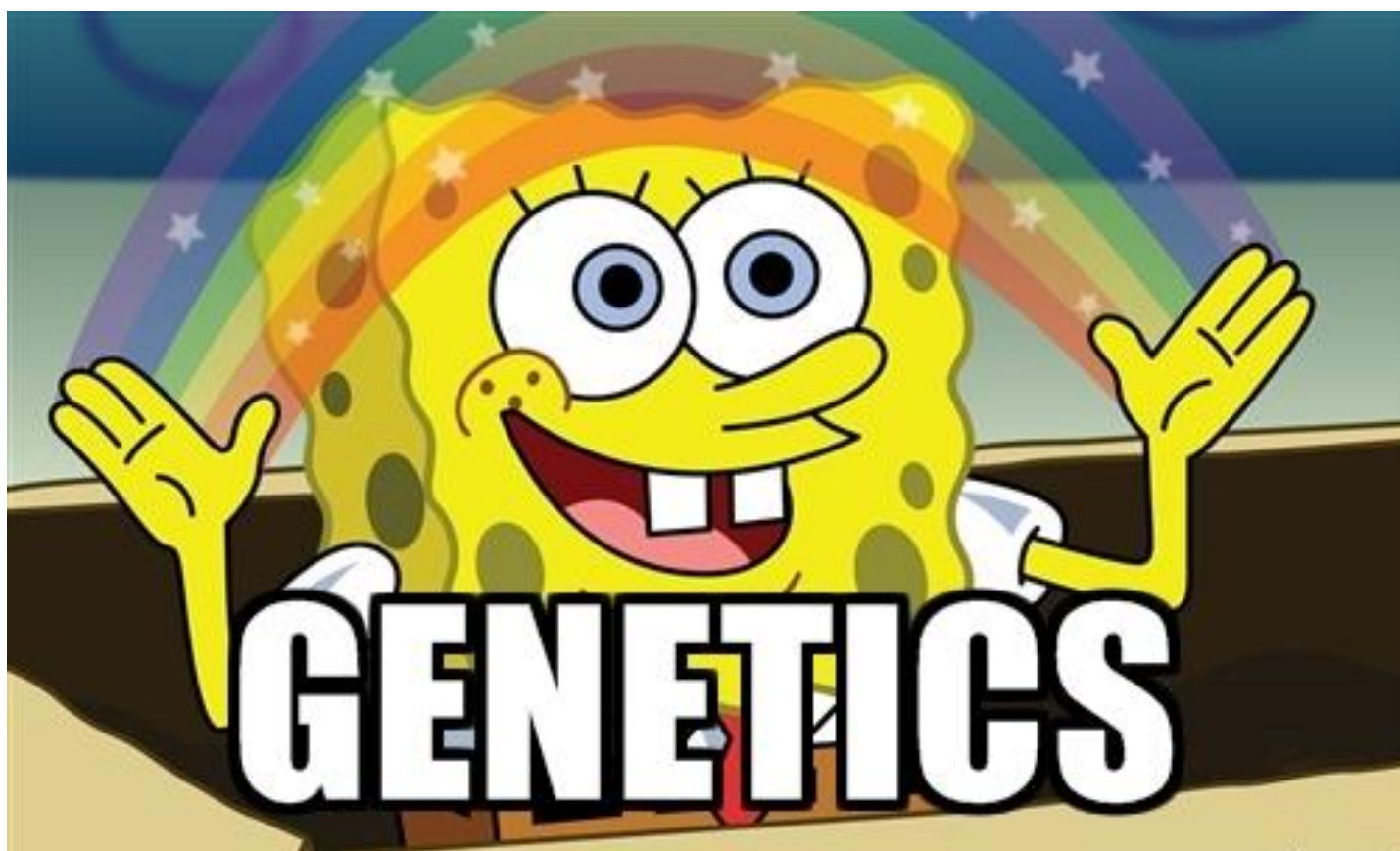


# **BIOLOGIE A GENETIKA**

**VYPRACOVANÉ OTÁZKY KE ZKOUŠCE NA 1. LF UK**

**2015/2016**



1. Základní zákony genetiky
2. Dihybridismus
3. Aditivní model polygenní dědičnosti
4. Interakce nealelních genů
5. Genová vazba
6. Genotyp a jeho variabilita, mutace a rekombinace
7. Genotyp a prostředí
8. Dědičnost multifaktoriálních znaků a chorob
9. Dědivost a význam jejího hodnocení v lékařství
10. Multifaktoriálně podmíněné znaky u člověka
11. Genealogická metoda
12. Autosomálně dominantní dědičnost v pokusu a v rodokmenu, příklady znaků u člověka
13. Autosomálně recesivní dědičnost v pokusu a v rodokmenu, příklady znaků u člověka
14. Dědičnost pohlavně vázaná v pokusu a v rodokmenu, příklady znaků u člověka
15. Dvojčata a dvojčecí metoda v genetice
16. Genetické metody vazebné analýzy
17. Genetické metody asociační analýzy
18. Metody genetické analýzy v experimentu a v genetice člověka
19. Genetické mapování u člověk
20. Genetické mapy a jejich význam
21. Struktura a funkce eukaryotní buňky
22. Buněčný cyklus, jeho regulace a poruchy
23. Buněčná signalizace
24. Mítoza, její regulace a poruchy
25. Meióza, její regulace a poruchy
26. Crossing-over, jeho mechanismus a význam
27. Gametogeneze
28. Mimojaderná dědičnost
29. Nemendelovská dědičnost
30. Struktura a typy eukaryotních chromosomů
31. Metody chromosomálního vyšetření
32. Molekulární cytogenetika
33. Karyotyp člověka, metody jeho vyšetření
34. Odchytky v počtu chromosomů, příčiny a klinické projevy u člověka
35. Strukturální přestavby chromosomů, příčiny a klinické projevy u člověka
36. Somatické a gametické chromosomální aberace
37. Příčiny vzniku chromosomálních aberací
38. Syndromy podmíněné aneuploidii autosomů u člověka
39. Syndromy podmíněné aneuploidii gonosomů u člověka
40. Indikace chromosomálního vyšetření v klinické genetice
41. DNA - stavba a funkce
42. RNA - typy, stavba, funkce
43. Replikace DNA
44. Transkripce a posttranskripční úpravy RNA u eukaryot
45. Translace, posttranslační úpravy proteinů u eukaryot
46. Genetický kód
47. Struktura a funkce genu
48. DNA sekvence kódující (proteintvorné) a nekódující
49. Regulace transkripce u eukaryot
50. Translace membránových a exkrečních proteinů (targeting)
51. Regulace genové exprese u eukaryot
52. Epigenetika, genetický imprinting
53. Polymorfismy nukleových kyselin
54. Metody analýzy nukleových kyselin
55. Rekombinantní DNA a genetické inženýrství
56. Genové mutace, typy a manifestace
57. Mutageny a mutagenese, testování mutagenních účinků
58. Reparační mechanismy buňky a jejich genetická kontrola
59. Reparační mechanismy nukleových kyselin
60. Molekulární podstata dědičných chorob
61. Proteiny a jejich funkce, genetický polymorfismus bílkovin
62. Lidské hemoglobiny a jejich dědičnost
63. Hemoglobinopatie
64. Dědičné poruchy metabolismu
65. Genetická informace mitochondrií, mitochondriální choroby
66. Přímá diagnostika dědičných chorob analýzou nukleových kyselin
67. Nepřímá diagnostika dědičných chorob analýzou nukleových kyselin
68. Fyzické metody genového mapování
69. Mapa lidského genomu, Human Genome Project, výsledky a využití
70. Genová terapie - principy, současné možnosti a její perspektivy
71. Principy terapie dědičných chorob
72. Dědičnost a biologický význam krevně skupinových systémů
73. Dědičnost a biologický význam Rh systému
74. Buňky imunitního systému, imunofenotypizace
75. Genetická kontrola imunitní odpovědi
76. Genetická kontrola tvorby protilátek
77. Imunitní odpověď (rozpoznání antigenu, kooperace buněk)
78. Genetika imunoglobulinů, B a T receptorů
79. Genetika transplantací, transplantační pravidla, histokompatibilitní systémy
80. Hlavní histokompatibilitní komplex člověka
81. Imunologická tolerance a možnosti jejího navození
82. Funkce imunitního systému ve vztahu k nádorovým onemocněním, genetické aspekty
83. Geneticky podmíněné imunodeficience
84. Struktura a funkce prokaryotní buňky
85. Význam a struktura chromosomů prokaryot
86. Biologie a genetika bakterií, význam v medicíně
87. Regulace genové exprese u prokaryot

88. Transkripce a translace u prokaryot
89. Konjugace, transformace, transdukce
90. Biologie a genetika virů, význam v medicíně
91. Ontogeneze a její genetická regulace
92. Genová kontrola embryonálního vývoje tělní osy
93. Chromosomální determinace pohlaví
94. Ontogeneze pohlaví u savců a její poruchy
95. Apoptóza a klinické důsledky poruch její regulace
96. Genová kontrola a význam apoptózy v ontogenezi
97. Genetické příčiny procesu stárnutí a smrti
98. Teratogeneze, teratogeny
99. Mutagenní a teratogenní faktory životního prostředí
100. Vrozené vývojové vady člověka, příklady, rozdělení podle příčin
101. Populace z genetického hlediska, Hardy-Weinbergova rovnováha
102. Selektce a její typy
103. Inbred, příbuzenské sňatky a jejich rizika
104. Populační polymorfismy a jejich příčiny
105. Mutace z populačního hlediska, četnost mutací
106. Migrace, tok genů
107. Struktura populací, genový drift, význam pro evoluci
108. Charakteristika nádorově transformovaných buněk
109. Charakteristika nádorového bujení
110. Příčiny vzniku nádorů, kancerogeneze, kancerogeny
111. Protoonkogeny, onkogeny
112. Tumor supresorové geny
113. Mutátorové geny, stabilita buněčného genomu
114. Chromosomové aberace v nádorových buňkách
115. Nádorová onemocnění s familiárním výskytem
116. Role genetiky v presymptomatické diagnostice a prevenci nádorových onemocnění
117. Možnosti genové terapie nádorových onemocnění
118. Genetické mechanismy evoluce
119. Druh a speciace
120. Evoluce genů, evoluce genomu
121. Vznik a vývoj druhů
122. Evoluce druhu Homo sapiens
123. Cíle a úkoly lékařské genetiky
124. Etické a právní aspekty lékařské genetiky
125. Genetická konzultace a její význam
126. Postnatální skrínink dědičných chorob
127. Prenatální skrínink vývojových vad plodu
128. Prenatální diagnostika chromosomových aberací, možnosti jejich prevence
129. Prenatální diagnostika dědičných chorob, možnosti jejich prevence
130. Prenatální diagnostika vývojových vad, možnosti jejich prevence
131. Prekoncepční prevence dědičných chorob a vývojových vad
132. Postnatální prevence a léčba dědičných chorob
133. Ekologie, ekogenetika
134. Farmakogenetika, nutrigenetika

# 1. Základní zákony genetiky, Mendelovy pokusy

---

- **formální genetik**
  - shrnuje základní **principy dědičnosti**
  - na základě pozorovaného **fenotypu** se usuzuje **genotyp jedince**
  - **základní předpoklady** formální genetiky
    - **diploidie** studovaného organismu (dvě sady chromosomů v jádrech somatických buněk)
    - **lokalizace** studovaného genu na **nepohlavních jaderných chromosomech** (autosomech)
    - **absolutní korelace** mezi formou genu a výsledným znakem (100% penetrance)
- **fenotyp**
  - souhrn všech **pozorovatelných**, popř. **měřitelných znaků** a vlastností jedince
  - **konkrétní forma**, kvantitativní nebo kvalitativní, vyjádření znaku (barva očí, koncentrace cholesterolu v krvi, inteligenční testy apod.)
- **genotyp**
  - **souhrn** všech **genetických charakteristik** jedince (v poslední době nejen lineární sekvence DNA řetězce, ale i metylační vzorce DNA apod.)
  - **konkrétní konstelace obou forem** studovaného genu přítomných na maternálním a paternálním chromosomu **homologního páru** (konkrétní nukleotid na pozorovaném místě genomu, počet opakování repetitivní sekvence, počet kopií genu atd.) – zápis obou alel na homologních chromosomech jedince
- **alela**
  - **konkrétní forma genu** z hlediska studované molekulární variace
  - v systému **dialelním** mohou u daného jedince nastat pouze dvě situace
    - genotyp AA nebo aa – **homozygot**
    - genotyp Aa – **heterozygot**

## Mendelovy pokusy

- Mendel byl původem z Moravy a při studiu prováděl **pokusy s hrachem** (*Pisum sativum*)
- **jeho poznatky** (F1 je uniformní, v F2 dochází ke štěpení) byly známy již dříve, on se ale zabýval **analýzou jednotlivých znaků** (ne komplexních charakteristik jako jeho předchůdci) a dosažené výsledky analyzoval **matematicky** (dříve nevídané v genetických výzkumech)
- soustředil se na **7 znaků**
  - barva a tvar semen
  - barva a tvar lusků
  - barva květu
  - pozice květů a lusků
  - velikost rostlin
- prováděl **semikastrace květů** (odstraněním tyčinek) a semena následně přenášel na květy, se kterými probíhalo křížení, zkoumané rostliny pak chránil **organtýnovým sáčkem** proti nežádoucímu **opylování hmyzem**
- v případě **křížení F1 generace** se nechávaly rostliny křížit **samoopylením**
- někdy potomci sdíleli vlastnosti jednoho ze svých rodičů (**dominantní znak**), někdy sdíleli znak, který se u rodičů nemusel projevit (**recesivní znak**)
- **činitele**, které umožnily vysvětlit tyto účinky Mendel označil jako **dědičné faktory**
- **Mendelovy zákony** byly formulovány až po jeho smrti při znovuobjevení jeho poznatků

## Mendelovy zákony

- u každého **diploidního potomka** se **alelární pár** skládá z jedné alely **otcovské** a jedné alely **mateřské**
- přenos alel na potomky podléhá **základním pravidlům kombinatoriky**
- jako první vyřešil tuto problematiku právě J. G. Mendel
- od něj taktéž pochází kombinační (Mendelovské) čtverce
- jeho poznatky lze shrnout do **3 Mendelových zákonů**

- jsou univerzální, tvoří **základ genetické vědy**
- jsou výsledkem jeho **experimentů** s odrůdami hrachu, pozoroval dvě generace potomstva kříženců
- **1. zákon – uniformity**
  - zákon o uniformitě F1 generace
  - při vzájemném křížení **2 homozygotů** vznikají **potomci** genotypově i fenotypově **jednotní**
  - pokud jde o **2 různé homozygoty**, jsou potomci vždy **heterozygotními hybridy**
- **2. zákon – segregace**
  - zákon o **náhodné segregaci genů** do gamet (zákon o štěpných poměrech v F2 generaci)
  - při křížení **2 heterozygotů** může být potomkovi předána každá ze **dvou alel (dominantní i recesivní)** se stejnou **pravděpodobností**
  - dochází ke genotypovému a tedy i fenotypovému štěpení – **segregaci**
  - pravděpodobnost pro potomka je tedy **25%** (homozygotně dominantní jedinec) : **50%** (heterozygot) : **25%** (homozygotně recesivní jedinec)
  - **genotypový štěpný poměr 1 : 2 : 1**
  - **fenotypový štěpný poměr 3 : 1**
  - pokud je mezi alelami **vztah kodominance**, je **fenotypový štěpný poměr 1 : 2 : 1 = genotypový štěpný poměr**
- **3. zákon – nezávislého výběru**
  - zákon o nezávislé **kombinovatelnosti alel**
  - při zkoumání 2 alel současně dochází k **téže pravidelné generaci**
  - máme-li **2 polyhybridy AaBb** může každý tvořit **4 různé gamety** (AB, Ab, aB, ab)
  - při vzájemném křížení těchto **2 gamet** vzniká **16 různých zygotických kombinací**
  - některé kombinace se opakují – vzniká pouze **9 různých genotypů** (poměr 1 : 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 1 : 2 : 1)
  - **fenotypové projevy** jsou pouze **4**, štěpný poměr je 9 : 3 : 3 : 1
  - tento zákon platí pouze v případě, že **sledované geny** se nachází na **různých chromozomech**
- **hybridizační pokusy**
  - **P generace AA x aa** – vznikají uniformní potomci Aa **F1 generace** (uplatnění **Z1**)
  - **F1 generace** navzájem Aa x Aa – vzniká genotypový poměr 1 : 2 : 1 **F2 generace** (uplatnění **Z2**)
  - **zpětné křížení** je křížení Aa x AA/aa – v zásadě P x F1 – potomci jsou **B nebo Bc** a genotypový poměr je 1 : 1
  - **fenotypové štěpení** je patrné pouze při křížení Aa x aa – tzv. **testovací zpětné křížení (testcross)**
  - pokusy se zapisují do **Punnettova kombinačního čtverce**
- **alelické interakce**
  - **úplná dominance**
    - **fenotyp heterozygota Aa** je stejný jako **fenotyp dominantního homozygota AA**
    - **fenotypový štěpný poměr** v F2 je v tomto případě  $\frac{3}{4}$  dominantních jedinců (AA/Aa) a  $\frac{1}{4}$  recesivních jedinců (aa)
    - **dominance a recesivita** je označení vztahu dvou alel, ale také popis znaku dominantního nebo recesivního
  - **neúplná dominance**
    - **fenotyp heterozygota** je někde mezi fenotypy **obou rodičů**
  - **kodominance**
    - situace, kdy fenotyp **heterozygot** má v sobě **znaky obou rodičů** (např. krevní skupina AB)
    - ve všech případech je **fenotypový štěpný poměr F2** stejný jako **genotypový (1:2:1)**
  - z **fenogenetického hlediska** je dominance a recesivita závislá na **detailním fenotypovém pozorování** – v detailním pozorování se pak **úplná dominance** mění v **neúplnou** a nakonec až v **kodominanci**

## 2. Dihybridismus (polyhybridismus)

---

### Dihybridismus, polyhybridismus

- jedná-li se o **znak determinovaný jedním genem** (lokusem), mluvíme o monohybridismu nebo **monohybridním křížení**
- sledujeme-li současně dva takové **fenotypové znaky**, jedná se o **dihybridismus** (pojem zaveden 1900, de Vries)
- sledování tří znaků je **trihybridismus** apod. – při sledování mnoha znaků se jedná o **polyhybridismus**
- z Mendelových výsledků dihybridních křížení lze odvodit pravidlo o **nezávislé kombinaci vloh** – platí pro geny lokalizované na různých **nepohlavních chromosomech** nebo genech, lokalizovaných na jednom **chromosomu**, leč v dostatečné vzdálenosti, aby se neuplatňovala **genová vazba**
- **dihybridní křížení**
  - pokus je analogický **monohybridismu**
  - **rodičovská generace P** je AABB x aabb nebo AAbb x aaBB
  - P generace odpovídá v obou případech požadavku na křížení dvou různých **homozygotů**
  - **potomstvo F1** je uniformní a vždy se jedná o **dvojnásobné heterozygoty** AaBb
  - v **generaci F2** dochází ke štěpení, kdy při úplné dominanci v obou případech se každý ze znaků štěpí ve **fenotypovém poměru 3 : 1**
  - vzhledem k **nezávislosti genů** je fenotypový štěpný poměr  $(\frac{3}{4} + \frac{1}{4}) \times (\frac{3}{4} + \frac{1}{4}) = \frac{9}{16} + \frac{3}{16} + \frac{3}{16} + \frac{1}{16}$  – dle pravidel o **násobení pravděpodobností** nezávislých náhodných jevů
    - **9/16** jedinců s dominantním fenotypem v obou znacích
    - **3/16** jedinců s recesivním fenotypem pro první znak a dominantním pro druhý
    - **3/16** jedinců s dominantním fenotypem pro první znak a recesivním pro druhý
    - **1/16** jedinců s recesivním fenotypem v obou znacích
  - štěpný poměr **Bc generace** pak bude  $\frac{1}{4} + \frac{1}{4} + \frac{1}{4} + \frac{1}{4}$
- pro sledování **více znaků** je odvození výsledků křížení kombinačním čtvercem možné, ale s přibývajícím počtem znaků **nepraktické** – informace se odvozují matematicky
  - **počet fenotypů** je u úplné dominance **2<sup>n</sup>**
  - **F2 generace**
    - fenotypový **štěpný poměr**  $(\frac{3}{4} + \frac{1}{4})^n$
    - **počet genotypů** je **3<sup>n</sup>**
    - **n** je počet sledovaných znaků
  - **Bc generace**
    - fenotypový **štěpný poměr** je  $(\frac{1}{2} + \frac{1}{2})^n$
- je-li **neúplná dominance**, v F2 generaci se objeví 3 fenotypové projevy – dominantní, **intermediární** a recesivní
- stále se jedná pouze o **model** – v realitě při výsledcích epidemiologických výzkumů nebo při **experimentálním křížení** budou výsledky pouze blízké těm modelovým, s přesností experimentů a měření stoupá i **podobnost výsledků** s modelem

## 3. Aditivní model polygenní dědičnosti

---



## 4. Intrakce nealelních genů

---

### Penetrance a expresivita

- **pravidla fenogenetiky** předpokládají, že genotyp jednoznačně determinuje fenotyp, což zdaleka neplatí pro **všechny dědičné znaky**
- dojde-li k tomu, že u jedinců se stejným genotypem dochází k projevu daného fenotypu jen u některých z nich, mluvíme o **neúplné penetranci**
- **penetrance** dané formy genu
  - **relativní počet** těch jedinců, u kterých je fenotypový znak přítomen
  - kvantifikace **míry shody** mezi genotypem a očekávaným fenotypem
  - u autosomálně dominantně dědičné **polydaktylie** je u člověka mezi 100 Aa nalezeno jen 80 jedinců s touto chorobou – **penetrance** zodpovědné alely je 80%
  - někdy může být penetrance závislá na **věku jedince** – onemocnění s pozdním nástupem např. – klinicky se projevují ve **vysokém věku** (Huntingtonova chorea) – **kumulace toxických metabolitů** nebo snížená schopnost organismu kompenzovat poškození
- v případě, že se **dědičný znak** projeví u jedinců daného genotypu v **nestejně míře**, mluvíme o **různé expresivitě** genu
- **expresivita** dané formy genu
  - závisí na mnoha **faktorech** (ostatní geny, vlivy prostředí apod.)
  - u nositelů alely např. pro **polydaktylii** se nachází různé morfologické odchylky (kožní řasa až plně funkční nadpočetné prsty)
  - expresivita je tedy **míra vyjádření** daného genotypu ve fenotypu jedince

### Fenokopie

- situace, kdy se ve fenotypu **manifestuje znak**, který je typická pro **jiný genotyp**, než má daný jedinec
- znak je vyvolán **vlivy prostředí**, proto není dědičný
- příkladem je **fenylketonurie (PKU)**
  - kdyby **otěhotněla žena, homozygotní** pro daný gen (aa, mutace pro fenylalaninhydroxylasu – PAH), v mládí **úspěšně léčená** pro tuto chorobu, v manželství s **mužem AA**, pak je **dítě heterozygot Aa** – normální fenotyp
  - když žena během těhotenství **nebude držet dietu** pro PKU, bude plod poškozen vysokou **koncentrací phenylalaninu**, resp. jejích metabolitů – bude mít příznaky těžké PKU, aniž by byl **homozygotem** pro mutaci v genu PAH

### Genokopie (heterogenie)

- situace, kdy **stejný fenotypový efekt** vyvolávají **různé geny**
- příkladem je **vrozená hluchota** u člověka
  - typy dědičnosti mohou být **AR, AD nebo GR**
  - manželství dvou osob, které mají vrozenou hluchotu, ale rodič 1 má **genotyp aaBB** a rodič 2 genotyp **AAbb** – jejich dítě je pak dvojnásobný heterozygot AaBb a **slyší normálně**, protože důvodem hluchoty u rodiče 1 bylo aa a u rodiče 2 bb

### Interakce nealelních genů

- na **Mendelovy pokusy** navazoval Correns, De Vries a Tschermak, po dlouhé době se přišlo na **odchylky** od Mendelových i jejich prací - jednou z nich je **interakce nealelních genů**
- za předpokladu, že jeden **fenotypový znak** je podmíněn více geny, dochází k odchylkám ve **štěpných poměrech**
- příkladem je **křížení hrachoru bělokvětého a purpurového**
  - **F1 generace**: květy purpurové
  - **F2 generace**: očekávaný štěpný poměr 3:1 je nahrazen 9:7
  - barva květu hrachoru je totiž **determinována dvěma geny**, kdy pro vznik purpurové barvy je třeba alespoň jedné **dominantní alely** u obou genů



- v F2 tedy nacházíme **purpurovou barvu** pouze u genotypů A-B- a **bílou barvu** naopak pouze u aa--, bb-- nebo aabb
- **fenogenetika** zavedla pro tuto nealelní interakci pojem **epistáze** – nadřazenost určitého genotypu jednoho genu nad genotypy genu druhého
- **epistáze** je cosi jako **dominance** na úrovni **interakcí alelních**
- pojmu **recesivita** odpovídá méně častý pojem **hypostáze**
- příklad hrachoru je podle Snydera příkladem **dvojnásobné recesivní epistáze** – aa je nadřazen jakémukoli genotypu genu B/b a recesivní homozygot bb je nadřazen jakémukoli genotypu genu A/a – je potlačena tvorba anthokyanu v květu
- existuje mnoho případů **nealelních interakcí**, které mají specifické **názvy**
- předpokládá se vždy **úplná dominance 2 alel**, přítomných na 2 genech
- **dominantní epistáze (12:3:1)**
  - nastává, když **dominantní genotyp** jednoho lokusu se realizuje ve výsledném **fenotypu** bez ohledu na genotyp v **lokusu druhém**
  - pouze v případě, že jsou **obě alely** prvního lokusu recesivní (aa--), mohou se fenotypicky uplatnit i alely **druhého lokusu**
- **recesivní epistáze (9:3:4)**
  - uplatňuje se, když **recesivní genotyp** jednoho lokusu se realizuje ve výsledném **fenotypu** bez ohledu na genotyp v **lokusu druhém**
  - pouze v případě, že alespoň **jedna alela** prvního lokusu je **dominantní** (A---), mohou se fenotypicky projevit i alely **druhého lokusu**
- **komplementace / duplicitní recesivní epistáze (9:7)**
  - popisována v případě, že **recesivní homozygotie** v každém z **lokusů** vede ke stejnému fenotypu, takže jedinci aaB-, A-bb a aabb budou **stejní**
  - pokud jsou současně **přítomny dominantní alely** obou lokusů, jejich účinky se komplementují a výsledkem je **odlišný fenotyp**
- **duplicita s kumulativním efektem (9:6:1)**
  - nastává, když každý z **dominantních genotypů** (homozygot nebo heterozygot) zodpovídá za produkci **téhož znaku** (např. tvorbu určitého množství pigmentu)
  - potom u příkladu **pigmentu** aabb neprodukuje žádný, A-bb a aaB- produkují **jednotkové množství** pigmentu a u jedinců s genotypem A-B- se účinek dominantních alel **kumuluje** a dochází k tvorbě **největšího množství pigmentu** (dvou jednotek)
- **duplicita bez kumulativního efektu (15:1)**
  - stav, kdy každý z **dominantních genotypů** vede k manifestaci téhož znaku, aniž by se jejich účinek nějak **kumuloval**
  - fenotypicky se budou odlišovat pouze **dvojitě recesivní homozygoti**, kteří nenesou ani jednu ze **čtyř možných** dominantních alel
- **inhibice / dominantně-recesivní interakce (13:3)**
  - nastává, když **dominantní genotyp** v jednom lokusu a **recesivní genotyp** v druhém mají stejný **výsledný fenotyp**
  - v F2 získáme tedy pouze **2 fenotypové třídy**, např. zastoupené na jedné straně genotypy A-B-, A-bb, aabb a na straně druhé aaB-

## 5. Genová vazba

- výjimka z **klasického dihybridismu** podle Mendela (tj. dvě různé alely dvou genů segregují nezávisle na sobě)
  - toto klasické schéma platí pouze **pro lokusy na různých chromosomech**, pokud však dva lokusy leží **velmi blízko u sebe** na jednom chromosomu, alely těchto dvou lokusů prakticky **vůbec neselegrují** a dědí se jako fixní kombinace neboli **haplotyp**
    - **haplotyp** = kombinace určitých alel dvou nebo více lokusů na jednom chromosomu
    - **syntenní lokusy** = lokusy umístěné na stejném chromosomu

- genotyp pro danou **chromosomální oblast** se pak skládá ze dvou haplotypů - tato situace se nazývá **úplná vazba**
- díky **crossing-overu při meióze** existuje kontinuum mezi těmito dvěma **okrajovými situacemi - neúplná vazba**
  - pozorujeme **4 genotypové a fenotypové skupiny** jako u klasického dihybridismu, ale štěpný poměr již není 1:1:1:1, neboť **množství jedinců** s genotypem vzniklým na základě **crossing-overů** (tj. rekombinantů) je menší než množství jedinců s **parentálními chromosomy** (tj. non-rekombinantů)
  - **obecně**: čím **blíže** leží oba lokusy na chromosomu, tím spíše se budou **dědit spolu** a tím menší bude **množství rekombinantů** - můžeme stanovit genetickou (vazebnou) vzdálenost
  - **genetická (vazebná) vzdálenost** se měří jako rekombinační zlomek ( $\theta$  - theta) = **Morganovo číslo (p)** - tj. podíl rekombinantů v celkovém množství potomků

$$q = \frac{\text{pocet\_rekombinantu}}{\text{pocet\_vsec\_h\_jedincu}}$$

- **jinak také síla vazby** = pravděpodobnost, že mezi dvěma geny téhož chromosomu proběhne crossing-over
- **minimum rekombinačního zlomku** je 0, což značí úplnou vazbu a tím pádem žádné rekombinanty, **maximum** je 0,5=50%, v případě, že jsou sledované geny na různých chromosomech nebo i na stejném chromosomu, ale velmi **daleko** od sebe
  - $\theta=0,5$  je vzdálenost mezi geny dostatečně velká, tím pádem mezi nimi dochází ke **crossing-overu** a výsledkem je stejný poměrem gamet bez rekombinace i s rekombinací
- pro **konstrukci genetických map**, dochází k problémům s použitím **rekombinačního zlomku** jako měřítka vzdálenosti (není aditivní, nereflktuje interakci chiasmat, ...), proto bylo zavedeno mnoho **matematických transformací** rek. zlomku a zavedena jednotka **mapové vzdálenosti** - Morgan (M), respektive častěji centimorgan (1cM=1/100M)
  - pouze pro **malé vazebné vzdálenosti** odpovídá 1cM 1% rekombinací, maximální hodnota  $\theta$  je totiž 0,5 tj 50%, zatímco délka chromosomu po sečtení jednotlivých úseků při genetickém mapování může být i **120 až 150 cM**
- v případě **genetické vazby** může zápis genotypu AaBb znamenat dva různé haplotypy, tj. AB/ab nebo Ab/aB
  - první možnost, kdy jsou **dominantní** respektive **recesivní alely** obou lokusů na témže chromosomu se nazývá **vazba ve fázi cis** neboli coupling
  - druhá možnost, kombinace jedné **dominantní** a jedné **recesivní alely** na jednom chromozomu se nazývá **vazba ve fázi trans** neboli repulsion
  - zapisovat **konkrétní haplotypy** je velmi podstatné pro správné určení, který z potomků je **rekombinant** a který **non-rekombinant**
- **základní představa** o vazbě genů vyplynula z hybridizačních pokusů **W.Batesona** s hrachorem (vycházeli mu jiné štěpné poměry než **předpovídal Mendel**), základní poznatky o vazbě genů zobecnil T.H.Morgan - **Morganovy zákony**
  - geny jsou vždy uloženy v chromosomu **lineárně za sebou**
  - počet **vazbových skupin** genů každého druhu organismu je roven jeho **chromosomovému číslu**, tj. počtu páru homologních chromosomů v diploidním jádře (resp. počtu **chromosomů v jedné sadě**)
  - mezi **geny homologického páru** může prostřednictvím crossing-overu probíhat **genová výměna**. Frekvence crossing-overu je přímo úměrná **vzdálenosti genů**
- pro **stanovení vazby** je velice důležité rozlišit **náhodné fluktuace** frekvence jednotlivých kombinací alel obou genů v **nepřítomnosti vazby** a skutečnou vazbou

- nejčastější metoda se nazývá **LOD skóre** – jedná se o logaritmus o základu 10 poměru mezi **pravděpodobností zjištění pozorovaných dat** (čili počtu rekombinantů a non-rekombinantů) za předpokladu **vazby**, ku **pravděpodobnosti získání stejných dat** u volně **kombinovatelných** lokusů
  - je-li např. **LOD=3**, znamená to, že vazba je 1000x pravděpodobnější než tytéž výsledky **bez vazby**, což se považuje za dostatečné kritérium pro přijetí vazby
  - naopak **LOD=-2** tedy „kurs proti vazbě“ 100:1 je dostatečné kritérium pro **odmítnutí** vazby
- praktické **využití genové vazby** – velmi významná z hlediska diagnostiky:
  - **tvorba genetických map** (tj. map chromosomů založených na pořadí a vzdálenosti **polymorfních markerů** a znaků)
  - klasické využití v medicíně jako **nepřímá DNA diagnostika** – pokud neznáme vlastní genetický defekt, který je podkladem **monogenně podmíněného onemocnění**, nebo pokud v daném genu existuje velké množství **různých mutací**, lze přesto konzultovat rodiny v riziku, pokud známe alespoň přibližně **chromosomální lokalizaci** vlastního **genetického postižení**

## 6. Genotyp a jeho variabilita, mutace a rekombinace

- **genotyp**
  - souhrn všech **charakteristik jedince** (v poslední době byl tento pojem významově rozšířen, takže nezahrnuje jen **lineární sekvenci nukleotidů DNA**, ale i další charakteristiky genomu, jako jsou např. **metylační vzorce DNA** apod.)
  - **konkrétní konstelace** obou forem studovaného genu přítomných na maternálním a paternálním chromosomu **homologního páru** (konkrétní nukleotid na definovaném místě genomu, počet opakování repetitivní sekvence, počet kopií genu atd)
    - v tomto smyslu je genotyp **zápisem obou alel** přítomných na homologních **chromosomech jedince**
    - **alela** = konkrétní forma genu z hlediska studované molekulární variace
    - **polymorfní lokusy** = polymorfismy se v populaci vyskytují nejméně ve dvou alelách, některé mají **fenotypové projevy**, ale všechny jsou v posledku variace na úrovni DNA, v **genotypu**
      - **minimální polymorfismus** je pak polymorfismus v jednom nukleotidu – single nucleotide polymorphism **SNP** (čti snip)
      - technicky považujeme **lokus za polymorfní**, pokud má vzácnější alela ve studované populaci frekvenci **alespoň 1%**, jestliže je frekvence nižší hovoříme o **vzácné alele** nebo se jedná o **mutaci**
      - historicky prvními takovými **polymorfními lokusy** byly krevní skupiny – **vysoce polymorfní proteiny** (MN, Ss, Rh) nebo **sacharidy** (ABO) na buněčné membráně červených krvinek, dále jsou hodně polymorfní např. **HLA antigeny**
  - určuje **míru a rozsah** fenotypických možností jedince
- **sekvence DNA** podléhá změnám, které jsou vyvolány **působením** chemických, fyzikálních a biologických činitelů nebo vznikají jako **vzácné chyby** při replikaci (endogenní mutace) - v důsledku toho vznikají **alelické variace**
  - **některé varianty DNA** se ve fenotypu nemusí projevit, jiné mohou mít vliv na funkci nebo projev znaku v souvislosti s **konkrétním místem**, kde se varianta DNA nachází
  - mutace vzniklé díky **chybě při replikaci** DNA se nazývají mutace **spontánní** (dochází k nim bez zásahu z **vnějšího prostředí**).
    - **DNA polymeráza** je velmi přesná, navíc má samoopravnou funkci - pravděpodobnost takovéto chyby se pohybuje v **řádech asi 10<sup>-7</sup>**
    - četnost těchto mutací je tedy **velice nízká**, navíc buňky jsou do jisté míry schopné tyto chyby díky **reparačním enzymům** likvidovat - většina mutací je tedy tzv.

- indukovaných**, tj. vyvolaných vnějšími mutagenními faktory (mutageny), těmi může být např. **záření** (UV, RTG), **chemické látky** (areny, těžké kovy, peroxidy....)
- podle **rozsahu působení** rozlišujeme mutace
    - **genové (bodové)** – probíhají na úrovni molekuly DNA, postihují jeden gen, výsledkem je **poškozená nukleotidová sekvence**, díky tomu se mění triplet (kodony) a může dojít k chybě v **proteosyntéze** (tj. syntéza jiných AMK)
      - pokud je poškozen gen **regulující množení a diferenciaci buňky**, může to vést až k nekontrolovatelnému bujení (**nádorové onemocnění**)
      - **rozdělení genových mutací z hlediska změn v sekvenci DNA**
        - **substituce** – záměna jednoho nukleotidu za nukleotid nesoucí jinou basi, patří mezi nejčastěji se vyskytující mutace
          - **transice** – záměna purin-purin, pyrimidin-pyrimidin
          - **transverze** – záměna purin – pyrimidin a naopak
        - **delece** – ztráta jednoho nebo více nukleotidů v sekvenci DNA
        - **inserce** – do sekvence DNA je zařazen jeden nebo více nukleotidů
      - rozdělení genových mutací z hlediska **účinku na genový produkt**:
        - mutacím mohou podléhat jak **kódující tak nekódující** sekvence lidského genomu, vážné následky mají převážně mutace týkající se **kódující DNA**
        - **synonymní (tiché)** – nemění sekvenci genového produktu
        - **nesynonymní** – mění sekvenci genového produktu (proteinu nebo RNA) se všemi možnými důsledky
    - **chromosomální (aberrace)** – dochází ke změně počtu nebo struktury chromozomů, např. při **crossing-overu** se chromosomové úlomky špatně spojují, může ale dojít i ke ztrátě **celého bloku**
      - porušují **průběh meiózy** a způsobují nefunkčnost gamet
      - **druhy**:
        - **delece** – ztráta části chromosomu
        - **inverze** – převrácení části chromosomu
        - **duplikace** – zdvojení části chromosomu
        - **translokace** – připojení části chromosomu na chromosom špatný
        - **fragmentace** – rozpad chromosomu na fragmenty
    - **genomové** – dochází ke změně samotného genomu, většinou jde buď o znásobení **celé chromosomové sady** (euploidie = polyploidie, jedinec je  $3n$  nebo i více), nebo ke změně **počtu jednotlivých chromozomů sady** (aneuploidie)
  - mutace můžeme dělit ještě podle **typu postižených buněk** na
    - **somatické mutace** - postihují potomstvo mutované buňky, ale nepřenášejí se mezi jedinci
    - **zárodečné (gametické) mutace** – postihují buňky zárodečné dráhy, mohou se přenášet z rodičů na potomky
- **rekombinace** je označení pro různé změny v DNA spočívající v jejím rozštípnutí a připojení k jinému řetězci, jíž vznikají **nové vlastnosti**
- **meiotická rekombinace** – tj. crossing – over
    - proces během kterého si **dva homologní chromozómy** spárované v profázi I meiózy vymění **část své DNA**, výsledkem správně provedeného crossing-overu je výměna části **alel mezi chromozomy** – tj. narušení vazby genů
    - důsledkem je značné zvýšení **variability potomstva**
      - **crossing-over** je vedle mutací a nahodilého rozchodu chromozómů do gamet, jedním z hlavních zdrojů **genetické variability**, nevytváří sice nové alely, ale umožňuje vytváření **nových kombinací** již existujících alel genů lokalizovaných na **stejném chromosomu** (viz genová vazba)
      - rozlišujeme **jednoduchý crossing-over** (dochází k jednomu překřížení, chromatidy si prohodí konce) a **vícenásobný crossing-over** (několikanásobné překřížení, prohozeny jsou i úseky „uvnitř“ chromatid)

- **vícenásobné crossing-over** narušují výpočty určující sílu vazby a vzdálenost genů na chromosomu – k jejich odfiltrování se používá **tříbodový test**
- **mitotická rekombinace** – velmi vzácná
- **rekombinantní DNA technologie** – postup v genovém inženýrství, při kterém se z buněk izolují jednoduché geny a ty se pak zavádějí zpět do buněk stejného nebo odlišného druhu organismu
  - jedná se o **biotechnologické postupy**, které umožňují vytvářet nové kombinace molekul DNA, které se v přirozeném organismu společně nevyskytují
  - **rekombinantní DNA technologie** se využívá například v genové terapii nebo **genetické modifikaci** (GMO – např. modifikovaná kukuřice nebo sója)

## 7. Genotyp a prostředí

- **soubor všech alel** v organismu nazýváme genotyp, ten zároveň i určuje rozsah či míru **fenotypových možností** organismu; konkrétní fenotyp pak, na základě zděděného genotypu **dotváří prostředí**, ve kterém jedinec žije
  - obecně platí **genotyp + prostředí = fenotyp**
  - znaky **monogenně determinované** (tj. znaky kvalitativní) jsou prostředím mnohem **méně ovlivnitelné**, naopak největší vliv mají faktory prostředí na znaky **polygenně dědičné** (tj. kvantitativní)
    - u **kvantitativních znaků** nás často zajímá, jaké jsou **relativní podíly** dědičné složky a faktorů prostředí na **rozptylu** (varianci) fenotypových hodnot znaku, **relativní podíl** genetických faktorů na celkové varianci znaku pak označujeme jako **heritabilitu (dědivost)**
      - $H^2 = V_G/V_P$ 
        - $V_G$  – variance fenotypu způsobený genetickými faktory
        - $V_P$  – celkový rozptyl hodnoty fenotypu
      - $H^2$  může nabývat teoreticky hodnot **od 0 do 1**, pokud je rovna 0 je variance fenotypu plně závislá na **faktorech prostředí**, při  $H^2=1$  naopak faktory prostředí nemají **žádný vliv** a veškerý pozorovaný rozptyl závisí na **faktorech genetických**
- velká většina medicínsky **významných znaků** je podmíněna jak **složkou genetickou**, tak složkou **prostředí**
- **poměr mezi složkami** je proměnlivý, škála sahá od **přísně geneticky determinovaných** znaků (jedinec s genotypem  $I^A I^A$  bude exprimovat antigen A bez ohledu na působení vnějších faktorů) až po znaky s **minimální genetickou účastí** (dopravní nehoda)
  - ovšem i u některých **monogenních chorob** je zcela zásadní přítomnost určité složky **vnějšího prostředí**, což lze využít i v prevenci a léčbě – vyloučení **fenylalaninu** ze stravy **fenylketonuriků** eliminuje jejich genetickou predispozici
- v interakci **genom-prostředí**, prostředím chápeme **životní správu** a **životní podmínky** jedince v nejširším slova smysl (od intrauterinního prostředí až po sociálně-ekonomický status)
  - obor, který zahrnuje zkoumání **vztahů genomu a prostředí**, se proto nazývá **ekogenetika** (někdy také xenogenetika) případně **ekogenomika**
    - v rámci **ekogenetiky** se časem osamostatnilo několik dílčích oborů, které se liší **dominantním faktorem prostředí**, jehož vliv na člověka je geneticky ovlivněn – **farmakogenetika** (léky), **nutrigenetika** (potravin), **toxikogenetika** (chemikálie) atp.
- studium **interakcí genů** s prostředím samozřejmě vyžaduje dostatek informací o obou **složkách interakce**
  - **genetickou informaci** většinou představují výsledky analýzy nukleových kyselin (sekvence, konkrétní polymorfismy DNA, genealogická analýza)
  - zdrojem **informací o prostředí** a životním stylu bývají buď cílené dotazníky nebo přesnější měření tzv. **biomarkerů expozice** určitým látkám

- nejčastěji testujeme **hypotézu**, jestli je relativní riziko onemocnění při kombinaci **genetické predispozice a expozice faktorům** vnějšího prostředí signifikantně větší (**supermultiplikativní**) nebo menší (**submultiplikativní**), než by se dalo očekávat z prostého **multiplikativního modelu**
- první důkazy pro **interakci genomu a životního stylu** v patogenezi civilizačních chorob (např. obezita), byly podány v tzv. **migračních studiích**, které porovnávají geneticky blízké skupiny (populace), které se liší životním stylem či životosprávou; další důkazy pro význam **genetických faktorů** v reakci na dietu přinesla pak řada **studií dvojčat**

## 8. Dědičnost multifaktoriálních znaků a chorob

- polygenně dědičné znaky nemají **typický rodokmen**
- přesto vzhledem k tomu, že **příbuzné osoby** sdílejí alely společně původem, příbuzní postižené osoby budou mít pravděpodobně **vyšší počet aktivních alel** než osoby nepříbuzné a tím také větší riziko postižení **polygenně děděnou chorobou**
- z tohoto důvodu se i u **polygenně děděných chorob** využívá pro orientační odhad rizika výskytu onemocnění **rodokmenová studie**
- polygenně dědičné choroby u člověka lze zjednodušeně rozdělit podle **frekvence výskytu** v populaci na:
  - **vzácné vady a choroby (populační četnost < 1%)**
    - vrozené vývojové vady (VVV) jako rozštěpy v obličeji (ret, patro)
    - srdeční VVV
    - rozštěpy nervové trubice
    - nesprávný vývoj kyčelního kloubu
    - zúžení jícnu
  - **vady a choroby se střední četností (< 5%)**
    - značná část těžkých duševních onemocnění jako je schizofrenie (rozštěp osobnosti)
    - bipolární psychóza (maniodepresivita)
    - slabomyslnost (oligophrenie)
  - **onemocnění s vysokou populační frekvencí**
    - vysoký krevní tlak (hypertenze)
    - diabetes mellitus typu II
    - obezita
    - vředová choroba zažívacího traktu
    - poruchy imunity – alergie (např. astma, atopie)
- **rizika postižení** pro příbuzné postiženého jdou přímo závislá na:
  - **frekvenci choroby** v populaci
  - **koeficientu příbuznosti** k postiženému
  - **počtu** postižených příbuzných
  - **stupni závažnosti** postižení
  - na **pohlaví** v případě, kdy jsou populační četnosti postižení mužů a žen různé - jestliže má **postižený jedinec** pohlaví, které je v populaci **postiženo vzácněji**, je riziko postižení jeho **příbuzných vyšší**
  - na **faktorech prostředí**
- pro **orientační odhad** výše rizika výskytu choroby se pro příbuzné prvého stupně používá **Edwardsův vzorec** nebo odhad rizika podle tabulky empirických rizik
- **empirická rizika** jsou stanovena na základě analýzy většího **počtu rodokmenů** s danou **klinickou jednotkou** (chorobou)
- **Edwardsův vzorec**
  - **odhad rizika** postižení u příbuzných **postiženého jedince**
  - **riziko postižení  $r = \sqrt{\text{relativní četnost choroby v populaci}}$**
  - vzorec platí pro **příbuzné prvého stupně** (rodiče/děti; sourozenci)

- za předpokladu, že je **postiženo více příbuzných** prvního stupně osoby, pro kterou je počítána prognóza, násobí se výsledek **jejich počtem**
- **obecně platí pravidla**
  - s **vyšším počtem** postižených blízkých příbuzných stoupá **riziko postižení**
  - jsou-li postižení naopak **vzdálení příbuzní**, je vzestup rizika velmi malý
  - jestliže **vada** (choroba) postihuje obě pohlaví v **různé míře**, pak postižení osoby **vzácněji postiženého** pohlaví zvyšuje riziko pro **příbuzné**
  - podobně je-li **stupeň postižení** kvantifikovatelný, je zvýšené riziko v rodinách s těžším průběhem onemocnění
  - **příbuzenské sňatky** zvyšují riziko pro děti v nich narozené
- výhodou **multifaktoriální dědičnosti** je
  - na manifestaci se kromě **faktorů genetických** (polygenní dědičnost) podílejí i faktory **vnějšího prostředí**
  - u polygenně děděných chorob mohou **nepříznivé faktory prostředí** zhoršit manifestaci znaku při **nižších hodnotách** dispozice
  - naopak **zlepšení vnějšího prostředí** může vést k nižší pravděpodobnosti postižení
  - s faktory prostředí na rozdíl od faktorů genetických můžeme **manipulovat** a tak postižení **ovlivnit**

## 9. Dědivost a význam jejího hodnocení v lékařství

- **dědivost** (heritabilita) udává, jak velká část **proměnlivosti znaku** je zapříčiněna genetickými **faktory**
- lze ji vypočítat jako **podíl variace fenotypu** způsobený genetickými faktory ( $V_G$ ) a celkového **rozptylu hodnot** fenotypu ( $V_P$ )
- tento výraz označujeme jako **heritabilitu** v širokém smyslu (broad-sense heritability) – označujeme ji jako  $H^2$ :

$$H^2 = V_G / V_P$$

- $H^2$  může teoreticky nabývat **hodnot 0-1** a lze tak vyčíst vlastnosti **daného znaku**
  - $H^2 = 0$  : variace fenotypu je plně závislá na **faktorech prostředí**
  - $H^2 = 1$  : variace fenotypu je plně závislá na **genetických faktorech**
- mnohdy je pro nás ale podstatnější znát podíl **aditivní složky** na celkové varianci fenotypu – heritabilita v **úzkém smyslu** (narrow-sense heritability) – označujeme ji jako  $h^2$  :

$$h^2 = V_A / V_P$$

- **heritabilitu** lze odhadnout pomocí celé **řady postupů**
  - **eliminace komponent variance** (experimentální genetika)
    - metody **experimentální genetiky** zásadním způsobem napomáhají analýze polygenních a multifaktoriálních **znaků**, protože umožňují minimalizovat nebo dokonce zcela odstranit některé z **komponent**, jež zodpovídají za rozptyl v běžné **lidské populaci**
    - u **savčích modelů** (myš a potkan) lidských onemocnění se často využívají tzv. **inbrední kmeny**, tedy takové, kde opakovaným příbuzenským křížením (**inbreeding**) došlo k **fixaci** prakticky všech alel v **homozygotním stavu** (čistá linie)
    - jedinci **stejného pohlaví**, podobně jako **monozygotická dvojčata**, jsou pak geneticky **identičtí**
    - v tom případě je  $V_G = 0$  a veškerá variance padá na vrub prostředí a tedy  $V_P = V_E$
    - u **experimentů** lze také stabilizovat **vnější podmínky** prostředí, což vede k **minimalizaci**  $V_E$
    - pokud pro **modelované onemocnění** nebo znak vytvoříme **segregující F2 populaci** (intercross) ze dvou **inbredních kmenů**, chovaných ve stejných podmínkách, lze usuzovat na míru **genetické komponenty variance**:

$$V_G(F_2) = V_P(F_2) - V_E(P,F_1)$$

- odečítáme tedy **vliv prostředí**, které je identické pro všechny generace
- **regresní analýza v rodinách**
  - porovnání **hodnoty fenotypu** rodičů a dětí
  - jestliže předpokládáme, že **dědičné faktory** zodpovídají za část rozptylu fenotypu, měli by potomci být **fenotypicky blíže svým rodičům**, než **nepříbuzným jedincům**
  - **fenotypové hodnoty** jsou vyneseny do **grafu** (průměrná hodnota fenotypu rodičů na x a hodnota **průměrného fenotypu potomků** na y – každá rodina je tedy jeden bod)
  - pomocí **lineární regrese** je usuzováno na **míru heritability**, kterou určuje korelační koeficient
- stanovení heritability pomocí **koeficientu příbuznosti**
  - založeno na **premise**, že čím vyšší **koeficient příbuznosti** mají dva lidé, tím více **shodných alel** budou sdílet
  - jestliže mají **genetické faktory** významný vliv na **varianci sledovaného fenotypu**, měli by si tito lidé být **fenotypicky blíže** než např. zcela nepříbuzní jedinci
  - dobře je tento rozdíl ilustrován mezi **monozygotními a dizygotními dvojčaty**
- **podle analýz platí, že koeficient příbuznosti r je:**
  - **rodiče - děti:**  $r = h^2$
  - **rodič - dítě:**  $r = \frac{1}{2} h^2$
  - **sourozenci vlastní** (pro jakékoli dítě daného rodiče):  $r > \frac{1}{2} h^2$
  - **sourozenci nevlastní:**  $r = \frac{1}{4} h^2$
- **význam hodnocení v lékařství**
  - zjištění **genetického podílu** dané choroby a možnosti jejího ovlivnění
  - význam pro **predikci fenotypu** selekční odpovědi

## 10. Multifaktoriálně dědičné znaky u člověka

---

### Polygenní & multifaktoriální dědičnost

- zvláštním případem nealelních interakcí je **polygenní dědičnost**
- ve zjednodušeném modelu se stále uvažuje **velký počet genů**, které podmiňují určitý **fenotypový znak**
- každý z nich sám o sobě má **malý vliv na fenotyp** – minor geny
- **fenotypové znaky** polygenně determinované bývají obvykle **měřitelné** (kvantitativní, např. výška) – pro **polygenní dědičnost** se někdy používá také termínu **kvantitativní genetika**
- v patogenezi většiny **běžných chorob** (hypertenze, obezita, onkologická, neurologická a psychiatrická onemocnění) se ale oproti zjednodušenému modelu **polygenní dědičnosti** předpokládá tzv. **multifaktoriální dědičnost**, která je založena na interakci **genů velkého účinku** (major geny) s **polygenním systémem** (tzv. genetické pozadí)
- tato multifaktoriální dědičnost je navíc **modulována** různě **intenzivním působením faktorů vnějšího prostředí**

### Zjednodušený model polygenní dědičnosti

- **zjednodušené modely** předpokládají
  - **alelní interakci** typu **semidominance** (hodnota fenotypu heterozygota odpovídá průměru hodnot fenotypu **parentální generace**)



- **nealelní interakci** označovanou jako **aditivita** (kumulativnost), tedy že účinky jednotlivých alel se **sčítají** (konvenčně se označují alely zvyšující hodnoty daného fenotypu jako aktivní – velká písmena)
- obvykle geny jednoho **polygenního systému** znázorňujeme písmenem ze začátku abecedy a jednotlivé geny odlišujeme **číselným suffixem**
- z **fenogenetického hlediska** nelze většinou na základě pozorované **fenotypové hodnoty** usuzovat na genotyp, lze ale do jisté míry **odhadnout počet aktivních alel** (např.  $A_1A_1a_2a_2$ ,  $A_1a_1A_2a_2$  a  $a_1a_1A_2A_2$  mají stejnou **fenotypovou hodnotu**, protože tu vždy jsou **dvě aktivní alely**)
- hodnota **polygenně determinovaných fenotypových znaků** bývá obvykle ovlivněna do určité míry faktory vnějšího prostředí – **faktory negenetické**
- metodicky se v kvantitativní genetice používá řada **specializovaných postupů** genetické statistiky
  - zajímá nás, jaké jsou **relativní podíly** dědičné složky a faktorů prostředí na **rozptylu** (varianci) fenotypových hodnot znaku
  - **relativní podíl genetických faktorů** na celkové varianci znaku pak označujeme jako **heritabilitu** (dědivost)
- **hypotetický příklad dědičnosti výšky**
  - **parentální generace** je tvořena dvěma čistými liniemi o výšce 200 a 100 cm
  - **průměrná výška F1 generace** odpovídá průměru – 150 cm a neliší se příliš ani variační šíří (statistická veličina **rozptyl** – variance)
  - **u F2 generace** nacházíme též jedince o výšce 150 cm, ale variance je **značně větší** – způsobeno segregací a následným ustavením **jedinečné kombinace** aktivních i neaktivních parentálních alel v genomu jedinců **F2 generace**
- **rozptyl vypočítáme podle vzorce**

$$V = (N-1)^{-1} \sum (x_i - \bar{X})^2$$

N..... počet pozorování

$x_i$  .... hodnota pozorování i-tého jedince

$\bar{X}$ ..... aritmetický průměr všech pozorování

- jedná se tedy o **průměr součtu čtverců** odchylek jednotlivých pozorování od jejich aritmetického průměru

- v kvantitativní genetice je **rozptyl fenotypových hodnot** dán

$$V_P = V_G + V_E + V_{GE}$$

$V_P$  .... fenotypový rozptyl

$V_G$  .... rozptyl fenotypu vyvolaný genetickými faktory – rozdíly v genotypu jedinců dané skupiny/populace

$V_E$  .... rozptyl fenotypu daný faktory vnějšího prostředí (teplota, kalorický příjem, expozice slunečnímu záření, sociálně ekonomické postavení + prakticky všechny nedědičné vlivy)

$V_{GE}$  ... rozptyl fenotypu závislý na interakci genotypu a prostředí

- **rozptyl fenotypu** vyvolaný genetickými faktory zahrnuje ještě **další vlivy**

$$V_G = V_A + V_D + V_I$$

$V_A$  ... aditivní účinek genu, kdy výsledný efekt odpovídá součtu působení jednotlivých aktivních alel

$V_D$  ... rozptyl fenotypu vyvolaný působením dominance – není aditivní a účinek dané alely závisí na typu alely na homologním chromosomu

$V_I$  ... složka genetických nealelních interakcí (epistáze)

- v **polygenním systému** se tedy variance vyjadřuje jako

$$V_P = V_A + V_D + V_I + V_E + V_{GE}$$

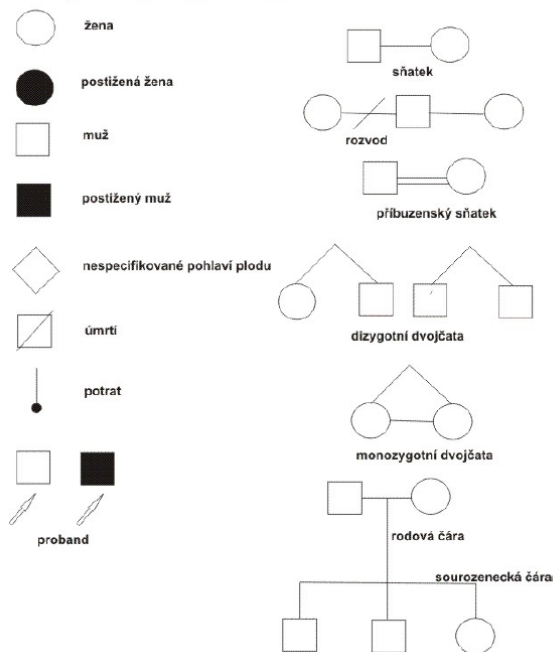
### Polygenní dědičnost s prahovým efektem

- vzhledem k tomu, že zvláště v **klinické genetice** se objevuje řada **kvantitativních znaků** (přítomnost choroby nebo vývojové vady nebo její nepřítomnost), které se jeví jako **dědičné**, ale typ přenosu neodpovídá žádnému **typu monogenní dědičnosti**, zavedl Falconer model **polygenní dědičnosti s prahovým efektem**
- dědí se tu **dispozice** k dané chorobě a to polygenně
- tato **dispozice** má v populaci **normální rozložení četností** a dosáhne-li množství **aktivních alel** v genotypu jedince **určitého počtu** – prahu, choroba (vrozená vada) se objeví (manifestuje) ve **fenotypu**
- poloha prahu je ovlivňována **faktory prostředí** – zvyšují ji i snižují

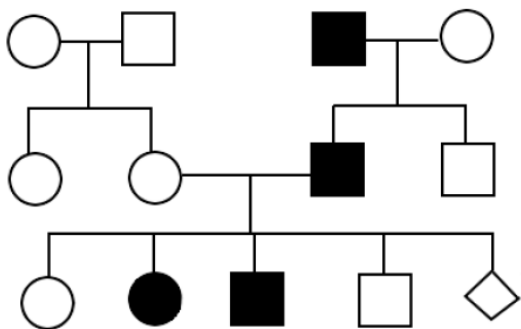
## 11. Genealogická metoda

- člověk není z **hlediska genetiky** organismem ničím **výjimečným**, proto poskytuje mnohostranný **zdroj informací** pro zkoumání dědičnosti
- sledování **dědičných zákonitostí** u člověka však pro genetiku představuje též řadu **objektivních potíží**
  - z **etických důvodů** nelze aplikovat základní metodu experimentální genetiky **-hybridizační pokus**
  - lidé jsou relativně **dlohověcí**, věk **pozorovaného jedince** je přibližně stejně dlouhý jako **věk pozorovatele**, z tohoto důvodu je možné obvykle sledovat přímo u rodin pouze **3 generace**
  - počet potomků v jedné rodině je z **genetického hlediska** nízký
- z těchto důvodů se v **genetice člověka** používá jako základní **metoda genealogie** nauka o **rodokmenech**
- genealogie může sloužit jak k **pochopení genetických zákonitostí** přenosu určitého znaku, tak pro **praktické aplikace** v oblasti **poradenské činnosti** v klinické genetice
- výzkumná **metoda** spočívá ve sledování z genetického pohledu **vhodných rodin**
- osoba, která vedla k **výběru rodiny** se označuje jako **proband**
  - proband může být jak **postižený pacient**, tak jedinec z rodiny s **možnou dědičnou zátěží**
- **rodinná anamnéza** je konzultována v genetické poradně s **klinickým genetikem**
- údaje se zaznamenávají **graficky formou** genealogického **schématu** a doplněny tzv. legendou
- **genealogické schéma**
  - pro sestavování **genealogických schémat** (rodokmenů) se používají standardizované **značky**
  - je možné tu **graficky** zachytit jeden, nejvíce několik **málo znaků**, aby nebyla porušena **názornost** této metody
  - další údaje je třeba zaznamenat do **legendy**
  - metoda požaduje, aby **získané údaje** byly co nejhlubší – až k **nejvzdálenějším předkům** a co nejširší – zahrnující i **vzdálené příbuzné**
  - z **praktického hlediska** tomuto požadavku ale **neodpovídá** požadavek na naprostou **objektivnost údajů**

Vybrané symboly potřebné pro sestavení rodokmenu



- objektivita je největší v případě **vyšetření všech členů rodiny** jedním odborníkem, o něco horší je objektivita při vyšetření **odborníky různými** a nejméně spolehlivé jsou **anamnestické laické údaje**



- získaný **genealogický materiál** je pak podroben **logické analýze**
- v případě, že se **sledovaný znak** v populaci objevuje **vzácně** (většina jednoduše dědičných chorob), mívají genealogická schémata podobu **typického rodokmenu**

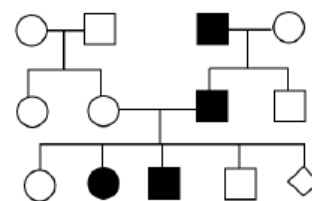
- **genealogická analýza**
  - pro zkoumání typu **genetické determinace** (monogenní vs. polygenní dědičnost)

byla vyvinuta řada **statistických metod**, které umožňují zjišťování **štěpných poměrů**, **penetrance** sledovaného genu a odhady **heritability**

- důležitou úlohu má způsob **výběru rodin** do souboru
  - optimální je **namátkový výběr** ze souboru všech rodin populace
  - tato metoda je možná pouze u **vysoce polymorfních znaků**
- u **monogenně děděných vzácných znaků** jsme obvykle odkázáni na **výběr rodin**, kdy:
  - (i) v případě **dominantních znaků** můžeme vybírat prostřednictvím **postiženého rodiče** (nejčastěji heterozygot)
  - v případě (ii) **autosomálně recesivně děděných znaků** je většina **rodičů klinicky zdravá** (heterozygoti), takže vybíráme pouze ty **rodiny**, kde se narodilo alespoň jedno **postižené dítě** (recesivní homozygot)
  - v takovém případě ale **vynecháváme ty rodiny**, kde se postižené dítě náhodou nenarodilo ani jedno – výběr je tedy **neúplný**
- k těmto skutečnostem je třeba přihlížet při **zpracovávání materiálu**
- současné znalosti o **genetické podstatě** mnoha znaků spolu s moderními statistickými zpracováními **genealogického materiálu** umožňují rozhodovat o typu jejich **genetické determinace**

## 12. Autosomálně dominantní dědičnost v pokusu a v rodokmenu, příklady znaků u člověka

- **základní charakteristika**
  - týká se genů umístěných na **nepohlavních chromosomech** – autosomech
  - sledujeme znak podmíněný **dominantní alelou** genu
  - fenotypově se znak objevuje jak u **heterozygotů** (Aa), tak u **dominantních homozygotů** (AA)
  - v případě **neúplné dominance** mají **heterozygoti** (Aa) méně závažné **fenotypové projevy** než **dominantní homozygoti** (AA), u kterých se příslušná choroba projeví velmi těžkou formou
  - **fenotypově zdraví** jedinci (recesivní homozygoti, aa) nepřenáší mutaci do **dalších generací**
- **genealogická charakteristika**
  - postižení jsou stejně často **muži i ženy**
  - onemocnění se většinou (při **úplné penetranci** genu) vyskytuje v **každé generaci** (vertikální typ výskytu)
  - je pozorován i **přenos z otce na syna**
- **výpočet rizika**
  - při křížení dvou **heterozygotů** (Aa) je tříčtvrtinová pravděpodobnost (75%) narození **postiženého potomka** (ve 25% případů dominantní homozygot)
  - při křížení **recesivního homozygota** (aa) s **heterozygotem** (Aa) je poloviční (50%) pravděpodobnost narození

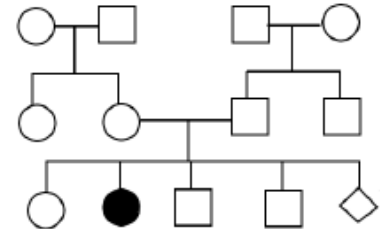


Příklad rodokmenu rodiny s autosomálně dominantně děděným znakem

- postiženého potomka (Aa)
- **riziko** pro další dítě je 50%
- pro **zdravého jedince** je riziko postižení dětí nulové
- **odchytky**
  - **sporadické případy** – mutace de novo (nová mutace) – časté např. u achondroplasie
  - **neúplná penetrance** (alela se fenotypově projeví u **menšího počtu nositelů** než bychom očekávali)
  - **variabilní expresivita** (variabilní stupeň manifestace znaku)
  - důsledek působení **vnějšího prostředí** nebo dalších **genů**
  - onemocnění s **pozdním nástupem** – polycystická choroba ledvin, Huntingtonova chorea
  - **mozaicismus** zárodečných buněk
  - **nonpaternita**
- **typické AD choroby**
  - **chondrodystrofie**
    - jeden typ trpasličího vzrůstu
  - **achondroplasie**
    - často u zdravých rodičů, staršího otce
    - mutace adenosinu a guaninu u otce, aktivace určitého receptoru
    - předčasná ossifikace dlouhých kostí
  - **otosklerosa**
    - porucha sluchu
  - **polycystická choroba ledvin**
    - dospělého typu
    - 1 : 1000
  - **brachydaktylie**
    - AD krátkoprstost – u člověka
  - **polydaktylie**
    - jeden typ víceprstosti
  - hereditární typ **polypózy** tlustého střeva
  - **hyperlipoproteinémie**
    - AD typ poruchy metabolismu lipidů
  - **Huntingtonova chorea**
    - neurodegenerativní onemocnění
    - 1 : 10 000 – 20 000
  - **familiární hypercholesterolemie**
    - zužují se cévy
    - lymfocyty pohltní **cholesterol** a hromadí se v podobě tzv. pěnových buněk
    - 1 : 500
  - **myotonická dystrofie**
    - myotonie, svalová dystrofie
    - katarakta
    - hypogonadismus
    - čelní pleš
    - změny v EKG
  - **neurofibromatosa**
    - 1 : 3 500
  - **osteogenesis imperfecta**
  - **Apertův syndrom**
  - **Marfanův syndrom**

## 13. Autosomálně recesivní dědičnost v pokusu a v rodokmenu, příklady znaků u člověka

- **základní charakteristika**
  - týká se genů umístěných na **nepohlavních chromosomech** – autosomech
  - sledujeme přenos znaku podmíněného **recesivní alelou**
  - fenotypově se znak projeví pouze u recesivních homozygotů (aa)
  - **heterozygoti** (Aa) jsou bez **klinického projevu**, nelze je fenotypově odlišit od **dominantních homozygotů** (AA)
  - **složený heterozygot** pro 2 různé mutace (obě alely jsou mutované, každá ovšem jinak) fenotypově je **recesivní homozygot** (aa)
- **genealogická charakteristika**
  - **obě pohlaví** jsou postižena stejně často
  - typicky je to **horizontální typ dědičnosti** – rodiče jsou obvykle zdraví (heterozygoti Aa, přenašeči), nemoc se projevuje u **potomků** (výskyt nemoci „ob generací“)
  - eventuálně může být postižen **sourozenc** některého z rodičů
  - obecně se zvyšuje **pravděpodobnost projevu** choroby u **příbuzenských sňatků**
- **výpočet rizika**
  - při křížení **dvou heterozygotů** (Aa) je čtvrtinová pravděpodobnost (25%) narození postiženého potomka (aa)
  - riziko pro **sourozence postiženého** je 25%
  - riziko pro **děti postiženého** závisí na četnosti choroby v populaci
  - při křížení **recesivního homozygota** (aa) s **heterozygotem** (Aa) je poloviční (50%) pravděpodobnost narození postiženého potomka (aa)
- **odchyly**
  - **genetická heterogenita**
  - **albinismus**
    - podmíněn různými geny
    - potomek dvou recesivních homozygotů může být v některých případech **pigmentovaný**
  - **hluchoněmost**
    - podmíněna 10 různými geny, neplést ovšem s **polygenní dědičností**
    - potomek dvou hluchoněmých může rovněž normálně slyšet
  - **pseudodominance**
- **typické AR choroby**
  - **cystická fibrosa**
    - pankreatu
    - mukoviscidosa
    - v plicích hustý hlen, opakované těžké infekce
    - poruchy trávení
    - mutace – delece v pozici 508
    - dožití 30 let
    - 1 : 2 500
  - **fenylketonurie (PKU)**
    - defekt enzymu **fenylalaninhydrogenasy**, která mění Phe na tyrosin
    - vysoká hladina Phe způsobuje **defekty CNS**, provádí se testy už v porodnici
    - málo **tyrosinu** = málo melaninu (světlost)
    - provádí se test z paty pár dní po porodu
    - 1 : 10 000
  - **galaktosémie**



Příklad rodokmenu rodiny s autosomálně recesivně děděným znakem

- **Wilsonova** choroba
- **kongenitální adrenální hyperplasie (CAH)**
- **Friedreichova** ataxie
- **glykogenosy**
- syndrom **Hurleyové**
- srpkovitá **anemie**
  - subtropy, tropy
  - tam kde je malárie
  - S hemoglobin – ucpávají se kapiláry
  - malá životnost
  - u heterozygotů je krev smíšená
- **Tayova-Sachsova** choroba
- **thalasémie**
- **Werdnigova-Hoffmannova** choroba
- **androgenitální syndrom**
  - jakoby obojetný genitál

## 14. Dědičnost pohlavně vázaná v pokusu a rodokmenu, příklady znaků u člověka

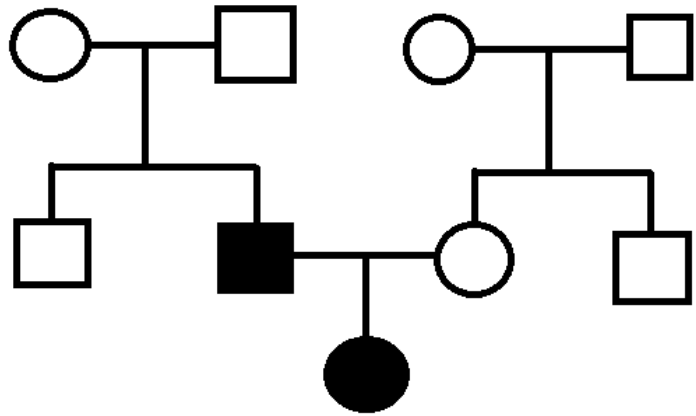
### Dědičnost pohlavně vázaná

- jedná se principiálně o **odchylku** od Mendelových zákonů
- sledovaný **gen** není lokalizován na autosomu, ale na **gonosomu**
- **lokalizace na X chromosomu**
  - v případě lokalizace tohoto genu na **nehomologní části chromosomu X** hovoříme o dědičnosti **pohlavně vázané** nebo o gonosomální dědičnosti (GD, GR)
  - muži jsou pro tyto geny **hemizygoti** a v případě recesivních genů se u nich potom projevuje **pseudodominance**
  - **pseudodominance**
    - fenotypový projev jedné **recesivní alely**
    - je vyvolána tím, že alela nemá na **druhém heterochromosomu** odpovídající lokus
  - po formální stránce je vhodné úlohy na **gonosomální dědičnost** řešit pomocí znaků X Y s **indexy přítomných alel**
  - příkladem těchto dědičností je např. **hemofilie, daltonismus** nebo **muskulární dystrofie**
- **lyonizace**
  - změny na **chromosomech X**, z nichž jeden je **inaktivní** – geny se neprojeví ve fenotypu
  - **inaktivace** probíhá v průběhu **embryonálního vývoje** – je náhodné, který z X chromosomů bude **inaktivní**
  - výsledný fenotyp heterozygotky tedy do jisté míry závisí na tom, jak **lyonizace proběhla** (částečný projev choroby u přenašeček)
- **lokalizace na Y chromosomu**
  - v případě lokalizace zkoumané alely na **nehomologní části chromosomu Y** se znak vyskytuje pouze u **jedinců mužského pohlaví** a všichni synové mají znak shodný s otcem – **holandrická dědičnost** (po meči)
  - z hlediska **lékařské genetiky** není tato dědičnost příliš významná, nicméně **polymorfismy** na chromosomu Y jsou účinným nástrojem **genetické epidemiologie** a forenzní genetiky
  - chromosom Y je **akrocentrický** – centromera je blízko konci – nejmenší chromosom v lidském **karyotypu**
  - oblast pro **determinaci mužského pohlaví** je na krátkých raménkách – v její blízkosti leží oblast SRY – je odpovědná za **determinaci pohlaví**, resp. spermatogenezi

- v případě lokalizace genu na **homologní části** heterochromosomu hovoříme o **neúplně pohlavně vázané dědičnosti**

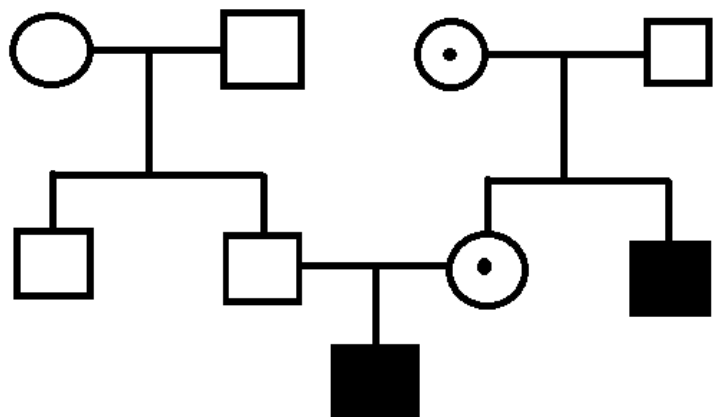
- **gonosomálně dominantní onemocnění (GD)**

- v populaci jsou dvakrát častěji postiženy **ženy než muži** (dva X chromosomy)
- postižený jedinec má alespoň **jednoho rodiče** postiženého – vertikální typ přenosu
- **heterozygotní žena** má s 50% rizikem postižené syny i dcery
- **postižený muž** má postižené všechny dcery a synové jsou zdraví (mají od něj Y)
- **D-vitamin rezistentní rachitis**
  - porucha metabolismu vápníku vedoucí ke křivici
  - lze ji léčit jen neobvykle vysokými **dávkami** vitamínu D
- **incontinentia pigmenti**



- **gonosomálně recesivní onemocnění (GR)**

- u vzácných chorob, postižení v podstatě jen **muži**
- **ženy** (heterozygoti) jsou **přenašečky** choroby
- typický rodokmen GR jeví charakteristické **přeskokování jedné generace**, tzn. že postižený muž má všechny **dcery přenašečky** (zdravé heterozygoty) a všechny syny zdravé (získávají od otce Y)
- **synové** ženy přenašečky mají 50% riziko postižení
- **hemofilie A a B**
  - dědičná krvácivost vyvolaná poruchou tvorby faktorů pro srážení krve
- **daltonismus**
  - poruchy rozeznávání barev
- **Duchennova muskulární dystrofie**
  - okolo 4-5 roku začínají potíže s pohybem
  - svalová ochablost
  - po 20 roce selhávají dýchací cesty a srdeční sval



### Mitochondriální dědičnost

- **mitochondriální DNA (mtDNA)** je předávána další generaci **výhradně matkou** (matroklinní dědičnost) – po oplodnění vajíčka jsou zachovány pouze **mitochondrie oocyty**
- patrně se nejedná pouze o důsledek mnohem vyššího **počtu mitochondrií** v oocyty (100 000) než ve spermii (50-70), ale o důsledek aktivního procesu likvidace **paternálních mitochondrií** po oplození
- tomuto přenosu odpovídá i **přenos chorob**, způsobených mutacemi mtDNA v rodokmenu
- vzhledem k velkému **počtu mitochondrií** v jedné buňce bývá často mutace přítomna pouze u části mitochondrií – tzv. **heteroplazmie**
- pokud je **heteroplazmická mutace** zděděna, nebo k ní dojde během časného období **embryogeneze**, normální i mutovaná varianta jsou náhodně předávány při buněčném dělení **dceřinným buňkám**

(mitosa i meiosa) – přítomnost mutace v buňkách určitých orgánů je tedy patrně závislá na čase a vzniku mutace a rovněž na typu **postižené buňky**

- ne všechna onemocnění, způsobena **dysfunkcí mitochondrií**, jsou způsobena touto dědičností – některé proteiny kupříkladu mohou být kódovány jak **mtDNA** tak **jadernou DNA**
- u některých chorob je proto nutné uvažovat o **Mendelovské** i o **mitochondriální dědičnosti**
  - maternální typ dědičnosti
  - prahový efekt
    - díky **mitotické a meiotické segregaci** nacházíme různý stupeň postižení v různých tkáních a **variabilní projevy** u potomků v jedné mateřské linii, což souvisí s efektem tzv. **prahového efektu**
    - pro **manifestaci dysfunkce** je potřeba překročit prahový **poměr mitochondrií s mutovanou DNA** a mitochondrií **zdravých** – většinou 60-90%
  - projevy **poruchy OXPHOS** (oxidativní fosforylace)
    - **mitochondriální poruchy** často postihují tkáně s vysokými energetickými nároky – **neuromuskulární orgány, CNS**
    - **běžné mitochondriální choroby** jsou encephalopatie, ataxie, spasticita, kardiomyopatie, hluchota nebo diabetes mellitus

### Imprinting

- **genomický imprinting** je proces, kdy je aktivita určitého genu regulována v závislosti na tom, od kterého rodiče byl **gen zděděn**
- ve většině případů to znamená, že pouze **maternální** nebo **paternální alela** je exprimována (je aktivní), kdežto druhá je **utlumena**
- většina studií pochází od myši – pokud jeden **celý pár chromosomů** pocházel od jednoho rodiče (**uniparentální disomie**), byly často popisovány poruchy vývoje nebo různá **onemocnění**
- u člověka je v současné době známo asi **80 imprintovaných genů** a jejich počet stále narůstá
- většinou se nejedná o **izolované geny**, ale shlukují se do celých chromosomálních oblastí s **imprintovanými geny**, kde je lze snadněji lokalizovat
- onemocnění, která vznikají na základě **poruch imprintingu** jsou obvykle zapříčiněna **abnormalitou** na molekulární úrovni – **mikrodelece**, bodové mutace či uniparentální disomie
  - **syndrom Prader-Williho**
  - **syndrom Angelmannův**
  - **syndrom Beckwith-Wiedemann**
  - **syndrom Silver-Russell**
  - **transientní novorozenecký diabetes mellitus**

## 15. Dvojčata a dvojčecí metoda

- zvláštní **genealogickou metodou**, která je do značné míry **specifická pro genetiku člověka**, je zkoumání **dvojčat**
- pomáhá zkoumat **genetickou složku** znaku a podíl **vnějšího prostředí** na jeho realizaci
- uplatňuje se jak při sledování **monogenně dědičných znaků**, tak při zkoumání znaků **polygenně děděných**
- dvojčata se dělí na
  - **dizigotní (DZ)**
    - dvouvaječná, fraternální
    - vznikají oplozením **dvou vajíček** (každého jednou spermií)
    - takto vzniklí jedinci jsou z **genetického hlediska** ve stejném příbuzenském vztahu jako **normální sourozenci** (koeficient příbuznosti  $r = 0,5$ )
  - **monozygotní (MZ)**
    - jednovaječná, identická
    - vznikají rozdělením **jedné zygoty** v časných stádiích **ontogeneze**



- z genetického hlediska mají takoví jedinci stejnou **genetickou výbavu** (koeficient příbuznosti  $r = 1$ )
- jejich **epigenetická výbava** (např. metylace DNA) není zcela identická a tento rozdíl se v průběhu života dále prohlubuje
- **dvojčecí metoda**
  - geminologická metoda
  - metoda do značné míry **specifická** pro genetiku člověka
  - v případě **alternativních znaků** se opírá o **zjišťování konkordance** (shodnosti) a **diskonkordance** (rozdílnosti) mezi členy dvojčecího páru a o zastoupení konkordantních a diskonkordantních párů pro zkoumaný znak v populaci
  - **prvním krokem** je stanovení tzv. **zygozity dvojčecího páru**
    - rozdělit **soubor dvojčat** na skupinu MZ a DZ párů
    - pokud jsou k dispozici **porodnické údaje**, je možné z těchto vycházet, v ostatních případech je možné vycházet z toho, že **členové MZ páru** musí být konkordantní ve všech **geneticky determinovaných znacích**, jako jsou např. krevní skupiny
    - při dostatečném počtu takových znaků lze **zygozitu** určit poměrně spolehlivě
  - **Weinbergova metoda**
    - stanovuje tzv. **apriorní pravděpodobnost** zygozity
    - používaným fenotypovým znakem je zde **pohlaví**
    - všechny MZ páry musí být stejného pohlaví
    - předpokládáme-li, že **pravděpodobnost** narození chlapce je stejná jako narození dívky, pak **diskonkordantní páry** z hlediska pohlaví představují polovinu počtu **DZ párů**:  
chlapec, chlapec : dívka, dívka; dívka, chlapec : chlapec, dívka
    - pak **dvojnásobek počtu** diskonkordantních párů je celkový počet DZ dvojčat v souboru, zbývající **konkordantní páry** jsou dvojčata MZ
    - po rozdělení **souboru dvojčat** na soubor DZ a MZ lze porovnávat mezi těmito soubory zastoupení konkordantních, resp. diskonkordantních párů pro **daný znak**
  - je-li např. v **souboru MZ** mnohonásobně vyšší podíl **konkordantních párů** než v souboru **DZ dvojčat**, lze usuzovat na **monogenní determinaci** daného znaku
  - **variabilita** ve fenotypovém projevu určitého znaku v souboru MZ ukazuje na modifikaci např. vlivy **vnějšího prostředí**
  - pro hodnocení výsledků **dvojčecích studií** existuje řada statistických postupů – mezi klasické patří **Holzingerova H statistika**

$$H = KMZ - KDZ/1 - KDZ$$

KMZ .... relativní zastoupení konkordantních párů ve skupině MZ dvojčat

KDZ .... relativní zastoupení konkordantních párů ve skupině DZ dvojčat

- **dvojčecí metoda** má také značné uplatnění při dědičnosti kvantitativních znaků člověka – vhodné statistické postupy umožňují odhady **heritability** u multifaktoriálně podmíněných znaků

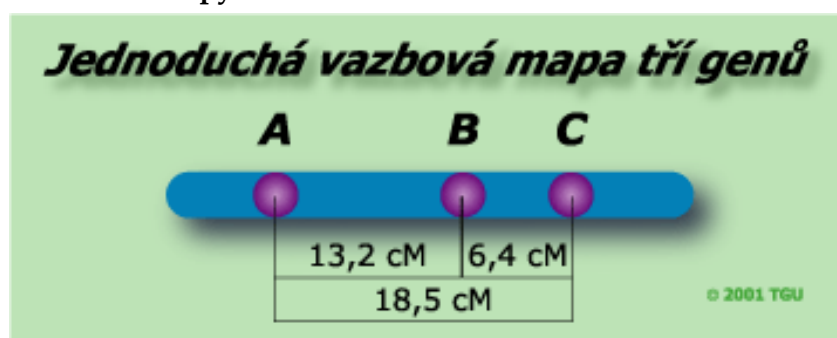
## 16. Genetické metody vazbové analýzy

- **genová vazba** je jednou z výjimek z **Mendelovských zákonů**
- **jednotlivé lokusy** jsou na chromosomech spořádány lineárně za sebou a každý chromosom tvoří **vazebnou skupinu**, tzn. geny na něm se dědí společně
- vazba může být **úplná** (nedochází k rekombinaci), anebo **neúplná** (max. 50cM), kdy může docházet k **rekombinaci** s pravděpodobností, kterou můžeme vyjádřit pomocí rekombinačního **zlomku**
- vazba je v genetice využívána v **mapování či diagnostice**
- **genetické mapování** – cílem je určit pořadí genů a jejich vzdálenosti v **centimorganech** na chromozomech

- pro stanovení **pořadí a vzdálenosti genů** na chromosomech se využívá zákonů genové vazby a **tříbodového pokusu**
- **tříbodový test** – současně sledujeme dílčí vazbové vztahy (rekombinační frekvence) 3 různých genů, např. A, B, C

$$\frac{ABC}{abc} \cdot \frac{abc}{abc}$$

- **postup vyhodnocení tříbodového testu**
  - **určíme rodičovské genotypy**
    - jsou to vždy ty, s největší **frekvencí**
    - zde se jedná o genotypy ABC a abc
  - **určíme pořadí genů**
    - vycházíme ze znalosti **dvojitého crossing-overu**, který určíme z nejnižší frekvence genotypů - zde AbC a aBc
    - je nutné si uvědomit, že dvojitý crossing-over přesune **prostřední alelu** mezi nesesterskými chromatidami
    - můžeme vidět, že gen B musí být **uprostřed**, protože recesivní alela b je nyní na stejném chromozomu jako alely A a C a dominantní alela B je na **stejném chromozomu** jako recesivní alely a a c
    - **pořadí genů** na chromozomu je ABC
  - **určíme vazbové vzdálenosti mezi geny**
    - určíme vazbové vzdálenosti mezi **geny A-C a C-B**
    - vazba se vypočítá jako **podíl celkového počtu rekombinantních gamet k celkovému počtu gamet** (~ Morganovo číslo p)
    - je třeba vzít v úvahu **dvojitý crossing-over**
    - do obou výpočtů vzdálenosti se proto začlení jeho **hodnota**
      - **A-B vzdálenost:**  $(89+94+3+5)/1448 = 0,1319 \sim 13,19 \text{ cM}$
      - **B-C vzdálenost:**  $(45+40+3+5)/1448 = 0,0642 \sim 6,42 \text{ cM}$
      - jestliže je správné **konstatování**, že překřížení je funkcí vzdálenosti mezi geny, pak můžeme stanovit **mezi geny A a C**, jako součet dvou **frekvencí jednoduchých c.o.**:  $13,19 + 6,42 = 19,61 \text{ cM}$
      - v daném případě však **celkový počet** jednotlivých c.o. mezi geny A a C činí  $(89+94+45+40)/1448 = 0,1851 \sim 18,51 \text{ cM}$
      - **vzdálenost mezi geny A a C** vyjádřena součtem jednotlivých c.o. je větší o 1,1 cM než celá vzdálenost A-C
      - určení vzdálenosti mezi geny **A a C**:  $18,51 + 2 \times 0,55 = 19,61 \text{ cM}$
      - **zdvojení procenta** dvojitých c.o. je nutné proto, že každý dvojitý c.o. vzniká na základě dvou **nezávislých jednoduchých zlomů** ve dvou bodech
  - **nakreslení mapy**



Gamety F <sub>1</sub>	Genotypy zygot	Počet jedinců	Počet jedinců
-----------------------	----------------	---------------	---------------

1. .			v %
2. ABC nerekombinované (rodičovské) abc	$\frac{ABC}{abc}$ $\frac{abc}{abc}$	580 592 celkem 1172	80,94
AB / c jednoduchý c.-o. mezi B a C ab / C	$\frac{ABc}{abc}$ $\frac{abC}{abc}$	45 40 celkem 85	5,87
A / bc jednoduchý c.-o. mezi A a B a / BC	$\frac{Abc}{abc}$ $\frac{aBC}{abc}$	89 94 celkem 183	12,64
A / b / C dvojitý c.-o. a / B / c	$\frac{AbC}{abc}$ $\frac{aBc}{abc}$	3 5 celkem 8	0,55
<b>Celkem</b>		<b>1448</b>	<b>100 %</b>

- ve

skutečnosti je **dvojitých rekombinantů** ještě o něco méně než by odpovídalo výpočtu, to vysvětluje jev zvaný **interference** (=výskyt jednoho crossing-overu negativně ovlivňuje vznik druhého crossing-overu v blízkosti prvního)

- **míru interference** je možno spočítat jako koeficient interference (i), který nám říká, jak velký podíl **potenciálních dvojitých crossing-overů** byl „potlačen“ přítomností prvního crossing-overu

$$i = 1 - \frac{\text{pozorovany\_podil\_dvojitých\_rekombinantů}}{\text{očekavana\_pravdepodobnost\_dvojitě\_rekombinace}}$$

- poměr **pozorované a očekávané frekvence** dvojitých rekombinantů se nazývá **koeficient koincidence (coc)**
  - pro náš případ je  $i=0,33=33\%$  a  $coc=0,67=67\%$ , máme tedy 67% očekávaných **dvojitých crossing overů** a 33% možných **rekombinací** bylo **inhibováno**

- **nepřímá DNA diagnostika**

- pokud neznáme **vlastní genetický defekt**, který je podkladem monogenně podmíněného onemocnění, nebo pokud v daném genu existuje velké **množství různých mutací**, lze přesto konzultovat rodiny v riziku, pokud známe alespoň přibližně **chromosomální lokalizaci** vlastního genetického postižení
- vezmeme **polymorfismus**, který se nachází na **daném místě genomu**, stanovíme genotyp zdravých i nemocných členů rodiny (pro tento polymorfismus) a snažíme se **dedukovat**, která alela daného polymorfismu je ve vazbě s patogenní alelou a takto **predikovat prenatalně** nebo **presymptomaticky genotyp** dalších členů rodiny

- využít lze i dosti **vzdálené markery** – AD onemocnění a polymorfismus ležící 1Mb od patogenního genu, přesto bude pravděpodobnost rekombinace 1% a prenatalní diagnostika bude tedy přesná na 99% - významné zpřesnění oproti **genealogickému riziku** 50%
  - **100% přesnosti výsledku** můžeme dosáhnout pouze intragenové sondy (přímá DNA diagnostika)
- **nevýhody**
  - potřeba **úplné rodiny** s již postiženými členy (alespoň dva postižení)
  - v každé rodině bude **onemocnění ve vazbě s jinou alelou** polymorfismu (jde o vazbu, nikoliv o příčinu onemocnění) - některé rodiny budou **neinformativní** a bude třeba stanovit jiný informativní polymorfnní lokus
- **vazebná nerovnováha**
  - pro studium **komplexních (polygenních) onemocnění** u populace se používají často asociační studie, jde o studie typu **případ-kontrola** (case-control)
  - pátrá se po alelách, které se vyskytují **častěji u nemocných** než u kontrol (takové alely pravděpodobně zvyšují riziko onemocnění) nebo naopak po alelách vyskytujících se **častěji u kontrol** (zdravých) a které pravděpodobně riziko onemocnění snižují
  - může se ale jednat i o zásah doslova „**těsně vedle**“ – objevená riziková alela je ve skutečnosti neutrální (nemá vliv na daný fenotyp), ale je v **těsné vazbě** se skutečným „viníkem“, a to ve vazbě tak těsné, že v průběhu celé historie sledované populace došlo k pouze **omezenému počtu rekombinací** mezi oběma alelami, tudíž se v populaci nachází vysoký podíl původních **haplotypů zakladatelů populace** – tomuto efektu se říká **vazebná nerovnováha**
    - např. **adrenogenitální syndrom** bývá ve vazbě s HLA-B47
    - tento AR syndrom je způsoben defektem 21-hydroxylázy, která se nachází ve skupině genů **HLA III. třídy**
    - lokus pro 21-hydroxylázu a pro HLA-B47 jsou tedy oba na krátkém raménku 6. chromosomu, a to ve vzdálenosti 2 až 3 cM
    - **pravděpodobnost rekombinace** je tu tedy malá
    - svou roli při výskytu této vazebné nerovnováhy pravděpodobně hraje **efekt zakladatele**

## 18. Metody genetické analýzy v experimentu a lidské genetice

---

## 18. Metody genetické analýzy v experimentu a lidské genetice

---

- **genetická analýza** se zabývá popisem metod a výsledků v **genetice** a **molekulární biologii**
  - může být využívána například k diagnóze různých **dědičných onemocnění, nádorových onemocnění** spojených s genetickou predispozicí nebo změn v počtu kopií genů a mutací DNA
  - mezi **metody genetické analýzy** patří PCR, RT PCR, DNA sekvenování nebo DNA microarray, spadají sem taky **cytogenetická vyšetření** jako tvorba karyotypu nebo fluorescenční metody
  - právě **tvorba karyotypu** převažuje v genetické analýze u lidí, důvodem jsou zejména **etické otázky** a nemožnost testování na lidech
    - ve výzkumech se proto používají zejména **laboratorní zvířata**, jedná se často o speciálně chované laboratorní potkany, kteří jsou z pohledu genetiky „totožní“ a výsledky jsou proto **srovnatelné mezi laboratořemi**
- **metody genetické analýzy v lidské genetice**
  - **hlavním prostředkem** je stanovení **rodokmenu**
    - informace získává lékař **podrobným pohovorem** s rodinnými příslušníky
    - osoba, která je zkoumána v dané rodině se nazývá **proband**
    - pomocí různých **genealogických značek** se zapisují vztahy v rodině a případný výskyt onemocnění
    - výsledkem procesu je **genealogické schema**
    - určuje se také **forma dědičnosti** – zda se jedná o onemocnění dominantní nebo recesivní a přenášené **autosomálně** nebo **gonosomálně** – **AR, AD, GD, GR**
    - výsledkem může být **určení rizika pro potomky** nebo další členy rodiny
    - nevýhodou této metody je skutečnost, že spoléhá na **lidský faktor** a na paměť pacientů
    - často se můžeme setkat s **nejasnostmi**, nediagnostikovanými onemocněními nebo smrtí příbuzných z neurčených důvodů
    - jedná se tedy o metodu **subjektivní**, pokud nelze jednotlivé členy rodiny vyšetřit a výsledky zhodnotit
- **metody genetické analýzy v experimentu**
  - pro výzkumy lidských onemocnění nebo jiných teorií, kde by bylo neetické provádět zkoumání **na lidech**, jsou užívány **modelové organismy**
    - **závěry ze zkoumání** těchto organismů jsou poté používány i pro jiné druhy
    - tento způsob analýzy je umožněn **společnými vývojovými** nebo metabolickými cestami, kterými prošly všechny organismy během procesu evoluce
    - existuje proto mezi nimi **určitá korelace** (vztah)
    - vlastností **modelového organismu** by měl být krátký životní cyklus a nespécifické **nároky na růst**
    - musí zároveň **existovat techniky**, které jsou schopné genetické manipulace
    - jedním z prvních modelů užívaných v molekulární biologii byla bakterie **E. coli**
    - mezi další patří **viry** (bakteriofágy)
    - z eukaryot jde o **houby** (Saccharomyces), **rostliny** (lotus, tabák, rýže) nebo **zvířata** (dříve se často užívaly ovocné mušky – **Drosophila melanogaster** – nebo různí červi)
    - z obratlovců jsou modelovými organismy **morčata, myši, potkani** a další
  - výhodou **modelových organismů** je schopnost produkce velkého množství potomků (u potkanů 5–15 potomků ve vrhu, 3–5x ročně) a **krátká doba života**
    - **laboratorní potkani** (**Rattus norvegicus**) jsou chováni ve speciálních zařízeních, kde se postupným **křížením příbuzných jednotlivců** docílí generace potomků se stejným **genomem**

- pokusy na nich jsou pak tedy **porovnatelné**, jak již bylo zmíněno výše
- pokud bychom chtěli hledat **podobný ekvivalent** u lidí, jednalo by se o **jednovaječná dvojčata**
- ačkoliv podobné "lidské testy" v době druhé světové války probíhaly, dnes jsou eticky naprosto nepřijatelné

## 19. Genetické mapování u člověka

- jedním z hlavních úkolů **lékařské genetiky** je identifikovat geny, určit jejich funkci a odhalit změny, které **způsobují onemocnění** – nezbytným předpokladem k tomu je mapování genů
  - = určení jejich **pozice a pořadí** na chromosomech
  - značná část genů je již v současné době **přirážena na chromosomy**, u řady onemocnění byly nalezeny a definovány **mutace ve specifických genech**
  - mapování a identifikace **lidských genů** však stále nejsou dokončeny
  - k **mapování lidského genomu** jsou využívány dvě metody
    - **genetické mapování**
      - využívá frekvenci **meiotických crossing-overů** k odhadu vzdálenosti mezi lokusy
    - **fyzické mapování**
      - využívá **cytogenetické a molekulárně genetické techniky** k přesné lokalizaci na chromosomu
- **genetické mapování**
  - založeno na **vazebné analýze**, kdy je k odhadu vzdálenosti mezi dvěma lokusy využívána **frekvence meiotických crossing-overů** mezi nimi, tzv. rekombinační zlomek
    - vzdálenosti udávány v **cM** (relativní vzdálenosti)
  - **problémy u člověka**
    - **malý počet potomků** – nutno sbírat data od velkého počtu rodin
    - nemožnost **zpětného křížení**
    - proto jsou **rekombinační frekvence** odhadovány na základě sledování přenosu alel genu v rodinách s využitím **specifických statistických metod** (stanovení LOD skóre)
  - úspěch **vazebné analýzy** závisí na dostupnosti polymorfních genetických markerů
    - **genetický marker** = jakýkoliv polymorfní mendelovský dědičný znak, např. definovaný **segment DNA, protein nebo fenotyp**
    - první **hrubé mapy** byly založeny na zkoumání vazby identifikovatelných **fenotypů** v rodokmenech (např. krevní systém ABO a Nail-Patella syndrom, které vykazovaly vazbu na chromosomu 9)
    - v dnešní době je velký pokrok v objevování **nových genetických markerů**
      - polymorfismus v délce **restrikčních fragmentů** (RFLP)
      - **VNTR polymorfismus** (minisatelity)
      - polymorfismus **krátkých tandemových repetit**
    - **požadavky na vlastnosti markerů**: kodominantní dědičnost, početnost a variabilita
      - **vysoký stupeň polymorfismu** je žádoucí, protože pak je většina rodičů v heterozygotním stavu a je možné určit **vazebnou fázi**
  - vazebná analýza mezi **markerem a lokusem** způsobujícím onemocnění umožňuje zúžit velikost oblasti, ve které se **hledaný lokus nachází**
- **fyzické mapování**
  - určuje **fyzické umístění genů** na chromosomech, přičemž vzdálenosti mezi nimi jsou vyjádřeny **počtem bazí** (na rozdíl od genetických map, kde vzdálenosti jsou relativní, v cM)
  - využívá celou řadu metod včetně metod cytogenetických a molekulárně genetických technik
  - **postup**: lokalizace širokého spektra **polymorfních markerů** vytvoří „záchytné body“ po celém genomu, mezi než pak lze umisťovat **různé sekvence DNA** včetně genů, všechny přístupy

vedou k vytipování **kandidátních oblastí** a posléze kandidátního genu, který je dále analyzován za účelem potvrzení, že se skutečně jedná o **hledaný gen**

- **kandidátní geny** jsou geny, jejichž charakteristiky naznačují, že mohou být zodpovědné za **genetické onemocnění**
- více otázka 64. Fyzikální metody genového mapování

## 20. Genetické mapy a jejich význam

---

- **genetické mapy**
  - určují **vzájemnou polohu** polymorfních značek (markerů) na základě **frekvence rekombinací** a zároveň nás informují o **pravděpodobnosti rekombinace** – díky tomu můžeme přesněji **odhadnout výsledky analýz**, které využívají vazbu (např. nepřímá DNA diagnostika)
  - **polymorfismus** = existence více rozlišitelných alel (variant) v populaci
  - **rozdělujeme dva druhy map:**
    - **genetická mapa** – určuje relativní vzdálenosti v jednotkách cM
    - **fyzická mapa** – určuje fyzické umístění genů na chromosomech, vzdálenosti mezi nimi jsou vyjádřeny počtem basí (b, kB, MB, ...)
- pro člověka jsou nyní k dispozici **3 celogenomové genetické (vazebné) mapy**
  - **2 mapy** (Genethon a Marshfield) jsou založeny na **rodinách CEPH** (Centre d'Études du Polymorphisme Humaine du Paris), mapa od společnosti **deCODE** na **146 rodinách z Islandu**
  - všechny jsou k dispozici na **internetu**
- **projekt lidského genomu (The human genome project)**
  - započal v roce 1990 jako **mezinárodní projekt** plánovaný na 15 let a stanovil si 3 hlavní úkoly
    - vytvořit **genetickou mapu** markerů
    - vytvořit **fyzickou mapu**
    - zkompletovat **sekvenci 3 bilionů** párů basí lidského genomu
  - odpovědnost za **koordinaci projektu** převzala **HUGO (Human Genome Organisation)**
  - **mapa markerů** byla již komplementována a zahrnuje mnoho tisíc polymorfismů lokalizovaných po celém genomu (RFLP, VNTR, STRP a SNP)
  - rovněž je kompletní **fyzická mapa** známých STS (sequence tagged sites)
    - tato místa jsou nepostradatelná při **experimentech pozičního klonování** při umístění sekvencí DNA do **správného pořadí**
  - v roce 2001 bylo zpracováno přibližně **90% sekvence** lidské DNA, konečná sekvence byla oznámena v **roce 2003**
  - úspěchy v rámci projektu, zejména vytvoření **fyzické mapy**, usnadnily použití pozičního klonování identifikaci genů - počet **identifikovaných genů** stále roste a s tím i možnosti **genetické diagnostiky**, výroby genových produktů technikami rekombinantní DNA a léčby **specifickými léky** nebo využitím genové terapie
  - **výzkum lidského genomu** ale tímto nekončí, naopak je spíše na začátku, neboť je třeba nejen geny **identifikovat**, ale i porozumět jejich **regulaci a expresi** a charakterizovat složité **interakce mezi geny** samotnými, mezi jejich produkty a mezi prostředím

## 21. Struktura a funkce eukaryotní buňky

---

- buňka je základní **strukturální jednotkou** všech živých organismů
- existují dva základní typy buněk – liší se především stavbou, ale vzhledem k existenci četných **biochemických analogií** lze předpokládat, že se jeden typ vyvinul z typu druhého
- buňka představuje určitý objem živé hmoty – **protoplazmy**, ohraničené buněčnou membránou
- buňka má celou řadu **funkcí**

- realizace látkové výměny
- schopnost růstu
- schopnost pohybu
- schopnost odpovídat na vnější podněty (drážditelnost)
- souhrn těchto funkcí buňce umožňuje buňce udržet svou existenci a množit se
- **prokaryotní buňka**
  - buňka typická pro **bakterie**, malá velikost: 1 – 5  $\mu\text{m}$
  - mohou být opatřeny **buněčnou stěnou** (vně hraniční buněčné membrány – plazmalemy)
  - **bez jaderného** membránového **obalu**, oddělujícího genetický materiál DNA od dalších buněčných komponent
  - absence **histonů** (specifické bazické proteiny) vázaných na DNA
  - dále menší množství **DNA**
  - chybí také **membránové buněčné organely**
- **eukaryotní buňka**
  - buňky větší než prokaryotické
  - jádro ohraničeno jadernou membránou (oddělení karyoplazmy a cytoplazmy), s DNA se pojí bazické proteiny **histony**
  - v cytoplazmě lze nalézt mnoho **membránových organel**

### Eukaryotická buňka

- během fylogeneze došlo k výraznému vývoji původně primitivních buněk, začaly se specializovat a zvyšovat svou odolnost – postupně vzniklo velké množství diferenciovaných elementů – **buněčná diferenciac**
- např. svalová buňka se při diferenciaci prodlužuje a mění v buňku vřetenovitého tvaru, která syntetizuje a strádá myofibrilární proteiny – ve výsledku má schopnost přeměňovat efektivně energii chemickou ve svalovou kontrakci
- celkem se v lidském těle vyskytuje okolo **200 typů** vysoce diferenciovaných buněk
- změny tvaru jsou předcházeny změnami chemickými, každý typ diferenciované buňky má **specifickou úroveň syntézy** proteinů (aktin a myosin ve svalové buňce X trávicí enzymy a buňkách pankreatu)
- zároveň ale různé typy buněk stále užívají stejného mechanismu **proteosyntézy**, buněčného **transportu, transformace** energie a **duplikace** genetického materiálu
- buňky ale mají schopnost vykonávat i dvě a více funkcí (např. buňky proximálních stočených kanálek – transport iontů, absorpce metabolitů, trávení proteinů)
- **zákon jednoty struktury a funkce** – pro specifické funkce jsou specifické morfologické struktury (tvar, barvitelnost apod.) – proto se různě specializované buňky liší nejen funkcí, ale i tvarem
- **tvar buněk**
  - buňky těsně vedle uspořádané, tvořící buněčné vrstvy, mají obvykle tvar **polyedrický**
  - podle výšky se buňky dělí na **ploché, kubické, cylindrické**
  - buňky, vystylající sférické prostory acinů, mají tvar **pyramidový**
  - buňky, které se uvolňují ze svazku s okolními buňkami nebo jsou suspendovány v řídkém prostředí, mají tendenci se **zakulacovat**
  - některé buňky mají **speciální tvar**
    - hladké svalové buňky jsou **vřetenovité**
    - některé neurony se svými četnými výběžky mají tvar **hvězdovitý**
    - jiné neurony mají tvar **pyramid**
    - buňky zvláštních specializovaných tvarů se nacházejí zejména v některých **smyslových orgánech**
- **velikost buněk**
  - průměr buněk lidského těla kolísá mezi **4-150 $\mu\text{m}$**
  - v jedné vrstvě kůry mozečku se vyskytují **nejmenší buňky**, neurony o velikosti pouze **4 $\mu\text{m}$**
  - v sousední vrstvě se vyskytují velké neurony zvláštního tvaru – **Purkyňovy buňky** o velikosti **120 $\mu\text{m}$**
  - největší buňkou lidského organismu je **oocyt - 150 $\mu\text{m}$**
  - průměrná velikost **somatických buněk** je **10-20 $\mu\text{m}$**



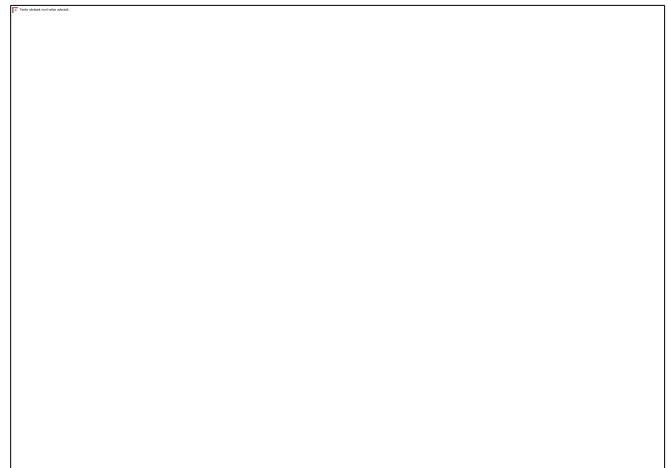
- některé buňky žijí velmi krátce, některé dlouho - **červené krvinky** (v řádu dní), **neurony** a **kardiomyocyty** – po celý život organismu
- eukaryotní buňka se dělí na **kompartmenty**
- 2 základní kompartmenty: **jádro** a **cytoplazma**
- jen dočasně a na programovanou dobu mohou některé buňky existovat **bez jádra** – erytrocyty
- **plazmatická membrána (biomembrána)**
  - každá biomembrána je tvořena z molekul **bílkovin** a **lipidů**, v menší míře i molekulami **sacharidů** (ve formě glykoproteinů a glykolipidů)
  - základem je **lipidová dvojvrstva**
  - molekuly **bílkovin** jsou přítomny na **povrchu** této vrstvy, jsou to **glykoproteiny** a mají především **ochrannou funkci**
  - **rozlišujeme bílkoviny**
    - **integrální (vnitřní)**: částečně nebo zcela zanořené do lipidové vrstvy
    - **periferní**: na povrchu lipidové vrstvy
  - bílkoviny jsou jen na některých místech membrány – **mozaika**
  - membrány mají **polotekutý charakter** – fluidní model – bílkoviny a lipidy jsou v neustálém pohybu
  - plazmatická membrána má zásadní význam pro **život buňky**
    - **ohraničuje cytoplazmu** vůči okolí
    - **reguluje transport** mezi buňkou a okolím
    - jejím prostřednictvím dochází ke **kontaktům** mezi buňkami
  - **kontakty** jsou zjednodušeně dvojího typu
    - **dotykem** povrchových membrán
    - pomocí **desmosomů** – vláčénky, která pronikají z jedné buňky do druhé
  - v membráně též lokalizováno mnoho **receptorů**, reagujících na **chemické signály** okolí a regulujících **aktivitu buňky**
  - receptory zajišťují i **rozlišení vlastních i cizích buněk**, přijímají látky z okolí a mají důležitou roli v buněčné **dráždivosti**
  - plazmatická membrána je volně **propustná** jen pro některé látky, ostatní látky jsou přenášeny **mechanismy**, které označujeme jako **transport látek**
  - **typy transportu**
    - **dífuze**: volné proudění látek podle koncentračního spádu
    - **pasivní transport**: transport pomocí **přenašeče**, na který se látka naváže, přenos se děje podle koncentračního spádu
    - **aktivní transport**: přenos se děje navázáním na přenašeč a **spotřebou energie**, přenos proti koncentračnímu spádu
  - buňka může přijímat a vydávat i takové látky, u nichž **aktivní transport** není možný
    - **exocytosa**: vysokomolekulární látka uzavřená v **transportním váčku** se přiblíží k membráně, váček s ní splyne a obsah se tak uvolní do okolí
    - **endocytosa**: vchlípení membrány dovnitř buňky, okraje se uzavřou a dovnitř buňky se odštěpí váček, dojde k jeho rozpuštění a obsah se tak uvolní do cytoplazmy
      - **pinocytosa**: kapalné nebo malé rozpuštěné částice
      - **fagocytosa**: větší částice, nejprve jsou obklopeny výběžky (pseudopodia) a poté endocytovány
- **buněčné organely**
  - **membránové systémy** uvnitř buněk (převážně, jsou i **nemembránové organely**)
  - mají různé **specifické funkce**
  - **endoplazmatické retikulum**
    - soustava vzájemně propojených **cisteren** a **trubiček**
    - probíhá tu **syntéza molekul**, které tvoří ostatní organely, zejména jejich **membrány** (lipidy, protein a polysacharidy) a také převážně proteinů, určených na **export z buňky**
    - rozlišujeme **endoplazmatické retikulum hladké** (bez ribosomů) a **drsne** (na jeho povrchu jsou navázány ribosomy)
  - **Golgiho aparát**

- stálá součást buněk
- soustava vzájemně propojených **cisteren (dictyosomy)** s měchýřky na jejich povrchu
- probíhají tu **přeměny organických látek** a jejich transport na místo pomocí **vesikul**
- současně se tu hromadí **sekrety**, jež mohou být z buňky vyloučeny **exocytosou**
- **lysosomy**
  - membránové struktury, obsahující velké **množství enzymů**
  - vznikají **odštěpením cisteren** z Golgiho aparátu, enzymy jsou ale tvořeny v **endoplazmatickém retikulu**
  - lysosomy rozkládají látky přijaté **endocytosou**
- **mitochondrie**
  - organely, tvořené dvěma **samostatnými biomembránami** – vnější a vnitřní
  - mezi nimi je **vnitřní prostor**, který obsahuje základní hmotu mitochondrií – **matrix**
  - do ní vbíhá **vnitřní membrána** množstvím **mitochondriálních krist**
  - mitochondrie mají **vlastní DNA**, vlastní syntézu bílkovin
  - probíhají tu **buněčné oxidace**, při nichž se uvolňuje energie
- **vakuoly**
  - v živočišných buňkách velmi **drobné**
  - váčky, naplněné **vodnými roztoky** různých látek
- **ribosomy**
  - **drobná zrnka** v cytoplasmě, účastní se **proteosyntézy**
  - obsahují **rRNA a bílkoviny**
  - jsou v **mitochondriích, cytoplasmě** a nebo připojeny na **povrchu ER**
- **cytoskelet**
  - různé **vláknité struktury** v buňce, mají stejný princip stavby
  - jedná se o **tři typy** struktur
    - **mikrotubuly**: trubice tvořené tubulinem
    - **mikrofilamenta**: jemná bílkovinná vlákna
    - **intermediární filamenta**: tlustší bílkovinná vlákna
  - cytoskelet je **dynamická struktura** tvořící mechanickou kostru buňky
  - umožňuje **buněčné pohyby** a zpevňuje buňky
  - **cytoskeletární charakter** má také **centriol**, má význam pro dělení buňky
- **inkluze**
  - různé **odpadní nebo zásobní látky**, nacházející se v cytoplasmě
  - odpadní látky jsou v cytoplasmě **rozpuštěné** nebo ve formě **drobných zrníček – inkluzí**
- **základní cytoplasma – cytosol**
  - zbývající hmota buňky
  - řídké médium, v němž jsou uloženy **organely**, se nazývá **základní cytoplasma – cytosol**
  - v cytosolu jsou pozorovány **bílkovinná vlákna** zvaná **mikrotrabekuly**
  - ty tvoří **síť** napojenou na **plazmatickou membránu** a buněčné organely (s výjimkou mitochondrií)
- **jádro**
  - největší a nejvýznamnější **buněčná organela**
  - pro život buňky **nepostradatelné**
  - ohraničeno **dvojitou membránou** s četnými **póry**, uvnitř je hmota jádra – **karyoplasma**
  - v karyoplasmě je **jedno nebo více jadérek** a **chromatin**
  - **jadérko**
    - obsahuje **bílkoviny a RNA**
    - dochází tu k **syntéze ribosomů**
  - **chromatin**
    - **komplex** nukleových kyselin a bílkovin
    - v dělicí se buňce se z chromatinu organizují **dlouhé vláknité útvary – chromosomy**
    - jsou velmi tenké a patrnými se stávají až při **dělení buněk**
    - obvykle jsou ohnuté a tvoří je **2 ramena**
    - v místě ohybu se nachází **centromera**

- v každé buňce je **charakteristické množství chromosomů**, jejich počet je označován jako **diploidní sada chromosomů** ( $2n$ ) v somatické a **haploidní sada** ( $1n$ ) v buňce pohlavní
- každý chromosom je v buňce přítomen **dvakrát** – od otce i od matky, v pohlavní buňce pak jen jednou, výběr je **náhodný**

## 22. Buněčný cyklus, jeho regulace a poruchy

- většina buněk během své existence **roste**, zdvojnásobuje své složky a pak se **rozdělí**
- tento opakující děj se nazývá **buněčný cyklus**
- buněčný cyklus trvá od **mitosy k mitose** a dělí se na dva hlavní úseky – **interfáze a mitosa**
- **mitosa**
  - **replikované chromosomy** a **cytoplasma** se rozdělí do dvou **dceřinných buněk** (cytokinese)
- **interfáze**
  - v buňce je **optickým mikroskopem** rozeznatelné jádro s jedním nebo více jadérek
  - obsahem jádra je **jemně zrnitý materiál** – **chromatin**, který představuje zejména **despiralizovanou DNA** chromosomů
  - dělí se na období **G1, G2, S** a **M** (už není interfáze ale mitosa)
  - **G1 fáze (1. přípravná)**
    - G = gap, mezera nebo growth, růst
    - nastává po **ukončení mitosy**, chromosomy jsou zde tvořeny **jednou chromatidou**
    - začíná v okamžiku, kdy se **po rozdělení mateřské buňky** stává dceřinná buňka soustavou schopnou **samostatné existence**
    - končí **zahájením replikace jaderné DNA**
    - **průběh: zdvojení** buněčné hmoty, intenzivní **syntetické procesy** – RNA + proteinů → buňka **roste**, vytváří se **zásoba nukleotidů** a syntetizují se enzymy pro budoucí **replikaci jaderné DNA**
    - leží zde **hlavní kontrolní uzel cyklu**
    - v G1 fázi buňka setrvává **různě dlouhou dobu** – hodiny až týdny i déle (**G0 fáze**)
  - **S fáze (syntetická)**
    - S = synthesis
    - **replikace jaderné DNA** (→ zdvojení množství DNA) + současná rychlá **spřažená syntéza histonů** (H2A, H2B, H3, H4 & H1) → aby se mohly tvořit nové **nukleosomy** a **chromatinové vlákno**
    - chromosomy jsou tvořeny dvěma identickými sesterskými chromatidami
    - mechanismus **replikace DNA**
      - **DNA helikáza** → rozplétání dvouvláknové DNA
      - **DNA polymerasa** → vlastní replikace DNA
      - **primasa** → „primer“
      - **replikace vlákna 3' - 5'**: DNA polymerasa  $\delta$ , kontinuální replikace → „leading strand“
      - **replikace vlákna 5' - 3'**: DNA polymerasa, diskontinuální replikace → „lagging strand“, **Okazakiho fragmenty**
      - **DNA polymerasa  $\beta$ , DNA ligasa**: odstranění „primers“
      - **topoisomerasa II**: v místě setkání replikačních vidlic
      - **telomerasa**: dosyntetizuje DNA na koncích chromosomu
    - na konci - **chromatidy** spojeny v místě **centromery**; dvojnásobná genová dóza buněk

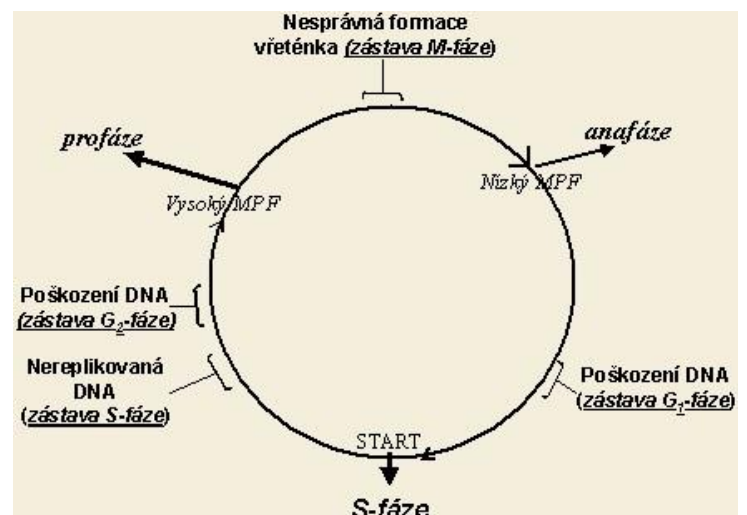


- v některých místech **genomu** probíhá replikace **opožděně** – typická pozdní replikace **inaktivovaného chromosomu X**
- **G2 fáze (2. přípravná)**
  - příprava na **mitosu**, která probíhá v **M fázi**
  - závislá na **dokončení replikace DNA** v S fázi
  - **průběh**: syntéza a aktivace proteinů – dochází ke **kondenzaci** chromosomů, ke tvorbě **mitotického aparátu** a destrukci jaderného obalu, končí zahájením **mitózy**
  - zde leží **2.kontrolní uzel** buněčného cyklu – rozhoduje o tom, zda buňka do mitózy skutečně **vstoupí**
- **M fáze (mitotická)**
  - **jaderné dělení** → poslední etapa buněčného cyklu
  - **chromosomy reduplikované** do konce S fáze jsou ohraničeny, **sesterské chromatidy** odděleny a přemístěny k protilehlým pólům buňky = **vlastní mitóza**
  - dceřinné buňky obdrží **2 kompletní sady chromosomů** a shodnou výbavu cytoplazmatických organel = cytokineze → završuje celý proces
  - **mitóza a cytokineze** jsou většinou propojené procesy
  - kondenzace chromosomů – až **10 000x**
  - pro pravidelné **rozdělení sesterských chromatid** do obou dceřinných buněk je důležitý **mitotický aparát** buňky
    - **centromery**
    - **kinetochory**
    - vývoj **mitotického aparátu** začíná v **G2 fázi** → reduplikace centrozomů a výstavba kinetochor pro každou z chromatid
- některé buňky po G1 fázi vstupují do **G0 fáze** – klidové období, dochází k **zástavě buněčného cyklu**
- **trvání** buněčného cyklu je u různých buněk odlišně dlouhé – ovlivněno zejména **délkou G1 fáze** eventuelně **G0 fáze**
- doba od zahájení **S fáze** do **dokončení mitózy** bývá obvykle **krátká a konstantní**
- **cyklus** buněčného dělení **rychle se dělicích buněk** obvykle trvá **24 hodin**, z toho na **mitózu** připadá asi **1-2 h**, na **G<sub>1</sub>-fázi 9 h**, na **S-fázi 10 h** a **G<sub>2</sub>-fázi 4,5 hodin**
- **rychlost dělení** buněk a tedy i délka jejich buněčného cyklu je závislá na **vnějších podmínkách**, na období ontogenetického **vývoje** i na buněčném **typu**
  - **epiteliální buňky střeva** se dělí více než dvakrát za den a tím plynule obnovují střevní výstelku
  - **embryonální buňky** mají bezprostředně po oplození **G1 fázi** zanedbatelně **krátkou** a jejich buněčný cyklus lze v podstatě rozdělit na 2 části – **S fázi a mitosu**
  - po **poškození tkání**, jejichž buňky mají schopnost **proliferovat** dochází ke zkrácení jejich **buněčného cyklu** a buňky se dělí rychleji než obvykle
- buňky dělicí se **pomalou** setrvávají v **G1 fázi** dny, týdny i roky – zástava se pak označuje jako **G0 fáze** – buňky **klidové**
  - **G0 fáze** se liší tím, že **proteosyntéza je redukována** až na 20% ve srovnání s proliferujícími buňkami
  - **ustává exprese genů**, které kódují proteiny nutné pro pokračování buněčného cyklu (**Cdk proteiny** a všechny typy **cyklinů**)
  - u dospělého v **G0 fázi** dlouhodobě setrvávají **neurony** nebo buňky **kosterní svaloviny**, přechodně pak **hepatocyty** nebo **lymfocyty** (navrací se pak zpět do **G2 fáze**)
- v průběhu **buněčného cyklu** se mění **počet chromosomů**, **chromatid** i **množství DNA**

Fáze buněčného cyklu	Počet chromosomů	Počet chromatid
G1	2n	2n
S	2n	2n -> 4n
G2	2n	4n
profáze	2n	4n
telofáze (dceřiné jádro)	2n	2n

## Řídící systém buněčného cyklu

- buněčná proliferace závisí na **vnitřních i vnějších činitelích**
- **řídící systém** zajišťuje a koordinuje cyklicky se opakující biochemické reakce, které vedou k replikaci DNA, duplikaci chromatid a jejich následné segregaci do dceřiných buněk
- koordinuje také **vyváženost stimulace a inhibice proliferace**
- podstatou je **interakce specifických proteinů**
- mechanismus regulace buněčného cyklu → uskutečňuje se na **dvou základních úrovních**
  - **aktivace:**  $G_0 \rightarrow G_1$  → začíná expresí **genů primární odpovědi** a poté následuje exprese kaskády příslušných **sekundárních genů**
  - **progrese:**  $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M \rightarrow \dots$
- **kontrola** → kontrolní systém → monitoruje **kompletnost kroků** v buněčném cyklu
  - **neúplnost** → vyslání **inhibičních signálů** blokujících buněčný cyklus v tzv. **kontrolních bodech**
  - **3 kontrolní body:**
    - $G_1/S$  → blokáda buněčného cyklu jsou-li buněčný růst nebo **okolní podmínky** nepříznivé pro další dělení
    - $G_2/M$  → zastavení buněčného cyklu není-li dokončena **replikace DNA** event. je-li DNA **poškozena**
    - $M/G_1$  → na přechodu metafáze - anafáze → stop nejsou-li chromosomy řádně **přípevněny k mitotickému vřeténku**
  - **kontrolní systém** buněčného cyklu → založen na **oscilacích aktivity proteinkinasy**
  - **cyklin-dependentní kinasy** - CdK → katalyzují **kovalentní vazbu**  $\sim P$  na bílkovinné substráty → změny v:
    - enzymatické **aktivitě** substrátu
    - jeho **interakci** s jinými proteiny
  - **komplex cyklin E / Cdk2:** regulace vstupu do S fáze
  - **komplex cyklin E / Cdk2:** regulace vstupu do mitózy
- ve **standardně probíhajícím** buněčném cyklu je regulace buněčné proliferace zajištěna zejména **zastavením cyklu** ve specifickém bodě **G1** případně **G2** fáze - kontrolní body
- další **kontrolní bod (M)** se nachází v průběhu mitózy na rozhraní metafáze a anafáze
- teprve při **překonání kontrolních bodů** se buněčný cyklus posouvá do další fáze
  - na **zastavení cyklu** v kontrolních bodech **G1, G2 a M** se podílejí **endogenní buněčné faktory**
  - je to důsledek **zpětné vazby** mezi pochody na **molekulární úrovni**, které brání řídicímu mechanismu v navození následujících reakcí dokud předešlé reakce **nebyly ukončeny**
    - příkladem je **zastavení cyklu v G2 fázi** pokud nebyla ukončena **replikace DNA**
  - dále jde o odezvu na **porušení buněčných struktur** - poškození DNA, nesprávné vytvoření **mitotického vřeténka** nebo špatné napojení chromosomů k vřeténkům
  - délku **buněčného cyklu** ovlivňuje hlavně zastavení cyklu v **kontrolním bodě G1**
- na **pozastavení cyklu** v tomto bodě se podílejí různé faktory podmíněné signály, které přicházejí zejména z **vnějšího prostředí buňky**
- pro překonání **kontrolního bodu G1** je nezbytná přítomnost **růstových faktorů** (tzv. mitogenů), pokud však vstoupí cyklus do **S fáze**, může být dokončen i **bez nich**
- **proteiny řídicího systému** a jejich genetická informace
  - jedná se o **cykliny a cyklin dependentní proteinkinázy** - Cdk proteinkinasy
  - tyto proteiny jsou součástí **řídicího systému** buněčného cyklu



- jsou to **enzymy** katalyzující **fosforylaci jiných proteinů**
- vyskytují se v **inaktivní formě** nebo ve formě **aktivní**, jež je závislá na vazbě s **dalšími molekulami**, které Cdk proteiny **fosforylují**
- u vyšších živočichů známo **8 cyklinů**, které jsou značeny A, B, C, D, E, F, G a H a pro jednotlivé fáze buněčného cyklu je typická přítomnost určitých **typů cyklinů**
- v buňkách obratlovců je pak **7 typů Cdk proteinkinas**, vykazují odlišné funkce v závislosti na fázi buněčného cyklu
- **Cdk proteinkinasy** fosforylují seriny a threoniny cílových proteinů, ale jediné v případě že jsou v **komplexu s cykliny**
- cyklické navázání a odpojení jednotlivých typů **cyklinů od Cdk molekul** a jejich následná **degradace** je hlavní reakce, která umožňuje navození **postupných pochodů buněčného cyklu**
- účinnost **Cdk-proteinkinas** závisí na jejich spojení s **cykliny**, bez této vazby jsou Cdk molekuly **inaktivní**
- dále je působení **molekul Cdk** podporováno vazbou s **PCNA** (proliferating cell nuclear antigen) a inhibováno působením **inhibitorů proeinkinas**
- **mitotické cykliny**
  - (**cyklin B**) aktivují **cdk 1** a umožňují, aby buňka vstoupila do **M-fáze**
  - na **počátku G<sub>1</sub>-fáze** jsou mitotické cykliny **nedetekovatelné**; ale jejich syntéza začíná a pokračuje po celou **interfázi**; aktivačních hodnot je dosaženo při přechodu **G<sub>2</sub>/M**
  - vazba **mitotických cyklinů** na **cdk1** navodí sérii **postranslačních modifikací enzymu cdk1**, které jej aktivují, což má za následek **nástup mitózy**
  - **cyklin B** se nejprve **hromadí** v cytoplasmě a do **jádra** vstupuje těsně před rozpadem **jaderné membrány**
  - funkce **MPF** (Mitosis Promoting Factor) je částečně **regulována transportem cyklinu B do jádra**
- **G1 cykliny**
  - při přechodu **G<sub>1</sub>→S-fáze** hraje klíčovou úlohu **cdk2** a skupina **G<sub>1</sub>-cyklinů**
  - mechanismus je obdobný jako u **přechodu G<sub>2</sub>/M**
  - hned po té co buňka vstoupí do **S-fáze**, **Cdk2** se spojí s **cyklinem A**
  - syntéza **cyklinu A** začíná při **přechodu G<sub>1</sub>/S**; protein je ihned transportován do jádra
  - přerušení funkce cyklinu A brání probíhající **syntéze DNA**
  - z toho vyplývá, že **komplex Cdk2-cyklin A** je klíčovým faktorem pro postup **S-fáze**
  - substrátem aktivované **cdk2** jsou pravděpodobně enzymy potřebné pro **syntézu DNA** a jejich **prekurzorů**
- **faktory inhibující proliferaci buněk**
  - přímá **inhibice proteinkinas** je vyvolána například produkty **tumor supresorových genů** – proteiny **p15, p16, p21 a p 27**
  - zvýšená hladina **inhibitorů Cdk proteinkinas** je tak jedním z regulačních mechanismů, jenž vede k **zastavení buněčného cyklu ve fázi G1**
  - růstový faktor **TGF beta**
    - reguluje **transkripci tumor supresorového genu INK4** (inhibitor protein kinase 4)
    - transkripcí tohoto genu vznikají **2 transkripty** – jeden pro syntézu **p15** a druhý **p16**
    - oba proteiny jsou **inhibitory Cdk**, které se podílejí na průběhu **G1 fáze (p15 inhibuje Cdk4 a p16 Cdk 2, 4 a 6)**
    - růstový faktor též **reguluje syntézu p27**, což je produkt **KIP** (kinase interacting protein), jenž je asociován jednak s **inhibičním účinkem na buněčnou proliferaci**, ale též s vlivem na **terminální diferenciaci některých tkání**
    - **kontaktní inhibice** vyvolaná vzájemným **dotykem buněk** vede ke zvýšení hladiny **p27**, jenž se podílí na **zastavení cyklu**
    - **inhibiční účinek p27** je univerzálnější než u **p15, 16 a 21**, protože se váže na všechny **komplexy cyklinů s Cdk kinasami** – ovlivňuje všechny fáze cyklu
  - **inhibiční účinek p21**
    - je závislý na **aktivitě genu TP53**, který reaguje na **stárnutí buněk** nebo na **poškození DNA** zvýšením **transkripční aktivity**

