DNA-polymerasy opravovat replikační chyby** tak, aby **frekvence** těchto **spontánních mutací** byla **pro evoluci optimální.** To znamená, aby mutační zátěž nebyla příliš vysoká, ale aby fixace určitých spontánních mutací dovolila organismům přizpůsobovat se změněným podmínkám (viz například rezistence bakterií k antibiotikům).

Doposud není k dispozici metoda, která by umožňovala snížit mutační intenzitu spontánních mutací. Naopak je známa **řada faktorů**, které zvyšují mutační intenzitu, tyto faktory jsou souhrnně označovány jako **mutagenní faktory.**

(ii) **Indukované mutace a mutagenní faktory** můžeme rozdělit na faktory:

a) **Biologické**, mezi které jsou zařazeny i faktory genetické, kdy např. poruchy ve funkci reparačních mechanismů vedou ke zvýšení počtu mutací vznikajících při replikaci. U člověka bylo prokázáno, že **vyšší věk** mužů je faktor zvyšující v některých genech počet mutací. Týká se to např. vzniku nové mutace v genu *FGFR3*, který kóduje receptor pro fibroblastový růstový faktor. Tato mutace má dominantní charakter a přítomnost jedné mutované alely v genomu novorozence vede k achondroplázii (porucha vývoje skeletu vedoucí k trpasličímu vzrůstu – AD onemocnění).

Mutagenní **efekt některých virů** byl popsán například jako jedna z příčin vzniku určitých typů maligních nádorů. Mezi viry s potenciálním mutagenním účinkem patří **DNA viry** ze čtyř odlišných rodin: herpesviry, hepdnaviry, papovaviry (papillomaviry) a adenoviry; **RNA viry**: retroviry (viz Onkogenetika).

### b) Chemické

U celé řady chemických sloučenin byly experimentálně prokázány a definovány mutagenní účinky. Mezi chemické kancerogenně působící látky jsou řazeny například polycyklické a aromatické uhlovodíky, chlorované uhlovodíky, aromatické aminy, nitrosaminy, azbest, těžké kovy, mykotoxiny atd.

Na tomto místě je třeba zdůraznit, že **řada léků je prokazatelně nebo potencionálně mutagenní** (např. cytostatika - léky používané při léčbě nádorového bujení). Vzhledem k tomu, že se lidé dostávají neustále do styku s novými výrobky (např. potravinářský průmysl atp.), je třeba provádět **testování nových látek na jejich mutagenitu** (viz dále).



**HeLa buňky: Mitóza po ovlivnění cytostatikem, šipky označují chromatidové zlomy, zvětšeno 1000x**  
(Experimentální výsledek – Onkogenetická laboratoř ÚBLG 1. LF UK)

### c) Fyzikální - UV a ionizující záření

Mezi nejvíce prozkoumané fyzikální mutagenní činitele patří ionizující záření (například gamma, rtg). Testování účinků ionizujícího záření bylo provedeno na různých typech živočichů.

**Pro drosofilu** (*Drosophilla melanogaster*) a některé další organismy byla prokázána **jednoduchá lineární závislost četnosti mutací na dávce záření**. Mutagenní účinek ionizujícího záření závisí pouze na celkové dávce a nezávisí na způsobu aplikace (chronické dlouhodobé ozařování, jednorázová velká dávka).

**Pro savce** (testováno zejména na myších) je tato **závislost složitější**. Lineární závislost byla prokázána pouze pro malé dávky, při vysokých dávkách byl mutagenní efekt nižší. **Chronické ozařování mělo menší efekt než stejně velká dávka podaná jednorázově**. Tyto odchylky mezi savci a bezobratlými je možné vysvětlit buď (i) zánikem citlivých buněk vůči záření nebo (ii) činností reparačních mechanismů, (iii) případně kombinací obou dějů.

