

Vanda **REPISKÁ**
Daniel **BÖHMER**
Tatiana **BRAXATORISOVÁ**
Jana **MALOVÁ**

LEKÁRSKA BIOLÓGIA A GENETIKA 2

VYSOKOŠKOLSKÁ UČEBNICA PRE PREGRADUÁLNE
ŠTÚDIUM NA LEKÁRSKYCH FAKULTÁCH



UNIVERZITA KOMENSKÉHO BRATISLAVA, LEKÁRSKA FAKULTA

LEKÁRSKA BIOLÓGIA A GENETIKA 2

Vysokoškolská učebnica pre pregraduálne štúdium na lekárskech fakultách

prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., doc. MUDr. Daniel Böhmer, PhD.,
MUDr. Tatiana Braxatorisová, CSc. a RNDr. Jana Malová, PhD.

Prvé vydanie

© prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., doc. MUDr. Daniel Böhmer, PhD., MUDr. Tatiana
Braxatorisová, CSc. a RNDr. Jana Malová, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave, 2020

Recenzenti: doc. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.
doc. MUDr. Ján Chandoga, CSc.

Neprešlo jazykovou úpravou.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani žiadnu jeho časť nemožno reprodukovat', ukladať do
informačných systémov alebo inak rozširovať bez písomného súhlasu majiteľov autorských
práv.

Univerzita Komenského v Bratislave

ISBN 978-80-223-4929-1

OBSAH

1	METÓDY V MOLEKULOVEJ GENETIKE	5
	<i>(Repiská, V.)</i>	
1.1	Získavanie biologického materiálu.....	5
1.2	Spracovanie biologického materiálu	5
1.3	Postup pri izolácii nukleových kyselín.....	6
1.4	Gélová elektroforéza	6
1.5	Restrikčné endonukleázy a ich praktické využitie	8
1.6	Princípy DNA polymorfizmu a DNA-DNA hybridizácie.....	9
1.6.1	Polymorfizmus dĺžky restrikčných fragmentov (RFLP)	10
1.7	Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	11
1.7.1	Kvantitatívna PCR.....	15
1.7.2	Metylačne špecifická PCR	16
1.7.3	MLPA	17
1.8	Sekvenovanie DNA	17
1.9	Biočipy	19
2	ĽUDSKÝ GENÓM	21
	<i>(Repiská, V.)</i>	
2.1	História projektu „Ľudský genóm“	21
2.2	Ciele projektu „Ľudský genóm“	23
2.3	Výsledky projektu „Ľudský genóm“	23
2.4	Etické problémy projektu „Ľudský genóm“	26
3	ZÁKLADNÉ METÓDY GENETIKY ČLOVEKA	28
	<i>(Braxatorisová, T., Repiská, V.)</i>	
3.1	Gemelologická metóda (metóda výskumu dvojčiat).....	28
3.2	Genealogická metóda	29
3.3	Populačná genetika	30
3.4	Cytogenetická analýza.....	32
3.4.1	Klasická cytogenetika.....	32
3.4.1.1	Cytogenetická analýza v mitóze	32
3.4.1.2	Cytogenetická analýza v interfáze.....	36
3.4.2	Molekulová cytogenetika	37
3.4.2.1	Typy sond pre FISH	38
3.4.2.2	Modifikácie FISH.....	39
4	MONOGÉNOVO PODMIENENÉ NORMÁLNE A PATOLOGICKÉ ZNAKY AUTOZÓMOVO DEDIČNÉ.....	41
	<i>(Böhmer, D., Braxatorisová, T., Repiská, V.)</i>	
4.1	Základné pojmy používané v monogénovej dedičnosti	41
4.2	Autozómovo dominantná dedičnosť	43
4.2.1	Normálne znaky autozómovo dominantne dedičné	43
4.2.2	Autozómová dominantná dedičnosť ochorení a patologických znakov.....	44
4.2.2.1	Príklady ochorení s autozómovo dominantným typom dedičnosti	45
4.2.2.1.1	Huntingtonova chorea	45
4.2.2.1.2	Neurofibromatóza typ 1.....	46
4.2.2.1.3	Neurofibromatóza typ 2.....	46
4.2.2.1.4	Achondroplázia (Chondrodystrofia).....	46
4.3	Autozómová recesívna dedičnosť patologických znakov a ochorení	47
4.3.1	Príklady ochorení s autozómovo recesívnym typom dedičnosti	47

4.3.1.1	Alkaptonúria	47
4.3.1.2	Cystická fibróza.....	48
4.3.1.3	Fenylketonúria	48
5	MONOGÉNOVO PODMIENENÉ NORMÁLNE A PATOLOGICKÉ ZNAKY VIAZANÉ NA X CHROMOZÓM.....	50
	<i>(Böhmer, D., Braxatorisová, T., Repiská, V.)</i>	
5.1	Patologické znaky (choroby) s X – viazaným dominantným typom dedičnosti	50
5.1.1	Priklady ochorení s X viazaným gonozómovým dominantným typom dedičnosti ...	50
5.1.1.1	Hypofosfatemická rachitída, rezistentná na vitamín D	50
5.1.1.2	Rettov syndróm	51
5.2	Patologické znaky a ochorenia s X viazaným recesívnym typom dedičnosti	51
5.2.1	Priklady ochorení s X viazaným recesívnym typom dedičnosti	52
5.2.1.1	Hemofília A	52
5.2.1.2	Hemofília B	52
5.2.1.3	Duchennova svalová dystrofia	53
5.2.1.4	Beckerova svalová dystrofia.....	53
5.2.1.5	Daltonizmus.....	53
5.2.1.6	Adrenoleukodystrofia	54
5.2.1.7	Fabryho choroba	54
6	MULTIFAKTORIÁLNA DEDIČNOSŤ	55
	<i>(Böhmer, D., Malová, J.)</i>	
6.1	Kvantitatívne znaky s multifaktoriálnym typom dedičnosti	55
6.2	Heritabilita	56
6.3	Kvalitatívne znaky s multifaktoriálnym typom dedičnosti	56
6.4	Vrodené vývojové chyby s multifaktoriálnym spôsobom dedičnosti	57
6.4.1	Rázštep pery a podnebia	58
6.4.2	Rázštep nervovej rúry	60
6.4.3	Pylorostenóza	61
6.4.4	Pes equinovarus	62
6.4.5	Vrodené vývojové chyby srdca	62
7	MUTAGENÉZA A TESTOVANIE POTENCIÁLNYCH MUTAGÉNOV	64
	<i>(Repiská, V.)</i>	
7.1	Mutagenéza.....	65
7.2	Klasifikácia mutácií.....	66
7.3	Využitie mutagenézy pri objasnení funkcie génu	69
7.4	Testy potenciálnych mutagénov	70
8	GAMETOGENÉZA.....	72
	<i>(Braxatorisová, T.)</i>	
8.1	Meióza	72
8.1.1	Poruchy meiózy	74
8.1.2	Porovnanie priebehu mitózy a meiózy	74
8.2	Spermiogenéza	75
8.3	Oogenéza	76
9	CHROMOZÓMOVÉ ABERÁCIE.....	79
	<i>(Braxatorisová, T.)</i>	
9.1	Numerické chromozómové aberácie	79
9.1.1	Polyploidie.....	79
9.1.2	Aneuploidie	79

9.1.2.1	Najčastejšie numerické aberácie autozómov	81
9.1.2.2	Numerické aberácie gonozómov	83
9.2	Štruktúrne chromozómové aberácie	84
10	REPARAČNÉ MECHANIZMY A SYNDRÓMY SO SPONTÁNNOU INSTABILITOU CHROMOZÓMOV	89
	<i>(Repiská, V.)</i>	
10.1	Oprava DNA	89
10.1.1	Oprava DNA počas replikácie a hneď po nej	90
10.1.2	Oprava DNA mimo obdobia replikácie a reparačné mechanizmy	90
10.1.2.1	Priama oprava poškodenia – fotoreaktivácia	91
10.1.2.2	Excízná oprava	91
10.1.2.3	Tolerovanie poškodenia DNA - SOS reparácia	92
10.2	Syndrómy so spontánnou instabilitou chromozómov	92
10.2.1	Xeroderma pigmentosum	92
10.2.2	Fanconiho anémia	93
10.2.3	Bloomov syndróm	93
10.2.4	Ataxia teleangiektázia (syndróm Henner-Louis-Barovej)	94
10.2.5	Cockayneov syndróm	94
11	REGULÁCIA A DEREGULÁCIA BUNKOVÉHO CYKLU	95
	<i>(Böhmer, D.)</i>	
11.1	Princípy regulácie bunkového cyklu	95
11.2	Priebeh a kontrolné uzly bunkového cyklu	100
11.2.1	Kontrolné uzly fáz bunkového cyklu	101
11.3	Protoonkogény a tumorsupresorové gény – ich úloha pri regulácii bunkového cyklu	105
11.3.1	Tumorsupresorové gény	105
11.3.2	Protoonkogény	108
12	ÚVOD DO GENETIKY VÝVOJA	114
	<i>(Böhmer, D.)</i>	
12.1	Etapy intrauterinného vývoja	114
13	ÚVOD DO EXPERIMENTÁLNEJ TERATOLÓGIE	120
	<i>(Böhmer, D.)</i>	
14	APOPTÓZA	124
	<i>(Böhmer, D.)</i>	
15	GÉNOVÁ TERAPIA	127
	<i>(Repiská, V.)</i>	
15.1	Choroby používané na génovú terapiu	127
15.2	Základné požiadavky na úspešnú génovú terapiu	129
15.3	Základné spôsoby génovej terapie	130
15.4	Výhody a limity génovej terapie	130

1 METÓDY V MOLEKULOVEJ GENETIKE

1.1 Získavanie biologického materiálu

Základným predpokladom úspešnej molekulovej analýzy je získanie vhodného biologického materiálu, z ktorého sa vyizoluje DNA alebo RNA. Tá sa potom používa na molekulárno-genetické vyšetrenia dedičných a nádorových ochorení, identifikáciu jedinca, detekciu mikroorganizmov, v paternitných sporoch a personalizovanej medicíne. V praxi je potrebné získať DNA napríklad z lymfocytov periférnej krvi, z choriových klkov, bukalnej sliznice, rôznych druhov tkaniva, plodovej vody, slín, mitochondrií alebo baktérií.

Jednoduchou metódou odberu materiálu je **venepunkcia** – odobratie periférnej krvi z *vena cubity*. Na DNA analýzu sa využívajú leukocyty odobraté do antikoagulantu. Pri niektorých ochoreniach sa v periférnej krvi pacienta môžu nachádzať rôzne typy buniek alebo voľná DNA/RNA, ktorá je využiteľná na genetické analýzy. Napríklad z krvi tehotnej matky sa neinvazívne vyšetruje fetálna DNA, čo umožňuje určiť pohlavie plodu alebo numerické aberácie chromozómov. Onkologickým pacientom sa robí analýza génovej expresie, čo je dôležité pri predikcii alebo prognóze poskytnutej terapie súvisiacej s liečbou nádorového ochorenia.

Na DNA analýzu sa môže používať aj tkanivo získané **biopsiou** – odobratím vzorky tkaniva zo živého organizmu, pri operačných výkonoch robených pre terapeutické alebo diagnostické účely, alebo **nekropsiou** – materiál odobraný pri pitve. Odber by mal byť vykonaný tak, že okrem vzorky z tkaniva, v ktorom predpokladáme patologický proces, získame na porovnanie aj materiál zo zdravého tkaniva. Dá sa použiť aj archívny materiál – **tkanivo fixované** vo formalíne a zaliate v parafíne. Pri určovaní otcovstva a identifikácii jedinca, ale napr. aj v gynekológii, sa používajú **stery** zo slizníc, ktorých bunky chceme vyšetriť. Na genetické vyšetrenie môžeme použiť lícný ster z bukalnej sliznice. Na jeho odber sa používajú sterové tampóny, prípadne kefký.

Na odber sa používajú firemne pripravené súpravy (kity). Existujú v princípe dva typy. Jeden je určený na analýzu DNA a druhý je navrhnutý k zberu a preprave sterov vzoriek určených na testy otcovstva a forenzné (súdno-lekárske) účely. Za účelom získania DNA profilu je možné odberať biologické vzorky aj prvostupňovým príbuzným nezvestných alebo mŕtvych osôb (biologickým rodičom a deťom) a ostatným osobám, pomocou ktorých je možné zrekonštruovať DNA profil. Zdrojom DNA môžu byť aj sliny, kvapka krvi, cigaretový ohorok, spermie, časť tela ako kúsok kosti, tkaniva, zub, vlas s korienkom alebo čokoľvek biologické, obsahujúce DNA. V špeciálnych prípadoch, najmä pri DNA analýze vírusov a baktérií, sa používa **filtrácia**.

1.2 Spracovanie biologického materiálu

Pred izoláciou DNA sa musí tkanivo vopred **homogenizovať** (rozrušiť, dezintegrovat'). **Mechanická** homogenizácia v trecej miske využíva mechanické drvenie a trenie pomocou porcelánového tĺčika. Dajú sa použiť aj prístroje nazývané homogenizátory a rôzne mixéry. Pri **fyzikálnej** homogenizácii sa používa ultrasonikácia, hypotonizácia alebo opakované zmrazovanie a rozmrazovanie buniek, ale aj mrazenie v tekutom dusíku. Jednoduchým a účinným typom je **chemická** homogenizácia, kde sa pridávajú detergenty, ktoré znížením povrchového napätia spôsobia prasknutie cytoplazmatickej membrány buniek a obsah cytoplazmy s DNA sa dostane z bunky von. Často sa používa aj kombinácia spomínaných metód. Najpoužívanejšou metódou pri ďalšom spracovaní biologického materiálu je **centrifugácia**, Tuhé častice sa v kvapalnom prostredí usadzujú rýchlejšie pomocou zvýšenia gravitácie, ktorá je vyvolaná rotáciou. Častice klesajú ku dnu v závislosti od vlastností látky (veľkosť, tvar, hustota) a prostredia (hustota, viskozita).

1.3 Postup pri izolácii nukleových kyselín

Základným problémom pri izolácii nukleových kyselín je odstránenie bielkovín a polysacharidov tak, aby nedošlo k porušeniu ich primárnej a sekundárnej štruktúry. Nukleové kyseliny sa totiž v živých organizmoch nenachádzajú voľné (okrem tRNA), ale v komplexe s bielkovinami a polysacharidmi. Na izoláciu nukleových kyselín sa používajú izolačné kity.

Princíp izolácie DNA:

- **homogenizácia a lýza buniek** – rozrušením cytoplazmatickej membrány, u baktérií aj bunkovej steny, sa uvoľní obsah bunky;
- **inhibícia nukleáz** – pri izolácii DNA sa používa RNáza, aby sme v izoláte mali len DNA, na ktorú sa zameriavame, a nie aj RNA (pri izolácii RNA sa naopak používa DNáza);
- **rozklad nukleoproteínového komplexu** – na rozrušenie väzby nukleových kyselín s bielkovinami sa používajú organické činidlá (fenol, chloroform, močovina a pod.). Fenol a chloroform (trichlórmetán) sú organické rozpúšťadlá, čiže sú nemiešateľné s vodou, a preto po ich pridaní k vodnému roztoku nukleových kyselín vytvoria dve fázy. Na rozhraní fáz dochádza k denaturácii proteínov;
- **odstránenie proteínov a vyžrážanie DNA** – proteíny sa odstraňujú centrifugáciou. DNA molekuly zostávajú v roztoku, vyžrážajú sa pomocou solí a alkoholu. Vytesnenie vody roztokom alkoholu spôsobí zlepenie dlhých vlákien DNA. DNA sa namotá na paličku, nechá sa vysušiť, rozpustí sa v redestilovanej vode, čím vznikne tzv. vzorka DNA.

Koncentrácia a čistota získanej DNA sa určuje elektroforeticky, fluorimetricky alebo spektrofotometricky. Princípom **elektroforetického stanovenia** je, že sa izolovaná DNA v géle prejaví ako jeden hrubší pásik (band) v blízkosti štartu, čo dokazuje, že DNA nie je polámaná (pásikov by bolo viac). Tým sa deteguje kvalita vyizolovanej DNA. Množstvo sa stanovuje porovnaním vzorky so štandardom molekulových hmotností. Výrobcovia štandardov uvádzajú, aké množstvo DNA v nanogramoch je v jednotlivých prúžkoch. Na základe porovnania intenzity svietenia prúžku analyzovanej DNA s intenzitou rovnako veľkého prúžku štandardu sa dá odhadnúť koncentrácia analyzovanej vzorky DNA. Tento výsledok je menej presný, ako výsledok získaný spektrofotometricky alebo fluorimetricky. **Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie:** molekuly nukleových kyselín obsahujú bázy, ktoré absorbujú ultrafialové žiarenie vlnovej dĺžky 200 - 300 nm, absorbanciu DNA meriame pri 260 nm. **Fluorimetrické stanovenie koncentrácie:** DNA sa zafarbí fluorescenčným farbivom a pomocou fluorescenčného spektrometra sa meria intenzita signálu. Výhodou je špecifita, pretože farbivo sa interkaluje (včlení) do dvojzávitnice DNA. Informáciu o kvalite izolovanej DNA (teda či nie je fragmentovaná) sa nedá získať spektroforetickou ani fluorimetrickou metódou.

1.4 Gélová elektroforéza

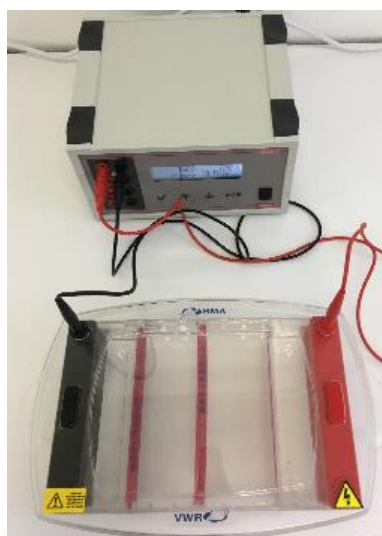
Elektroforéza patrí k najpoužívanejším metódam separácie nukleových kyselín a proteínov podľa ich veľkosti, náboja či väzbovej afinity. Pomocou elektroforézy môžeme rozdeliť zmesi fragmentov DNA a iných polárnych makromolekúl. Nukleové kyseliny majú záporný náboj, pretože obsahujú zvyšok H_3PO_4 (tzv. „fosfát“). Podstatou je migrácia iónov v elektrickom poli. Elektroforéza je pohyb elektricky nabitých molekúl k elektróde s opačnou polaritou. Z praktických dôvodov sa elektroforéza nerobí priamo v roztoku, ale vo vhodnom nosiči. Pri elektroforetickej separácii nesmie dochádzať ku samovoľnej migrácii biomolekúl difúziou, čo je zabezpečené použitím pevných podkladov, akými sú filtračný papier, celulóza alebo gél. Najčastejšie sa používajú polyakrylamidový alebo agarózový gél, ktoré vytvárajú zložitú sieťovú štruktúru polymérových molekúl s pórmi. Veľkosť pórov vo výslednom géle sa dá ovplyvniť zložením roztoku a koncentráciou polyméru, z ktorého sa pripravuje. Agaróza je prírodný polysacharid a izoluje sa z červených morských rias. Po rozvarení práškovej formy

agarózy v roztoku elektrolytu vylejeme vzniknutý hustý roztok do pripravenej aparatury a gél spolymerizuje. Vzorky DNA sa nanášajú do jamiek v géle, vytvorených hrebeňom počas tuhnutia gélu, pričom pripravený gél je počas nanášania DNA ponorený v príslušnom tlmivom roztoku s rovnakým zložením, ako je zloženie tlmivého roztoku použitého na prípravu gélu.

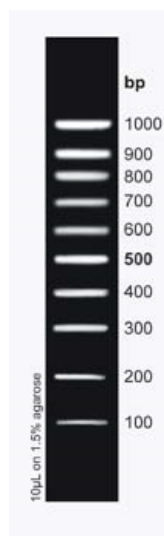
Aparatúry potrebné na elektroforézu možno rozdeliť do troch skupín. **Horizontálne elektroforézy** sa najčastejšie používajú pri separácii DNA a nosným médiom je agarózový gél (obr. 1). **Vertikálne elektroforézy**, pri ktorých je nosným separačným médiom polyakrylamidový gél, sa používajú najmä pri práci s proteínmi. **Kapilárne elektroforézy** (v tenkých sklenených trubičkách) obsahujú taktiež polyakrylamidový gél, a slúžia na sekvenovanie a delenie RNA.

Rýchlosť pohybu makromolekúl v géle sa nazýva **elektroforetická pohyblivosť** a závisí od:

- **molekulovej hmotnosti molekuly** alebo fragmentu. Čím je molekula väčšia, tým sa v géle pohybuje pomalšie. Odhad veľkosti neznámeho fragmentu sa stanovuje porovnaním so štandardom známej veľkosti (obr. 2). Pri každej elektroforéze sa do jednej z dráh nanesie štandard molekulových hmotností (DNA marker – *ladder*). V géle po rozdelení vyzerá ako nepravidelný rebrík. Je tvorený zmesou fragmentov DNA známej veľkosti, ktoré sa počas elektroforézy separujú spoločne so skúmanou vzorkou DNA – vo vedľajšej dráhe. Komerčne je dostupných množstvo rozličných štandardov molekulových hmotností. Výber vhodného štandardu závisí od očakávaných veľkostí separovaných fragmentov;
- **koncentrácie gélu** – čo súvisí s veľkosťou pórov v géle. Hustotu gélu si volíme sami, podľa dĺžky molekúl, ktoré v ňom chceme oddeliť. Čím je gél hustejší, tým má väčšiu „rozlišovaciu schopnosť“, teda dajú sa v ňom oddeliť molekuly veľmi podobnej molekulovej hmotnosti;
- **konformácie** (trojdimenzionálnej štruktúry) molekuly. Napríklad RNA sa pohybuje najrýchlejšie. Kruhovú DNA (napr. plazmidovú) sa pohybuje rýchlejšie ako lineárna dvojvláknová DNA;
- **veľkosti elektrického napätia** – nízkonapäťová a vysokonapäťová (nad 1000 V), obvykle sa využíva napätie 80 - 120 V. Vyššie napätie nesie so sebou riziko roztavenia gélu pri dlhšom pôsobení;
- **zloženia roztokov a teploty** – zloženie elektroforetického roztoku, a to predovšetkým obsah solí v ňom, podstatne ovplyvňuje mobilitu fragmentov DNA počas elektroforézy. Bez prítomnosti solí sa DNA v elektroforéze takmer nepohybuje.



• **Obr. 1.** Aparatúra na elektroforézu



• **Obr. 2.** Štandard molekulových hmotností

Keďže samotná DNA je neviditeľná, vizualizuje sa najčastejšie použitím fluorescenčných farbív (etídium bromid), ktoré sa interkalujú do DNA a po ožiarení UV

svetlom na transiluminátore fluoreskujú. Novšie farbivá ako SYBR® Green, GoldView®, GelRed nie sú taký silný mutagén, akým bol doteraz používaný etídium bromid. Získané výsledky sa dokumentujú pomocou fotodokumentačného zariadenia.

1.5 Restričné endonukleázy a ich praktické využitie

Restričné endonukleázy sú súčasťou restrično – modifikačného systému, ktorý zabezpečuje v bakteriálnych bunkách kmeňovo špecifický obranný mechanizmus proti cudzorodému genetickému materiálu (najmä bakteriofágovej DNA) vnikajúcemu do bunky. Znamená to, že restričný enzým fragmentuje iba cudzorodú DNA baktériofága, ale nie svoju vlastnú DNA, ktorú pozná.

Restrično – modifikačný systém sa skladá z dvoch enzýmov:

- **modifikačného enzýmu** – metylázy. Podstatou modifikácie je postsyntetická metylácia určitej bázy. Modifikovaná DNA je rezistentná voči štiepeniu homologickou restričnou endonukleázou. Modifikáciou bunka chráni svoju DNA pred rozštiepením vlastným restričným systémom. Najčastejším spôsobom modifikácie u baktérii je metylácia adenínu na N6 – metyladenín alebo cytozínu na C5 – metylcytozín;
- **restričnej endonukleázy** – špecificky štiepi lineárnu aj kruhovú dvojvláknovú DNA, pričom rozpoznáva symetrickú sekvenciu zrkadlovo sa opakujúcich nukleotidov – tzv. **palindróm** (tab. 1).

• **Tab. 1.** Pôvod a pôsobenie niektorých restričných enzýmov (endonukleáz)

Baktéria, z ktorej bol izolovaný	Názov restr. enzýmu	Rozpoznávaná sekvencia a spôsob strihania
<i>Aerobacter luteus</i>	Alu I	AG CT TC GA
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	Bam H I	G GATCC CCTAG G
<i>Escherichia coli</i> R I 13	Eco R I	G AATTC CTTAA G
<i>Moraxella boris</i>	Mbo I	GATC CTAG

Názvy restričných enzýmov sa píšú kurzívou a sú tvorené trojpísmenkovým akronymom. Prvé písmeno je rod, ďalšie dve písmená sú druh baktérie, z ktorej bol restričný enzým izolovaný. Rímska číslica vyjadruje poradové číslo endonukleázy izolovanej z baktérie rovnakého rodu a druhu. Napríklad najznámejší restričný enzým *EcoRI* bol ako prvý získaný z baktérie *Escherichia coli*.

Za restriciou nasleduje *in vivo* veľmi rýchla degradácia DNA inými nukleázami na produkty rozpustné v kyseline. Najrozšírenejšie a najpoužívanejšie sú enzýmy typu II., ktoré sú dôležité pre vytváranie rekombinantných molekúl DNA, pretože vykazujú len restričnú enzýmovú aktivitu. Ak nedochádza k štiepeniu DNA v strede palindrómu, štiepením vznikajú prečnievajúce tzv. **lepivé konce**. Konce bez presahu sa nazývajú **tupé konce**. Podľa toho ako príslušná restričná endonukleáza štiepi dvojvláknovú DNA a aké konce zanecháva, delíme ich na tri základné typy:

- 5' – prečnievajúce (lepivé) konce (napr. *Sau3AI*, *ClaI*, *EcoRI*);
- 3' – prečnievajúce (lepivé) konce (napr. *HbaI*, *PstI*);
- tupé konce (napr. *AluI*, *SvaI*, *PvuII*).

Restričné endonukleázy sa v tzv. **rekombinačných technikách** využívajú ako „enzýmové nožnice“, čím sa vytvárajú nové možnosti pre kombinácie genetického materiálu.

Pomocou nich sa vybraný úsek DNA včlení do plazmidu, vírusu alebo iného vektora. Základom je, že vo vektore a na koncoch vkladanej (rekombinantnej) cudzoročnej DNA musí byť prítomný identický palindróm. Preto sa obidve molekuly štiepia rovnakým restriktčným enzýmom. Používajú sa endonukleázy, ktoré vytvoria v DNA komplementárne lepivé konce. Tieto dve molekuly sa spoja, čiže hybridizujú lepivými koncami, a nakoniec sa vytvoria fosfodiesterové väzby v jednotlivých reťazcoch pomocou DNA ligázy. Pomocou vektora sa inzert (rekombinantná DNA) dopraví do cieľovej bunky – na replikáciu DNA *in vitro* alebo na biotechnologické využitie.

Pri replikácii DNA *in vitro* sa nechá plazmid v bunkách baktérií mnohonásobne namnožiť, baktérie sú potom homogenizované a vyextrahuje sa z nich plazmidová DNA. Endonukleázou, ktorá štiepi na tupé konce sa z vektorov vystrihnú inzerty (vložené fragmenty DNA) a separujú sa v géle – na ďalšie využitie. Pri biotechnologickom využití sa v baktérii navodia podmienky, aby sa do vektora vložený gén mohol exprimovať a bunka mohla vytvárať ním kódovaný proteín. Prvou aplikáciou v praxi bola produkcia inzulínu bunkami baktérií *E. coli*. V súčasnosti sa takýmto spôsobom vyrábajú napríklad interleukíny, interferóny, sérové proteíny, hormóny a vakcíny.

Ďalšie využitie restriktčných enzýmov je v **génovej terapii**. Zameriava sa predovšetkým na nádory a bunky kostnej drene, s cieľom opraviť poruchy na úrovni DNA. Prvá génová terapia, ktorá sa podarila bola robená u detí s ťažkou kombinovanou imunodeficienciou (SCID – *severe combined immunodeficiency*). Napriek zdanlivej jednoduchosti, skrýva tento postup v sebe dva okruhy problémov – riziko zmeny vlastností a miesta inzertovania „terapeutického génu“, ako aj nebezpečenstvo malígnej transformácie bunky. V máji 2016 bola SCID oficiálne schválená ako prvá génová terapia pre deti v Európe a jednorázovo sa robí v Miláne (viac v kapitole 15).

1.6 Princípy DNA polymorfizmu a DNA-DNA hybridizácie

Pojem DNA polymorfizmus znamená, že existujú dva alebo viac variantov v sekvencii DNA so signifikantnou frekvenciou v ľudskej populácii (viac v kapitole 7). Hybridizáciou fragmentov DNA, sa pomocou rádioaktívne značených, lokusovo špecifických minisatelitných sond, deteguje polymorfizmus dĺžky restriktčných fragmentov. Metodický postup umožňuje nájsť v genóme jednotlivca úsek DNA, ku ktorému je pripravená komplementárna (značená) hybridizačná sonda.

Existujú dva hlavné typy polymorfizmu DNA, ktoré majú odlišný molekulový základ – bodový polymorfizmus a hypervariabilné oblasti DNA.

Bodový polymorfizmus – zámena jednej alebo viacerých báz. Najznámejší je bodový polymorfizmus, kde existujú dve rôzne alternatívy. Jedna sekvencia sa dá rozštiepiť restriktčným enzýmom, druhá (najčastejšie v dôsledku mutácie) nie je štiepiteľná, pretože sa zmenila sekvencia pôvodného palindrómu a restriktčný enzým nerozpozna zmenený palindróm, preto ho neštiepi. V minulosti sa na RFLP využívala metóda Southern blott s použitím rádioaktívne značených sond (kapitola 1.6.1), v súčasnosti sa úsek namnoží pomocou PCR a k PCR produktu sa pridá príslušný restriktčný enzým, ktorého úlohou je potvrdiť vznik alebo stratu restriktčného miesta.

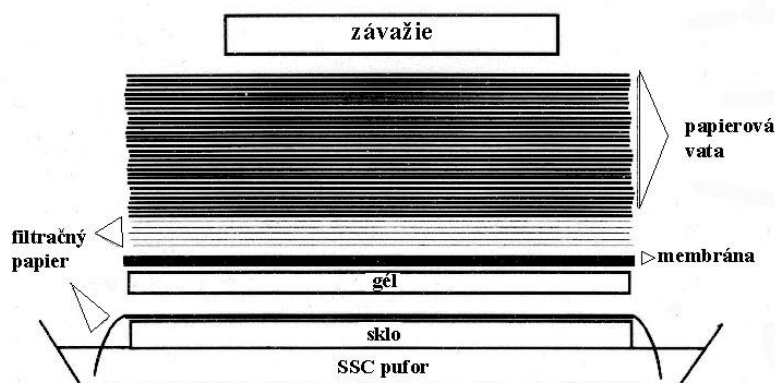
Ďalším typom bodového polymorfizmu je jednonukleotidový tzv. SNP (*single nucleotide polymorphism*), kedy môže byť jeden nukleotid napr. A zamenený za jeden zo zvyšných troch, napr. C, T, G, pričom zmena nie je viazaná na restriktčné miesto. SNP sa vyskytujú v priemere na každých 300 nukleotidov. Nachádzajú sa v nekódujúcich sekvenciách, najmä v intrónoch, ale približne 50 000 sa ich nachádza v exónoch, nazývajú sa funkčné SNP. Sú intenzívne skúmané, pretože môžu ovplyvňovať génovú expresiu a súvisia s multifaktoriálne podmienenými chorobami (napr. rázštepky). Veľa ich je „skrytých“ pre tzv. degeneráciu genetického kódu. Ak sú napr. 4 varianty tripletu kódujúceho tú istú aminokyselinu, prvé dve sú „povinné“ a tretia báza môže byť ktorákoľvek.

Hypervariabilné oblasti DNA sú úseky za sebou idúcich repetitívnych sekvencií s rozličným počtom opakovaní určitého sekvenčného motívu. Môžu byť unikátne, ale aj časté, rôznej dĺžky motívov a počtu ich opakovaní – s medzerami (roztrúsené) alebo tesne za sebou (tzv. tandemové opakovania). Zvyčajne sú lokalizované mimo kódujúcich oblastí DNA, ale môžu sa nachádzať aj v génoch (napr. niektoré z CpG trinukleotidov). Dĺžka týchto oblastí je daná počtom opakovaní daného motívu. Analyzuje sa **variabilný počet tandemových opakovaní** (*variable number of tandem repeats*, VNTR). Pre klasickú VNTR metódu je potrebné, aby sa pred a za skúmaným úsekom opakovaní vyskytovali palindrómy. Ak chýba čo i len jeden z nich – použije sa kopírovanie týchto úsekov metódou PCR. Dĺžka týchto úsekov (fragmentov) sa potom zistí elektroforézou pomocou štandardu molekulových hmotností.

1.6.1 Polymorfizmus dĺžky restriktčných fragmentov (RFLP)

Pre pochopenie princípu hybridizácie a *blottingu* si najprv objasníme postup pri klasickej RFLP. DNA sa štiepila jednou restriktčnou endonukleázou, čím sa získalo veľké množstvo (rádovo stotisíce) fragmentov rôznych dĺžok. Dôvodom pre vznik množstva fragmentov je prítomnosť mnohých štiepných miest (palindrómov) v DNA pre jednu konkrétnu restriktčnú endonukleázu. Dvojvláknové DNA fragmenty sa separovali pomocou elektroforézy v agarózovom géle a denaturovali sa.

Jednovláknové fragmenty DNA sa preniesli na hybridizačnú nitrocelulózovú alebo nylonovú membránu tzv. **Southernovým blottingom** (obr. 3). Kapilárnou eleváciou (vzlínavosťou kvapaliny) prechádzal pufor z misky cez gél až do papierových vrstiev, tým vertikálne vymýval fragmenty z gélu, ktoré sa vyplavili a zachytili sa na membráne. Membrána ukotvila DNA ale pufor cez malé otvory presakoval až do pijavých vrstiev nad membránou. Tým sa preniesli (blottovali) jednovláknové DNA fragmenty z gélu na membránu a nachádzali sa na jej povrchu. Následne sa pripravila sonda. **Sonda** je jednoreťazcová, rádioaktívne alebo fluorescenčne značená DNA, prípadne RNA, o známej sekvencii dusíkových báz. Pri rádioaktívnom značení sú do sekvencií sondy začlenené nukleotidy, ktoré obsahujú rádioaktívny izotop, najčastejšie ^{32}P alebo ^{35}S . Pri nerádioaktívnom značení sa často používajú molekuly biotínu alebo digoxigenínu, ktoré sa do sekvencie sondy začleňujú namiesto tymínu, pričom je na nich pripojená fluorescenčná farbička. Fragmenty uchytené na membráne sa hybridizovali s denaturovanou sondou. Vizualizácia prítomnosti a dĺžky analyzovaných fragmentov sa robila autorádiograficky. V prípade ak vnútri palindrómovej sekvencie dôjde k mutácii a nastane zámena nukleotidu, štiepne miesto zanikne. Taktiež ak v oblasti podobnej palindrómu nastane mutácia, ktorá vytvorí palindróm, vznikne nové štiepne miesto. Dĺžky fragmentov sa teda odlišujú.



• **Obr. 3.** Usporiadanie zariadenia na prenos (*blotting*) fragmentov DNA z gélu na membránu

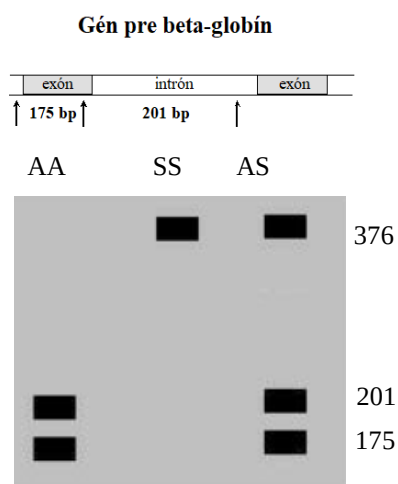
Príkladom využitia metódy RFLP u bodového polymorfizmu je diagnostika kosáčikovej anémie (autozomálne recesívne ochorenie). Pri tomto ochorení dochádza k zmene jednej zo 146 aminokyselín v beta - globínovom reťazci hemoglobínu. U postihnutého jedinca je v šiestom

kodóne kyselina glutámová nahradená valínom. Príčinou je substitučná mutácia – zámena adenínu za tymín:

A = normálna sekvencia : CCT GAG GAG
kódované aminokyseliny: Pro **Glu** Glu

S = mutovaná sekvencia: CCT GTG GAG
kódované aminokyseliny: Pro **Val** Glu

Restrikčný enzým *MstII* rozpoznáva palindróm a štiepi cieľovú sekvenciu CCT GAG GAG. U zdravých jedincov (A) vzniknú po štiepení dva fragmenty (201 bp a 175 bp), pretože enzým rozpozná palindróm a nastáva štiepenie. Mutovaný fragment (S) sa neštiepi vo svojom vnútornom úseku, pretože mutáciou sa zmenilo štiepne miesto a má dĺžku ako súčet predchádzajúcich fragmentov, čiže 376 bp (obr. 4).



• **Obr. 4.** Bodový polymorfizmus pri kosáčikovej anémii. Možno odlíšiť chorých homozygotov SS (majú jeden pásik 376 bp), AA (majú dva pásiky 201 bp a 175 bp) a heterozygotov (majú tri pásiky 376 bp, 201 bp a 175 bp)

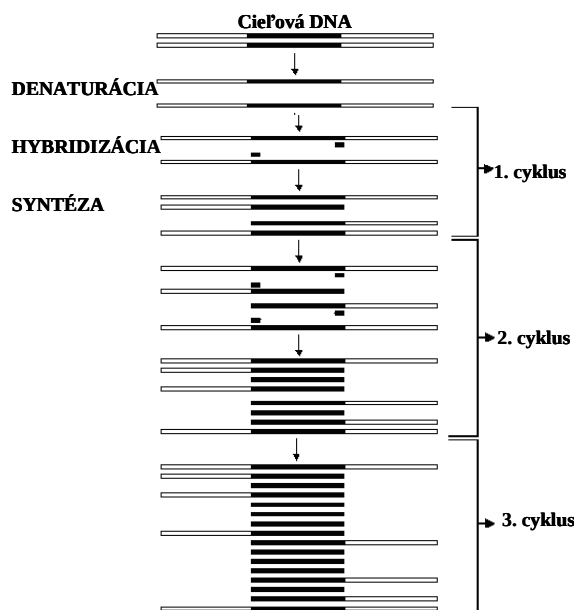
V súčasnosti sa už rádioaktívne značené sondy nepoužívajú. Úsek DNA, v ktorom predpokladáme prítomnosť zámény nukleotidu, sa namnoží pomocou PCR a následne sa štiepi reštrikčným enzýmom. Ďalšiu možnosť detekcie bodového polymorfizmu predstavuje analýza pomocou DNA mikročipov, spomínaná na konci tejto kapitoly, ktorá umožňuje detegovať až 100 000 SNP počas jednej analýzy.

1.7 Polymerázová ret'azová reakcia (PCR)

PCR (*polymerase chain reaction*) je metóda umožňujúca enzýmovú syntézu špecifických úsekov DNA definovanej dĺžky a ohraničenia v podmienkach *in vitro*. Je jednou z najpoužívanějších molekulo-geometických metód. Využitie metódy PCR v praxi je veľmi široké. PCR je v podstate navodenie procesu replikácie DNA v laboratórnych podmienkach. V procese takejto replikácie nedochádza k syntéze celej molekuly DNA, ale len jej krátko definovaného úseku. Na vymedzenie tohto úseku sú nevyhnutné dva krátke (oligonukleotidové) úseky DNA – primery. Na základe komplementarity s cieľovou sekvenciou dochádza k hybridizácii primerov s denaturovanými vláknami cieľovej DNA, čo umožňuje začatie replikácie. Naviazané primery sú rozpoznávané *Taq* polymerázou, ktorá k nim pripája ďalšie nukleotidy na základe komplementarity a syntetizuje komplementárne vlákno až do konca fragmentu. *Taq* polymeráza je izolovaná z termostabilnej baktérie *Thermophilus aquaticus*, žijúcej v horúcich sírnych prameňoch v Yellowstone národnom parku.

Pomocou PCR je možné zmnožiť akýkoľvek úsek DNA s dĺžkou do 23 kb. Podmienkou je však, že sekvencia báz na oboch koncoch amplifikovanej DNA musí byť známa, aby bolo možné cielene použiť primery k týmto úsekom. Úplná sekvencia vnútornej časti fragmentu nemusí byť známa. Pri degradovanej DNA napríklad stačí, ak je kompletný len jeden z oboch reťazcov DNA. Dá sa namnožiť DNA z materiálu fixovanom v parafinových bločkoch, múmií a rôznych starých biologických vzoriek.

Proces amplifikácie DNA prebieha na základe presných zmien teploty v prostredí, kde sa nachádza reakčná zmes v zariadení, ktoré sa nazýva **teplotný cyklovač** (*thermal cycler*). Pozostáva z opakujúcich sa cyklov, z ktorých každý má tri kroky: **denaturácia**, **hybridizácia primerov** na jednovláknovú DNA (tzv. annealing) a **syntéza** komplementárnych vlákien DNA. V každom cykle dochádza k zdvojnásobeniu množstva amplifikovaného úseku DNA. Narastajúci počet opakovaní vedie k exponenciálnemu množeniu vymedzeného úseku. V praxi možno 25 - 35 opakovaniami cyklu dosiahnuť približne 10^4 - 10^6 – násobnú amplifikáciu požadovaného úseku (obr. 5).

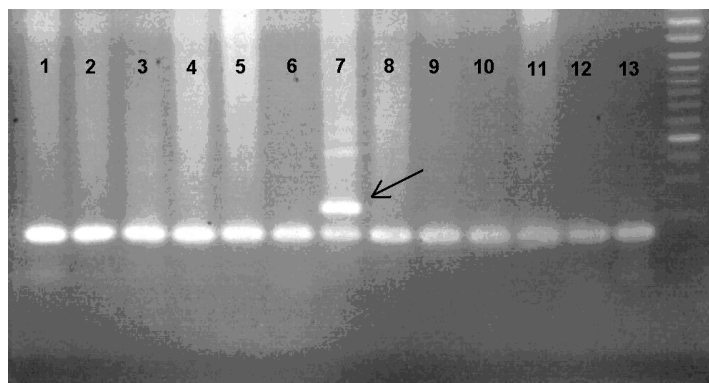


• Obr. 5. Schéma PCR

Pred začatím vlastnej PCR reakcie je potrebné pripraviť reakčnú zmes:

- **templátová DNA** – jedno alebo dvojitá vlákna DNA. Môže to byť celková genómová DNA, ale aj fragmenty degradovanej DNA (izolovanej z kvapky krvi, vlasu, kúska kože, spermií). Na uskutočnenie amplifikácie teoreticky postačuje len jedna kópia požadovanej sekvencie;
- **oligonukleotidové primery** – umelo syntetizované jednovláknové úseky DNA s dĺžkou približne 20 nukleotidov, ktoré sú komplementárne k 3' koncom oboch cieľových vlákien DNA. Pre PCR sú potrebné dva primery – *forward* a *reverse*. Primery vymedzujú sekvenciu DNA, ktorú chceme amplifikovať a slúžia ako štartovacie miesta pre prichytenie *Taq* polymerázy;
- **dNTP** (deoxyribonukleozidtrifosfáty) – používa sa dATP, dGTP, dCTP, dTTP;
- **voda** – musí byť sterilná;
- ***Taq* polymeráza** – pracuje rýchlosťou 100 - 150 nukleotidov za sekundu;
- **MgCl₂** – Koncentrácia MgCl₂ výrazne ovplyvňuje hybridizáciu templátovej DNA s primermi.

Amplifikovanú DNA (obr. 6) je možné štiepiť restriktčnými endonukleázami a vytvoriť jej restriktčný profil, prípadne hybridizovať s oligonukleotidovými sondami alebo priamo sekvenovať.



• **Obr. 6.** 13 fragmentov namnožených metódou PCR, tzv. PCR produktov. Ich veľkosť sa stanoví podľa markera na pravej strane. V dráhe č. 7 je analyzovaná mutácia.

PCR má nasledujúce výhody:

- krátke trvanie celého vyšetrovacieho procesu (okolo 3 hodín), čo má veľký význam najmä pre prenatálnu genetickú diagnostiku a pre detekciu patogénov;
- veľká citlivosť – odhalenie jedinej bunky infikovanej vírusom;
- potreba malého množstva DNA (rádovo nanogramové množstvá), čo umožňuje predimplantačnú diagnostiku z jedinej blastoméry, DNA diagnostiku z buniek vlasovej cibulky, z jednej spermie alebo somatickej bunky;
- DNA môže byť veľmi stará a degradovaná – chromozómové preparáty, parafrínové bločky tkanív, zmrazené tkanivá, mŕtvolý.

Nevýhody PCR sú:

- musí byť známa sekvencia báz na väzbu primerov;
- dajú sa množiť len krátke úseky – do 23 kb;
- kontaminácia hoci len jednou cudzou molekulou spôsobí falošnú pozitivitu reakcie.

PCR sa využíva v mnohých oblastiach:

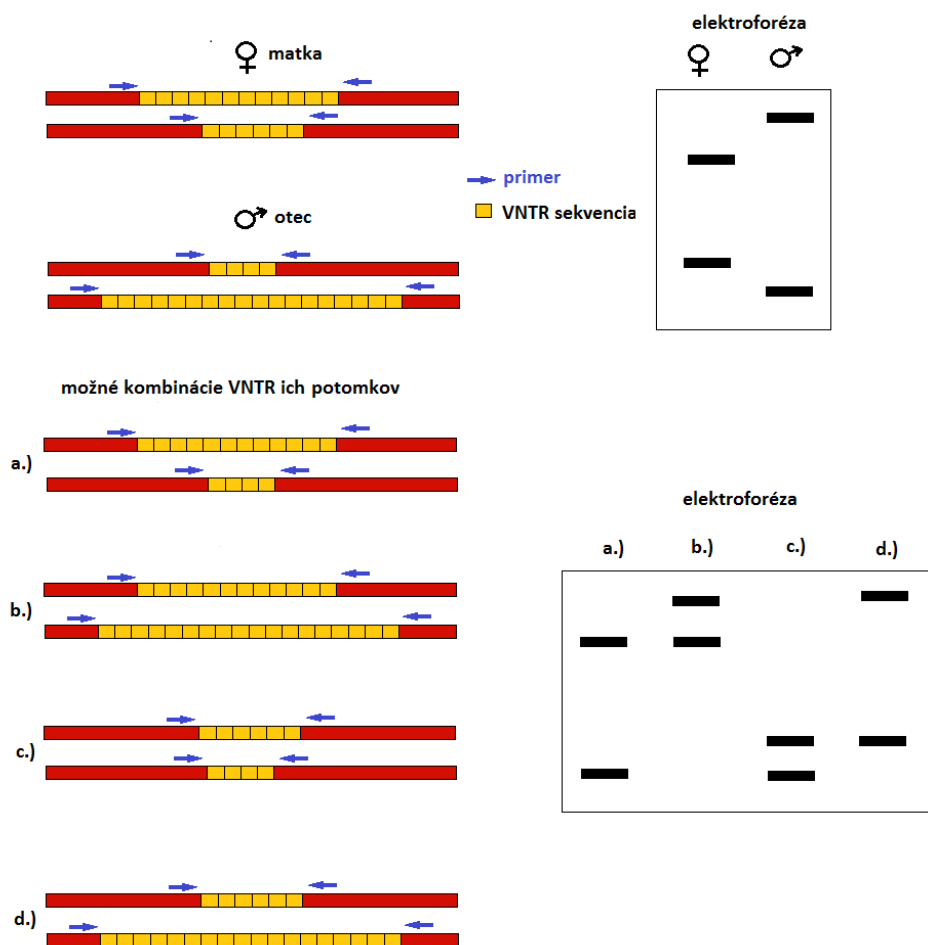
- **v lekárskej genetike** – napr. na detekciu mutácií a polymorfizmov pri rôznych ochoreniach, pri stanovení pohlavia, predimplantačnej, prenatálnej a postnatálnej diagnostike (napr. Duchennova svalová dystrofia, fragilný chromozóm X, hemofília, talasémia, cystická fibróza, fenylketonúria a mnohé ďalšie enzymopatie a syndrómy). PCR väčšinou slúži na namnoženie analyzovaného úseku, ktorý sa sekvenuje;
- **vo výskume** – napr. pri genetických manipuláciách (príprava rekombinantných DNA molekúl z mRNA pre ich expresiu v baktériách), izolácii génov alebo ich častí, *in vitro* mutagenéze, analýze klonov z génových knižníc, konštrukcii a množení sond, určovaní prítomnosti vybraných sekvencií DNA, vrátane štúdia ľudského genómu atď.);
- **v diagnostike rôznych ochorení** – predovšetkým nádorových, ale napr. aj infekčných vírusových, bakteriálnych, mykotických a parazitárnych ochorení (chlamydiózy, toxoplazmóza). S úspechom sa PCR využíva aj v skríningu (hromadnom vyhľadávaní) jedincov s genetickou predispozíciou k niektorým, najmä nádorovým ochoreniam (napr. karcinómy prsníka, prostaty, hrubého čreva, ovárií, endometria, pľúc, močového mechúra atď.);
- **v imunológii** – napr. pri stanovení HLA polymorfizmu pri hľadaní vhodného darcu a príjemcu na transplantáciu;
- **v šľachtiteľstve a chovateľskom výskume** (ochrana genofondov);

- **v potravinárstve** – detekcia geneticky modifikovaných organizmov a potravín;
- **v súdnom lekárstve** tzv. **DNA profilovanie** alebo **DNA fingerprinting** – pri identifikácii jedinca, forenznnej analýze a **pri určovaní spornej paternity a maternity**.

Príkladom použitia metódy PCR pri vyšetrovaní hypervariabilných oblastí (VNTR) je určovanie otcovstva pri paternitných sporoch (obr. 7). Väčšina DNA je úplne rovnaká u všetkých ľudí. Líšime sa len vyše 1 % genetickej informácie uloženej v jadre. Táto sa označuje minisatelitná a je u každého jedinca rozdielna, je to zároveň nekódujúca DNA. Tieto hypervariabilné úseky DNA sú charakterizované významnou variabilitou ich dĺžky, ktorá vzniká v dôsledku rôzneho počtu opakovaní určitého motívu. Práve počet opakovaní týchto krátkych sekvencií je pre DNA identifikáciu kľúčový, pretože je u rôznych ľudí rozdielny. Dĺžka úseku DNA sa označuje ako „alela“ príslušného VNTR systému. Alely sa prenášajú z rodičov na deti (jedna alela je od matky a jedna je od otca). Dieťa môže mať len tie alely, ktoré má jeho rodič. Táto ich dedičnosť sa využíva na učenie materstva či otcovstva. Vzhľadom na veľkú variabilitu medzi členmi populácie je minimálna pravdepodobnosť, že sa dvaja jedinci zhodujú vo väčšom počte VNTR systémov (v alelách) naraz. Porovnaním počtu opakovaných sekvencií na rôznych miestach DNA molekuly vieme určiť, či ide o DNA tej istej osoby alebo dvoch odlišných osôb. Samozrejme, na danom mieste môžu mať dvaja ľudia rovnaký počet tandemových opakovaní, čiže majú rovnakú alelu. Ak však skúmame opakovania na rôznych miestach genómu, je veľmi nepravdepodobné, že na všetkých miestach majú dvaja ľudia rovnaký počet opakovaní. Čím viac miest s opakovaniami skúmame, tým jednoznačnejšie vieme identifikovať vzorku a genetici už presne vedia, kde sa takéto polymorfne miesta v DNA nachádzajú. Ak tieto hypervariabilné oblasti skúmame zároveň získame obraz, ktorý tvorí niekoľko desiatok prúžkov (tzv. DNA profil). Ten je individuálne ešte špecifickejší ako odtlačky papilárnych línií na prstoch. To bol zrejme dôvod, že Alec Jeffreys, ktorý túto metódu vyvinul v roku 1984, ju nazval DNA fingerprinting. Už v roku 1986 bola táto metóda v Anglicku využitá na kriminalistické účely, a to v prípade znásilnenia a vraždy dvoch mladých dievčat. U oboch boli zaistené stopy spermií. Analýza, ktorú zrealizoval osobne Alec Jeffreys, jednoznačne preukázala, že patrí tomu istému mužovi. Dnes sa profily získané zo stôp nájdených na mieste činu porovnávajú s profilmi podozrivých osôb. DNA „odtlačky“ pomáhajú pri určení viny v kriminálnych prípadoch, určovaní totožnosti osôb a pozostatkov, identifikácii páchatel'ov, vrahov alebo pri znásilneniach, paternitných sporoch ale aj pri zámene detí v pôrodnici.

DNA profilovanie v súčasnosti využíva na identifikáciu osôb a plemien krátke tandemové opakovania tzv. mikrosatelity typu STR (*short tandem repeat*). Ich dĺžka je iba 2 - 5 nukleotidov a opakujú sa viackrát za sebou. Jednu STR sekvenciu nazývame STR systém, počet opakovaní je 1 - 100, dĺžka blokov je do 150 bp. Na identifikáciu osôb sa štandardne používa 13 STR systémov ľudského genómu a na Slovensku ich používame až 16. Na identifikáciu spornej paternity a osôb existujú aj iné metódy. STR polymorfizmy majú veľkú úspešnosť a minimálnu chybovosť, preto sú veľmi populárne. Jednotlivé úseky DNA sú pri amplifikácii pomocou PCR fluorescenčne značené a na analýzu výsledkov sa používa CCD kamera, laser a program GeneScan určí aké alely má jedinec vo všetkých šestnástich STR systémoch. Tým sa vytvorí tzv. DNA profil osoby, ktorý sa ukladá do databázy. DNA profilovanie je rozšírené po celom svete a vznikajú rozsiahle národné databázy obsahujúce profily miliónov ľudí. Do tejto databázy sa zaznamenávajú profily usvedčených páchatel'ov, ale aj podozrivých, nezvestných, unesených, zavraždených alebo uväznených osôb. Najväčšiu DNA databázu majú v USA s vyše 5 miliónmi DNA profilov. FBI v r. 1994 vytvorilo databázu s názvom CODIS (*combined DNA index system*), ktorá slúži na porovnávanie skúmaných a uložených DNA profilov. Databáza je anonymná ak sa jedná o nevinných a obeť. V databáze sa eviduje len typ trestného činu, pri akom bola stopa zaistená, kde, kedy, z akého materiálu a ako bola spracovaná, číslo policajného spisu, evidenčné číslo a miesto archivácie, aby sa dala

vzorka v prípade potreby opätovne nájst'. Pri DNA profile páchatel'a sa ukladajú jeho kompletne osobné údaje.

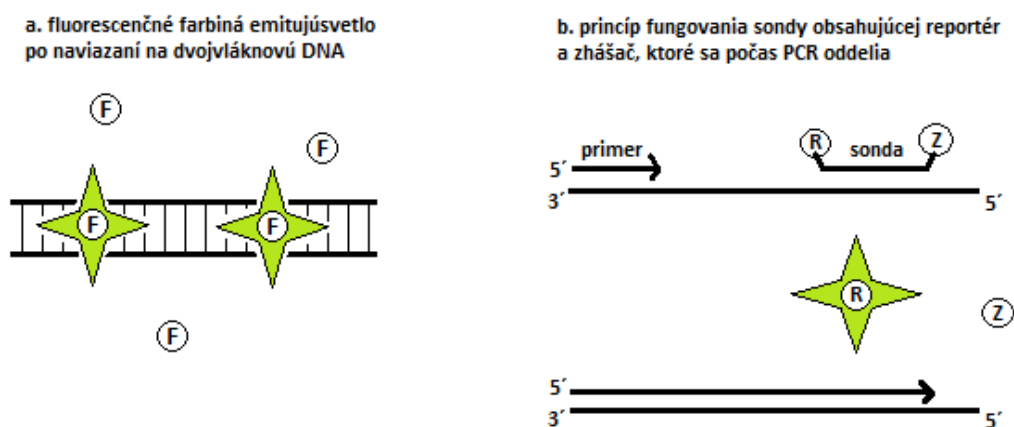


● **Obr. 7.** Určenie paternity VNTR – matka (♀), možné dieťa (a, b, c, d) a otec (♂). Otcovstvo sa pokladá za vylúčené, ak sa dieťa s vyšetrovaným mužom nezhoduje najmenej v dvoch nezávislých VNTR systémoch (alelách).

1.7.1 Kvantitatívna PCR

Kvantitatívna PCR, inak nazývaná aj *real time PCR*, je metóda, ktorá sa využíva na stanovenie presného množstva DNA templátu sledovaním tvorby PCR produktov po každom cykle PCR reakcie. Na detekciu prírastku DNA fragmentov sa využíva fluorescencia. Používajú sa buď fluorescenčné farbivá, ktoré sú schopné naviazať sa len na dvojvláknovú DNA a následne fluoreskujú (obr. 8a.) alebo hybridizačné sondy, ktoré obsahujú pripojený tzv. **reportér** (R) – fluoreskujúcu molekulu a tzv. **zhášač** (Z) – molekulu, ktorá potláča fluorescenciu reportéra pred reakciou, pričom reportér a zhášač sú na DNA hybridizačnej sonde pripojené blízko seba, takže dochádza k potláčaniu fluorescencie reportéra. Hybridizačná sonda musí byť komplementárna k úseku amplifikovaného fragmentu. Pri PCR reakcii dochádza vplyvom 5' nukleázovej aktivity polymerázy k rozkladu hybridizovanej DNA sondy, čím dôjde k oddeleniu zhášača od reportéra, čo sa prejaví fluorescenciou (obr. 8b.). V prípade oboch prístupov dochádza po každom cykle k nárastu množstva produktu, a tým aj fluorescencie, ktorá sa meria. Na začiatku reakcie je fluorescencia nemerateľná, preto je zachytená až po určitom množstve

cyklov. Počet cyklov, pri ktorom dôjde k zachyteniu fluorescence sa nazýva prahová hodnota, pričom čím je vyšší počet cyklov potrebných pre zaznamenanie fluorescence, tým menšie bolo počiatočné množstvo DNA.



• **Obr. 8.** Princípy metódy real time PCR - sledovanie prírastku DNA fragmentov

Metóda *real time* PCR je vhodná najmä na meranie úrovne expície génov, pričom jej predchádza reverzná transkripcia, teda prepis z RNA do cDNA. Používa sa tiež na určenie počtu kópií génov (napríklad delécie a duplikácie) a určenie genotypu (genotypovanie). V mikrobiológii sa používa na identifikáciu prítomnosti a stanovenie množstva patogénu u pacienta. Nie je potrebná kultivácia, čo značne urýchľuje diagnostiku ochorení. Obrovskou výhodou je rýchly výsledok, čo je dôležité najmä pri ochoreniach, ktoré si vyžadujú urgentnú liečbu. Pri **relatívnej kvantifikácii** sa porovnávajú množstvá PCR produktov medzi viacerými vzorkami a štandardom. Pri **absolútnej kvantifikácii** je výsledkom množstvo DNA (v počte molekúl alebo hmotnostných jednotkách).

1.7.2 Metylačne špecifická PCR

Metylačne špecifická PCR (MSP) – sa používa pri analýze metylácie DNA, najčastejšie v oblasti GpC ostrovčekov v promótoroch génov. Templátová DNA sa modifikuje pomocou hydrogénuhličitanu sodného, ktorý v nej pozmení všetky nemetylované C na U. Po PCR sú v novovytvorených vláknach v týchto miestach A, ktoré sa párujú s U. V prípade, že C je metylovaný, v komplementárnom vlákne sa k nemu priradí G. Je nutné použiť dve sady primerov. Prvá sada je špecifická pre nemetylovanú, druhá pre metylovanú DNA.

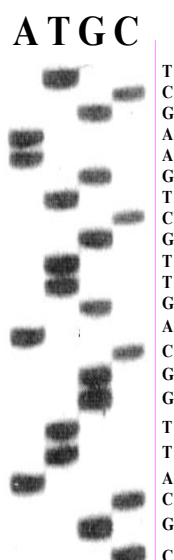
1.7.3 MLPA

MLPA (*multiplex ligation-depend probe amplification*) – po denaturácii DNA sa pridá ku vzorke zmes MLPA oligonukleotidových sond špecifických pre cieľovú sekvenciu. Každá sonda pozostáva z dvoch častí, ktoré sú navrhnuté tak, aby mohli byť spojené do jednej. Až po hybridizácii oboch sond s cieľovým miestom sú navzájom sondy spojené ligázou. Iba spojené sondy sú amplifikované klasickou PCR, pričom je jeden z primerov fluorescenčne značený. V prípade mutácie sa sonda nenapojí a nevzniká PCR produkt. Nasleduje elektroforetická separácia PCR produktov a analýza dát. Výhodou MLPA je možnosť súčasne analyzovať až 50 rôznych genomických DNA sekvencií.

1.8 Sekvenovanie DNA

Sekvenovanie DNA je súbor metód, ktoré umožňujú určiť presné poradie báz, tak ako nasledujú za sebou v DNA. Vychádzajú z dvoch klasických, navzájom odlišných techník – Sangerovej a Maxamovej–Gilbertovej.

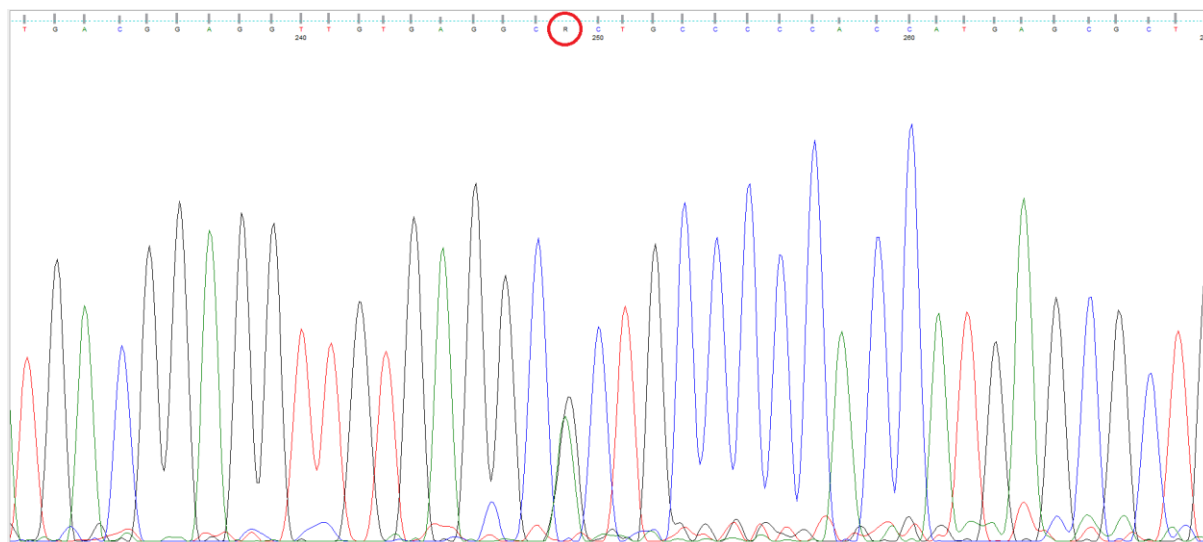
Sangerova metóda (r. 1975) – sa klasicky robí tak, že sa vzorka sekvenovanej DNA rovnomerne rozdelí do štyroch skúmaviek. Pripraví sa 2' – 3' dideoxyribonukleotidy (ddNTP) na identifikáciu každej zo štyroch báz (A, T, C, G). Do každej zo 4 skúmaviek sa v správnom pomere pridajú neoznačené deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP) všetkých typov, ako aj jeden zo značených dNTP (najčastejšie je značený A). Pridaná DNA polymeráza vytvára nové úseky DNA na základe komplementarity, pričom náhodne použije aj ddNTP. Tým dôjde k zastaveniu syntézy reťazca, pretože nemôže byť vytvorená fosfodiesterová väzba medzi dNTP a ddNTP, nakoľko ddNTP má na 3' len vodík. Takto v každej skúmavke vzniká séria fragmentov rôznej dĺžky. Ich veľkosť závisí na vzdialenosti od začiatku reťazca, v akej bol ddNTP zaradený. V každej zo skúmaviek sa teda nachádza DNA, ktorú chceme prečítať, krátky DNA špecifický primer, DNA polymeráza, všetky štyri deoxyribonukleozid trifosfáty (dNTP) a jeden zo štyroch dideoxyribonukleozid trifosfátov (ddNTP). Vzorky z jednotlivých skúmaviek sa nanesú vedľa seba do polyakrylamidového gélu a rozdelia sa elektroforézou. Po autorádiografii sa odčíta poradie báz v sekvenovanom úseku. DNA sa číta postupne od spodnej bázy nahor, v každom stĺpci je v riadku vždy len jeden pásik, pod príslušnou bázou (obr. 9).