- produktem TP53 je **p53**, jenž je transkripčním faktorem genu **CIP/WAF1 (cycline dependent inhibitor protein kinase / wild type p53 dependent growth arrest factor)**, který kóduje **protein p21**
- ten pak potlačuje **aktivitu komplexů cyklin a Cdk**
- **tumor supresorové geny** kódují proteiny, jež se mohou uplatnit při **inhibici proliferace a růstu buněk** za normálních fyziologických podmínek
- jejich **ztrátové mutace** souvisí se vznikem různých **nádorů**
- nejlépe prozkoumán **vztah buněčného cyklu** a genů **Rb1 a TP53**
- **gen Rb1**
  - na dlouhém raménku **chromosomu 13**
  - aktivní téměř ve všech **somatických buňkách**
  - jeho produkt – **pRb (Rb protein)** je **jaderný fosfoprotein** (fosforyluje různé proteinkinázy), který je podstatný při **regulaci dělení**, během diferenciaci a při **indukci apoptózy**
  - má schopnost **vazby** k velkému **množství proteinů**, které se na těchto procesech podílejí
  - vliv **pRb** na průběh transkripce cílových genů je **pozitivní** (buněčná diferenciaci) i **negativní** (buněčný cyklus)
  - inhibičně usměrňuje **přechod z G1 do S fáze**
    - protein je **aktivní nefosforylovaný** nebo velmi málo **fosforylovaný**
    - jeho hlavním cílem jsou **multifunkční transkripční faktory** rodiny E2F, které se podílí na **řízení aktivity genů**, podstatných pro **progresi buněčného cyklu**, syntézu DNA a apoptózu
    - komplex **pRB-E2F** inhibuje expresi genů, jejichž produkty jsou podstatné pro **G1/S přechod** – cyklin D a E
  - naopak **fosforylovaný**, tedy neaktivní **pRB** je uvolněn z vazby s **E2F**, které za těchto okolností pozitivně **podporují přechod G1/S**
    - **fosforylací serinů a threoninů pRB** (vyvoláno Cdk) vzniká postupně komplex **Cdk-cyklin**
    - jejich **interakce** je indukována **vazbou různých růstových faktorů** k receptorům
    - komplex **cyklin D-Cdk 4/6** se podílí na první fázi uvolnění buněčného cyklu z kontrolního bodu **G1** - následná syntéza **cyklinu E** v komplexu s **Cdk2** posunuje cyklus z kontrolního bodu **G1 do S fáze**
  - **pRb** je v buňkách přítomen neustále, jen se střídá jeho **fosforylovaná forma** (S, G2 a M fáze) a forma **defosforylovaná**, tedy aktivní
- **gen TP53**
  - krátká raménka **chromosomu 17**
  - hlavní funkcí je podíl na **pozastavení buněčného cyklu** v kontrolním bodě **G1** a při indukci **apoptózy**
  - exprese genu **TP53** je regulována **poškozením DNA** a různými typy stresu – **hypoxie**, nedostatek **růstových faktorů** apod.
  - vede ke zvýšení **exprese genu** a zvýšení stability **proteinu p53** (delší poločas degradace)
  - pozastavení **buněčného cyklu v G1** umožňuje **reparačním mechanismům** provést opravu **poškozené DNA**
  - také se podílí na **pozastavení cyklu v G2 fázi**, kdy dochází k akumulaci **p53** obdobně jako ve **fázi G1**
  - **reakce buněk** na aktivaci **p53**, která vede k **pozastavení buněčného cyklu** je závislá na **hladině p53**, na **typu buňky** a dalších regulačních proteinech, hlavně **Rb**
  - hlavní **produkt TP53** je **p53** - fosfoprotein, který je transkripčním faktorem pro mnoho podstatných cílových genů, např. **CIP1/WAF1, GADD 45 a BAX**
  - **CIP1/WAF1**
    - produktem je **protein p21** – váže se k Cdk a inhibuje je jak v **G1** tak v **G2 kontrolním bodě**
    - **p21** také může tlumit **replikaci** zpomalením postupu **replikační vidlice**
    - inhibuje i katalytickou **aktivitu PCNA dependentní DNA polymerasy delta**

- **GADD 45** (growth arrest and DNA damage)
  - podněcuje **reparaci excizí** (vyštěpením), přímo nebo v **kooperaci s PCNA**
- **BAX**
  - **proapoptotický gen**, úloha pro navození apoptosy
- pro regulaci **G1 kontrolního bodu** je podstatný také **gen AT**
  - jeho produktem je **proteinkinasa (ATM)**, podílí se na průběhu buněčné **signalizace iniciací fosforylační kaskády**
  - mutovaný gen AT produkuje **mnoho ATM** což vede k absenci **kontrolního bodu G1** a k zamezení **reparace poškozen DNA** – přenos zlomů do dceřiných buněk
- **tumor supresorové geny**, podílející se na reparacích jsou **geny BRCA1 a BRCA 2** (breast cancer)
  - při **mutaci** jsou asociovány s děděnou **predispozicí k rakovině prsu nebo vaječníků**
  - **produkty** obou BRCA tvoří **komplexy** s dalšími genovými produkty a podílejí se na **regulaci buněčného cyklu** při opravách **dvouvláknových zlomů DNA**
- **faktory podporující buněčnou proliferaci**
  - **růstové faktory**
    - specifické **kombinace růstových faktorů** v dostatečném množství mohou stimulovat buňky k **proliferaci** (výjimečně ji primárně inhibují – RGF beta)
    - důležitou funkcí je kromě stimulace proliferace také **regulace proteosyntézy** a buněčného **růstu**
    - **růstové faktory** většinou ovlivňují obojí, ale ve svých funkcích se značně liší – **obdobím působení, cílem působení** apod. – mohou působit jak **specificky** tak **pleiotropně**
    - **PDGF** – destičkové růstové faktory (platelet derived GF)
      - produkovány **epitelem a destičkami**
      - stimulace **proliferace fibroblastů, hladké svaloviny a neuroglálních buněk**
      - významné v **embryonálním období** a při **hojení ran**
    - **VEGF** – cévní **endoteliální růstové faktory** (vascular endothelial GF)
      - podporují **angio a vaskulogenezi** a růst endoteliálních buněk
      - podněcují též **permeabilizace cévních stěn**
      - **aktivita** ovlivněna dalšími **růstovými faktory** (fibroblastový např.), **cytokiny, Zn** a **Ca** závislými **endopeptidázami, gonadotropiny, NO, hypoxií a hypoglykemií**
    - **EPO** = erythropoetin
    - **EGF** = epidermal growth factor
    - **FGF** = fibroblast growth factor
      - podněcují **fibroblasty, chondroblasty** a stimulují **angiogenezi**
    - **NGF** = neural growth factor
    - **GGF** = glial growth factor
      - **Schwannovy buňky a astrocyty**
    - **TGF** = transformující růstové faktory
      - působí nepřímo, svými **produkty**, jež usměrňují aktivitu dalších genů
      - **TGF alfa** stimuluje **mitosu**, podporuje hojení ran a stimuluje zánětlivou reakci
      - **TGF beta** inhibuje mitosu a má **protizánětlivý účinek**
    - **TNF** = tumor nekrotizující faktory
      - **TNF alfa** (kachektin) a **TNF beta** (lymfotoxin) mohou působit **cytotoxicky** a podílet se na **indukci apoptózy**
    - **interleukiny IL-1 až IL-23**
      - regulace různých stránek **vývoje a aktivace leukocytů**
  - nedostatek **růstových faktorů** inhibuje buněčnou proliferaci



## 23. Buněčná signalizace

- **koordinace pochodů**, která zajišťuje existenci **mnohobuněčného organismu** jako celku, je zprostředkována **mezibuněčnou signalizací**
  - **jednoduchá mezibuněčná signalizace** existuje i u jednobuněčných organismů
    - např. proces **konjugace u kvasinek** *Saccharomyces cerevisiae* – buňky kvasinek uvolňují **bílkovinný faktor**, který indukuje ukončení proliferace sousedních buněk **opačného sexuálního typu** a vyvolá v nich děje vedoucí ke konjugaci a následnou **meiózu**
  - u **mnohobuněčných** se jedná o velmi složitý proces
  - buňky jsou vystaveny působení **velkého množství různých signálních molekul** v mnoha rozdílných kombinacích
    - jsou **geneticky naprogramovány** tak, že mohou na signální látky reagovat **selektivně** podle vývojového stádia organismu a v závislosti na typu buněk
  - mezi **signální molekuly** nezbytné pro přežití buněk patří zejména – **růstové faktory**, v jejich nepřítomnosti a někdy při jejich **nedostatku**, je v buňce aktivován **sebevražedný program** (apoptóza)
  - přenos signálu od **signální molekuly** do **jádra** je zprostředkován mnohastupňovým **signalizačním systémem**, kdy je informace předávána pomocí dalších **specifických molekul**, až ke konečné realizaci informace na **úrovni DNA**
  - **cílová buňka** je schopna reagovat na signální molekuly pouze prostřednictvím **receptorů**
    - **vazba signální molekuly** a receptoru je vysoce specifická
    - **receptory** jsou lokalizovány na buněčné membráně nebo nitrobuněčně
    - **signální molekuly**, též nazývané ligandy, se spojují s receptory a vytvářejí **ligandoreceptorové komplexy**
    - některé signální molekuly mohou mít u různých cílových buněk **identické receptory**, ale po vazbě s nimi vyvolat **odlišné odpovědi**
      - **acetylcholin** se váže v buňkách srdeční svaloviny a v sekrečních buňkách se stejným typem receptorů – v srdeční svalovině způsobí **pokles frekvence** a intenzity kontrakce svaloviny, naopak v sekrečních buňkách podněcuje **vylučování jejich produktů**
    - v jiném případě se mohou **stejně signální molekuly** v různých typech buněk vázat na **různé typy receptorů**
      - na membráně **kosterní svaloviny** se **acetylcholin** váže na jiné receptory než u buněk **srdeční svaloviny**, a na rozdíl od srdeční svaloviny v buňkách kosterního svalu vyvolá **kontrakci** buněk

### Typy signálních substancí

- signální molekuly jsou většinou **secernovány signalisujícími buňkami** a to buď exocytózou nebo difúzí **plasmatickou membránou**
- k cílovým buňkám jsou buď **přepřavovány** nebo zůstávají vázány k **extracelulární matrix** či povrchu **secernující buňky**
  - pokud **zůstávají vázané**, pak působí pouze ve svém **bezprostředním okolí**
- **lipofilní signální substance**
  - téměř **nerozpustné** ve vodě (hydrofóbní)
  - patří sem například **steroidní hormony** (gestageny, kortikoidy, androgeny, estrogeny, prostaglandiny), **thyroidní hormony** (thyroxin), **vitamin D**, **retinoidy** (deriváty vitamínu A – retinolu), molekuly **NO** a **CO**
  - některé **lipofilní substance**, například hormony, jsou po své syntéze **secernovány do krevního řečiště**, v krvi jsou pevně reversibilně vázány na bílkovinné nosiče, v této formě jsou přeneseny z místa vzniku k **cílovým buňkám**, kde jsou vazby uvolněny, do cílové buňky vstupují **plasmatickou membránou** prostou difúzí, v buňce se reversibilně váží na proteiny **nitrobuněčných receptorů**
- **lipofobní signální substance**

- převážně **rozpuštěné ve vodě**, některé lokální mediátory lipofóbní povahy jsou rozpustné i v **tucích**
- váží se na **receptory** uložené v plasmatické membráně
- patří sem například **hormony insulin a glukagon**, růstové hormony, deriváty arachnoidové kyseliny, aminokyseliny, nukleotidy, katecholaminy (dopamin, adrenalin, noradrenalin)
- na **převodu signálu** vyvolaného lipofóbními signálními substancemi do nitra buňky se podílejí **tři typy membránových receptorů**
  - **iontové kanály**
  - receptory aktivované **G proteiny**
  - receptory s **enzymovou aktivitou**

### Typy signalizací

- **přenos signálu** mezi buňkami závisí na lokalizaci, rychlosti a selektivitě, se kterou jsou signální molekuly dopravovány z místa sekrece k **cílovým buňkám**
- **lokální mediátory**
  - mediátory působící v **bezprostřední blízkosti** vzniku
  - účastní se jak **parakrinní tak autokrinní signalizace**
    - **parakrinní signalizace** - rychlé zachycení signálních molekul okolními cílovými buňkami
      - pokud **signální substance** nevytvoří okamžitě komplex s receptorem, jsou destruovány **extracelulárními enzymy** nebo **imobilizovány** v extracelulární matrix
    - **autokrinní signalizace** - vazba signálních molekul s receptory buněk, které samy tuto **signální substanci produkují** nebo s receptory buněk téhož typu
      - platí zde obdobné **omezení časové účinnosti** jako u parakrinní signalizace
    - oba typy signalizace se významně uplatňují během **časného vývojového stádia** při buněčné **diferenciaci**
  - příklady **signálních molekul** působících jako **lokální mediátory**
    - **růstové faktory** - většinou glykosylované proteiny
      - produkovány různými **typy buněk**, např. buňkami mesenchymálního původu, makrofágy, granulocyty a lymfocyty
      - působit můžou až v komplexu se **specifickým membránovým receptorem** s enzymovou aktivitou a to převážně tyrosinkinasovou
      - především stimulují buňky k **proliferaci**, ta nebývá podnícena pouze jedním **růstovým faktorem**, ale jedná se o výsledek účinku specifické **kombinace** několika odlišných růstových faktorů
      - regulují **proteosyntézu** a buněčný **růst**, řídí **diferenciaci** buněk v průběhu embryogeneze i postnatálně, podílejí se na jejich **vyzrávání**, migraci a funkci v závislosti na vlivech okolního prostředí
      - ne všechny **růstové faktory** mají funkci lokálních mediátorů, některé jsou vylučovány **signalizujícími buňkami** do krevního oběhu a působí na vzdálené **tkáně**
      - jako růstové faktory mohou působit i **steroidní hormony**, které narozdíl od glykosylovaných proteinů váží k **nitrobuněčným receptorům**
    - **eicosanoidy (prostaglandiny)**
      - převážně deriváty nenasyčené mastné **kyseliny arachidonové**
      - nepřetržitě syntetizovány v **plasmatické membráně** buněk všech tkání savců a uvolňovány do **extracelulárního prostředí**
      - **ovlivňují** kontrakci hladké svaloviny, agregaci krevních destiček, účastní se pochodů probíhajících při bolesti a při zánětlivých reakcích
      - **aspirin** a jiné protizánětlivé léky jejich **syntézu inhibují**
    - **NO a CO**
      - malé **hydrofóbní molekuly**, které snadno prostupují buněčnou membránou **cílových buněk** a váží se v ní na specifické nitrobuněčné receptory

- účinek je velmi **rychlý**
- NO vzniká **deaminací argininu** NO-syntasou → v cílových buňkách reaguje s guanylycyklatázou, kterou stimuluje k produkci cGMP, obdobně účinkuje i CO
- **acetylcholin** přenáší vzruch na buňky hladké svaloviny cév a odezvou je **relaxace** endotheliálních buněk cévních stěn, kterou vyvolá NO
  - na obdobném principu je založen účinek **nitroglycerinu** u pacientů s **anginou pectoris** → nitroglycerin je v organismu rychle rozložen a **uvolněný NO** roztahuje krevní cévy v srdci a tak zvyšuje průtok srdce v srdeční svalovině
  - NO se také podílí při **nespecifické obraně organismu** proti mikrobiální infekci
    - lokálně **produkován makrofágy** a **neutrofilly**, které byly aktivované mikrobiální infekcí
- **histamin**
  - secernován **žírnými buňkami** pojivové tkáně, při poškození nebo lokální infekci je rychle **uvolňován exocytózou**
  - rozšiřuje **místní krevní cévy**, které se stanou prostupné pro místní sérové proteiny (protilátky, složky komplementu) a bílé krvinky
- **kyselina retinová** - vzniká z vitamínu A1
  - jako **lokální mediátor** má zejména význam během ontogeneze obratlovců
- **přímá mezibuněčná komunikace - gap junction**
  - zprostředkována **spojením plazmatické membrány** sousedících buněk a vytvořením úzkých kanálků (gap junction) - **hydrofóbní kanály**
  - umožněna výměna malých **intracelulárních molekul** jako Ca<sup>2+</sup> nebo cAMP
  - velký význam v průběhu **embryonálního vývoje** živočichů
- **synaptická signalizace**
  - přenos signálních molekul zvaných **neurotransmitery** mezi presynaptickým zakončením axonu a postsynaptickou cílovou buňkou
  - **prostor chemické synapse**: konec axonu v těsném kontaktu s receptory cílové buňky, to umožňuje velice rychlý přenos **neurotransmiteru** (milisekundy)
  - neurotransmitery působí jako **lokální mediátory** s **parakrinním typem** signalizace
- **endokrinní signalizace**
  - buňky endokrinních žláz uvolňují většinou **hormony** do krevního řečiště
  - krví jsou přenášeny ve **vazbě na bílkoviny**, působí i na velké vzdálenosti od místa sekrece
  - **přenos** je pomalý, **koncentrace** hormonů je během přenosu snížena - jelikož hormony mohou působit i ve velmi **nízkých koncentracích**, snížení koncentrace přenosem, tak není překážkou v **působení**

## Receptory

- proteiny, které jsou schopny **specificky vázat signální molekuly** (ligandy)
- uloženy buď v **plasmatických membránách** (membránové receptory), v cytosolu anebo v některých případech i v **jádře** (nitrobuněčné receptory)
- membránové receptory lze dělit na **tři základní typy**:
  - **iontové kanály**
    - nacházejí se v **plasmatických membránách** elektricky vzrušivých postsynaptických buněk
    - rychlá **synaptická signalizace**
    - signálními látkami jsou převážně **neurotransmitery**, které přechodně otevírají nebo uzavírají iontové kanály a tím mění dráždivost buněčných membrán
    - v klidovém stavu platí, že **hladina Na a K** není uvnitř a vně buňky rovnoměrně rozptýlena, Na je více vně buňky, naopak K uvnitř buňky → při podráždění dochází k náhle **propustnosti buněčné membrány** nervové buňky a Na proudí dovnitř buňky → dochází ke vzniku **akčního potenciálu**

- např. nikotinové acetylcholinové receptory v postsynaptické membráně kosterního svalu a v nervových buňkách, neurotransmiterem je v tomto případě acetylcholin
- **receptory spojené s aktivací G proteinů**
  - všechny receptory spojené s **aktivací G proteinů** jsou evolučně příbuzné a mají obdobnou strukturu – jsou tvořeny jediným **polypeptidickým řetězcem**, který se **skládá ze tří částí**:
    - z části uložené **vně plasmatické membrány**
    - části **prostupující plasmatickou membránou**
    - části uložené **uvnitř buňky**
  - **k vnější části** se váže signální molekula, která mění **konformaci receptoru** a aktivuje ho, **k vnitřní části** se po aktivaci receptoru váží **G proteiny**
  - **G proteiny (GTP-vázající regulační proteiny)** – převádějí signál od receptoru k signálním molekulám v buňce
    - tvořeny třemi **podjednotkami** – alfa, beta, gama
    - v závislosti na **sekvenci AMK** především v podjednotce alfa existuje několik **typů G proteinů** – tyto odlišné typy aktivují odlišné enzymy, které podněcují vznik **nitro buněčných mediátorů** (sekundárních posílů)
      - např. **G<sub>s</sub> protein** aktivuje adenylátcyklasu, G<sub>q</sub> protein fosfolipasu C-beta
    - mezi G proteiny patří např. produkty **protoonkogenů** rodiny genů ras
      - **ras proteiny** se účastní především přenosu signálů, které regulují buněčnou proliferaci a diferenciaci, signál předávají **proteinkinásám**, které se nacházejí v cytosolu
    - **proteinkinasy** jsou enzymy, které přenášejí na protein fosfát z ATP nebo GTP, jde o **posttranslační úpravy bílkovin**, které souvisí s jejich funkcí, tímto procesem dochází buď k **maturaci proteinu** nebo dojde k jeho inaktivaci
  - **aktivace adenylátcyklasy alfa-podjednotkou G<sub>s</sub> proteinu**
    - **ligand-receptorový komplex** mění konformaci cytoplasmatické oblasti receptoru
    - to umožní vazbu **receptoru s alfa podjednotkou G<sub>s</sub> proteinu**, na kterou je navázán GDP
    - po připojení G<sub>s</sub> proteinu k receptoru dojde k **disociaci GDP** a jeho nahrazení **GTP**
    - po vazbě alfa podjednotky s GTP se alfa podjednotka oddělí od **dimeru beta gama** a od receptoru
    - **oddělená podjednotka** alfa s navázaným GTP se váže na adenylátcyklasu, která je uložena na **vnitřní straně** cytoplasmatické membrány
    - po **hydrolyze GTP** se alfa podjednotka G<sub>s</sub> proteinu oddělí od adenylátcyklasy
    - alfa podjednotka se vrací k **původní konformaci**, spojí se s dimerem beta gama (vytvoří se znovu inaktivní **G<sub>s</sub> protein** s trimérem uspořádáním), adenylátcyklasa se tímto **procesem aktivuje**
    - **aktivace adenylátcyklasy** vede k syntéze cAMP, ta účinkuje jako intracelulární **signální molekula**, množství syntetizovaného cAMP závisí na konkrétním typu **ligand-receptorového komplexu**
    - cAMP aktivuje především **proteinkinasu A**
      - se skládá z komplexu dvou **katalytických** a dvou **regulačních podjednotek** – každá regulační podjednotka má dvě vazebná místa pro cAMP
      - navázání více než dvou **molekul cAMP** k regulačním podjednotkám vede ke změně jejich **konformace** a důsledkem je uvolnění z **komplexu**
    - **katalytické podjednotky** proteinkinasy A se takto staly aktivními a fosforylují seriny a threoniny regulačních proteinů
    - na aktivaci **proteinkinasy A** je například závislý metabolismus glykogenu v **buňkách kosterního svalu**
      - syntéza a **degradace glykogenu** ve svalových buňkách je regulována **adrenalinem** – zvýšení hladiny cAMP stimuluje jak štěpení glykogenu

tak potlačuje jeho syntézu, konečným výsledkem je zisk maximálního množství glukózy

- **aktivace fosfolipasy C-beta G<sub>q</sub> proteinem**
  - tato signální dráha se nazývá **inositol-fosfolipidní signalizace** a výsledkem je zvýšení Ca<sup>2+</sup> v cytosolu s následnou aktivací proteinkinasy C-beta
  - přenos signálu od receptoru k **fosfolipase C-beta** probíhá obdobně jako při aktivaci **adenylátcyklasy**
  - aktivovaná fosfolipasa C-beta štěpí na vnitřní straně cytoplasmatické membrány fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>), jeho hydrolýzou vznikají **dva produkty**:
    - **inositol-1,4,5-trifosfát (IP<sub>3</sub>)** - rychle opouští plasmatickou membránu a difunduje cytosolem k **endoplasmatickému retikulu**, zde se váže k Ca<sup>2+</sup> kanálkům, to umožní jejich otevření a uvolnění Ca<sup>2+</sup> z endoplasmatického retikula do **cytosolu** - IP<sub>3</sub> je rychle defosforylován **specifickými fosfatasami** a tím je inaktivován
      - ve svalových ale i jiných buňkách existuje kromě Ca<sup>2+</sup>-kanálků v endoplasmatickém retikulu **analogický typ** kanálků v sarkoplasmatickém retikulu
      - Ca<sup>2+</sup> je **intracelulární mediátor**, který je využíván k široké škále buněčných aktivit, druhý **způsob vstupu** Ca<sup>2+</sup> do cytosolu je prostup iontovými kanály, jejichž funkce je **řízená napětím**
      - koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů v **cytosolu** je velice nízká (10<sup>-7</sup>M), zatímco v **extracelulární tekutině** a endoplasmatickém retikulu je vysoká - tento rozdíl vyvolává napětí, které vede k **rychlému vstupu** Ca<sup>2+</sup> do cytosolu jakmile se Ca<sup>2+</sup> kanálky v plasmatických nebo endoplasmatických membránách **přechodně otevřou**
      - nízkou hladinu Ca<sup>2+</sup> pomáhá v buňce udržovat celá řada molekul, **zásadní úlohu** má buněčný protein kalmodulin
      - Ca<sup>2+</sup>/kalmodulinový komplex se většinou nepřímo **účastní fosforylace serinů a threoninů** cílových proteinů, komplex se váže s **proteinkinasami** (např. myosinkinasa) a ty uskutečňují vlastní **fosforylaci** serinů a threoninů
    - **1,3-diacylglycerol** - má dva možné signalizační účinky
      - **štěpením** (deacylací) diacylglycerolu se může uvolňovat kyselina arachidonová a ta buď sama účinkuje jako přenašeč signálu anebo se může účastnit při **syntéze eicosanoidů** a ty se pak podílejí na přenosu signálu
      - druhý účinek souvisí s **aktivací serin/threoninové proteinkinasy C** - 1,2-diacylglycerol po svém vzniku zůstane v membráně a spolu s Ca<sup>2+</sup> a negativně nabitým membránovým, fosfolipidním fosfatidylserinem aktivuje serin/threoninovou proteinkinasu C
      - **stimulovaná proteinkinasa C** fosforyluje seriny a threoniny cílových proteinů, například v nervových buňkách mozku se účastní fosforylace proteinů **iontových kanálů**, v jiných cílových buňkách se podílí na **transkripci některých genů** regulujících **buněčnou proliferaci**- **receptory s enzymovou aktivitou**
  - **transmembránové proteiny** s vazebnou oblastí pro ligandy ležící na zevní straně plasmatické membrány
  - **vazba s ligandem** mění konformaci receptoru a aktivuje ho, na vnitřní straně membrány dochází k **přenosu signálu** aktivací intracelulárních proteinkinás
  - dělíme je do skupin podle **typu enzymu**:
    - **receptory s tyrosinkinasovou aktivitou**
      - převážně receptory většiny **růstových a diferenciačních faktorů** jako například EGF (epidermální růstový faktor), PDGF (od destiček

odvozený růstový faktor), **IGF-1** (insulinu podobný růstový faktor) a receptor pro **insulin**

- po vazbě ligandu k receptoru dochází k jeho **aktivaci** a k přenosu fosfátové skupiny z **ATP** na specifické tyrosiny, fosforylovány jsou buď tyrosiny samotných **receptorových proteinů** nebo tyrosiny specifických **buněčných proteinů** – tím je zahájena kaskáda nitrobuněčného **přenosu signálu**
- **ras proteiny** patří mezi významné intracelulární signální proteiny, které se prvořadě podílejí na **přenosu signálu od receptoru** s tyrosinkinaseovou aktivitou do **nitra buňky**, kde uvádějí v činnost serin/threoninovou **fosforylační kaskádu**
  - ras proteiny jsou ukotveny v **cytoplasmatické části plasmatické membrány**
  - patří do rodiny monomerních GTPas (na rozdíl od G proteinů – **trimerické GTPasy**)
  - ras proteiny jsou **fosforylovány** (aktivovány) receptorovými tyrosinokinásami, inaktivovány **fosfatásami** a hydrolýzou GTP, kterou samy uskutečňují
- další **přenos signálu** z ras proteinů je zajištěn fosforylací serinů a threoninů **MAP-proteinkinas**
  - **fosforylace** těchto serinů a threoninů má delší trvání než fosforylace **tyrosinů proteinů ras**
  - ras proteiny fosforylují a tím aktivují **kaskádu tří typů** MAP-kinas, aktivovaná třetí MAP-kinasa po vstupu do jádra fosforyluje nejprve **regulační protein**, který je vázán ke krátké sekvenci DNA v regulační **oblasti genů časně odpovědi** – genu myc, jun a fos, tím dochází k jejich transkripci
  - **produkty genů** myc, jun a fos stimulují transkripci genů **pozdní odpovědi** – produkty genů pozdní odpovědi se účastní regulace **buněčné proliferace**
    - patří mezi ně například **hlavní složky řídicího systému** buněčného cyklu – cykliny a cyklin-dependetní proteinkinasy
- **receptory s připojenou tyrosinkinaseovou aktivitou**
  - se liší od receptorů s **tyrosinkinaseovou aktivitou** tím, že tyrosinase je v tomto případě kódována **dalším samostatným genem** (např. protoonkogenem src) a je nekovalentně připojena k cytoplasmatické části receptorového polypeptidového řetězce
  - například receptory pro **většinu cytokinů**, které regulují proliferaci a diferenciaci buněk **hemopoetického systému**, antige-specifické receptory na T a B lymfocytech, receptory hormonů (např. růstový hormon, prolaktin)
- **receptory s tyrosinfosfatasovou aktivitou**
  - specifická aktivita těchto enzymů zajišťuje, že **fosforylace tyrosinů** trvá velmi krátkou dobu, a že v klidových buňkách je tyrosinů fosforylováno **velmi málo**
  - příkladem **tyrosinfosfatasového receptoru** je membránový glykoprotein CD45, který se nachází na povrchu **bílých krvinek** – účastní se aktivace B a T lymfocytů po setkání s **cizími antigeny**
- **receptory s guanylátcyklozovou aktivitou**
  - například receptory vázající **atriální natriuretické peptidy** (ANPs), což je skupina **peptidových hormonů** nacházejících se v buňkách ledvin a v buňkách **hladké svaloviny cév** – reagují na zvýšení TK a navozují relaxaci **svalových buněk** ve stěnách krevních cév, to vede ke **snížení TK**

## Regulace buněčné signalizace

- přenos signálu je přesně regulován tak, aby všechny **buněčné pochody** byly koordinovány
- regulace se uskutečňuje na **základě zpětné vazby**
- může být realizována **změnou množství funkčních membránových receptorů** – jejich počet může být snížen/zvýšen podle **potřeb buňky**
  - receptory mohou být **redukovány endocytózou** ligand-receptorového komplexu a jeho následnou **degradací v lysosomech** nebo uskladněním receptorů v **intracelulárních váčcích**
  - dále mohou receptory zůstat na **buněčném povrchu**, ale mohou být změněny tak, že nejsou schopny **navázat ligand** anebo vážou ligandy, ale ligand-receptorový komplex vytvoří konformaci, která není schopna vyvolat **příslušnou signální dráhu**
- **přenos signálu** může být mimo regulaci receptorů regulován i na úrovni **převodních systému v buňce**

## 24. Mitosa, její regulace a poruchy

- **buněčné dělení** má význam pro **uchování a přenos** genetické informace **mezi buňkami** jedince a **mezi generací** rodičů a potomků
- dělení probíhá dvěma způsoby – **mitosa a meiosa**

### Mitosa

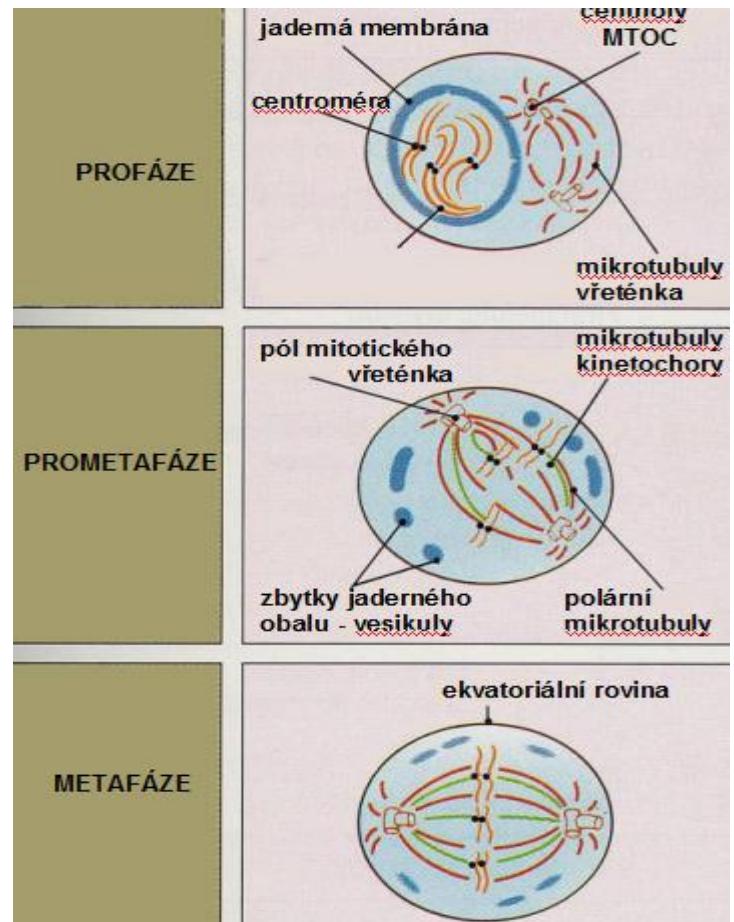
- proces **dělení somatických buněk** mnohobuněčných organismů
- během tohoto dělení vznikají z **jedné mateřské buňky** dvě **identické buňky dceřiné** – mají stejnou **genetickou výbavu** jako buňka mateřská
- **proces segregace chromosomů** do dceřiných buněk je zajištěn komplexním **cytoskeletárním zařízením** – mitotickým dělicím vřeténkem
- **první dělení** ve vývoji jedince jsou **rýhování zygoty**, **další dělení** zajišťují **růst, diferenciaci a obnovu** orgánů a tkání
- mitosa je součástí **buněčného cyklu**
- **M-fáze** buněčného cyklu sestává z rozdělení jádra (**karyokineze**, mitosa) a rozdělení cytoplazmy (**cytokineze**)
- nezbytnou podmínkou pro správný průběh mitosy je předchozí **replikace** v S fázi buněčného cyklu, kdy dochází ke zdvojení veškeré **chromosomální DNA**
- během vlastní mitosy se pak DNA ve formě **spiralizovaných chromosomů** rovnoměrně rozdělí do **dceřiných jader**
- obdobně v **S-fázi** musí proběhnout i **duplikace centrosomu**
- mitotické dělení je **kontinuální**, lze jej ale rozčlenit do **5 stádií** – profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze
- **profáze**
  - chromosomy se **zkracují**, kondenzují a stávají se postupně viditelnými v optickém mikroskopu
  - **jaderný obal** zachován, **jadérka** se rozpadají až zcela vymizí
  - začíná tvorba **dělicího vřeténka**, dosud mimo jádro
  - **centrosomy** neboli **mikrotubulární organizační centra** se pohybují směrem k pólům buňky
  - základem **centrosomů** je dvojice **centriolů** orientovaných kolmo na sebe obklopená **centrosomovou matrix** (pericentriolární materiál)
  - centrioly jsou krátké útvary **válcovitého tvaru**, každý tvořený devíti trojicemi **mikrotubulů**
  - z centrosomů radiálně vyrůstají **mikrotubuly** dělicího aparátu, každý ze svého **nukleačního centra**, očka
  - každý centrosom má **sadu mikrotubulů** a jejich interakcí se vytvoří vřeténko
  - mikrotubuly jsou tvořeny **heterodimerními podjednotkami** alfa a beta tubulinu
  - jsou **polarizované** – určeno orientací tubulinových heterodimerů
  - každé vlákno má tedy **plus konec** (ve směru beta podjednotky) a **minus konec** (ve směru alfa podjednotky)

- svým minus koncem jsou **mikrotubuly** ukotveny k **centrosomu** a na plus konci se **zkracují** nebo **prodlužují** odbouráváním nebo připojováním **tubulinových podjednotek**
- potřebná **energie** je získávána hydrolýzou navázaných **molekul GTP**

- **prometafáze**

- někdy označována jako **pozdní profáze** nebo **časná metafáze**
- rozpadá se **jaderný obal** a chromosomy se rozptýlí v celé buňce
- **kondenzace chromosomů** pokračuje
- vhodná fáze pro chromosomální vyšetření s **vysokou rozlišovací schopností (HRT)**
- **centrosomy** dosahují pólů a s **mikrotubuly** tvoří dělicí vřeténko
- rozpad jaderného obalu umožní **kontakt mikrotubulů s chromosomy**, mikrotubuly je aktivně vyhledávají a zachycují je v cytoplazmě
- prostřednictvím **kinetochorů** se chromosomy připojují k **mikrotubulům dělicího aparátu**
- **kinetochory**

- útvary s komplexní **trilaminární proteinovou strukturou** a jako celek se utvářejí v pozdní profázi
- jsou lokalizovány v oblasti **centromery** každého chromosomu
- v elektronovém mikroskopu složitá struktura, ne zcela prozkoumaná
- tvoří je vnější a vnitřní **elektrondenzní vrstva**, mezi nimiž je tenká **elektrotransparentní interzóna**
- **vnitřní vrstva** slouží k propojení s **centromerickým heterochromatinem** a má zřetelné **chromatinové uspořádání**, přetrvává po celou dobu **buněčného cyklu** v podobě vnitřní **kinetochorové destičky**
- vnější vrstva je **dynamickou strukturou**, kterou tvoří mnoho proteinů a je přítomna pouze v **mitose**
- zajišťuje kontakt a **napojení mikrotubulů vřeténka**



- správné **napojení chromosomů** k vřeténku musí být **bipolární** – tzn. k mikrotubulům z obou pólů současně

- **metafáze**

- chromosomy jsou **maximálně kondenzovány** a dostupné pro rutinní vyšetření **karyotypu**
- **aktivní činností dělicího aparátu** se postupně řadí v **ekvatoriální rovině** kolmé na osu vřeténka
- mikrotubuly dělicího vřeténka se **zkracují** (depolymerizují) nebo **prodlužují** (polymerizují) dle **aktuální potřeby**
- v rámci vřeténka se rozlišují **3 druhy mikrotubulů**
- **polární**
  - překryvné, interzonální
  - směřují od **opačných pólů** do **středu buňky**, kde se navzájem částečně **překrývají**
  - odpovídají za **symetrický** a **bipolární** tvar **dělicího vřeténka**
- **kinetochorové**
  - upínají se na **kinetochory** jednotlivých chromosomů a **interagují** zde s proteiny zevní vrstvy **kinetochorů**



- zkracováním nebo prodlužováním těchto vláken převážně na jejich plus konci se chromosomy přesouvají do **středu buňky** – ekvatoriální rovina
- **astrální**
  - směřují od **pólů** do **všech stran**
  - podílejí se na **oddalování pólů** v průběhu anafáze a slouží k **orientaci** a udržení správné pozice **centrosomů** a celého vřeténka v buňce
- **metafáze** trvá tak dlouho, dokud se **všechny chromosomy** neseřadí v **ekvatoriální rovině**
- kinetochory dosud nepřipojené k mikrotubulům vřeténka vysílají **inhibiční signál** oddalující **nástup anafáze**
- dohled nad tímto dějem má **metafázní (mitotický) kontrolní bod** sledující připojení **chromosomů k vřeténku**
- určité **chemické látky** mohou tento kontrolní bod **aktivovat** a zastavit **metafázi** na několik **hodin až dní**
- např. **kolchicin** se váže na volné **tubulinové podjednotky**, způsobuje **depolymerizaci mikrotubulů** a znemožňuje tak napojení **kinetochotů** (nenastoupí anafáze)

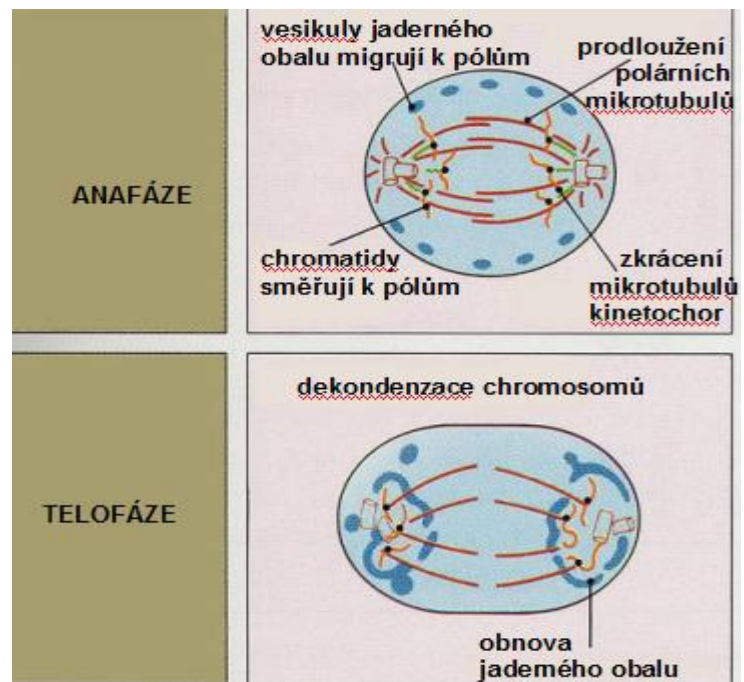
- **anafáze**

- začíná náhle oddělením **sesterských chromatid** jednotlivých chromosomů po celé jejich délce
- **oddělené chromatidy** se stávají samostatnými chromosomy
- v anafázi se rozlišují **dva procesy** – anafáze A a B
- **anafáze A**

- pohyb chromosomů k **pólům vřeténka**
- zajištěn **zkracováním kinetochorových vláken** převážně na plus konci a zároveň **aktivním pohybem** kinetochorů podél mikrotubulů

- **anafáze B**

- následné samotné **oddalování pólů vřeténka** od sebe a tím celkové **prodlužování buňky**
- k tomuto ději dochází s určitým **zpožděním** po oddělení sesterských chromatid
- na oddalování pólů se podílí **prodlužování polárních vláken** a jejich vzájemný antiparalelní pohyb
- v **ekvatoriální zóně**, kde se vlákna překrývají, dochází k jejich posouvání podél sebe navzájem a k další **polymerizaci** jejich plus konců
- druhou aktivní složkou **pohybu pólů** od sebe je **zkracování astrálních vláken** a tažení pólů k okraji buňky
- proces **oddalování pólů** se zastavuje, když vřeténko dosáhne dvojnásobku své délky v metafázi



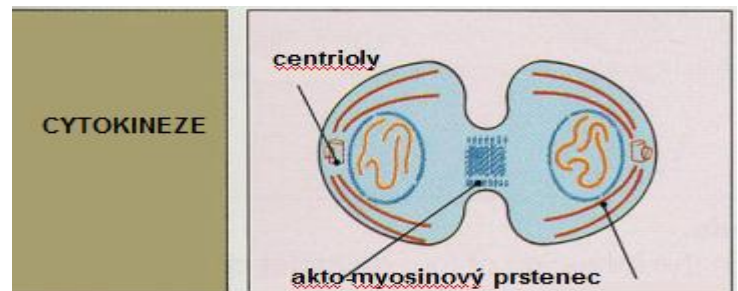
- **anafáze** je velmi rychlá, trvá jen **několik minut**

- pohybové děje v jejím průběhu jsou způsobeny **činností mikrotubulárních motorů**

- **mikrotubulární motory**

- zajišťují veškeré **pohyby spojené s pohybem chromosomů**, centrosomů nebo pólů vřeténka a také s posunem mikrotubulů v jednotlivých fázích mitózy
- **motor proteiny** se vážou na konce nebo v blízkosti konců polarizovaných vláken a užívají **energii získanou hydrolýzou ATP** k pohybu podél vláken
- existují dva typy – **dynein** a **kinesin**

- **kinesiny**
  - pohyb **směrem k plus konci** nebo na protisměrný pohyb polárních mikrotubulů ve středu buňky v anafázi (bipolární motory)
  - jsou **aktivní v mitose a meiose** a při vlastním rozdělení buňky
- **dyneiny**
  - pohyb **směrem k mínus konci**
  - **nejrychlejší motory** vůbec
- aktivní pohybové děje v anafázi **zajišťují mnohé motory**
- pohyb chromosomů k pólům je kromě **zkracování kinetochorových vláken** působen **aktivní činností motorů** na kinetochorech
- tyto motory umožňují **klouzáni chromosomů** podél mikrotubulů k pólům
- oddalování pólů při **anafázi B** je způsobeno kombinací opačných sil tahových a tlakových – **tažná síla** jsou motory mezi astrálními vlákny a buněčnou stěnou, **tlaková síla** jsou bipolární motory, přemostřující překrývající se vlákna s opačnou polaritou v ekvatoriální rovině
- za **současného prodlužování** polárních mikrotubulů na plus konci se tato vlákna po sobě posouvají a roztlačují tak póly vřeténka od sebe



- **telofáze**
  - pokračuje proces **oddalování pólů** a prodlužování dělicího vřeténka
  - kolem chromosomů na pólech buňky se tvoří **jaderný obal** a chromosomy se postupně dekondují a opět přestávají být pozorovatelné
  - vytváří se také znovu **jadérko**
- **cytokineze**
  - dokončení **M-fáze**, rozdělení cytoplazmy navazující **bezprostředně na mitosu**
  - tento děj se liší v **rostlinách**, kde se tvoří přepážka ze středu k obvodu buňky, a u živočichů, kde dochází k **zaškrvení** od obvodu ke středu
  - na obvodu **živočišné buňky** se vytvoří **kontraktilní prstenec** z aktinových a myosinových mikrofilament
  - **akrívni kontrakcí prstence** vzniká dělicí rýha, která se prohlubuje až buňku postupně přeškrtní na dvě buňky dceřiné

### Regulace mitozy

- **G2/M kontrolní bod** – buněčný cyklus je blokován, je-li
  - nepříznivý **buněčný růst**
  - nepříznivé **okolní podmínky**
  - poškozena DNA
- **metafáze/anafáze kontrolní bod**
  - v případě špatného či neúplného napojení **dělicího vřeténka (mikrotubulů)** na kinetochory jsou produkovány látky **bránící nástupu anafáze** – kolchicin např.

## 25. Meiosa, její regulace a poruchy

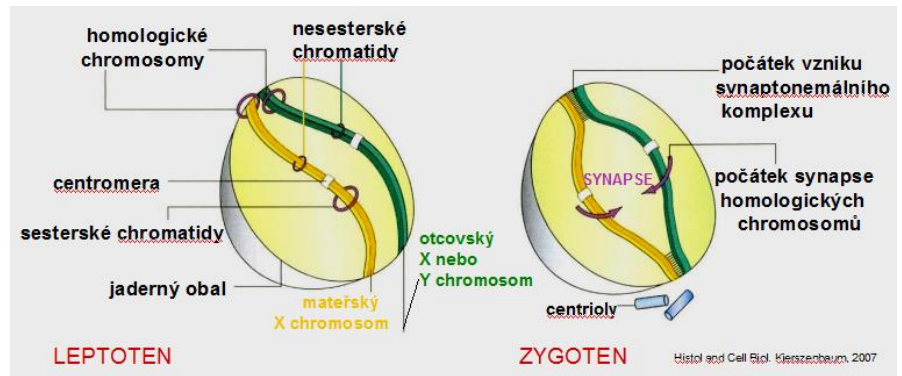
### Meiosa

- specializovaný **dvoustupňový typ** jaderného dělení, jímž vznikají **pohlavní buňky** – gamety
- gametogenezi lze označit jako zrání, proto se meiose někdy říká **dělení zrání**
- meiosa je podobně jako mitosa podmíněna **replikací DNA** v S fázi buněčného cyklu – buňky vstupující do meiosy mají tedy **diploidní počet** dvouchromatidových chromosomů
- při meiose probíhají dvě odlišná **jaderná dělení** po sobě
  - **meiosa I**
    - redukční nebo heterotypické dělení

- dochází k **redukci** počtu chromosomů na  $1n$  – diploidní počet na haploidní
- **meiosa II**
  - dělení ekvační neboli homeotypické
  - probíhá obdobně jako **mitosa**
- výsledkem jsou **4 buňky** s haploidním počtem chromosomů
- splnutím **2 haploidních gamet** při oplození tedy vzniká zygota, která má opět diploidní chromosomální výbavu – procesem **fertilizace** je tedy střídání diploidních a haploidních fází ukončen

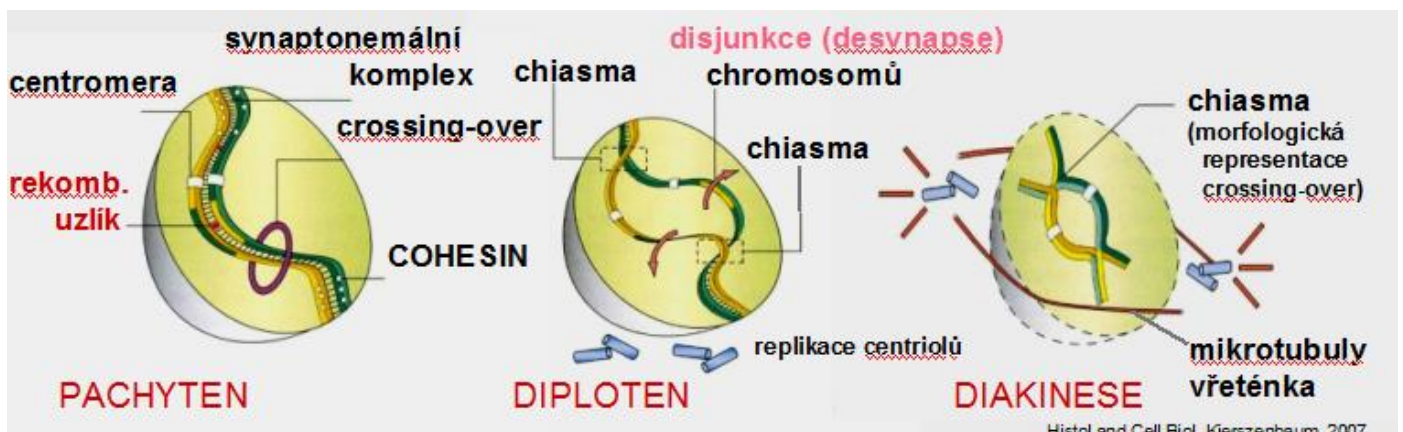
## Meiosa I

- probíhají tu **specifické procesy**, které významně odlišují meiosu od mitosy a mají charakteristické **genetické důsledky**
- podobně jako v mitose tu rozlišujeme profázi, metafázi, anafázi a telofázi
- **profáze I**
  - nejdelší **období** celé meiosy
  - chromosomy na začátku profáze I jsou tvořeny **dvěma sesterskými chromatidami**
  - zdvojení chromatid nastává v předcházející S fázi replikací DNA chromosomů
  - profáze se dělí do **5 fází**
  - **leptotén**
    - chromosomy se začínají **kondenzovat** a stávají se viditelnými jako velmi tenká dlouhá vlákna
    - sesterské chromatidy jsou k sobě těsně **přiložené**, opticky zatím splývají v jedno vlákno



- **zygotén**
  - homologní chromosomy se navzájem **vyhledávají** zatím neznámým mechanismem
  - začínají se **párovat** a postupně k sobě přiléhají po celé délce, těsné spojení homologních chromosomů se nazývá **synapse**
  - odpovídající úseky DNA se k sobě přikládají obvykle **lineárně** a vytváří se tak struktura zvaná **bivalent**
  - výjimkou jsou u člověka **chromosomy X a Y**, které nepředstavují klasický **homologní pár**, přesto mezi nimi dochází k **synapsi**
  - v časně fázi se párují homologní segmenty v tzv. **pseudoautosomálních oblastech**, jež se vyskytují na obou koncích chromosomů X i Y
  - v pozdější fázi se párují i určité **přilehlé oblasti**, většina délky X a Y však zůstává nespárována
  - proces tvorby synapse je **komplikovanější** také v případě chromosomálních **strukturních aberací**, kdy jsou při párování homologních oblastí vytvářeny struktury odlišných tvarů
  - v přítomnosti **inverze** způsobuje synapse vznik inverzní **smyčky**, u reciproké translokace vzniká **tetravalent** a u Robertsonovy translokace **trivalent** apod.
- **pachytén**
  - proces párování homologů **dokončen**
  - chromosomy těsně spojeny pomocí speciální **proteinové struktury** – **synaptonemální komplex**
  - komplex tvoří dva **laterální elementy** a centrální žebříčkovitý element uprostřed
  - každý **laterální komplex** představuje proteinovou osu jednoho **homologního chromosomu** a je podélně přiložen k oběma **sesterským chromatidám**

- z **laterálního elementu** radiálně vybíhají smyčky chromatinových vláken a **centrální element** je s laterálními propojen transverzálními filamenty
- v tomto stavu přetrvávají i **několik dní**
- základním účelem **synaptonemálního komplexu** je zajištění přesného párování odpovídajících úseků DNA, čímž se podílí na **bezchybné rekombinaci**
- **spiralizace chromosomů** pokračuje, mají nyní vzhled hrubších vláken s nerovnoměrně barvitelnými oblastmi
- začíná být pozorovatelné **dvouchromatidové složení** jednotlivých chromosomů
- v tomto stádiu také probíhá **rekombinace DNA** mezi nesesterskými chromatidami homologních chromosomů – **crossing over** (překřížení a výměna chromosomálních segmentů)
- vlastní **výměna úseků DNA** může nastat i mezi chromatidami sesterskými, ale v tom případě se nejedná o **rekombinaci** v pravém slova smyslu, protože vyměněné úseky nesou **identickou genetickou výbavu**
- pravděpodobné místo, kde probíhá proces **crossing overu** odpovídá místu výskytu tzv. **rekombinačního uzlíku** (nodulu)
- rekombinační uzlíky nasedají na **centrální element synaptonemálního komplexu** a pravděpodobně obsahují řadu enzymů pro správnou rekombinaci



- **diplotén**
  - **homologní chromosomy** se začínají oddělovat, synaptonemální komplex se odbourává (desynapse)
  - v místech **crossing overu** zůstávají chromosomy navzájem spojené, tato místa jsou tzv. **chiasmata**
  - rozložení chiasmata není pravidelné, mohou se vyskytovat **kdekoli** na chromosomu
  - existují ale místa, kde dochází ke crossing overu častěji – **rekombinační „hotspots“** a naopak i místa s málo pravděpodobným výskytem (např. pericentromerická oblast)
  - je možno vyzpozorovat i jev **interference chiasmata**, tzn. snížení pravděpodobnosti vzniku chiasmatu v blízkosti výskytu jiného (mechanismus zatím nejasný)
  - u člověka obvykle nacházíme **1-3 chiasmata** na každém homologním páru (podle velikosti chromosomů), celkově nacházíme **40-50 chiasmata** v jedné buňce
  - pro zajištění **správné segregace** v dalším průběhu prvního meiotického dělení se i na nejmenším chromosomu vyskytuje alespoň **jedno chiasma**
  - v každém **bivalentu** jsou již zřetelně rozpoznatelné **čtyři chromatidy**, celou strukturu homologního páru chromosomů označujeme **tetráda**
- **diakineze**
  - chromosomy se maximálně **kondenzují** a **zkracují**
  - bivalenty s chiasmata mají tvar **křížků**, kroužků a dalších figur
- **metafáze I**
  - na začátku mizí **jaderný obal**, jako u mitosy
  - tvoří se dělicí **vřeténko**

- páry homologních chromosomů jsou pomocí kinetochorů připojeny k mikrotubulům dělicího aparátu a řadí se v **ekvatoriální rovině** buňky
- **chiasmata** udržují homologní chromosomy **pohromadě** až do začátku anafáze I
- nejdříve jsou chiasmata lokalizována v místě **crossing overu**, později dochází k jejich posunu směrem ke koncům chromatid (**terminalizace chiasmata**)
- **anafáze I**
  - po rozpojení chiasmata se homologní chromosomy **rozcházejí** k opačným pólům vřeténka, každý tvořený dvěma **sesterskými chromatidami**
  - tento moment je klíčový pro celou meiosis – **diploidní počet** se redukuje na haploidní, polovinu
  - rozchod chromosomů maternálního a paternálního původu **k pólům** probíhá zcela náhodně a nezávisle, jak odpovídá **Mendelovu zákonu** o nezávislé kombinovatelnosti vloh
  - vzniká velký počet **různých kombinací**, u **člověka**  $2^{23}$  a při účasti crossing overu je počet kombinací ještě mnohem větší
- **telofáze I**
  - haploidní sady chromosomů se shlukují na **pólech buňky**, vznikají dvě dceřiná jádra a po rozdělení cytoplazmy i dvě **dceřiné buňky**
  - tato fáze je krátká, průběh velmi **variabilní**
  - následuje **interkineze** (analogie s mitotickou interfází, nedochází ale k replikaci DNA)
  - chromosomy se dočasně **despiralizují**, interkineze je velmi krátká a u některých druhů úplně chybí
  - buňka poté vstupuje do **II. zrcího dělení**

## Meiosa II

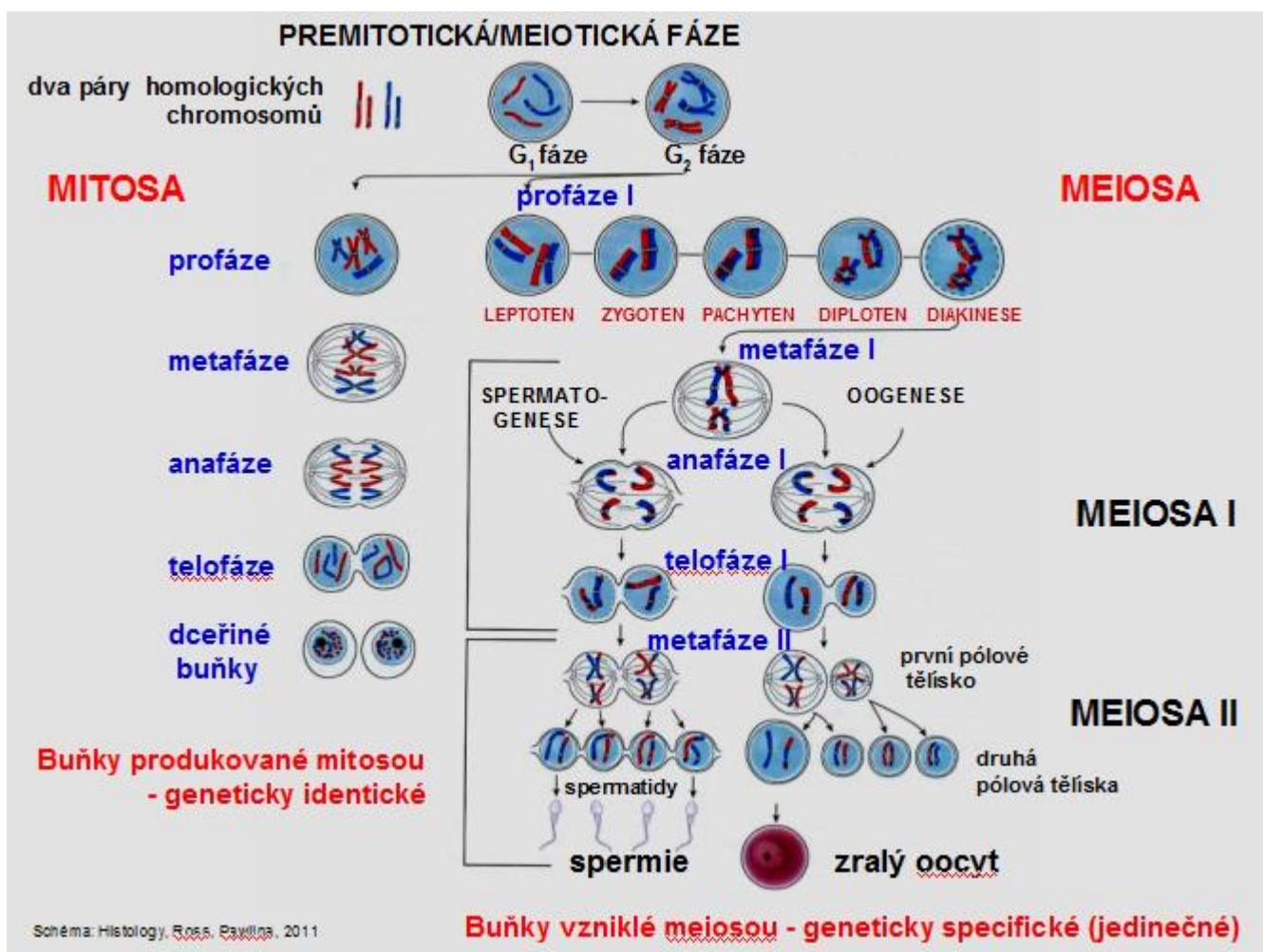
- proces velmi **podobný mitose**, ale celkový počet chromosomů je haploidní
- v **metafázi II** se chromosomy tvořené dvěma sesterskými chromatidami srovnávají v ekvatoriální rovině a osa dělicího vřeténka je kolmá na **osu vřeténka meiosis I**
- v anafázi II se k opačným pólům rozcházejí **sesterské chromatidy** jednotlivých chromosomů
- konečným produktem **meiosis** jsou tedy 4 buňky s haploidním počtem chromosomů, představovaných každý **jednou chromatidou**
- mezi tvorbou mužských a ženských gamet existují značné **rozdíly**

Fáze meiosis	Počet chromosomů	Počet chromatid
profáze I	2n	4n
telofáze I	n	2n
profáze II	n	2n
telofáze II	n	n
gamety	n	n

## Význam a důsledky meiosis, regulace a poruchy

- jednobuněčné organismy se rozmnožují **mitosou**, rostliny se mohou množit vegetativně výhonky apod. a např. nezmar se množí pučením
- tento způsob rozmnožování (nepohlavní, asexuální reprodukce) je **přímý**, jednoduchý a geneticky konzervativní, potomci jsou ale **identičtí** s rodiči a mezi sebou
- **pohlavní rozmnožování** (sexuální reprodukce) je evolučně mladší a charakterizuje jej **střídání** diploidních a haploidních jaderných fází
- pro průběh je nezbytná tvorba vysoce **specializovaných haploidních buněk** – gamet, které vznikají meiotickým dělením
- v procesu **fertilizace** pak dvě gamety splynou a obnoví se tak diploidní počet chromosomů v zygote a tedy i v celém **organismu potomka**
- meiotické dělení s redukcí počtu chromosomů je mechanismus **zvyšující genetickou variabilitu**
- vyvinulo se jako **fylogeneticky výhodný jev** doprovázející pohlavní rozmnožování

- vznik nových kombinací alel přináší nositelům **odlišné vlastnosti** a charakteristiky pozitivní i negativní, jedincům s výhodnou genetickou **výbavou** umožňuje lepší adaptaci při změnách zevního prostředí
- většina rostlin a živočichů se proto adaptovala na tento **typ množení**
- proces meiosis je příčinou obrovské variability mezi **jedinci téhož druhu**
- každá z gamet vzniklá meiosou je odlišná od druhé a **každý jedinec** (kromě homozygotních dvojčat) je geneticky odlišný od **ostatních**
- na této variabilitě se podílí nezávislá **segregace paternálních a maternálních chromosomů** v meiose I a rekombinace úseků DNA homologů při crossing overu
- spojení samčí a samičí gamety je rovněž **náhodné**
- **poruchy**
  - správný proces segregace homologních chromosomů v meiose I a segregace sesterských chromatid v meiose II se označuje **disjunkce**
  - nastane-li v některém z těchto procesů chyba, správný rozchod je narušen a vytváří se gamety s chybnou genetickou výbavou – **nondisjunkce**
  - ke správnému rozchodu homologů přispívá i **crossing over** a **chiasmata**
  - při selhání tvorby chiasmata může dojít k předčasnému **oddělení chromosomů** a k nepravdělné segregaci do dceřinných buněk
  - **nondisjunkce** pak vede k aneuploidiím apod.
- **regulace**
  - pro správný průběh meiosis je podstatný **synaptonemální komplex** a následně **chiasmata**



## 26. Crossing-over, jeho mechanismus a význam

- rekombinace části chromosomu při **meiose I** (pachytén)
- k výměně **chromosomálních segmentů** nesesterských chromatid homologního chromozomu dochází v **pachytenním stádiu** meiózy I.
- jedná se o dočasné splynutí **2 homologních chromosomů** se vzájemnou výměnou jejich částí = **překřížení chromosomů**
  - nejprve dojde k **dočasnému splynutí** dvou homologních chromozomů
  - poté se rozpojí **dvoušroubovice DNA** obou rekombinujících se chromatid
  - následuje vzájemná **výměna jejich částí** = překřížení chromozomů
- vznikají **nové kombinace** uvnitř chromosomu - určitá **část chromosomu** je totožná s chromosomem původní mateřské **soupravy**, kdežto jiná část téhož chromosomu je stejná, jako byla u **otce**
- vznikají nová **chromosomová individua**, která se pak po oplození v dalších buněčných generacích **reduplikují** a jsou předány jako celky dalším generacím tak dlouho, dokud na nich opět nedojde k **novému překřížení**
- rekombinace genů vzniklá **překřížením** má význam pro evoluci - dostanou-li se některé geny do sousedství s geny novými, mohou vznikat **nové formy znaků** a je-li nový znak prospěšný v procesu **přírodního výběru**, pak se příslušný chromosom dědí do dalších pokolení jako **nový celek**
- **nevhodné kombinace** jsou přirozeným výběrem - smrtí svých nositelů - **eliminovány**
- tato operace, tedy **výměna genetické informace**, je pro genetické algoritmy velmi důležitá
- během crossing overu dojde k roztržení původních **genetických popisů** obou předků na části a jejich vzájemné výměně - **výsledný genotyp** potomka je pak složen z vyměněných částí genotypu předků
- tento proces je řízen náhodně; místo, kde se oba rodičovské popisy "rozstříhnou" a následně "slepi" dohromady, je vybráno neviditelnou rukou evoluce
- **průběh**
  - v profázi I se k sobě **homologní chromozomy** přiblíží, až se díky synaptonemálnímu komplexu spojí v jeden útvar, tzv. **bivalent**
  - u bivalentů dochází k **překřížení, zlomům, rozpojením a znovuspojení** chromatid, výsledkem čehož může být výměna úseků chromatid
  - po rozpadu synaptonemálního komplexu od sebe chromozomy **podstoupí**
  - sesterské chromatidy jsou navzájem spojeny v **centromerách** (tvoří jeden chromozom), nesesterské, jež se překřížily, jsou spojeny v „**chiazmatech**“ (0 až 2 na jeden crossing over), která zaniknou později
  - poté se dokončí **redukční dělení**
  - výsledkem správně provedeného crossing-overu je výměna **odpovídajících úseků** chromatid a tudíž prohození alel na těchto úsecích lokalizovaných genů mezi chromatidami homologních chromozomů: tj. **narušení vazby genů** a vznik nové kombinace alel na jednom chromozómu, což zvyšuje **variabilitu potomstva**
  - v případě nesprávně provedeného crossing overu (vymění se odlišné úseky chromatid), vzniká **mutace**, jejíž nebezpečnost se liší případ od případu
  - zpravidla jde o **mutaci chromozómovou**, pokud však díky crossing-overu jeden z chromozomů ztratí centromeru, může celý defekt ve výsledku vyústit až v **genomovou mutaci** v dceřiných buňkách
- **rozlišujeme**
  - **jednoduchý crossing-over** (vzniká na základě jednoho překřížení a chromatidy si při něm prohodí konce)
  - **vícenásobný crossing-over**, ke kterému dochází při několikanásobném překřížení a prohozeny jsou (i) úseky „uvnitř“ chromatid (běžně se uvažuje dvojitý crossing over, někdy se bere v úvahu i trojitý crossing-over)
  - **dvojitý** (a případně další **vícenásobné**) crossing-overu narušují výpočty **určující sílu** vazby a vzdálenost genů na chromozómu (veličiny založené na pravděpodobnosti překřížení a následného crossing-overu mezi nimi), proto se k jejich odfiltrování používá **třibodový test**

- **crossing-over** probíhá u člověka během **jednoho meiotického dělení** asi 30–40krát, tedy obvykle jednou či dvakrát na **jeden chromozom**
- **crossing over** je vedle mutací a nahodilého rozchodu chromozómů do gamet, jedním z hlavních **zdrojů genetické variability**
- nevytváří sice **nové alely**, ale umožňuje vytváření nových kombinací již existujících alel genů lokalizovaných na **stejném chromosomu**

## 27. Gametogeneze

---

- vývoj **pohlavních buněk**
- schopnost **reprodukce** je jedna ze základních charakteristik všech forem života – zachování druhu je zajištěno reprodukcí
- **bakterie** se množí dělením, vyšší **houby** výtrusy, vznikajícími **mitosou**
- mitosou vznikají i všechny **somatické buňky**
- **pohlavní rozmnožování** je evolučně mladší, zárodečné buňky vznikají redukčním dělením a mají **haploidní sadu chromosomů**
- **gamety** vznikají z buněk zárodečného epitelu pohlavních žláz
  - **samčí pohlavní žlázy** = testes
  - **samičí pohlavní žlázy** = ovaria
- během embryonálního vývoje organismu se tyto buňky **intenzivně dělí**
- v době **pohlavní aktivity** se v gonádách z **gametogonií** vyvíjejí **gamety**, ve 2. fázích
  - **stádium růstu** (proliferace)
  - **stádium zrání**
- nejprve se z **primordiálních pohlavních buněk** vytvoří sérií **mitotických dělení spermatogonie a oogonie**, dalším vývojovým stupněm je pak **primární spermatocyt či oocyt**, který v době pohlavní prochází **meiotickým dělením**

### Spermatogeneze

- u **samců** probíhá po celé období **pohlavní aktivity**
- **mužské pohlavní buňky**



- spermie, velikost cca. 50µm
- vyvíjejí se v **semenotvorných kanálcích varlete**
- jejich zrání začíná vlivem **pohlavních hormonů** v pubertě
- pro správný vývoj spermií je zapotřebí jak **dostatečná stimulace** pohlavními hormony (testosteronem), tak **nižší teplota** (docílena umístěním varlat v šourku)
- důležitá je též funkce **Sertolliho buněk**, jež zajišťují správné **prostředí** pro vývoj spermií
- výchozí buněčný typ pro meiotické dělení je **primární spermatocyt** (46,XY)
- **stádium růstu**
  - zárodečné buňky, **spermatogonie**, opakovaně **rostou**, obohacují se živnými látkami a **mitoticky** se dělí na **spermatocyty I. řádu (primární)**
- **stádium zrání**
  - z **primárních spermatocytů** vznikají 1. meiotickým dělením **prespermatidy**
  - prespermatidy = **spermatocyty II. řádu** (23,X nebo 23,Y)
  - **prespermatidy** jsou již haploidní, ovšem stále mají zdvojené **chromatidy**
  - následuje krátká **interkineze** (interfáze bez zdvojení DNA) a 2. meiotické dělení
  - 2. meiotickým dělením vznikají malé buňky s haploidní sadou chromosomů – **spermatidy**
  - spermatidy jsou 4
  - prespermatidy a spermatidy zůstávají spojeny **mezbuněčnými cytoplazmatickými můstky** – zajišťují synchronizaci vývoje a výměnu produktů genů mezi buňkami s haploidními sadami chromosomů
  - **spermatidy** zůstávají v **záhybech Sertolliho buněk**, které je zásobují pro jejich vývoj důležitými látkami a energií
  - spermatidy v průběhu dozrávání získávají **tvary i funkce**, které jsou nezbytné pro proniknutí k vajíčku a jeho oplodnění – z jádra se formuje **hlavička spermie**, centriol vytváří **bičík**, který se postupně prodlužuje
  - **energií** k pohybu bičíku zajišťují **mitochondrie v krčku** spermie oxidativní fosforylací
  - z **Golgiho komplexu** se vytváří **akrosomální váček**, jehož enzymy jsou nezbytné k **proniknutí** spermie do vajíčka
  - chromosomy jádra se velmi pevně **kondenzují**, DNA je fixována do **krystaloidní formy** bazickými proteiny – **protaminy** (nahrazují histony)
  - veškerá **genová aktivita** je potlačena
  - po dokončení **histogeneze** se spermie uvolňují do **lumen kanálků** a jsou pasivně unášeny do **epididymis**
- z každého **primárního spermatocytu** vznikají celkem **4 spermatidy** – diferencují se ve 4 zralé **spermie**
- proces zrání spermií trvá celkově asi **60-65 dní** a je kontinuální
- za celý život muž vyprodukuje průměrně **10<sup>12</sup> spermií**

## Oogeneze

- **ženské pohlavní buňky** – vajíčka, vznikají v **ováriích**
- **lidský oocyt**
  - průměr **0,1mm**, velikost je druhově specifická
  - vajíčko vzniká z buněk **zárodečné linie** v kůře vaječnicků
- ve vaječnicku plodu je založeno okolo **2 milionů zárodečných buněk** oogonií
- **stádium růstu**
  - **množení oogonií mitosou** začíná koncem 2. měsíce a končí v 6. měsíci **intrauterinního vývoje**
  - k oogoniím se přikládají v jedné vrstvě buňky **coelomového epitelu** a vznikají tzv. **primordiální folikuly**
  - asi u 1/2 se tato vrstva nevytvoří a buňky tak **hynou apoptósou**
  - následně vznikají mitosou z oogonií **oocyty I. řádu** neboli **primární oocyty**, které jsou uloženy do **primárních folikulů**
  - u žen jejich vznik – stádium růstu – končí do **3. měsíce** narození
  - následuje vstup do **meiosy**
- **stádium zrání**

- **profáze I.** probíhá až do **diplotenního stádia**, ve kterém oocyty setrvávají až do hormonální iniciace dalšího zrání v **pubertě**
- toto přechodné stádium se nazývá **diktyotenní stádium**
- zrání jednotlivých folikulů pokračuje až po pubertě **vlivem hormonů**
- stádium zrání pak probíhá po celé **období pohlavní aktivity** (u ženy v cyklech **28 dní** – dozrává vždy jedno vajíčko)
- dozrání vajíčka je řízeno **hormonálně** – stimulem k pokračování **prvého zracího dělení** je u některých druhů **progesteron**, u jiných změna hladiny **estrogenů** a progesteronu v průběhu **cyklu**
- během života ženy dozraje celkem jen **400-500 vajíček**
- v pubertě se nejprve zvětšují jak **primární oocyty**, tak okolní **folikulární buňky**
- **vývoj folikulů**
  - okolo **primárního oocytu** se nejprve objevuje vrstva **glykoproteinové hmoty (zona pellucida)**
  - vzniklý útvar se nazývá **primární folikul**
  - folikul s **vícevrstevným obalem** folikulárních buněk a vznikající dutinkou se pak nazývá **sekundární folikul**
  - vrcholem vývoje folikulu je tzv. **Graafův folikul**, který je větší, vyplněný velkou dutinou s **tekutinou**
  - vajíčko je na jedné straně spojeno s vrstvou **folikulárních buněk (granulózní buňky)**, které tvoří obal folikulu (**membrana granulosa**)
  - nad vrstvou těchto buněk jsou pak **buňky thékální**
  - pak těsně před ovulací je dokončeno **první meiotické dělení** a vzniká **sekundární oocyt a pólové tělísko**
  - ovulace je **prasknutí** Graafova folikulu a uvolnění oocytu
- **vývoj oocytů**
  - **1. meiotickým dělením** (v metafázi) z vyvíjejícího se oocytu vznikají **2 haploidní buňky** – **1. sekundární oocyt**, obsahující většinu cytoplasmy, a 1 buňka rudimentární – tzv. **polocyt** (první pólové tělísko)
  - velmi záhy začíná **2. meiotické dělení**, které během ovulace dospěje do **metafáze II**
  - **2. dělení** je dokončeno až v případě **proniknutí spermie** do vajíčka
  - ze sekundárního oocytu vznikne **1 zralý oocyt** a **druhé pólové tělísko**
  - zároveň první pólové tělísko prochází ještě **meiosou** a dělí se na 2
  - všechna **3 pólová tělíška** záhy zaniknou a jsou **resorbována**
  - neoplozené vajíčko však nedokončí **meiosu 2** a zaniká
- výsledkem **meiotického dělení** při oogenezi je pouze jedna pohlavní buňka a 2-3 pólová tělíška
- v průběhu zrání vajíčka před ovulací jsou některé geny vajíčka **intenzivně exprimovány**, probíhá **syntéza RNA, proteinů** a různých **zásobních látek**
- některé **mRNA** jsou transportovány do cytoplasmy, kde jsou skladovány v inaktivní formě a **aktivovány** teprve po **oplození vajíčka**
- další zásobní látky, proteiny i RNA všech typů jsou do vajíčka transportovány z **buněk folikulů**
- některé **zásobní látky** (např. žloutek u ptáků) jsou syntetizovány v **játrech** matky a transportovány **krví** do vajíčka
- struktura **vajíčka** i množství látek jsou tak významně ovlivněny **geny mateřských somatických buněk**
- proces **zrání** probíhá v určité časové posloupnosti, při poruchách **hormonální regulace** dochází k **prodloužení** proliferační fáze cyklu, **přezrávání** vajíčka a **dezintegraci** struktury buněk
- může docházet i k **poruchám dělicího vřeténka** a vzniku nondisjunkcí chromosomů a **aneuploidii plodu**
- **primární oocyt** je diploidní, **sekundární oocyt** haploidní se zdvojenými chromatidami a teprve **finální oocyt** je haploidní s polovinou genetické informace
- **pólová tělíška** v drtivé většině případů beze zbytku zanikají (slouží pouze k eliminaci **chromosomů** během meiosis)

## Hlavní rozdíly spermatogeneze a oogeneze

- **spermatogeneze** probíhá od puberty po celý život X **oogeneze** probíhá v prenatálním období a poté pouze od puberty do menopauzy
- vývoj od **prekurzorové buňky** po zralou gametu je mnohem **kratší** u spermatogeneze (okolo **60 dní**) než u **oogeneze** (i přes **40 let**)
- u spermatogeneze vznikají z **primárního spermatocyty** 4 spermie X u oogeneze vzniká z **primárního oocyty** jediný zralý oocyt (pólová tělíska zanikají)

## 28. Mimojaderná dědičnost

- převážná část DNA a tedy i genetické informace je v **eukaryotních buňkách** uložena v **jádře**
- malá část – asi 2% – je však uložena **mimo jádro** v organelách
- tyto organely mají **fyzičnou kontinuitu**, reprodukují se souběžně s reprodukcí buňky a nemohou vznikat **de novo** – znaky, které jsou z části nebo zcela **nezávislé** na **jaderné genetické informaci**
- mimojaderné geneticky aktivní částice obsahující DNA = tzv. **plazmidy**
- soubor vloh lokalizovaný v cytoplazmě = tzv. **plazmom**
- **zákony dědičnosti** podmíněné plazmidy **nesouhlasí** s mendelovskými pravidly = tzv. **nemendelovská dědičnost**
- **kritéria mimochromosomové dědičnosti**
  - výsledky **reciprokého křížení** nejsou identické – výraznější je vliv jednoho z rodičů
  - potomstvo nejčastěji dědí znaky po **matce** – tzv. **matroklinita**
  - **mimojaderné vlohy** nelze studovat v souvislosti s jadernou dědičností
  - potomstvo jedinců hybridních pro mimochromosomově uložené vlohy se štěpí v poměrech, které nelze interpretovat v souladu s poznatky o štěpení, kombinovatelnosti a interakci vloh lokalizovaných na **chromosomech**
  - v některých případech není fenotyp prokazatelně řízen geny jádra – **experimentální záměna jádra** v buňkách jasně prokáže podíl jaderné a mimojaderné dědičnosti a přenos znaků bez přenosu jádra svědčí pro **mimojadernou dědičnost**
  - mimojaderně řízené znaky častěji jeví **somatické štěpení**
- popsané jevy **nejsou vždy současně** u jednotlivých případů mimochromosomální dědičnosti
- **dědičnost vázaná na plastidy** (u rostlin)
  - **plastidy** = organely typické pro rostlinné buňky
  - od cytoplazmy jsou ohraničené **semipermeabilní membránou**
  - podle **funkce** a **obsahu barviva** se dělí na **leukoplasty** (bez barviva), **chromoplasty** (s barvivem) a obsahují-li chlorofyl, **chloroplasty**
  - vznikají **autoreprodukci**, dělením nebo z proplastidů
  - první pozorování **cytoplazmatické dědičnosti** vázané na plastidy
    - bylo provedeno na nocence, jejíž listy byly **panašované** – měly bílé skvrny tvořené buňkami bez chloroplastů, pouze s **leukoplasty**
    - za semen květů na **zelených větvích** vzniká jen zelené potomstvo, ze semen na **bílých větvích** pouze potomstvo bílé
    - bílé rostlinky záhy po vyklíčení **hynou**
- **dědičnost vázaná na mitochondrie**
  - **mitochondrie** jsou organely eukaryot s klíčovým významem v uvolňování chemické energie, v jejím přenášení a využití
  - vznikají **autoreprodukci**
  - obsahují malé množství **specifické DNA**
  - **mitochondriální geny** jsou nahloučeny těsně vedle sebe, neobsahují **intronové úseky**, jsou rovnou **přepisovány do mRNA**
  - obsahuje jiné **stopkodony** – AGA a AGG
  - UGA navíc kóduje **tryptofan**, AUA **methionin** a CUA **threonin**
  - nejsou tu přítomny **bílkoviny typu histonů**

- rychlejší a četnější **replikace** než u DNA eukaryot
- nemá ale **opravné systémy** – mitochondriální choroby (chronická onemocnění často s pozdním nástupem)
- **mitochondriální DNA** i **plastidová DNA** mají řadu společných znaků
  - obě tyto DNA jsou v daných organelách přítomny ve formě **volně uložených molekul**
  - mitochondriální DNA i ctDNA mají strukturu **cyklické dvoušroubovice**, tzn. že opačné konce řetězce makromolekuly DNA jsou vzájemně **spojeny**
  - taková molekula pak nemá **začátek ani konec** a lze ji zakreslit kružnicí
  - mitochondriální DNA se obvykle nachází v **mitochondriální matrix** a občas je připojena k **vnitřní mitochondriální membráně**
- **mitochondriální genom** je děděn výhradně téměř po **maternální linii**
- geny, které jsou obsaženy v **molekule mtDNA** kódují proteiny **respiračního řetězce**, jednotky ATPázového komplexu, podjednotky NADH dehydrogenázového komplexu, dva geny pro ribosomální RNAázu a 22 genů pro molekuly tRNA
- v **mtDNA** rozlišujeme **řetězec těžký H** (vyšší obsahu purinů) a **lehký L** (vyšší obsahu pyrimidinů)
- většina genů kódovaných v **mtDNA** je uložena v **řetězci H**
  - geny pro cytochrom-c-oxidázový komplex
  - geny pro podjednotky 6 a 8 ATPázového komplexu
  - geny pro cytochrom-b
  - geny pro NADH dehydrogenázový komplex (7 podjednotek)
  - geny pro NADH reduktázový komplex (7 podjednotek)
- v **L řetězci** je uložena informace pro **další struktury**
  - geny pro podjednotku 6 NADH reduktázového komplexu
  - geny pro 14 typů molekul tRNA
- H řetězec navíc nese informaci o jednom **dlouhém fragmentu mRNA**, o jednom **krátkém fragmentu rRNA** a také **většině molekul tRNA**
- **chondrinogeny**, neboli geny vázané na mitochondrie se dědí tzv. **cytoplazmatickou dědičností**
- vzhledem k velkému počtu mitochondrií v jedné buňce je často **mutace** přítomna jen u části mitochondrií – **heteroplazmie**
- **mtDNA** je předávána další generaci výhradně **matkou** (matroklinní dědičnost), když po oplodnění jsou zachovány pouze **mitochondrie lidského vajíčka**
- to patrně není pouhým důsledkem **nepoměru počtu mitochondrií** lidského oocyty (cca 100 000) a spermie (50-70), ale předpokládá se **aktivní proces**, který po oplození zlikviduje mitochondrie paternálního původu
- o **mitochondriální dědičnosti** uvažujeme v případech
  - **maternálního** typu dědičnosti
  - díky mitotické a meiotické segregaci nacházíme **různý stupeň postižení** v různých tkáních a **variabilní projevy** u potomků v **jedné mateřské linii**, což souvisí s existencí **prahového efektu** (pro manifestaci dysfunkce je nutné, aby byl překročen určitý poměr mitochondrií s mutantní a normální mtDNA – **60-90%**)
  - **projevy poruchy OXPHOS** (oxidativní fosforylace) – dědičná mitochondriální onemocnění většinou postihují tkáně s vysokými nároky na přísun energie (neuromuskulární systém či CNS)
- **mitochondriální patologie**
  - molekulárně genetickou podstatou **mitochondriálních patologií** mohou být buď **delece** (oblast 5kb dlouhá mezi geny pro ND5 (NADH-dehydrogenázová subjednotka 5) ATPáza 8 (ATP-ázová podjednotka 8)) nebo **bodové mutace** (většinou měnící smysl čtení kodonu – missense nebo substitute)
  - **při deleci**
    - **Kearns-Sayre syndrom** s charakteristickou progresivní externí oftalmoplegií, pigmentovou degenerací sítnice a srdečními a cerebellárními obtížemi
  - **při bodové mutaci**

- **LHON** (Leberova Hereditární Optická Neuropatie) – onemocnění charakteristické slepotou mužů mladších 25 let, penetrance choroby 3-4x vyšší u mužů než u žen
- **syndrom MELAS** (Mitochondria Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes), jehož první příznaky nastupují mezi 5.-15. rokem života jedince
- **syndrom MERF** (Myoclonic Epilepsy with Ragged red Fibers), který se manifestuje u postižených osob mezi 5.-12. rokem života jedince

## 29. Nemendelovská dědičnost

- **genomický imprinting**
  - proces, kdy je **aktivita určitého genu** regulována v závislosti na tom, od kterého **rodiče** byl gen **zděděn**
  - většinou to znamená, že pouze **maternální** nebo **paternální alela** je exprimována (aktivní), kdežto druhá je **utlumena**
  - souvisí s **methyloací bází genů** – inaktivace genu je vyvolána methyloací **cytosinů** následovaných ve vláknech DNA **guaninem**
  - to potlačuje **transkripce**, methyloace neovlivňuje **replikace**, ale gen je nefunkční – methyloace způsobí **deacetylaci NK** – větší **kondenzace** chromatinu
  - **genomický imprinting** je výsledkem odlišného stupně methyloace na **maternálním a paternálním** chromosomu
  - methyloace je děděna z jedné **buněčné generace** do **další** a během života jedince je **konzervována** v důsledku stabilní enzymové výbavy buňky
  - **změna aktivity genu** může nastat v zygotě, kdy dojde k novému vztahu mezi paternálními a maternálními chromosomy
  - jedním z příkladů **genomického imprintingu** jsou **mikrodeleční syndromy**
    - **Prader-Williho syndrom** (delece části paternálního chromosomu)
    - **Angelmanův syndrom** (delece části maternálního chromosomu)
  - u postižených PWS a AS bez mikroskopicky prokazatelné delece 15q 11-12 byla nalezena **uniparentální disomie**
  - **uniparentální disomie**
    - **nondisjunkce** s ztrátou chromosomu ze zygoty
    - imprinting zabezpečuje **specifickou genetickou modifikaci**
    - **hydatiformní mola**
      - chorion se vyvíjí abnormálně s **cystickými změnami**
      - místo normálního vývoje embrya dochází k jeho **nevývinu**, placenta se vyvíjí **hrubě abnormálně**, chybí fetální vaskulatura
      - tato tkáň se může transformovat v **choriokarcinom** (vzniká teratom)
    - **parciální mola**
      - vždy **triploidní**, projevuje se hypertrofií placenty, ale plod je hypotrofický
      - triploidie plodu s **nadpočetnou mateřskou sadou** vede k hypotrofii a fibrose placenty a teprve následně i k těžké růstové retardaci plodu
    - **kompletní mola**
      - karyotyp 46,XX, ale **obě sady chromosomů jsou otcovského původu**
      - charakteristická výraznými změnami struktury placenty a zánikem plodu
- **mozaiky**
  - přítomnost alespoň **dvou buněčných linií**, které se liší geneticky, ale jsou odvozeny z **jedné zygoty**
  - mitotická **nondisjunkce** v časném **postzygotickém** vývoji
  - efekt závisí na
    - **stádiu** vývoje
    - **typu** buněk a tkání
    - typu chromosomální **odchylky**

- závisí na tom, **jak brzy ve vývoji zygoty** se objeví nondisjunkce
- **expanze trinukleotidů**
  - nestabilita **repetitivních sekvencí**
  - čím **větší počet repetic**, tím závažnější je jejich průběh a časnější **věk manifestace**
  - **dynamické mutace** (jejich charakter se mění z generace na generaci) nestabilních chromosomů
    - **Huntingtonova chorea** – repetice CAG – postupná ztráta motorické kontroly, halucinace, psychické změny
    - **syndrom fragilního X** – 2. nejčastější příčina vrozené retardace mentálního vývoje (hned za Downovým syndromem)
  - **expanze trinukleotidů** obecně způsobuje
    - mentální deficit různého stupně, poruchy chování podobné autismu, vysoký hlas, prolapsus mitrální chlopně, makrocefalie, charakteristicky protažený obličej s prominující dolní čelistí, velké ušní boltce, u postižených mužů makroorchidismus
  - **expanze trinukleotidů CGG** v 5'-UTR (5'-nepřekládané sekvence) genu FMR1 způsobí chybění **proteinu FMRP**
    - když **počet repetic** převýší **200**, jedná se o plnou mutaci (normální počet repetic je 6-50)
    - **nepřítomnost FMRP** způsobuje řadu patofyziologických pochodů, především v NS (přítomnost četných dlouhých nezralých dendritů a defektní přenos signálu na postsynaptické úrovni u matabotropních glutamátových receptorů)
  - další chorobou je **myotonická dystrofie**
  - **Friedrichova ataxie (FA)** je způsobena expanzí GGA
    - nejčastější dědičná **forma ataxie**
    - většina pacientů má **homozygotní expanzi GGA** v prvním intronu genu pro **frataxin** – dochází ke snížení množství odpovídající mRNA a proteinu
    - snížení **koncentrace frataxinu** je provázáno akumulací železa v mitochondriích – zvýšená citlivost na **oxidační stres** a snížení **oxidativní fosforylace**
  - funguje tu **genetická anticipace** – v dalších generacích se onemocnění vyskytuje **dřív a s horším postižením** (možnost zvyšování počtu repetic při přenosu na další generaci)
  - tímto mechanismem může dojít k tomu, že u dětí **zdravých osob** s podprahově **zvýšeným počtem repetic** (nositelů tzv. premutace) dojde v důsledku **zmnožení repetic** k manifestaci choroby

### 30. Struktura a typy eukaryotních chromosomů

- chromosomy (chroma – barva, soma – tělo) byly popsány už v 19. století jako drobné **barvitelné útvary** v buňkách
- 1903 nezávisle Sutton a Boveri prokázali jejich souvislost s **dědičností**
- kromě **chromosomů jaderných** nacházíme v buňkách i jiné mimo jádro – **plasmidy** u prokaryot, chromosomy **organel** (plastidů a mitochondrií) u eukaryot
- chromosomy, jejich strukturu a funkci studuje **cytogenetika**
- cytogenetika se rozvíjí v roce 1956 kdy Tjio a Levan prokázali **46 lidských chromosomů** (ne 48 jako u primátů)
- první popsanou chorobou v důsledku chromosomální aberace byl **Downův syndrom** (Lejeune 1959)
- **druhým mezníkem** byl objev barvicích technik na začátku 70. let
- zavedení metod **molekulární cytogenetiky** v 80. a 90. letech bylo zatím posledním skokem
- cytogenetika prokázala **změny chromosomů** v etiologii vrozených vad, poruch plodnosti, nádorů a dalších chorob – chromosomální vyšetření má proto místo v **diferenciální diagnostice** a prevenci závažných **postižení člověka**

#### Struktura chromosomů

- chromosomy eukaryot jsou soustředěny do **jádra buněk**
- obsahují **3 základní biopolymery**

- DNA
- bazické bílkoviny (histony)
- bílkoviny kyselého charakteru
- **DNA**
  - v lidských chromosomech je přibližně **20 500 genů** a DNA v chromosomech obsažená tvoří **2 x 23 molekul** obsahujících celkem 3 miliardy párů bází v haploidní sadě – celková délka cca. 2m
  - každý chromosom tvoří **1 lineární molekula DNA** v komplexu s histony = jedna **chromatida**
  - po replikaci DNA v **S-fázi buněčného cyklu** každý chromosom tvoří 2 chromatidy = 2 molekuly DNA – tento stav trvá až do **rozchodu sesterských chromatid** v anafázi
- **histony**
  - bílkoviny, ve kterých je více **bazických aminokyselin** – lysinu a argininu
  - jedná se o **polykationty** a tak se dobře a pevně vážou na **polyaniont** DNA
  - existuje **pět typů**: H1, H2A, H2B, H3 a H4
  - sekvence aminokyselin histonů a poměr histonů a DNA je obdobná u většiny druhů – histony jsou evolučně **nejkonzervativnější proteiny**
- **kyselé proteiny (nehistonové)**
  - heterogenní skupina velkého počtu **různých bílkovin**
  - množství i složení se u jednotlivých druhů liší, liší se i v různých **typech tkáně**
  - ovlivňují prostorové **uspořádání DNA** v jádře a aktivitu genů
- **struktura chromosmů**
  - DNA v chromosomech má několik **stupňů spiralizace** – vzhledem k velké délce řetězců a malému prostoru jádra musí být **DNA zkrácena** asi 10 000 x
  - výsledkem spiralizace jsou **metafázové chromosomy** o délce desítek μm
  - **primární spirála** (dvoušroubovice DNA)
    - průměr 2nm
  - **nukleosom**
    - základní **strukturní jednotka** spiralizace DNA v chromosomech
    - jeví se jako **korálky** na vláknu DNA
    - jádrem nukleosomu je oktamer **komplex histonů** (H2A, H2B, H3 a H4 – každý dvakrát)
    - kolem jádra je obtočeno **1,75 závitů** DNA (146 párů bází)
    - nukleosomy mají průměr 11 nm
    - **sousedící nukleosomy** spojuje vlákno DNA lineární, překryté histonem H1 – délka této **lineární části** (spojovací, internukleosomální DNA) je druhově specifická, u člověka 60 bp
    - na celý nukleosom připadá cca. **200 párů bází** DNA
    - **nukleosomové vlákno** se dále svinuje do solenoidů
  - **solenoid (cívka)**
    - solenoidy vytvářejí **chromatinové vlákno**
  - **chromatinové vlákno**
    - má průměr 30 nm
    - vytváří **prostorové smyčky** ve spojení s nehistonovými proteiny
    - průměr smyček je 300 nm a nazývají se někdy **scaffold**
    - v této struktuře jsou vázány **proteiny, enzymy a chromosomální RNA** ve složitém komplexu chromatinu
  - dynamická struktura chromatinu umožňuje **kontrakci a kondenzaci**, ale je při tom stabilní
  - v průběhu profáze další **spiralizací** vznikají **metafázické chromosomy** (průměr 1400nm), které jsou dobře patrné v optickém mikroskopu
- **chromatinová DNA** představuje největší podíl DNA v buňce a nese tedy většinu genetické informace
- **konformace chromatinu** se mění s aktivitou buňky v jednotlivých částech buněčného cyklu – uspořádání chromatinu je tedy odrazem **aktivity buňky**
- v období **metabolické aktivity** (transkripce, replikace) je DNA despiralizována a jádro je tedy světlejší X buňky s jádry kondenzovanými jsou **méně aktivní**

## Morfologie chromosomů

- cytogenetické vyšetření je zaměřeno na **chromosomy v metafázi**, kdy jsou maximálně spiralizovány – dobře hodnotitelné v mikroskopu
- na chromosomu rozlišujeme **centromeru** a **ramena s telomerami**
- **centromera**
  - primární konstriktce
  - oblast **spojující** obě sesterské chromatidy (po replikaci) metafázního chromosomu
  - je patrná jako **zaškrvení** a dělí chromosom na krátká a dlouhá raménka
  - k centromere přiléhá **specializovaná struktura – kinetochor**, místo úponu dělicího aparátu
  - chromosomy bez centromery (**acentrické fragmenty**) zůstávají na konci buněčného dělení v cytoplasmě a **nejsou pravidelně děděny** – postupně se ztrácí
  - při přípravě **umělých chromosomů** (YAC – yeast artificial chromosome) musí být oblast centromery přenesena do jejich struktury pro zajištění jejich **stability**
  - centromerické oblasti chromosomů jsou tvořeny **konstitutivním heterochromatinem**
    - **repetitivní sekvence** tohoto chromatinu jsou druhově specifické
    - centromery lidských chromosomů obsahují **alfa-satelitní DNA** s repetitivními sekvencemi 171 bp
- na některých chromosomech (**akrocentrických**) lze nalézt i **konstriktci sekundární** – místo tzv. **organizátoru jadérka** (NOR – nucleolus organizing region)
  - funkcí organizátoru jadérka je **formování a udržování jadérka** v interfázním jádru
  - obsahuje vysoký **počet kopií genů** pro rRNA
  - **sekundární konstriktce** rozděluje krátká ramena akrocentrických chromosomů na dvě části, z nichž **distální** se nazývá **satelit**
- **telomery**
  - terminální části **chromosomových ramének**
  - komplexní specifická struktura, má vliv na **stabilitu chromosomu** a brání vzájemnému **propojení chromosomů** v jádře buňky
  - dále chrání vlákno DNA před **destrukcí exonukleasami**
  - specifická funkce při **dokončení replikace** DNA na koncích chromosomů
    - po replikaci DNA DNA-polymerasou jeden řetězec přesahuje a zbývající úsek je **doreplikován** specifickým enzymem – **telomerasou**
  - telomera je tvořena **tandemovou repeticí** sekvencí nukleotidů (TTAGGG)
  - tyto repetitivní úseky jsou **velmi konzervativní**, jejich počet je druhově specifický a liší se i v buňkách a u jednotlivých chromosomů
  - jedna z hypotéz o významu telomer jim přikládá význam jako **polyA ocásku** u mRNA – předpokládá se, že při každé replikaci se telomera **zkracuje** – limitující faktor počtu **buněčných dělení**
  - tento omezený počet dělení je v buňce **naprogramován**
  - v zárodečných buňkách dochází k **opakovanému prodlužování** telomer – telomerasa tu je aktivní
  - v somatických buňkách je téměř neaktivní – telomery se postupně **zkracují**
  - tyto buňky jsou schopny rozpoznat, kdy je telomera už **příliš krátká** – navození **apoptózy**
  - některé nádory ale tento mechanismus nemají a **aktivita telomerasy** je v nich vysoká – jejich buňky se chovají jako **nesmrtelné** (stále se neomezeně dělí)
- **morfologii chromosomů** určuje délka jejich krátkého (p) a dlouhého (q) raménka a **centromerický index** (poměr p : celkové délce chromosomu)

## Euchromatin a heterochromatin

- na chromosomech rozlišitelné dvě formy chromatinu
  - **euchromatin**
    - slaběji barvitelné, **méně kompaktní** a transkripčně velmi aktivní úseky
    - v interfázním jádře **despiralizován**, proto organizovaná struktura pozorovatelná pouze v **elektronovém mikroskopu**
    - tvořen především **unikátními sekvencemi DNA**, je zde lokalizována většina genů



- **heterochromatin**
  - intenzivně se barvící, **kondenzované** a geneticky inaktivní oblasti chromosomu
  - i v interfázi je více či **méně spiralizovaný** a ve světelném mikroskopu má podobu **hrudek**
  - replikuje se později než DNA euchromatinu
  - je složen z převážně **vysoce repetitivních sekvencí**, které neobsahují geny
  - **uplatňuje se při**
    - organizaci chromosomální struktury
    - párování homologních chromosomů
    - crossing-overu
    - ochraně důležitých strukturních genů
  - **funkci** řady úseků dosud neznáme
  - rozlišují se dva typy – **konstitutivní a fakultativní**
- **konstitutivní heterochromatin**
  - lokalizován v **okolí centromery** (centromerický hch)
  - druhově **specifický**, na určitých chromosomech - u člověka přítomen na chromosomech 1, 9, 16 a Y (jejich velikost je variabilní, např. velké rozdíly u Y)
  - v souvislosti s různou **délkou heterochromatinu** nebyl popsán žádný **fenotypový efekt**
- **fakultativní heterochromatin**
  - **spiralizační druhého** (a každého dalšího) **X chromosomu**
  - většina genů tohoto X chromosomu je tak **inaktivována**
  - kondenzovaný X chromosom je patrný v **interfázním jádře** jako plankonvexní tělíčko při jaderné membráně – **sex chromatin** / X chromatin / Baarovo tělíčko
  - hodnocení X chromatinu umožňuje **orientační vyšetření heterochromosomů** v interfázních **jádrech**
  - vyšetřují se buňky **stěrů bukalní sliznice** nebo vlasových folikulů
  - muži mají X chromatin negativní, ženy pozitivní v 10-40%
  - hodnocení se používá i jako tzv. **sex test** při závodech a podobně
  - může upozornit na **odchylky** v počtu X chromosomů
- **inaktivace X chromosomu**
  - nastává cca. **14. den embryonálního vývoje**
  - postihuje obecně 2. a každý další X chromosom – kompenzace **nerovnováhy** genetické výbavy mužů a žen
  - této inaktivaci ale uniká tzv. **pseudoautosomální oblast** lokalizovaná v distálních částech obou ramen chromosomu X
  - tato oblast (PAR1, PAR2) je **komplementární** k odpovídající oblasti na **chromosomu Y** – geny zde ležící jsou exprimovány ve dvou kopiích bez ohledu na pohlaví, stejně jako geny na **autosomech**
  - **spiralizace** buď paternálního nebo maternálního X chromosomu v buňkách zárodku je děj **náhodný**, ale **nevratný** – v linii dalších buněk je vždy spiralizován stejný chromosom X
  - žena je z hlediska většiny genů, lokalizovaných na X chromosomu **mozaikou** buněčných linií s inaktivovaným X chromosomem buď od otce nebo od matky
  - výjimkou z pravidla o **náhodné inaktivaci** je případ morfologicky změněného X chromosomu – přednostně je inaktivován **chromosom aberovaný**
  - **fenotypové projevy** X inaktivace se nazývají **lyonizace**
  - spiralizovaný chromatin X chromosomu se replikuje **opožděně**

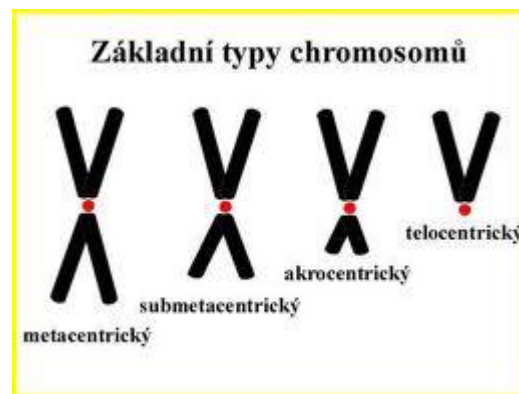
#### Počet a typy chromosomů

- **chromosomy prokaryot**
  - z 1 kruhové **molekuly DNA**, bílkovin (polyaminy + enzymy) a variabilního množství RNA
  - není tu **jaderná membrána** – chromosomy jsou umístěny volně v cytoplazmě a ukotveny v jednom místě do buněčné membrány
  - DNA je vysoce **kondenzovaná** – suprahelikální šroubovice
- **chromosomy mitochondrií**

- genom tvoří **kruhová molekula DNA** od 16 kb až k několika stům kb
- **chromosomy eukaryot**
  - soustředěny do **jádra buněk**
  - obsahují 3 základní **biopolymery**
    - DNA
    - histony (bazické proteiny)
    - proteiny kyselého charakteru (nehistonové povahy)
- **počet chromosomů**

	<b>chromosomy</b>	<b>bivalenty</b>	<b>molekuly DNA</b>
pachyten	46	23	92
diploten	46	23	92
diakineze	46	23	92
anafáze I	46	0	92
telofáze I	23	0	46
profáze II	23	0	46
metafáze II	23	0	46
telofáze II	23	0	23

- **typy chromosomů**
  - **metacentrický**
    - centromera leží zhruba uprostřed chromosomu
  - **submetacentrický**
    - centromera je umístěna tak, že p raménka jsou výrazně kratší než q raménka
  - **akrocentrický**
    - centromera je posunuta k jednomu konci chromosomu
    - raménka p jsou velmi krátká
  - **telocentrický**
    - centromera leží na úplném konci chromosomu
    - chromosom má pouze dlouhá q raménka
    - u člověka se nevyskytuje
  - **holocentrický**
    - útvary plnící funkci centromery jsou roztroušené po celé délce chromosomu
    - u člověka se nevyskytuje, je velmi vzácný (u hlístů vzácně)



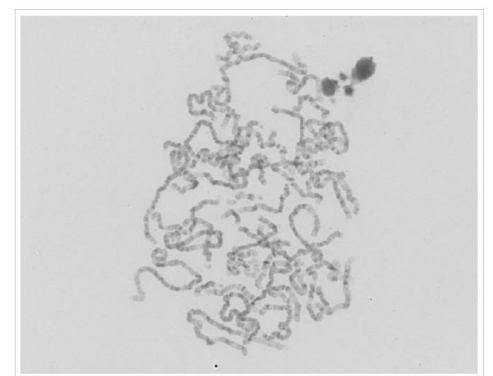
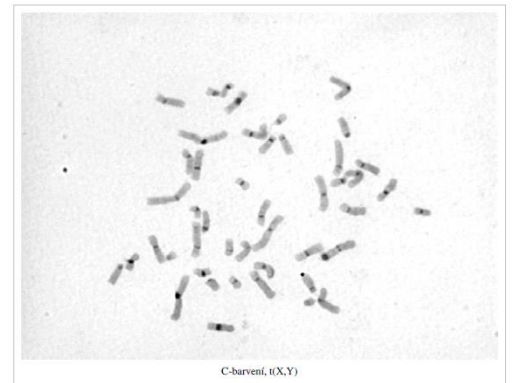
## 31. Metody chromosomálního vyšetření

- **příprava cytogenetického materiálu, kultivace buněk**
  - nedělící se buňka je ve stádiu **interfáze** – chromosomy despiralizovány jen s úseky heterochromatinu – **chromomerami**, které jsou patrné
  - chromosomální vyšetření jsou možná jen v **některých stádiích buněčného dělení**, kdy jsou chromosomy **spiralizované** a po zpracování **pozorovatelné** v optickém mikroskopu
  - pro kvalitní preparáty třeba tkáň s dostatečnou **proliferační intenzitou** (vyšší mitotický index – poměr počtu buněk v mitóze : všech buněk vzorku)
  - v tkáních s přirozeně vysokou **mitotickou aktivitou** (kostní dřeň, choriové klky, nádory) je možné přímé **zpracování buněk**
  - ve většině tkání **nutná kultivace** (periferní krev 72 hodin, některé tkáně i týdny)
    - v lahvičkách s **kultivačním médiem** s přísadkou séra s růstovými faktory
    - kultury vyžadují konstantní teplotu 37°, konstantní pH, dlouhodobé kultury i 5% oxidu uhličitého v atmosféře **termostatu**

- pro postnatální analýzu se kultivují **lymfocyty periferní krve** stimulované mitogenem (obvykle fytohemaglutinin) – stimulace **blastické transformace** lymfocytů T
- prenatalně se nejčastěji vyšetřuje **plodová voda** (amniocentéza, 16.-20. týden), **fetální krev** (kordocentéza, po 20. týdnu) nebo **choriové klky** (okolo 12. týdne)
- buňky získané **biopsií** (fibroblasty, nádory) musí být nejprve mechanicky nebo enzymaticky **rozvolněny** a jejich mitotická aktivita se vyvolává **růstovými faktory telecího séra** a bývá pomalejší
- vyšetření chromosomů v **meiose** je obtížnější a standardně se neprovádí
- chromosomální vyšetření **vajíček, pólových tělísek i buněk embryí** je prováděno v souvislosti s asistovanou reprodukcí
- **vlastní zpracování buněčné kultury**
  - zahajuje se přidáním **mitotického jedu – kolchicinu** (alkaloid) nebo jeho syntetických derivátů (colcemid) – několik **minut či hodin před zpracováním**
  - tyto sloučeniny rozrušují **aparát vláken** dělicího vřeténka, jež se napojují k centromerám – zabrání se seřazení v **ekvatoriální rovině** a oddělení sesterských chromatid
  - dělení se zastavuje v **metafázi** (c-metafáze – kolchicin)
  - dalšího zlepšení rozložení chromosomů dosáhneme během zpracování působením **hypotonického roztoku** 0,075 M KCl – kvůli osmotickým jevům dojde k rozvolnění buněčného obsahu a individualizaci jednotlivých chromosomů
  - následuje fixace směsí **kyseliny octové a metanolu** (1:3) pro zachování vnitřní struktury chromosomů
  - získaná suspenze se nakape na podložní sklo a preparáty se dále barví
- **cytogenetické barvicí metody**
  - z mnoha možností se v praxi uplatňuje jen několik postupů barvení
  - **klasické konvenční barvení**
    - barvení jedním, obvykle **Giemsovým**, barvivem
    - **homogenně zbarvené** chromosomy vhodně pro hodnocení počtu, **hrubších strukturních odchylek** a získaných **chromosomálních aberací** – chromosomálních a chromatidových zlomů
  - pro identifikaci jednotlivých chromosomů v karyotypu a hodnocení jejich **struktury a přestaveb** jsou využívány diferenciální techniky barvení – **pruhování (banding)**
    - dosáhne se střídání světlých a tmavých **proužků** po celé délce chromosomů
    - pruhy jsou rozsáhlé struktury **5-10 Mb** – stovky genů
    - molekulární podstata pruhování odráží **funkční organizaci genomu**, zastoupení jednotlivých bazí a přidružených **proteinových molekul** ve vnitřní struktuře chromozomu
    - **strukturní proužky** je možné vyvolat pouze u vyšších obratlovců, u jiných druhů zatím nelze využít
    - **Q pruhování** (quinacrine)
      - barvení fluorescenčním **barvivem chinakrinem** bez předchozího chemického působení
      - nejstarší metoda, dnes již využívaná výjimečně
      - preparáty je nutno pozorovat pod **fluorescenčním mikroskopem** a fotograficky dokumentovat
      - rozložení jasně **zářících Q proužků** odpovídá tmavým **G pruhům**
    - **G pruhování (Giemsa)**
      - barvení Giemsovým barvivem po ovlivnění chromosomů **denaturačním činidlem**, obvykle trypsinem



- tmavé **G-pruhy** odpovídají oblastem relativně **genově chudým** s převažujícím zastoupením AT bází a pozdně se replikujícím
- naopak **G-negativní** světlé pruhy jsou oblasti bohaté na **GC páry** s časnou replikací a vyšší **genovou hustotou**
- G pruhování představuje **základní metodu vyšetření člověka**
- **R pruhování (reverse)**
  - vzniká po **denaturaci** a následné **renaturaci** DNA při alkalickém působení za vysoké teploty
  - **Giemsovým barvivem** se poté barví tmavě úseky při G pruhování světlé a světlé úseky při **G pruhování tmavě**
  - často se užívá pro zvýraznění **telomer**
- **selektivní techniky barvení**
  - barvení **specifických oblastí chromosomů**
  - **C pruhování**
    - barvení **Giemsou** po denaturace v alkalickém prostředí
    - zvýrazňuje **oblasti konstitutivního heterochromatinu** – centromery a heterochromatinové úseky chromosomů 1,9,16 a Y
  - **Ag-NOR barvení**
    - dusičnanem stříbrným
    - znázorňuje **oblasti organizátorů jadérka** na akrocentrických chromosomech
    - barví se pouze organizátory, které se v předchozí interfázi aktivně účastnily **formace jadérka**
  - **výměny sesterských chromatid (SCE)**
    - umožňuje odlišit DNA **syntetizovanou** před prvním, druhým a dalšími cykly buněčného dělení
    - **inkorporace bromdeoxyuridinu (BrdU)**, analogu thymidinu, během S-fáze do nově syntetizované molekuly DNA, tedy do sesterské chromatidy během replikace
    - následné **barvení Giemsou** zbarví bledě chromatidu s BrdU (inhibuje barvitelnost) a tmavě **chromatidu původní**
    - metoda se užívá pro testování **mutagenních účinků** chemických látek a pro diagnostiku **syndromů** s výraznou **lomivostí chromosomů** (Bloomův syndrom)
- **kvalita cytogenetického vyšetření** závisí na stupni spiralizace pozorovaných chromosomů a jejich délce, počtu hodnotitelných pruhů apod. – **rozlišovací schopnosti vyšetření**
  - v c-metafázi rozlišíme **400-450 pruhů** v haploidní sadě pro orientační vyšetření
  - přesnější analýza je možná při **550 pruzích**
  - někdy je třeba až **850 pruhů**
  - větší **počet buněk** v prometafázi získáme synchronizací buněčného dělení a kratším působením **kolchicinu**
  - synchronizaci navodíme působením určitých látek nebo **změnou teploty**
  - tento způsob přípravy se označuje jako **HRT – technika s vysokou rozlišovací schopností** – jemné strukturální přestavby, zejména **mikrodelece**



### Molekulární cytogenetika

- v roce 1986 objevena metoda **fluorescenční in situ hybridizace (FISH)** – rozvoj molekulární cytogenetiky

- společný princip je **denaturace DNA** a následná hybridizace (komplementární párování bazí)
- tyto metody slouží k **upřesnění analýzy**, ale v praxi se užívají stále běžné cytogenetické metody (těchto se užívá např. u **solidních nádorů**, kde není dostatečná mitotická aktivita a vhodná morfologie chromosomů apod.)
- molekulárně cytogenetické metody jsou zejména **FISH, CGH, M-FISH, SKY** a microarray-CGH
- **fluorescenční in situ hybridizace (FISH)**
  - logické spojení postupů **klasické a molekulární cytogenetiky**
  - založena na schopnosti **jednovláknové (denaturované) DNA**, tzv. sondy, vázat se k cílové sekvenci na principu **komplementarity**
  - vyšetření **chromosomů** v mitose, ale i interfázických
  - sonda je předem označena některým **fluorochromem**
  - používá se výhradně **přímé značení**, pomocí něhož lze okamžitě sledovat ve fluorescenčním mikroskopu
  - existuje **mnoho sond**, volených podle typu vyšetření
  - **centromerické sondy**
    - tvořeny **alfa satelitními sekvencemi** repetitivní DNA přítomné v oblasti centromery
    - pro rychlou detekci **numerických aberací**, hlavně v nedělicích se buňkách
    - vhodné i pro **prenatální diagnostiku** aneuploidií (13,18,21,X a Y) bez nutnosti předchozí kultivace
    - výsledek je rychlý, ale informuje jen o **přítomnosti chromosomů**, nehodnotí karyotyp jako takový
  - **lokus specifické sondy**
    - vážou se na specifický lokus chromosomu – je možné detekovat konkrétní **strukturní odchylky** (mikrodeleční syndromy, translokace malignit – onkogenetika)
    - zvláštní podskupina jsou **telomerické sondy** (nespecificky se vážou na všechny telomery) a **subtelomerické sondy** (specificky analyzují subtelomerickou oblast jednotlivých chromosomů – kryptické změny, subtelomerické delece u mentálních retardací dětí)
  - **celochromosomové sondy (malovací)**
    - směs **fragmentů DNA** konkrétního chromosomu
    - po aplikaci dojde k **obarvení** celého chromosomu
    - pro **strukturní aberace** – translokace, inserce, kompletní přestavby a pro stanovení původu nadpočetných marker nebo ring chromosomů
    - vyžadují **chromosomy v metafázi**, nikoli interfázické
- **komparativní genomová hybridizace (CGH)**
  - slouží k **detekci odchylek** v množství genetického materiálu – počtu kopií jednotlivých úseků DNA – mezi **jednotlivými genomy**
  - nezastupitelný význam má tato metoda pro **onkogenetiku**
  - principem je **současná hybridizace** dvou rozdílně značených DNA (např. nádorová zeleně a kontrolní červeně) k **metafázickým chromosomům** zdravého dárce v poměru 1:1
  - následuje **změření intenzity fluorescence** obou fluorochromů podél všech chromosomů a v případě delece, duplikace nebo amplifikace je viditelná změna zbarvení
  - změna barvy je patrná díky změně **poměru intenzity** obou barviv – v oblasti delece bude převažovat signál červené kontrolní DNA X v oblasti zmnožení genetického materiálu bude převažovat nádorová zelená
  - **možnosti využití**
    - detekce **malých delecí**, delecí maskovaných translokacemi
    - u **nádorů** detekce delecí tumor-supresorových genů a amplifikací protoonkogenů
    - **prenatální diagnostika** nebalancovaných přestaveb
  - výhodou je možnost aplikace na **nekultivované buňky** – není třeba mitózy a provádí se na malém množství buněk, protože i to stačí na izolovanou DNA
  - dále je výhodné **vyšetření celého genomu** najednou při jedné hybridizaci
  - limitující je možnost detekovat jen **nebalancované změny** (delece a amplifikace) a zároveň o velikosti 2-10 Mb a více – odpovídá jednotlivým podpruhům v karyotypu

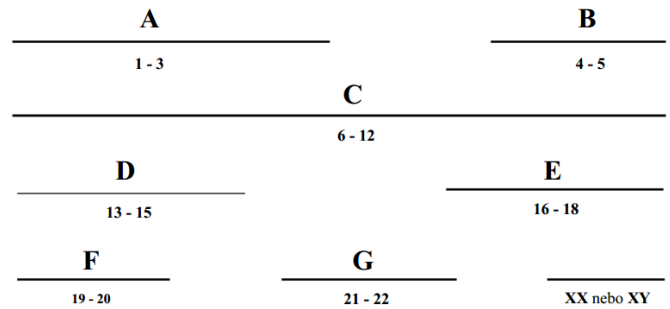
- další nevýhodou je nemožnost prokázat odchylku v **buněčném klonu** menším než 50% - nelze vyšetřit mozaicismus
- **mnohobarevná FISH**
  - použití **malovacích sond** na úplnou sadu chromosomů v metafázi
  - pomocí **kombinatoriálního značení** jednotlivých chromosomů lze vyšetřit najednou celý genom a odhalit většinu strukturních přestaveb, balancovaných i nebalancovaných
  - kombinací **5 fluorochromů** se získá způsob odlišení 22 párů autosomů a 1 páru gonosomů
  - fluorescenční signály jednotlivých chromosomů jsou snímány přes **speciální filtry**
  - počítač pak chromosomům přiřadí **pseudobarvy**, lépe rozeznatelné okem
  - jinou variantou získání barevných chromosomů je metoda spektrálního karyotypování - **SKY** - pro detekci signálů používá **interferometr**
  - novou metodou je **multicolor FISH** - barevně se na stejném principu i pruhuje - možnost detekce **konkrétní strukturní přestavby** i s místy zlomů

## 32. Molekulární cytogenetika

---

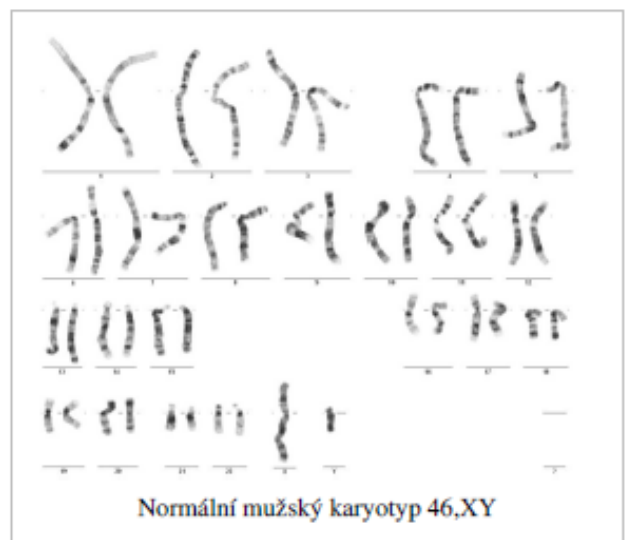
### 33. Karyotyp člověka, metody jeho vyšetření

- seřazený soubor chromosomů buňky se nazývá **karyotyp** a je druhově specifický
- karyotyp člověka se skládá z **22 párů autosomů** a **1 páru heterochromosomů** XX nebo XY
- **zápis normálního karyotypu**
  - **muž:** 46, XY
  - **žena:** 46, XX
- chromosomy řadíme a označujeme podle jejich **délky**, **polohy centromery** a specifického **pruhování**
  - **podle délky**
    - nejdelší je chromosom 1
    - nejkratší je chromosom 22
    - chromosom Y patří k nejkratším
  - **podle uložení centromery**
    - metacentrické
    - submetacentrické
    - akrocentrické
    - telocentrické u člověka nejsou
  - **podle pruhování**
    - pruhování je pro každý pár typické, proto hodnocení patří ke **standardnímu chromosomálnímu vyšetření**
    - v roce 2004 byla ustanovena v současnosti **platná verze** – nomenklatura - definuje normální sadu chromosomů a její odchylky
    - je standardizován **vzor proužků** na každém chromosomu a jsou zavedeny symboly numerické a strukturální aberace
  - chromosomy jsou také rozděleny na **7 skupin**, nejspíš podle polohy centromery



skupina	chromosomy	velikost a tvar
A	1-3	velký metacentrický
B	4-5	velký submetacentrický
C	6-12 a X	střední submetacentrický
D	13-15	střední akrocentrický
E	16-18	malý submetacentrický
F	19-20	malý metacentrický
G	21-22 a Y	malý akrocentrický

- metody **vyšetření karyotypu**
  - pruhování jednotlivých chromosomů je pro každý pár **typické**, proto hodnocení pruhů je **standardním chromosomálním vyšetřením** karyotypu
  - k usnadnění vyšetření byla definována **nomenklatura** zápisu odchylek a také **správný karyotyp** a jeho vzor proužků
  - k analýze se tedy užívají již zmíněné metody, studující **proužky** chromosomů, jejich **strukturu**, **komponenty** a **odchylky** a podobně
  - **obecný postup vyhodnocení karyotypu**
    - celkový počet
    - pohlavní chromosomy
    - úplnost párů
    - nadbytečné chromosomy
    - strukturální odchylky (nejprve akrocentrické chromosomy)
  - **u odchylek se podává**



- cytogenetická analýza, např.: 45,X
- klinická diagnóza např.: Turnerův syndrom

zkratka	význam	příklad
<b>p</b>	krátké rameno chromosomu	
<b>q</b>	dlouhé rameno chromosomu	
<b>mat</b>	maternální	
<b>pat</b>	paternální	
<b>+ (-)</b>	nadpočetný (chybějící)	47, XX, +21
<b>/</b>	mozaika	45, X / 46, XX
<b>del</b>	delece	46,XX,del(5)(p?); 46,X, del(X)(q?)
<b>der</b>	derivovaný (odvozený)	46,XY,der(4)t(4;12)mat - abnormální chromosom 4 odvozený od reciproké translokace u matky
<b>t</b>	reciproká translokace	46, XY, t(2;8)(p?q?)
<b>rob/der</b>	Robertsonova transformace	45,XX,rob(14;21) - nositelka balancované translokace 46,XY,der(21;21),+21 - nositel nebalancované translokace, Downův syndrom
<b>inv</b>	inverse	46,XY,inv(9)(p12q13)
<b>mar</b>	marker chromosom	47,XY,+mar
<b>r</b>	ring chromosom	46,XY,r(18)
<b>i</b>	isochromosom	46,XY,i(22)

### 34. Odchyly v počtu chromosomů, příčiny a klinické projevy

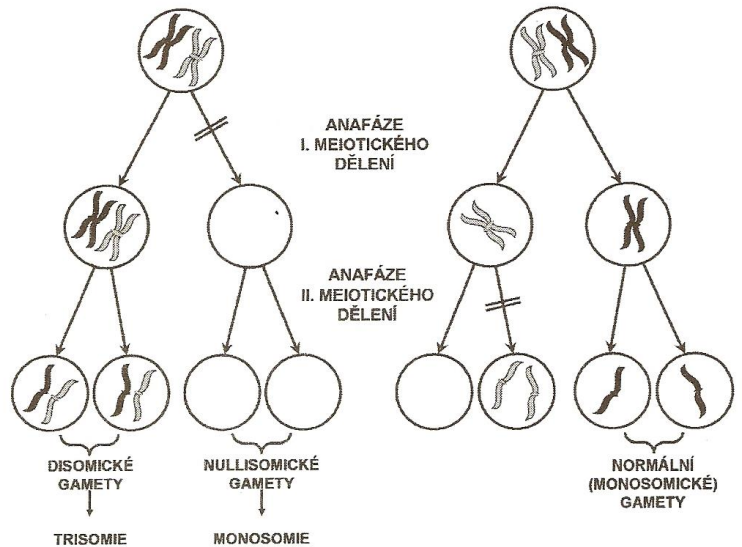
- **chromosomální abnormality** můžeme rozdělit do 3 skupin
  - **numerické aberace**
  - **strukturální aberace**
  - **mixiploidie** (mozaicismus, chimérismus)
    - nálezy odlišné chromosomální výbavy ve dvou nebo více buněčných liniích
- změny u obou postihují buď **autosomy** nebo **gonosomy**
- základní rozdělení numerických chromosomálních aberací
  - **numerické**
    - **aneuploidie**
      - monosomie
      - trisomie
    - **polyploidie**
      - triploidie
      - tetraploidie
- **způsob vzniku numerických aberací**
  - vznikají během meiosis nebo mitosis **nerovnoměrným rozdělením** chromatid nebo chromosomů do dceřiných buněk
  - tento typ se označuje jako **genomové mutace**
  - rozlišujeme změny v **počtu jednotlivých chromosomů** v sadě (aneuploidie) a změny **celých haploidních sad** chromosomů (polyploidie)



- normální výbavu buněk nazýváme **euploidní, resp. diploidní**

### Aneuploidie

- ztráta 1 chromosomu v genomu buňky = **monosomie**
- přebývání 1 nebo více chromosomů = **trisomie, tetrasomie** apod.
- nejčastější příčinou aneuploidie u člověka je **nondisjunkce**, tj. porucha oddělení homologních chromosomů v I. zracím dělení nebo sesterských chromatid v II. zracím dělení
- **nondisjunkce v meiose I.**
  - vznik disomických gamet, obsahujících celý pár homologních chromosomů
- **nondisjunkce v meiose II.**
  - vznik disomických gamet, obsahujících dvě stejné kopie jednoho chromosomu
- jako doplněk u obou typů vznikají i **gamety nullisomické**, které neobsahují žádnou kopii chromosomu příslušného páru
- monosomie mohou být způsobeny také **ztrátou chromosomu** při pohybu k pólu buňky během **anafáze**
- podle studií s využitím **DNA markerů** 2/3 aneuploidii u plodů nebo novorozenců mají maternální původ + z toho opět 2/3 vznikají nondisjunkcí v meiose I.
- k nondisjunkci může dojít i v mitose během **časného vývoje zárodku** - vzniknou dvě nebo více buněčných linií s různým počtem chromosomů - **mozaicismus**
- **riziko postižení aneuploidii**
  - riziko trisomie stoupá s **věkem matky**
  - lze dobře demonstrovat u křivky výskytu dětí s Downovým syndromem závislém na věku matky
  - podobná souvislost zaznamenána u **trisomie 13. a 18. chromosomu**
  - vztah mezi **aneuploidii** a **věkem otce** prokázán nebyl - příčina tohoto rozdílu je zřejmě v odlišném časovém průběhu oogeneze a spermiogeneze
    - **profáze I. zracího dělení** vajíček začíná už ve 12. fetálním týdnu děvčátek - v průběhu desítek let existence oocyty se mohou uplatnit různé **mutagenní vlivy** (záření, chemické látky, viry) i vliv **hormonálních poruch** regulace oogeneze
    - **zráním spermií** oproti tomu trvá pouze 72 dní
- **příčina vzniku nondisjunkce** je dosud neznámá
  - opakovaný výskyt **trisomií** v jedné rodině (ať už homo nebo heterotrisomií) podporuje domněnky, že se budou uplatňovat další, patrně **maternální vlivy**
  - **gonadální mozaicismus** může vysvětlit některé ojedinělé případy homotrisomie, ostatní jsou předmětem výzkumu
- podle **novějších výzkumů** se ukazuje, že chromosomy, u kterých nedošlo v **profázi I.** meiotického dělení k **rekombinaci** jsou náchylnější k spontánní nondisjunkci
  - **chiasmata** vznikající při rekombinaci (crossing-over) udržují homologní chromosomy u sebe až do jejich rozchodu v **diakinezi**
  - při selhání chiasmata může docházet k **předčasnému oddělení** chromosomů a k **nepravidelné segregaci** do dceřiných buněk
  - během **oogeneze** probíhá proces rekombinace v prenatálním období, ale k nondisjunkci může dojít kdykoli mezi **15-50 lety života** - období plné ovariální aktivity
  - nondisjunkce tedy může být vyvolána hned **2 způsoby**
    - **chyběním rekombinace** mezi homologními chromosomy ve fetálních ovariích
    - pravděpodobná **porucha tvorby a funkce dělicího vřetenka** během dozrávání folikulů



- další alternativou je hypotéza **opožděného oplození**
  - u některých zvířat bylo prokázáno, že **prodloužení doby** mezi ovulací a oplozením vede ke zvýšenému výskytu aneuploidií a polyploidií
  - někteří lékaři považují fertilizaci **po více než 48 hodinách** po ovulaci za příčinu aneuploidií u člověka
  - souvislost s věkem matky tu lze pozorovat – sexuální aktivita žen má s rostoucím věkem **klesající tendenci** – vyšší pravděpodobnost **opožděného oplození**
  - druhá hypotéza ale tvrdí, že tu má vliv **stárnutí spermií** při nižší frekvenci pohlavních styků (podporují to zvířecí nálezy paternálního Downova syndromu, asi 20% případů)
- u některých druhů (Drosophila) byla nalezena **genetická kontrola nondisjunkce** – tento fakt by mohl vysvětlit opakovaný výskyt nondisjunkce v **některých rodinách**
- **syndromy podmíněné aneuploidií autosomů**
  - **Downův syndrom** (47,XY,+21; 47,XX,+21)
  - **Edwardsův syndrom** (47,XY,+18; 47,XX,+18)
  - **Patauův syndrom** (47,XY,+13; 47,XX,+13)
- **syndromy podmíněné aneuploidií gonosomů**
  - **Turnerův syndrom** (45,X)
  - **syndrom XXX** – superfemale (47,XXX a vzácně i 48,XXXX)
  - **Klinefelterův syndrom** (47,XXY a vzácně i 48,XXXXY nebo 49,XXXXY)
  - **syndrom YY** – supermale (47,XYY)

## Polyploidie

- **střídání** haploidie a diploidie v reprodukčním cyklu je jedním z principů rekombinace a zachování **stability druhu**
- **selhání redukčního dělení** nebo **endoreduplikace** vedou ke zmnožení sad – k polyploidii
- polyploidní buňky obsahují v jádrech 3 a více **násobky haploidní sady chromosomů** (n)
- rozlišujeme **triploidii** ( $3n = 69$  chromosomů), **tetraploidii** ( $4n = 92$  chromosomů) atp.
- **polyploidizace** v evoluci byla mechanismem duplikace genů
- typická je u **kulturních rostlin**, běžná u bezobratlých
- fyziologicky polyploidie přítomna v **somatických buňkách** s velkou **metabolickou aktivitou** (jaterní buňky) nebo **specifickou funkcí** (nervové buňky)
- **triploidie**
  - u člověka nalézána poměrně často v buňkách **vykultivovaných** z časně potracených plodů
  - je popsáno i několik **narozených dětí** s nízkou hmotností a četnými vývojovými vadami, ale ve všech případech **brzké úmrtí**
  - jedinci s **triploidní linií** v mozaice přežívají déle, ale mají mentální retardaci a nespécifické vývojové vady
  - triploidie může vzniknout poruchou I. a II. zracího dělení vajíček (např. **zachování polárního tělíska**) nebo spermií (**produkce diploidních gamet**)
  - další možností je oplození vajíčka 2 spermiemi, **tzv. dispermie**
  - fenotypový projev závisí na původu **nadpočetné sady chromosomů**
    - pokud zárodek obsahuje navíc **mateřskou sadu**, placenta bývá obvykle malá, růst a vývoj plodu je postižen a těhotenství končí **spontánním potratem**
    - je-li nadpočetná **sada paternální**, dochází k nadměrnému růstu trofoblastu a charakteristickým změnám placenty s **tvorbou cyst** (parciální hydatiformní mola)
  - na **počátku gravidity** někdy dojde ke zvrhnutí vývoje placenty – vznik **hroznovitého útvaru** – hydatiformní mola (mola hydatosa, zásněť hroznová)
    - **parciální mola**
      - vznik cystickou přeměnou **trofoblastu** na části obvodu plodového vejce
      - **plod** je rostoucí placentou **utlačován** a zaostává ve vývoji
      - nacházíme tu **triploidii** (69,XXX nebo 69,XXY)
      - nadpočetná sada je **původem od otce**
    - **kompletní mola**
      - vzniká přeměnou **celé placenty**

- **plod není vůbec přítomen** a v buňkách je karyotyp 46,XX
- obě sady chromosomů jsou identické a **paternálního původu**
- **kompletní mola** se vysvětluje oplozením bezjaderného vajíčka haploidní spermií (23,X) a následným **zdvojením sady chromosomů**
- v 5-15% případů může dojít k **malignímu bujení** na základě moly – vznik **choriokarcinomu**
- **tetraploidie**
  - **karyotyp** obvykle 92,XXXX nebo 92,XXYY a příčinou je porucha v prvním mitotickém dělení **normální zygoty**
  - stav je časně **letální**
  - několik **nálezů hydatiformní moly** s tetraploidní výbavou (92,XXXXY) – kombinace haploidního vajíčka a tří sad paternálních chromosomů
  - tetraploidii je možno experimentálně navodit **působením kolchicinu**, který narušuje tvorbu **dělicího vřeténka** a zabraňuje tak rozchodu replikovaných chromosomů v **mitose**

