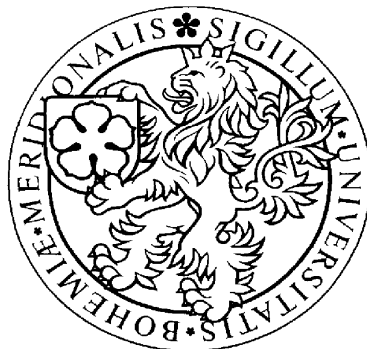


**JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Zdravotně sociální fakulta**



# RADIOBIOLOGIE BUŇKY

*doplňkové texty pro posluchače kombinované formy studia  
studijního programu „Ochrana obyvatelstva“*

*studijního oboru „Ochrana obyvatelstva se zaměřením na CBRNE“*

**doc. Dr. Friedo Zölzer, Ph.D.**

**ČESKÉ BUDĚJOVICE 2007**

Cílem předmětu je vysvětlení základních procesů v buňkách, které hrají roli pro interakce ionizující záření s buněčnými a subbuněčnými strukturami. Předmět je tedy zaměřen na potřeby studentů, kterým chybí pořádné vzdělávání v molekulární a buněčné biologii.

## 1. DEOXYRIBONUKLEOVÁ KYSELINA

DNA (Deoxyribonukleová kyselina - DNK) je nositelkou genetické informace všech organismů s výjimkou těch nebuněčných organismů, u nichž hraje tuto úlohu RNA (RNA-viry, virusoidy a viroidy). DNA je pro život nezbytnou látkou, která ve své struktuře kóduje a buňkám zadává jejich program a tím předurčuje vývoj a vlastnosti celého organismu.

U eukarotických organismů (jako rostliny a živočichové) je DNA uložena vždy uvnitř buněčného jádra zatímco u prokaryot (např bakterie) se DNA nachází volně v cytoplazmě. Genová výbava člověka obsahuje přibližně  $3,2 \times 10^9$  vazebných párů. Kdyby se měla jejich struktura popsat, jejich začátečními písmeny, vznikla by kniha s více než 500 000 stranami.

DNA je biologická makromolekula - polymer, dvoušroubovice tvořená dvěma řetězci nukleotidů v obou vláknech. Jednotlivé nukleotidy se skládají ze tří složek:

- fosfátu (vazebný zbytek kyseliny fosforečné)
- deoxyribózy (pětiuhlíkový cukr - pentóza)
- nukleové báze, (konkrétní dusíkaté heterocyklické sloučeniny).

V DNA se v různých kombinacích vyskytují čtyři nukleové báze: purinové báze jsou - adenin (A) a guanin (G) a pyrimidinové báze jsou - thymin - (T) a cytosin (C). Spojení dusíkaté báze a deoxyribózy (tedy bez fosfátu) se nazývá nukleosid.

### 1.1 Struktura DNA

Nukleotidy jsou uspořádány do řady za sebou, jejich spojení v řadě zajišťují fosfátové zbytky, které spojují uhlík 3' jedné deoxyribózy s uhlíkem 5' druhé deoxyribózy. Směr vláken se označuje právě podle orientace deoxyribózy v něm, tedy: směr  $3' \rightarrow 5'$  a opačný směr  $5' \rightarrow 3'$ .

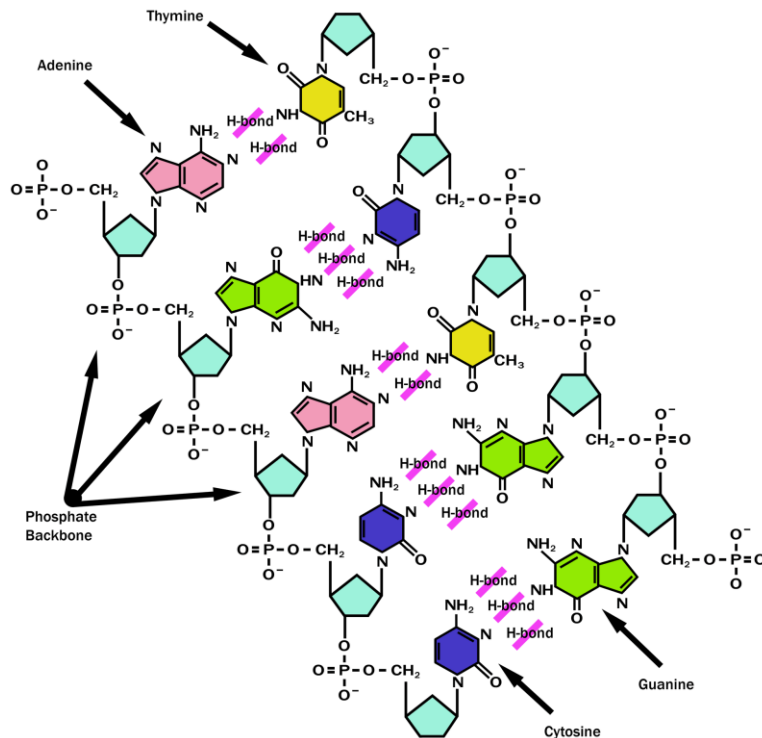
Na uhlík 1' deoxyribózy se váží dusíkaté báze (A,G,C,T). Ty se spojují navzájem s odpovídající bází z protějšího řetězce, podle jednoduchého klíče:

$A \leftrightarrow T + T \leftrightarrow A$  (vzájemně jsou spojeny dvěma vodíkovými vazbami)  
 $C \leftrightarrow G + G \leftrightarrow C$  (vzájemně jsou spojeny třemi vodíkovými vazbami)

Jde o tzv. komplementaritu bazí, z ní vychází vzájemná komplementarita obou vláken DNA. Vždy je na určité pozici v molekule jeden nukleotid z dvojice a v protějším vlákně druhý z nich.

Takto se uchovává v každém z vláken tatáž informace, pouze s tím rozdílem, že jde o vzájemný „negativ“. Vzájemné spojení nukleotidů není skutečně regulární chemickou vazbou, ale „jen“ vodíkovými můstky.

DNA se v organismu uchovává ve formě pravotočivé dvoušroubovice ve které se nacházejí dva antiparalelní řetězce 5'-3' a 3'-5', (vlákna jdou tedy proti sobě, na jednom konci molekuly se se setkává zároveň 3' konec jednoho řetězce a 5' konec druhého a na druhém konci molekuly naopak). Při sobě je drží vodíkové můstky mezi komplementárními dusíkatými bázemi. Tato struktura se narušuje, jen pokud je nutné DNA zreplikovat či použít genetickou informaci v ní ukrytou.



Genetická informace se v DNA kóduje pomocí genetického kódu, který přiřazuje k jednotlivým tripletům (trojicím nukleotidů) aminokyseliny. Genetický kód je shodný prakticky u všech organismů (drobné odchylky byly nalezeny u mitochondrií).

Jde o tzv. komplementaritu bazí, z ní vychází vzájemná komplementarita obou vláken DNA. Vždy je na určité pozici v molekule jeden nukleotid z dvojice a v protějším vlákně druhý z nich.

Takto se uchovává v každém z vláken tatáž informace, pouze s tím rozdílem, že jde o vzájemný „negativ“. Vzájemné spojení nukleotidů není uskutečněno regulární chemickou vazbou, ale „jen“ vodíkovými můstky.

DNA se v organismu uchovává ve formě pravotočivé dvoušroubovice ve které se nacházejí dva antiparalelní řetězce 5'-3' a 3'-5', (vlákna jdou tedy proti sobě, na jednom konci molekuly se se setkává zároveň 3' konec jednoho řetězce a 5' konec druhého a na druhém konci molekuly naopak). Při sobě je drží vodíkové můstky mezi komplementárními dusíkatými bázemi. Tato struktura se narušuje, jen pokud je nutné DNA zreplikovat či použít genetickou informaci v ní ukrytou.

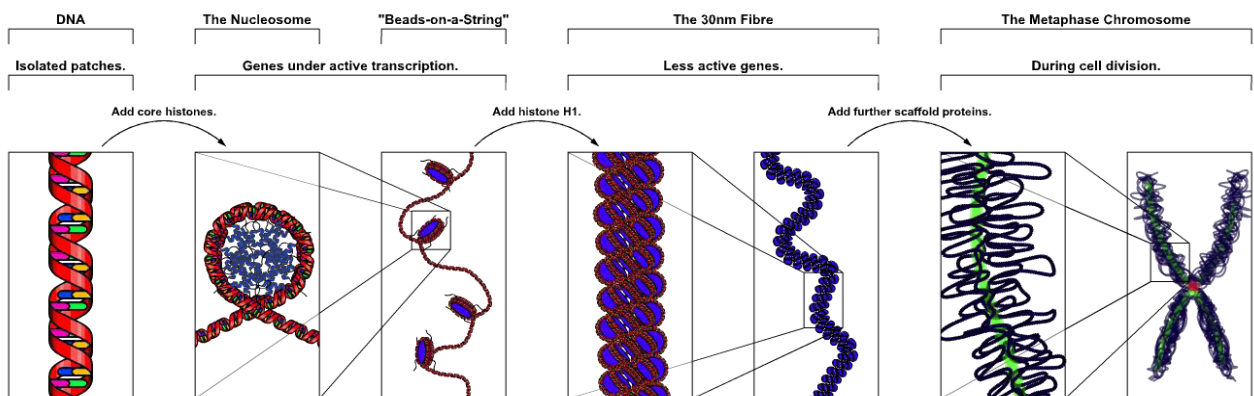
Genetická informace se v DNA kóduje pomocí genetického kódu, který přiřazuje k jednotlivým tripletům (trojicím nukleotidů) aminokyseliny. Genetický kód je shodný prakticky u všech organismů (drobné odchylky byly nalezeny u mitochondrií).