• **Obr. 9.** Čítanie autorádiogramu pri sekvenovaní DNA

V diagnostike sa rutinne používa tzv. **automatické sekvenovanie**. Je to spojenie Sangerovej metódy, s použitím fluorescenčne značených ddNTP a na namnoženie slúži PCR. Výhodou je, že všetky štyri reakcie sa uskutočňujú v jednej skúmavke (respektíve kolóne

s géloom). Akýmsi „čítačom“ je lúč lasera, ktorý deteguje u jednotlivých ddNTP rôzny farebný signál a ten sa zaznamenáva. Podstatné zlepšenie predstavovalo aj nahradenie elektroforetickej separácie v polyakrylamidových géloch kapilárovou elektroforézou v tekutom polyméri. Automatické analyzátory DNA, tzv. sekvenátory, separujú produkty sekvenačných reakcií, detegujú fluorescenčne značené fragmenty DNA a zberajú sekvenačné dáta. Výstupom analýzy je elektroferogram nazývaný sekvenogram (obr. 10). Automatizácia sekvenovania výrazne prispela k urýchleniu prác na projekte „Ľudský genóm“ (kapitola 2).



• **Obr. 10.** Sekvenogram (dôležitá je farba „píkov“ a nie ich výška)

Maxamova-Gilbertova metóda (r. 1977) – vzorka sekvenovanej DNA sa rovnomerne rozdelí do štyroch skúmaviek. DNA sa denaturuje a jednovláknová molekula sa potom značí rádioaktívnym fosforom. V každej skúmavke sa chemicky (metyláciou) poškodí jeden typ dusíkatej bázy. Podmienky reakcie sú zostavené tak, aby sa nepoškodili všetky, len ich malá časť. Na poškodené bázy sa pôsobí piperidínom, čím sa v miestach, kde sa nachádzajú preruší reťazec DNA. Vznikne veľa fragmentov rôznej dĺžky v závislosti od toho, ako ďaleko sa nachádzala poškodená báza od konca molekuly. Elektroforéza, autorádiografia a vyhodnotenie sa robia obdobne, ako pri Sangerovej metóde.

V súčasnosti existuje široká paleta sekvenačných metód, ktorá sa spoločne nazýva **sekvenovanie novej generácie**, prípadne **nextgen sekvenovanie**. Toto vysokoparalelné sekvenovanie dnes patrí medzi revolučné metódy v molekulárnej biológii. Tento typ sekvenovania je možné využiť na celogenómové sekvenovanie, na sekvenovanie vybraných fragmentov DNA alebo RNA a tiež na epigenetickú analýzu (sekvenca DNA je rovnaká ale prítomnosť niektorých druhov chemických látok na nukleotidoch môže ovplyvniť expresiu niektorých génov). Nextgen sekvenovanie umožňuje tzv. *de novo* sekvenovanie, teda zisťovanie celých sekvencií DNA, ktorých sekvenca je doposiaľ neznáma. Taktiež umožňuje tzv. resekvenovanie, teda sekvenovanie už známych sekvencií, ktoré slúži napr. na detekciu rôznych variantov alebo mutácií v DNA, čo sa často uplatňuje napr. v diagnostike alebo fylogenetike.

Princípom sekvenovania pomocou v súčasnosti najvyužívanejšej platformy Illumina je prvotná fragmentácia DNA na úseky podobnej dĺžky. Následne sa jednotlivé fragmenty spracujú tak, aby boli schopné pripojiť sa na tzv. **sekvenačný čip**. Samotné sekvenovanie jednotlivých fragmentov prebieha paralelne na čipe. Počas sekvenovania dochádza k pripájaniu fluorescenčne značených nukleotidov komplementárnych k DNA fragmentu na čipe pomocou DNA polymerázy, pričom každý typ nukleotidu má iné farebné označenie. Po pripojení každého nukleotidu dôjde na malú chvíľu k ožiareniu a následnej emisii farebného záblesku

čím je možné zistiť, ktorý nukleotid bol ku konkrétnemu fragmentu DNA pripojený ako posledný. Snímacie zariadenie odфотографuje po každom ožiarení celý povrch čipu. Následné bioinformatické spracovanie umožní konverziu obrazových súborov do podoby zápisu sekvencie pomocou nukleotidov DNA. Následne je potrebné *in silico* (výpočtovou technikou) spracovanie krátkych fragmentov a ich pospájanie do finálnej sekvencie DNA, čo si vyžaduje značné nároky na výpočtovú techniku. Najnovšie platformy Illumina sú schopné paralelne sekvenovať 3 miliardy fragmentov s dĺžkou fragmentu 300 bp v jednom sekvenačnom behu. To predstavuje obrovský rozdiel oproti klasickému Sangerovmu sekvenovaniu, ktoré umožňuje sekvenovať počas jednej sekvenačnej reakcie len jeden fragment DNA s dĺžkou 400 - 900 bp. Nezanedbateľné sú tiež náklady na sekvenovanie, ktoré sa prerátavajú na cenu potrebnú na osekvenovanie 1 milióna báz. Kým u klasického Sangerovho sekvenovania táto suma predstavuje niekoľko tisíc dolárov, pri nextgen sekvenovaní je to len niekoľko centov. V súčasnosti dochádza k rozvoju sekvenačných technológií a snaha je vyvinúť metódu sekvenovania, ku ktorému by stačila len jedna molekula DNA, ktorá by mohla byť sekvenovaná vcelku. Tým by sa predišlo potrebe fragmentácie DNA a následnému skladaniu fragmentov, čo by značne zjednodušilo hlavne celogenómové *de novo* sekvenovanie.

1.9 Biočipy

Revolúciou v molekulovo-genetických laboratóriách bolo zavedenie biočipov (*microarray* obr. 11). Názov vznikol z toho, že technológia ich priemyselnej výroby je obdobná ako u počítačových čipov.

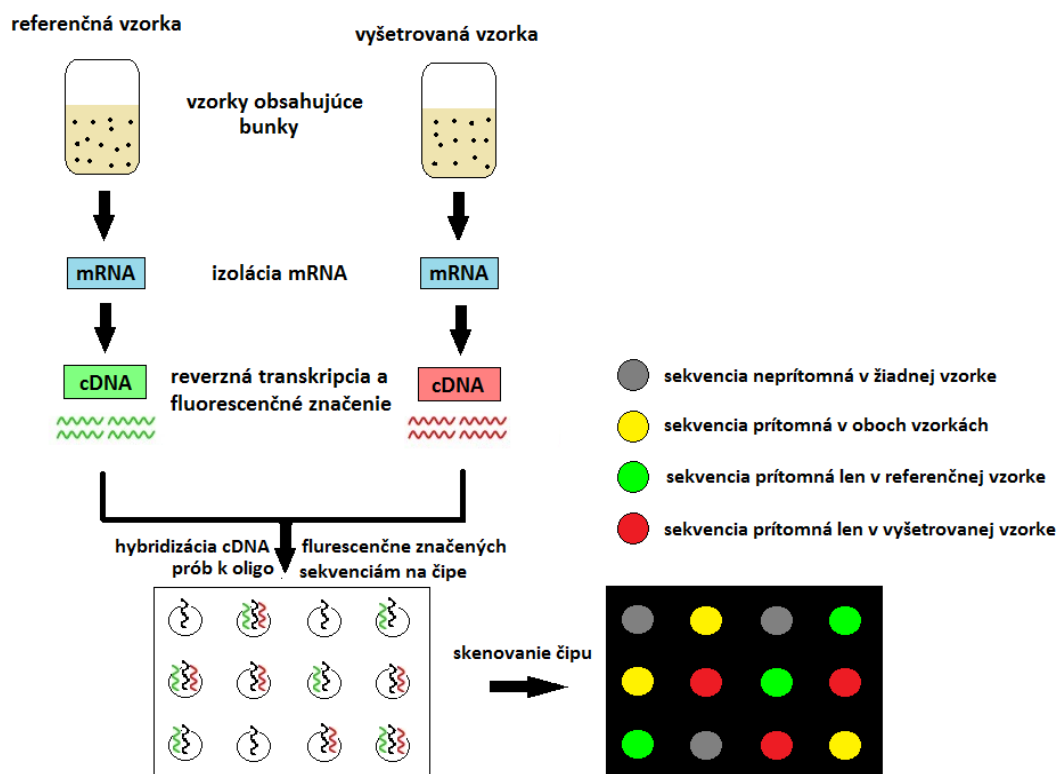
Za ich predchodcov možno považovať komerčne dostupné membrány, ktoré mali na povrchu vopred nanesené sondy, na ktorých sa uskutočňovala hybridizácia s analyzovanou DNA. Na jednej membráne s rozmermi 22 x 22 cm bolo 36 864 DNA sond, ktorými bolo možné detegovať 18 394 génov. Pri biočipoch bola membrána nahradená silanizovanou sklenenou dosičkou veľkosti poštovej známky. Môže na nich byť nanesené viac ako 100 000 rôznych sond a pri jednom vyšetrení identifikovať veľké množstvo parametrov. Napríklad všetky doteraz známe polymorfizmy a mutácie určitého génu (napr. genetickej predispozície k nádorom prsnej žľazy) alebo na vzniku polygénovo podmienených ochorení sa podieľajú viaceré gény, ktoré môžu obsahovať rôzne polymorfizmy, prípadne je ochorenie podmienené zmenou dvoch a viac génov zaradených do určitého metabolického cyklu. Snaha rýchlo a efektívne monitorovať súčasne viaceré gény v jednej vzorke viedla k vývoju techniky mikročipov. Okrem diagnostiky našli uplatnenie aj vo farmakogenetike a používajú sa aj na zisťovanie fylogenetických súvislostí. Čipy sa dodávajú komerčne alebo si laboratórium samé navrhne a pripraví čip podľa potreby.

Sondy sú v tejto technike jednovláknové oligonukleotidy, ktorých sekvenciu poznáme, napríklad úseky génov a sú fixované na čipe. K čipu sa pridá analyzovaná vzorka nukleovej kyseliny, čo je DNA (alebo mRNA prepísaná do cDNA) a fluorescenčne značená. Obvykle DNA nanáša na čip mikrorobot pomocou kovového hrotu. Na základe komplementarity dochádza k hybridizácii DNA so sondami imobilizovanými na mikročipe. Po odmytí nenaviazaných sekvencií zostávajú len tie, ktoré sú spojené s príslušnou sondou na čipe. Na báze fluorescence sú detegované miesta, kde došlo k hybridizácii, v prípade detekcie polymorfizmov je analyzovaná prípadná prevaha farbičky analyzovanej/kontrolnej vzorky DNA. Ak sa snažíme odhaliť jednonukleotidové polymorfizmy v DNA tak sa k čipu pridá aj kontrolná vzorka nukleovej kyseliny, označená inou fluorescenčnou farbičkou, ktorá slúži na porovnanie zmien množstva konkrétnych úsekov DNA. Vyhodnocuje sa prítomnosť a aj množstvo značky. Napríklad v prípade, že je jedinec pre danú alelu heterozygot, naviaže sa na konkrétnu sekvenciu na čipe len polovičné množstvo analyzovanej DNA sekvencie oproti kontrolnej DNA sekvencii, čo sa prejaví prevahou zafarbenia v prospech kontrolnej vzorky.

Touto metódou sa dajú porovnávať vzorky zdravých aj chorých v rôznych štádiách ochorenia a sleduje sa, ktorá zo zmien súvisí s daným ochorením. Taktiež sa využíva

porovnanie expresie génov analýzou mRNA, ktorá funguje na podobnom princípe ako *microarray* pre detekciu jednonukleotidových polymorfizmov. V praxi sa využívajú aj proteínové mikročipy, ktoré obsahujú imobilizované špecifické protilátky proti niektorým proteínom.

V súčasnosti už existujú automaty, robotické stanice, ktoré dokážu priamo zo vzorky periférnej krvi separovať lymfocyty, izolovať z nich DNA, pomocou PCR namnožiť žiadaný úsek, porovnať ho so sondou a vyhodnotiť výsledok. Používajú sa v laboratóriách, ktoré rutinne analyzujú veľké množstvo vzoriek.



• Obr. 11. *Microarray*

Doplňujúca študijná literatúra

ALBERTS, B. – BRAY, D. – JOHNSON, A. – LEWIS, J. – RAFF, M. – ROBERTS, K. – WALTER, P.: Základy bunčnej biológie. Úvod do molekulárnej biológie buňky. 2. vydanie. Ústí nad Labem: Espero Publishing 2005, 740 s.

GBELCOVÁ, H. – REPISKÁ, V. – SHAWKATOVÁ, I.: Nukleové kyseliny a proteíny. Analytické metódy a postupy. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave 2017, 316 s.

2 ĽUDSKÝ GENÓM

Sme prvou generáciou, ktorá bola pri odhaľovaní tajomstiev ľudského genómu. Prečítanie kompletného genómu človeka vyvolalo mimoriadny záujem vedeckých kruhov aj verejnosti. Dlho bola ľudská DNA a jej gény takmer tajomstvom. Predtým ako sa oboznámime s doteraz najväčším, najnáročnejším, najdrahším a najkontroverzným projektom v histórii biológie, musíme si vysvetliť niektoré pojmy. Pre istotu si zopakujeme aj pojem **gén** – predstavuje kompletnú sekvenciu nukleovej kyseliny (DNA alebo RNA), ktorá nesie informáciu pre syntézu určitého produktu (funkčnej RNA alebo proteínu). **Genóm** je súbor všetkých génov a nekódujúcich sekvencií jedinca, ktoré predstavujú jeho kompletnú genetickú informáciu uloženú v jeho DNA. Usporiadanie génov v genóme označujeme ako **štruktúru a organizáciu genómu**. Genóm nachádzajúci sa v bunkových organelách (jadro, mitochondrie, chloroplasty) nazývame **bunkový genóm**. Vedná disciplína, ktorá stanovuje, mapuje a analyzuje genómy sa nazýva **genomika**.

2.1 História projektu „Ľudský genóm“

Robert Holley už v roku 1965 osekvenoval genóm pekárskej kvasinky. Myšlienka úplného dešifrovania ľudského genómu bola prvýkrát navrhnutá biomedicínskymi vedcami v polovici 80-tych rokov dvadsiateho storočia, teda pár rokov po tom, ako bola v roku 1975 vynájdená Sangerova metóda sekvenovania DNA. Onedlho po zverejnení sekvenačnej metódy a jej zavedení v rôznych laboratóriách vo svete bolo možné v roku 1981 publikovať kompletnú sekvenciu ľudskej mitochondriálnej DNA.

Na príprave projektu „Ľudský genóm“ (*Human Genome Project* – **HGP**) sa postupne podieľalo až dvadsaťštyri krajín. Program začala koordinovať Organizácia výskumu ľudského genómu (*Human Genome Organization* – **HUGO**) pod vedením jedného z najvýznamnejších genetikov tej doby Victora A. McKusicka, autora prvého katalógu monogénovo podmienených chorôb človeka *Mendelian Inheritance in Man* – MIM (v súčasnosti Online MIM – OMIM <http://www.omim.org>). Po úvodných diskusiách sa dohodlo, že HGP sa bude realizovať postupne v Spojených štátoch a koordinátorom bude Národný inštitút zdravia (*National Institute of Health* – NIH). V marci 1988 okrem toho vzniklo Národné centrum pre výskum ľudského genómu (*National Center for Human Genome Research* – NCHGR), ktorého prvým šéfom bol spoluobjaviteľ sekundárnej štruktúry DNA a komplementarity dusíkových báz James Watson. Po ňom Michael Gottesmann a od roku 1993 Francis Collins, ktorý sa podieľal na identifikovaní génov cystickej fibrózy, neurofibromatózy a Huntingtonovej choroby. Projekt mal stáť 3 miliardy dolárov a mal prečítať 3,2 miliardy báz DNA.

Samotná práca na tomto projekte bola naplánovaná na 15 rokov a rozbehla sa koncom roka 1990 súčasne v dvadsiatich vedeckých laboratóriách (USA, Kanada, Veľká Británia, Francúzsko, Nemecko, Čína a Japonsko). Pre USA bol tento projekt od začiatku vedeckou prioritou a postupne bol podporovaný čoraz väčšími finančnými prostriedkami, ktoré sa vyšplhali až k sume 200 miliónov dolárov ročne. Predpokladané náklady celého projektu boli 3 miliardy dolárov. Výsledky, teda prečítané fragmenty DNA, boli denne zverejňované na internete. Prvé roky nepriniesli očakávané výsledky. Zavedením automatického sekvenovania sa od roku 1995 začalo projektu dariť. Craig Venter spočiatku pracoval na projekte „Ľudský genóm“ v NIH, kde nebol príliš spokojný ani uznávaný. Preto v roku 1994 založil súkromnú biotechnologickú firmu TIGR, v ktorej za jediný rok prečítali kompletný genóm baktérie *Hemophilus influenzae*.

Informácie ukryté v našich génoch začali byť zaujímavé. Nielen vedci, ale aj podnikatelia si uvedomovali, že nové vedomosti majú obrovskú hodnotu. Vývoj nových liekov, diagnostických postupov a prístrojov sľuboval obrovský profit. To bol dôvod, prečo C. Venter v roku 1998 založil firmu CELERA a začal rýchlo konkurovať vedcom v NIH. Používal najrýchlejšie moderné metodiky sekvenovania (tzv. automatické sekvenovanie) a počítačové

programy. Ešte v tom istom roku dokázali vedci pod jeho vedením sekvenovať celý genóm hlísty *Caenorhabditis elegans*. Hlísta síce nie je podobná človeku v žiadnom smere, avšak genetický kód je nám veľmi podobný (35 % génov *C. elegans* má homológ v ľudskom genóme). Vedci najprv rozstrihali DNA na malé fragmenty, potom v nich prečítali poradie dusíkových báz a prekrývajúce sa úseky poskladali pomocou počítačových analýz, táto metóda sa nazýva *shotgun*. Rovnaká metóda aká bola použitá na sekvenovanie DNA hlísty, bola použitá na sekvenovanie ľudského genómu.

Konkurenčný boj medzi NIH a Venterom veľmi urýchlil prácu v genetických centrách. Po zložitých diskusiách, do ktorých musel zasahovať aj vtedajší americký prezident Bill Clinton, vedci ohlásili predbežný výsledok na spoločnej tlačovej konferencii 26. júna 2000. Tento deň bol označený ako **deň G**, kedy bol nahrubo prečítaný ľudský genóm. **15. 4. 2003 bol projekt úspešne ukončený.** Dokončili ho za necelých 13 rokov a stál 3,8 miliardy dolárov. Oveľa väčšie náklady, ako boli použité na samotný projekt, slúžili na riešenie etických a právnych problémov, a podporu aktivít HGP. V tej dobe sa lekári a biológovia dostali k obrovskej databáze údajov, avšak až doteraz majú problémy s interpretáciou získaných dát, ktoré vyplývajú z komplexnosti genómu. Nedajú sa totiž analyzovať len jednotlivé gény a ich bielkovinové produkty, pretože sa zistilo, že jeden gén môže mať viaceré funkcie. Aj keď bol HGP ukončený, i naďalej sa vedci pokúšajú zistiť, ktoré gény, prípadne ich varianty sú pre vznik, vývin a progresiu chorôb dôležité. Projekt poznania ľudského genómu je teda aj naďalej vytrvalo realizovaný. Sú vypracovávané ďalšie plány, sekvenujú sa viaceré DNA vzorky a porovnávajú sa DNA polymorfizmy. Analýza polymorfizmov ľudského genómu mala svoj vlastný projekt „*Human Genome Diversity Project*.“ DNA sa izolovala od osôb z 56 populácií a zistilo sa, že jednonukleotidové polymorfizmy typu SNP sa vyskytujú v priemere na každých 300 nukleotidov našej DNA, čo je obrovské množstvo variácií.

Na projekt ľudského genómu nadväzuje „*1000 Genomes Project*“, ktorého cieľom bolo preskúmať genetické varianty u 2 500 neidentifikovaných osôb z 20-tich populácií sveta metódou sekvenovania druhej generácie, ktorou môžeme rýchlo sekvenovať vybrané oblasti, zistiť genetickú výbavu mnohých ľudí a hľadať genetické odlišnosti. Výsledky by sa mali dať použiť pri pátraní po genetických príčinách rôznych chorôb. V pilotnom štádiu programu „*1000 Genomes Project*“ preskúmali a porovnali genetickú výbavu osemsto ľudí. Približne 99 % genómu máme rovnakých. Práve v tom jednopercentnom zvyšku sú skryté rozdiely. O tom, že lúštenie genetického kódu výrazne pokročilo, svedčí aj fakt, že genóm prvého jednotlivca sekvenovali vedci takmer 11 rokov a potrebovali na to tri miliardy dolárov. Projekt genóm 1000 si vystačí so 120 miliónmi dolárov. V rokoch 2003 - 2012 realizovalo 32 vedeckých tímov projekt, ktorý mal identifikovať a kategorizovať funkčné elementy v DNA, teda kódujúce aj nekódujúce sekvencie (proteín kódujúce gény, promótory, enhancery, gény pre RNA, regulačné sekvencie, pseudogény, atď.) s názvom ENCODE – „*Encyclopedia Of DNA Elements*“. Náklady projektu boli 288 miliónov amerických dolárov. Zaujímavý je aj projekt „*Human Microbiome Project*“, ktorého cieľom bolo charakterizovať mikrobiálne spoločenstvá v rôznych častiach ľudského tela (urogenitálny trakt, koža, ústna dutina, gastrointestinálny trakt...) a spoznať ich úlohu v normálnej fyziológii a pri ochoreniach. Projekt sa realizoval v rokoch 2008 - 2016 a bolo vyšetrených obrovské množstvo vzoriek zdravých aj chorých jedincov. Koncom roku 2018 bol spustený rozsiahly projekt nazvaný „*Earth BioGenome*“ – EBP, ktorého úlohou je zmapovanie genómov všetkých 1,5 milióna známych živých rastlinných a živočíšnych druhov na Zemi. Očakáva sa, že náklady na projekt budú 4,7 biliónov dolárov. Výsledky by mali slúžiť na pochopenie fylogénzy, evolúcie, posilnenie ochrany prírody, zachovanie biodiverzity a udržanie ľudských rás. Ako prvé sú sekvenované vzácne druhy a je už známa kompletná sekvencia kanadského rýsa, novozélandského papagája, vtákovyska, netopiera, či zebry. Napríklad USA plánuje sekvenovať 66-tisíc stavovcov a Čína 10-tisíc rastlinných genómov. Projekt má tri hlavné výskumné a koordinačné centrá: v New Yorku, Cambridge a Drážďanoch.

Dosiaľ bol zverejnený kompletný genóm 244 007 prokaryotických, 11 006 eukaryotických (pes, kôň, krava, sliepka, šimpanz, ryža, ľalia, kukurica, pšenica, atď.) biologických druhov a 35 423 vírusov. V r. 2019 bolo z celkového počtu 4 000 múmií osekvencovaných 3 000 kusov.

Ukončenie genomického projektu otvorilo priestor pre ďalšie súvisiace projekty, ako je proteomický. Proteomický projekt má za úlohu kompletne opísať (funkcie, lokalizáciu, asociované gény) a kvantifikovať proteínové produkty vznikajúce génovou expresiou.

2.2 Ciele projektu „Ľudský genóm“

Hlavným cieľom HGP bolo získať základné informácie týkajúce sa humánnej DNA. To by následne viedlo k pochopeniu molekulovej biológie a genetiky človeka a jej úlohy v zdraví a pri chorobách. Podrobné ciele projektu sú nasledovné:

- vytvorenie genetickej mapy
- vytvorenie fyzických máp
- stanovenie úplnej sekvencie ľudskej DNA
- identifikácia všetkých génov ľudskej DNA
- uskladnenie informácií – počítačové databázy
- riešenie etických, právnych a sociálnych otázok, ktoré projekt vytvoril

2.3 Výsledky projektu „Ľudský genóm“

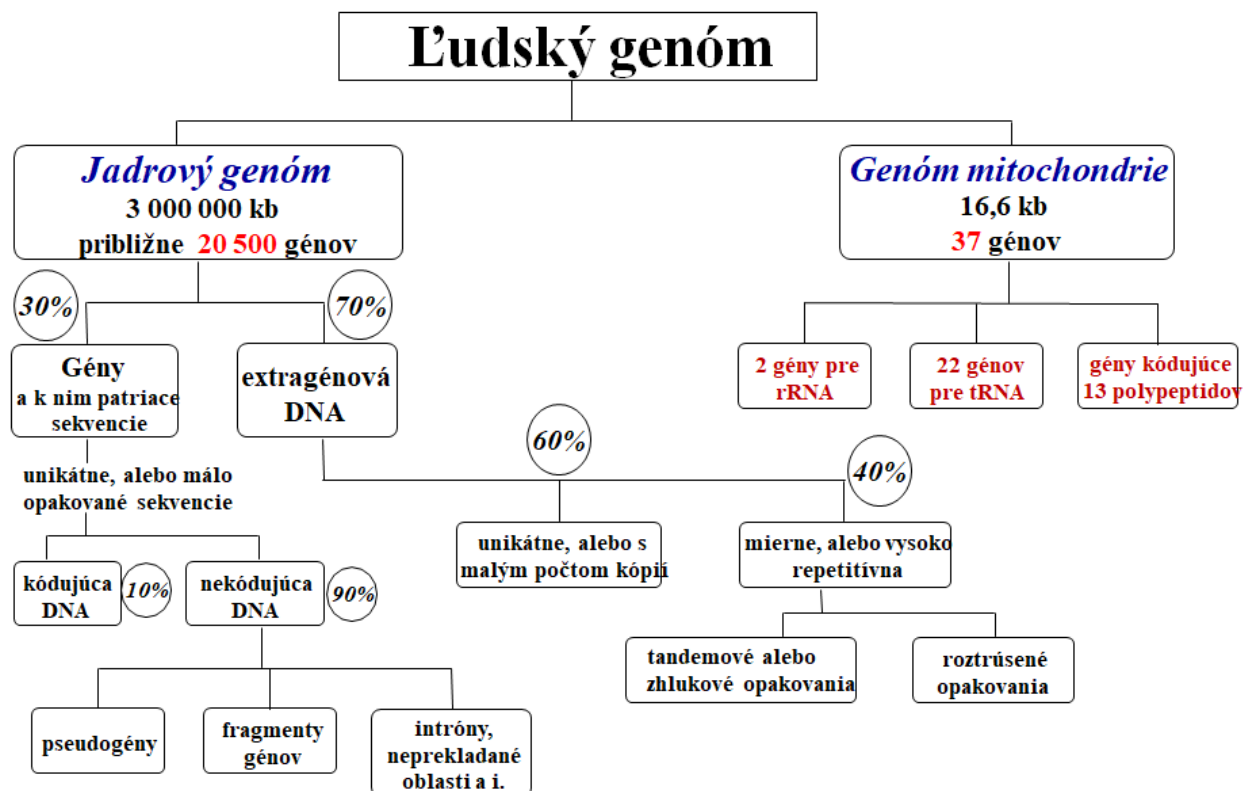
Momentálne už vieme zhodnotiť obrovský prínos HGP pri vývoji metód molekulovej biológie, konštrukcii genetických a fyzických máp, tvorbe rekombinantných DNA molekúl, vytváraní DNA databáz, v bioinformatike, v diagnostike nádorových, monogénových chorôb a hľadaní genetických predispozícií pre určité choroby na úrovni DNA. Nemalý význam je spojený s výrobou nových liekov (predovšetkým antibiotík) a s personalizovanou medicínou.

Výsledky projektu sú poskytnuté verejným databázam, preto môžeme hovoriť, že je to "významný dar celému ľudstvu". Najdôležitejšia elektronická databáza je GenBank spravovaná Národným centrom pre biotechnologické informácie (NCBI) pri Národnom ústave zdravia (NIH) v USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Po zverejnení hrubej sekvencie genómu bolo kompletne identifikovaných 11 000 génov. Ďalšie tisícky sa predpovedali na základe počítačových analýz sekvencií a pomocou analýz CpG ostrovčekov (oblasti 200 - 500 bp DNA s vysokým výskytom cytozínu a guanínu), ktoré sa nachádzajú v promótorových oblastiach génov, a preto predpovedajú prítomnosť génu.

Najväčším objavom vyplývajúcim z projektu HGP bolo zistenie, že človek nemá dovtedy predpokladaných 80 - 100 tisíc génov ale len asi 20 - 25 tisíc. Na začiatku roku 2020 sa počet kódujúcich génov človeka odhadoval na ešte nižší počet, presne na 20 449 (http://www.esembl.org/Homo_sapiens/Location/Genome).

Pre porovnanie malý už spomínaný červ *C. elegans* má 20 tisíc génov a väčšina cicavcov ich má toľko ako človek. Štruktúra a funkcia veľkej väčšiny génov zvierat je totožná s funkciou a štruktúrou analogických ľudských génov. Vysvetlenie rozdielu medzi nižšími a vyššími organizmami a medzi zvieratom a človekom spočíva práve v komplexnosti genómu. Z 3,2 miliárd bp genomovej DNA je okolo 5 % silne konzervovaných a v porovnaní s inými živočíchmi veľmi podobných, teda ostali počas evolúcie zachované, a väčšinou kódujú génový produkt so zásadným významom. Obrovským prekvapením bolo, že iba približne 1,1 % našej DNA kóduje proteíny, menej než 4 % predstavujú iné konzervované sekvencie (regulačné sekvencie, RNA gény a proteíny nekódujúcu konzervovanú DNA) (Obr. 12).



• Obr. 12. Schéma organizácie ľudského genómu

V bunke sa niektoré gény vyskytujú iba v jednej kópii (nazývajú sa jednokópiové alebo unikátne gény). Iné sú viackópiové a vznikli zmnožením sa v genóme počas evolúcie. Niektorým mnohokópiovým ostala rovnaká funkcia ako jednokópiovým genóm a niektoré majú podobnú funkciu. Funkčne podobné gény môžu byť zoskupené na chromozóme blízko seba, ale aj roztrúsené.

Gény delíme na **funkčne**:

- **identické gény** (napr. histónové gény, ktorých je asi 86);
- **podobné gény** (napr. gény pre alfa a beta globín);
- **príbuzné gény** (napr. súčasti jednej signálovej dráhy).

Génové rodiny môžu byť:

- **klasické**, majú rovnakú sekvenciu v celom géne (napr. históny, globíny);
- **kódujúce produkty s krátkymi aminokyselinovými motívami**, majú rovnaký len krátky DNA motív, ale v iných oblastiach génu sa líšia (napr. transkripčné faktory, na DNA sa viažúce domény);
- **superrodiny**, kódujú funkčne príbuzné produkty (napr. imunoglobulíny, HLA).

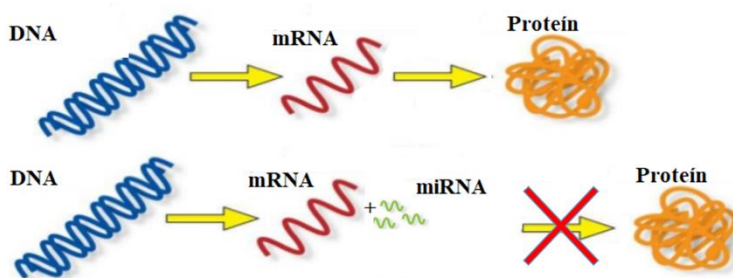
Okrem génov máme v genóme repetitívne sekvencie, ktoré môžu byť zoskupené alebo roztrúsené (viac učebnica I., kapitola „Typy DNA v ľudskom genóme“).

Aj v rámci HGP bolo zistené, že ľudská DNA vykazuje určité polymorfizmy = variácie na úrovni sekvencie DNA. DNA dvoch osôb na svete nie je identická, s výnimkou monozygotných (jednovaječných) dvojčiat. Už sme spomínali, že DNA polymorfizmus znamená existenciu minimálne dvoch variantov v sekvencii DNA so signifikantnou frekvenciou v ľudskej populácii. DNA polymorfizmy delíme podľa veľkosti (rozsahu) na bodové a na tzv. hypervariabilné oblasti. V klinickej genetike ich delíme na normálne a patogénne.

DNA polymorfizmy slúžia ako **genetické markery**. Genetický marker musí mať vysokú heterozygotnosť v populácii, aby bol informatívny (musí odlišiť materskú a otcovskú alelu, potvrdiť identickosť DNA darcu a príjemcu pri transplantácii). Ako genetický marker slúži aj **minisatelitná DNA**, kde sa opakuje 9 až 65 nukleotidov dlhý DNA motív. V praxi najužitočnejšie markery predstavuje mikrosatelitná DNA s 2 - 5 nukleotidovými repetíciami, najčastejšie sa používajú dinukleotidové CA opakovania. **Mikrosatelitná DNA** je vysoko polymorfná, v populácii sa môže vyskytovať množstvo alel, zároveň sa dá ľahko analyzovať pomocou PCR, tzv. fragmentačnou analýzou. Genetické mapy boli založené na detekcii mikrosatelitných markerov. Vytvárajú sa detailné genetické väzobné (*linkage*) mapy využívajúce DNA markery, teda lokusy na presne definovanom mieste na chromozóme, ktoré sú polymorfné v populácii. Dajú sa testovať pomocou metód molekulovej genetiky. Umožňujú od seba odlišiť jednotlivé homologické chromozómy, detegovať alely dvoch alebo viacerých markerov segregovaných spolu v rodinných štúdiách.

DNA markery je možné lokalizovať do tzv. **väzobných skupín** (*linkage groups*). Jednotlivé väzobné skupiny je možné priradiť k patričnému chromozómu pomocou fyzického mapovania. Bola vytvorená špeciálna databáza tzv. UniSTS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>) sekvencií, ktoré sú orientačnými bodmi fyzických máp genómu.

Veľkým prekvapením sú výsledky o počte génov pre RNA, ktorých počet stále nie je definitívny a v súčasnosti sa odhaduje na asi 60 000. Ľudské gény kódujúce rRNA a tRNA sú organizované do veľkých génových zoskupení (klastrov). Nedávno boli identifikované nové malé nekódujúce jednovláknové RNA molekuly (21 až 23 nukleotidov dlhé) tzv. **mikroRNA** (miRNA), ktoré sa podieľajú na regulácii génovej expresie. Vznikajú transkripciou z génov uložených v DNA, ale nedochádza k ich translácii na proteín. Namiesto toho sa každý primárny transkript páruje s niektorými vlastnými komplementárnymi bázami a nakoniec sa premení na funkčnú miRNA. Tieto molekuly sú čiastočne komplementárne k určitým molekulám mRNA (obvykle k regiónu 3' UTR) a sú preto schopné regulovať proteín vznikajúci z tejto mRNA. Keď sa komplementárne spáruje miRNA a mRNA, je obvykle inhibovaná translácia a nevzniká proteín (obr.13). MikroRNA sa nachádza nielen u ľudí, ale aj u rastlín a živočíchov. Sekvencie miRNA sú, na veľké prekvapenie pre vedcov, zapísané v nekódujúcej oblasti DNA, o ktorej sme až doteraz vôbec nič nevedeli.



- **Obr. 13.** Regulácia génovej expresie pomocou miRNA

Je vysoko pravdepodobné, že rozlúštenie genómu človeka zasiahne v blízkej budúcnosti každú oblasť medicíny a spôsob liečby. Nebudeme hovoriť o lekárskej genetike, ale oveľa viac o genomike. Diagnostika mutovaných génov, ktoré predisponujú choroby bude súčasťou rutinej medicíny. Mnohé DNA testy sú k dispozícii už v súčasnosti. Možnosť identifikovať mutácie v nádoroch naštartovalo éru génovej terapie „šitej“ presne na mieru jednotlivých pacientov. Sekvenovanie prinieslo niekoľko zaujímavých informácií. Napríklad deti majú 60 genetických variácií, ktoré nezískali ani od jedného z rodičov, a tak museli vzniknúť ako mutácie *de novo*. Takisto žiadna osoba nemá perfektnú genetickú výbavu, ale nesie si so sebou

50 až 100 genetických variácií, ktoré boli v doterajších výskumoch spojené s niektorou z chorôb.

Výsledky HGP sú zhrnuté v tabuľke 2.

• **Tab. 2.** Prehľad najdôležitejších výsledkov HGP

Veda	- evolúcia človeka a pôvod ľudských populácií - kompletná DNA sekvencia, slúži ako dôležitá informačná databáza - determinácia štruktúrnych génov - porovnanie rôznych genómov (evolučný a fylogenetický význam)
Medicína	- izolácia a charakteristika génov zodpovedných za dedičné a nádorové ochorenia - DNA diagnostika chorôb - pochopenie normálneho formovania stavby a myslenia človeka - štúdium biologických funkcií na molekulárnej úrovni (diferenciácia, starnutie, atď.)
Technológia	- genetická konzultácia - génová terapia (genetických a nádorových ochorení) - cielená liečba („molekulárna farmakológia“) - DNA databázy (kriminalistika, armáda)

2.4 Etické problémy projektu „Ľudský genóm“

V priebehu jedného alebo dvoch desaťročí budeme možno mať pri sebe svoju genetickú informáciu v mobile. Súčasťou bude informácia o krvnej skupine, genetickej predispozícii k rôznym chorobám, alergiám a podobne. Bude podstatne jednoduchšie vybrať genetické znaky ľudských embryí pred umelým oplodnením.

Liečba pacientov bude založená na možnosti ovplyvňovania konkrétnych génov (genetických ochorení, vývinových chýb alebo rakoviny). Budeme snáď vedieť dosť o spojení určitých génov v našom genóme s prvkami ľudskej povahy, budeme chápať ľudské myslenie a budeme vedieť regulovať starnutie. To sú výhody, ktoré nám prináša znalosť ľudského genómu. Ale realizácia tohto projektu priniesla so sebou aj veľké morálne dilemy. Na ich riešenie vznikla komisia ELSI (*Ethical, Legal and Social Issues Joint Working Group*), ktorá sa venuje etickým, právnym, politickým a spoločenským aspektom súvisiacich s realizáciou HGP.

Na tieto problémy upozornili členovia Medzinárodného bioetického výboru, ktorí vydali v roku 1996 dokument s medzinárodnou platnosťou, ktorého cieľom je chrániť ľudský genóm. O Projekt sa začali zaujímať nielen poisťovne ale aj katolíci, etici a právnici. Na prvý pohľad je HGP zdanlivo bezproblémová vec, avšak už od začiatku jeho realizácie vznikali mnohé etické, legálne i sociálne problémy. Jeho organizátori vyčlenili 3 % z rozpočtu len na riešenie etických aspektov. V súčasnosti tento podiel rapídne stúpol. Výsledky riešení etických problémov sú predmetom medzinárodných dohôd (Rada Európy, Európsky parlament, UNESCO) s cieľom harmonizovať legislatívne normy jednotlivých štátov. Všetky normy uznávajú autonómiu, dôvernú informáciu a právo na súkromie, rovnosť prístupu a rešpektovanie ľudskej dôstojnosti. Výsledky genotypovania sú vysoko osobnou záležitosťou, ale svojimi dôsledkami sa dotýkajú aj iných osôb.

DNA analýza na rozdiel od iného typu vyšetrení je vo svojej podstate spojená s možnosťou diskriminácie. Napríklad v zamestnaní vás nemusia prijať pokiaľ by ste mali predispozíciu k chorobe, a ani poisťovňa vás nemusí poistiť, pokiaľ by mala takéto informácie.

Genetické testovanie často prináša informácie aj o ostatných členoch rodiny a môže priniesť i rozvrat v rodine. Napríklad genetické testovanie novorodencov na cystickú fibrózu vo Veľkej Británii dokázalo, že až 13 % zákonných otcov nie sú biologickými otcami. Stále častejšie sa vynára otázka, či HGP neprehĺbi sociálnu nerovnosť a diskrimináciu niektorých etnických skupín, kde určité mutované gény budú vo vyššej prevalencii.

Riešenie etických problémov je prejavom zodpovednosti súčasnej generácie ľudstva pred budúcimi generáciami. Niektorí kritici naznačujú, že pokiaľ sme schopní diagnostikovať genetické poruchy pred ich prejavom, môže to u človeka vyvolať frustráciu, najmä v prípadoch keď nie je k dispozícii vhodná liečba. Genetici majú niekoľko presne definovaných génov, v ktorých mutácie spôsobujú konkrétnu chorobu, ale terapia doposiaľ neexistuje. Napríklad mutácia v gène pre beta-globín, ktorá vyústi do kosáčikovitej anémie, bola identifikovaná už v roku 1956, ale doteraz je neliečiteľná. Ale aj pri absencii spôsobov liečby, mutácia detegovaná pred nástupom príznakov často účinne ovplyvní manažment poruchy.

Doplňujúca študijná literatúra

ALBERTS, B. – BRAY, D. – JOHNSON, A. – LEWIS, J. – RAFF, M. – ROBERTS, K. – WALTER, P.: Základy bunčnej biologie. Úvod do molekulárnej biologie buňky. 2. vydanie. Ústí nad Labem: Espero Publishing 2005, 740 s.

BÖHMER, D. – DANIŠOVIČ, Ľ. – REPISKÁ, V.: Lekárska biológia a genetika 1. Druhé doplnené vydanie. Bratislava: Univerzita Komenského 2020, 102 s.

GBELCOVÁ, H. – REPISKÁ, V. – SHAWKATOVÁ, I.: Nukleové kyseliny a proteíny. Analytické metódy a postupy. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave 2017, 316 s.

3 ZÁKLADNÉ METÓDY GENETIKY ČLOVEKA

Genetika človeka má svoje výrazné špecifiká, ktoré vyplývajú z faktu, že u ľudí nemožno použiť klasickú metódu genetického výskumu rastlín a živočíchov – experimentálne kríženie, teda nútené pohlavné rozmnožovanie vybraných jedincov. To však nič nemení na skutočnosti, že podiel dedičnosti na formovaní tak normálnych, ako aj patologických znakov a ochorení, je v popredí záujmu humánnych a klinických genetikov. Odborníci zaoberajúci sa genetikou človeka teda museli vyvinúť zvláštne metódy ako sú gemelologická a genealogická, ktoré umožňujú študovať genetickú podmienenosť znakov u človeka. Neskôr boli vyvinuté ďalšie metódy, ktoré umožňujú diagnostikovať konkrétne ochorenia a patologické stavy, ako aj pravdepodobnosť ich výskytu.

Diagnostikou a genetickou prognózou dedičných ochorení sa zaoberá klinická genetika. Pretože dedičné ochorenia sú spôsobené zmenami genetického materiálu rôzneho charakteru (napr. ochorenia monogénové, multifaktoriálne, mitochondriálne, ako aj aberácie chromozómov) má genetika človeka mnoho špecifik, ktoré sa týkajú predovšetkým metód výskumu a možnosti ich využitia najmä v medicíne.

Praktická aplikácia genetických poznatkov v medicíne umožňuje poznať podstatu rozličných geneticky podmienených patologických stavov a stanoviť riziko ich výskytu v rodine a u ďalších príbuzných postihnutého (genetická prognóza), prípadne i prenatálne jednoznačne potvrdiť alebo vylúčiť geneticky podmienené postihnutie plodu.

Medzi metódy používané v humánnej genetike patria:

- gemelologická – výskum dvojčiat;
- genealogická – rodokmeňová;
- populačná – štatistická;
- cytogenetická;
- analýza DNA.

3.1 Gemelologická metóda (metóda výskumu dvojčiat)

Táto metóda sa používa na stanovenie podielu dedičných a nededičných faktorov na formovaní (pri vzniku) sledovaného znaku. Vychádza sa zo skutočnosti, že **monozygotné (MZ, jednovajíkové)** dvojčatá vznikajú pôvodne z jednej zygoty. Zárodok (*morula*) sa vo včasných štádiách embryogenézy rozdelí na dve časti, ktoré sa ďalej vyvíjajú samostatne. MZ dvojčatá majú za normálnych okolností úplne rovnaký genotyp. Všetky fenotypické odlišnosti medzi nimi sú spôsobené negenetickými faktormi. Koeficient príbuznosti je 100 %.

Dizygotné (DZ, dvojvajíkové) dvojčatá vznikajú oplodnením dvoch rôznych vajíčok dvomi rôznymi spermiami a vyvíjajú sa v maternici v tom istom čase. Koeficient príbuznosti ich genotypov je 50 %, tak ako u iných súrodencov.

Podstatou metódy výskumu dvojčiat je porovnávanie zhodnosti (**konkordancie**) a nezhodnosti (**diskordancie**) výskytu rovnakej formy sledovaného znaku u obidvoch jedincov v každom páre, v študovanej skupine MZ a DZ dvojčiat.

Podiel dedičnosti a prostredia na vytváraní určitého znaku vyjadruje **veličina H** (heritabilita, dedivosť). Veličinu H vypočítame porovnaním (percenta) konkordancie znaku u monozygotných dvojčiat (K_{MZ}) a (percenta) konkordancie znaku u dizygotných dvojčiat (K_{DZ}) podľa vzorca:

$$H = \frac{K_{MZ} - K_{DZ}}{100 - K_{DZ}}$$

Veličina H môže nadobúdať hodnoty od 0 po 1. Čím je znak viac ovplyvnený dedičnými faktormi, tým viac sa hodnota H blíži k 1. Ak je K_{MZ} 100 (%), tak je veličina H rovná jednej a znak je úplne dedične podmienený (napríklad krvné skupiny). Zvyčajne ide o znak podmienený jedným génom veľkého účinku. Naopak, u znakov ovplyvnených výrazne prostredím, sa hodnota veličiny H blíži k nule. Ak sa K_{MZ} rovná K_{DZ} je veličina H rovná nule – znak je úplne ovplyvnený negenetickými faktormi.

3.2 Genealogická metóda

Spočíva v zhotovení a analýze štandardného rodokmeňa rodiny, v ktorej sa vyskytol sledovaný znak, napr. ochorenie. Údaje sa získavajú od väčšieho počtu rodín, zvyčajne formou vopred pripraveného dotazníka. Genealogická metóda umožňuje:

- stanoviť typ dedičnosti študovaného znaku, u ktorého bola gemelologickou metódou preukázaná výrazná dedičná podmienenosť. Uskutočňuje sa to spracovaním veľkého počtu rodokmeňov rodín, kde sa tento znak vyskytuje;
- zaznamenať výskyt zreteľných znakov v konkrétnej rodine, čo sa využíva v činnosti klinických genetikov;
- pri recesívne dedičných ochoreniach identifikovať nositeľov patologickej alely (heterozygotov) alebo vysloviť tento predpoklad;
- stanoviť riziko ďalšieho výskytu ochorenia v rodine, vzhľadom na genotypy rodičov.

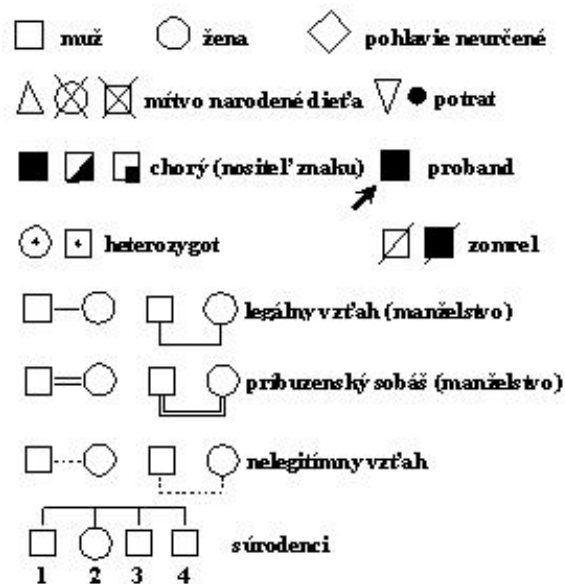
Ten člen rodiny, od ktorého sa začína genealogická analýza rodiny sa nazýva **proband**. V praxi je to obyčajne prvý jedinec, u ktorého bol znak zistený alebo jeho príbuzný. Okrem zisťovania výskytu patologických stavov a anomálií, sledujeme aj výskyt spontánnych potratov, mŕtvonarodených detí, porúch fertility, príbuzenských sobášov atď.

Údaje treba podľa možnosti získať z viacerých zdrojov a objektivizovať ich (zdravotné záznamy, matriky a pod.). Získané údaje sa používajú na zostavenie štandardného rodokmeňa použitím medzinárodne uznávaných symbolov (obr. 14), podľa nasledovných pravidiel:

- rodokmeň musí byť dostatočne rozpracovaný do šírky aj do hĺbky;
- rodokmeň má zachytiť najmenej tri generácie za sebou (označujú sa od najstaršej po najmladšiu rímskymi číslami). V súčasnosti, pri predlžovaní doby prežívania, možno objektívne posúdiť (vyšetriť) v rodine štyri generácie;
- podľa možnosti treba v každej generácii zachytiť všetkých členov (aj nelegitímnych), označujú sa arabskými číslami zľava doprava, od najstarších po najmladších;
- súčasťou genealogickej schémy je legenda, v ktorej sa uvedú závažné údaje, odchýlky v použitých symboloch a pod.

Každého člena rodiny možno identifikovať pomocou súradníc (číslo generácie / číslo poradia v generácii).

Dôraz kladený na legitimitu vzťahov je historicky tradičný a zohľadňuje možnosti získania ďalších potrebných údajov cez matriky a iné registre údajov. Z genetického hľadiska je pochopiteľne najdôležitejšie, aj keď niekedy nie ľahké, zistiť skutočných biologických rodičov, najmä otca. V súčasnosti je odborná stránka tohto problému elegantne riešiteľná identifikáciou osôb metódami analýzy DNA.



• Obr. 14. Základné symboly genealogickej schémy

3.3 Populačná genetika

Populačná genetika sa zaoberá genetickými javmi na úrovni celej populácie, prípadne jej časti, t.j. rozsiahleho súboru jedincov toho istého druhu (osôb); sleduje výskyt alel v genofonde a genotypov v populácii:

- študuje podmienky a zákonitosti vývoja genofondu;
- využíva modelovanie, t.j. vytvorenie modelovej populácie, kde sa zisťuje, nakoľko takýto model odpovedá reálnej populácii;
- má výrazné preventívne – medicínske praktické zameranie.

Populácia je súbor jedincov jedného druhu, žijúcich v reprodukčnom kolektíve, v ktorom sú členovia potenciálne schopní sa navzájom krížiť (pohlavne rozmnožovať) a majú spoločný genofond.

Genofond (génová výbava, *gene pool*) je súhrn (množina) všetkých génov (alel) jednotlivých členov určitej reprodukčnej populácie.

Gametový fond je množina všetkých alel v gamétach jedincov danej populácii. **Zygotový fond** je súbor alel v zygotách, vzniknutých v populácii. Genofond je súhrnom gametového a zygotového fondu populácie.

Faktory, ktoré spôsobujú zmenu genofondu sú charakteru:

- náhodného a uplatňujú sa v početne malých populáciách. Čím je populácia menšia, tým viac sa môže uplatniť náhoda, to znamená, že génové frekvencie v nasledujúcej generácii budú iné ako v predchádzajúcej. Ide o tzv. **génový posun** (genetický *drift*);
- zákonité faktory pôsobia vo veľkých populáciách, kde ich účinok neprekrývajú náhodné zmeny. Patria sem mutácie, selekcia a migrácia.

Mutáciám sa bude venovať samostatná časť tohto učebného textu (kapitola 7). Pre potreby populačnej genetiky sú významné dedičné mutácie, čiže tie, ktoré ich nositeľ (mutant) môže odovzdať svojim potomkom. V medicínskej praxi sa jedná najmä o tzv. alelové varianty, ktoré majú rôzny dôsledok na vlastnosti kódovaného proteínu.

Selekcia (prírodný výber) je súbor faktorov, ktoré ovplyvnia to, či sa nositeľ mutácie môže zúčastniť reprodukcie a teda či sa jeho mutácia dostane do genofondu. Negatívna selekcia (vyraďovanie nositeľa z reprodukcie pre úmrtie, závažný zdravotný stav alebo neschopnosť tvoriť zrelé gaméty) je častejšia a týka sa najmä dominantne dedičných mutácií vyvolávajúcich závažné ochorenia alebo patologické stavy. Pozitívna selekcia zvyhodňujúca nositeľa je zriedkavejšia – napr. zvýšený výskyt kosáčikovej anémie v oblastiach s výskytom malárie (nedostatok kyslíka v obehovom systéme chorých bráni rozmnožovaniu plazmódiov).

Migrácia, čiže premiestňovanie veľkých skupín obyvateľstva, má vždy dôsledky na distribúciu (výskyt) jednotlivých mutácií v lokálnych populáciách. Súčasné metodické možnosti molekulovej genetiky umožňujú spätné sledovanie migračných ciest jednotlivých národov a národností.

Populačná genetika človeka študuje:

- distribúciu genetických odlišností – mutácií a polymorfizmov v sledovanej populácii;
- rozvoj genetických odlišností pomocou selekcie, migrácie a kvantitatívnych populačných faktorov – genetický *drift*.

Podľa metodického prístupu má populačná genetika dva základné odbory – teoretická genetika populácií, ktorej základnou pracovnou metódou je konštrukcia matematických modelov a empirická genetika populácií.

Poznáme tri základné reprodukčné populácie:

- **panmixia** – dostatočne rozsiahla populácia, v ktorej dochádza k náhodnému párovaniu geneticky nepříbuzných jedincov (ich pohlavných buniek). V takejto otvorenej (bez zásadných – napr. geografických obmedzení) populácii úplne platia pravidlá náhody pri kombinácii alel a výskyte genotypov;
- **homogamia** – preferovanie sobášov a rodičovstva medzi fenotypovo podobnými jedincami (napr. u chondrodystrofikov). Tento typ populácie výrazne zvyšuje pravdepodobnosť výskytu rovnakej formy patologických fenotypov u potomkov, aké boli u rodičov;
- **inbríding** – nenáhodné párovanie geneticky príbuzných jedincov. Pri šľachtení rastlín a živočíchov patrí, okrem umelého výberu, k základným pracovným metódam. U ľudí k nim dochádza najmä v izolátoch – geografických, etnických, religióznych a ekonomických. Výrazne sa tu, v porovnaní s panmixiou, zvyšuje pravdepodobnosť narodenia jedincov, ktorí sú homozygoti (pre mutovanú alelu).

Hardyho – Weinbergov zákon, objavený autormi nezávisle v roku 1908, platí ucelene len pre panmixiu. Ak je panmiktická populácia dostatočne veľká, potom populácia nadobudne po jedinej generácii **rovnovážny stav** genotypových a alelových frekvencií. A tieto frekvencie sa udržiavajú aj v nasledujúcej generácii. Ak frekvenciu výskytu dominantnej alely označíme ako „**p**“ a frekvenciu recesívnej alely označíme ako „**q**“, potom je možné stav v genofonde označiť ako **p + q = 1**. Pravdepodobnosti výskytu genotypov v populácii vyrátame na základe zásad kombinatoriky:

$$\begin{aligned} p^2 & \text{ – frekvencia homozygotov dominantných} \\ 2pq & \text{ – frekvencia heterozygotov} \\ q^2 & \text{ – frekvencia homozygotov recesívnych} \end{aligned}$$

Inak povedané, ak sú pre daný majoritný gén lokalizovaný na autozóme, podmienujúci kvalitatívny znak iba 2 možné alely, ktorých frekvencie sú **p** a **q**, tak v dostatočne veľkej panmiktickej populácii sú frekvencie jednotlivých 3 genotypov dané koeficientom rozvinutého binómu $(p+q)^2$ čiže **p² + 2pq + q² = 1**, pričom súčet všetkých frekvencií sa rovná 1 (lebo všetkých 3 genotypov je 100 %).

Empirické poznatky a výskum ukazujú, že frekvencie genotypov, determinujúce väčšinu monogénovo podmienených znakov, sú takmer vo všetkých populáciách sveta veľmi blízke uvedenej binomickej distribúcii.

Pre udržanie Hardyho – Weinbergovej rovnováhy v populácii musia byť splnené nasledujúce podmienky:

- populácia je panmiktická;
- neprebíha selekcia;
- nevznikajú mutácie;
- nedochádza k migrácii;
- populácia má dostatočnú veľkosť.

Pre rozloženie genotypov v populácii, kde sa uplatňuje inbríding platí Bersteinov – Wrightov zákon, že v porovnaní s panmiktickou populáciou je vyššia frekvencia obidvoch typov homozygotov a nižšia frekvencia heterozygotov.

Rôzne zastúpenie genotypov v panmiktickej a inbrídnej populácii závisí nielen od pravdepodobnosti vzniku tzv. spontánnych mutácií (mutačný tlak) ale aj pravdepodobnosťou stretnutia sa mutovaných alel v zygote. Mutačný tlak je rovnaký v oboch typoch populácií, výskyt jednotlivých mutácií, prípadne DNA polymorfizmov je zistiteľný a zisťovaný. Rozdiel je v pravdepodobnosti spoločného výskytu rovnakých alel pre daný gén v zygote. U inbrídingu (u „príbuzenského kríženia“) je pravdepodobnosť výskytu homozygota (pre obmedzený počet a genetickú príbuznosť rodičov) podstatne vyššia ako v panmixii.

3.4 Cytogenetická analýza

Cytogenetika je vednou disciplínou, ktorá sa zaoberá štúdiom organizácie genetického materiálu na úrovni chromozómov (chromatínu) – ich počtu a tvaru, prípadne niektorých ich úsekov. Používa sa na diagnostikovanie numerických a štruktúrnych aberácií chromozómov u rôznych patologických stavov.

Na základe odlišného metodického prístupu možno cytogenetiku rozdeliť na:

- **klasickú** – analýza spočíva v mikroskopickom hodnotení, farbením vizualizovaného materiálu chromozómov v mitóze (vyšetrujú sa metafázové chromozómy) a v interfáze, (vyšetruje sa pohlavný heterochromatín);
- **molekulovú** – analýza je založená na identifikácii chromozómov alebo ich častí, po hybridizácii ich DNA s označenou sondou (napr. metóda FISH).

3.4.1 Klasická cytogenetika

3.4.1.1 Cytogenetická analýza v mitóze

Na vyšetrovanie sú potrebné živé bunky schopné proliferácie. Na získanie spoľahlivého výsledku je potrebné na analýzu získať kultiváciou *in vitro* dostatočný počet deliacich sa buniek. V praxi bol veľký rozvoj cytogenetickej analýzy v druhej polovici 60-tych rokov minulého storočia podmienený práve rozvojom a štandardizáciou metód kultivácie buniek *in vitro*. Zároveň bol práve v tomto období objavený účinok kolchicínu (Borisy a Taylor, 1967), ktorý inhibuje depolymerizáciu tubulínu kinetochorových mikrotubulov, čím zabráni začiatku anafázy A. Pridaním mitotického jedu kolchicínu do bunkovej kultúry sa zastaví progres mitózy v tom štádiu, v ktorom sú chromozómy najlepšie pozorovateľné – v tzv. **c-metafáze**.

Metafáza mitózy je najvhodnejšia na numerickú i štruktúrnu analýzu chromozómov, nielen preto že sú chromozómy maximálne kondenzované, ale aj z dôvodu, že sú usporiadané prakticky v jednej rovine – v **metafázovej platni** (ekvatoriálnej rovine), čo uľahčuje zhotovenie karyologického preparátu.

Príprava karyologického preparátu na analýzu metafázových chromozómov má nasledovné kroky, ktoré majú zaručiť, aby boli bez poškodenia chromozómy na podložnom sklíčku čo najlepšie rozprestreté a dali sa dobre rozpoznať a hodnotiť:

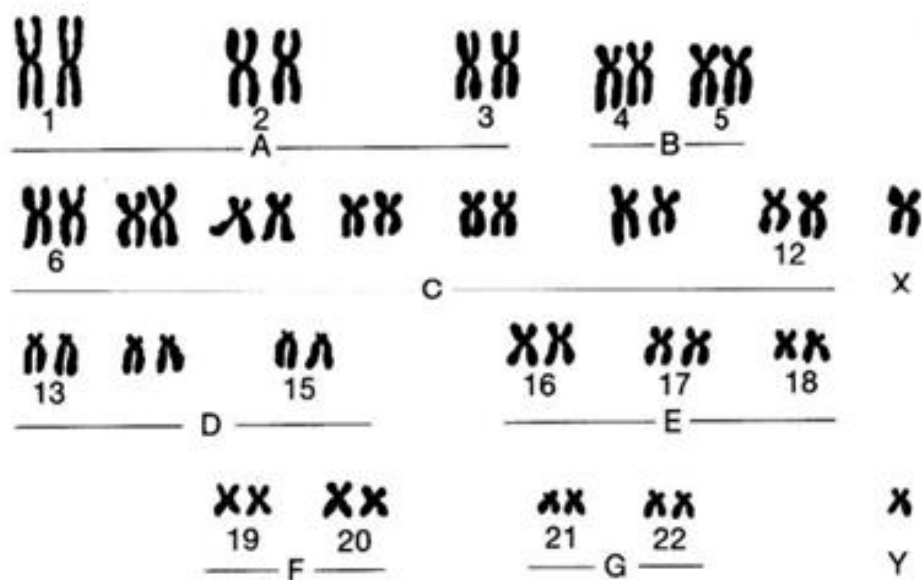
- **Trypsinizácia** – ak sú *in vitro* kultivované bunky adherované na kultivačný substrát. Pridaním 0,25 % roztoku trypsínu do kultúry sa bunky odpoja od substrátu (dna nádoby v ktorej sú kultivované) a vznikne z nich suspenzia. Proteolytický účinok trypsínu sa zruší pridaním kultivačného séra;
- **Hypotonizácia** (0,075 M roztokom KCl) spôsobí zväčšenie objemu bunky a chromozómy v metafáze sa viac od seba vzdialia;
- **Fixácia** acetalkoholom (zmes etanolu a kyseliny octovej) zabráni poškodeniu chromozómov.

Kvapnutím suspenzie takto upraveného materiálu z výšky na podchladené podložné sklíčko sa dosiahne potrebné rozprestretie chromozómov.

Takto pripravené karyologické **preparáty možno farbiť** rôznymi spôsobmi:

- **Farbenie konvenčné (difúzne)** je najstaršie. Používa sa pri ňom farbivo Giemsa (resp. Giemsa-Romanowski), ktoré má typickú afinitu ku chromatínu. Triedenie takto difúzne zafarbených chromozómov sa uskutočňuje podľa tzv. **Denverskej klasifikácie**;
- **Farbenie identifikačné** – tzv. G, Q, C, R, T pásikovacie techniky. Princíp je v tom, že po pôsobení vonkajšieho faktoru na chromozómy dôjde k zvýrazneniu heterochromatínových a euchromatínových blokov v chromozónoch a následným zafarbením sú na chromozónoch viditeľné tmavšie a svetlejšie úseky (pásiky z angličtiny „bandy“).