**Zdvojnásobující dávka** je taková dávka záření, která zdvojnásobí množství spontánních mutací. Pro myš je odhadována na 0.3 - 0.8 Gy (Gray = fyzikální jednotka pro dávku záření). Pro člověka jsou údaje odvozené od hodnot, které platí pro myš. Je to průměrná dávka hodnot udávaných u myši: 0.5 Gy.

Gonády člověka dostanou během plodné periody (30 let) z přirozených zdrojů přibližně 30 mGy a v civilizované společnosti přibližně stejnou dávku z umělých zdrojů jako je např. využívání záření v lékařství.

Ionizující záření vyvolává zejména zlomy a přestavby chromosomů nebo chromatid (viz výše obrázek – obdoba působení některých cytostatik).

Pro UV záření je typický vznik dimérů thyminu (spojení sousedních thyminů ve vláknech DNA).

#### Dělení mutací podle rozsahu

**a) Bodové mutace – záměna nukleotidu, delece (ztráta) nebo inserce (včlenění) nukleotidu (i více nukleotidů)**. Tyto mutace mohou být neutrální – pak nevyvolají fenotypovou změnu. Mohou ale zasáhnout úsek DNA, který kóduje polypeptid, a pak mohou vést k záměně aminokyselin v polypeptidu, a nebo může dojít v důsledku mutace k předčasnému vzniku terminačního tripletu. Působením mutací mohou vznikat nové alely daného genu. Některé nové formy genu (alely) mohou přispět k širší variabilitě znaku, jiné

mohou být škodlivé – pak vedou například ke vzniku vývojových vad, poruch metabolismu a k některým nádorovým onemocněním. Některé mutace jsou dokonce letální, způsobují smrt jedince ve stadiu embrya nebo plodu.

(1) **Záměny basí** (substituce) mohou **změnit** například **původní kodon** na **kodon pro jinou aminokyselinu** (např. vznik srpkovité anémie), **nebo pro stop-kodon**. Takové **mutace, kdy vznikne jiná aminokyselina** se nazývají **mutace s chybným smyslem** (missense). **Mutace, které vedou ke vzniku stop kodonu** se nazývají **mutace beze smyslu** (nonsense).

Následující obrázek schematicky znázorňuje záměnu nukleotidu (base) na paměťovém vlákně DNA (viz tabulka genetického kódu – Molekulární genetika; genetický kód, triplety purinových/pyrimidinových basí)

**(i) Mutace s chybným smyslem** (missence)

**Původní sekvence nukleotidů v paměťovém vlákně DNA**

5'..... **GCCAGGCAC** ..... 3'

↓

transkripce

↓

translace

Sekvence aminokyselin ..... **ala arg his** .....

**Sekvence nukleotidů po bodové mutaci**

5'..... **GCCTGGGCAC** ..... 3'

↓

transkripce

↓

translace

Sekvence aminokyselin ..... **ala trp his** .....

**(ii) Mutace mutace beze smyslu** (nonsense)

**Původní sekvence nukleotidů v paměťovém vlákně DNA**

5'..... **GTGCAGGGT** ..... 3'

↓

transkripce

↓

translace

Sekvence aminokyselin ..... **leu gln gly** .....

**Sekvence nukleotidů po bodové mutaci**

5'..... **GTGTAGGGT** ..... 3'

↓

transkripce

↓

translace

Sekvence aminokyselin ..... **leu (↑ stop kodon) terminace translace**

(2) **Delece nebo inserce** jednoho nebo několika nukleotidů mohou mít za následek **posun čtecího rámce** (frameshift). Může to znamenat začlenění jiných aminokyselin (pokud není delece nebo inserce rovna nebo násobkem tří) a předčasné ukončení syntézy polypeptidu, v důsledku změny čtení tripletů, které následují za mutací.