## 1.2 Vyšší úrovně struktury

Velmi dlouhá molekula DNA není jen neuspořádaným klubkem náhodně zamotaného vlákna. Celá molekula se velmi pečlivě několikanásobně navíjí a skládá. Do tzv. nadšroubovicového vinutí pozitivní - strukturu DNA utěsňuje, nebo negativní - strukturu uvolňuje, může vést až k porušení párování bazí.

Chromozóm se sestává z histonových bílkovin, které tvoří jakousi kostru, na níž se namotává molekula DNA (1,6-8,2 cm), a zároveň se podílí na různých dalších úkolech (replikace DNA, ochrana DNA, regulace replikace atd...). Tento komplex DNA a bílkovin se nazývá chromatin. V oblastech chromozómu se strukturální funkcí se ještě může vyskytovat RNA.

Struktura chromatinu má několik úrovní. Základní je nukleozóm, struktura tvořená histonovými molekulami omotanými DNA (asi 80 bp). Vyšší strukturou je solenoid, spiralizované uspořádání nukleozómů (1 závit tvoří asi 6 nukleozómů a nese 1200 bp). Solenoidy se uspořádávají do smyček, z nichž každá obsahuje okolo 50 otoček solenoidu a nese statisíce bp. 18 smyček pravidelně uspořádaných okolo základní proteinové matrice vytváří základní segment chromozómu.



## 1.3 Funkce DNA

DNA uchovává ve své struktuře genetickou výbavu celého jedince (viz totipotence buňky), nicméně jen určitá část této informace, je v konkrétní buňce realizována (viz buněčná diferenciace). Pro každou konkrétní buňku je však DNA určitou „kuchařkou“, podle níž, ikdyž specificky realizuje svůj program.

Většina genů potřebných pro život se v eukaryotických buňkách nachází – v jádře na chromozómech, částečně pak v mitochondriích a u rostlin v chloroplastech (podrobněji viz mimojaderná dědičnost).

U prokaryotických organismů se genetická informace nachází na tzv. prokaryotním chromozómu a v plazmidech.

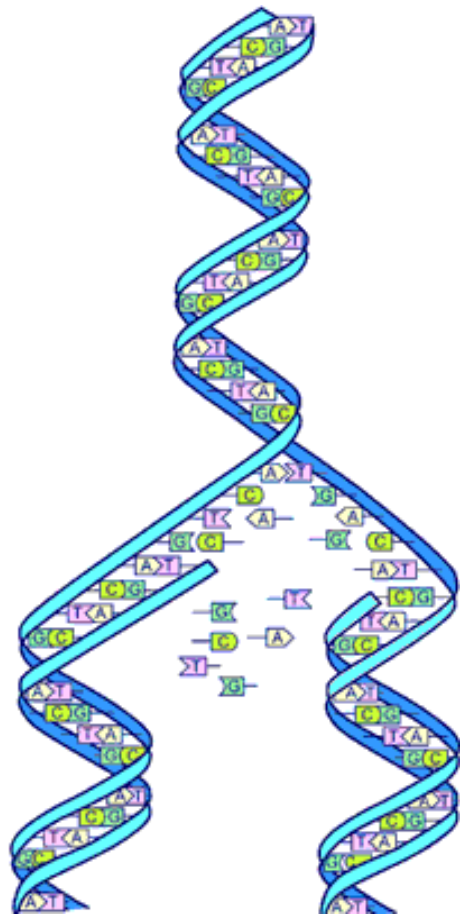
Přepis sekvence DNA do sekvence RNA se nazývá transkripce. Část molekul RNA (mRNA) pak po přesunu z jádra do cytoplazmy slouží jako šablona pro translaci, ta probíhá na ribozómech. Tímto způsobem na základě genetického kódu vznikají nové bílkoviny

## 1.4 Replikace DNA

Na to aby mohla DNA plnit svou funkci a předávat svou informaci do dceřiných buněk (a dalších generací organismu), musí být schopná zdvojení sebe sama. Toto zdvojování se nazývá semikonzervativní replikace. Jde o enzymaticky řízený proces přesného kopírování sekvence DNA na základě výše zmíněné komplementarity nukleových bazí.

Syntéza u prokaryota začíná pouze v jednom místě zvaném lokus OriC, odkud pokračuje oběma směry podél kružnicové molekuly DNA. Jelikož eukaryotické buňky mají mnohem obsáhlejší genom, proces by byl příliš pomalý a tak dochází k replikaci na mnoha místech současně. Body, v nichž replikace začíná, se nazývají iniciační nebo replikační body, úseky, náležející vždy k jednomu replikačnímu bodu se zvou replikony.

Při vlastní syntéze DNA se obě vlákna původní molekuly začínou od sebe vzdalovat a rozplétat působením enzymu helikázy podobně, jako když se rozepíná zip. Do rozevřené DNA se na obě vlákna připojí enzym RNA-polymeráza a vytvoří na každém vlákně krátký úsek RNA (tzv. primér). Na něj se pak napojuje nově vytvořená DNA. Volné nukleotidy se podle principu komplementarity (enzym DNA-polymeráza) začínou přikládat k původnímu (matricovému) vlákně DNA ( $3' \rightarrow 5'$ ), oproti druhému vlákně ( $5' \rightarrow 3'$ ) syntetizuje DNA-polymeráza jen krátké fragmenty (tzv. Okazakiho fragmenty), (DNA-polymeráza totiž umí syntetizovat pouze ve směru  $3' \rightarrow 5'$ ). Jelikož se však DNA rozplétá postupně jen z jedné strany a k syntetizaci dochází prakticky okamžitě, nezbyvá jí, než na „špatném“  $5' \rightarrow 3'$  řetězci syntetizovat po krátkých úsecích proti směru rozepínání zipu, říkáme, že replikace probíhá semidiskontinuálně (na jednom vlákně kontinuálně a na druhém diskontinuálně). Poté je odštěpen primér a Okazakiho fragmenty následně pospojuje enzym DNA-ligáza.



Tímto způsobem se z jedné původní molekuly DNA vytvoří dvě molekuly dceřiné, každá s jedním vláknem původním a s jedním vláknem nově dosyntetizovaným - proto semikonzervativní replikace. V následujícím (vlastně zároveň probíhající) procesu dělení buněk se každá z molekul začne skládat (do vyšších úrovní struktury - viz výše) do chromatinu, do chromozómů a je spolu s chromozómem pečlivě řízeným procesem oddělena do jiné dceřiné buňky.

## 2. Z DNA K PROTEINU

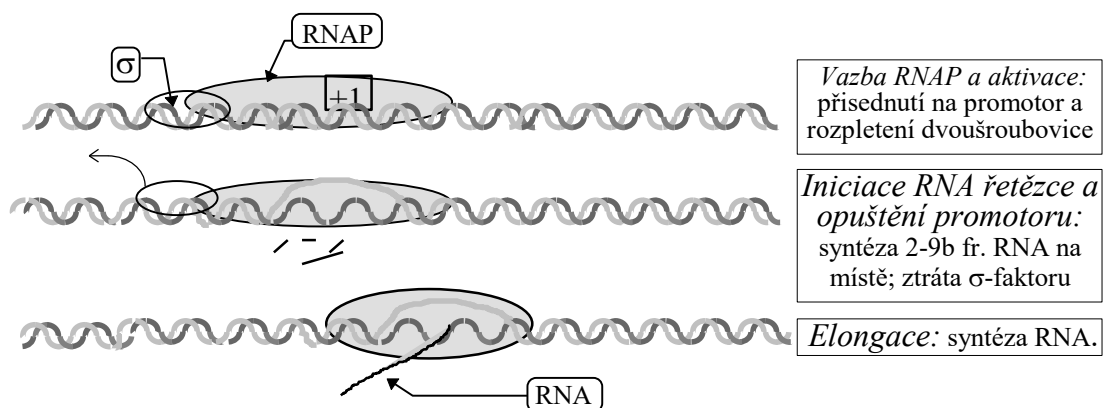
### 2.1 Transkripce a posttranskripční úpravy

Transkripcí rozumíme přepis genetické informace z DNA do mRNA. Jedná se v drtivé většině o informaci z jednoho genu, sloužící k tvorbě 1 specifické bílkoviny, kterou buňka zrovna potřebuje. Poté, co je informace přepsána, je díky mRNA přenesena na proteosyntetický aparát, kde se podle opsaného pořadí zahájí proteosyntéza.

#### 2.1.1 Iniclace a přepis

Transkripce je opět enzymatický proces, tentokrát je jako enzym využívána DNA dependentní RNA-polymeráza (U eukaryot rozeznáváme typ I, II a III). Prozkoumávání řetězce má opět směr od konce 5' ke konci 3'. Rna-polymeráza hledá v DNA startovní sekvenci nukleotidů, tzv. promotor (jde o některé specifické sekvence nukleotidů, umístěných v řetězci několik desítek bází před začátkem transkripce - např. TATA [sekvence opakujících se A a T] box nebo CAT [CCAAT] box). Ke správnému navázání polymerázy je nutná přítomnost transkripčních faktorů, které jakožto další makromolekuly, vytvoří s polymerázou trojrozměrný komplex, který pak zajistí správné nasazení polymerázy na sekvenci, od které má být zahájena transkripce.

Ačkoli je molekula DNA dvouřetězcová, je promotor asymetrický, z čehož plyne, že dochází vždy k přepisu jen z jednoho vlákna (tzv. vlákno pracovní, negativní či antikódující), zatímco druhé vlákno pro transkripci tohoto genu význam nemá (tzv. vlákno paměťové, kódující či pozitivní). Druhé vlákno má samozřejmě zase smysl při transkripci jiných genů. Po rozpoznání promotoru a rozpojování vodíkových můstků se podle komplementarity bází k pracovnímu vláknu DNA nasyntetizuje RNA vlákno (pozor: místo T je U). Jakmile polymeráza narazí na stop sekvenci v řetězci (terminátor - specifická sekvence DNA), dojde k zastavení přepisu a uvolněná RNA může putovat dále.