Po spracovaní buniek uvedeným postupom získame v mikroskope analyzovateľne usporiadané metafázové chromozómy. Ich obraz sa zachytí klasickou alebo digitálnou formou. Zostavením chromozómov do párov, podľa štandardnej klasifikácie, získame karyotyp (obr. 15).

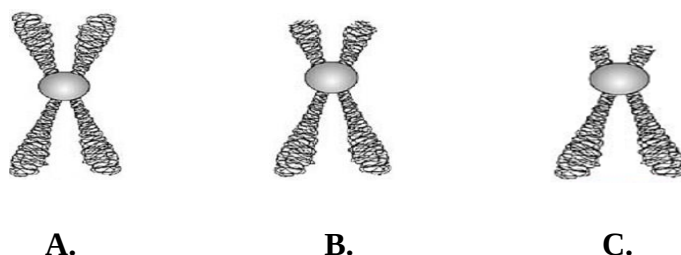


• **Obr. 15.** Normálny mužský karyotyp, chromozómy sú farbené konvenčne

Použitie farbiace techniky rozhodujú o úrovni rozlíšenia jednotlivých chromozómov a ich následnej klasifikácii.

Denverská klasifikácia – hodnotiacimi kritériami pre zaradovanie difúzne farbených chromozómov do skupín je ich relatívna veľkosť (veľké, stredné a malé) a poloha centroméry (obr. 16). U ľudí rozlišujeme chromozómy metacentrické (majú centroméru skoro v strede),

submetacentrické (majú centroméru bližšie k jednej z telomér) a akrocentrické (majú centroméru blízko k teloméru).



• **Obr. 16.** Klasifikácia chromozómov podľa uloženia centroméry (A – metacentrické, B – submetacentrické, C – akrocentrické)

Pri tejto klasifikácii môžeme hodnotiť len celkový počet chromozómov a ich počet v jednotlivých skupinách (A - G):

- skupina A – veľké metacentrické chromozómy 1 - 3;
- skupina B – veľké submetacentrické chromozómy 4 - 5;
- skupina C – stredne veľké submetacentrické chromozómy 6 - 12, do tejto skupiny zaraďujeme aj chromozóm X;
- skupina D – stredne veľké akrocentrické chromozómy 13 - 15;
- skupina E – malé metacentrické až submetacentrické chromozómy 16 - 18;
- skupina F – malé metacentrické chromozómy 19 - 20;
- skupina G – malé akrocentrické chromozómy 21 - 22 do tejto skupiny zaraďujeme aj chromozóm Y.

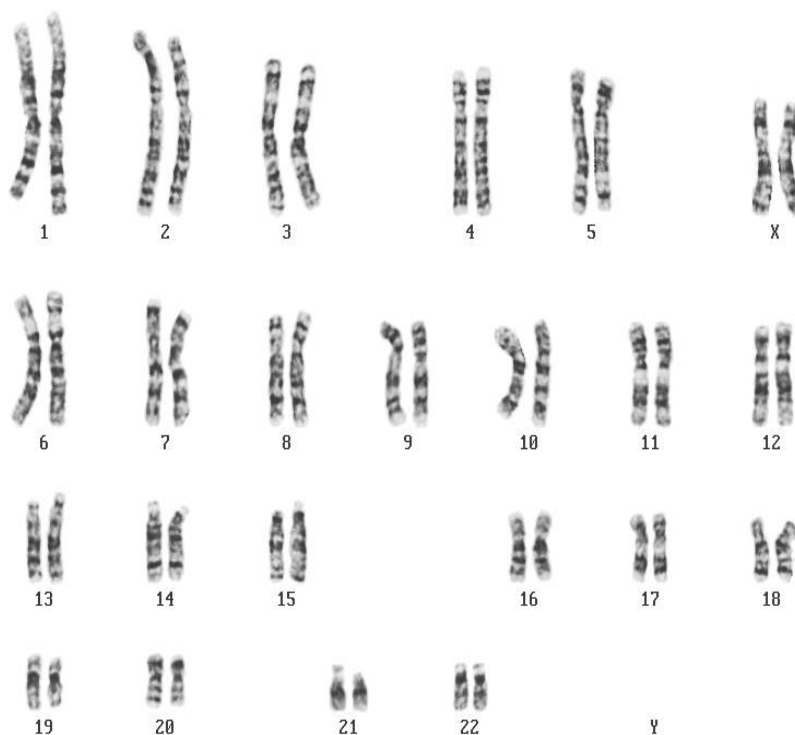
Táto metodika však neumožňuje identifikovať jednotlivé chromozómy v rámci skupín, ani menšie chromozómové prestavby. Chromozómy sú totiž pri tomto spôsobe hodnotenia farbené (Giemsovým farbivom) homogénne – hovoríme o konvenčnom homogénnom, difúznom farbení chromozómov.

Parížska klasifikácia (podľa miesta prvej konferencie v r. 1979) umožňuje nielen presné určenie (identifikáciu, opis) jednotlivých chromozómov 1 - 22, X, Y, ale aj detekciu štruktúrnych aberácií chromozómov. Je to možné vďaka použitiu mikroskopu a identifikačných farbiacich techník, ktorými dosiahneme **pásikovanie** chromozómov. Vzniknuté pásiky sú pre každý chromozóm typické, počtom aj umiestnením a vyplývajú z jeho konkrétnej euchromatínovej a heterochromatínovej štruktúry. Najčastejšie používanými identifikačnými metodikami sú G–, Q–, R– a C– pásikovanie (prúžkovanie, bandovanie). Ešte detailnejšiu analýzu umožňuje tzv. technika vysokého rozlíšenia (**high resolution technique – HR**) u prometafázových až profázových, čiže málo kondenzovaných chromozómov. Zatiaľ čo v metafázovom karyotype je možné rozlíšiť asi 400 pásikov, pri použití HR ich počet stúpne na 800 – 1 400.

Q–band bol prvou metodikou, ktorá umožnila vytvorenie pásikov. Princíp je v tom, že fluoreskujúca látka (*quinacrine mustard*) sa špecificky viaže k heterochromatínovým úsekom chromozómov a tým na nich v ultrafialovom svetle fluorescenčného mikroskopu vznikajú intenzívnejšie fluoreskujúce pásiky tzv. Q–bandy. Menej intenzívne sa zobrazujú euchromatínové úseky. Problémami boli nutnosť pracovať v tmavej komore a používať žiarivky emitujúce UV svetlo, ako aj spontánne vyžiarovanie fluorochrómov, čo znemožňovalo dlhodobú archiváciu preparátov.

G–band je najčastejšie používaná identifikačná farbiaca metodika, pri ktorej sa bielkoviny chromozómov pred farbením čiastočne natrávia proteolytickým enzýmom (napr. trypsínom) alebo sa vyššou teplotou mierne denaturujú a následne farbja Giemsovým farbivom. Vzniknuté pásiky tzv. G–bandy korešpondujú s Q–pásikmi a reprezentujú striedanie kondenzovaných heterochromatínových (tmavých) a euchromatínových (svetlých) pásikov

(obr. 17). Výhodami sú nielen možnosť analýzy v bežných svetelných mikroskopoch, ale aj jednoduchá a dlhodobá archivácia karyologických preparátov.

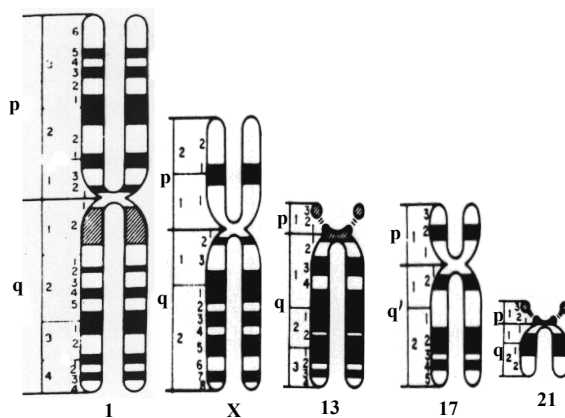


• **Obr. 17.** Normálny ženský karyotyp – 46,XX (G-band)

R-band je metodika, pri ktorej dostaneme pružky opačného charakteru z anglického „reverse“ po inkubácii chromozómových preparátov pri vysokej teplote okolo 90° C. Využíva sa na hlbšiu analýzu prítomnosti a zloženia tých pásov, ktoré sú v Q- a G-pásikovaní „bledé“.

C-band je metodika, ktorá umožňuje znázornenie blokov konštitutívneho heterochromatínu v centromerickej oblasti všetkých chromozómov, v pericentromerickej oblasti chromozómov 1, 9, 16 a Yq (C-pásiky), čo sa v praxi využíva, najmä v prenatalnej diagnostike. Napríklad pri odlíšení autozómov 21 (22) od chromozómu Y, pri diferenciálnej diagnostike trizómie a Klinefelterovho syndrómu.

Parížska klasifikácia hodnotí počet, veľkosť a polohu pásov na krátkych (**p**) a dlhých (**q**) ramienkach každého chromozómu (obr. 18). Každé ramienko obsahuje 1 až 6 oblastí a v každej z nich určitý (štandardný) počet pásov. Číslovať sa začína od centroméry smerom k terminálnemu úseku chromozómu (teloméru).



• **Obr. 18.** Schéma Parížskej klasifikácie

Na označenie konkrétneho pásiku na chromozóme treba uviesť číslo chromozómu, symbol pre ramienko, číslo príslušnej oblasti a číslo vlastného pásiku. Všetko sa píše za sebou bez medzery a bez interpunkcie (napr. 1q24 znamená chromozóm č. 1, dlhé ramienko, oblasť 2, pásik 4). Pri metodike HR dochádza k rozčleneniu pôvodne jedného pásiku na niekoľko ďalších subbandov. Jednotlivé subbandy sa označujú rozšírením zápisu za bodkou, napr. 1q24.12.

3.4.1.2 Cytogenetická analýza v interfáze

Prvou metódou, ktorá umožňovala identifikáciu pohlavných chromozómov v nedeliacich sa interfázových bunkách, bola analýza pohlavného chromatinu v pohlavných chromozómoch X a Y. Začiatkom 70-tych rokov išlo o revolučnú metodiku, ktorá našla využitie pri testovaní chromozómového pohlavia u športovcov a pri orientačnom vyšetrení pacientov s podozrením na chromozómovú aberáciu niektorého z pohlavných chromozómov (gonozómov). Bola založená na detekcii špecifického chromatinu v interfázových jadrách.

Podľa klasickej cytogenetiky pozostávajú chromozómy z euchromatinu a heterochromatinu.

Heterochromatín predstavuje silne kondenzovanú oblasť chromozómu „chudobnú“ na gény (geneticky nemú). Podľa umiestnenia a mechanizmu vzniku rozoznávame dva typy heterochromatinu:

- **konštitutívny** – prítomný vo všetkých bunkách jedinca a vo všetkých štádiách jeho vývoja. Nachádza sa v oblastiach centromér všetkých chromozómov. Okrem toho tvorí veľké heterochromatínové bloky v pericentromerickkej oblasti dlhých ramien chromozómov 1, 9, 16 a veľkú časť dlhých ramien chromozómu Y (Yq);
- **fakultatívny** – závisí od typu bunky a od jej vývinového štádia. Príkladom je heterochromatín X u žien, ktorý vzniká inaktíváciou jedného chromozómu X v najvčasnejšom štádiu embryogenézy medzi 9. a 12. dňom vývoja – kondenzáciou a masívnou metyláciou jedného z dvojice chromozómov X (vrátane jeho euchromatínových oblastí). Tým sa genetická informácia umiestnená na tomto chromozóme stáva nedostupnou. Podľa Lyonovej teórie ide o mechanizmus zabezpečujúci **kompenzáciu efektu génovej dávky** – u žien zostáva aktívny len jeden X chromozóm, tak ako je to u mužov.

Lyonovej teória – hovorí o „**kompenzácii efektu génovej dávky**“. V ľudských somatických bunkách je celý aktívny len jeden X chromozóm. Druhý chromozóm X u ženy je čiastočne kondenzovaný a inaktívny (v interfázových bunkách tvorí pohlavný chromatín X). V každej jednotlivéj bunke embrya je inaktívovaný buď chromozóm X od matky alebo od otca – náhodne, pričom inaktívácia je v ďalšom vývoji pre daný bunkový klon stabilná a trvalá (okrem oogónií).

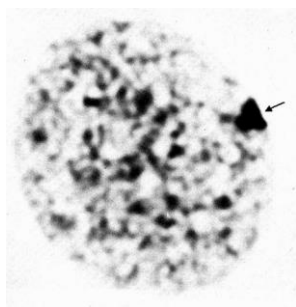
Žena je teda **fyziologická mozaika** pre X chromozóm, pretože má štatisticky v polovici somatických buniek „na plno“ aktívny X chromozóm od otca a v druhej polovici od matky. Táto skutočnosť vysvetľuje prítomnosť fenotypických prejavov u prenášačiek X viazaných recesívnych ochorení – nastávajú, ak sú v cieľovom tkanive náhodne v prevahe bunky, ktoré majú aktívny X chromozóm s patologickou alelou.

Inaktívácia chromozómu X **nie je úplná** – nie je inaktívovaný celý chromozóm.. Príkladom je aj gén *XIC* (centrum inaktívácie X chromozómu, lokalizovaný na tom X chromozóme, inaktíváciu, ktorého riadi), produkt ktorého – *XIST* (inaktívny špecifický transkript) riadi inaktíváciu X chromozómu metyláciou GC dinukleotidov.

Princíp je totiž v tom, že na X a Y chromozóme existujú úseky s tzv. **pseudoautozómovými** génmi, ktoré sa za normálnych okolností prejavujú bielelicky, teda na každom z gonozómov je po jednej alele. Nazýva sa to (tradične) ako „homologické úseky“ heterochromozómov. Toto vysvetľuje fenotypové prejavy u žien s nadpočetným chromozómom X a pri monozómii X, kde chýba druhá alela pre pseudoautozómové gény.

Inaktivovaný chromozóm X (pohlavný heterochromatín X) je v interfázových bunkách viditeľný ako tzv. **Barrovo teliesko**, umiestnené na vnútornej stene jadrovej membrány (obr. 19). Počet X chromozómov je $n + 1$ (n = počet Barrových teliesok), čo umožňuje určiť počet X chromozómov vo vyšetrovanej bunke.

Podobne môžeme v interfázovom jadre dokázať aj Y chromozóm ako v UV svetle jasne svietiaci bod, tzv. F teliesko (obr. 20). Metóda je založená na silnej afinite a interkalácii fluorescenčného farbiva (chinakrín) do heterochomatinového bloku na jeho dlhých ramenách Yq.

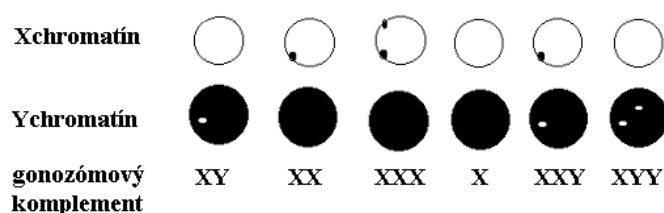


• Obr. 19. Barrovo teliesko (označené šípkou)



• Obr. 20. F teliesko

Súčasným vyšetrením X a Y chromatínu teda získame obraz o gonozómovom komplemente vyšetovaných buniek (obr. 21). Pre presnú diagnostiku a na vylúčenie štrukturálnych aberácií týchto chromozómov (iXq, iYq, delYq) je však nutné vyšetrenie metafázových chromozómov.



• Obr. 21. Schéma vyšetrenia X a Ychromatínu

3.4.2 Molekulová cytogenetika

Molekulová cytogenetika je založená na **hybridizácii sondy** (označenej jednovláknovej molekuly DNA o známej sekvencii nukleotidov) s k nej komplementárnym úsekom v denaturovanej analyzovanej DNA *in situ*, čiže na sklíčku priamo v jadre alebo v karyologickom preparáte. Pri **ISH** (*in situ hybridizácia*) sa používajú rádioaktívne označené sondy. Pri **FISH** (*fluorescenčná in situ hybridizácia*) sondy označené fluorescenčným farbivom tzv. fluorochrómom. Metóda FISH je prepojením molekulovej genetiky a cytogenetiky. Jej princípom je komplementárne spojenie fluorescenčne značenej sondy a určitého cieľového úseku DNA v chromozómoch, v intaktnom, teda nehomogenizovanom materiáli. Metódu možno aplikovať na chromozómy v metafáze, ale aj na sledovanie jadier v interfáze. FISH sa osvedčila aj na vyšetrenie čerstvého materiálu – napr. odtlačky z biopsií (jadrá) alebo kultivované bunky s mitotickými figúrami. Metóda FISH je založená na afinite molekúl použitých na označenie úspešne hybridizovanej sondy s analyzovaným (vyšetrovaným) úsekom. Najčastejšie sa používa mimoriadna afinita biotínu (vitamínu B7, resp. vitamín H) a streptavidínu, ktoré sú schopné sa rozpoznať a naviazať sa aj pri zriedení 1 : 1 000 000. Biotín

je pripojený na sondu a na streptavidín je naviazaná tzv. reportérová skupina, čiže fluorochróm. Po úspešnej hybridizácii sondy, je možné fluorescenčným mikroskopom identifikovať jej prítomnosť a polohu biotínu s fluorochrómom. Toto usporiadanie umožňuje, že sa sonda môže bezchybne naviazať na komplementárny úsek (nie je obmedzovaná veľkosťou molekuly fluorochrómu). Použitím rôznych sond a fluorochrómov emitujúcich rôzne farby, možno v tom istom jadre označiť viacero rôznych cieľových sekvencií.

Napríklad pri prenatálnej genetickej diagnostike, použitím sond identifikujúcich chromozómy 13, 18, 21, X a Y sa dajú v bunkách plodovej vody (amniocyty) odhaliť najčastejšie sa vyskytujúce aneuploidie. FISH sa využíva nielen pri analýze karyotypu v klinickej diagnostike a monitorovaní chorôb, ale aj pri génovom mapovaní, pri štúdiu organizácie chromatinu, replikácie, transkripcie, rekombinácie a reparácie DNA.

Veľkou výhodou FISH a jej modifikácií, v porovnaní s klasickými cytogenetickými metodikami, je možnosť ich použitia aj v interfáze, čím odpadá zdĺhavý proces kultivácie buniek. Nedoceneniteľnou výhodou je možnosť analýzy aj archívneho materiálu. Aby bolo možné aplikovať FISH vyšetrenie v praxi, je najprv metódami klasickej genetiky vhodné odhadnúť typ prestavby a jej lokalizáciu v rámci genómu a podľa toho použiť konkrétnu sondu špecifickú pre konkrétny typ aberácie.

3.4.2.1 Typy sond pre FISH

Pomocou FISH sond môžeme jednoznačne charakterizovať a zatriediť každý ľudský chromozóm do karyotypu, odhaľovať chromozómové aberácie a z nich vyplývajúce genetické choroby, ako aj mapovať pozície jednotlivých génov na chromozóme. Používajú sa aj na diagnostiku chromozómových zmien pri rôznych onkologických ochoreniach.

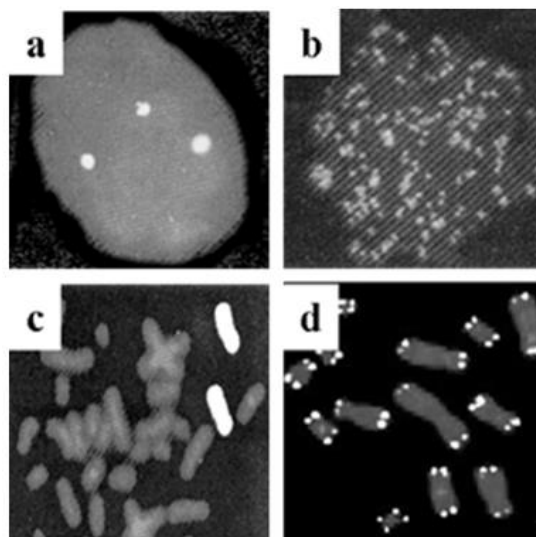
Podľa cieľovej sekvencie rozdeľujeme FISH sondy do štyroch skupín:

Centromerické (satelitné) – hybridizujú s oblasťami satelitných sekvencií centroméry, ktoré sú pre každý chromozóm unikátne. Využívajú sa najmä v prenatálnej a predimplantačnej diagnostike, napr. pri zisťovaní počtu určitého chromozómu (u aneuploidií sú namiesto dvoch signálov – jeden, tri alebo viac) a pôvodu neznámeho chromozómu (obr. 22a).

Génové (lokusovo špecifické – minilokusové) – hybridizujú s unikátnymi sekvenciami DNA. Využívajú sa najmä na zisťovanie amplifikácie alel určitého génu (napr. onkogénov), hľadanie translokácií a mikrodélcií (napr. u malignít a mikrodelených syndrómov) (obr. 22b).

Celochromozómové (paintingové) – hybridizujú s celým konkrétnym chromozómom alebo s jeho významnou časťou. Používajú sa napríklad na diagnostiku chromozómových prestavieb a na pri diagnostike aneuploidií – v mitotických figúrach (obr. 22 c).

Telomerické – využívajú sa pre určenie počtu koncových úsekov chromozómov tzv. telomér, u človeka TTAGGG (obr. 22d).



• Obr. 22. Typy sond pre FISH – a. Trizómia 21 (FISH – centromerická sonda); b. mnohonásobná amplifikácia c-myc onkogénu; c. chromozómy č. 8.; d. teloméry

3.4.2.2 Modifikácie FISH

Multifarebná FISH (*multicolour – mFISH*) umožňuje kombináciou piatich rôzne označených sond fluorochrómov (*FITC*, *Rhodamin*, *TexasRed*, *Cy5*, *Cy5.5*) farebne odlišiť každý jeden chromozóm, ako aj diskretné štruktúrne prestavby chromozómov. Kombináciou fluorochrómov môžeme získať až 31 farieb. Je to technicky náročná digitálna zobrazovacia technika. Na vyhodnotenie je potrebná obzvlášť citlivá kamera a výkonný počítač so softvérom. Výsledná farba pre konkrétny chromozóm sa získa **snímaním jednotlivých farieb** pod 6 príslušnými filtermi a zlúčením obrazov. Multifarebnú FISH sa nedá použiť pri bunkách v interfáze, pretože chromozómy sú dešpiralizované.

Spektrálna karyotypizácia (*spectral karyotyping – SKY*). Je to technika podobná mFISH a bola prvý krát použitá na identifikáciu chromozómu 5 v roku 1999. Rozdiel medzi týmito dvomi technikami je v technike získania konečného obrazu. Princípom SKY je meranie emisných spektier jednotlivých špecifických sond, ktoré sa viažu na testované chromozómy. Sondy sú značené štyrmi fluorescenčnými farbami, ktoré dokážu v konečnom dôsledku spektrálne odlišiť všetky chromozómy. Na vyhodnotenie výsledkov sa používa CCD kamera, snímame pomocou Fourierovho spektroskopu (pri spracovaní signálov slúži na transformáciu z časovej oblasti, do oblasti frekvenčnej) a sú použité len dva filtre. Výsledný **obraz sa sníma naraz** – nie po jednotlivých farbách ako pri mFISH a každému chromozómu je priradená akási „pseudofarba“. Použitím tejto metódy je možná detekcia väčších interchromozomálnych prestavieb. Uplatňuje sa hlavne v onkocytogenetike pri spracovávaní komplexných karyotypov pochádzajúcich z nádorových buniek a v prenatálnej a postnatálnej diagnostike pri detekcii balansovaných a nebalansovaných translokácií.

Multifarebné pásikovanie (*multicolour – mBanding*) spája farebnú vizualizáciu chromozómov s ich klasickým pásikovaním. Ide o súčasnú hybridizáciu zmesou krátkych prekrývajúcich sa sond značených piatimi fluorochrómmi, čo umožňuje rozlíšenie cieľových sekvencií na chromozóme. Na vizualizáciu je potrebné podobné technické vybavenie ako v prípade mFISH, výsledkom je farebné pásikovanie špecifické pre jednotlivé chromozómy, čo umožňuje podrobnú analýzu translokácií, delécií, inzercií, inverzií a komplexných zmien, vrátane intrachromozómových aberácií.

Komparatívna genomická hybridizácia (*comparative genomic hybridization – CGH*) prispela k analýze chromozómových zmien pri onkologických ochoreniach, táto metóda bola zavedená v roku 1992. Umožňuje celogenomový skríning nebalansovaných zmien nad 10 - 20 Mb, rýchlu detekciu a mapovanie zmien v počte kópií konkrétnych úsekov DNA. Ide o

kvantitatívne vyhodnotenie signálov rôzne označenej DNA, a to z normálneho tkaniva (referenčná DNA - označená červenou) a z tkaniva nádoru (testovaná DNA - označená zelenou), ktoré sa nechajú hybridizovať. Na základe rozdielnej fluorescence, vyhodnotenej počítačom, možno odhaliť malé zmeny v množstve DNA vo vyšetrovanom tkanive, t.j. stratu alebo zisk krátkeho úseku DNA. Pomocou fluorescenčného mikroskopu s tromi excitačnými filtrami (DAPI-FITC-rodamin) sa vyhľadávajú kvalitné mitózy, ktoré sa nasnímajú CCD-kamerou. Počítačový program vyhodnotí intenzitu zelenej a červenej fluorescence v jednotlivých úsekoch chromozómov. Pri normálnych nálezoch by mal byť pomer medzi intenzitou zeleného a červeného signálu 1. V prípade, že je pomer vyšší než 1,2 ide o amplifikáciu úseku, ak je pod 0,8 o deléciu úseku. Nemožno však odhaliť štruktúrne prestavby chromozómov (reciproké translokácie, inverzie), pretože nemenia počet kópií v genóme.

Čipová technológia (microarray CGH) je podrobne spomínaná v kapitole 1.9, tak si iba zopakujeme, že namiesto metafázických chromozómov sa využívajú unikátne jednovláknové DNA sondy, ktoré sú fixované na DNA čipe. Týchto sond je naraz použitých veľmi veľa. K čipom sa pridá značená analyzovaná DNA, ktorá na určitých miestach v čipe hybridizuje (niektoré jednovláknové sondy ukotvené v čipe sa spoja s jednovláknovou analyzovanou DNA na základe komplementarity). Po excitácii laserom vzniká svetlo určitej vlnovej dĺžky. Vyhodnocuje sa prítomnosť a aj množstvo značky. Využitie je v analýze génovej expresie, analýze bodových mutácií a polymorfizmov typu SNP, delécií a amplifikácií úsekov chromozómov ako pri CGH. Táto technika v posledných rokoch výrazne prispela k identifikácii molekulárnej podstaty množstva geneticky podmienených chorôb, nedokáže však identifikovať balansované prestavby. Medzi výhody metódy patrí jej robustnosť, automatizácia, reprodukovateľnosť a precíznosť. Metóda čipov je rýchlejšia ako cytogenetické metódy, pretože nie je potrebné kultivovať bunky a stačí len malé množstvo analyzovanej DNA.

Doplňujúca študijná literatúra

ALBERTS, B. – BRAY, D. – JOHNSON, A. – LEWIS, J. – RAFF, M. – ROBERTS, K. – WALTER, P.: Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. 2. vydanie. Ústí nad Labem: Espero Publishing 2005, 740 s.

BÖHMER, D. – DANIŠOVIČ, Ľ. – REPISKÁ, V.: Lekárska biológia a genetika 1. Druhé doplnené vydanie. Bratislava: Univerzita Komenského 2020, 102 s.

GBELCOVÁ, H. – REPISKÁ, V. – SHAWKATOVÁ, I.: Nukleové kyseliny a proteíny. Analytické metódy a postupy. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave 2017, 316 s.

4 MONOGÉNOVO PODMIENENÉ NORMÁLNE A PATOLOGICKÉ ZNAKY AUTOZÓMOVO DEDIČNÉ

Monogénovo dedičnými nazývame znaky, pri ktorých sú jednotlivé fenotypy podmienené génmi v jednom lokuse. Podľa umiestnenia lokusu na chromozóme rozlišujeme dedičnosť autozómovú alebo gonozómovú, ktorá môže byť podľa charakteru zodpovednej alely dominantná (s úplnou dominanciou, kodominantná, intermediárna) a recesívna.

Podstatou monogénovo podmienených patologických stavov je mutácia na úrovni génu (bodová mutácia), ktorá zapríčiňuje odchýlku v syntéze príslušného polypeptidového reťazca. Podľa funkcie génového produktu (zmenenej bielkoviny) vznikajú defekty rôzneho charakteru.

4.1 Základné pojmy používané v monogénovej dedičnosti

Alela je konkrétna forma génu (verzia genetickej informácie) v lokuse jedného z chromozómov.

Distribúcia znaku je opis (charakteristika) jeho výskytu v populácii. Kvantitatívne znaky (napr. telesná výška) majú spojitú (kontinuálnu) distribúciu, teda vyskytujú sa v na sebe nadväzujúcich formách a graficky ich možno zobraziť ako Gaussovu (binomickú) krivku. Kvalitatívne znaky majú nespojitú (diskontinuálnu) distribúciu. Monogénovo podmienené kvalitatívne znaky (napr. krvné skupiny) sa vyskytujú v jasne odlišiteľných formách, vyjadriteľné napr. stĺpcovým diagramom. Multifaktorálne podmienené kvalitatívne znaky majú výskyt s tzv. prahovým efektom (prah je forma znaku, ktorú už považujeme za patologickú).

Expresia génu je syntéza bielkoviny kódovanej génom. Miera expresie označuje to, ako rýchlo a koľko génom kódovaných bielkovín sa nasyntetizuje. Je to regulovaný proces: riadením prístupu ku génu, rýchlosťou transkripcie (enhancery a silencers), efektívnosťou translácie (elongačné faktory) a počtom ribozómov, na ktorých za sebou možno použiť tú istú mRNA (závisí od dĺžky polyA chvostika na konci mRNA).

Expresivita je stupeň prejavu vloh (klinický nález – ľahký, stredne ťažký a ťažký). Variabilná expresivita je variabilita závažnosti fenotypu (prejavov) u nositeľov rovnakého patologického génu (alely).

Epigenetické faktory sú vplyvy pôsobiace na prejav znaku podmieneného génom. Na expresiu majoritných génov majú vplyv len výnimočne (napr. účinok hormónov u tzv. pohlavím ovplyvnených znakov, ako je predčasná plešatosť). Na expresiu minoritných génov majú zásadný vplyv.

Fenotyp je pojem, ktorý sa používa nielen na označenie súboru všetkých znakov organizmu, ale aj na opis konkrétnej formy jedného znaku.

Genotyp je súbor všetkých génov (alel) živého organizmu. Zároveň sa tento pojem používa aj na označenie konkrétnej kombinácie alel, ktoré podmieňujú sledovaný znak. **Genóm** sa zvyčajne zhoduje s genotypom, ale sú aj odlišnosti – napr. v súvislosti s inaktívaciou chromozómu X, kedy v genotype sú u ženy obidva chromozómy X, ale v jednej bunke je aktívny len jeden gonozóm X.

Homozygot je jedinec, ktorý má pre konkrétny gén obidve alely rovnaké. Ak sú obidve alely dominantné ide o dominantného homozygota, ak sú recesívne ide o homozygota recesívneho.

Hemizygot je jedinec, ktorý má pre konkrétny gén len jednu alelu. Za normálnych okolností ide o alely v heterologickej oblasti chromozómu X u muža.

Heterozygot je jedinec, ktorý má pre konkrétny gén dve rôzne alely (dominantnú aj recesívnu). Zložený heterozygot je jedinec, ktorý má pre konkrétny gén dve rôzne alely, pričom každá z nich má mutáciu na inom mieste a kóduje odlišný izoproteín.

Heritabilita je podiel genetickej zložky na celkovom fenotype. Označuje sa aj koeficient dedivosti a vyjadruje vzájomný vzťah medzi dedičnou a nededičnou zložkou premenlivosti.

Intermediarita znamená, že sa na tvorbe znaku u heterozygota zúčastňujú obidve alely rovnakou mierou, pričom vo fenotype vzniká iba jeden znak (napr. ružová farba kvetov).

Izoproteín je variant normálneho proteínu, ktorý je dôsledkom mutácie génu. Tým síce dôjde k zmene primárnej štruktúry proteínu, ale zachová sa jeho funkčnosť (aspoň čiastočne). Alely, ktoré kódujú izoproteíny nazývame alelové varianty.

Kodominancia je stav, kedy sa na tvorbe znaku zúčastňujú dve rôzne alely v lokuse, nezávisle jedna od druhej, pričom vznikajú dva fenotypové prejavy (napr. krvná skupina AB).

Lokus je konkrétne miesto uloženia génu na chromozóme. Na jednom mieste chromozómu sa môže nachádzať vždy len jedna alela určitého génu. Lokusy rôznych génov sú vždy uložené lineárne, teda za sebou. Zvyčajne jeden lokus obsahuje jeden štruktúrny gén kódujúci jeden proteín. Sú ale aj výnimky, napr. lokus pre Rh faktor, ktorý obsahuje tri štruktúrne gény – C, D a E.

Majoritný gén má určujúci vplyv na fenotypový prejav (formu) kvalitatívneho znaku (napr. krvnej skupiny). Vo väčšine prípadov nedochádza k vplyvu epigenetických faktorov na formu znaku. Mutácia majoritného génu môže zmeniť formu znaku. Pôsobia buď jednotlivo (tzv. monogénová dedičnosť) alebo niekoľko takýchto génov zároveň (tzv. polygénna dedičnosť – napr. dva gény pri dedičnosti farby dúhovky alebo tri pri dedičnosti pigmentácie pokožky).

Minoritný gén nemá určujúci vplyv na formovanie znaku. Tieto gény tvoria skupiny, v ktorých sa v zložitých vzájomných kombináciách (tzv. aditívny efekt), počas dlhého obdobia a za silného vplyvu epigenetických faktorov spolupodieľajú na formovaní kvantitatívnych znakov (napr. telesná výška).

Monogénová dedičnosť (anglicky *single gene inheritance*) znamená, že znak je podmienený jedným majoritným génom. Ak má lokus na autozóme – má dve alely. Ak je lokus v heterologickej časti chromozómu X alebo Y má aktívnu jednu alelu, ak je v homologickej časti, má aktívne alely dve (tzv. pseudoautozómové gény).

Multifaktoriálne podmienené znaky sa nazývajú aj komplexné znaky. Majú genetickú zložku z minoritných génov (tzv. predispozícia) a na ich formu závažne vplývajú aj epigenetické faktory. Kvantitatívne znaky tohto typu – napr. telesná výška, majú kontinuálnu (súvislú) distribúciu vyjadrovanú Gaussovou krivkou. Typ distribúcie sa nemení ale krivka sa môže „pohybovať“ po ose X v závislosti od aritmetického priemeru danej veličiny. Normálne formy takéhoto znaku sú vymedzené extrémami. Kvalitatívne multifaktoriálne podmienené znaky sú charakterizované „prahom“, teda formou znaku, ktorú už považujeme za patologickú. Tak normálne ako aj patologické formy znaku majú svoju distribúciu (výskyt v populácii). Vo všeobecnosti možno povedať, že čím je patológia závažnejšia, tým menej často sa vyskytuje.

Mutácie na úrovni DNA sa označujú aj bodové mutácie. Vplyv takejto mutácie na fenotyp závisí od typu a rozsahu mutácie, ale hlavne od jej polohy. Ak mutácia vyradí promótor, transkripcia sa nemôže uskutočniť a bielkovina sa nevyrába. Ak mutácia zmení miesto v gène obsahujúce kód pre „aktívne centrum“ proteínu – bielkovina sa síce syntetizuje, ale je nefunkčná.

Chromozómové mutácie sa v klinickej genetike nazývajú štruktúrne aberácie chromozómov. Sú rozsahom väčšie ako mutácie génové, pretože sú to zmeny v počte alebo poradí génov v nich, ktoré sa môžu prejaviť v tvare a štruktúre chromozómov. Na ich detekciu je možné použiť molekulárne cytogenetické metódy, ale hlavne mikroskopickú analýzu.

Neúplná dominancia je stav, kedy sa na tvorbe jedného znaku u heterozygota zúčastňujú obidve alely (dominantná aj recesívna). Ideálnou formou neúplnej dominancie je intermediarita, kedy sa alely na forme znaku podieľajú rovnakou mierou.

Penetrancia je frekvencia (v %) prejavu fenotypu u nositeľov určitého (rovnakého) genotypu. Úplne penetrantný gén sa prejaví u všetkých jedincov, ktorí majú tento genotyp. Neúplne penetrantný gén sa prejaví len u časti jeho nositeľov.

Polygénna dedičnosť je determinovaná veľkým počtom génov, ktorých aditívny efekt sa v hlavnej miere podieľa na ich fenotypovom prejave.

Úplná dominancia je stav, kedy u heterozygota dominantná alela úplne potlačí fenotypový prejav recesívnej alely. Na vytvorenie dominantnej formy znaku postačuje jedna alela. U tohto typu dedičnosti nie je možné, podľa formy znaku (fenotypu), odlíšiť dominantného homozygota od heterozygota.

Znak je štruktúrna alebo funkčná charakteristika organizmu, ktorú môžeme presne špecifikovať tak, že vieme sledovať jej prenos z rodičov na potomkov. Môže ísť o kvalitatívny alebo kvantitatívny znak, ktorý je výsledkom vplyvu genotypu alebo genetických a epigenetických faktorov.

4.2 Autozómovo dominantná dedičnosť

Pri tomto type dedičnosti sa lokus pre znak nachádza na niektorom z autozómov. Znak sa vyskytuje rovnako často u mužov aj u žien. Na vytvorenie znaku stačí jedna dominantná alela, čiže vyskytuje sa nielen u dominantných homozygotov ale aj u heterozygotov. Ak sú rodičia heterozygoti, pravdepodobnosť, že potomstvo bude mať dominantnú formu znaku je 75 %. V rodine sa vyskytuje veľmi často a v každej generácii (tzv. vertikálny prenos genetickej informácie). Pohlavie rodiča nemá vplyv na prenos znaku na potomkov. Prenos z otca na syna je možný. Ak jedinec nemá dominantnú formu znaku je recesívny homozygot. Ak sú obaja rodičia nositeľmi recesívnej formy znaku u ich potomka sa môže vyskytnúť dominantná forma znaku len ako dôsledok mutácie *de novo*.

4.2.1 Normálne znaky autozómovo dominantne dedičné

Poznáme 25 typov rôznych antigénov na povrchu erytrocytov (tzv. krvných skupín) a každý z nich má jednoduchý typ dedičnosti. Medzi najznámejšie normálne znaky s týmto typom dedičnosti patria krvné skupiny (AB0 a Rh systém). AB0 krvné skupiny sú určené prítomnosťou antigénov (aglutinogénov) na povrchu červených krviniek. Vlastnou antigénovou determinantou je oligosacharidový základ. Systém AB0 je najstarším známym krvným systémom. V sére ľudí s krvnými skupinami A, B a 0 sa nachádzajú reaktívne bielkoviny („prirodzené protilátky“) – aglutiníny (tab. 3).

Sérum jedincov s krvnou skupinou A aj B možno použiť ako diagnostické, pre určenie krvnej skupiny vyšetrovanej osoby. Ide o hemaglutináciu, čiže zhľukovanie červených krviniek vyšetrovanej osoby v kvapke séra, obsahujúcej jeden z aglutinínov.

• **Tab. 3.** Aglutinogény a aglutiníny v systéme AB0

Krvná skupina	Aglutinogén	Aglutinín
A	A	anti B
B	B	anti A
AB	A aj B	žiadny
0	žiadny	anti A aj anti B

V AB0 systéme sú 3 alely (A, B, 0), čo nazývame tzv. multialelizmus). Alely A a B sú navzájom kodominantné a obidve sú dominantné nad alelou 0. Z toho vyplýva, že je možných 6 kombinácií párov alel. Ich kombináciou vznikajú 4 možné fenotypy (tab. 4).

• **Tab. 4.** Fenotypy a genotypy v systéme AB0

Fenotyp krvných skupín	Genotyp krvných skupín
A	AA, A0
B	BB, B0
AB	AB
0	00

Vzhľadom na možnosť heterozygotného usporiadania pri krvnej skupine A a B (A0, B0) nevieme z vyšetrovania týchto skupín určiť ich genotyp. Preto pri výpočte pravdepodobnosti krvných skupín u potomka musíme predpokladať obidve možnosti.

Charakteristické pre **Rh systém (faktor)** je, že nemá aglutiníny. Rh pozitívny (Rh+) človek má na červených krvinkách antigén a Rh negatívny (Rh-) tento antigén nemá. Dedí sa autozómovo dominantne, 85 % jedincov našej populácie je Rh+. Gén pre Rh faktor sa nachádza na 1. chromozóme a stačí jedna alela Rh+ (heterozygot), aby bol jedinec Rh pozitívny (tab. 5). Rh negatívny človek je recesívny homozygot.

• **Tab. 5.** Dedičnosť Rh faktoru

Fenotyp	Genotyp
Rh pozitívny	Rh+ Rh+, Rh+ Rh-
Rh negatívny	Rh- Rh-

Fisherova teória predpokladá, že Rh faktor je podmienený 3 alelami (C, D, E), pričom určujúca alela je alela D (tab. 6). Sérologicky sa dajú dokázať antigény, kódované alelami D, C, c, E, e na príslušných lokusoch. Antigénový produkt alely d nebol dokázaný (recesívna stratová alela).

• **Tab. 6.** Dedičnosť Rh faktoru – Fisherova teória

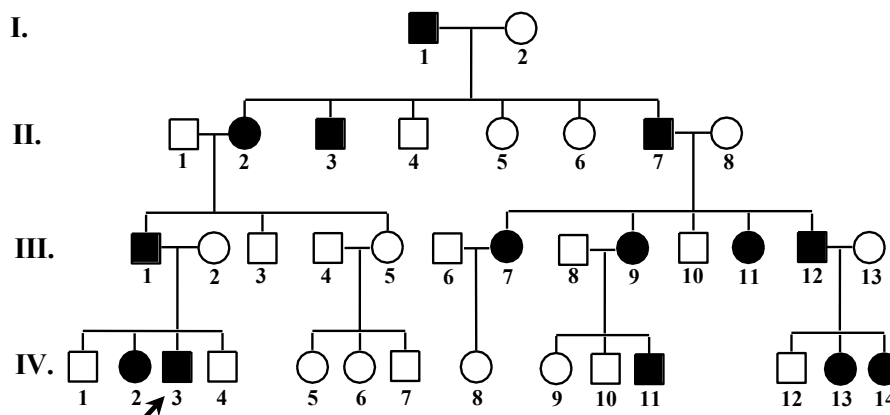
Fenotyp	Genotyp
Rh pozitívny	DD, Dd
Rh negatívny	dd

4.2.2 Autozómová dominantná dedičnosť ochorení a patologických znakov

Pre uvedený typ dedičnosti patologických znakov platí, že lokalizácia patologického génu je na niektorom autozóme. Pri život ohrozujúcich stavoch pôsobí negatívna selekcia, takže sa nositeľ dominantnej patologickej mutácie nemôže zúčastniť reprodukcie. Často ich teda zisťujeme ako mutácie *de novo*. Výnimkami sú neskorý nástup prejavov ochorenia, alebo také postihnutie, ktoré neohrozuje prežitie. Miera postihnutia (expresivita) u nich často závisí od genotypu, u niektorých z nich v klinickej praxi poznáme výskyt len u heterozygotov (dominantný homozygot neprežije).

Choroba (ak nepodlieha selekcii) je spravidla zistiteľná v niekoľkých generáciách po sebe (vertikálny typ dedičnosti). Každý z postihnutých jedincov má postihnutého niektorého z rodičov. Rodičia obvykle nie sú navzájom príbuzní. Prenos a výskyt nie je viazaný na pohlavie. Choroba je zastúpená rovnako často u rodičov a detí (50 %). Prenos z otca na syna je možný. Z manželstva postihnutej osoby (heterozygota) a zdravej osoby je teoretický pomer postihnutých a nepostihnutých detí 1 : 1. Z manželstva postihnutej osoby (homozygota dominantného) a zdravej osoby budú všetky deti postihnuté. Z manželstva dvoch postihnutých rodičov (heterozygotov) je teoretický predpokladateľný pomer postihnutých a zdravých detí 3

: 1. Zdravé deti neprenášajú chorobu ďalej na svojich potomkov. Pravdepodobný pomer pohlaví medzi postihnutými je 1 : 1. Postihnutý jedinec je veľmi zriedka homozygotom. V homozygotnom stave je priebeh choroby ťažší. Génovým produktom sú najmä zmeny základných bielkovín štruktúrneho charakteru (bielkovín vo funkcii biologických nosičov a bunkových receptorov). Zmeny enzýmového charakteru sú veľmi zriedkavé. Na obrázku 23 je uvedený rodokmeň patologického znaku s autozómovo dominantným typom dedičnosti.



• **Obr. 23.** Typický rodokmeň patologického znaku s autozómovo dominantným typom dedičnosti

4.2.2.1 Príklady ochorení s autozómovo dominantným typom dedičnosti

4.2.2.1.1 Huntingtonova chorea

Degeneratívne ochorenie nervových buniek bazálnych ganglií, ktoré prebieha postupne, prvýkrát opísané Georgom Huntingtonom v roku 1872. V časovom rozmedzí 5 - 10 rokov vedie k úplnej strate motorickej kontroly a intelektuálnych schopností. Charakteristické sú choreatické –bezúčelné, nekontrolované pohyby a postupná progresívna demencia. Je to programovaná smrť mozgu. Pacient speje k úplnej mentálnej a fyzickej neschopnosti. Väčšina pacientov je do doby dospelosti normálna. Priemerný vek nástupu choroby je 38 rokov. Dedičnosť autozómovo dominantná s úplnou penetranciou, incidencia výskytu je 1 : 15 000 až 1 : 20 000 pôrodov. Na rozdiel od iných dedičných ochorení človeka je Huntingtonova chorea zatiaľ jediné známe úplne dominantné ochorenie, čo znamená, že jedinci homozygotní pre mutáciu sa klinicky nelíšia od jedincov, ktorí majú mutáciu vo svojom genóme len v jednej kópii.

Gén pre Huntingtonovu choreu patrí medzi prvé gény, ktoré sa podarilo zmapovať výlučne na základe rodinných štúdií a väzbovej analýzy pomocou polymorfizmu DNA. Takmer desaťročné úsilie mnohých výskumných tímov bolo konečne v roku 1993 korunované úspechom, keď rozsiahle medzinárodné konzorcium oznámilo identifikáciu génu *IT 15*, ktorého mutácia je kauzálnou príčinou Huntingtonovej chorei. Uvedený gén s veľkosťou 200 kb má 67 exónov a je lokalizovaný na 4. chromozóme (4p16.3). Génovým produktom je proteín huntingtín, ktorý sa skladá z 3 144 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 348 kDa.

Huntingtín bol identifikovaný takmer vo všetkých tkanivách, predovšetkým v mozgu (najvyššia hladina v cerebelle, hipokampe a kortexe). Jeho zvýšená hladina sa nezistila v oblasti striatum, ktorá je najviac postihnutá pri Huntingtonovej chorei. Najnovšie výsledky naznačujú, že je nevyhnutný pre normálny vývin a pre vnútrobunkový transport závislý od mikrotubulov.

Molekulárnym základom Huntingtonovej chorei je opakovanie tripletu CAG v exóne č. 1 v lokuse 4p16.3. Normálny počet opakovaní je 9 - 35 krát. Pri 35 - 39 opakovaníach ide o tzv. premutáciu, počet opakovaní dosiahol určitú kritickú hranicu. U pacientov je tzv. tripletová

expanzia, pričom je počet CAG zvýšený na 39 - 100. Najväčšia doteraz identifikovaná expanzia bola 250 kópií. Čím je rozsiahlejšia expanzia tripletu, tým je skorší nástup ochorenia.

Pri diagnostike sa používa nepriama DNA diagnostika (RFLP, VNTR) – založená na sledovaní kosegregácie mutácie s určitou alelou polymorfizmu v rámci rodiny sa používala iba do odhalenia génu. V súčasnosti sa používa len vo výnimočných prípadoch, pri prenatálnej diagnostike. V praxi sa používa detekcia expenzie tripletu CAG pomocou metódy PCR. Časť rodín s príznakmi ochorenia pripomínajúcimi Huntingtonovu choreu nevykazovala mutácie v lokuse 4p16.3. Patologické stavy podobné Huntingtonovej chorei sa nazývajú *Huntington Disease Like* a označujú sa HDL 1, 2 a 3, pričom HDL3 je autozómovo recesívne dedičná.

4.2.2.1.2 Neurofibromatóza typ 1

Ochorenie postihuje nervový systém v koži, vnútorných orgánoch, mozgu a má veľmi variabilnú expresivitu. Jeho prejavmi sú mnohopočetné fibrómy (nezhubné nádory väzivového tkaniva), ktoré sú rozptýlené po celom tele, angiómy (nezhubné nádory ciev), prejavujúce sa červenými škvrnami. Zvláštnym znakom sú škvrny farby bielej kávy (*café-au-lait*). U pacientov s fibromatózou je vysoká pravdepodobnosť zhubného ochorenia na nádory typu neuroblastómov, meningiómov a astrocytómov (nádory nervového tkaniva). Typické sú zmeny skeletu, deformácie a defekty kostí, skolióza. Častá je mentálna retardácia a svalová slabosť. Dedičnosť je autozómovo dominantná a incidencia výskytu je 1 : 2 500 - 1 : 3 000 pôrodov.

Zodpovedným génom je tumor-supresorový gén *NF1*, ktorý má veľkosť 350 kb, obsahuje 60 exónov a je lokalizovaný na 17. chromozóme (17q11.2). Génovým produktom je proteín neurofibromín 1, ktorý sa skladá z 2 818 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 327 kDa. Príčinou choroby sú mutácie v tumor-supresorovom géne *NF1*, ktorého úlohou je regulácia funkcie Ras protoonkogénu. Pri diagnostike sa používa metóda FISH a sekvenovanie.

4.2.2.1.3 Neurofibromatóza typ 2

Je obmedzená na oblasť akustických nervov (obyčajne bilaterálne). Môžu sa však vyskytovať aj mozgové nádory. Incidencia výskytu je 1 : 40 000 pôrodov.

Zodpovedným génom je tumor-supresorový gén *NF2–Merlin*, ktorý má veľkosť 219 kb, obsahuje 24 exónov a je lokalizovaný na 22. chromozóme (22q12.2). Génovým produktom je proteín neurofibromín 2, ktorý sa skladá z 595 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 696 kDa. Príčinou choroby sú delécie v tumor-supresorovom géne *NF2*, najčastejšie v exónoch 2 a 3. Pri diagnostike sa používa sekvenovanie.

4.2.2.1.4 Achondroplázia (Chondrodystrofia)

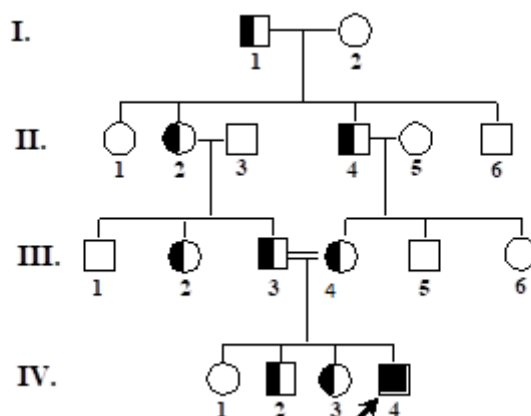
Patrí medzi dysplázie – vývinové abnormality určitého tkaniva, konkrétne unidysplázie, kde sú postihnuté tkanivá len jedného zárodočného listu. Ide o poruchu funkcie rastových chrupiek dlhých kostí a tým ich rastu do dĺžky. Charakteristická je kombinácia nápadne krátkych končatín, väčšej hlavy a normálnej veľkosti trupu. Deformity na krčkoch femuru vedú ku kolísavej chôdzi. Inak je vývoj, vrátane inteligencie primeraný. Výška chondrodystrofikov je do 140 cm. Ochorenie má rôzne typy dedičnosti, ale z hľadiska klinickej závažnosti má najväčší význam typ s autozómovo dominantnou dedičnosťou. Dominantní homozygoti pre achondropláziu nie sú schopní života (tzv. tanatoformný – smrť prinášajúci genotyp). Mnohé fenotypy z tejto skupiny sú neúplne dominantné, to znamená, že u heterozygotných jedincov sú prítomné menej závažné príznaky. Dedičnosť autozómovo dominantná a incidencia výskytu je 5 - 15 : 100 000 pôrodov.

Zodpovedným génom je gén pre receptor 3 pre fibroblastový rastový faktor (*FGFR 3, Fibroblast Growth Factor Receptor 3*), ktorý má veľkosť 16,5 kb, obsahuje 19 exónov a je lokalizovaný na 4. chromozóme (4p16.3). Génovým produktom je receptor s tyrozin kinázovou aktivitou, ktorý sa skladá z 806 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 115 kDa.

4.3 Autozómová recesívna dedičnosť patologických znakov a ochorení

Autozómovo recesívne znaky sú vo veľkej väčšine prípadov ochorenia. Pre uvedený typ dedičnosti patologických znakov platí, že lokalizácia patologického génu je na autozóme. Prítomné musia byť identické patologické alely na obidvoch lokusoch. Ochorenie sa neprejaví v každej generácii a nemusí sa vyskytovať ani u rodičov ani u vzdialenejších predkov. Časté je však medzi súrodencami postihnutého jedinca (horizontálny typ dedičnosti). Rodičia bývajú často vzájomne príbuzní. Zdraví rodičia (heterozygoti) môžu mať postihnuté deti s pravdepodobnosťou 25 %. Treba však zdôrazniť, že u ľudí – vzhľadom na malý počet potomkov – je skutočný výskyt genotypov náhodný.

Zdraví rodičia (homozygoti dominantní) budú mať všetky deti zdravé. Zdraví rodičia (homozygot dominantný a heterozygot) budú mať taktiež nepostihnuté deti. Z manželstva zdravého rodiča (heterozygota) a postihnutého rodiča sa dá predpokladať pomer postihnutých a nepostihnutých detí 1 : 1. Pomer pohlaví medzi postihnutými je 1 : 1. Produktom patologického génu je predovšetkým enzýmový defekt – enzymopatia. Na obrázku 24 je uvedený rodokmeň patologického znaku s autozómovo recesívnym typom dedičnosti.



• **Obr. 24.** Typický rodokmeň patologického znaku s autozómovo recesívnym typom dedičnosti

4.3.1 Príklady ochorení s autozómovo recesívnym typom dedičnosti

Produktom recesívnej mutovanej alely je pozmenený (nefunkčný) proteín, alebo mutácia (v promótoře) čo spôsobí, že neprebehne transkripcia. Pre toto ich nazývame molekulové choroby. Predpokladom je, že je postihnutý jedinec recesívny homozygot. Z molekulových chorôb sa potom často vyskytujú predovšetkým defekty enzýmov (enzymopatie) a patologické stavy majú najmä charakter dedičných metabolických porúch. **Enzymopatie** sú choroby (poruchy), vyvolané chýbaním určitého enzýmu (alebo produkciou nefunkčného enzýmu), s následným hromadením substrátu, ktorý telo nevie metabolizovať. Pokiaľ nemajú tradičný názov (napr. Tayova-Sachsova choroba, Wilsonova choroba), označujú sa názvom substrátu + émia (ak sa hromadí v krvi – napr. galaktozémia), alebo + úria (ak sa vylučuje močom – napr. alkaptonúria, fenyلكetonúria). Okrem typických príznakov býva v popredí klinického obrazu zaostávanie telesného a duševného rozvoja, spôsobeného intoxikáciou organizmu nestráviteľným substrátom.

4.3.1.1 Alkaptonúria

Je dedičná porucha spojivového tkaniva. Chýbanie enzýmu homogentizát-1,2-dioxygenázy (HGD) spôsobuje hromadenie kyseliny homogentizovej (normálneho medziproduktu metabolismu fenylalanínu a tyrozínu). Hlavným príznakom je vylučovanie kyseliny homogentizovej do moču, čo zapríčiňuje jeho tmavé sfarbenie a ukladanie ochrnotického pigmentu (oxidačný polymér kyseliny homogentizovej) do rôznych

spojivových tkanív – sklér, chrupiek, väzív, do intímnej väčších ciev, endokardu, epidermy. Komplikáciou je častý nález obličkových a prostatických kameňov, a to i v detskom veku. Najťažším príznakom je postihnutie veľkých kĺbov a chrbtice (ochronotická artropatia), ktorá sa objavuje medzi 20. - 40. rokom života a postupne invalidizuje pacienta. Dedičnosť autozómovo recesívna a incidencia výskytu je 1 : 100 000 - 250 000, na Slovensku 1 : 19 000 pôrodov, čo je najvyšší výskyt na svete.

Zodpovedným génom je gén *HGD*, ktorý má veľkosť 55 kb, obsahuje 14 exónov a je lokalizovaný na 3. chromozóme (3q21–q23). Génovým produktom je proteín homogentizát–1,2–dioxygenáza, ktorý sa skladá zo 445 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 50 kDa.

Molekulovo-genetické štúdie priniesli prekvapivé zistenie, že defekt enzýmu HGD nie je spôsobený len jedinou mutáciou, ako sa pôvodne predpokladalo, ale viacerými mutáciami. Sú to najčastejšie mutácie meniace zmysel, kde dochádza k zámene jedného nukleotidu v DNA a nachádzajú sa v kódujúcich aj nekódujúcich úsekoch génu *HGD*. Do roku 2000 sa v súbore vyše 100 pacientov, pochádzajúcich z viacerých krajín sveta, identifikovalo viac ako 40 rôznych mutácií spôsobujúcich alkaptonúriu. V súčasnosti je ich najmenej 67. Najčastejšia mutácia v Európe, ktorá tvorí asi 20 % všetkých mutácií, je Met368Val (zámena metionínu za valín v pozícii 368). V Slovenskej populácii sa zistilo 10 rôznych typov mutácií (meniace zmysel, posunové a zostrihové mutácie).

Pri diagnostike sa používa PCR amplifikácia a následná detekcia substitučnej mutácie restričným enzýmom a heteroduplexná analýza. Ak sú prítomné heteroduplexy, je mutácia v heterozygotnej forme a homozygoti nevytvoria heteroduplexy. Výsledky tejto formy analýzy DNA sa vždy potvrdzujú sekvenovaním.

4.3.1.2 Cystická fibróza

Ochorenie je spôsobené poruchou čerpania chloridových iónov, predovšetkým v hlienotvorných exokrinných žľazách, ktoré tvoria viskózne sekrét s obsahom proteínov, vedúci k upchatiu žľazových vývodov. Hustý hlien uzatvára priedušky, čo sťažuje ventiláciu pľúc a navyše podporuje rozvoj zápalových, vírusových alebo bakteriálnych ochorení. Prejavuje sa generalizovanou dysfunkciou exokrinných žliaz. Je to najčastejšia dedičná porucha bielej rasy. Dedičnosť je autozómovo recesívna a incidencia výskytu je 1 : 2 500 pôrodov (na Slovensku 1 : 1 800).

Zodpovedným génom je *CFTR*, ktorý má veľkosť 250 kb, obsahuje 27 exónov a je lokalizovaný na 7. chromozóme (7q31.2). Génovým produktom je proteín CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), ktorý sa skladá z 1 480 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 168 kDa.

Mutáciou sa zastavuje syntéza proteínu CTRF, čo zapríčiňuje poruchu transportu chloridových iónov a vody v žľazových bunkách, čím sa zvyšuje viskozita hlienu. V géne je identifikovaných viac ako 1 300 mutácií a najčastejšia je mutácia F508del, ktorá sa označuje podľa chýbajúceho kodónu 508 a u slovenských pacientov s cystickou fibrózou sa vyskytuje v 59,4 %. Medzi častejšie zistené mutácie v SR patria G542X (5,6 %), R553X (3,5 %) a N1303K (3,0 %).

Prenatálna genetická diagnostika sa vykonáva priamou detekciou mutácií – pomocou PCR sa amplifikujú oblasti s častými mutáciami.

4.3.1.3 Fenylketonúria

Fenylketonúria (PKU) je najčastejšia vrodená porucha metabolizmu aminokyselín. Ochorenie sa zvyčajne diagnostikuje v rámci novorodeneckého skríningu. Je charakterizované špecifickým zápachom moču (“po myšiach”), ekzémami, epileptickými kŕčmi, svalovou hypertoniou, mikrocefalom a ťažkou mentálnou retardáciou. Poškodený je enzým fenylalanín hydroláza, ktorý sa tvorí len v pečeni. Normálne katalyzuje premenu fenylalanínu na tyrozín, ktorý sa enzymovými reakciami mení na fumarát a acetoacetát. Poškodený enzým premenu nekatalyzuje, pričom dochádza k hromadeniu fenylalanínu v telových tekutinách a tkanivách.

Dedičnosť je autozómovo recesívna a incidencia výskytu je 1 : 10 000 - 12 000 pôrodov (u slovenských rómov 1 : 1 000) a celková incidencia fenylketonúrie je na Slovensku 1 : 6 276 novorodencov.

Zodpovedným génom je gén *PAH*, ktorý má veľkosť 90 kb obsahuje 13 exónov a je lokalizovaný na 12. chromozóme (12q22–q24). Génovým produktom je proteín fenylalanin –4 – monooxygenáza, ktorý sa skladá zo 452 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 55 kDa.

Prenatálna diagnóza je možná pomocou DNA analýzy – PCR. V tomto gène je v súčasnosti známych viac ako 500 mutácií. Fenylketonúria sa dlho považovala za klasický príklad jednoduchej genetickej choroby, ktorá je liečiteľná. V súčasnosti vieme, že v klinických prejavoch a odpovedi na liečbu existujú značné rozdiely medzi pacientami s fenylketonúriou. V dôsledku veľkého počtu mutácií v gène pre fenylalanínhydroxylázu nie je ľahké stanoviť koreláciu medzi genotypom a fenotypom pacienta.

Doplňujúca študijná literatúra

BÖHMER, D. – DANIŠOVIČ, L. – REPISKÁ, V.: Lekárska biológia a genetika 1. Druhé doplnené vydanie. Bratislava: Univerzita Komenského 2020, 102 s.

GBELCOVÁ, H. – REPISKÁ, V. – SHAWKATOVÁ, I.: Nukleové kyseliny a proteíny. Analytické metódy a postupy. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave 2017, 316 s.

NUSSBAUM, R. L. – MCINNES, R. R. – WILLARD, H. F.: Klinická genetika. 6. vydání. Praha: Triton 2004, 426 s.

SRŠEŇ, Š. – SRŠŇOVÁ, K.: Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata. 4., prepracované a rozšírené vydanie. Martin: Osveta 2005, 446 s.

5 MONOGÉNOVO PODMIENENÉ NORMÁLNE A PATOLOGICKÉ ZNAKY VIAZANÉ NA X CHROMOZÓM

Gonozómová dedičnosť je viazaná na pohlavné chromozómy X a Y. Má oproti autozómovej daedičnosti určité odlišnosti. Sú dané tým, že u muža je len jeden chromozóm X (je tzv. hemizygot) a preto pre každý lokus na chromozóme X má len jednu alelu.

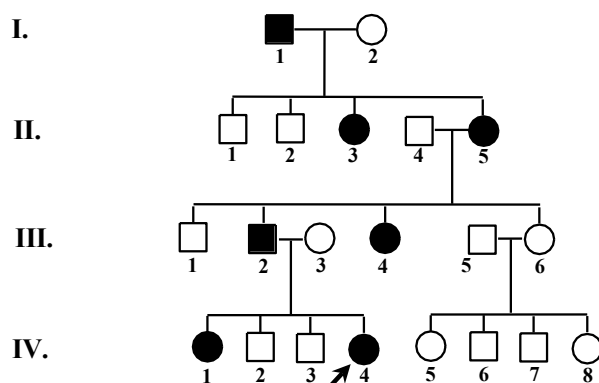
Predtým ako si povieme o chorobách s X – viazaným typom dedičnosti si zopakujme Lyonovej teóriu o „kompenzácii efektu génovej dávky“ (kapitola 3).

