

# Lekárska biológia II.

Helena Mičková  
Ján Šalagovič  
Peter Brezáni  
Viera Habalová  
Jana Halušková  
Lucia Klimčáková  
Anna Ondrušeková  
Jozef Židzík

Učebné texty Lekárska biológia II. sú určené predovšetkým pre študentov I. ročníka lekárskeho fakult v rámci štúdia všeobecnej biológie, genetiky a základov molekulovej biológie. Študentom by mali poskytnúť teoretické základy a ich praktickú aplikáciu v rámci riešenia modelových problémov a realizácie úloh pri praktických cvičeniach z biológie či genetiky. Obsah učebných textov by mal zároveň slúžiť aj ako podklad pre úspešné zvládnutie obsahovej náplne predmetu biológia.

Okrem základných údajov obsahujú niektoré kapitoly i rozširujúce poznatky predovšetkým v súvislosti s mohutným rozvojom molekulovej biológie v poslednom období. Tieto údaje slúžia ako doplnenie informácií pre exaktné pochopenie príslušných kapitol a nie sú nevyhnutné pre zvládnutie skúšky z biológie (sú oddelené i veľkosťou písma). Príslušné informácie však môžu využiť i študenti vyšších ročníkov lekárskeho fakult, či študenti postgraduálneho štúdia.

Editori: RNDr. Helena Mičková, PhD.  
Prof. RNDr. Ján Šalagovič, PhD.

Autori: RNDr. Helena Mičková, PhD.  
Prof. RNDr. Ján Šalagovič, PhD.  
Prof. RNDr. Peter Brezání, PhD.  
RNDr. Viera Habalová, PhD.  
RNDr. Jana Halušková, PhD.  
RNDr. Lucia Klimčáková, PhD.  
Doc. RNDr. Anna Ondruššková, PhD.  
RNDr. Jozef Židzík, PhD.

Recenzenti: Doc. MUDr. Eva Mečířová, CSc., mim. prof.  
MUDr. Marek Dudáš, PhD.

Technická spolupráca pri tvorbe kapitol 5-8: Terézia Hudáková

Text neprešiel jazykovou úpravou.



\*2720097820\*

© 2007 ÚLB LF UPJŠ v Košiciach

Vydalo vydavateľstvo EQUILIBRIA, s.r.o.  
pre Ústav lekárskej biológie Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika v Košiciach

ISBN 978-80-89284-02-3

## Obsah

<b>1. Bunkový cyklus</b> (Šalagovič, Mičková, Halušková) .....	5
1.1. Mitóza .....	7
1.2. Cytokinéza .....	10
1.3. Meióza .....	12
1.4. Ľudská gametogenéza .....	14
1.5. Oplodnenie .....	17
<b>2. Regulácia bunkového cyklu</b> (Šalagovič, Halušková) .....	25
2.1. Proteíny riadiaceho systému bunkového cyklu .....	26
2.2. Faktory stimulujúce proliferáciu a rast buniek .....	31
2.3. Faktory inhibujúce proliferáciu a rast buniek .....	33
<b>3. Karcinogenéza</b> (Klimčáková) .....	35
3.1. Vývoj malígneho nádoru .....	35
3.1.1. Mutagénne faktory prostredia .....	36
3.1.2. Epigenetické zmeny .....	39
3.1.3. Gény v procese karcinogenézy .....	40
<b>4. Diferenciácia, starnutie a smrť buniek</b> (Židzík) .....	49
4.1. Diferenciácia buniek .....	49
4.1.1. Vnútorne a vonkajšie faktory regulácie diferenciácie buniek .....	51
4.2. Problém starnutia buniek .....	54
4.2.1. Starnutie buniek .....	55
4.3. Bunková smrť – zánik buniek .....	59
4.3.1. Nekróza .....	59
4.3.2. Apoptóza .....	59
4.3.3. Porovnanie nekrózy a apoptózy .....	62
<b>5. Chromozómová podstata dedičnosti</b> (Mičková) .....	63
5.1. Prokaryotické chromozómy .....	63
5.1.1. Plazmidy a epizómy .....	64
5.2. Chromozómy mitochondrií .....	66
5.3. Ľudské chromozómy .....	69
5.3.1. Submikroskopická štruktúra chromozómov .....	70
5.3.2. Euchromatin a heterochromatin .....	72
5.3.3. Inaktivácia chromozómu X - lyonizácia, kompenzácia dávky .....	73
5.3.4. Karyotyp človeka, morfológia chromozómov .....	74
5.3.5. Cytogenetické metódy .....	76
<b>6. Mutácie</b> (Mičková) .....	88
6.1. Génové mutácie .....	89
6.1.1. Rozdelenie génových mutácií podľa dôsledkov na štruktúru polypeptidu .....	91
6.1.2. Génové mutácie u človeka .....	92
6.2. Štruktúrne chromozómové aberácie .....	98
6.3. Genómové mutácie .....	110
6.4. Somatické a gametické mutácie .....	114
<b>7. Mendelove princípy dedičnosti</b> (Ondruššková, Mičková) .....	124
7.1. Základná terminológia klasickej genetiky .....	125
7.1.1. Alelové a nealelové interakcie .....	126
7.1.2. Expresivita, penetrancia .....	126