**Obr. 2.1:** Schema prvních tří kroků transkripce

#### 2.1.2 Regulace transkripce

Ačkoli mají buňky vícebuněčného organismu stejnou genetickou informaci - dochází ke tvorbě určitých specifických proteinů pouze v některých tkáních. Tvorba těchto produktů tedy musí být "zapnuta" pouze někde. Pro regulaci tvorby určitých produktů byl vyvinut

mechanismus regulace exprese. Tato regulace může být na úrovni transkripce, translace i sestřihových úprav.

Co se týče regulace transkripce u eukaryot - je ovlivněna dvěma typy molekul, které se váží na specifické úseky DNA (často několik tisíc bází před regulovaným genem) a podílí se svojí strukturou na vzniku transkripčního komplexu s RNA polymerázou (nebo naopak znemožňují jeho vznik). Podle funkce dělíme tyto faktory na enchancery (podporují transkripci) a silencery (utlumují transkripci).

### 2.1.3 Posttranskripční úpravy

U bakterií a prokaryot obecně k žádným posttranskripčním úpravám mRNA nedochází. Zato u eukaryotních buněk je situace značně složitější. Primární transkript prochází tzv. sestřihem, kdy jsou z něj odstraněny nekódující sekvence. Lasovitým stáčením primárního transkriptu dochází k odstrižení intronů (části řetězce nekódující žádné aminokyseliny) Kódující úseky (exony) jsou pak pospojovány do finálního řetězce. Opět se zde uplatňují specifické sekvence, které označují hranice mezi introny a exony. Odstrižené introny jsou ihned odbourávány. Primární transkript je na 5' konci vybaven tzv. čepičkou vytvořenou zvláštním nukleotidem (7-methylguanidin, připojený třemi zbytky kyseliny fosforečné) a na opačném 3' konci je vybaven tzv. polyadenilovým koncem (několik set adeninových zbytků).

<http://genetika.wz.cz/transk.htm>

## 2.2 Translace a proteosyntéza

Translace je vlastně přenos genetického kódu mRNA do pořadí aminokyselin v polypeptidovém vlákně. K proteosyntéze (tj. biosyntéze bílkovin) dochází na ribozómech (stavba eukaryotního ribozomu - viz ribozomy). Kromě mRNA vzniklých transkripcí jsou zapotřebí i tRNA z cytoplazmy. Základní popis platí pro eukaryotní buňky, zvláštnosti prokaryot a virů jsou probrány v příslušných kapitolách.

### 2.2.1 Genetický kód

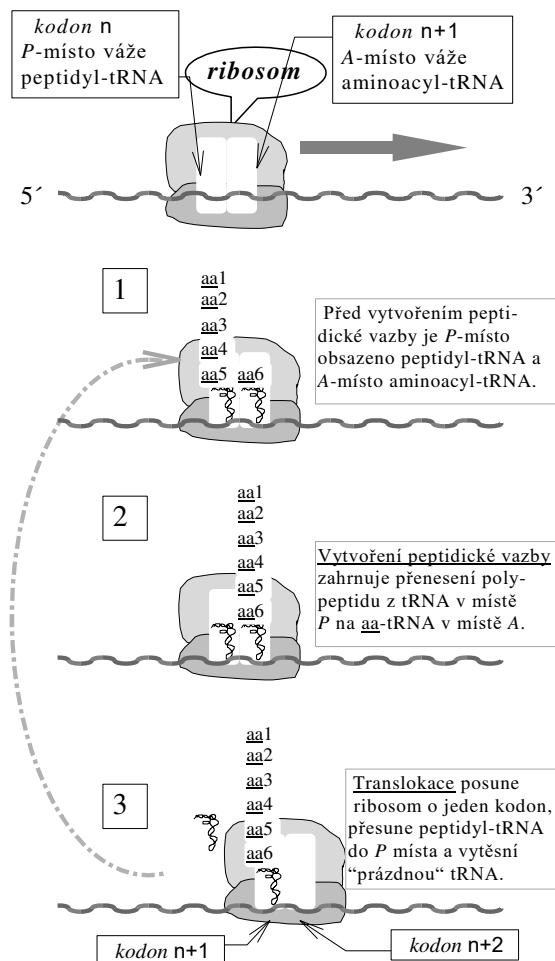
Po řadě pokusů bylo dokázáno, že genetický kód je tripletový, to znamená, že každá trojice bází kóduje jednu aminokyselinu. Tyto trojice na mRNA se nazývají kodony. Celkem jsou 4 báze, takže pro kombinaci máme celkem  $4 \times 4 \times 4 = 64$  možností. Důležitý je triplet AUG, neboť jde o triplet iniciační (zároveň kóduje methionin) a triplet UAA, UAG a UGA, které jsou označovány jako tripletety terminační, neboli beze smyslu. Genetický kód je degenerovaný, protože pro asi 20 aminokyselin existuje mnohem více kódujících kodonů, z toho plyne, že některé aminokyseliny jsou kódovány více tripletety. Na druhou stranu tento genetický kód je platný pro všechny organismy na Zemi (existují ale i výjimky - např. u genetického kódu lidských mitochondrií). Tato degenerace má své výhody - například pokud dojde k bodové mutaci (substituci) na třetí pozici kodonu - je ve většině případů zařazena stejná aminokyselina.

### 2.2.2 Proteosyntéza

Proteosyntéza je zahájena iniciační tRNA, to jest tou, která nese methionin. Ta se naváže na malou ribozomální podjednotku a začne pomalu projíždět molekulou mRNA od 5' konce. Jakmile objeví iniciační sekvenci AUG - naváže se a translace začíná. Na další sekvence

(kodony) nasedají další tRNA podle komplementarity bází (systém kodon na mRNA - antikodon na tRNA). Mezi přinesenými aminokyselinami vznikají peptidové vazby. Za tuto část translace - elongaci - je zodpovědná zejména velká ribozomální podjednotka. Jakmile zbývá již jen kodon bez smyslu (terminační) je proteosyntéza ukončena a vzniklé polypeptidové vlákno může být dále v buňce upravováno na požadovanou bílkovinu.

Drsné endoplazmatické retikulum (s ribozomy) je specializováno pro tvorbu transmembránových proteinů (různé iontové kanály či receptory) nebo proteinů určených "k zabalení", které se zabudují do vnitřku membrán (sekreční granula, lysosomy). Naopak volné ribozomy se podílejí především na tvorbě cytoplazmatických proteinů (enzymy, atd.).



Obr. 3.2: Základní schema translace

### 2.2.3 Posttranslační úpravy

Vzniklé polypeptidové vlákno je v buňce samozřejmě dále upravováno, ať již v endoplazmatickém retikulu nebo v Golgiho systému. V endoplazmatickém retikulu je to již výše zmíněné zabudování nebo "balení" do membrán a zahájení procesu glykosylace. Velké množství proteinů není ve své finální podobě čistými proteiny, ale tzv. glykoproteiny, což jsou proteiny s navázanými řetězci oligosacharidů (vícečetných cukrů). To je velmi důležité pro finální 3D strukturu výsledného produktu. V Golgiho aparátu je proces glykosylace jemnějšími prostředky dokončen. Velké množství produktů proteinové povahy nemá biologickou aktivitu, dokud z něj nejsou odštěpeny určité části řetězce. To se může dít extra- i intracelulárně. Příkladem budiž některé trávicí enzymy, které jsou buňkami produkovány v neaktivní formě a jsou aktivovány až v patričné části trávicího traktu, kde již jejich účinek neohrožuje okolní tkáň.

<http://kgn.umbr.cas.cz/prednasky>

### 2.2.4 Tabulka genetického kódu

Tabulka určuje druh aminokyseliny, který je při proteosyntéze přinesen pomocí tRNA na ribozóm. Určující je pořadí nukleotidů v tripletu na mRNA, každému odpovídá nějaká aminokyselina. Některé aminokyseliny jsou kódovány více než jednou možností. Speciální význam mají triplety AUG, který zahajuje proteosyntézu a triplety UAA, UAG a UGA, které ji ukončují.



	U		C		A		G	
<b>U</b>	UUU	fenylalanin	UCU	serin	UAU	tyrosin	UGU	cystein
	UUC	fenylalanin	UCC	serin	UAC	tyrosin	UGC	cystein
	UUA	leucin	UCA	serin	UAA	<b>stop</b>	UGA	<b>stop</b>
	UUG	leucin	UCG	serin	UAG	<b>stop</b>	UGG	tryptofan
<b>C</b>	CUU	leucin	CCU	prolin	CAU	histidin	CGU	arginin
	CUC	leucin	CCC	prolin	CAC	histidin	CGC	arginin
	CUA	leucin	CCA	prolin	CAA	glutamin	CGA	arginin
	CUG	leucin	CCG	prolin	CAG	glutamin	CGG	arginin
<b>A</b>	AUU	izoleucin	ACU	treonin	AAU	asparagin	AGU	serin
	AUC	izoleucin	ACC	treonin	AAC	asparagin	AGC	serin
	AUA	izoleucin	ACA	treonin	AAA	lysin	AGA	arginin
	AUG	<b>metionin</b>	ACG	treonin	AAG	lysin	AGG	arginin
<b>G</b>	GUU	valin	GCU	alanin	GAU	kys.	GGU	glycin
	GUC	valin	GCC	alanin	GAC	asparagová	GGC	glycin
	GUA	valin	GCA	alanin	GAA	kys.	GGA	glycin
	GUG	valin	GCG	alanin	GAG	glutamová	GGG	glycin

<http://genetika.wz.cz/transl.htm>

### 2.3 Mutace

Mutace jsou změny v genotypu organismu oproti normálu. Velká většina mutací je naprosto náhodných, cílená mutagenese se používá téměř výhradně pro vědecké účely. Mutace vzniklé třeba díky chybě při replikaci DNA se nazývají mutace spontánní (dochází k nim bez zásahu z vnějšího prostředí). Jak jsme si již ale řekli v kapitole o transkripci, DNA polymeráza je velmi přesná, navíc má samoopravnou funkci. Pravděpodobnost jedné takovéto chyby se pohybuje v řádech asi  $10^{-7}$ . Četnost těchto mutací je tedy velice nízká, navíc buňky jsou do jisté míry schopné tyto chyby díky reparačním enzymům likvidovat. Většina mutací je tedy tzv. indukovaných, tj. vyvolaných vnějšími mutagenními faktory (mutageny - viz níže).