### Mozaicismus, chimérismus

- **mozaicismus**
  - přítomnost **dvou a více geneticky odlišných buněčných linií** v organismu nebo tkáni
  - buněčné linie pocházejí z **jedné zygoty**
  - **chromosomální mozaicismus** je obvykle způsoben nondisjunkcí v období časného **dělení zárodku**
  - **trisomie 21** se vyskytuje v mozaice asi v 1% případů
  - s **rozvojem molekulárních metod** jsou popisovány mozaiky na úrovni molekuly DNA
  - podle výskytu se rozlišuje **mozaicismus somatický a gonadální**
    - **somatický mozaicismus**
      - **abnormální buněčné linie** v somatických buňkách jedince
      - **fenotypové projevy** úměrné velikosti mozaiky a postihují jen svého nositele
      - mozaiky vznikají kdykoli, **prenatálně i postnatálně** (při onkogenezi)
    - **gonadální mozaicismus**
      - podmíněn **vznikem mutací** v zárodečných buňkách, kde se vytvářejí gamety
      - jedna z možných příčin narození dítěte s **vrozenými vadami** zdravým rodičům
- **chimérismus**
  - přítomnost dvou nebo více **geneticky odlišných linií** pocházejících z **více než jedné zygoty** nebo od dvou **jedinců** (dvojčat)
  - tyto linie mají **odlišný původ**
  - u člověka **chiméry dispermičké a krevní**
    - **dispermičký chimérismus**
      - **současné oplození** dvou vajíček nebo vajíčka a jeho pólového tělíska dvěma spermii
      - **vytvořené zygoty** následně splynou v jeden zárodek se smíšeným obsahem **genetického materiálu**
      - pokud došlo k **oplození spermii** nesoucími odlišný **heterochromosom**, vyvíjí se jedinec s **karyotypem XX/XY** a znaky pravého **hermafroditismu**
    - **krevní chimérismus**
      - způsoben přenosem buněk mezi **dizygotickými dvojčaty** placentární cestou

## 35. Strukturální přestavby chromosomů, příčiny a klinické projevy u člověka

### Typy strukturálních přestaveb chromosomů

- základní podmínkou vzniku **strukturálních aberací** je přerušení kontinuity chromosomů
  - **spontánní**
  - působením **indukujících mutagenních vlivů** (ionizující záření, chemické látky)
- vznikají tak **chromosomové** nebo **chromatidové zlomy**

- obnažené konce DNA mají tendenci k **opětovnému napojení** na původní nebo jiný volný konec na základě komplementarity **terminálních bází** – vznik abnormálních struktur a při větším počtu zlomů komplexní **strukturální přestavby**
- **stabilní aberace**
  - změněný chromosom obsahuje **centromery a telomery**
  - je předáván pravidelně do **dceřiných buněk**
- **nestabilní aberace**
  - dojde ke **ztrátě centromery** (acentrický fragment) nebo **telomer** (ring chromosom)
  - segregace do dceřiných buněk není **pravidelná**, vede k eliminaci nebo dalším změnám těchto struktur
- **strukturální chromosomální aberace** mohou být
  - **vrozené**
    - **fenotypový efekt** se liší u jednotlivých typů
    - rozlišujeme změny balancované a nebalancované
    - **balancované**
      - v buňkách je **normální množství** genetického materiálu
      - nedošlo ke ztrátě ani k přebývání části **chromosomální výbavy**
      - nositelé obvykle nemají **žádné fenotypové projevy**, kromě vzácných situací, kdy se **chromosomálním zlomem** poškodí nějaký významný **funkční gen**
      - závažné je riziko pro jejich potomstvo – může docházet ke tvorbě gamet s **nebalancovanou chromosomální výbavou**
    - **nebalancované**
      - změna genomu ve smyslu **chybění nebo přebývání** určité části genetického materiálu
      - tento stav s sebou nese většinou **závažné klinické důsledky**
  - **získané (ZCHA)**
    - stanovujeme při **testování mutagenních a genotoxických účinků** chemických látek a životního prostředí na člověka
    - pro hodnocení **počtu chromosomových zlomů** a přestaveb využíváme metody klasické **cytogenetické analýzy**
    - ZCHA hodnotíme v **preparátech** v z krátkodobě (48 hodin) **kultivovaných** lymfocytů periferní krve
    - zjišťujeme strukturální a početní **odchylky** u 100-200 mitos
    - frekvence ZCHA odráží **expozici škodlivým látkám** v posledních měsících
    - při snížení nebo vyřazení **mutagenního vlivu** prostředí dochází postupně ke snižování počtu přestaveb a zlomů
    - uplatňují se **reparační mechanismy** (variabilní) a selekce postižených buněk
    - v praxi testujeme expozici různým **škodlivinám** na vybraných pracovištích (ve zdravotnictví chemické látky, jedy a cytostatika v laboratořích a na klinických odděleních)
    - hodnotíme tzv. **skupinové riziko** pro zaměstnance jednoho pracoviště jako průměrnou hodnotu výskytu ZCHA ve skupině
    - normální nález je výskyt **aberantních mitos** do 2%, vyšší hodnoty jsou důvodem pro zpřísnění **bezpečnostních opatření** na pracovišti
    - stanovujeme i riziko pro jedince, **individuální**
      - **hraniční hodnoty** jsou 2-5% - důvod pro opakování vyšetření s časovým odstupem
      - hodnoty **nad 5%** svědčí o vysoké mutagenní expozici nebo o zvýšené citlivosti jedince
    - cytogenetickou analýzu lze použít jako metodu **biodozimetrie** u jedinců, **vystavených záření**, u nichž byla zjištěna lineárně logaritmická závislost počtu aberací v buňce na **dávce**
- samostatnou skupinu tvoří **syndromy s lomivostí chromosomů** (syndromy chromosomální instability)
  - Fanconiho anémie, Bloomův syndrom, xenoderma pigmentosum a ataxia teleangiectasia
  - onemocnění AR dědičná s častým výskytem nádorů
  - typické nálezy **vyššího počtu chromosomových zlomů a přestaveb**
- obecně lze vymezit několik základních typů **strukturních aberací**

- **balancované**
  - translokace
  - inverze
  - inserce
- **nebalancované**
  - delece
  - duplikace
  - isochromosom
  - ring chromosom

## Delece

- **ztráta** části chromosomu
- způsobuje **monosomii** příslušného úseku a jedná se tedy o nebalancovanou přestavbu
- **terminální delece**
  - vzniká **jedním zlomem** chromosomu
  - ztráta **acentrické** koncové části
- **intersticiální delece**
  - ztráta části chromosomu mezi **dvěma zlomy**
- delece může vznikat i tzv. **inekválním crossing-overem**, kdy na jednom chromosomu vzniká duplikace a na druhém delece
- delece velkého úseku chromosomu bývá **neslučitelná se životem**
- obecně platí, že ztráta **více jak 2-3% genomu** haploidní sady je letální, prognóza ale také závisí na konkrétním genetickém **obsahu deletovaného úseku**
- podle rozsahu se rozlišují dvě **úrovně delece**
  - **delece viditelné** v mikroskopu na chromosomech při standardním cytogenetickém vyšetření
  - **mikrodelece**
    - ztráta **submikroskopického úseku** pozorovatelná na prometafázických chromosomech získaných **metodou HRT** (high resolution technique)
- **zvláštní chromosomální přestavby** spojené s **delecí** jsou ring chromosom, isochromosom a dicentrický chromosom
  - **ring a dicentrický chromosom** patří mezi nestabilní struktury
  - nacházíme je často v **nádorových buňkách**
  - **dicentrický chromosom** vzniká současným zlomem obou chromatid dvou chromosomů, jejich spojením a ztrátou **acentrických fragmentů**
  - vzniklý chromosom pak má **dvě centromery**
  - při dalším dělení dochází většinou k jeho **přerušení** a vzniku dalších strukturálních přestaveb
- **deleční syndromy**
  - **Cri du chat syndrom**
    - **karyotyp:** 46,XX, del(5)(p?) / 46,XY, del(5)(p?)
    - **terminální delece** různého rozsahu na krátkém rameni chromosomu 5
    - způsobuje klinický obraz syndromu **kočičího křiku**
    - **klinický obraz**
      - nízká **porodní hmotnost**, neprospívání
      - výrazná psychomotorická **retardace**
      - **mikrocefalie**, faciální dysmorfie (měsícovitý obličej, malá brada, hypertelorismus, epikanty)
      - **charakteristický pláč** připomínající mňoukání kočky – **hypoplasie laryngu** v časném věku, s věkem se postupně upravuje
    - **četnost** 1:20 000
    - **délka života** je většinou nezkrácena
    - typické projevy spojeny s **chyběním** distální části krátkého ramene, delece může být tedy malá až **submikroskopická** nebo naopak rozsáhlá, když chybí téměř celé krátké rameno 5p
    - v přesném **zápisu karyotypu** pak nahrazujeme otazník konkrétním označením místa zlomu
  - **Turnerův syndrom – deleční forma**

- **karyotyp:** 46,X,del(X)(p?) / 46,X,del(X)(q?)
- Turnerův syndrom může být zapříčiněn nejen chyběním **druhého pohlavního chromosomu**, ale i strukturálními změnami chromosomu X případně Y
- patří sem **delece různého rozsahu**, isochromosom, ring chromosom, dicentrický nebo isocentrický chromosom
- všechny tyto změny vedou k **chybění některých úseků** chromosomu X nebo méně často chromosomu Y a vyskytují se v **mozaice** nebo vzácně v **čisté linii**
- **výsledný fenotyp** je variabilní a vliv mají geny ležící v **pseudoautosomálních oblastech chromosomů X a Y**, které nepodléhají inaktivaci (oblasti PAR1 a PAR2)
- **delece na krátkém rameni Xp**
  - přítomny **znaky Turnerova syndromu**, hlavně malá postava a skeletální odchylky
  - změny souvisejí s chyběním distální části Xp, kde je lokalizován **gen SHOX** (Short stature Homeobox-containing gene), nepodléhající **inaktivaci**
  - tento gen má klíčovou roli ve **vývoji skeletu**
  - přítomnost poruchy vývoje **sekundárních pohlavních znaků** a sterility je variabilní podle **rozsahu** chybějící části Xp
- **delece na dlouhém rameni Xq**
  - poměrně **vzácné případy**
  - ze znaků Turnerova syndromu je především **ovariální dysgeneze** s primární amenoreou a **sterilitou**
  - **růstová porucha** přítomna být nemusí
- **mikrodeleční syndromy**
  - skupinu mikrodelečních syndromů tvoří syndromy způsobené **poškozením více genů** lokalizovaných těsně vedle sebe na **jednom chromosomu**
  - označovány jako syndromy genů naléhajících na sebe (**contiguous genes syndromes**)
  - každý z genů ovlivňuje **fenotyp nezávisle** na ostatních a výsledný klinická manifestace odpovídá **rozsahu poškození DNA**
  - zpravidla se jedná o **mikrodelece**, vzácně **mikroduplikace**, které nerozeznáme běžnou cytogenetickou metodou
  - změny vznikají prostou delecí nebo ztrátou **krátkého segmentu chromosomu** v rámci reciproké translokace nebo inverze v **kritické oblasti**
  - detekci umožňuje vyšetření **prometafázických chromosomů** získaných technikou **HRT**
  - nejmenší změny struktury chromosomů ještě viditelné v mikroskopu odpovídají **délce 4 Mb**
  - **menší delece** jsou diagnostikovatelné **pomocí FISH** s použitím lokus specifických sond nebo metodami molekulární **DNA analýzy**
  - klinicky syndromy nejsou **přesně definované** a vyhraněné
  - různé kombinace a počet **poškozených genů** v oblasti podmiňují variabilní fenotypové projevy, pravidelně bývá přítomna **mentální retardace**
  - stejný **klinický obraz** může být způsoben i **bodovými mutacemi** příslušných genů bez delece (syndrom Rubinstein-Taybiho až v 90%) nebo mechanismem **genomového imprintingu** v souvislosti s uniparentální disomií (Prader-Williho a Angelmanův syndrom)
  - **výskyt** mikrodelečních syndromů je sporadický
  - **příklady mikrodelečních syndromů**
    - **Williamsův syndrom:** 7q11.23
      - dysmorfický skřítkovitý obličej
      - VVV cév a ledvin
      - hypoplastické zuby
      - mentální retardace
    - **Langer-Giegionův syndrom:** 8q24.11
      - mnohočetné chrupavčité exostózy
      - malý vzrůst
      - trichorinofalangeální dysplasie
      - mentální retardace
    - **WAGR syndrom:** 11p13

- Wilmsův tumor
- aniridie
- genitourinální dysplazie
- mentální retardace
- **retinoblastom: 13q14**
  - retinoblastom
  - psychomotorická retardace
- **Angelmanův syndrom: 15q11-13**
- **Prader-Williho syndrom: 15q11-13**
- **Rubinstein-Taybiho syndrom: 16p13.3**
  - charakteristická facies
  - široké konečné články především palců rukou a nohou
  - malý vzrůst
- **Miller-Diekerův syndrom: 17p13.3**
  - psychomotorická retardace
  - lisencefalie
  - faciální dysmorfie
- **Smith-Magenisův syndrom: 17p11.2**
  - brachycephalie
  - faciální dysmorfie
  - psychomotorická a růstová retardace
  - poruchy chování
- **DiGeorgův syndrom: 22q11.2**
  - aplasie thymu a příštítných tělísek
  - dysmorfický obličej
  - srdeční vady (často překrývání s velokardiofaciálním syndromem)
- **Prader-Willyho syndrom a Angelmanův syndrom**
  - **kritická oblast** spojená s Prader-Willyho a Angelmanovým syndromem je lokalizována na dlouhém rameni chromosomu 15 (15q11-13)
  - v této oblasti se v **70% případů** vyskytuje intersticiální delece různého rozsahu a pokud delece postihuje chromosom 15 **pocházející od otce**, vyvíjí se **klinický obraz Prader-Willyho syndromu**
  - **delece maternálního** původu vede ke vzniku **Angelmanova syndromu**
  - **vliv původu delece** na vývoj syndromu vysvětluje existence **genomického imprintingu** v kritické oblasti 15q
    - v dané oblasti leží **dva genové úseky**, první (PWCR – Prader-Willy critical region) je aktivní pouze na **paternálním chromosomu** 15 a analogický úsek na **maternálním** je vlivem imprintingu **umlčen**
    - **druhý úsek** je aktivní pouze na **maternálním chromosomu** 15 (ACR – Angelman critical region) a **neaktivní** na chromosomu **otcovském**
    - za normální situace je přítomen jeden otcovský a jeden mateřský chromosom – jedinec má po jedné **aktivní kopii obou** kritických genových úseků a jeho fenotyp není **postižen**
    - v případě delece ale **jeden kritický úsek** chybí a vzniká tak podle původu deletovaného úseku **konkrétní syndrom**
  - oba syndromy ale mohou být způsobeny **jinou příčinou** bez delece
  - nejčastější je **uniparentální disomie** – původ obou chromosomů nebo jejich kritických oblastí pouze od **jednoho rodiče**
    - pokud oba **pocházejí od otce** = Angelmanův syndrom (chybí aktivní ACR a oba analogické úseky paternálního chromosomu jsou inaktivní imprintingem)
    - pokud oba **pocházejí od matky** = Prader-Williho syndrom (chybí aktivní PWCR)
  - **Angelmanův syndrom** může být způsoben i mutací v genu UBE3A v ACR úseku a asi u 10% je příčina nezjištěna

- ve **vzácných případech** obou syndromů může nastat porucha vlastního imprintingu (mutace imprintingového centra, IC) a aktivace/inaktivace kritických oblastí je chybná
- klinicky se řadí **oba syndromy** mezi behaviorální syndromy s typickým chováním
- fenotyp obou jednotek je **značně odlišný**
- **Prader-Willyho syndrom**
  - 1 : 10 000 – 15 000 dětí
  - u novorozenců nápadná těžká **hypotonie**
  - kojenci problém s kojením, polykáním – **neprospívají**
  - od dvou let se projevuje **patologické přejídání** až žravost – extrémní obezita
  - mentální retardace bývá jen mírná
  - nápadné jsou **změny nálad**, poruchy chování ve smyslu agresivity
  - nesnášenlivost při změně **rutinních situací** a poruchy spánku
  - prognóza závisí na výskytu **komplikací obezity** (diabetes, kardiovaskulární komplikace, poruchy metabolismu)
  - lze ovlivnit **omezením příjmu potravy** a úpravou pohybového režimu
- **Angelmanův syndrom**
  - 1 : 12 000 dětí
  - těžká **psychomotorická retardace**, děti se obvykle nenaučí mluvit
  - u třetiny patologické EEG a **epileptické záchvaty**
  - typická **toporná chůze**, stereotypní ataktické pohyby končetin
  - nemotivované **záchvaty smíchu**
  - děti se syndromem milují vodu, plastové předměty, zvukové hračky a balony
  - **fascinace vodou** jim může být životně nebezpečná, proto vyžadují stálý dozor
  - pro zvláštní chůzi a veselý výraz se tomuto syndromu dříve říkalo **happy puppet**
- **Wolf-Hirschhornův syndrom**
  - **delece** krátkého ramene chromosomu 4
  - může být různého rozsahu, ale většinou chybí pouze malá subtelomerická část (4p16.3)
  - proto syndrom obvykle řadíme mezi **mikrodelece**
  - vyskytují se vzácně – 1 : 25 000 – 30 000 novorozenců
  - třetina postižených umírá do **jednoho roku**
  - **klinický obraz**
    - je přítomna těžká psychomotorická retardace, neprospívání
    - typická **faciální dysmorfie** (hypertelorismus, široký nos, rybí ústa)
    - časté jsou vrozené **vady srdce**, CNS a dalších orgánů

## Ring chromosom

- **prstenčitý chromosom**
- vzniká současným **zlomem obou ramen** chromosomu a jejich **spojením**
- **terminální acentrické fragmenty** jsou ztraceny
- ring chromosom byl popsán u **všech chromosomů člověka**
- při původu z některého **autosomu** je fenotypový efekt závažný a závisí na velikosti **deletovaného úseku**
- vždy je přítomna těžká **psychomotorická retardace**
- ring chromosom podléhá při **mitotickém dělení** často dalším strukturálním změnám (v anafázi dochází k **propletení prstenců** sesterských chromatid a k jejich zlomu)
- díky své **nestabilitě** bývá detekován zpravidla jen v části buněk jedince, v **mozaice**
- jedním z nejčastějších nálezů této aberace je **ring chromosom X**, obvykle přítomný v **mozaikové formě**
- další linií může být např. 46,XX, 45,X nebo také 46,XY

## Inverse

- **balancovaná** strukturální přestavba
- podmíněna **2 zlomy** na jednom chromosomu a **znovunapojením** části mezi nimi v obrácené poloze
- podle umístění na chromosomu se rozlišují **2 typy**
  - **pericentrická inverze**



- invertovaný úsek obsahuje **centromeru**
- **paracentrická inverze**
  - místa zlomu jsou na **stejném rameni**
- v **karyotypu** inverzi rozeznáváme podle změny pořadí pruhů a pericentrická inverze mění **poměr délek** krátkých a dlouhých ramének chromosomu
- pro svého nositele nepřináší **fenotypový projev**, kromě vzácných případů, kdy je v místě zlomu postižen **významný gen**
- inverze má ale důsledky pro **potomstvo** a pro fertilitu nositele, protože při gametogenezi může dojít ke vzniku nebalancovaných gamet
  - během **meiosy I** dochází při synapsi mezi homologními chromosomy v úseku inverze k tvorbě **inverzní smyčky**
  - **crossing overem** v této oblasti vznikají rekombinované chromosomy s **nebalancovanou výbavou**
  - **pericentrická inverze**
    - tvoří se dva **komplementární rekombinované chromosomy** s parciální delecí jednoho úseku distálně od místa inverze a **parciální duplikací** druhého koncového segmentu a naopak
    - riziko postižení dětí nositelů je 1-10% v závislosti na **relativní velikosti inverze** a na anamnéze
    - u inverzí **velkého rozsahu** bude riziko narození postiženého dítěte větší – deletované a duplikované **úseky budou relativně krátké** a narodí se tak plod s těžkými **vývojovými vadami**
    - u inverzí **malého rozsahu** bude riziko narození postiženého dítěte malé – rekombinované chromosomy mají **relativně dlouhé úseky** deletované nebo duplikované, takto nebalancovaná výbava není **slučitelná se životem** a plody jsou často **spontánně potraceny**
  - **paracentrická inverze**
    - následkem **inekválního crossing-overu** vznikají acentrické a dicentrické rekombinanční chromosomy s **letálním účinkem** pro embryo
    - nositelé této inverze mají **sníženou plodnost** a riziko narození postiženého dítěte je u nich **extrémně nízké**
- častým nálezem je při **vyšetření periferní krve** pericentrická inverze heterochromatinové oblasti chromosomu 9
- je považován za **variantu nebo polymorfismus** bez fenotypových následků pro nositele
- na rozdíl od ostatních inverzí není spojena se **zvýšeným rizikem spontánních potratů** ani postižení potomstva

## Translokace

- **balancovaná** strukturální přestavba
- dochází k **přemístění genetického materiálu** z jednoho chromosomu na druhý
- rozlišujeme translokaci **reciprokou a Robertsonovu**
  - **reciproká translokace**
    - podmíněna zlomem **dvou nehomologních chromosomů** a vzájemnou výměnou oddělených částí za vzniku **dvou nových** derivovaných chromosomů
  - **Robertsonova translokace**
    - zvláštní typ translokace vznikající pouze mezi **akrocentrickými chromosomy** jejich **centrickou fúzí**
- **reciproká translokace**
  - vzniká současným zlomem dvou **nehomologních chromosomů** a výměnou fragmentů
  - méně časté jsou **komplexní přestavby** za účasti více chromosomů – typické pro nádorový karyotyp
  - celkový **počet chromosomů** zůstává 46
  - **reciproké translokace časté** – 1:500, u párů s opakovanými spontánními aborty nebo s dítětem s **vrozenými vadami** (nebalancovaná chromosomální výbava)
  - po zjištění **nosičství** reciproké translokace lze určit riziko postižení dítěte – 1-10%
  - **balancovaná translokace** neovlivňuje fenotyp, výjimkou je **efekt pozice**

- při přemístění určitého genu na místo, kde **podléhá regulačnímu vlivu** jiného genu, se může významně změnit jeho exprese a funkce
- translokace t(9;22) u myeloidní leukémie – **Filadelfský chromosom**
- translokace t(8;14) u **Burkittova lymfomu**
- **závažnost** balancované translokace spočívá v chování chromosomů v meiose
  - v profázi **I. zracího dělení** se vytvářejí v průběhu synapse složitě figury – **tetravalenty**
  - tetravalent vzniká **párováním homologních úseků** zúčastněných chromosomů
  - **pravidelná segregace** do dceřiných buněk je narušena a probíhá jinak – obvykle segregace 2:2 – do každé gamety se rozcházejí vždy 2 zúčastněné chromosomy
  - rozlišujeme **3 možné způsoby** této segregace
    - **střídavou**: vznikají gamety s normální nebo balancovanou haploidní výbavou, embryo takto počaté bude obsahovat **normální chromosomy** nebo opět **balancovanou translokaci** jako jeden z rodičů
    - **sousední-1**: rozchod chromosomů s homologními centromerami
    - **sousední-2**: vzácná, oddělují se chromosomy s nehomologními centromerami (chromosomy s homologními chromosomy putují společně k jednomu pólu)
  - gamety vznikající **sousední segregací** jsou vždy nebalancované a nesou **delece** nebo **duplikace**
  - embrya z těchto gamet pak mají **parciální monosomie a trisomie** úseků umístěných distálně od **místa zlomu**
  - pravděpodobnost vzniku **gamet balancovaných a nebalancovaných** se liší v závislosti na **velikosti translokovaných úseků**
  - další možností je **segregace 3 chromosomů** do jedné gamety a 1 chromosomu do **druhé gamety** (3:1)
  - většina **kombinací** vzniklých tímto způsobem je neslučitelná se životem, malá část vede k mnohočetnému **těžkému postižení** (některé tzv. terciární trisomie)
- **Robertsonova translokace**
  - vzniká zlomem dvou **akrocentrických chromosomů** (13, 14, 15, 21, 22) v oblasti centromery a následným **spojením dlouhých ramen**
  - přestavba se označuje jako **centrická fúze**
  - **krátká ramena** jsou ztracena, což ale **nezpůsobuje klinické projevy** – obsahují jen geny pro rRNA, které se vyskytují mnohonásobně i na **jiných akrocentrech**
  - celkový počet chromosomů je **snížen na 45**, ale přestavba je balancovaná a fenotyp neovlivněn
  - významná je opět **segregace chromosomů** do gamet – téměř ve všech případech se tvoří šest typů gamet 3 způsoby segregace (jako u reciproké translokace)
  - většina gamet je **nebalancovaná** – disomické a nullisomické, menší část obsahuje normální nebo balancovaný **haploidní komplement**
  - při **těhotenství postižených rodičů** je závislý na druhu postižených chromosomů, obecně vyšší výskyt **spontánních abortů**
    - **disomické gamety** s chromosomy 13 a 21 podmiňují trisomii 13 – Pataův syndrom a trisomii 21 – Downův syndrom
    - **monosomie** chromosomů 13, 14, 15, 21 a 22 a trisomie 14, 15 a 22 jsou nebalancované a letální
    - u nositele **translokace 21;21** vznikají dva typy gamet – disomické nebo nullisomické – v tomto případě je riziko Downova syndromu 100% bez ohledu na pohlaví nositele
- **translokační syndromy**
  - **Downův syndrom – translokační forma**
    - u 4-5% jedinců s Downovým syndromem je **translokační forma trisomie 21**, kdy třetí kopie 21. chromosomu je translokována na některý jiný **akrocentrický chromosom**
    - tato forma bývá často **familiární**, jeden z rodičů je nositelem balancované **Robertsonovy translokace**
    - riziko **opakování narození dítěte** s Downovým syndromem závisí na typu translokace a na pohlaví nositele **translokace**

- **teoretické riziko** je při translokaci chromosomu 21 s chromosomem 13, 14, 15 nebo 22 je 1/3 ale v praxi je riziko obecně nižší
- pokud je **nositelem translokace otec**, uvádí se riziko 5-7%, u **mamy** se uvádí 10-15%
- u translokace 21;21 je **pravděpodobnost narození** dítěte s Downovým syndromem 100%

### Isochromosom

- **mediocentrický chromosom** tvořený dvěma krátkými nebo dvěma dlouhými rameny téhož chromosomu
- vznik **příčným rozdělením centromery** během II. meiosis – rozdělení sesterských chromatid proběhne **chybně** (příčně) a výsledný chromosom obsahuje **dvě kopie** krátkých nebo dlouhých **ramen chromosomu**
- způsobuje **parciální monosomii** jednoho ramene a parciální trisomii druhého ramene daného chromosomu
- popisováno u řady **syndromů**
- nejčastější je isochromosom **dlouhých ramen chromosomu X** s fenotypovými znaky Turnerova syndromu – asi 15% celkového výskytu
- **isochromosom Xp** je vzácnější, podmiňuje gonadální dysgenesi
- často se isochromosomy vyskytují v **karyotypech nádorových buněk**

### Inserce

- **vložení chromosomového segmentu** na kterékoli místo jiného nebo téhož chromosomu
- vyžaduje **nejméně 3 zlomy** a postihuje jeden nebo dva chromosomy
- **insertovaný úsek** může být na novém místě v normální nebo obrácené poloze (přímá, resp. invertovaná inserce)
- **inserce je balancovaná** přestavba bez ovlivnění fenotypu
- při **postížení dvou různých chromosomů** představuje pro svého nositele 50% riziko tvorby **nebalancovaných gamet**, nesoucích buď deletovaný nebo insertovaný chromosom

### Duplikace

- **chromosomové duplikace** označují zdvojení určitého úseku chromosomu
- vznikají **inekválním crossing-overem** za současného vzniku **delece na párovém chromosomu**
- jiným mechanismem je segregace chromosomů derivovaných nebo rekombinovaných v důsledku **strukturální přestavby** (translokace, inverze)
- **duplikace se vyskytuje jako**
  - **tandemová**: zdvojené úseky jsou umístěny vedle sebe
  - **inserční**: nadpočetný úsek je lokalizován na kterémkoli místě genomu
- pro svého nositele mají duplikace **méně závažné klinické projevy** než delece
- obecně bývá letální **delece** o rozsahu 3% haploidního genomu a **duplikace** až při 5% (záleží ale na konkrétním postiženém chromosomu)
- **fenotypový obraz** odpovídá zčásti příznakům **trisomie** daného chromosomu, mluvíme též o **parciální trisomii**

### Marker chromosom

- **malé nadpočetné chromosomy** v karyotypu
- určitý chromosomový **segment**, jehož původ většinou nelze konvenčně blíže specifikovat
- stanovení **rizika postižení plodu** při nálezů marker chromosomu v plodové vodě je ovlivněno více faktory
- pokud **marker chromosom** nese i jeden z rodičů, pravděpodobně se neprojeví ani u plodu
- v případě nálezů **de novo** se ale uvádí riziko až 15%
- význam má i **morfologie marker chromosomu**
  - riziko je nižší pokud **obsahuje satelity** a je tvořen převážně heterochromatinovým materiálem
  - riziko je vyšší pokud marker chromosom **neobsahuje satelity**, ale je tvořen euchromatinem – klinický obraz pak odpovídá parciální trisomii této oblasti

- relativně častý je výskyt marker chromosomu v **mozaice**
- **zavedení FISH** umožňuje přesnější určení původu marker chromosomů a tím lepší **prognostický odhad**
- nejčastějším nálezem bývá **marker chromosom** z části materiálu **15. chromosomu**
- pojem marker je užíván i v jiném významu – pro označení **určitého jevu** nebo nálezu, který je asociován s určitou chorobou, diagnózou a podobně
- klasickým příkladem je **Filadelfský chromosom** – marker chronické myeloidní leukémie

### Fragilní místa

- při vyšetření nacházíme na **některých chromosomech** oblasti, ve kterých není chromatin plně **spiralizován** a obě chromatidy jsou jakoby **přerušeny**
- tyto nebarví se mezery (gapy) jsou **fragilní místa** (fragile site) – v těchto bodech se jednotlivé chromatidy častěji **lámou**
- podle některých hypotéz mají **fragilní místa** souvislost se zlomy chromosomů při specifických strukturálních přestavbách v buňkách **maligních nádorů**, tzv. hotspots
- přítomnost fragilních míst je prokazatelná po **kultivaci buněk** v médiu se sníženým obsahem **kyseliny listové nebo thymidinu**
- v současné době se pro **detekci** častěji užívají techniky **molekulární diagnostiky**
- fragilní místa se vyskytují poměrně **vzácně**, zvláštní postavení má fragilní místo na **dlouhém rameni chromosomu X**
- **syndrom fragilního X (FRA X syndrom)**
  - představuje **nejčastější vrozenou příčinu mentální retardace** u chlapců s výskytem asi 1 : 4000
  - dědičnost je **gonosomálně recesivní**, postižení jsou většinou chlapci
  - ženy bývají **přenašečkami** ale mohou být i postižené, obvykle ale méně silnou formou
  - **klinický obraz**
    - nápadně **protáhlý typický obličej**
    - velké ušní boltce
    - zvětšená testes
  - diagnostika bývala **cytogenetická**, po speciální kultivaci s deficitem **kyseliny listové** v médiu se zjišťovala přítomnost **fragilního místa** na distálním konci dlouhého ramene X – fra (X)(q27.3)
  - vyšetření značně **nespolehlivé** – fragilní místo zachyceno jen ve velmi malém počtu mitóz
  - v současnosti diagnostika **výhradně molekulární**, založena na přímé detekci vlastní příčiny – **amplifikaci trinukleotidových repetit CCG** v genu FMR1 ležícím v dané oblasti

## 36. Somatické a gametické chromosomální aberace

- 
- chromosomální aberace jsou **numerické** nebo **strukturní odchylky** od normální stavby karyotypu

### Somatické chromosomální aberace

- **získané** chromosomální aberace
- nepřenáší se na **potomky**
- vznikají až v **průběhu života jedince** a to pouze v některých buňkách
- v časných stádiích vývoje zygoty vzniká **mozaika**, dochází ke vzniku podobných syndromů jako při **gametických** chromosomálních aberacích
- **postnatálně** zpravidla znamenají vznik nádorů
- jedná se o **numerické i strukturní aberace**
- typickým příkladem jsou chromosomální přestavby v **nádorových buňkách** nebo např. Philadelphský chromosom apod.

### Gametické chromosomální aberace

- **vrozené** chromosomální aberace
- přítomné od **narození**, přesněji již od počátku vývoje jedince
- přítomné ve **všech buňkách těla** (i v zárodečných) a mohou se přenášet na potomky
- **numerické**

- **nondisjunkce v meiose I** vede ke vzniku gamety s 2 různými (jeden od otce, jeden od matky) nebo žádným z páru chromosomů u kterého nondisjunkce proběhla
- **nondisjunkce v meiose II** vede ke vzniku gamety s 2 stejnými (oba od otce nebo matky) nebo žádným s párů chromosomů, u kterého nondisjunkce proběhla
- **polyploidie** – zmnožení celých sad chromosomů, genomové aberace (vzniká hydatiformní mola neslučitelná se životem)
- **aneuploidie** – trisomie nebo monosomie
- **strukturní**
  - delece
  - duplikace
  - inzerce
  - inverze
  - ring chromosom
  - isochromosom
  - marker chromosom
  - dicentrický chromosom
  - translokace reciproká a Robertsonova

### 37. Příčiny vzniku chromosomálních aberací

- **chromosomální aberace** – poškození molekulární struktury DNA se může v eukaryotním genomu projevit i poškozením normální **struktury chromosomu**
  - **numerické**
  - **strukturní**
- poškozením **struktury chromosomu** není změněna **struktura genů**, které jsou v něm lokalizovány, ale je změněno pořadí nebo i počet jeho **genových lokusů**
- podstatou **chromosomální aberace** je zlom na 1 či více místech – v důsledku toho se vždy porušuje jeho **homologie** s chromosomem párovým; **fragmenty** chromosomu se sice obvykle spojí, ale jinak než v **chromosomu standardním**, někdy zůstanou i nespojeny
- **příčiny vzniku**
  - **rodinné predispozice**
  - **vlivy prostředí** – mutagenní faktory
  - **vyšší věk matky**
  - existence genů **predisponujících** na nondisjunkci – autoimunitní choroby matky
  - **radioaktivní záření**
  - **chromosomové abnormality rodičů**
  - **numerické**
    - nerovnoměrné rozdělení chromatid v průběhu mitózy a meiózy = tzv. genomové mutace
    - aneuploidie a polyploidie
  - **strukturní**
    - chromosomové zlomy – reparační mechanismy – chybné napojení částí molekul DNA
    - delece, duplikace, marker chromosom, inverze, translokace, isochromosom, fragile site

#### *Numerické chromosomální abnormality*

- příčinou **aneuploidií** (trisomií, monosomií) je **nondisjunkce** – chyba v rozdělení homologních chromosomů v I. meiotickém dělení, nebo chromatid v II. meiotickém dělení a oplození abnormální **disomické** nebo **nullisomické** gamety
- další mechanismus, který vede po oplození abnormální gamety k monosomii je **opoždění chromosomu v anafázi** a jeho nezačlenění do dceřiného jádra
- obě tyto chyby mohou nastat i **postzygoticky**, pak vzniká mozaika

- pokud chyba v rozdělení chromosomů postihne všechny chromosomy, vzniká abnormální **neredukovaná gameta**
- **příčiny nondisjunkce**
  - za hlavní příčinu považován **vyšší věk matky** (věk matky ovlivňuje délku **I. meiotického dělení**, které u ženy započiná již v době embryonálního vývoje)
  - **věk otce** nemá tak výrazný efekt
  - vyšší věk matky **exponenciálně zvyšuje riziko** nondisjunkce v gametogenezi a **riziko trisomií** u plodu
  - **incidence monosomie 45 X** a polyploidii však na věku matky nezávisí – monosomie X častěji vznikají **opožděním chromosomu** v anafázi a jeho ztrátou, většina **triploidii** vzniká **chybou fertilizace** (tzv. dispermií) a **tetraploidie** vzniká **endoreduplikací** – chybou při prvním **dělení zygoty**
- vysvětlení **závislosti trisomie** na věku matky
  - **stárnutí vajíčka**, nedostatečná **hormonální činnost** a další faktory spojené se stárnutím mohou přispívat k chybě v **rozdělování chromozomů** – nondisjunkci, zvláště v I. meiotickém dělení
  - bylo zjištěno, že s věkem dochází ke snížení četnosti **rekombinací** chromozomů
  - protože **chiasmata stabilizují bivalenty** v pozdní profázi I. meiotického dělení, pokud k **rekombinaci nedojde**, bivalent se rozpadá na **univalenty** předčasně, nebo předčasně **separují chromatidy** (ty mohou začít separovat již v prvním meiotickém dělení)
  - to je považováno za **bezprostřední příčinu** chybného **rozchodu chromozomů** a vzniku **abnormálních gamet**
  - o příčinách **opoždění chromozomu** v anafázi a jeho ztrátě, která vede k nulizomické gametě, nebo **monozomické buněčné linii** (pokud nastane postzygoticky), víme mnohem méně
  - je ale známo, že **somatická ztráta** jednoho **gonozomu** postihuje buňky **starších žen** (vyskytuje se i u mužů), jak můžeme detekovat v periferních lymfocytech
  - zřejmě se jedná o nedostatečnou funkci mechanismu, který kontroluje **nápojení chromozomů na dělicí vřeténko** (funkce kinetochoru, kinetochorových proteinů)
  - **abnormální segregace** chromozomů v anafázi může být i důsledkem mutace některého z **genů**, které se svými produkty podílí na **kontrole mitotického dělení** (kontrole **nápojení kinetochorů** na dělicí vřeténko)
  - takovéto **mutace** vedou k **chromozomální nestabilitě**, tj. k numerickým změnám chromozomů, které jsou popisovány v **nádorových buňkách**
- **rodičovský původ aneuploidních gamet**
  - studium **polymorfních molekulárních markerů** prokázalo, že nondisjunkce nejčastěji nastává v oogenezi, a to častěji v I. meiotickém dělení než v II. meiotickém dělení
  - **trisomie 21**
    - 90 % chyb vzniká v **oogenezi**, pouze 10 % ve **spermiogenezi**
    - 73 % mateřských nondisjunkcí chromozomu 21 vzniká v **I. meiotickém dělení**, 25 % v **II. meiotickém dělení**, 2 % nondisjunkcí vzniká **postzygoticky**
    - převaha chyb v I. meiotickém dělení v mateřské meioze platí i pro další trizomie (trizomie 18, 13, XXX i další)
    - zajímavé je, že letální **trizomie 16**, častá v potratech, ale nevyskytující se u živě narozených, je pouze mateřského původu (chyba vždy v I. meiotickém dělení)
  - **karyotyp 47,XXY**
    - vzniká chybou (nondisjunkcí) na **straně matky** pouze v 54 %, chyba je opět častější v **I. meiotickém dělení**
  - **monosomie X**
  - 78 % všech **monozomií X** vzniká ztrátou **otcovského gonozomu**, tato ztráta je zřejmě **postzygotická**, alespoň u živě narozených monozomií X
  - uvádí se, že pouze 1 % všech vzniklých monozomií X přežívá, pravděpodobně monozomie X je letální a všechny přeživší monozomie X jsou ve skutečnosti mozaiky i když často **nepoznané mozaiky**
  - pokud se ztrácí **Y chromozom**, ztrácí se velmi časně

## Strukturní aberace chromosomů

- **strukturní aberace** jsou důsledkem **zlomů**, ev. jejich nesprávného spojení
- vznikají působením **exogenních**, ale i **endogenních faktorů**
- **faktory**, které mají schopnost produkovat zlomy chromosomů označujeme jako **klastogeny**
- kritickou lézí pro vznik strukturních aberací jsou **dvouvláknové zlomy DNA** (v literatuře používaná zkratka DSBs = double strand breaks) a **chromozomální aberace** je tak vlastně důsledkem **nezreparovaného** nebo chybně zreparovaného **DNA poškození**
- **vznik dvouvláknových DNA zlomů (DSB)**
  - endogenně vznikají zlomy DNA v průběhu **oxidativního metabolismu**, působením **topoizomeráz**
  - v průběhu **DNA replikace a reparace**, DNA rekombinace (crossing-over v meioze)
  - při **somatické rekombinaci imunoglobulinových** genů, tedy během přirozených buněčných procesů
  - **jednovláknové zlomy** mohou být v průběhu replikace konvertovány ve zlomy **dvouvláknové**
  - mezi **exogenní faktory** s klastogenními účinky patří **záření (ionizující, UV)**, **chemické látky** (alkylační látky, analogy bazí, alkyl epoxidy, aromatické aminy, nitrozosloučeniny, těžké kovy) nebo **restrikční endonukleázy**
  - **dvouvláknové zlomy DNA** mohou být indukovány **přímo** (ionizující záření), nebo **nepřímo** (UV záření, volné radikály, chemické látky nebo jejich metabolity), kdy primární DNA poškození (alkylace, hydroxylace nebo jiné alterace bazí) je **enzymatickou** reparací transformováno v jednovláknové a poté dvouvláknové zlomy DNA
- **oprava DSB**
  - DSB jsou opravovány **dvojím způsobem**
  - **homologní rekombinace**
    - homologní rekombinace vyžaduje přítomnost **homologních sekvencí**, tj. přítomnost **sesterské chromatidy**
    - probíhá tedy v S nebo G2 fázích **mitotického buněčného cyklu**
    - nebo přítomnost homologního chromozomu (způsob, kterým probíhá meiotická rekombinace)
  - **nehomologní spojování zlomených konců**
    - nehomologní **spojování zlomených konců** probíhá hlavně v G0, G1 fázích buněčného cyklu, tj. **bez přítomnosti homologního templátu**, ale může probíhat ve všech fázích buněčného cyklu
    - tímto způsobem probíhá i **somatická rekombinace** imunoglobulinových genů, genů pro T buněčné receptory a izotypový přesmyk
    - tento druhý způsob spojování zlomů je **náchylnější k chybám**, protože využívá krátkých homologií, které se nacházejí v **blízkosti zlomených konců** chromosomů a úpravu zlomených konců, což může vést k **submikroskopickým delecím** nebo **inzercím** v místě zlomů při jejich spojování
  - oba způsoby – homologní rekombinace i nehomologní spojování zlomených konců chromosomů – mohou vést jak k **bezchybné eliminaci DSB**, tak i k mutacím a **chromozomálním aberacím** v důsledku chybné reparace
- **predisponujícím faktorem** pro vznik zlomů a strukturních přestaveb chromosomů mohou být **traspozibilní elementy** (transpozony), které, jsou-li integrovány do **genomu**, představují oblasti, které nejsou homologní, což může aktivovat **reparační mechanismy** a indukovat vznik zlomů a submikroskopických intersticiálních delecí
- dalším **predisponujícím faktorem** pro vznik zlomů jsou **opakované** (repetitivní) po genomu rozptýlené **sekvence**, vzniklé retrotranspozicí a fixované v genomu (LINEs = long interspersed elements, SINE = short interspersed elements)
- tyto sekvence tvoří **jednovláknové smyčky**, které rozeznává DNA reparační mechanismus, což může též vést k **malým delecím**
- po genomu **rozptýlené repeticce** představují oblasti homologie mezi různými chromozomy, to v případě zlomů v těchto místech může vést ke vzniku **Robertsonských nebo reciprokých translokací**, stejně tak **inverzně repetitivní sekvence** mohou být příčinou **submikroskopických inverzí**

- přítomnost těchto rozptýlených repetitivních sekvencí je důvodem nenáhodné distribuce zlomů, tzv. „hot spots“ při vzniku chromozomálních aberací
- **aberrace chromatidové a chromosomové**
  - typ aberrace závisí na typu **klastogenního agens** a na **fázi buněčného cyklu**, ve které klastogen působí
  - **příklad:** ionizující záření – ozáření lidských lymfocytů (v G0 fázi) vede po kultivaci k **aberracím chromozomového typu** (dicentry a ringy, zlomy obou chromatid), ale ozáření v G2 fázi (in vitro v průběhu kultivace) vede ke vzniku **chromatidových aberací** (ionizující záření je na S fázi nezávislé)
  - podobně účinky jako záření mají látky, které nazýváme **radiomimetika** (např. bleomycin). Většina chemických látek působí **aberrace chromatidové**, protože působí v S fázi buněčného cyklu, tj. aberrace vznikají při **replikaci** (chemické látky na S fázi závislé)
  - **aberrace chromozomů** jsou považovány za projev časného **genotoxického účinku**, zvýšená hladina **aberrací chromozomů**, zjištěná v periferních lymfocytech jedince je určitým **prediktorem** (biomarkrem) rizika **nádorového onemocnění** (nádory – důsledek pozdního genotoxického efektu)

### 38. Syndromy podmíněné aneuploidii autosomů u člověka

- jedná se v zásadě o **tři syndromy**, podmíněné trisomií chromosomů 13, 18 a 21 – Downův, Edwardsův a Patauův

#### Downův syndrom

- **karyotyp:** 47,XX,+21 / 47,XY,+21
- klinicky poprvé popsán Dr. Langdonem Downem (1866), ale molekulárně až Lejeunem (1959)
- **výskyt:** 1:600 – 1:800 narozených dětí
- **výrazná závislost na věku matky** v době porodu
- prenatalně v ČR detekováno 65-70% případů a neukončených těhotenství je čím dál více
- **klinický obraz**
  - výrazná svalová **hypotonie** u novorozenců
  - brachycefalie
  - široký, plochý obličej, šikmé oční štěrby, **epikanty** (kožní řasy, přemostující vnitřní koutek oka), široký kořen nosu, velký jazyk a anomálie zubů
  - 50% jedinců **palmární** (opičí, čtyřprsté) **rýhy** na dlaních (u normální populace 2-3%)
  - **prsty na ruku** jsou krátké a široké, malíčky rohlíčkovité (klinodaktylie) s krátkým středním článkem
  - široká **mezera** mezi prvním a druhým prstem na nohou
  - postava menší, kolem **150 cm**
  - psychomotorická retardace různého stupně
  - IQ bývá v rozpětí **25-75**, průměrně 40-45
  - společensky **dobře adaptabilní** a díky lepší zdravotní péči se dožívají 50-60 let (schopnost léčit infekce, nádorová onemocnění, vrozené srdeční vady i vývojové vady dalších orgánů – **mají k nim sklony** a dnes je lze operovat)
  - u většiny dospělých v pozdějším věku **Alzheimerova choroba** – efekt třetí dávky genu na chromosomu 21 – gen pro **amyloidní prekurzorový protein**
  - **plodnost** velmi snižena, hlavně u mužů
  - u žen případy **gravidity** častější, u mužů téměř nulová plodnost
  - riziko postižení **potomků** rodičů s Downovým syndromem je obtížné vzhledem k počtu stanovit, ale jsou i případy dětí zdravých
- **typy Downova syndromu**
  - **prostá trisomie** chromosomu 21 (95%)
  - **translokační forma** trisomie 21 (4-5%)



- **mozaicismus** trisomické a normální linie (1%) – jedinci mívají obecně mírnější projevy Downova syndromu

### Edwardsův syndrom

- **karyotyp:** 47,XX,+18 / 47,XY,+18
- **výskyt:** přibližně 1 : 5000 živě narozených dětí
- přímo **souvisí s věkem matky**
- většina takto počatých plodů je spontánně **potracena**
- **klinický obraz**
  - těžká **psychomotorická retardace** a neprospívání
  - vrozené vývojové vady **ledvin a srdce**
  - mikrocefalie a prominující záhlaví
  - ustupující brada, nízko nasedající malformované boltce
  - charakteristické **držení prstů** v sevřených pěstích s křížením druhého prstu přes třetí a pátého přes čtvrtý
  - nehty bývají **hypoplastické**
- prognóza jedinců s **trisomií chromosomu 18** je špatná, vzácně se dožívají několika měsíců až jednoho roku
- postižení jedinci bývají v **80% ženského pohlaví**, chlapci mají obecně nižší šance na přežití

### Patauův syndrom

- **karyotyp:** 47,XX,+13 / 47,XY,+13
- **trisomie chromosomu 13** se vyskytuje vzácněji – 1 : 10 000
- má nejhorší prognózu z těchto **tří syndromů** – dožití 1 měsíce po narození maximálně
- **klinický obraz**
  - těžká mentální i růstová retardace
  - závažné malformace CNS, **holoprosencephalie**
  - malformace očí, které mohou splynout v jedno nebo i zcela chybět
  - kraniofaciální dysmorfie s těžkými rozštěpy patra a rtu
  - ušní boltce malformované a nízko posazené
  - přítomny vrozené vady **srdce a urogenitálu**
  - postaxiální polydaktylie horních i dolních končetin

## 39. Syndromy podmíněné aneuploidií gonosomů u člověka

- 
- jedná se v zásadě o **4 hlavní syndromy** podmíněné aneuploidií chromosomů X a Y – Turnerův syndrom, Klinefelterův syndrom, syndrom XXX (superfemale) a syndrom YY (supermale)

### Turnerův syndrom

- **karyotyp:** 45,X
- poprvé popsán až v roce 1938, **monosomie X** jako příčina jeho klinického obrazu až v roce 1959
- **incidence** je asi 1 : 2000 – 2500 živě narozených dívek
- chromosomální výbava 45,X nalézána u mnoha zárodků (1-2%), ale naprostá většina (99%) těchto těhotenství končí **abortem** – monosomie X je asi 20% všech spontánních abortů
- **původ odchylky** je na rozdíl od většiny ostatních aneuploidií **paternální** – chybí pohlavní chromosom od otce
- **klinický obraz**
  - ultrazvukem často diagnostikováno již **prenatálně**, u plodu patrné rozsáhlé **lymfedémy**, zejména v oblasti krku (hygroma coli), až **generalizovaný hydrops**
  - po vstřebání tekutiny zůstává u některých děvčátek **kožní řasa** po stranách krku – **pterygium coli**, které lze chirurgicky odstranit

- u **novorozenců** též pozůstatek prosáknutí měkkých tkání v podobě **edémů na nártách**
- ve fenotypu patrný hlavně **malý vzrůst** (135-150 cm) a ovariální **dysgeneze**
- diagnóza dnes obvykle stanovena v **časném dětství**, dříve však až v **pubertě** při absenci **menstruace** a sekundárních pohlavních znaků
- ovaria nejsou vyvinuta – na jejich místě jen **vazivové pruhy**
- **ostatní znaky variabilně**
  - široký štítovitý hrudník se vzdáleně postavenými bradavkami
  - nízká vlasová hranice na krku
  - gotické patro
  - skeletální odchylky (cubiti valgi, relativně zkrácené kosti předloktí a bérců)
  - koarktace aorty atd.
- **IQ** bývá **průměrné**, pozorovány odchylky v určitých oblastech činnosti
- **vliv imprintingu** – neurokognitivní funkce (potíže s matematikou) a **sociální přizpůsobivost** bývají výrazněji narušené, pokud je přítomen **X chromosom** pocházející od matky
- posledních 20 let přineslo velký pokrok v oblasti léčby dvou **hlavních projevů** Turnerova syndromu – malého vzrůstu a sterility
  - pomocí léčby **růstovým hormonem** od 3-5 let lze docílit výšky až 160 cm
  - léčba musí být zahájena dostatečně brzy – před uzavřením **epifyzárních štěrbin**
  - v další fázi pak **substituce estrogenu a gestagenu** navodí nástup puberty – cílem je navození pravidelného **menstruačního cyklu**, správný vývoj a růst dělohy, vývin sekundárních pohlavních znaků a prevence osteoporózy
  - substituce pokračuje od puberty až do menopauzy
  - takto substituovaná žena se může dokonce stát matkou díky **metodám asistované reprodukce** (z darovaného vajíčka)
- jediná **monosomie slučitelná se životem**
  - toto tvrzení je všeobecně uznávané, ale nepřesné
  - existuje totiž hypotéza, která předpokládá u všech žijících dívek s Turnerovým syndromem přítomnost další buněčné linie obsahující **dva pohlavní chromosomy**, buď X nebo Y
  - druhý pohlavní chromosom pak může být normální nebo **strukturně změněný**
  - tyto mozaikové linie mohou být velmi malé a proto těžko **detekovatelné**
  - z prognostického hlediska je důležité pátrat především po **přítomnosti chromosomu Y** nebo jeho sekvencí, neboť pro svou nositelku představuje **zvýšené riziko** rozvoje **gonadoblastomu** (cca 15-20%)
  - při nálezů Y sekvencí je indikováno **preventivní odstranění dysgenetických gonád**

### Klinefelterův syndrom

- **karyotyp**: 47,XXY (vzácně i 48,XXXYY nebo 49,XXXXYY)
- nadpočetný X chromosom, mužský fenotyp
- **incidence** je 1 : 1000 narozených chlapců
- **klinický obraz**
  - až do puberty nebývá fenotyp nijak nápadný, od puberty se zvyrazňuje
  - **vysoká hubená postava**, dlouhé končetiny
  - **hypogonadismus** (malá tuhá varlata) se sníženou hladinou testosteronu
  - **azoospermie**, resp. aspermie (spermie se vůbec nevyvíjejí)
  - jedinci s tímto syndromem nejčastěji diagnostikováni při vyšetřování sterility
  - **klinický obraz** je variabilní, někteří jedinci nemusí být diagnostikováni po celý život
  - ve fenotypu často **eunuchoidní vzhled**
    - gynekomastie
    - ženské rozložení tuku
    - řídké a ohraničené ochlupení
    - snížený až žádný růst vousů
  - **IQ** je **normální** nebo lehce snížené oproti kontrolní skupině
  - popisovány **poruchy učení** a snížená sociální přizpůsobivost

- vzácnější formy se 3 a více X mívají závažnější fenotypové projevy s dysmorfii, orgánovými vadami a **mentální retardací**
- zřídka je nalezen **karyotyp 46,XX** u muže s výše popsány projev
  - zapříčiněno obvykle **submikroskopickou translokací** části krátkých ramen chromosomu Y na krátká ramena chromosomu X, případně na jakýkoli jiný chromosom
  - na krátkých ramenech Y je přítomen **gen SRY** – sex determining region on Y, zodpovědný za vývoj jedince **mužským směrem**
  - tato přestavba většinou klasickým **cytogenetickým vyšetřením** není zachytitelná – k důkazu slouží **metody molekulárně cytogenetické (FISH)** nebo DNA analýza

### Syndrom XXX (superfemale)

- **karyotyp: 47,XXX** (vzácně i 48,XXXX)
- diagnóza z velké části náhodná, nejčastěji v souvislosti s vyšetřováním příčin **poruch menstruačního cyklu** nebo spontánních abortů
- vyskytuje se často, asi 1:1000, i když odhady mohou být i **podhodnocené** kvůli absenci typických výrazných fenotypových projevů
- **klinické projevy**
  - méně často je popisována **mírná mentální porucha** (porucha učení)
  - porucha **sociální adaptace**
- ženy se syndromem XXX mohou mít častěji **spontánní aborty**, avšak riziko postižení jejich potomstva chromosomální aberací není zvýšené
- ve větším procentu u nich nastává předčasné **ovariální selhání**

### Syndrom YY (supermale)

- **karyotyp: 47,XXY**
- syndrom YY je také diagnostikován zřídka a většinou náhodně
- **frekvence výskytu** je 1 : 1000 mužů
- **klinický obraz**
  - **fenotyp** není příliš výrazný, nositelé bývají **vyšší postavy**
  - v průběhu dospívání mohou trpět **těžkou akné**
  - plodnost je zachována
  - **IQ je normální**, jsou ale popisovány častěji poruchy chování a vzdělávání (problémy jsou především s **mluveným projevem** a čtením)
  - v mnohé literatuře se stále ještě v souvislosti s tímto syndromem uvádí **zvýšená agresivita a psychopatologické chování**
  - je to pozůstatek několika výzkumů 60. a 70. let provedených ve věznicích a ústavech pro chorobomyslné, kde byl tehdy nalezen zvýšený počet mužů se 2 Y chromosomy, plošným výzkumem ale bylo potvrzeno, že tato **hypotéza je mylná** a incidence je mezi lidmi normálními a kriminálníky stejná

## 40. Indikace chromosomálního vyšetření v klinické genetice

- **chromosomální vyšetření** je jednou ze základních metod **klinické genetiky**
- hlavním cílem je u pacienta vyloučit **numerické** či **strukturní** chromosomální aberace
- podle potřeby se může jednat o **vyšetření karyotypu** pomocí standardních pruhovacích metod nebo o některou z metod molekulární cytogenetiky (**FISH**)
- vyšetření indikuje **klinický genetik** (často v rámci mezioborové spolupráce – např. s pediatry, gynekology či porodníky) a to z mnoha různých důvodů a v rámci různých **diagnostických programů**
- **seznam indikací** - vyšetření může být indikováno v rámci:
- **prenatální diagnostiky**
  - vyšetřuje se karyotyp ještě **nenarozeného plodu**

- materiál k **cytogenetickému vyšetření** je zapotřebí získat některou **invazivní metodou** prenatalní diagnostiky (amniocentéza, CVS, kordocentéza)
- **hlavními indikacemi jsou:**
  - výsledky upozorňující na **zvýšené riziko** chromosomální aberace (VCA)
    - **pozitivní screeningové** (biochemické či ultrazvukové) **vyšetření** I. nebo II. trimestru
    - pozitivní výsledek **integrovaného screeningu** (I. + II. trimestr hodnocený dohromady)
  - **těhotenství u ženy starší 35 let**
    - není již absolutní indikací, těhotné starší 35 let mají však na provedení invazivní **prenatální diagnostiky** právo i bez přítomnosti jiných rizikových faktorů
  - těhotenství s apriori **vyšším rizikem** vrozené chromosomální aberace
    - chromosomální aberace či vývojové vady v **rodinné anamnéze**
    - jeden z rodičů nositelem **balancované chromosomální aberace**
    - jeden z rodičů po **onkologické léčbě** – cytostatika, ozařování apod.
  - určité případy **rizikového těhotenství**
    - těhotenství po **asistované reprodukci**
  - těhotenství, jejichž průběh mohl být narušen **závažnými faktory zevního prostředí** s klastogenním účinkem
    - stavy po expozici **ionizačnímu záření**
  - spíše historická indikace karyotypizace plodu za účelem zjištění **pohlaví plodu**
    - v případě rodinného výskytu závažné **geneticky podmíněné choroby** vázané na **pohlaví**
    - v současné době je ve většině případů možná **DNA diagnostika**
- **postnatální diagnostiky**
  - vyšetřuje se karyotyp **narozněného jedince** (dítěte či dospělého)
  - materiálem je nejčastěji **periferní krev** (leukocyty) nebo vzácně kožní fibroblasty
  - **hlavními indikacemi jsou:**
    - **vyšetření novorozence** nebo dítěte při podezření na chromosomální aberaci
      - fenotyp odpovídající některému z **typických syndromů**
      - mnohočetné **vrozené vývojové vady**
      - psychomotorická či mentální retardace apod.
    - **vyšetření karyotypu rodičů**
      - pokud prenatalní diagnostika plodu či postnatální diagnostika dítěte poukázala na **vrozenou chromosomální aberaci**
      - v případě **opakovaných spontánních abortů**
      - při výskytu **častých potratů** či chromosomálních aberací v rodinné anamnéze
    - **osoby s poruchami sexuálního vývoje**
      - primární amenorea apod.
      - osoby (děti) klinicky neurčitelného nebo obojetného pohlaví
    - **komplexní vyšetření neplodnosti**
      - u neplodného páru
      - poruchy spermatogeneze u mužů
    - vyšetření karyotypu u **dárkyní oocytů** a **dárců spermatu**
    - vyšetření karyotypu buněk **solidních nádorů** nebo krevních elementů u **hematoonkologických onemocnění**
      - cytogenetické vyšetření v **onkologii** má diagnostický a prognostický význam
      - může rozhodovat i o **vhodné terapii**
    - **vyšetření získaných chromosomálních aberací (ZCA)**
      - u osob vystavených působení **klastogenů** např. v pracovním prostředí (chemikálie, ionizační záření)
- **preimplantační diagnostiky**
  - preimplantační genetická diagnostika (prováděná v rámci programu In Vitro Fertilizace) se vzácně používá i v případě **vysokého rizika** vrozených chromosomálních aberací

- zejména u osob s **balancovanou chromosomální aberací**, u kterých reálně hrozí vznik nebalancované aberace u potomka
- materiálem k vyšetření jsou nejčastěji **blastomery** vyvíjejícího se embrya
- diagnostika se provádí také z **potracené tkáně**
  - stanovení karyotypu **potraceného plodu**
  - vyloučení **vrozené chromosomové aberace** u plodu

## Kultivace buněk a tkání in vitro, význam v medicíně

- vypracování techniky **kultivace buněk in vitro** (tkáňové kultury) umožnilo definovat rozdíly mezi **normálními buňkami** a **maligně transformovanými buňkami**
- **normální buňky** při kultivaci in vitro
  - zachovávají **kontrolu množení** v daném prostředí regulací zvanou **kontaktní inhibice** – buňky zastaví růst po vzájemném kontaktu, to znamená po vytvoření **souvislé buněčné vrstvy** pokrývající povrch dna kultivační láhve nebo **Petriho misky = monolayer**
  - mají omezený **počet generací**, buněčná kultura zaniká po určitém počtu generací (maximálně po **50 generacích**, záleží to na typu buněčné kultury)
  - na **buněčném povrchu** nesou typické **antigenní determinanty** odpovídající antigenním determinantám tkáně, ze které byla buněčná kultura odvozena
  - metabolismus převážně **aerobní**
  - mají vysoké požadavky na přítomnost **růstových faktorů** v kultivačním médiu – potřebují **stimulaci** pro svůj růst
  - mají **diploidní počet** chromosomů
  - zachovávají specifický **buněčný tvar**
- **nádorové buňky** v podmínkách in vitro
  - většinou získávají schopnost **neomezeného růstu** (dochází ke ztrátě kontaktní inhibice, transformované buňky rostou v **několika vrstvách**, buňky bývají přes sebe neorganizovaně nakupené)
  - kultura je **nesmrtelná**, při vhodných kultivačních podmínkách je možná jejich stálá kultivace, vzniká neomezený **počet generací**
  - vykazují různé změny v **povrchových antigenech**
  - mají zvýšený **anaerobní metabolismus**
  - mají nižší požadavek na množství proteinových **růstových faktorů** v kultivačním médiu
  - mají **změněný počet chromosomů** (u transformovaných buněk bývá **heteroploidní** nebo **pseudodiploidní** chromosomální výbava) a chromosomy transformovaných buněk vykazují často náhodné nebo nenáhodné (systematicky se opakující) **numerické** nebo **strukturní aberace**
  - maligní transformace je často provázena změnou **tvaru buněk**
- technika kultivace buněk in vitro také umožnila podat důkaz, že **maligní zvrát** je zakódován v **DNA** transformovaných buněk
- důkaz, že DNA nádorových buněk nese **genetickou informaci** odpovědnou za **maligní zvrát**, byl založen na **transfekci**, na přenosu DNA z **nádorových buněk** do buněk **normálních**
- DNA izolovaná z **různých typů nádorů** (indukovaných chemicky, nádorovými viry nebo izolovaná ze spontánně vzniklých nádorů) vyvolává v tkáňové kultuře **vznik ložisek** nádorových buněk
- **cíle genové terapie maligních nádorů**
  - vedle dnes už **klasické kombinace** chirurgického zákroku, radioterapie a chemoterapie a novější imunoterapie se na **specializovaných pracovištích** začínají vypracovávat různé **strategie genové terapie**
  - ta má **dva směry**
    - **přímá genová terapie**: oprava chyby (změna v sekvenci DNA), maligní fenotyp má multifaktoriální charakter, nelze tedy opravit všechny buňky
    - **nepřímá genová terapie**: vnesení nové genetické informace do buněk, která vede k likvidaci nádorových buněk

- **genová manipulace** je uskutečněna **mimo organismus** a techniky používané pro vnesení genu do lidských buněk jsou založeny na fyzikálním, chemickém nebo biologickém principu
- kultivace buněk se využívá i pro **cytogenetické vyšetření**
  - **chromosomální vyšetření** je možné v dělicích se buňkách
  - v tkáních s přirozenou **vysokou mitotickou aktivitou** (kostní dřev, trofoblast, některé nádory) je možné přímé zpracování buněk pro cytogenetické vyšetření
  - ve většině tkání je nezbytná **kultivace buněk krátkodobá** (několik dní) nebo **dlouhodobá** (několik týdnů)
  - pro zjištění, zda je kultivace buněk tkáně nutná a jak dlouho se používá **mitotický index**
  - **mitotický index** = buňky v mitose / všechny buňky tkáně . 100 (%)
  - buňky se kultivují v lahvičkách s kultivačním médiem s přídatkem **séra s růstovými faktory**
  - kultury vyžadují **teplotu 37°C**, konstantní **pH**, dlouhodobé kultury i 5% **CO<sub>2</sub>** v atmosféře **termostatu**
  - pro **postnatální vyšetření** obvykle kultivujeme lymfocyty periferní krve stimulované lektiny (**fytohemaglutininem**)
  - ty, stejně jako **antigeny**, stimulují **blastickou transformaci** T lymfocytů
  - pro **prenatální vyšetření** se používají buňky z **plodové vody** (amniocentéza v 16.-18. gestačním týdnu), buňky **trofoblastu** (biopsie trofoblastu v 11.-12. týdnu) nebo **lymfocyty** z fetální krve (kordocentéza po 20. týdnu)
  - biopsií získané buňky různých tkání musí být před kultivací **mechanicky a enzymaticky rozvolněny**
  - **aktivovány** jsou růstovými faktory telecího (lépe fetálního) séra a jejich růstová aktivita je pomalejší
  - vyšetření chromosomů v **meiose** je obtížnější
    - **haploidní sadu spermií** můžeme analyzovat po **oplození** křehkých oocytů lidskými spermii
    - chromosomální vyšetření **vajíček** i buněk **embrya** je experimentálně prováděno v souvislosti s **IVF (in vitro fertilizací)**
  - **několik hodin (2-4)** před zpracováním kultury přidáváme **mitotický jed** kolchicin, který ruší funkci **dělicího vřeténka** a zastaví buněčné dělení v **metafázi**
  - kolchicin je jed z **ocunu** a doba jeho působení bývá kratší pro **metody HRT**, kdy se využívají buňky v **prometafázi**
  - zabrání **seřazení chromosomů** do ekvatoriální roviny a **oddělení** sesterských chromatid
  - chromosomy jsou **rozloženy** po celé buňce (tzv. **c-metafáze**)
  - dalšího zlepšení rozprostření chromosomů dosahujeme působením **hypotonického roztoku** – 0,075M KCl (v důsledku **osmotických jevů** dochází k **rozvolnění** buněčného obsahu a **individualizaci** chromosomů)
  - následuje **fixace** směsí **kyseliny octové a methanolu 1:3**, rozkapání na **podložní skla** a barvení (**Giemsovým barvivem**)
- lékařství působí **proti přírodní selekci** tím, že umožňuje, v souladu s lékařskou etikou, život a rozmnožování lidem s **dědičným postižením** (obecně s nízkou adaptivní hodnotou genotypu), kteří by se často nedožili ani **reprodukčního věku**
- to je výhodné a žádoucí pro **jedince**, ale nevýhodné a nežádoucí pro **populaci**
- řešení vidíme v **realizaci preventivních programů** lékařské genetiky
- medicína zasahuje i do genetické struktury populací **patogenních mikroorganismů**
  - např. podáváním **protibakteriálních léků** nemocným je vyvolán v bakteriálních populacích silný **selekční tlak**, který způsobuje početní růst a šíření bakterií **rezistentních** k lékům (atb)
  - následkem toho vznikají **kmeny bakterií** se sdruženou **rezistencí** k několika **lékům**
  - představují významný problém **lékařské mikrobiologie a epidemiologie a infekcí**

## 41. DNA – stavba a funkce

- poměrně dlouhou dobu převládala v genetice domněnka, že hmotným **nositelem genetické informace jsou bílkoviny**
- později Griffith a Avery (1944) dokázali, že nositelem **genetické informace** je DNA
- zásadní význam NK pro genetiku byl uznán po **objevu struktury DNA Watsonem a Crickem** (1953)

### Deoxyribonukleová kyselina, DNA

- molekuly DNA se u eukaryot nacházejí v **chromosomech jádra** a **mitochondrií** (u rostlin chloroplastů)
- DNA je polymer, který se skládá ze **základních jednotek** – nukleotidů
- každý nukleotid se skládá ze **3 částí**
  - **cukerná složka** (2-deoxyribosa)
  - **purinová** nebo **pyrimidinová dusíkatá báze**
  - zbytek **kyseliny fosforečné**
- nukleotidy obsahují jednu ze **4 bází**
  - **pyrimidinové**: thymin, cytosin (T,C)
  - **purinové**: adenin, guanin (A,G)
- komplex **cukerné složky** a **dusíkaté báze** se nazývá **nukleosid**
- nukleotidy jsou spojovány v polynukleotidový řetězec **3' – 5' fosfodiesterickou vazbou**, což znamená, že **5' uhlík deoxyribosy** je spojen se zbytkem kyseliny **trihydrogenfosforečné**, která je ve vazbě s **3' uhlíkem pentosy** následujícího nukleotidu
- mezi **sousedními bázemi** navíc působí **Van der Waalovy síly** pro stabilizaci
- **polynukleotidový řetězec** má na jednom konci volný 5' trifosfát – 5' konec DNA
- na druhém konci je volná **3' hydroxylová skupina** – 3' konec DNA
- v zápisech se zpravidla uvádí 5' konce nalevo a 3' konec napravo
- **primární struktura**
  - **lineární pořadí** (sekvence) bází v DNA (primární struktura) kóduje genetickou informaci
  - tato sekvence se zapisuje ve **směru 5'-3'**
  - při zápisu **sekvence sousedních bází** se vkládá mezi označení bází písmeno p (fosfodiesterová vazba), aby bylo zřejmé, že se jedná o sekvenci bází na stejném vlákně (např. CpG)
  - zápis CpG tedy znamená, že **cytidin** je vázán se sousedním **guanosem** na stejném vlákně DNA, nikoliv **vodíkovými můstky** s guaninem na komplementárním vlákně DNA
  - molekula DNA může být různě dlouhá – maximální počet různých sekvencí purinů a pyrimidinů je  $4^n$  kde n je **počet nukleotidů**
  - např. DNA obsahující 6 basí může být uspořádána do  $4^6 = 4096$  různých sekvencí
- **sekundární struktura**
  - **molekula DNA** má charakteristickou **třírozměrnou strukturu** známou jako dvojité šroubovice (**double helix**)
  - skládá se ze dvou **polynukleotidových řetězců**, které jsou navzájem vázány **vodíkovými můstky** mezi purinovými a pyrimidinovými bázemi (dsDNA – double stranded)
  - **páteř řetězce** DNA tvoří komplex pentosa – fosfát
  - do **centra helixu** pak směřují purinové a pyrimidinové báze a mezi oběma řetězci dochází ke **komplementárnímu párování** purinů s pyrimidiny a tím ke **stabilizaci interakce řetězců**
  - **váže se vždy A-T a C-G**
    - adenin-thymin = 2 vodíkové můstky
    - guanin-cytosin = 3 vodíkové můstky
  - z toho plyne, že **A+C/T+G = 1**
  - A+T/C+G ale bývá většinou 0,25-0,75
  - řetězce ve dvojité šroubovici jsou **antiparalelní**
  - jen v tomto uspořádání utváří **stabilní helix**
  - na šroubovici DNA lze rozeznat **velký a malý žlábek**, které jsou důležité pro interakci s proteiny regulujícími **replikaci DNA** a expresi genetické informace
- DNA se vyskytuje v **různých formách** v závislosti na různých podmínkách

- **B forma:** pravotočivá dvoušroubovice
- **A forma:** pravotočivá dvoušroubovice s kompaktnější strukturou
- levotočivé formy C, D, E, Z
- biologický význam různých forem DNA ale dosud není znám
- **přechod** mezi jednotlivými formami je možný na základě změn **fyzikálně chemických podmínek**
- **denaturace DNA**
  - rozdělení obou komplementárních vláken od sebe (např. zahříváním roztoků)
  - dvouvláknové molekuly DNA mají menší schopnost **absorbance ultrafialového světla** o vlnové délce 260 nm, než molekuly **jednovláknové**
  - při **ochlazování roztoku** dochází k **renaturaci** – samovolné obnovování vodíkových můstků mezi komplementárními vlákny
  - jestliže k denaturované DNA přidáme cizí denaturovanou DNA (eventuálně RNA), může na **principu komplementarity** mezi nimi docházet k **renaturaci** – molekulární hybridizace

## Typy DNA

- **jaderná (chromosomální)**
  - její přenos se řídí **Mendelovými zákony**
  - z **funkčního hlediska** se skládá z
    - DNA **kódující pořadí AMK** v polypeptidu nebo některé RNA
    - DNA, která má **funkci kontrolní** a řídící
    - **zvláštní typy** DNA mající specifické funkce v chromosomech, např. v oblasti centromery a telomer
    - DNA o jejíž funkci zatím nic nevíme
  - podle počtu **identických nebo podobných** kopií
    - u eukaryot přibližně 60% DNA tvoří **jedinečné** (nebo málo se opakující) **sekvence**
      - patří sem např. geny kódující **polypeptidy** a dále **pseudogeny** (odvozovány od předchozí skupiny, na rozdíl od ní však nejsou funkční)
    - **repetitivní sekvence**
      - **sekvence středně repetitivní:** počet kopií v genomu  $10^3$ - $10^5$ , patří sem geny pro rRNA a bílkoviny typu histonů
      - **sekvence vysoce repetitivní:** řádově  $10^6$  kopií v genomu
      - repetitivní sekvence mohou být v genomu **rozptýlené**, dlouhé se označují **LINE** (long interspersed repetitive elements) a krátké jako **SINE**
      - většina SINE je odvozována od tRNA genů – jejich vznik je vysvětlován **retropozicí** (přepisem) z RNA reverzní transkriptázou
      - pro primáty specifické Alu-sekvence, kdy téměř každý 4kb úsek lidské DNA obsahuje tuto sekvenci, jejich původem je 7SL DNA
      - jinou možností jsou **tzv. tandemové repetitivní sekvence**, kdy jednotlivá opakování jsou za sebou – př. jsou geny pro rRNA nebo **tzv. satelitní DNA**
- **mimochromosomální DNA**
  - u člověka v **mitochondriích**
  - mitochondrie mají značný podíl v **energetickém metabolismu buňky**, pracují na principu protonové pumpy (dochází k přenosu  $H^+$  přes membránu), probíhají v nich reakce **Krebsova cyklu**
  - z genetického hlediska patří do skupiny **semiautonomních buněčných organel** (organely s vlastní genetickou výbavou)
  - uspořádání **genomu mitochondrií** je odlišné od jaderného genomu eukaryotní buňky, je podobné **uspořádání prokaryot**
  - **DNA** má cirkulární uspořádání
  - u člověka o velikosti 16,6 kb celkem kóduje 37 genů, z toho 24 se podílí na **proteosyntetickém aparátu mitochondrií** (geny 16S a 23S pro rRNA a 22 genů pro tRNA)
  - zbývajících 2 se podílí na vlastních **polypeptidech** podílejících se na **enzymatické výbavě** mitochondrií



- většina genů je kódována **na H (těžkém) vlákně DNA** – informace je silně komprimována, neobsahuje např. **introny**
- **proteosyntetický aparát** pak má i řadu odchylek
- další rozdíly jsou v **genetickém kódu** – tripletety mají rozdílný význam než u **jaderného genomu** a jsou rozdíly i v **iniciaci a terminaci**

## 42. RNA – typy, stavba, funkce

### Ribonukleové kyseliny

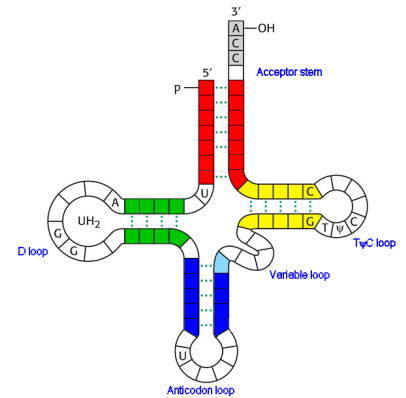
- **ribonukleová kyselina RNA** je polymer purinových a pyrimidinových ribonukleotidů, spojených dohromady 3'-5' **fosfodiesterickou vazbou**
- oproti struktuře DNA můžeme najít značné **rozdíly**
  - **cukerná složka**
    - v DNA nacházíme 2-deoxyribosu, u RNA obyčejnou **ribosu**
  - **pyrimidinové báze**
    - v DNA nacházíme cytosin a thymin, v RNA thymin nahrazuje **uracil**
  - **řetězce**
    - DNA je obvykle pravotočivá **dvojšroubovice**, RNA je **jednovláknová**
    - RNA se však může svinout do **vlásenky**, která má **dvouřetězcový** charakter v případě, že se na řetězci nalézají komplementární antiparalelní úseky
  - **poměr bází**
    - na rozdíl od DNA u RNA vzhledem k jejímu **jednořetězcovému charakteru** neplatí pravidlo  $G+T/A+C = 1$
  - **cyklické mononukleotidy**
    - RNA může být **hydrolysována louhy** na 2',3'-cyklické mononukleotidy
    - tyto látky nelze získat z DNA, protože jí chybí na **uhlíku 2' OH skupina**
    - **labilita RNA** v alkalickém prostředí je užitečná zejména diagnosticky i analyticky
- v RNA je **genetická informace** obsažena v pořadí (sekvenci) purinových a pyrimidinových nukleotidů v polymeru (primární struktura)
- sekvence je **komplementární** k templátovému **řetězci genu**, ze kterého RNA transkripcí vznikla
- díky této skutečnosti může být RNA na základě **pravidel o párování bází** zpět navázána na odpovídající **templátový řetězec** DNA, nebude se však vázat (hybridisovat) na druhý, **kódující řetězec** svého genu
- vzhledem k **posttranskripčním úpravám RNA** se však otázka sekvenční shody s genem komplikuje
- **cytoplasmatické RNA**, které slouží jako templát pro syntézu proteinů se označují jako informační, messengerové, mediátorové RNA (mRNA)
- některé **další molekuly RNA** v cytoplasmě (ribosomální RNA, rRNA) mají strukturální úlohu, která přispívá k utvoření **ribosomu** (buněčná organela, kde se odehrává proteosyntéza)
- jiné **cytosolové RNA** slouží jako adapterové molekuly (transferová RNA, tRNA) pro překlad informace z RNA do specifické **sekvence polymerovaných aminokyselin**
- některé molekuly RNA pak mají vlastní **katalytickou aktivitu** – úpravy primárního transkriptu do **zralé mRNA**
- značná část RNA je v **eukaryotních buňkách** ještě v jádře **rozložena** a nikdy neslouží jako strukturální ani jako informační entita v cytoplasmě
- v lidských buňkách jsou pak **malé jaderné RNA** (snRNA, small nuclear RNA), které se přímo neúčastní syntézy proteinů, ale mohou se **uplatnit v úpravách RNA** a v buněčné architektuře
- velikost těchto malých molekul se pohybuje mezi **90-300 nukleotidy**
- genetickým materiálem některých **živočišných a rostlinných virů** není DNA, ale RNA
- některé **RNA viry** ani nepřepisují svou genetickou informaci do DNA, genom mnohých živočišných **RNA-virů**, zejména **retrovirů (HIV)** je však pomocí RNA-dependentních-DNA-polymeras, tzv. **reverzních transkriptas**, přepsán do dvouřetězcové kopie DNA

- v mnoha případech je tento **DNA-transkript** začleněn do **hostitelského genomu** a slouží pak jako **templát**, který se přepisuje do nových virových genomů

## Typy RNA

- ve všech prokaryotních i eukaryotních organismech existují **3 hlavní třídy RNA** – mRNA, tRNA a rRNA
- liší se velikostí, funkcí a stabilitou
- **mRNA**
  - nejrozmanitější třída co do velikosti i **stability** molekul
  - všechny mRNA přenášejí informaci z genu do **procesu proteosyntézy**, kde mRNA slouží jako **templát**, podle něž se aminokyseliny řadí do polypeptidu (konečného produktu genu)
  - mRNA zejména u **eukaryot** mají některé charakteristické **chemické rysy**
  - **čapkování**
    - jejich 5' konec je čapkován 7-methyl-5'-trifosfátem, který se zde váže na **sousední 2'-O-methylribonukleosid**, prostřednictvím svého trifosfátu
    - molekuly mRNA často obsahují uvnitř řetězce též **6-methyladenyláty a nukleotidy methylované na 2'-O-ribose**
    - tyto čapky nejspíš pomáhají **rozpoznání mRNA** při proteosyntetickém pochodu a chrání mRNA před 5' exouklesami
    - syntéza proteinu začíná **translací mRNA** od čapkování konce
  - **polyadenylace**
    - k opačnému **3' konci většiny mRNA** je připojen polymer asi **20-250 adenylátů**
    - funkce polyA zakončení zatím není známa, nejspíš se jedná o **ochranu mRNA před 3' exonukleasami**
    - některé mRNA, včetně **histonových**, neobsahují tuto polyA modifikaci
    - **polyadenylovaný konec** může vytvořit polymery bazí s **oligodeoxythymidinem**, navázaným na barevný nosič (např. celulosu) a tak může být využit k oddělení mRNA od jiných **druhů RNA**
  - mRNA přítomné v cytoplasmě eukaryotních buněk nejsou produkty **bezprostředně vzniklé na templátu DNA** – musely vzniknout úpravami prekursorových molekul ještě před transportem do cytoplasmy
  - **prvotní produkty transkripce** genů tvoří vlastně 4. třídu RNA
    - mají velmi **rozdílnou velikost** a jsou dosti veliké
    - jedná se o **hnRNA** (heterogenous nuclear RNA)
    - mívají molekulovou hmotnost větší než  $10^7$ , zatímco mRNA bývá menší než  $2 \cdot 10^6$
- **tRNA**
  - **transferové RNA** jsou tvořeny cca. 75 nukleotidy
  - vznikají též **posttranskripčními úpravami** v jádře
  - tRNA slouží k **překladi informací**, uložené v mRNA do sekvence aminokyselin v proteinu
  - v každé buňce je nejméně **20 druhů tRNA**, z nichž aspoň jedna vždy odpovídá jedné z 20 proteinogenních **aminokyselin**
  - **specifické tRNA** se vzájemně liší v sekvenci nukleotidů, ale mají mnoho společných strukturních znaků
    - **primární struktura** všech tRNA umožňuje svinutí řetězce a spojené komplementárních úseků – **sekundární struktura** připomíná jetelový trojlíst
    - jedná se však o schéma, in vivo mají **tRNA tvar L**
  - všechny tRNA mají **4 hlavní ramena**
    - **akceptorové rameno**
      - obsahuje spárovaný úsek končící sekvencí CCA
      - ostatní ramena jsou tvořena nespárovanou kličkou
      - na akceptorové rameno je vázána aminokyselina
    - **antikodonové rameno**
      - pozná triplet nukleotidů neboli kodon na templátu mRNA
      - klička má nukleotidovou sekvenci komplementární ke kodonu – podstata specifčnosti tRNA

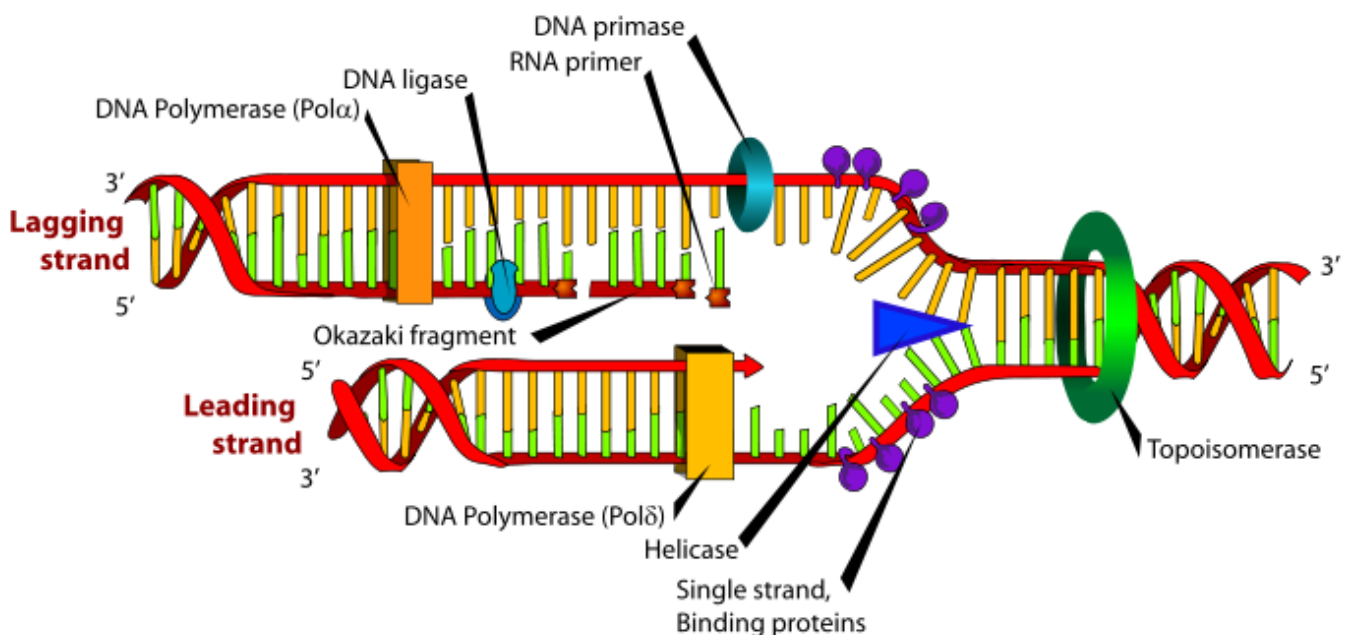
- **D-rameno**
  - nazváno podle přítomnosti dihydrouridinu
- **TΨC-rameno**
  - podle sekvence T – pseudouridin – C
- **extra rameno**
  - je podkladem klasifikace do tříd, jedná se o nejvariabilnější rys molekuly tRNA
  - existují 2 hlavní třídy
  - liší se převážně délkou tohoto extra ramene
- **sekundární struktura** modelu tRNA je udržována párování bazí v ramenech – charakteristický rys
- tRNA jsou dost **stabilní u prokaryot** a poněkud **labilnější u eukaryot**
- opačná je **stabilita mRNA** – u prokaryot labilní, u eukaryot stabilní
- **rRNA**
  - ribosomy jsou **cytoplasmatické nukleoproteiny**, které jsou místem složitého procesu syntézy proteinů řízené podle templátu mRNA
  - na ribosomu reaguje mRNA s tRNA tak, aby se informace přepsaná z genu přeložila do **struktury proteinu**
  - savčí ribosom je složen ze dvou **podjednotek nukleoproteinů**
    - větší **60S podjednotka** se skládá z 5S, 5,8S a 28S rRNA a 50 specialisovaných polypeptidů
    - menší **40S podjednotka** se skládá z 18S rRNA a asi 30 polypeptidů
  - všechny rRNA jsou odvozeny v **jadérku** z jediné prekursorové 45S rRNA
  - 5S rRNA jediná má svůj **vlastní prekurzor** syntetizovaný nezávisle
  - vysoce **methylované ribosomální rRNA** jsou v jadérku sdruženy se specifickými **ribosomálními proteiny**
  - v cytoplasmě jsou ribosomy stabilní a jsou schopny **vykonat mnoho translačních cyklů**
  - úloha rRNA v ribosomové částici není zcela objasněna, je však jasné, že jsou nezbytné pro **sestavení nového ribosomu** a zřejmě mají klíčovou úlohu při navazování mRNA na ribosom a při její translaci
- **malé stabilní RNA**
  - v eukaryotních buňkách je velké množství zvláštních vysoce konservativních, malých a **stabilních typů RNA**
  - většina těchto molekul je vestavěna do **ribonukleoproteinů**
  - vyskytují se buď v **jadře** nebo v **cytoplasmě** nebo i v obou oblastech současně
  - jejich délka se pohybuje mezi **90-300 nukleotidy** a v buňce se vyskytují ve **100 000 – milionu kopií**
  - malé jaderné **nukleoproteinové částice (SNURPS)**
    - jsou nejspíš zapojeny do **řízení genů**
    - podílí se také na **posttranskripčních úpravách**
- další RNA nacházené u **eukaryotních buněk** jsou
  - **snoRNA** (small nucleolar RNA)
  - **miRNA** (micro RNA)
  - **siRNA** (small interfering RNA)



## 43. Replikace DNA

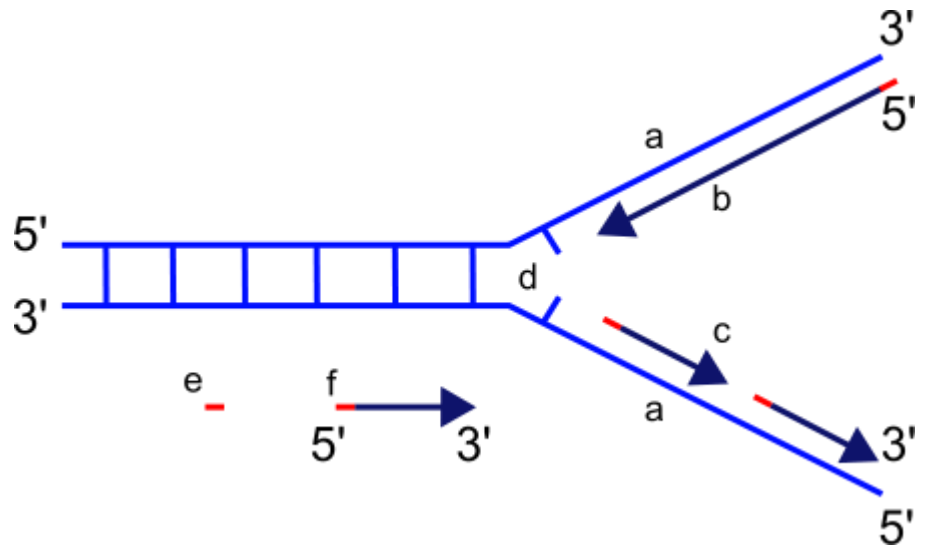
- proces odehrávající se v **S fázi buněčného cyklu**, kterým buňka vytváří kopie DNA před následným rozdělením
- DNA je **kopírována enzymy**, DNA-dependentními-DNA-polymerásami
- ty syntetizují **nový řetězec**, komplementární k původnímu řetězci DNA, vždy ve **směru 5'-3'**

- replikace je **semikonzervativní proces**, což znamená, že každá kopie DNA obsahuje jeden řetězec původní a jeden **nově syntetizovaný**
- u eukaryot je DNA syntetizována za účasti **5 DNA-polymeras** –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , a  $\epsilon$
- replikace musí být **přesná**, protože i malá chyba může způsobit změnu nebo ztrátu důležité **genetické informace**
- **DNA polymerasa** udělá 1 chybu asi na  $10^7$  zreplikovaných bází (teoreticky mohou vznikat i dvojice G-T a A-C, jsou ovšem mnohem **méně stabilní**)
- to je zajišťováno **schopností DNA-polymeras** prohledávat řetězec 3'-5', **exonukleasovou aktivitou** odstraňovat špatně zařazené báze a nahrazovat je správnými bázemi (kontrolní čtení - **proofreading**)
- v průběhu replikace se **šroubovice DNA** postupně rozvinuje působením **topoisomeras**
- vznikají tak úseky **jednovláknové DNA** přístupné **replikaci** – oba řetězce slouží jako **templáty**
- rozvinování začíná v tzv. **replikačním začátku** (replication origin) a postupuje v **obou směrech** podél molekuly DNA
- **replikační počátky** obvykle obsahují sekvence bohaté na páry nukleotidů, nesoucích **A a T**
- oblast, kde došlo k rozvinutí DNA a probíhá tu replikace se nazývá **replikační vidlice**



- v replikační vidlici probíhají následující děje
  - **enzymy helikasy** dokončují rozvinování DNA a dochází k separaci obou vláken
  - **suprahelikální strukturu** rozvinuje enzym **gyrasa**
  - po **oddělení vláken** se na ně napojují **proteiny SSB** (single strain binding), které **stabilizují** jednovláknové struktury a zabraňují jejich **opakovanému spojení**
  - na obou vláknech pak začíná **syntéza nového řetězce** DNA ve směru 5'-3'
- **syntéza nových řetězců**
  - vzhledem k tomu, že jsou obě původní vlákna **antiparalelní**, uplatňuje se na nich poněkud **odlišný mechanismus replikace**
  - vlákno syntetizované podle vlákna s orientací 5'-3' je replikováno **kontinuálně** a označováno jako **vlákno vedoucí** (leading)
  - **druhé vlákno**, označované jako **opoždující se** (lagging strand), je syntetizováno v **opačném směru** a proto **diskontinuálně** po úsecích zvaných **Okazakiho fragmenty**
  - DNA-polymerasy na rozdíl od RNA-polymeras **vyžadují 3' hydroxylový konec** předcházejícího nukleotidu k připojení dalšího nukleotidu jeho **5' koncem** a nemohou proto zahájit **syntézu de novo**
  - proto je proces replikace zahájen **enzymem primasou**, což je **RNA-polymerasa**, která na počátku replikovaného úseku vytvoří krátký **úsek RNA (primer)**
  - nově zařazované nukleotidy jsou používány ve formě **nukleotidtrifosfátů** – odštěpením dvou **makroergních vazeb** je získávána potřebná energie pro uskutečnění vazby

- na jeho 3' konec může DNA-polymerasa připojit první **nukleotid**
  - DNA-polymerasa  $\alpha$ : syntéza opožd'ujícího se vlákna
  - DNA-polymerasa  $\delta$ : syntéza vedoucího vlákna
  - DNA-polymerasa  $\beta$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ : účast na opravných procesech DNA (excise base nebo nukleotidu)
  - DNA-polymerasa  $\gamma$ : replikuje mitochondriální DNA (mtDNA) a rovněž má schopnost ji opravovat
- konečným krokem je **odstranění primerů ribonukleasou**, vzniklá mezera je doplněna působením DNA-polymerasy a **Okazakiho fragmenty** jsou spojeny působením enzymu **DNA-ligasy**
- vzhledem k tomu, že **eukaryotické chromosomy** jsou velmi dlouhé, probíhá replikace z mnoha **začátků**
- tvorba **replikační vidlice** postupuje oběma směry a vytváří **replikační bubliny**, až se navzájem spojí
- DNA replikovaná z jednoho začátku se nazývá **replikon**
- replikace neprobíhá ve všech replikonech **současně** - obecně začíná v oblastech, umístěných v **heterochromatinu**, později
- typická savčí buňka může mít **50-100 000 replikonů**
- každý replikuje úsek dlouhý **40-200 kb** (kilobasí, 1 kilobase = 1000 basí)
- při replikaci **lineární DNA** eukaryotických chromosomů vzniká na 5' konci opožd'ujícího se vlákna **problém**
  - po **odstranění primeru** není možno tuto sekvenci na opožd'ujícím se vlákně doplnit (není zde 3' hydroxylový konec)
  - proto se **koncový úsek DNA**, telomera, zkracuje po každé **replikaci**
  - **telomera** je specializovaná struktura, která obsahuje **DNA a proteiny**
  - DNA se v této oblasti skládá z tandemově uspořádaných **repetitivních sekvencí** - u člověka 5' TTAGGG 3' (3-20kb)
  - kromě toho konec 3' vedoucího vlákna **přesahuje svou telomerickou sekvencí 5' konec** opožd'ujícího se vlákna
  - **zkrácení telomer** u diferencovaných buněk (na určitou délku) má za následek **smrt buňky** nebo **zástavu replikace**
  - u buněk v **embryonálním období** řeší problém koncové replikace komplex zvaný **telomerasa** - kromě proteinů a enzymu (forma reverzní transkriptasy - RNA-dependentní-DNA-polymerasa) obsahuje také **molekulu RNA**
  - tato molekula se částečně váže na **repetitivní sekvence** vedoucího vlákna a slouží jako **templát** pro rozšíření **vedoucího řetězce**
  - nově **rozšířený vedoucí řetězec** pak slouží jako **templát** pro replikaci 5' konce **opožd'ujícího se vlákna**
  - telomerasa je aktivní především v buňkách v **embryonálním období**
  - v **postnatálním období** pak v některých **buňkách maligních**
- **rychlost replikace DNA** je u živočichů odhadována na 0,5 - 0,15 $\mu$ m/min - pomalý proces



## 44. Transkripce a posttranskripční úpravy RNA u eukaryot

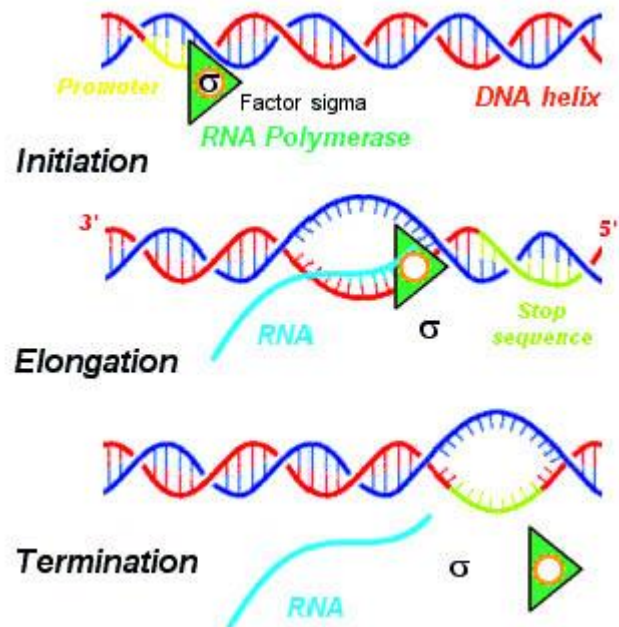
### Trankripce DNA

- transkripce je proces **přepisu informace z DNA do molekuly RNA**
- obvykle je přepisováno pouze **jedno vlákno DNA** – nazývá se **pracovní vlákno** (antisense strand, templát, nekódující, negativní, -DNA)
- **komplementární vlákno** se nazývá **paměťové** (sense strand, kódující, pozitivní, +DNA)
- oba řetězce však mohou sloužit jako **templáty**, což znamená, že různé geny mohou být přepisovány z **různých řetězců DNA**
- syntéze RNA předchází **rozvinutí lokálního segmentu DNA** nutné pro zpřístupnění **pracovního řetězce** (transkripční bublina)
- RNA je **syntetizována enzymy zvanými DNA-dependentní-RNA-polymerasy** jako řetězec komplementární k pracovnímu vláknu DNA
- **sekvence bazí RNA** je tedy shodná se sekvencí bazí v paměťovém vláknu DNA s tím rozdílem, že místo **thyminu** je zařazován **uracil** (komplementární k adeninu)
- transkripce probíhá vždy ve **směru 5'-3'** podobně jako replikace DNA
- v průběhu tohoto procesu vzniká **hybrid RNA-DNA**, výsledkem přepisu je primární transkript, který je posléze **modifikován do podoby zralých molekul RNA**
- na transkripci se u eukaryot podílejí **3 RNA-polymerasy** (I, II, III) – mírně se liší ve svých funkcích a každá přepisuje **specifickou sadu genů**

- **RNA-polymerasa I:** pracuje v jadérku a transkribuje geny kódující pre-RNA pro ribosomální RNA (rRNA) 18S, 28S a 5,8S
- **RNA-polymerasa II:** přepisuje geny, které kódují proteiny (tzn. pre-mRNA) a určité druhy snRNA (podstatné pro splicing)
- **RNA-polymerasa III:** katalyzuje transkripci sady krátkých genů, které kódují tRNA a 5S rRNA

- **iniciace transkripce**

- zahájení **transkripce genů kódujících proteiny** je umožněno vazbou komplexu proteinů, mezi něž náleží transkripční faktory (TF) a RNA-polymerasa II na **promotor genu**
- **transkripční faktory** se váží na **signální sekvence DNA** v promotoru, navádějí **RNA-polymerasu II** do správné pozice, dochází k její aktivaci a tak je zahájena transkripce
- **RNA-polymeráza** tuto pozici rozezná pomocí své **podjednotky (sigma faktoru)**
- TF se obvykle váže na **oblast obsahující sekvenční element DNA** zvaný **TATA box**
- jeho název vyplývá z většího počtu **T a A bazí** v sekvenci dané oblasti (TATAAA)
- TATA box je **signální sekvence**, umístěná přibližně 25 bp proti proudu (-25bp) od místa začátku transkripce (obvykle nukleotid A v pozici označené jako +1)
- jeho funkcí je lokalizovat **RNA-polymerasu** ve správné pozici na startu transkripce
- připojení RNA-polymerasy k TATA boxu se uskutečňuje pomocí **specifických transkripčních faktorů** TF IIA, TF IIB a dalších
- pro **stimulaci nebo inhibici transkripce** mohou geny využívat i jiné iniciační signální sekvence s podobnou funkcí – **CCAAT (CAT) box** umístěný v pozici -70 až -80 bp, nebo sekvence bohaté na **CG (CpG ostrůvky)**, lokalizované přibližně 100bp proti proudu
- CG boxy se často vyskytují u genů, které **nemají TATA box** (např. housekeeping geny – geny kódující histony, ribosomální proteiny apod.)
- **promotor** je asymetrický, tzn. že při transkripci je jen **jedno vlákno smysluplné**



- **druhé vlákno** ale může být smysluplné zas v jiné oblasti, při transkripci jiného genu
- transkripce je ukončena dosud **ne zcela známým způsobem**, vlivem terminačního signálu
- ten je umístěn na 3' konci za kódující **sekvenci genu**
- v **terminaci transkripce** hraje úlohu sekvence AAUAAA označovaná jako **polyadenylační signál**, která podmiňuje štěpení RNA v krátké vzdálenosti za tímto signálem
- kromě **promotorů** existují ještě sekvence DNA zvané **enhancery**
  - jedná se o tzv. **zesilovače**, úseky DNA, které mohou být od genu, jenž ovlivňují, značně **vzdáleny**
  - jde o krátké sekvence, jejichž funkce **není ovlivněna vzdáleností** od řízeného genu a mohou působit jak ve směru 5'-3', tak i naopak
  - jejich mechanismus účinku je podobný jako u **promotoru**

### Posttranskripční úpravy

- transkripce genu kódujícího protein vzniká **prekursorová mRNA**, tzv. heterogenní jaderná RNA (**hnRNA**) - primární transkript, která obsahuje sekvence **exonů i intronů**
- musí proto být následně upravena do **zralé formy** procesy, které jsou označovány jako **posttranskripční úpravy**
- mezi ně patří **sestřih a modifikace 5' a 3' řetězce**
- **sestřih (splicing)**
  - sestřih je proces, kterým jsou z **pre-mRNA** odstraněny nekódující sekvence, introny
  - **introny** jsou poté téměř ihned odbourávány
  - zároveň dochází ke **spojení exonů**, takže ve zralé mRNA je obsažena kontinuální informace pro **syntézu proteinu**
  - **sestřih** musí být velmi přesný, malá odchylka v napojení exonů může vést k odlišnému **čtení genetické informace** a tvorbě odlišného proteinu, mnohdy nefunkčního
  - sestřih závisí na přítomnosti **konzervovaných signálních sekvencí**, uložených na **začátku a konci intronu**
  - ve většině genů jsou na **prvních místech 5' konce intronu** nukleotidy GT (v mRNA GU) a na **posledních dvou místech jeho 3' konce** AG (GT-AG pravidlo)
  - tyto sekvence jsou však součástí větší oblasti **signálních sekvencí** na obou koncích intronu
  - kompletní signální sekvence 5' konce je 5' AGGTAAGT 3', 3' konce je 5' YYYYYYNCAG 3' (Y=pyrimidin, N= jakýkoli nukleotid)
  - kromě toho se ve vzdálenosti 10-40 proti proudu od AG 3' konce intronu vyskytuje další signální sekvence, **5' CURAY 3'**, která je nazvána „větvicí sekvence“ (branch point, R = purin)
  - sestřih se odehrává ve **dvou krocích**
    - nejprve se **vytvoří smyčka**, kdy se 5' konec intronu štěpí a váže na větvicí sekvenci
    - ve druhém kroku je **intron rozštěpen** za nukleotidem G v sestřihovém místě 3' a tím **vyštěpen**
  - sestřih je zprostředkován **komplexem molekul RNA a proteinu**, který se nazývá **spliceosom**
  - **spliceosom** se skládá z pěti typů snRNA (small nuclear RNA), označovaných U 1, 2... (bohaté na uridin) a více než **50 proteinů**
  - každá **snRNA** se připojuje na specifický protein a tvoří malé partikule - nukleární ribonukleoproteiny (snRNP - small nuclear ribonucleoprotein)
  - spliceosom je zodpovědný za **vytvoření konformace mRNA** vhodné pro sestřih, **katalyzuje** vystřížení intronů a napojení (ligaci) exonů
  - kromě tohoto způsobu existují i **jiné mechanismy sestřihu**
- **editace**
  - pochod, při němž jsou do transkriptu některé **nukleotidy přidávány** nebo jsou některé stávající nukleotidy **chemicky měněny**
- **modifikace 5' konce mRNA**
  - modifikace 5' konce eukaryotických mRNA spočívá ve **vytvoření tzv. čepičky (cap)**
  - dochází k přidání modifikovaného nukleotidu 7-methylguanosu ( $m^7G$ )
  - nejprve je přidán GTP neobvyklou vazbou 5'-5' na první nukleotid mRNA a poté je připojena skupina  $-CH_3$  na guanin

- čepička chrání mRNA před degradací 5' konce **působením exonukleas** v cytoplasmě a usnadňuje tak **transport mRNA** z jádra do cytoplasmy a zároveň umožňuje rozpoznání startovního místa **mRNA v ribosomu**
- **modifikace 3' konce mRNA**
  - většina **eukaryotických mRNA** je na 3' konci modifikována především sekvence asi 250 adeninů (poly A konec)
  - **polyadenylace** vyžaduje přítomnost signálních sekvencí, mezi něž patří zejména 5' AAUAAA 3' v blízkosti konce 3' pre-mRNA
  - na tyto sekvence se váží **specifické proteiny** a vytvoří komplex, který štěpí mRNA ve **specifickém místě**, které je lokalizováno 15-30 nukleotidů za signální sekvencí **po proudu**
  - poté enzym poly(A)polymerasa připojuje adeniny k 3' konci molekuly
  - **modifikace** pravděpodobně chrání mRNA před enzymatickou degradací kódující sekvence od 3' konce, usnadňuje **transport mRNA** a translaci
  - zralá **upravená mRNA** je exportována do cytoplasmy – slouží jako templát pro syntézu **proteinů**
  - na rozdíl od **rRNA a tRNA** je **mRNA** poměrně nestabilní, **přežívá neporušená asi 6 hodin**, jen některé mRNA (kódující globin např.) přežívají mnohem déle
- **tRNA**
  - molekula tRNA vzniká **transkripcí genů**, které jsou ve skupinách umístěné na různých **místech genomu**
  - geny pro tRNA existují v mnoha kopiích, což odráží skutečnost, že buňka potřebuje **velké množství těchto molekul** – u člověka 46 genových rodin pro geny tRNA
  - **primární transkript pre-tRNA** je u eukaryot upraven sestřihem, kdy je odstraněn krátký **intron** a připojena sekvence CCA na 3' konec řetězce
- **rRNA**
  - molekuly vznikají transkripcí genů, které existují v **mnoha kopiích** na krátkých raménkách **akrocentrických chromosomů** v oblastech nukleolárních organizátorů
  - sekvence 28S, 18S a 5,8S jsou uloženy v rámci jedné transkripční jednotky, která existuje v mnoha kopiích separovaných od sebe krátkými nepřepisovanými oblastmi
  - **RNA-polymerasa I** transkribuje pouze jednu molekulu pre-rRNA
  - **primární transkript podléhá štěpení** na několika místech a specifickým modifikacím bazí za účasti molekul snoRNA (small nucleolar RNA)
  - tím jsou vytvořeny **zralé molekuly** 18S, 5,8S a 28S rRNA
  - **primární transkripty** jsou u různých eukaryot různě dlouhé, což je dáno přítomností **nekódujících sekvencí** mezi sekvencemi pro rRNA – mezerníky (spacer)
  - **separátně** je transkribována 5S rRNA enzymem **RNA-polymerasa III**, vzniká transkript o délce 121 bazí, který **není dále upravován**
  - geny pro tuto rRNA se nacházejí v **různých oblastech genomu**

## 45. Translace, posttranslační úpravy proteinů

### Translace

- **translace** = proces syntézy proteinů, při němž je využita informace mRNA k zajištění správného **pořadí amk** v proteinu
- **zralá mRNA** migruje do **cytoplasmy** a v komplexu s ribosomy a dalšími složkami řídí syntézu **polypeptidů**
- translatovány jsou pouze **centrální části mRNA** – na 5' a 3' konci zůstávají úseky, které translaci nepodléhají (5' UTR a 3' UTR – untranslated regions)
- translace běží na mRNA opět od **5' ke 3' konci**
- klíčovou úlohu hrají **molekuly tRNA**, které **dopravují aminokyseliny** na **ribosom** a zařazují je na správná místa mRNA, která rozeznává na **principu komplementarity** mezi antikodonem tRNA a kodonem mRNA



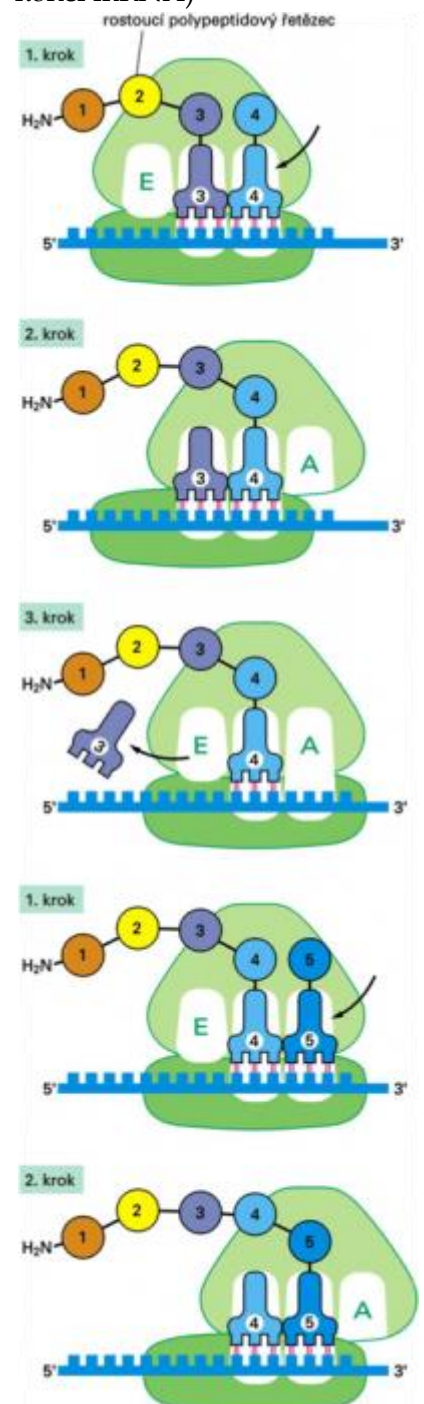
- **před zahájením translace** však musí být aminokyseliny nejprve **aktivovány** (prostřednictvím ATP) a poté **pomocí enzymů** (aminoacyl-tRNA-syntetasa) připojeny na 3' OH konec odpovídající **tRNA**
- **proces translace** se odehrává na ribosomech
  - ve velkém množství v buněčné cytoplazmě **volně**
  - vázány na **endoplazmatické retikulum**
- každý ribosom se skládá z **velké** (cca 60S) a **malé** (cca 40S) **podjednotky**
- celková velikost **eukaryotního ribosomu** je 80S (Svedbergovy jednotky)
- **velká podjednotka** obsahuje 3 typy rRNA (28S, 5.8S, 5S) a přibližně 50 polypeptidů
- **malá podjednotka** obsahuje 18S rRNA a více než 30 proteinů
- **maximální rychlost** translace je za optimálních podmínek zařazení asi 40 amk za sekundu do polypeptidu
- **pravděpodobnost chyby** při translaci je méně než 1%
- translace se skládá ze **3 částí**
  - iniciace
  - elongace
  - terminace

### Iniciace

- prvním krokem je **vazba malé podjednotky** ribosomu na mRNA ve specifickém bodě, uloženém **proti proudu** od iniciačního tripletu **AUG** (u eukaryot rozeznává čepičku na 5' konci mRNA)
- **iniciační tRNA** s navázaným methioniem se váže na **triplet AUG**
- **triplet** je rozeznán jako **iniciační** v případě, že je obklopen vhodnou iniciační sekvencí
- vše probíhá za účasti **iniciačních faktorů**, u eukaryot označovaných jako eIF a číslem (eIF1, 2..) a GTP jako zdroje energie
- jakmile je dokončena tvorba **iniciačního komplexu**, dojde připojení **velké podjednotky ribosomu**
- **kompletní ribosom** obsahuje **2 místa** pro vazbu tRNA molekul
  - **1. místo** se nazývá **peptidylové (P)** pro vazbu tRNA nesoucí methionin a vázající se na AUG
  - **2. místo** se nazývá **aminoacylové (A)**, uložené pod druhým kodonem
  - v podstatě existuje i **3. místo** do něž se posouvá již **samostatná tRNA** již byla odebrána amk, předtím, než je z ribosomu uvolněna (E)
- **molekula mRNA** se pohybuje po **malé podjednotce** až narazí na první triplet **AUG** - otevření **čtecího rámce**, zajištění čtení informace po kodonech (tripletech) bazí

### Elongace

- začíná, když **tRNA vstoupí do místa A** a páruje se svým antikodonem s druhým kodonem mRNA
- obě místa jsou obsazena, aminokyseliny jsou v těsném kontaktu a mezi nimi dojde k vytvoření **peptidické vazby**
- tato reakce je **katalyzována** komplexem enzymů (peptidyltransferasy)
- **methionin** je uvolněn ze své tRNA
- ribosom se pohybuje k **dalšímu kodonu mRNA**, dipeptid vázaný na druhou tRNA se přesouvá na **místo P** a **místo A se uvolňuje** pro další tRNA
- tento postup se opakuje a opět se při něm uplatňuje **řada dalších proteinů** - elongační faktory (u eukaryot eEF2, 3...)
- **iniciační místo** je volné pro vazbu dalšího ribosomu, takže vzniká **polysom** a mRNA je translatována **několika ribosomy** najednou



## Terminace

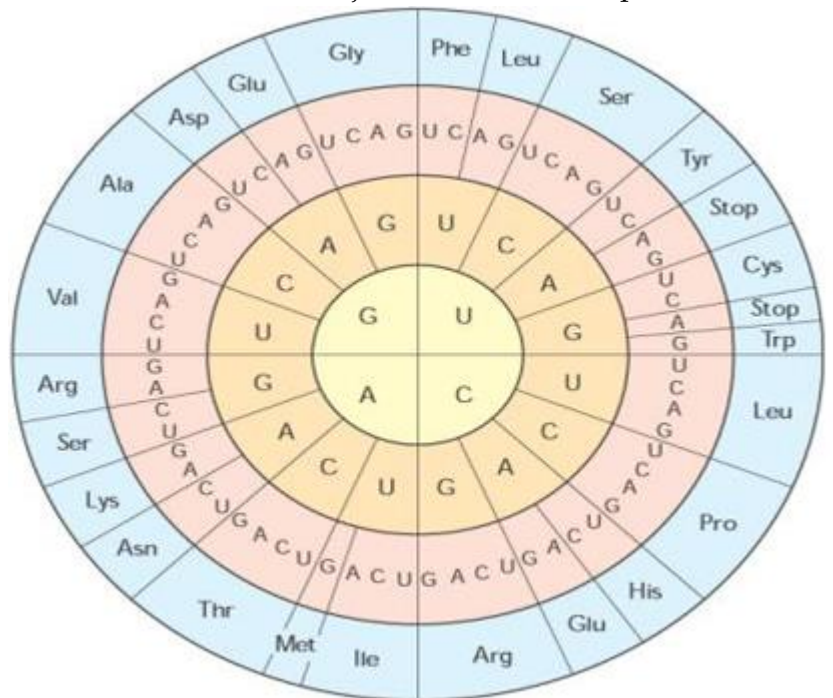
- translace probíhá, dokud do místa A nevstoupí **terminační triplet**
- místo tRNA vstoupí do tohoto místa **protein** (releasing factor), který způsobí odpojení polypeptidu z **ribosomálního komplexu**
- odpojuje se mRNA a ribosom se rozpadá na malou a velkou **podjednotku**

## Posttranslační úpravy


- k tomu, aby se nově **syntetizovaný polypeptid** stal funkčním, prochází **řadou úprav**
- běžnou posttranslační úpravou je odstranění prvního **methioninu** z N konce polypeptidu
- dále např. **kovalentní připojení chemických skupin** a rozštěpení **polypeptidu**
- **chemické modifikace proteinu zahrnují**
  - methylace
  - fosforylace
  - acetylace
  - připojení větších molekulárních struktur na **postranní řetězce aminokyselin**
    - lipidy
    - oligosacharidy (glykosylace)
- **posttranslační úpravy** souvisí s funkcí, kterou má protein vykonávat
- **glykosylace**
  - typická pro proteiny, které jsou **sekretovány z buňky** nebo transportovány do lysosomů, Golgiho aparátu nebo plasmatické membrány
- **lipidy**
  - lipidové skupiny jsou přidávány zejména na **membránové proteiny**
  - slouží k **zakotvení** proteinu
- **rozštěpení**
  - při rozštěpení polypeptidu může docházet k **odstranění vnitřních peptidů** nebo signálních peptidů na N konci (methionin)
- proteiny, které mají být **secernovány** (např. hormony) nebo dopraveny do určité oblasti buňky (histony do jádra, DNA-polymerasy též) musí být opatřeny **určitou signální sekvencí** (signálním peptidem)
- tato signální sekvence se nazývá **vedoucí sekvence** (leader), tvoří ji 15-30 amk uspořádaných do **spirálovité vlásenky**
- po **dopravení proteinu** na správné místo je odštěpena speciální peptidasou
- proteiny určené k sekreci jsou nejdříve dopraveny do **endoplasmatického retikula** (ER) pomocí **signální rozpoznávací partikule** (SRP) – komplex malých cytoplasmatických RNA a proteinů
- tento komplex se váže na **rostoucí polypeptid** a **ribosom** a prostřednictvím SRP receptoru na povrchu **drsného ER** (dokovací protein) se dostává do **lumen ER** a poté **ven z buňky**
- podobně jsou další proteiny nasměrovány do různých **cílových míst** prostřednictvím jiných **signálních sekvencí** (např. jaderné lokalizační signály – transport do jádra, lysosomální proteiny – transport do Golgiho aparátu a do lysosomu apod.)