Tento dokument smíží se souhlasem autora jako  
ke studiu oborů Výtvarná studia, chemicko-technologické  
Jeho použití k jiným účelům je zakázáno  
bez souhlasu autora

**Posun čtecího rámce** (frameshift);

**Původní sekvence nukleotidů v paměťovém vlákně DNA**

**5'.....AAAGAAAAGATTGGAAGCTAGGTCA ..... 3'**

↓

transkripce

↓

translace

**Sekvence aminokyselin ..... lys glu lys lle gly thr arg ser .....**

**Delece pěti nukleotidů v paměťovém vlákně DNA**

**5'.....AAAGA↓TTGGAAGCTAGGTCA ..... 3'**

**AAAGA**

↓

transkripce

↓

translace

**Sekvence aminokyselin ..... lys asp trp asn (↑ stop kodon) terminace translace**

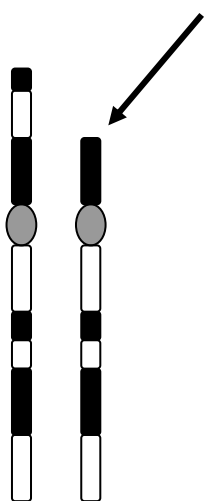
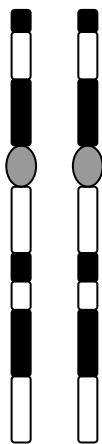
K mutacím může dojít jak v kódujících oblastech genu, tak v promotoru nebo dalších regulačních oblastech a nebo v oblastech regulujících posttranskripční úpravu mRNA.

Tzv. **tiché mutace se ve fenotypu neprojevují**. Například, mění kodon, ale změna v kodonu nevede k začlenění jiné aminokyseliny (viz degenerace genetického kódu).

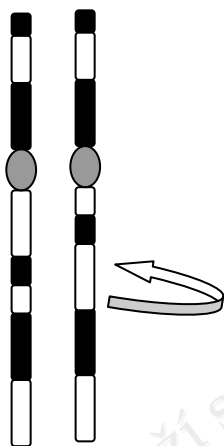
**b) Mutace na úrovni úseků DNA můžeme rozdělit na delece, inverze, translokace a duplikace (až multiplikace).**



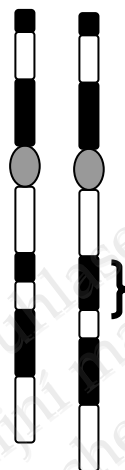
**Homologní pár chromosomů před strukturální aberací  
(schematicky znázorněno G pruhování)**



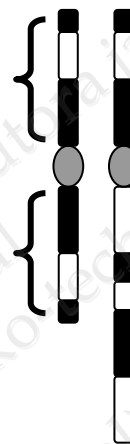
**Delece (terminální),  
raménko p**



**Inverse, raménko q**



**Duplikace,  
raménko q**



**Isochromosom,  
obě raménka p**

Tento dokument slouží se souhlasem autora jako  
doplňkový studijní materiál v Pražské chemicko-technologické  
ke studiu oborů Vysoké školy učelům a další šíření  
Jeho použití k jiným účelům a další šíření  
bez souhlasu autora je zakázáno

Z pohledu evoluce jsou zejména zajímavé duplikace. Duplikace úseku DNA se mohou zařadit do jiné oblasti genomu nebo mohou být tandemové, kdy zmnožený úsek DNA bezprostředně sousedí s úsekem původním. Dojde-li ke zdvojnásobení počtu genů, pak jedna z kopií obvykle stačí k zachování původní funkce a další kopie je již nadbytečná. Dojde-li k mutaci jednoho z duplikovaných genů, nemusí mít tento proces negativní důsledky, protože původní funkce zůstane zachována. **Genové duplikace mění mutace zakázané na mutace tolerované.** Během evoluce byly duplikace jedním z mechanismů zmnožení genomu. Příkladem běžně se vyskytujících tandemových duplikací jsou geny pro rRNA, geny kódující hemoglobiny nebo imunoglobuliny.