Z hlediska klinické genetiky, jsou to právě mutace, které způsobují genetické choroby nebo nádorové bujení. Ovšem vzhledem k tomu, že jen malá část lidského genomu (asi 1,5%) skutečně kóduje proteiny, dochází k většině mutací v nekódujících oblastech. I zde však mohou mutace působit negativně, pokud změní sekvenci promotoru, regulační oblasti transkripce nebo signální sekvenci pro sestřih pre-mRNA. Závažnější projev mají mutace v kódujících oblastech (viz dále - genové mutace).

Z pohledu evoluce jsou mutace velmi užitečné. Dříve byly dokonce považovány za hybnou sílu evoluce, dnes jim již tak obrovský význam přiznáván není. Mutace mohou být z evolučního hlediska nevýhodné (takové se neudrží), neutrální nebo výhodné. Největší šanci udržet se a následně zasáhnout do evoluce mají mutace výhodné, ani ty se však nemusí udržet a mohou být z genofondu vyeliminovány.

### 2.3.1 Mutace genové

Probíhají na úrovni vlákna DNA. V následujícím přehledu budeme uvažovat, že k mutaci došlo v kódujícím úseku DNA, abychom mohli lépe demonstrovat možné vlivy této mutace na proteosyntézu.

Z hlediska vlivu na proteosyntézu rozlišujeme:

Mutace neměníci smysl (samesense, silent mutation), které těží z degenerace genetického kódu (viz kapitola translace), kdy je i přes mutaci zařazena stejná aminokyselina. Jsou způsobeny substitucemi na třetí pozici kodonu.

Mutace měnící smysl (missense mutation), které mění smysl polypeptidového vlákna. Jsou způsobeny zejména takovými substitucemi, které způsobí zařazení odlišné aminokyseliny při proteosyntéze.

Nesmyslné mutace (nonsense mutation), které zapříčiní vznik předčasného terminačního kodonu v sekvenci DNA. Syntéza takového polypeptidu pak není dokončena a výsledkem je zcela nefunkční protein. Tyto mutace jsou způsobeny delecí nebo inzercí určitého množství bází, pokud nejde o  $3n$  násobek.

Mechanismy genových mutací jsou:

Adice (inzerce) - Zařazení jednoho nebo více nadbytečných nukleotidových párů. Pokud je zařazen takový počet nukleotidů, který není celočíselným násobkem 3 ( $3n$ ), potom dojde k posunu čtecího rámce (tzv. frameshift mutation) a následně k syntetizování zcela odlišného polypeptidu nebo dokonce k předčasnému ukončení proteosyntézy vznikem terminačního kodonu. Zařazení  $3n$  nukleotidů prodlužuje polypeptidový řetězec o  $n$  aminokyselin podle inzertované sekvence.

Delece - Jde o ztrátu jednoho nebo více nukleotidů původní sekvence. Účinek je podobný jako u adicí, pouze místo prodloužení polypeptidového řetězce dochází ke zkracování.

Substituce - Substituce je náhrada báze původní sekvence bází jinou. Pokud jde o záměnu purinové báze za purinovou bázi, nebo o záměnu pyrimidinové báze za pyrimidinovou bázi - pak je tato substituce označena jako transice. Záměna purinové báze za bázi pyrimidinovou nebo naopak se označuje jako transverse. Následky substituce mohou být různé, podle toho, na které pozici kodonu k substituci došlo.

### 2.3.2 Mutace chromosomové

Dochází při nich ke změně struktury nebo počtu chromosomů. Obecně se označují jako chromosomové aberace.

Strukturní změny chromosomů vznikají jako následek chromosomální nestability (zlomů), způsobené nadměrnou expozicí jedince mutagenům, nebo zhoršenou funkcí reparačních mechanismů. Následky těchto odchylek závisí na tom, zda je i po strukturní přestavbě zachováno normální množství genetické informace. Pokud ne, potom dochází k fenotypovým projevům, které se odvíjejí od toho, která část genomu chybí nebo je strukturně poškozena, či naopak přebývá.

Duplikace - Z násobení úseku chromosomu. Může být způsobeno nerovnoměrným crossing-overem, jehož následkem dojde na jednom chromosomu k duplikaci sledovaného úseku, zatímco na druhém je tentýž úsek deletován (viz níže).

Delece - Část chromosomu chybí. Deletován může být konec raménka (potom jde o terminální delecii) nebo střední část některého z ramének chromosomu (intersticiální delecii). Delece vznikají jako následek chromosomální nestability nebo nerovnoměrného crossing-overu (viz výše).

Inverse - Při inversi dochází vlivem chromosomové nestability k vyštěpení části chromosomu, jejímu převrácení a následnému napojení. Například následkem inverse na chromosomu s původní sekvencí A-B-C-D-E-F-G-H by byla sekvence A-B-F-E-D-C-G-H (pokud je na invertované části chromosomu centromera, potom je inverse označována jako pericentrická; pokud na invertovaném úseku centromera není - jde o inversi paracentrickou).

Translokace - Při translokaci je část chromosomu vyštěpena z původního chromosomu a připojena k jinému chromosomu. Translokace mohou být balancované (kdy je zachováno stejné množství genetické informace v buňce) nebo nebalancované (kdy původní množství není dodrženo).

Reciproké translokace jsou vzájemné translokace mezi dvěma nehomologními chromosomy. Chromosomy si vymění nehomologní úseky, počet chromosomů však zůstane stejný.

Robertsonské translokace jsou zvláštní případy translokace, kdy dochází k fúzi dvou akrocentrických chromosomů (po ztrátě satelitů) - např. 14, 21. Jedinec s takovou balancovanou translokací má o chromosom méně, ale původní množství genetické informace - proto většinou nemá žádné fenotypové projevy. Současně má však velmi velké riziko, že jeho děti budou postiženy nebalancovanými chromosomálními aberacemi.

Fragmentace - Fragmentace je krajní případ chromosomové aberace, kdy vlivem silných mutagenů a vysoké chromosomální nestability dojde k rozpadu chromosomu na fragmenty. Buňka s takovýmto chromosomem se nemůže dále mitoticky dělit a může u ní být navozena apoptóza.

Ring chromosom - Pokud dojde u chromosomu k delecii konců obou ramének (telomer), může se tento chromosom stočit, koncové části se spojí a vznikne "kolečko" - tedy kruhový chromosom (ring chromosom).

Numerické změny chromosomů jsou způsobeny poruchou rozestupu chromosomů (nondisjunkcí) při dělení buňky. Standardně je každý chromosom v eukaryotické buňce přítomen ve dvou kopiích - základním stavem je tedy disomie. Odchyly od tohoto stavu se nazývají aneuploidie. Pokud není přítomen žádný chromosom z páru - nazývá se tento stav nuliosomie, pokud je přítomen pouze jeden chromosom potom monosomie, pokud je chromosom přítomen ve třech kopiích pak trisomie atd.

Pokud k nondisjunkci dojde při meiotickém dělení (při I. nebo II. meiotickém dělení) během vzniku pohlavních buněk (nondisjunkce na germinální úrovni), potom bude mít zygota k

jejímuž vzniku přispěla tato aberovaná gameta nestandardní počet chromosomů a tím pádem každá buňka jedince, který z této zygoty vznikne (tedy pokud vůbec bude vývoj dále pokračovat...), bude mít aberovaný karyotyp. Pokud k dojde k nondisjunkci až během mitózy - vzniká chromosomová mozaika - viz níže.

### 2.3.3 Mutace genomové

Dochází ke změně samotného genomu, většinou jde o znásobení celé chromosomové sady. Takovýto stav se nazývá polyploidie, jedinec je  $3n$  - triploidní,  $4n$  - tetraploidní nebo i více. Tento stav je relativně běžný u některých rostlin, u člověka (a vyšších živočichů obecně) není sluchitelný se životem. Běžně polyploidní jsou ty buňky, které mají více jader (syncytia - např. svalové vlákno) nebo u buněk, kde je velmi vysoká metabolická aktivita, která vyžaduje velkou transkripční aktivitu - příkladem mohou být jaterní buňky - hepatocyty. Druhým extrémem pak mohou být červené krvinky - erytrocyty, které jako terminální buňky nemají jádro a postrádají tak jadernou genetickou informaci (tento stav by se mohl nazývat nuliploidie).

Mozaicismus - Nondisjunkce (neoddělení) chromosomů může nastat i během mitózy ve vyvíjejícím se organismu (na somatické úrovni). Takový jedinec je potom tvořen několika (2, případně ale i více) liniemi buněk, z nichž každá linie vykazuje jiný karyotyp. U takového jedince se potom může manifestovat příslušný klinický syndrom (známé jsou mozaiky Downova a Turnerova syndromu), projev však může být velmi variabilní a závisí na tom, kolik a jakých buněk nese aberovaný karyotyp.

Chimerismus - Zvláštním případem je chimerismus, kdy je jedinec tvořen dvěma liniemi buněk, které vznikly ze dvou různých zygot, které následně splynuly v jednoho jedince. Příkladem mohou být některé druhy srostlých dvojčat, nebo vlastně i jedinec s transplantovaným orgánem.