Chromozóm X je šiesty najväčší u človeka a doposiaľ na ňom bolo identifikovaných 846 génov. Chromozóm Y patrí medzi najmenšie u človeka. Obsahuje 46 génov, pričom najdôležitejší gén pre určenie mužského pohlavia (tzv. *TDF* – testes determinujúci faktor), mutácia ktorého zapríčiňuje gonádovú dysgenézu (poruchu vývoja pohlavných orgánov a žliaz). Preto Y viazaný typ dedičnosti (tzv. holandrická dedičnosť) nemá pre klinickú genetiku praktický význam.

5.1 Patologické znaky (choroby) s X – viazaným dominantným typom dedičnosti

Pre X viazaný dominantný typ dedičnosti platí, že lokalizácia patologického génu je na X chromozóme. Medzi pacientami prevládajú ženy a prenos z otca na syna nie je možný. Pri postihnutí matky (ak je heterozygot) je riziko postihnutia pre dcéry aj pre synov 50 %. Ak je postihnutá matka dominantný homozygot, prenáša ochorenie na všetky svoje deti. Postihnutý muž nemá postihnutých synov ale všetky jeho dcéry budú postihnuté. U mužských pacientov možno očakávať ťažší až letálny priebeh ochorenia. U postihnutých heterozygotných žien ($X_D X$) normálna alela zmierňuje účinok patologickej alely.

Klinicko–genetické jednotky s X – viazaným dominantným typom dedičnosti sú zriedkavé, pretože tu pôsobí výrazná negatívna selekcia. Na obr. 25 je znázornený rodokmeň patologického znaku s X – viazaným dominantným typom dedičnosti.



• Obr. 25. Modelový rodokmeň patologického znaku s X – viazaným dominantným typom dedičnosti

5.1.1 Príklady ochorení s X viazaným gonozómovo dominantným typom dedičnosti

5.1.1.1 Hypofosfatemická rachitída, rezistentná na vitamín D

Ochorenie je spôsobené deficitom fosforu, ktorý sa manifestuje typickými klinickými prejavmi rachitídy, ako je nízka postava, bolesti kostí, deformity skeletu a sprievodné je postihnutie zubov (porucha skloviny a abscesy). Mutácia génu spôsobuje zníženú reabsorpciu fosforu v proximálnom tubule obličky na 42 – 72 % (norma 85 – 95 %), dôsledkom ktorej je

hladina fosforu v sére nízka. Aktivita alkalických fosfatáz je mnohonásobne zvýšená. Oproti krivici z nedostatku vitamínu D chýba hypokalcémia (nízka hladina vápnika v krvi). Pri tejto forme rachitídy fyziologické dávky vitamínu D nemajú terapeutický účinok. Frekvencia výskytu je približne 1 : 20 000 pôrodov. Ženy sú postihnuté dvakrát častejšie ako muži.

Zodpovedným génom je gén *PEX* (fosfát regulujúca endopeptidáza), ktorý má veľkosť 220 kb, obsahuje 22 exónov a je lokalizovaný na X chromozóme (Xp22.1). Génovým produktom je proteín PHEX, ktorý sa skladá zo 749 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 86 kDa.

Príčinou ochorenia sú rôzne mutácie génu *PEX*, napr. rôzne bodové mutácie substitučného charakteru, posunové mutácie, delécie jedného alebo viacerých exónov, mutácie zostrihových miest medzi intrónom a exónom.

5.1.1.2 Rettov syndróm

Je komplexná neurologická vývojová porucha, vyskytujúca sa takmer výlučne u dievčat. Sú známe prípady výskytu Rettovho syndrómu aj u chlapcov, ale ide obvykle o smrteľnú formu syndrómu, spôsobujúcu potrat, narodenie mŕtveho dieťaťa alebo predčasnú smrť. Počiatkový vývoj dieťaťa sa do 6. -18. mesiaca života obvykle javí ako celkom normálny. Potom nasleduje obdobie dočasnej stagnácie alebo regresie, kde dieťa stráca schopnosť reči a vedomého používania rúk. Hlavným rysom Rettovho syndrómu je apraxia (dyspraxia), t.j. neschopnosť prehliadať, používať ruky, ovládať telo a vykonávať motorické pohyby. Objavujú sa stereotypné pohyby rúk, tlieskanie a charakteristický obraz umývania si rúk, poruchy chôdze a spomaľujúci sa rast hlavy. Pridružujú sa epileptické záchvaty, zvyšujúci sa tonus svalstva, deformácie chrbtice, kĺbov a atrofia svalovej hmoty. Udáva sa, že 95 % žien sa dožíva 25 rokov.

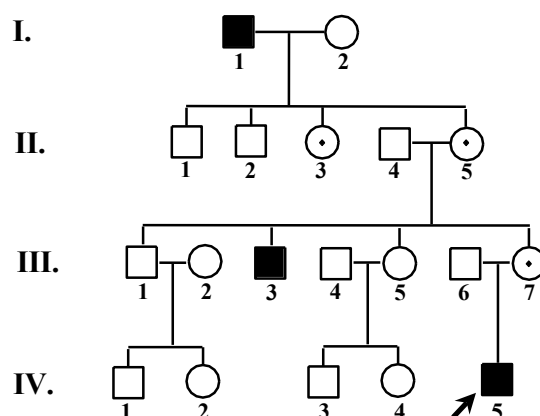
Dedičnosť je X viazaná dominantná s neúplnou penetranciou a variabilnou expresivitou. Výskyt približne 1 : 10 000 živo narodených dievčat, čo platí pre všetky etnické skupiny.

Zodpovedným génom je gén *MECP2* (methyl CpG-viažuci proteín), ktorý má veľkosť 76 kb, obsahuje 4 exóny a je lokalizovaný na X chromozóme (Xp28). Génovým produktom je MeCP2 (na metylovaný CpG sa viažuci proteín), ktorý sa skladá zo 486 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 52,4 kDa. Tento proteín je dôležitý pre normálny vývoj mozgu. Bez tohto proteínu sa nesprávne vyvíjajú oblasti mozgu zodpovedané za zmyslové, emocionálne, motorické a autonómne funkcie. Mutácia spôsobuje poruchy vývinu neurónov v poslednom trimestri tehotenstva.

5.2 Patologické znaky a ochorenia s X viazaným recesívnym typom dedičnosti

Pre uvedený typ dedičnosti platí, že patologická (mutovaná) alela génu sa nachádza na X chromozóme. Medzi postihnutými prevažuje mužské pohlavie, pričom však nie je možný prenos z otca na syna. V prípade, ak je otec zdravý a patologická alela sa prenáša od nepostihnutej matky (prenášačky), je pravdepodobnosť postihnutia synov 50 %. Dcéry nebudú postihnuté, ale majú pravdepodobnosť 50 %, že budú prenášačky. Od postihnutého otca dostanú patologický gén len dcéry, z ktorých budú prenášačky (ak dostali od matky normálnu alelu). Postihnutie žien môže nastať len v prípade, ak od každého z rodičov získali mutovanú alelu. U prenášačiek môže nastať rôzny stupeň klinických prejavov v zmysle hypotézy Lyonovej (ak má prenášačka vo viac ako 50 % buniek inaktívovaný chromozóm s normálnou alelou).

Na obr. 26 je znázornený rodokmeň patologického znaku s X viazaným recesívnym typom dedičnosti.



• **Obr. 26.** Modelový rodokmeň patologickeho znaku s X viazaným recesívnym typom dedičnosti

5.2.1 Príklady ochorení s X viazaným recesívnym typom dedičnosti

5.2.1.1 Hemofília A

Je to najznámejšia, najvážnejšia a najčastejšia geneticky podmienená porucha zrážania krvi (hemokoagulácie). Vyskytuje sa v 80 % prípadov. Prejavuje sa neustávajúcim krvácaním i z nepatrnej rany. Podmienená je chýbaním, znížením hladiny alebo stratou aktivity koagulačného faktora VIII, čo spôsobuje jeho zlyhanie vo funkcii kofaktora pre aktiváciu faktora X, dôležitého v procese hemokoagulácie (premena protrombínu na trombín a fibrinogénu na fibrín). Fibrínová zrazenina, ktorá je u jedincov, postihnutých hemofiliou veľmi slabá, nedokáže uzavrieť postihnuté krvácajúce tkanivo a rana stále krváca (nevytvorí sa tzv. krvný koláč). Ochorenie postihuje chlapcov a frekvencia výskytu je približne 1 : 6 000 – 10 000 narodených chlapcov. Hemofília A sa vyskytuje päťkrát častejšie ako hemofília B. U dievčat sa nevyskytuje, pretože má v homozygotnom stave letálny efekt už počas intrauterinneho vývoja.

Zodpovedným génom je gén *HEMA* (F8), ktorý má veľkosť 186 kb, obsahuje 26 exónov a je lokalizovaný na X chromozóme (Xp28). Génovým produktom je faktor VIII, ktorý sa skladá z 2 332 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 330 kDa. Ak je faktor zrážania krvi celkom nefunkčný, ide ťažkú formu hemofilie. Naopak, ak je faktor čiastočne funkčný, hovoríme o strednej alebo dokonca ľahkej forme.

Príčinou ochorenia sú rôzne typy mutácií – inverzie, bodové a posunové, delécie, duplikácie a inzercie. Diagnostika je založená na ich identifikácii.

5.2.1.2 Hemofília B

Je zriedkavejšou formou poruchy koagulácie. Frekvencia výskytu je približne 1 : 100 000 narodených chlapcov. Príčinou je chýbanie alebo zníženie hladiny koagulačného faktora IX.

Zodpovedným génom je gén *HEMB* (F9), ktorý má veľkosť 35 kb, obsahuje 8 exónov a je lokalizovaný na X chromozóme (Xq27.1–q27.2). Génovým produktom je faktor IX, ktorý sa skladá zo 418 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 56 kDa.

K X-viazaným hemofiliám treba poznamenať, že už viac ako 10 rokov sú dostupné biotechnologicky pripravované náhrady chýbajúcich koagulačných faktorov, ktoré sú im podávané a podstatne zmierňujú vedľajšie účinky, predovšetkým poškodenie kĺbov (najmä kolien).

5.2.1.3 Duchennova svalová dystrofia

Je to ťažké a progresívne svalové ochorenie postihujúce chlapcov, ktoré končí letálne. Pacienti sa len s malou pravdepodobnosťou dožívajú 20 rokov. Typickými klinickými prejavmi sú na začiatku ľahká unaviteľnosť, slabosť, atrofia kostrového svalstva, ospalé a nevýrazné rysy tváre ako aj časté respiračné choroby. Ochorenie končí takými degeneratívnymi zmenami kostrových svalov (vrátane dýchacích), že postihnutý chlapec zomiera na neschopnosť spontánnej ventilácie a sprievodných komplikácií. Dedičnosť je X viazaná recesívna a frekvencia výskytu je 1 : 3 500 narodených chlapcov.

Zodpovedným génom je najväčší ľudský gén *DMD* (*duchenne muscular dystrophy*), ktorý má veľkosť 2,4 Mb, obsahuje 79 exónov a je lokalizovaný na X chromozóme (Xp21.2). Génovým produktom je dystrofín – bielkovina potrebná na správnu stavbu a funkciu svalov a skladá sa z 3 685 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 427 kDa.

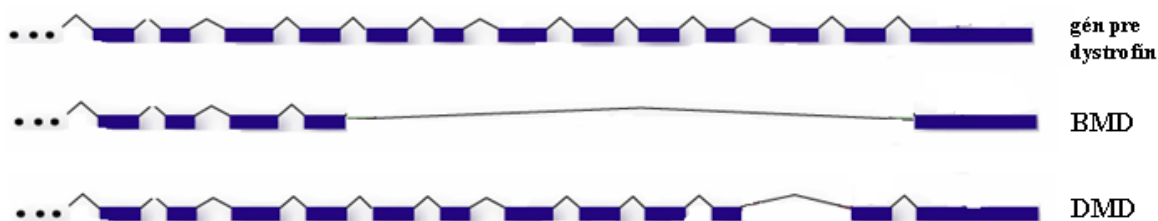
Gén *DMD* je obrovský, tvorí 0,1 % celého ľudského genómu. Jeho veľkosť je spôsobená extrémne dlhými intrónmi. Až 32 % z celkovej dĺžky intrónov tvoria repetitívne sekvencie. Kompletná mRNA má dĺžku 14 kb. Transkripcia tohto génu je kontrolovaná 7 promótormi, ktoré regulujú vývinovú a tkanivovo špecifickú expresiu.

Až 65 % mutácií je spôsobených deléciou jedného alebo viacerých exónov, 20 % mutácií je bodových typu nonsense a minsense a zvyšných 15 % sú duplikácie, translokácie a inzercie. Asi v tretine prípadov sú za vznik ochorenia zodpovedné mutácie *de novo*, príčinou je veľkosť génu *DMD*. Následkom defektného génu dochádza k tvorbe dystrofínu so zmenenou štruktúrou, k jeho nedostatku, alebo úplnej absencii.

5.2.1.4 Beckerova svalová dystrofia

Je miernejšia a zriedkavejšia forma dystrofie, s neskorším začiatkom a pomalším priebehom ochabovania svalov. Môže byť spojená s mentálnou retardáciou. Dedičnosť je X viazaná recesívna a frekvencia výskytu je 1 : 17 000 narodených chlapcov.

Zodpovedným génom je gén *DMD*. Gén je taký istý ako u Duchenneovej svalovej dystrofie (obr. 27). Obidve choroby sú spôsobené odlišnými mutáciami alely toho istého génu (tzv. interalelická heterogenita).



• **Obr. 27.** Veľké delécie u Beckerovej muskulárnej dystrofie (BMD) nemenia čítací rámec a majú pre pacienta menšie dôsledky ako malé delécie pri Duchenneovej svalovej dystrofii (DMD), ktoré menia čítací rámec

5.2.1.5 Daltonizmus

Farbosleposť alebo daltonizmus prvýkrát popísal v roku 1794 anglický fyzik a chemik J. Dalton, ktorý sám trpel touto poruchou. Daltonici zvyčajne nerozlišujú červenú a/alebo zelenú farbu. Literárne pramene udávajú, že v západnej Európe je 8 % mužov farboslepých, z nich približne 75 % má defekt rozpoznávania zelenej farby, 25 % rozpoznávania farby červenej.

Zodpovedným génom je gén *IKBKG*, ktorý má veľkosť 23 kb, obsahuje 10 exónov a je lokalizovaný na X chromozóme (Xq28). Génovým produktom je proteín, ktorý sa skladá zo 412 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 48 kDa.

5.2.1.6 Adrenoleukodystrofia

Je najčastejšie dedičné peroxizómové ochorenie. Ochorenie sa manifestuje u mužov a jeho incidencia je v SR je 1 : 16 800 - 1 : 42 000. Aj napriek X viazanému recesívnemu charakteru dedičnosti sa miernejšie formy ochorenia vyskytujú aj u žien. Hlavným patobiochemickým znakom tohto ochorenia je porucha odbúravania a akumulácia karboxylových kyselín s veľmi dlhým reťazcom v tkanivách centrálného nervového systému, periférnych nervov, nadobličiek a v telových tekutinách. Charakteristický je histologický a biochemický nález v tkanive kôry nadobličiek. Pri manifestácii ochorenia dochádza k progresívnemu zhoršovaniu správania sa, poznávacích a neurologických funkcií. Prvými príznakmi sú emocionálna labilita, rečové ťažkosti, apraxia (poruchy hybnosti), zlá orientácia v priestore a zníženie zrakovej ostrosti. Pri manifestácii v školskom veku dochádza k zhoršovaniu prospechu, zmenám správania, k zhoršovaniu pamäti. Znamky demencie a epileptické kŕče sa môžu dostaviť v pokročilom štádiu ochorenia. Až u 90 % pacientov sa vyvinú prejavy zlyhávania činnosti nadobličiek.

Zodpovedným génom je gén *ABCD1*, ktorý má veľkosť 21 kb, obsahuje 10 exónov a je lokalizovaný na X chromozóme (Xq28). Génovým produktom je peroxizómový membránový proteín, ktorý sa skladá z 745 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 83 kDa.

Pri diagnostike sa využíva RFLP a sekvenovanie. Doteraz bolo zaregistrovaných 866 rôznych mutácií spôsobujúcich adrenoleukodystrofiu, z čoho 435 mutácií sa týka jedného nukleotidu, 61 % predstavujú mutácie meniace zmysel, 23 % delécie a inzercie.

5.2.1.7 Fabryho choroba

Je progresívne, multisystémové dedičné lyzozomálne ochorenie charakterizované defektom odbúravania glykosfingolipidov v dôsledku deficitu lyzozómovej alfa galaktozidázy A. Tieto sa hromadia v rôznych tkanivách vo forme hustých depozitov (tzv. *lysosomal storage diseases*). Dochádza k poškodeniu štruktúry a funkcie viacerých orgánov, najmä však kardiovaskulárneho systému, kože a obličiek. Klinický obraz choroby zahŕňa široké spektrum prejavov od miernych foriem u žien (heterozygotov) až po tie závažné u mužov – hemizygotov s nulovou reziduálnou aktivitou alfa galaktozidázy A. Patrí medzi zriedkavo sa vyskytujúce ochorenia. Výskyt sa odhaduje na 1 : 40 000 mužov. Ochorenie sa vyskytuje vo všetkých etnických skupinách.

Zodpovedným génom je *GLA*, ktorý má veľkosť 10,15 kb, obsahuje 7 exónov a je lokalizovaný na X chromozóme (Xq22.11). Génovým produktom je lyzozomálny enzým alfa-galaktozidáza, ktorý sa skladá zo 429 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 48,8 kDa.

Pri diagnostike sa využíva PCR a sekvenovanie. Doposiaľ bolo identifikovaných 370 rôznych mutácií tohto génu.

Doplňujúca študijná literatúra

NUSSBAUM, R. L. – MCINNES, R. R. – WILLARD, H. F.: Klinická genetika. 6. vydání. Praha: Triton 2004, 426 s.

SRŠEŇ, Š. – SRŠŇOVÁ, K.: Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata. 4., prepracované a rozšírené vydanie. Martin: Osveta 2005, 446 s.

6 MULTIFAKTORIÁLNA DEDIČNOSŤ

Termíny polygénna dedičnosť a multifaktoriálna dedičnosť sa niekedy používajú ako synonymum. **Polygénna dedičnosť** ale znamená, že jeden kvalitatívny znak je podmienený viac ako jedným majoritným génom, teda viacerými génmi (alelovými pármami) v rozličných lokusoch. Napríklad na farbe dúhovky očí sa podieľajú dve alely a na farbe kože alely tri. Prostredie má na polygénne dedičné znaky minimálny vplyv.

Multifaktoriálna dedičnosť (v anglosaskej literatúre nazývané aj znaky komplexné) znamená, že multifaktoriálne podmienené znaky sú výsledkom kombinácie tak genetických ako aj epigenetických faktorov. Genetické faktory (predpoklady) sa označujú ako predispozícia. **Dedičná predispozícia** je daná veľkým počtom minoritných génov (kedysi sa volali „gény malého účinku“), ktoré majú aditívny efekt – počas dlhého obdobia sa ich alely, v rôznych vzájomných kombináciách a za silného vplyvu epigenetických faktorov, spolupodieľajú na tvorbe znaku(ov).

Na dedičnú predispozíciu zvyčajne upozorní tzv. **familiárny výskyt** patologického znaku, čiže to, že sa v určitých rodinách vyskytuje určitá forma znaku častejšie, ako v celej populácii. O minoritných génoch platí, že jednotlivý gén nemá zásadný vplyv na formovanie znaku a jeho mutácia nezmení formu znaku. Alely týchto génov sú exprimované v rôznych kombináciách a čase. Multifaktoriálne znaky sú čiastočne podmienené zložitým typom dedičnosti a zároveň aj epigenetickými faktormi, ktoré v týchto rodinách pôsobia (napr. nutričné zvyklosti). Medzi epigenetické faktory patrí napr. hormonálny profil organizmu, zložky potravy, geografické podmienky, sociálno-ekonomická situácia, denný režim, celková životospráva, vek matky, nákaza vírusom, účinok škodlivín a pod.

V konkrétnych (jednotlivých) prípadoch patologického stavu (napr. vývojová chyba alebo ochorenie) je často veľmi ťažké rozhodnúť, či má v jeho etiológii skutočne úlohu niektorý z faktorov prostredia alebo či predispozícia jedinca znamená jeho zvýšenú vnímavosť na tento faktor. To spôsobuje nielen závažné problémy pri vysvetľovaní príčiny vzniku patologickej formy znaku u konkrétnej osoby a stanovenia prognózy vývoja ochorenia, ale najmä pri odhadovaní pravdepodobnosti jeho opakovania u potomkov.

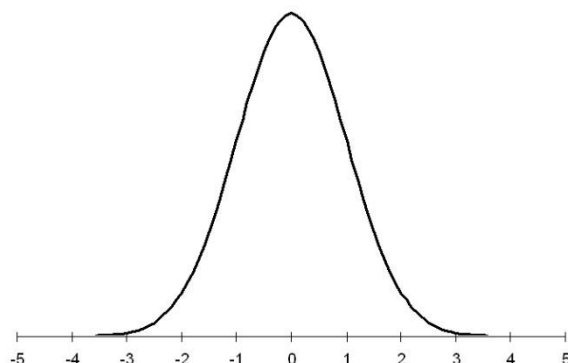
V prognostickej oblasti a pri prenatálnej diagnostike týchto znakov má zásadný význam vyhľadávanie a štúdium tzv. kandidátskych génov. Sú to (fenotypovým prejavom) majoritné gény, ktoré sú odhaľované nepriamo, napríklad pri štúdiu tzv. mikródelečných syndrómov. Ak sa v klinickom obraze tohoto syndrómu vyskytnú aj príznaky typické pre určitý multifaktoriálne podmienený patologický znak, začne sa v deletovanom úseku hľadať (kandidátsky) gén, ktorého mutácia alebo špecifický vzťah jeho produktu (ním kódovanej bielkoviny) k určitej molekule, môže navodiť situáciu, že vznikne obdobný patologický fenotyp. Ak sa potvrdí, že patologický fenotyp môže byť podmienený aj týmto génom, rozširujú sa naše možnosti jeho diagnostiky, prevencie a terapie.

Znaky s multifaktoriálnym typom dedičnosti delíme na kvantitatívne a kvalitatívne.

6.1 Kvantitatívne znaky s multifaktoriálnym typom dedičnosti

Kvantitatívne znaky sa vyjadrujú v definovaných jednotkách (napr. cm, kg, roky a pod.). Zaradíme sem napr. telesnú výšku a iné rozmery tela, stupeň pigmentácie, počet papilárnych línií (na bruškách prstov, dlaniach), vek nástupu prejavu ochorenia, krvný tlak, IQ a pod. Väčšina normálnych kvantitatívnych znakov má v populácii tzv. **kontinuálnu** (normálnu) **distribúciu** (variabilitu). Jednotlivé formy znakov nasledujú plynulo za sebou (bez prerušenia) a rozdiely medzi ich formami sú dané vnútrodrohovou variabilitou. U normálnych multifaktoriálne podmienených kvantitatívnych znakov (napr. telesná výška) poznáme tzv. normálnu (kontinuálnu) distribúciu (variabilitu) znaku (obr. 28). Výskyt znaku v populácii je charakterizovaný priemernou hodnotou (aritmetickým priemerom) a smerodajnými odchýlkami, ktoré charakterizujú tzv. „strmosť“ krivky (rozptyl). Normálna hodnota variability

znaku sa teda vyjadruje zápisom: aritmetický priemer $\pm$ smerodajné odchýlky, čo zahrňuje takmer 94 % z populácie. Krivka samotná sa nazýva podľa autora ako Gaussova alebo Pearsonova. Podstatné je to, že jej tvar (teda distribúcia znaku) sa nemení, ale môže sa pohybovať po osi X. Inak povedané – priemerná výška obyvateľstva Švédska je vyššia ako v oblasti Stredozemného mora, ale tvar krivky (distribúcia) zostáva rovnaký.



• **Obr. 28.** Gaussova krivka

U znakov s najnižšou a najvyššou frekvenciou výskytu hovoríme o tzv. extrémoch – napr. telesná výška u dospelých mužov pod 140 a nad 220 cm. Ale ešte stále je to len prejav fyziologickej variability znaku.

Patologické hodnoty formy kvantitatívneho znaku (abnormality) presahujú toto rozmedzie, a zvyčajne sú podmienené monogénovo dedičným patologickým znakom. Takže ak má jedinec výšku do jedného metra, zvyčajne ide o achondropláziu. Naopak, ak je niekto vysoký 230 cm, je to najčastejšie dôsledok vyvolaný nadprodukciou rastového hormónu v hypofýze.

Pri familiárnych štúdiách metrických (kvantitatívnych – vyjadrovaných v metrických jednotkách, napr. výška v centimetroch) znakov často pozorujeme tendenciu k priemerným hodnotám. Zákonitosť tendencie k priemerným hodnotám vychádza aj z bežného pozorovania. Rodičia, ktorí dosahujú extrémne hodnoty znaku (v zmysle lokalizácie hodnoty ich znaku v krivke normálneho rozdelenia) majú deti, ktoré dosahujú hodnoty bližšie k populačnému priemeru.

6.2 Heritabilita

Pojem heritability vznikol z úsilia o rozlíšenie podielu génov a prostredia na dosiahnutých hodnotách multifaktoriálnych znakov. **Heritabilitu** (dedivosť) definujeme ako podiel aditívnej genetickej variácie na celkovej fenotypovej variancii znaku. Heritabilita je mierou toho, či je podiel genetických faktorov (predispozície) na vzniku určitého fenotypu (alebo predispozície k fenotypu) veľký alebo malý. Čím je vyššia heritabilita, tým je vyšší podiel genetickej zložky (pozri gemelologická metóda humánnej genetiky, kapitola 4).

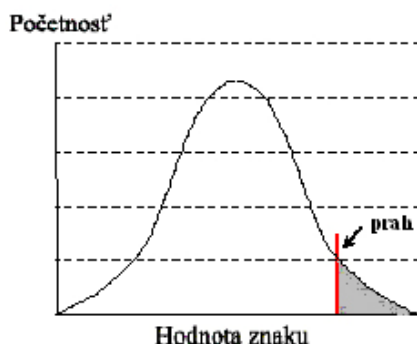
6.3 Kvalitatívne znaky s multifaktoriálnym typom dedičnosti

Kvalitatívne znaky sa vyjadrujú opisom alebo porovnaním. Normálne kvalitatívne multifaktoriálne podmienené znaky tiež vykazujú istú formu variability (napr. tvar hornej pery alebo zmeny v organizme spôsobené starnutím). Avšak ak je forma znaku tak odlišná, že ju považujeme za patologickú, ide o tzv. prahový efekt. Medzi jednotlivými formami znaku v populácii nie je plynulý prechod – je tu tzv. **diskontinuálna distribúcia**. Patologická forma znaku sa začína po prekročení tzv. prahu, kde spolu pôsobia predispozícia a vplyv prostredia. Prahová hodnota je hranicou, za ktorou sú postihnutí všetci jedinci, ktorí majú predispozíciu

k ochoreniu.

Krivka síce má podobný priebeh, ale distribúcia je diskontinuálna. Znamená to, že sa formy znakov delia na dve – **normálne a patologické**, pričom **u každej z nich je variabilita**.

Čím je patologický znak závažnejší, tým menej často sa vyskytuje (obr. 29). Súvisí to s tým, že pravdepodobnosť súčasnej prítomnosti vysokej vnímavosti (predispozície) a silného negatívneho pôsobenia epigenetických faktorov je veľmi malá.



• Obr. 29. Schéma prahovej hodnoty

Príkladom sú laterálne podnebné platničky, ktoré tvoria v embryogenéze tvrdé podnebie. Ak sa spoja je podnebie celistvé a znak normálny. Nezávisle od toho, aké „konštrukcie“ vznikajú, od normálneho až po tzv. gotické podnebie. Ak sa však platničky nespoja, hovoríme že ide o „rázštep podnebia“. Znamená to, že sa forma znaku zmenila „**skokom**“, na inú (patologickú) kvalitu.

Formy znaku, ktoré sú prejavom variability teda považujeme za normálne a pri tomto type dedičnosti za podprahové. Patologické formy znakov sa označujú ako nadprahové. Predispozícia sa môže prejaviť dvoma spôsobmi. Prvým spôsobom je, že predispozícia vedie k vzniku patologického znaku a je len otázkou pôsobenia epigenetických faktorov, ako, či a kedy sa prejaví.

Príkladom je pylorostenóza. U mužov sa vyskytuje päťkrát častejšie ako u žien. Ženy sú pred týmto ochorením chránené estrogénmi. Preto synovia postihnutej ženy majú 18-krát vyššiu pravdepodobnosť mať pylorostenózu, ako synovia postihnutého muža.

Druhým spôsobom vyjadrenia predispozície je zvýšená vnímavosť buniek a tkanív na pôsobenie škodliviny. Typickým príkladom nadprahovej vnímavosti na pôsobenie škodliviny sú vrodené vývojové chyby (napr. rázštep pery a rázštep podnebia, izolovaný rázštep podnebia, rázštep nervovej trubice, vrodené chyby srdca). Ďalším typom sú civilizačné choroby (ateroskleróza, ulkusová choroba, esenciálna hypertenzia, niektoré typy cukrovky).

6.4 Vrodené vývojové chyby s multifaktoriálnym spôsobom dedičnosti

Multifaktoriálne podmienené vrodené vývojové chyby (VVCh) a choroby u človeka možno podľa frekvencie ich výskytu rozdeliť na:

- vzácne chyby a choroby (populačná početnosť < 1 %), napr. rázštep pery a podnebia, rázštep nervovej rúry, VVCh srdca, chybný vývoj bedrových kĺbov;
- chyby a choroby so strednou početnosťou výskytu v populácii (< 5 %), napr. prevažná časť ťažkých duševných chorôb ako schizofrénia, maniodepresivita (bipolárna porucha), oligofrénia;
- ochorenia s vysokou populačnou frekvenciou – napr. vysoký krvný tlak, cukrovka (typ nezávislý od inzulínu), vredová choroba zažívacieho traktu, atopia.

Pri praktickej genetickej konzultácii v rodinách s polygénne podmienenou chybou (chorobou) sa môžu používať teoreticky vypočítané pravdepodobnosti postihnutia (napr. pomocou Edwardsovho vzorca) alebo podľa tzv. tabuľky empirických rizík. Empirické riziká

prvého alebo opakovaného výskytu sú stanovené na základe spracovania väčšieho množstva rodokmeňov rodín s danou chybou resp. chorobou. Všeobecne platí pravidlo, že s vyšším počtom postihnutých blízkych príbuzných stúpa riziko postihnutia. Naopak, ak sú postihnutí vzdialení príbuzní, je riziko postihnutia nízke. Ak chyba, resp. choroba postihuje obidve pohlavia v rôznej miere, potom postihnutie osoby vzácnjšie postihnutého pohlavia zvyšuje riziko pre príbuzných. Napr. nedostatočne vyvinuté bedrové kĺby sa vyskytujú 5x častejšie u dievčat. Ak sa narodí takto postihnutý chlapec, je predpoklad vyššieho rizika postihnutia v tejto rodine.

Edwardsov vzorec vyjadruje odhad rizika postihnutia u príbuzných postihnutého jedinca.

Riziko postihnutia $r = \sqrt{\text{relatívnej frekvencie choroby v populácii}}$

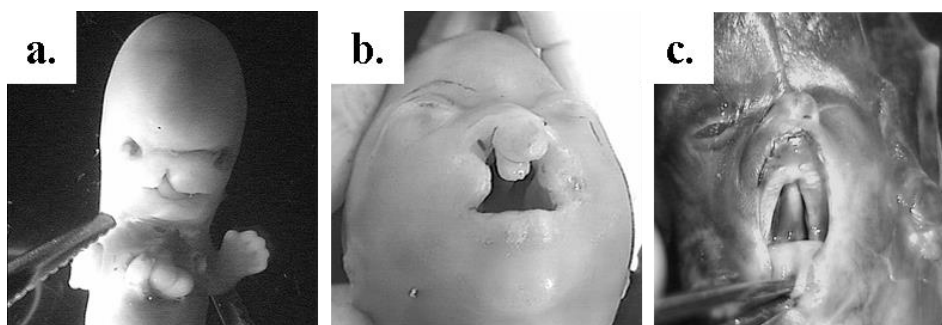
Vzorec platí pre príbuzných 1. stupňa (rodičia, deti, súrodenci). Za predpokladu, že je postihnutých viac príbuzných 1. stupňa osoby, pre ktorú sa počíta prognóza, násobí sa výsledok vzorca ich počtom. Napr. otec a syn trpia rovnakou VVCh. Aké je riziko, že ďalšie dieťa sa narodí s tou istou VVCh? Frekvencia výskytu tejto chyby v populácii je 0,09 %.

$$r = \sqrt{0,0009 \times 2} = 0,03 \times 2 = 0,06 = 6 \%$$

Pri multifaktoriálne podmienených chybách a chorobách sa na ich manifestácii okrem genetických faktorov podieľajú aj faktory prostredia. Napr. u chorôb s prahovým efektom môžu nepriaznivé faktory prostredia posúvať hodnotu prahu doľava (dochádza k manifestácii znaku pri nižších hodnotách predispozície). Naopak, zmenšením negatívneho vplyvu faktorov z vonkajšieho prostredia dochádza ku zvýšeniu prahovej hodnoty, a teda aj k nižšej pravdepodobnosti vzniku ochorenia. Všeobecne známymi príkladmi sú ochorenia kardio-vaskulárneho systému. Ak je predispozícia vysoká (a nejde o monogénovo podmienenú poruchu), správnu životosprávu možno u členov rodiny dosiahnuť oddialenie nástupu alebo zmiernenie príznakov ochorenia.

6.4.1 Rázštepý pery a podnebia

Rázštepý pery a podnebia sú druhou najčastejšou vývojovou chybou a predstavujú 13% všetkých vrodených vývojových chýb. Rázštepý pery a podnebia netvorí homogénnu genetickú jednotku. Môžeme ich rozdeliť na dve od seba geneticky nezávislé skupiny (obr. 30a, b, c).



• **Obr. 30. Rázštepý pery a podnebia** – **a.** Jednostranný rázštep pery vpravo; **b.** obojstranný rázštep pery a podnebia; **c.** rázštep sekundárneho podnebia

Kongenitálny (vrodený) rázštep pery a podnebia je reprezentatívnym príkladom toho, že výsledný patologický fenotyp môže mať viacero nezávislých možných príčin vzniku. Inak povedané – počet typov VVCh je menší, ako je súčet etiologických faktorov, ktoré ich podmieniajú.

Prvú skupinu tvoria rázštepý pery s rázštepom alebo bez rázštepu podnebia. Frekvencia

ich výskytu je 1 : 1 000 živonarodených. Laterálny rázštep hornej pery vzniká okolo 35. dňa intrauterinného vývoja po čiastočnom alebo nesprávnom spojení maxilárneho výbežku s mediálnymi nosovými výbežkami.

Ľavostranný rázštep sa vyskytuje dvakrát častejšie ako pravostranný, častejšie sa vyskytuje u mužov (70 : 30).

Mediálny rázštep hornej pery je veľmi zriedkavý, vzniká buď chybným vývojom obidvoch mediálnych nosových výbežkov, alebo poruchou vo vývoji filtra hornej pery (0,2 - 0,7 % všetkých prípadov rázštepov pery). Mediálny rázštep hornej pery býva niekedy spojený s VVCH mozgu – holoprosencephalia podmienenou napr. mutáciou génu pre *SHH*.

Druhou skupinou je izolovaný rázštep podnebia s frekvenciou 1 : 2 500 živonarodených. Je dvakrát častejší u žien ako u mužov. Podnebie vzniká zrastením primárneho podnebia s laterálnymi podnebnými platničkami, ktoré vyrastajú z maxilárnych výbežkov horizontálnym smerom v 8. týždni a zrastajú smerom spredu dozadu v 10. týždni. U plodov ženského pohlavia zrastajú približne o týždeň neskôr, a možno preto je rázštep podnebia častejší u žien.

Rázštepy pery a podnebia (spolu alebo izolovane) môžu byť:

- podmienené mutáciami v (najmenej desiatich) majoritných génoch (aj keď niektoré z nich sú ešte kandidátske), lokalizovaných na chromozómoch 1, 2, 3, 4, 6, 11 a 13;
- súčasťou fenotypu u viac ako 200 syndrómov – napr. Apertovom, Marfanovom a Larsenovom;
- súčasťou patologického fenotypu syndrómov súvisiacich s chromozómovými aberáciami, napr. trizómiou 13, 18 alebo 21, ale aj pri syndróme 49,XXXXY;
- jedným z dôsledkov pôsobenia špecifických škodlivých faktorov na vyvíjajúci sa zárodok a plod, ako sú napr. teratogény (napr. izotretinín a fenytoin) alebo mechanické strangulčné (útlakové) násilie (amniové pruhy);
- dôsledkom interakcie genetických a vonkajších faktorov (multifaktoriálna dedičnosť).

Najnovšie štúdie na základe analýzy DNA zistili predispozíciu k vzniku rázštepových chýb v závislosti od prítomnosti určitých alel v lokuse pre *TGF-alfa*. Na vzniku orofaciálnych rázštepov sa podieľajú nasledujúce skupiny génov:

- gény, ktoré sa exprimujú v určitej časti embrya alebo v určitom období vývoja palatinálneho oblúka, napr. gény pre transformujúci rastový faktor alfa a beta (*TGF alfa*, *TGF beta 2*, *TGF beta 3*);
- gény, ktoré majú biologickú aktivitu nepriamo spojenú s vývojom orofaciálnych štruktúr (napr. receptor pre retinovú kyselinu, receptor pre metyléntetrahydrofolát–reduktázu a receptor pre kyselinu listovú);
- gény alebo lokusy identifikované v pokusoch na zvieratách ako homeotické gény *MSX-1* a *MSX-2*;
- gény zahrnuté do interakcie s metabolizmom xenobiotík, napr. v P-450 cytochrómovom systéme.

Určenie etiológie má veľký význam pre stanovenie rizika rekurencie (opakovaného výskytu) v rodine.

Multifaktoriálne podmienená skupina tvorí podstatnú časť všetkých rázštepov pery a podnebia. Pri odhade rizika rekurencie musíme brať do úvahy aj zdravotný stav rodičov, ako aj počet už narodených postihnutých a zdravých detí v konkrétnej rodine. S pribúdajúcim počtom postihnutých detí v rodine sa zvyšuje pravdepodobnosť postihnutia, naopak s pribúdajúcim počtom zdravých detí klesá (tab. 7).

• **Tab. 7.** Riziko vzniku rázštepov pery a podnebia (CL/CP) a izolovaného rázštepov pery (CP) pre ďalšie dieťa v %

postihnutí	postihnutí	postihnutí	CL/CP	CP
------------	------------	------------	-------	----

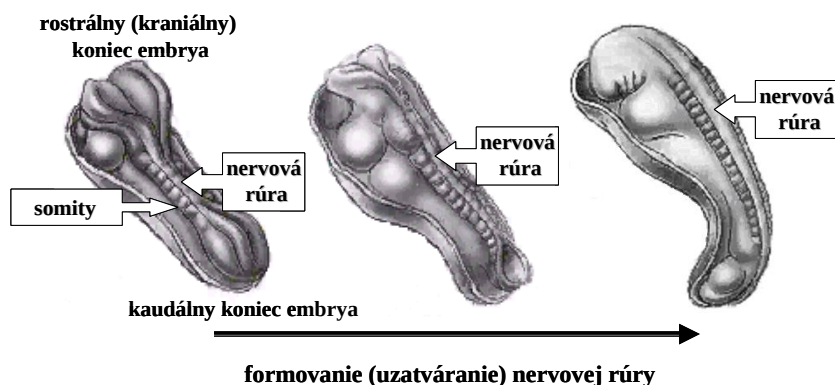
rodičia	súrodenci	príbuzní		
0	0	0	0.1	0.04
0	1	0	4	2
0	1	1	4	7
0	2	0	9	—
1	0	0	4	6
1	1	0	17	15

Na výšku rizika vplýva aj stupeň defektu a pohlavie pacienta. Z multifaktoriálneho modelu dedičnosti s prahovým efektom totiž vyplýva, že čím je ťažší stupeň defektu u pacienta, tým vyššia je v danej rodine predispozícia, čo zvyšuje pravdepodobnosť vzniku danej patológie (defektu) u ďalších potomkov. Podobný vplyv na výšku rizika má aj pohlavie pacienta.

Hodnoty empirického rizika sú v rôznych populáciách značne odlišné. Preto v genetickej konzultačnej činnosti treba vychádzať vždy z populácie, z ktorej pacient pochádza a výsledky iných populácií možno používať len s rezervou.

6.4.2 Rázštep nervovej rúry

Nervová rúra je za normálnych okolností úplne uzavretá okolo 28. dňa embryogenézy. Najskôr sa uzavrie približne v strede embryonálneho tela, neskôr jej uzatváranie pokračuje kaudálnym a kraniálnym smerom. Predný neuroporus sa uzavrie počas 25. až 26. dňa vývoja a asi o dva dni neskôr sa uzavrie aj zadný neuroporus (obr. 31).



• **Obr. 31.** Schéma postupu uzatvárania sa nervovej rúry

Ak nedôjde k uzáveru, vzniká rázštep nervovej rúry (*Neural Tube Defect* – NTD). Patria k nim, v poradí závažnosti anencefália, encefalokéla a spina bifida. V postihnutých rodinách sa často vyskytujú súčasne a predpokladá sa, že majú spoločný pôvod. Malá časť NTD (menej ako 10 %) má dokázateľnú príčinu:

- amniové pruhy;
- monogénová dedičnosť (napr. Meckelov syndróm – autozómovo recesívne dedičný, lokus je na 17q22–q23);
- syndrómy podmienené chromozómovou aberáciou (najmä trizómia 13, 18, triploidia);
- účinok niektorých teratogénov (napr. aminopterín, talidomid, kyselina valproová).

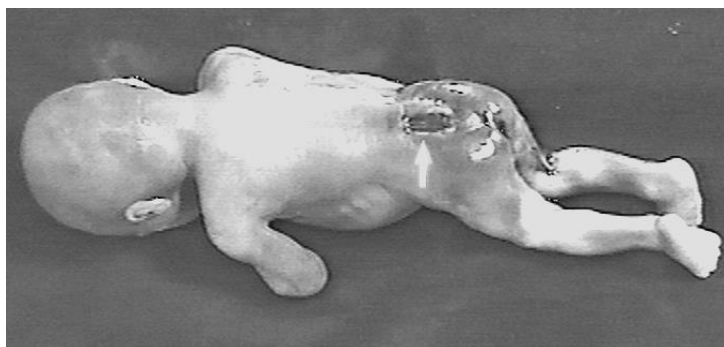
Anencefália je vrodená porucha vývoja, pri ktorej sa nevyvinie väčšia časť mozgu a chýba klenba lebky (obr. 32). Následkom tejto poruchy ostáva otvorená dutina medulárnej rúry na jej hlavovom konci. Postihnuté dieťa môže prežiť nanajvýš niekoľko hodín po pôrode (výskyt anencefalu pri samovoľných potratoch je 5-krát vyšší ako u novorodencov). Často sa vyskytuje v spojení so spinou bifidou (až v 17 %), rázštepom pery a podnebia (v 2 %), ale aj s inými malformáciami. Asi 2/3 postihnutých tvoria dievčatá.



• Obr. 32. Anencefalus

Cefalokéla (encefalokéla, kraniálna – okcipitálna meningokéla) je malformácia, pri ktorej je koža neporušená a cez defekt v lebečnej kosti sa vyklenuje mozog a jeho obaly. Výskyt je 0,3 - 0,6 : 1 000 živonarodených. Má multifaktoriálny typ dedičnosti, ale môže byť súčasťou monogénovo podmienených syndrómov (napr. Walker–Warburgov syndróm, autozómovo recesívne dedičný, lokus je na 9q31), ako aj výsledkom pôsobenia teratogénov. Táto porucha sa vyskytuje v kombinácii s ďalšími poruchami vývoja – hydrocefalom, spinou bifidou, mikrocefáliou atď.

Spina bifida (rachischíza, meningokéla, myelomeningokéla) je vývojová anomália, pri ktorej sa nevyvinú trňové výbežky a oblúk, a to buď pri jednom alebo viacerých susedných stavcoch. Kostný kryt miechy tak zostáva v strednej rovine otvorený (obr. 33). Nachádza sa najčastejšie v dolnej hrudníkovej, drienkovej alebo krížovej oblasti. Frekvencia výskytu spiny bifidy v ľudskej populácii je rôzna. Prejavujú sa tu geografické (od 0,3 v Japonsku do 4,1 v Južnom Walese na 1 000 novorodencov) a etnické rozdiely (častejšie sa vyskytuje u belochov, ako u orientálcov a černochoch). Okrem multifaktoriálnej dedičnosti býva súčasťou niektorých syndrómov monogénovo podmienených (napr. Meckelov sy.) a pri chromozómových aberáciách (trizómia 13 a 18, delécia v 22q11 a triploidia). Spina bifida je spojená aj s inými anomáliami CNS a dolných končatín.



• Obr. 33. Spina bifida

6.4.3 Pylorostenóza

Pylorostenóza je ochorenie je spôsobené hypertrofiou pylorického zvierača, ktorá obmedzuje otváranie vrátnika a vyprázdňovanie žalúdka. Obštrukcia sa lieči chirurgicky. Prejavuje sa v detstve zo začiatkom približne v 3. – 4. týždni života novorodenca. Na vysvetlenie vysokej incidence stenózy pyloru v niektorých rodinách sa vyvinul model multifaktoriálnej dedičnosti s prahovým efektom (tab. 8).

- **Tab. 8.** Incidencia pylorostenózy u potomkov pacienta v porovnaní s incidenciou vo normálnej populácii

Príbuzní	Riziko	Násobok populačného rizika
Synovia postihnutého muža	1:18	x 11
Dcéry postihnutého muža	1:42	x 24
Synovia postihnutej ženy	1:5	x 40
Dcéry postihnutej ženy	1:14	x 70

Pylorostenóza je asi 5-krát častejšia u chlapcov ako u dievčat (chlapci 5 : 1 000, dievčatá 1 : 1 000 novorodencov uvedeného pohlavia).

Potomkovia postihnutej ženy majú vyššiu priemernú predispozíciu k pylorostenóze ako potomkovia postihnutého muža. Prah pre vznik znaku je nižší u chlapcov ako u dievčat, a preto, bez ohľadu na to, či sa chorobný stav dedí od otca alebo od matky, majú synovia väčšiu pravdepodobnosť ako dcéry, že sa u nich daná porucha prejaví. Najvyššie riziko majú synovia postihnutých matiek (cca 20 %). Toto je vzorový príklad toho, že významným epigenetickým faktorom je aj hormonálne „pozadie“ organizmu. Pre toto uprednostňujeme pojem „epigenetický“ pred „faktory prostredia“.

6.4.4 Pes equinovarus

Pes equinovarus je flexia spojenia kostí nohy (clubfoot) alebo ruky (clubhand) v kĺbovom puzdre (obr. 34). Incidencia je 1,2 : 1 000 živonarodených. Je to najčastejšie sa vyskytujúca sa deformita nôh. Môže byť jednostranná alebo obojstranná. Pomer chlapcov a dievčat je 2 : 1. Pes equinovarus môže byť podmienený genetickými ale aj epigenetickými faktormi. Môže tu byť aj genetická predispozícia menejcennosti ligamentózneho aparátu kĺbu. Ďalšie kongenitálne ochorenia, ako napr. skeletálne dysplázie (porucha vývoja alebo rastu), končatinové redukčné chyby alebo anomálie CNS (spina bifida), bývajú často asociované s pes equinovarus. Faktory „vonkajšieho prostredia“, ale aj nedostatok priestoru v maternici (oligohydramnion – znížené množstvo plodovej vody, syndróm amniových pruhov a septá a nádory maternice), môžu tiež byť príčinou tejto vývojovej anomálie. Pes equinovarus je súčasťou aj viacerých geneticky podmienených syndrémov (napr. Ecsobarov sy, Meckel–Gruberov sy., trizómie chromozómov 13 a 18).



• **Obr. 34.** Pes equinovarus

6.4.5 Vrodené vývojové chyby srdca

Vrodené vývojové chyby srdca sú u nás druhou najčastejšou vývojovou chybou u detí. Môže ísť o:

- skratové chyby, pri ktorých sa mieša okysličená a odkysličená krv, napr. otvorené spojky medzi pľúcnicou a aortou, ako aj skraty na úrovni priehradkových otvorov (predsiene a komôr)
- bezskratové chyby, pri ktorých nedochádza k zmiešavaniu okysličenej a odkysličenej krvi. Najčastejšie sa jedná o prítomnosť tzv. koarktácie aorty, teda zúženie najväčšej tepny ľudského tela, srdcovnice.

Fallotova tetralógia je charakterizovaná štvoricou vývojových chýb – stenózou truncus pulmonalis (zúženie pľúcnej tepny), defektom medzikomorovej prepážky, transpozíciou aorty a hypertrofiou pravej komory. Vyskytuje sa aj pri trizómii chromozómu 21 (3 - 4 % prípadov). Incidencia 2,5 - 3,5 : 10 000 živonarodených, predstavuje 4 -7,5 % všetkých vývojových chýb srdca.

Navonok sa prejavuje paličkovitými prstami, namodralou kožou (tzv. cyanózou), čo svedčí o zlom okysličovaní krvi. Deti majú plytký dych, bývajú nadmerne unavené. Vzniká aj hypertenzia a hypertrofia pravej komory, čo môže viesť k ťažkým poruchám srdcového rytmu. Keďže mozog nie je dostatočne okysličovaný, dochádza k následnému poškodeniu vývoja dieťaťa.

Jediným riešením je chirurgický zákrok, bez operácie prežíva do 20 rokov života 10 %, do 40 rokov života len 3 % postihnutých. Výsledok liečby je najlepší, ak sa operácia uskutoční ešte pred dovŕšením 12. roku.

Ductus arteriosus – spojka medzi pľúcnicou a zostupnou aortou, krv plodu touto spojkou obchádza pľúcnou cirkuláciou, za normálnych okolností sa uzatvára krátko po narodení. Otvorený ductus arteriosus je jednou z najčastejších anomálií veľkých ciev (výskyt 1 : 3 000 živonarodených detí) a môže sa vyskytovať izolovane alebo v spojení s inými vývojovými chybami srdca. Trvalo otvorený ductus arteriosus spôsobí, že krv z aorty prúdi do pľúcnic, preto sa zvýši tlak v pľúcach a následne hypertrofuje svalovina pravej komory. Je potrebný chirurgický zákrok.

Defekt predsieňového septa – u 25 až 30 % ľudí zostáva vo foramen ovale (otvor medzi pravou a ľavou predsieňou vo fetálnom období, za normálnych okolností sa uzatvára v prvých minútach po narodení) malý otvor, ktorý však nespôsobuje funkčné poruchy. Zriedkavejšie býva tento otvor oveľa väčší a vtedy okysličená krv z ľavej predsieňe preteká týmto otvorom do pravej predsieňe. Tento návrat krvi spôsobuje preťaženie pravej strany srdca. Často sa vyskytuje spolu s inými vážnymi vrodenými vývojovými chybami, ako napr. stenóza pulmonálnej chlopne alebo transpozícia aorty. Niekedy sa nevytvorí celé predsieňové septum.

Defekt komorového septa sa vyskytuje zriedkavejšie ako poruchy predsieňového septa. Otvory v septe bývajú oválne alebo okrúhle, v priemere 1 - 2 cm veľké. Následkom tejto chyby je, že krv prúdi z ľavej komory do pravej. Spôsobuje to rozšírenie pravej komory. Chýbanie celého interventrikulárneho septa je zriedkavé.

Doplňujúca študijná literatúra

NUSSBAUM, R. L. – MCINNES, R. R. – WILLARD, H. F.: Klinická genetika. 6. vydání. Praha: Triton 2004, 426 s.

SRŠEŇ, Š. – SRŠŇOVÁ, K.: Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata. 4., prepracované a rozšírené vydanie. Martin: Osveta 2005, 446 s.

7 MUTAGENÉZA A TESTOVANIE POTENCIÁLNYCH MUTAGÉNOV

Dohodou odbornej genetickej verejnosti bolo pôvodne ustanovené pravidlo, že sa interpersonálne rozdiely v sekvencii dusíkových báz budú nazývať podľa ich frekvencie (početnosti výskytu) v populácii. Ak sa zmenená sekvencia (alelový variant) vyskytuje u 1 % a menej jedincov v populácii – označovala sa pojmom mutácia (náhla zmena sekvencie, množstva alebo usporiadania genetickej informácie). Ak sa odchýlka vyskytovala u viac ako 1 % – nazývala sa polymorfizmus. To, či ovplyvnila zdravotný stav sa v tomto prípade nebralo do úvahy.

V súčasnej ére personalizovanej genomiky sa definícia týchto pojmov modifikovala. Pojmy „mutácia“ a „polymorfizmus“, ktoré sa však široko používajú, často vedú k zmätku z dôvodu nesprávnych predpokladov ich patogénnych a benígnych účinkov. Preto sa obidva výrazy nahradili výrazom „variant“.

Existuje päťstupňový systém klasifikácie variantu: 1. patogénny, 2. pravdepodobne patogénny, 3. neistý, 4. pravdepodobne benígny a 5. benígny variant.

Pre zjednodušenie budeme používať staršie označenie, aby sme sa vyhli nesprávne pochopeniu pojmov.

Polymorfizmus je zmena v genetickej informácii, ktorá sa vyskytuje u viac ako 1 % populácie (nezávisle od toho, či vyvoláva klinické prejavy alebo nie). DNA polymorfizmy sa môžu nachádzať v nekódujúcich aj v kódujúcich oblastiach DNA.

Zopakujeme si, že DNA polymorfizmy delíme podľa rozsahu na bodové a na hypervariabilné oblasti.

Bodové DNA polymorfizmy sa často týkajú jednej bázy (SNP – *single nucleotide polymorphism*) alebo niekoľkých dusíkových báz, a to najmä v kódujúcich oblastiach. V klinickej genetike ich delíme na:

- **normálne** – nevyvolávajú ochorenie alebo patologický stav. U väčšiny z nich v dôsledku „degenerovanosti“ genetického kódu zmenený triplet kóduje tú istú aminokyselinu. Oveľa zložitejšia je situácia, ak dôjde k zmene poradia alebo počtu báz a výsledkom je zmena kódovanej aminokyseliny. Tu funkčné dôsledky závisia od polohy kódovanej aminokyseliny v bielkovine (blízkosti k jej aktívnemu miestu) a jedná sa o tzv. izoproteíny a izoenzy.
- **patogénne** – vedú k vzniku ochorenia alebo patologického stavu. Dôsledkom je zmena kódujúcej aminokyseliny, ktorá spôsobuje stratu funkcie výslednej bielkoviny.

Diagnostika bodových polymorfizmov závisí od miesta, kde sa nachádzajú. Ak zmena zruší alebo na inom mieste vytvorí palindróm – možno použiť RFLP (napr. pri kosáčikovej anémii). Najčastejšie sa však používajú metódy sekvenovania DNA, ktoré umožňujú presne rozpoznať typ a miesto chyby v poradí dusíkových báz.

U **hypervariabilných oblastí DNA** sa jedná o rôzny počet opakovaní určitého motívu. Môžu byť unikátne ale aj časté, rôznej dĺžky motívov a počtu ich opakovaní – s medzerami alebo tesne za sebou (tandemové opakovania). Zvyčajne sú lokalizované mimo kódujúcich oblastí DNA, ale môžu sa nachádzať aj v génoch (napr. niektoré z CpG trinukleotidov). Obdobne ako predchádzajúci typ, ich v klinickej genetike delíme na:

- **normálne**, ku ktorým patria najmä tandemové opakovania nachádzajúce sa v nekódujúcich oblastiach (tzv. markery).
- **patogénne**, pri ktorých nárast počtu tandemových opakovaní navodzuje ochorenie alebo patologický stav. Typickým príkladom sú „expandujúce“ CpG trinukleotidy v etiológii fragilného chromozómu X, Huntingtonovej chorey (CAG), myotonickéj dystrofie (CTG) a pod. (tab. 9). Napríklad syndróm fragilného chromozómu X (FRAXA – *fragile X syndrome*, Xq27.3) je najčastejšou príčinou dedičných mentálnych retardácií. U mužov je okrem retardácie predĺžená tvár, vystupujúce čelo a veľké ušnice. U žien sú príznaky

ochorenia menej závažné. FRAXA je spôsobený expanziou trinukleotidových CGG repetícií, ktoré sa nachádzajú v 5'-UTR oblasti génu *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*). Expanzia tripletov je spojená s metyláciou cytidín-fosfát-guanozínových dinukleotidov, tzv. CpG ostrovčekov, ktoré sa nachádzajú 250 párov báz od (CGG)_n a ich metylácia má za následok inaktiváciu génu *FMR1*. Tým dôjde k zbaleniu štruktúry chromatinu a euchromatín sa zmení na neaktívny heterochromatín. V normálnej populácii je počet CGG repetícií v rozmedzí 5 - 54. Jedinci s počtom CGG repetícií 55 - 200 sú nosiči premutačnej alely. Tieto premutácie nie sú spojené s metyláciou CpG ostrovčekov, ale sú nestabilné počas meiózy a môžu v ďalších generáciách expandovať do plnej mutácie. Pacienti s viac ako 200 opakovaniami nesú plnú mutáciu, ktorá je spojená s metyláciou CpG ostrovčekov.

• **Tab. 9.** Choroby zapríčinené trinukleotidovou expanziou

Choroba	Lokalizácia	CpG	Počet
Huntingtonova ch.	gén	CAG	9 – 35
Kennedyho ch.	gén	CAG	17 – 24
Spinocerebrálna ataxia 1	gén	CAG	19 – 36
Spinocerebrálna ataxia 3	gén	CAG	12 – 36
FRAXA	5'UTR	CGG	6 – 54 (200 <)
Myotonická dystrofia	3'UTR	CTG	37 – 50 (50 <)

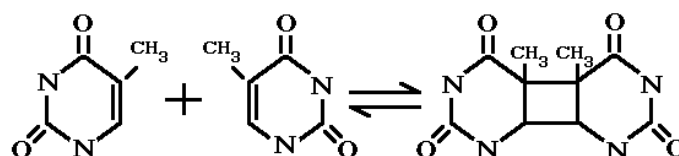
Diagnostika počtu opakovaní („dĺžky“ úseku) sa vykonáva najmä pomocou metód VNTR a PCR, často ich kombináciou.

7.1 Mutagenéza

Mutácia je náhla zmena kvality, kvantity alebo usporiadania genetickej informácie. Od miesta, kde nastala, od jej typu a od jej dôsledkov závisí, či sa replikuje a či sa fenotypovo prejaví. Terminologická genetická komisia definuje pojem mutácia ako „zmenu v nukleotidovej sekvencii génomu, ktorá spočíva v substitúcii, delícii alebo inzercii“.

Pojem **mutant** (nositeľ mutácie) nadobúda rôzny rozmer. Klasicky – v experimentoch na modelových organizmoch (napr. *Drosophilla melanogaster*), je mutant jedinec, u ktorého sa mutácia prejaví vo fenotype. V genetike človeka sa pod pojmom mutant chápe jedinec, ktorý má pre daný lokus takú alelu (alely), ktorá sa prejaví zmenou fenotypu. Príklady takto podmienených ochorení sú uvedené v kapitole 4 o monogénovej dedičnosti.

Mutagény sú faktory fyzikálnej, chemickej alebo biologickej povahy, ktoré možno dať do súvisu so vznikom mutácie. K **fyzikálnym** patria najmä rôzne typy žiarenia, ktorých účinky závisia od mechanizmu pôsobenia, intenzity, dávky a dĺžky expozície. Účinkom röntgenového alebo rádioaktívneho žiarenia dochádza k ionizácii báz alebo k tvorbe hydroxylových radikálov z vody, ktoré reagujú s DNA bázami a menia ich štruktúru. Gama žiarenie spôsobuje štiepenie N-glykozidovej a fosfodiesterovej väzby v reťazci DNA, pri veľkých dávkach až zlomy a následné prestavby chromozómov. Ultrafialové žiarenie spôsobuje v DNA reťazci tvorbu pyrimidínových – najmä tymínových dimérov cyklobutánového typu, ktoré vznikajú cyklizáciou dvoch susedných tymínov (obr. 35). Tymínový dimér bráni replikácii a transkripcii.



• **Obr. 35.** Tymínový dimér

Chemické mutagény sú širokou skupinou látok. Mechanizmy ich účinku sú veľmi rozmanité, od alternatívnych báz až po degradáciu DNA. Podľa mechanizmu účinku sa chemické mutagény delia do troch skupín:

- **látky, ktoré priamo poškadzujú DNA** – chemické látky, ktoré modifikujú štruktúru DNA. Napríklad deamináciou cytozínu (odstránenie NH_2 skupiny) vzniká uracil, ktorý sa páruje s adenínom namiesto guanínu alebo sa začlenia priamo do DNA a spôsobia posun v čítaní genetického kódu (kyselina dusitá, hydroxylamín, alkylačné látky a akridínové farbivá);
- **analógy dusíkových báz** – sú chemikálie, ktoré majú podobnú chemickú štruktúru ako dusíkaté bázy nachádzajúce sa v primárnej štruktúre DNA. Ak sú prítomné počas replikácie DNA, môžu byť zaradené do polynukleotidového reťazca (napr. 5-brómuracil, 2-aminopurin);
- **látky, ktoré znižujú aktivitu reparačných enzýmov** (napr. kofeín u baktérií).

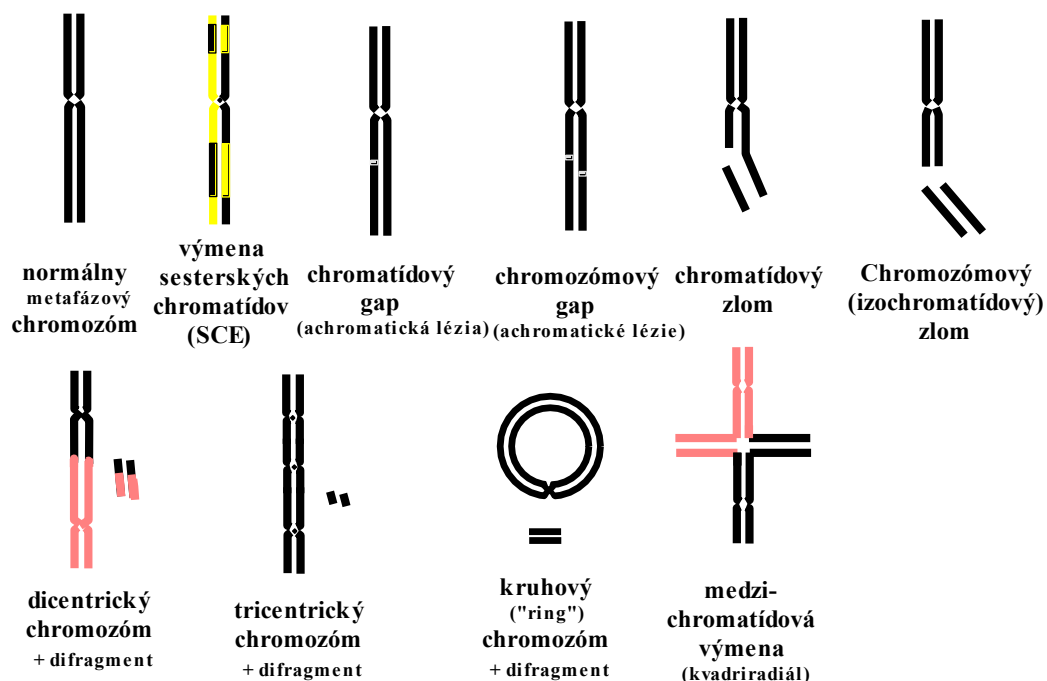
Za **biologické** mutagény možno považovať napríklad rôzne mobilné genetické elementy, ktoré sa môžu náhodne včleniť do kódujúcej oblasti génu a vyvolať inzerčnú mutáciu, napr. LINE-1 do génu *F8* u hemofilie A a provírusy z retrovírusov.