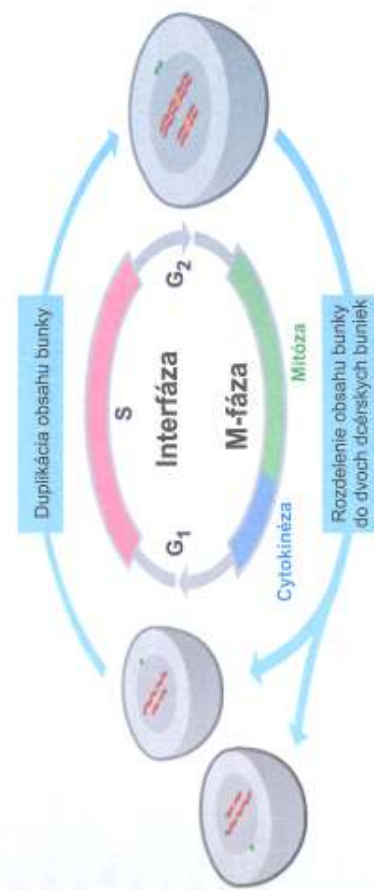
## 1. Bunkový cyklus

"Tam, kde vzniká bunka, tam pred tým musela nejaká bunka existovať, podobne ako živočíchy môžu vzniknúť iba zo živočíchov a rastliny iba z rastlín." Táto *bunková doktrína* navrhnutá nemeckým patológom Rudolfom Virchowom v roku 1858 obsahuje hlbokú myšlienku kontinuity života. Bunky vznikajú z buniek a jedinou možnou cestou ako vytvoriť viac buniek, je delenie buniek, ktoré už existujú. Všetky živé organizmy od jednobunkových baktérií po mnohobunkové cicavce sú výsledkom opakovaného delenia a rastu buniek už od počiatku života pred viac ako tromi miliardami rokov.

Bunka sa rozmnožuje vykonávaním usporiadaného sledu úkonov, počas ktorých zdvojnásobí svoj obsah a potom sa rozdelí na dve bunky. Tento cyklus duplikácie a delenia známy ako **bunkový cyklus**, je základným mechanizmom, ktorým sa rozmnožuje všetko živé. U jednobunkových organizmov (baktérie, kvasinky) vzniká bunkovým delením celý nový organizmus, zatiaľ čo u mnohobunkových organizmov je pre vznik nového individua z jednobunkového oplodneného vajíčka potrebných mnoho bunkových delení, kedy v procese postupnej diferenciácie (viď kapitola 4.) vznikajú zoskupenia navzájom odlišných buniek, ktoré vytvárajú tkanivá a orgány. Napríklad dospelý ľudský organizmus sa skladá z približne 80 biliónov buniek. U väčšiny mnohobunkových organizmov dochádza k bunkovému deleniu i počas života – delením buniek sa nahrádzajú straty spôsobené ich „fyziológickým opotrebovaním“, takisto reparačné procesy pri rôznych patologických stavoch sú podmienené do značnej miery množením buniek.