Tandemové **multiplikace oligonukleotidových sekvencí** jsou dalším z evolučních mechanismů. Jedním z důsledků multiplikace oligonukleotidových sekvencí je například vznik polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP, viz Molekulární genetika).

Speciální druh polymorfismu je **variabilita počtu krátkých tandemových repetice sekvence nukleotidů (VNTR – variable number of tandem repeats) – tzv. mikrosatelitů.** Polymorfní lokus sestává z variabilního počtu tandemových opakování bi-, tri- nebo tetranukleotidových sekvencí, např.  $[(-5'CA3')_n; (-5'CAA3')_n; (-5'GATA3')_n]$ . Například dinukleotidové repetice cytosinu a adeninu  $(-5'CA3')$  jsou extrémně polymorfní. Jsou přítomny v genomu na mnoha různých místech a v různém počtu opakování. Délka celého úseku může obsahovat desítku až stovku opakování oligonukleotidové sekvence.

VNTR polymorfismus můžeme definovat stejně jako polymorfismus alel strukturního genu, kdy stejně jako u jakéhokoliv znaku jedna alela (v tomto případě počet repetice) byla zděděna od otce a druhá od matky. Vysoký polymorfismus VNTR umožňuje identifikaci každého jedince při použití několika kombinací odlišných mikrosatelitních sekvencí. Kombinace alel několika mikrosatelitů na různých chromosomech je unikátní pro každou osobu (mikrosatelitové markery).

Identifikace různých mikrosatelitních sekvencí je využívána například v kriminalistice.

**c) Genomové mutace zasahují celé chromosomy, případně celé chromosomové sady** (viz Cytogenetika). Vznikají v důsledku poruch průběhu buněčného dělení. Jsou to buď aneuploidie (změna v počtu homologních chromosomů) nebo polyploidie (zmnožení celé sady chromosomů). Z evolučního hlediska měl proces polyploidizace vliv na zvětšování genomu. Mohl se však evolučně uplatňovat pouze do doby než došlo k ustálení heterochromosomální determinace pohlaví.

U člověka vede **změna počtu chromosomů ke vzniku neplodných jedinců**, protože změnou počtu chromosomů dojde ke změně poměru mezi počtem autosomů a heterochromosomů. Tím, že jedinci jsou neplodní, mutace se nepředává do další generace.

Chromosomové aberace vznikají většinou působením mutagenů, jako jsou alkylační látky a dále např. 5-fluoro-2'-deoxyuridin, 2'-deoxyadenosin, arabinosyladenin a hydroxyurea a další.

**Látky vyvolávající změny na úrovni chromosomů** poškozují **(i)** molekuly účastnící se chromatinového připojení a separace. Působí na kondenzaci chromosomů, na průběh crossing-overu, na funkci kinetochoru; **(ii)** Působí na repetitivní struktury centromer a telomer; **(iii)** Mají vliv na molekuly kontrolující průběh buněčného cyklu (např. cykliny, cyklin-dependentní proteinkinasy, p53); **(iiii)** poškozují molekuly vřeténkového aparátu (tubulin, centrioly atp.) a další složky podílející se na průběhu mitózy.

### **Genetická kontrola mutací a jejich reparací**

**Jedním z klíčových genů** v regulaci průběhu kontrolního bodu G1 buněčného cyklu je **gen AT** (odvozeno od genetické poruchy **ataxia teleangiectasia**). **Produkt** genu **AT** je **proteinkinasa (ATM)**, která se **podílí na průběhu buněčné signalizace iniciací fosforylační kaskády**. **Mutovaný gen AT** produkuje velké množství ATM-proteinkinasy, což vede k **absenci kontrolního bodu G1 a následkem toho k zamezení možnosti reparace poškození DNA**, jejímž důsledkem je **přenos zlomů do dceřiných buněk**.