7.2 Klasifikácia mutácií

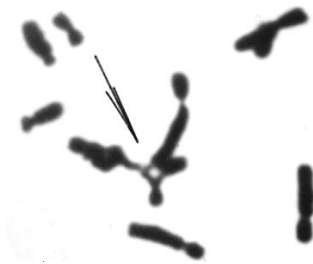
Pre hodnotenie mutácií je dôležité posúdiť:

- **vlastnosti mutagénov;**
- **mechanizmy, ktorými mutácie vznikajú** – pri tzv. **spontánných** mutáciách nie je známa príčina ich vzniku. Každý ľudský gén má pravdepodobnosť 1×10^{-5} až 10^{-10} , že počas jednej generácie zmutuje. Zároveň s identifikáciou nových verzií alel sa okamžite počíta ich populačná frekvencia, čiže ich výskyt v genofonde. **Dominantné mutácie** vznikajú najčastejšie *de novo*. Závažne postihujú jedinca a zväčša sa nedostanú do genofondu, nakoľko je proti nim silná selekcia. **Recesívne mutácie** sa prenášajú cez heterozygotov a postihnutí recesívni homozygoti sa vyskytujú zriedkavo (5 - 10 na 10 000 novorodencov). Pri **indukovaných** mutáciách je známa príčina ich vzniku a sú podmienené fyzikálnym, chemickým alebo biologickým mutagénom (napr. v experimente). V testoch potenciálnych mutagénov je potrebné preukázať, že študovaný faktor štatisticky významne zvyšuje frekvenciu výskytu mutácií u modelového organizmu (systému) alebo zvyšuje závažnosť „spontánne sa vyskytujúcich“ mutácií;
- **faktory, ktoré ovplyvňujú pôsobenie mutagénov**, napríklad cesta, ktorou sa dostanú do tela, ich detoxikácia a metabolizmus;
- **kapacitu a podmienky pre pôsobenie reparačných mechanizmov**, ktoré poškodenie opraví, alebo mutácia pretrvá;
- **miesto zásahu a typ mutácie** – ak vznikne **mutácia v nekódujúcej oblasti** a neporuší sa integrita molekuly DNA, dôsledky sa nemusia fenotypovo prejaviť a pozorujeme len zmenu polymorfizmu DNA. Ak je zasiahnutá **regulačná oblasť** génu, môže nastať overexpresia – zvýšenie intenzity transkripcie alebo naopak jej zníženie, až zastavenie. **Mutácie kódujúcich oblastí** (exónov) sa prejaví, ak sú nad rámec „degenerácie“ genetického kódu a delíme ich na bodové a posunové. **Bodová mutácia** je zámena jednej alebo viacerých báz, ktorej dôsledkom je zmena tripletu. Následne je priradená iná aminokyselina alebo vzniká stop-kodón. Fenotypový prejav závisí od stupňa odlišnosti mutovaného produktu (proteínu) od pôvodného (napr. pri kosáčikovitej anémii). **Posunové mutácie** vznikajú ako dôsledok včlenenia (inzercie) alebo straty (delécie) jednej alebo viacerých báz. Výsledkom je posun v čítaní genetického kódu ako napr. mikrolečné syndrómy, Duchennova a Beckerova muskulárna dystrofia. Obdobný efekt vzniká, ak je pri replikácii „použitý analóg dusíkovej bázy“, ktorý RNA polymeráza pri transkripcii nepozná a „preskočí ho“, čím dochádza k posunu čítacieho rámca. Toto sa už viac desaťročí používa pri chemoterapii rakoviny;

- **fenotypové dôsledky vzniku mutácie pre bunku** – ak mutácia zasiahne gén nevyhnutný pre existenciu bunky, bunka zaniká nekrózou alebo apoptózou. Pri mutácii génov, ktoré sa podieľajú na regulácii bunkového cyklu sa môže navodiť malígna transformácia bunky. Pri mutácii pre bunku menej esenciálneho génu, vzniká aberantný proteín, ktorý môže, ale nemusí ovplyvniť fenotypové prejavy v bunke a organizme. Ak sa mutácia neprejaví vo fenotype hneď po svojom vzniku, hovoríme o tzv. **odloženej mutácii**. Príkladom je retinoblastóm, ktorý v bunke vznikne až ďalšou mutáciou (zásahom – krokom), pri ktorej bunka stratí aj druhú funkčnú alelu, čím nastane strata heterozygotnosti (LOH – *loss of heterozygosity*);
- **typ buniek, v ktorých nastala mutácia** – pri **gametických** mutáciách (zdedených alebo vzniknutých *de novo*), ju obsahujú všetky bunky jedinca, ktorý vznikol po fertilizácii takouto mutovanou pohlavnou bunkou. Pri **somatických** mutáciách dôjde k zásahu v izolovanej telovej bunke, pričom sa mutácia prenáša len na bunky vzniknuté jej delením a vzniká klon mutovaných buniek. Fenotypové dôsledky somatickej mutácie sú rozmanité – od nulových prejavov až po malígnu transformáciu alebo zánik bunky. Rádioterapia nádorov je príkladom zámerného vyvolania masívnych mutácií v bunkách nádoru, ktoré aktivujú mechanizmy spúšťajúce apoptózu, tj. proces tichej bunkovej smrti;
- **rozsah genetického materiálu, ktorý je zasiahnutý** – podľa tohto delenia rozlišujeme mutácie genómové, chromozómové a génové. **Genómové mutácie** sa v klinickej genetike nazývajú numerické aberácie a sú to zmeny počtu celých sád alebo jednotlivých chromozómov. Podrobnosti o mechanizme ich vzniku a dôsledkoch sú uvedené v kapitole 9.1. **Chromozómové mutácie** (tzv. štruktúrne aberácie) sú zmeny v štruktúre, teda organizácii stavby chromozómov sú uvedené v kapitole 9.2. Pri testovaní mutagénov sa stretávame s rôznymi typmi porúch chromozómov (obr. 36 až 38). **Génové** (bodové) **mutácie** sú zmeny v DNA na úrovni jedného alebo niekoľkých nukleotidov (delécie, adície, substitúcie, inverzie a posuvné mutácie).



• **Obr. 36.** Schéma typov chromozómových mutácií, po pôsobení mutagénov



• **Obr. 37.** Reunionkomplex



• **Obr. 38.** Chromozómový zlom

Delícia – strata báz (v rozsahu od 1 bázy a až do megabáz). Sú časté v nekódujúcich oblastiach, zriedkavé v kódujúcich. Najjednoduchšou je strata jednej bázy (napr. GATC → GTC), ktorá vyvolá posunovú mutáciu.

Adícia (inzercia) – je vsunutie jednej alebo niekoľkých báz (napr. GATC → GGATC). Sú veľmi bežné v nekódujúcich oblastiach a zriedkavé v kódujúcich oblastiach. Spôsobujú posunové mutácie. Do DNA sa môže včleniť aj iná, podstatne dlhšia DNA sekvencia, napríklad mobilný genetický element. V tomto prípade ide o **duplikáciu** (napr. GATC → GAGATC) alebo **expanziu** – zmnoženie uceleného motívu báz napr. CpG ostrovčeka pri nestabilnom opakovaní trinukleotidov CAG CAG CAG → CAG CAG CAG CAG CAG, čo je príčinou už spomínaných závažných chorôb.

Substitúcia – záměna báz (napr. GATC → CATC). Ak sa zamení purín za purín, resp. pyrimidín za pyrimidín ide o **tranzíciu**. V prípade záměny purínu za pyrimidín a opačne ide o **transverziu**. Substitúcie sa podľa dôsledku rozdeľujú na:

- **nemeniace zmysel (*silent*)** – v dôsledku degenerácie genetického kódu nedôjde záměnou báz k zmeňe aminokyselín, pretože niektoré aminokyseliny môžu byť kódované viacerými variantmi tripletov. Najčastejšie dochádza k záměne tretej bázy v triplete, pretože rozhodujúce bázy pre zaradenie aminokyseliny sú prvé dve bázy.

Napr. UAU → UAC
Tyr → Tyr

- **meniace zmysel (*missense*)** – záměnou jedinej bázy sa zmeňí kodón a dôjde k záměne aminokyseliny za inú.

Napr. UAU → UCC
Tyr → Ser

- **nezmyselné (*nonsense*)** – najzávažnejším typom mutácie je zmeňa kodónu pre aminokyselinu na stop-kodón, pretože dôjde k skráteniu bielkovinového produktu. Naopak k predĺženiu produktu dôjde vtedy, ak sa nahradí stop-kodón tripletom pre aminokyselinu. Takýto produkt končí až ďalším stop-kodónom.

Napr. UAU → UAA
Tyr → STOP

- **mutácie v mieste zostrihu (*splice site*)** – mutácia vznikne na rozhraní exónu a intrónu, čím dôjde k nesprávnemu vystrihnutiu intrónu. Môžu vznikať v konzervovaných dinukleotidoch GU na 5'-mieste zostrihu a dinukleotidoch AG na 3'-mieste zostrihu, alebo v sekvenciách, ktoré tieto dinukleotidy obklopujú. Tieto dinukleotidy sú dôležité pre rozpoznanie exónu a správny zostrih. Príkladom ochorenia spôsobeného mutáciou v zostrihovom mieste génu *ATP7A* je Menkesova choroba, tiež známa ako choroba

kučeravých vlasov. Dedičnosť je viazaná na X-chromozóm (Xq13.3). Väčšinu pacientov tvoria muži, pretože na rozdiel od žien majú len jeden chromozóm X. Gén *ATP7A* kóduje Cu-transportujúcu adenosín trifosfatázu (ATPázu). Bunky sú schopné med' zadržať, ale med' nie je schopná bunky opustiť a nemôže byť dopravená ku kľúčovým enzýmom, ktoré ju potrebujú pre normálne fungovanie. Tým bunky črevnej sliznice nedokážu prenášať med' do krvného obehu, čo sa prejaví v 2. - 3. mesiaci u novorodenca neurodegeneráciou, hypotóniou a charakteristickými kučeravými vlasmi. Pacienti umierajú už v skorom detstve.

Inverzia – otočenie poradia báz o 180° (napr. *GATC* → *GTAC*)

Posunová mutácia (*frameshift*) – dôsledkom delécie, inzercie alebo inverzie jedného alebo dvoch nukleotidov (nie troch alebo ich násobku), je posun v čítaní genetického kódu a zmena poradia aminokyselín.

Súčasná medzinárodná nomenklatúra určuje jednotné pravidlá na opis typu a pozície mutácie. Pôvodný gén sa označuje z angličtiny termínom **wild-type** (divý typ). Aminokyseliny sa označujú veľkým písmenom, napr. K je lyzín, L je leucín, G je glycín, R je arginín a X je stop-kodón. Prípadne sa používajú aj trojpísmenové symboly, napr. Arg (arginín) a His (histidín). Poradie aminokyselín sa počíta od N-konca molekuly proteínu a dusíkovej bázy od adenínu na začiatku štart tripletu. Príklady:

G52R alebo *Gly52Arg* – v poradí 52. aminokyselina glycín sa zmenila na arginín
K320X – v poradí 320. aminokyselina sa z pôvodného lyzínu zmenila na stop-kodón
nt400(C→G) – v poradí 400. cytozín sa zamenil za guanín
nt5445(del4) – delécia štyroch nukleotidov od pozície 5445
ΔF508 – delécia kodónu pre fenylalanín v pozícii 508
nt317(insA) – adenín sa začlenil po nukleotide na pozícii 317

Genómové aj chromozómové mutácie sa analyzujú cytogenetickými metódami. Génové mutácie sa analyzujú predovšetkým metódami molekulovej biológie.

7.3 Využitie mutagenézy pri objasnení funkcie génu

Pri analýze sekvencií ľudského genómu sa ešte aj v súčasnosti objavujú gény s neznámou funkciou. K objasneniu funkcie proteínu nepostačuje znalosť nukleotidovej sekvencie génu a trojrozsmernej štruktúry proteínu. Pomerne veľa proteínov (najmä tie, ktoré sú súčasťou multienzymových komplexov) nemá žiadnu samostatnú aktivitu, naopak niektoré, ako sú napr. kinázy a molekulové motory sa zúčastňujú v bunke na viacerých procesoch.

Na objasnenie úlohy určitého génu sa konštruujú jeho mutanty, ktorým sa znefunkční iba jeden proteín, čím sa dá odhaliť jeho funkcia. Najvýhodnejšie je sledovanie mutantov, ktoré produkujú proteín, ktorý je funkčný len pri konkrétnej teplote. Takéto proteíny sa dajú ľahko inaktivovať zmenou teploty.

Techniky rekombinantných DNA molekúl umožňujú pozmeniť gén v *in vitro* podmienkach, vrátiť takýto zmutovaný gén naspäť do pôvodného organizmu a sledovať jeho funkciu. Tieto techniky umožňujú zmeniť kódujúcu sekvenciu génu, čím vznikne čiastočne funkčný alebo nefunkčný proteín, prípadne jeho regulačnú oblasť, čím sa zmení množstvo proteínu.

Organizmy, ktoré obsahujú gény upravené rekombinantnými technikami sa nazývajú **transgénné organizmy**. Najčastejšie sa využívajú haploidné organizmy (baktérie, kvasinky), kde sa dá gén nahradiť, vyradiť (*knock out* technika) alebo pridať. Oveľa zložitejšie je nahradiť gén v diploidnom organizme napr. u myši, preto sa gény zavádzajú do zárodočných buniek, čím sa zabezpečí, že aspoň časť potomstva bude mať trvale integrovaný mutovaný gén. Podobné techniky sa začínajú využívať v génovej terapii.

Riadenou mutagenezou sa dá v proteíne zmeniť jednu alebo niekoľko aminokyselín. Touto technikou sa dá zistiť, ktorá časť polypeptidového reťazca je dôležitá pre tvorbu kvartérnej štruktúry, interakciu proteínu s ligandom, prípadne enzýmovú katalýzu.

7.4 Testy potenciálnych mutagénov

Jednou z priorít ochrany a tvorby životného prostredia je včasné určenie a odstránenie látok, ktoré môžu mať nepriaznivé účinky na človeka a celé ekosystémy. Faktory vonkajšieho prostredia, ktoré predstavujú genetické riziko, sú predmetom testovania. Všetky chemické látky, ktoré sa používajú v bežnom živote a v hospodárskej praxi prechádzajú veľmi prísny testovacím systémom.

V experimentálnej genetike a pri testovaní mutagénov sa organizmus, ktorý nesie mutáciu nazýva mutant (mutantný typ). Štandardom pre porovnanie je tzv. divý typ, t.j. forma, aká sa nachádza u organizmov v prírode. Toto rozdelenie je relatívne. Mutácia smerom od divého k mutantnému typu sa nazýva **priama mutácia** a mutácia opačného smeru **spätná mutácia**. Spätné mutanty čiže jedince, ktoré opakovanou mutáciou obnovia normálny fenotyp, sa nazývajú revertanty.

Toxikológia sa zaoberá testovaním faktorov vonkajšieho prostredia, ktoré môžu mať škodlivé účinky na bunku a organizmus. Jej súčasťou sú aj experimentálne testy potenciálnych mutagénov. Pri nich je nevyhnutné preukázať, že skúmaný faktor, v presne definovaných podmienkach, spôsobuje v modelovom systéme signifikantný (štatisticky významný) nárast počtu mutácií, v porovnaní s ich známym spontánnym výskytom.

Neexistuje univerzálny testovací objekt, ani metodika, ktoré by umožnili zistiť všetky typy mutácií. Preto sa používa široká škála testov a rôzne biologické modely, ako sú vírusy, baktérie, kvasinky, rastliny, hlodavce, cicavčie bunky, ľudské bunky, atď.. Výsledkom je stanovenie výšky rizika študovaného faktora pre človeka, ktorý je vystavený jeho účinkom.

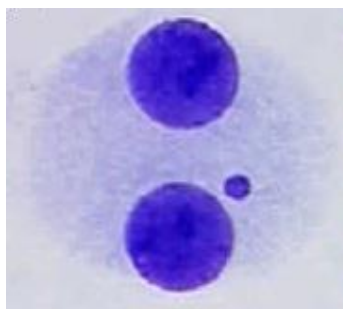
Medzinárodne uznávané všeobecné **kritéria pre testovanie mutagénov** vyžadujú:

- **vysokú citlivosť** – nesmú poskytovať falošne negatívne ani pozitívne výsledky. Je potrebné preukázať vzťah dávka – efekt, čiže nárast počtu mutácií (alebo ich závažnosti), so zvyšovaním dávky testovaného faktora;
- **sledovanie a hodnotenie všetkých typov genetických poškodení** – testy odhaľujú možné génové, chromozómové a genómové mutácie;
- **testy musia byť presne metodicky definované a opakovateľné** – pri použití rovnakého modelu, podmienok vykonania, dávkovania a vyhodnotenia sa musia výsledky (kdekoľvek bol test vykonaný) zhodovať;
- **testy musia, po konečnom zhodnutí, slúžiť na odhadnutie rizika pre človeka.**

Testy na detekciu potenciálnych mutagénov rozdeľujeme na povinné, overovacie a doplnkové.

Povinné testy, sa vykonávajú napríklad u novo syntetizovaných látok, pri registrácii liečiv a pod. Sú to:

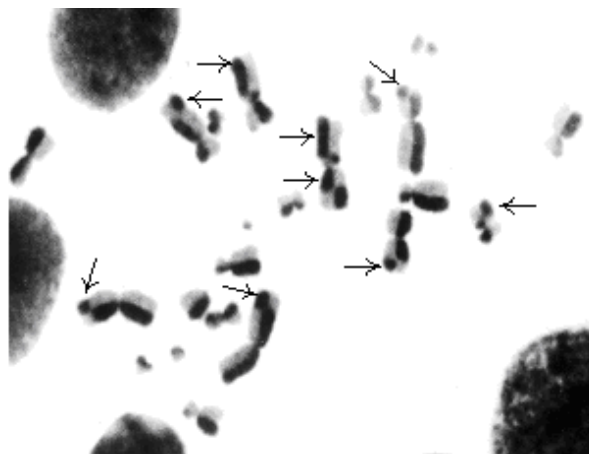
- **testy na génové mutácie**, ktoré sa robia na baktériách (napr. *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*), kvasinkách (napr. *Saccharomyces cerevisiae*) a vlných muškách (napr. *Drosophila melanogaster*);
- **testy na chromozómové aberácie** – po aplikácii testovaného faktora modelovému systému sa jeho účinok sleduje cytogenetickou analýzou deliacich sa buniek kostnej drene laboratórnych zvierat (najmä čínskych škrečkov a myši) a na kultivovaných lymfocytoch periférnej krvi. Často sa vykonáva mikrojadrový test (obr. 39) na kultivovaných zvieraciach a ľudských bunkách;
- **reparačné testy** na detekciu poškodenia a opravy DNA. Ako modelové organizmy sa používajú najčastejšie baktérie (*Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli*).



• **Obr. 39.** Výsledok mikrojadrového testu

Overovacie testy sa robia vtedy, ak nebola použitá celá sada povinných testov alebo ak aspoň jeden z nich priniesol pozitívny výsledok. Patria k nim testy na detekciu a opravu DNA, testy na génové mutácie v cicavčích bunkách a testy prenosných translokácií u myší a škrečkov.

Doplňkové testy slúžia na zistenie podrobností o vlastnostiach a účinku mutagénu. Patria sem napríklad dominantný letálny test (na drozofilách), test na abnormalitu spermií (zvieracích aj ľudských), výmena sesterských chromatídov (obr. 40) a test mitotickej rekombinácie na *in vitro* kultivovaných bunkách.



• **Obr. 40.** Výmeny sesterských chromatídov

V každom teste musia byť modelové bunky alebo organizmy rozdelené do nasledovných skupín – skupiny s rôznym dávkovaním testovanej látky (obvykle tri), negatívna kontrola (aplikuje sa len rozpúšťadlo) – slúži na zistenie prípadného ovplyvnenia pokusu neznámym faktorom a pozitívna kontrola (podáva sa známy mutagén) – na overenie reaktivity genetického materiálu modelového systému.

Doplňujúca študijná literatúra

ALBERTS, B. – BRAY, D. – JOHNSON, A. – LEWIS, J. – RAFF, M. – ROBERTS, K. – WALTER, P.: Základy bunčnej biológie. Úvod do molekulárnej biológie bunky. 2. vydanie. Ústí nad Labem: Espero Publishing 2005, 740 s.

8 GAMETOGENÉZA

Gametogenéza, ako proces vytvárania a vývoja špecializovaných pohlavných buniek z prapohlavných buniek, je základom pohlavného rozmnožovania.

V priebehu gametogenézy **dochádza k zníženiu počtu chromozómov** na polovicu, čím sa zachováva objem genetickej informácie pri pohlavnom rozmnožovaní. Gametogenéza zároveň zabezpečuje **vytváranie nových genetických kombinácií** (každý jedinec, s výnimkou jednovajčkových dvojčiat, má prakticky **neopakovateľnú kombináciu alel a foriem znakov**). Takto podmienená genetická variabilita umožňuje **prežívanie druhu** v zmenených podmienkach.

Variabilita je podmienená dvomi javmi, ktoré sprevádzajú pohlavné rozmnožovanie. Prvým z nich sú procesy, ktoré súvisia s meiózou. Ide o **crossing-over** (v profáze prvého meiotického delenia) a **náhodnú segregáciu chromozómov** (v anafáze prvého a druhého meiotického delenia).

U ľudí môže vzniknúť 2^{23} – vyše 8 miliónov možností kombinácií pôvodných rodičovských chromozómov. Crossing-over umožní ďalšiu reorganizáciu alel.

Druhým javom, ktorým sa vytvárajú nové genetické kombinácie, je **náhodnosť oplodnenia**, teda, ktorá pohlavná bunka fertilizuje, s ktorou (opačného typu). Splynutím gamét sa zachováva aj druhovo špecifický počet chromozómov.

Gametogenéza prebieha výhradne v pohlavných žľazách. Možno ju rozdeliť na **spermiogézu** (vývoj mužských pohlavných buniek – spermii) a **oogenézu** (vývoj ženských pohlavných buniek – vajíčok). Spermie sa vytvárajú v mužskej pohlavnej žľaze (testis) a vajíčka v ženskej pohlavnej žľaze vaječníku (ovarium). Zrelé pohlavné bunky sa z pohlavných žliaz dostávajú do odvodných pohlavných ciest (mužských a ženských), cez ktoré sa dopravujú na miesto fyziologického určenia.

Vývoj pohlavných buniek možno štandardne rozdeliť na tri fázy:

- **fáza množenia** – opakovaným mitotickým delením prapohlavných buniek – gametogónií (spermiogónií alebo oogónií) dochádza k zvyšovaniu ich počtu;
- **fáza rastu** – má názov podľa mikroskopicky pozorovateľného zväčšenia objemu gametogónií. Diploidné gametogónie syntetizujú bunkové organely a pripravujú sa na delenie. Na konci tohto štádia hovoríme o primárnych gametocytoch (primárnych spermatocytoch prípadne oocytoch) alebo gametocytoch I. rádu, ktoré sú ešte stále diploidné;
- **fáza zretia** – zodpovedá meiotickému deleniu. Pri vývoji spermii táto fáza zahŕňa aj spermiohistogézu. Výsledkom je vznik haploidných pohlavných buniek.

8.1 Meióza

Meióza sa skladá z dvoch za sebou nasledujúcich delení, pričom k replikácii DNA dochádza len raz (pred I. meiotickým delením).

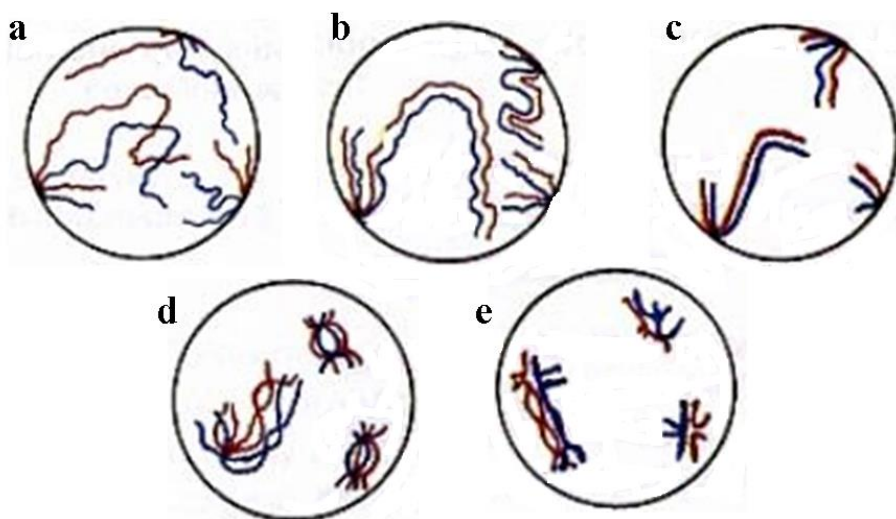
I. meiotické delenie (nazývané aj zrecie, redukčné, heterotypické delenie):

Profáza I. meiotického delenia je veľmi dlhá a prebieha oveľa zložitejšie ako profáza mitózy, pozostáva zo štádií:

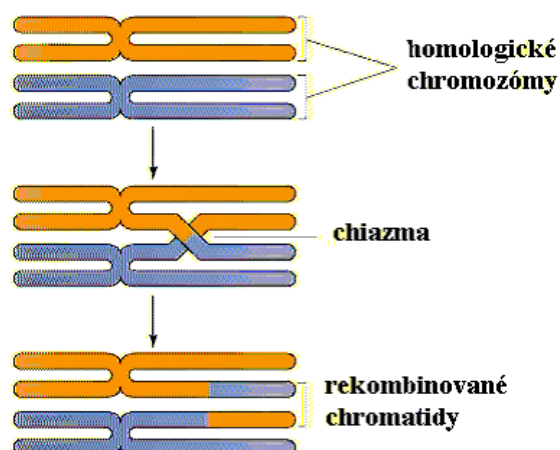
- **proleptoténne** – chromozómy sa začínajú kondenzovať. Bunkové jadrá sú tvorené difúznym chromatínom s variabilným množstvom zrníčok kondenzovanejšieho chromatínu;
- **leptoténne** – kondenzácia chromozómov pokračuje a čiastočne kondenzované tenké a dlhé chromozómy sú ešte svojimi telomérmi prichytené k jadrovej membráne (obr. 41a);
- **zygoténne** – homologické chromozómy sa párujú a pozdĺžne sa k sebe prikladajú svojimi homologickými úsekmi. Dochádza k synapsii chromozómov a vytvárajú sa tzv. bivalenty

(obr. 41b). Synapsia je podmienená proteínovým komplexom, ktorý nazývame synaptonemálny komplex;

- **pachyténne** – bivalenty sa ďalej kondenzujú (obr. 41c). Na každom chromozóme sú viditeľné jeho dva chromatidy, preto sa tento útvar nazýva tetráda. Nesesterské chromatidy v tetráde sa okolo seba špirálovite obtáčajú. Tento jav sa označuje ako crossing-over (prekríženie chromozómov) a miesta prekríženia sa nazývajú chiazmy (obr. 42). V oblasti synaptonemálneho komplexu nachádzame rekombinačné uzlíky, ktoré obsahujú vysokomolekulárne proteíny zodpovedné za rekombináciu chromatidov;
- **diploténne** – nastáva vymiznutie synaptonemálnych komplexov, homologické chromozómy sa začínajú od seba oddeľovať. Ich oddeľovanie je však sťažené v miestach, v ktorých došlo k prekríženiu. V týchto miestach môže dôjsť k zlomu a následnej výmene homologických úsekov medzi nesesterskými chromatidmi. Novšie údaje naznačujú, že ide o cieľnú aktivitu topoizomerázy. Dochádza tak ku vzniku rekombinovaných chromatidov, ktoré obsahujú pôvodne materské aj otcovské úseky. Toto je mechanizmus, ktorý umožnil organizmom s pohlavným rozmnožovaním dosiahnuť takmer neobmedzenú variabilitu a tým aj adaptabilitu (obr. 41d);
- **diakinéza** – pokračuje kondenzácia chromatidov a chiazmy sa posúvajú ku koncom chromozómov – terminalizácia chiazmiem (obr. 41e). V tomto štádiu dochádza k rozpadu jadrového obalu a miznutiu jadierka. Tvorí sa deliaci aparát a proces ďalej prebieha rovnako ako mitotické delenie.



- **Obr. 41. a.** Leptoténne štádium; **b.** Zygoténne štádium; **c.** Pachyténne štádium; **d.** Diploténne štádium; **e.** Diakinéza



- **Obr. 42.** Priebek crossing-overu

Po skončení profázy I. meiotického delenia nasledujú metafáza, anafáza a telofáza I. meiotického delenia. Po jeho skončení nastáva krátka interfáza, ktorá však nezahŕňa S-fázu a tak nedochádza k replikácii DNA.

Výsledkom I. meiotického delenia je rozdelenie (segregácia) homologických chromozómov, pričom ich distribúcia je náhodná. Teda z každého typu chromozómu sa do bunky dostane (zdvojený) chromozóm jedného z budúcich starých rodičov. Vznikajú bunky len s jednou chromozómovou sadou (n), avšak chromozómy sa ešte skladajú z dvoch chromatidov.

V priebehu II. meiotického delenia (nazývaného aj ekvačné, homeotypické), ktoré bezprostredne nadväzuje na I. meiotické delenie a prebieha ako mitotické delenie, sa sesterské chromatidy rozchádzajú (náhodne segregujú) do dcérskych buniek – gamét. Gaméta tak obsahuje len polovičný počet chromozómov, pričom vopred nevieme, od ktorého zo starých rodičov, a či podstúpili crossing-over, alebo nie).

Výsledkom meiózy je redukcia počtu chromozómov na polovicu ($2n \rightarrow n$) a vytvorenie nových genetických kombinácií prostredníctvom náhodnej segregácie rodičovských chromozómov a crossing-overu. Produktom I. meiotického delenia sú haploidné (n) sekundárne spermatocyty a oocyty. Tie vstupujú do II. meiotického delenia, výsledkom ktorého je oocyt alebo 4 spermatidy, ktoré sa v procese dozrievania (spermiohistogénézy) diferencujú na zrelé spermie (vyvíja sa im bičík).

8.1.1 Poruchy meiózy

Normálny priebeh gametogénézy má existenčný charakter, pretože týmto mechanizmom je zabezpečený vznik normálneho potomstva a tým kontinuita života. Tak ako každý zložitý proces v prírode aj gametogénéza je procesom s určitým percentom omylov. Dôsledkom chybnnej gametogénézy je vznik chromozómovej aberácie u potomstva, ktorá je vo väčšine prípadov ťažko zlučiteľná alebo nezlučiteľná so životom. Príčinami chybnnej gametogénézy môžu byť:

- **poruchy v párovaní homologických chromozómov** – vznik **univalentov** alebo **parciálne asynaptických bivalentov**, ktoré sú počas ďalšieho priebehu meiózy selektované a podmieniajú vznik aneuploidnej gaméty a **nehomologické párovanie**, prípadne **laterálne párovanie univalentu**, ktoré rovnako vedie k vzniku štruktúrnych aberácií chromozómov;
- **nerovnomerný crossing-over v profáze I. meiotického delenia** – dôsledkom je delícia určitého úseku v jednom a jeho duplikácia v druhom chromatide;
- **nondisjunkcia** (neoddelenie sa) – **páru chromozómov v anafáze I. meiotického delenia**, ktorá vedie k vzniku aneuploidných gamét, a to dvoch dizomických (s chromozómom naviac) a dvoch nulizomických (bez chromozómu) alebo **chromatidov v anafáze II. meiotického delenia** pričom vzniká jedna dizomická a jedna nulizomická gaméta;
- **anafázové zaostávanie** v anafáze I. alebo II. meiotického delenia – chromozóm nestihne včas doputovať k pólu bunky v dôsledku poruchy kinetochórového mikrotubulu a nie je zahrnutý do novovznikajúceho jadra.

Ako si ukážeme v kapitole 11 o regulácii bunkového cyklu, je nondisjunkcia dôsledkom zlyhania metafázového kontrolného uzla a anafázové zaostávanie je dôsledkom nedostatočnej funkcie motorických proteínov (dyneínov a kinezínov).

8.1.2 Porovnanie priebehu mitózy a meiózy

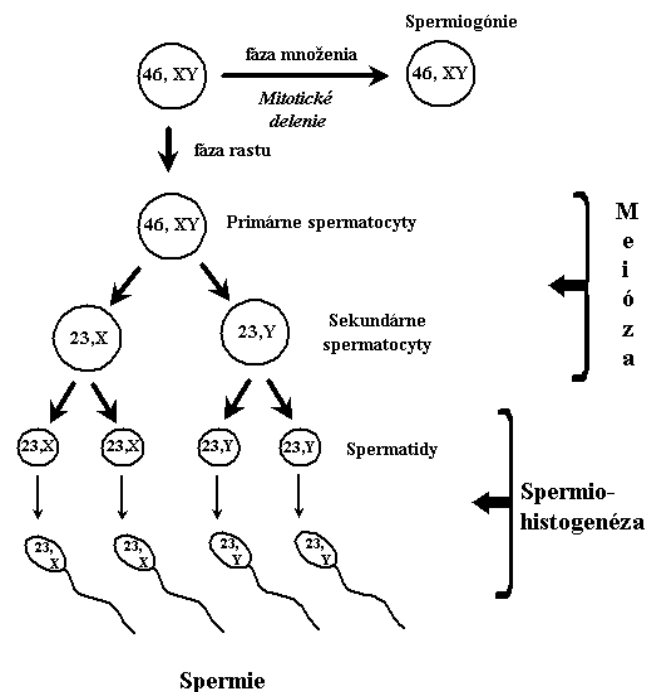
- Meióza prebieha len v tkanive pohlavných žliaz. Mitóza prebieha v bunkách všetkých tkanív.
- Mitóza a spermiogénéza prebiehajú kontinuálne, oogenéza cyklicky.
- Do mitózy a spermiogénézy je zapojený veľký počet buniek. Pri oogenéze vzniká len jedno funkčné vajíčko.

- Výsledkom meiózy sú haploidné gaméty. Mitózou vznikajú diploidné somatické bunky.
- Samotná gametogenéza je zvláštnym typom diferenciácie buniek. U somatických buniek prebieha diferenciácia až po delení, v G 1 fáze interfázy.
- Replikácia DNA prebehne pri gametogenéze len raz, pred I. meiotickým delením. Pri mitóze sa replikácia uskutoční pred každým delením.
- Pri meióze dochádza k párovaniu homologických chromozómov a ku crossing-overu. Pri mitóze sa tieto procesy za normálnych okolností nevyskytujú.
- Bunky vzniknuté meiózou nesú navzájom rôznu genetickú informáciu (alely). Dcérske bunky vzniknuté mitózou sú geneticky identické.
- Genetický význam meiózy je v udržaní druhovo štandardného počtu chromozómov a vo vytváraní dedičnej variability. Mitózou sa genetická informácia presne prenáša z materskej bunky do dcérskych.
- Dôsledkom narušenia meiózy je vznik gametických mutácií, ktoré sa prenášajú do všetkých buniek jedinca. Dôsledky mutácie v somatickej bunke sa prenášajú len na subpopuláciu jej dcérskych buniek a dôsledky môžu byť rôzne.

8.2 Spermiogenéza

Spermiogenéza u človeka prebieha kontinuálne – od puberty do neskorej staroby (s individuálnou variabilitou). Proces trvá 64 – 72 dní. Spermie vznikajú v množstve 100 – 200 miliónov v jednom ejakuláte. V SR sa v súčasnosti považuje v spermiograme za normálnu hodnotu minimálne 30 miliónov spermií na 1ml ejakulátu.

Pri spermiogenéze vznikajú z jednej spermiogónie 4 rovnocenné spermie (obr. 43). Bunky vzniknuté II. meiotickým delením sa nazývajú spermatidy, ich ďalší vývoj sa nazýva spermiogénéza – vytvorením hlavičky, krčka, spojovacej časti a bičíka sa menia na spermie bez ďalšieho delenia.

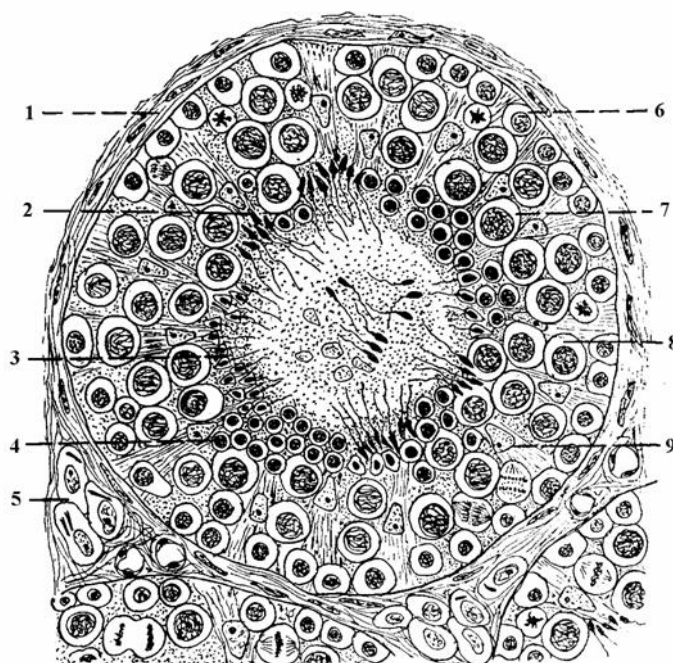


• Obr. 43. Schéma spermiogenézy

Spermiogenéza prebieha v stočených semenotvorných kanálikoch semenníkov (tubuli seminiferi contorti, obr. 44). Na periférii semenotvorných kanálikov kontinuálne prebieha fáza množenia – intenzívne mitotické delenie spermiogónií.

Nad vrstvou spermiogónií (smerom do lúmenu semenotvorného kanálíka) prebieha rastová fáza – nachádzajú sa tu primárne spermatocyty, ktoré pribrali zásobné látky a zväčšil sa ich objem.

Sekundárne spermatocyty, ktoré vznikli I. meiotickým delením sa nachádzajú v ďalšej vrstve, nad nimi sú spermatidy a do lúmenu kanálíka vyčnievajú bičíky spermií, ktoré prekonávajú spermiohistogézu (fáza zretia).



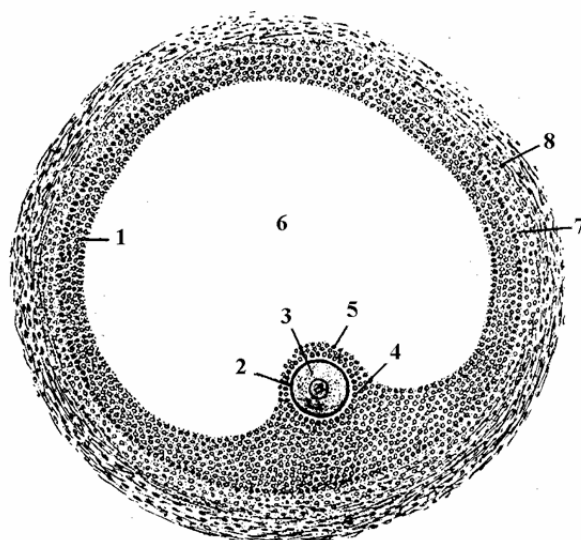
- **Obr. 44.** Prierez semenotvorným kanálíkom – podľa Staneka (1 – membrana propria, 2 – spermie v styku so Sertoliho bunkami, 3 – spermiohistogéza, 4 – spermatidy, 5 – intersticiálne Leydigove bunky, 6 – spermiogónie, 7 – sekundárne spermatocyty, 8 – primárne spermatocyty, Sertoliho bunka s jadrom)

8.3 Oogenéza

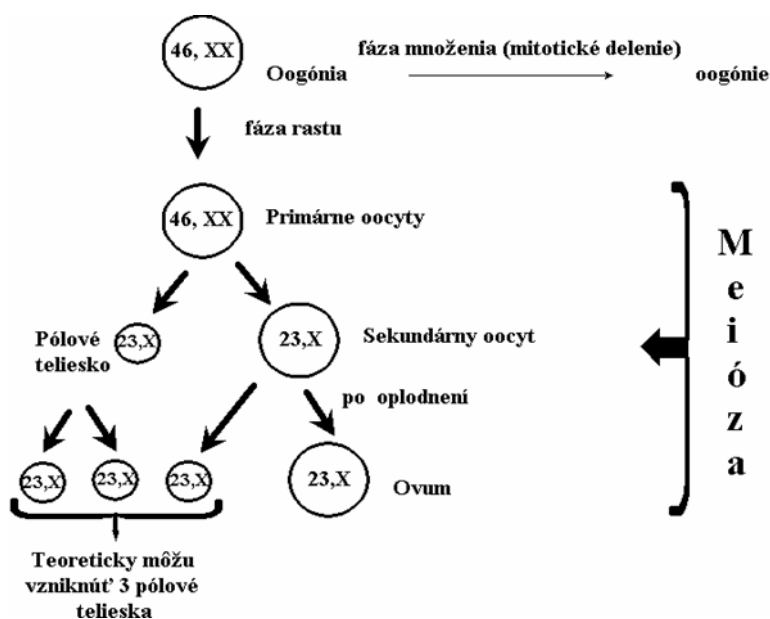
Oogenéza začína už vo včasných štádiách intrauterinného vývoja v kôrovej vrstve vaječníka. Primárny oocyt obalí vrstvička epitelových folikulových buniek a vytvorí sa primordiálny folikul. Do narodenia prebehne vo všetkých oocytoch profáza I. meiotického delenia – až do diploténneho štádia. Potom, až do puberty, zostávajú v kľúde.

Jednotlivé oocyty sa ďalej vyvíjajú (od puberty) v mesačných cykloch. Folikuly začínajú rásť – množením folikulových buniek vznikne viacvrstvový epitel a vytvorí sa sekundárny folikul. Potom rozostúpením folikulových buniek vzniká folikul s dutinkou, ktorý sa nazýva terciálny folikul, v ňom sa oocyt nachádza excentricky v kopčeku buniek – cumulus oophorus. Folikul s veľkou dutinkou sa nazýva zrelý Graafov folikul (obr. 45). V ňom oocyt dokončí I. meiotické delenie a prejde profázou a metafázou II. meiotického delenia. Vtedy dochádza k ovulácii. II. meiotické delenie je dokončené až po oplodnení (ak k nemu dôjde).

Prvým meiotickým delením vznikajú dve nerovnocenné bunky: sekundárny oocyt a pólóvé teliesko (ktoré sa môže rozdeliť). Druhým meiotickým delením vznikne vajíčko a druhé pólóvé teliesko (obr. 46).



• **Obr. 45.** Schéma Graafovho folikulu – podľa Staneka (1 – membrana granulosa, 2 – zona pellucida, 3 – sekundárny oocyt, 4 – corona radiata, 5 – cumulus oophorus, 6 – cavum folliculi, 7 – theca folliculi interna, 8 – theca folliculi externa)



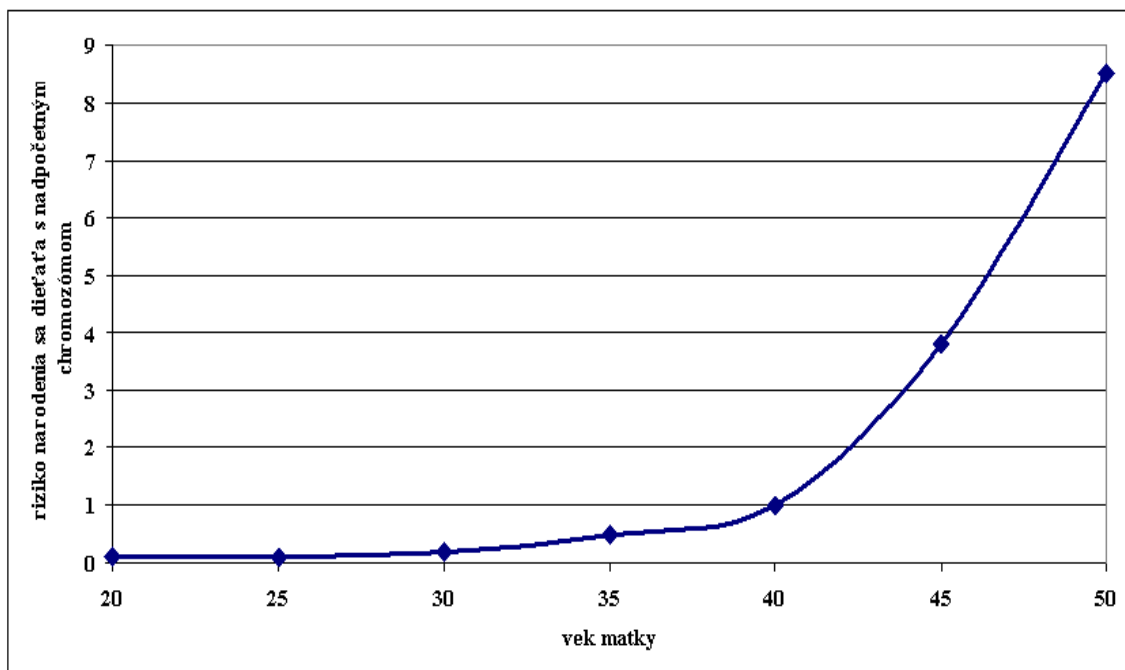
• **Obr. 46.** Schéma oogenézy

V ováriách novorodeného dievčatka sa nachádza približne 2,6 milióna oocytov, v priebehu reprodukčného veku ich dozrie asi 400, ostatné sú odstránené apoptózou.

Oogenéza trvá približne od 4. mesiaca intrauterinného vývoja do 45. - 50. roku veku ženy. Vývoj konkrétneho oocyta môže teda trvať aj niekoľko desiatok rokov, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť nondisjunkcie v I. meiotickom delení a tým riziko narodenia sa dieťaťa s nadpočetným chromozómom (obr. 47).

Spermioogenéza je kontinuálny proces, čo sa odráža v tom (ako ukázali rozsiahle štúdie), že len do 7 % spermií nesie mutáciu a so stúpajúcim vekom sa skôr znižuje pohyblivosť spermií a nedochádza k nárastu počtu mutácií.

Oogenéza je proces rozdelený na fázy a dlhé časové obdobia, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť poruchy mechanizmov delenia a tým aj vzniku aneuploidii.



• **Obr. 47.** Vek matky a riziko narodenia sa dieťaťa s nadpočetným chromozómom

Doplňujúca študijná literatúra

ALBERTS, B. – BRAY, D. – JOHNSON, A. – LEWIS, J. – RAFF, M. – ROBERTS, K. – WALTER, P.: Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. 2. vydanie. Ústí nad Labem: Espero Publishing 2005, 740 s.

NUSSBAUM, R. L. – MCINNES, R. R. – WILLARD, H. F.: Klinická genetika. 6. vydání. Praha: Triton 2004, 426 s.

SRŠEŇ, Š. – SRŠŇOVÁ, K.: Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata. 4., prepracované a rozšírené vydanie. Martin: Osveta 2005, 446 s.

9 CHROMOZÓMOVÉ ABERÁCIE

Pri cytogenetickej analýze sa v karyotype môžu zistiť rôzne odchýlky, ktoré v klinickej genetike nazývame chromozómové aberácie. Týkajú sa zmeny štruktúry alebo počtu chromozómov. Tieto zmeny sú veľmi závažné, pretože môžu podmieňovať patologické stavy.

Chromozómové aberácie podľa charakteru odchýlky delíme na **numerické** a **štruktúrne**. Podľa toho, ktoré chromozómy sú aberáciou postihnuté rozoznávame aberácie autozómov a gonozómov.

Všetky chromozómové aberácie sú veľké zmeny genetického materiálu vznikajúce mutáciou. Zopakujeme si, že podľa druhu buniek, v ktorých mutácie nastanú, rozdeľujeme mutácie na:

- **gametické**, ktoré sa nachádzajú už v gamétach (zdedené alebo vzniknuté *de novo*) a prenášajú sa na všetky bunky potomka, ktorý vznikne po fertilizácii takouto gamétou;
- **somatické**, ktoré vznikajú na rôznej úrovni postzygotického vývoja jedinca (**postzygotické mutácie**). Prenášajú sa len na tie bunky, ktoré vzniknú mitotickým delením postihnutej bunky (klon, línia). Mutácia sa teda vyskytuje len u časti buniek, ktoré tvoria telo jedinca. Tento stav, keď sú v organizme prítomné dve alebo viac bunkových línií s rôznou chromozómovou výbavou sa nazýva **mozaicizmus**.

9.1 Numerické chromozómové aberácie

Pri týchto aberáciách je počet chromozómov v somatickej bunke odlišný od diploidného počtu ($2n$), ktorý sa nazýva aj euploidia. Rozdeľujeme ich na:

- **polyploidie**, pri ktorých ide o nadpočetnosť úplných chromozómových sád, napr. **triploidia** ($3n$ – 69 chromozómov) alebo **tetraploidia** ($4n$ – 92 chromozómov);
- **aneuploidie**, pri ktorých sa počet chromozómov odlišuje od euploidie, ale nie je celým násobkom haploidného počtu. Výsledný počet chromozómov je najčastejšie 46 ± 1 . Ak ide o zvýšený počet určitých chromozómov (hyperdiploidia) hovoríme o **polyzómii**, najčastejšie sú to trizómie (tri chromozómy určitého typu – namiesto dvoch, ako je to normálne). Ak jedná o znížený počet chromozómov (hypodiploidia) hovoríme o **monozómii**.

9.1.1 Polyploidie

U človeka sa najčastejšie vyskytuje triploidia a tetraploidia. Sú relatívne časté u včasných samovoľných potratov (najmä triploidia), nie sú však zlučiteľné so životom.

Triploidia je väčšinou dôsledkom viacnásobnej fertilizácie (oplodnenie jedného oocyту dvoma spermiami). Môže byť však aj dôsledkom patologickej gametogenézy (vznik diploidného oocyту alebo spermie) alebo nevypudenia 2. pólového telieska z oplodneného oocyту. Triploidia tvorí 17 - 20 % z chromozómových aberácií zistených u včasných potratov. Narodenia sa však dožijú ojedinele a novorodenci prežívajú nanajvýš niekoľko hodín až dní (ak sa im vyvinula predĺžená miecha).

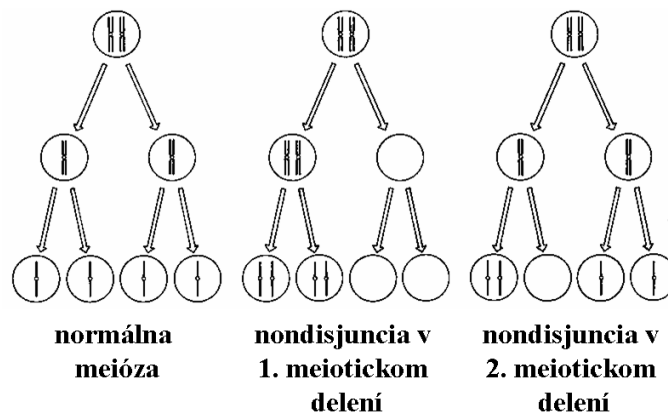
Tetraploidia vzniká najčastejšie endoreduplikáciou (opakovanou S-fázou) pri prvom mitotickom delení zygoty, prípadne sa môže tiež jednať o dôsledok viacnásobnej fertilizácie. Tento stav je u ľudí nezlučiteľný so životom už vo včasných štádiách embryogenézy.

9.1.2 Aneuploidie

Aneuploidie vznikajú:

- **nondisjunkciou** v anafáze 1. alebo 2. meiotického delenia. Pretože sa chromozómy od seba neoddelia, vzniká jedna dcérska bunka s 24 a druhá s 22 chromozómami (obr. 48);

- **anafázovým zaostávaním** v priebehu 1. alebo 2. meiotického delenia. Pri tejto poruche sa počas anafázy jeden z páru homologických chromozómov nedostane k centrozómu a stratí sa v cytoplazme. Vzniká jedna bunka s 22 a druhá s 23 chromozómami;
- **poruchou párovania homologických chromozómov** v profáze 1. meiotického delenia. Ak nedôjde k párovaniu, vznikajú univalenty, prípadne parciálne asynaptické bivalenty, ktoré sa v ďalšom priebehu meiózy strácajú a zapríčinia vznik aneuploidnej gaméty.



• **Obr. 48.** Nondisjuncia v 1. a 2. meiotickom delení

Aneuploidie sa môžu týkať každého chromozómu. Všeobecne platí, že nadbytok genetickej informácie je organizmom lepšie tolerovaný ako jej chýbanie, a že aneuploidie autozómov majú závažnejšie dôsledky ako aneuploidie gonozómov.

Monozómie autozómov sú nezlučiteľné so životom už vo včasných štádiách embryogenézy. Jediná so životom zlučiteľná mono-zómia u človeka je mono-zómia X, ktorá spôsobuje Turnerov syndróm. Z nich 99 % prenatalne zahynie, avšak u 1 % prežívajúcich dievčat (jedná sa prevažne o mozaikovú formu) paradoxne podmieňuje pomerne ľahké postnatálne postihnutie.

Trizómie veľkých chromozómov (s veľkým počtom génov) majú závažnejšie negatívne dôsledky ako trizómie malých chromozómov.

Chromozómové aberácie ako príčina samovoľných potratov majú dôležitú úlohu. Najvyšší výskyt najťažších foriem aberácií sa predpokladá v prvých dvoch týždňoch intrauterinného vývoja, a sú potratené skôr, ako je gravidita klinicky diagnostikovaná. Po diagnostikovaní gravidity sa chromozómové aberácie v I. trimestri vyskytujú až u 50 % vyšetrených samovoľných potratov (toto číslo sa udáva pri použití metód klasickej cytogenetiky, pri použití FISH je ešte vyššie). Najčastejšie ide (okrem polyploidii) o trizómiu chromozómu 16 a mono-zómiu X, môžu sa však vyskytovať všetky trizómie okrem trizómie chromozómu 1 (o ktorej sa predpokladá, že je letálna už na úrovni gamét).

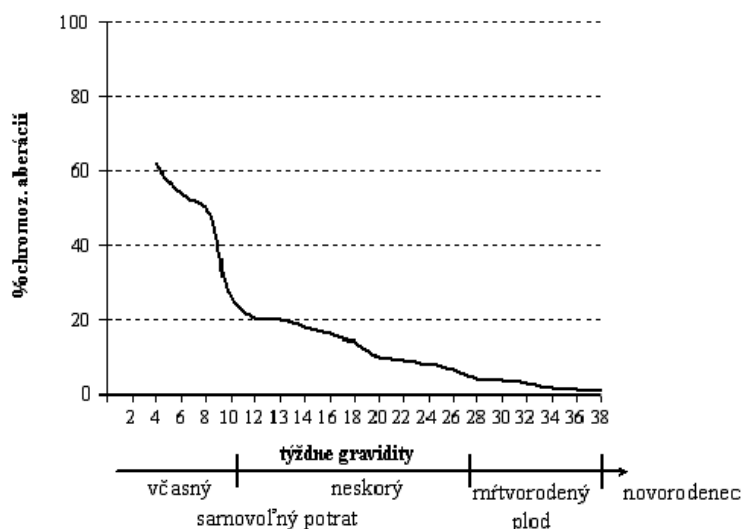
V ďalšom vývoji, dôsledkom prirodzenej selekcie, klesá u samovoľných potratov a mŕtvonarodených novorodencov percento chromozómových aberácií (obr. 49).

Pre Vašu orientáciu – ak dôjde k úmrtiu zárodka alebo plodu do 28 týždňa gravidity hovoríme o samovoľnom potrate, ak po 28. týždni – ide o mŕtvorodený plod. S postupujúcou graviditou sa zužuje aj spektrum typov zachytených aberácií, čo je tiež dôsledkom selekcie – čím je zárodok (plod) ťažšie postihnutý, tým skôr zahynie a je potratený alebo predčasne porodený ako mŕtvorodený novorodenec.

Jedným z faktorov, ktoré výrazne zvyšujú pravdepodobnosť vzniku numerických aberácií, je vek matky nad 35 rokov (stúpajúce riziko nondisjunktie v 1. meiotickom delení), ako je uvedené v kapitole 8 o gametogenéze. Niektorí odborníci sa nazdávajú, že ak je žena staršia ako 40 rokov, až 1/3 jej vajíčok má abnormálny počet chromozómov.

Fenotypové prejavy chromozómových aberácií sú závažné a väčšinou zahŕňajú aj rôznu stupeň psychomotorickej retardácie. Vytvárajú komplex príznakov a abnormalít (syndróm),

ktoré sú charakteristické pre konkrétnu chromozómovú aberáciu, aj keď sa niektoré z nich vyskytujú aj u viacerých syndrómov.



- **Obr. 49.** Frekvencia chromozómových aberácií u potratov, mŕtvonarodených (6 %) a živonarodených plodov (0,6 %)

9.1.2.1 Najčastejšie numerické aberácie autozómov

Downov syndróm (výskyt 1 : 700 živonarodených novorodencov) je podmienený trizómiou chromozómu 21 (obr. 50). Medzi fenotypové prejavy patrí psychomotorická retardácia, hypotónia svalov a hyperflexibilita kĺbov, opičia ryha na dlani, široká plochá tvár, veľký jazyk, epikantus (očná riasa), vrodené vývojové chyby srdca, náchylnosť k infekciám a nádorovým ochoreniam (leukémia). Forma Downovho syndrómu spôsobená voľným nadpočetným chromozómom 21 vo všetkých bunkách jedinca sa nazýva **trizomická (voľná) forma**. Okrem tejto formy poznáme **mozaikovú formu** a **translokačnú formu** Downovho syndrómu (vysvetlenie ďalej v texte).



- **Obr. 50.** Karyotyp pri trizómii 21

Príčinou najfrekventovanejšieho výskytu Downovho syndrómu u novorodencov nie je to, že by sa poruchy meiózy týkali najčastejšie chromozómu 21. Vznik aneuploidii autozómov je rovnako pravdepodobný a väčšinou už prenatálne spôsobuje so životom nezlučiteľné poškodenia. Hlavným postihnutím pri Downovom syndróme sú vrodené vývinové chyby srdca, ktoré však väčšinou neobmedzujú prenatálne prežívanie. U plodu nemusí zlyhať srdcovo-cievna sústava, pretože má vytvorené arterio-venózne spojky a krv prúdi cez placentu. Po pôrode sa tieto spojky uzatvárajú.

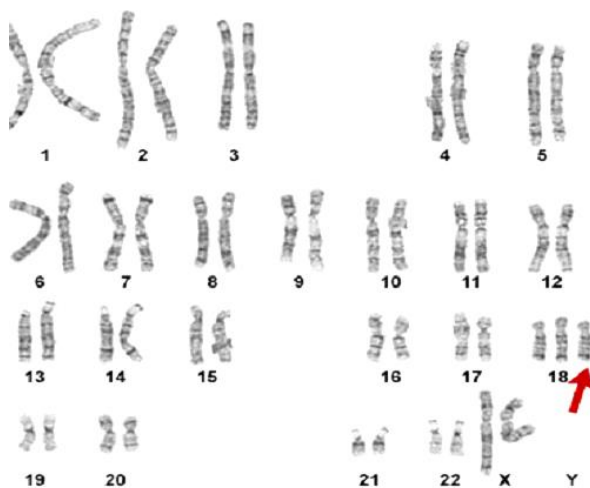
U ďalších najčastejších aneuploidií autozómov sú v prevahe VVCH mozgu a tie rozhodujú o dĺžke prežívania.

Patauov syndróm (1 : 10 000) je podmienený trizómiou chromozómu 13 (obr. 51). Medzi fenotypové prejavy patrí psychomotorická retardácia, hluchota, rászštep pery a podnebia, polydaktýlia, vrodené vývojové chyby srdca, obličiek a pohlavných orgánov. Postihnutí novorodenci väčšinou umierajú do konca 1. mesiaca života.



• **Obr. 51.** Karyotyp pri trizómii 13

Edwardsov syndróm (1 : 7 500) je podmienený trizómiou chromozómu 18 (obr. 52). Medzi fenotypické prejavy patrí psychomotorická retardácia, malformácie mnohých orgánov, hypoplázia mandibuly, malé ústa a nos, deformity prstov, pes equinovarus. Postihnutí umierajú väčšinou do pol roka po narodení.

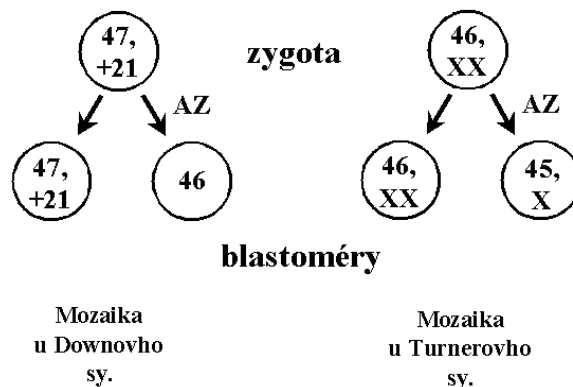


• **Obr. 52.** Karyotyp pri trizómii 18

Numerické aberácie ostatných autozómov sú zriedkavé. Ak sa vyskytujú, nachádzajú sa väčšinou v mozaikovej forme, pretože prítomnosť normálnej bunkovej línie má zriedčovací vplyv na závažnosť fenotypových prejavov. Závažnosť postihnutia súvisí s tkanivovou distribúciou a percentom zastúpenia patologickej línie.

Mozaiková forma chromozómovej aberácie môže vzniknúť pri mitotickom delení v postzygotickom období, následkom nondisjunkcie alebo anafázovým zaostávaním. Dôsledky anafázového zaostávania a vzniku mozaiky môžu byť rôzne (obr. 53). Ak prebehne v jednej z blastomér, ktoré vznikli mitotickým delením trizomickej zygoty, nastáva zriedčovací efekt

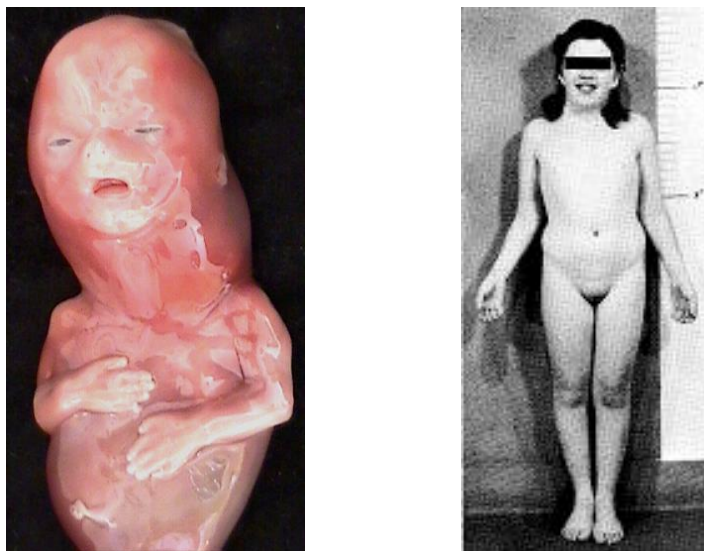
a jedinec s **mozaikovou formou** (napr. Downovho syndrómu). Má tým miernejšie klinické prejavy, čím skôr anafázové zaostávanie nastalo, čiže čím je početnejšia populácia buniek s normálnym počtom chromozómov. Naopak, po anafázovom zaostávaní a strate chromozómu X v niektorej z blastomér pochádzajúcich z normálnej zygoty s genómom 46,XX – vznikne mozaiková forma monozómie X. Ženy s touto formou Turnerovho syndrómu majú tým menšie klinické príznaky, čím neskôr sa to stane.