Eukaryotický bunkový cyklus možno rozdeliť z funkčného hľadiska predovšetkým na dve základné časti (obr. 1):

- **interfáza** - obdobie, ktoré je najdlhšie a počas ktorého sa bunka nedelí. V tomto období dochádza k duplikácii celkového obsahu bunky. Väčšina bunkových komponentov sa replikuje postupne počas celej interfázy, výsledkom čoho je dvojnásobná veľkosť bunky na konci bunkového cyklu. Z funkčného hľadiska sa interfáza delí na tri časti: na **G<sub>1</sub>**, **S** a **G<sub>2</sub>**-fázu. Chromozómy, ktoré sa vyskytujú len v jednej kópii sa musia zreplikovať len raz v diskrétnej časti cyklu – počas S-fázy.
- **M-fáza** – obdobie bunkového cyklu počas, ktorého dochádza k rozdeleniu jadra – *karyokínéze* (najčastejší typ delenia jadra somatických eukaryotických buniek – *mitóza*) a rozdeleniu samotnej bunky na dve dcérske – *cytokínéze*.



Obrázok 1. Bunkový cyklus.

7.1.3. Heterogenita, pleiotropia, fenokópia .....	127
7.2. Mendelove princípy .....	128
7.2.1. Monohybridné kríženie .....	129
7.2.2. Dihybridné kríženie - zákon o voľnej kombinovateľnosti alel .....	131
7.3. Dedičnosť kvalitatívnych a kvantitatívnych znakov .....	133
8. Väzba génov (Mičková, Ondrušeková) .....	139
8.1. Crossing-over a väzba génov .....	140
8.2. Jednotka mapovej vzdialenosti .....	140
8.3. Väzba génov a diagnostika .....	142
9. Dedičnosť a pohľavie (Mičková) .....	149
9.1. Dedičnosť viazaná na pohľavie .....	150
9.1.1. Y-chromozóm .....	150
9.1.2. X-viazaná dedičnosť .....	151
9.2. Dedičnosť pohľavim ovládaná a ovplyvnená .....	155
9.3. Mitochondriálna dedičnosť .....	155
10. Základy imunológie a imunogenetiky (Habalová) .....	160
10.1. Antigény .....	160
10.1.1. Krvnaskupinové antigény .....	161
10.1.2. Hlavný histokompatibilný systém – HHK .....	172
10.2. Mechanizmy imunitnej odpovede .....	175
10.2.1. Špecifická imunitná odpoveď .....	176
10.2.2. Imunitná reakcia .....	181
11. Genealógia (Mičková, Brezáni) .....	188
11.1. Autozómový typ dedičnosti .....	190
11.1.1. Autozómovo dominantný typ dedičnosti (AD) .....	190
11.1.2. Autozómovo recesívne choroby (AR) .....	191
11.2. Gonozómový typ dedičnosti .....	193
11.2.1. Holandrický typ dedičnosti (Y-viazaná gonozómová dedičnosť) .....	193
11.2.2. Gonozómovo dominantný typ dedičnosti (GD) .....	193
11.2.3. Gonozómovo recesívny typ dedičnosti (GR) .....	194
11.3. Mitochondriálne genetické ochorenia .....	195
12. Genetika populácií (Brezáni, Mičková) .....	204
12.1. Hardyho-Weinbergov zákon genetickej rovnováhy .....	205
12.2. Vývoj genofondu a faktory ovplyvňujúce genetickú rovnováhu populácie .....	206
12.2.1. Spôsob kríženia .....	206
12.2.2. Väzbové disekvilibrum .....	208
12.2.3. Gény na gonozómovom lokuse .....	208
12.2.4. Mutácie .....	209
12.2.5. Selektia a reprodukčná schopnosť .....	209
12.2.6. Migrácia .....	210
12.2.7. Génový posun – drift .....	210
12.3. Eufénika a eugenika .....	211
13. Genetické poradenstvo (Mičková, Židzík) .....	217
13.1. Retrospektívne a prospektívne genetické konzultácie .....	217
13.2. Genetická prognostika .....	218
13.3. Prenatálna genetická diagnostika (PGD) .....	218
Literatúra .....	224