Dynamické mutace - Dynamické mutace jsou spojené s expanzí repetitivních sekvencí. Bylo zjištěno, že u některých chorob (Huntingtonova chorea, syndrom fragilního X chromosomu, Fanconioho anémie) nalzáme oproti normálu zvýšený počet trinukleotidových repetic na specifickém úseku genomu. Vinou nepřesností při replikaci tohoto úseku, může docházet ke zvyšování počtu trinukleotidových (existují i dinukleotidové a jiné repetice) repetic. Pokud nepřesáhne počet repetic kritické číslo (k rozvoji choroby), ale je oproti normálu zvýšen, označuje se tento stav jako premutace. Jakmile je tento kritický počet dosažen či překročen, dojde k plné mutaci a u jedince se manifestuje příslušná choroba.

## 2.4 Mutageny

Mutageny jsou látky, které jsou schopny způsobovat mutace. Z klinického hlediska jde o nežádoucí produkty vnějšího prostředí, které mohou poškodit genetickou informaci člověka. U dospělého člověka mohou některé mutageny působit jako kancerogeny a způsobit tak zhoubné bujení (rakovinu). Pokud mutageny způsobí mutace pohlavních buněk, bude potomek rodičů postižen příslušnou dědičnou chorobou či chromosomovou aberací. Zároveň některé mutageny mohou mít účinkovat i jako teratogeny (viz genetické poradenství) a způsobit tak poruchy prenatálního vývoje jedince.

Mutace můžeme i uměle indukovat, což se využívá k pokusům na modelových organismech, zejména pro studium exprese genů. Experimentálně se testují i potenciaální mutagenní účinky nových chemických látek.

Mutageny dělíme na:

#### Fyzikální

UV záření - zdrojem je Slunce, nebezpečné je zejména vzhledem ke slábnoucí ozonové vrstvě  
Ionizující záření - radioaktivní nebo RTG záření. Může způsobovat chromosomové zlomy

#### Chemické

Aromatické uhlovodíky - v tabákovém kouři a produktech spalování vůbec

Barviva - např. akridinová barviva

Některé dříve běžně užívané látky - např. součásti plastů (PCB), hnojiv, herbicidů, insekticidů (DDT) nebo i léčiv

Bojové látky - např. yperit

#### Biologické

Viry - některé viry (retroviry) se mohou inkorporovat do genetické informace infikované buňky, čímž mohou porušit sekvenci některého strukturního genu, nebo jeho regulační oblasti, promotor aj.

Mobilní genomové sekvence - Transposony a retrotransposony - mohou působit stejným mechanismem jako retroviry - tj. inzercí na "nesprávné" místo.

<http://genetika.wz.cz/mutace.htm>

### 3. STRUKTURA PROTEINŮ

Proteiny se skládají z jednoho či více polypeptidových řetězců, což jsou lineární polymery aminokyselinových zbytků. Prostorovou strukturu proteinů můžeme rozdělit do několika úrovní: primární, sekundární, terciární (super-sekundární a doménová) a kvartérní.

Primární struktura: je dána chemickou povahou polypeptidového řetězce proteinu, tzn. počtem a pořadím aminokyselinových zbytků spojených navzájem peptidovou vazbou.

Sekundární struktura: Sbalení polypeptidového řetězce v důsledku vytváření vodíkových vazeb mezi karbonylovými a imidovými skupinami hlavního řetězce proteinu.

Terciární struktura: Prostorové uspořádání všech atomů v jednom polypeptidovém řetězci. Dále se dělí na supersekundární strukturu což je spojení několika málo elementů sekundární struktury skrze interakce postraních řetězců; a domény což jsou shluky strukturních motivů.

Kvartérní struktura: Agregace jednotlivých polypeptidových řetězců při vytváření funkčního proteinu.

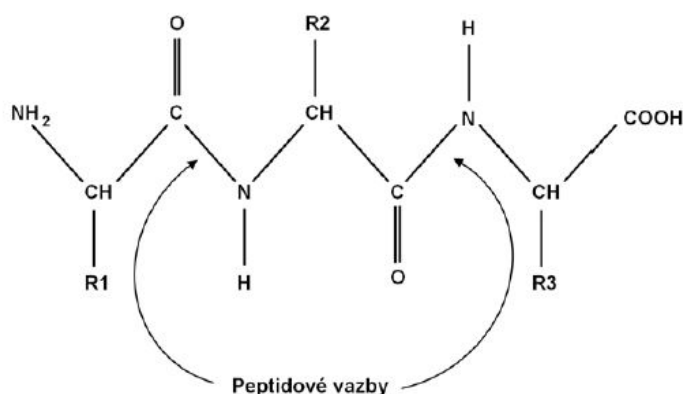
### 3.1 Primární struktura

V proteinech se přirozeně vyskytuje 20 různých aminokyselin. Pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci představuje tzv. primární strukturu proteinu. Tato primární struktura obsahuje veškerou informaci nutnou pro vytvoření 3D struktury.

Aminokyseliny rozdělíme podle jejich fyzikálně-chemických vlastností do několika skupin:

- Alifatické: alanin (Ala, A), glycin (Gly, G), isoleucin (Ile, I), leucin (Leu, L), prolin (Pro, P), valin (Val, V)
- Aromatické: fenylalanin (Phe, F), tryptofan (Trp, W), tyrosin (Tyr, Y)
- Kyselé: kyselina asparagová (Asp, D), kyselina glutamová (Glu, E)
- Zásadité: arginin (Arg, R), histidin (His, H), lysin (Lys, K)
- Obsahující hydroxylovou skupinu: serin (Ser, S), threonin (Thr, T)
- Obsahující síru: cystein (Cys, C), methionin (Met, M)
- Amidické: asparagin (Asn, N), glutamin (Gln, Q)

Dvě aminokyseliny spolu mohou reagovat za vzniku větší molekuly (dipeptidu) a uvolnění molekuly vody jako vedlejšího produktu. Vazba C-N, která se vytvořila mezi dvěma aminokyselinami se nazývá peptidová vazba. Termín „peptidová vazba“ značí přítomnost peptidové skupiny  $-\text{CONH}-$ .



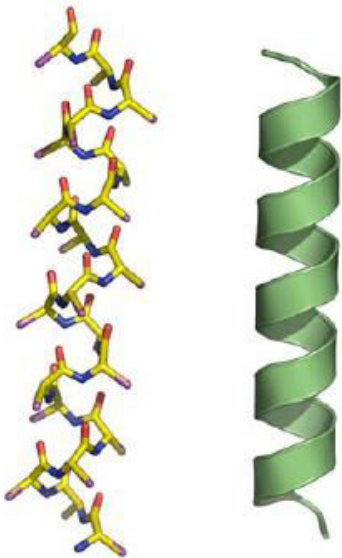
Lineární polypeptidový řetězec se „sbaluje“ do určitého 3D uspořádání (struktury). Proteiny, které „rozbalíme“ in vitro se za vhodných podmínek mohou opět sbalit do své původní 3D struktury. Zdá se tedy, že všechny informace o tom jak má 3D struktura vypadat jsou obsaženy v primární struktuře. Proteiny se proto mohou sbalovat zcela samostatně (existují však výjimky - některé proteiny pro své sbalení in vivo potřebují pomoc dalších molekul tzv. molekulových chaperonů).

### 3.2 Sekundární struktura

Sekundární strukturou označujeme lokální sbalení polypeptidového řetězce v důsledku vytváření vodíkových vazeb mezi karbonylovými a iminodovými skupinami hlavního řetězce proteinu. V proteinech se běžně vyskytují tři typy sekundární struktury: alfa helixy, beta listy a ohyby. Uspořádání, která nemohou být klasifikována ani jedním z těchto tří základních typů sekundární struktury se označují jako tzv. struktury náhodného klubka.

### 3.2.1 Helixy

V helikálním uspořádání je prostorový vztah mezi dvěma po sobě jdoucími peptidovými jednotkami stejný pro všechny C $\alpha$  atomy. To znamená, že dvojice dihedrálních úhlů phi a psi je stejná pro všechny aminokyselinové zbytky v helixu. Helixy jsou klasifikovány jako repetitivní sekundární struktura, protože dihedrální úhly hlavního řetězce se neustále opakují (pro ideální pravotočivý alfa helix je phi = -57,8 a psi = -47 stupňů). Nejčastější helikální konformace je alfa helix (viz. obrázek č. 4). Průměrná délka alfa helixu je 10 zbytků a průměrné dihedrální úhly jsou phi =  $-64 \pm 7$  a psi =  $-41 \pm 7$  stupně.



### 3.2.2 Skládání list

Struktura skládaného listu (beta struktura) je také druh repetitivní sekundární struktury. Základním stavebním kamenem beta listu je beta vlákno s dihedrálními úhly přibližně phi = -120 a psi = +120 stupňů. Jedná se o nataženou strukturu, která není stabilizována vnitřními vodíkovými vazbami. Tato struktura je stabilní pouze jako součást beta listu, který je stabilizován vodíkovými vazbami a van der Waalsovými interakcemi mezi sousedními vlákny. Beta listy nalzáme ve dvou formách antiparalelní a paralelní podle relativní orientace jednotlivých vláken.