• **Obr. 53.** Vznik mozaikovej formy chromozómovej aberácie

9.1.2.2 Numerické aberácie gonozómov

Turnerov syndróm (1 : 1 000) podmieňuje monozómia X. Ženy majú malú postavu, sú sterilné, nemajú vyvinuté primárne a sekundárne pohlavné znaky, na krku majú kožnú riasu (*pterygium colli*). U tohto syndrómu je výrazná diskrepancia medzi závažnosťou postihnutia prenátálne a postnatálne. Aj keď sa 99 % z nich potráca alebo sa narodia mŕtve, postnatálne postihnutie je relatívne ľahké (obr. 54).



• **Obr. 54.** Turnerov syndróm prenátálne a postnatálne

Syndróm s tromi X chromozómami (1 : 1 000) má karyotyp 47, XXX. Tieto ženy sú plodné (s 50 % pravdepodobnosťou teda prenášajú nadpočetný chromozóm na svoje potomstvo), častejšie sa však u nich vyskytujú potraty. Bývajú mierne mentálne retardované.

Klinefelterov syndróm podmieňuje karyotyp 47,XXY (1 : 1 000). Postihnutí muži až do dospievania nemusia mať problémy. Nositelia tohto syndrómu sú neplodní, majú poruchy vývoja genitálu, gynekomastiu, ženský typ pubického ochlpenia, vysokú postavu. Môžu byť mentálne retardovaní.

Syndróm (Jacobsovej) s **dvomi Y** chromozómami podmieňuje karyotyp 47,XY^Y (1 : 1 000). Muži nemávajú závažné fenotypové prejavy.

9.2 Štruktúrne chromozómové aberácie

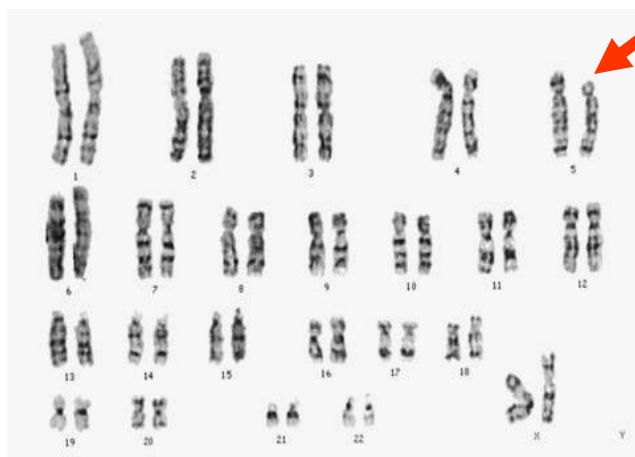
Štruktúrne aberácie chromozómov sú zmeny v organizácii genómu, teda zmeny štruktúry jedného alebo viacerých chromozómov.

Vznikajú **chromozómovým zlomom** (prerúšením kontinuity chromozómu) alebo **poruchou crossing-overu**.

Pri nerovnomernom (inekválnom) crossing-overe nastane zdvojenie úseku v jednom a jeho chýbanie v druhom chromozóme. Porucha môže nastať aj pri párovaní chromozómov. K zmene štruktúry chromozómu tiež dochádza pri párovaní nehomologických chromozómov a výmene úsekov medzi nimi, prípadne laterálnym párovaním univalentu,

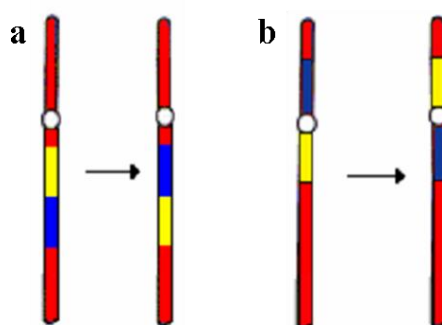
Medzi štruktúrne chromozómové aberácie patria:

- **delécie** je strata časti chromozómu. Ak chýba koncový úsek nazýva sa **terminálna**, ak nastane vo vnútri chromozómu ide o **intersticiálnu deléciu**. U novorodencov je najčastejšou štruktúrnou aberáciou delécia terminálneho úseku p ramienka chromozómu 5 (obr. 55), ktorá podmieňuje syndróm mačacieho kriku (cri du chat). U postihnutého sa prejavuje ťažkou psychomotorickou retardáciou a anomáliou vývoja hrtana, ktorá zapríčiňuje typický plač;



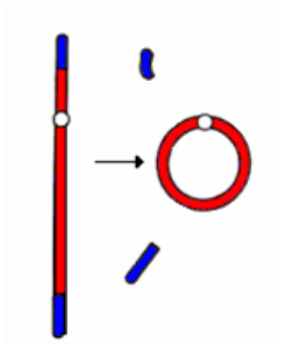
• **Obr. 55.** Syndróm mačacieho kriku (karyotyp)

- **duplikácie** – zdvojenie úseku chromozómu;
- **inverzie** – otočenie segmentu chromozómu o 180°. Ak sa týka úseku bez centroméry, nazýva sa **paracentrická**, ak invertovaná časť zahŕňa centroméru, ide o **pericentrickú inverziu** (obr. 56);



• **Obr. 56.** Schéma paracentrickej (A) a pericentrickej inverzie (B)

- **prstencovitý chromozóm** sa vytvorí, ak nastanú zlomy a strata častí na oboch koncoch chromozómov a zvyšok chromozómu sa uzavrie do prstenca (obr. 57);



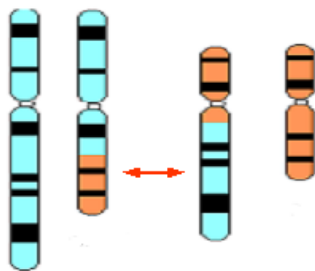
• **Obr. 57.** Schéma prstencovitého chromozómu

- **izochromozóm** vznikne, ak sa sesterské chomatydy od seba neoddelia v centromére pozdĺžne, ale priečne. Vzniknú tak dva mediocentrické chromozómy, z ktorých sa jeden skladá z dvoch dlhých a druhý z dvoch krátkych ramienok. Ide o súčasnú duplikáciu jedného ramienka a deléciu druhého ramienka (obr. 58);

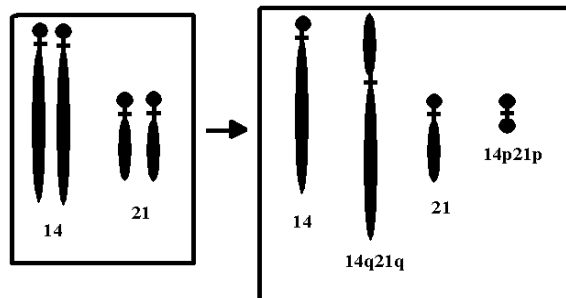


• **Obr. 58.** Isochromozóm

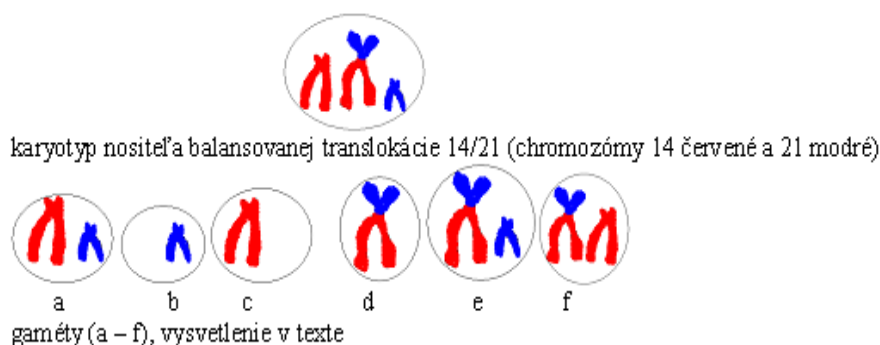
- **translokácie** nastanú, ak sa úsek chromozómu premiestni z jednej lokalizácie na druhú. Môže ísť o **jednoduchú translokáciu**, pri ktorej sa časť chromozómu premiestni na iné miesto toho istého chromozómu alebo na iný chromozóm. Ak si dva chromozómy vzájomne vymenia určité úseky, hovoríme o **recipročnej translokácii** (obr. 59). Zvláštny typ translokácie je **Robertsonovská translokácia** (obr. 60). Ide o spojenie dvoch akrocentrických chromozómov (chromozómy skupiny D a G) v centromére do jedného metacentrického alebo submetacentrického chromozómu.



• **Obr. 59.** Recipročná translokácia



• **Obr. 60.** Robertsonovská translokácia



• **Obr. 62.** Gametogénéza u nositeľa balansovanej translokácie 14/21



• **Obr. 63.** Nevyvážená translokácia 14/21

So životom (po oplodnení normálnou gamétou) sú v tomto prípade zlučiteľné len tri kombinácie chromozómov v gamétach (a, d, e). Ostatné kombinácie (b, c, f) vedú k potrateniu konceptu.

Zo životom nezlučiteľné kombinácie chromozómov v gamétach nositeľa vyváženej translokácie 14/21:

- gaméta bez chromozómu 14, po oplodnení vzniká zygota s monoziómiou 14 (b);
- gaméta bez chromozómu 21, po oplodnení vzniká zygota s monoziómiou 21 (c);
- nevyvážená prestavba obsahujúca dva chromozómy 14, po oplodnení vzniká zygota s trizómiou 14 (f).

Zo životom zlučiteľné kombinácie chromozómov v gamétach nositeľa vyváženej translokácie 14/21:

- kombinácia bez chromozómovej prestavby (a);
- vyvážená prestavba bez následných fenotypových zmien po oplodnení (d);
- nevyvážená prestavba obsahujúca dva chromozómy 21, po oplodnení vzniká translokačná forma Downovho syndrómu (e).

Nositeľ vyváženej prestavby 14/21 má teda teoretické riziko 33 %, že sa mu narodí dieťa s Downovým syndrómom (prenáša svoju vyváženú prestavbu na potomstvo vo vyváženej forme). Empirické riziko (zistené výskumom výskytu v skutočnosti) je však menšie ako teoretické riziko (5 - 10 %).

Pretože sa Robertsonovská translokácia môže týkať všetkých akrocentrických chromozómov (napr. 14/13, obr. 64), môže dôjsť aj k narodeniu dieťaťa s translokačnou formou Patauovho syndrómu ak je do prestavby zapojený chromozóm 13.



• **Obr. 64.** Vyvážená translokácia 14/13

Ak sa jedná o balansovanú translokáciu homologických chromozómov (napr. 21/21), nositeľ nemôže tvoriť normálne gaméty – tvorí buď gaméty s obidvomi homologickými chromozómami (v prípade translokácie 21/21 vznikne po oplodnení translokačná forma Downovho syndrómu, obr. 65, so 100 % rizikom) alebo gaméty nulizomické, čo po oplodnení spôsobí so životom nezlučiteľnú monozómiu autozómov. Nositeľ vyváženej prestavby homologických chromozómov teda nemôže mať zdravé potomstvo.



• **Obr. 65.** Nevyvážená translokácia 21/21

Doplňujúca študijná literatúra

ALBERTS, B. – BRAY, D. – JOHNSON, A. – LEWIS, J. – RAFF, M. – ROBERTS, K. – WALTER, P.: Základy bunčnej biológie. Úvod do molekulárnej biológie buňky. 2. vydanie. Ústí nad Labem: Espero Publishing 2005, 740 s.

NUSSBAUM, R. L. – MCINNES, R. R. – WILLARD, H. F.: Klinická genetika. 6. vydání. Praha: Triton 2004, 426 s.

SRŠEŇ, Š. – SRŠŇOVÁ, K.: Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata. 4., prepracované a rozšírené vydanie. Martin: Osveta 2005, 446 s.

10 REPARAČNÉ MECHANIZMY A SYNDRÓMY SO SPONTÁNNOU INSTABILITOU CHROMOZÓMOV

10.1 Oprava DNA

Vznik poškodení DNA vyvoláva: fyzikálne žiarenie, chemické látky (mutagény) a biologické faktory (niektoré vírusy) (viac v kapitole 7. mutagenéza), ale aj niektoré potraviny a ich úprava (konzervačné látky, vyprážanie, údenie), fajčenie a alkohol. Endogénne a exogénne faktory neustále poškadzujú DNA. Napriek tomu, že mutácie mali obrovský význam vo fylogénéze, väčšina z nich nepriaznivo pôsobí na bunku. Odhaduje sa, že u človeka je potrebné opraviť každý deň v každej bunke niekoľko tisíc poškodení DNA. Väčšina týchto chýb je iba dočasná, pretože sú okamžite opravované.

Počas evolúcie sa museli vyvinúť systémy, schopné opraviť alebo aspoň tolerovať poškodenie DNA v bunke. Nazývajú sa **opravné – reparačné mechanizmy** a ich úlohou je odstránenie chýb DNA vzniknutých v priebehu replikácie, rekombinácie alebo po pôsobení faktorov vonkajšieho prostredia. Pokles aktivity reparačných enzýmov je sprievodným znakom starnutia.

Reparačné mechanizmy sa nachádzajú u všetkých doteraz testovaných organizmov, od jednobunkových až po človeka, pričom aj najjednoduchšie organizmy ich majú pomerne zložitú. U ľudí bolo identifikovaných približne 150 génov zodpovedných za reparáciu DNA. Tieto gény sa v minulosti volali „reparátové“ a strata alebo zníženie ich aktivity sekundárne viedlo k zvýšenému výskytu mutácií = k zníženiu ich opráv.

Existujú rôzne poškodenia DNA, ktoré sa reparujú príslušnými špecializovanými dráhami, z ktorých každá je nasmerovaná na opravu len určitého typu poškodenia DNA (tab. 10).

• **Tab. 10.** Reparačné mechanizmy

Priama oprava DNA poškodenia	- enzymatická fotoreaktivácia - oprava spórových fotoproduktov - oprava alkylovaných báz a alkylfosfotriesterov pomocou alkyltransferázy - ligácia zlomov reťazcov DNA
Excízia DNA poškodenia	- bázočná excízna oprava - nukleotidová excízna oprava - oprava chybné spárovaných báz (“Mismatch” oprava)
Tolerovanie poškodenia DNA	- obídanie poškodeného úseku DNA s vytvorením medzery a rekombinácia - translézná syntéza DNA (SOS reparácia)

Pre existenciu života je dôležitá „neomylnosť“ replikácie a oprava náhodne vzniknutých chýb. Reparácia DNA zahŕňa všetky bunkové procesy, ktoré sa podieľajú na odstránení poškodených, nevhodných alebo chybné spárovaných báz z genómu živých buniek. Všetky typy buniek obsahujú **reparačné enzýmy**, ktoré sú schopné opraviť poškodenú DNA. Väčšinou sú tieto enzýmy induktibilné a bunka ich produkuje po signále informujúcom o prítomnosti mutagénu alebo po poškodení DNA.

Pokles aktivity reparačných enzýmov a poruchy reparačných mechanizmov môžu mať na bunku nielen krátkodobé dôsledky ako napr. fyziologická disfunkcia (redukcia bunkovej proliferácie), abnormálny vývoj a metabolizmus (zníženie génovej expresie), ale aj dlhodobé následky – porucha signálnych funkcií, starnutie, vznik nádorových ochorení, apoptóza a sú často príčinou alebo vedú k vzniku syndrómov so spontánnou instabilitou chromozómov.

Pri oprave DNA majú úlohu produkty piatich opravných ciest:

- **MMR** (methyl-directed mismatch repair) – oprava chybné spárovaných báz – súvisí s génmi MSH 2, 3, 6, MLH1, PMS1 a PMS2.
- **NER** (nucleotide-excision-repair) – nukleotidová excízna oprava – súvisí s génmi XPA až ZPG
- **BER** (base excision repair) – bázová excízna oprava
- **DSB** (double-strand break repair) – oprava dvojreťazcových zlomov
- **DR** (direct reversion) – priama obnova poškodenia

Z hľadiska doby pôsobenia je možné reparačné mechanizmy rozdeliť na dve skupiny a to pôsobiace počas a po replikácii DNA.

10.1.1 Oprava DNA počas replikácie a hneď po nej

Reparačný mechanizmus pôsobí už v priebehu replikácie DNA, pretože samotná DNA polymeráza zabraňuje vzniku mutácií. Je to veľmi presne pracujúci enzým. Pri syntéze DNA je vzhľadom na jej rýchlosť obrovský potenciál na vznik chýb pri párovaní báz. Reálna chybovosť je iba jedna chyba na miliardu báz, vďaka kontrolným mechanizmom počas replikácie i bezprostredne po nej. Takmer všetky DNA polymerázy majú schopnosť opravovať nesprávne priradené bázy v smere 3'-5', čo sa označuje „**self-proofreading aktivita**“ („kontrolné čítanie“). Enzým postupuje po reťazci a pridáva na základe komplementarity jednotlivé nukleotidy. Predtým ako konkrétny nukleotid zabuduje, skontroluje, či naviazanie predchádzajúceho nukleotidu vyhovuje pravidlám komplementarity (A-T, G-C). Pri chybe je polymeráza schopná rozštiepiť fosfodiesterovú väzbu a vložiť správny nukleotid. V našom genóme ale existujú miesta, kde DNA polymeráza urobí chybu s väčšou pravdepodobnosťou. Sú to napríklad úseky s opakovaním jednej bázy AAAAAA, napríklad poly(A)-chvost. DNA polymeráza sa môže „pošmyknúť“ a včleniť o jednu bázu viac alebo naopak o jednu bázu menej.

U baktérií sa na oprave DNA podieľajú DNA polymerázy II, IV a V. U eukaryotických je najdôležitejšia DNA polymeráza β .

Bezprostredne po ukončení replikácie určitého úseku DNA nasleduje ešte jedna korekcia. Tento typ opravy sa nazýva **oprava chybné spárovaných báz** (tzv. mismatch repair), ktorá dokáže odhaliť mnoho chýb, ktoré unikli kontrole DNA polymerázy. Ak je napríklad spárovaný guanín s adenínom špecializovaná skupina enzýmov rozozná templátový DNA reťazec a vymení bázu za správnu.

Rekombinačná oprava nastáva vtedy, keď dôjde k zlomu DNA reťazcov. V takomto prípade sa naruší celistvosť DNA a nejaký úsek DNA sa môže dokonca aj stratiť. Pretože existuje viac typov mechanizmov zlomu DNA, existuje aj viac podtypov rekombinačnej opravy. Medzera však musí byť zacelená podľa komplementárneho rodičovského vlákna, ktoré už medzitým bolo tiež zreplikované. Úlohou tohto typu opravy je teda dosyntetizovanie chýbajúceho úseku a zacelenie DNA. Rekombinačnú opravu ďalej delíme na:

- **homologickú rekombináciu**, ktorá zacelí zlomenú DNA tak, že pomocou druhej kópie DNA komplikovanými procesmi poskladá chýbajúci úsek DNA;
- **nehomologickú rekombináciu**, ktorá spojí zlomené konce DNA, ak nedošlo k strate veľkého úseku DNA.

10.1.2 Oprava DNA mimo obdobia replikácie a reparačné mechanizmy

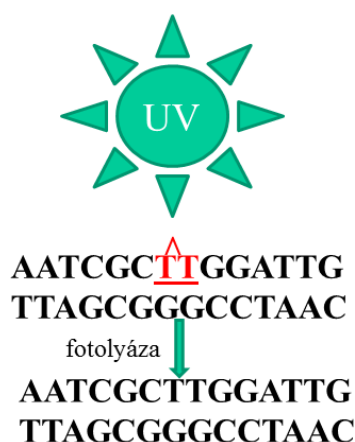
Ostatné reparačné mechanizmy sú zacielené na rozpoznanie chybného párovania báz a výmenu samotného nukleotidu v dvojvláknovej DNA, ktorá je už zreplikovaná alebo mutovaná. Rozsiahle poškodenie DNA zväčša bunka rieši skôr apoptózou, než by mala plytvať čas a prostriedky na opravu množstva mutácií, alebo riskovať transformáciu bunky na malígnu.

Existujú dve základné podmienky, kedy bunka spustí opravu DNA – poškodenie nesmie zasiahnuť gény riadiace a kontrolujúce reparačný mechanizmus a poškodenie nesmie presiahnuť rozsah 1 000 bp. V zásade platí, že menšie poškodenia sa reparujú pred replikáciou a väčšie poškodenia po replikácii.

10.1.2.1 Priama oprava poškodenia – fotoreaktivácia

Aby u živých organizmov nevznikali mutácie po každom nepriaznivom vplyve UV žiarenia, vytvoril sa v bunkách mechanizmus, ktorý opravuje takéto poškodenia. Doposiaľ boli opísané tri spôsoby fotoreaktivácie a to priama, nepriama a senzitivovaná. Najviac preštudovaná je priama. UV žiarenie preniká do buniek kože a poškodzuje DNA. Poškodenie DNA sa prejaví vytvorením diméru medzi susednými bázami jedného DNA vlákna, čo je problém pri replikácii a transkripcii. Je to jediný mechanizmus, ktorý využíva na opravu svetlo a iba jeden enzým, nazvaný **fotolyáza**. Aktivuje sa svetlom o vlnovej dĺžke 340 - 400 nm. Tento mechanizmus pracuje bezchybne a opravuje **tymínové diméry**, ktoré vznikajú v DNA po pôsobení UV žiarenia (obr. 66). Podobné diméry môže vytvárať aj cytozín. Fotolyáza sa naviaže v tme na tymínový dimér. Cez deň jej kofaktory **FADH₂** a pterín absorbujú svetlo, tým dôjde k aktivácii enzýmu a priamo k rozštiepeniu tymínového diméru. K fotoreaktivácii dochádza aj v RNA.

Priamu opravu chýb vznikajúcich po pôsobení alkylačných činidiel zabezpečuje **O⁶-metylguanín-DNA-metyltransferáza**, ktorá opravuje bázy **O⁶-guanín** a **O⁴-tymín**. Tento enzým sa nazýva aj samovražedný, lebo po prenesení jednej alkylvej skupiny sa nevratne inaktivuje.



• Obr. 66. Fotoreaktivácia

10.1.2.2 Excízna oprava

Ďalším typom opravy je excízna oprava, pri ktorej dôjde k odstráneniu poškodeného úseku. Jeden z reťazcov však musí byť nepoškodený a poškodenie musí byť len malé. Zahŕňa tri základné kroky: vyštiepenie poškodeného úseku z DNA, oddelenie poškodených úsekov a syntézu nových úsekov.

Bázová excízna oprava – opravuje poškodené bázy, ktoré vznikajú hlavne endogénnymi oxidatívnymi poškodeniami DNA. Enzým DNA-glykozyláza je schopná rozpoznať nesprávnu bázu (najčastejšie uracil nachádzajúci sa v DNA), uracil-N-glykozyláza rozštiepi N-glykozidovú väzbu, ktorou je báza viazaná na deoxyribózu a nahradí ju **cytozínom**. Týmto mechanizmom sa môžu opravovať chyby vzniknuté **metyláciou**, prípadne samovoľnou deamináciou **adenínu** na hypoxantín či cytozínu na uracil. Vznikne apurínové alebo apyrimidínové miesto, označujeme ho AP. AP endonukleáza ho nájde, napojí

sa naň a rozštiepi fosfodiesterovú väzbu. V DNA vznikne zlom, DNA-deoxyribofosfodiesteráza odštiepi jeden nesprávny nukleotid, ktorý následne DNA polymeráza doplní za správny na základe komplementarity. DNA ligáza na záver spojí reťazce vytvorením fosfodiesterovej väzby.

Nukleotidová excízna oprava – tento opravný mechanizmus sa anglicky nazýva nucleotide excision repair – NER, čo môžeme preložiť ako „mechanizmus vystrihujúci poškodené miesto z DNA“. Odstraňuje rozsiahlejšie poškodenia, väčšinou spôsobené environmentálnymi faktormi. Predstavuje ďalšiu možnosť ako opraviť pyrimidínové diméry. V tomto prípade sú dôležité endonukleázy, ktoré ako nožnice nastrihnú poškodený úsek DNA po oboch stranách v určitej vzdialenosti od miesta poškodenia. U *E. coli* sú to endonukleázy Uvr A, B, C, D a u človeka **XPA** – xeroderma pigmentosum. Tým je z molekuly DNA vyštiepený oligonukleotid obsahujúci dimér. Následne sa u baktérií pomocou DNA polymerázy I dosyntetizujú chýbajúce nukleotidy, čím dôjde k zaplneniu medzery. Opravný proces končí pôsobením DNA-ligázy ako pri bázeovej excízii. Poruchy v týchto excíznych mechanizmoch môžu viesť ku chorobe nazývanej xeroderma pigmentosum, ktorá je prekancerózou.

10.1.2.3 Tolerovanie poškodenia DNA - SOS reparácia

U baktérií je dobre preštudovaná tzv. SOS oprava. Nastáva v prípade rozsiahleho poškodenia DNA. V bunke sa najprv zastaví bunkový cyklus a spustia sa opravné mechanizmy. Túto reparáciu zabezpečujú **SOS gény**, ktoré sú usporiadané za sebou v tzv. SOS boxoch. Je tu zabezpečená koordinovaná syntéza enzýmov a proteínov. V nepoškodenej, neindukovanej bunke pôsobí produkt génu **LexA** ako represor a blokuje SOS gény. Ak dôjde k poškodeniu baktérie, aktivuje sa **RecA** proteín, ktorý sa viaže na jednoreťazcové úseky DNA v medzerách. RecA proteín inaktivuje LexA proteín a dôjde k aktivácii SOS génov, ktorých úlohou je akútna oprava poškodenej DNA. Teda jeden proteín, v tomto prípade **RecA**, aktivuje celý rad proteínov podieľajúcich sa na SOS odpovedi. Jedná sa však o značne nedokonalý proces, ktorý je akási „posledná záchrana“ bunky a pri tomto type opravy vznikajú často mutácie.

10.2 Syndrómy so spontánnou instabilitou chromozómov

Týmto názvom sa označujú **syndrómy s defektným DNA reparačným mechanizmom**. Do tejto skupiny patrí päť chorôb (xeroderma pigmentosum, Fanconiho anémia, Bloomov syndróm, ataxia teleangiectasia a Cockayneov syndróm), ktoré vznikajú v dôsledku mutácií génov pre reparačné enzýmy. Sú to autozómovo recesívne dedičné choroby s veľmi nízkou frekvenciou výskytu. Postihnutí jedinci sú sekundárne extrémne vnímaví na vplyv mutagénov. V ich DNA sa hromadia mutácie, čo u nich vedie k vysokému riziku malígnej transformácie a vzniku rakoviny. Doposiaľ neexistuje terapia.

10.2.1 Xeroderma pigmentosum

Toto ochorenie sa vyskytuje približne u 1 z 20 000 osôb v Japonsku, USA je incidencia 1 : 250 000 a v Európe 1 : 430 000. Postihuje rovnako mužov aj ženy. Príčinou je mutácia v niektorom z génov, ktoré kódujú proteíny potrebné na opravu poškodenia spôsobeného UV žiarením (fotoreaktivácia a excízna reparácia DNA). Rozlišuje sa 7 skupín (XPA až XPG), podľa typu poruchy (tab. 11).

• **Tab. 11.** Typy Xeroderma pigmentosum

Typ	Gén	Lokus	Veľkosť génu (kb)	Počet exónov	Počet aminokyselín	Veľkosť proteínu (Da)
XP-A	XPA	9q22.3	22,41	6	273	31 368
XP-B	XPB	2q21	36,89	15	782	89 300
XP-C	XPC	3p25	33,90	16	940	105 981
XP-D	XPB	19q13.2	20,73	23	760	86 909
XP-E	DDB2	11p12	24,26	10	427	47 864
XP-F	ERCC4	16p13.3	28,18	11	905	103 289
XP-G	ERCC5	13q33	29,93	15	1186	133 329

V karyotype sa nachádzajú zlomy, dicentrické, acentrické a prstencovité chromozómy. Charakteristickou črtou je zvýšená citlivosť na slnečné žiarenie a poruchy kožnej pigmentácie (červené, žltohnedé až čierne fľaky). Pacienti trpiaci týmto ochorením majú zjazvenú, suchú, šupinatú kožu (xeroderma). Deti s týmto ochorením sa označujú ako „deti noci“, pretože nesmú byť vystavení ani na pár minút slnečnému žiareniu, ktoré u nich vyvoláva okamžité spálenie pokožky a tvorbu pľuzgierov. Ochorenie je typické vysokým rizikom vzniku rakoviny kože (ruky, pery, nos, viečka), pravdepodobnosť výskytu rakoviny kože je u nich 2 000-krát väčšia ako u zdravých jedincov. Pacienti sú postihovaní rakovinou v priemere okolo ôsmeho roku života, čo je o 50 - 60 rokov skôr ako v ostatnej populácii. Často majú vplyvom UV žiarenia poškodený zrak. Môžu sa vyskytnúť aj záchvaty, poruchy intelektu a strata sluchu.

10.2.2 Fanconiho anémia

Úvodom chceme upozorniť, že Fanconiho syndróm nie je to isté ochorenie. Fanconiho anémia sa vyskytuje s frekvenciou 1 : 350 000 a podľa posledných odhadov je frekvencia heterozygotov 1 : 200. Zvyčajne je autozómovo recesívna porucha, ale môže sa vyskytnúť aj forma viazaná na X chromozóm. Je charakterizovaná progresívnou pancytopeniou (nedostatočná krvotvorba), poruchami pigmentácie, rastovou retardáciou, nízkou hmotnosťou, variabilnými kongenitálnymi malformáciami končatín a ucha. V karyotype sa nachádzajú zlomy, trhliny a kvadriradiály. Najčastejšou príčinou je mutácia génu *FANCA* (79,1 kb), lokalizovaného na 16q24.3. Má 43 exónov a kódovaný proteín o hmotnosti 162 775 Da sa skladá z 1 455 aminokyselín. Rozoznáva sa 8 skupín tohto ochorenia (FAA-C, FAE-G, FAL a FAM), podľa proteínov, ktoré vytvárajú komplex. Doposiaľ bolo identifikovaných 22 génov, ktoré sa spolupodieľajú na vzniku Fanconiho anémie. Ich mutáciou dochádza k poruche v reparácii DNA, v dôsledku čoho sa u pacientov sa môže rozvinúť myelodysplastický syndróm, ktorý často prechádza až do akútnej myeloidnej leukémie. Pacienti sú vysoko náchylní ku vzniku solídnych tumorov, hlavne hlavy a krku alebo v anogenitálnej oblasti. Prenatálna diagnostika je možná iba DNA analýzou. Jedinou kuratívnu liečbou pri hematologickej manifestácii je transplantácia kostnej drene.

10.2.3 Bloomov syndróm

Vyskytuje sa s frekvenciou 1 : 100 000 ale u židov aškenázy častejšie, približne 1 : 48 000. Ochorenie patrí do skupiny tzv. "chromozomálnych zlomov". Príčinou je mutácia génu *LIG4* pre DNA ligázu veľkosti 8,9 kb, s 2 exónmi, lokalizovaného na 13q33.3. Proteín má 103 971 Da a tvorí ho 911 aminokyselín. Tento gén zohráva dôležitú úlohu počas replikácie, rekombinácie a opráv DNA. Ochorenie nemá varianty (skupiny). Je charakterizovaný výraznou genetickou instabilitou, vrátane vysokého počtu výmen sesterských chromatíd. Dochádza až k desaťnásobnému zvýšeniu počtu výmen sesterských chromatíd v bunkách s Bloomovým syndrómom v porovnaní s normálnymi bunkami. V karyotype sa nachádzajú zlomy, dochádza až k fragile chromozómov. K typickým prejavom patrí edém motýľovitého tvaru na tvári,

rastová retardácia, ťažké prejavy imunodeficiencie a vyskytujú sa tu v zvýšenej miere rôzne malignity.

10.2.4 Ataxia teleangiektázia (syndróm Henner-Louis-Barovej)

Napriek tomu, že sa považuje za zriedkavé ochorenie, prevalencia sa odhaduje na 1 : 40 000 - 50 000. Postihuje v rovnakej miere mužov a ženy a manifestuje sa do druhého roku života. Ochorenie ako prví opísali českí lekári Syllaba a Henner v roku 1922 a v roku 1941 Louis-Barová. V karyotype sú evidentné zlomy a translokácie. Príčinou je mutácia génu *ATM* (*ataxia teleangiectasia mutated*), lokalizovaného na 11q22.3, veľkosti 143 kb, ktorý má 64 exónov. Proteín je zložený z 3 056 aminokyselín, má veľkosť 350 644 Da a zúčastňuje sa regulácie bunkového cyklu.

ATM proteínkináza má za úlohu rozpoznať dvojvláknové zlomy v DNA. Mutáciou vzniká skrútený a nefunkčný proteín, neschopný rozoznať poškodenú DNA a zastaviť bunkový cyklus. Rozoznáva sa 6 skupín tohto ochorenia (ATA až ATF).

Je to veľmi komplexný syndróm. Problém je v imunitnom systéme. Porušená je predovšetkým humorálna imunita s poklesom hladiny sérového a sekrečného IgA a IgE a so vzostupom IgG a IgM. Dôsledkom je nedostatočná tvorba protilátok a opakované časté respiračné infekty. Ochorenie začína ataxiou, poruchami chôdze, neskôr sa pridružujú mimovoľné pohyby charakteru choreoatetózy. Teleangiektázie na spojivkách, na koreni nosa, ušniciach, šiji, kubitálnej jamke sa objavujú až medzi 3. - 10. rokom života a zvyrazňujú sa po expozícii na slnku. Medzi typické príznaky patrí predčasné šedivenie vlasov, stenčenie a strata elasticity kože. Tieto deti majú 40 - 100krát častejšie lymfómy, leukémie, lymfosarkómy a Hodgkinovu chorobu ako ich vrstovníci. Polovica z nich má v adolescencii diabetes.

10.2.5 Cockayneov syndróm

Cockayneov syndróm je pomenovaný po anglického lekára Edwarda Cockayna, ktorý ho opísal v roku 1936. Vyskytuje sa s frekvenciou 1 : 250 000. V karyotype sa nachádzajú predovšetkým zlomy. Príčinou sú mutácie génov *CSA* a *CSB*, čím dochádza k poruche exíznej reparácie. *CSA* je lokalizovaný na 5q12.1. Má veľkosť 71,23 kb a 12 exónov. Ním kódovaný proteín má hmotnosť 44 055 Da a je tvorený 396 aminokyselinami. *CSB* gén s lokalizáciou 10q11, s veľkosťou 80,36 kb a s 21 exónmi kóduje proteín zložený z 1 493 aminokyselín o hmotnosti 168 416 Da.

Rozlišujú sa tri skupiny tohto ochorenia *CSA*, *CSB* a *CSIII*. Prvý typ nazývaný klasický, je charakterizovaný narodením morfológicky normálneho dieťaťa. Choroba sa objavuje už v prvom roku. Dožívajú sa do 20 rokov. Druhý typ patológie je diagnostikovaný už pri narodení. Neonatológ odhaľuje veľmi slabý vývoj nervového systému, absenciu „povinných“ reflexov a reakcie na podnety. Deti sa dožijú sedem rokov. Pri treťom type choroby sú všetky príznaky oveľa menej výrazné a ich začiatok sa pozoruje neskôr ako v prvom alebo druhom type. Navyše jedinci s týmto typom môžu žiť až do dospelosti. Z príznakov sa vyskytujú mentálna retardácia, neurologické poruchy, problémy s chôdzou, predčasné šedivenie, starecká tvár, dlhé končatiny, poruchy zraku a sluchu. Nedáva sa do súvisu s konkrétnym typom rakoviny.

Doplňujúca študijná literatúra

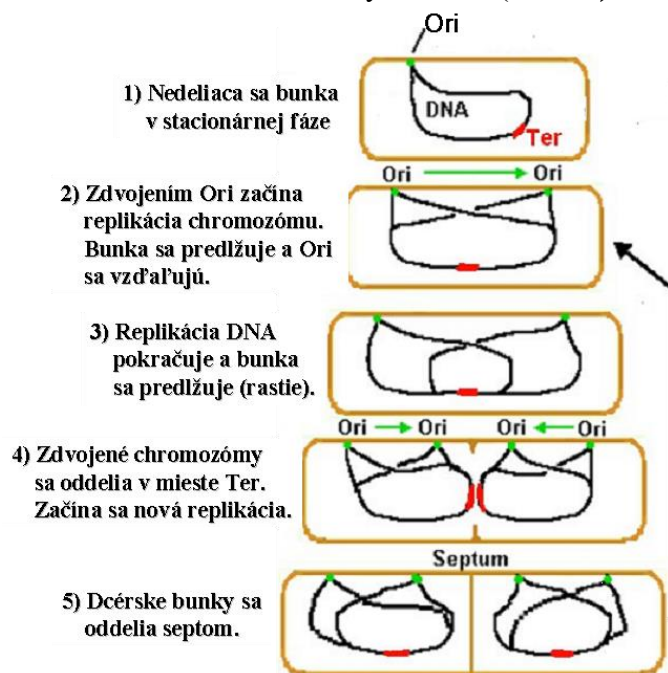
ALBERTS, B. – BRAY, D. – JOHNSON, A. – LEWIS, J. – RAFF, M. – ROBERTS, K. – WALTER, P.: Základy bunčnej biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. 2. vydanie. Ústí nad Labem: Espero Publishing 2005, 740 s.

11 REGULÁCIA A DEREGULÁCIA BUNKOVÉHO CYKLU

11.1 Princípy regulácie bunkového cyklu

Bunkový cyklus (BC) začína vznikom dcérskej bunky a končí jej rozdelením na dve nové bunky. Ak sú splnené vonkajšie aj vnútorné podmienky, cyklus sa opakuje. Vzniká klon (subpopulácia) buniek.

U prokaryotov je, vzhľadom na ich jednoduchosť, bunkový cyklus skrátený. Bunka sa rozdelí hneď po ukončení replikácie DNA. Nazývame to delenie priame (amitóza). Nasledujúca replikácia DNA môže začať skôr, ako skončila cytokinéza (obr. 67).



• Obr. 67. Schéma delenia prokaryotickej bunky

Ak na začiatku cyklu nastala diferenciácia prokaryotickej bunky, vznikne anabiotické štádium – spóra. Cyklus pokračuje až po tom, ako sa spóra dostane do optimálneho prostredia. Tu desporuluje a stáva sa vegetatívnou formou, schopnou delenia.

Eukaryotické bunky sú podstatne zložitejšie. Majú rozsiahly a zložito usporiadaný jadrový genóm. Ich DNA je lineárna, rozdelená na úseky a je asociovaná s histónovými a nehistónovými bielkovinami (pozri kapitolu 2.3.1.3 v Lekárska biológia a genetika I).

Dcérske bunky u mnohobunkových organizmov musia byť navzájom geneticky identické (po mitóze) alebo musia mať haploidný počet chromozómov (po meióze). Zároveň musí priebeh cyklu zaručiť kontrolu a opravu všetkých chýb v DNA – pred replikáciou, počas nej a po jej skončení. Ak sa nepodari opravy urobiť v časovom limite, riziková bunka je apoptózou eliminovaná, aby malígnu transformáciou neohrozila celý organizmus.

Z uvedených dôvodov je bunkový cyklus eukaryotických buniek mnohobunkových organizmov riadený zložitým systémom kontrolných a riadiacich (regulačných) mechanizmov, ktoré musia byť v rovnováhe.

Bunkový cyklus je rozdelený na viacero etáp a v každej z nich sa nachádza **kontrolný uzol** – časovo limitované **obdobie**, v ktorom sa interakciou regulačných bielkovín skontroluje doterajší priebeh cyklu. Cyklus sa zastaví (aby bolo možné vykonať opravy) a potom sa povolí jeho pokračovanie. Ak je rozsah mutácií príliš veľký, po zastavení cyklu sa navodí zánik bunky apoptózou.

Základné **princípy riadenia (regulácie) priebehu bunkového cyklu** somatických buniek sú:

- normálna telová bunka sa bude deliť len po tom, ako dostane príslušný **podnet** z okolia. Týmto podnetom je niektorý z tzv. mitogénov (rastových faktorov), prichádzajúcich endokrinnou alebo parakrinnou cestou. Po jeho pripojení na receptor pre rastový faktor (je na povrch bunky „vyložený“ až keď je bunka pripravená na pokračovanie v BC) vznikne signál, ktorý sa šíri kaskádou interakcií molekúl v bunke. Samovoľne sa delia len nezávislé, čiže maligne transformované bunky;
- **signál** (podnet) pre pokračovanie bunkového cyklu sa v bunke realizuje cestou tzv. **signálových dráh**. Výsledkom je zvyčajne cielená expresia génu (génov) alebo ovplyvnenie činnosti (aktivácia alebo inhibícia) cieľového proteínu (komplexu). Signál sa postupne rozširuje (amplifikuje), čím je zabezpečená koordinácia rôznych procesov, ktoré prebiehajú zároveň. Mnohé z nich sú kontrolované spätnou väzbou, alebo tým, že sa jednotlivé signálne dráhy stretávajú a vzájomne ovplyvňujú svoj ďalší priebeh (tzv. „cross-talk“). Zabezpečenie ich prítomnosti, aktivácia a inhibícia proteínov a ich komplexov v bunke (jadre), má presne určenú časovú následnosť, ktorou sa zabezpečuje správne poradie procesov regulácie. Nazýva sa to aj „domino efekt“.

Aktivita a množstvo zúčastnených regulačných proteínov je pre správnu reguláciu jednotlivých etáp bunkového cyklu mimoriadne dôležitá. Len rovnováhou ich interakcie sa dosahuje korektná regulácia bunkového cyklu. Ak sa táto rovnováha poruší, dochádza k deregulácii bunkového cyklu a zvyšuje sa riziko malignej transformácie bunky.

Hlavnými mechanizmami riadenia (tzv. „chemizmus“) aktivity (účinnosti) bielkovín zúčastnených na regulácii **bunkového cyklu** sú riadenie expresie génu (génov), aktivácia a inaktivácia proteínov regulujúcich bunkový cyklus, väzba aktivátora, cielená likvidácia proteínov a väzba špecifického inhibítora.

Riadenie expresie génu (génov) zabezpečuje správne načasovanie prítomnosti príslušnej bielkoviny v jadre alebo v cytoplazme. V bunke sú dva spôsoby, ako to dosiahnuť. V prvom prípade, **signálová dráha končí expresiou konkrétneho génu**, ktorý zvyčajne kóduje špecifický transkripčný faktor (napr. c-myc). Ten potom zabezpečí cielenú transkripciu niektorých ďalších génov (v tomto prípade napr. pre cyklíny D, E a nakoniec cyklín A) a pre podjednotku ubikvitínovej ligázy SCF). Tento postup sa používa najmä v prípadoch, keď ide o bielkoviny so závažnou regulačnou funkciou. V druhom prípade **signálová dráha končí expresiou rodiny génov**, čo umožní postupnú alebo hromadnú a paralelnú (v tom istom čase prebiehajúcu) transkripciu potrebných génov. Príkladom je rodina E2F génov pre špecifické transkripčné faktory – umožňuje v krátkom čase, po úspešnom prechode cez G1 fázy kontrolný uzol BC, zabezpečiť expresiu génov pre všetky enzýmy a regulačné bielkoviny potrebné pre replikáciu DNA;

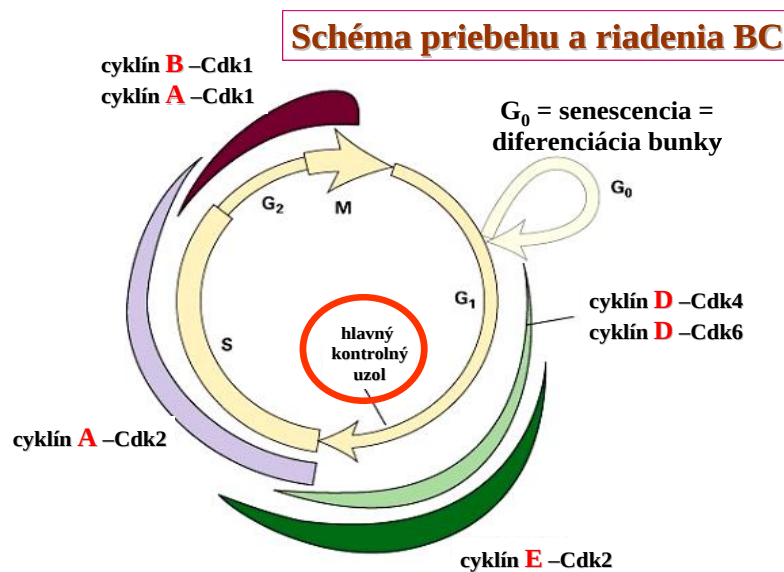
Pri **aktivácii a inaktivácii** proteínov regulujúcich bunkový cyklus ide o **enzýmovú úpravu** – napr. aminoacylácia a deacylácia histónov (reguluje linearizáciu DNA a tým prístup ku génom), ako aj metylácia, ktorá má blokujúci účinok. Tieto enzýmové zásahy patria k tzv. posttranslačným úpravám bielkovín. Ďalej, **kompletizácia podjednotiek enzýmov** – napr. pri ubikvitínovej ligáze SCF a **fosforylácia a defosforylácia** cieľových bielkovín na mieste konkrétnych aminokyselín mení ich konformáciu (priestorové usporiadanie), čím sú buď aktivované alebo inaktivované. Výsledok závisí od toho, ktoré aminokyseliny sú fosforylované a na ktorých (koľkých) miestach cieľovej bielkoviny. Príkladom je kináza cdc2 vo väzbe s cyklínom B. Fosforylácie cdc2 na treoníne v pozícii 14 a tyrozíne v pozícii 15 sú inhibičné. Prevažujú nad aktivačným účinkom fosforylácie treonínu v pozícii 160 (resp. 162, či 164 – podľa typu buniek).

Enzýmy, ktoré získavajú fosfát (PO_4^{2-}) z donora (adenozíntrifosfát alebo guanozíntrifosfát) a **pridávajú** ho na niektorú aminokyselinu s –OH skupinou (serín, treonín alebo tyrozín) sa nazývajú **kinázy**. Účinnými sa stávajú po tom, čo sa k nim pripojí aktivátor (cyklín), ktorý dokončí výstavbu ich aktívneho centra a zároveň určí cieľovú bielkovinu

a miesto na nej, kam majú pridať fosfát. Pre toto sa volajú aj cyklín-dependentné kinázy (cdk alebo cdc).

V regulácii BC majú význam najmä ako:

- receptory pre rastové faktory s kinázovou aktivitou ich vnútrobunkových domén;
- cytoplazmatické transitory – MEK a MAP kinázy (mitogénom aktivované proteín kinázy), ktoré prenášajú signál do jadra;
- cyklín-dependentné kinázy (cdk alebo cdc), ktoré sú aktívne len po spojení s cyklínom a zabezpečujú prechody do jednotlivých fáz BC (obr. 68). V bunke sú stále prítomné. U človeka je známych viac ako 10 cdk, z nich len cdk 1, 2, 4, 6 a 7 hrajú dôležitú úlohu v regulácii BC (ostatné môžu mať doplnkovú alebo regulačnú funkciu). U niektorých kvasiniek, u ktorých bola pôvodne študovaná funkcia väčšiny z nich, sa označujú skratkou cdc. Na aktiváciu cdk je potrebná jej väzba s cyklínom, pričom jedna cdk fosforyluje rôzne cieľové bielkoviny, podľa toho s akým cyklínom je spojená a naopak, cyklín môže striedať rôzne cdk – s ovplyvnením odlišných bielkovín (procesov). V niektorých prípadoch (cyklín A–cdk2 alebo cyklín E–cdk2) pre aktiváciu cdk stačí samotná väzba s cyklínom, inokedy je potrebná aktivačná fosforylácia (cyklínB–cdk2) alebo pripojenie ďalšieho regulačného komponentu (cdk4–cyklínD–cdc37). Enzýmy, ktoré odoberajú fosfát z miest, kde bol pripojený kinázou sa volajú **fosfatázy** (defosforylázy). Príkladom je cdc25 – fosfatáza, ktorá zabezpečuje aj prechod z G₂ do M-fázy tým, že odníme inhibujúce fosfáty z treonínu 14 a tyrozínu 15 na cdc2, čím prevládne jej aktivujúca fosforylácia na treoníne 160* a komplex tejto kinázy s cyklínom B spustí mitózu.

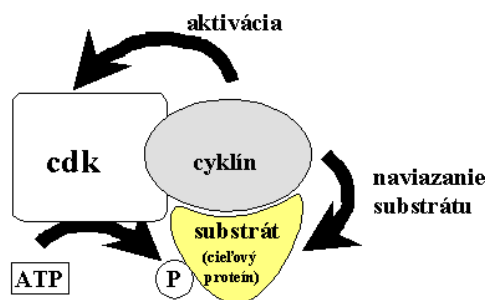


• **Obr. 68.** Cyklíny a cdk v bunkovom cykle

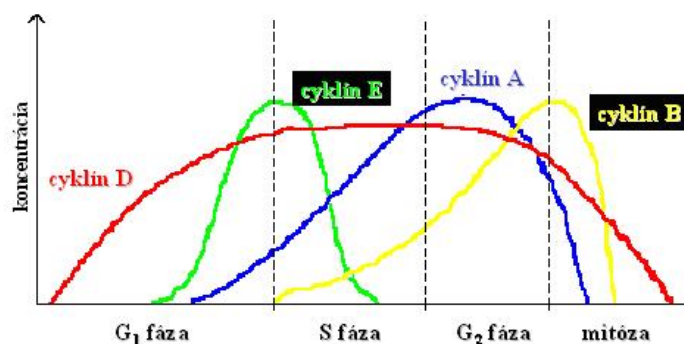
Väzba aktivátora – napr. cyklínu na cdk (obr. 69). Cyklíny sú bielkoviny, ktoré majú za úlohu aktivovať cdk.

V eukaryotických bunkách je známych viac ako 15 typov cyklínov, ale len niektoré z nich sa podieľajú na riadení BC – cyklíny A, B, C, D, E a H. Jednotlivé cyklíny sú syntetizované, prítomné v jadre a (v komplexe s cdk) aktívne, len v určitej fáze BC (obr. 70). Po splnení „úlohy“ sa buď prestanú vyrábať (ukončí sa expresia génov, ktoré ich kódujú), alebo sú (po ubiquitinácii) degradované v proteazóme. Cyklíny A a B obsahujú deštruktívnu doménu a cyklíny D a E obsahujú PEST sekvenciu (bohatú na prolín, kys. glutámovú, serín a treonín), ktorá je typická pre bielkoviny s veľmi krátkou životnosťou.

Dynamika cyklínov má teda definovaný priebeh a skončenie ich syntézy, „životnosti“ alebo ich odstránenie sú primárnou prevenciou opakovania procesov v bunkovom cykle, ktoré riadia.



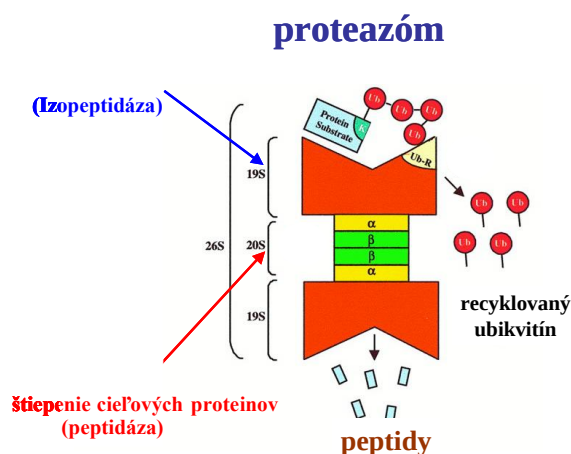
• Obr. 69. Aktivácia cdk naviazaním cyklínu



• Obr. 70. Dynamika cyklínov v priebehu bunkového cyklu

Cielená likvidácia – napr. ubikvitináciou. Názov pochádza z latinského ubiqu – všadeprítomný. Tento proces je univerzálnou metódou cielenej špecifickej likvidácie nepotrebných proteínov. Sú označené reťazcom ubikvitínov a ich „pomocou“ sú následne likvidované komplexom proteáz (proteolytických enzýmov) v cytoplazme, ktorý sa nazýva 26S proteazóm.

Pomocou tzv. „E“ enzýmov – ubikvitín-aktivačného enzýmu (E1) a ubikvitín-konjugáčného enzýmu (E2) vznikne ubikvitínový reťazec. Tento reťazec je potom ubikvitínovou ligázou (E3) pripojený na lyzín proteínu, ktorý je určený na likvidáciu. E3 sa odpojí a označený proteín je ubikvitínovým reťazcom pripojený na ubikvitín-rozpoznávajúcu doménu (receptor) proteazómu (obr. 71). Reťazec ubikvitínov je následne odpojený a rozpojený – jeho molekuly sa môžu znovu použiť. Bielkovina je prijatá do proteazómu a je v ňom rozložená na peptidy, ktoré sú ďalšími enzýmami (tzv. cytoplazmatickými peptidázami) štiepené až na recyklovateľné aminokyseliny.



• Obr. 71. Proteazóm

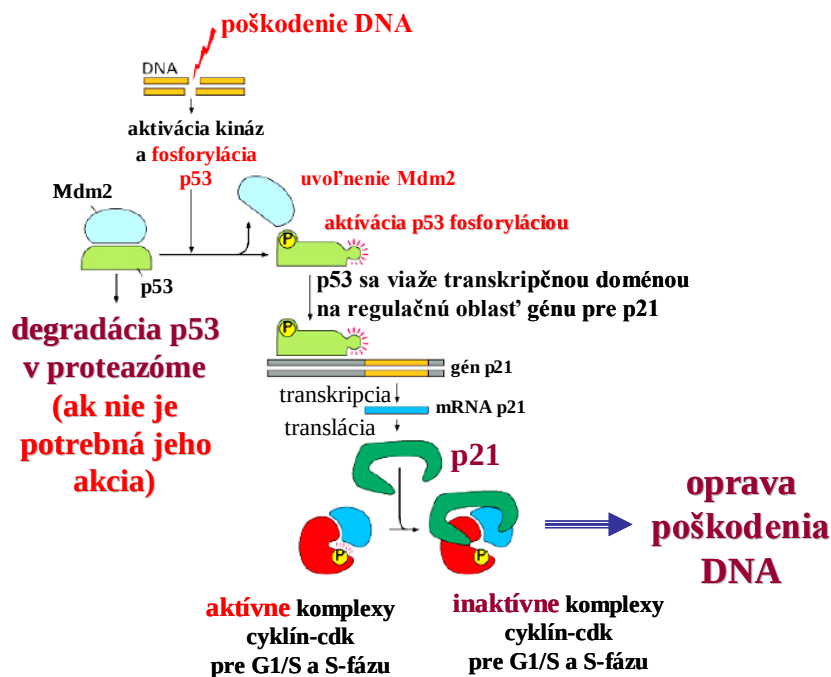
Kľúčovým hráčom tohoto typu regulácie aktivity proteínov sú teda E3 enzýmy – **ubikvitínové ligázy**. Pri regulácii BC majú význam najmä dve z nich – **SCF** a **APC/C**.

SCF je zodpovedná za likvidáciu inhibítorových molekúl p27 a p21, ktoré spomaľujú (p27) alebo blokujú (p21) prechod z G1 fázy do S-fázy. APC/C je súčasťou anafázy promujúceho komplexu v mitotickom kontrolnom uzle BC – ubikvitínuje tu napr. cyklín B a sekurín.

Väzba inhibítora – napr. p27 a p21. Pri prevencii výskytu a hromadenia mutácií v genóme bunky zohrávajú inhibítory aktivity komplexov cyklín-cdk závažnú úlohu. Uvedené inhibítory blokujú najmä aktivitu komplexov cyklín D-cdk4 a cyklín E-cdk2, aby nemohli silne fosforylovať proteín rb1 a umožniť prechod z G1 do S-fázy.

Úlohou proteínu s molekulovou hmotnosťou 27 kDa (p27) je najmä blokovať aktivitu komplexu cyklín E-cdk2 a tým spomaľovať jeho príspevok k fosforylácii rb1. Takto sa v G1 fázovom kontrolnom uzle BC získa čas na kontrolu a opravu mutácií, ktoré vznikli v DNA. Molekuly p27 sú postupne likvidované pomocou SCF a ich inhibičný účinok zaniká. Toto platí, ak je počet zistených mutácií v DNA „zvládnuťelný“.

Kým p27 je pravidelným účastníkom regulácie prechodu G1/S, tak inhibítorový proteín p21 je syntetizovaný len vtedy, ak došlo ku kritickému poškodeniu DNA. Funkciou p21 je zablockovať (zamknúť) pokračovanie (progresiu) BC a získať čas pre reparáciu mutácií a ak to nestačí – navodí sa zánik bunky apoptózou (obr. 72).



• **Obr. 72.** Vznik a funkcia inhibičného proteínu p21

Po tom, ako monitorovací („reportérový“) systém (napr. skupina Rad) zistí poškodenie DNA, pomocou systému ATM-ATR sú aktivované kontrolné („check“) kinázy Chk1 a Chk2. Tie v tzv. „rýchlej odpovedi“ najprv fosforylujú aktuálne aktívne komplexy cyklín-cdk a pozastavia („zmrazia“) pokračovanie v BC, aby bol poskytnutý dostatočný čas na reparáciu mutácií v DNA. Aktivuje sa to v priebehu krátkej doby (minút).

Ak ale naďalej pokračuje prísun (tok) informácií od reportérov o prítomnosti mutácií, nové check-kinázy fosforáciou jeho nosiča, ktorý ho dopravil do jadra (mdm2), aktivujú bielkovinu p53. Nazýva sa aj ochranka („guardian“) genómu a je to špecifický transkripčný faktor, ktorý:

- najprv spôsobí expresiu génu pre inhibítorový proteín p21 a ten sa vloží do aktívneho centra pre v tom čase pôsobiaceho komplexu (komplexov) cyklín-cdk, čím ich zablokuje

(„arrest“). Nakoľko istú dobu trvá, kým sa p21 vyrobí a vráti sa do jadra, nazývame to „neskorá odpoveď“;

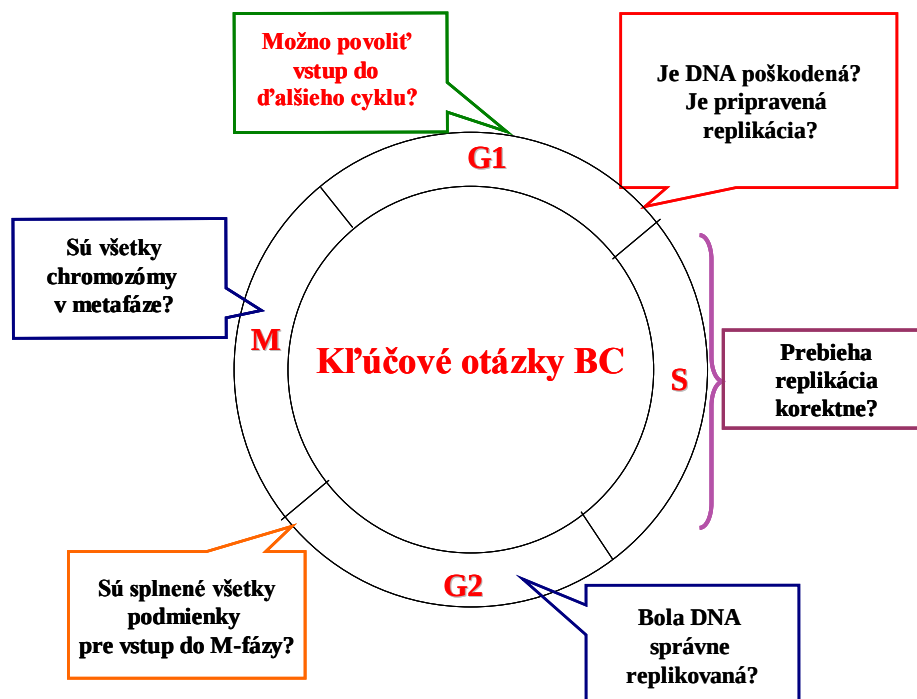
- ak naďalej prichádzajú od reportérov informácie o mutáciách, alebo ak má bunka „vyčerpané“ teloméry chromozómov, ďalšie aktivované molekuly p53 spôsobia transkripciu gánu pre p73 (resp. p78) a tieto bielkoviny navodia apoptózu bunky mitochondriálnou dráhou.

11.2 Priebeh a kontrolné uzly bunkového cyklu

Jednotlivé etapy (fázy) BC sú charakterizované sériou procesov, ktoré v nich prebiehajú. Majú vnútornú následnosť, ktorá sa opisuje ako „domino efekt“. Dominantou interfázy je ochrana kvality DNA a v mitóze sa musí zabezpečiť identická kvantita (objem) informácie pre obidve dcérske bunky.

Vyvrcholením jednotlivej série (kaskády) procesov v každej z fáz BC je kontrolný uzol, ktorý má jednu alebo niekoľko kľúčových molekúl (hráčov). Interakcia regulačných proteínov buď túto kľúčovú bielkovinu aktivuje (alebo inaktivuje) – čím sa povolí pokračovanie v cykle. Ak je priveľa mutácií, cyklus sa spomalí alebo zastaví, aby boli opravené mutácie. Ak je poškodenie DNA prívelké – navodí sa zánik bunky apoptózou.

Princíp je v tom, že zánik jednej bunky mnohobunkový organizmus neohrozí, ale klon vzniknutý z jednej maligne transformovanej bunky môže tento organizmus zahubiť. Aby sa to nestalo, sú v priebehu každej fázy BC položené otázky (obr. 73), ktoré je potrebné vyriešiť.



• **Obr. 73.** Kľúčové otázky bunkového cyklu

Miera diferenciácie bunky, funkčný stav bunky, podmienky prostredia (napr. teplota) atď., rozhodujú o tom, či sa povolí pokračovanie v cykle. Ak áno, zvyčajne sa to prejaví tým, že bunka na svoj povrch umiestni receptor(y) pre rastové signály.

Pre **povolenie prechodu z G1 do S fázy** je podstatný počet mutácií, ktoré vznikli v DNA. Kľúčovým hráčom pre povolenie pokračovania v cykle je proteín **rb1**, ktorý blokuje syntézu všetkých bielkovín potrebných na začatie replikácie DNA, vrátane cyklínu A, ktorý prevedie bunku do S-fázy. Pre pozastavenie progresie cyklu (a prípadné navodenie apoptózy) zohrávajú kľúčovú úlohu check-kinázy a proteín p53.

V priebehu S-fázy BC má kľúčovú (kontrolnú) funkciu DNA polymeráza III, ktorá nielen replikuje väčšinu DNA (syntetizuje komplementárnu kópiu vedúceho reťazca a Okazakiho fragmenty), ale aj vyhľadáva a opravuje chyby (v komplementarite báz), ktoré urobí. Pri závažnom narušení priebehu S-fázy môže s ňou interferovať inhibičný proteín p21, ktorý zablokuje jej progres tým, že sa naviaže na komplex cyklín A-cdk2.

Po skončení S-fázy (v G2 fáze) je potrebné skontrolovať priebeh replikácie a opraviť chyby, ktoré počas nej vznikli. Kľúčovým hráčom je cdc25, ktorá odstráni inhibujúce fosforylácie a tým aktivuje komplex cyklín B-cdc2, aby bunku previedol do mitózy.

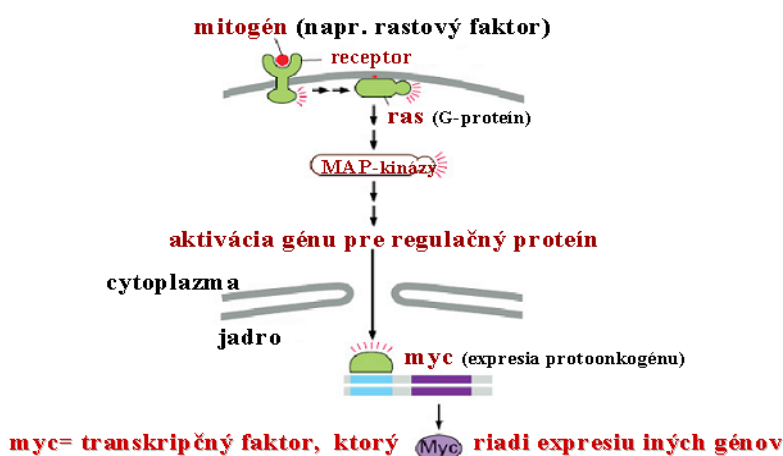
Sústredenie všetkých zdvojených chromozómov v metafázovej platni je základom pre ekválne rozdelenie rovnakého objemu genetickej informácie (počtu a typu chromozómov) do dcérskych buniek. Kľúčovými proteínmi sú najmä mad2 a APC/C.