Časové trvanie všetkých fáz dokopy označujeme ako **dĺžka bunkového cyklu** alebo **generačná doba bunky**. Doba od začiatku S-fázy do ukončenia mitózy predstavuje pomerne krátku časť bunkového cyklu. Dĺžka bunkového cyklu je ovplyvnená predovšetkým trvaním G<sub>1</sub> fázy a u jednotlivých druhov buniek sa značne líši. Zatiaľ čo napríklad epitelové bunky črevnej výstelky a mnoho prekurzorových krvných buniek v kostnej dreni sa delia raz za niekoľko dní, ľudské pečenevé bunky sa delia priemerne jedenkrát za rok. Niektoré ľudské bunky sa u dospelých ľudí obvykle nedelia vôbec (svalové a nervové bunky).

## Interfáza

Obdobie v živote bunky medzi dvoma M-fázami sa nazýva interfáza. Počas celej interfázy bunka prepisuje svoje gény, syntetizuje proteíny a zväčšuje svoju veľkosť. Jadro je pevne ohraničené jadrovou membránou a v jeho vnútri možno pozorovať len chromatin (dekondenzované interfázové chromozómy svetelným mikroskopom nie sú rozlíšiteľné).

V S-fáze (S=syntéza) bunka replikuje jadrovú DNA, ktorej množstvo sa zdvojnásobí a každý chromozóm sa stáva dvojjadrovým. S-fáza časovo spadá medzi G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> fázu (G = z anglického „gap“ = medzera).

G<sub>1</sub> fáza nasleduje po M-fáze a predchádza S-fázu. G<sub>2</sub> fáza nasleduje po S-fáze a predchádza mitózu. Fázy G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> predstavujú pre bunku čas, aby mohla rásť a rozmnožiť cytoplazmatické organely. Vo fázach G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> sa nachádzajú tiež úseky, v ktorých sa bunka rozhoduje, či prejde do ďalšej fázy alebo či zastane v momentálnej fáze bunkového cyklu.

## G<sub>1</sub>-fáza

Hneď po mitóze vstupuje bunka do G<sub>1</sub>-fázy. G<sub>1</sub>-fáza má variabilnú dĺžku trvania. V G<sub>1</sub>-fáze prebieha kontrola genómu bunky. Reparačné mechanizmy odstraňujú chyby genetickej informácie (väčšiu genových mutácií) – poškodenia, ktoré vznikli v DNA v priebehu mitózy. V tomto období je interfázový chromozóm jednochromatidový.

V G<sub>1</sub>-fáze prebiehajú intenzívne syntetické procesy, hlavne syntéza RNA a proteínov, bunka sa zväčšuje, rastie. Zvyšuje sa počet väčšiny bunkových štruktúr – ribozómov, mitochondrií, endoplazmatického retikula, atď. V G<sub>1</sub>-fáze sa vytvára zásoba nukleotidov a syntetizujú sa enzýmy potrebné pre replikáciu jadrovej DNA v S-fáze.