**Gen TP53** patří do skupiny tumor-supresorových genů (viz Onkogenetika, Regulace buněčného cyklu). Je to klíčový gen, který je odpovědný za pozastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě G1 fáze. Exprese genu **TP53** je regulována poškozením DNA a různými typy stresu (hypoxie, nedostatek růstových faktorů atp.). Vede ke zvýšení exprese genu a **zvýšení stability proteinu p53** (prodloužení poločasu degradace).

**Protein p53** je jaderný fosfoprotein. Je to **transkripční faktor pro několik cílových genů** se zásadním významem **pro regulaci buněčného cyklu (např. pro gen *CIP1/WAF1*), reparaci poškození genetického materiálu (gen *GADD 45* - **G**rowth **A**rrest and **D**NA **D**amage) a navození apoptózy (gen *BAX* z rodiny genů *Bcl2* ).**

Produkt genu ***CIP1/WAF1*** je **protein 21 (p21)**, který se **váže k cyklin-dependentním proteinkinám a inhibuje jejich aktivitu** jak v kontrolním bodě G1 tak G2 fáze. Protein p21 může tlumit replikaci zpomalením postupu replikační vidlice, inhibuje katalitickou aktivitu PCNA-dependentní-DNA-polymerasy-delta.

Produktem genu *GADD 45* je **protein Gadd 45**, který **podněcuje excizní reparaci** přímo a nebo v kooperaci s PCNA (proliferating cell nuclear antigen).

**Gen BAX je proapoptotický člen rodiny Bcl-2 genů. Podílí se na navození apoptózy. Dalšími tumor-supresorovými geny, které se podílejí na průběhu reparací** poškozeného genomu jsou **geny BRCA1** (breast cancer 1) a **BRCA2** (breast cancer 2), které pokud jsou mutovány, jsou asociovány s familiárním výskytem (děděnou predisposicí) nádoru prsu nebo prsu a ovarií. Produkty obou genů *BRCA* tvoří komplexy s produkty dalších genů ( např. **genu RAD51**) a podílejí se tak na regulaci průběhu buněčného cyklu a při opravách dvouvláknových zlomů DNA.