## 46. Genetický kód

- rozluštění **genetického kódu** se datuje do roku 1961, kdy byly pokusy s translací in vitro zjištěno, že vždy **trojice nukleotidů** (triplet) kóduje určitou aminokyselinu
- tyto triplety se nazývají **kodony**
- 4 báze DNA a RNA se mohou kombinovat jako  $4^3=64$  **kodonů**, které specifikují 20 **proteinogenních aminokyselin** pro tvorbu proteinů
- genetický kód je degenerovaný**
  - počet kodonů** je větší než počet **aminokyselin** – všechny amk s výjimkou tryptofanu a methioninu jsou kódovány **více triplety**
  - genetický kód se tedy vyznačuje **nadbytečností** – označujeme jej jako degenerovaný
  - kodony**, které specifikují stejnou aminokyselinu se nazývají **synonymní**
  - variace** mezi synonymními kodony se týká hlavně **3. pozice** v tripletu, rozhodující úlohu mají obvykle první dvě báze kodonu
  - degenerace genetického kódu minimalizuje **efekt mutací**
  - díky degeneraci také nelze z proteinu určit strukturu mRNA, jež ho kódovala, naopak však **strukturu proteinů** můžeme určit zcela přesně
- ze **64 kodonů** kóduje aminokyseliny **61 kodonů** – zbývající 3 (UAG, UGA a UAA) jsou tzv. **terminační kodony** nebo stop kodony a proteosyntézu **ukončují** (tRNA mající komplementární antikodon totiž nese místo amk obvykle vodu)
- proteosyntéza** je naopak zahájena v místě **iniciačního kodonu** AUG, který kóduje **methionin**
- je lokalizován v některém z prvních exonů a určuje **čtecí rámec** sekvence RNA
- každá **sekvence RNA** může být čtena třemi soubory kodonů, podle toho, která báze je vybrána jako **začátek kodonu**
- soubor kodonů, který je omezen **iniciačním a terminačním kodonem** se nazývá otevřený čtecí rámec – **ORF, open reading frame**
- genetický kód je považován za **univerzální**
  - stejným způsobem ho využívají **všechny organismy**
  - existují však výjimky – zejména **mitochondrie** a některé jednobuněčné organismy
  - např. v mitochondriích UGA (obvykle terminační) kóduje **tryptofan** a naopak AGA a AGG (obvykle arginin) jsou **terminační**
- ne všechny synonymní kodony jsou užívány u různých druhů se stejnou četností – některé více, některé méně – tzv. **kodonový dialekt**



## 47. Struktura a funkce genu

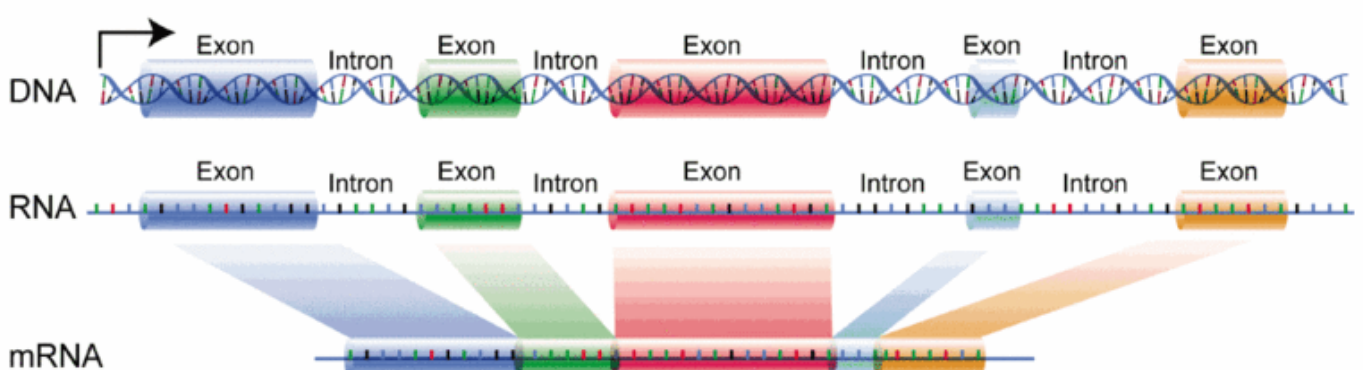
- **definice genu** je složitá, během dějin prodělala řadu změn
  - **Mendel** (1865) definoval, že nositeli dědičnosti jsou **hmotné elementy** pro jednotlivé znaky, jež se přenášejí z generace na generaci – nedědí se tedy znaky jako takové, ale jejich **hmotné základy**, jejich souhrn v každém živém jedinci se nazývá **genotyp**
  - **Bateson** (1906) označil hmotné dědičné základy jednotlivých znaků jako geny
  - geny lze definovat jako **jednotky genetické informace**, jako úseky DNA (RNA u RNA virů), ve kterých část nebo celá sekvence kóduje v konečné fázi exprese **specifický protein**
  - existují i geny, kde konečným produktem není **bílkovina**, nýbrž **nekódující RNA** (rRNA, tRNA a další)
  - **další definice zní**: gen je lokalizovaná oblast genomové sekvence, odpovídající jednotce dědičnosti, které je asociována s **regulačními a transkripčními oblastmi**
- úsek molekuly DNA, který kóduje informaci pro syntézu 1 proteinu = **strukturní gen**
- geny které řídí činnost těchto strukturních genů se pak nazývají **geny regulační**
- hlavní **nositelkou genetické informace** je deoxyribonukleová kyselina (DNA)
- **mechanismus kopírování** byl objasněn v roce 1953 Jamesem Watsonem a Francisem Crickem
- geny se nacházejí na **chromosomech**, což bylo prokázáno roku 1944
- geny jsou uloženy v chromosomech **lineárně za sebou**, oblast chromosomu, kde se nachází daný gen, se označuje jako **lokus**
- **pořadí genů** v každém chromosomu je určité, za normálních okolností neměnné
- oba **homologní chromosomy** obsahují vždy přesně tytéž lokusy a na obou homologních lokusech je umístěn vždy týž gen v téže formě
- **rozdílné geny**, uložené na chromosomu na témže lokusu jsou **alely** – každá alela téhož páru ovlivňuje jeden a týž znak – **alela** = konkrétní forma genu
- chromosom je tvořen jedním **velmi dlouhým DNA helixem**, na kterém jsou kódovány stovky až tisíce genů
- **genetická informace** je uložena v sekvenci dusíkatých bází v DNA
- kompletní soubor celé genetické informace organismu se nazývá **genom**
- množství genetické informace v buňce je obrovské – **lidský genom** obsahuje kolem  $3 \cdot 10^9$  nukleotidů (cca. 1m)
- kompletní nukleotidová sekvence lidského genomu by pak zabrala kolem **900 000 stran**
- během dělení buňky musí dojít ke **zkopírování všech těchto informací**, může tedy docházet k chybám a proto existují reparační mechanismy
- většina genů v buňce je uložena v **jádře na chromosomech** – geny jaderné (mají rozhodující důležitost pro život jedince i jeho druhu)
- geny uložené v chromosomech cytoplazmatických struktur se nazývají **plasmageny**
- **introny a exony**
  - u vyšších organismů včetně člověka je **kódující informace genu** uspořádána do série úseků DNA, které se nazývají **exony**
  - exony jsou separovány úseky nekódujících sekvencí – **introny**
  - počet a délka exonů a intronů velmi kolísá, avšak **délka intronů** je obvykle mnohem větší než délka exonů
- **regulační oblasti**
  - součástí genu jsou i **regulační oblasti**, které řídí zahájení nebo zastavení určitého procesu, např. **exprese genetické informace**
  - zde má zásadní význam tzv. **promotor**, úsek DNA, který je uložen směrem k 5' konci vlákna DNA od místa **počátku transkripce**  
  
(užívá se termín proti proudu – upstream nebo naopak u sekvencí po proudu – **downstream** směrem ke 3' konci)

- promotor obsahuje specifické tzv. **signální sekvence**, které jsou rozpoznávány transkripčními faktory (proteiny) a jejich prostřednictvím **RNA-polymerasou**
- v závislosti na jejich vazbě je následně zahájena (nebo zastavena) **transkripce genu**
- tyto signální sekvence jsou vysoce **konzervované**, což znamená, že jsou stejné nebo podobné u různých živočišných druhů
- souvisí to s jejich **významnými funkcemi**, neboť mutace signálních sekvencí mají pro buňku vážné důsledky a proto jsou z evolučního hlediska řazeny mezi **zakázané mutace** (mutačně evoluční mechanismy)
- **velikost genů** je různá, kolísá v rozsahu od méně než **100 párů bází** (bp-base pair) až po několik **milionů bp**
- většina genů je na chromosomech rozložena **nerovnoměrně**, některé však existují ve **skupinách (cluster)**
- tyto geny jsou si více či méně podobné a vytvářejí tzv. **genové rodiny**
- genové rodiny vznikly v průběhu evoluce mechanismem **opakovaných duplikací** původního genu a následným rozrůzněním vlivem mutací
- **exprese genetické informace**
  - **metabolismus** organismů a jejich schopnost růstu a reprodukce se skládají z tisíců biochemických reakcí, katalyzovaných enzymy
  - každý **enzym** se skládá z jednoho nebo více polypeptidů
  - další polypeptidy se podílejí na **struktuře** buněk a organismů nebo mají **regulační funkci** a podílejí se na **transportu** látek
  - v **počtu genů** se organismy významně liší, základní **genetické zákonitosti** exprese genů jsou ale v principu **univerzální**, ovšem s odchylkami, které vznikaly a fixovaly se v průběhu miliony let trvajícího **vývoje druhů**
  - **genetická informace** v DNA je dána sekvencí bází
  - proces, kterým se tato informace stává použitelnou pro buňku se nazývá **exprese genu**
    - **Crick** tento proces popsal jako **centrální dogma přenosu genetické informace** ve směru DNA - RNA - protein nebo DNA - DNA
    - toto jednoduché schéma představuje velice **komplexní proces**, který je výsledkem regulačních aktivit celé řady **proteinů**
    - je třeba ho ještě doplnit o možnost **reverzní transkripce** - přenosu informace z RNA do DNA, která byla poprvé pozorována u **retrovirů**
    - bylo ale zjištěno, že i **eukaryotické buňky** obsahují sekvence DNA, které kódují enzymy **reverzní transkriptasy**
    - **reverzní transkripční** zralé mRNA vzniká tzv. **cDNA** (complementary DNA)

## 48. DNA sekvence kódující (proteintvorné) a nekódující

- **přepis DNA** do RNA je stejný pro **všechny organismy**, ačkoliv následné úpravy se již liší
- u bakterií se DNA nachází přímo v **cytoplasmě**, kde se nachází i **ribosomy** a tak dochází rovnou i k jejímu **překlada do mRNA**
- u eukaryot je však DNA uložena v **jádře**, odkud následně **prostupuje** (po přeložení do RNA) **jadernými póry** do cytoplasmy
- před **překladem** této RNA do aminokyselinové sekvence dochází k **posttranskripčním úpravám** - přidání čepičky a polyadenylaci
- v 70. letech minulého století však došlo ke **zjištění**, že jaderné a **cytoplazmatické RNA** se liší ve své **velikosti**, ačkoli obě obsahují zmíněnou čepičku i polyadenylované oblasti
- ve skutečnosti se z **jaderné RNA** do cytoplasmy dostalo pouhých 5%

- zpočátku důvod nebyl jasný, vše vysvětlil objev poněkud zvláštní **struktury genů**
- ty v sobě nesou části, které se do **bílkovinné sekvence** nepřekládají
- jedná se o **neproteinotvorné sekvence** – introny
- objeveny byly v roce 1977
- **exony – proteinotvorné sekvence**
  - exony tvoří relativně **malou část DNA** a jaderné RNA
  - jedná se asi jen o 5% **původní sekvence**
  - po vystřížení intronů dochází ke **spojení zbylých částí mRNA**
  - tato jaderná forma se dostává na **ribosomy**, kde je v procesu translace přeložena do jednotlivých **bílkovin**
  - z toho vyplývá také **důležitost těchto sekvencí**
  - dojde-li k poškození v oblasti intronů, obvykle nedochází k **významným škodám**
  - jakýkoli **zásah do oblasti exonů** je však naprosto zásadní a často vede ke vzniku **defektní nebo pozměněné bílkoviny**
- **introny – neproteinotvorné sekvence**
  - introny jsou **součástí DNA i jaderné RNA**, do cytoplasmy a na ribosomy se však již nedostávají
  - jejich informace není totiž **překládána do bílkovin**
  - tvoří **drtivou většinu** lidského genomu (95%)
  - jejich **velikost** bývá různá, často mezi 80-10 000 nukleotidy
  - při vzniku mRNA dochází k **transkripci intronů i exonů**
  - předtím, než opustí jádro, jsou však všechny **introny vystříženy** a exony pospojovány – cytoplasmatický mRNA je tedy výrazně kratší
  - tato úprava se nazývá **RNA splicing** – RNA sestřih
  - k rozpoznání intronů k vystříhnutí dochází následovně
    - o všem rozhodují **nukleotidy** na obou koncích intronů
    - o odstranění se starají **speciální enzymy – snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particles – SNURPs)** – malé jaderné ribonukleoproteinové částice
    - kromě vystřížení intronů zajišťují i **spojení exonů**
    - enzymy umožní **přiblížení obou konců intronu** a vznik lasovité struktury, která je nakonec **odstraněna**
- **význam intronů**
  - i tyto zdánlivě **zbytečné části DNA** jsou potřebné
  - svoji roli hrály zejména v počátku **evoluce genů**, často urychlovaly vznik nových **bílkovin** pomocí **rekombinace exonů**
  - druhou výhodou je pak možnost tzv. **alternativního sestřihu**, kdy může vznikat na základě vývojového stádia buňky hned několik **různých typů mRNA**
  - z jednoho genu tak může vznikat několik **různých bílkovin**
  - vše závisí na **spojení kódujících sekvencí** – exonů
  - je pravděpodobné, že existoval společná **předchůdce prokaryot a eukaryot**, který introny obsahoval
  - v rámci evoluce se však jednotlivé **skupiny oddělily**
  - prokaryota se vyznačují velkým **počtem dělení**
  - **kratší genom** (tvořený pouze exony) je pro ně tedy výhodou
  - dochází tak k urychlení procesu tvorby bílkovin
  - u eukaryot nedochází k tak **častému dělení** a proto si nekódující části genomu zachovala větší genom přináší na druhé straně výhodou možné **rekombinace**



## 49. Regulace transkripce u eukaryot

- jedním z významných **kontrolních bodů** exprese genů je **iniciace transkripce**
- **transkripčně inaktivní DNA** je součástí vysoce kondenzované chromatinové struktury v chromosomu – tato struktura musí být před transkripcí **reverzibilně upravena** do konformace, která umožňuje **navázání RNA-polymerasy** na DNA
  - **změna konformace** chromatinu je umožněna **modifikací histonů** a remodelací chromatinu
    - histony jsou součástí **nukleosomů** a jejich modifikace spočívá v acetylaci nebo deacetylaci
    - jedná se o přidání **acetylových skupin** k amino-skupinám postranních řetězců lysinů v histonech pomocí enzymu **acetyltransferasy**
    - tak se **redukuje afinita** mezi histony a DNA – oblast promotoru genu je **přístupnější** pro komplex transkripčních faktorů a RNA-polymerasy
    - **deacetylace** histonů má opačný efekt
    - na aktivaci nebo potlačení transkripce má vliv i **methylace histonů** (methyltransferasa) – methylace argininů aktivuje, lysinů deaktivuje
    - tyto modifikace s účastí **dalších proteinů** dočasně mění strukturu chromatinu
  - **interakce transkripčních faktorů** a specifických sekvencí promotoru genu
    - **regulace transkripce** se uskutečňuje především **interakcí promotoru** s těmito specifickými proteiny, vázajícími se na DNA
    - **regulační sekvence** jsou umístěny různě daleko od **počátku transkripce**, ale na stejné molekule DNA nebo RNA – pracují tedy v **pozici cis** (cis elementy)
    - **transkripční faktory** jsou syntetizovány v cytoplazmě, působí však v jádře a musejí proto **migrovat** do místa určení
- základní **transkripční faktory** se vážou s DNA promotoru v místě **sekvence TATA** a tvoří komplex pro **lokalizaci RNA-polymerasy** do správné pozice – iniciace transkripce
- **účinnost transkripce** závisí na dalších specifických TF, jež se mohou vázat na další **signální sekvence** v promotoru a mohou **interagovat** s transkripčním iniciačním komplexem a posílit jeho **stabilitu**
- mezi **specifické TF** patří např. tkáňově specifické TF
- kromě **základních signálních sekvencí** se v regulaci transkripce mohou uplatnit sekvence zvané **enhancery** (zesilovače), které velmi účinně stimulují transkripci
- jsou většinou **mimo promotor** genu, často ve velké vzdálenosti od genu, ale i uvnitř genu různě daleko po proudu od začátku transkripce
- **silencery** jsou naopak sekvence transkripci inhibující
- **transkripční faktory**
  - TF tvoří velkou rodinu proteinů, které mohou pozitivně nebo negativně ovlivňovat transkripci
  - většinou fungují jako **homodimery**, méně často tvoří heterodimery odlišných transkripčních faktorů
  - obsahují několik funkčně důležitých **domén** – doména pro vazbu s DNA, dimerizační doména a aktivační doména
    - **aktivační doména** aktivuje vznik transkripčního komplexu poté, co se TF váže na signální sekvenci genu
    - **doména pro vazbu s DNA** obsahuje několik charakteristických konzervovaných struktur – **motivů**
    - všechny tyto motivy používají  **$\alpha$ -helixy**, které zapadají do velkého žlábků DNA
    - TF jsou podle **typu domény** pro vazbu s DNA a podle genů, jejichž expresi ovlivňují, **klasifikovány**
  - **motiv v doméně pro vazbu DNA**
    - **motiv helix-turn-helix** (spirála-otáčka-spirála)
      - tvořen dvěma  $\alpha$ -helixy, oddělenými  $\beta$  otáčkou, vytváří **dimery**
      - jeden z helixů se váže na DNA ve **velkém žlábků**
      - příkladem proteinů s tímto motivem jsou TF obsahující **homeodomény**, jež jsou kódovány velmi **konzervovanými geny** (homeobox geny)

- podílejí se na **regulaci diferenciaci** a hrají významnou roli v **embryogenezi**
- **motiv zinkových prstů**
  - tvořen **smyčkou** amk, připevněných na basi dvěma **cysteiny** a dvěma **histidiny**, které jsou vázány prostřednictvím **atomu zinku**
  - zinkové prsty vytvářejí **homodimery** i složitější struktury
  - úsek aminokyselin **interaguje s DNA** prostřednictvím velkého žlábků
  - obdobný motiv tvořený **4 cysteiny** spojenými atomem zinku se uplatňuje v **TF regulujících receptor** steroidních hormonů
- **motiv leucinového zipu**
  - bohaté na **zbytky leucinu**, každá sedmá amk je Leu
  - na DNA se váží jako **dimery** a **dimerizace** nastává interakcí mezi hydrofobními povrchy dvou Leu zipů
  - příležitostně mohou tvořit **heterodimery**, což může podstatně zvýšit variabilitu **regulace transkripce**
- **motiv helix-loop-helix** (spirála-smyčka-spirála)
  - **dimerizační doména** obsahuje 2  $\alpha$ -helixy spojené smyčkou
  - dimerizace nastává mezi **hydrofobními amk** na jedné straně COOH konce helixů
  - mohou tvořit **homodimery i heterodimery** a vázat se na DNA
- **aktivační domény**
  - nejsou charakterizované **konkrétními motivy**
  - jsou zde přítomny oblasti bohaté na určité **amk** – glutamin či prolin
- poměrně **vysoké procento genů** transkribovaných RNA-polymerasou II. vykazuje tkáňově **specifickou expresi** působením tkáňově specifických TF, enhancerů a silencerů
- enhancer se v důsledku **vytvoření klíčky DNA** přiblíží promotoru a naváže se na něj pomocí **specifických proteinů** – tato vazba brání napojení RNA-polymerasy II. na promotor
- následně se v důsledku působení **signálních molekul** změní konformace celého komplexu, promotor je uvolněn pro RNA polymerasu II. a transkripce je **zahájena**
- **iniciace transkripce** rRNA genů je regulována vazbou dvou TF na promotorové sekvence, a to na sekvenci v **místě počátku** transkripce a sekvenci vzdálenou 100 nukleotidů proti proudu od **startovací pozice**
- transkripce tRNA je umožněna **vazbou TF** na promotorové sekvence a vazbou dalších faktorů a nakonec **RNA-polymerasy III.**
- **regulace exprese genu extracelulárními signály**
  - vývoj a přežití mnohobuněčných organismů závisí na dokonalé **koordinaci činnosti** všech jejich buněk
  - koordinaci zajišťují **signální molekuly**, které se k buňkám dostávají různými cestami
    - **buňky endokrinních žláz** secernují své produkty (hormony) do krve – ovlivnění vzdálených orgánů
    - **parakrinní buňky** secernují látky difundující do blízkého okolí (zažívací trakt)
    - **autokrinní buňky** ovlivňují zpětně činnost téže buňky, jež je syntetizuje
  - pro regulaci signálními molekulami platí několik **společných zásad**
    - ovlivňují jen **cílové buňky** se specifickými membránovými nebo cytoplasmatickými receptory, kaskádou pro přenos signálu v cytoplazmě a specifickými **TF v jádře**
    - **mutace genu** pro jakýkoli ze zúčastněných proteinů (receptory, enzymy, TF) může přerušit **přenos informace** a projevit se ve fenotypu jako ztrátová mutace
    - nebo může mutace způsobit **trvalou expresi genu** – např. v procesu **kancerogeneze**
    - různé cílové buňky mohou reagovat **specificky** na stejnou signální molekulu – reakce závisí na **přenosu (přečtení) signálu** systémem buňky
    - některé signální molekuly jsou přítomny v oběhu **nárazově**, jiné **trvale**
    - **množství signálních molekul** (např. hormonu) je zpravidla řízeno **zpětnou vazbou**
    - signální molekuly navázané na receptory jsou rychle **odbourávány** – pružnost reakce
    - uplatnění **signálních molekul** v regulaci buněčného cyklu
  - pro tuto otázku podstatný **přenos signálů** pro regulaci funkce genů hormony



- hormony ovlivňují **charakteristiky a funkce** cílových buněk aktivací transkripce **specifických genů**
- jsou to malé **molekuly steroidní** (estrogeny, glukokortikoidy) nebo **polypeptidové** (insulin) povahy
- **hormony lze dělit na**
  - **hydrofobní:** ve vodě nerozpustné, jen v tucích - steroidy (testosteron, estradiol) nebo thyroxin
  - **hydrofilní:** ve vodě rozpustné - polypeptidy (oxytocin a inzulin)
  - **aminy:** adrenalin
- **mechanismus působení hydrofobních hormonů**
  - mají relativně malé hydrofobní molekuly, vzniklé metabolizováním **cholesterolu**
  - tekutinami transportovány jen ve vazbě na specifické **hydrofilní bílkovinné nosiče** a buněčnou membránou pronikají snadno po odpojení od nosiče
  - v buňce se vážou na **intracelulární receptory** v cytoplazmě nebo jádře
  - komplex hormon-receptor prochází **póry jaderného obalu**, receptory se ale většinou vracejí zpět do **cytoplazmy**
  - v jádře jsou přítomny **hormonální jaderné receptory** - vytváří superrodinu receptorů a fungují jako indukibilní TF
  - po navázání hormonu se **receptorový protein** připojuje ke specifické sekvenci DNA v promotorové oblasti **cílových genů** a aktivuje jejich transkripci
  - syntéza proteinu pak buď přímo ovlivní **aktivitu buňky** nebo je protein secernován a působí na **cílové buňky**
  - **nezměněná molekula** receptoru bez navázání hormonu expresi genu neovlivní
  - v cytosolu přítomen **inhibiční protein**, který se v nepřítomnosti hormonu váže na doménu pro receptor hormonu a vytváří komplex, který neproniká do jádra
- **mechanismus působení hydrofilních hormonů**
  - hydrofilní hormony (polypeptidové) mohou být transportovány tekutinami **bez nosičů**, ale nemohou samostatně procházet membránou - váží se na specifické receptory na **povrchu buněk**
  - receptor prodělá **konformační změnu**, aktivuje se a přenáší signál prostřednictvím **dalších molekul** v buňce
  - řada receptorů má vlastní **proteinkinasovou aktivitu** nebo aktivuje **intracelulární proteinkinasy**
  - přenos signálu do jádra buňky je zprostředkován **fosforylační kaskádou** proteinů a sekundárními **nitrobuněčnými molekulami** (poslůčky)
  - **aktivované proteinkinasy** fosforylují cílové transkripční faktory, které v jádře umožňují transkripci cílových genů
- **alternativní transkripce individuálních genů**
  - kromě mechanismů, umožňujících **regulaci aktivity genů** (aktivace a represe), existují i kontrolní mechanismy, které mohou vybírat mezi **specifickými alternativními transkripty** a tím i produkty (isoformy) jednoho genu
  - **využití alternativních promotorů**
    - vyskytují se u některých **savčích genů**
    - využití vede k tvorbě **isoform** s různými vlastnostmi
    - **alternativní promotory** mohou být lokalizovány v prvním exonu, který je pak vystřižen, ale i ve větších vzdálenostech v genu směrem **po proudu**
    - produkty genové exprese pak mohou mít vlastnosti **specifické** pro určité tkáň
  - po úpravách **genové sekvence mRNA** se mohou vyskytnout variace, které vedou ke vzniku **různých mRNA** a tím i různých forem proteinu (isoformy)
  - **patří sem alternativní sestřih**
    - jsou využita i jiná **sestřihová místa**, což může vést k různým kombinacím exonů (intronisace exonů či exonisace intronů) jednoho genu
    - tím mohou vznikat různé **isoformy** proteinu
    - asi 50% lidských genů má odhadem možnost **alternativního sestřihu**

- sestřih může být **tkáňově specifický** nebo se může vyskytnout v různých vývojových stádiích buňky
- **další variací je alternativní polyadenylace**
  - jsou využity alternativní **polyadenylační signály** – oblast 3' UTR apod.
  - rovněž alternativně **polyadenylované transkripty** mohou být tkáňově specifické
- jednou z vzácných **posttranskripčních úprav je tzv. RNA editace**
  - dochází k inserci, delecí nebo substituce nukleotidů na úrovni RNA
  - u savců byla v omezeném počtu genů pozorována **substituční editace**, zejména deaminace vybraných cytosinových (C-U) a adeninových (A-I, inosin, který se chová jako G) zbytků
  - **význam RNA editace** není zcela jasný, může to být způsob regulace genové exprese a další cesta k **diversitě proteinů**
  - některé studie naznačují, že je nezbytná pro **přežívání organismu**
- **regulace transkripce mitochondriálních genů**
  - sekvence promotoru, rozpoznávané **mtRNA-polymerasami** jsou bohaté na A a zahrnují **startovní nukleotid (+1)**
  - lidská mitochondriální DNA má pro všechny geny jen **dva promotory** se signálními sekvencemi dlouhými 15 bazí
  - jeden promotor zajišťuje **transkripci** jednoho řetězce, druhý druhého
  - řetězce jsou transkribovány v **celé své délce** a primární transkript je upravován na **mitochondriální mRNA, rRNA a tRNA**
  - transkripci stimuluje transkripční faktor **mtTF1**
  - řídicí prvek je lokalizován proti proudu od startovního nukleotidu a má **opačnou orientaci** než promotor
  - **regulace** genové funkce odpovídá tedy spíše uspořádání regulačních prvků u **eukaryot**
  - lze tedy uzavřít, že **transkripce mtDNA** a její regulace jsou **kombinací mechanismů**, popsanych v prokaryotních i eukaryotních buňkách

## 50. Translace membránových a exkrečních proteinů (targeting)

- eukaryotní buňky vyrábějí velké **množství proteinů**
- aby proteiny mohly plnit svou funkci, musí být v buňce začleněny do **odpovídající struktury**
- některé proteiny jsou v **cytosolu**, jiné jsou dopravovány do různých **buněčných kompartmentů** (jádro, mitochondrie, peroxisomy apod.), nebo jsou zakotveny do **buněčné membrány** či membrány organel
- další proteiny jsou **secernovány konstitutivně nebo fakultativně** do mezibuněčné hmoty (hormony nebo jiné signální molekuly)
- **targeting** = nasměrování nových proteinů k místu jejich určení, regulace transportu
- o základním nasměrování polypeptidů rozhoduje **místo jejich syntézy** - na volných ribosomech v cytosolu nebo na **ribosomech v GER**
  - **volné ribosomy** – zůstávají v cytosolu, jsou dopraveny do mitochondrií, peroxisomů nebo do jádra
  - **ribosomy GER** – secernovány z buňky, event. směřovány do GK, lysosomů nebo jsou zabudovány jako integrální proteiny do membrán a přeneseny na definitivní místo určení, např. do plazmatické membrány
- k tomu, aby se proteiny dostaly na **správné místo určení** musí být vybaveny specifickými **lokalizačními signály**, obvykle představovanými krátkými peptidovými sekvencemi
- o směřování polypeptidů rozhoduje **sekvence asi 75 bazí** na 5' konci mRNA = tzv. **topogenní sekvence**
- základní **směr transportu proteinů** je: cytosol – GER – transportní vezikuly – GK – sekreční vezikuly – exocytosa
- **exkreční proteiny**
  - proteiny **určené k sekreci** mají po zahájení translace na počátku tzv. **vedoucí (leader) sekvenci** (16 – 30 AMK) – tvořena hydrofobními AMK s pozitivním nábojem (Phe, Leu, Ser, atd.)
  - **translace exkrečních proteinů** je iniciována navázáním **mRNA na ribosom** v cytosolu

- je zastavena po asi **70 AMK** a na vedoucí sekvenci vznikajícího polypeptidu se naváže **SRP** (Signal Recognition Particle) a tento celý komplex se váže na **SRP receptor na GER**
- **vedoucí sekvence** vstoupí do membrány GER, kde ji váže **specifický protein SSB**
- **transmembránové proteiny** vytvářejí kolem polypeptidu **transmembránový kanál**, translace proteinu **pokračuje**, SRP a receptor SRP se **energií GTP** uvolní z vazby
- na vznikající protein se v **lumen GER** naváže tzv. **Bip protein** (binding) který brání předčasně **degradaci** vznikajícího polypeptidu a spolu s dalšími proteiny posouvá **translatovaný lineární polypeptid** kanálem do GER
- v **nepřítomnosti Bip** je elongace blokována
- **vedoucí sekvence** je odštěpena **signální peptidasou** a degradována, vznikající polypeptid je ihned v **GER modifikován** (glykosylace) a **konformován**
- až po dokončení **posttranslačních úprav** prochází kanálem i C-konec proteinu a transmembránový kanál se **rozpadá**
- mutací zkrácený nebo chybně modifikovaný polypeptid je v **GER degradován**
- nově syntetizované proteiny jsou přenášeny do **GK transportními vezikulami**, k buněčné membráně **transportními a sekrečními vezikulami**
- **transmembránové proteiny**
  - funkce receptorů, transmembránových kanálů, povrchových antigenů
  - jsou **syntetizovány v GER**, zůstávají v ER
  - vlivem **jiné signální sekvence** jsou transportovány do **GK** a transportními vezikulami k **buněčné membráně**
  - jejich zabudování a ukotvení umožňuje **ukotvovací topogenní sekvence**, vytváří  $\alpha$ -helix a ukotvuje protein ve **fosfolipidové dvojvrstvě**
  - **transmembránové proteiny** tak mají 2 signální sekvence – **vedoucí a ukotvovací**
  - **vedoucí sekvence** se stává při průchodu membránou **GER** její součástí a fixuje vznikající protein v **membráně**
  - **umístění sekvencí** na polypeptidu rozhoduje o **délce** extra a intracelulární části proteinu

## 51. Regulace genové exprese u eukaryot

- **eukaryotní buňky** mají daleko složitější strukturu než buňky prokaryot
- systém membrán odděluje jádro od cytoplasmy, látková přeměna probíhá ve **funkčně specializovaných organelách** (mitochondrie, ER)
- toto rozdělení vyžaduje i **jinou regulaci** jednotlivých kroků proteosyntézy a tvorby buněčných struktur
- **regulace exprese genů** u eukaryot je podstatně komplexnější a mnohotvárnější než u prokaryot
- transkripce a translace probíhají na **jiných místech buňky** a v časové posloupnosti
- **syntéza polypeptidů** je diferencována v závislosti na tom, zda budou užívány uvnitř buňky nebo exportovány
- v mnohobuněčném organismu je exprese genů regulována zprostředkovaně **systémem signálních molekul**, jež zajišťují předávání informací mezi buňkami (a tím i informace o stavu vnějšího a vnitřního prostředí)
- pro **přenos** těchto signálů jsou buňky vybaveny specifickými membránovými a cytoplazmatickými **receptory**
- exprese lidských genů je komplexně regulována **dle potřeb buňky**, které závisejí mimo jiné na **typu a vývojovém stádiu** buňky
- po splynutí vajíčka a spermie vzniká **totipotentní zygota** – tyto buňky jsou schopny se dělit a produkovat jakékoli **diferencované buňky** organismu
- po několika děleních se začnou **specializovat**
- DNA v každé lidské buňce obsahuje **všechny geny genomu**, ale ve většině buněk je aktivní jen část v závislosti na vývojovém stádiu a tkáni a postupující diferenciaci
- buňky exprimují cca **15% svých genů**
- některé geny se exprimují ve **všech buňkách organismu** (housekeeping geny) – jejich produkty (histony, ribosomální proteiny) jsou životně důležité pro buňky

- k regulaci exprese genů dochází na několika úrovních
- na úrovni chromosomu
  - změna struktury
  - **efekt pozice** = přenos genů z euchromatinu na heterochromatin - změna funkce
  - **amplifikace** = zmnožení počtu transkribovaných chromosomů
  - **translokace** = přemístění struktur genu do regulační sféry silného promotoru
  - **inzerce promotorů** = zvýší expresi onkogenů
  - **přestavby** na úrovni DNA (delece, inzece) = sestřih
- regulace transkripce
  - **RNA-polymerasa**
    - **I:** v jadérku transkribuje prekurzor rRNA (15 proteinů)
    - **II:** transkribuje všechny pre-mRNA (14 proteinů)
    - **III:** transkribuje všechny pre-tRNA (17 proteinů)
  - **regulace transkripce cis-elementy**
    - enhancery (zesilovače) / silencery (zeslabovače)
    - **enhancer** se vytvořením kličky DNA přiblíží k promotoru, na který se naváží specifické proteiny - aktivátory
    - tato vazba **brání napojení** RNA-polymerasy na promotor
    - teprve po **změně konformace** komplexu působením signálních molekul nebo navázáním **koaktivátorů** je promotor uvolněn pro polymerasu - zahájení transkripce
  - **transkripční faktory**
    - **Znc-fingers:** proteiny, jejichž řetězce vytvářejí krátké smyčky, kde je atom  $Zn^{2+}$  vázán na 2 cysteiny a 2 histaminy - regulace transkripce 5S rRNA
    - **leucinové zipy:** spojují 2  $\alpha$ -helixy vazbami mezi molekulami leucinu
    - **HLH** (helix - loop - helix)
    - **HTH** (helix - turn - helix)
    - **homeodomény**
  - **regulace transkripce mediátory** = signální molekuly
    - **koordináční činnost:** parakrinní, autokrinní, endokrinní
- kaskádová regulace funkce genů
  - **primárně regulované geny** mohou přes svůj vlastní produkt následně regulovat i expresi dalších genů
  - celá regulační kaskáda může mít celou řadu **mezistupňů**
  - na konci regulační kaskády mohou vzniknout i takové **faktory** (produkty), které naopak utlumí aktivitu **primárně regulovaných genů**
- regulace úpravou pre-mRNA
  - po transkripci pre-mRNA a **navázání 5' čepičky** v průběhu transkripce
  - **úprava pre-mRNA:**
    - **odštěpením** 3' konce a připojení poly(A)
    - **sestřih** intronů a spojení exonů
  - **alternativní sestřih**
  - **editace mRNA** - změna struktury pre-mRNA
  - **stabilita mRNA** v cytoplazmě
  - (viz otázka regulace transkripce)
- regulace na úrovni translace
  - **syntéza proteinů** je důležitým kontrolním bodem genové exprese
  - klíčovým bodem je **výběr iniciačního kodonu** AUG - v některých genech existuje možnost alternativního výběru **startovního kodonu** v mRNA
  - důsledkem je opět možnost **vzniku různých isoform** produktu
  - translace může být rovněž regulována **prostřednictvím specifických proteinů**, které se váží na **regulační sekvence** obsažené v nepřekládaných oblastech (UTR), často 3' konec
  - **regulační sekvence UTR** mohou také regulovat transport mRNA v podobě ribonukleoproteinových částic (RNP) do určitého místa v některých typech buněk, kde potom proběhne **translace**

- poměrně nové jsou **objevy regulačních schopností** malých molekul RNA – miRNA (microRNA) a siRNA (small interfering RNA)
- **miRNA**
  - jsou to malé (22nt) jednovláknové molekuly RNA, které se mohou **párovat** se sekvencí v oblasti 3' UTR cílové mRNA a potlačovat tak **iniciaci translace**
- **siRNA**
  - molekuly siRNA **aktivují** proces RNA-interference, jehož výsledkem je **utlumení aktivity** genu
  - **RNA interference** je velmi konzervovaný mechanismus
  - jedná se o **komplexní proces**, kdy vznikají krátké dvouvláknové molekuly RNA
  - tyto molekuly se nazývají **siRNA** a mají schopnost vázat se s **korespondující sekvencí mRNA**
  - výsledkem je **degradace příslušné mRNA**
  - v důsledku toho není produkován **příslušný protein** – naděje do budoucna pro cílené tlumení exprese genů, jejichž změny jsou **příčinou onemocnění**
- **targeting**
  - genetická **determinace nasměrování proteinů**
- **epigenetické mechanismy**
  - **epigenetický mechanismus** = změny v genetické expresi, které nejsou způsobeny změnami v sekvenci DNA, ale mají **dědičný charakter**
  - mezi nejdůležitější patří **methylace DNA**
    - methylace DNA je mechanismus **tlumící transkripci**
    - zajišťována **methyltransferasami**, které methylují cytosinové zbytky (vzniká 5-methylcytosin) zejména v **dinukleotidových sekvencích CG**
    - CG se vyskytují v různých částech genomu - **CpG ostrůvky**, které jsou součástí promotorových oblastí mnoha genů, ale i v prvním exonu nebo jiných částech kódující sekvence
    - při **regulaci transkripce** hraje roli především methylace v oblasti **promotoru**
    - **methylace DNA** souvisí úzce s modifikací histonů, hlavně s rozsahem jejich **acetylace** a tím i konformace **chromatinu**
    - methylace DNA a deacetylace histonu vyústí v **silně kondenzovaný stav** chromatinu, který neumožňuje napojení RNA-polymerasy
    - v průběhu replikace DNA je methylován jen **původní řetězec DNA**
    - methyltransferasy rozeznávají přednostně **hemimethylovanou DNA** – methylují cytosiny na novém řetězci, čímž zajišťují, že **nově syntetizovaný řetězec** bude mít stejně methylované **CpG** jako řetězec původní
    - tímto způsobem se **methylační vzorek** kopíruje do dceřiných buněk
    - methylace je podstatná pro **diferenciaci, ontogenezi**, souvisí s **inaktivací X a genomickým imprintingem**
  - **inaktivace X chromosomu**
    - u savců a člověka je mužské **pohlaví determinováno** heterochromosomy XY, ženské XX
    - jeden ze dvou XX chromosomů ženy je **15.-16. den po oplození** spiralizován (lze ho pozorovat jako X chromatin) a většina jeho genů je **inaktivována**
    - tím je kompenzována **nerovnováha v počtu X chromosomů** u mužů a žen
    - **inaktivace X** je náhodná (mateřský či otcovský), ale v klonu buněk z původní buňky je stále inaktivován **stejný chromosom X**
    - ženský organismus je proto **mozaikou buněk** s inaktivovaným mateřským nebo otcovským chromosomem X
    - inaktivace X zahrnuje **methyloci CpG ostrůvků**, proces inaktivace je kontrolován **X-inaktivčním centrem** (Xic), které obsahuje několik součástí
    - jedním z nich je **gen Xist** (X-inactive specific transcript) v oblasti Xq13, který kóduje RNA transkript dlouhý 17kb
    - transkript neproniká do **cytoplazmy** a nedochází k jeho translaci

- váže se na X chromosom, ze kterého byl **transkribován** a ovlivňuje jeho **strukturu**
- jinou součástí je **Xce** (X-chromosome controlling element), který kontroluje, **který ze dvou X chromosomů** bude aktivní a který inaktivován
- poté, co je **inaktivovaný X** pokryt RNA transkriptem, dochází k jeho pozdní replikaci, k **hypoacetylaci** histonů a **hypermethylaci** DNA
- **některé geny** zůstávají v inaktivovaném X aktivní – z pseudoautosomálních míst
- **genomický imprinting**
  - klasická **mendelovská genetika** předpokládala expresi obou alel autosomálních **homologních genů** zděděných po otci i po matce
  - byla prokázána řada **výjimek**
  - v některých genových lokusech je **potlačena exprese jedné alely** – maternální nebo paternální – to vede k monoalelické expresi (**alelická exkluze**)
  - jev se nazývá **genomický imprinting** = aktivace a inaktivace alely, která závisí na **rodičovském původu** chromosomu
  - může se týkat všech tkání, kde se gen **exprimuje**, nebo jen některých (tkáňová specifita), zatímco jinde jsou vyjádřeny **obě alely**
  - **výběr alely** není náhodný, v tkáních záleží na tom, zda je potlačena nebo aktivní alela maternálního nebo paternálního původu
  - tento stav se pak přenáší do **dceřiných buněk**, kde je potlačena exprese stejné alely
  - **mechanismus imprintingu** (rozdílení maternální a paternální alely a jak je alela označena k imprintingu) není zcela objasněn, není ani jasné, v **jakém stádiu** jsou alely imprintovány
  - na udržení tohoto stavu se však podílí **alelně specifická DNA** methylace – inaktivní alely mají methylované CpG ostrůvky v promotorech
  - u člověka se imprinting týká více než **30 genů**
  - velké imprintované oblasti v chromosomu 11p15.5 a 15q12, kde jsou shluky imprintovaných genů
  - v případě, že je **ztracena aktivní alela**, dochází ke vzniku **delečních syndromů**, protože druhý alela je imprintována a tudíž **inaktivní**

## 52. Epigenetika, genetická imprinting

---

## 53. Polymorfismy nukleových kyselin

---

- obecně pojem genom představuje **kompletní genetickou informaci** (nebo sadu chromosomů) organismu
- **genomika** je obor, který zahrnuje mapování, sekvenování a analýzu funkcí genomů
- s postupujícími znalostmi lze v genomice zaznamenat **vznik podoborů** – strukturální genomika, funkční genomika (analýza transkriptomu – kompletní sada RNA vzniklá transkripcí genomu) a analýza proteomu (kompletní sada kódovaných proteinů)
- **lidský genom** se skládá z jaderného a mitochondriálního genomu

### Jaderný genom

- jaderný genom obsahuje přibližně **3 miliardy bp** a haploidní sadě chromosomů a pravděpodobně 20 – 25 tisíc genů
- každý **jednochromatidový chromosom** obsahuje jednu molekulu DNA tvořenou 55-250 miliony bp
- **geny**
  - v chromosomech **rozloženy nerovnoměrně** – např. chromosomy 22 a 19 mají vysokou hustotu, zatímco Y a 18 jsou obsazené **geny řídčeji**
  - geny jsou separovány **sekvencemi**, jež nemají kódující charakter
  - **kódující DNA** zaujímá menší část genomu (asi 3% DNA), zbytek je DNA nekódující, jejíž funkce není **zcela známa**
  - **velikost genů** je různá s ohledem na počet a velikost exonů a intronů (některé geny mají stovky bp, jiné několik stovek bp a obsahují velký počet intronů)
  - jen velmi **malá část lidského genomu** neobsahuje introny (mt geny, geny pro histony)
  - geny mohou obsahovat i **repetitivní sekvence**, hlavně v intronech nebo v sekvencích obklopujících gen, ale byly nalezeny i v **kódujících oblastech** genu (např. huntingtin)
  - některé geny, existují v mnoha **identických kopiích** nebo ve formě podobných sekvencí, jež jsou seskupeny do **genových rodin**
  - vznikly v evoluci **opakovanými genovými duplikacemi** a následnou diverzifikací **vlivem mutací**
  - **rodiny mohou být různě organizovány**
    - všechny geny rodiny ve stejném **chromosomovém lokusu** (růstový hormon na chromosomu 17)
    - geny rodiny jsou umístěny na **různých lokusech** různých chromosomů

- geny jedné rodiny mohou existovat jako **série skupin** na různých chromosomech (homeobox geny ve 4 skupinách, každá po 10 genech)
- v některých rodinách jsou všechny **geny identické** a kódují ve velkém množství **požadovaný protein** (histony, ubikvitin) X v jiných rodinách jsou geny podobné, ale ne zcela **identické**
- v některých případech tyto **neidentické geny** kódují příbuzné proteiny, ale odlišných **vlastností** ( $\alpha$  a  $\beta$  globiny jedné rodiny apod.)
- v rámci **lidského genomu** se vyskytují také **pseudogeny**
  - **defektní kopie** funkčních genů nebo jejich částí
  - často se vyskytují v rámci **genových rodin** a vyznačují se tím, že jejich sekvence neobsahuje použitelnou **genetickou informaci** (např. pseudogeny ve skupině hemoglobinových genů)
  - některé pseudogeny evolučně zřejmě vznikly **procesem tandemové genové duplikace** a mohou obsahovat exonové, intronové a promotorové oblasti, které ale kvůli mutaci **nejsou funkční**
  - vyskytují se i **zkrácené kopie** bez 5' nebo 3' konce, nebo jsou to jen fragmenty funkčních genů vzniklé **deleci nebo rekombinací**
  - existují i pseudogeny v evoluci **kopírované transpozicí** pomocí reverzní transkripce, které nemají **promotor** a neobsahují **introny**
- **mimogenová DNA**
  - **extragenovou DNA** tvoří nekódující sekvence, které nejsou součástí strukturálních genů ani jejich **regulačních oblastí** nebo vzdálených regulačních elementů
  - **extragenová DNA** tvoří 70-80% **lidského genomu** a její funkce není většinou známa
  - tvoří ji **jedinečné sekvence** nebo sekvence v malém počtu kopií
  - kromě toho však obsahuje také **značné množství různě dlouhých sekvencí DNA**, které se vyskytují v **mnoha kopiích**
  - tyto sekvence se nazývají **repetitivní** a tvoří cca 50% nekódující DNA
  - podle výskytu v genomu se dělí na **vysoce nebo středně repetitivní sekvence** a jsou uspořádány **dvěma způsoby**
  - **rozptýlené repetitivní sekvence**
    - lokalizované na **mnoha místech genomu**, neseskupují se a jsou řazeny do skupiny **středně repetitivních sekvencí**
    - velkou část rozptýlených sekvencí tvoří **mobilní sekvence – transposony**
    - ty mají schopnost se po genomu pohybovat procesem **transposice** (místně specifická rekombinace) a začleňovat se do **jiných oblastí DNA**
    - podle způsobu transposice se dělí na **2 skupiny** – retrotransposony a DNA transposony
    - **retrotransposony**
      - **kopírovány postupnými kroky**: DNA – transkripce – RNA – reverzní transkripce – dsDNA a kopie na jiném místě začleněna do genomu
      - mnoho těchto elementů má **všechny komponenty** potřebné pro transposici včetně genu, kódujícího **reverzní transkriptasu**
      - do této skupiny spadají **sekvence**, které lze podle délky repetitivní jednotky dělit na **krátké rozptýlené repetice** (SINE) a **dlouhé** (LINE) – interspersed nuclear elements, a elementy podobné retrovirům
    - **LINE**
      - 5-7 kb, autonomní – mohou kódovat **produkty nezbytné pro retrotransposici** včetně reverzní transkriptasy
      - v genomu **50 000 i více kopií**
      - **tvoří 3 rodiny** – LINE1, LINE2, LINE3
      - nejdůležitější jsou LINE1, kódující **2 proteiny**: protein vázající se na RNA a protein s endonukleázovou aktivitou, fungující i jako **reverzní transkriptasa**
      - **kopie sekvence** intergrována často do oblastí DNA bohatých na A a T
    - **SINE**
      - kratší, 100-400 bp, nekódují proteiny a mohou být **mobilizovány sousedními LINE**



- nejznámější je Alu sekvence – 250 bp v mnoha kopiích (skoro 1 milion)
- jsou rozptýlené **po celém genomu**, včetně intronů některých genů
- obsahují sekvence **rozštěpitelné enzymem** Alu a jsou v oblastech DNA bohatých na G a C
- **DNA transposony**
  - transposice se v tomto případě odehrává tak, že sekvence je **vystřižena** (nikoliv kopírována) a znovu začleněna na **jiné místo genomu** (konzervativní transposice)
- **tandemově uspořádané repetitivní sekvence**
  - tyto sekvence NDA jsou **vysoce repetitivní**, vyskytují se v blocích těsně za sebou uspořádaných repetit a podle **velikosti se dělí**
  - **satelitní DNA**
    - **opakující se jednotka** může být různě dlouhá (několik nukleotidů až 200bp) a tvoří **úseky dlouhé 100-5000 kb**
    - vyskytuje se v **oblastech heterochromatinu**, hlavně v sousedství **centromer**
    - **satelitní DNA** není transkribována
  - **minisatelitní DNA**
    - opakující se jednotka má **14-100 bp** a tvoří úseky dlouhé až 20 kb
    - vyskytuje se v **oblasti telomer**, které rovněž nejsou transkribovány
    - lidské telomery obsahují **hexanukleotidovou repetici** TTAGGG, která zaujímá 3-20 kb
  - **mikrosatelitní DNA**
    - nejčastější forma **repetitivní DNA**, většinou tvořeny méně než 10 bp (1-5), které se opakují v délce až **150 bp**
    - nalézají se na **různých místech** genomu
    - z mononukleotidových repetit se objevují často **AT**, naopak nukleotidy **G a C** jsou vzácné
    - nejčastější **dinukleotidové repetice** jsou **CA** (TG na komplementárním vlákně) – představují 0,5% genomu a počet repetit je velmi **polymorfní**
    - jejich **obecná struktura** je  $(CA)_n$ , kde n je počet repetit
    - lidský genom obsahuje nejspíš 50-100 tisíc **polymorfních bloků**  $(CA)_n$
    - význam **mikrosatelitní DNA** není znám
    - kromě **mimogenové DNA** se mohou vyskytovat i v intronech genu a jsou případy, kdy se vyskytují v **kódující oblasti genu** a jsou transkribovány
  - **variabilní počet tandemových repetit (VNTR)**
    - délka **mikrosatelitových** (i mini) DNA je v rámci populace v daném lokusu genomu **individuálně variabilní**, ale u jedince **stabilní**
    - pravděpodobným mechanismem vzniku **variabilního počtu** je **sklouzávání DNA-polymerasy** v průběhu replikace
    - vysoká **variabilita** umožňuje užití těchto sekvencí jako markerů ke **stanovení genetického profilu** jedince ve forensní genetice
    - v medicíně pak k **identifikaci nosičů** onemocnění nebo stanovení **paternity** a využívají se i k mapování lidského genomu – identifikace a lokalizace genů na **chromosomech**

### Mitochondriální genom

- **mt genom je kompaktní**, 93% sekvence DNA kóduje
- geny **nemají introny** a jsou uspořádané těsně za sebou – kódující sekvence některých genů se **překrývají**
- v oblasti **D smyčky** je uložen počátek replikace těžkého řetězce (H), který je syntetizován podle **sekvence lehkého řetězce (L)**, zatímco počátek replikace L řetězce je zpřístupněn až po syntéze 2/3 **dceřiného H řetězce**
- v oblasti smyčky je i promotor pro **transkripci obou řetězců** – ta od promotoru pokračuje v opačných směrech **podle obou vláken** – vzniká mnoho **multigenních transkriptů**

- ty jsou pak štěpeny za **vzniku zralých RNA**
- mitochondrie se **autoreprodukuje** a v průběhu mitosy se náhodně rozcházejí do **dceřinných buněk**
- při oplození nedává **spermie mitochondriální genom**, proto zygota obsahuje jen mateřské mitochondrie a jejich genom se dědí proto **maternálně**
- **sekvence mtDNA** jsou velmi dobře použitelné v evolučních studiích
- **maternální dědičnost** zajistí homoplasmii v somatických tkáních potomků a změny v mtDNA mohou sloužit ke **sledování divergence v populaci**
- tyto studie vedly k závěru, že **současná lidská populace** pochází z jedné ženy, která žila přibližně před 200 000 lety – **kontroverzní**, záleží na stabilitě mutační frekvence a velikosti **populací**

### Mutace jako příčina vzniku polymorfismů nukleových kyselin

- obecně je polymorfismus existence dvou či více **variant** (alel, sekvenčních variant, proteinů apod.), které jsou zastoupeny v populaci s **frekvencí** vyšší nebo rovnou 0.01
- jsou považovány za **nepatogenní sekvenční varianty**
- v poslední době se ale ukazuje, že **polymorfismy NK** nemusí být tak neškodné a že samotné polymorfismy nebo jejich kombinace se mohou podílet na **vzniku nemocí**
- **většina lidské DNA** je v nekódujících oblastech a proto nepodléhá selekci (s výjimkami – regulační oblasti genů apod.)
- asi proto nejsou rozdíly v **nekódujících sekvencích DNA** mezi jedinci vzácné (uvádí se i variace každých 200-400 bp)
- obvykle se jedná o **jednoduché záměny bazí**
- analýza variací v **nukleotidové sekvenci DNA** je velmi významná, neboť zjištěné varianty mohou sloužit jako **genetické markery** a mohou být využity v mnoha oblastech genetiky – mapování genomu, identifikace genů, DNA diagnostika postižené rodiny, identifikace jedince, forensní genetiky apod.
- nejvíce jsou využívány **následující polymorfismy**
  - **jednonukleotidové polymorfismy**
    - **SNP** – single nucleotide polymorphism
    - dochází k substituci **jednoho nukleotidu**, ale může dojít i k inserci nebo deleci nukleotidu (inserce/delece – indel polymorfismus)
    - většina SNP je v **nekódujících oblastech DNA**
    - SNP se často užívají jako **markery** např. při studiu náchylnosti k onemocněním nebo citlivosti k léčbě určitými **farmaky** apod.
  - **polymorfismus v délce restrikčních fragmentů**
    - některé SNP polymorfismy mají za následek **změnu restrikčního místa** (restriction site polymorphism) ve smyslu ztráty nebo naopak vzniku nového **restrikčního místa**
    - dochází tak ke změně **délky restrikčního fragmentu** – lze stanovit Southernovou metodou, kdy sonda hybridizuje s příslušnými **fragmenty DNA**
    - pak hovoříme o **polymorfismu** v délce restrikčních fragmentů – RFLP (restriction fragment length polymorphism)
    - v současnosti se kombinuje **metoda PCR**, která amplifikuje oblast s polymorfním restrikčním místem s následným použitím **příslušného restrikčního enzymu**
    - **gelová elektroforéza** pak ukáže případnou změnu v sekvenci restrikčních míst
    - dojde-li ke změně **restrikčního místa**, vznikne nám činností restrikčního enzymu např. více fragmentů, nebo naopak méně fragmentů nebo **fragmenty o jiné délce**
    - to pak vidíme na **elektroforéze**
    - sledované fragmenty lze navíc **vizualizovat hybridizací** se značenými sondami DNA 1 a 2, jež jsou zcela nebo z části komplementární k **restrikčním fragmentům DNA**
    - tím je lze odlišit od velkého množství **dalších fragmentů**, vzniklých štěpením specifickým enzymem v **celém genomu**
    - výsledky jsou závislé na **použití sondě** a jsou ukázány pro jedince, kteří mají **kombinace chromosomů AA, AB nebo BB**
    - známe-li sekvenci v okolí **hledaného polymorfismu**, použijeme kromě RFLP také PCR a tak nám nevznikají fragmenty z jiných **částí genomu**

- výsledek po elektroforéze je opět závislý na **kombinaci homologních chromosomů** (A,B)
- **polymorfismus v počtu tandemových repetic**
  - VNTR – variable number of tandem repeat polymorphism
  - tandemové repetice mohou být **zdrojem delečního/inzerčního polymorfismu**
  - v důsledku toho je počet **kopíí repetitivních** jednotek v rámci homologních chromosomů často **odlišný**
  - tento polymorfismus se nazývá VNTR a zahrnuje jak mikro tak minisatelitové sekvence
  - rozdílnou délku úseků s **minisatelitními sekvencemi** lze zjistit kterýmkoli restrikčním enzymem, který **štěpí DNA** na obou koncích tandemové repetice
  - protože ale **oblast VNTR** může obsahovat několik tisíc bp, bývá PCR obtížná
  - **fragmenty DNA** získané restrikcí jsou detekovány pomocí **Southern blot**
  - výhodou těchto polymorfismů je **vysoký počet alel**, protože délka úseku s repeticemi bývá v různých homologních chromosomech vysoce variabilní
  - k detekci délky **repetitivních úseků** je možné po štěpení vybraným enzymem využít **2 typy sond**
  - **sonda 1**
    - hybridizuje s **jedinečným úsekem DNA** mimo oblast repetic
    - na **audiogramu** se objeví jeden pruh v případě, že oblast repetic je na obou DNA **stejně dlouhá**, nebo 2 pruhy, jsou-li oblasti různě dlouhé
  - **sonda 2**
    - **hybridizuje přímo** s tandemovými repetitivními sekvencemi a protože se tyto sekvence vyskytují i na **jiných místech genomu**, detekuje sonda mnoho dlouhých fragmentů po **štěpení enzymem** (např. EcoRI)
    - odhalí tak mnoho **polymorfních lokusů** současně a proto je velmi nepravděpodobné, že 2 různí jedinci budou vykazovat **stejný komplex pruhů**
    - tento typ DNA analýzy se nazývá **fingerprinting** a využíval se k identifikaci jedinců a **stanovení příbuznosti** zejména ve forensní medicíně a při sporech o **otcovství**
    - použití **multilokusové sondy** je původní metoda, v současné době se využívají **mikrosatelitové markery** (tri nebo tetranukleotidové), které mohou být typizovány **metodou PCR**
    - použití alespoň **15 vysoce specifických markerů**, které nejsou ve vazbě, postačí k vytvoření **DNA profilu** jedince
- **využití mikrosatelitů**
  - mezi **významné polymorfismy** patří mikrosatelitní sekvence (STRs – short tandem repeats)
  - často užívané jsou zejména **repetice CA** – difference v počtu v dané místě DNA různých chromosomů jsou **vysoce polymorfní**
  - představují proto **významné markery** ve vazebných analýzách za účelem mapování genů a DNA **diagnostiky člověka**
  - základní jednotka je kratší (2-4bp) než u **minisatelitů** a celá oblast dosahuje délky, kterou lze amplifikovat **pomocí PCR**
  - **polymorfismus** pak lze zjistit jednoduše separací v gelové elektroforéze
- vznik těchto polymorfismů je možné vysvětlit různými **genetickými mechanismy**
  - **mikrosatelity**
    - nejpravděpodobnější mechanismus u **mikrosatelitů** je nepřesné párování vláken **dvojšroubovice DNA**, obsahujících repetitivní sekvence, vzniklé sklouznutím řetězce DNA (během replikace – replikační sklouznutí, slippage) nebo sklouzáváním DNA-polymerasy
    - sklouzávání je pravděpodobnější právě v **bloku repetitivních sekvencí** a způsobuje tak inzerce a delece jedné nebo několika repetic v novém řetězci
  - **inzerční/deleční polymorfismus velkých úseků tandemových repetic**

- vzniká nejčastěji jako důsledek nerovnoměrného **crossing-overu** nebo nerovnoměrné výměny **sesterských chromatid**
- v rámci **tandemových repetit** může nastat nerekipkový přenos sekvence mezi alelními i nealelními sekvencemi, tzv. **genová konverze**
- jeden pár interagujících sekvencí zůstává **nezměněn** (donor), zatímco druhý pár je **změněn** (akceptor) tak, že jeho sekvence je nahrazen sekvencí kopírovanou ze **sekvence donora**

## 54. Metody analýzy nukleových kyselin

- současné analýzy DNA jsou založeny na dvou přístupech – **množení DNA** v živých organismech nebo in vitro chemickým procesem a molekulární **hybridizace**

### Množení DNA

- množení (amplifikace) zajišťuje vytvoření **dostatečného množství** DNA k další analýze
- spočívá v selektivním namnožení **specifických fragmentů** DNA z celkové genomové DNA nebo cDNA
- cDNA (complementary DNA) vzniká **reverzní transkripcí** z RNA, izolované z cytoplazmy buněk určité tkáně
- tady se RNA vyskytuje pouze jako **zralá RNA** – po postranskripčních úpravách
- cDNA proto bude obsahovat pouze **kódující sekvence** (exony)
- **amplifikace DNA** se provádí s využitím DNA-polymerasy buď uvnitř hostitelských buněk nebo in vitro
- **množení DNA uvnitř hostitelských buněk**
  - množení (klonování) DNA uvnitř **hostitelských buněk** je historicky první technikou, která umožnila **separovat úsek DNA**, kopírovat ho a získat tak množství, které dovoluje detailní analýzu sekvence a eventuelně další **manipulaci** s ní
  - umožnilo ji objevení **enzymů restrikčních endonukleas** – štěpí genomovou dsDNA ve specifických místech a vytvářejí tak různě **dlouhé fragmenty**, které mohou být dále **analyzovány**
  - dále lze klonování využít k **izolaci genů** za účelem jejich **blíže charakterizace**
  - klonování je založeno na tvorbě **rekombinantních molekul DNA** – dochází ke spojení různých **úseků molekul DNA**, často původem z různých taxonomických druhů
  - **fragment DNA** (např. lidské, kde je analyzovaný gen) je vložen (insertován) do jiné molekuly DNA, která se **nazývá vektor**
  - **rekombinovaný vektor** je vnesen do hostitelského organismu (transformace), např. bakterie, kde se mnohokrát při přirozeném **množení bakterie** replikuje a tím kopíruje
  - v případě dělení hostitelské buňky jsou **namnožené vektory** rozděleny do dceřiných buněk a proces **kopírování pokračuje**
  - namnožený vektor lze **izolovat a purifikovat** a použít k analýze insertu
  - **restrikční enzymy**
    - restrikční endonukleasy jsou enzymy izolované z **bakterií**
    - mají schopnost štěpit **dvouvláknovou DNA** ve specifických sekvencích, obvykle dlouhých **4-8 basí**
    - tyto sekvence mají **charakter palindromu** (sekvence na obou vláknech DNA jsou stejné, čteny ve **směru 5'-3'**)
    - každý **restrikční enzym** má svoji specifickou sekvenci, kterou rozpoznává a štěpí
    - např. enzym *E. coli* **rozpoznává GAATTC**
    - DNA je obvykle **štěpena tak**, že na koncích vznikají **jednovláknové přečnívající 5' a 3' úseky**, tzv. **kohezní nebo lepivé konce** (sticky ends)
    - některé **enzymy štěpí DNA** v ose specifické sekvence a vytvářejí tzv. **tupé konce** (blunt ends) bez jednovláknových struktur
    - **restrikčních endonukleas** je dnes celá řada - využití v analýze DNA ze dvou důvodů
    - poskytují sadu **fragmentů DNA** definované délky

- délka závisí na **četnosti restrikčních míst** v genomu
- tato místa tvořená **větším počtem** nukleotidů budou v genomu vzácnější a tak budou vzniklé **fragmenty delší** a jejich počet nižší (a naopak)
- **vznik rekombinantních molekul DNA**
  - molekuly DNA, rozštěpené **stejnými restrikčními enzymy**, mohou být spojeny za účasti DNA-ligasy na základě komplementarity mezi **lepivými konci**
  - tak mohou vznikat **rekombinantní molekuly DNA**
- **klonování DNA** je omožněno mnoha systémy, které jsou založeny na použití různých typů vektorů
- **vektory**
  - **plasmidy**
    - malé **cirkulární molekuly dsDNA**, které nesou několik genů
    - vyskytují se u **bakterií** a replikují se nezávisle na hlavním chromosomu bakterií
    - jsou hlavním **typem vektorů**, které byly používány od roku 1970
    - klonování **pomocí plasmidů** se skládá z několika kroků
    - plasmid je rozštěpen **restrikčním enzymem**, která je vybrán tak, že štěpí DNA pouze v **jednom místě**
    - **cirkulární molekula** se mění na lineární s lepivými konci
    - cizí DNA (lidská) je rozštěpena **stejným enzymem** a obě DNA jsou smíchány – spojují se **komplementárními lepivými konci** s obnovuje se cirkularita plasmidu
    - **rekombinantní plasmid** je vnesen do hostitelské buňky procesem transformace
    - **transformované bakterie** jsou přeneseny na agarové plotny, kde rostou v koloniích, odvozených z **individuálních buněk** (buněčné klony), mezi nimi i bakterie obsahující **rekombinantní plasmid**
    - **individuální kolonie** jsou pak dále kultivovány a po dostatečném namnožení z nich může být **rekombinantní plasmid** purifikován a klonovaná DNA použita pro analýzu
    - v jednotlivých klonech jsou **namnožené DNA** identické – DNA klony
    - plasmidy mají vlastnosti, pro které jsou vhodné jako **vektory**
    - jsou to **malé molekuly** (kolem 3 kb), které se z bakterií snadno purifikují
    - často obsahují geny **kódující proteiny**, které způsobují rezistenci bakterií na atb (např. ampicilin a tetracyklin)
    - tato vlastnost může sloužit jako **selekční marker** pro výběr rekombinantních plasmidů
    - jestliže kolonie bakterií pěstujeme na půdě s **obsahem atb**, je možné získat bakterie, které během rekombinace **získaly plasmid** – jsou atb rezistentní
    - jedním z nejčastěji používaných plasmidů je pBR322 – 2 geny způsobující rezistenci na **ampicilin a tetracyklin**
    - v průběhu klonování je DNA vnesena do **tetracyklinového genu** (nebo ampicilinového) a **inaktivuje jej**
    - **transformované bakterie** obsahující rekombinantní plasmid mohou být identifikovány tím, že jsou **rezistentní vůči těmto atb**
    - bakterie rezistentní na obě atb sice **inkorporovaly plasmid**, ale bez insertu
  - **lambda (λ) fág**
    - lambda fág patří mezi **bakteriofágy**, které infikují bakterie
    - ten, který **infikuje E. coli**, obsahuje lineární dsDNA
    - jeho použití jako **vektoru** vyžaduje úpravu, která spočívá v **odstranění centrální části** genomu, která je podstatná pro jeho schopnost **infikovat bakterii**
    - **deletovaná oblast** je nahrazena fragmentem cizí DNA a vzniká fág s **rekombinantní molekulou DNA**
    - ten je vpraven do **fágové kapsidy** in vitro a pak do bakterie
    - na 5' koncích **DNA λ fága** jsou přechýlující sekvence 12 nukleotidů, které jsou **komplementární** – může vzniknout cirkulární dsDNA (cos sekvence – kohezivní)
    - **infikované bakterie** jsou naočkovány na agarové plotny, vytvářejí souvislou vrstvu s malými **místy projasnění** – kde došlo k lýze bakterií kvůli infekci

- vznikají tzv. **plaky** a ty mohou být individuálně izolovány a použity k infekci **dalších kultur E. coli** a tak se získá mnoho klonované DNA
- hlavní výhodou  $\lambda$  **fága** je možnost klonování mnohem větších fragmentů DNA (až 25 kb) než v **plasmidech** (do 10 kb)
- **kosmidy**
  - **kombinace** DNA plasmidu a  $\lambda$  fága
  - do plasmidu jsou **insertovány** cos sekvence
  - výhodou kosmidů je možnost **inserce velkých fragmentů**
- **umělé kvasinkové chromosomy** (YACs – yeast artificial chromosomes)
  - uměle zkonstruované **vektory** využívají jako hostitele kvasinky a jsou replikovány stejně jako **kvasinkový chromosom**
  - YAC obsahuje všechny **základní součásti chromosomu**, které jsou nutné k jeho propagaci, tj. počátek replikace, centromeru a telomery, zároveň s fragmentem cizí DNA
  - výhodou tohoto **typu vektorů** je možnost klonovat velmi dlouhé fragmenty DNA (až 2 Mb) a z toho důvodu je tento typ vektorů důležitý při konstrukcích **map částí lidského genomu**
- **bakteriální umělé chromosomy** (BACs – bacterial artificial chromosomes) a P1 chromosomy (PACs)
  - **příbuznými typy vektorů** jsou BACs vytvořené z F plasmidu E. coli, do nichž je možné vložit insert až 300 kb dlouhý
  - dále **chromosom bakteriofága P1**, jehož genom je relativně velký a lze do něj vložit insert dlouhý až 150 kb
- **DNA knihovny**
  - **klonovací metody** umožnily vytvořit tzv. **DNA knihovny** – soubor DNA klonů, ve kterých jsou obsaženy všechny sekvence DNA daného organismu
  - **genomové knihovny** pocházejí z DNA jaderných buněk, která byla rozštěpena na fragmenty **restrikčními enzymy**
  - **cDNA knihovny** vznikají za použití celkové RNA, která je reverzní transkripcí převedena do komplementární DNA (cDNA) a ta je pak klonována stejnou cestou jako při tvorbě **genomové knihovny**
  - taková knihovna obsahuje soubory **odlišných klonů DNA**, které reprezentují aktivní geny v buňkách tkání
  - proto **cDNA knihovna** vyrobená např. z buněk jater bude obsahovat jiné klony než cDNA knihovna původem např. z **plicní tkáně**
  - **výhoda cDNA knihoven** je v tom, že klony neobsahují introny
  - **expresní knihovny** jsou typem cDNA knihovny, kdy klonované sekvence jsou v hostitelské buňce translatovány – to umožňuje stanovené proteinů kódovaných klonovanou sekvencí (např. pomocí protilátek)
- **využití klonování DNA**
  - **identifikace genů** v době před objevení PCR
    - použití metody vedlo k **identifikaci genů**, jež jsou defektní a vedou k dědičným onemocněním - např. **muskulární dystrofie** a **cystická fibrosa**
  - **mapování genomu**
    - vývoj vektorů byl v 90. letech podstatný pro projekt mapování lidského genomu
  - **rekombinantní proteiny**
    - klonování DNA je základní technika využívaná **biotechnologiemi** k produkci medicínsky **významných proteinů** jako je **inzulin** nebo **růstový hormon** a další
  - **geneticky modifikované organismy (GMO)**
    - klonování DNA je důležitou součástí technik používaných k přenosu genů mezi organismy a tím vytváření tzv. **transgenních rostlin a živočichů**
- **množení (amplifikace) DNA in vitro – polymerasová řetězová reakce (PCR)**
  - široce používaná metoda, umožňující **kopírovat** a tím amplifikovat specifické úseky DNA
  - vytvoření **dostatečného množství DNA** je předpokladem pro detailní analýzu genů nebo jiných sekvencí v daném úseku nebo **manipulaci** s nimi

- k úspěšné reakci je třeba zajistit několik **složek**
  - **templátová DNA**
    - obvykle směs mnoha různých sekvencí DNA obsažených v **genomové DNA**
    - mezi nimi se nachází sekvence, která má být **amplifikována**
    - k reakci lze použít i **RNA**, ale nejdříve musí být vytvořena komplementární **cDNA** pomocí reverzní transkriptasy a ta je pak namnožena PCR
  - **pár oligonukleotidových primerů**
    - **oligonukleotidové primery** jsou krátké jednovláknové molekuly DNA (ssDNA – single strand DNA) dlouhé přibližně 20 nukleotidů, které vymezují **amplifikovaný úsek**
    - sekvence primerů jsou vybrány tak, aby byly **komplementární k úsekům protilehlých vláken DNA** a v důsledku toho se vážaly na opačné úseky sekvence DNA, která bude **amplifikována**
  - **DNA-polymerasa**
    - používá se celá řada **DNA-polymeras**
    - všechny jsou **termostabilní**, tudíž snášejí vysoké teploty (do 100°C) aniž jsou inaktivovány
    - nejčastěji se používá enzym **Taq DNA-polymerasa**, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, jež žije v **horkých vřídlech**
    - enzym se váže na **oddělená vlákna DNA** a syntetizuje nový řetězec komplementární k **původnímu řetězci**
    - **poloha primerů** určuje cílovou sekvenci, která je kopírována
  - **deoxynukleotidtrifosfáty (dNTPs)**
    - směs **čtyř stavebních jednotek**, které korespondují se čtyřmi bazemi a jsou substrátem pro **DNA-polymerasu** (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) pro úseky DNA vznikající **amplifikací**
- **amplifikace cílové sekvence** je umožněna opakovanými cykly syntézy DNA
- každý cyklus se skládá ze **tří kroků** – denaturace, připojení primerů a elongace
- **denaturace DNA**
  - působením **vysoké teploty** (více než 90°C) se ruší vodíkové vazby
  - **dvoušroubovice DNA** se destabilizuje a rozvolňuje na jednovláknové molekuly, které v reakci slouží jako **templáty**
- **připojení primerů**
  - následuje připojení primerů na **komplementární sekvence 3' konců** obou vláken DNA za snížení teploty na **optimální hodnotu**
  - použitá teplota závisí na sekvenci a **počtu bazí v primeru** a je obvykle 50-70°C
- **elongace**
  - DNA-polymerasa zahajuje svou **činnost na úseku DNA** daném pozicí primerů a syntetizuje nový řetězec **cílové sekvence** (za teploty, kdy je nejvíce aktivní – Taq-polymerasa 72°C)
  - **cyklus denaturace, připojení primerů a elongace** se mnohokrát opakuje (20-40x)
  - **nově syntetizované řetězce** slouží jako templáty pro další syntézu DNA a výsledkem je **exponenciální navýšení** množství specifického úseku DNA, které je více než milionkrát větší než na **počátku**
  - celý proces se odehrává v přístroji zvaném **termocykler**, v němž je možno automaticky dosahovat **zvolených teplot** velmi rychle a přesně pro jednotlivé kroky
- **PCR** je v současné době jednou ze základních technik moderní molekulární genetiky a je široce využívána v mnoha **odvětvích biologie a medicíny**

### Hybridizace nukleových kyselin

- proces vyžaduje nejprve **denuraci dvoušroubovice DNA**, kdy jsou působením vysoké teploty rozrušeny vodíkové můstky, což vede k **separaci obou vláken DNA**
- následně **snížení teploty** má za následek obnovení původního helixu – renaturace DNA
- **hybridizace** může nastat mezi dvěma vlákny DNA, mezi DNA a RNA nebo mezi dvěma vlákny RNA
- hybridizace může nastat i mezi **vláknky různého původu**, pokud jsou komplementární

- tato **vlastnost nukleových kyselin** se využívá při řadě analytických technik, kdy je ve směsi sekvencí DNA nebo RNA vyhledávána **specifická sekvence** pomocí komplementární sekvence nukleové kyseliny (sonda)
- **sondy**
  - **sonda** (probe) je molekula DNA nebo RNA, která může být na základě hybridizace využita k detekci **komplementární sekvence** nukleové kyseliny
  - jako sondy mohou být **využity**
    - **klonované sekvence DNA**, sekvence **získané PCR**, syntetické **oligonukleotidy**
    - RNA získání transkripcí **klonované DNA** in vitro
  - sondy musí být použity v **jednovláknové podobě** a označené tak, aby bylo možné zviditelnit **hybridizační reakci**
  - sondy byly nejčastěji značeny **radioaktivními izotopy** (P32, S35, C14, H3) a hybridizace pak bylo detekována **autoradiograficky**
  - posléze byly vyvinuty **neradioaktivní systémy** značení sond, spočívající např. v inkorporaci **modifikovaného nukleotidu**, který obsahuje fluorofor – chemická skupina, jež po expozici světlu **fluoreskuje** apod.
  - příkladem je systém **biotin-streptavidin**
  - **southern blotting**
    - první **analytická technika** založená na hybridizaci nukleových kyselin a je pojmenována podle **objevitele** (Ed Southern)
    - prvním krokem je **izolace a purifikace DNA** z buněk v podobě velkých fragmentů (20000 bp a více)
    - následuje **štěpení DNA** restrikním enzymem za vzniku tisíců fragmentů a různé velikosti (několik bazí až několik tisíc bazí)
    - dalším krokem je **elektroforéza v agarosovém gelu**, kdy se fragmenty rozdělí podle velikosti
    - vzhledem k velkému množství **fragmentů** není možné v tomto stádiu na gelu jednotlivé **fragmenty rozlišit** (vytvářejí smear – šmouhu)
    - gel je ponořen do **alkalického roztoku**, jenž způsobuje **denaturaci DNA**
    - **denaturované fragmenty** DNA jsou pak přeneseny z gelu na membránu (nylon nebo nitrocelulosa) – tento přenos se nazývá **blotting** (přesátí)
    - membrána s přenesenými fragmenty je vystavena teplotě **80°C** a fragmenty se fixují
    - pak může nastat **vlastní hybridizace** – inkubace membrány se značenou sondou
    - po inkubaci je membrána umístěna na **rtg film** (pokud je sonda radioaktivní), který je po několika hodinách expozice **vyvolán**
    - v místech, kde nastala **hybridizace** se objeví tmavé pruhy (bandy), jejichž velikost může být odhadnuta z jejich pozice ve **srovnání s fragmenty DNA** sloužícími jako **marker** (jejich velikost je známa)
  - **northern blotting**
    - technika je podobná předešlé, ale **analyzovanou kyselinou je RNA** (zejména mRNA)
    - metoda umožňuje zjistit, jaké **geny jsou aktivní** v tkáni, z níž byla RNA izolována
  - **technologie mikročipů** (DNA chip, DNA array, DNA mikroarray, genome chip)
    - se zvyšujícím se množstvím **identifikovaných genů** v rámci projektu analýzy lidského genomu vyvstala potřeba mnohem více **sofistikovaných metod** analýzy
    - **vývoj technologie DNA mikročipů** umožnil mnohem rychlejší a přesnější analýzu na základě hybridizace, neboť v rámci **jednoho experimentu** je možné vyšetřit několik tisíc míst v **genomu najednou**
    - obrovský význam v **analýze genové exprese**, při identifikaci genotypů a ve **screeningu**
    - **DNA mikročip** je destička, obvykle skleněná, na kterou jsou připojeny tisíce různých známých **oligonukleotidových sekvencí DNA** ve stanoveném pořadí
    - tyto molekuly slouží jako sondy k **hybridizaci s testovanými vzorky DNA** nebo RNA
    - pokud dojde k hybridizaci, lze **hybridní molekuly detekovat** a získat informaci o tom, které sekvence DNA (RNA) jsou ve **vzorcích přítomné**
    - vlastní čip je oblast menší než **1,5 cm<sup>2</sup>**, která obsahuje až milion jamek, v nichž jsou specifické **molekuly DNA zakotvené**



- použité molekuly DNA mohou být velké **podle účelu** a jsou krátké oligomery, velké PCR produkty, cDNA molekuly nebo **klonované inserty**
- **testované vzorky** nukleových kyselin jsou většinou značeny fluorescenčně
- vzhledem k **vysoké hustotě jamek** a navázaných sond je identifikace jamek, kde došlo k hybridizaci, prováděna **čtecím zařízením** a vyhodnocena počítačem (fluorescenční signál zjišťován fluorescenčním mikroskopem)
- **využití technologie mikročipů**
  - **analýza genové exprese**
    - jako sondy slouží **produkty z PCR** amplifikované ze známých genů nebo cDNA molekuly odvozené ze **známých mRNA**
    - z testované tkáně **izolována mRNA** a označena fluorescenčním markerem
    - po hybridizaci jsou **na základě fluorescenčního signálu** rozpoznány všechny geny exprimované v **dané tkáni**
    - tento přístup je využíván pro **srovnávání exprese genů** ve tkáních nebo buňkách v **různých situacích** (např. normálních a nádorových buňkách nebo srovnání v buňkách hormonálně ovlivněných nebo neovlivněných, transfektovaných a netransfektovaných apod.)
    - **fluorescenční značení** umožňují i kvantifikaci hladiny exprese různých genů – silně svítící sondy jsou geny s vysokým **počtem transkriptů** a naopak
  - **analýza genomu**
    - **technologie DNA mikročipů** může být adaptována na detekci polymorfismu v jednom nukleotidu (SNP – single nucleotide polymorphism)
    - tento **typ polymorfismu** vzniká v důsledku mutace, která zamění jeden nukleotid v sekvenci DNA za druhý a je to polymorfismus velmi důležitý pro mapování genů
    - pro jeho detekci jsou užívány **krátké sondy**, obsahující sekvenci 25 nukleotidů
    - nukleotid, jehož polymorfismus je testován je umístěn blízko **centra oligomeru** a na okolních místech jsou série **4 oligomerů**, každý s jiným nukleotidem v testované **pozici**
    - **pátý oligomer** má delecii testovaného nukleotidu
    - testovaný vzorek DNA daného jedince je **hybridizován** a určen jeho genotyp – zda je aa/AA nebo Aa pro daný **polymorfismus**
    - na jednom čipu lze testovat **statisíce různých SNP**
  - **genetické testování**
    - DNA mikročipy mohou být využity ke **genetickým testům**, které mají potvrdit diagnosu dědičného onemocnění (detekce mutace) nebo identifikovat **nosiče mutace**
    - systém může identifikovat **mutace v genech** podobně jako SNP a je významný v případech, kdy se může vyskytovat velké množství **různých mutací** a je proto nutné vyšetřovat **celý gen**
- existuje řada dalších metod k analýze **variací v sekvenci DNA** založených na popsanych principech **klonování DNA** a hybridizaci nukleových kyselin
- základní metodou analýz DNA je **sekvenace DNA**
- **sekvenace DNA**
  - za účelem sekvenace – **určení pořadí nukleotidů v DNA** – byly vyvinuty 2 metody
    - **Sangerova metoda** (dideoxy chain termination method)
    - **Maxam-Gilbertova metoda** (chemické degradace)
  - nejčastěji se používá **metoda první**
  - **Sangerova metoda**
    - základem je použití **směsi standardních a modifikovaných nukleotidtrifosfátů** (dNTPs) při přípravě úseku DNA, který bude sekvenován
    - **modifikovaný dNTP** má za následek ukončení syntézy DNA
    - výsledkem **syntézy DNA** je pak série různě dlouhých molekul DNA, které se v délce liší vždy o **jeden nukleotid**
    - celý proces probíhá ve **4 separátních enzymových reakcích** a každá obsahuje **templátovou DNA** (úsek, jenž se sekvenuje) v jednovláknové podobě, DNA-polymerasu, primer, 4 dNTPs a modifikovaný nukleotid – dideoxynukleotidtrifosfát (ddNTP)

- ddNTPs se od dNTPs liší absencí volné **hydroxylové skupiny** na 3' uhlíku – jejich inkorporace do **rostoucího řetězce DNA** neumožní tvorbu vazby s dalším nukleotidem – **syntéza je ukončena**
- každá ze **4 sekvenačních reakcí** obsahuje jiný ddNTP
- DNA-polymerasa může náhodně **zařazovat do rostoucího řetězce** dNTP nebo ddNTP
- v každé ze 4 reakcí je pak série molekul DNA různé délky, které jsou **ukončeny použitým ddNTP**
- např. v sekvenační reakci obsahující ddATP je syntetizována série molekul DNA zakončená nukleotidem A, jenž koresponduje s T v templátu
- poté jsou molekuly DNA **separovány elektroforeticky** v genu ve 4 sousedních liniích
- jestliže je do sekvenační reakce přidán dNTP, označený **radioaktivně** (fosfor nebo síra) je vzniklá DNA radioaktivní a je možné ji detekovat na **rtg filmu** (autoradiografie) v podobě viditelných pruhů **všech 4 linií**
- sekvence **templátové DNA** je pak ve všech liniích odečtena od nejmenších pruhů k **největším**
- proces je **zautomatizován** – sekvenátory propojené s počítačem
- využívá se hlavně **fluorescenční značení ddNTPs**, kdy každý je značen jinou barvou
- místo gelové elektroforézy je použita **kapilární** – produkty procházejí kapilárou, kde se dělí **podle velikosti**
- jejich pořadí je registrováno **čtecím zařízením** a výsledkem jsou 4 barevné vrcholy (peaky), jejich pořadí odpovídá sekvenci nukleotidů v testovaném úseku DNA
- **sekvenace DNA** je jednou ze základních a široce využívaných technik molekulární genetiky
- velké množství **sekvencí DNA** do dnešní doby známých je organizováno do série **databází** – EMBL (Europe molecular biology laboratory) a Genbank (USA)
- tyto banky obsahují sekvence lidských genů a genů **dalších druhů**

## 55. Rekombinantní DNA a genetické inženýrství

- **charakteristika rekombinantní DNA**
  - uměle syntetizovaná DNA, která vzniká **inzerací genu** nebo určité části genu jednoho organismu do genomu jiného
  - **rc-DNA** molekuly obsahují úseky DNA **rozdílných organismů**
  - vytvářejí se insercí **cizorodé DNA** do vektoru (= bakteriální plazmid nebo fág)
  - fágy = bakteriální <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Viry> viry, které mohou **infikovat bakterii**, rozmnožovat se v ní a zapříčinit **lýzu bakteriálních buněk** – při tom se do prostředí uvolní potomstvo fága, které může infikovat okolí
- **tvorba plazmidů**
  - **plazmid** [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Escherichia\\_coli](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Escherichia_coli) E. coli (tzv. pBR322, měří 4362 bp) má více restrikčních míst, na kterých se dá kruh DNA otevřít specifickými **restrikčními endonukleasami**
  - to umožňuje, aby se **úsek cizorodé DNA**, rozštěpené tím stejným <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Enzym> enzymem, včlenil do **plazmidu** = rekombinoval, a vytvořil tak rekombinovaný plazmid
  - **rekombinované plazmidy** se znovu vloží do bakterií, které se pak nechají namnožit, pod **selekčním tlakem**
  - tak je možné **vytvořit klony bakterií**, které nesou specificky restrikční fragment **cizorodé DNA**
- **tvorba rekombinantní DNA**
  - příprava **rekombinantní DNA** začíná pokusem vložit množství víceméně náhodných **restrikčních fragmentů** do plazmidu, proto je zvlášť rozhodující rozpoznat konkrétní gen, což je možné tehdy, kdy je dostupná **příslušná mRNA**

- ta se **purifikuje** a použije se na přípravu cDNA pomocí reversní transkriptasy - výsledkem je **radionuklidem značená molekula cDNA** = tzv. **sonda** („probe“)
- za osobitých podmínek se **hybridizuje s genem**, o který nám jde

## 56. Genové mutace, typy a manifestace

---

- sekvence DNA podléhá **změnám**, které jsou vyvolány působením chemických, fyzikálních a biologických **činitelů** nebo vznikají jako vzácné chyby při replikaci (endogenní mutace)
- v důsledku toho vznikají **alelické variace**
- některé varianty DNA se nemusí ve **fenotypu projevit**, jiné se mohou projevit jen v závislosti na místě, kde se **DNA nachází**
- v některých případech je **obtížné rozhodnout**, zda je sekvenční variace patogenní či nikoliv
- **mutace lze klasifikovat dle velikosti**
  - **malé** mutace postihující jeden nebo několik málo nukleotidů v sekvenci DNA
  - **rozsáhlé** mutace včetně mutací chromosomálních a genomových (polyploidisace)
- **podle typu postižených buněk se dělí na**
  - **somatické mutace**: postihují potomstvo mutované buňky, nikoli jedince potomky
  - **zárodečné mutace**: postihují zárodečné buňky a mohou se přenést z rodičů na potomky
- **jiným kritériem je mechanismus vzniku**
  - **spontánní mutace**: není znám vyvolávající faktor
  - **indukované mutace**: navozené známými mutagenními faktory
- rozdělení genových mutací z hlediska **změn v sekvenci DNA**

- **substituce**: záměna jednoho nukleotidu za nukleotid nesoucí jinou bázi, nejčastější mutace, jedná se o **transici** (purin-purin, pyrimidin-pyrimidin) nebo **transversi** (purin-pyrimidin a naopak)
- **delece**: ztráta jednoho nebo více nukleotidů v sekvenci DNA
- **inserce**: do sekvence DNA je zařazen jeden nebo více nukleotidů
- rozdělení genových mutací z hlediska **účinku na genový produkt**
  - mutacím mohou podléhat **kódující i nekódující sekvence** lidského genomu
  - vážné následky mají ale hlavně **mutace kódující DNA**
  - ty se dělí podle efektu na **synonymní a nesynonymní**
    - **synonymní**: tiché mutace, nemění sekvenci genového produktu
    - **nesynonymní**: mění sekvenci produktu (proteinu či RNA) s různými důsledky
  - substituce lze z tohoto hlediska rozdělit na **tiché, missense, nonsense**
    - **tiché substituce**
      - následkem je vznik **nového kodonu**, který ale kóduje tutéž amk jako **kodon předešlý** (samesense mutace)
      - mutace se většinou vyskytují na **třetí pozici kodonu** (degenerace genetického kódu) a jsou známé jako **polymorfismy DNA**, jež přispívají k **variabilitě jedince**
      - v některých případech ale tyto mutace mohou ovlivnit **sestřih RNA** – aktivace **kryptického sestřihového místa**, postižení signálních sekvencí sestřihových míst nebo **nukleotidů** v sekvenci sousedící s konzervovanými **signálními sekvencemi**
      - pak mohou měnit **fenotyp** jedince
    - **missense mutace**
      - mění kodon s důsledkem **záměny amk v proteinu**
      - postihují většinou **první dvě báze** v kodonu
      - důsledek pro organismus závisí na tom, jaké místo v **proteinu** je zasaženo – někdy jsou změny v proteinu **tolerovány** a nemají vliv na jeho funkci
      - změny v částech **funkčně a strukturně důležitých** vedou k tvorbě mutantního, nefungujícího nebo špatně **fungujícího proteinu**
      - **missense** se dělí na mutace **konzervativní** (záměna za chemicky podobnou amk) a **nekonzervativní** (odlišná amk, vliv na vlastnosti proteinu)
    - **nonsense mutace**
      - mění **kodon** pro určitou amk na **terminační kodon**
      - zásadním způsobem ovlivňují **fenotyp**, protože způsobují předčasné ukončení translace a vznik **zkráceného**, většinou nefunkčního, proteinu
  - **posunové (frameshift) mutace**
    - vznikají delecí nebo insercí jednoho nebo **více nukleotidů** v sekvenci DNA genu
    - dojde k **posunu čtení informace** (čtecího rámce) a na ribosomu se překládá odlišná sada tripletů
    - v důsledku toho často vzniká **předčasný STOP kodon** a vzniká změněný, zkrácený protein – **mutantní fenotyp**
    - odlišný efekt má ztráta nebo vložení **3 nukleotidů** nebo násobku trojice nukleotidů – dojde ke ztrátě nebo přidání amk a **fenotypový projev** je podobný **substituci**
  - mutace se závažnými důsledky se mohou vyskytnout i v **nekódujících sekvencích genu**
    - mohou postihnout **regulační oblast** genu a ovlivnit jeho expresi
    - mutace v promotoru, postihující **signální sekvence**, může snížit afinitu RNA-polymerasy a redukovat **produkci mRNA**
    - podobný efekt mohou mít i **mutace genů pro RF a enhancery**
  - mutace se mohou uplatnit i v **intragenových nekódujících sekvencích**
    - zejména, jestliže postihují **hranice exon-intron**
    - jedná se o **sestřihové mutace** (splice site mutations), které postihují signální sekvenci GT na 5' konci (donor site) nebo signální sekvenci AG (acceptor site) na 3' konci nebo sekvence v blízkosti těchto oblastí – **aberantní sestřih**

- důsledkem je **retence intronu** nebo jeho části či **vystřížení exonu** nebo jeho části (intronisace exonu) v mRNA – systém užívá aberantní či **kryptické sestřihové místo**
- **dynamické mutace**
  - u člověka popsán tento **specifický typ** mutací
  - některé krátké **repetitivní sekvence**, zejména trinukleotidové (CAG, CTG, CGG, GAA) jsou uloženy v genu nebo jeho **sousedství** a mohou tak expandovat do **značné délky** a ovlivnit tak expresi genu
  - **expanze** (amplifikace) se odehrává při přenosu alely z rodičů na potomky dosud ne zcela známým **mechanismem**
  - existuje určitá **prahová délka** trinukleotidové sekvence, která je v průběhu mitosy a meiosis stabilní
  - při překročení tohoto prahu se stávají **repetitivní sekvence** vysoce nestabilními a v průběhu přenosu na **potomka expandují**
  - tyto změny v počtu repetitivních sekvencí se mohou **kumulovat** postupně v průběhu generací
  - nejprve **vzniká premutace**, z níž se po další expanzi stává plná mutace – může být příčinou **onemocnění**
  - **povaha mechanismu** expanze stále není zcela jasná, ale nejspíš je součástí tohoto procesu sklouzávání **DNA-polymerasy** v oblasti repetitivního úseku v průběhu **replikace DNA**
- **mutace jako příčina onemocnění**
  - nové mutace se mohou vyskytnout v **somatických i zárodečných buňkách** (germline) a poškodit svého nositele
  - **zárodečná mutace** se s určitou pravděpodobností může přenést do další generace – může způsobit **dědičné onemocnění** (není-li letální před obdobím reprodukce nebo nepoškozuje plodnost)
  - **somatická mutace** se nepřenáší a může vzniknout v kterékoli buňce, kdy za normálních okolností 1 mutovaná buňka organismus **nepoškodí** (buňky jsou stále obměňovány)
  - jsou ale situace, kdy mutace v **genech regulujících** např. buněčný cyklus mohou vést k nebezpečnému nádorovému bujení a ohrozit **život jedince**
  - mutovaný gen může mít za **následek**
    - **ztrátu funkce produktu**
    - **redukci funkce**
    - **abnormální funkci proteinu**
    - **aktivaci či posílení funkce produktu genu** (gain of function)
  - **ztráta funkce** (loss of function)
    - znamená **redukci funkce** produktu nebo výsledný protein vůbec nefunguje – takové mutace mají za následek většinou **fenotyp**, která se jeví jako **recesivně dědičný**
    - v **heterozygotním stavu** nemusí být snížené množství produktu zásadní a nemusí se projevit ve **fenotypu**
    - pro některé geny to však neplatí a **50% snížení hladiny**, haploinsuficience, způsobuje **abnormální fenotyp**
  - některé proteiny fungují jako **dimery nebo multimery** – mutantní protein u heterozygota tak může bránit **funkce celkového produktu** a hovoří se o **dominantně negativním efektu** mutace
  - závažný dopad na **genový produkt** ve smyslu ztráty funkce mají frameshift mutace, nonsense mutace a sestřihové mutace
    - **missense** mohou a nemusí být patogenní – záleží na místě a podobě mutace
    - v jiném případě **produkt mutovaného genu** funkci získává buď ve smyslu jeho zvýšeného množství nebo ve smyslu získání nové aktivity nebo nového produktu
    - často se to týká **kontrolních nebo signálních systémů**
    - tyto mutace **podmiňují fenotyp**, který se jeví jako dominantně dědičný
  - v řadě případů nelze mutace **přesně zařadit**
- **mutace v mitochondriálním genomu**

- mt genom je sice mnohem **menší než jaderný**, ale v každé somatické buňce jsou tisíce kopií mitochondriálních genů, zvláště v těch buňkách, které mají **vysoké energetické nároky** (mozkové či svalové buňky)
- **molekuly mtDNA** jsou u normálního jedince z 99,9% identické – **homoplasmie**
- frekvence mutací v mt genomu je ale dosti vysoká a jestliže se **nová mutace rozšíří** v populaci mtDNA, jsou výsledkem dva mt genotypy (eventuálně více) – **heteroplasmie**
- **frekvence mutací**
  - frekvence je zhruba stejná v **kódující a nekódující sekvenci** DNA – při průměrné délce genu 1,65 kb je frekvence spontánních mutací v genech  $1,65 \cdot 10^{-6} - 10^{-8}$  na gen a jedno buněčné dělení
  - **škodlivé mutace** se ve fenotypu projevují jen jsou-li v kódujících nebo regulačních **sekvencích DNA** (onemocnění nebo letalita)
  - v důsledku přirozené selekce tohoto typu mutací je proto jejich **populační frekvence** nižší než u mutací **nekódujících oblastí**
  - kódující a regulační oblasti proto vykazují poměrně **velký stupeň evoluční konzervace**
  - na úrovni genů je míra výskytu mutací **variabilní** –  $10^{-4} - 10^{-7}$  na lokus a dělení – to má několik **důvodů**
    - velikost genů je **velmi rozdílná**
    - určité nukleotidové sekvence jsou **náchylnější k mutacím** – mutation hot spots (dinukleotidové sekvence CG, v 80% methylovány – methylovaný C snadno ztrácí aminoskupinu a konvertuje na T)
- **detekce frekvence mutací**
  - frekvence se sleduje ve **formální genetice**
  - u člověk jsou mutace definovány jako **změna genetické informace** při přenosu z generace na generaci
  - v oplodněné **zygotě** můžeme najít mutace ve vajíčku i ve spermii
  - **přímá detekce mutací** v rodokmenu nebo hybridizačním pokusu je možná v případech, kdy se mutace projeví ve **fenotypu jedince**, jehož rodiče a příbuzní jsou nepostížení (sporadický výskyt znaku)
  - **podstata hodnocení frekvence mutací** je

$$\mu = \frac{\text{počet sporadických postižení určitou odchylkou fenotypu}}{2 \times \text{počet všech vyšetřených jedinců}}$$

- **vlastní realizace** metody je složitější
  - z hodnocení **přímou metodou** jsou vyloučeny recesivní mutace, které jsou **nejčastější**
  - nové **autosomálně recesivní mutace** jsou skryty v genotypu heterozygotů (jedinci Aa nejsou postiženi, ačkoli nesou postiženou alelu)
  - přímo mohou být hodnoceny jen **dominantní mutace** a dominantní i recesivní mutace vázané na **X chromosom**
  - tady mohou být **sporadická onemocnění** identifikována jako nové mutace při dodržení **určitých podmínek**
    - **vyločení nonpaternity**
    - nejedná-li se o **genetickou heterogenitu** znaku nebo nevzniká-li znak jako **fenokopie** vlivem prostředí
    - vyloučení **mikroformy znaku u rodičů** (neúplné expresivity)
    - vyloučení neúplné **penetrance znaku**
- touto metodou nelze zjistit mutace, které jsou **letální** již v průběhu **embryogeneze**
- **metody nepřímé detekce**
  - vycházejí z poznatků **populační genetiky** a z hodnocení selekčně mutační **rovnováhy v populaci**
  - umožňují hodnocení frekvence i **recesivních mutací**
  - v současnosti ale vlivy civilizace a vývoj medicíny významně ovlivňují **selekční mechanismy** a prakticky znemožňují získat poznatky touto **metodou**
- **nejpodrobnější poznatky** o mutacích získáváme metodami **molekulární genetiky**

- přímá detekce mutací a sekvenční analýza umožňují **studium mutací genů** na úrovni DNA a i v oblastech DNA, které se ve fenotypu většinou **neprojevují** (introny a další nekódující úseky chromosomu)
- **metody molekulární genetiky** poskytly významné informace o molekulární podstatě mutací, o korelaci mutací a fenotypu (závažnosti chorob) a o kvalitě **genofondu populací**
- **přinesly i poznatky** o evoluci, genovém driftu a toku
- údaje různých autorů se ale **neshodují** – ovlivnitelné metodikou šetření
- **frekvence nových mutací** genu nevypovídá o podílu nových mutací v etiologii postižení pacientů s **určitou diagnózou**, protože zastoupení nových mutací v souboru pacientů závisí také na selekci a tím **pravděpodobnosti přenosu** do dalších generací
- pokud jsou **mutace letální či semiletální**, je jimi podmíněný znak (choroba) vzácnější, ale podíl nových mutací je **významnější**
- **příklady procent nových mutací**: Apertův syndrom 95%, achondroplasie 80%, neurofibromatosa 40%, Huntingtonova chorea 1% a polycystická choroba ledvin 1%
- **riziko opakování mutací u sourozenců**
  - u gametických mutací předpokládáme **vznik mutace** v gametě a pak ostatní gamety mohou být postiženy mutací s **pravděpodobností odpovídající populačnímu riziku**
  - **empirické riziko** postižení sourozenců je však vyšší – studie uvádějí empirické riziko pro většinu dominantních mutací 1%, u některých znaků i více
  - je to proto, že v **ontogenezi člověka** buňky zárodečné linie prodělají více než jedno dělení a u plodů **ženského pohlaví** se zárodečné buňky dělí nejméně 20x mitoticky než vstoupí do **meiosy**
  - u mužů je počet **dělení podstatně vyšší**
  - pokud mutace postihne **některou z dělicích se linií** ve vývoji jedince, vzniká mozaika a mutací jsou postiženy buňky **celého segmentu ovaria či testes**
  - proto je **pravděpodobnost postižení sourozenců** osob s de novo vzniklou mutací genu vyšší, než by odpovídalo **náhodě** (podobně je tomu i u de novo vzniklé trisomie)
- **vliv věku rodičů na frekvenci mutací**
  - pravděpodobnost vzniku **aneuploidií** v důsledku nondisjunkce u žen s věkem stoupá, u mužů je závislost **sporná**
  - u genových mutací je souvislost **prokazatelná naopak u mužů** – rozdíl v počtu dělení buněk zárodečné linie a v době **prvního zracího dělení**
    - u žen **před meiosou 20-22** dělení a pak je vývoj pozastaven do puberty
    - vzniknou-li mutace, mají **reparační mechanismy** dost času je opravit
    - naopak se ale **poškozuje mechanismus** distribuce chromosomů při meiose
    - u mužů se odhaduje do puberty **30 dělení** a pak každý **rok 23 dalších** – ve věku 28 let je u muže **dělení 335**
    - na opravy je **méně času**
  - empiricky prokazatelné **zvýšení rizika mutací** s věkem otce – po 40 roku je výskyt mutací 5x vyšší než třeba ve 20-25 letech
  - otcové děti, **postižených novými dominantními mutacemi** (achondroplasie apod.) jsou významně starší než je věkový průměr otců v populaci

## 57. Mutageny a mutageneze, testování mutagenních účinků

---

- mutace mohou vznikat **spontánně** vlivem **exogenních** i **endogenních** faktorů
- za normálních podmínek je nejvíce **mutací endogenních** – chyby v replikaci, transkripci a opravných procesech
  - **přesnost replikace** DNA je dána specifitou vazby **komplementární bazí**
  - specifitu zařazení bazí zajišťuje i komplex **DNA-dependentních-DNA-polymeras**, ale při velké rychlosti replikace může dojít k zařazení **chybných bazí** (frekvence  $10^{-7}$ )
  - většinu těchto chyb ale reparační mechanismy najdou a **opraví**
  - další nepřesnost při replikaci vzniká **chemickou podstatou** vazeb DNA a strukturou bazí – atomy vodíku se mohou přesouvat mezi atomy bazí – **tautomerní posuny** (vzácné, ale podílejí se na chybném řazení bazí)
  - další možností je **sklouzávání** DNA-polymerasy (tvorba kliček a zkrácení úseku tandemových **repetitivních sekvencí** nebo naopak expanze o nadpočetné sekvence ve smyčce **nového řetězce**)
  - jev je tím častější, čím jsou **repetitivní sekvence** delší
- **vliv mutagenů**
  - jedná se o faktory schopné **vyvolat mutaci** a dělí se na 3 základní skupiny
  - **chemické mutageny**
    - velké množství **sloučenin**, i některé, jež se v minulosti standardně dávaly do potravin (akridinová barviva)
    - **produkty kouření** (cyklické uhlovodíky), složky **spalin** a výfukových **plynů** (cyklické uhlovodíky, oxidy dusíku), složky **umělých hmot** (PCB), **toxiny** (aflatoxin B1 kontaminující potraviny)
    - proto do hodnocení nově **syntetizované látky** patří i testy na mutagenitu
    - patří sem také **analogy bazí**
      - strukturálně podobné **normálním bazím**, mohou být zařazeny do DNA
      - patří sem **5-bromuracil** (5BU) – analog T, může ale změnit svou tautomerní formu
      - páruje se pak s G a místo TA páru vzniká GC pár
    - **vmezeřující se látky**
      - zařadí se mezi **sousední báze**
      - akridinová barviva, ethidiumbromid
      - vloží se do šroubovice a mírně **oddálí** sousední báze – zařazení jednoho nukleotidu do interkalární pozice a vznik **posunové mutace**
    - **chemikálie modifikující báze**
      - **alkylační činidla**, které báze methylojí nebo ethylojí – změna párování
      - **deaminační činidla** - deaminace A, G nebo C (kyselina dusitá a dusitany), dochází k záměně **původních párů** kvůli změně některé z bazí
    - **oxidy dusíku** vznikají z továren a kvůli automobilové dopravě
    - **dusitany** se mohou vyskytnout i v potravinách a vodě kvůli hnojení a jsou užívány při konzervaci uzenin – nebezpečné pro **buňky trávicího traktu**
    - reaktivní **oxygenové složky** kyslíku
      - **volné radikály**, v aerobních buňkách jako vedlejší produkt metabolismu (peroxid vodíku, hydroxylové radikály)
      - dále jako důsledek **ionizačního záření**
      - volné radikály podstatné v **buněčné signalizaci**, na druhou stranu mají však **nežádoucí účinky**
      - reakce s DNA může způsobit **mutace** vyvolávající celou řadu chorob včetně **nádorů**
    - mnoho mutagenů vzniká v **samotném organismu**, mnoho jich je ve **vnějším prostředí**
  - **fyzikální mutageny**



- různé **druhy záření**, jimž jsme vystaveni v průběhu života, mohou způsobovat mutace – kosmické, sluneční záření, radioaktivní prvky (např. radon)
- poměrně **malé riziko** jsou záření v rámci pracovních podmínek a lékařských vyšetření
- mezi **riziková pracoviště** kvůli expozici patří jaderné elektrárny, některé průmyslové závody, výzkumné laboratoře a některé zdravotnická zařízení, zbrojní zařízení apod.
- **ionizační záření**
  - **hlavní mutagen** – dostatek E pro uvolnění elektronů z atomů
  - nestabilní atomy pak emitují ionizační záření
  - **alfa záření** = jádro atomu helia, 2 protony a 2 neutrony, pohlcováno kůží (uran, radium)
  - **beta záření** = elektrony, penetrantnější (tritium)
  - **neutrony**
  - **gama záření** = elmg záření, fotony, vysoká penetrance (plutonium, celsium)
  - vyvolává hlavně **oxidaci bazí** a porušení vazby pentosy a P v DNA
  - **mutagenní efekt** závisí na množství vzniklých iontů a absorbovaná dávka se udává v **Greyích** (Gy = J/kg)
  - mutagenní efekt závisí na délce **exposice**, **dávce** záření, fázi **buněčného cyklu** a funkci reparačních mechanismů
  - vyvolává hlavně **chromosomální zlomy** a přestavby – lze tak hodnotit dávku záření i funkci reparace DNA, mohou ale vznikat i jiné mutace
  - u savců větší efekt **jednorázové ozáření** než aplikace stejné dávky v delším časovém období a četnost mutací se snižuje s dobou, jež uplynula od ozáření do **replikace buněk**
  - u **mužů** se po ozáření doporučuje rodičovství po 1-3, u **žen** 3 a více letech
  - nelze určit **prahovou dávku** záření a pro posuzování rizika je nutno vnímat, že kosmickému a slunečnímu záření jsme vystaveni běžně a umíme jej **snášet**
  - **nejvyšší radiace** byla v 50. letech kvůli nukleárním pokusům v atmosféře
- **intenzita kosmického záření** závisí na zeměpisné šířce a nadmořské výšce
- intenzita záření z **přirozených zdrojů** závisí na obsahu radionuklidů v podloží (ložiska uranu v ČR) i na uvolňování a vývěru **radonu**
- v **lékařství** vysoké dávky záření v onkologické léčbě
- **rtg** je pro rizika nahrazováno **ultrazvukem**
- ohrožující jsou **havárie** – Černobyl 1986 zvýšil incidenci **nádorů štítné žlázy** v exponované populaci (radioizotop jódu), podobně v Hirošimě a Nagasaki
- velikost dávky záření, která **zdvojnásobuje četnost mutací** je důležitá pro **predikci** rizika
  - obecně **zdvojnásobující dávka** při akutním ozáření je 1Sv(sievert) a při chronickém 4Sv
- vzhledem k poměru **počtu germinálních a somatických buněk** v organismu má záření větší vliv v etiologii **neoplázií** (somatické mutace)
- **neonizující záření v podobě UV**
  - je silně absorbováno mnoha **organickými látkami** – puriny a pyrimidiny, tvoří se dimery mezi sousedními pyrimidiny (hlavně T) a ty způsobují 2 typy mutací
    - **ruší dvoušroubovice DNA** – nemožný postup DNA-polymerasy a přerušení replikace DNA
    - při reparaci dimerů může dojít k **chybnému zařazení bazí**
  - opakované **narušení replikace dimery** (bez reparace) vede k **chromosomálním zlomům**
  - další projevy jsou způsobeny **substitucemi a delecemi bazí**
  - u lidí poškozuje UV hlavně **buněky povrchové** – vyvolává neoplazie kůže (karcinomy, melanomy)
  - **riziko UV** stoupá s ničením ozonové vrstvy
- významným mutagenem je také **vysoká teplota** – vznik míst se ztrátou purinu v DNA a bodová nebo deleční mutace

- **biologické mutageny**
  - zejména **viry**
  - v průběhu **lyzogenního cyklu** mohou být viry inkorporovány do DNA hostitele
  - inserce viru do sekvence DNA genu ovlivňuje jeho **funkci**, protože je pak zpravidla nefunkční
  - **transdukce virových promotorů** a onkogenů do buněk se zejména podílejí v etiologii nádorů
  - další formou **poškození DNA** viry jsou chromosomální zlomy, jejichž přítomnost lze pozorovat při vyšetření osob po **infekci viry**
  - k biologickým příčinám vzniku mutací počítáme i **změny vyvolané transpozony**, elementy schopnými přesouvat se z jednoho místa genomu na jiné - jejich přesuny v genomu mohou mít **mutagenní efekt**
  - molekulární genetika prokázala u člověka **inzerce IS** do genu jako příčinu některých mutací **podmiňujících** neurofibromatosu, Duchennovu dystrofii, familiární nádor prsu, thalasemii a další
- **testování mutagenity**
  - nedávno vzniklo odvětví **toxikologie**, zabývající se identifikací **mutagenů v prostředí**
  - testuje se potravinářství, farmaceutický průmysl, znečištění prostředí a podobně
  - nejpoužívanější metody jsou prováděny **in vitro** na bakteriích nebo tkáňových kulturách - známý je **Amesův test**
  - **Amesův test**
    - **auxotrofní bakterie** Salmonella typhimurium
    - tento druh má mutaci v **histidinovém operonu** a nemůže syntetizovat histidin
    - jsou umístěny na agarové plotny s malým množstvím histidinu spolu s **testovanými látkami**
    - bakterie rostou do **vyčerpání histidinu** z prostředí a poté rostou jen ty, u nichž došlo vlivem testovaných látek ke **zpětné mutaci** a histidin už umí syntetizovat
    - bakterie v případě mutagenity látek rostou hlavně v jejich **okolí** a použitím různě mutovaných bakterií lze detekovat přesný **mutagenní účinek látek**
  - některé látky (prokarcinogeny) způsobují nádorové bujení, jsou-li účinkem enzymů organismu **konvertovány v mutageny** (karcinogeny)
  - pro testování těchto látek lze upravit **Amesův test** přidáním jaterního extraktu (zdroj aktivujících enzymů) - aktivace prokarcinogenů se projeví zvýšením reverzních mutací
  - byly vyvinuty **testy obdobné** Amesovu, ale pro tkáňové kultury a s jiným systémem **selekce a genů**
  - látky, které poškozují chromosomy se nazývají **klastogeny**
    - testování na **buněčných liniích** nebo laboratorních zvířatech
    - sleduje se výskyt **chromosomálních aberací** - zlomy, výměny nesesterských chromatid, ring a dicentrické chromosomy, translokace
    - využívá se i hodnocení **výměn sesterských chromatid** (SCE - sister chromatid exchange) - procesu, který se v nízké frekvenci vyskytuje spontánně v průběhu **mitosy i meiosy**
    - po účinku **klastogenů** se jeho frekvence zvyšuje
  - pro testování mutagenity **vnějšího prostředí** je hodně metod, testují se mutagenní účinky i ovlivnění **reparačních mechanismů**
  - komplexní určování **genotoxicity** se zjišťuje na **3 úrovních**
    - **monitorování prostředí**
      - vzorky prostředí
      - Amesovým testem vyhledávání mutagenních rizik
    - **monitorování biologických účinků**
      - poskytuje informace o odpovědi lidského organismu na působení **genotoxických látek** a účinnosti preventivních opatření
      - cytogenetické metody hodnocení získaných chromosomálních aberací a výměn sesterských chromatid

- hodnotí **přítomnost mutagenních látek** v moči, neplánovanou syntézu DNA (intenzitu reparační DNA) a další imunologické a biochemické markery
- **monitorování genetické**
  - využívá epidemiologické studie výskytu spontánních potratů, VVV, nádorových onemocnění ve vztahu ke genotoxickým látkám
  - sledované jevy mohou vznikat i z jiných příčin, proto je důležitá volba vhodného **kontrolního souboru**

## 58. Reparační mechanismy organismu a jejich genetická kontrola

- shrnutí – detailní popis mechanismů v následující otázce

### Reparační mechanismy

- **fotoreaktivace**
  - u bakterií
  - ozáření UV-světlem vytváří v DNA dimery thyminu, k němu se váže DNA-fotolyasa
  - jeho **štěpící aktivita** je závislá na energii viditelného záření zejména modré frakce - po ozáření se dimery **rozštěpí**
  - u mnohobuněčných organismů, uplatňuje se jen v **povrchové vrstvě**
- **excizní opravy**
  - jsou důležitou součástí **replikace**
  - při vysoké rychlosti zařazování nukleotidů do nového řetězce je vysoká **frekvence chybného zařazení bazí**
  - **kontrola** = scanning správnosti **párování bazí** v nově syntetizovaném řetězci DNA a v matici, polypeptid, který je součástí komplexu DNA polymerasy III
  - **DNA-endonukleasa rozpozná** chybné zařazení bazí, naváže se a přeruší řetězec DNA
  - svojí funkcí exonukleasy pak chybné sekvence **vyštěpí**
  - **DNA-polymerasa I využije** 3'-OH opravného řetězce a podle původního řetězce doplní do mezery sekvenci **nukleotidů**
  - **DNA-ligasa** spojí nově syntetizovaný úsek s pokračováním opravného úseku
  - **excize bazí**
  - **excize nukleotidu**
- **mismatch repair**
  - **mismatch repair geny**: hMSH2, hMLH1, hMS1, hPMS2
  - časný postreplikační kontrolní a opravný **mechanismus**
  - **rozpoznání**, která z dvojice chybně se párujících bazí je chybně zařazená base v nově syntetizovaném řetězci DNA
  - **mutátorové geny** - opravují mutace
  - schopné pozdržet **replikaci buněk** do ukončení reparační DNA nebo vyvolat při větším poškození DNA **apoptózu buněk** jako konečnou ochranu před vznikem klonu buněk
- **postreplikační opravy**
- **SOS reparační**
  - poslední zoufalý pokus přežít
  - aktivace tzv. S.O.S odpovědi - geny nmuC a nmuD umožňují replikaci i poškozených a neopravených **úseků templátu DNA**

### Syndromy podmíněné poruchami reparačních mechanismů

- u člověka známa řada **dědičných syndromů**, které jsou spojeny se zvýšenou citlivostí vůči **mutagenním vlivům** a mohou být podmíněny poruchami reparačních mechanismů
- **xenoderma pigmentosum**
  - nejvíce probádané
  - **recesivně dědičné** onemocnění s incidencí 1 : 70 000
  - postižení jsou citliví na **UV záření**

- opalování vyvolává nepravidelnou pigmentaci a v časném věku se u nich objevují **karcinomy kůže**
- zvýšené je i riziko **neoplazií jiných orgánů**
- kromě **citlivosti kůže** mají pacienti s XP různé neurologické poruchy – vysvětlením je smrt **dlouhověkých nervových buněk** (apoptosa)
- onemocnění je způsobeno defektem v **excizním systému NER**
- postižení nejsou schopni opravit poškození způsobené **UV zářením**
- příkladem defektu v **systému BER** jsou u člověka mutace v genu MUTYH způsobující jednu z dědičných forem **kolorektálního karcinomu**
- **Bloomův syndrom**
  - způsoben mutací v  **genu BLM**, který se účastní procesu postreplicačních oprav
  - postižení mají **chromosomální nestabilitu**, zvýšené riziko výskytu nádorů a jsou **imunodeficientní**
- v některých případech **poškození DNA** vznikají onemocnění, kde příčina není přímo v defektu **opravných systémů**, ale spočívá v defektní reakci buňky na poškození genetického **materiálu**
- normální buňky reagují na **poškození DNA** zastavením buněčného cyklu v kontrolním bodě a umožňují tak buď opravu **poškození** nebo spuštění **apoptosy**
- součástí tohoto mechanismu je funkce  **genu ATM**, jehož produkt přenáší signál o poškození k dalším cílům až k **proteinu p53**
- ztráta funkce tohoto **proteinu ATM** způsobuje onemocnění **ataxia teleangiectasia**
- **ataxia teleangiectasia**
  - buňky nemocných jsou **hypersenzitivní** na ozáření a mají chromosomální nestabilitu
  - nemocní mají vysoké riziko vzniku nádorů a jsou postiženi **imunodeficiencí a cerebelární ataxií**
- **Fanconiho anemie**
  - též onemocnění, způsobené **defektní odpovědí** na poškození DNA
  - jedná se o onemocnění **autosomálně recesivně** dědičné
  - projevuje se různými **vrozenými vadami** a predisposicí ke vzniku **malignit**, zejména **akutní myeloidní leukémie**
- **HNPCC** (hereditary non polyposis colorectal carcinoma)
  - jedná se o mutace genů hMSH2, hMLH1 (human Mut L homologue 1 DNA repair gene), hMSH6, hPMS1 a hPMS2, které se podílejí na **mismatch repairu**
  - porucha reparací tohoto typu se projeví nejen v **různých genech**, ale i změnami počtu **repetitivních sekvencí** v buňkách nádorové tkáně
  - tato nestabilita **mikrosatelitových markerů** je charakteristickým rysem HNPCC
- **orientační hodnocení** reparačních mechanismů poskytuje i vyšetření získaných chromosomálních aberací (ZCHA)
  - **ZCHA** jsou obvykle vyšetřovány pro zjištění velikosti **expozice mutagenům**
  - jako norma je uváděno **1% buněk se ZCHA**, v horším životním prostředí až do 3-4%
  - jestliže však klient má při stejné míře **expozice** podstatně více zlomů a přestaveb chromosomů (i 10% a více poškozených buněk) než například jeho stejně exponovaní spolupracovníci, pak tento nálezní svědčí pro **méně aktivní reparační systém**
  - takto postiženým osobám je třeba doporučit **zvýšenou ochranu** před mutageny včetně omezení rtg vyšetření a změny pracoviště
- určitou **preventivní ochranu** před působením mutagenů poskytují antioxidanty
  - v praxi byla s úspěchem testována **kyselina askorbová** (vitamin C) a **tokoferol** (vitamin E)
  - pozitivní efekt na syntézu DNA a proces reparace DNA má **kyselina listová** (acidum folicum)

## 59. Reparační mechanismy nukleových kyselin

- navzdory působení mnoha faktorů, které mohou **mutovat DNA**, si organismy vyvinuly způsoby, jak mutace v genetickém materiálu **opravovat**
- opravné systémy jsou velmi **komplexní procesy**, na nichž se účastní přibližně 130 genů a podílí řada **bílkovin s různou funkcí**
- u člověka existuje minimálně **5 typů oprav DNA**
- **přímá oprava**
  - u lidí méně častý způsob
  - vyskytuje se u nás **několik genů**, které se účastní mechanismu přímé opravy
  - z nich je nejlépe charakterizován gen, který kóduje **DNA-methyltransferasu** schopnou odstranit methyl-skupinu z nesprávně **methylovaných guaninů**
  - u bakterií existuje opravný mechanismus, závislý na **viditelném světle** – fotoreaktivace
  - ta opravuje **dimery** pyrimidinů (thyminů např.) produkované UV zářením
  - viditelné záření indukuje enzymy nazývané **fotolyasy**, které rozpoznají thyminové dimery, váží se na ně a štěpí kovalentní vazby, které se mezi nimi vytvořily za využití **světelné energie**
- **excizní opravy**
  - excizní opravy jsou důležitou součástí **procesu replikace**
  - při vysoké rychlosti zařazování nukleotidů do nového řetězce je frekvence **chybného zařazení bazí** poměrně vysoká
  - jsou známy zejména dva **hlavní typy excizních oprav**
  - **BER (base excision repair)**
    - odstranění abnormální nebo chemicky modifikované **baze**
    - tento **kontrolní systém** opravuje velké množství nejběžnějších poškození DNA
    - oprava probíhá za účasti různých **DNA-glykosylas**, které jsou kódovány nejméně **8 geny**
    - každá **DNA-glykosylasa** je odpovědná za identifikaci a odstranění **specifické** purinové nebo pyrimidinové baze
    - po odstranění baze štěpí **endonukleasa** (AP endonukleasa) a **fosfodiesterasa** vlákno DNA v pozici špatně zařazené baze a odstraní **zbytek nukleotidu** (cukr-fosfát) za vzniku **mezery**
    - DNA-polymerasa pak nahradí **chybějící baze** podle originální struktury a DNA-ligasa spojí nový úsek DNA s původní DNA
  - **NER (nucleotid excision repair)**
    - odstranění **větších úseků DNA**
    - tento systém používá **komplex** jiných enzymů než systém BER
    - má schopnost **opravovat větší úseky DNA** i dimery pyrimidinů
    - **excizní opravy** poškozené DNA sestávají z následujících kroků
      - enzym **DNA-endonukleasa rozpozná** poškozené místo a označí jej (např. **přerušuje** jeden řetězec DNA v sousedství poškození)
      - **DNA-nukleasa odstraní** označený nukleotid a také několik sousedních nukleotidů
      - následně enzym **DNA-polymerasa doplní** vzniklou mezeru, přičemž jako templát slouží nepoškozený řetězec DNA
      - reparační proces je ukončen **spojením** nově syntetizované DNA s původní DNA činností **DNA-ligasy**
- **postreplikační oprava (homologní rekombinace)**
  - uplatní se zejména při nápravě **zlomů obou řetězců DNA** a je mnohem méně objasněný než excizní systémy
  - je realizován mechanismem, který je podobný **genové konverzi**
  - jedná se o homologní rekombinaci, kdy se jedno vlákno **homologního chromosomu** spáruje a **zrekombinuje** a s poškozenou DNA

- mezi lidské geny, které se účastní tohoto způsobu opravy patří **gen NBS** (gen mutovaný u Nijmegen breakage syndromu) nebo **gen BLM** (mutovaný u Bloomova syndromu) a **geny BRCA1 a BRCA2**
- **mismatch repair**
  - systém opravuje chyby, které vzniknou v **průběhu replikace DNA**
  - enzymy jsou schopné identifikovat **špatně zařazený nukleotid** (mismatch) a označit ho nebo přímo opravit
  - důležité je, že systém dokáže rozlišit **původní řetězec** a správnou sekvenci nukleotidů a dceřinný řetězec s mutovanou sekvencí a nahradit nesprávný nukleotid podle originálu
  - systém byl nejprve objeven **u bakterií** (E. coli), kde je rozlišení umožněno porovnáním methylace **obou řetězců**
  - řetězce DNA obsahují **palindromové sekvence GATC**, ve kterých je adenin v templátovém řetězci **methylovaný**
  - v novém řetězci dochází k methylaci adeninu až po **určité době**
  - proteiny mismatch repairu jsou schopné rozpoznávat tyto **semimethylované GATC sekvence** a tak původní a nově syntetizovaný řetězec
  - u E. coli **mismatch repair** zajišťují produkty 4 genů – mutH, mutL, mutS a mutU
    - **mutU** je helikasa, **mutS** protein rozpoznává chybné párování, **mutL** spojuje komplex proteinů a **mutH** přeruší nemethylovaný řetězec (GATC specifická endonukleasa) v **semimethylované sekvenci GATC** po nebo proti proudu
    - nově syntetizovaný řetězec s chybnou bází je **vyštěpen mutD**
    - excidovaný úsek může být dlouhý i **tisíce bází**
    - jeho délka závisí na vzdálenosti **nejbližší GATC sekvence** od místa chybného párování
    - **vyštěpený** úsek je syntetizován DNA-polymerasou I a spojen ligasou
  - **homology proteinů mutS a mutL** byly prokázány i u člověka v souvislosti se studiem onkogeneze
  - geny, které je kódují, jsou označovány jako **mutátorové geny**, i když mutace nevyvolávají, ale **opravují**
  - mutace těchto genů znemožňují **účinný mismatch repair**
  - mutace vzniklé při replikaci a **změny struktury DNA** jsou bez opravy přenášeny do dalších generací buněk
  - **kumulace mutací** může vést až ke vzniku tumoru
  - mismatch repair geny člověka jsou **označovány jako hMSH2, hMLH1, hMSI, hPMS2 a MSH6**
  - mismatch repair je zřejmě univerzální ve všech buňkách s **dvouřetězcovou DNA**
  - u člověka **germinální mutace** mutátorových genů podmiňují vznik nepolyposního hereditárního karcinomu tlustého střeva (Lynchův syndrom I a II)
- všechny tyto systémy (s výjimkou přímé opravy) vyžadují spolupráci **řady enzymů** – exo, endo nukleas, helikas, polymeras a ligas

## 60. Molekulární podstata dědičných chorob

- **fenotypové projevy** dědičných chorob a vad můžeme studovat na klinické, buněčné a molekulární úrovni
- další genetické poznatky získáváme **studiem rodin a populací**
- pro diagnostiku a kauzální terapii mají rozhodující význam poznatky **molekulární a biochemické genetiky**
- zakladatelem biochemické genetiky je **A. Garrod**, který v roce 1902 publikoval poznatky o biochemické podstatě recesivně dědičných chorob – albinismu, pentosurie, alkaptonurie a cystinurie
- v současné době známe velké množství **geneticky podmíněných onemocnění**, které řadíme do několika skupin
  - **chromosomálně podmíněná onemocnění** (chromosomální aberace)
  - **monogenně podmíněná onemocnění** (mutace v genu nebo páru genů)
  - **multifaktoriálně podmíněná onemocnění** (polygenně podmíněná + vliv prostředí)

- **mitochondriální choroby** (mutace mtDNA)
- mezi **monogenně podmíněná** dědičná onemocnění patří metabolické poruchy zmíněné v otázce 60.
- molekulární podstatu **dědičných chorob** a typické mechanismy fenotypových důsledků genových mutací lze v **preklinickém studiu** ukázat pouze na několika modelových příkladech, tyto příklady pak mohou přispět k pochopení dalších poznatků, se kterými se lze setkat v průběhu **klinického studia**
- z poznatků o struktuře a funkci **nukleových kyselin** (NK) vyplývá, že celé spektrum dědičných metabolických a morfologických znaků se realizuje prostřednictvím **bílkovin** podle standardního schématu
- **sled změn** v případě mutace genu je možné vyjádřit jako

mutace ---> **změněný protein** ---> změněná funkce ---> choroba

- mutace můžeme studovat **přímou analýzou NK** (DNA i RNA), analýzou **primárního produktu** (sledu amk v proteinech), hodnocením **metabolické aktivity** proteinů nebo změn jejich **ultrastruktury** a srovnávat je s fenotypem (s klinickým nálezem)
- tak genetika přinesla nejen nové **diagnostické metody** a zlepšení symptomatické léčby, ale především naději na kauzální léčbu metabolických odchylek včetně **genové terapie**
- každá z chorob zmíněných v otázce 60. anebo **mitochondriálních chorob** je modelem určitého typu regulace a poruchy funkce

## 61. Proteiny a jejich funkce, genetický polymorfismus bílkovin

---

- **genetická heterogenita** = přítomnost více forem určitého znaku, která se objevuje častěji než v 1% případů v populaci (**genetický polymorfismus**)
- **polymorfismus bílkovin** = existence několika různých variant proteinu určitého typu

### Genetická heterogenita

- **genetická heterogenita** je přítomnost více forem určitého znaku, která se objevuje častěji než v 1% případů v populaci
- jestliže je tato **hodnota nižší**, hovoříme o **mutaci**
- heterogenita je často určována již na **úrovni DNA**
- **polymorfismy v DNA** jsou detekovány pomocí molekulární genetiky
- různé mutace vytvářející **genetickou heterogenitu** mohou vést ke zvýhodnění jedince
- stejně tak ovšem mohou tyto změny svého nositele též **poškozovat**
- mezi onemocněním podmíněná **heterogenitou alel** nebo lokusů patří např.
  - CFTR gen pro cystickou fibrosu (známo je na 1000 forem tohoto genu)
  - retinitis pigmentosa

### Polymorfismus bílkovin

- **polymorfismus bílkovin** je existence několika různých variant proteinu určitého typu
- někdy mluvíme také o **biochemickém polymorfismu**
- důvodem rozmanitosti jednotlivých proteinů je **odlišná primární struktura proteinů**
- často se může jednat o záměny **jednotlivých aminokyselin**, změny náboje, změny velikosti nebo uspořádání molekuly
- **změny primární struktury** mohou někdy vést až k zániku funkce proteinu a vyústit v mnohá genetická onemocnění
- nejčastěji se u **polymorfismů bílkovin** setkáváme se vztahy kodominance, např. lidský hemoglobin
- **polymorfismus hemoglobinu**
  - dle primární struktury rozlišujeme **4 základní řetězce lidského hemoglobinu** – každá z nich je kódována **jiným genem**
  - polymorfním systémem myslíme **všechny formy proteinu** – tedy hemoglobin (Hb)
  - jednotlivé varianty jsou potom označovány **velkými písmeny** – HbA, HbB...
  - **polymorfní typ** pak označuje kombinaci jednotlivých variant a je projevem genotypu, tedy **fenotypem** – HbAA, HbAB, HbBB
- **význam polymorfismu**
  - **polymorfismus bílkovin** pravděpodobně sloužil k zachování určité náhodné mutace, která vedla ke **zvýhodnění jejího nositele**
  - typickým příkladem může být právě existence **polymorfismu hemoglobinu** a jeho vztah k **malárii**
  - je prokázáno, že **nositelé polymorfního typu HbA/HbS** jsou vůči malárii odolní a poskytují jim výraznou **výhodu**
  - jedná se vlastně o **formu selekce**

## 62. Lidské hemoglobiny a jejich dědičnost

- 
- **hemoglobin** přenáší kyslík v **červených krvinkách** obratlovců a některých nižších živočichů
  - jeho molekula tvoří **tetramer** čtyř řetězců **globinu** doplněného o **hem**
  - **hemová skupina** pomocí obsaženého železa váže kyslík a tak umožňuje jeho transport
  - **dospělý člověk**



- má převážně **hemoglobin A** (adult - HbA)
- tvoří asi **98%** hemoglobinu dospělého
- je tvořen dvěma podjednotkami **alfa** a dvěma **beta**
- **alfa řetězec** se skládá ze **141 amk**
- **beta řetězec** se skládá ze **146 amk**
- v **ontogenezi** se struktura hemoglobinu v erytrocytech **mění**
- molekuly všech **hemoglobinů** jsou **tetramerní**, liší se však **typem řetězců** a celkově pak svými **vlastnostmi** (HbF má vyšší afinitu ke kyslíku než HbA a podobně)

- **typy hemoglobinů**

Hemoglobin	Označení	Zastoupení řetězců
embryonální	Hb Gower 1	2x zeta, 2x epsilon
	Hb Gower 2	2x alfa, 2x epsilon
	Hb Portland	2x zeta, 2x gamma
fetální	HbF	2x alfa, 2x gamma
adultní	HbA	2x alfa, 2x beta
	HbA2	2x alfa, 2x delta

- **změny struktury** hemoglobinu v průběhu ontogeneze jsou klasickým příkladem **regulace genové exprese v ontogenezi**
- změny v expresi jednotlivých genů jsou označovány jako **přepínání (switching) globinů**
  - nejprve je zahájena syntéza **globinů zeta a epsilon** (Hb Gower 1)
  - po expresi **globinů alfa a gamma** vznikají i další dva typy embryonálních hemoglobinů
  - současně je **potlačena exprese** genů **zeta a epsilon** a ve fetálním období se vytváří zejména hemoglobin **HbF**
  - **u novorozence** obsahují erytrocyty asi 70% HbF
  - zastoupení HbF **po narození** klesá a v dospělosti obsahují erytrocyty asi jen 1% hemoglobinu HbF
- **regulace tvorby** hemoglobinu v ontogenezi souvisí s **lokalizací tvorby červených krvinek**
- **embryonální hemoglobin** se tvoří ve žlutkovém vaku, **fetální** v játrech a **dospělý** v kostní dřeni
- z **funkčního hlediska** je podstatné, že **HbF** váže kyslík při nižším **parciálním tlaku** než HbA – může tak snadněji vázat kyslík uvolňující se z hemoglobinu matky (HbA) v placentě a zásobovat jím **tkáň plodu**
- **lokalizace rodiny genů pro globinové řetězce**
  - skupina (cluster) genů **příbuzných genu alfa** (alfa-like) je lokalizována na **16. chromosomu (16p13)**
    - lokus pro **globin alfa** je tetraplikován
      - geny pro globin alfa1 a alfa2
      - pseudogeny pro globin alfa1 a alfa2 – nefunkční kopie předešlých genů
      - mohou se vyskytovat i chromosomy jen s jedním nebo třeba třemi alfa geny
    - gen pro **globin zeta** je duplikován
      - gen pro globin zeta
      - pseudogen pro globin zeta
    - struktura řetězců globinů **alfa1 a alfa2** je **identická** a kóduje proto identické polypeptidy
    - do skupiny patří také **gen theta**, jehož funkce je ale neznámá
  - skupina genů **příbuzných genu beta** je lokalizována na **11. chromosomu (11p15.5)**
    - lokus pro **gen beta** je duplikován
      - gen pro globin beta
      - pseudogen pro globin beta
    - lokus pro **gen delta**
    - lokus pro **gen gamma**
      - gen pro gamma A a gamma G
      - liší se v jednom nukleotidu

- lokus pro **gen epsilon**
- řetězce gamma a beta globinu se liší celkem v **38 amk**
- **mechanismus přepínání** transkripce genů globinu v průběhu vývoje je intenzivně studován
- na obou chromosomech je v určité vzdálenosti proti proudu (upstream) od globinových genů oblast, **koordinující expresi genů globinové struktury – LCR (locus control region)**
  - ukázalo se, že v **oblasti LCR** jsou místa **hypersenzitivní** na DNAasu I
  - sekvence DNA u těchto míst připomíná **sekvence enhancerů** obsahující vazebná místa pro běžně se vyskytující a tkáňově specifické **transkripční faktory**, které mohou ovlivnit expresi **globinového genu**
  - další místa hypersenzitivní na DNAasu I se nacházejí v **promotorech globinových genů**
  - mechanismus **specifického přepínání** exprese se pravděpodobně uskutečňuje **kompeticí** mezi globinovými geny, interakcí jejich **LCR** a specifickou aktivací **genově specifických silencerů**
  - mechanismus však stále není příliš jasný – **dřívější modely** předpokládající tvorbu **smyček** a přímý kontakt **LCR a promotorů** genů není ve světle současných poznatků příliš **pravděpodobný**
- poznatky o **struktuře skupin genů** a o aktivaci transkripce jednotlivých lokusů v ontogenezi vysvětlují **rozdílnou klinickou manifestaci mutací genů pro alfa a beta řetězec**
  - mutace genu beta postihují u **heterozygotů 50%** řetězců hemoglobinu
  - mutace některého z alfa genů postihují jen **25% molekul** hemoglobinu, ale projevují se už **před narozením**
- **dědičné choroby** hemoglobinu (hemoglobinopatie) rozdělujeme na choroby se **změnou struktury řetězce** globinu a choroby s **poruchou syntézy** řetězce globinu (tzv. thalasemie)

## 63. Hemoglobinopatie

- **dědičné choroby** hemoglobinu (hemoglobinopatie) lze dělit na choroby se **změnou struktury** řetězce globinu a choroby s **poruchou syntézy** řetězce globinu – tzv. **thalasemie**

### Poruchy struktury hemoglobinu

- příkladem tohoto onemocnění je **srpkovitá anemie** (sickle cell anemia), **hemoglobin C**, **methemoglobin** a další **mutace** v molekule hemoglobinu
- **srpkovitá anemie**
  - těžká recesivně dědičná **hemolytická anemie**, spojená s poruchami prospívání, zvětšením sleziny a krizemi
  - **krize** jsou vyvolávány **ucpáním kapilár** erytrocyty v končetinách, ve slezině a v plicích
  - **poškození sleziny** snižuje odolnost vůči infekcím a bez přiměřené zdravotnické péče je onemocnění **letální**
  - **heterozygoti** jsou klinicky zdraví, při vyšetření jeví pouze část jejich erytrocytů **srpkovitost**
  - krize u nich mohou vznikat v **zátěžových situacích**, např. při pobytu ve velkých **výškách**
  - u srpkovité anémie bylo poprvé **ověřeno**, že záměna amk v polypeptidu je podmíněna **mutací strukturního genu** (typu missense)
    - v tomto případě je v **globinovém řetězci beta** na 6. pozici zařazen valin místo k. glutamové – takto změněný Hb je označován jako **HbS**
    - příčinou je **záměna jednoho nukleotidu** A na T v tripleti GAG
    - důsledkem této záměny jediné ze **146 amk** je změna **isoelektrického bodu hemoglobinu**
  - při zvýšeném **parciálním tlaku** kyslíku (např. vysoké nadmořské výšky) se molekuly **HbS** agregují do **tyčkovitých polymerů** a zmenší plasticitu a zvýší fragilitu erytrocytů
  - obvyklá **bikonkávní forma** erytrocytů se mění na srpkovitou, srpkovité erytrocyty hůře procházejí kapilárami a mohou je **ucpat – lokální hypoxie až infarkt** (krize)
  - předčasná **destrukce srpkovitých erytrocytů** snižuje počet cirkulujících erytrocytů a hladinu Hb – **vzniká anemie**

- srpkovitá anemie je u nás **vzácná**, ale např. v **rovníkové Africe** tvoří heterozygoti téměř polovinu **populace**
- **vysoká frekvence** alely HbS je v mnoha dalších oblastech světa (středomoří, Arábie, Indie), kde se vyskytuje nebo vyskytovala **malárie**
  - **heterozygoti HbS** a dalších **hemoglobinopatií** jsou odolnější vůči malárii, chorobě způsobené prvky rodu **Plasmodium** – modelový příklad vlivu selekce na kvalitu genofondu populace
  - v **Africe, v USA** (černoši z Afriky) a ve **středomoří** představuje HbS i další hemoglobinopatie závažný zdravotnický problém – vyšetření Hb se tu provádí již u **novorozenců** a jako **předsňatkové** vyšetření, dokonce tu je běžná i **prenatální diagnostika** hemoglobinopatií
- **mutace hemoglobin C (HbC)**
  - v HbC je zařazen na 6. pozici v **beta řetězci** místo k. glutamové lysin
  - mutace je podmíněna **záměnou guaninu adeninem** (GAG-AAG)
  - **HbC** je méně rozpustný a **krystalizuje** v erytrocytech
  - příznaky **hemolytické anemie** i výskyt v oblastech s malárií jsou téměř shodné s HbS
  - **heterozygoti HbC/HbA** jsou rovněž odolnější proti malárii
  - v **endemických oblastech** s výskytem malárie proto nejsou výjimkou **složení heterozygoti** s HbS/HbC s mírnějšími projevy anemie
- mutace **strukturního genu** mohou ovlivňovat **schopnost** hemoglobinu **přenášet kyslík**
- tyto mutace jsou **vzácnější** než mutace způsobující hemolytické anemie
- jsou příkladem **mechanismu změny funkce proteinu**
- **stabilita a syntéza** hemoglobinu nejsou těmito mutacemi ovlivněny
- **methemoglobiny (HbM)**
  - příklad **poruchy** strukturního genu
  - v normální situaci je **železo v Hb** ve formě **dvojmocného kationtu**
  - v HbM mutace stabilizuje **formu trojmocnou**, která nemůže vázat kyslík, avšak v důsledku působení **enzymu reduktasy** je možná **konverze** této formy zpět na formu **dvojmocnou**, takže postižení jsou pouze **cyanotičtí**
  - **krátkodobá methemoglobinemie** s dramatickým klinickým obrazem může vzniknout i u osob s **HbA** po otravě dusičnany
  - ohroženi jsou zejména **kojenci**, kteří nemají dostatečnou **aktivitu reduktas** – proto jsou normy obsahu dusičnanů ve vodě a zelenině pro výživu kojenců **přísnější**
- v molekulách **hemoglobinu** bylo popsáno velké množství **různých mutací**, asi 2/3 z nich postihují **řetězec beta** a necelá 1/3 **řetězec alfa**, mutace ostatních řetězců jsou vzácné
  - **substituce 1 báze** mohou změnit ve struktuře Hb 1 amk – HbS
  - **2 substituce** v různých kodonech změni 2 amk – HbC Harlem
  - **délka řetězce** může být zkrácena **deleci** – Hb Gun Hill (delece 15 bp, tj. 5 amk)
  - **délka řetězce** může být prodloužena **mutací stop kodonu** – Hb Constant Spring (prodloužen o 31 amk v důsledku změny stop kodonu UAA na CAA)
- příkladem jiného vzniku **hemoglobinopatie** je Hb Lepore
  - řetězec **non-alfa** vznikl **rekombinací** první části DNA řetězce delta a druhé části řetězce beta
  - **anti Lepore** je komplementární rekombinace (první část beta a druhá delta)
  - tento **inekvální crossing over** je častý, neboť DNA sekvence pro beta a delta řetězce se liší jen v 30 nukleotidech

### Poruchy syntézy hemoglobinu, thalasemie

- thalasemie patří mezi nejčastější **monogenně dědičná onemocnění**
- pojmenování pochází z řeckého **thalassa** – moře, protože onemocnění bylo poprvé popsáno v populaci žijící v blízkosti **Středomořího moře**
- jako thalasemie označujeme **heterogenní skupinu chorob** s poruchou syntézy **globinového řetězce** alfa (alfa thalasemie) nebo beta (beta thalasemie)

- jestliže je **porucha syntézy** jednoho typu řetězce, druhý řetězec se syntetizuje sice v normálním množství, ale **relativně je v nadbytku**
- má proto **tendenci tvořit molekuly** sestávající ze 4 stejných řetězců – **homotetramery**
- v případě **alfa thalasemie** tvoří nadbytek beta řetězců **homotetramery**, které mají sníženou kapacitu **vázat kyslík** – důsledkem je **hypoxemie**
- homotetramery alfa u **thalasemie beta** precipitují a poškozují membránu prekursorů erytrocytů
- to způsobuje jejich **předčasnou destrukci** a prohlubuje **hypochromní anemii**
- **heterozygoti** thalasemie jsou odolnější vůči malárii podobně jako **heterozygoti HbA/HbS** nebo **HbA/HbC**
- thalasemie jsou proto obvyklé v **oblastech endemického výskytu malárie** – v těchto oblastech nejsou vzácností **složení heterozygoti Hb** se změněnou strukturou a thalasemie
- **alfa thalasemie**
  - porucha tvorby **alfa řetězce** poškozují tvorbu **fetálního i dospělého hemoglobinu**
  - **místo HbA** se tvoří hemoglobin ze 4 řetězců beta nebo gama
  - tyto **tetramery** nejsou schopny přenášet kyslík
  - při **těžších formách thalasemie** alfa trpí plod nedostatkem kyslíku a rozvíjí se u něj **hydrops** a další postižení podobně jako u **Rh inkompatibility**
  - nejčastější příčinou jsou **delece**
  - přítomnost dvou **identických genů** alfa ve vazbě s repetitivními bloky na 16. chromosomu zvyšuje pravděpodobnost **inekvální synapse**
  - následným **inekválním crossing overem** mohou vznikat různé kombinace počtu alfa globinových genů, např. vzniká triplicace genu alfa na jednom chromosomu a delece na druhém
  - v genotypu jsou **2 geny** (4 alely) pro alfa řetězec
    - **delece jedné alely** je bez klinických příznaků ( $\alpha\alpha/\alpha-$ )
    - **delece dvou** podmiňuje thalasemii minor (možná trans forma  $\alpha-/ \alpha-$  nebo cis forma  $--/\alpha\alpha$ ) s mírnou anemií
    - **delece 3 alel** ( $--/-\alpha$ ) způsobuje těžkou anemii
    - **delece všech 4 alel** je letální již v průběhu intrauterinního vývoje
  - další mechanismy vzniku **alfa thalasemie**, i když méně časté, jsou obdobné příčinám vzniku **beta thalasemie**
- **beta thalasemie (BT)**
  - vyvolává rovněž anemii, ale až **po 3. měsíci života** v době, kdy **syntéza HbF** (řetězce gamma) je vystřídána **syntézou HbA** (řetězce beta)
  - řetězce alfa v relativním přebytku **precipitují** již v kostní dřeni a způsobují **rozšíření neefektivní erythropoesy**
  - v **erytrocytech** nacházíme ve zvýšené míře **HbF a HbA**, neboť produkce řetězců gama a delta není postižena
  - **heterozygoti** mají jen **lehkou anemii** podobnou anemii při nedostatku železa (**thalasemia minor**)
  - **homozygoti** (většinou složení heterozygoti) mají **těžkou anemii** a typické změny skeletu, vyvolané rozšířením krvetvorby (např. prominující lícni kosti) (**thalasemia major**)
  - **klinický obraz** závisí i na typu poruchy tvorby řetězců beta
  - **beta thalasemie** může být způsobena různými typy mutací
  - na rozdíl od **alfa thalasemie** jsou však **delece genů** relativně vzácné, většina případů je způsobena **bodovými mutacemi** typu nonsense, frameshift a sestřihovými mutacemi
  - popsány jsou i **další mutace**
    - **mutace promotoru** (mírná BT, nejčastější v Japonsku)
    - **delece části beta globinového genu** (těžká BT, Indiáni)
    - **fúze řetězců** např. beta a gama (těžká BZ Lepore, Itálie)
    - **mutace místa čepičky** (lehká BT, Asie)
    - **porucha polyadenylace** konce mRNA (mírná BT, Afrika)