## 3.3 Terciární struktura

Historická definice terciární struktury ji definuje jako popis prostorového uspořádání elementů sekundární struktury v rámci jednoho polypeptidového řetězce. I když je tato definice stále platná, byly definovány detailnější úrovně terciární struktury. Byl zaveden termín supersekundární struktura, protože bylo zjištěno, že určitá uspořádání po sobě jdoucích elementů sekundární struktury (alfa helixů a beta vláken) jsou přítomna v řadě různých proteinových struktur i se zcela různými sekvencemi. Mezi klasické příklady supersekundární struktury patří např. alfa-alfa motiv (dva protiběžné alfa helixy spojené smyčkou, která mění směr polypeptidového řetězce o 180 stupňů), beta-beta motiv (dvě protiběžná beta vlákna spojená smyčkou), beta-alfa-beta motiv (dvě rovnoběžná beta vlákna oddělená alfa helixem, který je vůči nim kolmý). Motivy supersekundární struktury opět mohou vytvářet kombinace, které se opakovaně vyskytují ve struktuře různých proteinů. Tyto uspořádání nazýváme domény (nebo také tzv. sbalení). Příkladem může být svazek čtyř helixů skládající se ze dvou

alfa-alfa motivů spojených smyčkou, nebo tzv. Rossmanovo sbalení což jsou dva beta-alfa-beta motivy, které sdílejí alfa helix. Domény mohou být také chápány jako navzájem propojené více či méně strukturně a funkčně nezávislé jednotky. Každá z domén může být popsána podle typu sbalení. Zatímco některé proteiny se skládají pouze z jedné domény, jiné mohou obsahovat několik domén. Terciární struktura tedy popisuje strukturu vzniklou spojením domén (vše v rámci jednoho polypeptidového řetězce)

### 3.4 Kvartérní struktura

Některé proteiny, např. myoglobin, se skládají pouze z jednoho polypeptidového řetězce. U jiných proteinů biologicky funkční jednotku představuje agregát několika kopií stejného řetězce. Např. kvartérní struktura hemoglobinu se skládá ze čtyř řetězců. Existují i proteiny obsahující jednu či více kopií různých řetězců.

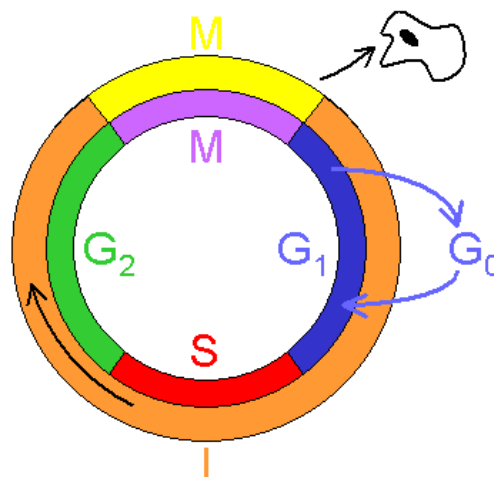
<http://www.otvarena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/28obsil.pdf>

## 4. BUNĚČNÝ CYKLUS

### 4.1 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je cyklus kterým prochází buňka mezi svými děleními. Doba trvání cyklu se nazývá generační doba. Buněčný cyklus se skládá z několika fází přípravných (souborně nazývaných jako interfáze - tj. období mezi dvěma následnými mitózami) a vlastního buněčného dělení. Časy zde uvedené jsou pouze orientační a liší se druh od druhu a i buňku od buňky (tyto odpovídají dělicí se lidské buňce).

Regulaci buněčného cyklu má na starosti velké množství látek enzymové i neenzymové povahy (Cykliny a CDK proteinkinázy). Obecně existují faktory, které dělení buňky urychlují, a faktory, které naopak dělení buňky zpomalují, či zcela zastavují. Ve složitém mnohobuněčném organismu (jakým je například člověk) je přísná regulace buněčného dělení zcela nezbytná, neboť jen tak lze dosáhnout harmonické funkčnosti organismu, kde se dělí pouze ty buňky, u kterých je to momentálně potřeba.





G<sub>0</sub> fáze - Buňka již dále nedělí, zastavení buněčného cyklu. Setkáváme se u diferencovaných buněk. Její nástup je ovlivněn kontrolním uzlem, umístěným na počátku G<sub>1</sub> fáze. Pokud se již buňka nemá dále dělit, vstoupí do G<sub>0</sub> (nula) fáze, místo do G<sub>1</sub> fáze. Plně diferencované buňky (např. neurony) se dále již nedělí. Naopak některé jiné buňky (např. jaterní buňky - hepatocyty) jsou schopny v případě potřeby přejít z G<sub>0</sub> fáze do G<sub>1</sub> fáze a začít se opět dělit.

G<sub>1</sub> fáze - Nazývána též postmitotická. Období růstu buňky, přípravná fáze na další dělení. Dochází zde ke kontrole a opravám DNA, před její budoucí replikací v následující fázi. Trvá asi 10 - 12 hodin.

S fáze - DNA se replikuje na dvojnásobné množství. Každý chromosom je od této doby zdvojený, tvořený párem sesterských chromatid. Trvá asi 6 - 8 hodin.

G<sub>2</sub> fáze - Zdvojování organel, tvorba struktur potřebných pro dělení buňky. Trvá asi 2 - 4 hodiny.

M fáze - Skládá se z jaderného dělení (mitózy) a vlastní cytokineze - viz níže. Trvá asi 1 - 2 hodiny.

## 4.2 Dělení buňky

Dělení buňky se skládá ze 2 fází: Karyokineze (jaderné dělení) a cytokineze (dělení celé buňky).

**Mitóza** je nejčastější typ jaderného dělení (**karyokineze**). Má 4 fáze:

Profáze - Rozpuštění jaderné membrány a jadérek, vznikají 2 centrioly -> vzniká dělicí vřeténko (mikrofilamenta, mikrotubuly), z chromatinu a jadérek vznikají pentlicovité chromosomy. (Touto dobou je již dávno po S fázi a veškerý genetický materiál je tudíž znásobený. chromosomy jsou zdvojené, jsou ale stále spojeny v centroměře, než budou v anafázi roztrženy).

Metafáze - Chromosomy se seřazují do rovníkové (ekvatoriální) roviny. Dělicí vřeténko se navazuje na centromery chromosomů. Chromosomy zůstávají spojeny jen v centromerách.

Anafáze - Roztržení chromosomů v centromerách zkrácováním mikrotubulů dělicího vřeténka. Chromosomy putují k pólům buňky.

Telofáze - Zánik dělicího vřeténka, despiralizace chromozómů, vzniká jaderná membrána a jadérka, počátek cytokineze.

Následuje samotná **cytokineze**. Při cytokynezi vzniká přepážka mezi dceřinými buňkami trojím způsobem:

- Pučením typické pro některé prvoky, kvasinky. Na mateřské buňce se vytvoří pupen (nestejně množství cytoplazmy), který se oddělí a teprve později doroste.

- Rýhováním živočišné buňky. Dostředivé dělení. Buňka se jakoby "zaškrť" od krajů do středu.

- Přehrádečným dělením rostlinné buňky. Přehrádka mezi buňkami vzniká od středu ke kraji.

### 4.3 Diferenciace buněk

U vícebuněčných organismů dochází k procesu diferenciace (viz  $G_0$  fáze výše), díky němuž se buňky svou stavbou přizpůsobují roli, kterou mají v organismu vykonávat. Všechny buňky organismu jsou sice vybaveny stejnou genovou výbavou, ale v konkrétní buňce dochází k realizaci pouze části genetické informace (např. působením hormonů, různých růstových faktorů apod.; které geny nakonec budou v buňce přepisovány záleží na přítomnosti specifických transkripčních faktorů). V průběhu vývoje organismu je takováto diferenciace nesmírně důležitá, neboť jen plně vyvinuté tkáně mohou plnit svojí fyziologickou úlohu na 100%.

Nepotřebné, staré nebo poškozené buňky potom hynou nekrózou nebo apoptózou.

<http://genetika.wz.cz/bunka.htm>

## 5. JAK VZNIKAJÍ NÁDORY?

Zdravý mnohobuněčný organismus představuje harmonické společenství velkého počtu buněk, z nichž každá má svou funkci, kterou vykonává ve vymezeném čase a vymezeném prostoru dané tkáně pro maximální užitek celé buněčné populace. Jednotlivé buňky daného organismu spolu nesoutěží, ale vzájemně se podporují a spolupracují, aby jejich existence byla pro jejich nositele užitečná a neznamerala zátěž. Buňky představující pro tělo potenciální riziko, např. z důvodů poškození, infekce nebo přílišného stáří, jsou včas eliminovány procesy programované buněčné smrti.

Každý živý organismus je vystaven účinkům vnějšího prostředí, které mohou být značně proměnlivé. Aby i za těchto okolností organismus úspěšně obstál, je vybaven schopností monitorování stavu vnějšího prostředí a schopností přizpůsobit své chování jeho aktuálnímu stavu. Příjem vnějších signálů, jejich zpracování a přenos do vnitřního prostředí buňky, integrace s jinými signály a indukce buněčné odpovědi jsou velmi komplexními procesy. Jejich případná porucha může představovat značné riziko, jímž je v případě lidských nebo živočišných systémů možnost vzniku rakoviny.

Nádory vznikají porušením základních pravidel „sociálního“ chování buněk organismu. Pro organismus nepředstavuje vážné riziko, pokud se jednotlivá buňka nahodile nezachová správně. Ale potenciálně nebezpečná situace nastává tehdy, dojde-li v jedné buňce ke genetické změně, která buňce dovolí přežít, rozdělit se a tak produkovat dceřiné buňky s podobně asociálním chováním. Organizace tkáně nebo i celého organismu tak může být rozvrácena postupně expandujícím klonem abnormálních buněk.

### 5.1 Co je rakovina, nádor, kancerogeneze?

**Rakovina** je závažné onemocnění, které vedle infekčních chorob, podvýživy a chorob srdce představuje hlavní příčinu smrti v lidské populaci. Například v Evropě a v Severní Americe umírá z důvodu rakoviny každý čtvrtý člověk a v celosvětovém měřítku tomuto zhoubnému onemocnění podléhá ročně 100 – 350 lidí na 100.000 obyvatel. Rakovina je onemocnění způsobené zhoubným nádorem. **Nádor** (tumor, neoplazma, novotvar) je patologický útvar vytvořený v tkáni mnohobuněčného organismu, jehož růst se vymkl kontrole. Proces vzniku a vývoje nádorů se označuje jako **kancerogeneze**.