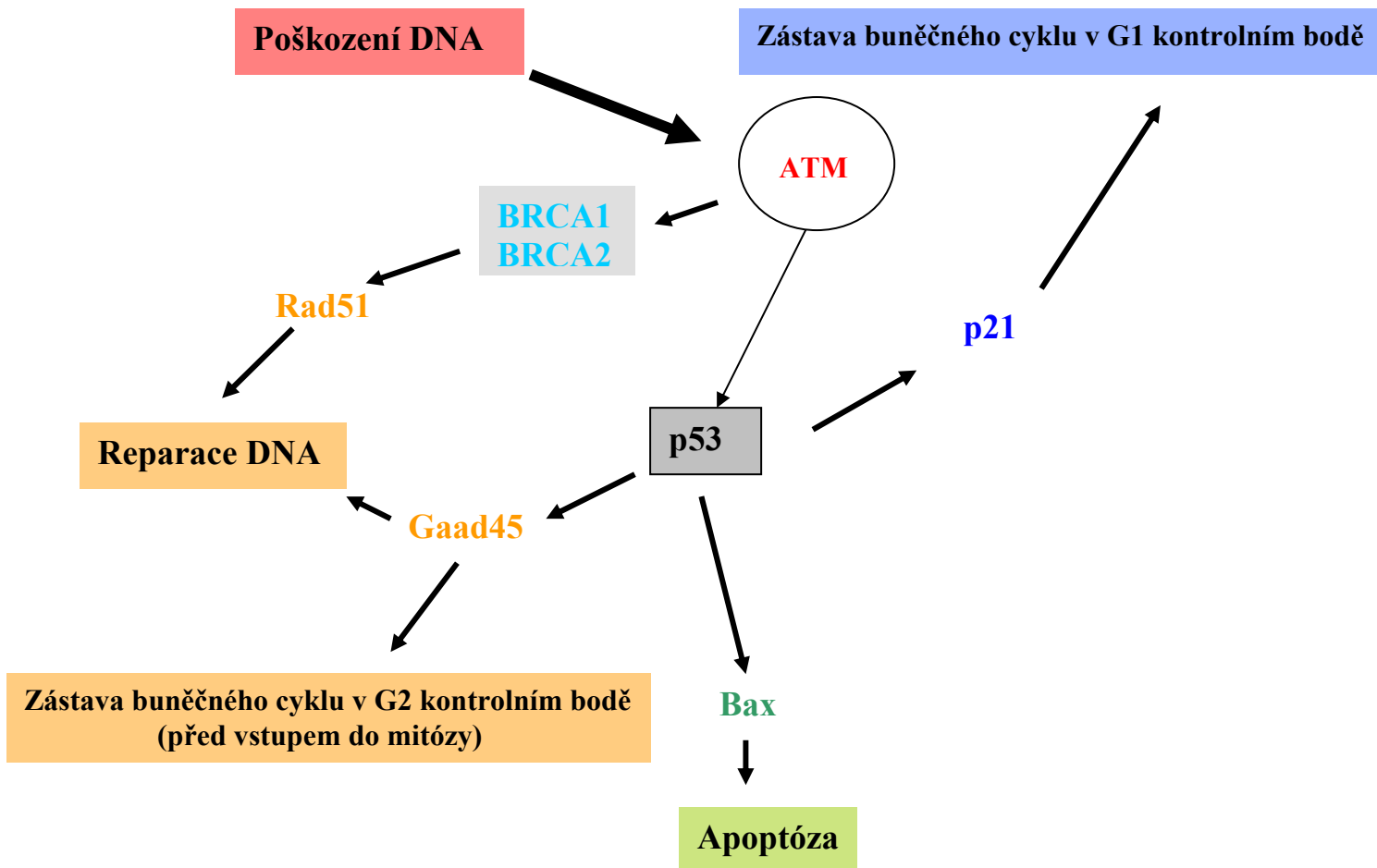
**Gen BRCA1 reguluje buněčný cyklus, inhibuje růst buněk mléčných žláz, uplatňuje se při reparaci poškozené DNA.** Jím kódovaný **protein interaguje s produktem genu RAD51**, který se podílí **na opravě zlomů DNA** (zlomy indukované zářením nebo vznikající při crossing-overu mezi chromatidami při meióze).

**Gen BRCA2 má obdobnou funkci jako gen BRCA1**, i když oba geny jsou svou strukturou odlišné. **Interaguje také s genem RAD51. Protein BRCA2 transportuje protein RAD51 do místa poškození DNA.**

**Gen RAD51 kóduje protein nezbytný pro opravu poškozené DNA.**

Na velmi zjednodušeném obrázku jsou znázorněny vzájemné vazby mezi výše uvedenými geny, respektive jejich produkty, které se podílejí na regulaci průběhu buněčného cyklu a reparaci poškozené DNA.

Tento dokument slouží se souhlasem autora jako  
doplňkový studijní materiál  
ke studiu oborů Vysoké školy chemicko-technologické  
v Praze.  
Jeho použití k jiným účelům a další šíření  
bez souhlasu autora je zakázáno



### Mutátorové geny

Mutátorové geny kontrolují stabilitu buněčného genomu (viz Onkogenetika). Odpovídají za opravy (reparace) v sekvenci DNA jako jsou chybná párování nukleotidů během replikace, modifikace templátu mutagenem nebo nesprávná registrace repetitivní sekvence (např.  $(CA)_n$ ).