## 64. Dědičné poruchy metabolismu

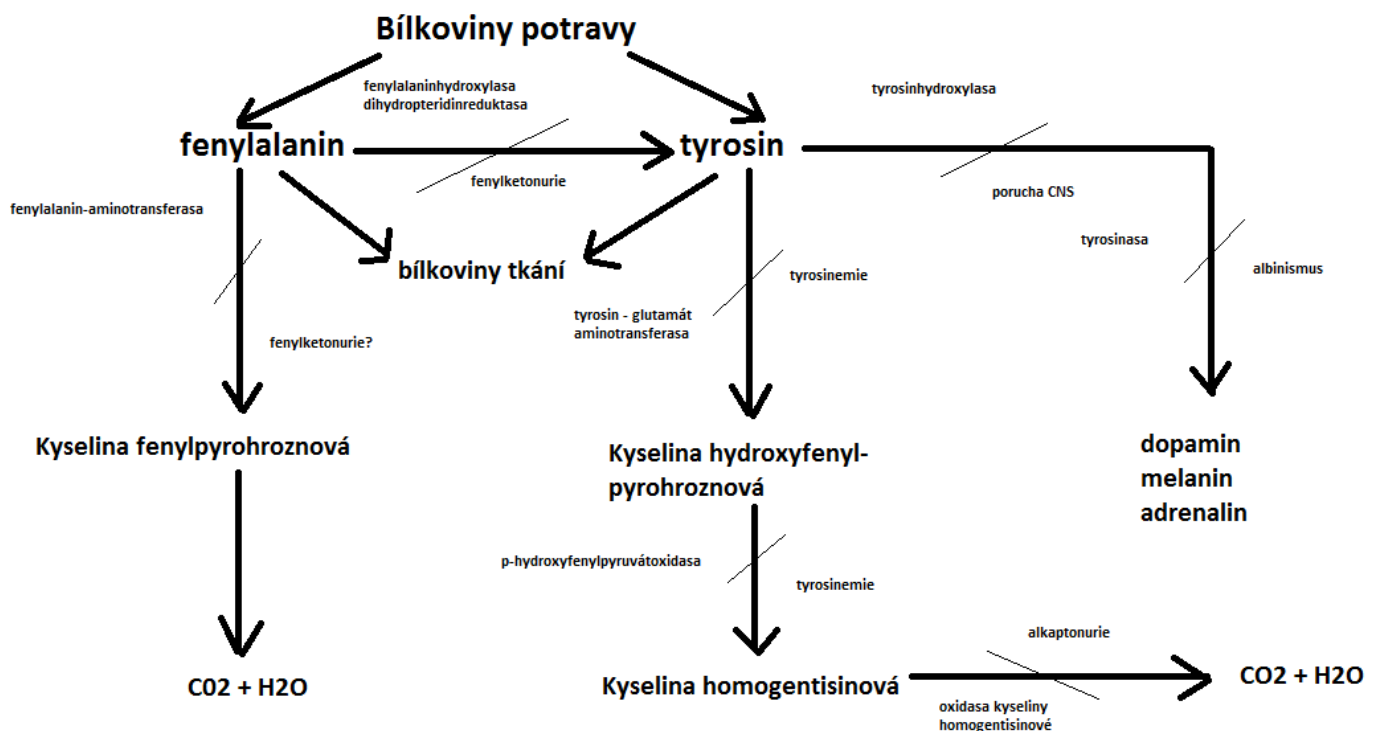
- pokrok **vyšetřovacích metod** umožnil získat podrobné poznatky o mutacích a následných změnách struktury bílkovin a metabolismu u mnoha **dědičných chorob**
- mutace se mohou projevit nejen jako **enzymopatie** ve smyslu klasického pojetí vrozených omylů metabolismu, ale mohou ovlivnit i další **mechanismy regulace**

Typ defektu	Příklady postižení
enzymy	fenylketonurie (PKU), galaktosemie, deficiencie adenosindeaminasy (ADA)
receptory	hypercholesterolemie, testikulární feminisace
molekulární transport	cystická fibrosa pankreatu, hypertenze
struktura buněk, homeostasa	Duchennova a Beckerova muskulární dystrofie, antihemofilický, globulin, imunoglobuliny
regulace růstu a diferenciaci	determinace pohlaví, inaktivace X chromosomu, tumor supresory, onkogeny
mezibuněčná komunikace	insulin, růstový hormon, diferenciaci pohlaví
mitochondrie	Leberova atrofie optiku

### Enzymopatie

- každý **metabolický proces** sestává z mnoha kroků, které jsou zprostředkovány enzymy, které **katalyzují biochemické reakce**
- na začátku 20. století se zjistilo, že určité **varianty metabolismu**, které mohou vést k **onemocnění**
- soubor těchto postižení byl nazván **vrozené omyly metabolismu**, základy tzv. biochemické genetiky
- A. Garrod tehdy vycházel ze **studia alkaptonurie**, což je vzácné onemocnění, při kterém je do moči vylučováno velké množství **kyseliny homogentisinové**
- tato kyselina je **meziproduktem metabolismu** fenylalaninu a tyrosinu, který způsobuje ztmavnutí moči při delším stání
- kromě toho se oxidační produkt **kyseliny homogentisinové** ukládá do pojivových tkání a způsobuje **abnormální pigmentaci a artritidu**
- mutace způsobuje **defekt genu**, který kóduje enzym oxidasu kyseliny homogentisinové
- v oboru biochemické genetiky a dědičných **poruch metabolismu** v současné době figurují poruchy metabolismu aminokyselin, metabolismu lipidů, cukrů, organických kyselin, lysosomální poruchy, defekty v produkci energie nutné pro aktivity buněk, abnormality v transportu molekul mezi buněčnými kompartmenty a další
- většinou se jedná o **vzácná onemocnění**, která se dědí autosomálně recesivně
- v mnoha případech je již možné provádět **testy na nosičství** mutované alely a prenatální diagnostiku, což souvisí s identifikací příslušných genů a charakteristikou jejich mutací
- klasickým příkladem **enzymopatie** jsou PKU a hyperfenylalaninemie – poruchy metabolismu aminokyselin
- **fenylketonurie (PKU) a hyperfenylalaninemie (HPA)**
  - klasická PKU je **autosomálně recesivně dědičná** porucha metabolismu fenylalaninu s frekvencí v ČR asi 1:6000
  - projevuje se postupným **rozvojem duševní zaostalosti**, epilepsií a malou pigmentací
  - byla popsána na základě vysoké **hladiny fenylalaninu** v krvi a tedy kyselinou fenylpyrohroznovou v moči – příčina PKU
  - je podmíněna mutací genu pro **fenylalaninhydroxylasu (PAH)**, která katalyzuje přeměnu fenylalaninu na **tyrosin**
  - fenylalanin je součástí všech **bílkovin stravy** a není-li pacienty s PKU metabolisován na tyrosin, hromadí se v tělních tekutinách a poškozuje **myelinizaci** vyvíjejících se nervových vláken
  - část Phe je **fenylalanintransferasou přeměněna** na kyselinu fenylpyrohroznovou, jež je vyloučena v moči a dává jí **zápach po myšince**

- v tělních tekutinách je navíc **nedostatek tyrosinu** a v organismu i méně produktů jeho metabolismu – např. **melaninu**
- PKU se projevuje teprve po **narození** (během těhotenství je Phe odváděn placentou)
  - s prvými vypitými **doušky mléka** ale stoupá hladina Phe u novorozence
  - dietou s velmi malým obsahem této amk a přídatkem tyrosinu lze ovlivnit hladinu Phe a zajistit tak v podstatě **normální psychomotorický vývoj** dítěte
  - malé množství Phe je ale nezbytné – **esenciální kyselina** nutná pro růst a vývoj
  - dieta by se měla dodržovat do **ukončení vývoje CNS**, jedná se o model léčby enzymopatií
- postižené dítě se rodí **zdravým rodičům**, proto lze PKU odhalit jen skríninkovým vyšetřením **novorozenců**
- 5. den po narození se odebírá pár **kapek krve** a odesílá se na testy – vysoká hladina se zjišťuje **Guthrieho metodou** pomocí bakteriální kultury která se množí jen při zvýšení množství **Phe** ve vzorku



- u žen s PKU je **kritické i těhotenství**
  - placenta **koncentruje Phe** do krve plodu a není-li dodržována přísná dieta, dojde k poškození i genotypově **zdravého plodu**
  - důsledkem PKU matky jsou **mentální retardace**, mikrocefalie, srdeční vady
- **heterozygoty** v rodinách s PKU lze zjistit zátěžově – efekt dávky
- heterozygot s nižší **aktivitou enzymu** bude Phe hůře a pomaleji zpracovávat, ale tento test není zcela **spolehlivý**
- **prenatální diagnostika** dříve nebyla možná – PAH je aktivní pouze v jaterních buňkách
- využitím sond mRNA byl gen **lokalizován na chromosomu 12q22-q24** a byly v něm popsány **stovky mutací** – missense, nonsense, frameshift i sestříhové
- v ČR **nejčastější mutace R408W** – kodon 408 kóduje místo argininu (R) tryptofan (W) – produkce defektního proteinu a **těžké onemocnění**
- je ještě několik **rozšířených mutací** (R158Q, R261Q nebo 12. intron), ostatní jsou vzácné
- frekvence jednotlivých typů alel je v různých **populacích různá** (efekt zakladatele)
- většina **osob s PKU** jsou složeni heterozygoti
  - jsou **mutovány obě alely** genu, avšak každá z nich v jiné pozici sekvence DNA
  - podle typu mutací je pak **síla onemocnění** (klasická PKU až benigní **hyperfenylalaninemie HPA** (R261Q))
- **hyperfenylalaninemie HPA**

- **aktivita PAH** je zčásti zachována a hladina Phe je podstatně nižší než u klasické PKU (méně než 1mM)
- **psychický vývoj** dětí je přiměřený i bez diety, avšak u těhotné ženy je efekt shodný s PKU
- **analýzou DNA** lze odhalit heterozygota i prenatalně stanovit plod dvou heterozygotů (trofoblast, plodová voda)
- u některých novorozenců se zvýšenou hladinou Phe není nutné **nasadit dietu**, stav se sám později upraví
  - **tranzitorní forma PKU** s opožděnou expresí genu PAH v jaterních buňkách
- u 1-3% dětí léčba **neúspěšná**, dieta musí být komplexnější (nejde o mutaci PAH ale mutaci genu pro syntézu **kofaktoru PAH** – tetrahydrobiopterinu)

## Receptory a poruchy jejich funkce

- **porucha receptorů** objevena jako jedna z příčin **familiárních hyperlipémií** (hypercholesterolémií, FH)
- **hyperlipémie** = zvýšená hladina cholesterolu, triglyceridů nebo obou těchto látek v plasmě
- hyperlipémie se významně podílí na vzniku **aterosklerosy** a následně infarktu myokardu
- postupně popsáno několik **monogenně dědičných forem** s charakteristickými projevy
- **transport tuků v organismu**
  - zdrojem je **potrava a syntéza** cholesterolu de novo v játrech organismu
  - tuky z potravy se vstřebávají v **tenkém střevě** a v krvi jsou přenášeny a distribuovány ve vazbě s **proteiny** (lipoproteiny)
  - **lipoproteiny** jsou kulovité a jejich součástí jsou **apolipoproteiny** (apo), které solubilizují tuky a váží se specificky na **receptory buněk** (je 9 typů apolipoproteinů)
  - **ze střeva** jsou tuky (hlavně triglyceridy) přenášeny **chylomikrony** (CM) do jater a tkání
  - v tkáních jsou tuky štěpeny **lipasami na glycerol** a mastné kyseliny – zdroj energie pro buňky
  - v jaterních buňkách jsou **CM metabolisovány** a spolu s cholesterolem syntetizovaným de novo inkorporovány do lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL) s apolipoproteiny a transportovány do tkání
  - ve tkáni odštěpí lipasy z **VLDL triglyceridy** a mění je na **LDL**, které nesou především cholesterol
  - **LDL** mohou pronikat do buněk pomocí receptorů na povrchu buněk procesem endocytosy
  - buňky **využívají cholesterol** jako součást buněčné membrány a prekursor dalších metabolitů
  - příjem LDL receptory jaterních buněk inhibuje **neosyntézu cholesterolu**
  - při nadbytku je cholesterol **přenášen z tkání do jater** jako lipoproteiny o vysoké hustotě (**HDL**) a vázán svými receptory na jaterní buňky a **metabolisován**
- **familiární hypercholesterolémie (FH)**
  - hyperlipoproteinémie se zvýšenou hladinou **cholesterolu v plasmě**
  - důsledkem je vznik **aterosklerosy** a ukládání cholesterolových deposit v kůži a podél šlach jako tzv. **xantomy**
  - je **autosomálně dominantně dědičná**
  - normální hodnoty **cholesterolémie** jsou okolo 5mM/L, heterozygoti mají cholesterolémii prakticky **dvojnásobnou**
  - je to **časté onemocnění** – 1 heterozygot na 500 zdravých osob
  - FH podmiňuje 5% případů **infarktu myokardu** ve středním věku
  - **homozygoti** jsou vzácnější (1:miliónu novorozenců), ale mnohem výrazněji postiženi
  - infarkt mohou prodělat i v **dětství či dospívání**
  - příčinou FH jsou nejčastěji **mutace receptorů LDL**
  - **gen LDLr** je na chromosomu 19p13 (45 kb, 18 exonů)
  - v genu bylo identifikováno více než **900 různých mutací** (převažují missense a nonsense, delece a inserce)
  - mutace v **různých exonech** mohou znamenat různý fenotypový projev
  - obecně ale všechny **mutace redukují počet LDL receptorů** a tak způsobují zvýšenou hladinu cholesterolu v krvi a vznik FH
  - léčení spočívá ve **snížení hladiny cholesterolu** dietou a **medikamentosně**

- vzhledem k efektu na LDL receptor rozlišujeme **5 tříd mutací**
  - nonsense, frameshift a sestřihové mutace: vážne syntéza proteinu a heterozygot má poloviční množství LDL receptorů
  - **mutace exonů 7-14**: syntéza defektního LDL receptoru v normálním množství, nemůže však opustit ER a je zde degradován
  - **mutace exonů 2-6**: produkce defektního LDL receptoru, který je schopen migrace na buněčný povrch, ale nemůže vázat LDL
  - **mutace exonu 18**: produkce LDLr s defektním cytoplasmatickým koncem – neschopnost přenosu navázaného LDL do buňky
  - mutace, znemožňující **disociaci receptoru a LDL** po jejich vstupu do buňky a blokuující recyklaci receptoru na buněčný povrch – **receptor degradován**
- jiný typ FH může být podmíněn mutací **genu APOB** pro apo B-100 – mutace ovlivňuje vazbu apoB na LDL receptor a tak může být porušena vazba **apoB-100** (apolipoprotein) k LDLr a tak zvýšena **hladina cirkulujícího LDL komplexu** – cholesterolu
- další dědičnou změnu metabolismu tuků podmiňuje např. **deficience cholesterylestertansferasy** (AR dědičná), která přenáší cholesterol mezi různými nosiči (apolipoproteiny)
- důsledkem je snížení **hladiny HDL** a zvýšení hladiny LDL a VLDL a proto tím větší riziko **aterosklerosy**

### Poruchy molekulárního transportu

- klasickým příkladem je **cystická fibrosa** (CF) – autosomálně recesivně dědičné onemocnění s incidencí u **novorozenců** 1:1600 – 2500
- **četnost heterozygotů** je vyšší než 1:25
- CF postihuje funkci **exokrinních žláz**
  - **nedostatečná sekrece** trávicích enzymů pankreatu (s cystickými a fibrotickými změnami – odtud název) má za následek **zahuštění stolice** a neprůchodnost střev u novorozenců a poruchy trávení u dětí
  - pacienti mají **abnormální potní žlázy** a v potu je více chloridů
  - hlen v **dýchacích cestách** je vazký a obtížně se vykašlává – příčina častých infekčních onemocnění dýchacích cest a plic
  - muži bývají **sterilní**, u žen je fertilita omezena
- příčinou úmrtí ve 20-30 letech jsou změny **plicní tkáně** (fibrosa) po infekcích a srdeční selhání v důsledku většího odporu **plicního řečiště**
- **gen CFTR** (cystic fibrosis transmembrane regulator) je umístěn na chromosomu 7q31
- je exprimován ve specializovaných **epiteliálních buňkách** ve střevní a plicní tkáni
- produktem je protein z 1480 amk, tvoří **chloridový kanál**, regulovaný prostřednictvím cAMP
- účastní se i regulace transportu **sodíkových iontů** přes epiteliální buněčné membrány
- protein má všechny **domény zdvojené** – 2 transmembránové domény a 2 domény pro vazbu nukleotidu a regulační domény (Cl kanál)
- změnou **genetické sekvence** v buňkách došlo k obnovení chloridového transportu – proto je CF reálným kandidátem **genové terapie**
- CF je způsobena více než 1000 různých mutací
  - v **Evropě** je více než 70% mutace deltraF508 – delece fenylalaninu – CFTR protein je degradován již v **ER** a není vestavěn do **membrány**
  - vysoká frekvence této alely je vysvětlována **efektem zakladatele** – předpokládaný vznik mutace před poslední dobou ledovou v Baskicku
  - v **Čechách** je 90% případů způsobeno touto a dalšími 20 nejčastějšími mutacemi – na něj zaměřena DNA diagnostika s **přímou detekcí mutací**
  - postižení jsou často **složením heterozygoti**, některé vzácnější mutace podmiňují mírnější formy CF, které dříve vůbec nebyly **diagnostikovány**
  - mutace v genu CFTR mohou způsobit **kompletní ztrátu proteinu**, defekty v jeho úpravách, defektní regulaci nebo **defektní přenos kanálem**



- DNA analýza však umožňuje v **90% případů přímou DNA diagnostiku** CF a prenatální z buněk plodové vody nebo biopsie trofoblastu
- **symptomatická léčba** je zaměřena na substituci exokrinní sekrece pankreatu, na zkapalnění sekretů **žláz dýchacích cest** a na prevenci a terapii infekcí dýchacích cest
- klonování genu CFTR otevřelo možnost **genové terapie** – inserce normálního CFTR do mutovaných buněk může **korigovat defekt**
- provádí se **klinické zkoušky** s vnesením normálního genomu do plic prostřednictvím **adenovirových** nebo podobných **vektorů**

### Defekt struktury buněk

- příkladem mutace s vlivem na **strukturu buněk** je Duchennova muskulární dystrofie (DMD) a Beckerova muskulární dystrofie (BMD)
- **DMD a BMD** jsou X vázaná **recesivně dědičná** onemocnění, postihující kosterní svaly a v menší míře i sval srdeční a hladké svalstvo
- **DMD**
  - pacienti s DMD jsou po porodu **bez potíží**, ale v dětství se projevuje svalová chabost nohou – obtížně **vstávají z dřepu**
  - lýtka jsou hypertrofická – **tuková pseudohypertrofie**
  - postižení CNS se projevuje **snížením IQ** v průměru o 20 bodů
  - v průběhu dospívání se **svalová ochablost** zhoršuje, pacienti jsou upoutáni na invalidní vozík a nakonec **umírají kolem 20. roku** věku na srdeční nebo dýchací selhání
  - v séru nemocných zvýšená **sérová kreatinkinasa**, která je projevem destrukce svalů (uniká z odumřelých svalových buněk)
  - u žen přenašeček je **manifestace ovlivněna inaktivací X chromosomu**, mohou mít mírné svalové potíže, zvýšenou hladinu **kreatinkinasy** a histologicky prokazatelné postižení některých **svalových vláken** (spolehlivost pro vyloučení nosičství DMD je ale omezená)
  - **DMD u žen** je vzácná – postihuje ženy s karyotypy 45,X0; 46,XY (testikulární feminizace) nebo s **deleci krátkých ramen X chromosomu** (studium osob se strukturálními změnami X vedlo k lokalizaci genu pro DMD)
  - **populační frekvence** je 1 : 3 500, z toho 10-15% případů odpovídá BMD
  - tato vysoká frekvence DMD je **udržována v populaci** vysokou frekvencí nových mutací, třetina případů je podmíněna **novými mutacemi** (četnost mutací 0,0001 – jedna z nejvyšších známých)
  - většina mutací **podmíněna delecemi**, ale jsou popsány i nonsense mutace a sestříhové mutace
  - gen DMD je jedním z **největších známých genů člověka** (2,5 Mb), jeden z prvních genů identifikovaných metodami **pozičního klonování** (Xp21)
- **BMD**
  - **BMD je mírnější**, s pozdějším nástupem klinických projevů, pomalejší progresí, umožňuje dožití **vyššího věku**
- DMD a BMD jsou **způsobeny mutacemi** ve stejném lokusu, závažnější průběh DMD je podmíněn **posunem čtecího rámce**, zatímco u BMD delece postihuje většinou násobky tripletů nebo **celé exony**
- **pacienti s BMD** produkují modifikovaný částečně funkční protein
- **produktem mRNA** je dystrofin z 3685 amk
- **dystrofin**
  - dystrofin je v nepatrném množství **lokalizován na cytoplasmatické straně buněčné membrány** (sarkolemy) svalových buněk
  - stabilizuje membránu s pravděpodobně udržuje **strukturální integritu cytoskeletu** buňky (ukotvuje **molekuly aktinu** v cytoskeletu)
  - jestliže ale v důsledku mutace není **dystrofin** produkován, buňky postupně hynou
  - dystrofin je jen jedním z **více proteinů**, které jsou specifické pro funkci a stavbu svalu
  - jeho objevení ale zdaleka neodhalilo **příčinu všech myopatií**
- **metody molekulární genetiky** umožňují spolehlivou diagnostiku DMD a detekci **heterozygotních žen**, postup je ale složitý a nákladný kvůli **velikosti genu**

- tato diagnostika má ale **rozhodující význam** v prenatalní diagnostice a genová terapie je **předmětem studií**
- jako vektory jsou testovány **adenoviry** v pokusech na myších a zlepšení byla dosažena i mikroinjekcemi cDNA **dystrofinu**

### Onemocnění způsobená dynamickými mutacemi

- příkladem je **expanze trinukleotidů CAG** uložených v kódující oblasti příslušných genů (kóduje glutamin)
- způsobuje např. Huntingtonovu choreu, spinobulbární muskulární atrofii (Kennedyho choroba) a některé druhy spinocerebelární ataxie apod.
- **Huntingtonova chorea (HD)**
  - progresivní **neurodegenerativní onemocnění** s pozdním nástupem (penetrance závislá na věku), charakterizované ztrátou kontroly pohybu a psychickými problémy, včetně **progrese demence** (ztráta svalové koordinace, změna osobnosti, ztráta kontroly tělesných funkcí, smrt)
  - nemoc se obvykle neprojevuje **před 30. rokem věku** (různé)
  - v rodokmenu se projevuje jako **AD dědičnost**, gen je uložen na 4. chromosomu (4p) a kóduje **protein huntingtin**
  - expanze CAG způsobuje **expresi proteinu** a dlouhým polyglutaminovým traktem, proto vznikají toxické **proteinové agregáty** v neuronech a ty pak hynou
  - normální počet CAG je 10-26, u pacientů s 27-35 repeticemi nedochází k projevu choroby, ale jedná se o **premutaci** – při přenosu na další generaci dojde k expanzi
  - 40 a více repetic způsobuje **onemocnění** (plná mutace)
  - při přenosu z generace na **generaci dochází k anticipaci** – v následných generacích se znak manifestuje časněji nebo je průběh **onemocnění těžší**
  - bylo též pozorováno, že k **větší expanzi** dochází při přenosu alely od otce, s tím také souvisí **časnější nástup nemoci**
- příčinou řady **dalších onemocnění** jsou expanze trinukleotidových repetic CTG, CGG, GAA a dalších – jsou uloženy mimo **kódující sekvence genů**
- tyto expanze pravděpodobně **znemožní transkripci** změnou struktury chromatinu nebo **methyloací promotorů**
- příkladem jsou syndrom fragilního X, Friedrichova ataxie, myotonická dystrofie, některé typy spinocerebelární ataxie atd.
- **syndrom fragilního X**
  - jedna z nejčastějších forem **mentální retardace**
  - **výskyt** převážně u mužů 1 : 4000, ženy postiženy jen 1 : 8000
  - **pacienti mají charakteristický vzhled**
    - odstávající velké ušní boltce
    - podlouhlý obličej
    - zvýšená pohyblivost kloubů a makroorchidismus (u chlapců)
  - **mentální retardace** je u žen mírnější a variabilnější než u mužů
  - cytogenetickým vyšetřením buněk v médiu s nízkým obsahem kyseliny listové lze na chromosomu X prokázat místo (nekondenzovaný úsek), které se málo barví a bylo pokládáno za zlom (proto fragilní)
  - onemocnění se dědí **recesivně** vázáno na X, ale ve štěpných poměrech jsou **nestandardní pravidla**
    - **ženy přenašečky** jsou často mírně mentálně retardovány, ale bez somatických projevů
    - **variabilita v expresi** a nízký stupeň penetrance u žen je projevem činnosti druhého chromosomu X a závisí i na variacích v inaktivaci X chromosomu
    - část mužů fraX pouze **přenáší** (přenašeči), bez klinických projevů
    - bylo zjištěno, že matky přenašeček mají postiženou mnohem menší část synů než jejich dcery
    - **dcery přenašeček** pak jsou zdravé, ale jejich synové mohou být mentálně postižení
    - tento jev, který neodpovídá **pravidlům X vázané dědičnosti** se nazývá **paradox Shermanové**

- je způsoben **rozdílným zmnožením repetit** v premutacích při přenosu ženami nebo muži
- **jedná se o gen FMR1 (FRAXA)**, kde u zdravých jedinců nacházíme 6-50 kopií CGG tripletů a u nemocných 230-1000 kopií i více
- **FMR1** je intenzivně exprimován v testes a mozku
- při přenosu **premutace na potomstvo ženami** vzniká plná mutace – 4000 repetit, u mužů je zmnožení malé nebo žádné
- bylo nalezeno i další místo poblíž, taktéž s **repeticemi CGG**, pro odlišení nazváno **FRAXE (FMR2)**

### Prionové choroby

- priony jsou částice schopné **vyvolat onemocnění**
- jsou tvořeny pouze **proteiny**, přesto mohou být přenášeny **vertikálně** (familiární choroby) i **horizontálně** (na ostatní jedince) a vyvolávat zejména poruchy nervového systému, tzv. prionové choroby
- u člověka známo zatím **několik chorob**
  - **Creutzfeldt-Jacobova choroba**
    - charakterizována demencí
    - doprovázena psychickými poruchami
    - končí smrtí
  - **Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom**
  - **kuru**
    - postihuje kanibaly na Nové Guineji
  - **familiární nespavost**
- **u zvířat** jsou to např. scrapie u ovcí, nemoc šílených krav a další.
- normální savčí prion je buněčný glykoprotein (PrP<sup>C</sup>) z 253 aminokyselin, kódovaný u člověka na **krátkém raménku 20. chromosomu**
- jeho konformace je odlišná od **infekčního PrP<sup>Sc</sup>**, přestože oba mají stejnou amk sekvenci
- interakce těchto dvou proteinů změní **konformaci normálního prionového proteinu** na konformaci, která je **patogenní**
- to se projeví ukládáním **abnormálních proteinů**, tzv. amyloidů v postižených buňkách
- **patogenní prion** je rezistentní vůči proteasám, vůči UV záření, má sklon k shlukování a nevyvolává **imunitní odpověď**
- obě formy jsou součástí **povrchových membrán buněk**, zejména neuronů
- dosud není přesně známo, jakým způsobem vzniká **neurotoxická forma proteinu**
- problematika onemocnění podmíněných **prionovými partikulami** je intenzivně studována, protože získané poznatky mohou ovlivnit pochopení a léčbu dalších **degenerativních onemocnění**

## 65. Genetická informace mitochondrií, mitochondriální choroby

- mitochondrie jsou **semiautonomní organely**, mají vlastní DNA, jsou schopné autoreprodukce
- **původ mitochondrií** se odvozuje od symbiozy Archeobaterií s eukaryotními buňkami
- mitochondriální **genom** je velmi odlišný od jaderného, připomíná uspořádáním genom **prokaryotický**
- při oplození předává spermie pouze svůj **jaderný genom**, zygota tedy obsahuje mateřské **mitochondrie**, a proto se mitochondriální genom dědí **maternálně**
- na jednu **mitochondrii** připadá zhruba **10 molekul DNA**
- **genom mitochondrie** tvoří cirkulární dsDNA (16 569 bp)
- řetězce DNA mají **odlišné složení bází**
- rozlišuje se **těžký řetězec H**, který je bohatý na guaniny, a **lehký řetězec L** bohatý na cytosiny
- malý úsek DNA je tvořen **3 vláknovou DNA** – vzniká opakovanou syntézou malého úseku H (7S DNA)
- **genom mitochondrií** obsahuje 37 genů – 22 kóduje mt tRNA; 2 rRNA (23S, 16S), které jsou složkami malé podjednotky **mt ribozomů**

- dále obsahuje **13 genů** kódujících polypeptidy, které jsou syntetizovány na **mt ribozomech**
  - **polypeptidy**: cytochrom B, 7 podjednotek NADH dehydrogenázy, 3 podjednotky cytochromoxidázy, 2 podjednotky ATPázy
- tyto polypeptidy jsou součástí **komplexů oxidativní fosforylace**
- **odlišnosti mitochondriálního genomu** od jaderného
  - **4 terminální kodony** – UAA, UAG, AGA, AGG
  - **UGA** kóduje tryptofan /stop kodon/
  - **AUA** kóduje metionin /isoleucin/
- **mitochondriální genom** kóduje všechny rRNA a tRNA, které potřebuje k proteosyntéze
- mitochondrie obsahuje **22 tRNA**, které rozpoznávají 60 kodonů
- **antikodony 8 tRNA** rozeznávají rodiny 4 kodonů (liší se pouze bazí na 3. pozici tripletu)
- 93% sekvence DNA má **kódující charakter**
- geny neobsahují **introny**
- kódující sekvence některých genů se **překrývají**
- V oblasti **D smyčky** je uložen počátek replikace H, který je syntetizován podle **sekvence L**
- **počátek replikace L** je zpřístupněn až po replikace cca **2/3 dceřiného H řetězce**
- v oblasti smyčky je uložen **promotor** pro transkripci obou řetězců
- **transkripce**
  - začíná v **promotoru**, pokračuje v **opačných směrech** podle obou vláken, vzniká velké množství multigenních transkriptů
  - transkripty jsou rozštěpeny za vzniku **zralých molekul RNA**
- mitochondrie vznikají **autoreprodukcí** a při mitóze se **náhodně rozcházejí** do dceřiných bb
- **sekvence mt DNA** jsou velmi použitelné v **evolučních studiích**
- **maternální způsob dědičnosti** zajistí homoplasmii (= mtDNA jsou u normálního jedince 99,9 % identické) v somatických tkáních potomků
- změny v mtDNA mohou být použity pro sledování **divergence v populaci** => současná lidská populace pochází z **1 ženy**, která žila asi před 200 000 lety
- tento odhad je **kontroverzní** - závislost na stabilitě mutační frekvence, velikosti populace

#### Mutace v mitochondriálním genomu

- v každé somatické b jsou **tisíce kopií** mt genů, nejvíce v bb s vysokými energetickými nároky
- molekuly mtDNA jsou u **normálního jedince** z 99,9% identické = **homoplasmie**
- **frekvence mutací** v mt genomu je vysoká (10x vyšší než DNA), a pokud se nová mutace rozšíří v populaci mtDNA, jsou výsledkem 2 mt genotypy (event. Více) = **heteroplasmie**

#### Mitochondriální choroby

- **mutace mtDNA** jsou zřejmě způsobeny nedostatkem opravných systémů a možným **poškozením mtDNA** volnými radikály, které se uvolňují v průběhu **oxidativní fosforylace**
- mutace mohou vést k některým **dědičným onemocněním**, které vykazují **maternální přenos**
- mutace postihují proces **oxidativní fosforylace**, a proto se projevují ve tkáních citlivých na **nedostatek energie**
- souvisejí s řadou **degenerativních onemocnění** např. CNS, svalů, srdeční tkáně, endokrino, ledvin, jater
- řada **proteinů mitochondrií** je kódována jadernou DNA => defekty struktury a fce mitochondrií mohou být podmíněny i **mutacemi jaderné DNA** (dědí se Mendelovským způsobem)
- **průběh** a závažnost onemocnění závisí na řadě **faktorů** (poměr normálních, mutovaných molekul mtDNA)
- **buňka** = 100vky mitochondrií = až 10 molekul DNA (v 1 mt)
- **homoplasmie** = všechny bb jsou buď normální, mutované
- **heteroplasmie** = normální i mutované molekuly mtDNA
- počet mt **onemocnění** stále vzrůstá
- **Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON)**

- nejčastější mutací je **missence mutace** v genu kódující protein, který katalyzuje přenos NADH na koenzym Q
- onemocnění je **vzácné** (1 : 50 000)
- vyvíjející se **ztráta vidění**, oboustranná slepota jako důsledek degenerace optického nervu
- častěji **muži** před 25. rokem
- **heteroplasmie** je vzácná, rodokmeny vykazují mt dědičnost
- **bodové mutace** – substituce v genech pro tRNA
  - např. myoklonická epilepsie doprovázená demencí; ataxie (nekoordinované sval. pohyby) a myopatie
  - mitochondriální myopatie a encefalopatie (epizody podobné mrtvici)
- **substituce v mt genech** pro rRNA má za následek jednu z forem **hluchoty**
- **delece** – syndromy
  - **Kearns-Sayre** (svalová slabost, postižení mozečku, srdeční nedostatečnost)
  - **Pearson syndrom** – infantilní insuficience pankreatu, pancytopenie, acidosa
  - chronická progresivní oftalmoplegie
- známo více než 50 **bodových mutací**, 100 delecí a duplikací mtDNA

### Neurologické příznaky mitochondriálních chorob

- obrna okohybných svalů, mozková mrtvice u mladého člověka, křeče, poškození zrakového nervu, svalové poškození, únava, neschopnost fyzické zátěže, ataxie, demence, periferní neuropatie, kalcifikace bazálních ganglií

### Projevy poškození jiných orgánů

- poruchy vedení srdečního vzruchu, kardiomyopatie, diabetes mellitus, šedý zákal, laktátová acidóza (=defekty mitochondrií mohou vést k poruchám oxidativního metabolismu a k hromadění laktátu), poškození ledvinných glomerulů, poškození sluchu, poškození jater, poškození slinivky, intestinální pseudoobstrukce, epizodické zvracení, pancytopenie, deprese

## 66. Přímá diagnostika dědičných chorob analýzou nukleových kyseliny

- metody umožňují **přímo zachytit a identifikovat** mutaci zodpovědnou za onemocnění u postižených ve sledované rodině
- **podmínky**
  - znalost **lokalizace** genu
  - znalost jeho standardní **sekvence**
- stejné onemocnění může být podmíněno u **nepříbuzných osob** jinou mutací v témže genu – tzn., že v genech populace bylo zjištěno velké množství **různých mutací**
- u většiny osob s **recesivně podmíněným onemocněním** se vyskytují 2 mutace na různých místech genu, každá na 1 **homologním chromozomu**
- tito jedinci se označují jako složení **heterozygoti**
- mutovaný fenotyp závisí na místě mutace v genu a na **typu mutace**
- **testování** začíná v úsecích genu s nejvyšším výskytem mutací, při negativním výsledku se **postupuje dále**
- po zjištění mutace jsou **vyšetřeni příbuzní nemocného** na výskyt této mutace
- určíme nosiče mutované alely až se **100% pravděpodobností**
- někdy je možné na základě **umístění mutace** předpokládat klinické projevy

### Metody detekce mutací

- **stanovení difference** mezi sekvencí pacienta a popsanou **standardní sekvencí**, nerozlišují se fenotypové projevy
- metody, které stanoví jakoukoliv odchylku od **standardní sekvence**

- většina metod **používá PCR**
- převážnou část genů nelze díky jejich velikosti vyšetřit v **1 reakci** → jsou pomocí zvolených párů primerů postupně **amplifikovány** jednotlivé úseky genu
- počet **amplifikovaných oblastí** je závislý na velikosti genu
- u **středně velkých genů** (tisíce bp) může vyšetření kódující oblasti genu vyžadovat více než 50 **amplifikačních reakcí**
- amplifikované úseky jsou pak vyšetřeny některou z **následujících metod**
- **heteroduplexní analýza**
  - založena na **detekci chybného párování bazí**, ke kterému dochází při hybridizaci **komplementárních vláken DNA** standardního a mutantního typu
  - vznikají hybridní molekuly DNA = **heteroduplexy**
  - **heteroduplexy** se tvoří v místech s delecemi nebo insercemi několika bazí i v místech se substitucemi 1 nebo několika **nukleotidů**
  - mohou vznikat již v **průběhu PCR**, když testovaná DNA obsahuje 2 různé alely
  - lze je připravit **tepelnou denaturací** produktu PCR a následným zchlazením na teplotu, při které dochází k **renaturaci** – výsledkem je vznik 2 typů **homoduplexů** – standardního a mutantního, a 2 různých **heteroduplexů**
  - při detekci mutací v **homozygotním stavu** nebo mutací X-vázaných je nutné smísit **produkty PCR** standardní a mutantní DNA a opět provést denaturaci a renaturaci DNA
  - přítomnost **heteroduplexů** lze odhalit elektroforézou v polyakrylamidovém gelu – pohyb heteroduplexů je pomalejší než pohyb **homoduplexů**
  - tvorba heteroduplexů a jejich **stabilita** závisí na typu mutace ve fragmentu PCR
- **metoda DGGE**
  - založena také na **analýze heteroduplexů**
  - heteroduplexy a homoduplexy připravené **podobným postupem** jako u HA migrují při **elektroforéze gelem**, který obsahuje lineárně se zvyšující množství denaturačních činidel (**urea a formamid**)
  - elektroforéza probíhá při **konstantní zvýšené teplotě**
  - **migrace** pokračuje až do místa v gelu, kde se vlákna DNA začínají od sebe **separovat** – v místě, kde koncentrace denaturačních činidel odpovídá teplotě ( $T_m$ ), při které dochází k **částečné denaturaci** vyšetřovaného fragmentu DNA
  - $T_m$  – teplota, kdy je polovina vláken **dvoušroubovice DNA** disociovaná nebo denaturovaná
  - **migrace parciálně denaturovaného fragmentu** DNA se značně zpomalí nebo zastaví, DNA heteroduplexy jsou méně stabilní a proto se jejich vlákna částečně separují dříve než vlákna **homoduplexů** → zpomalí svou mobilitu v gelu a migrují do **jiné pozice**
  - za optimálních podmínek je **DGGE** vysoce citlivá metoda, která zachytí delece a inserce, i difference v **1 páru bazí** (substituce) mezi standardním a mutantním vláknem DNA
- **chemické nebo enzymatické štěpení heteroduplexu**
  - metoda založená na **detekci heteroduplexů**, které jsou po smísení testované a kontrolní standardní **sekvence DNA** připraveny stejným způsobem jako u HA
  - používají se **chemikálie** (hydroxylamin, piperidin,  $OsO_4$ ) nebo **enzymy bakteriofágů** (uplatňují se v opravném systému DNA), které jsou schopny štěpit heteroduplex v místě, kde není úplná komplementarita obou vláken
  - **elektroforéza** pak prokáže přítomnost štěpených nebo neštěpených fragmentů testovaného **řetězce DNA**
  - metoda je velmi **citlivá**
  - umožňuje odhadnout pozici **mutace podle velikosti štěpeného fragmentu**
  - používané chemikálie jsou **velmi toxické** a metoda se nevyužívá v diagnostické praxi
- **metoda SSCP**
  - založena na **analýze ssDNA**
  - ssDNA má tendenci vytvářet **třírozměrnou strukturu** (konformaci) stabilizovanou slabými **intramolekulárními vazbami** (H-můstky)

- **elektroforetická mobilita** takových struktur v gelu závisí na jejich délce a jejich konformaci, která je dána složením **sekvence DNA**
- metoda využívá **metody PCR**
- **amplifikovaný** úsek DNA je denaturován a nanesen na polyakrylamidový gel
- jestliže je ve **vyšetřovaném úseku DNA** přítomna mutace, pak ssDNA zaujmou odlišnou konformaci → odlišná pohyblivost v gelu ve srovnání s **kontrolními vzorky vláken DNA**
- **vizualizace vláken DNA** – stříbřením, radioaktivním značením oligonukleotidů pro PCR
- méně **citlivá metoda** než DGGE
- **metoda PTT**
  - specifická pro **detekci mutací**, které mají za následek vznik předčasného **terminačního kodonu** a tím zkrácení proteinového produktu
  - z izolované RNA (mRNA) je **reverzní transkripce** a následnou PCR připravena cDNA a pak je provedena transkripce a translace in vitro
  - velikost proteinového produktu je **testována elektroforeticky** a srovnána s délkou **standardního produktu**
  - pro vyšetření těch genů, kde se vyskytují mutace **posunové a nesmyslné**, ve kterých jsou vzácné mutace měnící **smysl kodonu**
  - podle velikosti proteinového produktu lze určit **přibližnou lokalizaci** detekovaných mutací ve vyšetřovaném genu
- **metody sekvenování**
  - spolehlivě odhalí odchylky v **nukleotidové sekvenci DNA**
  - velmi **pracné a drahé**
  - používá se většinou v **závěrečné fázi vyšetření genu** – je sekvenován pouze úsek genu s **prokázanou mutací**
- **RT – PCR**
  - výchozím **materiálem je RNA**
  - pomocí reversní **transkriptázy** je konvertována do cDNA
  - umožňuje testovat **větší úseky**, než je průměrná délka exonů, zachytí aberantní sestřih, aktivaci **kryptického místa sestřihu** – při testování genomické DNA mnohem hůře **testovány**
  - **nevýhody**: RNA je rychle degradována, sledovaný gen nemusí být v dané tkáni **exprimován**
- **záchyt velkých delecí**
  - zachytitelné **Souther blottingem**, metoda **FISH** (Fluorescenční in situ Hybridizace), **CGH** (Komparativní Genomická Hybridizace)
  - použití **kvantitativní PCR** – akumulace produktu je měřena v reálném čase – R-T PCR
- **DNA čipy**
  - **miniaturizace**, využití automatického počítačového hodnocení výsledků
  - rychlá analýza **velkého počtu mutací** v jedné reakci
- **metody detekce specifických mutací**
  - metody určující **specifickou mutaci**
  - u nemocí, které se vyznačují pouze **jednou mutací**, nebo omezeným počtem mutací v **populaci**
  - cystická fibroza, achondroplazie, srpkovitá anemie
  - **PCR-RFLP**
    - mutačně specifický **polymorfismus** v délce restrikčních fragmentů
    - mutace vytváří, nebo ruší **restrikční místo** pro určitý restrikční enzym a zároveň je **příčinou onemocnění**
    - PCR se **amplifikuje úsek DNA** s místem pro restrikční enzym, restrikce enzymem, elektroforéza
    - **velikost produktů PCR** zjištěná na gelu odhalí přítomnost/nepřítomnost mutace
  - **ASO**

- **alelně specifické oligonukleotidy** jsou syntetizovány k detekci bodové nukleotidové difference v **sekvenci DNA**
- 15-19 nt krátké řetězce **komplementární k sekvenci genu**, která obsahuje místo se **záměnou nukleotidu**
- po označení je lze použít jako **sondy DNA**, které hybridizují s amplifikovanou cílovou DNA
- **ASO dané oblasti** – komplementární buď k standardní DNA, nebo k mutované
- poté **Southern Blotting**
- **diagnostika expanze trinukleotidů**
  - **Huntingtonova choroba** spočívá v amplifikaci oblasti genu, která obsahuje repetic, a elektroforéze **produktů PCR**
  - počet repetice souvisí s **rozvojem onemocnění**

## 67. Nepřímá diagnostika dědičných chorob analýzou NK

- je známa lokalizace genu, ale nemusí být známa jeho **přesná nukleotidová sekvence**, nebo dosud nejsou charakterizovány jeho **mutace** zodpovědné za vznik **onemocnění**
- využívá **vazebné analýzy** pomocí signálních znaků DNA (DNA markerů)
- **markery** - polymorfismy DNA, které jsou lokalizovány v **těsném sousedství** nebo uvnitř **sledovaného genu** a s vlastním onemocněním nesouvisejí
  - **RFLP** – detekce PCR
  - **VNTR** (Variable number of tandem repeats) – variabilní minisatelitní sekvence – detekce pomocí **Southern blotting**
  - **DNA fingerprinting** – při analýze RFLP – použijeme sondu zaměřenou na minisatelitní DNA – vysoký stupeň **polymorfismu restričních fragmentů** v lidské populaci
- **mikrosatelity (SSRs - single sequence repeats)**
  - 1. diagnostika na **úrovni analýzy DNA**
  - vychází z **rodové studie**, při které jsou použity markery vázané s genem, jehož mutace způsobují onemocnění v rodině
  - **tyto markery** jsou spolu se sledovaným genem přenášeny z rodičů na potomky
  - **cílem**
    1. **rozlišit chromosomy rodičů**, z nichž jeden může přenášet mutovaný gen – najít polymorfismus, který je ve vazbě se sledovaným genem, a pro který je rodič **heterozygot**
    2. zjistit,  **která z alel markeru segreguje s mutovanou alelou** sledovaného genu – můžeme to zjistit **vyšetřením dalších příbuzných** v rodině, postižených i **zdravých**
    3. pomocí **zvolených markerů** zjistit, který chromosom byl přenesen na probanda, eventuálně na další **členy rodiny**, zejména osoby v riziku
  - musí být **vyšetřeny vzorky DNA** co největšího počtu členů rodiny – vyšetření musí být nejméně 2 postižení v rodině a další příbuzní včetně **zdravých partnerů**
  - jen tak je možné **sledovat segregaci chromosomů** se zvoleným polymorfismem DNA a mutací ve **sledovaném genu**
  - pak je možné určit, zda **osoby v riziku** zdědily mutantní či normální alelu s vysokou pravděpodobností, která je závislá na **síle vazby** mezi markerem a sledovaným genem
  - **vazebná studie** - nemůžeme opomenout možnost rekombinace mezi sledovaným genem a markerem – vhodné použít **intragenový marker**, kde je pravděpodobnost **rekombinace minimální**
  - **velikost chyby** v diagnóze v důsledku rekombinace může být značně zredukována tím, že jsou použity **2 markery lokalizované na opačných koncích** sledovaného genu – vzniklou **rekombinací** lze pomocí nich zjistit a vyloučit falešnou predikci



- metoda je **rychlá a spolehlivá**
- markery vázané se **sledovaným genem**, zjištěné u matky a otce, nejsou vždy odlišné (tj. jedinec je pro ně homozygotní) a vyšetření potom není **informativní**
- provedení **nepřímé DNA diagnostiky** je závislé na dostupnosti DNA rodičů a dalších **příbuzných probanda**
- **RFLP**
  - polymorfismus v délce **restrikčních fragmentů**
  - **záměna nt** vedoucí k RFLP nemusí být vždy základem pro **vznik onemocnění**
  - většinou je to neutrální změna **bez funkčních následků**
  - mutace, které způsobí onemocnění se dědí **mendelovským způsobem**
- **detekce mikrosatelitů**

## 68. Fyzické metody genového mapování

### Metody s nízkým stupněm rozlišení (kb)

- **hybridomová technika**
  - základem bylo vytvoření **husté sítě marker-genů** v genomu
  - **hybridomové techniky** jsou založené na hybridizaci **2 druhů buněk** (člověk – myš) v tkáňové kultuře
  - za vhodných podmínek vzniká **buněčný hybrid**, který postupující řadou dělení
  - postupně náhodně **ztrácí chromosomy lidského původu**
  - po určitém **počtu dělení stabilizace**, kdy buňky mají karyotyp z chromosomů hlodavce a několika **chromosomů lidských**
  - **klonování buněk** - panel klonovaných buněk, na kterých zjišťujeme přítomnost vhodného znaku, který je specifický pro **lidské buňky**
  - při **pozitivním výskytu znaku** - cytogenetická analýza, které chromosomy člověka jsou v klonu přítomny
  - gen podmiňující **danou vlastnost** je tedy lokalizován na určitý chromosom **porovnáním přítomnosti** (nepřítomnosti) **znaku** a přítomnosti (nepřítomnosti) určitého **chromosomu** na panelu buněk
  - využívá se též k **lokalizaci genu** na určitém chromosomu
- **FISH metoda (Fluorescence in Situ Hybridizace)**
  - lokalizace genů pomocí **technik hybridizace DNA**
  - vhodně označená **sonda** + preparát **chromosomů**
  - **denaturace DNA** chromosomů v preparátu + „obarvení“ fluorescenčně značenou sondou, která se specificky **fixuje na denaturovanou DNA** chromosomů a místo její lokalizace prokážeme **mikroskopicky**

### Metody s vysokým stupněm rozlišení

- **cíl**: získání map jednotlivých chromosomů, které jsou představovány **pořadím bazí** jednotlivých nukleotidů
- využívají často **materiál genomových** a chromosomově **specifických knihoven**
- **ORF (Opening Reading Frame)** - k vyhodnocování kódujících sekvencí = metoda otevření **čtecích rámečků**
- principem je **prohledávání databáze** sekvenčních údajů na přítomnost **stop-kodonů**, které jsou od sebe **dostatečně vzdáleny**
- **poziční klonování** - využívá informace o lokalizaci genu na určité pozici některého chromosomu
- pátrání po **funkčním genu** je pak lokalizováno na **omezenou část DNA** v okolí této pozice

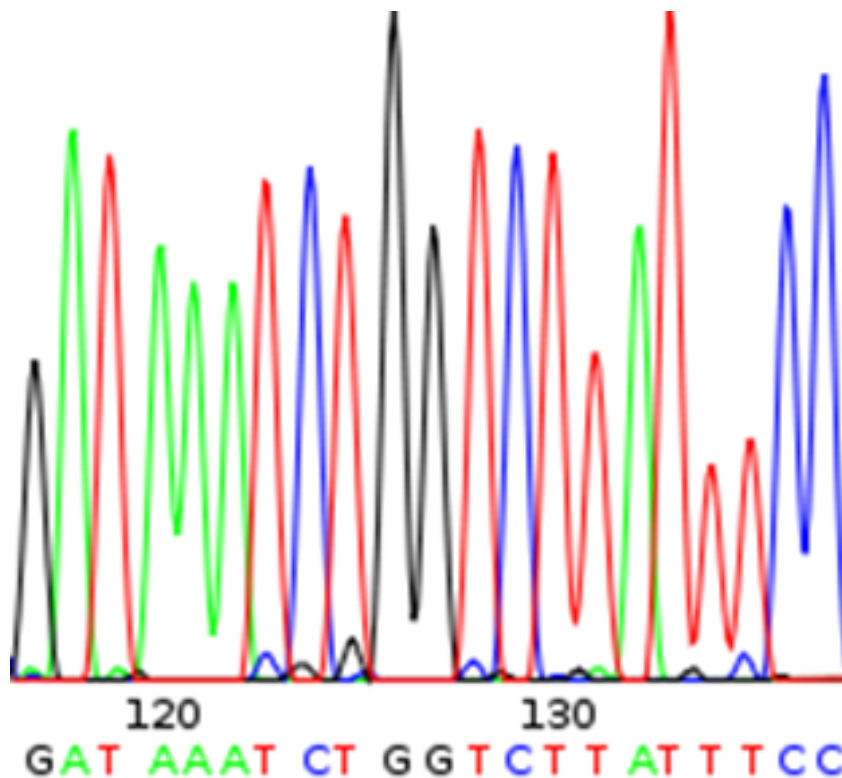
## 69. Mapa lidského genomu, Human Genome Project, výsledky a využití

- během několika příštích let **největší mezinárodní projekt** v biologii - **Projekt lidského genomu** (the Human Genome Project) dosáhne svého cíle
- 26. června 2000 dva nezávisle na sobě **pracující vědecké týmy** ze Spojených států a z Velké Británie (the National Human Genome Research Institute, Celera Genomics,) oznámily dokončení **mapování lidského genomu**
- tento **vědecký mezník** byl přirovnán k objevu štěpení atomu ve fyzice nebo k chůzi člověka po **povrchu Měsíce**
- výzkumníkům se podařilo tzv. **sekvenováním** určit pořadí asi 3,5 miliardy purinových a pyrimidinových bází DNA (adenin, cytosin, guanin a thymin) ve všech **genech**
- posledním, avšak nejobtížnějším krokem je **popis genetického kódu**, kdy vědci musí identifikovat každý gen a **jeho funkce**
- očekává se, že tento **poslední krok** bude dokončen během několika následujících let
- lékaři budou schopni vypracovat **genetický profil svých pacientů**, z něhož budou schopni určit náchylnost vůči různým chorobám a zvolit vhodnou **strategii léčby**
- **geny a genom**
  - **geny** - základní jednotky dědičné informace
  - tato dědičná informace je uložena v **deoxyribonukleové kyselině (DNA)**
  - každý gen obsahuje **genetický kód** pro produkci různých strukturních nebo funkčních proteinů
  - tyto proteiny buď slouží jako **stavební kameny** buněk a buněčných organel nebo zastávají v buňkách různé **funkce**, jako například **enzymy**, které řídí metabolismy látek (glycidů, lipidů, aminokyselin, nukleotidů, v rostlinách alkaloidů, atd.), **glykoproteiny** a **lipoproteiny**, které se nacházejí v buněčné membráně a ovlivňují její propustnost, nebo **nukleoproteiny**, které se nacházejí v buněčném jádru a mají význam pro dělení buněk
  - tisíce až stovky tisíc genů tvoří **genom**
  - genomy nejsou pouze **souborem genů**
  - geny kromě podstatné informace **obsahují oblasti**, které nekódují žádné proteiny a jejich účel je **nejasný**
  - odhaduje se, že asi 90 až 95 procent lidské DNA nekóduje **žádné proteiny**
  - genetika studuje **dědičné znaky** organismů
  - "otcem" genetiky je brněnský mnich Gregor Mendel, který objevil a statisticky studoval **dědičné znaky rostlin**, zejména barvu květů a výšku hrachu
  - britský biolog J.B.S. Haldane studoval **genetické znaky** indiánských rodin
  - na základě svých výzkumů se **řada autorů** domnívala, že jeden gen určuje jeden **dědičný znak**
  - později se ukázalo, že **jednoduchý vztah genu a dědičného znaku** je spíše výjimkou
  - je zcela běžné, že několik různých genů vede ke stejnému **dědičnému znaku**
  - některé geny zase **působí společně**
  - kromě **genetické informace** na projev určitého dědičného znaku působí také prostředí
  - genomy organismů nejsou **statické**
  - geny během **reprodukce organismu** (dělení buněk) mohou mutovat
  - nová generace buněk pak obsahuje v genech **určité změny**
  - tyto změny vedou k novým **variacím genetických znaků** a selektivní tlak (schopnost adaptace vůči vnějšímu prostředí) vybírá **nejúspěšnější organismy**
- první "**velký vědecký projekt** v oblasti biologie", šestý ze "sedmi divů současného světa" - takto by se dal charakterizovat popis projektu **lidský genom** (Humane Genome Project), mezinárodního úsilí zaměřeného na "**dekódování**" člověka
- **cíle**
  - genetická **mapa** lidského genomu
  - **fyzická mapa**: marker každých 100 kbp
  - sekvenování **modelových organismů** (E. coli, S.cerevisiae, C. elegans, Drosophila, myš)
  - objevit všechny **lidské geny** (předpoklad je 60-80 tisíc)
  - sekvenování celého **lidského genomu** (4000 Mbp) do r. 2005

- v roce 1988 vytvořila mezinárodní skupina vědců organizaci HUGO (Human Genome Organization)
- jejím cílem je koordinovat v účastnických zemích práci vědců, kteří se zabývají výzkumem genomu
- HUGO má k dispozici asi 3,5 miliardy dolarů na to, aby vědci vložili výsledky své práce do počítačové databáze
- dříve než začal projekt Lidský genom, měli vědci o naší genetické soustavě hodně informací
- byly dobře známy takové pojmy jako "geny", "chromozómy" a "DNA"
- projekt Lidský genom se nyní snaží na tomto základu stavět a dešifrovat celý náš genetický kód
- únor 2001: International Human Genome Sequencing Consortium publikuje draft lidského genomu v časopisu Nature 15.2.2001.
- Celera Genomics, Inc. publikuje svou sekvenci lidského genomu v časopisu Science 16.2.2001
- určení pozice genů
  - prvním cílem projektu Lidský genom je zjistit, kde na chromozómech jsou naše geny umístěny
  - výzkumníci studují rodiny, aby lokalizovali ty geny, jež určují dědičné charakteristiky a známé znaky
  - na úsecích jednoho chromozómu objevili např. geny způsobující barvoslepost, hemofilii a rozštěp patra
  - říká se tomu mapování genetických vazeb
  - tyto mapy jsou velmi nepřesné - ukazují umístění genů až na pěti miliónech párů bází
  - vědci se snaží vytvořit fyzickou mapu, aby se lokalizace genů na chromozómech zpřesnila
  - jedna metoda spočívá v tom, že se kopie DNA rozbijí na různě velké části
  - ty se vloží do gelu a nechá se na ně působit elektrický proud
  - výsledné skvrny se potom přenesou na tenkou nylonovou membránu
  - přidá se radioaktivní genová sonda a obsah membrány se vyfotografuje
  - výsledkem je otisk DNA
  - na různě velkých fragmentech DNA se potom zkoumají sekvence (pořadí) zvláštních genetických markerů
  - je samozřejmé, že čím více kousků DNA vědci mají, tím obtížnější je jejich rozřídění
  - tyto fyzické mapy omezují hledání genů na 500 000 párů bází
  - koncem roku 1993 vytvořil tým vědců vedený dr. Danielem Cohenem z Center for Study of Human Polymorphism (Středisko pro studium polymorfismu člověka) v Paříži to, co časopis Time nazval "první genetickou mapou lidského genomu" - i když ještě ne přesnou
- čtení genomu
  - geny činí jen 2 až 5 procent našeho genomu
  - zbývající část se často označuje jako "odpadní DNA"
  - někteří vědci se kdysi domnívali, že tyto takzvané nadbytečné sekvence se náhodně vyvinuly během evolučního procesu
  - nyní jsou vědci toho názoru, že některé z těchto negenových oblastí regulují strukturu DNA a obsahují instrukce, které chromozómy potřebují k tomu, aby se mohly kopírovat během buněčného dělení
  - vědci se už dlouho zajímají o to, co geny "zapíná" a "vypíná"
  - až 10 000 našich genů by mohlo určovat kód pro produkci proteinů zvaných transkripční regulátory
  - několik takových proteinů se zřejmě spojí a zapadne do rýhy v DNA jako klíč do zámku
  - když se tyto proteiny dostanou na patřičné místo potom sousední geny buď aktivují nebo jejich činnost potlačují
  - dále existují takzvané "koktající geny", které obsahují mnoho opakování částí chemického kódu
  - jeden z těchto genů obsahuje běžně 11 až 34 opakování trojice CAG - sekvencí tří nukleotidů, které určuje konkrétní aminokyselinu
  - jestliže se v tomto genu tato trojice vyskytuje více než třicet sedmkrát, způsobuje to degenerativní mozkovou poruchu zvanou Huntingtonova choroba
  - co může způsobit změna jednoho písmenu v genu? - špatné písmeno v sekvenci 146 písmen v jedné ze dvou složek hemoglobinu vyvolává srpkovitou anémii

- lidské tělo má sice korekční mechanismus, který kontroluje věrnost DNA při buněčném dělení, ale v tomto systému může dojít k chybě
- příčinou mnoha nemocí jako například cukrovky a srdečních chorob není pouze jedna genetická vada
- tyto nemoci jsou výsledkem součinnosti mnoha defektních genů
- přepis genomu
  - lékaři očekávají, že jim projekt Lidský genom poskytne informace, které jim pomohou diagnostikovat a léčit mnohé lidské nemoci
  - vyvinuli již testy, které odhalují určité abnormality v určitých genových sekvencích
  - vědcům a lékařům nestačí jen čtení "knihy života", ale chtějí také do ní psát
  - jednou z možností, jak to lékaři mohou dokázat, je použít retroviry
  - virus lze považovat za skupinu genů v chemickém obalu
  - vědci odstraní geny, které virus ke své reprodukci potřebuje a nahradí je zdravou verzí pacientových defektních genů
  - když se virus vpraví do těla, pronikne do příslušných buněk, a defektní geny nahradí zdravými geny, které nese
  - tyto postupy budí sice úžas, ale využívání genetického inženýrství je omezeno přísnými kontrolami
  - o složitém genomu zbývá objevit ještě mnoho
  - genetik Christopher Wills říká: "Neexistuje jediný lidský genom. Je jich pět miliard - jeden pro každou lidskou bytost na planetě"
- výsledky
  - klasifikace eukaryotické genomové DNA
  - podle "sbalenosti"
    - euchromatin
    - heterochromatin
  - podle opakování
    - vysoce repetitivní
    - středně repetitivní
    - nerepetitivní
  - podle funkce
    - strukturní (centromery, telomery)
    - kódující (protein nebo RNA)
    - nekódující
    - regulační oblasti
    - spacer, "junk DNA", "selfish DNA"
- velké rozdíly mezi chromosomy
  - chromosom 1: 2968 genů
  - chromosom Y: 231 genů
  - oblasti bohaté na geny ("města")
    - více C a G
  - oblasti chudé na geny ("pouště")
    - více A a T
  - CpG ostrůvky - "bariéra mezi městy a pouštěmi" - regulace genové aktivity
- solitární gen
  - v celém genomu v jediné kopii (asi polovina genů)
- genová rodina
  - skupina genů evolučně pocházející z jediného genu, v evoluci postupná diverzifikace sekvence a funkce
- pseudogen
  - gen který zmutoval natolik že nemůže být přepisován (v celém genomu > 20 000 !)
- zpracovaný ("processed") pseudogen
  - pseudogen vzniklý zpětným přepisem mRNA a integrací do genomu

- **sekvence** jakýchkoliv dvou lidských bytostí se liší v **jedné bázi** na 1000 bp, tj. pouze v 0,1 % genomu!!!



## 70. Genové terapie – principy, současné možnosti a její perspektivy

- rychlý rozvoj biotechnologií umožnil provádět **genetické manipulace**
  - kultivovaných buněk
  - pokusných živočichů
- tím umožnil i výzkum **životních jevů**, včetně procesů, vedoucích k **nemoci**
- genetické manipulace úzce souvisejí s přenosem genu do buněk, což je využíváno k
  - studiu genové exprese a funkce
  - vytváření **modelů** lidských nemocí u živočichů
  - produkci **rekombinantních** proteinů
  - genové **terapii**
- **sekvence DNA**, která je vnesena do buněk se nazývá transgen
- pokud je gen **přenesen do buněk** zárodečné linie, vzniká transgenní organismus
  - všechny jeho buňky obsahují **vnesený gen**
  - plně transgenní organismus vzniká z **transgenní zygoty**
  - její vznik je umožněn vnesením genu do **zárodečných buněk**, do gamet nebo do oplozeného vajíčka (před prvním dělením)
  - další možnost je vnesení DNA do buněk embrya v časném stádiu po **prvním dělení**, tak aby buňky, z nichž budou vznikat gamety, již byly **transgenní**
  - pak **splynutím těchto gamet** vzniká transgenní organismus
- **genetická modifikace** savců může spočívat i v tzv. klonování
  - jeho podstatou je **přenos jádra** somatické buňky dospělého organismu do oocyty, ze kterého bylo **původní jádro** odstraněno
  - implantace **oocyty do dělohy** pokusného zvířete a jeho další vývoj vede ke vzniku geneticky modifikovaných organismů (GMO)
  - tyto pokusy mimo jiné ukázaly, že **genomy buněk** dospělého organismu mohou být přeprogramovány oocytem na totipotentní
- **přenos genu**

- gen může být vpraven do **buněk různými cestami** prostřednictvím vektorů virové i neviróvé povahy
- **osud transgenu** závisí na mnoha faktorech, včetně vlastností vektoru
- může integrovat do **genomu buněk** a stát se jeho trvalou součástí s dlouhotrvající expresí nebo **není začleněn** do genomu a jeho přítomnost a exprese je přechodná
- **využití**
  - **vnesení nového funkčního genu** za účelem korekce defektního genotypu
  - vytváření **zvířecích modelů** lidských onemocnění
    - vnesení genu s **definovanou mutací** nebo zrušení exprese endogenního genu (genový knockout)
    - tyto modely jsou **nesmírně důležité** pro lékařský výzkum
    - **příklad** je cystická fibrosa, beta-thalassemie, hypercholesterolemie, syndrom fragilního X
    - v obou případech je **cílem náhrada** určitého endogenního genu genem novým, nikoli pouze vnesení **nového genu** a ponechání původního
    - to je umožněno **procesem homologní rekombinace** inserčního vektoru s původním lokusem (jako u **transdukce**)
    - předpokladem pro vytvoření **vhodného inserčního lokusu** je nejen znalost sekvence genu, ale i sekvencí, které ho **obklopují** a které by měly být identické se **sekvencemi lokusu** původního genu
    - dosud ne zcela **známým mechanismem** (asi podobným mechanismům při meiose nebo mitose) nalezne umělý **konstrukt cílové místo** a mezi homologními sekvencemi dojde k **rekombinaci**
  - přenos DNA může způsobit **inhibici exprese genu**
    - jsou to sekvence, které **nekódují protein**, ale jejich produkt inhibuje expresi genu, např. antisense RNA, dsRNA, siRNA a ribozymy
    - na **úrovni transkriptu** může dojít k inaktivaci specifické RNA vpravením antisense RNA nebo antisense nukleotidů
      - většinou má **vpravení takové sekvence** pouze přechodný efekt
      - řešením by bylo vpravit **transgen**, který by produkoval antisense RNA konstantně
    - **ribozomy**
      - **RNA enzymy**, které štěpí RNA molekuly
      - existují důkazy o tom, že molekuly RNA mají enzymatickou aktivitu, která se uplatňuje v **komplexu telomerasy**, RNA a specifických proteinů, při sestřihu RNA na hranicích **exonu a intronu** apod.
      - zejména schopnost **štěpit cílovou RNA** ve specifických sekvencích začala být experimentálně využívána při genové terapii
    - **RNA interference**
      - jediný z mechanismů **regulace genové exprese**
      - ukázalo se, že přítomnost krátkých molekul dsRNA má schopnost potlačit expresi genu
      - reakce je specifická, protože je **inhibován gen**, který nese sekvenci nukleotidů, komplementární k dsRNA
      - u člověka existují molekuly **miRNA** (micro RNA), které jsou jednovláknové a vážou se na specifickou mRNA, kterou tím inhibují
  - nejčastěji se transgen **integruje** na náhodné místo v genomu buňky a může tak rozrušit gen v daném místě a tudíž i jeho funkci – dochází k **inserční mutagenezi**
- **genetické inženýrství**
  - **cíleně konstruuje** buňky, resp. organismy o takových kombinacích genů v genomech, které v přírodě **neexistují**
  - otevírají se tak nové přístupy pro **hlubší analýzu** genomů samostatných a současně nové možnosti v **biotechnologických procesech**

- pracuje hlavně s **bakteriemi a kvasinkami** a to hlavními dvěma experimentálními přístupy – genovým a buněčným **inženýrstvím**
- **genové inženýrství**
  - je možné vytvořit **zcela nové molekuly DNA**
  - konstrukce **chimerických molekul DNA** in vitro z fragmentů DNA izolovaných buněk zcela odlišných druhů, rodů a dokonce i říší
  - jde o **kombinaci jejich genů** do souvislých nukleotidových sekvencí
- **klonováním DNA** pak můžeme získat vzácné buněčné proteiny ve velkém množství
- pro tvorbu proteinů zkonstruovány tzv. **expresivní vektory** – mají vhodné regulační sekvence a promotor v těsné blízkosti místa, do kterého je **vklonován insert** s kódující sekvencí
- **promotory s regulačními sekvencemi** zajišťují produkci velkého množství mRNA, která může být překládána **uvnitř buňky**
- fragmenty DNA mohou být spojeny **in vitro pomocí DNA ligasy** a dát vznik nové molekule DNA, která se v přírodě nevyskytuje
- po vytvoření **rekombinantní molekuly DNA** se vloží do rychle se dělící hostitelské buňky (např. bakterie) a při každém dělení dochází k její replikaci
- sady **klonovaných fragmentů**, které reprezentují kompletní genom organismu pak tvoří **genomovou knihovnu** – často ve formě bakteriálních klonů (každý klon nese jiný klonovaný fragment DNA)
- **klonované geny** pak mohou být pomocí různých technik genového inženýrství začleněny do genomu **buňky nebo organismu**
- **význam genového inženýrství**
  - umožnilo poznání úplných a přesných sekvencí řady eukaryontních genů, vč. **sekvence regulačních**
  - výrazně doplnilo **konstrukci fylogenetických „stromů“** živočišných a rostlinných druhů
  - genové manipulace zahájili současně novou **éru biotechnologií** - umožnily výrobu nové **generace vakcín** (proti hepatitidě A i B, proti chřipce, slintavce, atd.)
  - genové „**doplňené**“ **bakterie**, resp. kvasinky, dnes produkují **lidské hormony**: inzulin, somatostatin, somatotropin a řadu mozkových hormonů (enkefalinů a endorfinů)
  - z bakterie s **rekombinovanou DNA** lze získat také mimořádně čisté AMK, enzymy, alkaloidy, steroidy, giberilliny a další biologicky aktivní látky v prakticky neomezených množstvích
  - **v lékařství** - genové terapie dědičných chorob
- **genová terapie**
  - je léčba genů
  - je to nový přístup jak **léčit nemoci** na základě změny exprese genů pacienta
  - jednoduše řečeno, jestliže má **pacient nemoc**, která je způsobena chybou v nějakém **genu**, genová terapie je léčba, kterou se tento **chybný gen opraví**
  - předpokládá se, že touto metodou bude možno nejen **nemoci léčit**, ale i jim předcházet
  - v současné době je tato metoda ve **stadiu vývoje**, možnosti jejího použití se zkoumají v laboratořích **základního výzkumu**
  - zatím jí tedy nelze využít v **klinické praxi**
  - genová terapie jako **léčebná metoda** vznikla na základě znalostí o vlivu genů na lidská **onemocnění**
  - dnes je zřejmé, že každá **lidská nemoc** má nějakou souvislost s našimi geny, které jsme získali od **svých rodičů**
  - na poznání všech lidských genů byl před **několika lety** založen projekt **Lidský genom**
  - první výsledky - kompletní **znalost sekvence** lidského genomu
  - najít v něm všech těch **30 000-40 000 genů**, které zřejmě člověk má, bude ještě nějakou dobu trvat
  - drobné **odlišnosti v genech** každého člověka pomáhají formovat jeho osobnost od výšky postavy až po **barvu očí**
  - bohužel, některé tyto odlišnosti vedou k **rozvoji nemocí**, které jsou pak přenášeny z generace na generaci
  - některé z nich jsou **způsobené chybou** v jednom genu, jiné jsou ovlivněny celou sadou genů

- výhodou **genové terapie** je, že léčí lidské nemoci u jejich "kořenů"-opravuje poškozené geny
- **existují dva typy genové terapie**
  - **somatická genová terapie** (somatic gene therapy)
    - ta **opravuje geny pacienta**, aniž by došlo k dědičnému předávání opravených genů na **další generace**
    - tento typ genové terapie je také v současné době **nejvíce studován** v laboratořích po celém světě
  - **zárodečná genová terapie** (germline gene therapy)
    - tento typ **genové terapie** by měnil geny už v zárodečných buňkách (spermie, vajíčko) a změna genu by byla přenosná na **další generace**
    - jen velmi málo **výzkumu**, bylo započato v této oblasti a to z technických a zejména **etických důvodů**
    - pro tento typ léčby musí být dostatečný důvod - **závažné onemocnění** bez možnosti jiné **formy terapie**, vhodné cílové buňky příjemce a bezpečné vektory (defektní retroviry, adenoviry, herpesviry), chemický nebo fyzikální přenos
- **modelem genové terapie** jsou úspěšné pokusy s léčbou těžké kombinované imunodeficiency (SCID) podmíněné deficiencí adenosin-deaminasy (ADA)
  - **akumulace deoxyadenosinu** v leukocytech poškozuje funkci T i B lymfocytů
  - **onemocnění je AD**, bez léčby končí letálně do 2 let po narození
  - chybějící enzym lze do organismu **vpravit in vitro** s kovalentně vázaným polyethylenglykolem, **poločas jeho aktivity** je však jen 3 – 6 dní
  - proto byl nejprve na **primátech** a následovně i na **člověku** ověřen přenos **komplexu silného virového promotoru +ADA** genu do lymfocytů v tkáňové kultuře
  - **transformované lymfocyty** po infuzi v oběhu pacienta dlouhodobě přežívají a po tuto dobu trvá i léčebný efekt, inserce genomu je náhodná, nejde tedy o náhradu genu, ale o přidání funkční kopie genu do genomu
- **rekombinantní DNA technologie** přinesla i některé **léky v přijatelné ceně** - upravený lidský gen pro insulin (bez intronů) byl přenesen do **plasmidu** a klonován v bakterii E.coli
- **podobně byl vyráběn** lidský růstový hormon, interferon, faktory krevní srážlivosti VIII a IX.
- klonován je pouze gen pro **nejdůležitější antigen** a **vakcína** neobsahuje patogenní agens
- **podmínky použití genové terapie**
  - **znalost přesné sekvence** zkoumaného genu
  - **znalost příčiny** a patologického procesu vzniku onemocnění (nedostatečné množství produktu, tvorba patologicky působícího produktu mutovaného genu apod.)
  - **výběr vhodného vektoru** – nosiče (retroviry, adenoviry)
  - **souhlas pacienta**
- **Ex vivo techniky**
  - buňky postižené oblasti jsou **chirurgicky vyňaty**
  - následně aplikujeme do odebraných buněk **zdravou formu genu**
  - následuje jejich **kultivace** a dělení ve vhodném prostředí
  - po jejich namnožení jsou vpraveny zpět do **původní tkáně**
  - velice často **odebíranou tkání** na kultivaci je vzorek kostní dřeně
  - ta jakožto **producent krevních buněk** poté zajišťuje roznášení geneticky upravených buněk **krví po těle**
  - výhoda **snazší distribuce** je často utlačována nevýhodami této techniky – zákrok je pro pacienta **velmi bolestivý** a musí probíhat ve dvou fázích (odběr kostní dřeně a následná reimplantace), protože **sama kultivace** vyžaduje mnoho hodin
- **In vivo techniky**
  - tato metoda nevyžaduje **operační řešení** ani <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Anestezie> anestezii
  - dochází k **aplikaci upraveného genu** přímo do buněk těla
  - musí však docházet k využívání virů jako **nosičů informace**



- užívají se **2 hlavní skupiny virů**
- **jednoduché** <http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Retroviry&action=edit&redlink=1>retroviry
  - y
    - jejich výhodou je **kompletní potlačení virové DNA**
    - přenášena je pouze informace **geneticky upravené DNA**
    - jejich výsledky jsou **dlouhodobé** a nedochází k **napadání** pacienty viry
    - nevýhodou je, že působí pouze na nově **tvořené** [http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Dce%C5%99in%C3%A9\\_bu%C5%88ky&action=edit&redlink=1](http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Dce%C5%99in%C3%A9_bu%C5%88ky&action=edit&redlink=1)dceřiné buňky
    - na již existující **defektní buňky** vliv nemají
- **adenoviry**
  - působí **rychleji než retroviry**, ale doba trvání účinku je kratší – v rámci týdnů
  - **imunitní systém pacientů** má však větší tendence s těmito viry interferovat a vytvářet **reakci**
  - pacienti proto trpí příznaky **nachlazení a rýmy**
  - jsou však známy i případy **vážnějších interakcí**
  - k dosažení stejného výsledku je potřeba **několikanásobně menšího množství** roztoku adenovirů (v rámci mililitrů) než u retrovirů (v rámci litrů)

## 71. Principy terapie dědičných chorob

---

- **zárodečná genová terapie**
  - zásah v **gametě**, v zygotě nebo buňkách embrya ve velmi raném stadiu vývoje
  - genetická změna se nachází ve všech **buňkách** nově vzniklého organismu
  - vliv bb, ze kterých **vznikají gamety**, proto je přenosná na potomky
  - nemůžeme odhadnout **výsledky v dalších generacích**, etické bariéry před provedením zárodečné genové terapie
- **somatická genová terapie**
  - provedení genetické změny v **somatických buňkách**, nebo tkáních
  - tkáně jsou vybírány podle **typu onemocnění**
  - **manipulace v buňkách** lze provádět ex vivo, in vivo
  - **Ex vivo** = buňky jsou odebrány do vhodného prostředí, po provedení terapie jsou vráceny zpět
  - **In vivo** = vhodná pro bb, které je nemožné kultivovat nebo navrátit zpět do organismu
- **vektor nesoucí gen** by mohl být vpraven přímo do tkáně
- úspěšnost těchto pokusů je **velmi malá**
- nejvhodnější bb pro genovou terapii – dlouhá **délka života**, prolifерují, lze je snadno získat
- příkladem jsou **kmenové bb kostní dřevě** – jsou ale špatně izolovatelné
- **modifikace somatických buněk**
  - několik přístupů
  - **vnesení funkční kopie** genu do bb, mutantní gen zůstává nezměněn
  - **oprava** mutantního genu nebo umístění fungující kopie genu na místo mutantního genu
  - **cílená inhibice** exprese genu
  - **cílené zničení specifických buněk** (významné u nádorů)
  - zničení specifických buněk bb **imunitního systému**
- cílem je **dlouhodobá exprese vneseného genu**
- cizí gen se tedy musí **integrovat do chromozomu** hostitelské buňky, bb musí mít schopnost dalšího dělení
- cizí gen se tedy následně přenáší do **dceřiných buněk**
- dojde k **různé integraci genu**, v dalších cyklech se tedy nachází na jiných místech
- **virové vektory**
  - viry vyvinuly účinné systémy, jak vpravit svoje **genomy do lidských bb**
  - virus se musí **modifikovat** tak, aby jeho genom nepoškodil lidskou buňku
  - většina **virového genomu** je odstraněna, nahrazena lidským s promotorovými a **regulačními oblastmi**
  - **vysoká účinnost**
  - **retrovirové vektory**
    - **genom retrovirů** je tvořen RNA, obsahuje 3 geny (gag, pol, env) a sekvenci fí, která je rozpoznávána **virovými proteiny** - zkompletování virové partikule
    - mají vlastní **reverzní transkriptázu**
    - po vstupu do **hostitelské buňky** vyvolá reverzní transkripci = vznik cDNA
    - cDNA se napojí do **hostitelské informace** při dělení (jsou porušené membrány)
    - **klonovací kapacita** je 8 kb
    - vektor s **lidským genem** je vpraven do speciálních buněk, které vytvoří mnoho kopií retrovirů s **lidskou sekvencí**
    - **modifikované retroviry** jsou pak inkubovány se somatickými buňkami pacienta (lymfocyty)
    - dojde k **inzeri lidského genu** do DNA hostitelských buněk s vysokou účinností
    - **choroba** : těžká kombinovaná imunodeficiencie (SCID)
  - **adenovirové vektory**
    - dsDNA zůstane v jádře **lidské buňky**, ale neintegruje se do jejího genomu
    - vektor musí být stejně **modifikován jako retrovirus**
    - **infikují** bb, které se nedělí (dýchacího systému)

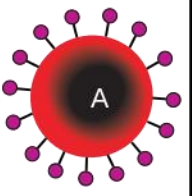
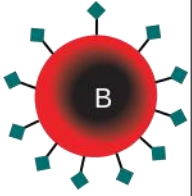
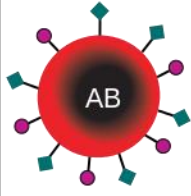
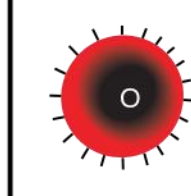


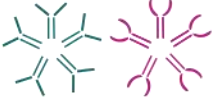



- terapie **cystické fibrozy** – lidský gen CFTR do adenoviru – modifikovaný virus byl aplikován epiteliálním bb dýchacích cest v podobě **aerosolu**
- malá účinnost, pouze přechodná **exprese genu**
- **adeno – asociované virové vektory**
  - ssDNA, jejíž replikace je závislá na **přítomnosti viru**
  - nevyvolávají žádnou **imunitní reakci**
  - jako adenoviry mohou **infikovat nedělicí se bb**
  - pojmu **malý inzert** – 5kb
  - vektor pro geny pro faktor IX lidem s hemofilí B
- **lentivirové vektory**
  - **komplexní retroviry**, mohou infikovat i nedělicí se bb
  - do jádra vstupují otvory v **jaderném obalu**
  - **klonovací sekvence** cca 8kb
  - **antivirus** = např. HIV
- **problémy spojené s virovou genovou terapií**
  - **přechodná exprese**, nízká exprese genu
  - **obtížné získání specifických bb**, tkání (neurony)
  - potřeba **přesné regulace** aktivity genu
  - **potenciální nebezpečí** nádorové transformace buňky (náhodná inserce viru do buňky může ovlivnit expresi **vedlejšího genu**, což může být protoonkogen)
  - **imunitní reakce** organismu proti virovému vektoru
- **vektory nevirové povahy**
  - **přímá injekce DNA** do tkáně
  - **nastřelení kovových částic**, které obsahují DNA
  - **spojení DNA** s molekulou, která je navázána prostřednictvím receptorů na povrch buňky, následuje **endocytóza**
  - velmi **malá účinnost** při těchto metodách
  - **lipozomy**
    - uměle vytvořené částice tvořené **fosfolipidovou dvojvrstvou**, které mohou pojmout poměrně **velký inzert DNA**
    - mohou **fúzovat s buňkou**, a tak přenést DNA inzert do cytoplazmy
    - neobsahují peptidy = nevyvolávají **imunitní odpověď**
  - **blokáda exprese genu**
    - produkty genu fungují v **komplexech molekul** (dimery)
    - **mutovaný protein** v komplexu může ovlivnit jejich funkci
    - inhibicí transkripce nedojde k **expresi genu**
    - náhrada poškození genu **homologní rekombinací**

onemocnění	cílové buňky	produkt inzertu
SCID	lymfocyty, stem cells kostní dřeně	adenosindeaminaza
hemofie B	hepatocyty	faktor IX
cystická fibroza	epitel. Bb dýchacích cest	CFTR
familiární hypercholesterolemie	hepatocyty	LDL receptor
Duchenova muskulární dystrofie	myoblasty	dystrofin
AIDS	TH lymfocyty	retrovirová mutace

## 72. Dědičnost a biologický význam krevně skupinových systémů

- **krevní skupiny** jsou určovány pomocí **specifických antigenů** na membráně erytrocytů
- přítomnost těchto antigenů je **podmíněna geneticky**
- v současnosti je známo již okolo **30 krevně skupinových systémů**
- největší význam má znalost krevně skupinových systémů pro **krevní transfúze**
- využití krevních skupin pro **potvrzení paternity** je dnes již obsolentní a je zcela nahrazeno DNA **fingerprintingem**
- **ABO systém**
  - **4 krevní skupiny** - A, B, AB, O
  - dle přítomnosti antigenů A a B na **membráně erytrocytů**
  - charakteristická **přítomnost protilátek** - IgM a IgG - trvale přítomny v séru
  - **antigeny ABO** = glykolipidy = krátké oligosacharidy vyčnívající z povrchu lymfocytů - napojeny na **lipidovou molekulu** v plazmatické membráně
  - **molekuly A a B** se liší pouze v posledním cukerném zbytku
    - **A** = N-acetyl-galaktosamin
    - **B** = galaktosa
    - poslední **cukerné antigeny** zodpovídají za to, že molekuly jsou rozpoznávány jako **různé antigeny**
  - **pro expresi antigenů ABO systému** nutná souhra několika genů - hlavní lokus ABO (chromosom 9) a H-lokus (19. chromosom)
    - **H - lokus**
      - 2 alely - H / h; H
      - kóduje fukosyltransferasu
    - **lokus ABO**
      - **tříalelní systém**
      - **alely A a B** - vůči sobě kodominantní a obě jsou dominantní vůči alele 0
      - **alela A** kóduje A transferasu - ta připojuje k H-substanci N-acetyl-galaktosamin a tvoří antigen A
      - produktem **alely 0** je inaktivní enzym
  - **existuje 11 podskupin** A a B - nejčastěji A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>
  - podskupiny se liší **počtem antigenů** na membráně erytrocytů
  - **typizace ABO antigenů** - význam při krevní transfúzi, transplantaci tkání a orgánů, využití v **určování otcovství**
  - **bombajský fenotyp**
    - i tvorba **antigenu H** je geneticky podmíněna (Hh gen; 19q13.3)
    - může dojít k **vzácnému případu**, že jedinec je hh recesivní homozygot a netvoří tedy **antigen H**
    - protože tento antigen je **prekurzorem pro tvorbu antigenů A i B**, může být syntéza antigenů A či B přerušena již v **tomto kroku**
    - ve výsledku bude mít **jedinec fenotyp skupiny 0** (nebude u něj prokázán antigen A, respektive antigen B), ačkoli jedinec **může nést geny** pro tvorbu některého z těchto **antigenů** (A či B, případně obou)
    - představme si situaci, že jedinec má genotyp AA ale zároveň i hh
    - fenotypově mu bude určena **krevní skupina 0** (právě tento fenotyp se označuje jako fenotyp Bombay)
    - pokud bude mít potomka s **jiným jedincem** se skupinou 0 - tentokrát ovšem jde o jedince s genotypem 00 aHH - potom bude mít tento potomek **krevní skupinu A** (genotyp A0 Hh)
    - výsledkem bude tedy **situace**, která odporuje základním pravidlům dědičnosti **krevních skupin**
    - jedná se však o **velmi vzácný fenomén**, poprvé identifikovaný právě v Indii
- **Rh**
  - oblast, která **kontroluje expresi Rh** antigenů je na krátkém raménku 1. chromosomu

- tvoří ji 2 těsně vázané strukturní **geny D a CcEe**
- kódují membránové proteiny **nesoucí antigeny D, C, c, E, e**
- velmi silná **vazba**
- kombinace **alel obou genů** se přenáší z generace na generaci v bloku – tzv. **haplotypy**
- nejdůležitější je **antigen D** - určuje Rh<sup>+</sup>; Rh<sup>-</sup> = dd (17% populace)
- **neexistují protilátky** - anti-Rh se vytvářejí až v případě inkompatibility (při opakovaných krevních transfuzích)
- **inkompatibilita matky a plodu**
  - matka Rh<sup>-</sup> a plod Rh<sup>+</sup> (od otce)
  - **rizikové** - dostanou-li se erythrocyty plodu do mateřského oběhu, stimulují antigeny D tvorbu **anti-D protilátek**
  - **mateřské protilátky** skrz placentu - hemolýza plodových erythrocytů

	Group A	Group B	Group AB	Group O
Red blood cell type				
Antibodies in Plasma	 Anti-B	 Anti-A	None	 Anti-A and Anti-B
Antigens in Red Blood Cell	 A antigen	 B antigen	 A and B antigens	None

### 73. Dědičnost a biologický význam Rh systému

- Rh je **krevně skupinový systém**, jehož antigeny se vyskytují pouze na erythrocytech
- je vysoce **polymorfní** - dosud zjištěno více než **40 serologicky odlišných Rh antigenů**
- oblast, která kontroluje **expresi Rh antigenů** je na krátkém raménku 1. chromosomu
- tvoří ji **2 těsně vázané strukturní geny D a CcEe** - kódují membránové proteiny nesoucí antigeny D, C, c, E, e (velmi silná vazba)
- **kombinace alel obou genů** se přenáší z generace na generaci v bloku – tzv. **haplotypy**
- nejdůležitější je **antigen D** - určuje Rh<sup>+</sup>; Rh<sup>-</sup>
- **Rh-** jsou dd recesivní homozygoti (17% evropské populace)
- nelze u nich **serologicky prokázat přítomnost antigenu D**, což je způsobeno delecí genu D v Rh oblasti DNA
- **antigeny C, c, E, e** nejsou tak silné a významné jako antigen D, přesto mohou v **případě inkompatibility** vyprovokovat tvorbu protilátek
- **exprese antigenů C, c, E, e** je kontrolována jedním genem, a je výsledkem **alternativního sestřihu primárního transkriptu CcEe genu**
- na **plazmatické membráně erythrocytu** vystupují jako samostatné antigeny
- mezi alelami C/c a E/e je **kodominance**

- **neexistují protilátky** - anti-Rh se vytvářejí až v případě inkompatibility (při opakovaných krevních transfuzích)
- **inkompatibilita matky a plodu**
  - matka Rh<sup>-</sup> a plod Rh<sup>+</sup> (od otce)
  - **rizikové** - dostanou-li se erythrocyty plodu do mateřského oběhu, stimulují antigeny D tvorbu **anti-D protilátek**
  - mateřské protilátky skrz **placentu** - hemolýza plodových erythrocytů
  - **první dítě** nebývá postižené, riziko stoupá s počtem **dalších**, inkompatibilních těhotenství
  - matka může být **senzibilizována** i při předchozích potratech Rh<sup>+</sup> plodu nebo transfúzi Rh<sup>+</sup> krve
  - **v naší populaci** je více než 80% jedinců Rh<sup>+</sup>, a méně než 20% Rh<sup>-</sup>
  - **příznaky poškození plodu**
    - hemolytická anémie, rozvoj žloutenky
    - v krvi se hromadí bilirubin
    - při překročení určité hranice **poškozuje CNS**
    - zvýšení krvetvorba s vyplavováním nezralých erythroblastů = tzv. **fetální erythroblastóza**
    - v těžkých případech umírá plod **in utero**
  - **poškození plodu** lze předejít podáváním anti-D protilátek matce 72 hodin po **senzitizační dávce Rh<sup>+</sup> erythrocytů** (po porodu)

## 74. Buňky imunitního systému, imunofenotypizace

- **imunokompetentní buňky** zprostředkovávají imunitní odpověď
- **rozlišujeme 2 skupiny**
  - **buňky nespecifické imunity** (granulocyty a makrofágy)
  - **buňky specifické imunity** (T a B-lymfocyty)
- vznikají z **pluripotentní kmenové buňky** kostní dřeně
- po aktivaci mají schopnost produkovat **tzv. cytokiny**, které zajišťují mezibuněčnou signalizaci a tím kooperaci **imunokompetentních buněk**
- na povrchu imunokompetentních buněk je vytvářeno množství **různých molekul** se signálními a **receptorovými vlastnostmi**
- některé jsou společně **několika buněčným populacím**, jiné jsou typické pouze pro jednu linii buněk - mohou být, jako tzv. **markery**, využity k rozlišení buněčných populací
- **buňky nespecifické imunity**
  - patří sem neutrofilní granulocyty, eosinofilní granulocyty, bazofilní granulocyty a makrofágy (v krvi označované jako monocyty)
  - jejich hlavní funkce je zahájení **nespecifické imunitní odpovědi**
  - na **ničení antigenů** se podílí nejvíce fagocytosou a aktivací **specifické imunitní odpovědi**
  - mohou snadno **migrovat z krve do tkání** na podkladě chemotaxe, kde se účastní obranné reakce (např. zánětlivého procesu)
  - **komplement**
    - komplement je **nebuněčná složka imunity**, ale má velký význam
    - je to skupina **proteinů krevního séra**, které se váží na komplex antigen-protilátka
    - posiluje **destrukci celulárních antigenů fagocyty** (opsonisace) nebo může mít sám destrukční vlivy (např. narušení membrán)
  - **monocyty a makrofágy**
    - **monocyty** jsou velké buňky, neobsahují výrazně se barvící granula a jejich jádro není segmentované
    - v případě potřeby se **mohou dělit**
    - **monocyt** je buňka kolující v krvi, **makrofág** je tatáž buňka, ale ve tkáni, např. **Kupfferovy buňky**

- makrofágy se uplatňují ve **stimulační**, jako **APCs** (antigen prezentující buňky), i v **konečné fázi** imunitní reakce, kde odstraňují následky napadení (poškozené tkáně, buňky, metabolity, komplex antigen-protilátka atd.)
- také produkují **cytokiny a modulátory** – IL-1, IL-8, IL-12, TNF, GM-CSF a interferony
- obsahují velké množství **cytoplazmatických lysosomů**, které hrají významnou roli jak při **intracelulární likvidaci mikrobů**, toxinů a odpadů, tak i při přípravě antigenu pro buňky **specifické imunity**
- na **plazmatické membráně** mají výbavu receptorů, která jim umožňuje kontakt s **mikroorganismem** a spolupráci s lymfocyty
- **k nejdůležitějším patří**
  - receptory pro vazbu na **povrchové sacharidy mikroorganismů**
  - **receptory Fc**, které vychytávají protilátky, které se spojily s antigenem (komplexy antigen-protilátka)
  - **receptory C1 a C3** podstatné pro reakci na složky komplementu
  - **receptory pro cytokiny** pro komunikaci buněk imunitního systému
  - **antigeny II. třídy HLA (MHC)** pro kooperaci s T-lymfocyty, umožňují předkládat **antigen**
- **APCs**
  - antigen presenting cells jsou všechny buňky, které jsou schopné **zpracovat antigen** a předložit jeho **epitopy** (antigenní determinanty) T-lymfocytům
  - k tomu jsou nezbytně nutné **molekuly HLA II. třídy**
  - **mezi APCs** se řadí makrofágy, dendritické buňky, někdy i buňky endotelu
  - APC buňky se v imunologii rozdělují na **profesionální APC** (makrofágy, dendritické buňky, B-cells) a **neprofesionální APC** (fibroblasty, epitelové buňky a endotelové buňky)
  - **funkci APC** mohou plnit i folikulární dendritické buňky v lymfatických uzlinách i **Langhansovy buňky kůže**
- **neutrofil**
  - **neutrofilní granulocyty** neboli neutrofil, polymorfonukleární leukocyty či mikrofágy jsou **bílé krvinky**, které se společně s eosinofily a bazofily řadí mezi **granulocyty**
  - význam v **protiinfekční obraně** spočívá v obraně proti extracelulárním bakteriím
  - neutrofil jsou schopny vykonávat **efektorové funkce** ihned, bez signálů od jiných buněk
  - tvoří 60-70% leukocytů **periferní krve**
  - 6-12 hodin se vyskytují v **krvním oběhu** a 4-5 dní ve tkáni
  - pouze 7% z celkového počtu se nachází v **periferní krvi**, 93% nalezneme v **kostní dřeni** (mění se vlivem zánětlivých cytokinů a bakteriálních produktů)
  - hlavní **chemotaktickou látkou** je chemokin IL-8
  - **funkce**
    - hlavní funkcí neutrofilů je **fagocytosa**
    - jejich **azurofilní granula** obsahují mnoho lytických enzymů
    - při **zabíjení mikrobů** mohou za dostatečného přísunu energie vyvolat tzv. **oxidační vzplanutí**
    - zároveň **secernují látky**, které vedou k rozvoji zánětlivé odpovědi
    - neutrofil se nemohou **dělit ani doplňovat** svou granulární výbavu
    - **aktivované neutrofil** po provedení svých funkcí umírají a stávají se součástí **zánětlivého ložiska**
    - odumřelé neutrofil **vytvářejí hnis**
    - **neutrofil** nepatří mezi APCs
  - **vývojová řada**
    - **myeloidní progenitorová buňka** kostní dřene – myeloidní prekurzor – neutrofil
    - **progenitorová buňka** nejen neutrofilů má adhezivní molekulu CD34
    - v malém počtu se nachází ve **dřeni po celý život**

- jejich jádro je tvořeno **2-5** laloky, počet laloků se zvyšuje se stářím buňky (nejmladší formy neutrofilů nemají jádro segmentováno a proto se označují jako tyče)
- v **cytoplazmě neutrofilů** jsou drobná, světle růžová granula
- jejich hlavní role spočívá ve **fagocytose**
- neutrofilové nemají schopnost se dále **dělit**
- **eosinofily**
  - buňky, jejichž granula se výrazně **barví eosinem** (červeně) a jádro má **bilobulární tvar** (brýlovitý)
  - jejich hlavní funkce je **obrana proti parazitům**
  - v případě aktivace se **eosinofily degranulují** a látky, obsažené v granulech, mohou působit **dvěma cestami**
    - **přímé zničení parazita**
    - **obalení parazita** – pokud selžou ničivé účinky, stimulují látky okolní fibroblasty k proliferaci a tak zabalí parazita do **vazivového pouzdra**
  - eosinofily se pravděpodobně účastní průběhu **alergických reakcí**
  - eosinofily se nemohou dále **dělit**
- **bazofily**
  - granula bazofilů se barví **bazickými barvivy** (hematoxylin)
  - obsahují především **histamin a heparin**
  - reagují na aktivitu **eosinofilů**
  - bazofily se také podílejí na **alergických reakcích**, především I. typu
- **mastocyty** (žírné buňky, heparinocyty)
  - jsou pravděpodobně **bazofilní buňky**, které vycestovaly do tkání
  - jejich granula jsou velmi podobná **bazofilům**
- **buňky specifické imunity**
  - jedná se pouze o **lymfocyty**
  - poslední dobou se vedou polemiky, zda by **B-lymfocyty** neměly být zařazeny do nespecifické imunity, protože jejich receptory se v **průběhu života** buňky mohou měnit
  - **lymfocyty**
    - tvoří **heterogenní skupinu** buněk (liší se velikostí a morfologií) a ze všech krevních leukocytů tvoří asi 45%
    - jsou to nevelké (8-14μm), kulaté buňky s velkým jádrem a tenkou vrstvou cytoplazmy
    - jejich morfologie se může se **zráním lymfocytu** výrazně měnit
    - morfologicky rozlišujeme **několik typů** lymfocytů podle jejich velikosti (malé, střední, velké)
    - podle **složení biomembrány** a podle funkce rozlišujeme dva typy lymfocytů
      - **T-lymfocyty** – málo receptorů, vývoj v thymu, zahajují specifickou imunitní odpověď a účastní se buněčné imunity
      - **B-lymfocyty** – mnoho receptorů, vývoj v kostní dřeni, maturace v plazmatické buňce (látková imunita)
    - B a T-lymfocyty se liší funkcí a **výskytem markerů** na plazmatické membráně
    - výskyt markerů je **dynamický proces** – některé jsou charakteristické pro určitá vývojová stadia buňky = tzv. **diferenciální antigeny**, jiné pro terminálně diferenciovanou buňku
    - některé se objevují jako **následek stimulace** a aktivace buňky antigenem
    - nejdůležitější markery rozlišující **T a B populaci** jsou
      - **molekuly CD1, CD2...** (CD = cluster of differentiation)
      - **molekuly tvořící receptory** pro rozpoznání antigenu
      - **molekuly I. a II. třídy MHC**
      - **molekuly tvořící receptory pro komplement**, erytrocyty, viry, mitogeny
  - **T-lymfocyty**
    - vznikají v **thymu** dělením prekurzorů, které do brzlíku vcestovaly z krevetvorných tkání (především kostní dřevě) v prenatálním období
    - nejvíce zastoupeny v **thymu**, lymfatických uzlinách, slezině a krvi, nejméně v **kostní dřevě**



- zde se učí rozpoznat **vlastní a cizí antigeny** za pomoci **HLA antigenů**
- buňky, které nejsou schopné **zareagovat** na cizí nebo příliš agresivně reagují na vlastní dostávají **apoptotické signály** a umírají
- ostatní T-lymfocyty **cestují krví** do sekundárních lymfatických orgánů a tam se setkávají se specifickými antigeny – tím dochází k jejich **aktivaci** a rozvoji zánětu
- T-lymfocyty hrají **klíčovou roli** v rozlišení antigenů, velmi úzce spolupracují s APCs
- zahajují **specifické imunitní reakce** a moderují je
- **specifita T-lymfocytů** je dána jejich T-cR (T-celulární receptory), ty ovšem samy k aktivaci (přenosu signálu) lymfocytu nestačí, nezbytný je **membránový komplex** TcR a CD-3
- po ukončení **imunitní reakce** kolují lymfocyty mezi krví a sekundárními lymfatickými tkáněmi a v klidové formě čekají na další setkání s antigenem
- podle jejich zapojení do **imunitní odpovědi** a CD znaků na jejich povrchu **rozlišujeme**:
- **helperové (pomocné), T<sub>H</sub> lymfocyty**
  - CD-4+, **zahájení** imunitní reakce
  - produkují mnohé **cytokiny**
  - reagují na **antigeny** předkládané na APCs v souvislosti s HLA II. třídy
  - zahajují specifickou **imunitní odpověď**
  - podle **arsenálu cytokinů**, které produkují, rozlišujeme T1 (podporují **cytotoxickou a buněčnou část imunity** – makrofágy, Tc lymfocyty) a T2 (podporují protilátkovou odpověď – B-lymfocyty a tvorba protilátek)
  - jsou cílem **HIV**
- **cytotoxické, T<sub>C</sub> lymfocyty**
  - CD-8+, kontrola **vlastních buněk** (změna HLA antigenů) – destruuji cílové buňky nesoucí **špatný antigen** (buňky infikované viry nebo jinými intracelulárními patogeny)
  - jsou schopné **donutit buňku k apoptóze**, popřípadě ji přímo zničit za pomoci **cytotoxických mechanismů**
  - jsou schopny rozpoznávat i **cizí molekuly** I. třídy na alogenních nebo xenogenních buňkách – **reagují na HLA 1. třídy**
  - kontrolují stav **buněk v organismu** (protinádorová imunita)
- **supresorové T<sub>S</sub> lymfocyty**
  - **mírnění a ukončení reakce** – sekrece buněk, které inhibují odpověď ostatních imunokompetentních buněk
  - **nejednotná** skupina T-lymfocytů
  - v průběhu zánětu se zřejmě vyvíjejí z **helperových lymfocytů**, proto jsou někdy označovány jako T<sub>H3</sub>(r) subset
  - nemají **typický CD znak**, některé jsou CD-4+ a některé CD-8+, jiné nesou jen jeden, nebo ani jeden z těchto znaků
  - jejich hlavním úkol je **moderovat a tlumit** průběh imunitní reakce
  - k tomu jim slouží **interleukiny** IL-10 a částečně i IL-4
  - **reparaci tkáně** a stimulaci fibroblastů pak urychlují pomocí TGF-beta (transformační růstový faktor)
- **specifita TcR (T cell receptor)**
  - lymfocyty reagují na **molekuly I. třídy MHC**
  - lymfocyty reagují na **molekuly II. třídy MHC**
- **natural killers, NK buňky**
  - součást **nespecifické imunity**, hlavní část **cytotoxické buněčné imunity**
  - jsou schopni **ničit i bez předchozího setkání s antigenem** (to se uplatňuje u novorozenců)
  - při výběru cílových buněk hrají roli **molekuly I. třídy MHC** – není-li na povrchu buňky, projeví se **cytotoxický účinek** a buňka je usmrcena, což má význam v případě některých buněk **infikovaných virem** a nádorových buněk, které mají potlačenou expresi molekul I. třídy MHC

- ač se jedná o lymfocyty, jsou řazeny do **přirozené imunity**
- nenesou CD-3 znak a morfologicky se jedná o **velké lymfocyty** (12-14 μm)
- **B-lymfocyty**
  - 5-15% cirkulujících lymfocytů
  - vznikají a vyžívají v **kostní dřeni**, nejvíce jsou v kostní dřeni, slezině a nejméně v thymu
  - pro jejich **plnou aktivaci** je nezbytné setkání se specifickým antigenem, ke kterému dochází v sekundárních **lymfatických tkáních**
  - tam je rozpoznán jejich **B-cR** (B-celulární receptor)
  - během jejich vývoj nedochází k **selekcí** (jako u T-lymfocytů)
  - jejich **maturace** probíhá po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických **orgánech**
  - konečným **diferenčním stádiem B-lymfocytů** jsou plazmatické buňky produkující **protilátky** proti bílkovinným a **glykoproteinovým antigenům a toxinům**
  - velmi úzce spolupracují s **T-lymfocyty**, jsou řízeny jejich cytokiny
  - po setkání s antigenem se část mění na **plazmatické buňky**, které se přesouvají do kostní dřene a **produkují protilátky**
  - představují **základní buňky** látkové imunity
  - **vývojová řada**
    - **pluripotentní kmenová buňka** – lymfoidní progenitor – B-lymfocy – plazmocyty (plazmatické buňky) produkující imunoglobuliny a paměťové buňky
    - receptorem B-lymfocytů je **BcR** (B-celulární receptor)
    - skládá se z **vlastního povrchového imunoglobulinu** (IgM, IgD a asociovaných **signalizačních molekul**)
    - **monomer IgM** je zakotvený do membrány svým Fc-fragmentem, který je odlišný od **normálního Fc** (je delší, obsahuje komponentu, která ho drží v membráně)
    - další **antigenní struktury** jsou CD-19, CD-20 (typické pro zralé B-lymfocyty), CD-10 (pouze v určité fázi nezralých buněk, u některých leukemických linií)
    - některé B-lymfocyty se po **setkání s antigenem** a klonální proliferací mění v **paměťové B-lymfocyty**
    - ty jsou **součástí imunitní paměti**, jsou zodpovědné za výrazné urychlení sekundární imunitní odpovědi při **opakovaném setkání** s antigenem (význam pro očkování)
- **aktivace lymfocytů**
  - **vazba antigenu** s receptorem na plazmatické membráně je signál, která je přenášen složitou cestou do **nitra buňky** a způsobí změny na úrovni DNA
  - na povrchu **stimulovaného lymfocytu** se objevují nové molekuly (aktivační markery), receptory pro **cytokiny** (např. IL-2R, receptory pro IL-3 na B-buňkách apod.)
  - lymfocyty se dostávají z **G0 fáze do S fáze** buněčného cyklu a mění se na lymfoblasty
  - dochází k jejich **proliferaci a zrání** v terminálně diferencované efektorové buňky
  - část z nich se přemění na **paměťové buňky**, které osidlují oblasti lymfatických tkání a jsou připravené odpovídat na opakovaný vstup stejného antigenu
  - stimulem pro **aktivaci lymfocytů** může být
    - **vazba specifických antigenů** – monoklonální, každý lymfocyt je schopen rozpoznat prostřednictvím svého receptoru jen jeden antigen ze široké nabídky, vazba antigenu pak **způsobí proliferaci** a vznik dostatku buněk (klonů) pro **zajištění imunitní reakce** – antigen selektuje specifické klony buněk (T-lymfocyty)
    - **vazba nesespecifických antigenů** – polyklonální, k vazbě nejsou potřebné specifické receptory (B-lymfocyty)
- **průběh imunitní reakce**
  - **antigen vstoupí** do těla
  - okamžitě je **napaden** protilátkami aktivujícími komplement
  - **opsonizovaný antigen** je fagocytován APCs
  - **zpracovaný antigen** je spolu s HLA II. třídy vystaven na povrch buňky

- **T<sub>H</sub>-lymfocyt** reaguje s HLA II. třídy a začne produkovat interleukiny
- **interleukiny** aktivují ostatní skupiny T a B-lymfocytů
- **B-lymfocyty**, které mají receptory pro daný antigen, se začnou **dělit a maturovat v plazmatické buňky**
- **plazmatické buňky** produkují protilátky a spolu s **T-lymfocyty** zničí antigen
- po **ukončení reakce** se některé maturované T i B-lymfocyty přemění zpět na **paměťové buňky**, které čekají na další setkání s antigenem, který zahájil imunitní reakci
- **specifická imunita** je velmi důležitá, bez ní je imunitní reakce neefektivní, což se projevuje při jejím selhání (AIDS)

## 75. Genetická kontrola imunitní odpovědi

- genetika hraje obrovskou úlohu při **regulaci imunitní odpovědi**
- zatímco **nespecifické imunitní mechanismy** jsou relativně jednotvárné a jsou vystavěny tak, aby nemohly **ublížit vlastnímu organismu**, musí být specifická imunita pod přísnou kontrolou, aby **imunokompetentní buňky** přesně rozlišovali cizí od vlastního a aby byly schopné rozeznat co nejvíce **cizích antigenů**
- **těžký řetězec imunoglobulinu** je kódován komplexem genů na 14q
  - jedná se o velkou oblast, ve které se nachází řada **variabilních (V)**, **diverzifikačních (D)**, **spojovacích (J)** a **konstantních úseků (C)**
  - **takzvaná VDJ rekombinace** (přeskupení, či rearrangement) odpovídá změnám na **somatické úrovni**, kdy je zachován pouze jeden V segment, D segment a J segment (k vystřížení mezi VDJ dochází na úrovni DNA, úsek mezi J a C je vystřížen na úrovni mRNA)
  - typ **konstantního řetězce** je určován konstantním C úsekem
  - jelikož nejbližší úseku J je po VDJ rekombinaci C<sub>μ</sub> – tvoří se **nejdříve IgM**
  - teprve později dochází pod vlivem určitých **cytokinů** k tzv. **izotypovému přesmyku**, během kterého jsou **vyštěpeny** určité konstantní úseky (B-lymfocyt tak může produkovat jiný typ **imunoglobulinu** než IgM, například IgG)
  - podobným stylem jako **rekombinace u těžkého řetězce** dochází k rekombinaci i u **lehkých řetězců** (zde jde pouze o VJ rekombinaci – nejsou zde diverzifikační úseky)
  - **imunoglobulin** má buď oba lehké řetězce **kappa** (genový komplex na 2q) nebo oba **lambda** (genový komplex na 22q) – nikdy nemá jeden kappa a druhý lambda
  - po úspěšné V(D)J rekombinaci na jednom chromosomu se tento stane pro vyvíjející se B-lymfocyt standardem a exprese komplexu na druhém **homologním chromosomu** se potlačí – **alelická exkluze**
  - pokud je **rekombinace** na prvním chromosomu **neúspěšná** (netvoří se funkční produkt), pokračuje se s rekombinací na **druhém chromosomu**
  - je-li i tato rekombinace neúspěšná, **B-lymfocyt hyne apoptózou** (v případě lehkých řetězců se nejprve zkouší rekombinace řetězců kappa, následně i lambda)
  - co je důležité – je zamezit **existenci autoreaktivních B-lymfocytů**, které by produkovaly protilátky proti vlastním tkáním
  - proto B-lymfocyty, které se v kostní dřeni vážou na **okolní tkáň**, jsou autoreaktivní, hynou řízenou **apoptózou**
  - pokud vezmeme v potaz všechny možné **kombinace úseků** v lehkém i těžkém řetězci, zjistíme, jaké obrovské množství **struktur imunoglobulinové molekuly** nám může vzniknout
  - to je velmi **žádoucí**, neboť každá molekula (která by samozřejmě neměla být autoreaktivní) může být klíčová pro **rozpoznání** příštího, zcela i nového antigenu
- podobná rozmanitost je velmi žádoucí i u **TCR**
  - **TCR receptor T-lymfocytů** je složen vždy ze dvou **podjednotek** (alfa-beta nebo gamma-delta)
  - tyto jednotky jsou kódovány **komplexem genů**, který je podobný komplexu genů pro imunoglobulinové řetězce
  - komplex genů pro **podjednotku alfa** leží na 14q, **beta** na 7q, **gamma** na 7p

- komplex genů podjednotky **delta** leží uprostřed komplexu podjednotky alfa
- i zde dochází k **přeskupování a vystřihávání** mezi V, J, D a C řetězci, aby na konci byla hotová TCR molekula, jež bude pro vyvíjející se T-lymfocyt **typická a jediná**
- i zde dochází k **likvidaci takových T-lymfocytů**, které buď nejsou schopny rozeznávat **MHC molekuly** vůbec nebo naopak reagují i s molekulami těla vlastními
- existuje i teorie jakési „**školky**“ pro vyvíjející se lymfocyty, kde je lymfocytům předkládána řada „**ukázek**“ vlastních antigenů (i takových, se kterými vy se v primárních lymfatických orgánech normálně nesetkaly) a každá **autoreaktivita** je „odměněna“ silným **proapoptotickým signálem**
- pokud **regulační úloha** nějakým způsobem selže – například díky mutacím v DNA – dochází k různě závažným **autoimunitním nebo imunodeficitním stavům**

## 76. Genová kontrola tvorby protilátek

- **imunoglobuliny Ig** jsou glykoproteiny vyskytující se jako
  - **zakotvené** v plazmatické membráně B-lymfocytů jako tzv. **membránové** nebo povrchové Ig (mIg) tvořící **receptor**
  - **volně přítomné** v krvi, lymfě i tkáňových tekutinách
- **kontakt** mezi mIg a cizím antigenem je nutný pro indukci tvorby **volných protilátek**
- **membránové Ig** na jedné buňce mají specifickou **vazebnou specifitu** pro určitý epitop antigenu – ta je shodná s vazebnou specifikou **protilátek**, které jsou posléze produkovány **plazmatickou buňkou**
- většina **receptorů B-lymfocytů** je tvořena Ig typu IgM a IgD
- **struktura protilátek**
  - protilátky se rozdělují do **5 tříd**: IgA, IgD, IgE, IgG a IgM, které se liší velikostí, aminokyselinovým složením a obsahem uhlohydrátů
  - **molekula Ig** se skládá ze 2 identických **lehkých** (L – light) polypeptidových řetězců (212 amk) a 2 řetězců **těžkých** (H – heavy, 450 amk) – jsou navzájem spojeny **disulfidickými můstky**
  - **lehké řetězce** jsou společné všem třídám, **těžké řetězce** jsou v jednotlivých třídách strukturně odlišné - třída Ig je určována typem těžkého řetězce
  - lehké řetězce se vyskytují ve **2 formách** – kappa a lambda
  - kterýkoli lehký řetězec se může **kombinovat** s kterýmkoli z těžkých řetězců
  - v jedné **molekule protilátky** se však vyskytují lehké řetězce pouze jednoho typu
  - za hlavní Ig **lidského séra** lze považovat molekulu IgG
  - lehké i těžké řetězce se skládají z **konstantní a variabilní části**
  - **konstantní části** ( $C_L$ ,  $C_H$ ) mají ve všech protilátkách stabilní aminokyselinové složení (COOH konec)
  - **variabilní části** ( $V_L$ ,  $V_H$ ) se liší počtem a sekvencí amk (amino konec)
  - v rámci **variabilních oblastí** L i H řetězce jsou **krátké segmenty**, které vykazují výjimečnou variabilitu – tzv. **hypervariabilní oblasti**
  - zejména tyto oblasti vytvářejí **povrchovou strukturu**, která váže antigen
  - molekulu Ig lze enzymaticky **rozštěpit** např. papainem v oblasti mezi  $CH_1$  a  $CH_2$  (Hinge oblast) a získáme tak **2 fragmenty**
    - **Fab**: váže antigen (fragment antigen binding)
    - **Fc**: umožňuje vazbu na buňky imunitního systému (fragment crystalizable)
  - **Hinge oblast** se vyznačuje určitou ohebností, což umožňuje lepší přizpůsobení vazebných **oblastí antigenu**
  - IgG, IgD i IgE jsou **monomery** X IgM je **pentamer** z 5 podjednotek spojených přídatným peptidovým řetězcem J
  - IgA je monomer, který prostřednictvím J řetězce vytváří **dimery**
- **funkce protilátek**
  - **navázání protilátky** na antigen může mít v řadě případů přímý efekt, např. **neutralizaci** bakteriálního toxinu nebo **zabránění vniknutí** viru do buňky
  - ve většině případů je však nutná **souhra** sekundárních efektorových funkcí zprostředkovaných Fc částmi Ig

- tyto části reagují s buňkami, které vyjadřují **Fc receptory** a napomáhají např. buněčně **zprostředkované cytotoxicitě** závislé na protilátkách a fagocytóze
- komplex **antigen-protilátka** se prostřednictvím Fc receptoru naváže na povrch fagocytu – což umožní **pohlcení antigenu** a jeho destrukci
- podstatou a jedinečnou vlastností **imunitní odpovědi** je schopnost tvorby enormního počtu různých typů **protilátkových molekul**, které se navzájem liší postupností aminokyselin – může být až  $10^8$  **rozdílných druhů** protilátek
- tato obrovská **rozmanitost** se u savců vyvinula jako **systém obrany** před množstvím infekčních a toxických činitelů v životním prostředí, ale i před **maligními buňkami**, které vznikají v jejich vlastním těle
- **genetika protilátek**
  - imunoglobulinové řetězce kódují **tři odlišné rodiny genů**
    - **rodina H** je na chromosomu 14
    - **rodina kappa** je na chromosomu 2
    - **rodina lambda** je na chromosomu 22
  - **uspořádání genů na chromosomu**
    - variabilní a konstantní část každého řetězce je kódovaná **oddělenými geny** – jejich funkční spojení vzniká až těsně před přepisem do mRNA
    - příkladem je syntéza těžkého řetězce v procesu **diferenciace B lymfocytu na protilátku secernující plazmatickou buňku** – jeden ze 100-300 genů pro oblast V těžkého řetězce ( $V_H$ ) se spojí s jedním genem **skromného klastru genů** pro oblast C těžkého řetězce ( $C_H$ )
    - podobně i jeden ze 100-300 genů pro **variabilní** oblast lehkého řetězce ( $V_L$ ) se naváže na jeden ze dvou typů genů pro **konstantní** oblast lehkého řetězce ( $C_L$ ), každý z těchto genů se na svém chromosomu vyskytuje jen v **jednom vydání**
    - mezi oblastmi  $V_L$  a  $C_L$  se těsně před genem  $C_L$  nacházejí **4 minigeny J** (joining) - na spojení segmentů  $V_L$  a  $C_L$  se použije jen **jeden z nich**
    - při tvorbě **těžkých řetězců** vystupuje ještě další úsek D (**diversity – rozmanitost**, protože variabilita tohoto úseku zodpovídá za rozmanitost typů těžkých řetězců
    - tento úsek je kódován **1-12 minigeny D** a je lokalizován mezi segmentem  $V_H$  a segmenty  $J_H$  a  $C_H$
    - kód pro **molekulu Ig** se tedy může kombinovat z velkého množství rozmanitých genů buňky **zárodečné linie** – umožňuje to velmi velké množství protilátek, které se odlišují v **pořadí aminokyselin**
    - další rozmanitost vyplývá z toho, že **kombinace VJ** a **VDJ** mohou vzniknout na vícerych místech (přesmyk) a inserci jedné nebo vícerych amk mezi  $V_H$  a  $D_H$  nebo mezi  $D_H$  a  $J_H$  (platí pro těžký řetězec)
  - **funkční domény imunoglobulinových genů** jsou kódované úseky DNA, které jsou rozdělené **introny**
  - například každá ze **4 domén**  $C_H - C_{H1}, C_{H2}$  a  $C_{H3}$  a  $H_i$  (hinge – pant) je kódovaná **exony**
  - jejich **introny se vyštěpí** v průběhu maturace mRNA
  - při tvorbě lehkých řetězců se uplatňuje **mechanismus exkluze alely** - kde každá buňka má dvě sady genů kappa ( $\kappa$ ) a dvě sady genů lambda ( $\lambda$ ), syntetizuje jen **jeden typ** lehkých řetězců

## 77. Imunitní odpověď (rozpoznání antigenu, kooperace buněk)

---

### T BUŇKY

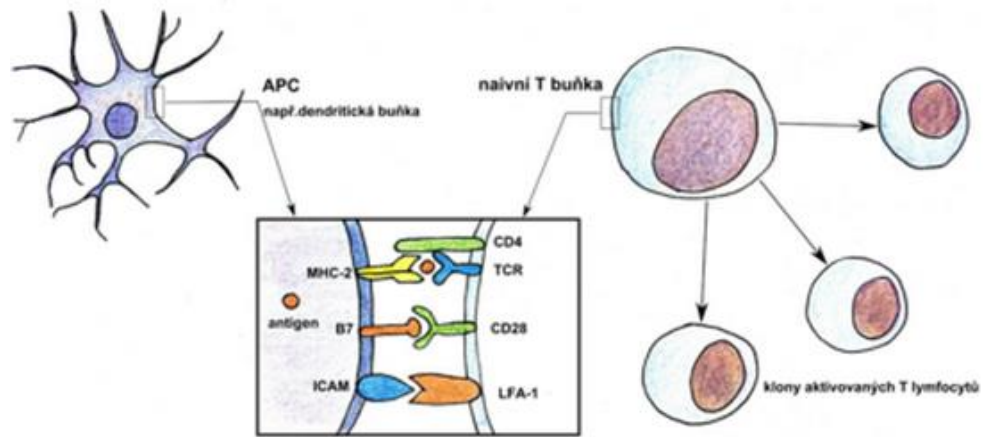
- **buněčně zprostředkovaná imunitní reakce** je jakákoli odpověď, v níž protilátky hrají podřadnou roli
- hlavním úkolem je **eliminace** buněk infikovaných virem
- **efektorovými buňkami**, které jsou schopné tyto cílové buňky lyzovat, jsou **cytotoxické lymfocyty – T<sub>C</sub>**
- T<sub>C</sub> se vyvíjejí z **prekurzorů** po kontaktu s antigenem a to tak, že antigen je po vniknutí do organismu **pohlčen APC** a po zpracování jsou na povrchu APC vystaveny **fragmenty antigenu** - některé spolu s **molekulami I. třídy**, jiné s **molekulami II. třídy MHC**
- **komplexy antigenu** a molekul I. třídy jsou rozpoznány receptory T<sub>C</sub> lymfocytů za přispění molekuly **CD8**
- antigeny s **molekulami II. třídy MHC** jsou rozpoznány lymfocyty T<sub>H</sub> buněk za pomoci molekuly **CD4**
- **vazba antigenu** na TCR představuje důležitý signál pro aktivaci T buněk
- **doplňující signály** obstarávají adhezivní molekuly, podobně jako u B-lymfocytů
- T<sub>H</sub> i T<sub>C</sub> se **začnou dělit**, k čemuž přispívají i **cytokiny**
  - **IL-1** produkovaný APC buňkou
  - **IL-2** produkovaný T<sub>H</sub> lymfocyty
- zralé T<sub>C</sub> lymfocyty rozeznají **prostřednictvím svého receptoru** infikované buňky, které vyjadřují na svém povrchu **virový antigen** a molekulu I. třídy
- T<sub>C</sub> se váže na **cílovou buňku** a prostřednictvím hydrolytických enzymů a proteinů (perforin) obsažených ve vezikulech **buňku zabíjí**
- **cytotoxický lymfocyt** tento dramatický děj přežívá a může zabít další cílové buňky

### B BUŇKY

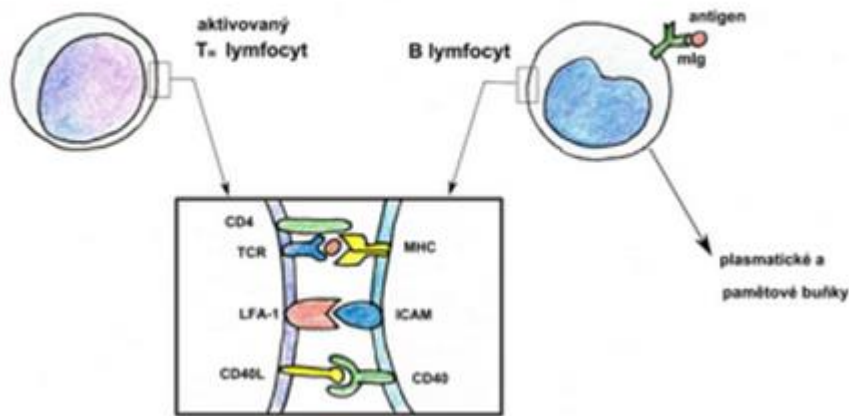
- k tomu, aby došlo k **úspěšné protilátkové odpovědi** je nutná spolupráce a souhra nejméně 3 typů buněk – **APC, T<sub>H</sub> a B lymfocytů**
- **antigen**, který pronikne do organismu je **zachycen B-lymfocyty**, které mají odpovídající **receptor**
- zároveň je **pohlčen a zpracován APB** (nejčastěji makrofág a dendritická buňka)
- **fragmenty antigenu** spolu s molekulou II. třídy MHC jsou ve vysoce **imunogenní** formě vystaveny na **povrchu APC**, v této podobě jsou rozpoznány **T<sub>H</sub> lymfocyty** s odpovídajícími **receptory**
- tato vazba představuje **signál k aktivaci T<sub>H</sub> lymfocytu**, ale sama o sobě nestačí
- jsou potřebné další, tzv. **druhotné signály**, které spočívají ve vazbě několika adhezivních molekul mezi APC a T<sub>H</sub> buňkou – nejdůležitější jsou např. **CD28 a LFA1** na T<sub>H</sub> a jejich ligandy na APC : **B7 a ICAM-1**
- k T<sub>H</sub> aktivaci dále přispívají **cytokiny** produkované APC, zejména **IL-1**
- výsledkem je dělení **prekurzorů T<sub>H</sub>** a vzniknou klonů aktivovaných T<sub>H</sub> lymfocytů, tyto aktivované T<sub>H</sub> lymfocyty pak dodávají **potřebné signály B-lymfocytu**
- k aktivaci B-lymfocytu jsou třeba opět nejméně **2 signály**
  - **antigen reagující s mIg** (membránový imunoglobulin) na B buňkách
  - **stimulační signály** z T<sub>H</sub> buněk
- samo **navázání antigenu** na BCR (B cell receptor) má často za následek **neodpovídavost B-lymfocytu** a někdy i jeho **odumření**
- jsou-li přítomny **aktivované T<sub>H</sub> lymfocyty** dochází k jejich kontaktu s **B-lymfocyty** prostřednictvím receptoru CD40 na B buňce a ligandu CD40L na T<sub>H</sub> buňce
- **T<sub>H</sub> lymfocyt** zároveň produkuje IL-2, IL-4, IL-5 a IL-6
- vlivem těchto **signálů** začnou B buňky **proliferovat**
- během tohoto období podléhají **variabilní geny** v klonech B buněk zvýšenou měrou **mutacím**
- na buněčném povrchu se objevují **mutantní formy mIg** s různou afinitou k antigenu, přežívají pouze B lymfocyty, které vážou **antigen nejsilněji**, ostatní hynou
- zároveň dochází k dalšímu **přestavění segmentů DNA** (přepínání tříd) a lymfocyty dokončí svůj vývoj v **plazmatické buňky**

- část **B buněk** se stává paměťovými buňkami
- **primární odpověď** na antigen nastupuje pomaleji a vyznačuje se přítomností **protilátek třídy IgM**
- **opakované setkání** s tímtež antigenem vyvolá **sekundární odpověď**, která nastupuje již mnohem rychleji, je silnější a přetrvává mnohem **delší dobu**
- při **sekundární odpovědi** jsou přítomné hlavně **protilátky typu IgG**

**Spolupráce APC a T<sub>H</sub> lymfocytu:**



**Aktivace B lymfocytu:**



## 78. Genetika imunoglobulinů, B a T receptorů

- rozpoznání **cizího antigenu** je umožněno existencí dvou typů molekul fungujících jako **receptor**
  - receptor T buněk
  - receptor B buněk a odvozené imunoglobuliny
- **imunoglobuliny - Ig**
  - **glykoproteiny** vyskytující se jako
    - **zakotvené** v plazmatické membráně B-lymfocytů jako tzv. membránové nebo povrchové Ig (mIg) tvořící receptor
    - **volně přítomné** v krvi, lymfě i tkáňových tekutinách
  - **kontakt** mezi mIg a cizím antigenem je nutný pro **indukci tvorby volných protilátek**
  - většina receptorů B-lymfocytů je tvořena Ig typu **IgM a IgD**
- **T receptory**
  - **TRC heterodiméry** jsou asociovány s přídatnými **polypeptidy**, s nimiž vytvářejí **TRC-komplex**
  - **TRC-komplex** je skupina 3-5 polypeptidů, které jsou nutné k **expresi TRC** na povrchu T-lymfocytu a k přenosu **signálu do nitra buňky**
  - **heterodimer** složený z 2 polypeptidových řetězců
    - 95% jsou  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce (TCR 2)
    - 5% jsou  $\gamma$  a  $\delta$  řetězce (TCR 1)
  - **TCR 2**
    - **řetězce  $\alpha$  a  $\beta$**  jsou transmembránové polypeptidy, složené z **externí části**, která je zakotvena v plazmatické membráně **transmembránovou částí** a krátkou **cytoplazmatickou oblastí**
- **genetika B a T receptorů**
  - schopnost imunitního systému **rozpoznávat antigeny** závisí na molekulách tvořících **receptor** na B a T lymfocytech
  - obě **buněčné populace** mohou rozeznat obrovské množství antigenů
  - buněčné a **molekulární procesy** vedoucí k této rozmanitosti jsou u obou typů receptorů **následovné**
    - v prvé řadě jsou to **změny**, které se nahromadily v průběhu **evoluce** a jsou předávány z **generace na generaci**, kdy původní gen byl „namnožen“ procesem **opakovaných duplikací**
    - zároveň probíhaly **mutace**, které tyto geny rozrůznily, takže nejsou přesnými kopiemi **původního genu** (tak vznikla tzv. genová rodina)
    - zůstaly-li tyto **rozrůzněné geny** uloženy v jedné chromosomové oblasti, vytvářejí **genový komplex** – ten obsahuje mnoho genů nebo segmentů, které kódují **variabilní oblasti** a pouze jeden nebo několik málo segmentů kódují **konstantní oblast**
    - v rámci **komplexu** pak v somatických buňkách probíhají **další změny** (somatická diverzifikace), které se ovšem na potomstvo **nepřenášejí** (jedná se o různé **přestavby genů** komplexu v jednotlivých buňkách, jejichž výsledkem je definitivní úsek DNA, kódující konkrétní receptor)
- **genetika B receptorů**
  - **řetězce imunoglobulinů** jsou kódovány třemi genovými komplexy
    - **IgH** – pro těžký řetězec (chromosom 14)
    - **IgK a IgL** – pro lehké řetězce kappa (chromosom 2) a lambda (chromosom 22)
  - **IgK komplex**
    - genový komplex, skládající se ze **tří oblastí**
      - **variabilní (VK)**
      - **spojovací (JK)**
      - **konstantní (CK)**
    - **konstantní oblast** spojuje 1 gen, ostatní jsou tvořeny větším počtem genů
    - každý **V gen** má 2 exony, oddělené krátkým intronem
    - **první exon** determinuje tzv. vedoucí sekvenci polypeptidu, která je potřebná pro transport protilátky endomembránovým systémem buňky