11.2.1 Kontrolné uzly fáz bunkového cyklu

1. kontrolný uzol – v závere G1 fázy sa tradične nazýva hlavný kontrolný uzol bunkového cyklu. Zabezpečuje povolenie prechodu z G1 do S-fázy bunkového cyklu.

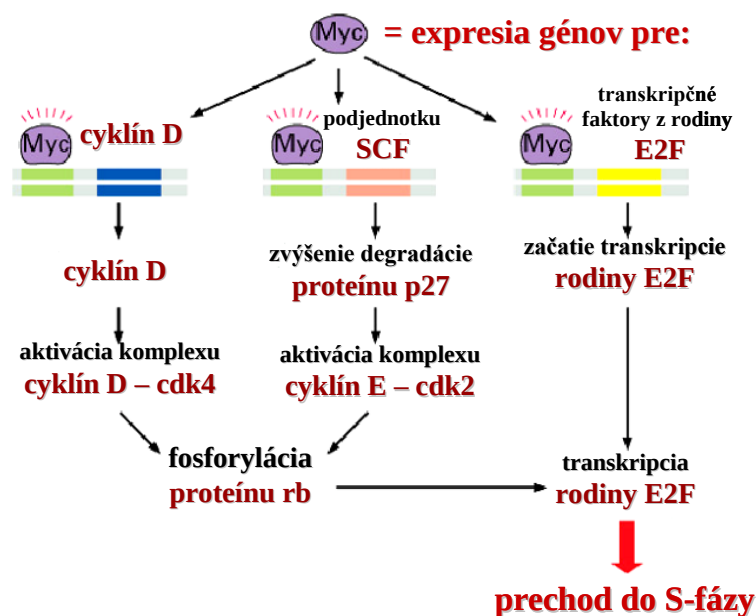
Dochádza v ňom k detekcii mutácií v DNA a ich reparácii. Po ich oprave je buď povolený prechod do S-fázy alebo je bunka (pre neopraviteľné mutácie) dovedená k zániku – apoptóze. Kľúčovým hráčom je proteín **rb1**, ktorý blokuje rodinu špecifických transkripčných proteínov (faktorov) E2F tým, že sa ako represor viaže na spoločný promótor (LCR) tejto rodiny génov. Po uvoľnení rb1 (silnou fosforyláciou cyklínmi D a E s ich cdk) z jeho represorového pôsobenia, zabezpečí rodina špecifických transkripčných faktorov E2F nielen syntézu S-fázového cyklínu A, ale aj všetkých bielkovín potrebných pre replikáciu jadrovej DNA (DNA polymerázy III a I, primáza, ligáza, ssbDNA-proteíny atď.).

Na začiatku tohoto obdobia života bunky (obr. 74) (keď sa vráti z G0 do G1 fázy a na svoj povrch „vyloží“ receptory pre mitogénne aktivátory), sa na tieto receptory na povrchu cytoplazmatickej membrány bunky napoja rastové faktory. Ich pôsobením sa receptor dimerizuje a aktivuje sa jeho vnútrobunková (intracelulárna) časť (doména) – uplatní sa jej kinázová aktivita. Výsledkom je aktivácia a zoskupenie pomocných proteínov (napr. GRB2 a SOS1), ktorá končí aktiváciou G-proteínu K-ras. Aktivácia spočíva v tom, že sa K-rasu odníme GDP a pridá sa mu GTP (guanozíntrifosfát). Tým je schopný fosforylovať ďalší proteín v kaskáde – Raf. Tento fosforyluje (a tým aktivuje) cytoplazmatické transduktory – MEK a ďalšie MAP (mitogénom aktivované proteín kinázy), ktoré nakoniec cez póry donesú signál do jadra bunky. Tu sa navodí expresia cieľového génu pre kľúčový špecifický transkripčný faktor – napr. c-myc. Pre rôzne dráhy je viacero takýchto génov (napr. jun, fos, erb a pod.), ale ich úloha je rovnaká.



• **Obr. 74.** Princíp prenosu signálu na pokračovanie v BC, z povrchu cytoplazmatickej membrány do jadra

Špecifický transkripčný faktor c-myc má (pri amplifikácii signálu) za úlohu postupne zabezpečiť transkripciu najmenej piatich génov a jednej rodiny génov (obr. 75).



• **Obr. 75.** Vnútrojadrová časť signálovej dráhy na prechod G1–S

C-myc najprv zabezpečí syntézu cyklínu D a následne cyklínu E. Po vytvorení komplexu cyklín D-cdk4 začína tento komplex fosforylovať represorový proteín rb1, čo však nestačí na jeho odpojenie od regulačnej oblasti génovej rodiny transkripčných faktorov E2F, ktorá sa nemôže exprimovať. Na pomoc (pri hyperfosforylácii rb1) mu síce prichádzajú komplexy cyklíny E-cdk2, ale tento je blokovaný inhibítorom p27. Avšak c-myc zabezpečil aj expresiu génu pre poslednú podjednotku SCF, čím sa aktivuje táto ubikvitínová ligáza. To vedie (pokiaľ nie je priveľa mutácií a nezačne účinkovať inhibítor p21) k postupnej likvidácii inhibítora p27. Výsledkom je, že sa naplno môže prejaviť aj fosforylačný účinok komplexu cyklín E-cdk2, ktorý vedie k odpojeniu rb1 od regulačnej oblasti E2F a tým syntéze bielkovín potrebných pre replikáciu DNA. Nakoniec c-myc „zariadi“ expresiu génu pre cyklín A, ktorý bude riadiť replikáciu DNA. Takto sú vytvorené molekulové podmienky k vstupu do S-fázy BC.

2. kontrolný uzol – v S fáze. Predpokladom priebehu S-fázy (replikácie DNA) je prítomnosť komplexu cyklín A-cdk2, ktorý riadi priebeh tejto fázy cyklu a blokovanie komplexu cyklín B-cdk1, ktorý spúšťa mitózu.

S-fázový kontrolný uzol sa realizuje postupne. Sú tu tri „zámky“, pričom len posledný z nich sa odomyká priebežne – DNA polymeráza III opravuje chyby, ktoré pri replikácii urobila.

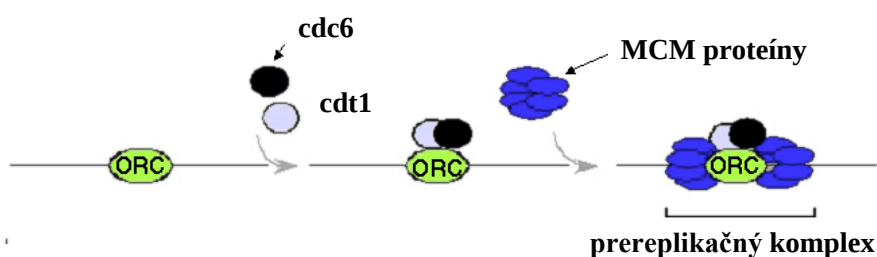
Prvým „zámkom“, ktorý rozhoduje o tom, či sa vôbec môže začať replikácia DNA v bunke (aj keď bol už boli vytvorené molekulové podmienky pre prechod do S-fázy a v jadre sú prítomné všetky bielkoviny potrebné pre replikáciu), je prítomnosť aspoň jedného voľného motívu pre väzbu primeru na telomére chromozómu(ov). Na prečnievajúcom vlákne DNA (s orientáciou 3'–5') sa totiž nachádza definovaný počet (bežne do 20) opakovaní hexanukleotidu – v ľudských bunkách to je TTAGGG, ale u rôznych eukaryotov sa tieto motívy veľmi odlišujú (tab. 12).

• **Tab. 12.** Motívy pre väzbu primeru na teloméry, u rôznych eukaryotov

druh	motív
<i>Arabidopsis</i>	TTTAGGG
Človek	TTAGGG
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG
Huby vreckaté	TAGGG
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG
Trypanozómy	TAGGG
kvasinky	(TG) ₁₋₃ TG ₂₋₃

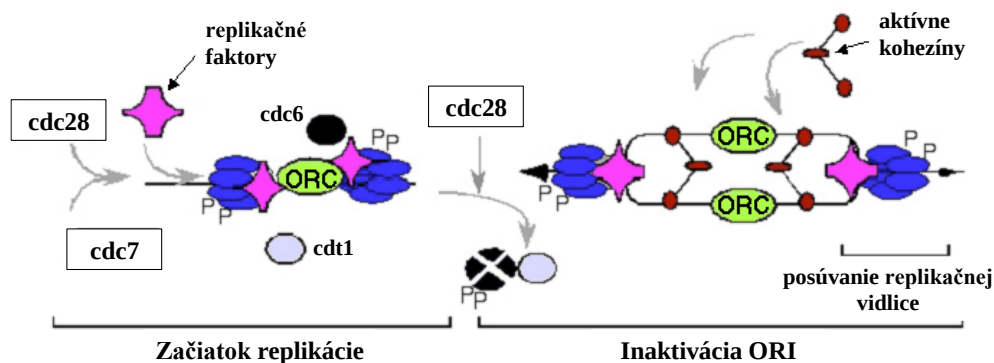
Pri začatí replikácie sa na tento motív napojí primer, čím sa má kam ukotviť DNA polymeráza III, aby začala kontinuálnu replikáciu vedúceho vlákna DNA. Miesto po väzbe primeru sa ale (na rozdiel od situácie pri syntéze Okazakiho fragmentov v zaostávajúcom vlákne DNA) nereplikuje, takže sa s každou replikáciou DNA prečnievajúce vlákno skracuje. Keď sa spotrebujú všetky hexanukleotidy, bunka zanikne apoptózou. Toto je primárna prevencia pred delením sa buniek, ktoré prekročili svoju životnosť. V embryonálnych (a v niektorých malígne transformovaných) bunkách je aktívny gén pre enzým telomerázu – ribonukleoproteín, ktorý je schopný doplniť chýbajúce motívy, čím sa bunka stáva nesmrteľnou.

„Druhým zámkom“ je povolenie prístupu k začiatkom replikácie, čiže k ORI sekvenciám, kde vznikajú replikačné bubliny. Hneď po replikácii sa na každý novo vzniknutý ORI naviažu bielkoviny ORC (ori rozpoznávajúci komplex). Zároveň sa pripoja aj ochranné tzv. licenčné faktory – proteíny *cdc6* a *cdt1*. Kým nebudú odstránené, nemôže znovu začať replikácia. Z oboch strán tohto komplexu sa (na začiatku G1 fázy nového cyklu) pripoja oktaméry tzv. MCM (*minichromosome maintenance*) proteínov. Celý tento konglomerát sa potom nazýva prereplikačný komplex (obr. 76)



• **Obr. 76.** Vznik prereplikačného komplexu

Replikácia môže začať len vtedy, keď sú z väzby na ORC fosforyláciou odpojené (a neskôr ubiquitínované) licenčné faktory *cdc6* a *cdt1*, čo v príslušnom čase vykonajú kinázy *cdc28* a *cdc7* (obr. 77). Zároveň sú fosforyláciou „uvoľnené“ oktaméry MCM a sú „posúvané“ predlžovaním sa replikačnej bubliny. ORC sa odpojí a „replikačné faktory“ (helikáza, primáza, DNA polymerázy atď.) vytvoria replikačnú bublinu a začne sa replikácia. Po tom, ako je ORI replikované, asociujú s ním proteíny ORC, čím sú znovu ORI „zamknuté“. Zároveň sú nové molekuly DNA „premostené“ kohezínnymi, ktoré neskôr budú spájať aj sesterské chromatídy, teda identické kópie toho istého chromozómu. Tak ako replikačná bublina postupuje, tlačí pred sebou MCM proteíny. Keď sa dve bubliny stretnú, spoja sa a MCM disociujú.



Obr. 77. Začiatok a priebeh replikácie DNA

3. kontrolný uzol – v G2 fáze má za úlohu povoliť začatie mitózy. Predpokladom je kontrola DNA po replikácii a oprava chýb. Kľúčovým hráčom je fosfatáza (defosforyláza) cdc25.

Obdobne, ako v závere G1 fázy, aj v G2 fáze systém reportérových bielkovín odhalí chyby v DNA, signál odovzdá systému ATR/ATM, ktorý za spoluúčasti proteínu BRCA1, aktivuje kinázy Chk1 a Chk2. Výsledkom rýchlej odpovede je fosforylácia cdc25 (na seríne v polohe 216) a neskôr aj naviazanie inhibítorového proteínu 14-3-3 na túto molekulu. Tým je cdc25 blokována. Obdobne ako v G1 fáze možno aj v G2 fáze (v prípade závažného poškodenia DNA) aktivovať p53, čím sa vytvorí inhibítor p21, alebo (pri nezvládateľnom počte chýb urobených pri replikácii) môže byť bunka likvidovaná apoptózou.

Po oprave chýb v DNA, je zrušená inhibičná fosforylácia cdc25 a je aj odpojený inhibítor 14-3-3. Fosfatáza cdc25 sa stáva aktívnou a z komplexu cyklín B-cdc2 odstráni inhibičné fosfáty na treoníne 14 a tyrozíne 15. Takto aktivovaný komplex cyklín B-cdc2 môže spustiť profázu mitózy. Volá sa to aj MPF (mitózu promovujúci faktor).

4. kontrolný uzol – v metafáze a slúži na zabezpečenie rovnakého objemu genetickej informácie pre obidve dcérske bunky. Je to teda proces, ktorý (okrem semikonzervatívnej replikácie DNA) zabezpečí identitu genómov dcérskych buniek. Skladá sa z dvoch častí, ktoré na seba naväzujú – z kontroly dostatočného napojenia mikrotubulov na kinetochory (tzv. SAC – *spindle assembly checkpoint*) a z povolenia začatia (tzv. promócie) anafázy.

Kľúčovým hráčom je E3 ubikvitínová ligáza APC/C (anafázu promovujúci komplex - cyklozóm). Od S-fázy do profázy sa proteín Emi1 viaže na cdc20 a jeho prostredníctvom blokuje APC/C. V prometafáze ho v inhibičnom účinku vystrieda RASSF1A. Na konci prometafázy sa uvoľní, čo spôsobí čiastočnú aktivitu komplexu cdc20-APC/C a vedie k ubikvitinácii zvyškov už teraz nepotrebného cyklínu A.

Na konci prometafázy mitózy nastupuje prvá fáza mitotického kontrolného uzla – na kinetochory sesterských chromatídov sa postupne pripájajú (z príslušnej strany) kinetochorové mikrotubuly. Ich predlžovaním a skracovaním sú postupne všetky zdvojené chromozómy presunuté do ekvatoriálnej roviny.

Z funkčného hľadiska je však najdôležitejšie, že kým nie je každý kinetochor úplne obsadený potrebným počtom mikrotubulov, proteíny Mad2 (*mitotic arrest deficient*) kolujú okolo kinetochoru, kde sú fosforylované. V takomto stave silne fosforylujú cdc20 a tým blokujú aktivitu komplexu cdc20-APC/C. Po úplnom obsadení každého kinetochoru mikrotubulmi končí SAC. Dôsledkom zlyhania SAC je anafázové zaostávanie a strata chromozómu, tak ako je to opísané v kapitole o chromozómových aberáciách.

Obsadením kinetochorov mikrotubulmi zostanú molekuly Mad2 nefosforylované, komplex cdc20-APC/C sa rozpadne a APC/C sa stane aktívnou. Potom ubikvitináciou odstráni

cyklíny B, sekuríny a chromokinezíny (inhibitory motorických proteínov). Anafáza sa môže začať.

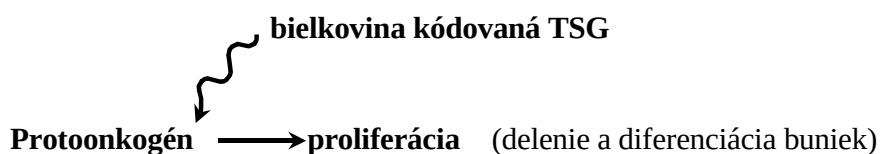
V metafáze vrcholí aktivita separázy, ktorá od telomér štiepi kohezíny spájajúce sesterské chromatídy, ale do oblasti centromér nepôsobí, keďže sú tam kohezíny chránené sekurínom (pre to má metafázový chromozóm tvar písmena X).

Odstránenie sekurínov umožní separáze oddeliť Scc1 podjednotky kohezínov aj v oblasti medzi sesterskými chromatídmi (z vnútornej strany), čo vedie k definitívnemu oddeleniu sa sesterských chromatídov a už ich potom voláme dcérske chromozómy. Toto oddelenie sa nazýva **disjunkcia** a ak zlyhá (teda sesterské chromatídy zostanú spojené a spoločne sú dopravené do jednej z dcérskych buniek) nazýva sa to **nondisjunkcia**.

Zároveň sú (ubikvitináciou ich represora – chromokinezínu) aktivované motorické proteíny (kinezíny a dyneíny), ktoré spolu s depolymerizáciou kinetochorových mikrotubulov vedú k priťahovaniu chromozómov k centrozómom (pólom). Ak tento mechanizmus zlyhá, dochádza k **anafázovému zaostávaniu**, teda chromozóm nestihne prísť k centriole a stať sa súčasťou nového jadra v karyokinéze a zaniká v cytoplazme.

11.3 Protoonkogény a tumorsupresorové gény – ich úloha pri regulácii a deregulácii bunkového cyklu

Na riadení priebehu bunkového cyklu sa **podieľajú** bielkoviny kódované dvomi typmi génov - **tumorsupresorovými** génmi (TSG), ktoré majú kontrolnú funkciu a **protoonkogénmi** (PO), ktoré zabezpečujú progresiu (napredovanie) cyklu. Pôsobia v úzkej vzájomnej interakcii a pri korektnej regulácii bunkového cyklu je medzi nimi rovnováha. Ich vzťah je relatívne antagonistický, ale pri každom z krokov bunkového cyklu sa nimi kódované bielkoviny (produkty) navzájom ovplyvňujú (obr. 78).



• **Obr. 78.** Princíp interakcie tumorsupresorového génu a protoonkogénu

Mnohé z nich a ich funkcia boli už v tejto kapitole opísané (napr. cyklíny a niektoré inhibitory). Cieľom nasledujúceho textu je rozšíriť poznatky študentov, hlbšie opísať vzťahy medzi TSG a PO a ich možný podiel na deregulácii bunkového cyklu s následným rizikom malígnej transformácie bunky.

11.3.1 Tumorsupresorové gény

Kódujú bielkoviny (obr. 79), ktoré kontrolujú niektorú etapu bunkového cyklu, ovplyvňujú prenos signálu, umožňujú opravu DNA, riadia časovo správnu expresiu niektorých génov alebo nasmerujú bunku do apoptózy. Počet známych TSG sa rozširuje, tak ako sa rozvíja výskum rakoviny.

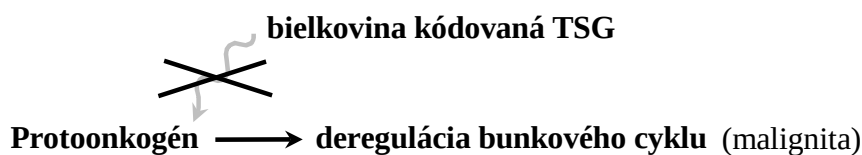
Pri **strate funkcie TSG** – mutáciou alebo tým, že vírusové onkoproteíny blokujú účinok nimi kódovaných proteínov – **zvyšuje sa pravdepodobnosť malígnej transformácie bunky** (obr. 80), nakoľko zlyhá kontrola nad bielkovinami kódovanými PO.

Treba uviesť, že tento názov nie je veľmi šťastný, nakoľko TSG nepotláčajú „rakovinu“ priamo – naopak – názov dostali od toho, že pri ich mutáciách sa zvyšuje pravdepodobnosť malignizácie buniek.

Príklady tumor supresorových génov

TSG	lokus	lokalizácia produktu	proces
RB1	13q	v jadre, regulácia transkripcie	Kontrolné uzly BC
TP53	17q	v jadre, regulácia transkripcie	
p73	1p	v jadre, regulácia transkripcie	
WT - 1	11p	v jadre, regulácia transkripcie	Anti-growth
NF - 1	17q	v cytoplazme, reguluje rodinu ras	
APC	5q21	v cytoplazme, segregácia chromozómov	
DCC	18q21	v cytoplazme, adhézia buniek	oprava DNA
MLH	3p21	v jadre, podieľ sa na reparácii DNA	
p16	9p21	v jadre, inhibítor CDK	
BRCA1	17q21	v jadre, podieľ sa na reparácii DNA	Bunková smrť
PTEN	10q23	v cytoplazme, lipidová fosfatáza	
TGFbR11	3p22	v cytoplazme, receptorová kináza	

• Obr. 79. Príklady tumorsupresorových génov



• Obr. 80. Schéma dôsledku straty tumorsupresorového génu alebo účinnosti ním kódovanej bielkoviny

Gén RB1 (lokalizovaný na 13q14) má dĺžku 180 kb a obsahuje 27 exónov, dlhých od 31 do 1 889 bp. Gén **RB1** kóduje proteín rb1 (s molekulovou hmotnosťou od 105 kDa až po 130 kDa). Proteín p105 sa skladá z 928 aminokyselín. V súčasnosti je známych viac ako 930 mutácií tohto génu. Väčšina z nich (80 – 85 %) vedie k vzniku predčasného stop-tripletu, čím vznikajú rôzne dlhé bielkoviny (izoproteíny). Známe mutácie **RB1** sú roztrúsené od 1. po 25. exón, prípadne zasahujú oblasť promótoru. Asi 80 % z *de novo* gametických mutácií **RB1** má paternálny pôvod. Hlavná funkcia proteínu rb1 (ako to už bolo uvedené v opise kontrolného uzla prechodu G1–S) je represia regulačnej oblasti rodiny špecifických transkripčných faktorov E2F. Po úspešnej oprave mutácií v DNA v G1 fázovom kontrolnom uzle je rb1 odstránený silnou fosforyláciou, za ktorú zodpovedajú komplexy cyklín D-cdk4 a cyklín E-cdk2.

Stratu funkcie rb1 **mutáciou**, opisuje Knudsonova teória dvoch krokov (zásahov). Prvým krokom je delécia (mutácia) jednej alely **RB1**. Jedinec (pri gametickej mutácii) a bunka (pri somatickej mutácii) sa stávajú heterozygotní – majú jednu alelu normálnu (dominantnú) a druhú mutovanú (recesívnu). Proteín rb1 je dimér (každá alela kóduje jeden monomér) a teda v heterozygotnom stave génu **RB1** si rb1 zachováva (tak ako väčšina TSG) funkčnosť. Len po ďalšej mutácii (kroku, zásahu), čiže po strate aj druhej alely v bunke vznikne recesívne homozygotný stav – rb1 nie je funkčný. Pre túto stratu (poslednej funkčnej) alely sa používa skratka **LOH** („loss of heterozygosity“) a jej dôsledky závisia od toho, či prvý zásah bol gametickou alebo somatickou mutáciou.

Príkladom je **retinoblastóm** – nádor sietnice – jedného z tkanív, ktoré sú najviac vystavené mutagénnemu účinku UV svetla. U zdravého človeka je táto malignita veľmi

zriedkavá a je dôsledkom LOH po somatickej mutácii. Preto, ak sa vyskytne, tak len vo vyššom veku, ojedinelý nádor a v jednom oku (unilaterálne). Naopak, ak má jedinec v každej telovej bunke gén *RB1* v heterozygotnom stave (ako dôsledok gametickej mutácie), je relatívne vysoká pravdepodobnosť, že v niektorej z buniek sietnice dôjde k LOH a k vzniku nádoru. Preto sa tzv. dedičný (familiárny) retinoblastóm objavuje často u detí, viacpočetne, v oboch očiach a bilaterálne.

Druhým typom straty pôsobenia TSG je **zabránenie účinku** bielkovín kódovaných tumorsupresorovými génmi, napr. pôsobením onkoproteínov DNA vírusov. Patria sem napríklad E1A adenovírusov, antigén T (u SV40, Ebstein–Barrovej vírusu a pod.) a proteíny E6 a E7 (u sérotypov 16 a 18) ľudského vírusu bradavíc (HPV). Tieto proteíny patria k tzv. včasným a slúžia vírusu na to, aby si bunku molekulovo úplne podmanil. Súčasťou tohoto procesu je aj prinútiť bunku, aby replikovala vírusovú DNA. Aby sa to dosiahlo, príslušný onkoproteín sa naviaže na *rb1* a uvoľní ho z represorovej väzby na regulačnú oblasť rodiny E2F, aby vznikli bielkoviny potrebné pre replikáciu vírusovej DNA. Problém je v tom, že ak aj bunka atak vírusu prežije a je práve na konci G1 fázy, môže dôjsť aj k replikácii jadrového genómu – bez opráv mutácií. To vedie k hromadeniu mutácií, ktorá je na začiatku malígnej transformácie bunky. U HPV je situácia o to nebezpečnejšia, že nielen onkoproteín E7 vyviaže *rb1*, ale navyše aj E6 zablokuje p53, čím sa priamo zabráni nielen predĺženiu obdobia potrebného na opravu mutácií, ale aj navodeniu apoptózy.

Gén **TP53** sa nachádza na 17 chromozóme (17p13.1), kódujúca oblasť génu je dlhá 2 629 bp. Je známych veľké množstvo mutácií tohoto génu. Mutácie *TP53* boli zistené u najmenej polovice nádorov. Proteín **p53** sa skladá z 393 aminokyselín. Tvorí tetramér pričom každý z monomérov má viacero funkčných domén, avšak najdôležitejšie sú tri z nich. Prvou je oligomerizačná doména, ktorou sa spájajú dva diméry – každá alela kóduje jeden dimér (dva monoméry), do tetraméru. Druhou je na DNA sa viažúca doména (DNA_{bd}) s charakterom zinkového prsta – ňou sa p53 viaže do veľkého žliabku DNA. Tretou je transkripčná doména, ktorou p53 zabezpečuje napr. transkripciu génu pre inhibičný proteín p21. Je to teda špecifický transkripčný faktor.

Úlohou proteínu p53 je, ako bolo už opísané, naviazať sa na DNA – najmä na konci G₁ fázy a zariadiť transkripciu génov pre inhibitor p21, prípadne pre p73 (p78) navodzujúce apoptózu. Tým pozastaví začiatok replikácie DNA a zároveň umožní činnosť enzýmovým systémom (tzv. **reparačné mechanizmy** kapitola 10), ktoré zisťujú a opravujú mutácie v DNA. Ak je mutácií príliš veľa, je to práve p53, ktorý navodí procesy vedúce k **apoptóze**.

Na rozdiel od väčšiny ostatných TSG, už mutácia jednej alely *TP53* naruší pôsobenie takto kódovaného p53 – aberantného heterotetraméru. Zníži sa jeho schopnosť viazať sa na DNA a predĺži sa jeho životnosť (z normálne jednej na 20 hodín), čím stráca schopnosť určiť časový limit určený na reparáciu mutácií v DNA. Zároveň stráca schopnosť navodiť apoptózu.

Jedinci, ktorí majú gametickú mutáciu p53 trpia tzv. syndrómom **Li-Fraumeni**. Reparácia DNA u nich nefunguje adekvátne a pri závažnom poškodení DNA nedochádza k apoptóze rizikových buniek. Vedie to k tomu, že sa v ich bunkách hromadia mutácie ďalších dôležitých TSG a PO. Najprv sa u nich vyskytuje široká paleta benígnych (nezhubných) nádorov. Je ale len otázkou času, kedy v niektorej z ich buniek nastane LOH v *TP53*, prípadne sa vyskytne taká kombinácia mutácií ostatných regulačných génov, že v ich bunkách dôjde k malígnej transformácii.

Z ďalších TSG uvedieme aspoň niekoľko príkladov.

Gén **WT1** má lokus na 1p13, skladá sa z 10 exónov a má najmenej štyri rôzne transkripčné varianty. Kóduje tumorsupresorový proteín, ktorý má charakter na DNA sa viažúceho regulačného proteínu (DNA_{bd}), ktorý obsahuje štyri zinkové prsty. Je aktivátor (alebo represor) transkripcie niektorých génov a patrí ku kľúčovým génom riadiacim napr. vývoj obličiek a genitálu. Mutácie *WT1*, najmä v jeho dvoch oblastiach alternatívneho zostrihu sa vyskytujú napríklad pri Wilmsomvom tumore obličiek (odkiaľ má názov).

NF-1 je gén vyvolávajúci neurofibromatózu prvého typu. Je lokalizovaný na 17q11.2, skladá sa z 50 exónov a má viac ako 300 kb genómovej DNA. Jeho funkciou je inaktivácia G-proteínu ras, ktorého aktivácia je základom prenosu signálu pre delenie bunky, do jadra.

APC gén je lokalizovaný v 5q21–q22, v lokuse patriacom génu *DP2.5*. Má 15 exónov a dva alternatívne 5' UTR. Transkript génu (mRNA) je dlhý 10 386 bp. V súčasnosti je známych viac ako 120 mutácií tohto génu. Vyskytujú sa u FAP (familiárna adenomatózna polypóza), u Gardnerovho syndrómu a u iných nádorov. Proteín FAP sa skladá z 2 843 aminokyselín. Tento TSG funguje ako jeden z určujúcich faktorov pri regulácii proliferácie črevného epitelu. Zúčastňuje sa aj na tvorbe medzibunkových spojov. Preto s typické mutácie FAP považujú za základný faktor dedičnej (familiárnej) predispozície pre rakovinu hrubého čreva.

DCC je jedným z TSG, ktorých mutácia bola zistená pri rakovine hrubého čreva. Lokus má na 18q21.3, blízko teloméry. Proteín kódovaný *DCC* má štruktúry spoločné pre bielkoviny, ktoré sa podieľajú na adhezívnych spojeniach buniek a spolu s nimi sa podieľajú na interakcii bunka-bunka alebo bunka-medzibunková hmota. LOH génu *DCC* (alebo delécia terminálneho úseku chromozómu 18) patrí pri vývoji (tumorigenéze) rakoviny hrubého čreva k finálnym a prudko zhoršuje prognózu pacienta. Dôvodom je narušenie medzibunkových kontaktov a uľahčenie procesu rozsevu (metastázy) nádorových buniek do tela chorého.

BRCA1 má lokus na 17q21, skladá sa zo 70 exónov. Má mnoho rôznych transkripčných variantov s dĺžkou mRNA od 3 559 b do 7224 b. Z toho vyplýva aj široká paleta izoproteínov s obsahom od 680 do 1 863 aminokyselín. Mutácie *BRCA1* (vyše 300) sú rôzneho typu a nachádzajú sa na rôznych miestach génu. Považujú sa za hlavný etiologický faktor pri približne 45 % geneticky podmienených nádorov mliečnej žľazy a pri viac ako 80 % geneticky podmienených foriem súčasného vzniku rakoviny prsnej žľazy aj vaječníkov. Ako už bolo uvedené, proteín *BRCA1* má kľúčovú úlohu pri zastavení bunkového cyklu v G2 fáze, pri kontrole a reparácii chýb, ktoré vznikli pri replikácii DNA. Zároveň má proteín *BRCA1* aj špecifickú funkciu – spomaľovanie proliferácie (je negatívnym regulátorom rastu) epitelov v mliečnej žľaze (a vo vaječníku). Mutácie tohto TSG vedú k zníženiu až zlyhaniu oboch hlavných funkcií *BRCA1* kódovaného proteínu, čím prispievajú ku karcinogenéze, najmä v uvedených orgánoch.

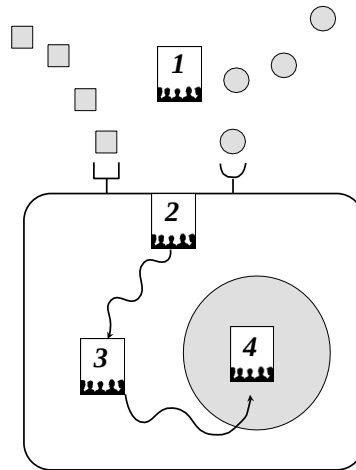
BRCA2 má lokus na 13q12.3. Gén obsahuje 27 exónov a jeho kódujúca oblasť má 10 987 bp. Proteín *BRCA2* obsahuje 3 418 aminokyselín. Spolupracuje s *BRCA1*, najmä pri oprave zlomov oboch vlákien DNA a homologických rekombinácií. Zlyhanie jeho funkcie sa podieľa na genetickej zložke vzniku väčšiny nádorov prsnej žľazy a/alebo nádorov vaječníkov.

Gén ***MLH-1*** je lokalizovaný na 3p21.3 a je tvorený 19 exónmi, v dĺžke približne 100 kb. Gén *MLH* je typickým predstaviteľom tzv. **mutátorových génov**. Kódujú bielkoviny zúčastnené na reparácii DNA, takže mutácie mutátorových génov nepriamo (sekundárne) prispievajú k celkovému nárastu výskytu (neopravených) mutácií v bunke. Proteín kódovaný *MLH* patrí do signálovej dráhy *BRCA1*. Mutácie tohto génu sa dávajú do priamej súvislosti s niektorými formami rakoviny hrubého čreva, ale aj iných orgánov.

11.3.2 Protoonkogény

Sú typom regulačných génov a kódujú bielkoviny, ktoré riadia napredovanie (progres) bunky v bunkovom cykle. Sú známe aj ako **proliferačné gény**, teda tie, ktoré riadia delenie a diferenciáciu buniek. Voláme ich aj **onkogény**, a to vtedy, ak sa stávajú príčinou malígnej transformácie bunky. **PO sa na onkogény menia buď mutáciou** (tvorí sa normálne množstvo hyperaktívneho proteínu) **alebo overexpresiou** (tvorí sa príliš veľké množstvo normálneho proteínu). Mutované PO zvyčajne vysielajú do bunky falošné signály, indukujúce pokračovanie cyklu – bez predchádzajúcich ktrokov signálovej dráhy. Overexpresia spôsobí nadmernú intenzitu signálu v dráhe. Výsledkom je deregulácia bunkového cyklu zlyhaním proti-aktivity TSG.

Bielkoviny kódované protoonkogénmi sa vyskytujú na všetkých úrovniach riadenia bunkového cyklu (obr. 81).



• **Obr. 81.** Lokalizácia bielkovín kódovaných protoonkogénmi. 1 – mitogénne aktivátory, 2 – membránové proteíny (receptory a G proteíny), 3 – plazmatické transmitery (prenášajú signál do jadra), 4 – jadrové protoonkogény (transkripčné faktory, cyklíny a pod.)

Rastové faktory (mitogénne aktivátory) – napr. PDGF, EGF a IGF. Sú to ligandy prevažne pre receptory s kinázovou aktivitou intracelulárnej domény. Sú buď výrazne špecifické (pôsobia len na jeden typ buniek) alebo pôsobia na viaceré typy buniek, čo závisí od typu extracelulárnej domény receptorov, na ktoré sa viažu. K bunkám sa dostávajú v rámci endokrínnej, ale častejšie parakrínnej regulácie.

PDGF (od krvných doštičiek odvodený rastový faktor) má pôvod nielen v uvedených krvných elementoch, ale tvoria ho aj bunky endotelu a placenty. Podporuje proliferáciu spojiv, buniek hladkých svalov, ale aj neuroglie.

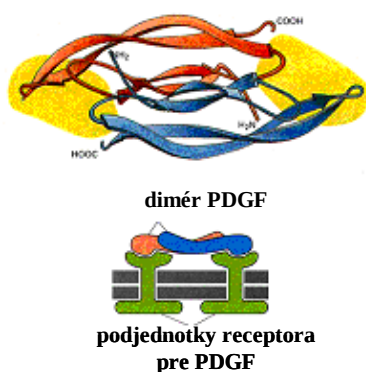
EGF (epiteliálny rastový faktor) produkujú najmä bunky slinných a iných žliaz. Podporuje proliferáciu z mezenchýmu odvodených buniek, epitelov a neuroglie.

IGF-I (od inzulínu odvodený rastový faktor) je tvorený v pečeni. Patrí k univerzálnym rastovým faktorom – podporuje proliferáciu mnohých typov buniek.

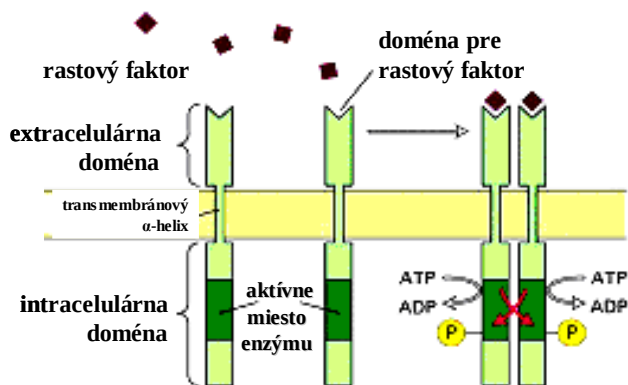
Membránové proteíny delíme na dve skupiny – receptory a výrobcov druhých poslov. Považujeme za potrebné pripomenúť, že kým rastové faktory sú v okolí bunky prítomné stále, receptory pre rastové faktory sú na jej povrch dopravené len na konci G1 fázy, ako je bunka pripravená pokračovať v cykle.

Receptory pre rastové faktory patria k tým, ktorých vnútrobunková časť (doména) má charakter kinázy, väčšinou tyrozínovej, ako je napríklad EGFR (receptor pre EGF). Aktivácia týchto receptorov nastáva naviazaním príslušného rastového faktora, čo zvyčajne vedie k **dimerizácii** (spojeniu) podjednotiek receptora, spusteniu kinázovej aktivity jeho intracelulárnej domény a autofosforylácii (obr. 82, 83).

Receptor pre epidermálny rastový faktor (EGFR; ErbB-1, u ľudí nazývaný HER1) je bunkový povrchový receptor pre proteínové ligandy z rodiny EGF. Je členom rodiny receptorových tyrozín kináz a podrodiny Erb1, kam okrem HER1 patria aj jej veľmi podobné HER2/c-neu, Her 3 a Her 4. Aktivované sú naviazaním špecifických ligandov, EGF a TGF α (transformujúci rastový faktor alfa). Po naviazaní ligandu dimerizujú – prechádzajú z neaktívnej monomérovej do aktívnej dimérovej formy. To stimuluje proteín-tyrozínovú kinázovú aktivitu ich vnútrobunkovej časti (domény). Výsledkom je autofosforylácia jeho vlastných tyrozínov v polohách 845, 992, 1045, 1068, 1148 a 1173. Tým sa uskutočnil prenos signálu do bunky. Na fosforyláciou aktivovanú doménu receptora sa naviažu ďalšie proteíny a môže sa začať signálová dráha, ktorá končí v jadre.



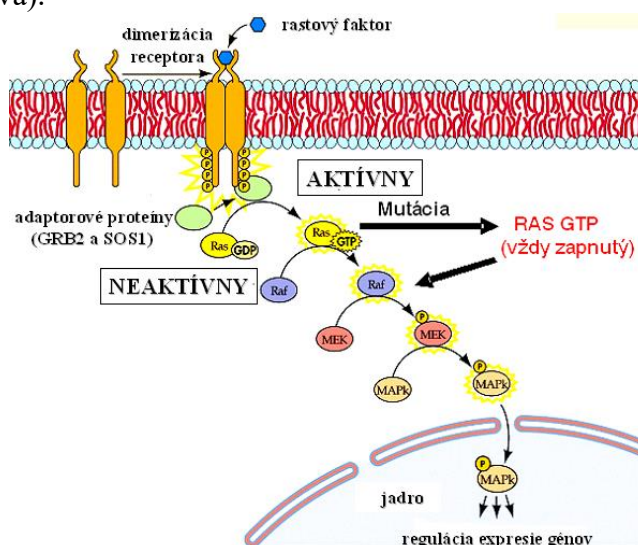
• Obr. 82. Dimerizácia receptora



• Obr. 83. Aktivácia intracelulárnej domény receptora

Mutácia, ktorá spôsobí buď ich nadmernú aktivitu alebo nadmernú syntézu (overexpresiu) spôsobí hyperaktivitu tohoto receptora a jeho premenu na onkogén, ako to bolo opísané pri mnohých typoch rakoviny, napr. pri karcinómoch pľúc a pri glioblastoma multiforme.

Výrobcovia druhých poslov sú bielkoviny, ktoré receptorom prenesený signál premenia na formu, ktorou sa môže v bunke šíriť a dostať sa k cieľovej molekule (obr. 84). Pre reguláciu bunkového cyklu majú najväčší význam G-proteíny. Predovšetkým je to rodina *Ras* – *N-ras*, *H-ras* a v týchto súvislostiach najvýznamnejší *K-ras* (lokus 12p12.1, proteín má molekulovú hmotnosť 21 kDa), ktoré patria k proteínom asociovaným s receptorami. Asistenčné proteíny (napr. SOS a GBR2) aktivujú *K-ras* tým, že mu odoberú GDP a pridajú GTP. Aktivovaný *K-ras* je schopný aktivovať serín-treonínovú kinázu Raf, ktorou sa začína prenos signálu cez cytoplazmu do jadra. Mutácie *K-ras* vedú k odstráneniu aktivity jeho GTPázy, čím nevzniká GDP, *K-ras* zostáva permanentne aktívny a **vysiela do bunky falošné signály**, bez toho, aby predtým došlo k aktivácii receptora. Ide o pomerne častý faktor deregulácie, napr. u rakoviny pankreasu sa vyskytuje až u 90 % prípadov. Mutácie *K-ras* majú najmä substitučný charakter a vedú k náhrade glycínu v polohe 12 za inú aminokyselinu – napr. za cysteín a arginín (pri niektorých typoch rakoviny pľúc) alebo za valín (u niektorých druhov rakoviny hrubého čreva).



• Obr. 84. Prenos signálu do jadra

Cytoplazmatické transmitery – prenášajú signál do jadra. Pri riadení bunkového cyklu je to kaskáda kináz, ktoré sú fosforyláciou aktivované a fosfátom aktivujú ďalší proteín

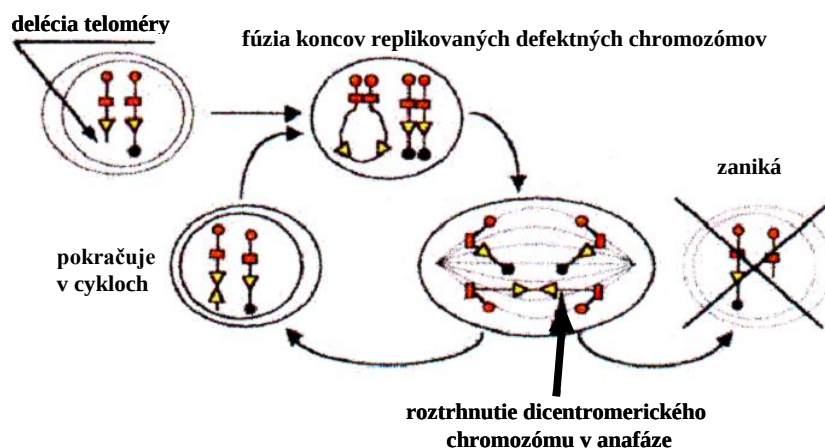
v kaskáde. Prvou je serín-treoninová kináza Raf. Nasleduje kináza Mek (Map/Erk kináza-1) a potom ostatné tzv. MAP-kinázy (mitogénom aktivované proteín-kinázy). Každá z nich je fosforyláciou aktivovaná v regulačnom mieste (tzv. T-slučka), čím nastane zmena jej konformácie a uvedie sa do činnosti jej aktívne centrum, schopné z donora (ATP) odobrať fosfát a fosforylovať ďalšiu kinázu v signálovej dráhe. S kinázami spolupracujú aj ďalšie enzýmy. Kinázy môžu vytvárať komplexy a viazať sa na scaffoldový proteín MP1. V zjednodušenom pohľade je úlohou kináz zabezpečiť (regulovať) expresiu určitého génu, najmä pre špecifický transkripčný faktor. Niektoré kinázy majú však opačný účinok – pôsobia ako spätná väzba – inhibujú iné kinázy.

Klasickým prípadom premeny cytoplazmatického transmittera (MAP kinázy) na onkogén je Abelsonova kináza (*abl*). Dochádza k tomu po translokácii (výmene) q ramienok chromozómov 9 a 22, ktorej dôsledkom je vznik typického markera – tzv. chromozómu Filadelfia. Po zlome chromozómu, ktorý je predpokladom translokácie, z génu *bcr* zostane len aktivačná doména a gén *abl* stratí regulačnú oblasť. Výsledkom fúzie zvyškov týchto dvoch génov (v lokuse 22q11.21) je gén *bcr-abl*. Kóduje stále aktívnu *bcr-abl* kinázu, ktorá (pri chronickej myeloidnej leukémii – CML) vysiela do jadra falošné signály stimulujúce delenie.

Jadrové protoonkogény – namä cyklíny a transkripčné faktory. Pri regulácii jednotlivých procesov prebiehajúcich počas každej z etáp bunkového cyklu, ako už bolo uvedené, majú zásadný význam **cyklíny**. Sú to regulačné molekuly, ktoré po väzbe na príslušnú cyklín-dependentnú kinázu (**cdk**) túto aktivujú. Je dôležité zdôrazniť, že v každej etape bunkového cyklu je prítomný (syntetizovaný) iný cyklín a použije sa jemu príslušná kináza. V adekvátnom čase je cyklín degradovaný (rozložený), alebo sa prestane vyrábať, teda ukončí sa expresia génu, ktorý ho kóduje. Naopak, kinázy majú dlhšiu životnosť, ale použitý je vždy len ten typ, pre ktorý sú v jadre prítomné príslušné cyklíny.

C-myc (lokus je na 8q24.12–q24.13, proteín má hmotnosť 65 kDa) je príkladom špecifických transkripčných faktorov, ktoré majú (ako už bolo uvedené) zásadnú úlohu pri regulácii expresie génov súvisiacich s prechodom G1–S. Ak dôjde k translokácii tohto génu na chromozóm 22 (do oblasti 22q11.2), za gén pre syntézu ťažkých (λ) reťazcov protilátok (imunoglobulínov), ktorý je permanentne a veľmi intenzívne transkribovaný, enhancerový efekt sa prenáša aj na translokovaný *c-myc*. To spôsobuje jeho nadmernú transkripciu (overexpresiu) a vzniká Burkittov lymfóm. Sú však aj prípady tohto lymfómu, kedy podobný efekt nastáva aj ako dôsledok hyperaktívnej mutácie *c-myc*.

Závažné dôsledky má však **amplifikácia** (mnohonásobné zmnoženie počtu alel) tohto protoonkogénu, známe napr. pri niektorých nádoroch hrubého čreva, alebo prostaty. Amplifikácia môže síce vzniknúť nerovnomerným crossing-overom, ale tu je nadpočetná len jedna alela. Predpokladá sa, že mnohonásobná amplifikácia, ktorej dôsledkom je vznik homogénne sa farbiace oblasti (HSR) na chromozómoch, je však dôsledkom opakovanej replikácie a „trhania“ chromozómu, ktorý stratil teloméru (obr. 85). Replikované úseky neúplného chromozómu sa zlepia a v anafáze je chromozóm s dvoma centromérmi roztrhne. Bunka, ktorá získa krátky úsek zanikne v dôsledku chýbania informácie. Bunka, ktorá získala dlhší chromozóm pokračuje v ďalších cykloch. Predlžovanie úseku pred zlomom pokračuje dovtedy, kým (mutáciou iného chromozómu) bunka získa teloméru.



• **Obr. 85.** Amplifikácia génov po delícii teloméru

V tabuľke 13 uvádzame príklady takto vzniknutej amplifikácie protoonkogénov a nádorové ochorenia, pri ktorých bola zistená.

• **Tab. 13.** Prehľad amplifikácie protoonkogénov a jej dôsledkov

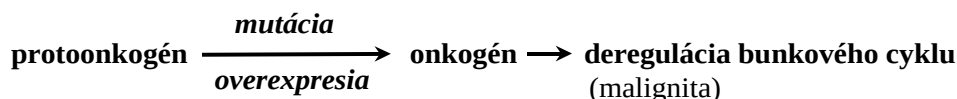
protoonkogén	amplifikácia	nádory
c-myc	20-krát	leukémia a karcinóm pľúc
n-myc	5-1 000-krát	neuroblastóm, retinoblastóm
l-myc	10-20-krát	malobunkový karcinóm pľúc
c-abl	5-krát	chronická myeloidná leukémia
c-myb	5-10-krát	akútna myeloidná leukémia, karcinóm hrubého čreva
c-erbB	30-krát	epidermoidný karcinóm
K-ras	4-20-krát	karcinóm hrubého čreva

Okrem uvedených (nevírusových) možností, existuje aj vírusová, presnejšie retrovírusová etiológia vzniku overexpresie c-myc (a mnohých iných protoonkogénov).

Regulačná overexpresia môže nastať vtedy, ak sa pred PO inzertuje provírus, ktorý vznikol reverznou transkripciou genómu retrovírusu. Koncová LTR sekvencia provírusu totiž účinkuje (do vzdialenosti 3kb) ako silný enhancer génov, ktoré nasledujú. Výsledkom je zvýšenie expresie PO, aj keď nemusí byť dramatické – preto ich nazývame takéto **neakútne transformujúce retrovírussy**.

Podstatne iná situácia nastane, ak genóm retrovírusu získa vírusový onkogén (v-onc). Môže sa to stať v cytoplazme hostiteľskej bunky (cestou na baliace miesto vírusu pri cytoplazmatickej membráne bunky) – ak dôjde (pre podobnosť molekúl) k rekombinácii genómu retrovírusu s mRNA vzniknutou transkripciou c-onc. Ak sa rekombinácia uskutoční v takom mieste jeho genómu, že je retrovírus ešte schopný v novej hostiteľskej bunke reverznej transkripcie a inzercie do jadrového genómu – dôjde k amplifikácii – okrem dvoch alel c-onc bude bunka mať aj tretiu alelu – v-onc. Závažný problém nastane vtedy, keď je v bunke potrebný PO kódovaný týmto génom a dôjde k expresii všetkých jeho alel. Začiatková LTR sekvencia provírusu je totiž veľmi silný promótor, čo spôsobí mimoriadne silnú overexpresiu v-onc. V bunke sa odrazu nachádza obrovské množstvo tejto bielkoviny a dôjde k náhlejšej deregulácii bunkového cyklu. Pre tento efekt nazývame retrovírussy, ktoré obsahujú v-onc **akútne transformujúce retrovírussy**. Sú dokonca známe aj prípady mnohonásobnej amplifikácie v-onc (napr. v-myc pri karcinóme prostaty)

Na záver zhrnieme mechanizmy, ktorými sa PO môžu podieľať na deregulácii bunkového cyklu a následnej malígnej transformácii bunky (obr. 86).



• Obr.

86. Schéma premeny protoonkogénu na onkogén

Premena protoonkogénu na onkogén je dôsledkom poruchy funkcie protoonkogénov, ako dôsledok jeho mutácie, alebo poruchy jeho expresie.

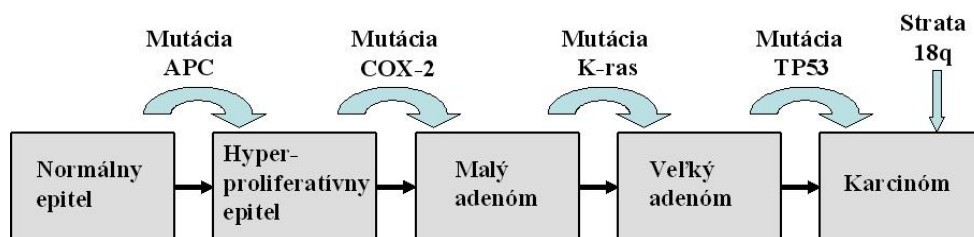
Prvým typom je **mutácia protoonkogénu**. Príkladom je vznik tzv. chimerického génu (zloženého z dvoch poškodených), ako spojenie génov *abl* a *bcr* (po mutácii každého z nich), pri chronickej myeloidnej leukémii.

Druhým typom premeny protoonkogénu na onkogén je **nadmerná expresia** (tzv. overexpresia) protoonkogénu. Výsledkom je abnormálne veľké množstvo príslušného proteínu s následnou dereguláciou bunkového cyklu. Vzniká buď regulačnou overexpresiou (zvýšenou transkripciou normálneho počtu alel pre daný protoonkogén), alebo amplifikáciou (zmnožením počtu alel).

Regulačná overexpresia môže vzniknúť prenosom (translokáciou) protoonkogénu do oblasti silného promótoru (napr. pri Burkittovom lymfóme), alebo patologickým zvýšením aktivity promótoru (vlastnej regulačnej oblasti) protoonkogénu (napr. vplyvom aktivity do neho inzertovaného provírusu, ktorý pochádza z retrovírusu).

Amplifikácia môže vzniknúť viacerými mechanizmami – nevírusovej a retrovírusovej etiológie.

Proces **karcinogenézy**, teda vzniku nádoru je len zriedkavo tak relatívne jednoducho dedične podmienený, ako sme uviedli v predchádzajúcich prípadoch. Zvyčajne sa jedná o postupný sled viacerých krokov, ktorý začína stratou TSG, pokračuje hyperaktivitou PO, nasleduje strata TSG atď. Na záver zvyčajne mutuje gén pre proteíny medzibunkovej hmoty a nastáva metastáza. Príkladom je Kinzlerova a Volgesteinova schéma vzniku rakoviny hrubého čreva (obr. 87)



• Obr. 87. Schéma vzniku rakoviny hrubého čreva

Doplňujúca študijná literatúra

ALBERTS, B. – BRAY, D. – JOHNSON, A. – LEWIS, J. – RAFF, M. – ROBERTS, K. – WALTER, P.: Základy bunčnej biológie. Úvod do molekulárnej biológie bunky. 2. vydanie. Ústí nad Labem: Espero Publishing 2005, 740 s.

BÖHMER, D. – DANIŠOVIČ, Ľ. – REPISKÁ, V.: Lekárska biológia a genetika 1. Druhé doplnené vydanie. Bratislava: Univerzita Komenského 2020, 102 s.

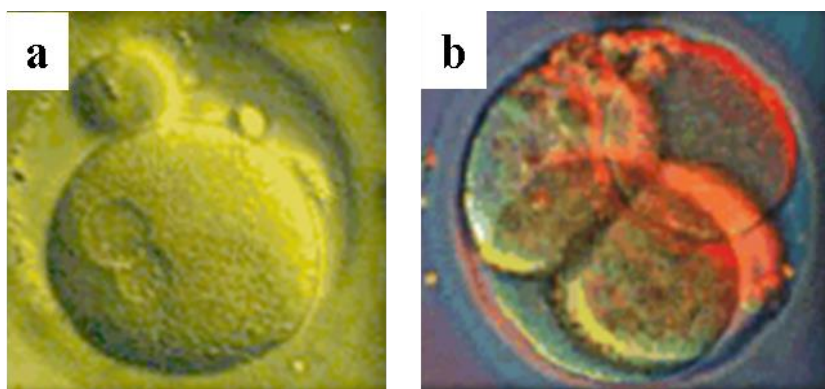
12 ÚVOD DO GENETIKY VÝVOJA

12.1 Etapy intrauterinného vývoja

Z funkčného hľadiska delíme intrauterinný vývoj na štyri etapy – predimplantačné štádium, blastogenéza, embryogenéza a fetálne obdobie. Odlišujú sa nielen obsahom prebiehajúcich dejov, ale hlavne typom predprogramovania použitia genetickej informácie.

Na začiatku **predimplantačného štádia** sa uskutoční oplodnenie (fertilizácia). Do 11 hodín sa dokončí 2. meiotické delenie oocyty a vytvorí sa druhé pólóvé teliesko (obr. 88a). Splynutie pronukleov pohlavných buniek rodičov (tzv. progenitorov) a vytvorenie sa zygoty prebehne do 24 hodín. Zygota je obklopená tenkou vrstvou – zonou pellucidou, ktorej primárny význam je zabrániť opakovanému vniknutiu spermie.

Zygota sa začína deliť a celý tento komplex cestuje vajcovodom k dutine maternice. Dcérske bunky, vznikajúce mitotickým delením zygoty (a neskôr seba samých) sa nazývajú blastoméry (obr. 88b). Po rozdelení sa nemôžu zväčšovať (rást'), ich priestor je vymedzený zonou pellucidou, naopak – ich rozmery sa zmenšujú. Usudzuje sa, že toto je jeden zo zásadných momentov, ktorý bráni blastoméram v diferenciácii. Sú to teda (rovnako ako zygota) totipotentné bunky a z každej jednej z nich môže (po oddelení) vzniknúť celý nový organizmus – ako je to známe u monozygotných dvojčiat.



• Obr. 88. a. Vznik zygoty; b. štyri blastoméry

Prechodom cez vajcovod delením blastomér vznikne zhhluk rovnocenných buniek – morula. Po vstupe do dutiny maternice sa roztrhne a uvoľní zona pellucida. Toto je prvý signál, ktorým začína diferenciácia buniek. Výsledkom je vznik útvaru s jednou dutinou – blastocysty. Ďalšie obdobie nazývame **blastogenéza**.

Na jednej strane blastocysty sa nachádza zhhluk buniek (tzv. vnútorná masa – embryoblast). Touto stranou (pólom) sa blastocysta pripojí na sliznicu maternice a začne do nej vstupovať. Tento proces sa nazýva nidácia. Je ovplyvnená látkami vylučovanými blastocystou (a neskôr mladým embryom), ktoré v sliznici maternice navodia apoptózu, ale aj iné reakcie, napr. proliferáciu sliznice a tvorbu nových ciev. Vo vnútornej mase buniek neskôr vznikne ďalšia dutina (útvár sa potom nazýva gastrula). Z buniek medzi oboma dutinami sa vytvorí embryoblast, ktorý sa najprv skladá z ektodermu a endodermu. Neskôr medzi nich vrastie mezoderm a vzniká tzv. zárodočný terčik. Toto je z hľadiska ďalšieho vývoja kľúčový moment. Tu sa uskutoční primárne predprogramovanie diferenciácie. Každá bunka získa charakteristiky zárodočnej vrstvy, z ktorej pochádza a môže sa ďalej diferencovať len na definované typy buniek – ako to dokazujú skúsenosti s kmeňovými bunkami.

Ďalšie pokračovanie vývoja jednotlivých orgánov a orgánových sústav prebieha v období **embryogenézy**. Zložitými procesmi, ktoré podrobne opisuje embryológia, a z ktorých je väčšina geneticky programovaná, sa dosiahne stav, že zo zárodočného terčika s priemerom

0,2 mm vznikne zárodok s dĺžkou 23 mm. Toto obdobie sa končí vyvinutím vonkajšieho genitálu a oddelením prstov na nohách.

Fetálne obdobie má u jednotlivých druhov cicavcov rôznu dĺžku trvania a končí sa pôrodom. V tomto období sa plod ďalej rozvíja, rastie a pripravuje sa na (relatívne) samostatný život po narodení.

Najzávažnejšie vývojové procesy prebiehajú v embryogenéze. Aj pre pochopenie riadenia diferenciácie buniek je veľmi užitočná téza, že základnou jednotkou zárodočného vývoja je populácia (klon) buniek, ktoré vznikli mitotickým delením z jednej predprogramovanej bunky. Táto populácia musí byť (v dostatočnom počte) v potrebnom čase, na určenom mieste zárodka a účinkovať (reagovať) potrebným spôsobom.

Teória elementárnych vývojových procesov opisuje štyri základné skupiny faktorov, ktoré zabezpečujú embryogenézu (proliferáciu, distribúciu, integráciu a redukciu buniek).

Proliferácia je delenie a diferenciácia buniek. Tu sa naplno prejavuje predprogramovanie nielen ako vytvorenie schém na riadenie expresie génov a na variabilné využitie genetickej informácie, ale aj na pripravenosť bunky prijímať signály na diferenciáciu z medzibunkového prostredia, teda vytvorenie potrebných (typov a počtu) receptorov na ich povrchu.

Distribúcia buniek, ako zmena polohy populácie v priestore, je buď aktívna alebo pasívna. Aktívne migrujú len niektoré typy buniek, napr. zložky budúceho imunitného systému alebo prapohlavné bunky. Zvyčajne sa zmena polohy dosahuje zmenou proliferatívnej aktivity samotnej populácie alebo okolitých populácií. Nezriedka sa to deje za spolupráce apoptózy, ktorá vytvára potrebný priestor.

Integrácia buniek znamená ich fyzický, ale najmä informačný kontakt. Fyzický kontakt (priamo alebo cez bielkoviny mimobunkovej hmoty) je základným predpokladom proliferácie. Ale, ako si uvedieme na príklade SHH, je zároveň nevyhnutná nielen správna tvorba diferenciáciu regulujúceho proteínu, ale aj jeho nerušená doprava k miestu účinku.

Redukcia nepotrebných buniek apoptózou je zákonitý proces a podrobnosti jej úlohy a chybného účinku na vývoj sú opísané v príslušnej kapitole.

Diferenciácia je stav, kedy majú bunky rovnaký genóm, ale odlišujú sa fenotypom. U mnohobunkových organizmov je riadená špecifickými regulačnými proteínmi (napr. SHH *Sonic hedgehog*) a programovaním expresie génov. Základnými mechanizmami diferenciácie sú variabilná expresia génov a alternatívne využitie genetickej informácie.

Variabilná expresia génov znamená, že sa v rôznych bunkách exprimujú rôzne gény. Je zabezpečovaná regulačnými proteínmi, ktoré podliehajú kontrole parakrinne prichádzajúcich signálov. Kaskády postupnej expresie génov sú riadené morfogénmi (napr. HOX a PAX). Kombinácie pôsobenia jednotlivých génov z rodín morfogénov sú, v začiatkových obdobiach embryogenézy, vopred naprogramované. Okrem prioritných dráh expresie (ako je napríklad príslušnosť k zárodočnej vrstve), možno rôznymi chemickými signálmi spúšťať aj aktivitu iných génov, ale len v rozsahu povolenom v danej bunke. Použitie ostatných génov je blokové. Inak povedané – v rôznych bunkách sa používajú rôzne gény a aj miera ich expresie môže byť odlišná.

Alternatívne využitie genetickej informácie je vysvetlením faktu, že hoci máme v genóme viac ako 20 500 génov, v našich telách sa vyskytuje viac ako 100 000 rôznych bielkovín. Pomocou niekoľkých typov zásahov možno z toho istého génu získať rôzne mRNA a následne rôzne proteíny. Podstata je v tom, že vlastnosti bielkovín závisia len od ich primárnej štruktúry, čiže od poradia aminokyselín, z ktorých sa skladajú. Odbor molekulovej biológie, ktorý sa venuje tejto oblasti sa nazýva proteomika.

Alternatívny štart transkripcie znamená, že je v géne viacero začiatkov transkripcie a regulačné proteíny rozhodnú, ktorý z nich sa použije. Výsledkom sú rôzne dlhé mRNA (a následne proteíny), ktoré majú odlišný začiatok a rovnaký koniec. Príkladom je najdlhší ľudský gén – pre dystrofin. Celý sa transkribuje len v bunkách mozgovej kôry. V sietnici sa transkribuje približne polovica z neho a v bunkách neuroglie len jedna pätina.

Alternatívny zostrih (tzv. procesovanie RNA) umožňuje cielene vystrihovať (pri úprave pre-mRNA) s kópiami intrónov aj kópie exónov. Výsledkom sú mRNA a proteíny, ktoré sa líšia nielen dĺžkou, ale aj priebehom. Príkladom je kalcitonínový gén, ktorý má 5 exónov. Kým v štítnej žľaze obsahuje mRNA prvé štyri exóny a piaty je vystrihnutý, v nervovom tkanive je odstránený štvrtý exón a vyskytuje sa piaty.