Mutace v mutátorových genech vedou k hromadění a udržování mutací v buňce. Ve fenotypu se projevují nestabilitou délky mikrosatelitních lokusů. Mutace v mutátorových genech jsou asociované s výskytem nepolypózních nádorů tlustého střeva (HNPCC – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) a dalšími nádorovými onemocněními. U lidí byly dosud identifikovány mutátorové geny *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hMLH1*, *hPMS2*.

Mutace v reparačních genech zvyšují 100x - 1000x frekvenci mutací v genomu.

### Typy reparací DNA

**Přímá reparace** je odstranění změny v sekvenci DNA zpětnou reakcí umožněnou specifickými enzymy; například zacelení jednovláknového zlomu ligasou.

**Reparace s excizí** (vyštěpení) poškozené nebo nesprávně zařazené purinové nebo pyrimidinové base (případně sekvence basí) se uskuteční pomocí komplexu enzymů, které jsou schopny mutaci vyhledat, odstranit a nahradit vyštěpenou část řetězce správným nukleotidem nebo úsekem sekvence DNA. Mezi komplex těchto enzymů patří, mimo jiné, DNA-glykosidasa, která odstraňuje nesprávně zařazené nukleotidy; endonukleasa, která štěpí vlákno DNA uprostřed; DNA-polymerasa, která zaplní vzniklou mezeru v sekvenci nukleotidů. DNA-polymerasa má sama reparační schopnost, díky své 3'-5'-exonukleasové aktivitě.

**Fotoreaktivace** se uplatňuje v případě, když dojde ke vzniku kovalentních vazeb mezi sousedními basemi v řetězci DNA (např. diméry thyminu) vlivem UV záření. Složkou slunečního světla s vlnovou délkou 340-400 nm se aktivuje enzym DNA-fotolyasa, který tyto vazby štěpí a obnoví tak strukturu vlákna DNA.

**Rekombinační oprava** je zejména oprava dvouřetězcových zlomů DNA. Jde o cílenou výměnu poškozených a nepoškozených sekvencí mezi dvěma molekulami DNA. Po rekombinační opravě vznikne jedna opravená molekula DNA, ve druhé molekule, která se stane nefunkční, se nahromadí všechny mutované úseky.

**Reparace dvouřetězcových zlomů** (NHEJ = nonhomologous end joining) je druhý způsob reparace dvouřetězcových zlomů, představuje prosté spojení nehomologických tupých konců (viz dále restriktasy) dvouvláknové DNA po dvouřetězcovém zlomu.

### **Monogenně děděné poruchy reparačních systémů**

**Ataxia teleangiectasia** je porucha souladu svalů, zpomalení růstu. V prvním roce života se v konjunktivě objevují malé vaskulární léze. Onemocnění provázejí neurologické a imunologické poruchy (infekce plic, průdušek), výskyt **leukémií, lymfomů**. **Genetický materiál poškozuje radiace, která vyvolává chromosomální přestavby.**

**Bloomův syndrom** se vyznačuje nízkou porodní hmotností (trpasličí vzrůst). Typická je **vyrážka na obličeji, která se zhoršuje po slunění. Postižení mají dispozici pro vznik nádorů.** Při cytogenetickém vyšetření je nalezena **vysoká frekvence výměn mezi sesterskými chromatidami, chromosomové zlomy a výskyt mikrojader.**

**Fanconiho anémie je provázána vrozenými anomáliemi skeletu** (malá postava, defekty článků prstů palce), anomáliemi **gastrointestinálního traktu a nervového systému**. Pacienti mají **úbytek krvinek**, je u nich zvýšené **riziko hematologických malignit, nádorů gastrointestinálního traktu a pohlavních orgánů**.

**Xeroderma pigmentosum** je provázána extrémní **přecitlivělostí na slunění**. V **časném věku (do osmého roku u 75 % pacientů)** vznikají **nádory kůže** – karcinomy buněk dlaždicového epitelu nebo melanomy.