- **druhý exon** kóduje variabilní část protilátky
- každý lymfocyt obsahuje více než **100 segmentů IgK**, z nich však pouze 3 jsou překládány do jazyka bílkovin – jeden z **VK** genů, jeden z **JK** genů a **CK** gen, což je umožněno tím, že v průběhu **vývoje B-lymfocyty** dochází k přestavbě **segmentů**
- 1 z genů VK je spojen s 1 z genů JK a dochází k deleci DNA, která je uložena mezi **vybranými geny**
- takto **přestavěné geny** jsou transkribovány do mRNA včetně sekvencí mezi kombinací VK – JK a segmentem CK
- v rámci **postranskripčních úprav** jsou tyto sekvence vyštěpeny jako introny
- zralá mRNA obsahuje **specifickou kombinaci V-J** spojenou **C segmentem**
- **delece** „nadbytečné“ DNA během několika přestaveb genů je umožněna existencí V i J
- označuje se jako **somatická mutace**
- **IgL komplex**
  - genový komplex **odlišného uspořádání**
  - kromě mnoha genů V $\lambda$  genů obsahuje 6 genů C $\lambda$
  - každý C gen má svůj **vlastní segment J**
  - v průběhu přestaveb se kombinuje **kterýkoli z V genů** s některým z **párů J-C**
  - každý lymfocyt nese informaci pro oba typy **lehkých řetězců**
  - **imunoglobuliny** produkované jednou buňkou však mají buď kappa nebo lambda řetězec, nikdy **oba současně**
  - tento jev se nazývá **alelická exkluze**
- **IgH komplex**
  - **složitý komplex**, obsahující u člověka nejméně 100V, 20D a 5J segmentů
  - oblast C se zde skládá z **několika segmentů** – C $\mu$ , C $\delta$ , C $\gamma$ , C $\epsilon$ , C $\alpha$
  - podle toho, který **C gen je funkční**, lze vzniklý imunoglobulin zařadit do třídy (C $\mu$  – IgM, C $\delta$  – IgD atd.)
  - **kroky přestavby**
    - spojení DH s jedním JH genem
    - k tomuto spojení je následovně **přemístěn** jeden z VH genů
    - po ukončení **uspořádání těchto segmentů** dochází k jejich transkripci, která pokračuje směrem k **oblasti C**, k C $\mu$  genu
    - **transkripce se zastaví**, a výsledkem je primární transkript, z něhož jsou vystříhány všechny **nekódující sekvence**
    - po translaci se v buňce vytvářejí **těžké řetězce  $\mu$** , které asociují s **lehkými řetězci** a kompletní molekula IgM je vystavena na **buněčném povrchu**
    - některé **primární transkripty** obsahují informaci C $\mu$  i C $\delta$
    - oblast C $\mu$  je vystřížena a po translaci buňka vytváří **těžké řetězce  $\delta$**  a **kompletní molekuly IgD**
  - všechny tyto **procesy** probíhají během **vývoje lymfocyty** z prekurzorů ve **zralé B buňce** a pak se zastaví
  - po **setkání lymfocyty s antigenem** pokračují během jeho proliferace přestavby na **úrovni DNA**
- **alelická exkluze**
  - každá protilátka se skládá ze **2 identických těžkých** a **2 identických lehkých řetězců** kappa nebo lambda
  - Ig molekuly produkované **jednou buňkou** mají stejnou specifitu pro antigen, mají identické **V-oblasti**
  - v každém **B-lymfocyty** je tedy aktivní **genový komplex Ig** pouze jednoho z chromosomů 2 nebo 22 (pro lehké řetězce) a jednoho z chromosomů 14 (pro těžké řetězce)
  - **ostatní Ig genové komplexy** homologních chromosomů jsou vyloučeny z funkce – nedochází u nich k přestavbám segmentů ani k transkripci = tzv. **alelické exkluze** (jedna alela z páru není aktivní)
- **variabilita Ig**

- obrovská **variabilita protilátek** je umožněn třemi mechanismy
  - pokud předpokládáme, že se segmenty V, D a J mohou **kombinovat náhodně**, pak může vzniknout řádově  $10^7$  různých kombinací (lze tedy rozlišit  **$10^7$  různých antigenů**)
  - **možnost nepřesného napojování konců segmentů** při procesu jejich spojování – některé nukleotidy mohou být deletovány či insertovány
  - **somatické mutace**, které se uplatňují v době, kdy B-lymfocyt stimulovaný antigenem začne proliferovat – během replikace DNA se mohou vyskytnout **chyby**, které mohou uniknout reparačním mechanismům
- **genetika T receptorů**
  - T receptor je kódován **třemi genovými komplexy**
    - **TCR- $\alpha$**  uložený na 14. chromosomu
    - **TCR- $\beta$**  uložený na 7. chromosomu
    - **TCR- $\gamma$**  uložený na 7. chromosomu
  - geny pro  **$\delta$ -řetězec** (TCR- $\delta$ ) jsou vmezeřeny mezi geny TCR- $\alpha$
  - **genový komplex** TCR-je složený ze 3 oblastí – variabilní (V $\alpha$ ), spojovací (J $\alpha$ ) a konstantní (C $\alpha$ )
  - **C-oblast** obsahuje 1 gen, ostatní jsou tvořeny velkým **množstvím genů**
  - pořadí oblastí je **V-J-C**
  - v komplexu TCR- $\beta$  je navíc ještě **segment D** s jiným uspořádáním genu
  - úsek D-J-C je zde **duplikován**: Vn-D1-J1-C1-D2-J2-C2
  - každý lymfocyt pak obsahuje **několik stovek segmentů** TCR, z nichž však **pouze 7** je přeloženo do proteinů: 1V $\alpha$ , 1J $\alpha$  a 1C $\alpha$ ; 1V $\beta$ , 1D $\beta$ , 1J $\beta$  a 1C $\beta$
  - vzniknou tak **2 polypeptidické řetězce**  $\alpha$  a  $\beta$ , tvořící receptor v plazmatické membráně
  - v průběhu vývoje **T-lymfocyту** dojde k představě segmentů následujícím způsobem
    - jeden z **genů V $\alpha$**  je spojen s jedním z **genů J $\alpha$**  a dojde k **deleci DNA**, která je uložena mezi **vybranými geny**
    - v rámci jednoho z **duplikovaných úseků** D-J-C se spojí jeden gen D $\beta$  s jedním z genů V $\beta$ , opět dochází k **deleci úseků DNA**
    - takto **přestavěné geny** jsou transkribovány do mRNA, vyštěpeny introny a dokončeny **úpravy** ve zralou mRNA
    - **delece** nadbytečné DNA během přestaveb genů je umožněná **existencí signálních sekvencí**, které obklopují každý segment V, D i J
    - **signální sekvence** jsou
      - **heptamery** – palindromní sekvence 7 párů bází: CACAGTG (GTGTCAC)
      - **mezerníky** – skládají se buď přímo z 12 nebo 23 nukleotidů
      - **nonamery** – sekvence 9 nukleotidů, která je charakteristická přítomností několika A na jednom a několika T na druhém vlákně DNA: ACACAAACC (TGTGTTTGG)
    - **mezerníky**
      - **liší se délkou** a zabraňují napojení dvou genů ze stejné oblasti (2J genů, 2V genů, atd.)
      - při **párování** platí totiž pravidlo 23/12, tzn. že úsek který v mezerníku obsahuje **23 nukleotidů** se může párovat pouze s úsekem s **12 nukleotidy v mezerníku**
      - tímto způsobem se do **těsného sousedství** může dostat kterýkoli z V-genů s kterýmkoli z J a D genů
      - **DNA uložená mezi nimi** vytváří jednovláknové smyčky, které jsou vystřiženy a **sousední segmenty spojeny**
    - tyto **signální sekvence** jsou umístěny na 3' **konci** každého V-genu, na obou koncích D segmentu a na 5' konci každého J-genu
    - v rámci **jednoho řetězce DNA** může pak dojít k **párování signálních sekvencí** některého z V-genů s některým J-genem a D-segmentem (párování se týká heptamerů a nonamerů)

## 79. Genetika transplantací, transplantační pravidla, histokompatibilitní systémy

- transplantace je **přenos buněk**, tkání nebo orgánů z jednoho místa organismu na druhé nebo mezi **dvěma organismy**
- jeden z nich je **dárce** transplantátu (**štěpu**), druhý je jeho **příjemcem**
- vyměníme-li štěpy náhodně mezi **nepříbuznými jedinci**, dojde většinou k jejich odhojení a transplantace je **neúspěšná**
- je to způsobeno tím, že u většiny **vyšších živočišných druhů** byla zjištěna přítomnost histokompatibilitních (H) genů, které zodpovídají za **antigenní výbavu** každého jednotlivce (histokompatibilita = tkáňová slučivost)
- **výsledek transplantace** závisí na genetických vztazích mezi dárce a příjemcem
  - v případě **shody v H genech** a tím i v **H antigenech** dárce a příjemce je **štěp přihojen** a trvale přežívá
  - liší-li se **dárce a příjemce** ve výbavě antigenů, pak je transplantát **odhojen imunitní reakcí** namířenou proti odlišným **H antigenům** – při tom se účastní oba typy imunitní reakce, ale především buněčně **zprostředkovaná imunita**
  - jde o důsledek **rozpoznání cizích antigenů** na povrchu buněk transplantátu T-lymfocyty příjemce
- **typy transplantátů**
  - **autotransplantát**
    - přenos tkáně z **jednoho místa na místo jiné** na témže těle
    - nevyvolává žádné **imunologické reakce** – MHC vnímá transplantát jako sobě vlastní
  - **isotransplantát**
    - přenos mezi **dvěma organismy** se stejným genetickým základem
    - příkladem jsou transplantace u **identických dvojčat**
  - **allograft**
    - přenos mezi **dvěma organismy stejného druhu**
    - nejčastěji se **vyskytující typ**
    - problémem je rozlišené **genetické pozadí**
    - hrozí **riziko imunitní reakce** a rejekce (odmítnutí) štěpu
  - **xenograft**
    - přenos z **jednoho živočišného druhu** na jiný
    - nastává velmi rychlá **reakční reakce** daná odlišností v genech
    - nejčastěji jde o **reakci IgM** nebo buněčně zprostředkovanou
- **histokompatibilitní antigeny**
  - glykoproteiny na plazmatické membráně **většiny buněk** (ne na erytrocytech)
  - **dědí se mendelovsky**
  - jsou **polymorfní** – několik alelních forem
  - existují **2 skupiny**
    - lokusy uložené v **jedné chromosomální oblasti**
      - **tvoří MHC** (hlavní histokompatibilitní komplex)
      - MHC je **rozsáhlý komplex genů** determinujících povrchově buňky – antigeny v **plazmatické membráně**
      - tyto antigeny se chovají jako **transplantační** – jsou příčinou odhojení tkáně při **inkompatibilní transplantaci**
      - hlavní **funkcí MHC** molekul je prezentovat antigeny nebo jejich **fragmenty** buňkám **imunitního systému**, zejména T-lymfocytům
      - umožňuje to rozlišení **cizích nebo vlastních složek organismu**
      - **MHC člověka = HLA** (human leukocyte antigen) – na p raménku 6. chromosomu, 2-3 cM
      - HLA se dědí, výsledný typ je **kombinací mateřské a otcovské** informace
      - jednotlivé buňky lidského těla **exprimují molekuly MHC** v různé míře

- u buněk, jež mají za **normálních okolností** malou aktivitu, dochází k jejich stimulaci po **vystavení interferonu gamma (IFNg)** nebo tumor necrosis faktoru (TNF)
- lokusy rozmístěné po **celém genomu** v různých chromosomech
  - tzv. minor H-antigeny
  - determinují **většinu H-antigenů**
  - rozdíly v **minor H-antigenech** u těla a štěpu se projevují pomalejším **odhojováním**

• **transplantační zákony**

- **soubor zákonitostí**, kterým se řídí osud transplantátu
- v roce 1966 je vyslovili **Snell a Stimpfling**, pracovali s inbredními kmeny laboratorních zvířat (myši)
- pro zjednodušení jsou **dva inbrední kmeny** laboratorních myši - A a B, liší se pouze alelami **jediného histokompatibilitního genu**
- základním pravidlem je, že **štěp je odhojen**, nese-li H-antigeny nepřítomné u příjemce

- **1. zákon**

- tkáň transplantovaná mezi **geneticky identickými** příslušníky téhož kmene je **trvale přijímána**
- **syngenní transplantace** je úspěšná

- **2. zákon**

- tkáň transplantovaná mezi příslušníky **dvou inbredních kmenů**, které se liší alelami jednoho nebo několika histokompatibilitních systémů je příjemcem **destruována**
- **allogenní transplantace** je neúspěšná, jedinec kmene A (aa) reaguje imunitní reakcí proti antigennímu produktu kmene B (bb) a naopak

- **3. zákon**

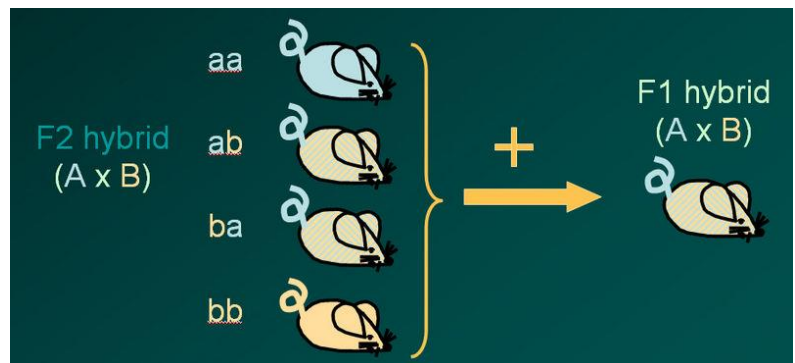
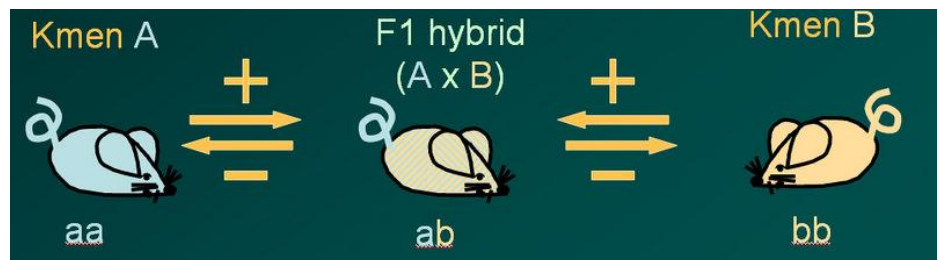
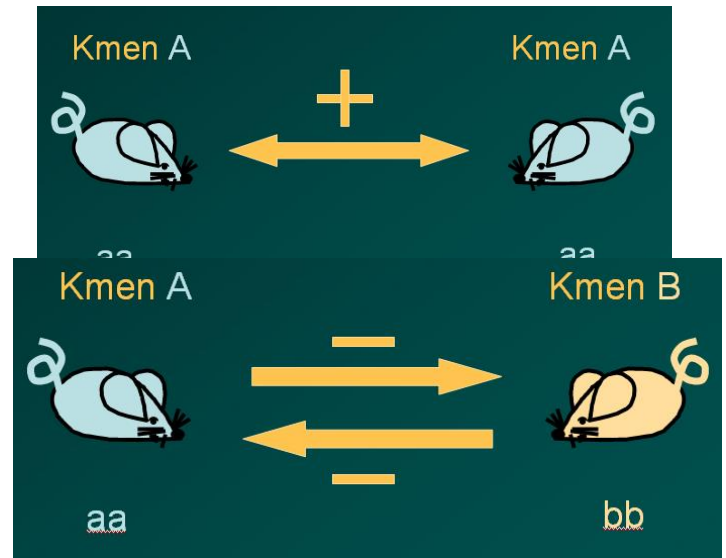
- tkáň jedinců obou **parentálních kmenů**

transplantovaná na příslušníky F1 hybridní generace je **trvale přijímána**, zatímco tkáň F1 hybridních jedinců je příslušníky **obou rodičovských kmenů odhojována**

- v důsledku **kodominance** histokompatibilitních genů jsou součástí **aloantigenní výbavy F1 hybridu** antigenní produkty odlišných alel obou rodičovských kmenů
- F1 hybrid je tak **geneticky areaktivní** vůči rodičovským antigenům, ale naopak jeho **tkáň navozuje** u obou rodičovských kmenů **imunitní reakci**

- **4. zákon**

- tkáň **příslušníků F2 hybridní generace** a všech dalších generací je **trvale přijímána F1 hybridními příjemci**
- je tomu tak proto, že se v dalších generacích mohou objevit pouze **různé**

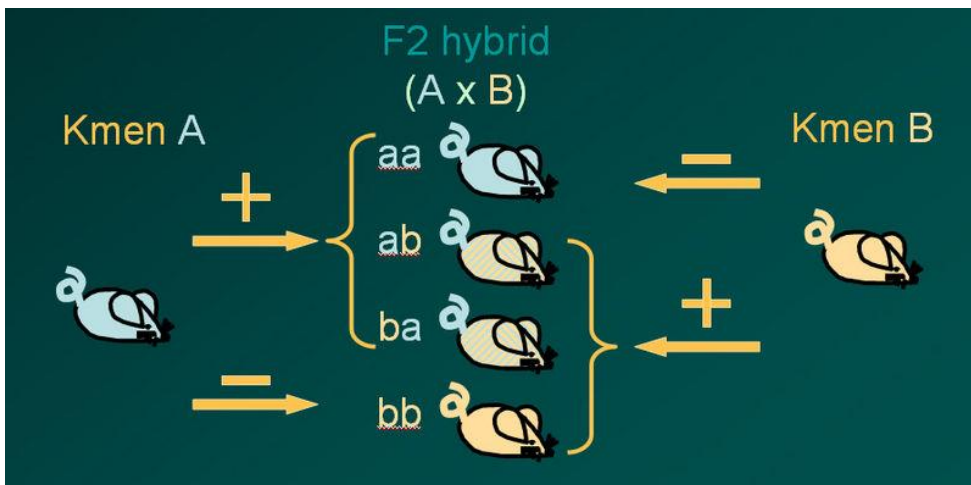


**kombinace aloantigenů** rodičovských kmenů (pokud nedojde k mutaci některého lokusu), které jsou všechny **obsaženy v genotypu F1** hybrida

- **F1 hybrid** dvou inbredních kmenů je univerzálním příjemcem štěpů obou parentálních kmenů a všech typů **potomků** jejich vzájemného křížení

- **5. zákon**

- tkáň jedinců obou parentálních kmenů je částí příslušníků F2 hybridní generace odhrojována a u části trvale přežívá
- na příkladu, kdy se rodičovské inbrední



**kmeny** liší alelami jediného histokompatibilitního lokusu vidíme, že přežívá **75% rodičovských štěpů** na F2 hybridních příjemcích

- **frekvence** přežití rodičovských štěpů na **F2 hybridních příjemcích**

- snižuje se se **zvyšujícím se počtem** odlišných histokompatibilitních lokusů

$$f_x = \left(\frac{3}{4}\right)^n$$

- **fx** je **frekvence** trvale přežívajících štěpů, n je počet histokompatibilitních (H) lokusů, jimiž se parentální **kmeny** odlišují

• **výjimky z transplantačních zákonů**

- **neúspěšná transplantace kůže** ze samců na samice téhož inbredního kmene - způsobeno expresí **samčího transplantačního antigenu** kódovaného H-lokusem na chromozómu Y (imunitní odpověď anti-H-Y)
- **neúspěšná transplantace kůže samce** parentálního kmene na F1 **samici** - odpověď proti H-Y antigenu
- **neúspěšná transplantace kůže jedinců obojího pohlaví** téhož parentálního kmene, z něhož pocházel otec, na F1 samce - odpověď proti H-X antigenu kmene A
- **neúspěšná transplantace kůže jedinců obojího pohlaví** téhož parentálního kmene, z něhož pocházel otec, na F1 samce - odpověď proti H-X antigenu kmene B (viz prezentace)

• **reakce štěpu proti hostiteli** (GVHR - graft versus host reaction)

- **podmínky jsou**
- **hostitel toleruje** štěp - a to:
  - je-li **hostitelem novorozenec**, který nemá plně vyvinutý imunitní systém
  - hostitelem je **dospělý jedinec**, jehož imunitní systém je vyřazen z činnosti, např. po **ozáření**, patologický stav - imunodeficience atd.
- štěp **obsahuje lymfatické buňky** schopné reakce, zejména T-lymfocyty
  - v praxi, nejčastěji u **transplantace kostní dřeně**
  - v tomto případě tyto **T-lymfocyty** útočí proti cizím antigenům hostitelova těla a vzniká **zánětlivá reakce**, protože hostitel bývá navíc kvůli transplantaci záměrně imunitně oslaben
- existuje **antigenní rozdíl** mezi příjemcem a dárcem
- jsou-li tyto **podmínky splněny**, štěp odpovídá na antigeny příjemce a rozvíjí se reakce, která **hostitele vážně ohrožuje**
- vzniká celý **komplex poškození** - úbytek váhy, zvětšení jater, sleziny a lymfatických uzlin, anemie, poškození GIT a kůže
- může vést až **ke smrti**

- **reakce štěpu (odhojení)**
  - ačkoliv na reakci proti štěpu se podílí **B-buňky i protilátky**, tak hlavní role zůstává na **T-buňkách**
  - jejich reakce je závislá na předložení **antigenů přes MHC**
  - do procesu se zapojují také **pomocné T-buňky (T<sub>H</sub>) a lymfokiny**
  - z lymfokinů má hlavní význam **interleukin 2 (IL-2)**, který aktivuje T<sub>C</sub> buňky
  - při odhojování nebývá napadán celý **transplantát rovnoměrně**
  - většinou bývá reakce zaměřena proti **vaskulárnímu endotelu** nebo parenchymálním **buňkám orgánů**
  - role **T-buněk v rejekcích** byla potvrzena testy na myších
  - u myši s vrozenou **aplázií thymu** byla pozorována neschopnost odhojovat **transplantáty**
  - stejný efekt mělo také **operační odstranění thymu** spolu s radioterapií odstraňující zbytek **imunokompetentních T-buněk** v těle
  - naopak **injekce T-buněk** těmto myším vede k rychlé a agresivní odhojovací reakci
  - **hyperakutní odhojení**
    - vyskytuje se **vzácněji**, zejména u pacientů, kteří již mají v krvi protilátky proti **štěpu** (krevní transfuze, těhotenství nebo rejekce předchozího štěpu)
    - dochází k destrukci buněk **cévního endotelu**, dochází ke vzniku sraženin a zablokování krevního **zásobení štěpu**
  - **akutní odhojení**
    - trvá dny až týdny, než dojde k **odhojení**
    - hlavní je role **T-buněk**, u často již dříve senzibilizovaných pacientů
  - **chronické odhojení**
    - závislé na genetických rozdílech mezi **dárce a příjemcem**
    - jedná se o **pomalý proces**, který může trvat měsíce až roky
    - pro tento typ rejekce je typická **luminární obliterace cév** a intestinální fibrózy
    - často se objevuje u **transplantovaných ledvin** i deset let po operaci
  - **rychlost odhojování** je závislá na genetické odlišnosti dárce a příjemce
- **transplantace u člověka**
  - předpokladem **úspěšné transplantace** u člověka je tedy co největší shoda v H-antigenech mezi **dárce a příjemcem**
  - shoda ve všech **antigenech** (tedy i v minor H) není možná, výjimku tvoří **homozygotní dvojčata**
  - v praxi je možné **typizovat antigeny HLA**, které představují velmi silnou transplantační bariéru – podle výsledků jsou vybíráni **vhodní dárce a příjemci**, aby shoda byla co největší
  - každý jedinec má **2 haplotypy genů HLA (A,B,C,D)** zděděné od svých rodičů
  - oba haplotypy jsou vyjádřeny, takže **každá buňka** nese na svém povrchu mateřské i otcovské antigeny
  - vysoký počet **známých alel HLA genů** způsobuje miliony možných kombinací a není snadné najít **optimálního dárce a příjemce** – typizace HLA se provádí několika způsoby
  - **serologická typizace**
    - **zdroj lidských protilátek** = séra pacientů po opakovaných transfuzích krve, séra žen po opakovaných těhotenstvích a séra dobrovolníků, kteří se podrobili transplantaci kožního štěpu
    - jsou to **polyklonální protilátky** – reagují nejen s buňkami dárce, ale i jiných osob
    - **některé epitopy** jsou přítomné na molekulách MHC různých osob, jsou po ně **společné** = tzv. veřejné (public) specifity
    - existují i **jedinečné epitopy**, přítomné na molekule MHC jedné osoby = tzv. **soukromé (private) specifity**
    - **polyvalentní protilátky** mohou být upraveny tak, že je zvýšena jejich specifita a mohou reagovat pouze s **buňkami jednoho haplotypu**
    - tak byl získán panel **cytotoxických látek**, které jsou namířeny proti všem známým **antigenům HLA**
  - **MLR (mixed lymphocyte reaction)**

- jedná se o **buněčnou reakci** používanou k typizaci antigenů HLA-D
- bylo zjištěno, že **přežívání transplantátu** je úspěšné i tehdy, shodují-li se dárce a příjemce pouze v **těchto antigenech** – zejména v HLA-DR
- test je **časově náročný** (trvá několik dní) – nevýhoda v případě, že je k **transplantaci** odebírán orgán z **mrtvého těla** – možno skladovat do 48 hodin
- princip spočívá v tom, že smícháme **in vitro lymfocyty** dvou různých osob – mají-li odlišnou **antigenní výbavu**, začnou se vzájemně stimulovat a prodělávají **blastickou transformaci** a proliferují
- proliferace buněk je měřena **inkorporací izotopu** ( $^3\text{H}$  thymidin) do replikující se DNA – **naměřená radioaktivita** je srovnávána s radioaktivitou v kultuře **syngenních lymfocytů**
- buňky odpovídající v **MLR** jsou převážně CD4+ lymfocyty
- test se používá v podobě **jednosměrné MLR** – lymfocyty jednoho jedince jsou ozářeny nebo ovlivněny **mitomycinem**, takže nejsou schopné odpovídat, chovají se pouze jako **stimulující lymfocyty**
- buňky druhého jedince jsou **buňky reagující**
- **typizace pomocí molekulárních technik**
  - založeny na analýze **polymorfismů** restrikčních fragmentů (RFLP)
  - zjednodušení typizace přinesla **PCR** – je využívána zejména v kombinaci s hybridizací se **sérií oligonukleotidových sond**, které jsou specifické pro určité alely
- **imunosuprese**
  - ve většině případů se nezdaří nalézt **plně identického dárce** a příjemce ani v HLA-antigenech natož v ostatních H-systémech
  - jsou vyvíjeny postupy, které **potlačují proliferaci příjemcových lymfocytů**
  - **nespecifická imunosupresiva** (steroidy, cyklosporin, azathioprin) potlačují všechny **klony lymfocytů** (nevýhoda) – příjemce je ohrožen běžnými infekcemi

## 80. Hlavní histokompatibilní komplex člověka

- jedná se o **genetický systém**, který je primárně zodpovědný za **rozeznávání vlastního od cizorodého** (Major Histocompatibility Complex)
- u člověka je **hlavním histokompatibilním systémem** komplex **HLA** (Human Leucocyte Antigen) – rozsáhlý komplex genů, které determinují **povrchové molekuly** (antigeny) umístěné v plazmatické membráně buněk
- antigeny se chovají jako **transplantační**, tzn. že jsou příčinou **odhojení tkáně** při inkompatibilních transplantacích
- **HLA systém** je homologický s **lokusem H-2** u myši (systém, na kterém byl poprvé objeven princip histokompatibility) a je lokalizovaný v určitém úseku krátkého ramena **chromosomu 6**
- obsahuje geny pro **histokompatibilní antigeny**, složky komplementu a pravděpodobně i **Ir-geny** (immune response genes, geny zodpovědné za intenzitu imunitní odpovědi)
- hlavní **fyziologickou funkcí** molekul MHC je **předkládat antigeny** nebo jejich fragmenty buňkám **imunitního systému**, především T-lymfocytům (prezentace antigenu je prvním předpokladem pro rozvoj **imunitní reakce** a tím obrany proti napadení mikroorganismy)
- pomocí těchto **molekul** buňky imunitního systému vzájemně **kooperují**
- v rámci **komplexu HLA**, nebo v jeho těsné blízkosti, leží i další lokusy – jde především o jeden **polymorfní enzym** (glyoxalasa – GLO) a **dvě choroby** (deficit 21-hydroxylasy – kongenitální adrenální hyperplasie a olivopontocerebelární ataxie)
- známe **5 HLA komplexů** – HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-DR (D-region related – ve vztahu k oblasti D)
- každý z nich má **množství alel** (dnes známo nejméně 20 alel pro HLA-A, 40 alel pro HLA-B, 8 a více pro zbylé 3)

- sada HLA genů na **jednom chromosomu** tvoří **haplotyp**, jedinec má tedy **2 haplotypy** (od každého z rodičů) a v každém **5 determinantů**
- **pořadí oblastí v MHC** je u různých živočišných druhů odlišné
- HLA geny jsou v tak **těsné vazbě**, že vystupují jako jednotka
- pravděpodobnost, že 2 děti budou mít **stejně haplotypy** je 1:4
- velké množství alel na každém z pěti lokusů umožňuje **variabilitu HLA**
- pokud je HLA systém **výrazně polymorfní**, dá se využít jako jediný genetický marker při populačních výzkumech nebo při **určování otcovství**
- **imunologové dělí** genové produkty HLA systému na
  - **molekulové produkty třídy I**: antigeny HLA-A, B a C (pořadí ve směru do centromery je B, C, A)
  - **molekulové produkty třídy II**: antigeny HLA-D a DR (antigeny buněk B)
  - **molekulové produkty třídy III**: složky komplementu (C2, C4, faktor B)
- všechny geny I. třídy leží v **jedné oblasti**, geny II. třídy zase v **jiné oblasti** komplexu, jejich pořadí ve směru od centromery je II - III - I
- mezi značným počtem genů jsou i **pseudogeny**
- pro každý z genů I. a II. třídy existuje **mnohotná alelie**
- **alelní formy MHC** se liší ve struktuře vazebného místa a tím i schopností vázat peptidy
- **polymorfismus** zde představuje selekční výhodu související se základní rolí molekul MHC, tj. **prezentace antigenu**
- mezi geny v HLA jsou pozorovány **rekombinace**, ne však příliš časté
- funkce molekul MHC je **prezentace antigenu T-lymfocytům**, čímž je umožněna u vzájemná **kooperace buněk** imunitního systému
- **T-lymfocyty rozpoznávají**
  - **cizí antigeny** v komplexu s **vlastními molekulami MHC**, což vede k imunitní reakci
  - **vlastní antigeny** v komplexu s **vlastními molekulami MHC**, což vede k toleranci
  - **cizí molekuly MHC** (transplantační reakce)
- **molekuly I. třídy**
  - jsou vyjádřeny na všech **jaderných somatických buňkách**
  - složeny z **těžkého řetězce  $\alpha$**  (44 kDa), který je nekovalentně asociován s **lehkým řetězcem  $\beta$ 2-mikroglobulinem**
  - **$\alpha$ -řetězce** ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3) jsou glykoproteiny se 3 funkčními oblastmi - externí, transmembránovou a cytoplazmatickou
  - **geny pro  $\alpha$ -řetězec** se skládají z 8 exonů a 7 intronů
  - 1 exon kóduje 5' oblast, která se **překládá** a vedoucí sekvenci L, další 3 exony nesou informaci pro  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 a  $\alpha$ 3 **externí domény**
  - 5. exon kóduje **transmembránovou oblast** a zbylé exony **cytoplazmatickou oblast** a 3' oblast, která se opět nepřekládá
  - **$\beta$ 2-mikroglobulin** je rozpustný protein složený z 99 amk, gen pro  $\beta$ 2-m neleží v HLA komplexu, ale je lokalizován na 15. chromosomu a skládá se ze 3 exonů a 2 intronů
  - většina **jedinců téhož druhu** i různých druhů má identické molekuly  $\beta$ 2-m, znamená to, že jeho **primární struktura** je v evoluci vysoce konzervovaná
  - oba řetězce vytvářejí **diméry** na buněčném povrchu
  - molekuly HLA-A, B, C jsou klasické **transplantační antigeny**, vysoce polymorfní
  - při bližší analýze byly identifikovány **další geny** - E, F, G s nižším polymorfismem, jejich funkce není **dostatečně známá**
  - HLA-G jsou vyjádřeny na **trofoblastu**, hrají roli při potlačení imunitní **odpovědi matky proti plodu**
- **molekuly II. třídy**
  - nemají tak širokou **tkáňovou distribuci** jako I. třída
  - jsou vyjádřeny na **B-lymfocytech** a aktivovaných makrofázích
  - jsou to **heterodimery** složené z jednoho těžkého  $\alpha$ -řetězce a jednoho lehkého  $\beta$ -řetězce



- oba řetězce jsou **glykoproteiny**, oba se skládají z externí, spojovací, transmembránové a cytoplazmatické oblasti
- **extracelulární část** je tvořena dvěma doménami –  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$
- domény  $\alpha 1$  a  $\beta 1$  jsou **variabilní**,  $\alpha 2$  a  $\beta 2$  jsou **konstantní**
- geny pro  $\alpha$  a  $\beta$ -řetězce se skládají z **5 nebo 6 exonů**
- 1 exon determinuje oblast 5' (ta se nepřekládá) a **vedoucí sekvenci**, 2.a 3. exon kódují 2 **externí domény**, 4. exon **transmembránovou oblast** a 5. a 6. exon oblast **cytoplazmatickou** a oblast 3', která se opět nepřekládá
- oba řetězce jsou **nekovalentně vázány** interakcí druhých externích domén, uvnitř buňky jsou syntetizovány **separátně**, po syntéze jsou asociovány s třetím řetězcem  $\gamma$
- v okamžiku, kdy tento komplex dospěje k **plazmatické membráně**, je  $\gamma$ -řetězec disociován a na membráně je vystaven pouze **dvouřetězcový komplex**
- **molekuly III. třídy**
  - jsou zde uloženy lokusy kódující **složky komplementu** C2, C4, Bf a dále **TNF** (tumor necrosis faktor), **Hsp** (heat shock protein), enzym 21-hydroxylasu a další
- **MHC a výskyt onemocnění**
  - u pacientů s některými onemocněními se vyskytují **některé alely** lokusů HLA častěji než ve skupinách **zdravých pacientů**
  - je zřejmá **asociace těchto chorob** s určitými alelami HLA
  - řada těchto onemocnění postihuje klouby, žlázy s vnitřní sekrecí a kůži
  - k nejsilnějším asociacím patří **M. Bechtěrev** (ankylozující spondylitis) – vyskytuje se spolu s alelou **HLA-B27**
  - postihuje a postupně **znehybňuje klouby** páteře a končetin, zejména kyčelní kloub

## 81. Imunologická tolerance a možnost jejího navození

- **imunologická tolerance** = stav, kdy organismus neodpovídá na antigenní podnět
  - **nespecifická**
    - **imunitní systém** je inaktivován, nereaguje proti **žádným antigenům** (vč. bakterií a virů)
    - lze ji navodit např. **ozářením nebo cytostatiky**, jejichž účinkem jsou vyřazeny imunokompetentní buňky z funkce – navozena **imunosuprese**
  - **specifická**
    - organismus neodpovídá pouze na **antigen**, který byl použit k jejímu navození;
    - normálně reaguje na **ostatní antigeny**
- za fyziologické situace je tolerance navozena proti **vlastním složkám organismu** – self tolerance, čímž ho chrání před **imunitní atakou**
- **tolerance vlastních složek organismu**
  - **odpověď efektorových T i B lymfocytů** je v závislosti na T buňkách
  - mechanismy navození **neodpovídavosti** T buněk se odehrávají během **vývoje T buněk** z jejich prekurzorů v thymu - dochází k **přestavbám genů pro receptory** T buněk, které se pak objevují na **buněčném povrchu**
  - T buňky jsou poté podrobeny **dvěma typům selekce** – negativní / pozitivní
    - receptory T lymfocytů reagují v thymu s buňkami, které pomocí molekul MHC **prezentují vlastní antigeny** – peptidové fragmenty buněčných proteinů
    - klony s **vysokou afinitou** k vlastním molekulám I. nebo II třídy s vlastními antigeny **hynou** (negativní selekce), jakož i klony, které mají velmi **nízkou, nebo žádnou afinitu** ke komplexu vlastních molekul MHC a vlastního antigenu (pozitivní selekce)
    - dochází ke **klonální delecii** - výsledkem je přežití klonů s nízkou afinitou k vlastním molekulám MHC s peptidovým fragmentem
    - **dozrávají** v CD4+ nebo CD8+ T buňky
  - antigeny, které nebyly **prezentovány v thymu** mohou být též tolerovány, protože

- jsou v tzv. **imunologicky privilegovaných místech** - z důvodu anatomické bariéry jsou tyto antigeny lymfocytům **nedostupné** (př. antigeny spermatozoí v testes, oční čočce, ...)
  - setkávají se s buňkami, které **nemohou antigen prezentovat**, protože nevyjadřují molekuly MHC
  - jsou přítomny v **malém množství** a T lymfocyty je proto nedetekují
  - není dostatečný kontakt TCR a **přídavných molekul** s antigenem
- **tolerance indukovaná na cizí antigeny**
    - v experiment může být tolerance navozena i na **antigeny alogenního původu** - po **inokulaci alogenních buněk** nebo transplantaci tkáně do **novorozeného organismu**, který nereaguje, protože nemá vyzrálý **imunitní systém**
    - tolerance může být navozena i u **dospělého hostitele**, jehož imunitní systém byl **potlačen** - ozářením, léky (imunopresiva), pomocí lymfocytárních protilátek...
    - u dospělých zvířat lze **indukovat toleranci** i bez utlumení imunitního systému - záleží na dávce, způsobu podání a na povaze **antigenu**
    - **nízké a vysoké dávky antigenu** zpravidla navozují toleranci, **střední dávky** imunitu
    - velmi vysoké dávky antigenu mohou způsobit **vyčerpání imunitního systému** (klonální **exhausce**) - je způsobena stimulací všech buněk schopných odpovědi, nevznikají **paměťové buňky** - organismus nereaguje na opakovaný přívod antigenu

## 82. Funkce imunitního systému ve vztahu k nádorovým onemocněním, genetické aspekty

---

- **posílení imunitního systému** jedince při nádorových onemocněních je jednou z podpůrných složek terapie
- jedním z rozdílů fenotypu normálních a nádorových buněk je **exprese membránových antigenů**
- změny v antigenní výbavě nádorových buněk lze charakterizovat jako
  - **kvalitativní**
    - vznik **neoantigenů**, nových antigenů, charakterizujících nádorové buňky
    - jde o specifické **nádorové transplantační antigeny** (TSTA – tumor specifické transplantační antigeny)
  - **kvantitativní**
    - změny v expresi antigenů vyskytujících se i v **normálních buňkách**
    - tyto kvantitativní změny zahrnují buď **zvýšení exprese** určitých antigenů, podmíněné např. **multiplikací příslušného genu**, nebo naopak sníženou expresi až úplnou **ztrátu exprese antigenů** (např. antigenů I. nebo II. třídy MHC)
- **neoantigeny**
  - antigeny **transplantačního typu**
  - pokud jsou dostatečně odlišné od **transplantačních antigenů** organismu, mají schopnost vyvolat **imunologickou odezvu** vedoucí k likvidaci transformovaných buněk, zejména v počátku **maligního procesu**
  - únik **transformovaných buněk** mechanismům imunitní kontroly může být způsoben např. **ztrátou antigenních determinant** v populaci nádorových buněk nebo potlačenou odezvou imunitního systému (**imunosupresí**)
    - **imunologická aktivita** organismu závisí na věku a fyziologickém stavu jedince
    - **imunosupresi** mohou vyvolat chemické kancerogeny, faktory fyzikální i biologické (HIV)
    - **imunosuprese** může být vyvolána také stresem, malnutricí nebo vlivem nadměrného požívání alkoholu
    - **imunologická reakce** jedince závisí na genetické dispozici
    - **snížená imunologická reakce** může být také navozena při některých léčebných zákrocích – **transplantace**
    - **navozená imunosuprese** i **vrozená imunodeficience** může mít vliv na zvýšený výskyt určitých nádorových onemocnění ve srovnání s jejich výskytem v populaci
  - **exprese TSTA** závisí na etiologickém agens transformující buňku
    - je variabilní nejen u **nádorů vyvolaných různými kancerogeny**, ale i u jednotlivých nádorů vyvolaných **týmž kancerogenem**
    - dokonce existuje **heterogenita** v antigenní výbavě TSTA mezi buňkami téhož nádoru
    - obdobné **zákonitosti** byly nalezeny i u nádorů **experimentálně indukovaných** fyzikálními vlivy
  - **antigenní výbava** nádorů vyvolaných jak chemickými kancerogeny, tak zářením závisí také na době **latence** (od setkání s kancerogenem do vzniku nádorového onemocnění)
  - při **dlouhém latentním období** se může antigenní fenotyp transformovaných buněk modifikovat tak, že vzniknou klon buněk bez **antigenních determinant**, a tak je znemožněna likvidace transformovaných buněk **imunologicky**
  - **charakter TSTA virových nádorů** se liší od TSTA nádorů indukovaných chemickými kancerogeny nebo zářením
    - **nádory virové etiologie**, vyvolané týmž virem, většinou nesou shodné, dostatečně výrazné TSTA
    - takové TSTA mohou navodit **imunologickou odezvu** organismu, kdy zejména T cytotoxické lymfocyty likvidují **transformované buňky**
  - příklad **regulace nádorového růstu** imunitním systémem může být **Burkittův lymfom**

- nádorově transformované B-lymfocyty jsou odstraňovány **imunologickými mechanismy** za rozhodující účasti T buněk
- T-lymfocyty na jejich povrchu rozpoznávají **virem indukovaný TSTA** prezentovaný **molekulami MHC**
- v nepřítomnosti **T buněk** nebo při potlačení jejich aktivity dojde k rychlému **rozvoji nádorového onemocnění**
- vysoký **endemický výskyt** Burkittova lymfomu u dětí v centrální Africe je vysvětlován jako důsledek snížené **imunologické reakce** (imunoprese vyvolaná nákazou prvokem Plasmodium malarie) v dětské populaci
- **kvantitativně změněná exprese antigenů u nádorových buněk**
  - změna exprese antigenů může být důležitým **diagnostickým a prognostickým markerem** některých nádorových onemocnění
  - tyto **antigenní markery** jsou buď vázány na **buněčném povrchu** (např. antigeny I. a II. třídy MHC, CD molekuly) nebo to jsou **parakrinně** působící produkty nádorových buněk (produkty amplifikovaných protoonkogenů)
  - dále jde o produkty, které jsou z nádorových buněk uvolňovány do **krevního oběhu** (karcinoembryonální antigen – CEA, alfa-fetoprotein – AFP)
  - **zvýšené hodnoty CEA**
    - jsou charakteristické pro **nádory GIT**
    - v normálních buňkách je jeho **exprese** orgánově a časově omezena
    - **u fétu** jej nalézáme v tkáni střeva, pankreatu a jater
    - **u dospělých jedinců** se nachází jen v nízkém množství ve sliznici střeva, v plicích a laktující mléčné žláze
    - vzestup hladiny CEA v krevním oběhu je zaznamenáván u dospělých jedinců při **nádorových onemocněních GIT**
    - není však **specifickým markerem** nádorového onemocnění – zvýšená hladina nalezena i u nenádorových chorobných procesů GIT
  - **alfa-fetoprotein**
    - přítomen ve fetálních játrech, séru a nízké množství se nalézá i v séru zdravých dospělých jedinců
    - u těchto je zvýšená **hladina AFP** v séru často asociována s hepatomy nebo testikulárním teratomem
  - také **MHC antigeny** jak I. tak II. třídy jsou využívány při sledování průběhu určitých nádorových onemocnění a **účinnosti léčby**
    - snížená **exprese antigenů I. třídy** je v korelaci s agresivitou a invazivitou tumorů žaludku, ovaria, střeva, ledviny, prsu a pankreatu
    - exprese antigenů I. třídy v nádorové tkáni se snadno stanovuje pomocí **hladiny beta-3-mikroglobulinu**
    - stanovení **exprese antigenů II. třídy** MHC má význam pro prognózu zejména u **leukémií**, kdy jejich nepřítomnost v membráně leukemických buněk znamená špatnou prognózu pro pacienta
- **diferenční antigeny**
  - dalšími **antigenními determinantami**, které jsou využívány pro diagnostiku, prognózu a volbu léčebných postupů jsou **diferenční antigeny** (membránové CD antigeny)
  - s jejich pomocí lze zpřesnit diagnózu u **morfologicky nerozlišitelných nádorových onemocnění** (zejména hematologických malignit) a následně volit léčebné postupy
  - **specifické mutace genů** v nádorových buňkách většinou vedou ke vzniku onkoproteinů, které se stávají tumor-specifickými antigeny maligních buněk
  - tyto proteiny jsou nejen specifickým **diagnostickým markerem**, ale mohou být využity i při **imunoterapii**
- **protinádorová imunita**
  - u nádorových onemocnění platí, že **imunitní odpověď** jedince má vliv při vzniku a progresi **maligního procesu**

- imunitní systém jedince může v počátečním stádiu nádorového onemocnění **rozpoznat a eliminovat** transformované buňky pomocí nově vzniklých antigenních determinant, které je odlišují od **normálních buněk**
- v **protinádorové imunitě** se uplatňuje hlavně imunita transplantačního typu – zprostředkována hlavně **T-lymfocyty**
  - významnou úlohu mají i jimi **produkované cytokiny**
  - nejvíce je znám pozitivní vliv IL-2, interferonů a tzv. **tumor necrosis factoru** (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ )
- spolu s nimi se v protinádorové reakci významně podílejí **NK buňky** a kategorie buněk zvaná **LAK** (heterogenní populace buněk aktivovaných některými interleukiny – lymfokiny aktivovaní zabíječi)
  - **aktivita NK a LAK buněk** není vázána na přítomnost molekul MHC
  - důležitým rysem NK buněk je, že s nádorovými buňkami reagují **bezprostředně** – proto jsou považovány za první přirozený obranný mechanismus v časných stádiích **růstu nádoru**
- nádorovou tkáň infiltruje funkčně **modifikovaná populace T-buněk** – tumor infiltrující lymfocyty (TIL)
  - pokud jsou izolovány a **namnoženy in vitro**, jsou schopny, po znovuzavedení do organismu **infuzí**, specificky likvidovat nádorové buňky **cytotoxickým efektem**
  - jejich aktivitu je případně možné ještě zvýšit **kultivací ex vivo** v kultivačním médiu obohaceném o IL-2
- v současnosti pro **protinádorovou imunoterapii** využívány specificky stimulované **dendritické buňky**
  - jedná se o **antigen prezentující buňky**, které usměrňují několik složek **imunitního systému**
  - **zralé dendritické buňky** se podílejí na vzniku specifické protinádorové imunity
  - při použití dendritických buněk v **protinádorové terapii** se tyto buňky izolují od pacienta, namnoží a stimulují **ex vivo v tkáňové kultuře**
  - po specifické stimulaci **nádorovými antigeny** se dendritické buňky ještě vystaví stimulačním faktorům, které indukují jejich **maturaci**
  - pacientovi se nazpět **aplikují infuzí**
  - tento zásah je specifický a **netoxický**
- pro nádory s **prokazatelnou virovou etiologií** (celosvětově cca 20%) se vypracovávají preventivní i terapeutické **imunologické přístupy**
  - preventivní přístup by spočíval ve **vakcinaci** (centrální Afrika – EBV, oblasti na jihu Číny – virus hepatitidy B, vakcín proti papilomaviru)
  - terapeutický přístup by využíval **imunizaci** proti virovým neoantigenům, které nesou nádorové buňky
- pro určitá nádorová onemocnění je užívána **imunoterapie rekombinantními cytokiny**
  - IL-2, interferon  $\gamma$ , GM-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor apod.
  - ta posiluje **buněčné imunitní reakce**
  - tato terapie je úspěšná např. při léčbě **Grawitzova karcinomu** (nádor ledviny), maligního melanomu, karcinomu děložního čípku, některých leukémií a předpokládají se i **další nádory**
- TSTA může mít význam při spontánní likvidaci nádorových buněk imunologickými mechanismy ne počátku **maligního procesu** a jen výjimečně při **rozvinutém onemocnění**
- význam TSTA pro léčbu nádorových onemocnění je **vysoce individuální**

## 83. Geneticky podmíněné imunodeficiencie

---

- je výsledkem **poruchy funkce** některé z mnoha složek imunitního systému
- geneticky podmíněné choroby vznikají jako **následek mutací**
- z hlediska **imunologie** jsou významné takové mutace, které způsobí poruchy syntézy proteinů, určitým způsobem se podílejících na **funkci imunitního systému**
- důsledky těchto mutací jsou **různě závažné** - vrozené dysfunkce imunitního systému, označované jako **primární imunodeficiencie**
- imunodeficiencie je stav, kdy vlivem určité **příčiny** není imunitní systém jedince stoprocentně funkční a tento jedinec je náchylnější k **infekčním onemocněním**
- na rozdíl od **sekundárních imunodeficiencí**, u kterých je příčina choroby získána až v průběhu života jedince
- je tedy u **primárních deficiencí** příčina přítomna již od samého počátku a závisí pouze na charakteru onemocnění, kdy a jak se **projeví**
- **příčiny snížené imunity**
  - **primární**
    - defekty v imunokompetentních buňkách, chybějící buňky, enzym, produkt buněk
    - většinou **geneticky determinované** - mutace v DNA
    - časté u **děti**
  - **sekundární**
    - vyvolané jinou **chorobou, faktorem** (nádor, infekce, malnutrice, ozáření, léky)
    - přítomné při jiných probíhajících **chorobách** nebo událostech
    - přítomny v **jakémkoliv věku**, méně závažné
- **typické známky**
  - **vysoce příznačné**
    - chronická infekce, opakovaná infekce, neobvyklé infekční agens
  - **časté**
    - kožní projevy (ekzém, kožní kandidóza), chronický průjem, poruchy růstu
  - **příznaky specifické**
    - ataxie, teleangiektasie, idiopatické endokrinopatie
- **deficiencie B buněk**
  - **X-vázaná agamaglobulinemie**
    - gen je uložen na dlouhém raménku X-chromosomu
    - deficiencie **B-lymfocytů** v cirkulující krvi ani v lymfatických tkáních
    - **kostní dřeň** sice obsahuje normální množství prekurzorů, které ale nedozrávají v B-buňky
    - nemocní nevytvářejí **žádné protilátky**
- **deficiencie T buněk**
  - kombinovaná **deficiencie humorální** i buněčné zprostředkované imunity
  - **SCID** (Severe Combined ImmunoDeficiency)
    - **letální** do 2 let života
    - infekce GIT a pneumonie
    - z 50% - X-vázané; zbytek AR
    - některé případy způsobeny defektem genu **kódujícího enzym** adenosindeaminázu (ADA) nebo purin- nukleosidfosforylasu (PNP)
    - **hromadění metabolitů** toxických pro kmenové lymfoidní buňky
  - **AIDS** (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
    - **sekundární imunodeficiencie** způsobená virem HIV (Human Immunodeficiency Virus)
    - přenos krví, placentou, pohlavním stykem a mateřským mlékem
    - jeden z **membránových proteinů** viru se váže na molekulu CD4
    - **virus infikuje** zejména **T<sub>H</sub>-lymfocyty** a **makrofágy** - selhání obou větví imunitní odpovědi
    - **letální** - v posledním stadiu oportunní infekce nebo malignity (Kaposiho sarkom, aj.)

- **primární imunodeficience**

- v současné době je již popsáno více než **100 primárních imunodeficiencí**
- pokroky posledních let v **molekulární genetice** pomohly definitivně lokalizovat zodpovědný gen a osvětlit **mechanismus vzniku** řady poruch imunitního systému
- většina těchto **imunodeficiencí** vykazuje recesivní typ dědičnosti
- **dominantní typ dědičnosti** je známý, ale velmi vzácný
- u některých velmi **vzácných typů** primárních imunodeficiencí byl zaznamenán pouze **sporadický výskyt** bez popsaného familiárního výskytu
- existují i typy s předpokládanou **multifaktoriální dědičností**, které tak stojí na rozhraní mezi **primárními a sekundárními imunodeficiencemi**
- relativně velké množství **zodpovědných genů** je lokalizováno na X chromosomu
- to u člověka v praxi vede k tomu, že chlapi bývají až **dvakrát častěji postiženi** primárními imunodeficiencemi než dívky
- nicméně i u dívek – přenašeček se mohou některé **klinické projevy** příslušné imunodeficience **manifestovat**
- jako u ostatních X-vázaných chorob, i zde toto závisí na tom, jak proběhl u konkrétní dívky **proces lyonizace**
- ostatní geny zodpovědné za vznik **primárních imunodeficiencí** jsou lokalizovány na **autosomech**
- z příčin nelze opominout ani některé **komplexní syndromy**, mezi jejichž projevy patří i určité **dysfunkce imunitního systému**
- vzhledem k příčině jde o některé **mikrodeleční syndromy** či syndromy **chromosomální nestability**
- primární imunodeficience snižují **funkčnost imunitního systému**, a tím i obranyschopnost organismu, který je tak náchylnější k **rozličným patogenům**
- jak již bylo řečeno, příčinou těchto deficiencí je mutace v **genetické informaci** člověka
- dosazením do **centrálního dogmatu** molekulární genetiky pak získáme následující schéma (zjednodušené):

mutovaná DNA – mRNA s nestandardní sekvencí – dysfunkční (eventuelně žádný) protein  
– poškozená funkce

- podle **poškozené funkce**, která může být součástí systému specifické i nespecifické imunity, jsou potom **primární imunodeficience** klasifikovány - rozlišujeme:
  - **protilátkové** deficity
  - **buněčné** deficience
  - **kombinované** deficience
  - poruchy **komplementového** systému
  - poruchy **apoptózy**
  - poruchy **fagocytózy**
  - deficience jako součásti jiných **typických syndromů**
  - **jiné** (např. poruchy cytokinů a cytokinových receptorů)
- pro přesné pochopení projevu příslušné mutace je potřeba brát v úvahu komplexnost **imunitního systému**
- defekt **jedné části** imunitního systému se může projevit současným defektem i jiné části, jejíž syntéza není přímo **mutací narušena**
- například u některých **kombinovaných imunodeficitů** nenacházíme T-lymfocyty
- B-lymfocyty se sice tvoří v **normálním množství**, ale bez možnosti interakce s T-lymfocyty je i jejich **funkce narušena**

- **diagnostika**

- jelikož jsou **primární imunodeficience** geneticky podmíněné, je jejich příčina přítomna od narození
- projevy **některých imunodeficiencí** tak mohou být rozpoznány již ve velmi raném dětství

- nástup příznaků je u **různých typů** imunodeficiencí odlišný – těžké kombinované poruchy se projeví velmi časně a razantně, zatímco některé poruchy komplementu a fagocytózy mohou zůstat **neodhaleny až do dospělosti**
- u **protilátkových deficitů** je nástup projevů opožděn díky období, kdy je novorozenec stále chráněn **materskými protilátkami**
- **komplexní syndromy** (spojené s poruchou imunitního systému) jsou často diagnostikovány na základě svých **dalších projevů**, které se imunitního systému netýkají
- pokud se v rodině již **příslušná imunodeficience** vyskytuje, bývá diagnóza známa a u narozeného dítěte mohou být rovnou **provedeny testy** na konkrétní chorobu (pokud prenatální diagnostika nebyla z nějakého důvodu **provedena**, nebo nepřinesla **uspokojivé výsledky**)
- u případů **nových mutací** se nemůžeme opřít o rodinnou anamnézu, a proto je třeba provést **komplexní vyšetření**
- obecně slouží jako podněty pro **vyšetření časté a opakované infekce**, děti často neprospívají a jsou **menšího vzrůstu** než jejich zdraví vrstevníci
- dalším příznakem je opakovaně **komplikovaný průběh** infekčních onemocnění, která relativně špatně odpovídají na **standardní terapii**
- metody vyšetření jsou různé, zahrnují vyšetření **diferenciálního krevního obrazu, stanovení koncentrace** jednotlivých typů imunoglobulinů nebo složek komplementu v séru či funkční testy **imunokompetentních buněk**
- přínosná jsou i **mikrobiologická vyšetření**, kdy průkaz určitého konkrétního mikroorganismu může být důležitým **vodítkem** ke stanovení konečné diagnózy
- velké možnosti pro diagnózu **primárních imunodeficiencí** nabízí DNA diagnostika, kdy můžeme pomocí **hybridizačních sond** jednoznačně potvrdit některou ze známých mutací a definitivně **stanovit diagnózu**
- u neznámých mutací přichází v úvahu i zjištění **sekvence určitých genů**
- včasná a správná diagnostika **imunodeficiencí** je důležitá kvůli včasnému nasazení léčby a kvůli správnému přístupu k **očkování postižené osoby**
- pro osobu s **imunodeficiencí** může být podání vakcíny nebezpečné, zejména pokud jde o **živou vakcínu**
- proto je podání veškerých **živých vakcín** u osob s vrozenými imunodeficiencemi **kontraindikováno**
- u nás jde zejména o **BCG vakcínu** proti tuberkulóze, která je podávána již krátce po narození (většinou 3.–5. den)
- vzhledem k tomu je to **právě reakce** na tuto vakcínu, která může upozornit na **imunodeficienci**
- u dětí z rodin, kde je možné díky **rodinné anamnéze** některou z primárních imunodeficiencí očekávat, je vhodné s užitím **BCG vakcíny** vyčkat do provedení příslušných **diagnostických testů**
- další v ČR běžně užívané **živé vakcíny** jsou vakcíny proti spalničkám, zarděnkám a **příušnicím**
- **kontraindikace** ostatních vakcín je závislá na typu **primární imunodeficience**
- u některých typů imunodeficience je naopak vhodné **doplnit základní** o některá **nadstandardní očkování**
- **genetické poradenství**
  - z hlediska genetického poradenství a prenatální **diagnostiky** jsou zajímavé následující skutečnosti:
    - u řady **primárních imunodeficiencí** známe přesně zodpovědný gen, jeho lokalizaci a sekvenci - můžeme tak přesně **identifikovat mutaci** a potvrdit diagnózu pomocí metod **přímé DNA diagnostiky**
    - díky známému typu dědičnosti můžeme na základě **rodinné anamnézy** odhadnout případná rizika pomocí genealogické metody - pro upřesnění odhadu můžeme využít i **metod nepřímé DNA diagnostiky (RFLP)**
    - u autosomálně **recesivně dědičných primárních imunodeficiencí** je třeba dbát zvýšeného rizika pro **sňatky příbuzných jedinců** a pro sňatky v populačních **izolátech**



- u **X-vázaných primárních imunodeficiencí** je nutné počítat s odlišným výskytem u chlapců a dívek - stanovení **pohlaví plodu** tak může mít velký význam pro zodpovězení otázky, zda narozené dítě bude trpět příslušnou imunodeficiencí
- **kordocentéza** je velmi přínosná metoda pro prenatální diagnostiku primárních imunodeficiencí, protože ze získané **pupečnickové krve** můžeme nejen izolovat DNA pro DNA diagnostiku (pro tento účel se zpravidla volí jiné invazivní metody, které lze použít s menším rizikem a dříve - AMC, CVS, ale získáme i buněčné elementy plodu, které lze vyšetřit po **fenotypové stránce**)
- i u diagnostiky **primárních imunodeficiencí** je budoucnost v rutinním používání **DNA čipů**, díky kterým bude možné provést test (nejen) na řadu různých typů **imunodeficiencí naráz**
- **možnosti terapie**
  - u genetických chorob jako jsou **primární imunodeficience** neexistuje skutečná kauzální terapie
  - ta by spočívala v **cílené opravě mutovaného genu** (primární sekvence DNA)
  - pokroky v **genové terapii** dávají naději pro budoucnost
  - současné **metody genové terapie** však nejčastěji využívají retrovirových nosičů, které insertují sekvenci do **genomu** víceméně náhodně
  - u **X-vázané SCID** (těžké kombinované imunodeficience) byla jako u první lidské choroby provedena **genová terapie**
  - nicméně u některých takto **léčených pacientů** došlo k následnému rozvoji leukémie, pravděpodobně díky narušení **tumor supresorových genů** retrovirovými nosiči
  - kvůli těmto komplikacím není prozatím možné uvedení této **terapie** do běžné praxe
  - s určitými úspěchy se setkala i **experimentální léčba** genovou terapií u deficience **ADA** (adenosindeaminasy)
  - nejrozšířenější léčbou u **těžkých primárních deficiencí** tak zůstává transplantace kmenových buněk **kostní dřeně**
  - tato metoda je náročná zejména kvůli zajištění **vhodného dárce** s co největší shodou v **HLA antigenech**
  - jako dárce jsou preferováni **rodinní příslušníci**, zejména stejného pohlaví
  - nalezení **nepříbuzného dárce** je velmi náročné a navíc nelze očekávat uspokojivou shodu v **minor HLA antigenech**
  - jelikož jde o **transplantaci imunoaktivní tkáně**, je třeba počítat s rizikem GVH reakce (GHVR = graft versus host reaction - reakce štěpu proti hostiteli)
  - **substituční léčba** zahrnuje intravenózní podávání imunoglobulinů; existují i terapie založené na **substituci defektního enzymu**, jak je tomu třeba u deficience ADA
  - vhodnou součástí **terapie** bývá preventivní podávání antibiotik, případně i virostatik či antimykotik
  - podle typu **imunodeficience** pak lze uvažovat některé nadstandardní vakcinace
  - pokud pacienta ohrožují **autoimunitní projevy choroby**, přichází na řadu i **imunosupresivní terapie**
- **přehled primárních imunodeficiencí**
  - **protilátková imunodeficience**
    - **anamnestické údaje**
      - opakované sinusitidy, časté hrudní infekce (anamnéza opakovaných ORL chirurgických zákroků)
      - jsou postiženy **další systémy** (sepse kůže, abscesy, infekce zažívacího traktu, meningitidy)
      - **infekce** jsou bakteriální a způsobeny běžnými (komezálními) mikroorganismy (*Strepto. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*)
      - jsou časté **neinfekční choroby** (autoimunitní onemocnění štítné žlázy, imunotrombocytopenická purpura, artritidy)
    - autosomálně dědičná agamaglobulinémie
    - Brutonova agamaglobulinémie
    - selektivní deficit IgA

- běžná variabilní imunodeficiencie
- syndrom hyperimmunoglobulinémie IgM
- **léčba protilátkových deficitů**
  - substituce Ig, léčba infekcí, **genová terapie**
  - **transplantace (BMT)**
- **kombinované a buněčné imunodeficiencie**
  - **typická anamnéza**
    - přítomny v **prvních týdnech/měsících života**, infekce jsou ale často virové nebo plísňové častěji než bakteriální
    - je přítomen chronický průjem často označovaný jako “gastroenteritis”, infekce dýchacích cest povlak orálních sliznic, neprospívání bez evidentní infekce
    - téměř u všech postižených dětí je **lymfopenie**
  - těžká kombinovaná imunodeficiencie
  - retikulární dysgeneze
  - Omennův syndrom
  - X-vázaný lymfoproliferativní syndrom
  - Wiskottův-Aldrichův syndrom
  - **léčba**
    - antimikrobiální terapie, **transplantace** kostní dřeně (BMT)
    - genová terapie
- **imunodeficiencie způsobené poruchami fagocytosy**
  - Chédiakův-Higashiho syndrom
  - chronická granulomatosní choroba
  - těžká vrozená neutropenie (Kostmannův syndrom)
  - Shwachmanův-Diamondův syndrom
- **imunodeficiencie způsobené poruchami komplementu**
  - hereditární angioedém
  - deficit lektinu vázajícího manózu
- **imunodeficiencie způsobené poruchami apoptózy**
  - autoimunitní lymfoproliferativní syndrom
- **imunodeficiencie jako součást syndromů chromosomální nestability**
  - ataxie teleangiectasia
  - Bloomův syndrom
- **imunodeficiencie jako součást mikrolečných syndromů**
  - Di-Georgův syndrom
- **primární defekty nespecifické imunity**
  - infekce jsou opakované a **protrahované**, klinické příznaky mohou být minimální přes vážnou infekci
  - infekce jsou špatně odpovídající na **antibiotika**, často stafylokokové, zasahují kůži i slizniční povrchy, komplikované hnisavou lymfadenopatií
- **sekundární imunodeficiencie**
  - sekundární příčiny imunodeficiencí jsou daleko **častější** než primární
  - **pokles syntézy**
    - malnutrice, lymfoproliferativní choroby, léky, infekce (virové infekce, chronické infekce)
    - alkoholismus (mateřský), ozáření, velké operace, anesiesie, některé chronické choroby (diabetes)
  - **zvýšené ztráty**
    - nefrotický syndrom, enteropatie se ztrátami proteinů, popáleniny

## 84. Struktura a funkce prokaryotní buňky

---

### Prokaryotní buňka

- netvoří tkáň, jen sklony ke **sdužování**
- jednodušší struktura než eukarya – **méně organel**
- **jaderný ekvivalent** = nukleoid (neoddělen membránou od cytoplazmy + ribozomy + cytoplazmatické membrána + cytoplazma + buněčná stěna)
- nukleoid obsahuje jednu **kruhovou dsDNA** – **prokaryotní chromozom**
  - neobsahuje **introny**
  - na mRNA již v **průběhu transkripce** nasedají ribozomy
  - translace začíná formylmethioninem (iniciační triplet AUG)
- **buněčná stěna** z peptidoglykanových polymerů (mureinu)
  - dlouhých disacharidových a kratších peptidových řetězců - **tvořící mřížku**
  - zajišťuje **tvár bakterií** a umožňuje jim přežít v hypotonickém prostředí
  - umožňuje **výměnu látek** s okolím
- buňka může být chráněna také **kapsulou** – pouzdro, často slizové (z polysacharidů)
- **plazmid** = útvar tvořený DNA nesoucí doplňující genetické informace
  - může **přecházet do jiných bakterií** (přenos resistance proti antibiotikům)
- mohou být **vyztuženy mikrotubulárními strukturami** cytoskeletu
- **pohyb** = jednoduchý prokaryotní bičík nebo přichytná vlákna
- rozmnožují se nepohlavně prostým **buněčným dělením** (20-30min)

### Prokaryota = nadříše prvojaderných organismů

- **nebuněčné organismy** (Subcellulata) – s oddělením protoorganismů (Eobionta) a virů
- **prvobuněčné organismy** (Protocellulata) – s oddělením bakterie, sinice (Cyanophyta) a prochlorofyta
- **metabolicky pestrá skupin**
  - **heterotrofní**
    - **dekompozitoři** - živí se produkty rozpadu a mrtvou organickou hmotou
    - **parazité** - vyvolávají infekční onemocnění rostlin a živočichů
  - **autotrofní**
    - schopné **získávat energii** fotosyntézou nebo oxidací anorganických látek
- **sinice**
  - **autotrofní organismy** s organelami (tylakoidy) obsahujícími chlorofyl a další barviva uplatňující se při **fotosyntéze**
  - žijí ve vodě a na **vlhkých místech**
  - byly pravděpodobně **prvním zdrojem O<sub>2</sub>** v zemské atmosféře
- **viry**
  - **nebuněčné formy života** - nitrobuněční paraziti, schopní reprodukce pouze s využitím buněčných struktur a **metabolismu hostitelských buněk**
  - vysoce **specializované**
  - v medicíně mohou být využity i jako **vektory** v genetickém inženýrství a genové léčbě
  - zbytek viz 88. Struktura, reprodukce a rekombinace virů (DNA viry, RNA viry), **význam v medicíně**
- **viroidy**
  - ještě menší a **jednodušší částice** než viry
  - schopné přenášet **genetickou informaci** či vyvolávat choroby
  - tvořeny jen **cirkulární molekulou RNA** bez proteinového obalu
  - schopné se replikovat ve **velkém množství** v rostlinných buňkách a vyvolávat choroby rostlin
  - přenos je možný jen z **poškozené do poškozené buňky**
- **priony**
  - ještě **menší než viroidy**
  - schopné **vyvolat onemocnění**

- tvořeny **proteiny** (neobsahují NK)
- mohou být přenášeny mezi **živočichy** a vyvolávat zejména **nervové choroby**
  - př. **Creutzfeld-Jacobova choroba** – dědí se dominantně a priony jsou produktem mutovaného genu PRNP (prion protein gene); normální buněčné prion proteiny (PrP) jsou glykoproteiny buněčného povrchu, jejich izoforma se kumuluje v buňkách a způsobuje poruchu funkce neuronů a jejich smrt
- **bakterie**
  - **všudypřítomné** - popsáno více než 2000 druhů bakterií
  - nemají vytvořenou **jadernou membránu** ani jádérko, transkripce i translace probíhají prakticky současně
  - obrovskou úloha v **ekosystémech**: degradují organické látky, recyklují živiny, fermentují potraviny, jsou schopné fotosyntézy, ale způsobují i onemocnění rostlin a živočichů
  - rychle se **množí**
  - neobvykle **přízpůsobivé**
  - **obrovská diverzita** metabolismu a schopností využívat různé zdroje energie
  - **velikost**: 1 – 10  $\mu\text{m}$
  - v cytoplazmě: ribosomy a jaderný ekvivalent (nukleoid – oblast uložení chromosomu)
  - **mají jeden hlavní kruhový chromosom**
    - mnohonásobně **spiralizovaná dvoušroubovice DNA** (cca 3Mbp o délce asi 1–2mm) - stupeň spiralizace závisí na **transkripční aktivitě** genů
    - velikost genomu bakterií je **druhově specifická**
    - množství proteinů je **nekonstantní** a závisí na intenzitě proteosyntézy
    - zastoupení **RNA v chromosomu** závisí na počtu aktuálně transkribovaných genů
    - jádro není **morfologicky ohraničeno**
  - **v cytoplazmě několik plazmidů**
    - genetickou informaci k určité **selekční výhodě**
    - využívají se pro svou velkou **replikační schopnost** jako vektory v genetickém inženýrství
  - **cytoplazmatická membrána zesílena buněčnou stěnou**
    - informace o struktuře **bakteriální stěny** jsou podstatné pro volbu antibiotik v léčbě **bakteriálních infekcí**
  - rozdílů ve **struktuře bakteriální stěny** využívá Gramovo diferenciální barvení:
    - **Gram-** - opouzdřené bakterie s lipopolysacharidy jsou
    - **Gram+** - bakterie se stěnou pouze z peptidoglykanů
  - mohou mít **kapsulu** – ochrana
  - možnost **fimbrií** - adhezi na buňky hostitele
  - **tvar bakteriální buňky** může být: **kulatý** (koky), **tyčinkovitý** (vibria, spirily, spirochety)
  - bakterie postrádají **klasický cytoskelet**: jádro není vytvořeno, chromosom je v tzv. nukleolární oblasti a je uchycen v jednom místě k cytoplazmatické membráně (OriC)
    - **jedinou organelou** jsou zde ribosomy – jsou menší než u eukaryot
  - **pohyb bakterií**
    - **pomocí bičíku** – má jednodušší stavbu než u eukaryot; pohyb vyvolán rotací (prstenec proteinů v plazmatické membráně kolem úponu bičíku reaguje změnou konformace na změnu gradientu  $\text{H}^+$  iontů )
    - **spirochety** se pohybují změnou svého **tvaru**
    - **myxobakterie** se pohybují pomocí produkovaného **sekretu**
  - vybaveny četnými **chemoreceptory** a reagují pohybem (pozitivně / negativně)
  - vysoce **adaptabilní**
  - **prototrofní** = schopné žít na minimální půdě a syntetizovat všechny pro život **potřebné látky**
    - **biochemické ztrátové mutace** způsobí, že bakterie jsou schopné růst pouze v prostředí, které obsahuje látku, kterou nejsou **schopné syntetizovat** = **auxotrofní**
  - **aerobní i anaerobní** – ohrožují pacienty s poruchami prokrvení tkání

## 83. Význam a struktura chromosomů prokaryot

---

- prokaryota nemají **pravé jádro**, pouze jaderný ekvivalent = **nukleoid**
- chybí jaderná **membrána**
- základní chromozom ukotven do cytoplazmatické membrány v **OriC místě**
- DNA kóduje
  - **bílkoviny** - polyaminy (krátké peptidy)
  - **enzymy** (pro replikaci a expresi genetické informace)

### Chromozomy

- 1 kruhová **molekula DNA** - 3Mbp, 1-2mm
  - **vysoce kondenzovaná** - suprahelikální spiralizace
- **stupeň spiralizace** závisí na transkripční aktivitě genů v daném úseku
  - v metabolicky **aktivních místech** (replikace, transkripce) je struktura chromosomu rozvolňována **gyrasami**
- uchovává **genetickou informaci** a předává ji do dalších generací buněk nebo organismů
- na struktuře se podílejí také **HLP** (Histon Like Proteins)

### RNA

- množství RNA závisí na **intenzitě transkripce**

### Plazmidy

- kromě **hlavního chromosomu** mají bakterie v cytoplasmě 1 a více malých **kruhových chromosomů**
- nesou genetickou informaci k určité **selekční výhodě**
- **extrachromosomální** částice
- **velké plazmidy** zpravidla jen v jedné kopii, **malých** obvykle více
- replikují se **nezávisle** na hlavním chromosomu
- **kruhová dsDNA** (1.5–250kbp)
  - suprahelikální **spiralizace**
  - velikost molekuly DNA odpovídá počtu **plazmidem kódovaných** polypeptidů (2-300)
- pro svou velkou **replikační schopnost** užití jako vektory pro genetické inženýrství
- **plazmidy F** (fertilní)
  - geny pro **konjugaci a přenos DNA** = F-faktor
  - mají na povrchu **fimbrie** - umožnění konjugace
  - bakterie s F-faktorem **označujeme F+**, bez faktoru F-
  - **plazmidy F'**
    - nesou i **další geny** obvykle lokalizované v hlavním chromozomu
    - F plazmid byl inkorporován do **hlavního chromozomu** a následně uvolněn včetně **sousedících úseků DNA** hlavního chromozomu - pro tyto geny jsou bakterie **diploidní**
    - jejich studium přineslo důležité poznatky o **expresi genů** a její regulaci u prokaryot
- **plazmidy R** (rezistentní)
  - geny pro **rezistenci vůči antibiotikům**, chemoterapeutikům, těžkým kovům atd.
  - kódují enzymy schopné modifikovat **útočící látky**
  - hlavně u bakterií nemocničního prostředí - nechtěně **vyselektovány kmeny patogenních bakterií** (stafylokoky, pseudomonády...)
  - jejich **exprese** ovlivňuje rezistenci na příslušné antibiotikum
  - mívají i **F-faktor** - geny pro rezistenci mohou být předávány při konjugaci mezi bakteriemi **různých kmenů**
  - příčina **rychlého vzniku rezistence** bakterií na antibiotika (proto se musí prášky vždy dobírat)
- **plazmidy s geny pro baktericidy**
  - **látky vylučované** do okolí - usmrcující jiné citlivé bakterie

### Inzertní sekvence

- mohou být v **hlavním chromozomu** i plazmidech
- umožnění **inkorporace plazmidů** do jiných plazmidů nebo do hlavního chromozomu – homologní **rekombinací**
- **transposony** = transponované části plazmidů
- bakterie jsou **prototrofní** = schopné žít na minimální půdě a syntetizovat všechny pro život potřebné látky
- biochemické **ztrátové mutace** způsobí, že bakterie jsou schopné růst pouze v prostředí, které obsahuje látku, kterou nejsou schopné syntetizovat = **auxotrofní**

## 86. Biologie a genetika bakterií, význam v medicíně

---

### Stavba bakterií

- **velikost** 1-10 $\mu$ m
- v **cytoplazmě jen**: ribosomy + jaderný ekvivalent = **nukleoid** (není morfologicky ohraničeno)
- **cytoplazmatická membrána zesílena** buněčnou stěnou - hlavní složky bakteriální stěny jsou peptidoglykany (**mureiny**) tvořící mřížku
  - zajišťuje umění žít v **hypotonickém prostředí**
  - některé bakterie mají buněčnou stěnu doplněnou **pouzdrém** – proteiny nebo lipopolysacharidy
  - antibiotika penicilinová a cefalosporinová – **inhibice syntézy buněčné stěny**
  - na struktuře stěny je založeno **Gramovo diferenciální barvení**
    - **Gram-negativní** – opouzdřené bakterie s lipopolysacharidy
    - **Gram-pozitivní** – stěna z peptidoglykanů
- některé bakterie mají ještě **ochrannou kapsulu**
- **na povrchu**
  - **fimbrie** – adheze na buňky hostitele
  - **bičíky** – pohyb (rotací)
    - **prstenec proteinů** v plazmatické membráně kolem jeho úponu
- pohyb také **změnou tvaru** nebo produkcí **sekretu**
- **tvar**
  - **kulatý** (koky)
  - **tyčinkovitý** (vibria, spirily, spirochety)
- **bez cytoskeletu** – na organizaci struktury se podílí vchlipující se buněčná stěna
- 1 hlavní kruhový chromosom v tzv. **nukleolární oblasti**
  - **uchycen v OriC** místě k membráně
  - **dvoušroubovice DNA** (3 Mbp) dlouhá 1 – 2 mm
  - mnohonásobně **spiralizovaná DNA** (suprahelikální spiralizace)
  - na struktuře se **podílí HLP** (histon like proteins)
- **výbava chemoreceptory** – reakce pohybem
- v cytoplazmě také **plazmidy**
  - **kruhové dvouvláknové** molekuly DNA
  - genetická informace k určité **selekční výhodě**
  - replikují se **samostatně**
  - užití jako **vektory** v genovém inženýrství
    - **plazmidy F** = geny pro kojugaci
    - **plazmidy R** = geny pro rezistenci vůči antibiotikům, chemotrapeutikům, těžkým kovům atd.
    - **plazmidy s geny pro baktericiny** (látky usmrcující jiné citivé bakterie)
  - mohou obsahovat **inzertní sekvence** – umožnění inkorporace plazmidů do jiných plazmidů

## Reprodukce

- **závislost na:** množství živin, koncentraci produktů metabolismu
- **nepohlavně**
  - **rychlé dělení** – jeden cyklus asi 20min
  - nejprve **prodlužování buňky** a replikace kruhového chromozomu
    - **replikace zahájena v OriC** = místo připojení chromosomu na plazmatickou membránu
  - **OriC se zdvojí** - tvorba nového úseku membrány mezi těmito dvěma úpony posunuje nově vzniklé **dceřinné chromosomy** od sebe
  - při **dostatečné vzdálenosti** se vytvoří prepážka
  - nakonec oddělení dvou nových buněk od sebe = **přehradečné dělení**
  - **haploidní organismy** s jedním hlavním chromosomem
  - nemají **mitotický aparát**
  - genom **dceřinné buňky identický** s mateřským
- **parasexuálně**
  - **rekombinace** genetického materiálu
  - přenos genetické informace vždy **jednosměrný** (od dárce k příjemci)
  - **viz 87.** Konjugace, transformace, transdukce

## 87. Regulace genové funkce u prokaryot

- **v buňkách trvale exprimovány jen konstitutivní geny = zajišťující základní funkce („housekeeping genes“ – geny pro tRNA, rRNA a proteiny katalyzující transkripci a translaci)**
- indukce
  - **produkty většiny genů jsou pro buňku přínosem jen tehdy, pokud jejich funkci potřebuje – vznik mechanismů schopných rychle aktivovat nebo utlumit produkci určitého proteinu (enzymu)**
    - **takto** regulovanými geny **produkované proteiny** = induktivní proteiny
    - induktivní enzymy katabolických reakcí (**energie získávána štěpením org. sloučenin**) **jsou produkovány jen tehdy, že v prostředí bakterie je substrát, který mohou štěpit**
- **bakterie jsou schopné syntetizovat většinu organických látek, které potřebují – jsou prototrofní**
- **produkovat nadbytek látek by však bylo neefektivní - vznik zpětné vazby**
  - **represe** = potlačení transkripce genů pro enzymy, pokud produkty jimi katalyzovaných reakcí jsou přítomné v **dostatečném množství**
  - **deprese** = aktivace těchto genů, typické pro anabolické reakce
- **exprese genu je u prokaryot regulována**
  - regulací **transkripce**
    - **pozitivní a negativní kontrola genové exprese**
    - **operonový systém**

- **stabilitou mRNA**
- regulací **translace**
- **posttranslační modifikací** polypeptidů
- **pozitivní a negativní kontrola genové exprese**
  - pracuje s **regulačními geny**, jejichž produkty regulují expresi dalších genů
    - **pozitivní** – produkt regulačního gen indukuje expresi strukturálních genů
    - **negativní** – regulační gen expresi dalších genů zastavuje
  - uplatňují se v induktivním i represivním **systému regulace**
  - **kaskádová regulace**
    - geny virů exprimovány v **určitém pořadí** – nejprve geny časné transkripce a poté geny pozdní transkripce
    - kaskáda je **geneticky naprogramovaná**
    - **promotory** genů časné transkripce mají signální sekvence, na které se váže **sigma faktor RNA polymerasy** hostitelské buňky a iniciuje jejich **transkripci**
  - další regulace probíhá **dvěma způsoby**
    - mezi geny **časné transkripce** je gen pro **virovou RNA-polymerasu** - specificky se váže na promotory **virových genů** pozdní transkripce
    - mezi geny **časné transkripce** je gen pro protein - nahradí v hostitelské RNA-polymerase **sigma faktor** a zajistí specifitu vazby RNA polymerasy bakterie na promotory genů **pozdní transkripce**
- **operonový model regulace transkripce**
  - dva **regulační prvky** transkripce
    - **regulátor** - kóduje protein zvaný **repressor**
    - **operátor** - na něj se repressor váže
  - **operon** = jednotka regulace funkce genů, tvořenou promotorem, operátorem a strukturálními geny
  - **induktivní systém**
    - typický pro **regulaci transkripce** genů kódujících katabolické enzymy
    - **regulační gen** je transkribován konstitučně (trvale) a translací z něj vzniká protein = **repressor**
    - **repressor** se váže na operátor **příslušného operonu** - brání navázání RNA polymerasy na promotor a **zahájení transkripce** strukturálních genů
    - pokud je v **prostředí látka**, kterou mohou enzymy strukturálních genů metabolizovat, účinkuje jako **induktor**
    - induktory svým navázáním na **repressor** mění jeho **alosterickou konfiguraci** - znemožňují jeho **navázání na operátor**
    - již navázané **molekuly reparatoru** jsou z vazby s operátorem uvolňovány a RNA polymerasa se může na **uvolněný promotor** navázat a zahájit transkripci strukturálních genů
    - (v případě **lac operonu** je induktorem laktosa; pokud je laktosa přítomna, váže se na repressor lac operonu a bakterie vytváří **enzymy**, které umožní využití laktosy jako **zdroje energie**; po vyčerpání zdrojů laktosy se uvolní i laktosa z vazby na repressor a volný (aktivní) repressor se váže na **operon** a transkripce genů lac operonu je **potlačen**)
  - **repressorový systém**
    - typický pro geny kódující **enzymy anabolických reakcí**
    - regulační gen produkuje **inaktivní repressor = aporepresor**
      - aktivován navázáním **korepresoru** (produkt metabolického řetězce, jehož syntézu katalyzují proteiny kódované geny operonu)
    - (trp operon – kóduje enzymy pro syntézu **tryptofanu**)
  - **atenuace = zeslabení**
    - **regulace trp operonu** je zčásti zachována i při mutaci jeho operátoru na konstitutivní
    - **atenuátor** = úsek DNA podílející se na tomto jevu
    - podobná strukturu jako **signální sekvence** pro terminaci transkripce
    - dodatečný **regulační mechanismus** syntézy i dalších AMK



- **regulace translace**
  - u prokaryot se transkripcí vytváří **multigenní mRNA** = kóduje více proteinů (enzymů) zpravidla jednoho **metabolického řetězce**
  - geny exprimovány současně v rámci **jednoho operonu**, ale v průběhu translace dochází k vytvoření různého **množství jednotlivých proteinů** díky různým **mechanismům regulace**
    - **nestejná iniciace** transkripce jednotlivých genů operonu
    - různá rychlost **přechodu ribosomů** mezi jednotlivými úseky mRNA
    - různá rychlost **vytváření vlásenek** mRNA, které ovlivňují rychlost posunu ribosomů po mRNA
    - různá **rychlost degradace** mRNA
    - **posttranslační** regulační mechanismy
  - **mRNA prokaryot nestabilní**
    - štěpení probíhá **ve směru 3'→5'** a může být zahájeno již v průběhu transkripce
    - **poločas existence mRNA** prokaryot je 2-10 minut - krátká životnost mRNA umožňuje bakteriím rychle se přizpůsobit **změnám prostředí** nejen regulací transkripce, ale i **ukončením translace**
- **regulace na úrovni aktivity enzymů**
  - **zpětnovazebná inhibice** neboli inhibice enzymů koncovými produkty
  - enzymy schopné této reakce mají kromě **vazebného místa** pro substrát ještě vazebná místa pro produkty **metabolického řetězce**
  - po navázání **koncového produktu** se změní alosterická konfigurace molekuly enzymu a tím jeho **afinita k substrátu** a metabolická aktivita - **alosterické proteiny**

## 89. Transkripce a translace u prokaryot

- 
- základní rysy stejné jako u **eukaryot**
  - **liší se** časovou návazností, prostorovým uspořádáním, mechanismem regulace, sekvencemi promotorů, strukturou ribosomů a posttranskripční úpravou RNA
  - **transkripce**
    - přepis informace z **DNA do RNA**
    - **transkripční jednotka** = segment DNA transkribující se jako jedna molekula RNA
      - obsahuje **jeden gen** nebo **sérii** sousedních genů
    - **katalyzována RNA-polymerázou**
      - **5 polypeptidů**: 2  $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1 $\beta'$ , 1 $\sigma$
      - **sigma faktor** - iniciuje transkripci
      - rozpoznává **signální sekvenci** promotoru a váže se na promotor
    - ve směru 5'→ 3'
    - DNA dvouřetězcová, ale promotor je **asymetrický**
      - dochází vždy k přepisu jen z **jednoho vlákna** (vlákno pracovní)
      - druhé vlákno pro transkripci tohoto genu **význam nemá** (vlákno beze smyslu) - smysl při **transkripci jiných genů**
    - **promotory** odlišné od eukaryot
      - **uniformní** struktura
      - **pořadí nukleotidů**, které se nejčastěji vyskytují ve vysoce konzervovaných sekvencích = **konsenzuální sekvence**
        - **konsenzuální sekvence** - 10 paměťového řetězce = TATAAT - tzv. TATA box - tvořena AT pb a je místem **zahájení despiralizace** (unwinding) a oddělování řetězců DNA
        - **konsenzuální sekvence** - 35 paměťového řetězce = TTGACA - tzv. Pribnow box - **sigma faktor** rozpoznává a váže se na - 35 sekvenci = tzv. **rozpoznávací sekvence**
        - **vzdálenost** mezi TATA boxem a Pribnow boxem je vysoce konzervovaná (15 - 20 pb) - změna počtu bazí mění **funkci promotoru**

- transkripce má **3 stádia**
- **iniciaci**
  - začíná **navázáním sigma faktoru** na promotor a dále komplementací **RNA-polymerasy** navázáním jejích zbylých **polypeptidů**
  - působením **RNA polymerasy** - despiralizován krátký úsek DNA - rozpojování **vodíkových můstků** a navázání prvních 8-9 nukleotidu RNA
  - po skončení iniciace se **sigma faktor** od RNA polymerasy oddělí
- **elongaci**
  - **syntéza RNA** ve směru 5' → 3'
  - místo T je U
  - RNA-polymeráza využívá jako matrici **pracovní řetězec** DNA
  - **prodlužování** se děje v místě tzv. transkripční bubliny (18bp, DNA despiralizovaná a řetězce odděleny)
  - RNA-polymeráza má schopnost jak **despiralizace** tak i **respiralizace** DNA
  - s **posunem RNA-polymerázy** po vlákně DNA se postupně prodlužuje vznikající RNA
- **terminaci**
  - řízena **terminačním signálem**
- **posttranskripční úpravy**
  - DNA prokaryot **nemá introny** - syntetizovaná RNA neprodělává posttranskripční úpravy před translací
  - **prokaryota** nemají **jadernou membránu** - na mRNA se váží ribosomy již v průběhu **transkripce**
  - transkripce i translace probíhají na **stejném místě** a téměř ve **stejném čase**
  - pro expresi genů důležitá **stabilita syntetizované RNA**

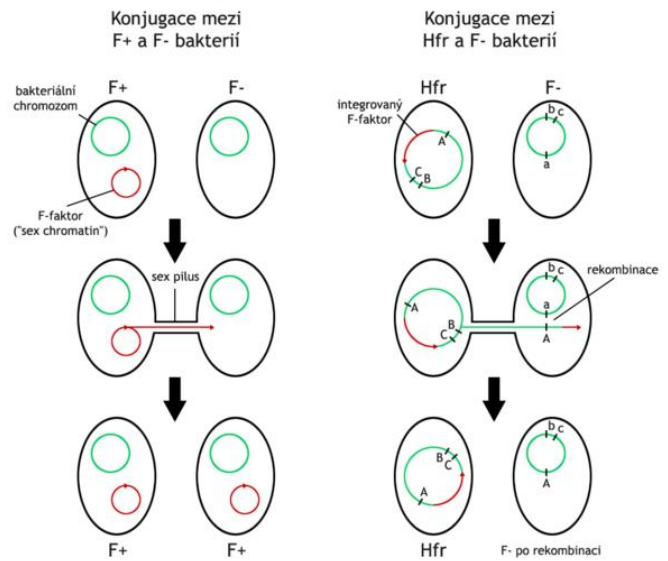
## 88. Konjugace, transformace, transdukce

- jedná se o **parasexuální děje** u bakterií, jimiž dochází k jednosměrnému přenosu **genetické informace**

### Konjugace

- postupný, **regulovatelný proces**
- u sexuálně **diferenciovanych** bakterií
- u **mikrobů** - analogie pohlavního rozmnožování vyšších organismů
- **spojení bakterií**, při němž dochází k přechodu **dědičné informace (DNA)** z jedné do druhé
  - vytvoření **cytoplazmatického spojení** mezi dvěma bakteriemi v podobě úzké trubičky
  - přenos části **genetického materiálu** z dárcovské buňky do buňky příjemce
- této **schopnosti** rozhoduje přítomnost **sex-chromatinu (F-faktoru)**
  - **buňky F+** : F-faktor tvoří samostatnou součást jejich **genetické výbavy (F-plazmid)**
    - **fenotyp** = F-pilie na povrchu bakterie
  - **buňky Hfr**: F-faktor integrován v hlavním **bakteriálním chromozomu (epizóm)**
    - může být na **různých místech chromozomu**
- **dárcovské buňky** musí obsahovat F-faktor, zatímco příjemci ho **postrádají**
- dochází k **přerušení a odpojení** jednoho řetězce DNA hlavního chromozomu v místě **F-faktoru**
- nově vzniklá **jednovláknová DNA** je předávána cytoplazmatickým můstkem do buňky příjemce, kde se **dosyntetizuje komplementární řetězec**
- přenesený chromozom se **rekombinuje** s hlavním chromozomem příjemce
- důležitá pro **mapování bakteriálního chromosomu** – metoda přerušovaná konjugace
  - při konjugaci dochází k postupnému **přesouvání chromosomového vlákna** z 1 bakterie do druhé
  - případné rozšíření těchto alel opět závisí na jejich **adaptativní hodnotě** (vliv selekce)

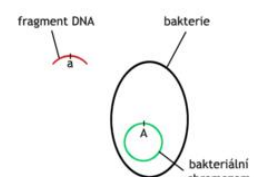
### KONJUGACE



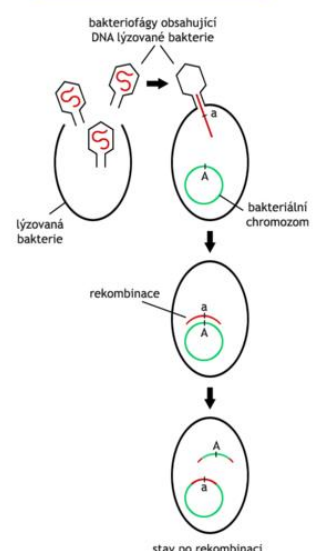
### Transformace

- přenos **dědičných vlastností** z jednoho kmene mikrobů na druhý
- **aktivní**, enzymy řízená, energeticky náročná
- pouze u buněk produkujících **faktor kompetence** – kompetentní buňky
- probíhá **zpětná rekombinace** geneticky aktivního materiálu
  - prostřednictvím DNA jsou **dárcovské alely** přenášeny do buněk příjemce
- **dárcovská DNA** se váže na buněčný povrch - jedno vlákno je rozloženo, druhé putuje pomocí **přenašeče** do buňky
- **přenos genetické informace** do bakterie přímo z DNA, **vnesení plazmidu** do bakterie v rámci klonování
- přenášejí se geny pro **virulenci a rezistenci**

### TRANSFORMACE



### TRANSDUKCE



### Transdukce

- převod
- přenos části **genetické informace (DNA)** z jedné bakterie do druhé, prostřednictvím **bakteriofágu**

- možná v průběhu **lyzogenního cyklu** reprodukce virů
  - **generalizovaná (obecná)** - bakteriofág je schopen přenosu kterékoli části genomu (fragment chromozomu nebo plazmid)
  - **specializovaná (restringovaná)** - mírný bakteriofág přenáší pouze určitou část svého chromosomu
  - **abortivní** - přenášená část DNA v hostiteli nereplikuje
- přirozený prvek **moderního genového inženýrství** - temperovaný fág napravuje dědičný defekt hostitele vnesením **normálního genu** do jeho **genomu**

## 90. Biologie a genetika virů, význam v medicíně

---

- viry jsou **nebuněčné organismy**
- 1000x menší než **bakterie**
- jen **genetická informace** a proteiny
- mimo buňku nejsou schopny **samostatného metabolismu** – napadají hostitelské buňky a využívají jejich struktury pro vlastní replikaci
- vysoká **druhová a orgánová specifita**
  - rostlinné
  - živočišné
  - bakteriofágy
- podíl na **vzniku mutací** eukaryotních buněk
  - **malígní transformace**, nádorové bujení
  - významně se podílejí i na **vzniku neoplázií** - onkoviry
- klasifikace podle tří **základních vlastností**
  - typ **nukleové kyseliny**
  - **počet řetězců** nukleové kyseliny
  - **struktury virionů** = zralých virových partikulí
    - genom **obalen** proteinovým obalem
    - kulovité, tyčinkovité, vláknité nebo složitější
- **DNA viry**
  - adenoviry, herpes viry
  - parvoviry (ssDNA lineární)
- **RNA viry**
  - reovirus (dsRNA)
  - polioviry (ssRNA)
  - retroviry, např. HIV

### Morfologie

- **kapsid** = proteinový obal
  - **obaluje** molekulu DNA/RNA (5-200kb)
  - obsahuje **více kapsomer** = identických podjednotek
    - složený z **proteinů kódovaných geny virů**
- **obalené viry** – mají kromě kapsidy ještě další obal tvořený **dvojvrstvou proteinů** a lipidů
  - získáno při **uvolňování exocytózou** z hostitelské buňky
  - **umožňují identifikaci** viru i virem infikovaných buněk
- **bakteriofágy**
  - proteinová hlavička + bičík – trubička obalena kontraktilním proteinem a zakončena destičkou obsahující **proteolytické enzymy**
  - uvnitř hlavičky uložena **dvouvláknová DNA**

- z destičky **vybíhají fimbrie** - zachycení na povrch bakterie v místě specifického **receptoru**
- DNA transportována **duťnou bičíku** do cytoplazmy bakterie (kapsida zůstává na povrchu buňky)
- **živočišné viry**
  - **viriony** se váží na specifické **receptory** na povrchu buněk - dovnitř se dostávají **endocytózou** (včetně kapsidy a obalu)
  - **obal** pak **rozštěpen lyzozomy** buňky - nukleová kyselina se uvolňuje

### Genom

- mimořádná **diverzita**
- 1 molekula **nukleové kyseliny** - DNA/RNA (jednořetězcové, dvouřetězcové, lineární, cirkulární)
  - **dvouřetězcová DNA**: přímo matrice pro mRNA
  - **jednořetězcová +DNA**: nutnost doplnění druhého komplementárního vlákna - matrice pro mRNA
  - **jednořetězcová -DNA**: přímo matrice pro mRNA
- **retroviry**
  - v kapsidě dvě **identické molekuly** ssRNA + reverzní transkriptáza
  - genom obsahuje **tři geny** (gag, pol, env) a **sigma sekvenci**
    - **pol** - reverzní transkriptáza, enzym umožňující přepis, enzym umožňující začlenění
    - **gag** - proteiny kapsidy
    - **env** - obal
  - **reverzní transkriptáza** využívá jako primer některou tRNA hostitelské buňky
  - **polymerace nové DNA** podle RNA ve směru 5' → 3'
  - po dokončení DNA, RNA odbourána **ribonukleázou** - ponechán pouze malý úsek sloužící jako **primer** pro syntézu komplementárního řetězce DNA
  - **dsDNA integrována** do chromozomu hostitelské buňky
  - např. **HIV** vázající se na T<sub>H</sub> lymfocyty a způsobující AIDS
  - významné **onkogenní faktory**

### Reprodukce

- nemožnost **autonomní reprodukce** - využívají transkripční a translační aparát hostitelské buňky
- **lytický cyklus**
  - pod obrazem **infekce**
  - viry se v hostitelské buňce **pomnoží - lyzují ji** - uvolněné viriony **napadají** další buňky
  - viry rozpoznávány **T lymfocyty** (také paměťové buňky)
- **lyzogení cyklus**
  - někdy se **nukleové kyseliny** po vniku viru do hostitelské buňky **nereplikují** a nevytvářejí **zralé viriony** - genom viru se začlení do genomu hostitelské buňky a **replikuje** se s ním
  - **začlenění je reverzibilní** - virus může po určité době vstoupit do **lytického cyklu**
    - **temperované vlívy** - zahajují vstup do lytického cyklu
  - DNA se změní z **lineární na cirkulární** a může být integrována do chromozomu **hostitele**
    - **provirus** = virová DNA integrovaná do chromozomu
  - **možnost integrace i RNA virů** - nutná reverzní transkripce
  - pro integraci musí **DNA viru** obsahovat **integrační sekvenci**

### Rekombinace genetické informace virů

- při **směsných infekcích** = infikování buňky dvěma a více viry současně
- DNA virů se mohou k sobě **přiložit a rekombinovat**
- přispívají k **variabilitě fenotypu virů**
- viry se využívají jako **vektory genetické informace** mezi buňkami - využívány v **genetickém inženýrství a genové terapii**

## 91. Ontogeneze a její genetická regulace

- vývoj jedince začíná **okamžikem oplození**, následují nejdůležitější změny v prenatálním vývoji a pak postnatální vývoj, během nějž již změny nejsou příliš výrazné, a vše končí smrtí organismu
- **úloha genomu**
  - vše, co je nezbytné pro **vývoj jedince**, alespoň z informačního hlediska, je přítomno v jedné buňce, **zygotě**
  - tato informace je **buněčný genom**
  - předává se ze zygoty do **ostatních buněk**, přesto jsou buňky výrazně odlišné
  - protože je jejich **genom stejný**, musí se lišit **epigeneticky**
  - zejména tedy tím, jaké geny jsou u daného typu buňky aktivní a to je ovlivněno **složitými regulačními kaskádami** - obsahují specifické transkripční faktory
  - teoreticky a historicky jsou dvě **protichůdné cesty**, jimiž může být informace z genomu použita k vytváření organismu
    - v jediné buňce (obvykle ve spermiu) je přítomen celý **dospělý organismus (homunculus)** a vývoj je jen růstem - dávno překonáno mikroskopii
    - **hypotéza epigenetické regulace** říká, že genotyp buňky dává potřebné nástroje, aparát, pro vývoj a tím vymezuje i **hranice možného**
    - **podle druhé hypotézy platí, že**
      - regulace vývoje je způsobena **různým okolím**
      - není možné dvakrát vyrobit **tentýž organismus**
      - drobná změna postupu může vést k **fatálním problémům**
      - některé **významné změny** ale vedou k normálnímu vývoji, jen s jinými vlastnostmi
- **základem vývojových procesů je chování buněk**
  - každý organismus je z buněk, proto základem vývoje jsou děje na **úrovni buněk**
  - každý typ buněk u dospělého organismu je výsledkem **unikátní sekvence událostí**, má svůj vlastní **vývojový program**
  - **obecně má 5 částí**
    - **dělení buněk** - proliferace (z jedné buňky řádově  $10^{15}$ )
    - **patterning** - vznik uspořádanosti (buňky zatím stejné dostanou informaci, čím budou a tak se mohou buňky **jednotlivé tkáně** rozrůznit a uspořádat časově i prostorově do různých celků)
    - migrace buněk (nebo částí - axon)
    - **diferenciace buněk** (vlastní morfologické a funkční rozrůznění)
    - **buněčná smrt** (možnost diferenciace)

### Řízení chování buněk během vývoje

- všechny řečené procesy musí být **modulovány**
- **řídící signál** může přicházet přímo z buňky (autospecifikace), častěji ale přichází z **okolních buněk** (indukce)
- signály mohou nabývat **různých významů** (mitogenní, apoptotické, poziční)
- signálem může být i **kontakt s jinou buňkou**, extracelulární matrix nebo nejčastěji signálními molekulami
- ty většinou pochází z **blízkého okolí** (parakrinní signály)
- kromě **chemických signálů** se mohou podílet i **fyzikální síly** (tlak pro formaci lumen apod.)
- pro signalizaci je nezbytná **vnímavost buněk** - cílová buňka obsahuje receptor
- kromě toho se skupiny buněk svými signály většinou **zpětnovazebně** ovlivňují navzájem
- **signální kaskády**
  - signalizace nekončí **vazbou signální molekuly** na receptor
  - tato molekula musí vyvolat **aktivaci příslušné signální kaskády**
  - nestačí **momentální ovlivnění buňky** (jako při vazbě hormonu na receptor v dospělém organismu), ale je nutné buňku **ovlivnit trvale**

- proto mají kaskády na konci **transkripční faktory**, které změni **funkci genů**
- odpovědí buňky na stimulaci je tedy primárně **diferenciální genová exprese**
- jako **sekundární posel** tu uvnitř buňky většinou funguje fosforylace zbytků tyrosinu
- **signální molekuly**
  - příkladem některých **signálních molekul**, které během vývoje většinou parakrinně působí jsou následující
    - **FGF** – fibroblast growth factor
      - neovlivňují jen fibroblasty, naopak se podílejí téměř na **všech vývojových procesech**
      - rodina má asi **22 členů** a existují pro ně **4 receptory**
      - jako růstové faktory ovlivňují nejen **proliferaci**, ale mají vliv i na **diferenciaci**
    - **BMP** – kostní morfogenetické proteiny
      - početná rodina, původně izolována z **extraktu kostí**
      - jsou **inhibovány NOG proteinem** – jeho mutace vedou k symfalangismu nebo syndromu mnohočetných synostóz
    - **rodina hedgehog**
      - u savců existuje **sonic (SHH)**, **indian (IHH)** a **desert (DHH) hedgehog**
      - **SHH**: podílí se zejména na vývoji axiálního skeletu a nervové trubice, mozku a končetin
      - **IHH**: účastní se enchondrální osifikace
      - **b**: podílí se na morfogenezi varlete a periferních nervů
      - obecně jsou umístěny v **membráně**, uvolňují se a tvoří micely, jejichž gradient ovlivňuje řízení **uspořádanosti tkáně**
    - **WNT** – wingless type
      - podílí se na **somitogenezi**, diferenciaci nervového systému, kožních adnex, zubů apod.
    - **NOTCH** – zářez
      - vyskytuje se tam, kde je třeba vytvořit **rozhraní** mezi buňkami – např. při somitogenezi
    - **kyselina retinová**
      - buňky ji vyrábějí z **vitaminu A**, difunduje pak do okolí a vytváří gradienty potřebné pro vývoj mozku, očí, končetin, gonád apod.
      - v dospělosti ovlivňuje diferenciaci **obnovujících se tkání** a lze užít léčebně při akné, psoriáze nebo promyelocytární leukémii
- **úloha transkripčních faktorů**
  - mají významnou roli, protože pro **řízení vývoje** a diferenciace buněk nestačí jen **regulovat expresi** proteinů, ale také syntetizovat **proteiny nové**
  - **příklady transkripčních faktorů** podstatných pro vývoj
    - **HOX geny** (homeotické, homeoboxové)
    - **SRY a SOX geny**
      - podstatné pro **diferenciaci pohlaví**, pro vývoj pohlavních orgánů
      - **SOX** samostatně se podílí na vytvoření chrupavčitých základů kostí z **nediferencovaného mezenchymu**
    - **PAX geny**
      - u Drosophily se obdobný gen podílí na **segmentaci**, u člověka podstatné pro organogenezi **konkrétních orgánů**
    - **MyoD**
      - nezbytný pro diferenciaci **svalů**
    - **TBX geny**
      - podílejí se na specifikaci vývoje horních a dolních **končetin**
      - mutace některého z nich způsobuje syndrom s postižením srdce a HK
- **trvalá modifikace aktivity genomu cílových buněk**
  - transkripční faktory fungují **reverzibilně** – není-li přítomen, dochází k útlumu exprese
  - často je ale třeba, aby aktivita přetrvávala i po **odeznění stimulačního signálu**

- jedna z možností je **pozitivní zpětná vazba**, kdy se TF váže na promotor genu pro tento faktor a tak stimuluje **transkripci své mRNA**
- pro **trvalou expresi** ale fungují jiné mechanismy – nejprozkoumanější je methyloci CpG
  - **methyloci** probíhá obvykle na obou vláknech
  - methylovaný promotor je **nefunkční promotor**
  - **CpG methyloci** je proto zodpovědná za imprinting – transkripční aktivita genu závisí na tom, zda je uložen na chromosomu **mateřského nebo otcovského původu**
  - **imprinting** vzniká methyloci daného genu během **gametogeneze** u jednoho pohlaví – u potomka je pak alela od tohoto **rodiče neaktivní**
  - to má velký klinický dopad např. při **uniparentální disomii** (gen může být v důsledku imprintingu zcela neaktivní, i když je přítomen ve dvou kopiích)
  - to se jeví jako **nevýhodné v evoluci**, je ale teorie „boje“ otce a matky
  - **matka** nechce aby jí dítě úplně vyždímalo, tudíž matka předává dítěti geny **regulující (brzdící) růst**
  - **otec** se na výživě nepodílí, chce z matky pro dítě vyždímat co nejvíc, proto předává dítěti geny **podporující růst**
  - **inaktivací** některých z nich pak dojde ke **vhodné regulaci** různých buněk a faktorů tak, aby vývoj **probíhal optimálně**
  - zvláštní mechanismus **potlačení funkce** je u chromosomu X (popsáno jinde)

### Buněčná proliferace

- opakované **řízené dělení** buněk, podmínka ontogeneze
- po 50 děleních jedné buňky vznikne **1,3 · 10<sup>15</sup> buněk**
- **počet dělení** většiny buněk je omezen mechanismem **zkracování telomer** při každém dělení – příliš krátké telomery zabraňují **ukončení replikace**
- **kmenové buňky**
  - zvláštní typ buněk, které mají schopnost **nesymetrického dělení**
  - jedna z **dceřiných buněk** je opět buňkou kmenovou (sebeobnova) a druhá prochází diferenciací v **progenitorovou buňku**, která je proliferačně velmi aktivní a její potomstvo se **postupně diferenciuje** v cílový funkční typ buněk
  - tento mechanismus je **protinádorový** – kmenové buňky se dělí velmi pomalu, počet dělení je malý a tak se **minimalizuje riziko** vzniku mutace a nádorové transformace
  - protože by však nestačily zásobovat tkáň, vznikají **buňky progenitorové**, které se rychle **diferenciují** (samy se neobnovují, jedná se o přechodné stádium, proto nehrozí kumulace mutací ani u nich)
  - **kmenové buňky** se liší podle toho, v jaké spektrum buněk se mohou **diferenciovat**
    - **embryonální kmenové buňky** jsou pluripotentní – sice nejsou schopny dát vznik embryu (to umí jen **totipotentní blastomery** časně moruly či zygota), ale jsou schopny se diferenciovat v jakékoli buňky s **výjimkou trofoblastu**
    - některé **somatické buňky** se podařilo in vitro indukcí přeměnit na buňky kmenové, jsou to však jen počátky **možností tvorby orgánů** k transplantaci z **kmenových buněk** jedince a podobně.
    - kromě **pluripotentních** existují i buňky s omezeným potenciálem - např. ve **střevních kryptách** jsou buňky pro obnovu **epitelu**
    - takové kmenové buňky jsou **unipotentní** a mohou se diferencovat jen v jeden typ **buněk cílových**
    - existují ale i buňky **multipotentní** – někde mezi repertoárem kmenových buněk **tkáňově specifických** (unipotentních) a **pluripotentních** – např. krvetvorné

### Patterning neboli vývoj uspořádanosti

- buňky jsou proliferací schopny vytvořit **jednotlivou masu buněk**
- v těle ale buňky podle své **pozice a polohy** zaujímají určitou funkci a diferenciují se v různé tkáňe a orgány - k tomu musí dostat nějakou **informaci** o tom, jak se mají nasměrovat a jakou pozici **zaujmout**



- **obecně:** vývoj uspořádanosti je možno definovat jako proces, kterým se jednodušnost tkáň (masa buněk) mění v prostorově uspořádaný orgán
- **stochastická determinace**
  - **mechanismus**, který dovolí vznik i několika různým typům buněk najednou aniž by bylo třeba jakéhokoli **zevního podnětu**
  - princip je jednoduchý – každý typ buňky je určen **aktivitou jednoho TF**, který dále **aktivuje expresi** své vlastní mRNA a **inhibuje expresi** ostatních zúčastněných TF
  - na počátku je ve všech buňkách slabá a **fluktuující exprese** všech TF (genetický šum), jakmile ale jeden TF **náhodně převládne**, dojde pozitivní zpětnou vazbou k jeho zesílení a o osudu buňky je **rozhodnuto**
  - **stejná pravděpodobnost** převládnutí jakéhokoli TF zajistí diferenciaci všech typů buněk
  - tento proces se zřejmě podílí na **prvním kole diferenciaci embrya** – vznik blastocysty z moruly
  - proto jsou **první stádia** vývoje velmi **pravidelná** a až do stádia 8 buněk je možno jednu buňku (blastomeru) odejmout **bez následků** (podstatné pro předimplantační diagnostiku)
- **patterning pomocí koncentračního gradientu**
  - jedná se o patterning na základě **gradientu difundující signální molekuly** (morphogenu)
  - model **francouzské vlajky**
    - **obdélník** má na jedné z kratších stran buňky, **produkující morfogen**
    - ten **difunduje** směrem k druhé kratší straně na základě **koncentračního gradientu**
    - cestou jej **vychytávají buňky** uvnitř obdélníku, které mají receptory jež specificky vážou a specificky reagují na různou **koncentraci morfogenu**, která postupně klesá
    - tak se buňky **nejblíže buňkám** produkujícím morfogen diferencují kvůli **vysoké koncentraci** na „modrý pruh“, buňky **uprostřed** díky **střední koncentraci** na „bílý pruh“ a buňky na **konci** díky **nejnižší koncentraci** na „červený pruh“
  - tento mechanismus se uplatňuje např. u **sonic hedgehog**, který je produkován strunou hřbetní
  - postupně **difunduje směrem dorzolaterálním** a cestou interakcí s dalšími faktory dává vzniknout **ventromediálně sklerotomům** (vliv PAX1 pro přeměnu somitu na mesenchymální sklerotom a SOX pro přeměnu na chrupavčitý základ) a **dorzolaterálně dermatomyotomům** (další diferenciaci pod vlivem jiných signálů)
- **reakčně difuzní mechanismus**
  - vyžaduje taktéž **gradient morfogenu**, resp. morfogeny 2 – aktivátor a inhibitor
  - **aktivátor** zesiluje produkci sebe sama (pozitivní zpětná vazba) a dále **aktivuje expresi inhibitoru**, který inhibuje produkci aktivátoru
  - důležitá je **rychlost difuze**, která je u aktivátoru **nízká**, ale u inhibitoru **vysoká**
  - jestliže náhodou u buňky, kde jsou **exprese v rovnováze** (šum) dojde ke stoupnutí **hladiny aktivátoru** a ta převyšší inhibitor, dojde k **zesílení exprese aktivátoru**
  - vznikne tím také **více inhibitoru**, ten ale kvůli rychlé difuzi přechází do okolí a proto je v daném místě jeho **koncentrace nízká**
  - **aktivátor** má naopak koncentraci vysokou v místě a v okolí nízkou, protože má **pomalou schopnost difuze**
  - tento systém se tak pohybuje **směrem k rovnováze**, kde se pravidelně střídají **aktivované a inhibované oblasti**
  - tento mechanismus vidíme u **vlasových folikulů** – folikuly produkují aktivátor WNT, epidermis mezi nimi inhibitor
- **molekulární hodiny**
  - tzv. **segmentační hodiny** se uplatňují v procesu somitogeneze
  - somity vznikají **kraniokaudálně**, oddělují se na předním konci presomitického **mesodermu**
  - vznikají s **naprostou pravidelností** – hypotéza hodin byla definována na základě objevu **pravidelné oscilace hladiny** mnoha mRNA v presomitickém mesodermu (očividně jeden cyklus na vytvoření jednoho páru somitů)
  - tímto mechanismem zřejmě **vznikají somity**, začíná se signální molekulou **NOTCH** která spouští **první kaskádu**
  - **druhá kaskáda** je aktivována **WNT**

## Migrace buněk

- podobný **typ informací** potřebují buňky (nebo jejich části), které do své finální destinace **migrují**
- při své migraci se **řídí gradienty rozpustných látek** (morfoгенů) tedy **chemotaxí** a dále **dopravními značkami** – molekulami nacházejícími s na povrchu ostatních buněk

## Diferenciace

- **diferenciaci buňky** je možno rozdělit do dvou částí
  - nejprve musí dojít k **rozhodnutí**, k jaké diferenciaci dojde
  - poté dojde k vlastní **viditelné změně** struktury a funkce buňky
- **rozhodovací fáze**, kdy se diferencující se buňka ještě morfologicky neliší od nediferencované se dá také rozdělit do dvou částí – **specifikace a determinace**
  - nejprve dochází ke **změně genové exprese** neboli některé geny ukončí nebo sníží svou expresi a některé ji naopak zahájí nebo zvýší
  - tato změna je zpočátku **reverzibilní**, pokud např. odstraníme vyvolávající faktor, buňka se vrátí do **nediferencovaného stavu**
  - této fázi se říká **specifikace**
  - v dalším stádiu, **determinaci**, je již osud buňky určen za normálních okolností nezvratně, resp. lze jej zvrátit jedině **hrubým zásahem**
- mechanismů, které zajišťují **stabilní determinaci** osudu buňky je několik
- kromě **významné role TF**, které se podílejí na specifikaci i determinaci se zde zcela jistě uplatňuje i trvanlivější **epigenetická modifikace** genomu, jako je CpG methylace
- **klonování**
  - vzhledem k **identitě genomu** všech buněk organismu je možno teoreticky z každé buňky organismu získat **genetickou kopii jedince** – klon
  - je třeba jen vyřešit problém **dediferenciace** takové buňky zpět na **totipotentní**
  - nejjednodušší technikou je tzv. **nukleární transfer** (přenos jádra buňky somatické do vajíčka zbaveného vlastního jádra)
  - **cytoplasma vajíčka** je vybavena mRNA, proteosyntetickým aparátem i hotovými proteiny, zejména TF, které zajišťují totipotentní stav zygoty
  - vložíme-li do tohoto prostředí **jádro jakéhokoliv buněčného typu**, přeprogramuje se na zygotu
  - podle zkušeností se zvířaty je to možné, ale **neefektivní** – zejména nelze zajistit dostatečnou **životaschopnost**, případně dobrý zdravotní stav klonovaného jedince
  - i tak lze u člověka **klonování eticky obhájit** snad jedině za účelem získání časných **embryí** a z nich pluripotentních embryonálních kmenových buněk k terapii, pokud by nebyla jiná možnost takové **buňky získat**
  - **základnosti**, jež skýtá metoda **nukleárního transportu**
    - **mitochondriální genom** bude z dárcovského vajíčka, nelze tedy nikdy hovořit o úplné identitě
    - **prostředí, životní zkušenosti**, udělají pravděpodobně i z geneticky identického jedince úplně jinou osobu
    - ve skutečnosti není jedno, jaká **dárcovská buňka** se použije – vezmeme-li např. buňku, která má za sebou řadu dělení a tím **krátké telomery**, je pravděpodobné, že tyto se po přenosu jádra neprodlouží a zygota pak nemusí mít potenciál k dostatečnému množství dělení pro **bezproblémový vývoj**
    - ani **vlastní přeprogramování** jádra není bez problémů, nejspíš zde hraje roli celá řada dosud **neznámých okolností**, takže u zvířecích modelů je tato metoda spojena s vysokou **úmrtností** takto modifikovaných vajíček, embryí, mláďat i dospělých
    - z hlediska **jakýchkoli klonování** je důležité, že neúspěšné přeprogramování jádra se může projevit jak v **mláděm**, tak i **dospělém věku** a nikdy není vyhráno
- **hierarchická posloupnost diferenciace**
  - v průběhu vývoje podstupuje buňka opakovaně **mnoho rozhodnutí** o dalším směřování
  - každé rozhodnutí zmenšuje prostor **možných budoucích osudů buňky**, až dojde k tzv. **terminální diferenciaci**

- terminální diferenciace je **nevratná specializace buňky** k určité funkci, která zahrnuje i **zastavení buněčného cyklu** v G0 fázi
- v tomto hierarchickém rozhodovací procesu platí, že **nelze postoupit** do dalšího stádia pokud úspěšně buňka **neprojde tím předešlým**
- tak i buňka se musí **nejdříve rozhodnout** jestli bude trofoblastem nebo embryoblastem a teprve stane-li se **úspěšně embryoblastem**, může se dále rozhodovat, jestli se přidá k **ekto nebo entodermu**

### Buněčná smrt

- jedno z **vývojových rozhodnutí** může být rozhodnutí zemřít
- **programovaná buněčná smrt** (nejčastějším způsobem je apoptóza) hraje důležitou roli v **různých stádiích vývoje**
- z hlediska buňky může být **apoptóza popravou** (signál přichází od jiných buněk) nebo **sebevraždou** (signál přichází zevnitř buňky např. je-li poškozena integrita genomu nebo mitochondrie)

### ( HOX geny )

- historicky **první objevená skupina** genů, kódujících TF s mimořádně důležitou rolí ve vývoji jsou **homeotické ev. homeoboxové geny (Hox)**
- Hox geny poprvé objeveny u **octomilky** (*Drosophila melanogaster*), jako skupina genů, jejichž mutace vedou k tzv. **homeotickým mutacím**
- typickým příkladem takové mutace je **mutace ultrabithorax**
  - hmyz má obvykle **3 hrudní segmenty**
  - u **dvoukřídých** nese druhý hrudní segment křídla, třetí segment směrem k zadečku pak pouze **kyvadélka**
  - mouchy s mutací **ultrabithorax** mají dva páry křídel, přičemž nejen křídla, ale celý **třetí hrudní segment** jsou shodné s **druhým hrudním segmentem**
  - taková situace se nazývá **přední homeotická transformace** (přetvoření segmentu na podobný segment, který se **normálně nachází více vpředu**)
- z toho plyne i **název Hox** genů, box je označené specifické sekvence amk jinak též zvané **homeodoména**, která se účastní vazby na DNA a která je u Hox genů velmi **konzervována**
- Hox jsou **exprimovány podél tělní osy** ve stejném pořadí, jako na chromosomu – pravidlo **kolinearity**
- je zřejmé, že toto **uložení genů** na chromosomu je úsporné z hlediska potřeby regulačních sekvencí – teoreticky by systém fungoval správně i s **jedním regulátorem** na celý Hox klastr
- dále je třeba zdůraznit, že Hox geny fungují velmi **speciálním způsobem** – neovlivňují přímo ani dělení ani přežití, ba ani konkrétní směr diferenciace buněk, ale v podstatě jen **chytrým způsobem modifikují program tvorby tělního segmentu** tak, aby odpovídal dané lokalizaci
- obratlovci se od členovců liší mnohem **větším genomem** (avšak ne o tolik větším počtem genů)
- tento rozdíl vznikl nejspíše **několikanásobnou duplikací genomu** předka obratlovců ve srovnání s předkem členovců
- jedním důkazem je právě **uspořádání Hox genů** u obratlovců, resp. člověka
  - člověk má **4 klastry Hox** genů – HoxA, HoxD, v každém klastru pak jsou ještě některé geny **multiplikovány**
  - podobně jako u octomilky, Hox geny se u člověka podílejí na **určení identity podél kranio-kaudální osy**, tedy patterning axiálních struktur – CNS, páteře a střeva
  - kromě toho ale významně ovlivňují **vývoj i dalších struktur** – končetin např.
  - na rozdíl od octomilky nejsou u člověka při mutaci Hox genů pozorovány **pravidelné homeotické transformace** axiálních struktur
  - tyto se však objeví, pokud jsou vyřazeny **všechny paralogní Hox geny**, tzn. geny pocházející z jednoho octomilkového předka



## 93. Chromosomální determinace pohlaví

---

- uplatňuje se u gonochoristů (živočichů s odděleným samčím a samičím pohlavím)
  - pohlaví determinováno v **různých etapách** jejich ontogenetického vývoje
  - u většiny určeno již **při oplození**

### Pohlavní chromozomy (gonozomy)

- jsou to **heterochromozomy**
- součástí chromosomální výbavy **každé buňky** v organismu
- **2 typy** - X, Y - pohlaví určeno jejich **vzájemnou kombinací**
  - v **haploidní sadě**: 1 gonosom + 22 autozomů
  - **diploidní buňky**: 1 pár gonosomů XX/XY + 22 homologních párů autosomů
- **morfologicky nápadné** - značná část je tvořena **heterochromatinem** (= chromatin, který zůstává **těsně stočený** (a tmavě barvicí) během celého buněčného cyklu - geneticky neaktivní)
- v interfázi **nedespiralizují**
- **Y** obvykle podstatně **menší** než chromosom **X**, i všechny **autosomy**
- **Y chromozom** determinuje samčí pohlaví
  - je-li přítomen, je **zahájen samčí vývojový program**
  - pokud chybí, jsou zahájeny procesy vedoucí k **vytvoření samičího pohlaví**
- **počet X chromozomů** pohlaví neovlivňuje
- při **oplození** je 50% pravděpodobnost vzniku **samčího i samičího pohlaví** (při meiotické tvorbě pohlavních buněk všechny gamety obsahují shodný chromozóm X, ale v gametách je s 50% pravděpodobností přítomen buď X nebo Y - při splynutí - 50:50 pravděpodobnost vzniku zygoty XX:XY)

### SRY gen

- zodpovědný za **zahájení vývoje samčího pohlaví**
- v oblasti **krátkého raménka Y** směrem 3' od pseudoautosomální oblasti 1
- vzácně se může objevit **crossing-over**, při kterém je SRY translokován na X - samec 46, XX
- protein SRY je **transkripční faktor** z rodiny HMG (high mobility group)
- exprimován v **podpurných buňkách** nediferenciované gonády - diferenciace v **Sertoliho buňky**
  - ty se organizují do **epiteliálních čepů**, obalují germinální buňky - indukce jejich diferenciace v **prospermatogonie**
  - čepy **později luminizují** - stávají se z nich semenotvorné kanálky
- krátce po **indukci SRY** začínají Sertoliho buňky plnit řadu úkolů
  - **indukují diferenciaci** zárodečných primordiálních buněk ve spermatogonie
  - **produkují AMH** - dezintegrace Müllerova vývodu
  - **diferenciace Leydigových buněk** - produkují androgeny
- **homologní** s geny pro tvorbu (TSPY) non-histonových jaderných proteinů
  - **produkt TSPY genu** - váže se na promotor genu cytochrom-P450-aromatasy, která mění **testosteron na ženský estradiol**
    - **inaktivace** genu pro cytochrom-P450-aromatasy u embrya - zachovává aktivitu vytvářené **testosteronu** a determinuje **mužské pohlaví**
    - **TSPY protein** se váže i na promotor genu Müllerovy inhibiční substance - jeho aktivace u **mužského embrya** - diferenciace testes a regrese ženských gonád

### Syndrom necitlivost k androgenům

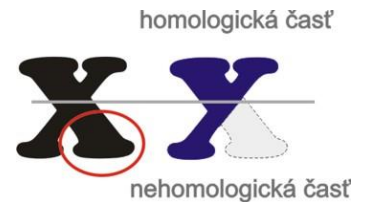
- mutace genu pro **androgenní receptor**
- **jedincům XY** se vyvine **ženský** zevní genitál, puberta a psychosociální vývoj také ženský
- **posttestikulární blokáda** - mají částečně sestouplá varlata produkující testosteron
- **varlata produkují AMH** - nemají dělohu a vejcovody
- chybí pubické a axilární ochlupení (vývoj závislý na androgenech)

## Diferenciace samičího pohlaví

- iniciována v **primordiální gonádě** pokud není exprimován gen SRY
- **diferenciace zárodečných buněk** v prekurzory oocytů – proliferují a prodělávají první meiotické dělení, zastaví se v **diploentním stádiu** až do ovulace (=dyktiotén)

## 2 typy určení pohlaví

- **savčí typ** (typ *Drosophila*)
  - savci včetně **člověka**, někteří obojživelníci, plazi, většina hmyzu a řada **dvoudomých rostlin**
  - **samičí pohlaví**: XX - homogametní (vajíčka pouze s chromozómem X)
  - **samčí pohlaví**: XY - heterogametní (spermie buď s chromozómem X nebo s Y v poměru 1 : 1)
- **ptačí typ** (typ *Abraxas*)
  - ptáci, některé ryby a motýli
  - **samičí pohlaví**: ZW - heterogametní
  - **samčí pohlaví**: ZZ - homogametní
- oplozením vzniká se **stejnou pravděpodobností** zygota XY i XX
- geny na **homologické části** podmiňují znaky neúplně pohlavně vázané
- geny na **heterologické části** podmiňují znaky vázané na pohlaví
- **heterologická část chromozomu Y** nemá párovou alelu – organismus je pro ně **hemizygotní** = jedinec pouze s **jednou alelou sledovaného genu**



## 94. Ontogeneze pohlaví u savců, poruchy

- u člověka je pohlaví určeno **přísně geneticky** – tato skutečnost je průkaznou díky studiu Turnerova a Klinelfelterova syndromu
- **jedinci s Turnerovým syndromem** – 45,X se vyvíjejí jako ženy
  - mají všechny **deriváty Müllerova vývodu** – dělohu, vejcovody
  - nemají ale deriváty **Wolfova vývodu**
  - mají ovaria a psychosociálně se vyvíjejí jako **ženy**
  - nicméně u nich pozorujeme **řadu patologií** – mnoho z nich může vznikat selháním redukčního dělení (meiosy) u vajíček (v průběhu fetálního vývoje), pravděpodobně díky přítomnosti **nepárového chromosomu X**
  - **oocyty** postupně hynou a v pubertě už ovaria neobsahují žádné **folikuly**
  - **ovaria** tudíž neprodukují **hormony**, nevzniká **menstruační cyklus**, puberta je narušena, dochází k předčasné **ateroskleróze a osteoporóze**
  - to znamená, že **chybění chromosomu Y** vede k vývoji ženského pohlaví, porucha pohlavního vývoje v pubertě je **sekundární**, v důsledku **deplece oocytů**
- **jedinci s Klinelfelterovým syndromem** – 47,XXY
  - mají dva chromosomy X, z nichž jeden se **deaktivuje** (stejně jako u normálních žen)
  - jsou ale **mužského pohlaví**, i když mají potíže s plodností a deficitem androgenů
- z **klinického obrazu** těchto syndromů lze říci, že **Y chromosom** determinuje samčí pohlaví – kdykoli je přítomen, zahájí **samčí program**
- pokud **chromosom Y chybí**, zahájí se procesy vedoucí k vytvoření samičího pohlaví
- **počet X chromosomů** neovlivňuje určení pohlaví
- **pohlavní chromosomy** a ontogeneze pohlaví
  - analýzou myšího a lidského **zvratu pohlaví** (samci XX a samice XY) bylo zjištěno, že za zahájení vývoje **samčího pohlaví** je zodpovědný **gen SRY** (Sex Determining Region on Chromosome Y)
  - gen SRY leží v oblasti **krátkého raménka chromosomu Y**, která je specifická pro muže – směrem 3' od **pseudoautosomální oblasti 1 (PAR1)**
  - **struktura lidského chromosomu Y**
    - je **nejmenší** z lidských chromosomů, jen asi polovina chromosomu obsahuje **kódující sekvence**, zbytek je konstitutivní heterochromatin (centromera a q12)

- evoluce byla iniciována **dvěma událostmi** – získáním **genu SRY** a potlačením **rekombinace** s chromosomem X v oblasti obsahující **gen SRY**
- **potlačení rekombinace** vedlo k diverzifikaci sekvencí obou chromosomů, tak se vytvořila oblast **specifická pro muže**, jež později ztratila většinu genů
- párování X a Y v meiose zajišťují dvě **pseudoautosomální oblasti** – PAR1 a PAR2, v obou **telomerických segmentech**, které jsou identické s příslušnými telomerickými segmenty **chromosomu X het.** = heterochromatin
- oblast specifická pro **muže MSY** (male specific region) je pestrá směsí různých **tříd sekvencí**
- kromě centromery to jsou
  - **degenerované sekvence v chromosomu X** – pozůstatek původního X chromosomu, obsahují 16 genů, které musí být exprimovány v obou kopiích i u muže
  - **sekvence transponované z X** – relativně nedávno se translokovaly z chromosomu X, obsahují jen 2 geny
  - **unikátní sekvence Y** – rozsáhlé invertované palindromy v menší míře tandemově opakované sekvence (Yp11.2), kterým se dohromady říká amplikony s cca 60 geny z 9 rodin
  - většina těchto genů je potřeba pro **spermatogenezi** a jejich amplifikace zvyšuje pravděpodobnost **udržení jejich funkce** v oblasti bez crossing-overu
- vzácně se u chromosomu Y může objevit **crossing-over**, nikoli v oblasti PAR1, ale v **přílehlé sekvenci**, která jeví určitou podobnost s chromosomem X
- v tomto případě je **gen SRY translokován na chromosom X**, výsledkem je samec (muž, 46, XX)
- **další děje ontogeneze pohlaví**
  - **protein SRY** je transkripční faktor z rodiny **HMG** (high mobility group) a je exprimován v **podpurných buňkách** nediferenciované gonády a způsobuje jejich diferenciaci v **Sertoliho buňky**
  - ty se organizují do **epiteliálních čepů**, obalují germinální buňky a indukují jejich diferenciaci v **prospermatogonie**
  - tyto **epiteliální čepy** se později **luminizují** a stávají se z nich semenotvorné kanálky
  - **exprese genu SRY**
    - cílovým genem, jehož exprese je **aktivována proteinem SRY** je **SOX9** (SRY-related box-9) – TF také z rodiny **HMG**
    - **SOX9** leží na chromosomu 17
    - mutace tohoto genu způsobuje **kapomelickou dysplasi** – syndrom, kde je karyotyp 46,XY spojen s ženským pohlavím a s dysplasií skeletu
    - **SOX9** je také nezbytný pro vývoj chrupavky
    - duplikace genu způsobuje u jedinců s **karyotypem 46,XX** zvrát v mužské pohlaví
    - všechno do sebe zapadá – **snížení funkce SOX9** vede k vývoji ženského pohlaví, **zvýšení exprese SOX9** podpoří vývoj pohlaví mužského
  - krátce po **iniciaci produktem genu SRY** začínají Sertoliho buňky plnit řadu úkolů
    - **indukují diferenciaci** primordiálních zárodečných buněk ve **spermatogonie** – v procesu spojeném s utvářením **semenných provazců**, které obklopí a uzavřou prekurzory **spermatogonií**
    - jaké povahy je **diferenční signál** pro zárodečné buňky a jaká je jejich samotná rol není jasné, jedním z kandidátů je **prostaglandin D2**
    - zadruhé Sertoliho buňky produkují **AMH** (anti-Müllerický hormon), který způsobuje **dezintegraci Müllerova vývodu** a blokuje tak vývoj jeho derivátů
    - zatřetí **Sertoliho buňky** zodpovídají za diferenciaci **Leydigových buněk**
    - Leydigovy buňky pak produkují **androgeny**, které částečně řídí **sestup varlete** a jsou plně odpovědné za **maskulinizaci zevního genitálu**
    - po této fetální periodě produkce androgenů, hlavně **testosteronu**, klesá a hladina se opět zvyšuje v **pubertě**, jejíž průběh je silně závislý na androgenech
- **mutace v genu pro androgenní receptor** (AR, lokalizován na X chromosomu)