Kancerogeneze má dva základní rysy, které jsou klíčem k pochopení její molekulární podstaty. (1) O nádorech mluvíme jako o onemocněních genomu, protože základem jejich vzniku jsou především **genetické změny**, tzv. mutace. (2) K přeměně normální zdravé buňky v buňku plně maligní nestačí mutace jediná. Kancerogeneze je **vícetupňový proces** postupného hromadění několika mutací. Mutace, které vedou k vývoji nádorů, postiženým buňkám neškodí, ale naopak je zvýhodňují v soutěži o přežití se sousedními buňkami. A právě tato výhoda, kterou individuální buňka s danou mutací získává, ohrožuje život celého mnohobuněčného organismu. Během vývoje nádoru se uplatňuje přírodní selekce, která umožňuje přežívání aktivně se množících mutantních buněk bez ohledu na buňky sousední. Jak původní populace mutovaných buněk roste, postupně se dále vyvíjí: v některých buňkách této populace se nahodile objevují další mutace a některé z nich jsou přírodní selekcí opět preferovány. Celý proces vrcholí vznikem agresivních nádorových buněk žijících uvnitř populace zdravých „disciplinovaných“ tělních buněk. Řádné struktury těla jsou utlačovány nádorovými buňkami, které se postupně prosazují na jejich úkor.

## 5.2 Protoonkogeny a nádorové supresory

Odhaduje se, že k rozvoji plně maligního fenotypu je nezbytná kumulace 4 až 8 různých genetických změn v buňce. Svědčí o tom výsledky epidemiologických studií a také např. výsledky sledování histopatologických stadií ve vývoji kolorektálního karcinomu. Mutace, které souvisejí s kancerogenezí, nastávají především ve dvou typech genů: v tzv. protoonkogenech a nádorových supresorech. Historicky byly tyto dvě kategorie genů vymezeny především ve vztahu k buněčné proliferaci a někdy jsou v užším smyslu i nadále chápány jako geny, jejichž translační produkty se podílejí na řízení buněčného cyklu. V širším smyslu jsou však v současné době chápány obecněji jako geny, jejichž mutace se podílejí na přeměně normální buňky na buňku nádorovou. Funkce těchto genů jsou protichůdné.

**Protoonkogeny** kódují proteiny, které jsou zapojeny do regulačních buněčných okruhů takovým způsobem, že urychlují buněčný cyklus a tak podporují růst nebo zvětšování tkání v důsledku aktivního dělení buněk – tzv. proliferaci. Společným rysem protoonkogenů je, že jejich přílišná funkce je nebezpečná, protože vede k nadměrné buněčné proliferaci i za nepřítomnosti fyziologické hladiny prorůstového signálu. Přeměna protoonkogenů na onkogen je provázána jeho hyperaktivací. Mutace protoonkogenů mají proto aktivující a dominantní povahu, pro kterou platí, že jediná mutovaná kopie genu je dostatečná pro neregulovanou aktivaci daného procesu. Až na několik vzácných výjimek se onkogeny vyskytují pouze v somatických nádorových buňkách.

**Nádorové supresory** (antionkogeny) kódují proteiny, jejichž úloha spočívá ve zpomalování rychlosti proliferace buněk. Z hlediska vzniku rakoviny jsou nebezpečné takové mutace nádorových supresorových genů, které vedou k inaktivaci jejich proteinových produktů. Jsou proto recesivní, a aby se mutace nádorového supresoru uplatnila v kancerogenezi, musí proběhnout inaktivace obou jeho alel. Na rozdíl od onkogenů mohou být mutantní formy nádorových supresorových genů dědičné a predisponují postiženého jedince ke vzniku určitého druhu rakoviny. Tento jedinec obvykle zdědí zárodečnou mutaci jedné alely daného nádorového supresoru, a dokud nedojde k somatické mutaci druhé alely, k tvorbě nádoru nedochází. Pokud je však vyřazena funkce zbývající „zdravé“ alely nádorového supresoru, je pravděpodobnost vzniku nádoru velmi vysoká.

Konkrétních genů, které mohou být u nádorů mutovány a přispívat tak k procesu kancerogeneze, bylo nalezeno velké množství (řádově desítky až stovky). Dokonce i nádory stejného nebo velmi podobného histologického typu mohou být podmíněny mutacemi různých genů. Můžeme tedy říci, že proces kancerogeneze může být velmi **individuální**. Přesto lze pro mutace související s kancerogenezí najít společného jmenovatele. Obecně je přijímána představa, že v buňce musí proběhnout alespoň šest základních změn, které se společně podílejí na vytvoření maligního fenotypu. Jsou jim věnovány následující odstavce.

### 5.3 Poškození buněčného cyklu

Buněčný cyklus představuje sled procesů, kterými buňka postupně duplikuje své složky, aby se následně rozdělila do dvou buněk dceřiných. Pro udržování tkáňové homeostáze, tj. správného počtu životaschopných buněk dané tkáně, je nezbytným předpokladem kontrola rychlosti, s jakou buňky proliferují (tj. kontrola buněčného cyklu), a kontrola rychlosti, s jakou buňky odumírají programovanou buněčnou smrtí. Deregulace buněčného cyklu a programované buněčné smrti často představují první fáze procesu kancerogeneze. Existuje mnoho způsobů, kterými lze přimět buňku k dělení bez ohledu na skutečné potřeby organismu. Například určitá mutace může vyvolat neadekvátní tvorbu růstového faktoru, na který pak již buňka „adekvátně“ reaguje tím, že se rozdělí. Jiná mutace může pozměnit strukturu a funkci některého z proteinů, který se podílí na přenosu signálů v buňce, takovým způsobem, že začne příliš citlivě reagovat na původně podprahový stimulus. Výsledkem je opět nadměrná buněčná proliferace. Protože je kontrola buněčného cyklu skutečně klíčovou vlastností zdravých buněk, odehrává se na dvou úrovních: klidový stav buňky je udržován nejenom nepřítomností pozitivního proliferacího, tzv. mitogenního signálu, ale zároveň i přítomností negativního, antimitogenního signálu. Proto je pro úspěšný vstup buňky do buněčného cyklu nezbytná nejen přítomnost mitogenního signálu, ale také absence antimitogenního signálu. Aby proliferace nádorových buněk mohla probíhat zcela nezávisle na okolním prostředí, musí tyto buňky zajistit nejen tvorbu vlastních mitogenních signálů, ale rovněž ztrátu citlivosti k signálům, které u zdravých buněk buněčný cyklus zastavují.

### 5.4 Poškození programované buněčné smrti

Expanze populace nádorových buněk vyplývá nejen ze zvýšení rychlosti jejich proliferace, tedy rychlosti, s jakou se buňky množí, ale také ze snížení rychlosti, s jakou buňky uvnitř nádorové populace umírají. Obvyklým způsobem, kterým buňky podléhají programované buněčné smrti, je apoptóza. Tento sebedestrukční proces, který je zanikající buňkou aktivně řízen, vede k fragmentaci buněčného jádra a v něm obsažené DNA a k postupnému rozkladu buněčných proteinů, aniž by došlo k porušení plazmatické membrány. Apoptotický program je latentně přítomen ve všech buněčných typech v těle, což samo o sobě svědčí o významu tohoto procesu a dokazuje neustálou připravenost každé buňky v těle odumřít apoptózou, je-li to v zájmu celého organismu. Spouštěcím signálem apoptózy může být poškození DNA, již zmíněná deregulace některých onkogenů, hypoxie, tedy nedostatek kyslíku, nepřítomnost signálů pro přežití nebo naopak přítomnost signálů smrti, které buňka dostává formou mimobuněčných faktorů. Jakmile je proces apoptózy zahájen, proběhne podle přesně stanoveného scénáře až do konce. Jednotlivými kroky tohoto procesu jsou zmenšení a kondenzace buňky, zaškrcování cytozolu, fragmentace jádra, rozklad buněčných membrán, degradace cytoplazmy a cytoskeletu, degradace chromozomů a nakonec degradace a úplné vymizení buňky.

Ani nefyziologicky rychle expandující klon buněk by nemusel v těle představovat vážné riziko, pokud by buňky tohoto klonu adekvátně odpovídaly na signály vyvolávající apoptózu. Apoptóza tak představuje další účinnou ochrannou bariéru organismu proti možnému vývoji nádoru, která musí být nevyhnutelně poškozena, aby vyvíjející se nádorová buňka mohla navzdory zájmům organismu přežít a dále expandovat. Současné poznatky o nádorech potvrzují, že rezistence k indukci programované buněčné smrti je skutečně znakem většiny a možná všech typů nádorů.

## 5.5 Získání neomezeného replikačního potenciálu

Další bariérou, kterou musí nádor při svém vývoji překonat, je omezenost replikačního potenciálu, která je vlastní většině somatických buněk v těle. Existence vnitřního limitu omezujícího celkový počet buněčných cyklů, kterými může savčí buňka projít, byla pozorovaná například při kultivaci buněk v tkáňových kulturách. Pochopení podstaty tohoto jevu souviselo s odhalením telomer a pochopením jejich funkce. **Telomery** jsou repetitivní sekvence DNA na koncích eukaryotických chromozomů. Na ně se váží složité proteinové komplexy, jejichž hlavní funkcí je ochrana konců chromozomů tak, aby nebyly vnímány buněčnými mechanismy jako zlomy DNA, nebyly degradovány, případně aby se vzájemně nespojovaly fúzí. Dvoušroubovicová DNA je během buněčného dělení replikována (zdvojována) takovým mechanismem, který nedovoluje kompletní syntézu konců DNA, a tak při každém buněčném dělení jsou dceřiné řetězce DNA na svém konci zkracovány. Při přílišném zkrácení ztrácejí telomery schopnost chránit konce chromozomů a jsou signálem k navození klidového stavu doprovázejícího stárnutí buněk, tzv. senescence, spojeného s úplným zastavením buněčného cyklu. Zkracování telomer tedy funguje jako mitotické počítadlo a určuje proliferační kapacitu buněk.