### **Testování mutagenních účinků nových sloučenin**

Součástí vývoje nového léku je vyšetření nežádoucích účinků na organismus. Proto předchází klinickým zkouškám stanovení, mimo jiné, jeho toxikologických vlastností. Mezi tato vyšetření patří stanovení, zda může docházet k poškození genetického materiálu (genotoxické účinky). Zařazení genetické toxikologie vzbudily obavy, že pokud by látka vyvolala v experimentálním systému mutace, mohl by se u lidí zvýšit výskyt geneticky podmíněných poruch. Experimentálně bylo zjištěno, že mnoho látek má mutagenní aktivitu a má kancerogenní účinky.

Proto preklinické experimentální studie testují sloučeniny na genotoxické účinky, tzn. je testována interakce látek s genetickým materiálem buňky. Genotoxické testy se hlavně využívají k predikci kancerogenity sloučeniny.

Mnoho mutagenních a kancerogenních sloučenin neinteraguje s DNA dokud nedojde k jejich biotransformaci, která je enzymově katalyzovaná (metabolická aktivace).

Genotoxické testy probíhají jak *in vitro*, tak *in vivo* systémech. Provádějí se standardní soubory testů (neexistuje jeden univerzální test):

- a) testy pro **stanovení genových mutací u bakterií** (Amesův test).

**Amesův test** je jeden ze základních toxikologických testů. Je to detekce mutací na speciálním kmeni bakterií *Salmonella typhimurium*, které mají mutaci v genu pro tvorbu histidinu a proto rostou pouze v prostředí, které histidin obsahuje. Amesův test spočívá ve **vysazení těchto mutovaných Salmonell do kultivačního prostředí bez histidinu**, do kultivačního prostředí je přidána frakce mikrosomů s aktivní jaterní oxydasou a testovaná látka, kterou oxidasa mění na reaktivní metabolit. Kultivace za **nepřítomnosti histidinu neumožňuje růst původnímu kmeni bakterií**, ale **noví mutanti**, kteří vznikli po působení testované látky, v tomto prostředí **rostou a tvoří kolonie**. Počet kolonií odpovídá intenzitě mutagenního účinku testované látky.

b) ***in vitro* testy** (na buněčných kulturách) **s cytogenetickým hodnocením chromosomového poškození.**

Na savčích buňkách, které proliferují v buněčné kultuře se po přidání testované látky mikroskopicky hodnotí mitotický index (procentuální poměr buněk v jednotlivých fázích mitózy vztažený ke všem jaderným buňkám), **chromosomální aberace** (zlomy a výměny sesterských chromatid, zdvojení chromosomů bez následné separace). **Mikrojaderný test s blokádou cytokinese** je další metoda pro hodnocení chromosomového poškození. Mikrojadra jsou malá extrajaderná tělíska, která vznikají z fragmentů chromosomů bez centromery nebo z celých chromosomů, které během mitózy nedoputují až k pólům dělicího vřeténka. Mikrojaderný test se obvykle provádí na lidských lymfocytech. V současné době je pro detekci chromosomových aberací využívána i metoda FISH (viz Cytogenetika).

c) **testy *in vivo***, v nichž se uplatní **obdobné testy jako v *in vitro* podmínkách**, ale navíc **i faktory ovlivňující genotoxickou aktivitu sloučenin jako je adsorpce, distribuce, metabolismus, exkrece atp.**

Testy jsou prováděny zejména na definovaných kmenech hlodavců. Patologické vyšetření dovoluje určit dopad působení na jednotlivé orgány, maximální tolerovanou dávku, reverzibilitu poškození tkáně atp. *In vivo* testy mají nezastupitelnou úlohu při testování teratogenních účinků látek (viz Embryonální vývoj).

Tento dokument slouží se souhlasem autora jako  
doplňkový studijní materiál  
ke studiu oborů Vysoké školy chemicko-technologické  
v Praze.  
Jeho použití k jiným účelům a další šíření  
bez souhlasu autora je zakázáno