- způsobuje syndrom **necitlivosti k androgenům** (AIS)
- pokud je funkce receptoru **úplně nulová** (kompletní AIS – CAIS), jde také o **testikulární feminisaci**
- jedincům XY se vyvine **ženský genitál**, puberta a psychosociální vývoj je také **ženský**
- jedná se ale o **posttestikulární blokádu**, protože tyto ženy mají varlata, která produkují testosteron a částečně **sestupují** (mohou být často nalezena v inguinálním kanálu nebo stydkých pyscích)
- protože varlata **produkuje AMH**, tyto ženy nemají dělohu, vejcovody a tak mohou být zachyceny pod **diagnózou primární amenorhea**
- zvláštní znak je chybějící **pubické a axilární ochlupení**, jehož vývoj také závisí na **androgenech**
- **diferenciace samičího pohlaví**
  - v primordiální gonádě iniciována pokud není **exprimován gen SRY** jako implicitní **vývojová dráha**
  - zárodečné buňky se diferencují v **prekurzory oocytů**, prolifерují, rekrutují folikulární buňky a prodělávají první **redukční dělení**
  - to se ale zastaví v **diploenním stádiu** až do ovulace
  - toto velmi dlouhé období se nazývá **diktyotén**
  - existují nové důkazy, že se oocyty mohou vyvíjet ze **zárodečných kmenových buněk**, diferencovaných de novo z **célového epitelu ovarií**
  - bez tohoto kontroverzního mechanismu **regenerace oocytů** procházejí všechny oocyty meiotickou profází ve **fetálních ovariích**
  - když je potom nějaký folikul v **menstruačním cyklu aktivován**, třeba po 45. letech jeho existence, oocyt nejprve **dokončí meiosis I.** (těsně před ovulací) a po ovulaci pak **II. zrací dělení** pokračuje až po **metafázi II.**
  - zde se dělení opět zastaví a pokračuje až **po oplození vajíčka**

## 92. Apoptóza a klinické důsledky poruch její regulace

- **schopnost dělit se** je u lidských buněk geneticky řízena a u normálních/zdravých buněk je omezena (**replikativní stárnutí**)
- po určitém počtu cyklů se buňky **dělit přestávají**, zestárnou
- stárnutí celého organismu souvisí se **stárnutím buněk** v jednotlivých tkáních
- **vyvážený vývoj** mnohobuněčného organismu vyžaduje nejen genetický program regulace buněčného cyklu, ale i **buněčné smrti**
- **současné poznatky** ukazují, že apoptóza může být **vyvolána celou škálou různých signálů** vycházejících jak z **vnitřního prostředí**, tak vlivem **vnějších faktorů**
  - **poškození DNA** zářením či chemickými látkami
  - **virová infekce**
  - reakce **imunitního systému**
  - **snížení hladiny** růstových faktorů nebo hormonů
  - **odpojení buněk** od substrátu apod.
- buňky mohou zanikat **2 způsoby** – apoptózou nebo nekrózou
  - tyto **dva procesy zániku** závisí na signálních molekulách, které se vážou k receptorům buněčné membrány a na další **kooperaci kaskády signálních molekul** v buňce
  - během přenosu signálů může dojít k **přepínání** mezi signálními drahami pro nekrózu a pro apoptózu
  - tak může být **původní indukční signál pro apoptózu** změněn a konečný výsledek je zánik buňky formou **nekrózy** a naopak
  - např. v buněčné **linii fibrosarkomu** bylo prokázáno, že k zániku buněk nekrózou dochází po indukci **tumor nekrotizujícím faktorem** (TNF) a zánik apoptózou je indukován navázáním **Fas ligandu** k receptoru
- **nekróza**



- **nekrotický proces** (oproti apoptóze) není závislý na specifických proteinech, které se vážou k **membráně mitochondrií**, na signalizaci se nepodílí **cytochrom c ani kaspasy**
- nekrózu provádí **vyvločkování chromatinu**, desintegrace organel a bobtnání buňky následované destrukcí buněčné membrány (**lýzou**)
- bývá provázána **zánětlivým procesem**
- **apoptóza**
  - zánik buňky apoptózou naopak vyžaduje mimo jiné **aktivaci kaspas**
  - aktivovaná **kaspasa 8** např. blokuje možný přechod mezi signální drahou vedoucí k **apoptóze a k nekróze**
  - pokud však na **apoptotické signální dráze** dojde k inhibici aktivity kaspas, může být tato **signální dráha** adaptačními molekulami přeměřována na **nekrotickou apoptózu** = geneticky programovaná buněčná smrt
  - je **fyziologický proces**, který udržuje rovnováhu mezi buněčnou proliferací a smrtí buněk
  - **geneticky programovanou buněčnou smrtí** je regulováno množství buněk tkání během ontogeneze i postnatálního života
  - uplatňuje se při **morfogenezi** a podílí se na přirozené obměně buněk ve tkáních
  - **apoptózou** jsou odstraňovány buňky nepotřebné, změněné nebo poškozené
  - u dospělého organismu má **nezastupitelnou úlohu** ve tkáních, které prodělávají **cyklické změny** např. vlivem kolísání hladiny hormonů (endometrium, prsní žlázy, prostata) i ve tkáních, kde dochází k **pravidelní obměně buněk** (střevní epitel, lymfocyty)
  - je součástí **procesu stárnutí a smrti** organismu
  - její základní funkcí je udržování **homeostázy** ve tkáních
- apoptóza může být **iniciována genetickým programem** buňky, **mezbuněčnou signalizací** (proteiny, hormony, cytokiny), ale mohou ji vyvolat **faktory prostředí**, které buňku poškozuji (záření, oxidativní stres, hypoxie, infekce)
- **poruchy apoptózy** se projevují poruchami vývoje organismu, vznikem vrozených vad a vyvolávají celou řadu onemocnění jako **neurodegenerativní syndromy** nebo vznik nádorů
- **průběh a genetická determinace apoptózy u savců**
  - průběh lze rozdělit na **3 fáze**
    - **signál**, kterým je buňka nenávratně **odsouzena k zániku**
    - nástup **kaskády nitrobuněčných dějů**, vedoucích k zániku buňky
    - **odstranění fragmentů** buňky fagoctyt nebo okolními buňkami
  - **fenotypová manifestace** apoptózy je téměř shodná v buňkách všech tkání
  - buňky podstupující apoptózu mění svou **morfolonii**
  - **jaderný chromatin** kondenzuje a shlukuje se v periferii jádra
  - chromosomy se uvolňují ze svého **ukotvení** k jadernému obalu
  - dochází k **fragmentaci DNA** specifickými endonukleasami mezi nukleosomy
  - **intranukleosomální štěpení** jaderné DNA je jedním z charakteristických znaků apoptózy
  - je vyvolané **aktivací endonukleasy**, jejíž funkce je závislá na přítomnosti iontů kalcia a magnesia
  - nejprve **vznikají fragmenty DNA** velké 30-50 kb a následně fragmenty s charakteristickou délkou 180 bp a násobky této délky, které mají typické uspořádání v **elektroforetickém gelu – apoptotický žebříček**
  - **proteolytické enzymy** štěpí vlákna, jež zajišťují integritu jádra a jaderného obalu
  - pro tyto děje je nezbytné dostatečné **množství energie** (ATP), kterou zajistí **mitochondrie**
  - v dalším průběhu dochází ke **změnám struktury mitochondrií** a narušení cytoskeletu
  - v cytoplazmě vznikají vakuoly, **rozšiřuje se ER**, jeho membrány se spojí s cytoplazmatickou membránou a tím vznikají **hluboké kapsy**, které zasahují z povrchu do buňky
  - jsou porušena **mezbuněčná spojení**, buňky se oddělují od sousedních a srašťují se
  - rozpadající se buňky jsou formovány do **apoptotických tělísek**, která jsou odstraňována **fagocytosou bez poškození okolí** - při **programované buněčné smrti** nedochází k **zánětlivé reakci**
- **vysoká uniformita** evoluční konzervace průběhu apoptózy u všech mnohobuněčných organismů svědčí pro vznik procesu v době vzniku strukturně **složitějších organismů**

- během studia apoptózy bylo objeveno, že apoptóza může být vyvolána několika **odlišnými signálními drahami**
- průběh byl definován na základě **studia různých lidských linií** buněk a histologických preparátů
- **kaskáda nitrobuněčných dějů**
  - **rodina kaspas** (cysteinové proteasy, ICE – interleukin converting enzyme) jsou **intercelulární enzymy**, které štěpí proteiny ve specifických místech – za kyselinou asparagovou
  - při **indukci apoptózy** dochází k jejich aktivaci z prokaspas
  - je známo **14 kaspas**, které se kaskádou reakcí podílejí na průběhu apoptózy
  - kaspasy jsou syntetizovány jako **inaktivní prekurzory** (proenzymy), které jsou aktivovány štěpením **jinými proteasami** nebo **autokatalyticky**
  - **aktivace kaspas** může být zahájena několika odlišnými způsoby
  - **tři nejtypičtější jsou následující**
  - **vlivy na ER**
    - nepříznivé vlivy na **endoplazmatické retikulum** zahájí apoptózu prostřednictvím **kaspasy-12**
  - **vazba ligandu s receptorem**
    - **Fas receptor/Fas ligand** aktivuje kaspasu-8
    - **receptor Fas** je transmembránový receptor který patří do rodiny receptorů TNF (synonyma: TNFR, APO-1, CD95 receptor)
    - **Fas ligand** (FsdL, CD95) je transmembránový protein, který může být z membrány enzymaticky odštěpen nebo po **alternativním sestřihu mRNA** je tvořen jako **sekreční protein**
    - převážně ho produkují **T-lymfocyty, NK buňky a makrofágy**
    - **apoptóza** indukovaná komplexem Fas/FasL se podílí na selekci lymfocytů v **periferní tkáni**
  - **mitochondrie**
    - proces zahájení apoptózy vychází od **mitochondrií**
    - vede ke **štěpení prokaspasy 9** mitochondriálními proteasami
  - kaspasy 8, 9 a 12 následně **proteolyticky aktivují** kaspasy 3, 6 a 7, které podnítlí **internukleosomální fragmentaci DNA endonukleasou CAD** (CAD = caspase-activated DNase)
- vedle **nezastupitelné úlohy kaspas** mají na průběh apoptózy vliv skupiny genů, které jsou dalšími **negativními nebo pozitivními regulátory** apoptózy
- **tumor supresorové geny TP53 a Rb1**
  - **nepříznivé vlivy** jako je záření nebo chemické látky poškozují DNA a pokud reparační mechanismy buňky nejsou schopny **poškozenou DNA opravit**, je zahájena likvidace buněk **apoptózou**
  - **TP53**
    - zahájení **programované buněčné smrti** vychází zejména z podnětů kontrolního bodu mezi **G1 a S fází interfáze**, kde má klíčové postavení gen TP53
    - jeho protein, **p53**, je aktivován a akumuluje se
    - **aktivovaný protein p53** reguluje mimo jiné expresi genů rodiny Bcl-2
      - **snižuje expresi** genu Bcl-2
      - **zvyšuje expresi** genu Bax
  - **Rb1**
    - Rb1 gen kóduje **nukleární protein**, který podporuje v součinnosti s proteinem p53 **pozastavení cyklu** mezi G1 a S fází
    - **fosforylace proteinu Rb** je nezbytná pro spuštění S fáze (pro aktivaci replikačních faktorů)
    - **inaktivovaný Rb protein** se podílí na průběhu apoptózy
  - rodina genů Bcl-2 má **klíčovou roli** v průběhu apoptózy
  - **jednotlivé proteiny** kódované příbuznými geny této rodiny odpovídají na různé podněty buď **akcelerací nebo inhibicí apoptózy**
  - **regulační aktivita** členů Bcl-2 rodiny se odehrává na **vnější membráně mitochondrií**

- dělí se na 2 opoziční skupiny
  - **proapoptotičtí členové** indukují uvolnění cytochromu c z mitochondrií
  - **antiapoptotičtí členové** brání uvolnění
- **cytochrom c** je cytoplazmatická signální molekula, která aktivuje kaspasy
- **proapoptotické proteiny** Bcl-2 rodiny, jako je Bax, Bak, Bcl-Xs, Bas, Bik a další jsou v buňkách lokalizovány v cytoplasmě
- po **proapoptotickém signálu** mění konformaci a přemístí se k membráně mitochondrií
- zde vytvoří **dimery**, které působí na potenciál vnitřní mitochondriální membrány
- z mitochondrií je **uvolněn cytochrom c** a apoptózu vyvolávající **faktor AIF** (apoptosis-inducing-factor), které pak **aktivují kaspasy**
- molekulární **studie rodiny** Bcl-2 ukázaly, že jak v proapoptotických genech, tak v antiapoptotických genech jsou shodné **domény** (BH1, BH2), které umožňují jejich vzájemnou vazbu a tvorbu **homo a heterodimerů**
  - **homodimery genu Bcl-2** brání spuštění apoptózy, **homodimery genu Bax** ji spouštějí
  - **antiapoptotičtí členové Bcl-2 rodiny** (Bcl-2, Bcl-XL a další) tvoří s produktem genu Bax **heterodimery**, které brání vytváření iontových kanálků, heterodimery genů Bcl-2/Bax ruší tedy **obě funkce**
  - **zastoupení dimerů** je výsledkem poměru produkce Bcl-2 a Bax proteinu
  - jejich **vzájemný poměr** tak plynule ovlivňuje vnímavost buněk k **proapoptotickým signálům**
- proteiny Bcl-2 a Bcl-XL působí i přímo na **molekuly**, které vytvářejí **apoptotickou kaskádu**
  - obě bílkoviny se mohou vázat na **cytochrom c** a blokovat jeho aktivitu
  - **protein Bcl-2** ovlivňuje několik dalších molekul, které se podílejí na průběhu **buněčné smrti**
  - váže se například s **komplexy bílkovin**, které obsahují tumor supresorový protein p53, brání jeho **přemísťování v jádře** a tím blokuje jeho funkci
  - na **membráně mitochondrií** se protein Bcl-2 váže se serin-threoninovou proteinkinásou Raf-1 – tato **proteinkinasa** není schopna v komplexu s proteinem **Bcl-2 fosforylovat cílové proteiny**, mezi něž patří Bad
  - **protein Bad** tím ztrácí proapoptotickou aktivitu
- **onkogen Bcl-2** byl detekován a klonován v lymfomu s translokací der(14;18) (B-cell lymphoma) a poznatky o jeho funkci byly získány na **transgenních myších**
  - **embrya myši** s knock-outovaným genem Bcl-2 se vyvíjely normálně
  - **po narození** se ale u nich projevuje apoptóza buněk ledvin (hypoplasie a dysplasia ledvin), porucha imunity (úbytek lymfocytů) a další změny
- **funkce dalších členů rodin** apoptotických genů Bcl-2 byla studována na myších
  - **myši embrya** bez genu Bcl-XL hynou v důsledku masivní apoptózy buněk CNS a krevních buněk
  - **myši samci** s knock-outovaným genem Bax jsou sterilní - apoptóza selektivně postihuje vyvíjející se spermie
- uvedené příklady ukazují, že **účinek různých genů téže rodiny** je tkáňově **specifický**
- **fagocytosa apoptotických tělísek**
  - buňky postižené **programovaným zánikem** tvoří apoptotická tělíška, která jsou odstraňována **fagocytosou**
  - fagocyt **rozezná apoptotickou buňku** pomocí změněných ložisek její membrány
  - **obklopí apoptotickou buňku** a přilne k ní za pomoci svých adhezivních molekul, receptorů a dalších molekul
  - na membráně má **fagocyt aktivované iontové kanály**, jako zdroj energie užívá ATP
- **zánik buněk apoptózou** je fyziologický proces, který je řízen **genetickým programem**
- apoptóza se podílí na **regulaci buněčné proliferace**, diferenciaci a odstraňování zestárlých buněk nebo při odstraňování buněk s neopravitelným poškozením genetického materiálu

## 96. Genová kontrola a význam apoptózy v ontogenezi

### Vývoj embrya

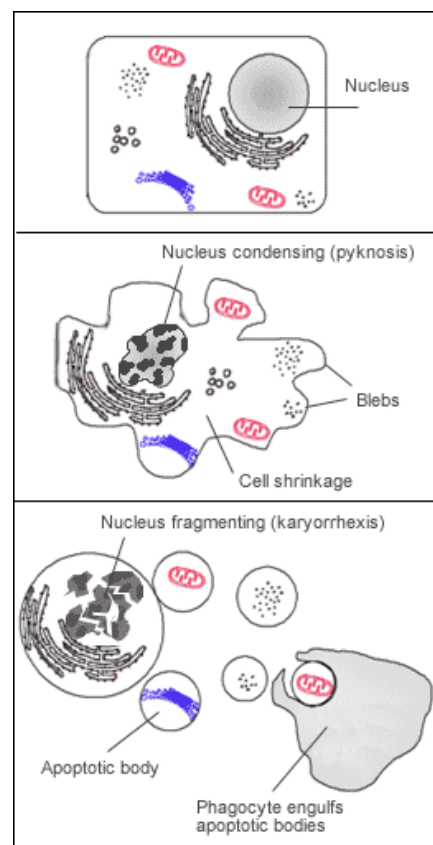
- růst, proliferace a migrace buněk
- diferenciace buněk
- apoptóza

### Buněčná smrt

- nejčastěji způsobem **programované apoptosy**
- důležitá role v **různých stádiích života**
  - v průběhu **vývoje končetiny** odumírá programovaně **interdigitální mesenchym**
- může být **popravou nebo sebevraždou**
  - signál pochází **zevnitř buňky**
  - např. je-li porušena **integrita genomu** nebo mitochondrie

### Apoptosa

- fyziologický proces
- vede k **programovanému zániku** buněk bez rozvoje zánětlivé reakce
- mechanismus sloužící k **eliminaci** nepotřebných či poškozených buněk
  - v případě, že buňka byla nějakým způsobem **poškozena**, změněna a nebo již není potřebná
- způsobena aktivací **cysteinových proteáz** a následně jaderných **endonukleáz**
  - **poškození** jaderné DNA
  - zástavě všech **biosyntetických pochodů** v buňce
- nedochází (na rozdíl od nekrózy) k **nafouknutí**, prasknutí a vylití obsahu buňky – **zánět**
- naopak **kondenzace buňky**, fragmentace DNA a rozpad na malé části - mohou být snadno **fagocytovány**
  - **pyknotizace jádra** – sraštění a ztmavnutí jádra.
  - **sraštění celé buňky** se zachováním celistvosti organel
  - cytoplazma se stává **tmavší** a její části se **odškrcují**
- projevuje se pouze **mikroskopicky** (nikdy není tak masivní, aby docházelo k makroskopickým změnám na orgánech)
  - odpadávání **zaniklých buněk** = apoptotických tělísek ze svazku s perzistujícími buňkami
  - ve **fagocytujících buňkách** mohou po určitou dobu perzistovat jako **lysozomální apoptotická tělíška**
    - při **hepatitidách** jsou v hepatocytech tzv. **Councilmanova tělíška**
    - v **centrofolikulárních makrofázích** lymfatických folikulů jsou **Flemingova tělíška** z apoptózy funkčně defektních **B-lymfocytů**
- **apoptóza spontánní** (fyziologická)
  - **redukce** buněčných populací v embryogenezi
  - **zánik buněk** postnatálně se obměňujících (krevní elementy, enterocyty, keratinocyty...)
  - **likvidace buněk** v hyperplastické populaci = návrat k normě **po hormonální stimulaci** nebo **redukce buněk** při snížené hormonální stimulaci (např. zmenšení mléčné žlázy po ukončení laktace)
- **apoptóza indukovaná patologickým podnětem**
  - likvidace buněk **infikovaných virem** T<sub>C</sub> a NK lymfocyty
  - **numerická atrofie** buněk po ucpání vývodů žláz



## Apoptosa v ontogenezi

- napomáhá **formování orgánů**
  - **končetiny** - zánik buněk na autopodiu, který vede k vývoji jednotlivých prstů (porucha: syndaktylie - AD)
  - **Müllerovy nebo Wolfovy vývody** podle toho, které pohlaví se vyvíjí
  - u mužů zanikají vlivem **Müllerovy inhibiční substance**, kterou produkují Sertoliho buňky, Müllerovy vývody, u žen Wolfovy
  - **ledviny** - morfogeneze tubulů a glomerulů - mírně zde probíhá apoptóza **po celý život** (patologicky až hypotrofie)
  - **PNS** - periferní nervy jsou založeny v nadbytku - přežijí jen ty, co se **spojí se svaly**

## 95. Genetické příčiny stárnutí a smrti

---

- **proces stárnutí**
  - sledováno gerontologií
  - znalost změn, které provázejí stáří, je důležitá pro adekvátní **léčebně preventivní péči** o seniory
  - individuální
- **biologické studie**
  - zaměřeny na **fenotypové projevy** stárnutí buněk
  - teorie **volných radikálů**
    - **reaktivní metabolity** reagují s makromolekulami membrán, struktur buněk i nukleových kyselin
    - postupně negativně ovlivňují jejich **funkci**
- **genetické příčiny**
  - hledány v **akumulaci** somatických mutací
  - funkční důsledky **genových i chromosomálních mutací** závisí na jejich lokalizaci, četnosti a typu postižení buněk
    - i **neletální mutace** porušují syntézu pro metabolismus buňky důležitých proteinů a obnovu
  - mutace mohou snižovat **adaptační schopnosti buňky** a posléze způsobit jejich zánik
- **věk je naprogramován délkou telomer**
  - velkým počtem **krátkých repetit**, které jsou druhově **specifické**
  - u člověka je **repetitivní sekvence telomer** TTAGGG s délkou telomer 5 – 15 kb
  - zakončena jednovláknovým úsekem
  - **baze telomer** jsou methylované – což umožňuje vytvoření specifické vlásenky, ve které se párují **methylované guanosiny**
  - struktura **zabraňuje štěpení DNA** deoxyribonukleasami, **fúzi molekul DNA** v genomu a umožňuje **replikaci DNA** bez ztráty koncových sekvencí
  - **prodlužování** schopen komplexní enzym **telomerasa** = RNA-dependentní-DNA-polymerasa
    - **aktivní pouze v buňkách** zárodečné linie, kmenových buňkách kostní dřeně, stimulovaných T a B lymfocytech a v buňkách nádorově transformovaných
  - v **diferencovaných somatických buňkách** není telomerasa exprimována
  - **délka telomery** se zkracuje při každém **buněčném dělení** asi o **100 bází**
    - **zkrácení telomery** pod 2,5kb je pro buňku kritické - přestává se dělit a může v ní být **navozena apoptóza**
    - buňky s **delšími telomerami** jsou schopné více dělení, než buňky s kratšími telomerami
- **projevy stárnutí**
  - úbytek funkce **jednotlivých orgánových systémů**
    - **klesá** bazální metabolismus, plicní ventilace a průtok krve jednotlivými orgány
    - **snížená výkonnost** a schopnost organismu zajistit **homeostázu** vnitřního prostředí
  - pro **délku dožití** má velký význam i výkonnost **imunitního systému**
    - chrání organismus nejen před infekcemi, ale i před **neoplazmiemi**

- **ovlivnitelné faktory**, které významně spoluurčují délku života je kvalita životního prostředí a životní styl
- **stárnutí a výskyt nádorů**
  - **nádory** možno považovat za **geneticky podmíněné** onemocněné starých buněk – došlo ke kumulaci mutací během **procesu stárnutí**
  - pravděpodobnost vzniku mutací s **věkem stoupá** a schopnost chyby **opravit klesá** – zvýšený počet nádorových onemocnění u **starých lidí**
  - **nestabilita genomu**
  - **zkrácení telomer** může vyvolat změny struktury nebo počtu chromozomů – buněčná smrt nebo **maligní transformace**
  - zvýšené poškození DNA **volnými radikály** – zkřížené spojení DNA a proteinu, poškození esterové vazby, specifické modifikace purinových nebo pyrimidinových bází
  - **enzym superoxidodismutasa** radikály neutralizuje pomocí H<sub>2</sub>O – s věkem **klesá její aktivita**

## 98. Teratogeneze, teratogeny

- část novorozenců je **postižena VVV** (vrozenými vývojovými vadami)
- **defekty orgánů**, ke kterým došlo během prenatálního vývoje, jsou přítomny při **narození jedince** (ať už jsou v té době diagnostikovatelné či nikoliv)
- VV je definována jako **odchylka od struktury** či **funkce** přesahující meze normální **variability druhu**
- tato odchylka svého nositele **znevýhodňuje** vzhledem k **ostatním jedincům**
- jejich frekvence jsou závislé na **genofondu populace**, expoziční zátěži prostředí, nastavení spektra jejich **sledování**
- v ČR je **frekvence výskytu VV** asi 5% při narození
- další **vývojové vady** jsou diagnostikovány až v průběhu života
- **intenzita výskytu VV** je jeden ze základních kvalitativních populačních a medicínských ukazatelů
- VV mohou mít celou **řadu příčin genetických i negenetických**, různé mechanismy vzniku, různé fenotypové projevy a v závislosti na tom i **různé konečné efekty**
- VV se může projevit **při narození** jako morfologické postižení různé intenzity nebo později poruchou růstu, poruchami fertility, sterilitou, očními poruchami, snížením IQ, poruchami učení, hyperaktivitou...
- do VV patří i **metabolické poruchy**, tzv. „vrozené omyly metabolismu“
- **typy a popis VV**
  - malformace, disrupce, deformace, dysplazie, sekvence, syndromy, asociace
  - **malformace**
    - poruchy **vývoje orgánů**, které jsou důsledkem změny **genetické informace**
    - **monogenně**, multifaktoriálně dědičné
    - vrozené vady postihující jen **jednotlivé orgány**
    - např. srdeční vady, rozštěpy páteře, polydaktylie, rozštěpy
  - **disrupce**
    - **poruchy orgánů** vyvolané **vnějšími vlivy**
    - **malformace končetin** vyvolané amniotickými pruhy (ovinutí, zaškrcení končetiny jako následek amniocentézy)
  - **deformace**
    - defekty vyvolané působením **neobvyklých sil** na normálně založený orgán
    - pes equinovarus při nedostatku **plodové vody**
    - způsoben vynuceným **chybným postavením nohy**
  - **dysplazie**
    - způsobeny **abnormální organizací** bb ve tkáních
    - příčinou je **porucha** indukce, diferenciací, apoptozy
    - osteogenesis imperfecta, dysplazie ledvin

- **sekvence**
  - **mnohočetné vady**, vznikají jako kaskáda následných dějů
  - při agenezi ledvin nedostatek plodové vody vede k deformaci obličeje tlakem stěn dělohy a k hypoplazii plic (bez dostatku plodové vody se nemohou správně vyvíjet)
- **syndromy**
  - **mnohačetné vady**, známe společnou příčinu
  - popsáno několik **1 000 syndromů** různé genetické etiologie
  - **monogenně** dědičné, chromozomální, vyvolané teratogeny
  - pro diagnostiku nezbytné **databáze syndromů**
- **asociace**
  - **kombinace** více vad, nejsou sekvencí ani syndromem
  - **VATER asociace** (vertebral-annal-tracheal-esophageal-reanal abnormalities)
  - vyvolána **působením teratogenů** na vývoj více orgánů současně
- **teratogen**
  - 10% VV je způsobeno **expozicí rodičů**, především **matky** nebo plodu exogenním vlivům
  - **teratogeny** = označení pro tyto exogenní vlivy
  - jejich účinek je značen jako **teratogeneza**
  - **vztah** mezi příčinami, mechanismy účinků a projevy je komplexní
  - **teratogen** = jakékoliv agens, které je odpovědné za vývojovou vadu nebo za zvýšení její **incidence v populaci**
  - důkaz faktu, že **určitý agens** má na lidský plod teratogenní účinek lze několika způsoby - prospektivní přístup, retrospektivní přístup
    - **prospektivní**: gravidní ženy jsou vystaveny tomuto agens a zkoumá se jestli se zvýší výskyt vývojových vad nad rámec incidence v dané populaci
    - **retrospektivní**: v anamnéze dětí s konkrétní vývojovou vadou vyskytuje expozice danému faktoru prostředí významně častěji než v anamnéze dětí bez této vady
  - vznik **dlouhodobých mezinárodních databází**, registry VV
    - European Registration of Congenital Anomalies (EUROCAT)
    - databáze registrující podávání léků v prvním trimestru gravidity a výskyt VV (MADRE - MALFORMATION AND DRUG EXPOSURE, TERIS, REPROTOX)
- **teratologie**
  - **interdisciplinární obor**, zabývá se studiem VV vzniklých působením vnějších činitelů
  - zkoumá **morfologické odchylky**, ale i **nestrukturální malformace**, tj. poškození funkce organismu a poruchy chování
- **typy teratogenů**
  - **biologické**
    - **původci infekčních onemocnění** - primoinfekce matky a plodu na začátku těhotenství
    - **viry** - rubeola, virus zarděnek (malformace CNS, srdce), herpes virus, HIV, cytomegalovirus
    - **bakterie** - syfilis
    - **prvoci** - toxoplasmosa
    - **metabolické choroby matky** - diabetes melitus, PKU, lupus
    - ženy trpící **diabetem** podstupují **prekoncepční péči** = co možná nejvyšší normalizace metabolických, hormonálních veličin v těle matky
    - **podáním glukózy** předcházíme vzniku srdečních malformací plodu.
    - **hypertriglyceridemie** indukuje apoptózu embryonálních buněk zvýšením **exprese Bax genu**, který má klíčovou úlohu pro spuštění apoptózy
  - **chemické**
    - řada látek užívaných v **průmyslu, zemědělství** = organická rozpouštědla, polychlorované bifenyly, těžké kovy
    - **léčiva** = cytostatika, antibiotika (tetracykliny), antiepileptika (fenytoin), warfarin, lithium, thalidomid, ACE-inhibitory, látky steroidní povahy, alkohol, drogy
  - **fyzikální**

- ionizující záření (RTG, gama zář.), vysoká teplota, mechanické teratogeny (amputace končetiny amniotickými pruhy)
- **vliv teratogenů je komplexní**, neplatí zjednodušení mutagen = teratogen
- VV vzniklé působením teratogenu **nejsou dědičné**
- změny vyvolané **DNA mutací** dědičné jsou (pro potomky nebo dceřinné buňky)
- teratogenní účinek je **multifaktoriální**
- **faktor dávky**
  - **dávka** teratogenního agens je často rozhodující
  - **nízké dávky** teratogenu nemusí vrozenou vadu způsobit vůbec, mohou způsobit **mírnější postižení**, nebo dokonce jiný **typ vady**
- **faktor času**
  - **citlivost k účinku** jednotlivých teratogenů není v průběhu celého těhotenství stejná
  - nejhorší prognózu má účinek teratogenů v **prvním trimestru** gravidity
  - **kritická perioda** = doba, po kterou je plod na určitý teratogen nejcitlivější, resp. kdy se vyvíjí orgán, který je **citlivý na účinek daného teratogenu**
  - „vše, nebo nic“ = reakce velice **časných stádií embrya**, která buď dokáže účinek teratogenu zreparovat, nebo dojde k **potratu**
- **faktor genetické výbavy druhu**
  - **citlivost** k působení jednotlivých **teratogenů** je ovlivněna i genetickou výbavou **konkrétního jedince**
  - významná **mezidruhová variabilita**
  - důležité v **testování teratogenu** na jiném živočišném druhu než je člověk
  - např. účinek **thalidomidu** u potkana je 100x menší než u člověka

## 99. Mutagenní a teratogenní faktory životního prostředí

### Mutageny

- mutageny = faktory schopné vyvolat mutace
- **fyzikální**
  - **elektromagnetické záření** o kratší vlnové délce a větší energii než má viditelné záření
  - **zvýšená teplota** organismu
  - **ionizující záření** (X-záření, gama záření, kosmické záření)
  - **ionizující záření**
    - má vysokou **energii** a prochází tkáněmi - při průchodu tkáněmi dochází ke **kolizím s atomy** a uvolňování jejich **elektronů**
    - **podél stopy paprsku** vznikají **volné radikály** a ionty ( $H^+$ ,  $OH^-$ ), které mohou reagovat s dalšími molekulami buněčné struktury, včetně DNA
    - záření mohou být zasaženy i **atomy DNA** - ionizující záření vyvolá zejména **oxidaci bazí** a porušuje vazbu pentosa-fosfát v řetězci DNA
    - **mutagenní efekt ozáření** závisí na množství vzniklých iontů
    - **absorbovaná dávka záření** - v jednotkách **Gray** [ $Gy = J/kg$ ]
    - **mutagenní efekt závisí** na dávce, době expozice, fázi buněčného cyklu a na kvalitě **reparačních mechanismů**
    - vyvolá především **chromosomální zlomy** a následně chromosomální přestavby, eventuelně **genové mutace**
    - pro záření neexistuje **prahová dávka**, a i jednotlivá kvanta mohou vyvolat **mutaci**
    - velikost **dávky záření**, která zdvojnásobuje četnost mutací u člověka, je důležitá v genetice pro **predikci rizika** – především v etiologii **neoplazií**
  - **ultrafialové (UV) záření**
    - má podstatně **menší energii** než záření ionizující, ale i UV záření je schopné zvýšit **energii elektronu** zasaženého atomu (excitace)



- **UV záření** je absorbováno mnoha organickými molekulami, zejména **puriny a pyrimidiny**
- UV záření je silným **mutagenem** pro jednobuněčné organismy
- u mnohobuněčných poškozuje jen jejich **povrchové buňky** - u člověka může vyvolat **neoplazie kůže** (karcinomy, melanomy)
- **riziko UV záření** se nyní zvyšuje se snižováním obsahu ozónu v atmosféře
- UV záření způsobuje **mutace** především vytvářením **hydrátů purinů a dimerů pyrimidinů**
- **mutace thyminu** způsobují mutace dvěma způsoby
  - ruší strukturu **dvoušroubovice DNA** a znemožňuje postup DNA polymerasy po **templátu** a tím přerušuje **replikaci DNA**
  - při jejich reparaci může dojít k **chybnému zařazení bází**
- **opakované přerušení** replikace dimery thyminu bez opravy vzniklé mezery v nově syntetizovaných řetězcích způsobí **zlom chromosomu**
- další projevy jsou způsobeny **substitucemi a delecemi** bází
- **chemomutageny**
  - **chemické látky** s mutagenním účinkem - potravinářská barviva akridinové povahy, produkty kouření (cyklické uhlovodíky), složky spalin a výfukových plynů, složky umělých hmot (PCB-polychlorované bifenyly)
  - podle mechanismu **působení chemomutagenů** je dělíme
    - látky **vyvolávající mutace** jen v **průběhu replikace**: analogy bází a akridinová barviva
    - látky **mutagenní** při působení i na **nereplikující se DNA**: látky způsobující alkylation, deaminaci a hydroxylaci bází
  - **analogy bází**
    - látky svou strukturou **příbuznou bazím nukleotidů**
    - **inkorporovány** do DNA v průběhu replikace
    - odchylky v jejich struktuře pak způsobují **chybné párování** bází a v jeho důsledku **mutace**
    - mají význam především v **experimentálním studiu** procesů mutagenese
    - **nejuzívanější analogy bází**: 2-aminouracil a 5-bromouracil
    - **5-BU** = analog thyminu - atom bromu nahrazuje methyl na C5 pyrimidinu a zvyšuje pravděpodobnost **tautomerního posunu**
    - v **enol formě** se 5-BU páruje s guaninem - při inkorporaci enol 5-BU do nového řetězce dojde při následné replikaci k **párování keto formy** 5-BU s adeninem a tím k transici G:C - A:T
  - **akridinová barviva**
    - proflavin, akridinová modř
    - indukují **posun čtecího rámce**
    - molekuly bází se **vmezerí mezi páry bází** v průběhu replikace a mění konformaci dvoušroubovice DNA
    - **při replikaci** pak dochází k delecí nebo inzercí jedné nebo více bází se všemi **fenotypovými důsledky**
  - **alkylační látky**
    - četné chemické látky, které mohou být **donorem alkylových skupin**
    - prvním **popsaným mutagenem** byl yperit, resp. jeho dusíkatý derivát
    - mezi nejúčinnější mutageny z této skupiny patří **nitrosoguanidin**
    - působením alkylačních činidel vyvolává **změnu párování** bází navazováním methyl nebo ethyl skupiny s thyminem
    - alkylační látky mohou vyvolat **všechny známé typy mutací** vč. chromosomálních **zlomů** a chromosomálních **prestaveb**
  - **deaminační látky**
    - vyvolávají **oxidativní deaminaci** aminoskupiny adeninu, guaninu a cytosinu
    - klasickými zástupci jsou **kyselina dusitá a dusitan**
    - **aminoskupina bází** je jejich působením změněna keto skupinou

- deaminace mění schopnost báze vytvářet **vodíkové můstky**
- **hypoxanthin** se páruje s cytosinem, uracil se páruje s adeninem
- deaminace bází způsobuje **transice** v obou směrech (C-G na A-T i A-T na C-G)
- **oxidy dusíku** vznikají při spalování fosilních paliv
- hlavním zdrojem emisí jsou tepelné **elektrárny** a automobilová **doprava**
- **dusitany** jsou užívány ke konzervaci **uzenin** - ohrožují mutacemi zejména buňky **trávicího traktu**
- **hydroxylační činidla**
  - mohou změnit **cytosin na hydroxylaminocytosin**, který se páruje s adeninem
  - vyvolávají tak **jednosměrnou transici** C-G na A-T
- **biologické**
  - **viry**
    - v průběhu **lyzogenního cyklu** mohou být viry inkorporovány do DNA hostitele
    - **inzerce viru** do sekvence DNA genu ovlivňuje jeho funkci - gen je zpravidla po jeho inkorporaci **nefunkční**
    - nádory, chromosomální zlomy
  - **transposony**
    - elementy schopné se **přemísťovat** z jednoho místa genomu na jiné
    - v genomu člověka jsou dvě skupiny **transponibilních elementů** - **LINE** (long interspred nuclear element) a **SINE** (short)
    - jejich **přesuny v genomu** mohou mít mutagenní účinek

## Teratogeny

- faktory, které vyvolávají **vznik vrozených vad**
- **výsledný efekt** závisí na typu teratogenu, intenzitě a době jeho působení, na genotypu plodu i matky
- **táž příčina** v závislosti na **různých okolnostech** může působit různým mechanismem a mít **různé následky**
- **fyzikální teratogeny**
  - **radioaktivní záření**
    - chromosomální zlomy
    - riziko vrozených vad se zvyšuje, je-li plod vystaven **větším dávkám záření** - např. při léčbě nádorů
    - velké dávky **ionizujícího záření** mohou způsobit vznik anencefalie, rozštěpu páteře a mikrocefalie v závislosti na stádiu vývoje plodu
  - **hypertermie**
    - poškození CNS
- **biologické**
  - **původci infekčních onemocnění** - primoinfekce matky a plodu na začátku těhotenství
  - **viry** - rubeola, virus zarděnek (malformace CNS, srdce), herpes virus, HIV, cytomegalovirus
  - **bakterie** - syfilis
  - **prvoci** - toxoplasmosa
  - **metabolické choroby matky** - diabetes melitus, PKU, lupus
  - ženy trpící **diabetem** podstupují **prekoncepční péči** = co možná nejvyšší normalizace metabolických, hormonálních veličin v těle matky
  - **podáním glukózy** předcházíme vzniku srdečních malformací plodu.
  - **hypertriglyceridemie** indukuje apoptózu embryonálních buněk zvýšením **exprese Bax genu**, který má klíčovou úlohu pro spuštění apoptózy
- **chemické**
  - řada látek užívaných v **průmyslu, zemědělství** = organická rozpouštědla, polychlorované bifenyly, těžké kovy
  - **léčiva** = cytostatika, antibiotika (tetracykliny), antiepileptika (fenytoin), warfarin, lithium, thalidomid, ACE-inhibitory, látky steroidní povahy, alkohol, drogy

## 100. Vrozené vývojové vady člověka, příklady, rozdělení podle příčin

---

- postihují 4 – 7% **novorozenců**
- **příčiny**
  - změny genetické informace (mutace)
  - vlivy prostředí
- **faktory** vyvolávající vznik vrozených vad = **teratogeny**
- **podle příčiny vzniku** rozdělujeme vrozené vady
  - **chromosomální aberace**
    - postihují asi 0,5% **novorozenců**
    - ihned po porodu lze **diagnostikovat**
    - **trisomie** (Downův syndrom), **monosomie** (Turner.syndrom) a **strukturní aberace** (Cri-du-chat syndrom)
    - **trisomie heterochromosomů a balancované translokace** - diagnostika až při vyšetření pro somatosexuální odchylky v dospívání a při vyšetření reprodukčních poruch (sterilita, infertilita)
    - **chromosomové aberace** vznikají většinou jako nové mutace
  - **monogenně dědičné vady**
    - **známý genetický přenos** (AD, AR, GD, GR)
    - postihují asi 0,5% novorozenců
    - mohou se **dědit** nebo mohou být vyvolány **novými mutacemi** genů
    - **riziko opakování** závisí na typu dědičnosti
    - **AD**: syndaktylie, polydaktylie, brachydaktylie, achondroplazie, kraniosynostosa
    - **AR**: adrenogenitální syndrom, infantilní polycystická choroba ledvin
    - **X-vázaná dědičnost**: hydrocephalus, hemofilie, daltonismus
  - **multifaktoriální dědičné vady**
    - **nejčastější**, postihují 2 – 4% novorozenců
    - na jejich vzniku se částečně podílí dědičná dispozice a vlivy prostředí
    - **nejčastější** jsou vrozené srdeční vady (0,5% novorozenců), rozštěpy rtu nebo patra (0,15% novorozenců), rozštěpy neurální trubice (0,15% novorozenců)
    - **riziko opakování** závisí na jejich incidenci v populaci a postu postižených v rodině
  - **exogenně podmíněné vady**
    - postihují asi 0,2% **novorozenců**
    - etiologie se obtížně prokazuje, pokud není **postižení typické** jako u alkoholového syndromu nebo hydatinového syndromu
- **podle typu poškození** rozdělujeme vrozené vady
  - **malformace**
    - poruchy **vývoje orgánů**, které jsou důsledkem změny **genetické informace**
    - **monogenně**, multifaktoriálně dědičné
    - vrozené vady postihující jen **jednotlivé orgány**
    - např. srdeční vady, rozštěpy páteře, polydaktylie, rozštěpy
  - **disrupce**
    - **poruchy orgánů** vyvolané **vnějšími vlivy**
    - **malformace končetin** vyvolané amniotickými pruhy (ovinutí, zaškrcení končetiny jako následek amniocentézy)
  - **deformace**
    - defekty vyvolané působením **neobvyklých sil** na normálně založený orgán
    - pes equinovarus při nedostatku **plodové vody**
    - způsoben vynuceným **chybným postavením nohy**
  - **dysplazie**
    - způsobeny **abnormální organizací** bb ve tkáních
    - příčinou je **porucha** indukce, diferenciací, apoptozy
    - osteogenesis imperfecta, dysplazie ledvin
  - **sekvence**

- **mnohočetné vady**, vznikají jako kaskáda následných dějů
- při agenezi ledvin nedostatek plodové vody vede k deformaci obličeje tlakem stěn dělohy a k hypoplazii plic (bez dostatku plodové vody se nemohou správně vyvíjet)
- **syndromy**
  - **mnohačetné vady**, známe společnou příčinu
  - popsáno několik **1 000 syndromů** různé genetické etiologie
  - **monogenně** dědičné, chromozomální, vyvolané teratogeny
  - pro diagnostiku nezbytné **databáze syndromů**
- **asociace**
  - **kombinace** více vad, nejsou sekvencí ani syndromem
  - **VATER asociace** (vertebral-annal-tracheal-esophageal-reanal abnormalities)
  - vyvolána **působením teratogenů** na vývoj více orgánů současně
- **mitochondriálně dědičné vady**
  - vznikají **mutací mtDNA**
  - nejznámější je **syndrom MELAS**
    - mitochondriální svalová porucha **Myopatie, Encephalopatie**
    - acidosa vyvolaná kyselinou mléčnou - **Lactic Acid**
    - záchvaty podobné štusu - **Stroke**
  - **matroklinní způsob** přenosu a velká fenotypová variabilita daná např. **heteroplasmii** (přítomností více genotypů v mitochondriální populaci)
- **příklady vrozených vývojových vad u člověka**
  - **Fallotova tetralogie**
    - nejčastější vrozená **cyanotická vývojová vada** srdce
    - defekt **komorového septa**, dextropozice **aorty**, nasedá nad defektem septa
    - stenóza **plicnice** - infundibulární či valvulární, hypertrofie **pravé komory** (PK)
    - díky zúžení plicnice odchází odkysličená krev defektem komorového septa do aorty a dochází k **míšení okysličené a odkysličené krve**, vzniká trvalá arteriální **desaturace a cyanóza**
    - hypoxické záchvaty lze přechodně ovlivnit **beta-blokátory**
    - novorozencům s kritickou hypoxémií podáváme **prostaglandin E1** k udržení **průchodnosti dučeje**
    - některé stavy jsou vhodné k **urgentní [http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Bal%C3%B3nkov%C3%A1\\_valvuloplastika&action=edit&redlink=1](http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Bal%C3%B3nkov%C3%A1_valvuloplastika&action=edit&redlink=1) balónkové valvuloplastice**
    - potvrzená Fallotova tetralogie je vždy **indikována k operaci**
      - **paliativní operace**: spojka mezi plicnicí a a. subclavia - modifikovaná spojka dle Blalocka-Taussigové nebo spojka goretexovou protézou (PTFE 5-6 mm)
      - **korektivní operace**: indikujeme ji plánovaně v batolecím věku - odstranění stenózy a rozšíření výtokové části pravé komory infundibulektomií, uzávěr defektu komorového septa záplatou a plastika plicnice
      - **funkční výsledek** bývá výborný a trvalý, protětim stenotické chlopně může vzniknout **regurgitace** (nižší výkonnost pacientů)

## 101. Populace z genetického hlediska, C-H-W rovnováha

- **populační genetika** je nauka o **změnách zastoupení alel** jednotlivých genů v populaci
- tyto změny mohou být důsledkem jak **přirozeného výběru**, tak **genetického driftu**
- **populace** = soubor jedinců téhož druhu, nacházejících se v jednom určitém místě v jednom určitém čase
- soubor geneticky vzájemně **příbuzných jedinců** téhož druhu organismu
- **genetická příbuznost** může být dána tím, že se jedinci mezi sebou mohou **vzájemně křížit**, ale také tím, že mohou pocházet z jednoho **společného předka**

- pojem nejde aplikovat na druh s převažujícím **vegetativním rozmnožováním**
- mohou být **genotypově i fenotypově velmi různorodé**, ale všichni jedinci se podílejí na společném **genofondu** (= soubor alel všech genů v gametách, jejichž splnutím vznikají zygoty další generace jedinců)
- **druhy populací**
  - **autogamická**
    - tvořena jedinci, kteří se **rozmnožují autogamií** (samooplozením)
    - každý jedinec je **hermafroditický** – produkuje samčí i samičí gamety
    - jedinci, kteří jsou v určitém **páru alel homozygotní**, mohou produkovat jen **homozygotní potomky**
    - **heterozygotní jedinci** produkují **heterozygoty** jen v 50% případů (2.MZ)
    - z generace na generaci tedy v této populaci **klesá podíl heterozygotů**, naopak vzrůstá poměrné **zastoupení homozygotních jedinců**, heterozygoti úplně nevymizí, ale populace se časem rozdělí na 2 čisté linie:
      - **homozygotně dominantní**
      - **homozygotně recesivní**
  - **alogamická**
    - vytváří ji organismy s **odděleným pohlavím** – jedinec vzniká splnutím 2 gamet od různých jedinců
    - **modelovým typem** této populace je **populace panmiktická** – velmi rozsáhlá populace, kde je zaručena stejná **pravděpodobnost zkřížení** jakýchkoliv 2 jedinců v populaci – **náhodné párování partnerů**
- **Castle-Hardy-Weinbergův zákon**
  - **platí za těchto podmínek**
    - nedochází k **mutacím** (alespoň ne u sledovaného genu)
    - nedochází k **selekci** (průměrná plodnost jedinců je stejná, nezávisí na genotypu)
    - nedochází k **migraci**
    - populace musí být **panmiktická** a velmi **početná**
  - **p** – vyjadřuje poměrné zastoupení **dominantní alely** v genofondu populace
  - **q** – vyjadřuje poměrné zastoupení **recesivní alely** v genofondu populace

$$p + q = 1$$

- proto platí také **p = 1 - q** a naopak
- lze také **aproximovat**:  $2pq = 2q$ , když frekvence p se blíží 1
- **p x p = p<sup>2</sup>** ..... šance setkání dvou dominantních alel (**dominantní homozygot**)
- **q x q = q<sup>2</sup>** .....šance setkání dvou recesivních alel (**recesivní homozygot**)
- **(p x q) + (p x q) = 2pq** ..... šance vzniku **heterozygota**
- celkové genotypové **složení populace**

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

- pokud se v daném lokusu vyskytuje **více než 2 alely**, platí:  $p + q + \dots + n = 1$
- pro výpočet **frekvence alely p** užíváme vzorec

$$p = \frac{2x \text{ počet homozygotů AA} + \text{počet heterozygotů Aa}}{2x \text{ počet všech jedinců ve vzorku}}$$

- pro výpočet **frekvence alely q** užíváme vzorec

$$q = \sqrt{\text{počet homozygotů aa} / \text{počet všech jedinců ve vzorku}}$$

- obě dvě alely také lze dopočítat ze **vztahu**  $p + q = 1$

- pokud se poměrné zastoupení **dominantních a recesivních alel** v genovém fondu z generace na generaci nemění, a pokud **pravděpodobnost párování** jakéhokoli genotypu s kterýmkoli jiným zůstává stejná, potom se nemění ani genotypové složení generace => **genetická rovnováha**
- **vnější vlivy působící na genofond populace**
  - **mutační tlak**
    - může docházet např. ke **vzniku** zcela nových alel či **změně** dominantní alely na recesivní i naopak
    - **četnost** těchto jevů je velmi nízká a změny se během jedné generace téměř **neprojevují**
  - **selekční tlak**
    - **selekce** neboli přírodní výběr má velký vliv
    - pokud alela svého nositele **zvýhodňuje** oproti jedincům bez této alely, bude frekvence této alely v následujících generacích postupně **stoupat**
    - **nevýhodné alely** postupně ubývají (dominantní mizí poměrně rychle, recesivní mizí pomalu a úplně nevymizí nikdy), protože své nositele **znevýhodňují** (tzv. negativní selekce)
  - **migrace**
    - migrace může znamenat **obohacení genofondu** o nové alely (ale i jeho ochuzení)
    - organismy žijí často na zcela **specifickém místě**, kde mohou tvořit více či méně izolované **subpopulace**
    - pro **výměnu genů** (genový tok) mezi takovýmito populacemi je pak migrace nezbytná
    - případné **rozšíření těchto alel** opět závisí na jejich adaptivní hodnotě (vliv selekce) - podmínky na původním a novém stanovišti se mohou lišit
  - **genetický drift**
    - genetický drift neboli posun jsou **náhodné posuny** ve frekvenci jednotlivých alel v rámci **genofondu dané populace**
    - v praxi to znamená, že tyto **změny frekvencí** nepodléhají selekci, ale závisí vyloženě na **náhodě při vzniku gamet a zygot** (i nositel výhodné alely nemusí tuto alelu svým potomkům předat a tato se v další generaci neobjeví)
    - tyto změny jsou **kumulativní** - časem tak může dojít dokonce i k **fixaci** jedné alely a **vymizení** alely druhé
    - **genetický drift** se uplatňuje v relativně **malých populacích** - čím je populace menší - tím výraznější je vliv driftu a tím častěji dojde k **fixaci jedné z alel**

## 102. Selekcce a její typy

- **selekce** = výběr
- pojmem selekce je v **populační genetice** charakterizována situace, která neodpovídá bodu 3. omezujících podmínek pro odvození **základního modelu** ( tj. průměrná plodnost jedinců je stejná, nezávislá na jejich genotypu, nedochází tedy k selekci)
- patří mezi klasické **evoluční mechanismy darwinismu**; vždy dochází ke snižování počtu potomků
- k měření **intenzity selekce** používáme průměrného počtu potomků od rodiče určitého genotypu; používá se počtu relativního, ne absolutního, kde může být tato relativní hodnota založena na poměru např. k **průměrnému počtu potomků** všech fenotypů nebo na poměru k počtu potomků **nejvhodnějšího fenotypu**
- z toho lze odvodit:  $w_i = w'_i / w_{(i=\max)}$  = průměrný počet potomků genotypu i / průměrný počet potomků **nejplodnějšího genotypu**, kde  $w_i$  = absolutní průměrné počty potomků genotypu i (i = AA, Aa, aa)
- **relativní reprodukční schopnost** (také adaptivní hodnota) daného genotypu =  $w'_i$
- **selekční koeficient**, který charakterizuje intenzitu selekce:  $s = 1 - w_i$
- **selekce proti homozygotům**
  - výchozí populace se nachází v **C-H-W rovnováze**
  - když začne probíhat selekce o **intenzitě**  $s_i$  proti homozygotům aa (i = aa)
    - **frekvence před selekcí**: pro aa =  $q^2$  (pro AA =  $p^2$ , pro Aa =  $2pq$ ,  $\sum = 1$ )

- **intenzita selekce**  $s_i$ : pro  $aa = s$  (pro  $AA = 0$ , pro  $Aa = 0$ )
- **relativní reprodukční schopnost**  $w_i$ : pro  $aa = 1 - s$  (pro  $AA = 1$ , pro  $Aa = 1$ )
- **frekvence po selekci**: pro  $aa = q^2(1 - s)$  (pro  $AA = p^2$  pro  $Aa = 2pq$ ,  $\Sigma = 1 - q^2s$ )
- vypočítáme **genovou frekvenci** v generaci po selekci jako
 
$$q' = q(1 - qs) / (1 - q^2s)$$
- velikost změny je charakterizována **selekčním rozdílem** (diferencí)
 
$$\Delta q = q' - q = -pq^2s / (1 - q^2s)$$
- $\Delta q$  nám umožňuje zjistit, zda je **zkoumaný polymorfismus** stabilní nebo přechodný, resp. jak rychle probíhají **změny** vyvolané selekcí
- v případě **stabilního polymorfismu** je  $\Delta q = 0$  - k tomu dojde tehdy, je-li čítec zlomku v rovnici roven 0, k čemuž může dojít, když:
  - $p = 0$ , tedy populace je tvořena pouze homozygoty  $aa$
  - $q^2 = 0$  ( $q=0$ ), populace se skládá pouze z homozygotů  $AA$
  - $s = 0$ , nedochází k uvažované selekci
- tyto **tři podmínky** = tzv. triviální (obecné, základní) podmínky
- za **netriviálních podmínek** dochází ke změnám genových frekvencí (ubývá alel  $a$ )
- pokud tedy  $\Delta q \neq 0$ , genové frekvence se generaci od generace mění - populační polymorfismus je **přechodného typu**
- **velikost** tohoto úbytku je přímo úměrná intenzitě selekce a čtverci genové frekvence
  - je-li na počátku genová **frekvence vysoká**, je její úbytek větší
  - při **menších hodnotách  $q$**  se úbytek zpomaluje
  - biologicky vysvětlitelné tím, že při **nízkých hodnotách  $q$**  je většina alel  $a$  v genotypu **heterozygotů**, proti kterým daný typ selekce nepůsobí
  - **dynamika** těchto změn genové frekvence pro hodnoty selekčního koeficientu má v grafu (závislost na čase měřeném v generacích) různě **sinusoidní charakter**
- je-li  $s = 1$ , tedy se jedná o systém s **recesivně letálním účinkem**, bude platit že
 
$$q^{(t)} = q / (1 + tq)$$
 , kde  $t$  je počet generací po který běží selekce
- **paradoxní výsledek** lze komentovat nevhodným použitím modelu (neznáme přesné údaje před stovkami generací apod.)
- **selekce proti oběma typům homozygotů**
  - tzv. **preferenci heterozygotů** -  $s_{Aa} = 0$  a  $s_{AA} > 0$  i  $s_{aa} > 0$
  - vede k **rovnovážnému stavu**, kdy:  $q_{rovn.} = s_{aa} / (s_{aa} + s_{AA})$
  - **tedy zjednodušeně**  $q = s_1 / (s_1 + s_2)$
  - lze pak **úpravou** získat  $s_1 = q_{rovn.} \times s_2 / (1 - q_{rovn.})$
  - př. **hemoglobinopathie** - v homozygotní konstituci vyvolávají anémii
  - **selekčním faktorem**, který postihuje dominantní homozygoty je **malarická infekce**, proti které jsou heterozygoti částečně odolní
  - extrémním případem je **balancovaný letální systém**, kdy  $s_{AA} = s_{aa} = 1$  a populace je potom tvořena pouze **heterozygoty**
  - př. T lokus u myši, který se podílí na vývoji kaudální části těla
    - **některé dominantní alely (T) i recesivní (t)** mají v homozygotní konstituci **letální účinek**, obvykle díky těžkým poruchám během ontogenesy
    - vzhledem k tomu, že mechanismus poškození je rozdílný pro dominantní a recesivní homozygoty, jsou **heterozygoti jedinci životaschopní**
- **selekce proti heterozygotům**
  - př. **fetální erythroblastosa**
  - s výjimkou situace, kdy  $p = q = 0,5$  je možné dosáhnout **rovnovážného stavu** pouze za triviálních podmínek
  - vzhledem k tomu, že **netriviální rovnovážný stav**  $p = q = 0,5$  se snadno poruší, prakticky vždy za tohoto typu selekce dochází k situaci, kdy se zvyšuje **genová frekvence alely** s vyšší četností
- **typy selekce**
  - **normalizující selekce**
    - uplatňuje se při zachování **současného stavu** populace vylučováním odchylek od normy

- př. dědičné choroby
- **Balancující selekce**
  - udržuje v populaci určitý **stupeň polymorfismu**
  - př. preference heterozygotů (srpkovitá anemie)
- **direkcionální selekce**
  - uplatňuje se zejména při **změně vnějších podmínek**, jejím působením je vybrán nejlépe **adaptovaný fenotyp**
  - jedná se o typické působení **přírodního výběru** ve smyslu klasického **Darwinismu**
  - př. průmyslový melanismus některého hmyzu
- **Fisherův fundamentální teorém** přírodního výběru zní: „Rychlost vzestupu (relativní) plodnosti kteréhokoli organismu v jakékoli době je rovna genetickému rozptylu (relativní) plodnosti v této době“

### 103. Inbred, příbuzenské sňatky a jejich rizika

- **inbred** = křížení mezi příbuznými jedinci
- **příbuzní** = jedinci, kteří mají alespoň jednoho společného předka, max. na úrovni pra-prarodiče
- dochází-li k **inbredu**, zmenšuje se počet **heterozygotů** a stoupá počet **homozygotů** - platí pro **populaci** i pro **jednotlivé rodiny**
- pro **zkoumání inbredu** je zavedena alela společného původu - **ibd alela** (Identical By Descendent) = taková alela, kterou jedince zdědil od **společného předka**
- **koeficient inbredu** - **F** stanovuje pravděpodobnost, že u jedince jsou obě alely daného lokusu **ibd alely**
- **výpočet** koeficientu inbredu je založena na skutečnosti, že rodič a jeho potomek mají 1/2 alel ibd
- pak je **koeficient inbredu**:

$$F = (1/2)^{n+1}$$

- kde **n** = **počet generací** (spojových čar rodokmenového schématu)
- **kinship koeficient** - **f** je definován jako pravděpodobnost, že **namátkově vybraná alela** daného lokusu jednoho jedince je **ibd s alelou** námtkově vybranou ze stejného lokusu u druhého jedince
- **koeficient příbuznosti** - **r** je pravděpodobnost, že námtkově vybraná alela u dvou **příbuzných osob** je **ibd alela**, tedy  $r = 2f$

$$r = (1/2)^n$$

- kde **n** = **počet generací** (spojových čar rodokmenového schématu) - svislé čáry rodiče / děti
- **příbuzenské sňatky**
  - z klinického hlediska představují **zvýšení rizika** narození dítěte s AR (příp. polygenně dědičným) onemocněním
  - za předpokladu, že je **choroba vzácná**, pak genová frekvence je nízká a pravděpodobnost vzniku homozygota pro alely **ibd** je **relativně vysoká**
  - nejběžnější sňatky jsou sňatky **bratrance a sestřenice** a **druhého bratrance a sestřenice**
  - podíl **AR dětí narozených ze sňatku** bratrance se sestřenicí závisí na genové frekvenci a množství sňatků tohoto typu v populaci - tzv. **Dahlbergův vztah** (závislost relativního podílu AR homozygotů narozených ze sňatku bratrance se sestřenicí na genové frekvenci a četnosti těchto sňatků v populaci)
- **inbred v populaci**
  - **modelová populace** s inbredelem je založena na úvaze že relativní část populace (**F**) je **plně inbrední**, druhá část populace (**1 - F**) pak **panmiktická**
  - lze dokázat, že **rozložení genotypů** v populaci je

Genotyp	AA	Aa	aa
Frekvence	$p(p + Fq)$	$2pq(1 - F)$	$q(q + Fp)$



- v populaci, ve které **probíhá inbred**, nedochází ke změnám genových frekvencí, ale dochází ke změnám ve **frekvenci genotypů** (ubývá heterozygotů a přibývá homozygotů)
- **koeficienty inbredu** pro lidské populace jsou obvykle velmi nízké, výjimkou mohou být tzv. **isoláty** - mohou být zeměpisné (ostrovy, horská údolí) nebo společenské (národnost, náboženská sekce)
- **genetická zátěž populace**
  - v populaci se vyskytují **alely**, které své nositele mohou **poškozovat**
  - účinek těchto škodlivých alel se projevuje ve **snížení relativní reprodukční schopnosti** jejich nositelů a z populačního hlediska představuje **genetickou zátěž populace**
  - **genetická zátěž** = rozdíl průměrné relativní plodnosti od relativní maximální plodnosti:

$$L = W_{\max} - W_{\text{prům}} / W_{\max}$$

- může být v populaci udržována rovnováhou mezi mutacemi a selekcí = tzv. **mutační zátěž**
- je-li zátěž udržována preferencí homozygotů = tzv. **segregační zátěž**
- zátěž populace je **lineární funkcí koeficientu inbredu**

$$L = a + bF$$

- kde a = velikost zátěže **neinbrední populace** (F = 0), b = velikost zátěže **inbrední populace**
- v genomu jednotlivce je vyjadřována pomocí **letálních ekvivalentů** = počet alel, které v homozygotní konstituci svého **nositele usmrcují**
- počet letálních ekvivalentů je **metodicky stanovován** na základě porovnání o úmrtnosti dětí pocházejících z **příbuzenských** sňatků s údaji o úmrtnosti dětí pocházejících z **nepříbuzenských** sňatků
- ze studií pro člověka platí: **4 letální ekvivalenty** na genom jedince
- **poškozující ekvivalenty** = nejrůznější genetická onemocnění, která poškozují své nositele, ale neprojevují se výraznými **změnami plodnosti**
- odhadem připadá asi **3 - 8 poškozujících ekvivalentů** na genom jedince

## 104. Populační polymorfismy a jejich příčiny

- populace, kde **genová frekvence nejčastější alely** je menší nebo rovna **0,99 (99%)** je polymorfní pro daný znak
- naopak **výskyt kombinace polymorfních alel**, resp. daného znaku, musí být **větší než 1%**, aby se jednalo o polymorfismus (jinak jde o pouhou mutaci)
- ovšem tato uvedená hodnota není žádnou **objektivní hranicí**, ale byla pouze stanovena dohodou
- nejvhodnější je stanovit **stupeň polymorfismu** pomocí **heterozygosity**, která je definována jako

$$H = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

- m = **počet alel sledovaného genu** a  $X_i$  = genová **frekvence** i-té alely (platí C-H-W zákon že  $X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_m = 1$ )
- nebo lze slovně stanovit jako **zastoupení jedinců** v populaci, kteří jsou heterozygotní pro určitý lokus
- **příklad**
  - v populaci je zastoupení alely p=0,5 a q=0,5

$$H = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2 = 1 - 0,5^2 - 0,5^2 = 1 - 0,25 - 0,25 = 0,5(50\%)$$

- toto je také **maximum**, kterého lze dosáhnout
- platí, že čím **větší** je  $m$  a **nerovnoměrněji** rozložená frekvence  $x$ , tím **menší** je  $H$
- **minimum** by bylo pro  $p = 1$  a  $q = 0$ , tam by se  $H$  rovnalo v podstatě 0, tady by byla naprostá **většina homozygotů** a **žádní heterozygoti** – tedy polymorfismus by byl populačně téměř nulový
- **heterozygosita** nám tedy může sloužit jako dobré měřítko mezi **subpopulacemi** jedné populace
- **druhy polymorfismů**
  - **stabilní polymorfismus**
    - genové frekvence se nemění
    - příkladem je populace v **C-H-W rovnováze** nebo polymorfismus udržovaný **frekvencí** heterozygotů, případně **mutacemi** a zpětnými mutacemi
  - **přechodný polymorfismus**
    - v populaci, kdy díky **selekci** je jedna alela postupně nahrazována jinou, jako je tomu např. při selekci proti homozygotům

## 105. Mutace z populačního hlediska, četnost mutací

---

- **mutace** obohacuje populaci o nové alely
- proti mutacím působí **selekce** a **genový drift**
- pokud probíhá zároveň selekce a zároveň vznikají mutace, může být dosaženo **mutačně selekční rovnováhy**, kdy se frekvence nových alel nemění
- **mutační intenzita** = relativní četnost, s jakou se proces mutací opakuje (mutace/gen/generace)
  - $\mu$ : A ---> a (forward mutace)
  - $\nu$ : a ---> A (backward mutace)
- **spontánní mutace**
  - mutace s **neznámou příčinou**
  - jejich četnost je  $10^{-5}$  –  $10^{-7}$
- probíhají-li současně mutace i zpětné mutace, pak platí **rovnováha**

$$p_{\text{rovn.}} = \mu / (\mu + \nu)$$
- **indukované mutace**
  - dosud není známo, jak je možné **četnost mutací snížit**, ale je možné ji zvýšit **mutageny**, které vyvolávají vznik indukovaných mutací
- **mutačně-selekční rovnováha**
  - u selekce proti **autosomálně recesivnímu genu** platí
$$q_{\text{rovn.}} = \sqrt{\mu / s}$$
  - u selekce proti **autosomálně dominantnímu genu** platí
$$p_{\text{rovn.}} = \nu / s$$
- **mutagenní faktory**
  - **biologické**
    - viry
    - poruchy reparačních mechanismů

- **chemické**
  - léky (cytostatika, chemoterapeutika)
  - mutagenita léků se testuje pomocí **Amesova testu** na bakterii *Salmonella typhimurium*, která je auxotrofní a není schopná se množit a přežít na médiu bez přídavku **histidinu**
  - na minimálním médiu s **minimem histidinu**, kde se nemnoží, se testuje, zda je lék mutagenní i mimo **replikaci**
  - po přidání **jaterních enzymů** se testuje mutagenita po metabolickém zpracování
  - akridinová barviva, analogy bází, alkylační, hydroxylační a deaminační činidla
- **fyzikální**
  - ionisující záření – dávka záření se měří v GY (Gray)
  - pro *Drosophila* a další **jednoduché organismy** platí lineární závislost četnosti mutací na dávce
  - u savců je lineární závislost platná jen u **malé dávky**, při vyšších dávkách už je mutagenní efekt nižší, než by odpovídalo **lineárnímu vztahu**
  - pro savce je také více mutagenní vysoká dávka než dlouhodobě nízká
  - to lze vysvětlit účinkem **reparačních mechanismů**
  - **zdvojnásobující se dávka** je taková dávka, která zdvojnásobí množství spontánních mutací
  - u člověka se odhaduje na **0,5 Gy**
  - **ionisující záření** způsobuje především zlomy DNA a sekundárně tedy chromosomální přestavby
  - **UV záření** je nebezpečné hlavně pro jednobuněčné organismy – u člověka vyvolává mutace jenom v povrchových buňkách (epidermis)
  - vyvolává zejména vznik **thymidinových dimerů**

## 106. Migrace, tok genů

### Migrace

- **migrace** = přemísťování, stěhování
- migrace může znamenat obohacení genofondu o **nové alely** (ale i jeho ochuzení)
- případné **rozšíření těchto alel** opět závisí na jejich **adaptativní hodnotě** (vliv selekce)
- **přesun** jednotlivců i skupin obyvatel v prostoru
  - relativně **trvalý proces**, nevratná migrace, stěhování
  - **krátkodobý, vratný proces**, dojíždění za prací, do škol, za službami, za rekreací - nevyžaduje trvalou změnu bydliště
- **další dělení**
  - vnitrostátní
  - mezistátní (emigrace, imigrace)

- **podle okolností**
  - dobrovolná
  - nucená
- **podle motivu**
  - ekonomická
  - politická
  - náboženská
- **migrace** je spolu s **porodností a úmrtností** klíčovým prvkem v procesu **populačního vývoje** a výrazně ovlivňuje společenské a kulturní **změny obyvatel** na všech úrovních
- s **ekonomickým rozvojem** se intenzita migrace dále zvyšuje

### Genový tok

- v protikladu k **náhodným změnám** genových frekvencí v malých populacích, které jsou následkem **genového posunu** (náhodná změna v genové frekvenci v malých populacích), vzniká ve **velkých populacích** plynulá změna genové frekvence vlivem **genového posunu**
- typickým příkladem je **plynulý pokles frekvence alely D** systému krevních skupin ABO přibližně od 0,3 ve východní Asii po 0,6 v západní Evropě
- dalším příkladem je **vtékání „bílých“ genů do genofondu amerických černochů**

### Příklad z učebnice

- ve frekvenci jedné z alel systému Rh byly popsány značné b
- frekvence této alely u **afričtých černochů** je 0,63, u **bělochů** pak 0,03
- u **černochů v Americe** byla zjištěna frekvence 0,45
- vypočítejte, jak velký podíl bělošských alel „imigroval“ do černošského obyvatelstva

běloši P (0,03)

afričtí černoši  $P_i$  (0,63)

američtí černoši  $P_i'$  (0,45)

$$P_i' - P_i = -m(P_i - P)$$

$$m = \frac{P_i' - P_i}{P - P_i} = 0,3 = 30\%$$

## 107. Struktura populací, genový drift, význam pro evoluci

- **genetický drift** je proces, kdy dochází k **náhodným změnám** (posunu = driftu) ve frekvencích alel v **dané populaci**
- tyto změny tedy nejsou zapříčiněny **selekčními tlaky**
- v **konečně velkých populacích** může genetický drift vést k tzv. **fixaci** jedné z variantních <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Alela> alel (její frekvence dosáhne 100 %), popř. její **eliminaci** (frekvence dosáhne 0 %)
- takto může vymizet i **výhodná adaptace**
- vedle selekce je genetický drift považován za jeden z **hlavních mechanismů** <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Evoluceevoluce>
- **genový posun** (drift) je tedy taková změna alelových a genotypových frekvencí populace, která je způsobena **neúplným předáním alelového fondu** z jedné generace do další
- uplatňuje se hlavně v **malých populacích** a u alel, které se v populaci vyskytují ve **velmi nízké frekvenci**
- v průběhu generací se projevuje **kolísáním** (fluktuací) alelových četností, fixací nebo eliminací některých alel a celkovou genetickou **homogenizací populace**
- **posun genových četností** je vyvolán malým počtem křížení – tj. nedostatečným počtem potomků

- za této situace se ovšem neustaví **H - W rovnováha**, ale dochází k **posunu genetické struktury** populace od této rovnováhy
- **kolísání alelových frekvencí** vlivem posunu (za nepřítomnosti selekce, mutace a migrace) je **náhodné** a má nepředvídatelný účinek
- **genový posun** může působit **trvale**, zůstává-li populace stále poměrně malá a chyba náhodného výběru jedinců pro křížení se pak výrazně uplatní v **každé generaci** nebo se dočasně uplatňuje u populací, jejichž početnost se **periodicky zmenšuje** (např. u přezimujícího hmyzu)
- **evoluční význam genového posunu**: genový drift vyvolá podstatné změny genetické struktury populace (ve směru homozygotizace) a přispívá ke vzniku **genetických diverzit** (rozmanitostí) mezi populacemi
- **chování populací lze simulovat** a výsledky zanást do grafu (např. pro alelu p pro několik populací), výsledky ukazují, že s **rostoucí populací klesá tendence fixovat** jednu alelu

## 108. Charakteristika nádorově transformovaných buněk

---

- **nádorové buňky při kultivaci**
  - získávají schopnost **neomezeného růstu**
  - dochází ke **ztrátě kontaktní inhibice**, transformované buňky rostou v několika vrstvách **neorganizovaně nakupené**
  - kultura je **nesmrtelná**, vzniká neomezený počet generací
- buňky vykazují různé změny v **povrchových antigenech**, nacházíme tu též tzv. **neoantigeny**
- **nádorová transformace** též často doprovázena změnou tvaru buňky
- nacházíme u nich zvýšený **anaerobní metabolismus** a tedy nižší požadavek na množství **proteinových růstových faktorů** v kultivačním médiu
- **chromosomální výbava**
  - v jádře je **změněný počet chromosomů** – heteroploidní nebo pseudoploidní chromosomová výbava
  - chromosomy transformovaných buněk vykazují často náhodné nebo nenáhodné **numerické nebo strukturální aberace**
  - pro buňky je charakteristické **vysoké procento chromosomálních zlomů** a četné chromosomální **přestavby**
- **maligní zvrát** je kódován v DNA transformovaných buněk
- v buněčné kultuře je též utlumen vliv **kortikosteroidních hormonů** na potlačení **mitos**, v důsledku poruchy příslušných **buněčných receptorů**
- ztráta **specifické prostorové orientace** a kontaktu vůči sousedním buňkám je způsobena sníženou schopností nádorových buněk vytvářet **mezibuněčné kontakty**

- nastává též **porucha zakotvení nádorové buňky** k pevnému buněčnému povrchu
- **shrnutí**
  - maligně transformované buňky se vyznačují především **pokračujícím dělením**
  - současně se u nich snižují požadavky na **přítomnost růstových faktorů a hormonů**, které potřebuje normální buňka a které přicházejí z vnějšku
  - některé transformované buňky produkují vlastní specifické růstové faktory – **autokrinní stimulace**
  - dochází ke ztrátě schopnosti **zastavit růst**

## 109. Charakteristika nádorového bujení

---

- **zhoubná nádorová onemocnění** jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí u nás, ale i v ostatních vyspělých státech světa
- nádorové onemocnění může být definováno jako **růst buněk**, které se vymkly kontrole buněčného dělení, a které prolifерují téměř **autonomně**
- podle aktivity prolifерace rozlišujeme **dva typy nádorů** – benigní (nezhoubné) nebo maligní (zhoubné)
- **benigní nádory**
  - rostou v **původním ložisku** relativně pomalu a nejeví **jinou agresivitu**
  - zachovávají charakter **původní tkáně**, ze které vznikly
- **maligní nádory**
  - prorůstají z **výchozího ložiska** do okolí (invazivní růst) a poškozují **strukturu i funkci orgánu**
  - uvolněné **nádorové buňky** jsou přenášeny **krevními a lymfatickými cévami** do jiných orgánů, kde pokračují ve **své prolifерaci (metastázy)**
  - **maligní nádory** jsou geneticky podmíněným onemocněním
- **mechanismus vzniku nádorové buňky**
  - vlastní příčinou **maligní transformace** buňky jsou změny na molekulární úrovni, mutace v **určitých genech**
  - za regulaci a kontrolu buněčné prolifерace jsou odpovědné zejména **3 skupiny genů** – protoonkogeny, tumor-supresorové geny (nádorový růst suprimující geny, antionkogeny) a mutátorové geny (kontrola stability genomu)
  - **protoonkogeny**
    - geny účastnící se **regulace buněčného růstu** a diferenciacе buněk
    - protoonkogen je gen **normální**, netransformované buňky, ale má onkogenní **potenciál**
    - mohou se ale (například mutací) změnit na **onkogeny** – tzn. geny nádorových buněk
    - **produkty onkogenů** jsou onkoproteiny – jsou odpovědné za změny regulace prolifерace a diferenciacе buněk
    - onkogeny, které vznikly **mutací protoonkogenů** somatických buněk jsou nazývány **celulární onkogeny (c-onc)**

- **obdobné geny**, které se nacházejí v genomu některých retrovirů, RNA virů s onkogenním potenciálem, se nazývají **virové onkogeny** (v-onc)
- **tumor supresorové geny**
  - regulují **množení buněk**
  - jejich produkty usměrňují **průběh buněčného cyklu** (regulují délku interfáze)
- **mutátorové geny**
  - **reparační geny**, jsou odpovědné za přesnost replikace DNA
  - mutace v těchto genech vede ke **ztrátě schopnosti reparovat** poškozenou DNA a tím dochází ke zvýšené míře k přepisu **chybné** genetické informace
- **vyšetření nádorových buněk** metodami DNA ukázala, že maligní transformace je **vícestupňový proces**
- transformace může být zahájena v **jediné buňce** v důsledku iniciační mutace
- **dokončení maligní transformace** bývá provázeno postupnou kumulací dalších mutací v několika **odlišných genech** téže buňky nebo v dceřiných buňkách, které vznikly dělením **výchozí mutované buňky**
- to znamená, že v klonu **dceřiných buněk** je přítomna každá mutace, která postihla **mateřskou buňku**
- vznik **maligního nádoru** (neoplasie) je proces, který může probíhat u jedinců v nestejně dlouhém **časovém úseku**
- délka maligního procesu závisí na **typu nádorového onemocnění**, na vnitřním prostředí jedince, ale i na podmínkách vnějšího **prostředí**
- malignímu stádiu předchází **stádium premaligní**, kdy ještě nedošlo ke konečné kumulaci mutací vedoucí k **maligní transformaci**
- počet mutovaných genů nutných pro vznik **maligní buňky** (nádorové tkáně) je pro jednotlivé **typy buněk různý**
- **nejmenší kumulace** mutovaných genů (2-3) byla zaznamenána u **hematologických malignit karcinomy a sarkomy** vznikají v důsledku kumulace většího počtu mutací
- **zvýšená frekvence** mutací protoonkogenů nebo tumor-supresorových genů je u některých osob vysvětlována defekty v genech odpovědných za reparaci poškození DNA
- selhání funkce těchto genů zvyšuje **četnost mutací**
- v současnosti je u některých nádorů známa **asociace** s charakteristickými onkogeny, tumor-supresorovými geny nebo mutátorovými geny (tzv. marker geny), které provázejí vznik **určitého typu nádoru**
- znalost **genetické podstaty** nádorového onemocnění může sloužit k zpřesnění diagnózy, terapie i prognózy
- **charakteristika nádorového růstu v podmínkách in vivo**
  - přeměna buňky v buňku nádorovou je tedy vyvolána **mutacemi** v protoonkogenech, tumor-supresorových genech a genech mutátorových, které vedou k **nekontrolovatelnému množení buněk**, což je hlavní rys **maligního zvratu**
  - zejména dochází k porušení **regulace přechodu** z G1 do S fáze buněčného cyklu
  - maligní transformace může postihnout buňky téměř **všech tkání**, v zásadě ale existují hlavní **3 typy nádorů**
    - **sarkom**: vzniká z mezenchymální tkáně
    - **karcinom**: vzniká z epiteliální tkáně
    - **hematopoetická a lymfoidní malignita**: leukémie a lymfomy
  - **přesnější klasifikace** pak zahrnuje
    - **místo vzniku**: orgán – např. nádor močového měchýře, prsu apod.
    - **typ tkáně**: dlaždicobuněčný karcinom ústní sliznice
    - **klinický stupeň či rychlost progresu**: akutní lymfoblastická leukémie
  - **morfologický obraz** nádorové tkáně vzniklé in vivo může být stručně charakterizován pomocí **3 kritérií**: nádory jsou tvořeny **proliferujícími** nádorovými buňkami (parenchym), **pojivovou** nenádorovou tkání (stroma) a **cévním** systémem, jehož vznik nádory samy stimulují
  - většina nádorových onemocnění bývá diagnostikována v **pokročilejším věku** jedince (nádory tlustého střeva a konečníku, nádory prsu, nádory prostaty)

- jedná se o takové **typy nádorů**, které vznikají následkem několika genetických změn v **průběhu let**
- existují ale určité typy nádorů se **specifickým výskytem** v dětském věku a obecně u **mladších jedinců** (retinoblastom, Wilmsův nádor ledvin, leukémie, lymfomy)
- **charakteristickým rysem** růstu maligního nádoru in vivo je jeho **invazivní růst** – schopnost prorůst do **okolní tkáně**
- další schopností je **metastazování** – z původního ložiska do jiných vzdálených orgánů
- tato **agresivní forma** růstu nádorové tkáně je mimo jiné podmíněna geneticky získanými změnami aktivity **proteolytických enzymů** a změnou adhezivních molekul **buněčného povrchu**
- jak vlastní **ložiska**, tak vzdálené metastázy nádorů mají schopnost **indukovat** tvorbu vlastního **cévního systému** – angiogenezi
  - produkce **angiogenních faktorů** je podporována jak geny nádorových buněk tak také okolním mikroprostředím
  - nádorové buňky mohou **podnítit proliferaci** endoteliálních cévních buněk a novou vaskularizaci jednak aktivací vlastních genů, které podněcují novou **angiogenezi**, ale také aktivací obdobných genů v sousedních nenádorových buňkách
  - při vzniku nového **vaskulárního systému** se podílejí např. růstové faktory **VEGF** (vascular endothelial growth factor), **bFGF** (basic fibroblast growth factor) nebo **angiopoietin-1**
  - u zvětšujícího se nádoru dochází v jeho centru k **nedostatečnému přívodu kyslíku** (hypoxii) a ta aktivuje geny, jejichž produkty podporují angiogenezi
  - na nové vaskularizaci se podílí i přilehlé **mikroprostředí** – signální molekuly přítomné v mimobuněčné matrix, složky imunitního systému, fibroblasty, pericyty apod.
  - **kooperace** mezi těmito složkami vede buď k proliferaci endoteliálních cévních buněk nebo naopak k **inhibici** jejich proliferace a apoptóze
  - mezi **inhibitory angiogeneze** patří transformující růstový faktor-beta (TGF-β)
- **vypracování techniky kultivace buněk in vitro** (tkáňové kultury) umožnilo **definovat rozdíly** mezi normálními buňkami a maligně transformovanými buňkami na **buněčné úrovni**
- **normální buňky při kultivaci in vitro**
  - zachovávají **kontrolu množení**
    - v daném prostředí k tomu dochází regulací zvanou **kontaktní inhibice**
    - buňky zastaví proliferaci po vzájemném kontaktu – po vytvoření **monolayeru** (souvislé jednobuněčné vrstvy pokrývající povrch dna kultivační lahve nebo Petriho misky)
  - mají **omezený počet generací**
    - buněčná kultura zaniká po určitém **počtu generací** (maximálně po 50 generacích – záleží na typu buněčné kultury)
    - jedná se o projev tzv. **replikativního stárnutí** buněk
  - typické **antigenní determinanty**
    - na buněčném povrchu buňky nesou **antigenní determinanty** odpovídající determinantám tkáně, ze které byla buněčná **kultura odvozena**
  - **metabolismus je hlavně aerobní**
  - požadavky na přítomnost **růstových faktorů**
    - buňky mají vysoké požadavky na **přítomnost RF** v kultivačním médiu
    - potřebují pro svůj **růst stimulaci**
  - mají **diploidní počet chromosomů**
  - zachovávají specifický **buněčný tvar**
- **nádorové buňky v podmínkách in vitro**
  - schopnost **neomezeného růstu**
    - v kultuře vzniká **neomezený počet generací**
    - dochází ke ztrátě **kontaktní inhibice**, transformované buňky rostou v několika **vrstvách**, buňky bývají přes sebe neorganizovaně nakupené
  - **kultura je nesmrtelná**
    - při vhodných podmínkách je možná **stálá kultivace** buněk, časově neomezená



- změny v **povrchových antigenech**
  - dochází např. ke ztrátě antigenů **kódovaných MHC**
  - dále dochází k **expresi nových**, pro daný nádor specifických, antigenů nebo k expresi **fetálních antigenů**
- zvýšený **anaerobní metabolismus**
  - mají proto nižší požadavek na množství proteinových **růstových faktorů** v kultivačním médiu
- dochází ke změně **tvaru buněk**
- změněný **počet chromosomů**
  - **heteroploidní** chromosomální výbava – aneuploidie, polyploidie
  - chromosomy transformovaných buněk často vykazují **náhodné nebo nenáhodné** (systematicky se opakující) strukturní **aberrace**
- technika kultivace in vitro též umožnila podat důkaz, že **maligní zvrát** je zakódován v DNA **transformovaných buněk**
  - **experimentální důkaz**, že DNA nádorových buněk nese genetickou informaci odpovědnou za maligní zvrát byl založen na **transfekci** – přenosu DNA z nádorových buněk do buněk normálních
  - DNA izolovaná z různých typů **experimentálních nádorů** (indukovaných chemicky, nádorovými viry nebo ze spontánně vzniklých nádorů) vyvolá v tkáňové kultuře vznik **ložisek nádorových buněk**

## 110. Příčiny vzniku nádorů, kancerogeneze, kancerogeny

- jako kancerogenezi označujeme **několikafázový děj** změny normální buňky na buňku **neoplastickou**

### Maligní transformace a dělení buňky

- u **nádorového bujení** je nejčastěji porušeny regulace přechodu buněčného cyklu z G1 fáze do S-fáze
- **mechanismů regulace** je několik a jsou velmi složité
- tři komplexy **cyklin-dependentních kinas (CdK)** s různými typy **cyklinů**
  - cyklin D + CdK 4
  - cyklin D + CdK 6
  - cyklin E + CdK 2
- **vliv Rb genu**
  - **výsledné komplexy** fosforylují produkt retinoblastomového genu (Rb genu) a to na 10 různých místech
  - mění tak **schopnost Rb** asociovat s ostatními proteiny
  - Rb je místem zásahu pro **transformující viry** jako SV40 large T-antigen, adenovirový E1A a antigen E7 lidského **papilomaviru** (human papillomavirus E7)
  - protein E2F je **transkripční faktor**, který tvoří heterodimer s transkripčním faktorem DP1, čímž se **aktivuje několik genů** nutných pro rozvoj S-fáze
  - znamená to **aktivaci** digyhydrofolátreduktasy, thymidinkinasy, DNA-polymerasy A a genů c-myc, c-myc a cdc 2
  - kromě této **podpory růstových faktorů** podporuje fosforylovaný Rb protein také **diferenciaci** prostřednictvím asociace s **transkripčními faktory** jako je MyoD a aktivovaný transkripční faktor
  - **výsledkem** toho jsou komplexy ATF a cAMP-response element binding proteins (CREB)
  - aktivita CdK je také **regulována inhibitory CdK**, což jsou nízkomolekulové proteiny s obecným **inhibičním účinkem** na řadu cyklin-dependentních kinas nebo se specifický inhibičním účinkem na komplex cyklin D/CdK4 a cyklin D/CdK6
  - **první člen** této rodiny byl identifikován jako p21 který inhibuje jak CdK, tak proliferační **antigen buněčného jádra** (PCNA), což je podjednotky DNA-polymerasy d
  - indukce tvorby p21, vzniklá **aktivací transkripce** prostřednictvím p53 při poškození DNA, zastaví **rozvoj cyklu buněčného dělení** na několika místech, včetně G1 a S-fáze

- to umožní nástup opravného mechanismu DNA
- **je-li poškození DNA** příliš rozsáhlé a tedy neopravitelné, buňka se stává nenormální a je **eliminována apoptózou**
- nedojde-li však k **apoptóze**, vzniklá mutace přetrvává a může být při dělení takto mutované buňky přenesena do **buňky dceřinné**
- vzniká tak fenomén **genové nestability**, který podporuje maligní transformaci
- stává se to častěji ku příkladu u **nosičů genu HNPCC** (hereditární nepolyposní kolorektální karcinom)
- je zde defekt v **opravném čtení**, takže chyba v replikaci DNA není zjištěna a opravný mechanismus není **nastartován**
- maligně transformované buňky se vyznačují především **pokračujícím dělením**
- současně se u nich **snížují požadavky** na přítomnost hormonů a růstových faktorů, které potřebuje normální buňka a které **přicházejí zvnějšku**
- některé **transformované buňky** produkují vlastní specifické růstové faktory (autokrinní stimulace)
- dochází ke ztrátě **schopnosti zastavit růst**
- u normálních buněk totiž **snížení hladiny isoleucinu**, fosfátu, epidermálního růstového a faktoru a dalších látek, které **regulují růst**, pod určitou prahovou koncentrací, navodí přesun do **klidového stavu** (G0-fáze)
- normální buňky začínají růst (dělit se) pouze, když jejich **nutriční požadavky** jsou řádně zajištěny
- **nádorovým buňkám** tato schopnost zastavit růst jako reakce na nedostatek živin a růstových faktorů schází, dokonce **pokračují v proliferaci**, i když přitom mohou zahynout
- předpokládá se, že **většina nádorů** vzniká z jediné buňky a nádorová progresse je výsledkem získané **genetické variability** původního klonu, která umožňuje sekvenční selekci agresivních **subklonů**
- **aberrantní regulace** cyklu buněčného dělení patří mezi klíčové body nádorového bujení
- nádorová buňka má tendenci se **vymknout fyziologickému mechanismu** kontroly dělení buněk
- **mezi faktory**, které se na tom podílejí, patří také Efp (estrogen-responsive RING-finger protein), který kontroluje **odbourávání inhibitorů** buněčného cyklu prostřednictvím **ubikvitinace** a usměřňuje přesmyk růstu nádorů prsu z hormon-dependentního mechanismu na **hormon-independentní**
- tento mechanismus je důležitý při **adenokarcinomu mléčné žlázy** tamoxigenem (antagonista estrogenu) nebo jinými **antagonisty estrogenu** (SERM), když dojde k přesmyku nádorových buněk na typ **hormon-independentních**
- **kritickou složkou ubikvitinace** je E3-ubikvitin-ligasa, která má 2 úlohy
  - působí jako **substrát** pro ubikvitinaci
  - stimuluje vznik E2-ubikvitin-konjugujícího enzymu
- protein, který je touto konjugací **označen**, podléhá rychlé destrukci proteasomy
- **vliv tumor supresoru p53**
  - **tumor supresorový protein p53** (TP53) je jeden z nukleárních proteinů, který má klíčovou úlohu v **regulaci cyklu buněčného dělení** při přechodu z G0 do G1 fáze
  - obsahuje domény pro **vazbu na specifický úsek DNA**, dále oligomerizující a transkripci aktivující domény
  - váže se jako **tetramer** na vazebné místo na určitém úseku DNA a tím aktivuje expresi genů, kódujících faktory inhibující proliferaci a podporující **invazivitu buněk**
  - mutanty genu p53 jsou nalézány u řady **maligních tumorů**
  - pozměněný TP53 ztrácí **schopnost vazby** na příslušný lokus DNA, což vede k nedostatečné produkci faktorů potlačujících nádorový růst
  - **alterace genu p53** se objevuje nejen jako somatická mutace, ale též jako mutace v zárodečných buňkách u některých nádorových onemocnění s familiárním výskytem (syndrom Li-fraumeni)
- **retinoblastoma protein 1** (RB1) je nukleární fosfoprotein s vazebnou aktivitou pro DNA, spolupůsobí s histondeacetylase při inhibici transkripce
- **regulátory buněčného cyklu** maligních nádorů

Gen	Alterace genu	Tumor
gen Rb	delece, bodová mutace	retinoblastomy, osteosarkomy, sarkomy měkkých tkání,

		malobuněčné karcinomy plic, karcinomy močového měchýře a prsu
cyklin D	translokace chromosomů, genová amplifikace	adenom parathyroidey, některé lymfomy, karcinomy mléčné žlázy, hlavy a krku, jater (primární), jícnu
Cdk 4	amplifikace, bodová mutace	glioblastom, sarkom, melanoblastom
p16INK4a/p15INK4b	delece, bodová mutace, methylace	karcinomy pankreatu, oezofagu, plic (malobuněčné), glioblastomy, sarkomy, familiární melanomy a karcinomy pankreatu

### Defekty apoptózy

- **růst nádorových buněk** je umožněn nejen nekontrolovaným buněčným dělením, ale také schopností nereagovat na **apoptotické signály**
- většina nádorových buněk, ne-li všechny, získala **rezistenci vůči mechanismům** vedoucím k jejich **programovanému zániku**
- existují **experimentální důkazy**, že narušení signalizace apoptózy je obecným předpokladem existence a **rozvoje nádorových buněk**
- velmi důležitou úlohu přitom má pravděpodobně **onkogenní potenciál** faktoru rodiny Bcl2, fyziologicky zodpovědného za **brždění apoptózy**
- **gen Bcl2**
  - **Bcl2 gen** (B-cell lymphoma 2) byl původně objeven jako gen napojený na **imunoglobulinový lokus** v průběhu chromosomové translokace u **folikulárního lymfomu**
  - přitom se též zjistilo, že jeho **nadměrná exprese** má spíše než na proliferaci vliv na apoptózu, respektive na **její nerušení**
  - znamená to, že **nascenní neoplastické buňky** získávají touto inhibicí programovaného zániku selekční výhodu
  - mohou **setrvávat zahnízděny** jako ložiska v hostitelské tkáni, zejména v místech, kam se nedostanou **cytokiny a kyslík**
  - tento únik **před apoptózou** je pak podpořen dalšími onkogenními sebezáchovnými mechanismy, které vedou ke vzniku **agresivnějších klonů**
- **defektní apoptóza** též usnadňuje metastázování, protože buňky mohou ignorovat restriktivní signály přicházející z okolí a přežít **odděleně od extracelulární matrix**
- mutace, které favorizují **rozvoj nádoru**, odvracejí odpověď na cytotoxickou terapii a vznikají tak **refrakterní klony**
- úloha Bcl2 a jeho **homologů** v mechanismu inhibice apoptózy spočívá pravděpodobně v ochranném účinku na **integritu mitochondrií** tím, že brání výstupu cytochromu c do cytoplasmy, což znemožní aktivaci **Apaf1** a následně aktivaci **kaspasové kaskády**

### Mitotická nesmrtnost buněk

- **nádorová buňka** se stává mitoticky nesmrtelnou – je to způsobeno zvýšenou **aktivitou telomerasy**
- opakované **dělení buněk** je fyziologicky omezeno zkracováním telomer
- délka telomer se zmenšuje po **mnohonásobných pasážích** (1 buněčný cyklus = zkrácení o 1 telomer) a dále v buněčných kulturách od pacientů v **pokročilém věku**
- jejich obnovování je **katalyzováno telomerasou**
- délka telomer koreluje s **expresí a aktivitou telomerasy**
- z toho důvodu se předpokládá, že **úbytek DNA** od konce chromosomů zkracováním telomer vede k delecí **nezbytných genů**, což má za následek poškození a následnou apoptózu buňky
- **počet telomer** slouží jako generační hodiny, které odpočítávají jednotlivé cykly buněčných dělení a určují tak **životnost buněk** a replikační potenciál
- nádorové buňky mají **replikační potenciál vysoký**
- umožňují jim to nejméně **dva mechanismy**, kterými si udržují dostatečný počet telomer, respektive jejich **obnovování**

- nejběžnější (aktivita prokázána u 85-90% nádorových buněk) je mechanismus **TERT - proteinová komponenta telomerasy**
- jen **malá část nádorových buněk** využívá další mechanismus tzv. alternativní **prodlužování telomer (ALT)**, které umožňuje udržování počtu telomer bez účinku telomerasy

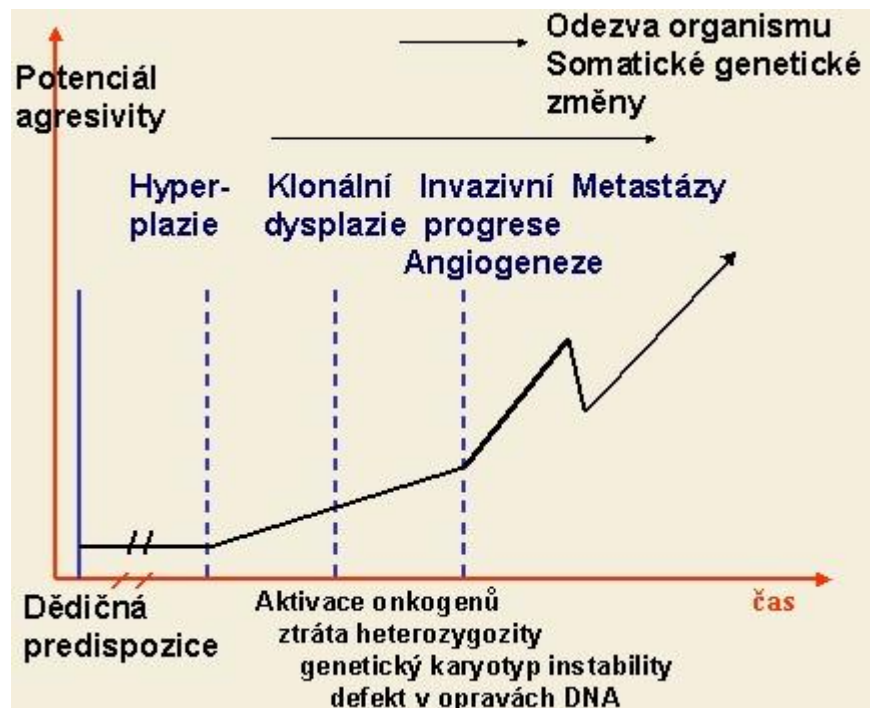
### Maligní transformace buňky

- množení buněk je velmi **pečlivě řízeno** tak, aby odpovídalo potřebám celého organismu
- v časných fázích života jedince **kapacita množení buněk** převažuje nad jejich **zanikáním**, v dospělosti je v dynamické rovnováze, ve stáří začíná **převažovat involuce**
- pro různé typy buněk je to však **různé**
  - **buňky sliznice tenkého střeva** zanikají a jsou obnovovány v několika dnech, podobně jako některé formy leukocytů
  - **životnost červených krvinek** je v průměru 120 dní
  - **hepatocyty** u zdravých dospělých zanikají jen zřídka a nervové buňky rovněž velmi málo, ale nejsou obnovovány vůbec
- některé buňky se však vyhnou **kontrole replikace** (nepotřebují vnější signály, kontrolující jejich dělení, jsou autonomní) a mění se tak na **buňky nádorové**
  - ty, které si alespoň přibližně **zachovávají vzhled** i funkci buněk normálních a především zůstávají stále na místě, kde vznikly, jsou **buňky benigní** a jejich proliferace dá vzniknout **benigním tumorům**
  - buňky, které ztratily **většinu vlastností buněk**, od kterých jsou odvozen a mají snahu pronikat do **svého okolí** (invazivita) i na **vzdálená místa** (metastázy), jsou buňky maligní a tvoří **maligní tumory**
- **maligní nádor** je genetické onemocnění (nemoc DNK), ale jeho exprese začíná v jednotlivé buňce (**monoklonální teorie**)
- jde o **několikastupňový proces**, kdy na úrovni chromosomů dochází k postupnému nahromadění mutací (alterací) genů, **kontrolujících proliferaci** (dělení), diferenciaci a zánik buněk

### Fáze kancerogeneze

- **první mutace** znamená proces vykopnutí
- buňky s **1. a 2. mutací** postupně v nádorové tkáni přerůstají nebo nahrazují buňky s **1. mutací**
- **další mutace** (genetické změny) podněcují buněčnou populaci k větší **agresivitě**
- **subklonální genetická heterogenita** nádoru je odrazem postupujícího vývoje nádorové tkáně
- ačkoli některé **formy nádorů** jsou dědičné, většina vzniká na podkladě mutace **somatických buněk** a je způsobena endogenními chybami v **replikaci DNA** nebo jsou změny vedoucí k **maligní transformaci** navozeny účinkem kancerogenů

- kupříkladu **UV záření** příslušné vlnové délky může být absorbováno bazemi DNA, která je tak poškozena za vzniku **dimerů** dvou sousedních pyrimidinů
- tato změna **překáží** normální transkripci i replikaci DNA



- **účinek X-paprsků** (ionizující záření) je odlišný – dochází k rozštěpení (přerušení) DNA-řetězce a vznikají tak volné řetězce DNA, které musí být beze zbytku opět navázány **opravným mechanismem**
- nestane-li se tak (buňka netoleruje volné konce DNA), může dojít k **translokaci** určitých **úseků chromosomů**, což bývá příčinou aktivace protoonkogenů
- jedna **genetická změna** však nestačí navodit mutagenní transformaci buňky – ta obvykle vzniká až po několika (5-10) **genových mutacích** v průběhu řady let
- **genová alterace** navodí vznik **nádorového fenotypu**, např.
  - proliferace epitelové buňky
  - hyperplazie
  - adenom
  - dysplazie
  - karcinom „in situ“
- **přeměna normální tkáně** organismu do stavu invazivní nádorové choroby trvá v průměru 5-10 let
- ovlivňují to **hereditární genetické faktory** a somatické faktory epigenetické
- **průběh** kancerogeneze bývá členěn do tří stádií
  - **iniciace**
    - **iniciační stádium**, které představuje prvotní genetickou událost, tj. mutaci určitého **kritického genu**
    - jde o období **časově krátké**, ale nevratné
    - **iniciovaným buňkám** přináší růstovou selekční výhodu
    - buňka tak získává **potenciál maligní transformace**
    - v tomto stádiu se může **proces zastavit**
  - **promoce**
    - **promoční stádium**, které trvá léta až desetiletí
    - postižené buňky (klon) jsou stimulovány ještě k **intenzivnější proliferaci**
    - **promoční faktory** samy o sobě nejsou však schopny vyvolat maligní nádorovou transformaci, jen ji **podpořit**
    - **intenzita promočních mechanismů** musí dosáhnout určitého stupně, aby byl iniciovaný klon **stimulován**
    - naopak odstranění **podpůrných faktorů** může proces kancerogeneze zpomalit nebo i zastavit
  - **progrese**
    - **stádium progrese** je charakterizováno dalším postupným nahromaděním **genetických změn** jako je
      - **nekontrolovatelný růst** pro trvalou aktivaci signální transdukce růstového stimulu
      - **alterace kritických bodů** buněčného cyklu
      - **deregulace DNA-transkripčních faktorů**
    - nádor zůstává nejprve na **místě svého vzniku**, ale aktivací dalších faktorů se začne šířit do **nejbližšího okolí** (invaze) a cestou krevního oběhu na místa **vzdálená** (metastázy)
    - velmi důležitou podmínkou pro **růst nádoru** je dostatečný přísun živin a kyslíku, který musí být zajištěn vytvořením **cévního zásobení** (nádorová neoangiogeneze)

## Kancerogeny

- mutace v genech s **onkogenním potenciálem** mohou být spontánní, ale častěji jsou vyvolané faktory **vnějšího prostředí** (mutageny), členěnými na
  - chemické látky
  - fyzikální vlivy
  - biologické vlivy
- **chemické látky**
  - polycyklické a aromatické uhlovodíky, chlorované uhlovodíky, aromatické aminy, nitrosaminy, azbest, těžké kovy, mykotoxiny a další

- **většina kancerogenně působících chemických látek** je v organismu aktivní až po jejich přeměně na **vlastní kancerogeny**
- při **metabolické aktivaci** chemických látek se uplatňuje individuální genetická dispozice jedince, která následně ovlivňuje **frekvenci nádorových onemocnění**
- na vzniku **chemicky indukovaných nádorů** trávicího traktu mají velký podíl nevhodné dietetické návyky – vliv nevhodné skladby a přípravy potravy se kumuluje s účinkem kancerogenních látek
- do **přímé souvislosti** s dietetickými návyky je dáván vznik nádorů tlustého střeva
- mezi **nejrizikovější potraviny** patří živočišné tuky a produkty, které je obsahují
- **nevhodná úprava potravin** – smažení, pečení, uzení – v nich zvyšuje obsah kancerogenních látek (nitrosaminů, polycyklických aromatických uhlovodíků)
- za vhodnou, až **protektivní stravu**, je považováno ovoce, zelenina, luštěniny (obsahují vitaminy, chemoprotektivní látky detoxikující kancerogeny) a potraviny s vysokým **obsahem vlákniny** (rozpuštěné – pektiny a slizy, nerozpuštěné – celulóza, lignin), které napomáhají **trávení** a vyprazdňování trávicího traktu
- **fyzikální vlivy**
  - kancerogenní jsou **UV záření, ionizující záření** (např. gamma záření, rtg)
  - záření zvyšuje riziko výskytu některých **typů nádorů** (ionizující záření například leukémií, záření UV nádorů kůže)
  - **ionizující záření** vyvolává zejména zlomy a přestavby chromosomů nebo chromatid, pro UV záření je typický vznik **dimerů thyminu**
  - obdobně jako u chemické **kancerogeneze** i frekvence výskytu nádorů vyvolaných zářením je ovlivněna zejména **činností genů pro reparaci** vzniklých chyb DNA
  - za statistických studií na souborech rodin vyplynulo, že potomci rodičů vystavených **vlivu kancerogenů** nebo mutagenů mohou získat **predispozici** k nádorovým onemocněním vznikem mutací v **prezygotickém stádiu** zárodečných buněk vystavených těmito **faktorům** (gametické mutace)
  - v případě **profesionální expozice** záření dokonce zaznamenán větší počet postižených dětí v **jedné rodině**
- **životní prostředí a životní styl** jsou významnými činiteli ovlivňujícími kancerogenezi – ovlivněním těchto faktorů lze možností nádorového onemocnění předcházet
- **biologické vlivy**
  - mezi **nádorová onemocnění**, vyvolaná biologickými vlivy patří nádory **virové etiologie**
  - do současné doby **identifikovány** v této souvislosti u lidí **viry**
    - **DNA viry ze 4 odlišných rodin** – herpesviry, hepadnaviry, papovaviry a adenoviry
    - **RNA viry** – retroviry
  - **lidské papilomaviry** jsou prokazatelně ve vztahu k maligní transformaci – příčina vzniku karcinomu děložního čípku, papilomatosy hrtanu a dlaždicobuněčného karcinomu ústní sliznice
  - **EB virus** (rodina herpesvirů) je asociován s B buněčnými lymfomy
  - **hepatitida B (HBV)** má prokazatelnou souvislost se zvýšeným výskytem hepatocelulárního karcinomu
  - **vysoký endemický výskyt** těchto karcinomů je v Jižní Africe a v souvislosti se **špatnými dietetickými návyky** se ještě uplatňuje kancerogenní účinek aflatoxinu B (z plísně) – kumulací těchto dvou vlivů je **zvýšená frekvence** hepatokarcinomů
  - **cílovým genem** pro mutagenesu je **TP53** – bodové mutace podmiňují maligní transformaci
  - **virus HIV** (human immunodeficiency virus) je asociován s výskytem **Kaposiho sarkomu a B lymfomu**
  - další lidský **retrovirus HTVL-1** je uváděn jako příčina T buněčné leukémie dospělého věku a **HTVL-2** byl izolován z T buněčné vlasaté leukémie (hairy cell leukémie)
  - **onkogenní viry** se při maligní transformaci nechovají jako infekční agens – maligní zvrát buňky nastává, když **virus ovlivní DNA hostitelské buňky** a působí zde jako **onkogenní faktor**
  - **integrace papilomaviru** do genomu eukaryotní buňky je příklad ovlivnění genů hostitelské buňky **regulační oblasti genomu viru**

- u **Burkittova lymfomu** je to EB virus, asociován se **strukturální aberací** typu translokace
- u **TP53 u hepatomů**, kdy za indukční je považován virus hepatitidy B, se jedná o **bodovou mutaci** typu substituce
- někdy při indukci **maligní transformace** působí virové onkoproteiny DNA virů, virové antigeny (onkoproteiny) se váží s **proteinem p53 a inaktivují ho**
- **Burkittův lymfom**
  - nejznámějším a nejstudovanějším lidským nádorem **virové etiologie** je **Burkittův lymfom** a **nasofaryngeální karcinom** – podmíněn mutagenním účinkem **EB viru**
  - má významný **územní výskyt** u dětí v oblasti **rovníkové Afriky**
- u nádorů s virovou etiologií se obvykle **kumulují s virovým vlivem** i vlivy **vnějšího prostředí** a dietetické a hygienické návyky rodiny
- **imunologie**
  - vznik nádorů závisí také na **imunologickém stavu** jedince či celé populace – u Burkittova lymfomu a dětí rovníkové Afriky se mluví o souvislosti s vysokým výskytem **původce malárie** (plasmodium)
  - **plasmodium** ve svém hostiteli vyvolává imunodeficienci a tím znemožňuje eliminaci vznikajících **maligních buněk** imunitním systémem
  - v současné době popsána existence dalších nádorů s **indukčním agens EBV** – Hodgkingův lymfom a určité typy T buněčných lymfomů
  - onemocnění tohoto typu není vázáno na **určité území**, ale souvisí s **imunologickým stavem** jedince
  - **imunosuprese** navozená např. léky nebo získaná (např. AIDS) zvyšuje frekvenci výskytu nádorů asociovaných s **virovou infekcí**

## 111. Protoonkogeny, onkogeny

- 
- první **identifikace genu** zodpovědného za **maligní transformaci** byla provedena při výzkumu **nádorových RNA virů** (retrovirů) izolovaných z nádorů experimentálních zvířat
  - u **onkogenních retrovirů** je genom tvořen RNA uzavřenou v **glykoproteinovém obalu**
  - do eukaryotní buňky vniká **virová RNA**, která je přepsána do molekuly DNA virovou **reverzní transkriptasou** (RNA-dependentní-DNA-polymerasa)
  - ta se včlení do **buněčného genomu** a začne se chovat jako buněčný gen
  - **místo integrace** je nespecifické
  - buněčná RNA-polymerasa II může virový **genom transkribovat** na RNA molekuly identické s původním **virovým genomem**
  - **onkogenní viry** se ale nemusí vždy chovat jako **infekční agens** – když nedojde ke kompletní replikaci a uvolnění virových partikulí, mohou tyto viry **transformovat normální buňky** na buňky **nádorové**
  - podle schopnosti **vyvolat nádory** u laboratorních zvířat můžeme onkogenní retroviry rozdělit do dvou kategorií podle **odlišného genomu**

- **pomalou** transformující retroviry
- **rychle** transformující retroviry
- **genom pomalu transformujících retrovirů**
  - **obsahuje jen 3 geny**
    - **gen gag**: kóduje kapsidové proteiny
    - **gen pol**: nese informaci pro reverzní transkriptasu
    - **gen env**: nese informaci pro syntézu specifických glykoproteinů, které tvoří složky virového obalu
  - transformace buněk těmito viry nastává po **dlouhém období latence**
  - **maligní transformace** buněk virem ze skupiny pomalu transformujících onkogenních retrovirů je důsledkem **různých změn**, které může retrovirus navodit v genomu **hostitelské buňky**
  - může to být například mutace vyvolaná **integrací retroviru** do genomu hostitelské buňky nebo **zvýšení aktivity** (enhancement) některého z buněčných protoonkogenů vlivem regulační oblasti **genomu retroviru** (LTR oblast – long terminal repeats)
  - **regulační sekvence LTR** retroviru umožňují integraci virové DNA, která vznikla reverzní transkripcí, do DNA **hostitelské buňky**
  - **LTR** obsahují nezbytné **regulační sekvence** pro transkripci DNA proviru
  - pokud je **integrace virové DNA** poblíž buněčného protoonkogenu (c-onc), je i jeho transkripční aktivita zvýšena **působením sekvencí LTR** virového genomu
  - pomalu transformující retroviry nejčastěji vyvolávají **leukémie** u koček, myši a kuřat
- **genom rychle transformujících retrovirů**
  - má vedle **3 základních genů** (gag, pol a env) ve svém genomu ještě jeden další gen – **virový onkogen** (v-onc)
  - ten kóduje **protein** odpovědný za **onkogenezi**
  - prvním objeveným genem této kategorie je **virus Rousova sarkomu** izolovaný z nádoru kuřat
  - rychle transformující viry se liší od předchozích tím, že **maligní transformaci** vyvolává v-onc lokalizovaný v jejich **genomu**
  - jsou uchovávány obvykle jen v **experimentálních podmínkách** a nádory vyvolají po injekční aplikaci virových partikulí izolovaných z **nádoru**
  - nádory pak vznikají během **2-3 týdnů**
  - nevyvolávají běžně **spontánní nádory** v populaci živočichů
- **Rousův sarkom** (model studia onkogenů)
  - detailní **výzkum virového onkogenu v-src** (retrovirus z Rousova sarkomu kuřat) metodou molekulární genetiky objasnil jeho **původ**
  - **provirová DNA** byla klonována v bakteriofágu, po získání dostatečného množství provirové DNA byla rozštěpena **restrikčními endonukleasami**
  - gen v-src byl izolován, vložen do **plasmidu** a pomnožen
  - čistá DNA nesoucí v-src byla použita k **transformaci kuřecích fibroblastů**
  - **transformace fibroblastů** izolovaným genem v-src byla úspěšná
  - metodou **DNA hybridizace**, která porovnávala strukturu onkogenu v-src s DNA izolovanou z normálních buněk kuřat bylo **prokázáno**, že onkogen v-src **není virového původu**, ale jde o kopii genu, který se nachází ve **všech kuřecích buňkách**
  - onkogen v-src je tedy **kopíí exonů** jednoho z buněčných **protoonkogenů**
  - **virový onkogen** byl pravděpodobně původně součástí **genomu eukaryotní buňky** a z genetického materiálu **hostitelské buňky** jej transdukcí náhodně získal předchůdce **Rousova viru**
  - na základě této studie byly identifikovány z **nádorů různých živočichů** další virové **onkogeny**
  - tento objev poukázal na **existenci buněčných genů** se skrytým **onkogenním potenciálem**
  - později byla objevena celá skupina **buněčných protoonkogenů** příbuzných s geny v-onc retrovirů
  - dále byly izolovány a identifikovány i **onkogeny** nádorových buněk – **celulární onkogeny** (c-onc), které vznikly mutacemi **buněčných protoonkogenů**
  - v současnosti identifikováno více než **100 různých lidských onkogenů** v nádorech



## Úloha protoonkogenů v regulaci buněčného množení

- **protoonkogeny** se podílejí na regulaci **buněčné proliferace**, regulaci průběhu buněčného cyklu, diferenciace, vývoje, stárnutí, programované buněčné smrti (apoptóze), imunitní odpovědi a karcinogenezi na všech úrovních **signálních drah**
- **produkty protoonkogenů jsou**
  - **růstové faktory**
    - **protoonkogen sis** kóduje část **biologicky aktivního** b-řetězce růstového faktoru **PDGF** (růstový faktor odvozený od krevních destiček)
    - **protoonkogen hst** kóduje růstový faktor fibroblastů **FGF**
    - v nádoru prsu, jícnu a u maligních melanomů je hst amplifikován a jeho zvýšená exprese má podíl na **maligní transformaci**
  - **receptory růstových faktorů**
    - nejčastěji mají **tyrosinkinasovou aktivitu** – jedná se tedy o enzymy, které fosforylují tyrosiny cílových proteinů nebo o proteiny s **tyrosinkinasovými doménami**
    - patří sem **protoonkogen HER-2/neu** (human epidermal growth receptor)
    - patří do rodiny 4 protoonkogenů kódujících receptory pro **epidermální růstové faktory** (EGFR) s tyrosinkinasovou aktivitou
    - v mutované **hyperaktivní formě** se vyskytuje v gliomech, amplifikace tohoto genu bývá také v buňkách **karcinomu prsu**
  - **proteiny vázající GTP – G-proteiny**
    - jde o **intracelulární proteiny** (GTPasy), které působí spolu s tyrosinkinasami
    - podílejí se na regulaci **buněčné proliferace**
    - mezi G-proteiny patří např. produkty **protoonkogenů rodiny ras**
    - **mutované protoonkogeny** (onkogeny c-ras) kódují protein, jehož aktivita není regulována **střídáním vazby** s GTP nebo s GDP (aktivace nebo inaktivace ras proteinu) – v důsledku toho není **ras onkoprotein** schopen ukončit signál stimulující **množení buněk**
    - nalézají se v buňkách **různých nádorů**
  - **tyrosinkinasy lokalizované v plasmatické membráně**
    - produkty **protoonkogenů abl a src** patří mezi proteiny s aktivitou tyrosinkinasy
    - umožňují přenos signálů z plasmatické membrány do **cytoplasmy**
  - **cytoplasmatické proteiny**
    - přenos **signálů cytoplasmou** do jádra, které jsou vyvolané růstovými faktory, diferenciačními hormony, cytokiny, mobilizací iontů kalcia, kyslíkovými radikály nebo látkami poškozujícími DNA, je regulován produkty mnoha **protoonkogenů**
    - spolu s **produkty protoonkogenů rodiny ras** zajišťuje přenos těchto signálů cytoplasmou také např. **protoonkogen raf-1**
    - jeho produkt – proteinkinasa Raf-1, neboli první MAP-kinasa, má **regulační úlohu** v kaskádě přenosu signálů zprostředkovaných **proteinkinasy**
  - **transkripční faktory**
    - protoonkogeny fos, jun, erb-A, myc kódují proteiny se specifickou funkcí – **transkripční faktory**
    - jsou aktivovány **MAP-kinasami** a jejich produkty podněcují nebo tlumí transkripci **cílových genů** pro regulaci jednotlivých úseků **buněčného cyklu**
  - **proteiny kontrolující průběh buněčného cyklu**
    - protoonkogeny myc a myb stimulují **přechod z G1 do S fáze**, zvýšená exprese vede ke zkrácení klidového stádia fáze G1 před vstupem do S fáze buněčného cyklu
    - tím je omezen čas pro **opravy DNA** (omezení tzv. velkého repairu)
- u různých protoonkogenů byly nalezeny velké **podobnosti** mezi různými živočišnými druhy, např. i u člověka, myši, kvasinek nebo drosophily
- **mutace** v jednom z párových protoonkogenů na homologních chromosomech je **dostatečná pro změnu** regulace buněčné aktivity, na které se tento protoonkogen podílí
- mutace protoonkogenů byly dosud převážně detekovány jen v **somatických buňkách** a mají charakter **dominantní mutace**

## Mechanismy měnící funkci protoonkogenů

- **bodové mutace**
  - příkladem genu, který je často mutován, je **protoonkogen H-ras**
  - jediná **záměna báze** kodonu 61 pro leucin (CTG) na kodon pro kyselinu glutamovou (CAG) ho mění na **celulární onkogen** asociovaný se vznikem **melanomu**
  - v buňkách **maligních melanomů** se vyskytují i další geny s bodovými mutacemi, např. gen pro cyklin-dependentní proteinkinasy Cdk 4
- **ovlivnění protoonkogenu virovým promotorem**
  - **insercí promotoru** retroviru poblíž nebo do sekvence protoonkogenu
- **amplifikace protoonkogenů**
  - **tandemové multiplikace**, které mnohonásobně zvyšují počet kopií protoonkogenu
  - **amplifikované sekvence DNA** se mohou vyskytovat v nádorových buňkách ve dvou formách – jako **homogenně zbarvené** oblasti chromosomu (HSRs) nebo malé samostatné chromosomy nazývané **double-minute chromosomy**
  - DNA amplifikace je projev **genetické nestability**
  - amplifikace určitých genů jsou pro nádory **diagnostickým a prognostickým markerem**
    - lidské **malobuněčné karcinomy** plic mají amplifikován gen c-myc, N-myc nebo L-myc
    - N-myc protoonkogen je též amplifikován u 30% **neuroblastomů**, u pokročilých onemocnění až u 50% nádorů
    - amplifikace typická též pro **HER2/neu**, který je součástí sítě signálů regulujících růst, diferenciaci a přežívání buněk mnoha tkání s výjimkou buněk **hematopoetického původu**
    - bývá amplifikován u několika typů nádorů – **karcinom prsu** nejvíce
    - stanovení nebo vyloučení této amplifikace spolu s dalšími ukazateli má význam pro volbu terapie a prognózu u 20-30% **karcinomů prsu**
    - další často **amplifikované protoonkogeny** u lidských nádorů jsou abl, K-ras, N-ras, EGFR a N-myc
- **chromosomální translokace**
  - zahrnují přemístění **protoonkogenů**
  - mohou vyvolat **2 typy změn**
  - **změna regulace transkripce**
    - změna **kvantitativní**
    - například zvýšené množství **produkce růstového faktoru** vyvolá zvýšení podnětů pro množení buněk
    - u **Burkittova lymfomu** je část chromosomu 8 translokována do blízkosti **imunoglobulinového lokusu**, nejčastěji IgH na chromosomu 14 – t(8;14) – 75% případů
    - tím se protoonkogen c-myc, lokalizovaný na chromosomu 8, dostává pod vliv **regulační oblasti** imunoglobulinového genu, který vyniká **vysokou transkripční aktivitou**
    - u zbývajících 25% onemocnění Burkittovým lymfomem se nalézá translokace t(2;8) nebo t(8;22) kde je protoonkogen c-myc přemístěn do **blízkosti lokusů** pro geny **lehkých řetězců imunoglobulinů (IgL)**
  - **změny ve struktuře genu**
    - následkem je syntéza **změněného produktu** (kvantitativní změna)
    - **odlišný produkt** (chimérický onkoprotein) je pak příčinou poruchy **regulace množení buněk**
    - **struktura genu** je většinou změněna **bodovou mutací** (substitucí nebo mikrodelecí)
    - u některých **hematologických malignit** bývá struktura genu změněna translokací, která je příčinou vzniku **chimerického (fúzního) genu**
    - např. pro **chronickou myeloidní leukémii** je charakteristická přítomnost **Filadelfského chromosomu**
      - vzniká **reciprokou translokací**, která přemístí část **protoonkogenu** c-abl z dlouhých ramének chromosomu 9(9q34) na dlouhá raménka chromosomu 22(22q11), kde se nachází lokus zvaný bcr (**break cluster region**)

- **neúplná sekvence** genu bcr (5' konec s promotorem a několika prvními exony) fúzuje s částí c-abl protoonkogenu (je zkrácen o 5' konec a první exon)
- produkt fúzovaného genu je **hybridní protein** značený p210<sup>bcr/abl</sup> s **tyrosinkinaseovou aktivitou**
- in vitro bylo potvrzeno, že tento protein je schopen navodit **maligní transformaci**

## 112. Tumor supresorové geny

---

- **druhý typ** genů po protoonkogenech, který má zásadní úlohu v **maligním procesu**, jsou **tumor-supresorové geny**
- produkty tumor-supresorových genů **regulují** zejména průběh **dělení buněk**, některé z nich se také účastní **procesu reparace DNA**
- k poruše **kontroly buněčného cyklu** vedou mutace **obou alel** určitých **tumor-supresorových genů** (např. bodové mutace, delece) nebo také **inaktivace proteinu**, který kódují
- např. **protein p53** je inaktivován vazbou s **antigenem** onkogenního **DNA viru**
- na rozdíl od protoonkogenů mutace v tumor-supresorových genech mají **recesivní charakter**

### Retinoblastom, gen Rb1

- jedná se o tumor supresorový **gen Rb1**, který v případě mutace způsobuje vznik **retinoblastomu**
- **retinoblastom**
  - je maligní nádor **oční sítnice**
  - tento nádor v **časném dětském věku** (před 5. rokem) postihuje vyvíjející se buňky retiny
  - včasná diagnosa umožňuje **lokální terapii** (laserem) vyléčit postižené oko a zachovat **schopnost vidění**
  - při pozdní diagnose musí být postižené oko **chirurgicky odstraněno**
  - včas neléčené onemocnění končí **smrtí pacienta**
- **statistické údaje** o výskytu retinoblastomů ukázaly, že postižené dítě se může v rodině vyskytnout **sporadicky** – jde tedy o nedědičnou formu onemocnění a pak nález malignity je **unilaterální** a nádor vzniká v pozdějším věku dítěte
- v některých rodinách však lze zaznamenat **výskyt retinoblastomu** s frekvencí odpovídající **autosomálně dominantnímu typu dědičnosti**
- v takovém případě jde o **hereditární výskyt** nádorového onemocnění
- nádory tu vznikají dříve než při **sporadickém výskytu** a postižení očí je často **bilaterální** a **multifokální**
- na základě statistické analýzy byla vypracována **Knudsonova hypotéza** dvou zásahů do homologních chromosomů – **dvou nezávislých mutací** tumor-supresorového genu, která vysvětluje sporadický a hereditární výskyt retinoblastomu
- **hereditární forma**
  - postižené dítě zdědilo jednu **nefunkční** (mutovanou) alelu genu Rb1, která je přítomna ve všech buňkách (zárodečná mutace)
  - druhá alela genu Rb1 je **inaktivována** (mutována) až v buňce sítnice (somatická mutace)
  - přítomnost **zárodečné mutace** vysvětluje bilaterální a multifokální fenotyp
- **sporadická forma**
  - onemocnění vzniká po **dvou nezávislých somatických mutacích** v tomtéž retinoblastu
  - proto se nádory vyskytují **později**, unilaterálně a unifokálně
- **chromosomální vyšetření buněk** retinoblastomu často zachycovala **mikrodelece** na obou homologních chromosomech 13 v oblasti 13q14

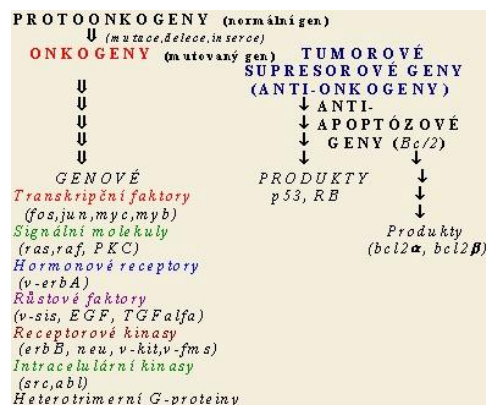
- **chromosomální vyšetření lymfocytů nebo fibroblastů** pacienta s retinoblastomem ale přinesla **2 typy nálezů**
  - pacienti s **hereditárním typem** onemocnění měli již v lymfocytech nebo fibroblastech nalezen **jeden chromosom 13** s delecí v dané oblasti, v buňkách retinoblastomu pak tato mutace byla přítomna na **obou homologních chromosomech**
  - pacienti se **sporadickým typem** onemocnění měly mutaci pouze v **nádorových buňkách**
- **karyologické nálezy** lokalizovaly gen na chromosomu 13 a ukázaly, že **vznik retinoblastomu** je podmíněn primárně **mutacemi obou alel** genu Rb1
- **sekvenční analýza DNA** izolované z periferní krve a z retinoblastomů pacientů s hereditárním výskytem potvrdila **teorii dvou zásahů**, vedoucích ke ztrátě funkce Rb1
- navíc v **nádorových buňkách** byla zaznamenána **ztráta vrozené heterozygosity** (LOH - loss of heterozygosity) na chromosomu 13 pro **řadu genů**, lokalizovaných **poblíž Rb1**
  - **vazebnou analýzou** prokázána těsná vazba s genem pro esterasu D
  - pacient, která je **heterozygotem** v tomto genu v somatických buňkách má v nádorové tkáni gen pro esterasu D buď v **homozygotní** nebo **hemizigotní** formě
  - LOH byla nalezena na určitých chromosomech i u **jiných typů nádorů**
- **ztráta funkce Rb1 je nejčastěji z důvodu delecí**
  - **delece** mohou postihnout různé oblasti genu a deletované oblasti nemusí být totožné v obou alelách genu Rb1
- **ztráta funkce** ale může být způsobena také **mitotickou nondisjunkcí**, mitotickou **rekombinací**, unipaternální **disomií** (oba chromosomy původem od jednoho z rodičů), chybným **sestříhem** při posttranskripční úpravě mRNA nebo **bodovou mutací**
- **gen Rb1** je 4,7 kb dlouhý a funkčním produktem je **jaderný protein p105**, jenž se uplatňuje při regulaci **transkripce**
- **inaktivuje** buněčné **transkripční faktory** genové rodiny E2F, které jsou nezbytné pro expresi genů kódujících proteiny pro **replikaci DNA** (DNA-polymerasa alfa, PCNA - proliferating cell nuclear antigen) kooperující s **DNA-polymerasou delta**
- **Rb protein** je inaktivován fosforylací a aktivován defosforylací
  - **fosforylace** závisí na funkčním stavu komplexu vzájemně **kooperujících cyklinů** a Cdk a jejich **inhibitorů**, tzn. proteinů podílejících se na **regulaci přechodu G1 fáze do S fáze**
- **analýza DNA** dalších tumor-supresorových genů, které jsou **asociovány s nádory jiných tkání** prokázala, že nejčastějším **typem mutace** v těchto genech jsou **delece** - patří sem např. maligní melanom, nádor močového měchýře, nádor děložního čípku, několik typů karcinomu prsu a plic, nádor tlustého střeva a rekta a Wilmsův nádor ledvin

### Tumor supresorový gen TP35

- tento gen má **výjimečný význam** pro kontrolu **buněčného cyklu**
- TP53 je lokalizován na chromosomu 17p13
- obsahuje 293 kodonů a obdobně jako Rb1 reguluje **průběh interfáze**, ale s větším rozsahem **působení**
- je označován jako **strážce genomu**
- reaguje na **poškození DNA** dočasným zastavením buněčného cyklu mezi G1 a S fází, kde existuje **první kontrolní bod** buněčného cyklu
  - zastavení buněčného cyklu umožňuje **kontrolu poškození DNA** před replikací a **reparací** získaných mutací (tzv. velký repair - opravy)
  - **gen TP53** není přímo zodpovědný za **pozastavení buněčného cyklu** ani za reparaci - zahájení a trvání **klidového stádia** kontroluje prostřednictvím genů, jejichž transkripční **aktivitu** řídí
  - **produkt** funkčního genu TP53 je **protein p53**, který má funkci transkripčního faktoru - **tetramery proteinu** se váží s promotory mnoha genů a aktivují jejich **transkripci**
  - tyto geny většinou produkují proteiny, které **inaktivují komplexy cyklinů s Cdk**
- gen TP53 se uplatňuje i v **druhém kontrolním bodě** interfáze mezi S a G2 fází - pozastavení umožňuje **postreplikační repair**
- další funkcí **genu TP53** je vyvolání a koordinace geneticky programované buněčné smrti - **apoptosy**, když reparace DNA **není úspěšná**

• **mutace genu TP53**

- mutovaný gen není schopen **udržet poškozené buňky** v G1 fázi a umožnit reparaci DNA
- v **S fázi** jsou při replikaci chyby duplikovány a fixovány v **buněčném klonu**
- mutovaný gen TP53 se vyskytuje u více než 50% **lidských malignit**
- změna jeho aktivity je vyvolána nejčastěji **bodovými mutacemi** se záměnou jedné amk
- **variabilita mutací** (lokalizace sekvencí a jejich typy), které vedou ke **změně normální funkce** genu je vysoká
- aby ale bodová mutace vyvolala **změnu** vedoucí k **maligní transformaci**, musí zasáhnout určité oblasti genu



- za souboru **1300 pacientů** s různými typy malignit (nádory tlustého střeva s nebo bez předcházející adenomatosní polyposy, s nádory prsu, plic, jater, močového měchýře apod.) bylo stanoveno, že přibližně 84% mutací jsou **missense mutace** (záměna amk), 10% jsou **delece** a nebo **inserce** a 6% **nonsense mutace**
- obdobné mutace v TP53 byly nalezeny jak u **sporadicky** tak **hereditárně** se vyskytujících **nádorů**
- nádory s **častým výskytem TP53** mutace jsou např. nádory plic, prsu, ovarií, tlustého střeva, hlavy a krku
- **okoprotein p53**, produkt **mutovaného tumor-supresorového genu** TP53, má odlišné vlastnosti než **původní protein** – stává se stabilnějším a dochází k jeho **akumulaci** v nádorových buňkách
- **ztráta schopnosti** pozastavit buněčný cyklus v G1 fázi může nastat nejen jako důsledek mutace TP53, ale také po **inaktivaci proteinu p53**
- **onkoproteiny některých DNA virů** (DNA virů s onkogenním potenciálem) se váží s proteinem p53 a **inaktivují** jej

**Tumor supresorové geny BRCA**

- při **familiárním výskytu** nádoru prsu nebo prsu a ovarií jsou v genetickém poradenství využívány **dva tumor-supresorové geny BRCA1** (breast cancer 1) a **BRCA2** (breast cancer 2)
- **produkty** obou genů BRCA tvoří **komplexy s produkty dalších genů** a podílejí se tak na regulaci průběhu **buněčného cyklu** a při **repairu DNA**
- **děděná mutace BRCA1** se vyskytuje u žen v rodinách s familiárním výskytem nádoru prsu, ovarií anebo prsu a ovarií
- **zárodečná mutace genu BRCA2** je asociována s výskytem nádoru prsu u žen i mužů; u mužů také se vznikem nádoru prostaty, pankreatu a s Fanconioho anemií
- **přehled** některých recesivních onkogenů **podmiňujících nádorová onemocnění**

Symbol	Název	Nádorové onemocnění
APC	Gen adematózní polypózy tlustého střeva	Kolorektální karcinom Karcinom pankreatu Desmoidy Hepatoblastom
BRCA1	Gen 1 pro familiární karcinom prsu/vaječníku	Hereditární karcinom prsu / ovaria
BRCA2	Gen I1 pro familiární karcinom prsu/vaječníku	Hereditární karcinom prsu / ovaria
CDH1	Gen pro kadherin 1	Familiární karcinom žaludku Lobulární karcinom prsu
CDNK2A	Gen inhibitoru cyklin-dependentní kinasy 2A (p16)	Maligní melanom kůže
EP300	Gen vazebného proteinu 300 kD-E1A	Karcinomy kolorektální, pankreatu, prsu

## 113. Mutátorové geny, stabilita buněčného genomu

- **mutátorové geny** (geny DNA repairu) kontrolují **opravné systémy nukleových kyselin**
- odpovídají ze **reparaci poškození** (opravy chyb) v DNA jako jsou
  - **chybná párování** nukleotidů během replikace (mismatch repair)
  - **chyby v délce** repetitivních sekvencí, např. CA, které vzniknou během replikace v důsledku tzv. **klouzáni DNA-polymerasy** nebo při modifikaci purinu mutagenem
  - **reparace excizí** jakkoli chybně replikovaných úseků DNA
- **mutace nebo inaktivace** těchto genů vedou k hromadění a udržování mutací v buňce a k **nestabilitě genomu**
- **zvýšená frekvence a kumulace** mutací v buňce je jednou příčin **maligní transformace**
- **mutátorové geny**, na rozdíl od onkogenů a mutovaných tumor-supresorových genů, neposkytují buňce **schopnost nekontrolované proliferace** samy o sobě - mutace mutátorových genů vede ke **zvýšené frekvenci** mutovaných onkogenů a tumor-supresorových genů, 100 až 1000krát
- **mutace genů pro excizní reparaci**
  - patří sem geny, jejichž produkty zajišťují **vystřížení poškozeného úseku DNA** a umožňují excizní opravný proces
  - jejich **recesivní mutace** způsobuje onemocnění zvané **xeroderma pigmentosum** a **Cockayenův syndrom**, což jsou prekancerózy se zvýšenou náchylností ke **karcinomům kůže** navozeným expozicí na UV-záření
- mutace genů pro opravu **chybného párování bází** (MMR - mismatch repair geny)
  - ve fenotypu se projevují **nestabilitou délky mikrosatelitních lokusů**
  - chybné párování bází vyvolá změnu v délce mikrosatelitních sekvencí - jejich prodloužení nebo zkrácení
  - **nestabilita délky mikrosatelitních** sekvencí vede k replikačním chybám
  - mutace mají **recesivní charakter**, obdobně jako mutace tumor-supresorových genů
  - tento typ mutací je charakteristický např. pro **Lynchův syndrom I a II**
  - **mikrosatelitní sekvence** jsou umístěny po celém genomu
  - jejich délka je dědičná, jsou to **repetitivní sekvence dinukleotidů nebo trinukleotidů**
  - nejběžnější repetitivní sekvence eukaryot je **CA**
  - v lidském genomu se vyskytuje 50 000 - 100 000 repetitivních CA
  - příkladem nádoru, u kterého se vyskytují **mutace mutátorových genů**, je dědičný nádor tlustého střeva bez předcházejícího polypózního stádia (**HNPCC - hereditary non polyposis colon cancer**)
    - **HNPCC** provázený jen výskytem karcinomů tlustého střeva, a nebo také rekta, je označován jako **Lynchův syndrom I**
    - u přibližně **30% HNPCC** pacientů vznikají navíc karcinomy v dalších orgánech (endometriu, žaludku, slinivce, močovém traktu) - tato skupina je označována jako **Lynchův syndrom II**
    - Lynchův syndrom I a II je děděn **autosomálně dominantně**
    - za **hereditární výskyt** je považováno postižení 3 a více členů rodiny
    - postižení se musí vyskytnout ve **dvou po sobě jdoucích generacích** a alespoň u jednoho postiženého musí být nádor **diagnostikován ve věku nižším než 50 let** (Amsterodamská kritéria)
  - **nestabilita mikrosatelitních sekvencí** se vyskytuje i u sporadických případů **kolorektálních karcinomů** bez předcházejícího polyposního stádia, ale u menšího procenta než při **hereditárním výskytu HNPCC**
  - nestabilita mikrosatelitních sekvencí byla také popsána u několika dalších typů nádorů
  - **příklady** prozkoumaných mutátorových genů

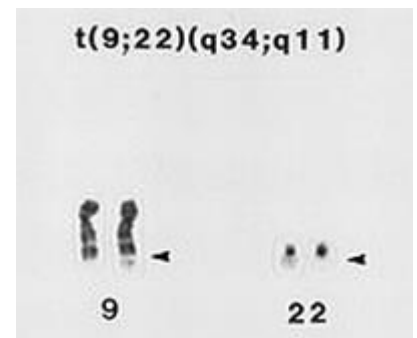
hMSH2	HNPCC, typ 1, nádory ovarií, glioblastomy, T-buněčné lymfomy
hMSH6	HNPCC, typ 5, nádory ovarií, karcinom endometria
hMLH1	HNPCC, typ 2, Turcottův syndrom provázený výskytem glioblastomů a leukémií

hPMS1	protein kódovaný tímto genem tvoří heterodimery s proteinem kódovaným genem hMLH1, byl detekován v mutované formě v některých HNPCC
hPMS2	HNPCC, typ 4, Turcottův syndrom provázený výskytem glioblastomů

- **Turcottův syndrom** je klinicky charakterizován jako koincidence hereditárního výskytu primárních nádorů tlustého střeva (FAP nebo HNPCC) s nádory centrálního nervového systému, případně s leukémií
- **defekty DNA-opravného mechanismu** přispívají k akumulaci genetických defektů, podporují **progresi** maligně transformovaných buněk

## 114. Chromosomové aberace v nádorových buňkách

- **chromosomové změny** při neoplasiích byly odhaleny pomocí **detailního proužkování**
- to vedlo k **detailním poznatkům** o chromosomových změnách při rakovině
- **maligní buňky** většiny nádorů mají chromosomové změny, mnohé z nich jsou stále
- **typické aberace** jsou
  - **delece**
  - **vyvážené translokace**
    - bývá postižen jeden chromosom pravidelně, i místo zlomu na tomto chromosomu je stále
    - další zúčastněný chromosom může být vždy jiný
  - **trisomie některých chromosomu**
    - méně časté
- **stálé změny**
  - diagnostikované při **lidských nádorech**
  - **nenáhodné, primární změny**
  - **chronická myeloidní leukémie**
    - reciproká translokace t(9q;22q)
    - vyskytuje se asi v 95% chronické myeloidní leukémie u dospělých
    - aberace se nazývá **Philadelphský chromosom** (dle místa objevu)
  - **Burkittův lymfom**
    - nádorově transformované B lymfocyty jsou odstraňovány **imunologickými mechanismy** za rozhodující účasti T buněk
    - **T-lymfocyty** na jejich povrchu rozpoznávají **virem indukovaný TSTA** (tumor specifické transplantační antigeny) prezentovaný **molekulami HMC**
    - v **nepřítomnosti T buněk** nebo při potlačení jejich aktivity dojde k rychlému rozvoji **nádorového bujení**
    - většina pacientů má **stabilní reciprokou translokaci** mezi chromosomy 8 a 14 - t(8q;14q)
    - **malignita**, vyskytující se v centrální Africe
    - typická je **osteolytická léze čelisti**
  - **retinoblastom**
    - **delece** jednoho proužku chromosomu 13 - 13q14
    - jde o **embryonální tumor retiny**
    - vyskytuje se **hereditárně i izolovaně** - při hereditární formě vzniká více nádorů, obvykle na **obou očích**, přičemž je zvýšené riziko i další **primární malignity** (osteosarkom apod.)
    - **lokus Rb** leží na chromosomu 13 v proužku q14
    - Rb se v mnoha rodinách **segreguje jako AD znak**
  - **karcinom plic**



- **delece nebo translokace** části chromosomu 3 – p14-23
- **asociace aniridie a Wilmsova tumoru**
  - **delece** úseku chromosomu 11 – proužek 11q15
  - **Wilmsův tumor** je zhoubný nádor **ledviny**, který se obvykle projevuje v časném dětském věku nebo dokonce **prenatálně**
  - **aniridie** je chybění duhovky
  - obě dvě onemocnění se mohou projevit **nezávisle**
  - mnozí pacienti mají často **další malformace** – mentální retardaci, zaostávání tělesného vývoje
  - u mnohých pacientů s touto asociací je prokazatelná delece 11q a v místě delece je lokalizovaný **jeden z onkogenů** (c-Ha-ras)
- **sekundární chromosomové změny**
  - v průběhu **vývoje neoplasí** mohou jejich buňky získat **rozdílné chromosomové změny**, které však nejsou náhodné
  - při **chronické myeloidní leukémii** se u pacientů v terminálním stádiu choroby objevují nadpočetné **Philadelphské chromosomy**, trisomie 8 nebo isochromosom dlouhých ramének chromosomu 17, u mužů se ztrácí chromosom Y
  - tyto **abnormality** souvisejí se selekcí a proliferačním zvýhodněním maligních klonů
  - změny se často vyskytují i v **solidních tumorech** – jde o vznik **homogenně se barvicích** oblastí (HSR – homogenously staining regions) a **acentrické fragmenty** - jedná se nejspíš o místa genové **amplifikace**
  - **znásobení genové dávky** může být důležité pro ztrátu kontroly nad růstem nádoru a jeho agresivitou
- **vztah onkogenů ke chromosomovým aberacím**
  - onkogeny tvoří skupinu **20 genů**
  - tyto geny jsou strukturně a funkčně **heterogenní** a mají význam při transformaci buňky na maligní
  - vyskytují se v buňce ve formě **protoonkogenů** a aktivují se buď spojením s **retrovirem nebo mutacemi**
  - názvy onkogenů jsou **zkratky** od jejich původu – např. c-myc se původně našel v B buňkách ptačího myelocytomu
  - po dobu evoluce byly **onkogeny konzervované** a předpokládá se, že každý se v lidském genomu nachází alespoň v **jedné kopii**
  - **nejznámějším vztahem** mezi onkogenem a chromosomovou aberací je souvislost c-myc s t(8;14) v případě **Burkittova lymfomu**
  - u člověka je c-myc lokalizovaný v oblasti proužku 8q24, který je zapojený do translokace
  - **translokace** tak dostává gen c-myc do blízkosti úseku 14q32 s genem, který kóduje **těžký řetězec imunoglobulinů**
  - v některých případech vede translokace až k 20-ti násobnému zvýšení transkripce c-myc, v jiných zase tvoří **abnormální genový produkt**



## 115. Nádory s familiárním výskytem

---

- **maligní transformace** je způsobena mutací na molekulární úrovni
- v DNA dojde postupně k několika **různým mutacím** (mutacím nebo zvýšení aktivitě protoonkogenu, ztrátě funkce tumor-supresorového genu apod.), které dojde-li ke kumulaci způsobí maligní zvrát
- k vlastnímu **malignímu zvratu** tedy dojde až po stádiu **pre maligním**
- maligní transformace začíná v 1 buňce a může postihnout **jakoukoli tkáň**
- protože se **množí klony** buněk s kumulovanými mutacemi, můžeme najít v nádoru více klonů nádorových buněk – tzn. že v **témže nádoru** může být zaznamenána větší nebo menší genetická variabilita – heterogenita
- změna v **jednom protoonkogenu** nebo tumor-supresorovém genu nevede hned ke vzniku **nádorového onemocnění** – to je komplexní a většinou dlouhodobý proces (závisí na typu onemocnění)
- na tomto procesu se podílejí jak **faktory genetické**, tak **epigenetické** (ovlivňují fenotyp beze změny genotypu – imprinting např.)