Editovanie mRNA – enzymatickým zásahom je cielene niektorý z kódujúcich tripletov premenený na stop-triplet alebo vznikne sekvencia aktivujúca poly(A)polymerázu, ktorá predčasne vytvorí polyadenylový chvostík. V oboch prípadoch sú výsledkom skrátenie translácie a mRNA majú rovnaký začiatok, ale odlišný koniec. Príkladom je gén pre lipoproteín apoB. V pečeni sa transkribuje celý a vzniká bielkovina apoB100 zložená z 4 536 aminokyselín. V bunkách sliznice čreva dochádza v mRNA enzymaticky na 6 666 nukleotide k zámene cytozínu za uracyl – predčasne vzniká stop- triplet UAA a vzniká bielkovina apoB48, obsahujúca len 2 152 aminokyselín.

Posttranslačná úprava bielkovín (napr. v Golgiho aparáte) vedie k ďalšej variabilite rôznorodých bielkovín.

Bielkoviny sú v bunke spojené obrovským množstvom interakcií a primárne zvýšenie ich variability horeuvedenými spôsobmi umožňuje ich ešte rozmanitejšie vzťahy, a v konečnom dôsledku vysokú variabilitu diferencovaných buniek.

Už veľmi dlho je známe, že sa u stavovcov hlavné etapy embryonálneho vývoja takmer zhodujú. Neskôr sa zistilo, že princípy genetického riadenia vývoja a diferenciácie buniek sú výrazne konzervované a že sa vyskytujú už u hmyzu. Rovnako dlho sa vie, že niektoré poruchy vývoja majú monogénový typ dedičnosti (napr. pri brachydaktýlii autozómovo dominantný). Ale až poznatky z konca 80-tych rokov minulého storočia umožnili pochopiť princípy genetického riadenia vývoja. Jednalo sa o objavenie antenapédie a bithoraxu o ovocnej mušky drozofily (obr. 89, 90).



• Obr. 89. Antenapédia



• Obr. 90. Bithorax

V prípade antenapédie sa jednalo o kvalitatívnu poruchu – premenu génov riadiacich vývoj hlavových končatín (tykadiel) na hrudné končatiny. V prípade bithoraxu išlo o závažnejšiu poruchu – o zdvojenie celej skupiny (segmentu) génov riadiacich kompletný vývoj hrudnej časti tela ovocnej mušky.

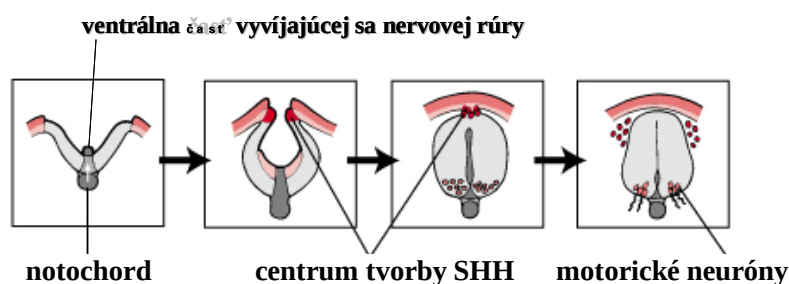
Tieto nové objavy viedli zakrátko k poznaniu, že existujú gény a rodiny génov, ktoré riadia zárodočný vývin, u drozofily najmä v predozadnej osi. Krátko na to, boli objavené aj ich paralógy (analogické gény) aj u cicavcov a človeka.

V súčasnosti sa nazdávame, že je embryogenéza riadená tak, že určité bunky zárodočného terčika (napr. v tzv. prednej pere neuropóru) vytvárajú a parakrinne do zárodka vylučujú základné regulačné molekuly, tzv. induktry. Tie potom pôsobia na ostatné bunky. Ich účinok sa potom prejaví na aktiváciu jedných buniek, ktoré produkujú regulátory diferenciácie (napr. SHH) a jedných na aktivitu tzv. morfogénov (napr. rodina HOX) v ostatných bunkách.

Prítomnosť a úloha **diferenciačných proteínov** so skupiny HH (*hedgehog*) sa, ako je tomu nezriedka, zistila až po odhalení ich mutácií u drozofily, ktoré viedli k závažným

poruchám vývoja ich embrya. Neskôr boli tieto proteíny (a gény) opísané aj u človeka. Z nich je pre vývoj embrya najdôležitejší SHH (*Sonic hedgehog*) proteín. Vytvárajú ho zvláštne populácie buniek (centrá), z ktorých sa molekuly SHH šíria difúziou v tkanivovom moku a aktívnym pohybom telových tekutín embrya. Tým vzniká koncentračný gradient molekúl, čiže v rôznych častiach tkaniva na bunky pôsobí rozličný počet molekúl. Aby sa prejavil diferenciačný a diferencovaný účinok, musia mať na cytoplazmatickej membráne zvláštne receptory, schopné hodnotiť nielen kvalitu signálu (typ ligandu), ale aj kvantitu (počet molekúl). Ide o zvláštne receptory (tzv. patch), ktoré majú väčší počet väzbových domén (až 11) a typ signálu, ktorý sa prenesie do bunky závisí od počtu domén, na ktoré sa naviaže signálová molekula.

Typickým príkladom vplyvu rôznej koncentrácie molekúl regulátora diferenciácie na správanie sa buniek, je vytvorenie (uzáver) nervovej rúry (obr. 91).



• **Obr. 91.** Schéma uzavretia nervovej rúry a diferenciácie motorických neurónov

Centrum pre tvorbu SHH sa nachádza na rozhraní okrajov nervovej lišty. Tu je koncentrácia SHH najvyššia, čo vedie k proliferácii okolitých tkanív a k uzáveru nervovej rúry. Zároveň to vysvetľuje, prečo dostredivé nervy vstupujú do miechy jej zadnými koreňmi. Ventrálnym smerom koncentrácia SHH klesá, čo na opačnej strane miechy vedie k diferenciácii motorických neurónov.

SHH sa podieľa aj na vývoji ostatných štruktúr tela. Príkladom jeho autozómovo dominantnej mutácie, ktorá spôsobí zníženie jeho expresie o 50 % je holoprozencefália. Ide o poruchy vývoja tváre, mozgu a mozgovne. Má variabilnú expresivitu, od kyklopie a anencefálie, cez rásť pery a podnebia, až po relatívne ľahké postihnutie – typický kužeľovitý tvar hlavy, blízko posadené oči a centrálny rezák.

Rodiny morfogénov sú génové rodiny pre transkripčné faktory. Majú typickú charakter rodín génov – jeden promótor (LCR) riadi postupnú expresiu génov za sebou. Toto považujeme za hlavný dôvod faktu, že sa zárodočný vývoj ubera jedným smerom a nemôže sa vrátiť.

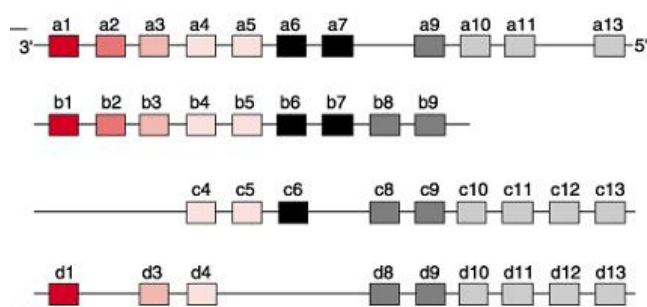
Najznámejšie z nich sú rodiny HOX–ov (boxy homeotických génov). Obsahujú tzv. homeogény – vysoko konzervatívne a najdlhšie známe regulačné gény. Majú dĺžku 180 bp a kódujú 60 aminokyselinové homeodomény, na DNA sa viažu proteíny, ktoré sa viažu do veľkého žliabku DNA pred génom. Zúčastňujú sa tak remodelácie chromatinu a regulácie expresie vybraných génov, najmä z rodiny transkripčných faktorov T2F.

HOXov je 38 rôznych druhov a tvoria 4 rodiny (tab. 14).

• **Tab. 14.** Rodiny HOXov v genóme človeka

HOX	Typy	Počet génov	Lokalizácia
A	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12	11	7 p 14-15
B	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	9	17 q 21-22
C	4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13	9	12q 13
D	1, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13	9	2 q 31-32

Transkripčné faktory, ktoré HOXy kódujú, riadia vývoj zárodka v antero-posteriórnom smere. Pri vývoji každej jednotlivej štruktúry sa zapájajú v zložitých vzájomných kombináciách (obr. 92).



• **Obr. 92.** Rodiny HOXov

Príkladom dôsledkov ich mutácií sú poruchy vývoja prstov – polydaktýlie, syndaktýlie a synpolydaktýlie pri mutácii génu *d13*, ktorý je jedným z posledných, ktoré sú aktivované.

Okrem HOXov sa na vývoji jednotlivých štruktúr zárodka podieľajú aj ďalšie morfogény, napr. zo skupiny PAX, ktoré tiež kódujú na DNA sa viažuce regulačné proteíny. Na rozdiel od HOXov sú roztrúsené po genóme (tab. 15).

• **Tab. 15.** Distribúcia PAXov v genóme

PAX	Lokalizácia
1	20 p 11,2
2	10 q 24.3 – 25.1
3	2 q 35
4	7 q 32
5	9 p 13
6	11 p 13
7	1 p 36
8	2 q 12 - 14
9	14 q 12 - 13

PAXy sú intenzívne študované a pre informáciu uvádzame úlohu niektorých z nich:

- **PAX 1** hrá úlohu pri formovaní segmentovej štruktúry zárodka, predovšetkým v rostro-kaudálnej (neskôr kranio-kaudálnej) osi;
- **PAX 2** hrá úlohu pri diferenciácii buniek obličky;
- **PAX 3** sa exprimuje počas včasnej neurogenézy. Jeho defekt vedie k vzniku tzv. Waardenburgovho syndrómu (hluchota a poruchy vývoja kože a oka);

- **PAX 5** je známy aj ako BSAP a je zahrnutý do diferenciácie B-lymfocytov, vývoja centrálného nervového systému a spermiogenézy;
- **PAX 6** (oculorhombín) je transkripčný faktor dôležitý pri vývoji oka a nosa. Jeho defekt spôsobuje anirídiu (chýbanie dúhovky), ako aj autozómovo dominantne dedičné parciálne chýbanie dúhovky.

Doplňujúca študijná literatúra

ALBERTS, B. – BRAY, D. – JOHNSON, A. – LEWIS, J. – RAFF, M. – ROBERTS, K. – WALTER, P.: Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. 2. vydanie. Ústí nad Labem: Espero Publishing 2005, 740 s.

13 ÚVOD DO EXPERIMENTÁLNEJ TERATOLÓGIE

Teratológia je interdisciplinárny vedný odbor, ktorý sa zaoberá štúdiom vrodených vývojových chýb, ich príčin a mechanizmov ich vzniku. Názov vznikol v 18. storočí a je odvodený od gréckeho teraton – netvor.

Vrodená vývojová chyba (VVCh) je postnatálne zistená odchýlka vnútromaternicového vývoja, ktorá presahuje normálne rozmedzie fenotypovej variability danej štruktúry alebo jej funkcie. Variabilita je určená epigenetickými faktormi, ktoré pôsobia v náhodne kolísajúcom množstve a intenzite.

U jednotlivých vyvíjajúcich sa štruktúr je frekvencia ich extrémnych foriem (VVCh) známa. V našej populácii sa VVCh diagnostikujú u približne 2 % novorodencov. Tento údaj je ovplyvnený spôsobom ich hlásenia a tým, čo sa považuje za VVCh. Vo výskyte VVCh boli pozorované výrazné regionálne rozdiely nielen v ich počte, ale aj v proporcii postihnutia jednotlivých orgánových sústav.

U VVCh rozoznávame tzv. mínus formy (chýbanie časti alebo celej štruktúry) a plus formy (napr. nadpočetnosť prstov).

Pre potreby experimentálneho testovania potenciálnych teratogénov je táto definícia rozšírená o požiadavku dokázať, že v súvislosti s podávaním testovaného agens, došlo k štatisticky významnému nárastu známej frekvencie VVCh u modelového organizmu.

V klinickej praxi sa stretávame s veľmi rôznorodým pomenovaním VVCh – malformácie, anomálie, atypický rast, chyby, znetvorenia, odchýlky vývoja atď.

Samostatnou kapitolou sú závažné poruchy intrauterinného vývoja, ktoré vedú k samovoľnému potratu zárodka alebo k narodeniu mŕtveho plodu. Nazývame ich len vývojové chyby, nakoľko nedôjde k pôrodu na termín.

Rozoznávame nasledovné príčiny porúch intrauterinného vývoja (vzniku VVCh):

- geneticky podmienené ochorenia a syndrómy, zdedené, alebo vzniknuté mutáciou *de novo*. Odhaduje sa, že sa podieľajú na 25 % vzniku VVCh;
- pôsobenie na bunky a ich vzťahy v pôvodne normálnom zárodke (teratogénéza). Poruchy vývoja môžu byť vyvolané nasledovnými skupinami príčin:
 - pôsobením mutagénu na niektoré bunky zárodka;
 - ovplyvnením expresie génov v bunkách zárodka;
 - negatívnym účinkom na medzibunkovú komunikáciu buniek zárodka a poruchou regulácie. Táto skupina je veľmi rozsiahla, patrí sem napr.: nedostatok energetických zdrojov, inhibícia syntézy alebo funkcie enzýmov, poruchy osmotickej rovnováhy, porušenie funkcií a integrity membrán, komunikácie buniek (fyzickej i parakrinnej), ale aj útlakové poškodenia (amniové pruhy), atď.;
 - príčiny zo strany matky (napr. niektoré endokrinné ochorenia a VVCh matrice);
 - infekčné ochorenia počas gravidity (napr. primoinfekcie vírusom rubeoly alebo protozomom *Toxoplasma gondii*).

Uvedené príčiny študuje teratológia. Zistiteľné faktory (zo strany matky, infekčné agens, chemické látky atď.) sa podieľajú na etiológii VVCh v 10 %. Príčina vzniku zvyšných 65 - 70 % VVCh nie je známa (rozpoznateľná).

Teratogén je faktor z vonkajšieho (extraembryonálneho) prostredia, ktorý po prechode transportným kanálom spôsobuje (podmieňuje) nežiadúce ovplyvnenie ontogenézy *in utero* s následným vznikom VVCh.

Účinok teratogénu závisí od:

- obdobia zárodočného vývinu (čím je zárodok „mladší“, tým závažnejšie sú poruchy, ktoré teratogén vyvolá);
- vnímavosti zárodka (v rámci vnútrodruhovej a medzidruhovej variability);
- dávky teratogénu a dĺžky expozície;

- mechanizmu jeho účinku (vrátane potenciačného alebo inhibičného účinku kombinácie rôznych naraz pôsobiacich faktorov);
- transportného kanálu (cesty, ktorú prekoná až k cieľovým štruktúram v zárodku. Pre chemické a biologické teratogény má rozhodujúci význam metabolizmus, resp. jej imunitný systém matky).

Typy teratogénov:

- fyzikálne (napr. prenikavé a ionizujúce žiarenie);
- chemické (napr. lieky, xenobiotiká, toxické látky, mutagény);
- biologické (vírusy, baktérie, protozoa).

V tabuľke 16 sú uvedené príklady najznámejších liekov, ktorých teratogénne vlastnosti boli odhalené a tieto lieky je zakázané podávať tehotným ženám.

• **Tab. 16.** Príklady liekových teratogénov u človeka

Isotretionin (13-cis-retínová kyselina)	Kraniofaciálne abnormality, NTD, kardiovaskulárne defekty
Litiumkarbonát	Rôzne malformácie srdca a veľkých ciev
Methotrexát	Mnohopočetné malformácie, predovšetkým skeletu, tváre, lebky, končatín a chrbtice
Phenitoin	Fetálny hydantoinový syndróm: IURR, mikrocefália, mentálna retardácia, strhnutý metopický šev, vnútorné epikantálne záhyby, ptóza viečok, hlboko stlačený koreň nosa, hypoplázia falangov
Thalidomid	Abnormálny vývoj alebo chýbanie končatín, systémové abnormality
Trimetadion	Zaostávanie vývoja, obočie v tvare písmena V, nízko sediace ušnice, rázštep pery a/alebo podnebia
Kyselina valproová	Kraniofaciálne malformácie, NTD, často hydrocephalus, defekty srdca a skeletu

Pre potreby experimentálnej teratológie, teda štúdia mechanizmu vzniku VVCh a testovania potenciálnych teratogénov, vznikla **teória elementárnych morfológických procesov** (EMP), ktoré sú opísané v kapitole 12 o genetike vývoja.

Čím sú EMP v zárodku aktívnejšie, tým sú vnímavejšie na pôsobenie teratogénu. Takto vysvetľujeme jav, že niekedy jeden teratogén vyvolá mnohopočetnú VVCh a inokedy viac teratogénov len jednu VVCh. Obdobia, v ktorých sú jednotlivé orgánové sústavy najviac citlivé na pôsobenie teratogénov sa nazývajú kritické periódy. U človeka:

- centrálny nervový systém (3. až 6. týždeň a klesá do narodenia);
- kardiovaskulárny systém (polovica 3. až 6. týždeň a klesá do polovice 8. týždňa);
- pera a podnebie (6. - 12. týždeň);
- končatiny (polovica 4. - 7. týždeň).

Základné postuláty teratológie sú:

- vnímavosť k teratogenéze závisí od genotypu zárodka a od spôsobu, akým dochádza k jeho interakcii s faktorom z vonkajšieho prostredia;
- vnímavosť na teratogénne agens varíruje v závislosti od obdobia vývinu zárodka a od času expozície (tzv. kritické periódy);

- teratogén pôsobí určitým mechanizmom na bunky a tkanivá zárodku a podmieňuje abnormálnu embryogenézu (teratogenézu);
- cesta škodlivých exogénnych faktorov k vyvíjajúcim sa štruktúram závisí od povahy faktorov (agens);
- manifestácia porušeného vývinu vzrastá v súlade so vzrastom dávky agensu. S postupujúcim ontogenetickým vekom veľkosť dávky relatívne klesá (nárastom hmotnosti organizmu matky a plodu);
- abnormálny vývin sa môže finálne manifestovať (v závislosti od rozsahu poškodenia) – smrťou, malformáciou, retardáciou rastu alebo funkčnou nedostatočnosťou.

Vzhľadom na medicínsku a sociálnu závažnosť VVCh, je potrebné študovať príčiny ich vzniku. Základné metodické prístupy sú:

- **teratoepidemiológia** (sledovanie výskytu VVCh a vyhľadávanie potenciálnych teratogénov);
- **experimentálna teratológia** – overovanie teratogénneho potenciálu sledovaných faktorov v pokusoch (od skriningových testov až po jednogeneračné reprodukčné štúdie).

Paradoxami identifikácie teratogénov u človeka je, že:

- ľudský zárodok, organizmus gravidnej ženy a feto-placentárna jednotka človeka sú unikátne, takže doteraz nemáme adekvátny nehumánny model, ktorý by umožňoval spoľahlivý prenos výsledkov z pokusov na modeloch vykonaných na človeka;
- spoločenská objednávka pre testovanie teratogénnych vlastností novo zavádzaných chemických látok, najmä liečiv je veľmi aktuálna;
- výsledkom je kompromis – zisťovanie, či skúmaná látka prechádza cez placentu (tento údaj má prioritu) a preverovanie jej teratogénneho potenciálu na experimentálnych modeloch. Ak je v oboch prípadoch výsledok pozitívny, liek sa nesmie podávať gravidným ženám.

V tabuľke 17 uvádzame modely používané na testovanie v experimentálnej teratológii.

• **Tab. 17.** Prehľad modelov používaných na testovanie v experimentálnej teratológii

In vivo	- Subvertebrata (napr. Hydra vulgaris) - Vertebrata - Amphibia (napr. FETAX – skriningový test na žabách Xenopus laevis) - aviarne modely (napr. CHEST – skriningový test na kuracích embryách) - laboratorne zvieratá (myši, potkany, králiky, atď.) sa považujú za najvhodnejšie, nakoľko ide o kompletný systém matka – placenta – zárodok (plod)
In vitro	- kultivované bunky (na štúdium mechanizmu účinku teratogénov) - kultivované časti embryí (na štúdium mechanizmu účinku teratogénov) - kultivované celé predimplantačné embryá (skriningové testy)

Organizácia testu embryotoxicity (vplyvu na vznik a prežívanie zárodkov) **a teratogenicity** (tzv. jednogeneračnej reprodukčnej štúdie, podľa OECD):

- výber vhodného modelu, ktorý adekvátne reaguje na potenciálny teratogén;
- stanovenie začiatku gravidity a embryogenézy;
- aplikácia testovanej látky (typ podávania by mal zodpovedať očakávanej expozícii u ľudí);
- dávkovanie (vychádza z predpokladanej terapeutickkej dávky alebo letálnej dávky). Používajú sa minimálne tri pokusné skupiny (s rôznymi dávkami) a jedna kontrolná skupina (podáva sa len vehikulum). V jednej skupine by malo byť 10 - 20 zvierat;
- aplikačná schéma (rozpis dní aplikácie a dávok);

- ukončenie experimentu (u laboratórnych zvierat, vzhľadom na maternálny kanibalizmus – deň pred fyziologickým ukončením gravidity).

V pokuse sledujeme nasledovné parametre, ktoré sú štatisticky spracovávané. :

- hmotnosť a správanie sa samíc počas experimentu (môže upozorniť na nešpecifické účinky testovaného faktoru, ktoré môžu zamaskovať špecifický účinok);
- počet: žltých teliesok (koľko oocytov bolo poskytnutých na fertilizáciu), implantátov (koľko zo zárodkov začalo vývoj – nidovalo), resorbátov (typ potratu u polyembryonálnych zvierat), živých a mŕtvych plodov;
- hmotnosť plodov;
- výskyt viscerálnych a skeletových malformácií.

Doplňujúca študijná literatúra

MACH, M. – UJHÁZY, E. – DUBOVICKÝ, M.: Teratológia - princípy a hodnotenie abnormálneho vývinu. Bratislava: Slovenská toxikologická spoločnosť 2014, 182 s.

14 APOPTÓZA

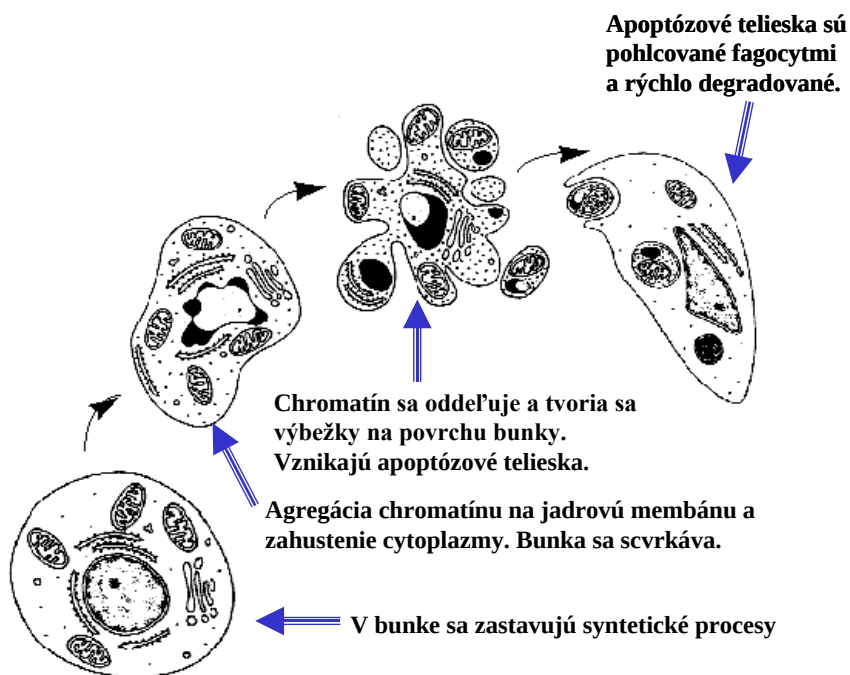
Apoptóza je zánik bunky, ktorý nevyvolá reakciu v okolí. Bola objavená až na začiatku 70-tych rokov minulého storočia, v súvislosti s rozvojom metodík elektrónovej mikroskopie. Je to tak diskretný proces, že sa nazýva tichá bunková smrť. Odráža sa to v jej názve – $\alpha\pi\omicron\tau\omega\sigma\iota\varsigma$ čo v starej gréčtine znamená opadávanie listov zo stromov na jeseň.

Zánik buniek je udalosť, ktorá sa v makroorganizme uskutočňuje priebežne. Súvisí s neustálou prestavbou a regeneráciou tkanív, orgánov a organizmu. Má aj základný význam pri remodelačných procesoch počas embryogenézy. Preto sa apoptóza nazýva aj programovaná bunková smrť.

Zároveň je spôsobom, ako sa telo chráni pred rizikom pochádzajúcim z buniek, ktoré už prekročili svoju životnosť alebo z tých, ktoré sú potenciálne nebezpečné, napríklad pre riziko ich malígnej transformácie.

Najstarším známym mechanizmom zániku buniek je patologický proces – **nekróza**, pri ktorej je rozpad bunky (buniek) sprevádzaný zápalovou reakciou okolia. Jedným z hlavných procesov, ktoré nekrózu sprevádzajú, je praskanie lyzozómov, uvoľnenie ich enzýmov a natrávenie bunky a jej okolia (tzv. autolýza).

Apoptóza sa skladá zo série procesov, ktoré sú buď navodené zvonku alebo ich iniciujú vnútrobunkové mechanizmy. Apoptózu vykonávajú vnútrobunkové mechanizmy, ktoré musia byť špecificky aktivované. Ich výsledkom je rozloženie bunkových proteínov i DNA a zánik bunky vo forme mechúrikov z membrány – tzv. apoptotické telieska, ktoré obsahujú rôzny podiel uvedených súčastí (obr. 93).



• **Obr. 93.** Schéma priebehu apoptózy

Apoptóza je proces pri ktorom sa v bunke najprv zastavuje syntéza bielkovín, vrátane tvorby lyzozómov. Následne DNÁza degraduje (štiepi) jadrovú DNA na krátke, 300 bp dlhé úseky. Degradovaný chromatin sa, v dôsledku rozloženia jadrovej matrix, pripája (agreguje) na vnútornú stranu jadrovej membrány. Súčasne sú rozložené aj bielkoviny v cytoplazme a v organelách. Bunka sa začína scvrkávať.

Štiepenie bielkovín vykonávajú zvláštne enzýmy, ktoré sa nazývajú **kaspázy**, pretože bielkoviny štiepia v mieste dvoch aminokyselín – cysteínu a kyseliny asparágovej. V bunke sú

prítomné v neaktívnej forme, ako **prokaspázy**. Je ich viacero typov a je medzi nimi hierarchické usporiadanie. Mechanizmus, ktorý spustí apoptózu, najprv aktivuje jednu z hlavných kaspáz (8, 9, 10 alebo 12), tým že ju zostaví z jej podjednotiek. Tak sa z nej stáva aktívny proteolytický enzým, ktorý čiastočným natrávením aktivuje niektorú z výkonných kaspáz (3, 6 alebo 7).

Apoptotický proces pokračuje vytváraním mechúrikov z jadrového obalu, ktoré obsahujú zvyšky chromatinu. Zároveň sa aj cytoplazmatická membrána vydúva a postupne sa odškrcujú mechúriky, ktoré obsahujú zvyšky cytoplazmy, jej obsahu a jadra. Takto vznikajú tzv. **apoptotické telieska**.

Apoptotické telieska nevykazujú aktivitu a sú v tkanive pohlcované bunkami schopnými fagocytózy, napr. lokálnymi fagocytmi (makrofágmi). Materiál uložený v mechúrikoch (fagozómoch) je v tkanive recyklovaný.

Aktivácia (vyvolanie) apoptózy je proces, ktorým sa v bunke spúšťa séria mechanizmov a reakcií molekúl, ktoré nakoniec vedú k apoptóze. Vo všeobecnosti ich delíme na dva hlavné typy, exogénnu a endogénnu.

Pri **exogénnej** aktivácii dochádza k naviazaniu signálovej molekuly z mimobunkového priestoru na špecifický receptor na povrchu bunky. Tento spôsob je bežný napríklad pri vývoji a reakcii buniek špecifickej imunity (T lymfocytov). Ligandom sú napr. Fas alebo TNF. Ich naviazanie vedie k trimerizácii troch podjednotiek tzv. receptora smrti a k aktivácii jeho intracelulárnej domény. Na ňu sa pripoja FADD (s Fas asociované proteíny domény smrti). Slúžia ako efektor – pripoja na seba podjednotky prokaspázy 8 a zostavia z nej funkčný heterotetramér. Kaspáza 8 potom čiastočnou hydrolýzou aktivuje DNázu a výkonné kaspázy, najmä kaspázu 3.

Pri **endogénnej** aktivácii apoptózy vzniká podnet v bunke samotnej. Najdôležitejšia časť endogénnej aktivácie apoptózy súvisí s replikáciou DNA, teda hlavne s nahromadením mutácií v DNA a so spotrebovaním motívov pre väzbu primerov na telomérach. Súvisia s proteínom p53 a boli opísané v časti o bunkovom cykle a jeho regulácii (kapitola 11).

Proteín p53 vyvolá expresiu génu pre proteín p73 (resp. p78), ktorý uvoľní proteín **bcl2** z väzby na bielkovinový kanál **bax** vo vonkajšej membráne mitochondrií. Umožní tým, aby z priestoru medzi vonkajšou a vnútornou membránou mitochondrie unikol enzým **cytochróm c**. Tento sa viaže na bielkoviny **Apaf1** (apoptózu aktivujúci faktor 1) a spolu vytvorí komplex **apoptozóm**, ktorý potom aktivuje enzým **kaspázu 9**. Tento enzým aktivuje podriadené kaspázy, ktoré rozštiepia bunkové bielkoviny. Okrem toho sa aktivujú DNázu, ktorá štiepia jadrovú DNA.

Ďalším typom endogénnej aktivácie apoptózy je dôsledok toxického šoku, ktorý nevedia zvládnuť detoxikačné mechanizmy endoplazmatického retikula. Dochádza k vylučovaniu Ca^{2+} iónov a kalpainu, čo vedie k aktivácii prokaspázy 12 a následne k procesom, ktoré už boli opísané.

Hlavné funkcie apoptózy sú zhrnuté v tabuľke 18.

• **Tab. 18.** Hlavné funkcie apoptózy

Programovaná bunková smrť pri	- ukončení „životnosti“ bunky (teloméry) - selekciu buniek (napr. prapohlavných a imunitných); - nidácii a embryogenéze;
riadená (tichá) bunková smrť pri ochrane mnohobunkového organizmu pred	- rizikovými bunkami (napr. malígne transformované); - cudzorodými bunkami (napr. parazity a transplantáty).

Hlavnými funkciami apoptózy v embryogenéze sú selekcia chybných alebo nepotrebných buniek a remodelácia štruktúr počas embryogenézy. Fyziologický priebeh

embryogenézy teda závisí od správnej časovej a priestorovej regulácie pomeru medzi proliferáciou buniek a apoptózou.

Apoptóza má kľúčový význam najmä pri vývoji srdca, končatín (najmä prstov), čreva, mozgu, vylučovacej sústavy a pohlavných orgánov. Neprimerane veľká alebo malá aktivita apoptózy pri vývoji týchto štruktúr, vedie k vzniku vrodených vývojových chýb.

Apoptóza sa vo vývoji srdca podieľa na mnohých procesoch, ale jej poruchy majú najzávažnejšie dôsledky pri vzniku porúch remodelácie komorového septa a vytvorenia primárneho a sekundárneho septa medzi predsieňami. Ide o závažný problém, nakoľko poruchy vývoja priehradiek tvoria takmer jednu desatinu zo všetkých VVCh zistených u živonarodených novorodencov.

Apoptóza má vo vývoji končatín základný remodelačný význam pri vývoji štruktúr počas progresie apikálnej ektodermovej lišty. Príkladom sú poruchy vývoja ruky a prstov. Pri nadmernej (prípadne predčasne začatej) apoptóze počas vývoja prstov vznikajú polydaktýlie a naopak pri jej malej intenzite (alebo neskorom nástupe) vznikajú syndaktýlie.

Pri vývoji čreva, najmä pri spájaní častí pochádzajúcich z mezodermy a z endodermy, majú poruchy apoptózy význam pri vzniku atrézie (uzavretie), duplikáci (zdvojenie) stenóza (zúženie). Aj keď VVCh zažívacieho systému tvoria len 2 % zo všetkých hlásených, najväčšiu časť z nich tvoria atrézie pažeráka a rekta.

Pri vývoji mozgu apoptózou zanikne postupne až 50 % vzniknutých neurocytov. Prvým dôvodom je prispôbovanie sa počtu cieľových buniek, ku ktorým sa novovznikajúce bunky môžu pripojiť. Druhým dôvodom je neustála prestavba mozgu, v procese vývoja, pri vytváraní definitívnych zapojení.

Apoptóza je významný dej aj pri vývoji genitálu. Využíva sa pri formovaní jedinej dutiny maternice a pošvy a jej poruchy sú zodpovedné za riziko duplikácie a vzniku priehradiek v týchto orgánoch. U pošvy sa nedostatočná apoptóza môže prejavovať aj jej atréziou. Samostatným problémom je vývoj maskulínneho fenotypu genitálu, predovšetkým progresia uretry. Apoptózou v priestore medzi corpora cavernosa vytvára priestor, v ktorom uretra progreduje na koniec glansu. V prípade nadmernej apoptózy dôjde k jej predčasnému vyústeniu. Vzniká vôbec najčastejšia VVCh – hypospádia, ktorá bola v niektorých rokoch zaznamenaná u viac ako 20 % živo narodených chlapcov.

Doplňujúca študijná literatúra

ALBERTS, B. – BRAY, D. – JOHNSON, A. – LEWIS, J. – RAFF, M. – ROBERTS, K. – WALTER, P.: Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. 2. vydanie. Ústí nad Labem: Espero Publishing 2005, 740 s.

15 GÉNOVÁ TERAPIA

Génovú terapiu môžeme definovať ako liečenie geneticky podmienených chorôb postupmi, ktoré využívajú metódy génového inžinierstva s cieľom vniesť chýbajúci gén, prípadne upraviť alebo odstrániť defektný gén. Nazývame ju aj liečba génom, poprípade oprava génov. Je lákavé preniesť skúsenosti z vkladania génov do rastlín a živočíchov aj na ľudí.

Príčinou väčšiny genetických chorôb je zmena v DNA, ktorá vedie k zníženiu funkcie príslušného génu (často kódujúceho enzým), prípadne k jeho úplnej nefunkčnosti. Dôsledkom je chýbanie potrebného funkčného proteínu, čo vedie k vzniku choroby. Úlohou génovej terapie je napríklad pripraviť funkčný gén a zaviesť ho pomocou vhodného vektora do genetického materiálu bunky. Ide teda o reparáciu genetického vybavenia bunky. Génová terapia je však veľmi zložitá záležitosť. Je nutné zabezpečiť, aby sa správny gén dostal do správnych buniek, aby sa začal prepisovať v správnom čase a aby vydržal čo najdlhšie (v ideálnom prípade po celý život). Aj množstvo syntetizovanej bielkoviny musí byť „akurátne“ – ani príliš malé, ani príliš veľké.

Hlavnou motiváciou génovej terapie je nájsť nové spôsoby liečenia chorôb v prípadoch, kde je tradičná terapia málo efektívna alebo neefektívna. Snahou je aspoň do niektorých buniek pacienta vniesť nepoškodený gén, ktorý nedostatkovú bielkovinu vyrobí a aspoň čiastočne nahradí jej existenciu. Často stačí, aby sa produkcia bielkoviny obnovila iba na zlomok obvyklej úrovne a chorému sa výrazne uľaví, prípadne sa zastaví alebo spomalí rast nádorových buniek.

Základom liečby je poznanie súvislosti medzi mutáciou v géne a fenotypovým prejavom choroby. Problémom je, že mnohé gény nemajú iba jednu funkciu ale plnia viaceré úlohy, ktoré sú často rozdielne. Preto gén a jeho funkcie musia byť presne identifikované. Ďalším dôležitým pravidlom je, že nová forma génu musí odstrániť alebo zmierniť prejavy choroby a nesmie negatívne ovplyvniť fyziologické funkcie.

15.1 Choroby používané na génovú terapiu

Teoreticky sa pomocou génovej terapie dá opraviť každá choroba, zatiaľ sa využívajú a klinicky testujú jednoduchšie situácie. Pre experimentálnu génovú terapiu sa používajú choroby, ktoré majú veľmi ťažký, často letálny priebeh a zároveň neexistuje iná možnosť terapie.

Tzv. modelové mutácie, pre ktoré sa génová terapia testuje môžeme rozdeliť do štyroch skupín:

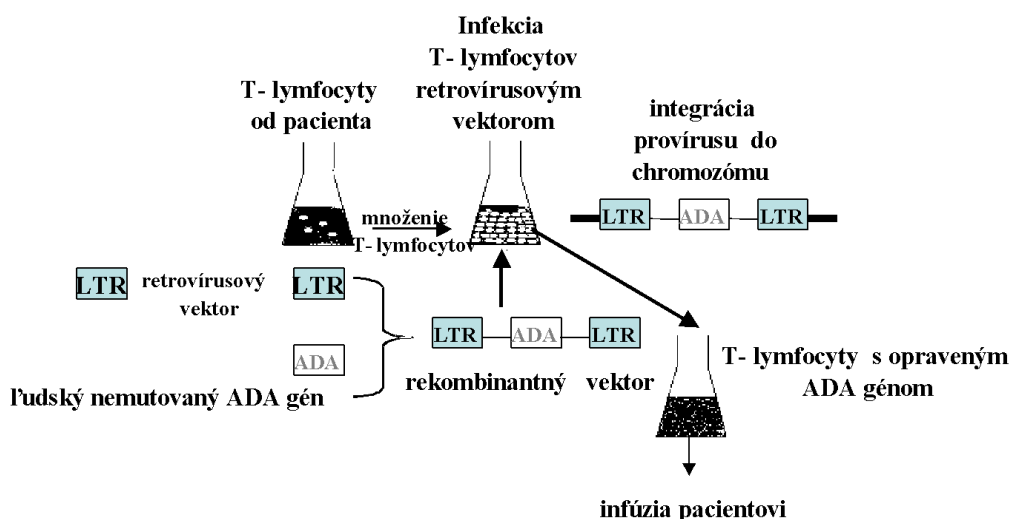
- **zmena v jednom géne** – (jednobodové mutácie), príkladom je kosáčikovitá anémia;
- **multigénové poruchy** – mutácie vo viacerých génoch zároveň, často sa prejaví aj vplyv prostredia, príkladom sú srdcovo-cievne poruchy, *diabetes*, nádorové ochorenia;
- **mitochondriálne poruchy** – mutácie v mitochondriálnej DNA, sú často letálne a spôsobujú poruchy orgánov;
- **chromozómové aberácie** – delécia, duplikácia, translokácia.

Napriek značnému úsiliu vedcov a lekárov je génová terapia vo väčšine prípadov iba v experimentálnom štádiu alebo sa klinicky testuje. Hlavný problém je, že často nesie so sebou mnoho vedľajších efektov. V Číne bola povolená prvá génová terapia *Gendicine* na liečbu nádorov mozgu a kože v r. 2003.

Európska komisia v r. 2012 schválila génovú terapiu s názvom *Glybera*. Základom tejto génovej terapie je vírus upravený metódami génového inžinierstva tak, aby do buniek pacienta vniesol ľudský gén pre enzým lipoproteínová lipáza (LPL). Z pôvodného vírusu ostalo len 4 %. Pacienti s týmto veľmi zriedkavým ochorením (1 až 2 ľudia z milióna) trpia ťažkými zápalmi pankreasu, majú narušený metabolizmus tukov a zvýšené riziko aterosklerózy a diabetu II.

typu. Doposiaľ boli odkázaní len na veľmi prísnu diétu. Táto génová terapia sa už nepoužíva, dôvodom bola vysoká cena.

V máji 2016, po 20 rokoch práce, bola oficiálne schválená prvá génová terapia pre *Strimvelis* od firmy GlaxoSmithKline (cena 665 000 dolárov). Je zameraná na liečbu **ťažkej kombinovanej imunodeficiencie** (SCID – *severe combined immunodeficiency*). Forma dedičnej SCID je nesmierne zriedkavá. Pacienti nemajú funkčný **gén ADA**, ktorý kóduje adenožín deaminázu. Jej úlohou je katalyzovať deamináciu adenožínu, pričom vzniká inozín, ktorý sa premieňa na hypoxantín. Mutáciou v gène *ADA* je deaminácia zastavená, adenožín sa mení na dAMP, ten na dATP, stúpa množstvo dATP v bunkách. dATP je silným inhibítorom tvorby deoxynukleotidov, hlavne deoxytymidíntrifosfátu. To vedie k zablokovaniu syntézy DNA a tým aj delenia buniek. Pokiaľ je gén *ADA* nefunkčný, dochádza k imunitnej nedostatočnosti a k infekčným chorobám, pretože T lymfocyty sú citlivé na zníženie syntézy DNA. Bez ADA biele krvinky odumierajú ihneď v kostnej dreni. Tieto deti majú od útleho veku jednu infekciu za druhou, od nádchy až po život ohrozujúce pneumónie. Pred dvadsiatimi rokmi mohli prežiť jedine pod ochranným plastickým krytom – bublinou. Takýto sterilný kryt chránil Dávida, slávneho "chlapca v bubline". Neskôr sa vedci pokúšali chemicky zmeniť ADA od kráv (liek nazvaný Adagen). Hoci tento liek zachránil deti, nevyliečil ich úplne, stále sa vyskytovali komplikácie. Sen o génovej terapii SCID sa vykryštalizoval, keď W. French Anderson prišiel k záveru, že deficiencia ADA je najlepšou chorobou na testovanie genetickej liečby. Jeho tím pracoval na osvojení techník génového transferu vyvinutých základným výskumom a na ich aplikácii v medicínskej terapii. Rekombinantnými technikami za pomoci restričných enzýmov sa gén schopný tvoriť chýbajúci **enzým adenožín deaminázu včlenil do nukleovej sekvencie retrovírusu** (RNA-vírusu). **RNA-vírusy obsahujú reverznú transkriptázu**, enzým zodpovedný za to, že pri replikácii týchto vírusov dochádza k reverznej transkripcii RNA genómu do komplementárneho vlákna DNA, ktoré je vzápätí dosyntetizované na dvojvláknovú DNA. Takáto DNA sa potom integruje do hostiteľskej chromozómovej DNA. Dlhो žijúce kmeňové bunky sú vyplavené z kostnej drene do krvného obehu. Geneticky zmenené vírusy a kmeňové bunky izolované z odobratej krvi sa zmiešajú. Vírusy nesúce nový gén vstúpia do kmeňových buniek (obr. 94). Touto technikou genetického transferu kmeňové bunky získajú schopnosť syntetizovať chýbajúci enzým. Zmenené kmeňové bunky sa injikujú do pacienta a trvale podporujú jeho imunitný systém.



• **Obr. 94.** Postup pri liečbe ťažkej kombinovanej imunodeficiencie génovou terapiou

Príkladom schválenej génovej terapie pri liečbe rakoviny sú: *Kymriah* – akútna lymfoblastová leukémia, *Yescarta* – niektoré lymfómy, *Imlygic* – lokálna liečba malígneho melanómu, *Provenge* – karcinóm prostaty, *Zalmoxis* – hematol. malignity.

Príkladom schválenej génovej terapie genetických ochorení sú: Luxturna – cieľ opraviť mutáciu v géne *RPE65*, ktorý fyziologicky produkuje proteín, vďaka ktorému očné receptory vnímajú svetlo. Pacienti s mutáciou v tomto géne postupne slepnú. Liečba je založená na vpichnutí injekcie s modifikovaným vírusom priamo do oka pacienta. V máji 2019 schválil americký Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) liek *Zolgensma* (cena 2 milióny €). Je to nová génová terapia pre deti do dvoch rokov so spinálnou muskulárnou atrofiou (SMA) a je dostupná zatiaľ iba v Amerike. SMA je autozomálne recesívne ochorenie. Mutovaný je gén *SMN1* (*survival motoric neuron*), ktorý kóduje syntézu proteínu SMN zodpovednú za fungovanie motorických neurónov. Prvé príznaky SMA sa objavujú už pri narodení, prípadne do pol roka dieťaťa. Choroba sa veľmi rýchlo rozvíja, dieťa nie je schopné zdvihnúť hlavu a vykonávať bežné pohybové zručnosti očakávané v prvých mesiacoch života. Nikdy sa nenaučí sedieť a postupne mu ochabujú všetky svaly. Až 95 % detí zomrie do 2. roku života na respiračné zlyhanie.

V tom istom čase bol v EU schválený *Zynteglo* na liečbu beta talasémie, ktorá znižuje schopnosť pacienta vytvárať hemoglobín. Génová terapia využíva vírus na zavedenie zdravých kópií génu na výrobu hemoglobínu do kmeňových buniek odobratých pacientovi. Bunky sa potom znovu zavedú do krvného obehu a transportujú sa do kostnej drene, kde začnú produkovať zdravé červené krvinky, ktoré môžu produkovať hemoglobín.

15.2 Základné požiadavky na úspešnú génovú terapiu

Ak má byť génová terapia úspešná, musia byť splnené niektoré základné požiadavky. Najdôležitejšia je **poznať presnú príčinu choroby** až na molekulovej úrovni, zodpovedný gén, jeho presnú DNA sekvenciu a lokalizáciu, génový produkt a mechanizmus jeho normálneho a patologického účinku. Osekvenovanie ľudského genómu a zavedenie techník nextgen sekvenovania výrazne napomohlo v odhaľovaní príčin chorôb. Robia sa tzv. celogenómové asociačné štúdie. Pomocou bioštatistických metód sa porovnávajú tisíce vzoriek pacientov a zdravých jedincov. Odhaduje sa význam v ich rozdieloch (napr. DNA polymorfizmach a mutáciách) pri vzniku a vývine choroby. Analyzuje sa, ktoré gény sú zodpovedné za vznik chorôb a dá sa vypočítať riziko pre konkrétneho pacienta (personalizovaná medicína). Odhaľujú sa nové asociácie medzi génom a chorobou, stáva sa že identifikované gény neboli predtým vo vzťahu k chorobe skúmané. Následne sa v laboratóriu vytvorí terapeutická genetická informácia, **transgén**, pomocou rekombinačných techník.

Druhou požiadavkou sú **vhodné cieľové bunky** génovej terapie. Ideálne sú bunky kmeňové, ktoré sa dajú ľahko získať od pacienta, je možné ich namnožiť v *in vitro* podmienkach a jednoducho sa s nimi manipuluje. Dôležité je, aby po vnesení do pacienta ostali funkčné a následne sa opravený gén prenášal do dcérskych buniek. V poslednom období sa používa na vystrihnutie a zacielenie vybraného úseku CRISPR-Cas9 systém, ktorý umožňuje výmenu defektného génu za zdravý.

Tretia súčasť stratégie je **voľba vhodného vektora** (nosiča). Používajú sa vírusové, nevírusové a bakteriálne vektory. Z vírusových sú to najčastejšie retro-, adeno-, adeno-asociované-, lenti-, herpes a alfa vírusové vektory. Z nevírusových sa najčastejšie používa nahá DNA a bakteriálne sa získavajú z baktérií rodu *Listeria*, *Escherichia* a *Salmonella*. Zároveň musí existovať vhodný **systém prenosu genetickej informácie** do cieľových buniek. Možností je mnoho – napr. mechanické metódy (mikroihly, mikromanipulátory a biobalistika), chemické či fyzikálne metódy (elektroporácia – umožní prienik genetickej informácie cez cytoplazmatickú membránu), samotná DNA či DNA v komplexoch s rôznymi molekulami (DNA prenos pomocou lipozómov (lipoplexov), modifikovaných lipozómov (polyplexov), komplexných mnohovrstvových lipozómov (piedmontov), mnohovrstvových lipidových nanočastíc (kochleátov).

Štvrtou požiadavkou je **zaručenie bezpečnosti prenosu** a zabránenie rekombinácii retrovírusového vektora s endogénnym retrovírusom, čo by malo za následok nekontrolované

množenie. Zároveň vnesená DNA nesmie pôsobiť ako mutagén a inaktivovať niektorý tumor-supresorový gén, poprípade aktivovať protoonkogén. Vzhľadom na určitú kontroverznosť tejto terapie je ju možné použiť na pacientovi iba ak je úspešne otestovaná a schválená. K podstúpeniu experimentálnej terapie je nutné získať informovaný súhlas pacienta.

Pre aplikáciu génovej terapie sa vytvárajú prísne zákony a normy. Experimentálna génová terapia sa používa na liečbu hemofílie, cystickej fibrózy, hemoglobínopatie, deficitu 1-antitrypsínu, parkinsonovej a alzheimerovej choroby, arterosklerózy, AIDS, hepatitídy, diabetu, Duchennovej svalovej dystrofie, cirhózy pečene a z malignít napr. multiformného glioblastómu. Po génovej terapii je potrebné starostlivo monitorovať zdravotný stav pacienta.

15.3 Základné spôsoby génovej terapie

Niektorí pacienti majú mutáciu v určitom géne (napr. deléciu, substitúciu) a pozmenený produkt pôsobí patologicky. V týchto prípadoch sa robí pomocou rekombinácie tzv. **oprava génu** (náhrada, transplantácia génu). Mutovaný gén sa vymení za zdravý. Pri strate funkčnosti génu, ak je patologický nedostatok génového produktu, sa dodávajú extrakópie tohto génu do genómu príslušných buniek, čím sa zvýši množstvo potrebného génového produktu. Gény sa pridávajú napríklad do kmeňových buniek, s cieľom zabezpečiť ochranu pred toxickým účinkom chemoterapeutík (génov rezistencie na chemoterapeutiká).

Metódou používanou v terapii nádorov je **cielené usmrtenie** určitých buniek vložením tzv. „killer“ génu, ktorý následne produkuje letálny toxín a tým zabije vybrané bunky (nádorové). Alebo sa použije „killer“ gén, ktorý je citlivý na smrtiaci účinok liečiva, ktoré sa dá pacientovi až po vložení takéhoto smrtiaceho génu do bunky, čo sa nazýva aj **samovražedná génová terapia**.

V niektorých prípadoch sa gén len ako keby „vypne“ (cielená inhibícia expresie chybného génu), čo sa nazýva **ablácia génu**. Ablácia génu sa vykonáva podľa potreby na úrovni DNA, RNA prípadne sa zablokuje už vzniknutý proteín. V určitých nádoroch je naopak možné spustiť expresiu terapeutických génov prostredníctvom špecifických sekvencií v promótoroch, ktoré sa zapínajú len v nádoroch a zdravé tkanivo sa nepoškodí.

Podľa typu ovplyvnených buniek môžeme definovať génovú terapiu ako **somatickú a zárodočnú**. V praxi sa robí iba somatická génová terapia, nakoľko pri zárodočnej je u človeka a vyšších stavovcov celosvetové moratórium. Pri zárodočnej terapii je zmenený genóm priamo vo vajíčku alebo spermii a zmena sa prenáša do ďalších generácií.

Génová terapia sa môže robiť **in vivo**, kedy sú cieľové bunky pre vnesenie génu lokalizované priamo v tele pacienta (cieľové bunky sú po celú dobu súčasťou organizmu) a **in vitro = ex vivo**, kedy sa gén vnesie do cieľových buniek v laboratóriu, čiže mimo tela pacienta (cieľové bunky sú najprv odobrané z organizmu a po uskutočnení génovej terapie sú vrátené na svoje miesto v organizme). Pri *in vivo* terapii ide o viac-menej náhodný proces, s malými možnosťami kontroly a riadenia. Používa sa v prípadoch, ak ide o bunky (tkanivá), ktoré nemožno kultivovať v *in vitro* podmienkach alebo ak nemožno kultivované bunky preniesť späť do tela pacienta. Pri *ex vivo* je genetický materiál najprv prenesený do buniek kultivovaných *in vitro*, čo je kontrolovaný proces, transfekované bunky sú selektované a množené. Výhodou je, že bunky sú zvyčajne autológne a možno ich vrátiť späť do tela pacienta.

15.4 Výhody a limity génovej terapie

Výhody génovej terapie sú nesporné, rovnako ako aj jej limity. Preto je snaha nedostatky génovej terapie zmierniť, poprípade úplne eliminovať. Medzi najdôležitejšie patrí krátkodobá účinnosť génovej terapie, pretože bez integrácie do genómu je veľmi ťažké dosiahnuť dlhodobý účinok transgénu. Imunitná odpoveď redukuje efektívnosť terapie a zabraňuje opakovanej aplikácii. Aj keď vírusové vektory sú najpoužívanejšie v génovej terapii, existuje obava, že vírusový vektor môže vyvolať iné ochorenie, problematická je ich toxicita, imunitná a zápalová

odpoveď. Pri použití vírusových vektorov je genetická informácia do genómu vložená viac menej náhodne. Vnesený gén tak môže narušiť sekvenciu iného génu (narušenie protoonkogénu alebo tumor-supresorového génu môže spustiť malígnu transformáciu bunky). A v neposlednom rade väčšina chorôb nie je spôsobená mutáciou v jednom gène ale sú vyvolané kombinovaným účinkom rôznych génov (ide o tzv. multigénové choroby, napr. ochorenia kardiovaskulárneho systému, Alzheimerova choroba, artritída a diabetes) a opraviť zároveň viacero génov je v súčasnosti nereálne. Na záver je to vysoká finančná, technická a technologická náročnosť týchto metód. Génová terapia je aj eticky problematická, je ťažké presne vymedziť hranicu medzi tým, na čo je ešte etické génovú terapiu použiť a na čo už nie.

Doplňujúca študijná literatúra

ALBERTS, B. – BRAY, D. – JOHNSON, A. – LEWIS, J. – RAFF, M. – ROBERTS, K. – WALTER, P.: Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. 2. vydanie. Ústí nad Labem: Espero Publishing 2005, 740 s.

GBELCOVÁ, H. – REPISKÁ, V. – SHAWKATOVÁ, I.: Nukleové kyseliny a proteíny. Analytické metody a postupy. 1. vyd. Bratislava: Univerzita Komenského, ISBN 978-80-223-4472-2, 2017. 316 s.

HALČÁK, L. – REPISKÁ, V.: Tvorba biomakromolekul a ich úloha v prenose genetickej informácie. 1. vyd. Bratislava: Asklepios, ISBN 978-80-7167-104-6, 2007, 83 s.

ROSYPAL, S.: Úvod do molekulární biologie. Díl I. 4. inovované vydanie. Brno: Stanislav Rosypal 2006, 288 s.

ROSYPAL, S.: Úvod do molekulární biologie. Díl II. 3. inovované vydanie. Brno: Stanislav Rosypal 2003, 300 s.

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1.	Aparatúra na elektroforézu	7
Obr. 2.	Štandard molekulových hmotností	7
Obr. 3.	Usporiadanie zariadenia na prenos (blotting) fragmentov DNA z gélu na membránu	10
Obr. 4.	Bodový polymorfizmus pri kosáčikovej anémii	11
Obr. 5.	Schéma PCR	12
Obr. 6.	13 fragmentov namnožených metódou PCR, tzv. PCR produktov	13
Obr. 7.	Určenie paternity VNTR	15
Obr. 8.	Princípy metódy real time PCR - sledovanie prírastku DNA fragmentov	16
Obr. 9.	Čítanie autorádiogramu pri sekvenovaní DNA	17
Obr. 10.	Sekvenogram	18
Obr. 11.	Microarray	20
Obr. 12.	Schéma organizácie ľudského genómu	24
Obr. 13.	Regulácia génovej expresie pomocou miRNA	25
Obr. 14.	Základné symboly genealogickej schémy	30
Obr. 15.	Normálny mužský karyotyp, chromozómy sú farbené konvenčne	33
Obr. 16.	Klasifikácia chromozómov podľa uloženia centroméry	34
Obr. 17.	Normálny ženský karyotyp – 46,XX (G-band)	35
Obr. 18.	Schéma Parížskej klasifikácie	35
Obr. 19.	Barrovo teliesko (označené šípkou)	37
Obr. 20.	F teliesko	37
Obr. 21.	Schéma vyšetrenia X a Ychromatínu	37
Obr. 22.	Typy sond pre FISH – a. Trizómia 21 (FISH – centromerická sonda); b. mnohonásobná amplifikácia c-myc onkogénu; c. chromozómy č. 8.; d. teloméry	39
Obr. 23.	Typický rodokmeň patologického znaku s autozómovo dominantným typom dedičnosti	45
Obr. 24.	Typický rodokmeň patologického znaku s autozómovo recesívnym typom dedičnosti	47
Obr. 25.	Modelový rodokmeň patologického znaku s X – viazaným dominantným typom dedičnosti	50
Obr. 26.	Modelový rodokmeň patologického znaku s X viazaným recesívnym typom dedičnosti	52
Obr. 27.	Veľké delécie u Beckerovej muskulárnej dystrofie (BMD) nemenia čítací rámec a majú pre pacienta menšie dôsledky ako malé delécie pri Duchennovej svalovej dystrofii (DMD), ktoré menia čítací rámec	53
Obr. 28.	Gaussova krivka	56
Obr. 29.	Schéma prahovej hodnoty	57
Obr. 30.	Rázštep pery a podnebia – a. Jednostranný rázštep pery vpravo; b. obojstranný rázštep pery a podnebia; c. rázštep sekundárneho podnebia	58
Obr. 31.	Schéma postupu uzatvárania sa nervovej rúry	60
Obr. 32.	Anencefalus	61
Obr. 33.	Spina bifida	61
Obr. 34.	Pes equinovarus	62
Obr. 35.	Tymínový dimér	65

Obr. 36. Schéma typov chromozómových mutácií, po pôsobení mutagénov	67
Obr. 37. Reunionkomplex	68
Obr. 38. Chromozómový zlom	68
Obr. 39. Výsledok mikrojadrového testu	71
Obr. 40. Výmeny sesterských chromatídov	71
Obr. 41. a. Leptoténne štádium; b. Zygoténne štádium; c. Pachyténne štádium d. Diploténne štádium; e. Diakinéza	73
Obr. 42. Priebeh crossing-overu	73
Obr. 43. Schéma spermiogenézy	75
Obr. 44. Prierez semenotvorným kanálikom – podľa Staneka	76
Obr. 45. Schéma Graafovho folikulu – podľa Staneka	77
Obr. 46. Schéma oogenézy	77
Obr. 47. Vek matky a riziko narodenia sa dieťaťa s nadpočetným chromozómom	78
Obr. 48. Nondisjunkcia v 1. a 2. meiotickom delení	80
Obr. 49. Frekvencia chromozómových aberácií u potratov, mŕtvonarodených (6 %) a živonarodených plodov (0,6 %)	81
Obr. 50. Karyotyp pri trizómii 21	81
Obr. 51. Karyotyp pri trizómii 13	82
Obr. 52. Karyotyp pri trizómii 18	82
Obr. 53. Vznik mozaikovej formy chromozómovej aberácie	83
Obr. 54. Turnerov syndróm prenatálne a postnatálne	83
Obr. 55. Syndróm mačacieho kriku (karyotyp)	84
Obr. 56. Schéma paracentrickej (A) a pericentrickej inverzie (B)	84
Obr. 57. Schéma prstencovitého chromozómu	85
Obr. 58. Izochromozóm	85
Obr. 59. Recipročná translokácia	85
Obr. 60. Robertsonovská translokácia	85
Obr. 61. Vyvážená translokácia 14/21	86
Obr. 62. Gametogenéza u nositeľa balansovanej translokácie 14/21	87
Obr. 63. Nevývážená translokácia 14/21	87
Obr. 64. Vyvážená translokácia 14/13	88
Obr. 65. Nevývážená translokácia 21/21	88
Obr. 66. Fotoreaktivácia	91
Obr. 67. Schéma delenia prokaryotickej bunky	95
Obr. 68. Cyklíny a cdk v bunkovom cykle	97
Obr. 69. Aktivácia cdk naviazaním cyklínu	98
Obr. 70. Dynamika cyklínov v priebehu bunkového cyklu	98
Obr. 71. Proteazóm	98
Obr. 72. Vznik a funkcia inhibičného proteínu p21	99
Obr. 73. Kľúčové otázky bunkového cyklu	100
Obr. 74. Princíp prenosu signálu na pokračovanie v BC, z povrchu cytoplazmatickej membrány do jadra	101
Obr. 75. Vnútrojadrová časť signálovej dráhy na prechod G1–S	102
Obr. 76. Vznik prereplikačného komplexu	103

Obr. 77. Začiatok a priebeh replikácie DNA	104
Obr. 78. Princíp interakcie tumorsupresorového génu a protoonkogénu	105
Obr. 79. Príklady tumorsupresorových génov	106
Obr. 80. Schéma dôsledku straty tumorsupresorového génu alebo účinnosti ním kódovanej bielkoviny	106
Obr. 81. Lokalizácia bielkovín kódovaných protoonkogénmi	109
Obr. 82. Dimerizácia receptora	110
Obr. 83. Aktivácia intracelulárnej domény receptora	110
Obr. 84. Prenos signálu do jadra	110
Obr. 85. Amplifikácia génov po delícii teloméry	112
Obr. 86. Schéma premeny protoonkogénu na onkogén	113
Obr. 87. Schéma vzniku rakoviny hrubého čreva	113
Obr. 88. a. Vznik zygoty; b. štyri blastoméry	114
Obr. 89. Antenapédia	116
Obr. 90. Bithorax	116
Obr. 91. Schéma uzavretia nervovej rúry a diferenciácie motorických neurónov	117
Obr. 92. Rodiny HOXov	118
Obr. 93. Schéma priebehu apoptózy	124
Obr. 94. Postup pri liečbe ťažkej kombinovanej imunodeficiencie génovou terapiou	128

ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1.	Pôvod a pôsobenie niektorých restriktčných enzýmov (endonukleáz)	8
Tab. 2.	Prehľad najdôležitejších výsledkov HGP	26
Tab. 3.	Aglutinogény a aglutiníny v systéme AB0	43
Tab. 4.	Fenotypy a genotypy v systéme AB0	44
Tab. 5.	Dedičnosť Rh faktoru	44
Tab. 6.	Dedičnosť Rh faktoru – Fisherova teória	44
Tab. 7.	Riziko vzniku rúžštepú pery a podnebia (CL/CP) a izolovaného rúžštepú pery (CP) pre ďalšie dieťa v %	60
Tab. 8.	Incidencia pylorostenózy u potomkov pacienta v porovnaní s incidenciou vo normálnej populácii	62
Tab. 9.	Choroby zapríčinené trinukleotidovou expanziou	65
Tab. 10.	Reparačné mechanizmy	89
Tab. 11.	Typy Xeroderma pigmentosum	93
Tab. 12.	Motívy pre väzbu primeru na teloméry, u rôznych eukaryotov	103
Tab. 13.	Prehľad amplifikácie protoonkogénov a jej dôsledkov	112
Tab. 14.	Rodiny HOXov v genóme človeka	118
Tab. 15.	Distribúcia PAXov v genóme	118
Tab. 16.	Príklady liekových teratogénov u človeka	121
Tab. 17.	Prehľad modelov používaných na testovanie v experimentálnej teratológii	122
Tab. 18.	Hlavné funkcie apoptózy	125

prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., doc. MUDr. Daniel Böhmer, PhD., MUDr. Tatiana Braxatorisová, CSc. a RNDr. Jana Malová, PhD.

LEKÁRSKA BIOLÓGIA A GENETIKA 2

Prvé vydanie

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave, 2020

Rozsah 135 strán, 9,7 AH

Vyšlo ako elektronická publikácia

Vanda Repiská [4,45 AH], Daniel Böhmer [3,1 AH], Tatiana Braxatorisová [1,80 AH], Jana Malová [0,35 AH],

ISBN 978-80-223-4929-1