K tomu, aby ke zkracování telomer nedocházelo, musí být v buňkách aktivní enzym nazývaný **telomeráza**. Tento enzym zajišťuje, aby replikace konců chromozomů proběhla úplně. U většiny lidských somatických buněk telomeráza není aktivní. Schopnost udržovat délku telomer je vlastní téměř všem maligním nádorovým buňkám. U velké většiny nádorů (85 až 90%) souvisí tato schopnost právě s aktivací telomerázy, zbývajících 10 až 15% nádorových buněk s neaktivní telomerázou používá alternativní mechanismus k udržování délky telomer, který je založen na rekombinaci DNA. Aktivní telomeráza pravděpodobně patří k nejuniverzálnějším znakům, které odlišují nádorové buňky od většiny ostatních buněk v těle. To z ní dělá významný marker s velkým potenciálem diagnostickým a také terapeutickým.

## 5.6 Indukce angiogeneze

Schopnost nádorů přesáhnout svou velikostí masu o průměru větším než 1 mm závisí na jejich schopnosti zajistit si přístup ke krevnímu systému. Tato schopnost umožňuje nádorovým buňkám v dostatečné míře získávat základní živiny a kyslík a zbavovat se odpadů svého metabolismu. Vzdálenost, která může být pro tento účel překlenuta prostou difuzí, nepřesahuje 0,5 mm. Během organogeneze je dostatečný přístup všech buněk ke krevnímu systému zabezpečen koordinovaným růstem a vývojem cév a orgánové tkáně. Proto je proces růstu nových krevních cév po dokončení vývoje tkáně, tj. proces angiogeneze, jen přechodný a přísně regulovaný. Přesvědčivé důkazy o závislosti vývoje nádorů na schopnosti indukce angiogeneze byly podány již v roce 1971. Zdánlivě buňky proliferující uvnitř tkáně disponují

inherentní schopností vyvolat růst krevních cév, ale ve skutečnosti tomu tak není. Proliferující premaligní léze jsou zpočátku neangiogenní, což limituje jejich schopnost expanze. Angiogenní charakter získávají až během dalšího vývoje. Je zajímavé, že přechod z neangiogenního na angiogenní stav, který se typicky odehrává v raných až středních fázích kancerogeneze, se neděje postupným vývojem, ale odehraje se „skokem“. Zapnutí angiogeneze je regulováno rovnováhou mezi aktivátory a inhibitory angiogeneze.

Nejvýznamnějším stimulem nádorové angiogeneze je patrně nedostatek kyslíku, tzv. **hypoxie**. Nedostatek kyslíku se během vývoje nádoru navíc významně uplatňuje při selekci angiogenních buněčných klonů uvnitř neangiogenní premaligní masy buněk. Tvorba nových krevních vlásečnic je nutně doprovázena lokálními degradacemi bazálních membrán obklopujících kapiláry, invazí okolních podpůrných struktur, tzv. stromatu prorůstajícími endoteliálními buňkami ve směru působení angiogenních faktorů nebo remodelace extracelulární matrix.

## 5.7 Tvorba metastáz

Pokud nádorové buňky zůstávají pohromadě a tvoří jednolitou masu, vzniká nádor, který se označuje jako **benigní**. Ten může být často úplně odstraněn chirurgicky. Nádor, jehož buňky však mají schopnost invadovat okolní tkáň, je **maligní**. Maligní buňky se mohou uvolňovat z primárního nádoru, vstoupit do krevního nebo lymfatického systému a vytvořit v jiných částech těla sekundární nádory, **metastázy**. Čím více se nádor šíří, tím složitější je jeho úplné odstranění. Metastázy jsou nejzhoršivějším projevem nádorového onemocnění a jsou příčinou asi 90% úmrtí pacientů s rakovinou. Během svého vývoje většina nádorů dříve nebo později metastázy vytvoří.

Úspěšná invaze a vývoj metastázy jsou podobně jako vznik primárního nádoru závislé na všech do této chvíle zmíněných vlastnostech, které nádorové buňky získávají během kancerogeneze. Schopnost vytvořit metastázu je však podmíněna ještě dalšími změnami. Metastatická kaskáda zahrnuje několik kroků. V první fázi se nádorová buňka musí uvolnit z primárního nádoru. Dále prostupuje extracelulární matrix (ECM) a bazální membránou a dostává se do krevního systému. Migruje tímto systémem a opět prostupuje bazální membránou a ECM a zakládá ohnisko sekundárního nádoru. Přesný průběh metastatické kaskády, především z hlediska mechanismů, které se na ní podílejí, a z hlediska jejich regulace není zcela objasněn. Je však zřejmé, že proces invaze provází postupná proměna schopnosti mezibuněčné adheze a remodelace extracelulární matrix. Obecně platí, že nádorové buňky jsou méně adhezivní než buňky normální a také vytvářejí méně extracelulární matrix. Ta musí být při průchodu nádorových buněk remodelována - degradována. Klíčovou roli při fyziologické remodelaci extracelulární matrix a také během invaze nádorových buněk hrají proteázy, především **metaloproteinázy**. Tvorbu metastáz obecně provází zvýšená aktivita těchto enzymů.

Na interakcích buňky s okolním prostředím se podílí několik typů povrchových **adhezivních molekul**. Některé z nich zprostředkovávají adherence mezi buňkami navzájem, jiné zajišťují především interakce mezi buňkou a extracelulární matrix. Navíc se tyto molekuly kromě pouhého zajišťování interakcí s okolím také často podílejí na přenosu signálů. Většina buněk v těle musí být přichycena k extracelulární matrix, aby mohla přežít. Porušení těchto vazeb za normálních okolností vede k jejich odumření apoptózou. Prostředí, kterým invadující a metastazující buňka během své cesty putuje, je proměnlivé a buňka je nucena se mu

přizpůsobovat. Tato adaptace spočívá mimo jiné právě ve změně spektra adhezivních molekul, které buňka na svém povrchu vystavuje.

## 5.6. Genetická nestabilita

V předcházejících odstavcích jsme popsali, že k vývoji plně maligního nádoru je nezbytných mnoho změn, které vznikají postupně, obvykle v průběhu mnoha let. Proto jsou nádory typickou nemocí vysokého věku: pro nahromadění dostatečně velkého počtu mutací je zapotřebí relativně dlouhé doby. Pravděpodobnost „úspěšného“ vývoje nádoru zvyšuje kromě časového faktoru ještě další okolnost, kterou je genetická nestabilita nádorových buněk. Genetická nestabilita nádorových buněk způsobuje významné zvýšení mutační rychlosti, která potom zvyšuje pravděpodobnost akumulace všech mutací souvisejících s kancerogenezí. Genetická nestabilita je výsledkem mutací, které (1) snižují přesnost replikace genomu, a tak zvyšují frekvenci vzniku mutací, (2) snižují účinnost mechanismů opravujících DNA nebo (3) zvyšují výskyt chromozomálních zlomů a přestaveb, což navozuje nestabilitu tzv. karyotypu, tj. souboru chromozomů buňky, jedince nebo druhu. Jiným zdrojem navýšení genetické nestability může být u některých buněk (4) kritické zkrácení telomer. Obecně má omezenost replikačního potenciálu vyjádřená kritickým zkrácením telomer charakter ochranného opatření proti nádorovému zvratu, protože omezuje životnost buněk, a tím i jejich potenciál úspěšně završit kompletní proces kancerogeneze. Kriticky zkrácená telomera spouští signály, které vedou k zastavení buněčného cyklu, případně k indukci apoptózy. Pokud ale v buňce již došlo k poškození těchto signálních drah, může kritické zkrácení telomer zůstat bez adekvátní odpovědi. Místo toho buňka pokračuje v dělení a chromozomy zbavené dostatečné ochrany svých koncových struktur fúzí a zvyšuje se pravděpodobnost translokací a rekombinací. Tyto procesy přispívají k navýšení genetické nestability. A tak zatímco u relativně nepoškozených buněk představuje neaktivní telomeráza a zkracující se telomery účinnou ochrannou bariéru proti vývoji nádorů, v průběhu kancerogeneze - po vyřazení odpovídajících signálních drah - naopak k vývoji nádorů přispívají.

I když nebylo prokázáno, že by genetická nestabilita byla nezbytnou podmínkou kancerogeneze, je nepochybné, že se objevuje u velkého počtu nádorů a nepřímo se na jejich vzniku významně podílí. Právě genetická nestabilita nádorů může navíc způsobit značnou heterogenitu buněčných klonů v rámci jediného nádoru. Nejzávažnějším důsledkem této heterogenity jsou komplikace pro terapii, protože heterogenní buněčná populace nádoru nemůže na danou terapii odpovídat uniformně. To znamená, že zvolená terapie může být účinná na některé nebo i na většinu buněčných populací v nádoru, ale ponechává bez účinku i třeba minoritní klon nádorových buněk, který je v důsledku terapie selektován, zvýhodněn a může se stát počátkem nové nádorové masy, která je agresivnější a odolnější vůči působení terapeutik. Genetická nestabilita má ještě jeden závažný důsledek. Metastázující populace nádorových buněk se ve srovnání s buňkami primárního nádoru nejenom dále vyvíjí podle nároků prostředí, kterým se pohybuje, ale zároveň se již na počátku tohoto procesu výrazně uplatňuje selekce, která z heterogenní populace buněk vybírá tu, která v novém prostředí nejlépe uspěje. Důsledkem je opět komplikace pro výběr účinné terapie, protože sekundární nádory se mohou svými vlastnostmi od primárních nádorů výrazně lišit.