### Hereditární a sporadický výskyt nádorů

- **sporadický výskyt nádorů**
  - většina nádorových onemocnění člověka má v populaci náhodný – **sporadický výskyt** – to znamená, že mutace genů nastaly pouze v **somatických buňkách**
  - **frekvence nádorového onemocnění** v rodině pak odpovídá populačnímu riziku
  - přibližně každý **3. občan** v naší republice onemocní některou formou nádoru – u mužů nejčastěji **kolorektální karcinomy** a nádory **prostaty**, u žen karcinomy **prsu**
  - v nádorové tkáni mohou být v různých **kombinacích mutovány** protoonkogeny, tumor-supresorové geny a mutátorové geny
  - pro některé typy nádorů jsou známe **mutace specifických genů** – marker geny
- **tentýž typ** nádorového onemocnění, který se vyskytuje sporadicky může mít hereditární i familiární výskyt (např. některé nádory plic, prsu, tlustého střeva, melanomy atd.)
- **familiární výskyt nádorů**
  - **vyšší výskyt nádorů** podobného typu u **více členů rodiny** je definován jako familiární výskyt **nádorového onemocnění**, když není známa **genetická příčina** (mutace)
  - u **familiárního výskytu** určitého typu nádoru může být příčinou vzniku **stejného typu nádoru** vliv stejných faktorů **vnějšího prostředí** jako jsou dietetické návyky (tlusté střevo), vysoký výskyt určitých **virových onemocnění** (nádory jater – virus hepatitidy B apod.)
- **hereditární výskyt nádorů**
  - jestliže je **mutovaný gen** přenesen **pohlavní buňkou** jednoho z rodičů (zárodečná mutace) a mutace druhé alely nastane v **somatické buňce**, mluvíme o hereditárním výskytu nádoru
  - přenos **zárodečné mutace** se ve většině případů týká tumor-supresorových genů nebo mutátorových genů
  - v současné době jsou známy zárodečné mutace dvou **protoonkogenů**
  - **zdeděním zárodečné mutace** je děděna predispozice k určitému nádorovému onemocnění
  - dědičný charakter existuje u přibližně **5-10% nádorových onemocnění**
  - v tomto případě je **frekvence výskytu** určitého typu nádoru v rodině vyšší než je jeho výskyt v populaci
  - z hlediska **formální genetiky** se výskyt dědičně predisponovaných nádorů jeví jako dědičnost typicky **autosomálně dominantní s neúplnou penetrancí**
  - pro hereditární výskyt je charakteristické **postížení více členů rodiny** stejným typem nádoru nebo určitou skupinou nádorových onemocnění (např. Lynchův syndrom) a **časnější nástup onemocnění** ve srovnání se stejným typem nádoru vyskytujícím se sporadicky
  - výskyt nádoru je většinou **multifokální** nebo **bilaterální** (bilaterální neurinom akustiku, multifokální a bilaterální retinoblastom, bilaterální nádor prsu)
  - v některých případech dochází ke vzniku jednoho, dvou, někdy i několika **primárních nádorů** různých orgánů u téhož jedince

- v těchto rodinách výskyt jednoho typu nádorového onemocnění může upozornit na **riziko vzniku nádoru** v dalším orgánu
  - u pacientů s **hereditární retinoblastomem** se vyskytují osteosarkomy, fibrosarkomy, melanomy
  - u pacientů s **hereditárním karcinomem prsu** se vyskytují u predisponovaných jedinců i nádory ovarií nebo malobuněčné nádory plic
- klinicky významná souvislost s výskytem **maligních nádorů** je popsána také u autosomálně **dominantně děděného onemocnění neurofibromatosis (NF1, NF2)**
  - **NF** postihuje periferní nervový systém
  - u pacientů s **NF1** je **variabilní výskyt** projevů, charakteristické jsou mnohočetné benigní neurofibromy v kůži, ploché nepravidelně pigmentované skvrny na pokožce, benigní nádory na oční duhovce
  - u pacientů s **NF2** se projevuje neurom akustiku a/nebo meningeom
  - ačkoli růst těchto nádorů je **benigní**, část pacientů má zvýšený výskyt **maligních nádorů** jiných orgánových systémů (neurofibrosarkomy, gliomy)
  - tato asociace je dávana do souvislosti se **zárodečnou mutací** tumor-supresorového genu NF1 nebo NF2
- obdobně **osteom mandibuly** je pravděpodobně markerem výskytu kolorektálních karcinomů (FAP)

### Příklady nádorového onemocnění

- **karcinom prsu**
  - výzkum se posledních 20 let cíleně zaměřuje na objasnění **genetických aspektů** nádorových onemocnění
  - u některých nádorů jsou známy **charakteristické mutace** genů, chromosomální přestavby nebo asociace s **určitými antigeny**, které se stávají markerem onemocnění
  - nádor prsu je nejběžnější **maligní onemocnění** u žen
  - jak sporadická tak hereditární forma vzniká **vícetupňovým procesem**, jenž zahrnuje **aktivaci onkogenů** a **inaktivaci tumor-supresorových genů**
  - při karyologickém vyšetření je pozorována **aneuploidie** a **amplifikace** některých genů (HER2/neu)
  - **inaktivaci tumor-supresorových genů** často vyvolávají bodové mutace v genu na párových chromosomech nebo delece genu/části genu
  - při **hereditárním typu** nádoru prsu nebo prsu a ovarií jsou využívány pro diagnostiku 2 tumor-supresorové geny – **BRCA1 a BRCA2** (breast cancer 1/2)
    - **mutace genu BRCA 1** je příčinou 52% hereditárních onemocnění
    - **mutace genu BRCA 2** je příčinou 32%
    - u 16% pacientek s **hereditárním typem** karcinomu prsu se jedná o dědičný syndrom způsobený **mutacemi jiných genů**
    - **produkty** obou BRCA genů se podílejí na vyhrávání mléčné žlázy a tvoří komplexy s produkty **dalších genů**, čímž se podílejí na průběhu buněčného cyklu a při opravách **dvouvláknových zlomů DNA**
    - **děděná mutace BRCA1** se vyskytuje u žen v rodinách s familiárním výskytem nádoru prsu, ovarií anebo prsu a ovarií
    - **zárodečná mutace genu BRCA2** je asociována s výskytem nádoru prsu u žen i mužů; u mužů také se vznikem nádoru prostaty, pankreatu a s Fanconiho anemií
  - kromě těchto dvou genů se u **maligních nádorových onemocnění prsu** vyskytují i mutace v dalších tumor-supresorových genech – **TP52 nebo PTEN**
  - dále je tu **protoonkogen H-ras1**
  - spolu s mutacemi příslušných genů se na **maligní transformaci** podílí i **epigenotyp** buňky – zděděná informace na úrovni exprese genů, tzn. že vliv na fenotyp nastává i beze **změny genotypu**
  - nádorové buňky mohou získat odlišný **epigenotyp** než má buňka před maligní transformací
  - hlavní **epigenetická modifikace** u člověka je **metylace cytosinů**
- **hereditární adenomatosní polypóza**

- vícestupňový proces **maligní transformace** lze demonstrovat na hereditární adenomatosní polypóze (FAP)
- vzniká kvůli zárodečné mutaci **tumor-supresorového genu APC**
- po **kumulaci mutací** vzniká z benigních polypů střevní sliznice karcinom tlustého střeva
- **1. stupeň**
  - epitel se mění na **hyperplastický** po mutaci obou alel APC na chromosomu 5
  - produkt genu je součástí **signální dráhy**, která kóduje proteiny kontrolující embryonální vývoj, inhibující apoptosu apod.
  - APC se také podílí na **regulaci exprese** protoonkogenu c-myc a cyklinu D
  - je také důležitý pro **stabilitu chromosomů**, během mitózy se akumuluje v kinetochoru
  - produkt mutovaného genu znemožní **spojení vřeténka s kinetochory**
- **2. stupeň**
  - vznik **časných adenomů** menších než 1 cm hypometylací DNA
- **3. stupeň**
  - **mutace protoonkogenu K-ras**
  - **střední adenomatosní stádium**, velikost adenomů nad 1 cm
- **4. stupeň**
  - delece **nádorového supresorového genu** na chromosomu 18 a nejspíš i dalších tumor-supresorových genů
  - **zhoršení stavu** střevní sliznice do pozdního stádia polypů
- do té doby stav hodnocen jako **benigní**, zvrát **maligní** a později vznik **metastáz** je provázen akumulací dalších **genetických poškození**
- u 75% karcinomů tlustého střeva je to ztráta **funkce TP53**
- vznik tohoto karcinomu je **sled mutací**, který se dává do souvislosti s působením mutagenních látek obsažených v **potravě**
- **zárodečná mutace** tumor-supresorového genu APC je ale markerem genetické predispozice
- **Le-Fraumeni syndrom**
  - vzácné **dominantně děděné onemocnění**, které se vyznačuje výskytem mnoha různých dědičně předurčených **primárních nádorů** podmíněných primárně mutací v tumor-supresorovém genu TP53
- příklady nádorových onemocnění s **hereditárním výskytem**, asociovaných s **tumor-supresorovými geny**

Gen	Lokalizace nádoru
Rb1	oči (retinoblastom), prsa, kosti, plíce, močový měchýř, prostata
WT1/WT2	Wilmsův nádor ledvin a nádory dalších orgánů urogenitálního traktu
TP53	různé typy nádorů (cca 50% všech nádorů)
APC	tlusté střevo (FAP – familiární adenomatosní polypóza, sporadické kolorektální karcinomy) a nádory dalších orgánů
BRCA1, 2	prsa, ovaria, prostata, larynx, zažívací trakt, pankreas

- **familiární nádorová onemocnění jsou například**
  - familiární retinoblastom
  - familiární adenomatosní polypóza
  - familiární neurofibromatosa
  - familiární maligní melanom a spousta dalších

#### Vrozené dispozice vzniku nádorů

- při **vrozené dispozici** ke zvýšenému výskytu nádorů se rovněž uplatňují geny, které nepřímo ovlivňují vznik **nádorového onemocnění**
- mohou ovlivnit **metabolismus chemických látek** (mutagenů) nebo reparaci DNA
- geneticky podmíněná schopnost **jedinice detoxikovat** škodlivé látky
  - **individuální vnímavost** k chemicky indukovaným nádorům

- příkladem je **kouření** – vyvolává plicní nádory
- při **vysoké aktivitě AAH** jsou geneticky podmíněně kuřáci více ohroženi plicním nádorem, naopak velmi malé procento má aktivitu **geneticky podmíněně nízkou** a tak jsou vůči karcinogennímu účinku cigaretového kouře **rezistentní**
- autosomálně recesivně **děděný defekt reparace DNA**
  - **riziková skupina** se zvýšeným výskytem maligních nádorů
  - u jedinců se **syndromem chromosomální nestability** jsou na chromosomech zlomy a **mezery**
  - onemocnění je podmíněno **vrozenými defekty reparace DNA**, které provází zvýšený výskyt nádorů **indukovaných zářením**
  - míra projevu závisí na **mutacích** v různých genech pro **reparaci DNA** (je to více než 10 genů)
  - například **excisní reparace** opravuje poškození DNA vyvolaná UV zářením, proto je pro pacienty s **vrozeným defektem** tohoto typu reparace významným **preventivním opatřením** omezení slunění, vystavení rentgenologickým vyšetřením a vyvarování se rizikovým **pracovním podmínkám**
- **ataxia teleangiectatica**
  - porucha **souladu pohybů**, zpomalení růstu
  - **autosomálně recesivní onemocnění** provázené neurologickými a imunologickými poruchami
  - v prvním roce se vyvíjejí v **konjunktivě očí** charakteristické malé vaskulární léze (teleangiectasie) a poté začíná **cerebrální ataxie**
  - zpočátku je **nemoc progresivní**, následně stacionární
  - **postižení imunitního systému** vede k vážným infekcím plic a průdušek – u postižených časté **leukémie a lymfomy**
  - **genetická podstata** je heterogenní
  - mutované geny vedou ale k **poruchám reparačních mechanismů**, které opravují **poškození radiací** – pacienti jsou citliví na rtg
  - **cytogenetická vyšetření** zaznamenávají přestavby zejména chromosomů 7 a 14
- **Bloomův syndrom**
  - nízká **porodní hmotnost**, extrémně malý (trpasličí) vzrůst, vyrážka na obličeji, která se vlivem **slunečního záření** zhoršuje
  - pacienti mají **predisposici** pro vznik maligních nádorů
  - **cytogenetické vyšetření** ukazuje vysokou frekvenci výměn mezi sesterskými chromatidami a **chromosomální zlomy**
- **Fanconiho anemie**
  - rozmanité **vrozené anomálie skeletu** (malá postava, defekty článků prstu, palce), anomálie GIT a CNS a úbytek krvinek (pancytopenie)
  - u pacientů je vysoké riziko vzniku **hematologických malignit** (leukémie, lymfomy), ale také malignit GIT a ženských pohlavních orgánů
- **Xenoderma pigmentosum**
  - **extrémní citlivost na UV záření**, resp. sluneční záření
  - vznikají **nádory kůže** (karcinomy dlaždicových buněk epitelu, melanomy) ve velmi **časném věku** (75% pacientů má nádory kůže do osmého roku života)

## Genomický imprinting

- při manifestaci **nádorového onemocnění** s hereditárním výskytem se uplatňuje fenomén zvaný genomický imprinting
- tento genetický jev vnáší **rozpor do Mendelovské genetiky** – že funkce genu nezávisí na tom, od kterého **rodiče** je daný gen zděděn
- přibývající informace podložené jak **experimentálními** tak **klinickými pozorováními** ukazují, že pro manifestaci určitých genů může být důležitý **jejich původ**
- **epigenetická modifikace DNA** je kopírována při replikaci
- mezi **epigenetické modifikace** patří regulace na úrovni transkripce, která má vliv na množství a časování výskytu **funkčního produktu** genu (RNA nebo protein)
- **DNA methylace**
  - **DNA methylace** je typ modifikace DNA, která je děděna bez změny sekvence DNA

- methylace je děděna z jedné **buněčné generace do další**, během života jedince je konzervována v důsledku stabilní **enzymové výbavy buňky** (soubor příslušných methylas)
- **změna aktivity genu** (změna methylace) může nastat v zygotě, kdy dojde k novému vztahu mezi paternálními a maternálními chromosomy, resp. **příslušnými geny**
- u lidí je asi 1% bází **DNA methylováno**, v somatických buňkách eukaryot je v DNA typická CpG methylace – methylace některých cytosinů na 5 uhlíku, které sousedí s nukleotidem s guaninovou bází
- počet a uspořádání **methylovaných cytosinů** ovlivňuje funkci genů – nízká methylace vede k vysoké aktivitě a naopak
- **enzymy skupiny DNA-methyltransferas** udržují po replikaci DNA identický typ methylace, jaký byl před replikací
- přibližně 60-70% CpG je methylováno a CpG jsou seskupeny do shluků zvaných **CpG ostrůvky**
- CpG jsou přítomny v oblasti **promotoru**, abnormální **hypermethylace** v promotoru tumor-supresorových genů byla zaznamenána u DNA izolované z **maligních nádorů** – je tak potlačena transkripce těchto genů v důsledku DNA methylace a tím ovlivněna regulace **buněčného cyklu**
- na základě **genomického imprintingu** je možné vysvětlit odchylky nalézané v rodokmenech ve frekvenci výskytu některých nádorů s **genetickou predisposicí**
  - **Wilmsův nádor** ledvin postihuje častěji děti postižených matek než otců
  - autosomálně dominantní onemocnění **neurofibromatosa 1 (NF1)** je závažnější při přenosu mutované alely od matky
- **genomický imprinting** ovlivňující expresi genů je spolu s protoonkogeny, tumor-supresorovými geny a geny opravných systémů (mutátorovými geny) považován za další faktor (epigenetický) podílející se na vzniku **nádorových onemocnění**
- další utlumení **transkripční aktivity** může probíhat na úrovni modifikace histonů – vzniká tak transkripčně **neaktivní heterochromatin** (struktura chromatinu je podstatná pro regulaci transkripce)
- **epigenetické modifikace** mají také vztah k funkci mRNA – pokud dojde k destrukci mRNA, **neproběhne translace** a nedojde k tvorbě produktu genu (většinou proteinu)
  - **posttranskripční utlumení aktivity** genu působením **RNA interference** (siRNA) je pravděpodobně evolučně velmi starý jev, který chránil organismus např. před **infekčními viry**
  - **siRNA** je epigenetický mechanismus vyvolaný přítomností určitých fragmentů dvouvláknové RNA (dsRNA), ta je enzymaticky separována na dvě vlákna schopná zničit **jednovláknovou RNA** buňky obsahující komplementární oblasti k fragmentu siRNA

### Mutagení faktory vnějšího prostředí a vznik nádorů

- mutace v genech s **onkogenním** potenciálem mohou být **spontánní**, ale častěji jsou vyvolané faktory **vnějšího prostředí** (mutageny), členěnými na
  - chemické látky
  - fyzikální vlivy
  - biologické vlivy
- **chemické látky**
  - polycyklické a aromatické uhlovodíky, chlorované uhlovodíky, aromatické aminy, nitrosaminy, azbest, těžké kovy, mykotoxiny a další
  - většina kancerogenně působících **chemických látek** je v organismu aktivní až po jejich přeměně na **vlastní kancerogeny**
  - při metabolické aktivaci chemických látek se uplatňuje **individuální genetická dispozice** jedince, která následně ovlivňuje frekvenci nádorových onemocnění
  - na vzniku chemicky indukovaných nádorů trávicího traktu mají velký podíl nevhodné **dietetické návyky** – vliv nevhodné skladby a přípravy potravy se kumuluje s účinkem **kancerogenních látek**
  - do přímé souvislosti s **dietetickými návyky** je dáván vznik nádorů tlustého střeva
  - mezi **nejrizikovější potraviny** patří živočišné tuky a produkty, které je obsahují
  - **nevhodná úprava potravin** – smažení, pečení, uzení – v nich zvyšuje obsah kancerogenních látek (nitrosaminů, polycyklických aromatických uhlovodíků)

- za vhodnou, až **protektivní stravu**, je považováno ovoce, zelenina, luštěniny (obsahují vitaminy, chemoprotektivní látky detoxikující kancerogeny) a potraviny s vysokým **obsahem vlákniny** (rozpuštěné – pektiny a slizy, nerozpuštěné – celulóza, lignin), které napomáhají **trávení** a vyprazdňování trávicího traktu
- **fyzikální vlivy**
  - kancerogenní jsou **UV záření, ionizující záření** (např. gamma záření, rtg)
  - záření zvyšuje riziko výskytu některých **typů nádorů** (ionizující záření například leukémií, záření UV nádorů kůže)
  - **ionizující záření** vyvolává zejména zlomy a přestavby chromosomů nebo chromatid, pro UV záření je typický vznik **dimerů thyminu**
  - obdobně jako u **chemické kancerogeneze** i frekvence výskytu nádorů vyvolaných zářením je ovlivněna zejména **činností genů** pro reparaci vzniklých chyb DNA
  - ze **statistických studií** na souborech rodin vyplynulo, že potomci rodičů vystavených vlivu kancerogenů nebo mutagenů mohou získat predisposici k nádorovým onemocněním vznikem mutací v **prezygotickém stádiu** zárodečných buněk vystavených těmto **faktorům** (gametické mutace)
  - v případě **profesionální expozice** záření dokonce zaznamenán větší počet postižených **dětí v jedné rodině**
- životní prostředí a životní styl jsou významnými **činiteli** ovlivňujícími kancerogenezi – ovlivněním těchto faktorů lze možností **nádorového onemocnění předcházet**
- **biologické vlivy**
  - mezi nádorová onemocnění, vyvolaná biologickými vlivy patří nádory **virové etiologie**
  - do současné doby **identifikovány** v této souvislosti u lidí viry
    - **DNA viry ze 4 odlišných rodin** – herpesviry, hepadnaviry, papovaviry a adenoviry
    - **RNA viry** – retroviry
  - lidské papilomaviry jsou prokazatelně ve vztahu k **maligní transformaci** – příčina vzniku karcinomu děložního čípku, papilomatosy hrtanu a dlaždicobuněčného karcinomu ústní sliznice
  - **EB virus** (rodina herpesvirů) je asociován s B buněčnými lymfomy
  - **hepatitida B** (HBV) má prokazatelnou souvislost se zvýšeným výskytem hepatocelulárního karcinomu
  - vysoký **endemický výskyt** těchto karcinomů je v Jižní Africe a v souvislosti se špatnými **dietetickými návyky** se ještě uplatňuje kancerogenní účinek aflatoxinu B (z plísňe) – kumulací těchto dvou vlivů je **zvýšená frekvence** hepatokarcinomů
  - cílovým genem pro mutagenesu je **TP53** – bodové mutace podmiňují maligní transformaci
  - **virus HIV** (human immunodeficiency virus) je asociován s výskytem **Kaposiho sarkomu a B lymfomu**
  - další lidský **retrovirus HTVL-1** je uváděn jako příčina T buněčné leukémie dospělého věku a **HTVL-2** byl izolován z T buněčné vlasaté leukémie (hairy cell leukémie)
  - onkogenní viry se při maligní transformaci nechovají jako **infekční agens** – maligní zvrát buňky nastává, když **virus ovlivní DNA hostitelské buňky** a působí zde jako **onkogenní faktor**
  - **integrace** papilomaviru do genomu eukaryotní buňky je příklad ovlivnění genů hostitelské buňky regulační oblasti genomu viru
  - u **Burkittova lymfomu** je to EB virus, asociován se strukturální aberací typu translokace
  - u **TP53 u hepatomů**, kdy za indukční je považován virus hepatitidy B, se jedná o bodovou mutaci typu substituce
  - někdy při **indukci maligní transformace** působí virové onkoproteiny DNA virů, virové **antigeny** (onkoproteiny) se váží s **proteinem p53** a inaktivují ho
  - **Burkittův lymfom**
    - **nejznámějším a nejstudovanějším** lidským nádorem virové etiologie je Burkittův lymfom a nasofaryngeální karcinom – podmíněn **mutagenním účinkem EB viru**
    - má významný územní výskyt u dětí v oblasti **rovníkové Afriky**
  - u nádorů s **virovou etiologií** se obvykle kumulují s virovým vlivem i vlivy vnějšího prostředí a dietetické a hygienické návyky rodiny

- **imunologie**
  - vznik nádorů závisí také na **imunologickém stavu** jedince či celé populace – u Burkittova lymfomu a dětí rovníkové Afriky se mluví o souvislosti s vysokým výskytem **původce malárie** (plasmodium)
  - **plasmodium** ve svém hostiteli vyvolává **imunodeficienci** a tím znemožňuje eliminaci vznikajících maligních buněk **imunitním systémem**
  - v současné době popsána **existence dalších nádorů** s indukčním agens EBV – Hodkingův lymfom a určité typy T buněčných lymfomů
  - onemocnění tohoto typu není vázáno na **určité území**, ale souvisí s **imunologickým stavem** jedince
  - **imunosuprese** navozená např. léky nebo získaná (např. AIDS) zvyšuje frekvenci výskytu nádorů asociovaných s virovou infekcí

### Stárnutí organismu a výskyt nádorů

- mezi **biologické vlivy**, podílející se na vzniku maligních nádorů můžeme řadit také **endogenní příčiny**, které souvisí se **stárnutím organismu**
- takto mohou být považovány nádory za onemocnění **geneticky starých buněk**, ve kterých došlo k **akumulaci mutací** během procesu stárnutí
  - **frekvenci mutací** ovlivňuje samozřejmě kvalita prostředí, vysoké je však i endogenní poškození, jako např. chyby DNA vznikající při replikaci DNA
  - **frekvence mutací** ukázala, že pravděpodobnost vzniku chyb s věkem stoupá, zatímco schopnost je **opravovat klesá**
- další příčinou zvýšeného výskytu **nádorových onemocnění** u starších lidí může být nestabilita genomu vyvolaná **zkrácením telomer**
  - **erose telomer** chromosomů somatických buněk může vyvolat změny struktury nebo počtu chromosomů
  - ty vedou buď k **geneticky programované buněčné smrti** nebo mohou být příčinou maligní transformace
- **maligní procesy** jsou dávány do souvislosti též se zvýšeným poškozením DNA volnými **kyslíkovými radikály**
  - volné kyslíkové radikály mohou **poškozovat** téměř všechny buněčné struktury nebo molekuly
  - mohou být též příčinou **zkříženého spojení DNA a proteinu**, poškození struktury vlákna DNA nebo samotné struktury nukleotidů anebo příčinou **modifikace purinových nebo pyrimidinových bází**
  - **volné kyslíkové radikály** jsou eliminovány superoxidodismutase
  - existuje několik typů těchto **enzymů**, liší se součinností s různými kovy (Cu, Zn, Mn, Co, Fe) – ty určují umístění **SOD** v buňce a její účinnost v **různých tkáních**
  - **variabilita SOD** se projevuje rozdílnou rychlostí stárnutí různých tkání
  - v průběhu **chronologického stárnutí** klesá aktivita SOD a následkem toho se volné radikály **rozkládají pomaleji** – konečným důsledkem je urychlení **degenerativních změn v tkáních**

## 116. Role genetiky v presymptomatické diagnostice a prevenci nádorových onemocnění

### Poradenství, preventivní opatření

- **rodokmenové studie** a diagnostika na **molekulární úrovni** dovolují rozlišit sporadický a hereditární výskyt nádorů
- při **hereditárním výskytu** je možné pomocí genetických markerů identifikovat **predisponované jedince** (heterozygoty)
- tím se otevřela možnost **presymptomatické a prenatalní diagnostiky** nádorů s hereditárním výskytem
- **molekulární diagnostika** je možná například u
  - hereditární adenomatosní polypózy (gen APC)
  - syndromu Li-Fraumeni (gen TP53)
  - Lynchova syndromu (délka CA repetice, MMR geny)
  - retinoblastomu (gen Rb1) atp.
- **nádor tlustého střeva**
  - nádor tlustého střeva, kdy **maligní transformaci** předchází stádium **adenomatosní polypózy** (FAP) byl poprvé popsán jako **dominantně děděný**
  - jeho celosvětový výskyt je uváděn na **1 : 7 000** narozených dětí
  - v případě adenomatosní polypózy je u v běžné praxi možné **diagnostikovat polypózní stádium koloskopii** a včasným chirurgickým zákrokem (odstraněním segmentu nebo celého střeva) zamezit vzniku **maligního procesu**
- v současné době lze **přímou DNA diagnostikou** nebo i **metodou nepřímou (RFLP)** zjistit **ohrožené jedince** v presymptomatickém i v prenatalním období
- záleží jen na lékaři, zda umí využít **možnosti spolupráce** se specializovaným pracovištěm – např. oddělením lékařské genetiky
- vznik nádorového onemocnění je **komplexní** a většinou **dlouhodobý proces** (závisející mimo jiné na typu nádoru) na kterém se podílejí jak **faktory genetické**, tak faktory **vnějšího prostředí**
- také je třeba si uvědomit, že **maligní nádory** téhož orgánu mohou u různých jedinců vznikat **kumulací odlišných mutací**
- **preventivní opatření** u jedinců s vrozenou dispozicí pro vznik nádorového onemocnění jsou zaměřena na
  - **pravidelné diagnostické testy**
    - **endoskopie** nádorů zažívacího traktu
    - **mamografie** a sonografie u nádoru prsu
    - **endoskopie** a vyšetření retiny u FAP (u některých jedinců se vyskytuje vrozená hypertrofie pigmentu sítnice – CHRPE)
    - **sonografie** u nádorů ovarií, močového traktu apod.
  - **úpravu životního stylu** včetně diety
  - profylaktické **chirurgické zákroky**
- **včasnou diagnózou** může lékař zabránit fatálnímu průběhu nádorového onemocnění

### Presymptomatická diagnostika

- k presymptomatické diagnostice nádorových onemocnění se používá zejména **celoplošného screeningu**
- screening je **plošné vyšetřování populace**
- jeho účelem je **záchyt léčitelného nádorového onemocnění** v časných stádiích
- cílem screeningu je **snížit morbiditu** (nemocnost) i **mortalitu** (úmrtnost)
- základem je **vyhledávání jedinců ohrožených vznikem onemocnění dříve**, než se objeví **první projevy**
- výhodou **presymptomatické diagnostiky** je záchyt onemocnění ve fázi, která umožňuje **snadnější léčbu** s lepšími výsledky
- zároveň dochází často ke **snížení nákladů** na léčbu samotnou
- **nádorová onemocnění** jsou typickým příkladem, jedná se zejména o rakovinu děložního čípku, prsu, tlustého střeva a konečníku



- **kritéria použití screeningu**
  - onemocnění musí mít relativně **vysokou morbiditu**
  - existuje účinná léčba v **časných stádiích**
  - pro detekci je k dispozici **dostupný a laciný test**
- **presymptomatická diagnostika kolorektálního karcinomu**
  - základem jsou **testy okultního krvácení** ve stolici a primární screeningová kolonoskopie
  - testy okultního krvácení (TOKS) jsou doporučovány u lidí **starších 50 let** jednou ročně – jsou k dostání u praktických lékařů
  - **lidé starší 55 let** podstupují TOKS jednou za 2 roky nebo kolonoskopii jednou za 10 let
  - **kolorektální karcinom** patří v ČR mezi první **3 nejčastější** zhoubné nádory
  - jejich léčba má výrazně **lepší výsledky při včasném záchytu** – ideálně u lidí, kteří ještě nepocítí ujit obtíže
  - celoplošně **republikový screening** byl zahájen v roce 2009
  - **symptomy** kolorektálního karcinomu
    - **specifické:** ztráta hmotnosti, průjemy i zácpy – změna pravidelnosti stolice, časté nucení na stolicí, bolení břicha, křeče
    - **nespecifické:** únava, nevolnost, zvětšující se objem dutiny břišní, teploty nebo subfebrilie
- **presymptomatická diagnostika rakoviny prsu**
  - rakovina prsu je **nejčastějším nádorem**, který se u žen v ČR vyskytuje
  - vyšetřování a **záchyt rakoviny prsu** spadá do kompetencí gynekologů, kteří by měli při každoroční **preventivní prohlídce** pacientkám palpačně vyšetřit také prsa
  - alternativou je **samovyšetření žen**
  - v případě **nálezů rezistencí** nebo symptomů, které bývají spojovány s rakovinou prsu jsou ženy odesílány k vyšetření do **mamologických center**
  - **mamograf** odhalí až 95% všech karcinomů, v případě potřeby je vyšetření doplňováno vyšetřením **ultrazvukovým**
  - mamografie je **rtg vyšetření**, což s sebou nese i určitá rizika – **vliv ozáření** se během našeho života počítá, proto se častá vyšetření mohou stát pro ženu **více škodlivá než přínosná**
  - **indikace** je proto vždy nutné zvážit
  - ženy **starší 45 let** mají právo jednou za dva roky na bezplatné **mamografické vyšetření**
  - vyšetření je určeno též pro ženy s **pozitivní rodinnou anamnézou**, kde se předpokládá zvýšené riziko **genetické formy onemocnění** (BRCA geny)
  - **celorepublikový screening** je nejstarším v ČR a probíhá úspěšně již od roku 2002
  - **symptomy** rakoviny prsu
    - vtahování kůže nebo vznik důlků
    - nepravidelnosti bradavky (vtažení)
    - zarudnutí a teplá kůže (též u mastitidy)
    - pomerančová kůže (infiltrace lymfatického systému)
    - zvrhedovatění
  - **rizikové faktory**
    - **pozitivní rodinná anamnéza** (5-10% nádorů je geneticky podmíněných)
    - v roce 1994-1995 byly diagnostikovány geny, které jsou spojovány s **autosomálně dědičnými formami rakoviny prsu** – BRCA 1 a BRCA 2
    - mutace v těchto genech zvyšuje **riziko onemocnění prsu** (56-87%) a **vaječníků** (10-60%)
    - **věk** – riziko stoupá po 40. roku věku, výrazně po roce 50.
    - **přítomnost cyst** v prsu
    - **brzký nástup menstruace** (před 12. rokem)
    - **pozdější nástup menopauzy**
    - **bezdětné ženy** mají vyšší riziko, stejně tak i ženy s prvním těhotenstvím po 30. roce
    - **kojení** snižuje riziko vzniku rakoviny prsu
    - vyšší příjem **alkoholu**
    - nevhodná strava a **obezita**

- **presymptomatická diagnostika karcinomu děložního čípku**
  - léčba časných stádií **rakoviny cervixu** je poměrně snadná, proto je screening naprosto **klíčový**
  - stádium **počátečních změn buněk** s sebou nese žádné symptomy, je proto odhalitelné jedině pomocí screeningu v rámci pravidelných **gynekologických vyšetření** každý rok
  - **brzké odstranění** již změněných buněk může zabránit rozvoji karcinomu
  - vyšetření se týká všech **dívek po zahájení sexuálního života**
  - významnou roli v rozvoji onemocnění nesou **HPV** (human papiloma virus), které jsou přenášeny **pohlavním stykem**
  - do věku 35 let se tak s touto infekcí u nás setká 60% žen
  - většinou proběhne infekce **asymptomaticky** díky zásahu **imunitního systému**
  - screening je založený na cytologickém vyšetření **stěru ze sliznice** čípku pod mikroskopem
  - buňky se odebírají malým **kartáčkem** nebo **štetičkou**
  - **celorepublikový screening** byl zahájen v roce 2008
  - v posledních letech došlo také k vývoji **vakcín** proti hlavním typům HPV
  - očkování je doporučováno mladým ženám **do věku 25 let**, nejlépe však před zahájením **sexuálního života**
  - očkování není hrazeno **zdravotními pojišťovami**
  - **symptomy** rakoviny děložního čípku
    - velmi často se jedná o stavy **asymptomatické** – nutné jsou preventivní prohlídky u gynekologa
    - objevují se až **pozdní příznaky** rozvoje karcinomu – bolest v podbříšku, krvácení, výtok z pochvy
  - **rizikové faktory**
    - **infekce** lidským papilomavirem
    - **promiskuita** a větší počet partnerů
    - kouření
    - poruchy imunity
    - věk **nad 35 let**

## 117. Možnosti genové terapie nádorových onemocnění

- **genová terapie**
  - léčba genů
  - jde o nový přístup jak **léčit nemoci** na základě **změny exprese genů** pacienta
  - má-li pacient nemoc, která je způsobena **chybou v nějakém genu**, genová terapie je léčba, kterou se tento **chybný gen opraví**
  - předpokládá se, že touto metodou bude možno nejen **nemoci léčit**, ale jim také **předcházet**
  - v současné době je tato metoda ve **stadiu vývoje**, možnosti jejího použití se zkoumají v laboratorních **základního výzkumu**
  - zatím jí tedy nelze využít v **klinické praxi**
- **genová terapie** jako léčebná metoda vznikla na základě **znalostí o vlivu genů** na lidská onemocnění
- dnes je zřejmé, že každá **lidská nemoc** má nějakou souvislost s **lidskými geny**, které byly získány od rodičů
- drobné **odlišnosti v genech** každého člověka pomáhají formovat jeho osobnost od výšky postavy až po barvu očí
- bohužel, některé tyto **odlišnosti** vedou k **rozvoji nemocí**, které jsou pak přenášeny z **generace na generaci**
- některé z nich jsou způsobené **chybou v jednom genu**, jiné jsou ovlivněny celou **sadou genů**
- výhodou **genové terapie** je, že léčí **lidské nemoci** u jejich „**kořenů**“ – opravuje poškozené geny
- rozvoj **molekulární biologie** přispívá k rozvoji genové terapie nádorových onemocnění

- vedle dnes už klasické kombinace **chirurgického zákroku, radioterapie a imunoterapie** se na specializovaných pracovištích začínají vypracovávat různé **strategie genové terapie** vybraných typů nádorů
- strategie genové terapie má **dva hlavní směry**
  - **přímá genová terapie**
    - **oprava chyby**, tzn. změny v sekvenci DNA, která je odpovědná za **maligní transformaci**, tedy např. odstranění mutace v protoonkogenu nebo vnesení chybějících tumor-supresorových genů
    - jelikož **maligní fenotyp** má multifaktoriální (polygenní) původ, je tento přístup zatím obtížně **realizovatelný**
  - **nepřímá genová terapie**
    - **vnesení nové genetické informace** do buňky (nádorové nebo jiného typu)
    - může jít o **vnesení sekvencí DNA**, které kódují například **stimulaci protinádorové imunitní odpovědi** nebo potlačují **angiogenezi** indukovanou rostoucím nádorem anebo aktivují cytotoxické působení molekul antimetabolitu
- **typy genové terapie**
  - **somatická genová terapie** (somatic gene therapy)
    - opravuje **geny pacienta**, aniž by došlo k dědičnému předávání opravených genů na **další generace**
  - **zárodečná genová terapie** (germline gene therapy)
    - měnila by geny už v **zárodečných buňkách** (spermie, vajíčko) a změna genu by byla přenosná na **další generace**
    - tento typ terapie zatím **není povolen**
- jak **experimentální přístup** ke genové terapii, tak **klinické testy** jsou podřízeny přísným pravidlům
- za přísných **etických kritérií** probíhá výběr pacientů, je zvažována bezpečnost zákroku jak pro pacienta tak pro **ošetřující personál**, účelnost terapie a volba vhodného typu buněk
- zatím není povolena **genová terapie**, která by využívala zárodečné buňky nebo buňky velmi časného **embryonálního stádia**
- v mnoha případech je vlastní genová manipulace uskutečněna **ex vivo** (mimo organismus)
- techniky používané pro **vnesení genu** do lidských buněk jsou založeny na fyzikálním, chemickém nebo biologickém principu
- **fyzikální metody**
  - umožňují přímé **vpravení nukleové kyseliny** do cílových buněk
  - používané techniky jsou **mikroinjekce, mikroprojektily** nebo zavedení slabého **elektrického proudu** k buněčné suspenzi za přítomnosti genu, který má být do buněk **inkorporován**
  - účinnost těchto technik měřená expresí genů je však **malá (<1%)**
- **chemické metody**
  - využívají pro **inkorporaci genů** do buněk například fosforečnan vápenatý, liposomy, DEAE-dextran, které zlepšují průchod **buněčnou membránou**
- **biologický přístup**
  - spočívá ve využití **virů jako vektorů** (přenašečů) DNA
  - nejvhodnější jsou **transformující DNA viry** (papovaviry, adenoviry, herpes simplex virus) a **retroviry**
  - tyto vektory mají **vysokou** (téměř 100%) **účinnost** přenosu požadované DNA
- **plasmidy**
  - další vektory používané v **genové terapii** jsou například plasmidy obsahující **multiplikované kopie** vybraného genu
  - plasmidy jsou **injikovány do krevního řečiště** nebo přímo do oblasti nádorového bujení
- **tumor infiltruující lymfocyty**
  - jako vektory jsou používány také **monoklonální protilátky**, in vitro namnožené tumor **infiltruující lymfocyty** (TIL) nebo **dendritické buňky**
  - **směry genové terapie** nádorů na několika příkladech
    - TIL po intravenózním podání, díky své specifické protinádorové aktivitě, selektivně infiltruji **pooperační residua nádoru**, ze kterého byly izolovány

- **ex vivo** může být do genomu TIL integrován například gen pro **faktor nekrotizující nádorové buňky (TNF)**
- gen kódující TNF se stal **trvalou součástí genomu TIL** a syntetizovaný faktor nekrotizující nádorové buňky je **secernován** přímo do nádorové tkáně, kterou nekrotickým procesem likviduje
- obdobně mohou být TIL využity pro **přenos genů kódujících produkci cytokinů**
- strategie této genové terapie spočívá v geneticky řízeném zvýšení **imunobiologické aktivity**
- dobře prostudovanou **metodou genové terapie** nádorových buněk je použití **retrovirů a herpes simplex viru** jako vektorů
- **retrovirus**
  - nejprve **geneticky modifikován** v prostředí in vitro
  - sekvence kódující **virové proteiny** jsou odstraněny a ponechány jsou pouze sekvence kontrolující jejich **expresi** (LTR oblasti – long terminal repeat; virové dlouhé opakující se sekvence s promotorovou funkcí)
  - v druhém kroku jsou **vystřížené sekvence zaměněny** za sekvence kódující tvorbu produktu zvoleného pro příslušnou **genovou terapii** (např. supresorový gen, upravená sekvence onkogenu, sekvence kódující nádorově specifické nebo **asociované antigeny**, antigeny MHC atd.)
  - tyto **rekombinantní retroviry** mají schopnosti infikovat buňky a začlenit do jejich genomu **exogenní geny**, ale nemohou se replikovat
  - retroviry jsou nyní **nejbezpečnějšími konstruovanými vektory**, se selektivní afinitou k rychle se množícím **nádorovým buňkám**
  - příkladem **genové terapie** využívající genetickým inženýrstvím upravený retrovirus je léčba **maligního gliomu**
  - tento nádor má vysokou **mitotickou aktivitu**, nemetastazuje a je obklopen nervovou tkání, která se **nereplikuje**
  - na několika vybraných pacientech proběhla úspěšně **studie**, kdy byly mikroinjekcí do maligního gliomu vpraveny **retrovirové partikule** nesoucí gen pro TNF
  - **gen kódující TNF** měl navíc zvýšenou transkripci díky **virovým LTR**, které působily v konstrukci jako jeho **promotor**
- **gen herpes simplex viru kódující enzym thymidinkinasu (HSV-TK)**
  - je příklad využití virového genomu pro **aktivaci cytostaticky působící látky** až v cílové **nádorové buňce**
  - gen kódující **enzym thymidinkinasu** byl transdukcí začleněn do **genomu nádorových buněk** a v nich teprve přeměňuje neaktivní **lékovou formu** (profarmakum) v aktivní látku s **cytotoxickým účinkem**
  - například **antimetabolit gancyclovir** je tímto enzymem **fosforylován** teprve v transdukovaných buňkách a stává se tak pro ně **cytotoxický**
  - **transdukcí genu HSV-TK** do nádorových buněk je tak zajištěna **selektivní terapie**
- uvedené příklady genové **terapie maligních nádorů** jen rámcově nastiňují současné směry v nádorové terapii, která by mohla být budoucí **kauzální terapií nádorových onemocnění**

## 118. Genetické mechanismy evoluce

---

- podle **syntetické teorie** sem patří
  - mutace
  - genové duplikace
  - selekce
  - genový drift
- **mutace**
  - **rozlišujeme mutace**
    - **tolerované:** mohou být pro svého nositele výhodné nebo neutrální
    - **zakázané:** nevýhodné pro svého nositele
  - proti **zakázaným mutacím** působí **selekce**, protože snižují schopnosti reprodukce svého nositele
  - extrémním případem takovýchto mutací jsou **mutace letální**
  - mutace **tolerované** selektovány nejsou, v případě výhodných mutací mohou být naopak **preferovány**
  - přináší totiž svému nositeli **výhodu** proti ostatním jedincům bez této výhodné mutace
- **genové duplikace**
  - většina mutací má pro svého nositele **negativní důsledky**, protože jimi dochází ke ztrátě **původní funkce genu**
  - mutací jen původních genů může dojít maximálně ke **zlepšení původní funkce**
  - **duplikace genů** mění zakázané mutace na **tolerované** – je zachována původní funkce + vzniká funkce nová (mutací v duplikaci)
  - **mechanismy vzniku duplikací**
    - nerovnoměrný **crossing-over**
    - nerovnoměrná **výměna** mezi sesterskými chromatidami
    - **sklouznutí** DNA-polymerasy
  - během evoluce dochází ke **zvětšování celého genomu** – polyploidizace, tandemové duplikace (rRNA, Hb, Ig, haptoglobin)
- **selekce**
  - klasický evoluční mechanismus **Darwinismu**
  - **typy selekce**
    - **normalizující selekce:** zachování současného stavu populace vylučováním odchylek od normy (např. dědičných chorob)
    - **balancující selekce:** udržuje v populaci určitý stupeň polymorfismu, např. preference heterozygotů
    - **direkcionální selekce:** uplatňuje se při změně vnějších podmínek, kdy přežívá nejlépe adaptovaný fenotyp, jde o přírodní výběr ve smyslu klasického Darwinismu, příkladem může být průmyslový melanismus některého hmyzu
  - **Haldaneovo dilema**
    - selekcí dochází ke **snižování počtu potomků**
    - při selekci proti více různým genům už jsou tyto ztráty **nezanedbatelné**, což by vedlo k **vyhynutí populace**
    - pokud by však selekce **nebyla tak silná**, aby vedla k vyhynutí, evoluce by pokračovala mnohem **pomaleji**, než je tomu ve skutečnosti
  - **Fisherův fundamentální teorém**
    - rychlost **vzestupu relativní plodnosti** kteréhokoliv organismu v kterékoli době je rovna **genetickému rozptylu** relativní plodnosti v této době
    - řada odborníků teorému vytýká čistě lineární model dědičnosti relativní plodnosti
- **genový drift**
  - genetický drift je proces, kdy dochází k **náhodným změnám** (posunu = driftu) ve frekvencích alel v dané populaci
  - tyto změny tedy nejsou zapříčiněny **selekčními tlaky**

- v **konečně velkých populacích** (malých populacích) se uplatňuje náhodné kolísání **genových frekvencí**, které vede až k **fixaci jedné alely** (její frekvence dosáhne 100%) popřípadě její **eliminaci** (její frekvence dosáhne 0%)
- takto může vymizet i **výhodná adaptace**
- proti driftu působí **mutace a migrace**
- genový drift je velmi **silným** ve velmi **malých populacích** – efekt nálevky
- podobně se uplatňuje také **efekt zakladatele** – vznik nové populace z velmi malé **skupinky jedinců** (například četnost **porfyrie** mezi bělošským obyvatelstvem Jihoafrické republiky)
- **selekční drift** je pak název pro kolísání intenzity selekce
- vedle selekce je drift považován za jeden z **hlavních mechanismů evoluce**

## 119. Druh a speciace

- **chromosomální evolucí** rozumíme změny v **molekulách DNA**, které se objevovaly během **vývoje druhu**
- ačkoliv ke **změnám na chromosomech** dochází velice často, jen málo z nich se stane trvalou součástí **karyotypu daného druhu**
- **přechodné změny** se nachází pouze u daného jedince
- **trvalé změny** jsou předávány dalším a dalším generacím a mohou být proto prostředkem ke **sledování společného původu** více druhů
- mezi jednotlivé prostředky **chromosomální evoluce** patří
  - translokace
  - inverze
  - změny telomer a centromer
  - duplikace
  - změny počtu opakování apod.
- **nestabilita genomů**, která umožňuje všechny **výše zmíněné úpravy DNA**, je základem evoluce
- jedná se často o velice **rychlý proces**, který je schopen měnit účelně pořadí genů na chromosomu
- v rámci změn však mohou vznikat i formy, které **nositele poškozují**
- v případě **některých duplikací** nebo inverzí může docházet ke **zdvojení určitých genů** nebo naopak k **jejich chybění**
- termín **speciace** označuje biologický proces **vzniku druhu**
- **důvody změn DNA**
  - základem pro **změny a kombinace chromosomů** je narušení soudržnosti DNA – **chromosomální zlomy**
  - mohou být **evokovány radiací** nebo působením **mutagenů**
  - změny jsou patrné pokud jde o **inverze** v oblastech **pericentrických nebo paracentrických**
  - pokud dochází k přesunům na **koncích chromosomů** – oblastech telomer – vliv se často neprojeví vůbec
  - **telomery** (koncev části chromosomů) jsou totiž určitým obranným mechanismem, který má zabraňovat **spojování jednotlivých chromosomů**, navíc jsou často tvořeny skupinami **opakujících se sekvencí**
- **následky změn**
  - následky **inverzí**, ke kterým dochází na chromosomech, jsou závislé na tom, zda proběhl nebo neproběhl **crossing-over**
  - pokud k němu dojde, výsledkem bývají **nebalancované mutace gamet**, u kterých vznikají problémy i v dalších generacích
  - pokud ke **crossing-overu** při inverzi **nedojde**, obvykle jsou gamety v pořádku
  - **crossing-over** neboli překřížení je genetická rekombinace během meiosis
  - část **maternální chromatidy** při něm může být zaměněna za odpovídající část **paternální chromatidy**

- tento proces normálně napomáhá vzniku jedinců s **novým uspořádáním** genů
- obecně můžeme říci, že změny na **chromosomální úrovni** vedou ke vzniku odlišných **heterozygotů**
- pokud dochází k **poškození DNA** těchto jednotlivců, je často zasažena i jejich schopnost se rozmnožovat
- **rozdíly v počtu chromosomů jednotlivých druhů**
  - kromě změn v uspořádání genů na chromosomech se setkáváme mezi jednotlivými druhy také s **rozdílným počtem chromosomů**
  - lidský genom obsahuje **23 párů chromosomů** ( $n=23$ ), ale savci obecně jsou v počtech párů velice variabilní
  - jednodušší organismy vystačí s počty **výrazně nižšími**
  - například Drosophila má **4 páry chromosomů** ( $n=4$ )
  - jeden z párů je však pro jednotlivé druhy stejný – pohlavní chromosomy
  - **počet chromosomů** je určitou formou adaptace, která umožňuje různý počet **rekombinací genomu**
  - čím více máme chromosomů, tím více **probíhá rekombinací**
  - zajímavým příkladem je **vztah lidí a šimpanzů**
    - **lidský genom** obsahuje  $2n = 46$  chromosomů
    - **šimpanzi** mají genom větší –  $2n = 48$  chromosomů
    - lidé se vývojově od větve lidoopů oddělili už dávno
    - od svých **blízkých příbuzných** se lišíme jen 9 pericentrickými inverzemi a jednou centrickou fúzí
- **evoluce na molekulární úrovni** se začala rozvíjet s objevem nových DNA technologií
- důvodem **zájmu vědců** je schopnost DNA být **svědkem vývoje druhů**
- vědci porovnávají DNA sekvence mezi **jednotlivými organismy**, čímž přicházejí na **příbuzenské vztahy**
- určitým problémem v tomto zkoumání jsou změny, ke kterým náhodně v DNA dochází a které mohou vést ke **zkreslení**
- ve zkoumání se užívá **dvou základních metod**
  - **zkoumání DNA** (struktury populace, variací a systémů)
  - **zkoumání různých organismů**
- **genom je proměnlivý**, proto v něm vznikají změny, které vedou ke zkreslení zdrojů DNA
- právě tím se zabývá studium **molekulární evoluce**
- **iniciální frekvence**, se kterou se vyskytuje v genomu mutace je  $\frac{1}{2}n$  (u člověka  $n=23$ )
- tato hodnota je také **mírou pravděpodobnosti fixace** dané mutace
- každá část genu **inklinuje k mutacím** různým způsobem
- vliv hraje také **selekce**
- **největší vliv na molekulární evoluci mají**
  - genetické mutace
  - rekombinace
  - drift
- evoluce vede k postupnému **přizpůsobování se** jedince vlivu okolí
- předpokládá se, že **všechno živé na zemi** pochází z prapůvodní buňky, která byla společným základem a existovala přibližně před **4 miliardami let**
- **postupným vývojem a diferenciací** došlo k vytvoření mnoha organismů, které se rozprostřely po celém světě
- **důvody evoluce**
  - **hypotéza selekce**
    - příčinou evoluce je snaha o **balancování** a pozitivní **selekcí**
  - **hypotéza neutralistická**

- zdůraznění vlivu mutací, náhodného genetického driftu a negativní selekce
- **hypotéza mutační**
  - zdůrazňuje vliv mutačního tlaku a náhodného driftu
- **mutace**
  - buněčné dělení je založeno na **předávání genetické informace** z mateřských buněk do buněk dceřinných
  - vždy přechází **polovina genetické informace**, proto jsou děti podobné svým rodičům
  - tyto přenosy však **nemusí být vždy přesné** a může docházet ke vzniku mutací
  - výsledkem může být **potomstvo silnější a schopnější přežít** nebo naopak potomstvo **slabší a méně odolné**
  - změny však mohou vést také k **neutrálním projevům** se stejnou životaschopností
- **rekombinace**
  - rekombinace je základní prvek v **sexuální reprodukci**
  - obecně předává každý rodič svému potomkovi **jednu kopii chromosomu**
  - pokud dojde během dělení ke kontaktu mateřského a otcovského chromosomu, může docházet k **promíchávání genů**
  - tím je zaručena široká paleta možného **genetického vybavení potomků**
  - proto nejsou děti týchž rodičů stejné
- **drift**
  - drift je určitým druhem **náhodného výběru**
  - počet jedinců, kteří nesou v populaci určitý znak, se nazývá **frekvencí genu**
  - drift má výrazný vliv zejména v **malých populacích**
  - jedná se o proces, kdy v rámci **dědění informace** může docházet k **potlačení** jednoho ze dvou druhů alel a **preferenci** alely druhé
  - drift nemusí vždy vést k **prospěchu jedince**, protože frekvence jednotlivých alel je **náhodná**
  - vztah **rekombinace a driftu** je poměrně úzký
  - původně **přínosné** alely mohou být totiž pomocí rekombinace přenášeny do **nevhodných** pozic
  - v některých případech pak zasahuje **přírodní selekce**, která nositele špatných genů **eliminuje**



## 120. Evoluce genu, evoluce genomu

---

- gen vzniká z genu
- geny jsou si podobné
- **duplikacemi** a postupnými **diverzifikacemi genů** docházelo ke vzniku genových **rodin a nadrodin**
- geny mohou vznikat těmito **mechanismy**
  - **přeskupování** exonů
  - **duplikace** genů
  - **retrotranspozice**
  - **fúze a štěpení** genů
- **přeskupování exonů**
  - exony různých genů mohou být spojeny za **vzniku nového genu**
- **duplikace genů**
  - **nerovnoměrný crossing-over**, nerovnoměrná výměna mezi sesterskými chromatidami, **sklouznutí DNA-polymerasy**
  - duplikace genů je základem **diversifikace**
  - duplikován může být celý gen, jeho **část** nebo i **klastr genů**
  - pokud je gen v genomu jenom ve **dvou kopiích** (na chromosomu od otce a od matky), pak mutace v něm obvykle způsobí **ztrátu jeho funkce** a tudíž jsou pro svého nositele nevýhodné
  - v takovémto případě může nanejvýš nastat **mutace**, která původní funkci vylepší, ale nemůže vzniknout **funkce nová**, protože tím by se ztratila ta stará
  - pokud je však gen **duplikován** a to třeba i mnohonásobně, mohou vést mutace v jeho kopiích ke vzniku **nové funkce**, což může být evolučně **výhodné** a proto preferované
  - tak se mutace v duplikovaném genu rozšíří v **populaci**
  - duplikace genů mění mutace **zakázané na tolerované**
- **retrotranspozice**
  - kopíruj a vlož
  - **přemisťování** úseků DNA v genomu

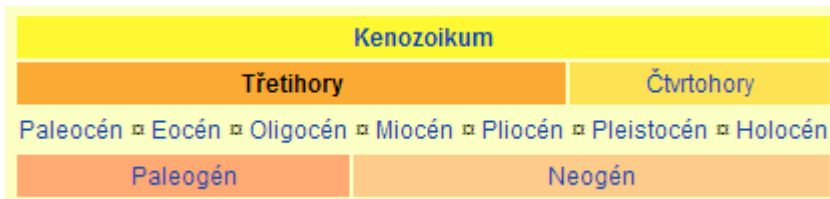
## 121. Vznik a vývoj druhů

- i když **původ života na Zemi** přenosem z vesmíru nelze vyloučit, předpokládají takřka všechny moderní teorie, že živé soustavy vznikly na Zemi (autochtonně) postupným **zvyšováním organizovanosti** „neživé hmoty“
- všechny dnes **existující hypotézy** jsou variantami, které vycházejí z jednoduchých postulátů
  - **nebiologický vznik organických sloučenin** a jednoduchých biopolymerů (zejména peptidů a peptidonukleotidů)
  - **asociace molekul organických látek** na podkladě fyzikálních či fyzikálně-chemických procesů v ohraničenou soustavu s relativně stabilní strukturou
  - **vznik primitivního metabolismu a autoreprodukční schopnosti** těchto soustav na podkladě fixace volné energie a biochemické paměti
- vývoj živých soustav zahrnuje **prebiotickou etapu** (chemický vývoj a vznik určitého stupně organizovatelnosti) a **etapu biotickou** zahrnující vznik nejprimitivnějších živých soustav (eobiontů) a jejich vývoj v evolučně **primitivní buňky**
- **druh** je jednou ze základních kategorií organizace živých soustav – **vývoj** jednotlivých druhů (**speciace**), existujících (**recentních**) i vymřelých (**fosilních**), je konkrétním obrazem, jak se živá příroda vyvíjela a vyvíjí
- předpokládáme-li, že život je **monofyletický** – tj. že všechny druhy vznikly z **jednotného základu** – pak množství existujících druhů vzniklo **rozrůžňováním** (divergencí)
- **postupná přeměna** jednotlivých druhů v jiné vyjadřuje i míru jejich příbuznosti a je tak základem **přirozeného systému organismu**
- **druh**
  - soubor jedinců shodných v **základních znacích** (druhových) a dávající navzájem **plodné potomstvo** (Darwin)
  - za **hlavní kritérium** (i když ne dokonalé) pro vymezení druhu považujeme dnes jeho **reprodukční izolaci** – tj. skutečnost, že jedinci téhož druhu dávají při zkřížení **plodné potomstvo**, nikoli však s jedinci jiného druhu (mezidruhová hybridizace je ovšem možná, **mezidruhová hybridi** nejsou však plodní)
  - druhy jsou tedy navzájem odděleny **reprodukční bariérou**
- **působením selekčních faktorů** dochází ke změně genofondu populace, tj. mění se postupně **vlastnosti** jedinců a celé populace (druhu)
- rozdělí-li se populace na **subpopulace**, které jsou pod tlakem jiných selekčních faktorů (kritérií), může se jejich **genofond** vyvíjet různým směrem
- **izolace části populace** nebo **rozdělení populace** na subpopulace je tedy základním předpokladem **divergentního vývoje** a předpokladem pro vznik nových druhů
- **geografická izolace**
  - při vzniku **geografických izolátů** vede k tomu, že oddělené subpopulace ztrácejí mezi sebou jakýkoli genetický kontakt = **tzv. alopatrické populace**
  - **příčiny geografické izolace**
    - **postupná migrace** části populace do jiných areálů
    - **introdukce** části populace do jiného prostředí
    - rozsáhlé přírodní **katastrofy**
    - **geologické změny** apod.
- k **rozpadu populace** může dojít i bez geografické izolace – jestliže se z nějakých příčin **nemohou** určité odrůdy či plemena téhož druhu spolu **křížit**
- tedy i u **společně žijících** (sympatrických) subpopulací může dojít k izolaci = **tzv. izolace reprodukční**
- **reprodukční izolace**
  - reprodukční izoláty vznikají z **různých příčin**
  - **příčiny reprodukční izolace**
    - **sezónní rozdíly** při páření různých odrůd (sezónní izolace)
    - **znemožnění kopulace** či oplození z anatomických příčin (mechanická izolace)
    - **letalita** některých genových kombinací (zygotová či embryová izolace)

- **polyploidizace** apod.
- **prostorovou izolaci** subpopulací je nutno považovat za hlavní předpoklad pro **vývojovou divergenci** a tedy i pro vznik **nových druhů**

## 122. Evoluce druhu homo sapiens

- **antropogeneze** = vývoj současného člověka
- **vývojová větev** rodu Homo vyrůstá z **hlavní větve** čeledi Hominidae a celá tato důležitá větev vyrůstá z **kmene Hominoidea**, kořeny této nadčeledi sahají hluboko do třetihor
- na **prahu třetihor** vznikla z hmyzožravců společná vývojová **linie primátů (Primates)**
- ta se již v **paleocénu** rozštěpila ve dvě větve – větev **poloopic** (Prosimii) a **společnou větev opic**, veleopů a lidí
- poslední **společný článek** této větve žil v **Africe asi v neocénu**, kde se od něj izolovala větev **ploskonosých opic Nového světa**
- **spodní oligocén** byl pak epochou posledního **společného článku** úzkonosých opic Starého světa a nadčeledi Hominoidea, sdružující čeledi **Hylobatidae, Pongidae a Hominidae**
- dosud nejstarší **známí primáti** této nadčeledi byli Propliopithecus a Aegyptopithecus a Proconsul
- od dosud neznámého **miocénního primáta**, který byl nejspíš blízký rodu Proconsul, se od sebe odštěpily **vývojová větev orangutana** a přechodně společná **větev šimpanze, gorily** a čeledi **lidé** (Hominidae)
- **evoluce čeledi hominidae**
  - známými vývojovými stupni čeledi Hominidae jsou rody Ramapithecus, Australopithecus a Homo
  - **Ramapithecus**
    - široce rozšířený v Africe, Evropě i v Asii na přechodu miocénu a pliocénu
    - při vzpřímeném stojí **vysoký 100-110 cm**
    - pohyboval se většinou **kvadrupedně**, po kotnících prstů ohnutých v pěst
    - **plochá mozkovna** o objemu asi 350 cm krychlových
    - v **tlupách** sbíral semena a jinou rostlinnou potravu
  - **Australopithecus**
    - široce rozšířený v Africe na přechodu pliocénu a pleistocénu
    - **vysoký 115-125 cm, hmotnosti** asi 25-35 kg
    - měl již dokonale **vzpřímenou postavu**, chodil bipedálně
    - hlava měla **klenutější mozkovnu** o objemu asi 490 cm krychlových a mozková kůra byla bohatě rýhovaná
    - byl **všežravec** s převažující masitou stravou
  - **Homo habilis**
    - žil ve střední a východní Africe již ve starém pleistocénu
    - v řadě somatických znaků byl **vyspělejší** než Australopithecus
    - průměrná **lebeční kapacita** asi 750 cm krychlových
    - měl typický **lidský chrup**, dokonale **vzpřímenou postavu**, bipedální chůzi odpovídala i **klenba nožní**
    - prsty zakončené **nehty**
    - **lovil** ve stepích, vyráběl **nejprimitivnější pracovní nástroje**
  - **Homo erectus**
    - pleistocénní obyvatel všech světadílů Starého světa
    - **kapacita mozkovny** cca. 1100 cm krychlových
    - žil a **lovil** ve stepních krajinách s řídkými lesy



- bydlel v **jeskyních**, z kamenů vyráběl **hrotnaté pěstní klíny**, sekyry a škrabadla
- znal již **oheň**, který dovedl po generace udržovat, ale ještě **ne rozdělávat**
- **Homo sapiens**
  - **Homo sapiens steinheimensis**
    - měl lebku s primitivními znaky, ale **kapacitu mozkovny** 1200 cm krychlových
  - **Homo sapiens neanderhalensis**
    - pračlověk
    - lebka se již postupně oprošťovala od primitivních znaků a dosahovala **kapacity mozkovny** 1400-1450 cm krychlových
    - žil a lovil v **tlupách**
    - znal a pečlivě **udržoval oheň**, vyráběl **kamenné nástroje** z odštěpků pazourků
    - kostěné i dřevěné nástroje opracovával poměrně **složitě**
    - vytvořil **prvobytně pospolnou společnost**
    - hlasové projevy se postupně vyvíjely v **jednoduchou řeč**
    - měl systém **kultů a rituálů**
  - **Homo sapiens sapiens**
    - člověk předvěký
    - průměrný **objem mozku** měl asi 1500 cm krychlových
    - lovil **velkou zvěř**
    - budovali **první obydlí** (zemljanky)
    - jako první se odívali (kůže)
    - vytvořili **první artikulovanou řeč**, závislou na mozkové kůře
    - vznikla druhá **signální soustava** a vznikla tak i **lidská inteligence**
- **člověk (Homo)** se po **2,5 milionu let** vyvíjel, po stránce biologické i kulturní, velmi pomalu
- asi před 40 tisíci lety přišla **evoluční změna** – dnešní člověk se objevil na scéně neuvěřitelně rychle
- v době kratší než **2% celého časového období**, po které již existují bipední hominidní organismy
- tento biologicky a zejména **kulturně nový člověk** vznikl jako produkt prudkého rozvoje **druhé signální soustavy**, svého intelektu, jímž záhy vytvořil veškeru moderní civilizaci

## 123. Cíle a úkoly lékařské genetiky

- 
- klinická, neboli **lékařská genetik**a tvoří samostatný lékařský obor
  - vychází z poznatků **obecné a experimentální genetiky**, které využívá na zkoumání vlivu genetických a vnějších faktorů na vznik **různých lidských chorob** a vad
  - přispívá k výkladu jejich **formální a kauzální patogeneze**, přináší nové diagnostické možnosti v **odhadování** heterozygotů, nosičů dispozic a nemocných
  - dědičné choroby a vrozené vývojové vady postihují **všechny orgánové systémy**, proto se s těmito skupinami chorob setkává drtivá **většina lékařských oborů**
  - je to však právě **lékařská genetik**a, kdo hraje ústřední roli v přístupu k těmto skupinám diagnóz
  - přesné **stanovení diagnózy** pomocí cytogenetického či molekulárně-genetického vyšetření, stanovení rizika opakování této patologie a možné preventivní přístupy jsou hlavní úkoly klinické genetiky
  - **klinická genetik**a
    - vypracovává a používá **metody pro účinné ovlivnění lidské reprodukce** a zdravého vývoje mladé generace v návaznosti na ostatní obory **léčebně preventivní péče** a napomáhá tak ke zlepšení **kvality populace**
    - základním rysem je **preventivní zaměření**, její principy se uplatňují ve všech oborech léčebně preventivní péče
    - zabývá se posuzováním **genetického rizika**, prevencí, diagnostikou a v některých případech i **léčbou geneticky podmíněných nemocí** a vrozených vad – tato péče začíná již **prekoncepčně**, pokračuje v období **prenatálním** a dále pak u dětí a dospělých

- nedílnou součástí je **registr a dispenzarizace jedinců** a rodin s dědičně podmíněnou vrozenou vadou a chorobou
- lékařská genetika je svými metodami schopna **vyčlenit z populace rizikové rodiny** a rody a umožnit jim vysoce efektivní preventivní a diagnostickou péči
- **genetická konzultace**
  - je nepostradatelnou součástí **klinicko-genetické praxe**
  - **účelem je**
    - poskytnout pacientovi všechny **důležité informace** k jeho chorobě
    - vysvětlit výsledky dosud **provedených testů**
    - rozebrat s ním možné **příčiny** jeho choroby, možnosti **léčby**
    - stanovit **rizika** opakování této choroby u jeho potomků
    - navrhnout **opatření**, která by toto riziko zmenšila
  - genetika není zcela jednoduchá záležitost, proto **pečlivě a srozumitelně vysvětlení** potřebných informací pacientovi je v tomto případě extrémně důležité
- **základní metodou** klinické genetiky zůstává **genealogické vyšetření** s rozbořem rodinné anamnézy
- po základním **posouzení případu** mohou být indikována další vyšetření (vyšetření karyotypu – viz indikace chromosomálního vyšetření, molekulárně-genetická vyšetření)
- důležité je zmínit, že klinická genetika je **striktně nedirektivní obor**
- **veškerá rozhodnutí** (například rozhodnutí o umělém ukončení těhotenství v případě zjištění závažné vývojové vady plodu) jsou zcela **dobrovolná** a klinický genetik má pouze poskytnout **dostatek informací** pro pacientovo **svobodné rozhodnutí**
- rozhodně by pacienta neměl k žádnému rozhodnutí **nutit**
- **úkoly klinické genetiky**
  - **prevence**
    - i přes některé pokroky v genové terapii není prozatím možné geneticky podmíněné choroby **běžně léčit kauzálním způsobem**
    - proto je prevence stále nejdůležitějším úkolem lékařské genetiky
    - prevence souvisí se zjišťováním **genetického rizika** různých vad nebo chorob
    - zjišťují se i rizika případných **vnějších faktorů**, které by mohly mít na genetickou informaci vliv (rizika **pracovního prostředí** apod.)
    - v rámci prevence vrozených vad je důležitá i spolupráce s dalšími obory
    - na základě zjištěných fakt je hledáno **optimální řešení** situace
    - v případě vrozených vývojových vad je dobrou prevencí **plánované rodičovství**
    - **profylaktické** podávání kyseliny listové může působit preventivně u vrozených vad neurální trubice
    - **v praxi je prevence zaměřena na**
      - **rodinný** ochranný režim včetně prekoncepční přípravy
      - **screening** vrozených vad u těhotných
      - sekundární **prevenci** vrozených vad a dědičných onemocnění při prenatalním genetickém vyšetření
      - vyhledávání **nosičů** vloh pro genetická onemocnění v postižených rodinách
  - **diagnostika**
    - úkolem diagnostiky je **odhalit vrozené vývojové vady** nebo geneticky podmíněné choroby a přesně je zařadit
    - prenatalní diagnostika se týká vyšetření ještě **nenarozeného jedince**
    - naopak postnatalní diagnostika se týká jedinců již **narozených**
    - existují **různá vyšetření** biochemická, cytogenetická, molekulárně genetická či zobrazovací, na základě kterých je možné vady či choroby diagnostikovat
    - vyšetřuje se i **nosičství** určitých chorob, kdy jedinec sám chorobou postižen není, ovšem může tento dědičný předpoklad předat svým potomkům
    - různé vady, choroby či syndromy nemusí jako první diagnostikovat genetik (bývá to třeba pediatr či internista), ovšem často je pro **potvrzení diagnózy** požadováno i genetické vyšetření

- časná prenatalní diagnostika vrozené vývojové vady má rovněž velký **terapeutický přínos**
- ačkoliv jen minimum stavů lze dneska řešit již prenatalně, může intenzivní a cílená **perinatální terapie** být rozhodující pro přežití či budoucí život dítěte s vrozenou vadou
- **diagnostika využívá metod**
  - genealogických, somatometrických, dermatoglyfických
  - cytogenetických, biochemických a molekulárně genetických
  - ve spolupráci s dalšími odděleními se užívají i vyšetření imunobiologická, radioimunobiologická, serologická apod.
- **léčba vad a chorob**
  - léčba **geneticky podmíněných chorob** na úrovni molekulární (tedy na úrovni DNA či RNA) je stále ve **stádiu vývoje**
  - proto i dnes jde stále jen o **péči symptomatickou**, kdy se snažíme omezit projevy choroby, aniž bychom léčili její příčinu (kterou je mutace v DNA)
  - vlastní symptomatická léčba je již úkolem **specializovaných oborů**
  - řadu strukturálních vrozených vad je možné řešit **chirurgicky**, rozhodující je leckdy **časná diagnóza** (například vrozených vad srdce)
  - mimo chirurgie se při léčbě uplatňují i obory další, řadu **metabolických chorob** je možné velmi dobře kompenzovat **speciální dietou** apod.
- **registrace a monitorování**
  - výskyt vrozených vývojových vad je v České republice, podobně jako ve většině vyspělých zemí, registrován za účelem **lepšího povědomí** o stavu populace a úspěšnosti prenatalní diagnostiky, stejně jako za účelem objevu nových faktorů vzniku těchto vad
- **spektrum případů**
  - klinická genetika řeší celou řadu případů a **různých diagnóz**
  - některé skupiny se však přeci jen řeší častěji
  - **jsou to především tyto případy**
    - **novorozenci** a děti s podezřením na vrozené vývojové vady
    - děti či dospívající s **psychiatrickým nálezem**, budícím podezření na chromosomální či jinou genetickou etiologii (vrozené metabolické poruchy)
    - děti a dospívající s **poruchou růstu** či s poruchou **sexuálního vývoje**
    - děti i dospělí s podezřením na **geneticky podmíněné choroby** (například podezření na trombofilní mutace či cystickou fibrosu)
    - osoby s **rodinnou anamnézou** častého výskytu **nádorového onemocnění** v mladším věku, u kterých je podezření na rodinný výskyt geneticky podmíněného **nádorového syndromu**
    - osoby či páry, trpící **sterilitou** (dlouhodobě neúspěšná snaha o koncepci) nebo **reprodukčními ztrátami** (opakované potrácení)
    - páry přicházející na **prekoncepční poradu**, například z důvodu výskytu vrození vady či geneticky podmíněné choroby v **rodinné anamnéze**
    - **těhotné ženy**, u kterých screeningové vyšetření (biochemické či ultrazvukové) upozornilo na **zvýšené riziko** vrozené vývojové vady, nebo u kterých je toto riziko zvýšené z **důvodu věku** (obecně nad 35 let)
- **spolupráce**
  - klinická genetika díky svému postavení spolupracuje téměř se všemi lékařskými a **diagnostickými obory**
  - přesto lze najít několik oborů, u kterých je **spolupráce nejčastější**
    - cytogenetické laboratoře a molekulárně-genetické laboratoře
    - gynekologie a porodnictví (včetně fetální medicíny a ultrazvukové diagnostiky)
    - pediatrie a neonatologie
    - klinická biochemie
    - onkologie
    - neurologie a psychiatrie
    - plastická chirurgie

## 124. Etické a právní aspekty lékařské genetiky

---

- genetika přímo nebo nepřímo zasahuje do **lidské reprodukce**, ale existuje velké riziko různých forem jejího **zneužití**
- není konsensus v **prioritě práv** různých subjektů – právo nenarozeného dítěte proti právu rodičů odmítnout narození postiženého dítěte
- z **právního hlediska** je rozhodující, že naše právo považuje **plod** za součást **těla matky** a za právní subjekt teprve **živého novorozence**
- v **České republice** má při volbě diagnostických a preventivních postupů v těhotenství **rozhodující slovo matka**
- **lékařské tajemství**
  - údaje o **zdravotním stavu**, výsledcích **genetického vyšetření** i **rizicích** mohou být sdělovány dalším osobám jen se **souhlasem klienta**
  - platí **zákaz sdělování informací** bez souhlasu klienta zaměstnavateli a pojišťovně
- **právo pacienta být informován/neinformován**
  - **genetická konzultace** je dobrovolná, každý pacient má právo **žádat o vyšetření** a získat veškeré informace o svém zdravotním stavu, ale má **právo je i odmítnout** (právo vědět nebo nevědět)
  - v praxi to znamená pro konzultujícího povinnost klienta v **plné míře informovat** o zjištěných skutečnostech a stejně respektovat, pokud **vyšetření odmítá** nebo si nepřeje **znát výsledky vyšetření**
  - lékař je povinen **poučit vhodným způsobem** nemocného, popř. členy jeho rodiny, o povaze onemocnění a o potřebných výkonech tak, aby se mohli stát **aktivními spolupracovníky** při poskytování léčebně preventivní péče
  - zákon požaduje pro lékařské úkony tzv. **poučený souhlas pacienta**, u náročnějších vyšetření se doporučuje písemný souhlas pacienta – **pozitivní revers** – v genetice jde hlavně o **invazivní metody** prenatálního vyšetření plodu a presymptomatickou diagnostiku DNA
  - **odmítá-li pacient** doporučené vyšetření, vyžádáme si **negativní revers** – písemné prohlášení pacienta, že ač o významu vyšetření byl **informován**, vyšetření **neakceptuje**
- **umělé ukončení těhotenství**
  - **na žádost těhotné** – interrupce do 12. týdne gravidity, pokud tento výkon není z nějakého hlediska **kontraindikován**
  - není součástí **zdravotní péče**, pokud se nejedná o zdravotní (genetické) **indikace**
  - **po uplynutí 12 týdnů gravidity** lze uměle přerušit těhotenství jen je-li ohrožen život ženy nebo je-li prokázáno **těžké postižení** plodu nebo že plod je neschopen života
  - svědčí-li pro umělé přerušování těhotenství **genetické důvody**, lze uměle přerušit těhotenství nejpozději **do 24. týdne gravidity**
  - nikdo ze zdravotníků **nesmí být nucen** spolupracovat na ukončení těhotenství
- **etické problémy molekulární genetiky**
  - **molekulární genetika a DNA diagnostika** sice přinesly výrazný pokrok, ale zároveň se prohloubily problémy se zachováním **lékařského tajemství**
  - DNA analýza může např. jen potvrdit nebo vyvrátit **klinickou diagnózu**
  - u chorob s pozdní manifestací a možností prevence a časné léčby je zájem o vyšetření zaměřen na **presymptomatickou diagnózu**, zde ve zvýšené míře platí dodržení lékařského tajemství

## 125. Genetická konzultace a její význam

---

- **lékařská genetika** zaměřuje svou péči nejen na pacienta, ale i na **celou jeho rodinu**
- hlavním úkolem **genetické konzultace** je poskytnout pacientovi přiměřené informace o **podstatě postižení** a **možnostech** jeho léčby
- jde-li o **dědičné onemocnění** i informace o riziku postižení pacienta a **dalších členů rodiny** a o možnostech předejít postižení nebo alespoň **snížit riziko**

- **genetická konzultace má 3 části**
  - **stanovení diagnózy**
    - **OA probanda**, studium zdravotních záznamů a výsledků dosavadních vyšetření
    - **RA obou větví rodiny**, klinicko-diagnostické vyšetření probanda, eventuálně i dalších členů rodiny
    - **cílená laboratorní vyšetření** – cytogenetická vyšetření a DNA analýza
  - **informace pacienta o podstatě postižení**
    - srozumitelné **vysvětlení podstaty postižení**, jeho klinické prognózy a možných komplikací
    - informace o **možnostech prevence a léčby** a o vyšetřeních, která mohou hrozící komplikace včas odhalit
  - **prognóza a preventivní opatření**
    - na závěr konzultace, seznámení pacienta s **rizikem postižení** jeho nebo dalších členů rodiny s možnostmi prevence
    - **nedirektivní vedení** této části – konzultant sděluje fakta neutrálním způsobem a proband sám musí zvážit **rozhodnutí o rodičovství**
    - **povinností konzultanta** je pomoci konzultovaným jejich volbu realizovat
    - tento **proces nelze uspěchat** – rodina musí mít čas vyrovnat se s novou skutečností
    - **názor rodiny** musí být za každých okolností akceptován
- **stanovení genetické prognózy vychází ze**
  - **známého typu dědičnosti**
    - **McKusickův katalog** mendelovské dědičnosti u člověka – uvádí téměř 6000 monogenně dědičných znaků
    - při stanovení prognózy se opíráme o ověřenou **klinickou diagnózu**, průkaz chromosomální aberace eventuálně o **výsledky DNA analýzy**
  - **genealogického vyšetření**
    - **stanovení typu dědičnosti** v rodině s více postiženými členy, zhodnocením štěpných poměrů zjištěných **genealogickým vyšetřením**
  - **empirického rizika**
    - pravděpodobnost opakování, zjištěná **studiem souboru rodin** s určitým postižením
    - uplatňují se u **polygenně dědičných znaků** a znaků **heterogenně podmíněných**
- **akceptabilita genetického rizika**
  - **výši genetického rizika hodnotíme jako:** nezvýšenou, nízkou, střední nebo vysokou
    - **nezvýšené riziko:** i při vyloučení přenosu vloh v rodině nemůžeme zcela zanedbat možnost postižení, např. způsobené novou mutací
    - **nízké riziko:** do 10%
    - **střední riziko:** mezi 10-20%
    - **vysoké riziko:** nad 20%
  - **subjektivní vnímání rizika** je ovlivněno nejen jeho výší, ale i závažností dědičného postižení, možnostmi prevence a léčby, socioekonomickými podmínkami ale i náboženským přesvědčením
  - za nejzávažnější postižení je nutno považovat těžká **invalidisující postižení** bez možnosti **kauzální terapie** – př. **Duchenova myopatie** (prenatální diagnostika umožňuje rodině **plánovat rodičovství** bez hrůzy z narození těžce postiženého dítěte)
  - riziko velmi **závažných postižení** neslučitelných se životem akceptuje rodina snáze – př. **Patauův syndrom**
  - s pokrokem medicíny je pro rodiny **akceptovatelné riziko** vad, které dříve jedince vyřazovaly ze společnosti – 25% riziko PKU s relativně **úspěšnou léčbou** postižených dětí dietou nebo 50% riziko polydaktylie s možností **chirurgické úpravy**
- je třeba **tolerovat i stanovisko** věřících, kteří se řídí zásadou ochrany počatého života bez ohledu na **výši rizika** a charakter **možného postižení**



## 126. Postnatální screening dědičných chorob

---

- **genetický screening** je dnes součástí programů zdravotnické péče
- původně šlo o **identifikaci novorozenců** s geneticky podmíněnou chorobou, která je léčitelná v případě **včasné diagnózy**, např. PKU
- **screening novorozenců**
  - **principy adekvátního screening testu**
    - **chorobný stav** musí být nejen **jednoznačně definovaný**, ale i léčitelný a jeho incidence ve sledované populaci musí být **významná**
    - samo **vyšetření** se musí dát udělat rychle a nenáročně na **velkém množství vzorků**
    - test má mít **málo falešně pozitivních výsledků** a podle možnosti nulovou falešnou negativitu
    - **dokončení diagnostiky** a začátek léčby musí být dobře zorganizované a promptní
    - pokud tyto podmínky **nejsou dodrženy**, nastanou komplikace
- **screening heterozygotů**
  - **podmínky umožnění screening testu**
    - **výrazný výskyt** choroby ve specifické populační skupině
    - **dostupnost testu** vhodného pro masový screening
    - možnost **prenatální diagnostiky**
  - **tato kritéria splňují choroby**
    - **Tay-Sachsova choroba**
      - často se vyskytuje u Židů rodu Aškenazi
      - jde o jednu z vícerých odlišných forem **familiární amaurotické idiotie** (amaurotický = nejasný)
      - **enzymová porucha** při této chorobě je významná deficiencie hexosaminidasy A (hex A) a to v široké škále tkání
      - úlohou hex A je odštěpit N-acetyl- $\beta$ -galaktosaminový zbytek od polysacharidového řetězce gangliosidové molekuly
      - v případě jeho **nedostatku** se gangliosid hromadí, hlavně v mozkové tkáni
      - heterozygoty lze detekovat **screeningovým vyšetřením krevních vzorků** na hexosaminidázovou aktivitu
      - choroba se dá detekovat **biochemickou analýzou** kultivovaných amniocytů
    - **srpkovitá anemie**
      - manifestuje se prakticky **vylučně u černochoů**
      - molekulárním podkladem je **abnormální hemoglobin - HbS**
      - jde o těžkou **hemolytickou chorobu** s charakteristickým sklonem červených krvinek na očividně **abnormální formu** v prostředí se sníženým **parciálním tlakem kyslíku**
      - **klinický obraz**: anemie, ikterus a krize – obstrukce cév a bolestivé infarkty různých orgánů (kosti, slezina, plíce)
    - **Thalasemie  $\beta$** 
      - **heterogenní skupina** poruch tvorby  $\beta$  řetězce HbA
      - způsobeno **poškozením genu** pro  $\beta$ -globin eventuelně **delecemi**
- **screening  $\alpha$ -fetoproteinu v séru matky**
  - možnost detekce **rozštěpových vad** eventuelně upozornění na Downův syndrom plodu
- hlavní úlohou genetického screeningu je **zlepšit zdraví společnosti**

## 127. Prenatální screening vrozených vad plodu

---

- **orientační metoda**, která slouží k vyhledání těhotných žen se zvýšeným rizikem některých **vrozených vad**
- u této skupiny těhotných je pak doporučováno pokračovat v **dalším vyšetření**, které již stanoví typ vady
- v každém těhotenství existuje **riziko asi 3-5%**, že plod může mít nějakou vrozenou vadu – od vad drobných až po závažné vady ohrožující život postiženého jedince
- toto riziko platí i pro **rodičovské páry** zcela zdravé, bez genetické zátěže v rodině
- test, který by 100% vyloučil všechny vrozené vady neexistuje, některé vady se ale dají odhalit **ultrazvukovým vyšetřením**, na jiné je zaměřen **biochemický screening**
- **provedení screeningu**
  - **odběr** se provádí obvykle v 15.-17. týdnu těhotenství
  - odebírá se 5 ml krve ze **žily těhotné**
  - laboratoř stanovuje hladiny **3 sledovaných látek**
    - alfa-1-fetoprotein (AFP)
    - volný estriol (uE3)
    - lidský choriový gonadotropin (hCG)
  - **zjištěné hodnoty** se dále zpracovávají počítačem, který bere v úvahu **týden těhotenství** určený ultrazvukem, hmotnost i věk těhotné
  - výsledkem je vyčíslené **individuální riziko** udávající pravděpodobnost postižení plodu vrozenou vadou
- **screening je zaměřen na vyhledávání rizika**
  - **Downova syndromu**
    - v případě rizika se doporučuje provedení **amniocentézy**
    - ta ho buď potvrdí nebo vyloučí
  - **Edwardsova syndromu**
    - diagnostickým testem je opět **amniocentéza**
  - **defektu neurální trubice (DNT)**
    - anencefalie, spina bifida, rozštěp přední stěny břišní
    - provádí se **ultrazvuk**
- **zvýšené hodnoty AFP**
  - **marker** vrozených vad plodů nekrytých kůží
  - např. rozštěp páteře
- **snížené hodnoty AFP a zvýšené hodnoty hCG**
  - charakteristické pro plody s **Downovým syndromem**
  - pro přesnější hodnocení jsou **odchytky hladiny** vyjadřovány v násobcích mediánů (MoM) a pro jejich vyhodnocení byly zpracovány počítačové programy hodnotící nejen délku těhotenství, ale i věk těhotné, její hmotnost a vycházející z mediánů té které laboratoře
- **invazivní vyšetření** je doporučováno, je-li **screening pozitivní**, tj. při rizicích vyšších než **1 : 350**
- **negativní výsledek screeningu** je, když je riziko vyhledávaných vad menší než riziko, které je důvodem k invazivnímu vyšetření
- **pozitivní výsledek screeningu** neznamena přítomnost vrozené vady, jen nutnost ověření dalším testem

## 128. Prenatální diagnostika chromosomových abercí, možnosti jejich prevence

---

- **vrozené chromosomální odchylky** jsou onemocnění způsobená **změnou počtu** chromosomů (genomové abnormality) nebo **změnou struktury** chromosomu (chromosomové abnormality)
- **vrozené** znamená, že jsou přítomny ve všech buňkách organismu a mohou se **přenášet** mezi generacemi
- jsou nazývány také jako **gametické**
- **odhady incidence** se odhadují na 5-8 případů na 1000 narozených
- **typické chromosomální odchylky**
  - **numerické aberace autosomů**: Downův syndrom (trisomie 21), Edwardsův syndrom (trisomie 18), Patauův syndrom (trisomie 13)
  - **numerické aberace gonosomů**: Turnerův syndrom (45,X), Klinefelterův syndrom (47,XXY), syndrom 47,XXX, syndrom 47,XYY
- **záchyt**
  - velmi **vyšoký počet** chromosomálních odchylek postihuje psychický a intelektuální vývoj jedince, proto má **prenatální detekce** významnou roli
  - se záchytem se začalo ve větší míře již v **60. letech**
  - hlavním prostředkem byla **amniocentéza**
  - o 10 let později se začala více používat **choriocentéza**
  - do budoucna se přistupuje spíše k **méně invazivním vyšetřením** – stanovení mateřského alfa-fenoproteinu (AFP), hCG nebo hladiny estradiolů, nověji také PAPP-A
  - stále důležitější roli má také **podrobné ultrazvukové vyšetření** zaměřené na specifické **markery** chromosomových aberací
  - stěžejní roli pro potvrzení diagnózy chromosomální aberace plodu má **cytogenetické vyšetření**
  - komplexní poradenství a návrhy vyšetřovacího procesu jsou v rámci **genetické konzultace**
  - prostředkem k vyšetření jsou **genetické testy**
- **rizikové faktory a varovná znamení**
  - abnormální výsledky **screeningu** (USG, biochemie)
  - těhotenství ve **vyšším věku** (nad 35 let)
  - infekční i neinfekční **nemoci těhotných**
  - **užívání léků** nebo expozice **chemickým látkám**
  - rodičovské páry s pozitivní **rodinnou anamnézou**
  - opakované **spontánní potraty**
  - poruchy **plodnosti**
- **prevence**
  - prevence vrozených chromosomálních abnormalit je poněkud svízelná
  - často se jedná o **onemocnění genetické**, kdy jsou chromosomy děděny po rodičích
  - **vnější vlivy** nemívají až tak významnou roli
  - přesto se doporučuje například **zvýšený příjem kyseliny listové** těhotným ženám
  - ta působí zejména proti **poruchám vývoje nervové trubice**
  - významnější je však **screening rodičů** - vyšetření se provádí ze vzorků krve pomocí **cytogenetického vyšetření** (sekundární prevence)
  - zvýšené riziko hrozí zejména **starším ženám**, za rizikový se považuje již věk matky **nad 35 let**
  - **primární prevencí** je omezení styku s potenciálně patogenně působícími faktory – biologické, chemické, fyzikální

## 129. Prenatální diagnostika dědičných chorob, možnosti její prevence

- umožňuje rodinám s **rizikem dědičných chorob** a vrozených vývojových vad plánovat rodičovství s vědomím, že postižení plodu bude možné zjistit již **v průběhu těhotenství**
- zahrnuje **vyšetřovací postupy**, které směřují k vyhledávání statisticky významné odchylky ve struktuře nebo funkci, která přesahuje hranice **fenotypové variability**
- v závažných případech umožňuje **ukončení gravidity**, v dalších je možno v předstihu plánovat optimální **perinatální péči**
- po zjištění **neléčitelného postižení** plodu je rodina v plné míře informována a má možnosti požádat o **ukončení těhotenství** do 24. týdne gravidity
- pokud je zjištěno postižení plodu **neslučitelné se životem**, je možné na žádost rodiny ukončit i **po 24. týdnu gravidity**
- ke **genetické konzultaci** a indikaci prenatální diagnostiky gynekologové odesílají
  - **těhotné s rizikem** vrozených vývojových vad a dědičných chorob pro plod na základě zjištění v osobní nebo rodinné anamnéze
  - **těhotné starší 35 let**
  - na základě pozitivních výsledků **screeningových vyšetření** (UZ plodu, vyšetření biochemických markerů ze séra matky)
- **invazivní vyšetření** se provádí na základě výsledků genetické konzultace a s poučeným **souhlasem těhotné** (biopsie choriových klků, amniocentéza, fetoskopie)
- **typy vyšetření**
  - screeningová
  - cílená
  - neinvazivní
  - invazivní

### Neinvazivní vyšetření

- **odběr krve matky**
  - **screening biochemických markerů**
    - alfa-fetoprotein (AFP)
    - choriový gonadotropin (hCG)
    - nekonjugovaný estriol (uE)
  - provádí se po **16. ukončeném gestačním týdnu**
  - **zvýšené hodnoty AFP**
    - marker vrozených vad plodu **nekrytých kůží** (rozštěp páteře)
  - **snížené hodnoty AFP a zvýšené hCG**
    - charakteristické pro **Downův syndrom**
    - pro přesnější hodnocení odchylky hladiny vyjadřovány v **násobcích mediánů** (MoM)
    - pro jejich vyhodnocení jsou zpracovány počítačové programy hodnotící nejen délku těhotenství, ale i věk těhotní, její hmotnost a vycházející z mediánů té které laboratoře
  - **invazivní vyšetření** je doporučováno, je-li screening pozitivní, tj. při **rizicích vyšších než 1 : 350**
  - **negativní výsledek** screeningu je když je riziko vyhledávaných vad nižší než riziko, které je důvodem k **invazivnímu vyšetření**
- **ultrazvukové vyšetření**
  - v 6., 18. a 32. týdnu gravidity = **standardní péče** o těhotné
  - při zjištění odchylek má být těhotná odeslána ke **konziliárnímu UZ vyšetření** a eventuálně i ke **genetické konzultaci**
  - **nepřímé známky** svědčící o **postižení plodu**
    - retardace vývoje
    - málo nebo mnoho plodové vody
    - disproporce vývoje jednotlivých částí plodu – indikace chromosomálního vyšetření

### Invazivní vyšetření

- **amniocentéza**

- odběr **vzorku plodové vody** jehlou přes stěnu břišní pod kontrolou UZ
  - **časná** (12.-14. týden gestace)
  - **klasická** (15.-18. týden gestace)
  - **pozdní**
- obvykle se provádí v **16.-18. týdnu gravidity**
- umožňuje vyšetření **kultivovaných buněk** a **nekultivovaných buněk** plodové vody a její biochemické vyšetření
- z buněk plodové vody lze vyšetřit **karyotyp plodu** po 10-20 denní kultivaci
- **biochemické vyšetření** plodové vody je zaměřeno především na **hodnocení hladiny AFP**
- **riziko potratu** po výkonu je < 1%
- **biopsie trofoblastu**
  - odběr **choriových klků** v 11.-12. týdnu těhotenství (po 10. týdnu gravidity)
  - provádí se **transabdominálně**
  - buňky trofoblastu mají vysokou **mitotickou aktivitu** a karyotyp lze vyšetřit po přidání **kolcemidu** po 1-2 hodinách
  - zjištěné **chromosomální odchylky** musí však být ještě potvrzeny **vyšetřením plodové vody**, neboť nález v buňkách trofoblastu nemusí ještě znamenat **stejně postižení i tkání plodu**
- **kordocentéza**
  - odběr **fetální krve** punkcí pupečníku po 20. týdnu gravidity
  - umožňuje rychlou **karyotypizaci lymfocytů** plodu, vyšetření **hematologické** (krevní skupina, krevní obraz, hladina bilirubinu), **imunologické** (průkaz protilátek) a biochemické (ionty)
  - umožňuje i **transfuzi krve plodu** - např. při Rh inkompatibilitě
- **fetoskopie**
  - vyšetření, kdy je do **amniální dutiny** zaveden optický systém (**fetoskop**) z malého řezu v břišní stěně - umožňuje **vizualizaci plodu** a **odběr vzorku tkáně** (kůže) pro bioptické vyšetření
  - provádí se v 12.-14. týdnu
  - **riziko výkonu** 5-10%, proto indikován zejména pro diagnostiku **monogenně dědičných chorob** a **syndromů** s rizikem postižení plodu 25-50%
- **cílené UZ vyšetření**
  - je dosud nejúčinnější **metodou prenatalní diagnostiky**
  - umožňuje **diagnostikovat** u plodu např. poruchy vývoje hlavy (anencefalie), rozštěpy páteře, srdeční vady, vady ledvin (ageneze, polycystosa), atresie močových cest, Turnerův syndrom
  - **s menší jistotou** lze zachytit např. rozštěpy rtu, neprůchodnost GIT, menší redukční deformity končetin
- **prenatální cytogenetická analýza**
  - kromě **vyššího věku matky** v čase gravidity a porodu předcházejícího dítěte s chromosomovou aberací de novo jsou pro cytogenetickou prenatalní diagnostiku i další méně časté **indikace**
    - **mozaicismus** nebo vyvážené translokace u rodičů
    - riziko syndromu **fragilního X**
    - některé ze **zřídkových syndromů** se spontánní instabilitou karyotyoyou
  - další indikací je **určení pohlaví plodu** při X-vázaných chorobách
- **systematické využití screeningu** geneticky rizikových těhotenství a prenatalní vyšetření jejich plodů umožňuje snížit počet **postižených novorozenců**
- **organizace prenatalní diagnostiky** vyžaduje součinnost porodníka, laboratorního odborníka a genetika

## 130. Prenatální diagnostika vývojových vad, možnosti jejich prevence

---

- vrozené vady jsou odchylky od **normálního vývoje** lidského jedince
- mohou se dělit na **strukturální nebo funkční**
- vědci objevili několik tisíc **různých defektů**, které se objevují při narození nebo nejpozději do **prvního roku věku**
- v ČR se v současné době pohybuje **výskyt vrozených vad** u dětí kolem 3-4%
- primárně se jedná o **poškození buněk**, které se projevuje ve tkáních a orgánech
- vrozené vady mohou být **mnohočetné** nebo **izolované**
- **strukturální vady** souvisí s určitou částí těla (rozštěpy patra nebo rtu, srdeční vady, abnormální tvary končetin, defekty neurální trubice – spina bifida, poruchy mozku)
- **funkční poruchy** mohou zasahovat mnoho systémů a mívají často vývojové nedostatky
  - **nervový systém**
    - často se objevují problémy s učením, mentální retardace, poruchy chování
    - dále problémy s řečí a vyjadřováním
    - v neposlední řadě pak problémy **pohybového charakteru**
    - mezi vrozené vady patří autismus, Downův syndrom, Prader-Willyho syndrom nebo syndrom fragilního X
  - **oběhový systém**
    - **vrozené srdeční vady** patří k nejčastější vůbec (až 1/3 všech VVV)
    - často se jedná o poruchy **vývoje chlopní** nebo nedostatečné oddělení jednotlivých oběhů (perzistující komunikace)
  - **smysly**
    - slepota, katarakty a vážná postižení sluchu přecházející až v hluchotu
    - typicky u dětí matek **nakažených syfilis** (hluchá je až 1/3 novorozenců)
  - **metabolické poruchy**
    - mezi nejčastěji se vyskytující patří **fenylketonurie (PKU)** a **hypothyroidismus**
- **příčiny vrozených vad**
  - v mnoha případech dochází ke **kombinaci několika faktorů** – kromě genetické **predispozice** se zapojuje působení fyzikálních, biologických nebo chemických vnějších faktorů
    - **genetické vady** - geny nepracují tak, jak mají nebo zcela chybí
    - chyby v počtu nebo struktuře **chromosomů**
    - **faktory prostředí**, kterým je vystavena žena v těhotenství – zarděnky, drogy, alkohol apod.
  - až u 60% VVV není **příčina** jejich vzniku známa
  - kolem 30% připadá na faktory **genetické**
  - 10% je tvořeno faktory **vnějšího prostředí**
- **diagnostika vrozených vad**
  - jestliže existuje určité **podezření na VVV**, je rodičům doporučena genetická konzultace
  - důvodem podezření může být např. **pozitivní rodinná anamnéza** (v rodině se již nějaká VVV vyskytla), nález na **zobrazovacích metodách (USG)**, **postižení rodičů** apod.
  - na základě informací rodičů o jejich **zdravotním stavu** a stavu jejich příbuzných, sestaví genetik jejich **rodokmen** a určí riziko pro plod
  - u některých onemocnění jsou vřele doporučovány **genetické testy**
  - můžeme rozlišit **skupiny** těchto testů
    - **cytogenetické vyšetření**: zaměřené na chromosomy, které jsou sledovány v mikroskopu (změny jsou viditelné pouhým okem – změny počtu chromosomů)
    - **molekulárně genetické testy**: slouží k odhalení změny genetické informace mutací, provádí se cíleně při konkrétním podezření, nemusí se vždy jednat o změny vedoucí k nemoci, zachyceni jsou i nosiči nemoci
  - existuje i soubor **prenatálních testů** (před narozením dítěte) a také **preimplantační genetická diagnostika** (v rámci asistované reprodukce dochází ke kontrole zdravotního stavu embryí před jejich implantací)

- poslední zmíněná metoda se však setkává s velkými **morálními problémy** a není společností příliš akceptována
- **prenatální testy VVV**
  - **neinvazivní metody**
    - **biochemické** (AFP, hCG, uE, inhibin)
    - **ultrazvuk (USG)**
    - vyšetření buněk **trofoblastu** z mateřské krve
  - **invazivní metody**
    - **amniocentéza** (16.-17. týden)
    - **časná amniocentéza** (12.-15. týden)
    - **biopsie choria** (od 11. týdne)
    - **placentocentéza** (od 13. týdne)
    - vizuální **embryoskopie a fetoskopie**
    - **odběry fetálních tkání – kordocentéza** (cca. od 20. týdne), kůže, punkce tělesných dutin
  - k invazivním metodám se přistupuje pouze při podezření na **velmi vážné poškození plodu**
  - tyto metody s sebou i dnes nesou poměrně **vysoké riziko** potratu plodu
- **prevence**
  - rodiče by se měli před početím dítěte pokud možno co nejdéle **vyvarovat kontaktu s různými mutageny**, které by mohly poškodit genetickou informaci pohlavních buněk (riziková pracoviště a vystavením záření, chemikálie...)
  - během těhotenství by se matky měly vyhýbat všem **teratogenním faktorům**, měly by těhotenství přizpůsobit životní styl a neměly by vynechávat **pravidelné kontroly** u gynekologa
  - ženy by neměly početí potomka odkládat – **po 35. roku věku** se zvyšuje riziko vzniku VVV, hlavně **chromosomových aberací**
  - **ochrana před mutageny**
    - do **realizace** reprodukčního záměru
    - **neodkládat reprodukci** dlouho, s věkem roste u žen riziko postižení plodu chromosomální aberací, u mužů bodovými mutacemi
  - **ochrana před teratogeny**
    - **v průběhu gravidity** – organogeneze začíná v 5. týdnu po poslední menstruaci, tj. v 3. týdnu po oplodnění, histogeneze probíhá až do konce gravidity
    - **mezi teratogeny patří**
      - **infekce** (toxoplasma, rubeola, cytomegalovirus, herpesvirus)
      - **chemické látky** (alkohol, některé léky, drogy)
      - **ionizující záření** (už terapeutické dávky jsou vysoce teratogenní)
  - **příznivý zdravotní stav matky**
    - organismus matky tvoří prostředí pro vývoj plodu po celé těhotenství – **choroby matky** a jejich léčba mohou výrazně ohrozit vývoj plodu
  - **gynekologická vyšetření** a úprava všech zjištěných odchylek
    - gynekologická **prekoncepční péče** snižuje riziko spontánních potratů, polygenně dědičných vad, vrozených vad podmíněných **mutacemi de novo**
  - **vitaminová clona**
    - příznivý vliv na vývoj plodu má podávání **kyseliny listové** (5-10mg/den) a **vitaminu C** (500mg/den) v prekoncepčním období
    - **vitamin C** je antioxidant – prevence mutací a teratogeneze
    - **kyselina listová** je koenzym v systému reparačních enzymů DNA a snižuje rizika vzniku **neuroblastomů**
  - podstatná je též dostatečná **výživa matky** – vyvážené zastoupení živin, vitaminů a stopových látek
  - matky by měly chodit na **pravidelné zdravotní prohlídky**, zejména ženy trpící chronickým onemocněním (DM, epilepsie, PKU, nemoci štítné žlázy apod.)
  - v uplynulých letech došlo ke zvýšené **kontrole účinku léků** na těhotenství
    - zejména **retinoidy** nebo některé látky (thalidomid) působí na plod nepříznivě

- postižení **zarděnkami** se dnes předchází pomocí sledování těhotných a **vakcinace** (všechny děti po 12. týdnu věku)
- prevencí vrozených vad se zabývá **genetické poradenství**

## 131. Prekoncepční prevence dědičných chorob a vad

- základem je **plánování rodičovství** – nejde jen o plánování počtu a doby narození dětí, ale i vytváření podmínek pro jejich **zdravý vývoj**
- úkolem **prekoncepční péče** (před otěhotněním) je odhalit rizika, která by mohla negativně **ovlivnit těhotenství** – přizpůsobit výživu, začít včas užívat **kyselinu listovou** či speciální **prekoncepční multivitaminy**, správně načasovat **pravidelné očkování** mimo těhotenství, upravit **užívání léků** pro chronická onemocnění, včas vyléčit zánětlivá onemocnění, ošetřit chrup a podobně
- rodiče by se měli před **početím dítěte** pokud možno co nejdéle vyvarovat kontaktu s různými **mutageny**, které by mohly poškodit genetickou informaci pohlavních buněk (riziková pracoviště a vystavením záření, chemikálie...)
- **během těhotenství** by se matky měly vyhýbat všem **teratogenním faktorům**, měly by těhotenství přizpůsobit životní styl a neměly by vynechávat pravidelné kontroly u gynekologa
- ženy by neměly početí potomka odkládat – po **35. roku věku** se zvyšuje riziko vzniku VVV, hlavně **chromosomových aberací**
- **ochrana před mutageny**
  - do realizace **reprodukčního záměru**
  - **neodkládat reprodukci** dlouho, s věkem roste u žen riziko postižení plodu chromosomální aberací, u mužů bodovými mutacemi
- **ochrana před teratogeny**
  - **v průběhu gravidity** – organogeneze začíná v 5. týdnu po poslední menstruaci, tj. v 3. týdnu po oplodnění, histogeneze probíhá až do konce gravidity
  - **mezi teratogeny patří**
    - **infekce** (toxoplasma, rubeola, cytomegalovirus, herpesvirus)
    - **chemické látky** (alkohol, některé léky, drogy)
    - **ionizující záření** (už terapeutické dávky jsou vysoce teratogenní)
- **příznivý zdravotní stav matky**
  - organismus matky tvoří **prostředí pro vývoj plodu** po celé těhotenství – **choroby matky** a jejich léčba mohou výrazně ohrozit vývoj plodu
- **gynekologická vyšetření** a úprava všech zjištěných odchylek
  - gynekologická **prekoncepční péče snižuje riziko** spontánních potratů, polygenně dědičných vad, vrozených vad podmíněných mutacemi de novo
- **vitaminová clona**
  - příznivý vliv na vývoj plodu má podávání **kyseliny listové** (5-10mg/den) a **vitaminu C** (500mg/den) v prekoncepčním období
  - **vitamin C** je antioxidant – prevence mutací a teratogeneze
  - **kyselina listová** je koenzym v systému reparačních enzymů DNA a snižuje rizika vzniku **neuroblastomů**
- podstatná je též **dostatečná výživa matky** – vyvážené zastoupení živin, vitaminů a stopových látek
- matky by měly chodit na **pravidelné zdravotní prohlídky**, zejména ženy trpící chronickým onemocněním (DM, epilepsie, PKU, nemoci štítné žlázy apod.)
- v uplynulých letech došlo ke **zvýšené kontrole účinku léků** na těhotenství
  - zejména **retinoidy** nebo některé látky (thalidomid) působí na plod **nepříznivě**
  - **postižení zarděnkami** se dnes předchází pomocí sledování těhotných a vakcinace (všechny děti po 12. týdnu věku)
- prevencí vrozených vad se zabývá **genetické poradenství**



## 132. Postnatální prevence a léčba dědičných chorob

---

- zaměřena na **screening geneticky rizikových osob** a rodin a cílené ovlivnění rozvoje nepříznivých vloh a dispozic
- může být realizována pouze v **těsné spolupráci genetiků a lékařů** různých oborů
- **populační screening**
  - je racionální pouze u relativně **častých postižení** s možností úspěšné prevence nebo léčby
  - při **nízkých nákladech** musí zabezpečovat vysokou specifitu a citlivost
  - příkladem je **screening Rh negativních těhotných** nebo **novorozenců s PKU**
    - pokud by nebyl **antiD** gamaglobulin aplikován Rh- matkám Rh+ novorozenců do 72 hodin po porodu, mohl by být plod v **dalším těhotenství ohrožen** antiD protilátkami matky
    - podobně pokud by u **homozygotů pro PKU** nebyla zahájena dieta s nízkým obsahem phenylalaninu co nejdříve po narození, vyvíjelo by se **ireverzibilní poškození CNS**
  - důležité jsou **pravidelné lékařské kontroly** kojenců a batolat
  - v dospělosti je **celopopulační screening** zaměřen hlavně na choroby **oběhového ústrojí** a některé **typy nádorů**
- **genealogický screening geneticky rizikových rodin**
  - efektivní u **dominantně děděných (AD)** a **polygenně děděných** chorob a vrozených vad
  - příkladem je **polycystická choroba ledvin** nebo **hypercholesterolemie**
    - při **včasné detekci** heterozygotů nebo osob s genetickou dispozicí lze rozvoj choroby oddálit
    - **dieta a zvýšená aktivita** a případně léky u **hypercholesterolemie** vedou k tomu, že ke vzniku **aterosklerotických změn cév** pak nedochází nebo až v **podstatně vyšším věku**

## 133. Ekologie, ekogenetika

### Ekogenetika

- studuje **dědičně podmíněné rozdíly** reakce osob na fyzikální, biologické a chemické vlivy prostředí
- navazuje na **farmakogenetiku** a rozvoj moderní medicíny
- **fyzikální vlivy**
  - **UV záření** = silný mutagen pro jednobuněčné organismy
  - u člověka je v malém množství třeba pro **tvorbu vitamínu D**
  - ochranou je **pigment**
  - pigmentace je **polygenně dědičná** – míra ochrany je dána genotypem
  - UV záření vyvolává **mutace**, ty jsou opravovány činností reparačních enzymů
  - u osob s poruchami **reparace** ale dochází ke zvýšenému **riziku malignit**
  - dědičné choroby spojené s **pigmentací**
    - **Xenoderma pigmentosum (AD)**
      - kůže je extrémně citlivá na **sluneční světlo**
      - na **exponovaných místech** vznikají v časném věku karcinomy
      - onemocnění je způsobeno **defektem endonukleasy** a mutací dalších 6 genů
      - heterozygoti jsou postiženi méně
    - **Ataxie-teleangiectasie**
      - vrozená **primární kombinovaná imunodeficience** s AR dědičností
      - lokus 11q22-23
      - manifestuje se kolem 11. měsíce života **komplexním syndromem**
      - **thymus** je hypoplastický a je značná senzitivita genů na ionizující záření
      - v důsledku **snížené genetické reparace** dochází k poškození genů, které kódují receptory pro **T-buňky** a těžké řetězce **imunoglobulinů**
      - **incidence malignit** je vysoká
    - **Bloomův syndrom**
      - erythema congenitale teleangiectaticum Bloom, AR
      - **erytémové změny** s teleangiectáziemi vznikající v dětství, zejména na obličeji s eventuelním šířením na horní končetiny
      - nápadné **poruchy růstu**
      - přítomny i další **abnormality** – imunitních funkcí, fotosensitivita, častější malignity
- **potraviny**
  - **tuky**
    - **hyperlipemie** s následnou aterosklerosou, ICHS, IM
    - individuální riziko je podmíněno nejen **životosprávou**, ale i genetickou **dispozicí**
    - **metabolismus tuků** závisí na jejich transportu v krvi, jejich vazbě na receptory buněk a na **odbourávání tuků** v buňkách
    - ovlivnitelné **dietou** a léky
  - **sůl**
    - citlivost čidel na **slanou chuť**
      - ovlivněna **prahem vnímavosti slané chuti** a rodovými návyky
      - podmíněna **geneticky**, modifikována v dětství
    - osoby s dominantně děděnou **poruchou transportu Na<sup>+</sup> z buněk a K<sup>+</sup> do buněk** (Na/K pumpa) mají arteriální **hypertenzi**
  - **mléko**
    - **snížená aktivita laktázy** – nestrávená laktosa způsobuje potíže GIT
    - AR dědičná **deficience laktázy** vede k atrofické enteritidě a degenerativním změnám v ledvinových kanálcích
  - **mouka**
    - osoby s **celiakií** (glutenovou enteropatií)
    - nebezpečné onemocnění – neschopnost **štěpit gluten v mouce** – poruchy resorpce **živných látek**, trávicí obtíže

- dědičnost nepravidelně **dominantní**
- upravitelné **dietou** – bezlepková
- **bílkoviny**
  - toxické pro děti s vrozenými **poruchami metabolismu aminokyselin**
  - příkladem je **PKU**, dieta s nízkým obsahem phenylalaninu
- **alkohol**
  - alkoholismus podmíněn **sociálními faktory** a geneticky
  - **alkoholdehydrogenasy** (ADH) způsobují metabolickou přeměnou v játrech na acetaldehyd
  - **tolerance k alkoholu** je ovlivněna i aktivitou acetaldehyddehydrogenasy (ALDH)
- **inhalanty**
  - **prach** – deficit antitrypsinu způsobí emfyzém
  - **kouření** – karcinomy plic
  - **alergeny** – změny v imunitní odpovědi, asthma bronchiale
- **infekce**
  - **insulin dependentní DM** (DM I. typu)
    - manifestace v dětství
    - dědí se **antigenní výbava** (HLA haplotypy, DR3 a 4) – u 95% postižených
  - **poruchy imunity**
    - gama globulinemie (XR)
    - aplasie thymu
    - AIDS, mononukleosa podmíněná EB virem
  - **vředová choroba žaludku a duodena**
    - Helicobacter pylori
  - **žloutenka, TBC...**

## Ekologie

- studuje **vzájemné vztahy mezi živými soustavami** a jejich **prostředím**
- **ekologie populací**
  - **populace** = soubor jedinců téhož druhu, obývajících v daném časovém období určité území
  - **populační ekologie** zkoumá vliv ekologických faktorů na populace (**demekologie**)
  - v populaci jsou jedinci **rozmístěni** tak, aby každý měl pravděpodobnost podílet se na **reprodukcii potomstva**
  - **populace**
    - **živý systém**, v němž se projevují biologické vlastnosti jedinců, ale i biologické vlastnosti **celé skupiny**
    - populace tak může růst, stárnout, diferencovat se, udržovat se, mít určitou strukturu, natalitu, mortalitu, rozptyl apod.
  - **populační ekologie** umožňuje zkoumat tyto vlastnosti a pomáhá tím k dokonalejšímu poznání **genofondu přírody**
  - **disperze**
    - **rozptyl** – rozmístění jedinců v populaci
    - informuje o **umístění jedinců** v obývaném prostoru
    - disperze je lineární, plošná nebo prostorová
  - **hustota populace**
    - s **rozmístěním jedinců** souvisí také hustota populace – je dána počtem jedinců na jednotku plochy – **abundance**
    - **hustota populace** podléhá druhově podmíněným změnám
      - **oscilace** = kolísání početnosti během 1 roku
      - **fluktuace** = kolísání během více let – výsledek mortality a natality
      - některé druhy se čas od času **přemnožují** = gradace – gradační vrchol – kulminace – retrogradace – latence – pregradace – progrese s novým gradačním vrcholem

- na **kolísání početnosti** populace mají vliv klimatické podmínky, nemoci, zásahy člověka...
- v důsledku **nerovnoměrného rozložení** životně důležitých složek prostředí jsou **živočiškové rozptýlení** v krajině nenáhodně a nerovnoměrně
- roli hraje i **sociální struktura populace** a poměr pohlaví
- **věková struktura**
  - další charakteristika populace, **3 kategorie**
    - preproduktivní
    - produktivní
    - postproduktivní (staří jedinci)
- **množivost** = natalita, přímo závislá na rychlosti metabolismu a nepřímo závislá na velikosti
- **úmrtnost** = mortalita
- živočišná populace vykazuje **prostorovou aktivitu**
  - při pohybu dochází k **expanzi druhu**
  - **migrace** probíhá
    - za teplem
    - za rozmnožováním
    - za potravou
    - vertikální migrace (kamzík)
- významným faktorem je **forma populačního růstu**
  - **uzavřený růst** = křivka písmene S, maximální hustota populace kolísá kolem tzv. únosné kapacity prostředí
  - **otevřený růst** = křivka písmene J, na počátku pozvolný nárůst, prudký vzestup, strmá pokles

## 134. Farmakogenetika, nutrigenetika

- pojem farmakogenetika definoval **Vogel** (1959)
- **farmakogenetika** = věda o geneticky podmíněné variabilitě, kterou lze prokázat pouze léky, rozvoj s biochemií
- nezahrnuje ale stavy, kdy některé léky mohou **vyvolat nebo zhoršit příznaky dědičných chorob**
- **metabolismus léků**
  - aplikace – absorpce – distribuce tkáním – vyloučení
  - dojde buď k **odbourání játry** nebo k přenosu k **cílovým buňkám**
  - v cílových buňkách má lék **léčebný efekt**, následuje odbourání a vyloučení
  - **rychlost metabolismu** ovlivňují enzymy – genetická výbava
- jako znak sledujeme **hladinu léku** v krvi po podání standardní dávky
  - **rozložení hodnot koncentrací je**
    - **kontinuální**
      - unimodální (Gaussova) křivka
      - polygenní dědičnost
    - **diskontinuální**
      - bi nebo trimodální křivka
      - monogenní dědičnost
  - dále sledujeme **pokles hladiny v čase**
  - projevují se **individuální rozdíly** v reakci na léky, včetně vedlejších účinků
  - dávka se počítá na **plochu těla**
- **příklady polymorfismů metabolismu léků**
  - **akatalasie**
    - chybění aktivity enzymu katalasy (recesivně dominantní dědičnost)

- **rychlí/pomalí inaktivátoři Isoniazidu**
  - lék na TBC, v populaci 50/50
  - **recesivní homozygoti** pro enzym N-acetyltransferasy s nižší aktivitou mají při léčbě časté vedlejší příznaky (polyneuritis, kožní vyrážky)
  - Isoniazid (INH) se vstřebává ze **zažívacího traktu**
  - u rychlých inaktivátorů klesá hladina INH v krvi rychle, u pomalých zůstává koncentrace INH vysoká po **delší dobu**
- **metabolismus hydralazinu (antihypertensivum)**
  - pomalí inaktivátoři mají častější vedlejší příznaky
- **zvýšená citlivost na sukcinylcholin (myorelaxans)**
  - deficit pseudocholesterasy
  - prolongována apnoe při anestezii
- **malígní hypertermie po halothanu**
  - dominantně dědičné postižení
- **metabolismus antiepileptik**
  - teratogenicita, závisí na metabolismu matky a plodu
- **dědičné choroby s odlišnou reakcí na léky**
  - **deficience glukoso-6-fosfátdehydrogenasy (G6PD)**
    - dědí se recesivně X-vázaně
    - výrazná novorozenecká žloutenka + hemolytická krize po podání jarmak – antimalarik, sulfonamidů, acylpyrinu
  - **dna (arthritis uratica)**
    - porucha metabolismu purinů
    - krystaly kyseliny močové se ukládají do kloubů
    - otoky kloubů
    - **dominantně dědičná choroba**, jejíž manifestace je ovlivňována dietou
    - **heterogenně** podmíněné onemocnění
    - po podání diuretik – chlorothiazidu – dojde ke zvýšení hladiny kyseliny močové a zhoršení obtíží
  - **alkohol = sociálně tolerovaná droga**
    - **ADH** (alkoholdehydrogenasa) - přeměna na acetaldehyd
    - **AcADH** (acetaldehyddehydrogenasa) - odbourávání acetaldehydu
    - **dispozice k alkoholismu** podmíněny i geneticky
    - **lidská ADH** = dimer z různých kombinací 3 různých polypeptidů kódovaných 3 lokusy
      - **ADH1**: exprimován od fetálního období
      - **ADH2**: v dospělosti
      - **ADH3**
- **význam farmakogenetiky v medicíně**
  - jsou zmiňovány následující oblasti jako ty, které mohou v současné praxi i v blízké budoucnosti nejvíce profitovat z **výsledků farmakogenetických studií**
  - **léky s úzkým terapeutickým indexem**
    - léky s **malým rozdílem** mezi terapeutickou a toxickou dávkou
    - vyžadují přísnou a stálou **optimalizaci dávkování**, nejčastěji formou opakovaných měření – **monitoringu**
    - použití **prediktivních genetických metod** umožní časnou identifikaci jedinců se zvýšeným rizikem, což umožní **lepší ochranu zdraví** takto léčených osob a sníží náklady na **léčbu nežádoucích účinků** (warfarin, 6-merkaptopurin apod.)
  - **chronická onemocnění**
    - u **chronických onemocnění** a stavů, kde díky absenci prediktivních markerů efektivní a bezpečné léčby se v praxi postupuje **metodou pokus omyl**
    - **farmakogeneticky orientované přístupy** k optimalizaci léčby v tomto případě bezpochyby naleznou své místo
  - **plné začlenění do procesu**

- začlenění farmakogenetických přístupů do procesu vývoje a výroby léčiv umožní **využití i těch léčiv**, která vykazují příznivý účinek v (geneticky) **definovaných skupinách pacientů**, ač tento benefit není zřejmý v **celkové kohortě**

## NUTRIGENETIKA