## S-fáza

S-fáza je obdobím syntézy jadrovej DNA. Rýchlosť syntézy DNA v eukaryotických chromozómoch je 50 nukleotidov za sekundu. Syntéza DNA nie je synchronna pre všetky chromozómy. Synchronne sa replikujú homologické páry. Najskôr sa replikujú euchromatinové časti chromozómu a neskôr heterochromatinové časti chromozómu. Replikujúca sa DNA tvorí stále súčasť chromozómov. Preto súčasne s jej replikáciou musí prebiehať aj syntéza histónov, aby sa mohli vytvárať nové nukleozómy a chromatinové vlákna. Replikácia nejadrovej DNA (t. j. mitochondriálnej a chloroplastovej) vo väčšine prípadov nie je synchronizovaná s S-fázou, ale prebieha počas celého bunkového cyklu (s výnimkou M-fázy).

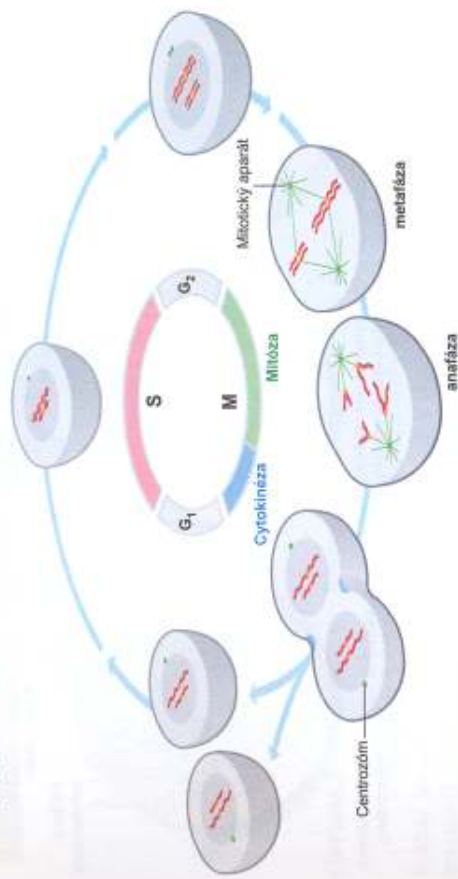
## G<sub>2</sub>-fáza

Po skončení S-fázy nastupuje G<sub>2</sub>-fáza, ktorá končí zahájením mitózy. G<sub>2</sub>-fáza je relatívne krátka. V G<sub>2</sub>-fáze pokračuje rast bunky podmienený intenzívnou syntézou proteínov, RNA a tvorbou bunkových štruktúr. Syntetické procesy v G<sub>2</sub>-fáze pripravujú bunku na

mitotické delenie. V G<sub>2</sub>-fáze sa každý chromozóm skladá z dvoch identických molekúl DNA, to znamená z dvoch sesterských chromatíd.

## M-fáza

Súčasťou M-fázy sú dva procesy: *rozdelenie jadra* - karyokinéza a *rozdelenie buniek* - cytokinéza. Za začiatok M-fázy považujeme zmeny v jadre, hlavne kondenzáciu chromozómov, rozpad jadrového obalu a tvorbu mitotického aparátu. Trvanie mitózy je relatívne konštantné, pomerne krátke. V M-fáze sa zastavuje expresia génov – prestáva tvoriť RNA, pretože chromozómy sú v kondenzovanom stave a DNA mitotických chromozómov sa nemôže prepisovať.



Obrázok 1-1. Jednotlivé štádiá bunkového cyklu.

## 1.1. Mitóza

Mitóza predstavuje najčastejší typ delenia jadra somatických eukaryotických buniek. Je to zložitý proces, ktorého cieľom je rozdeliť zreplikované chromozómy tak, aby obe dcérske bunky získali kompletne sady chromozómov. Mitóza sa delí na päť štádií: **profáza**, **prometafáza**, **metafáza**, **anafáza** a **telofáza** (obr. 1-2).

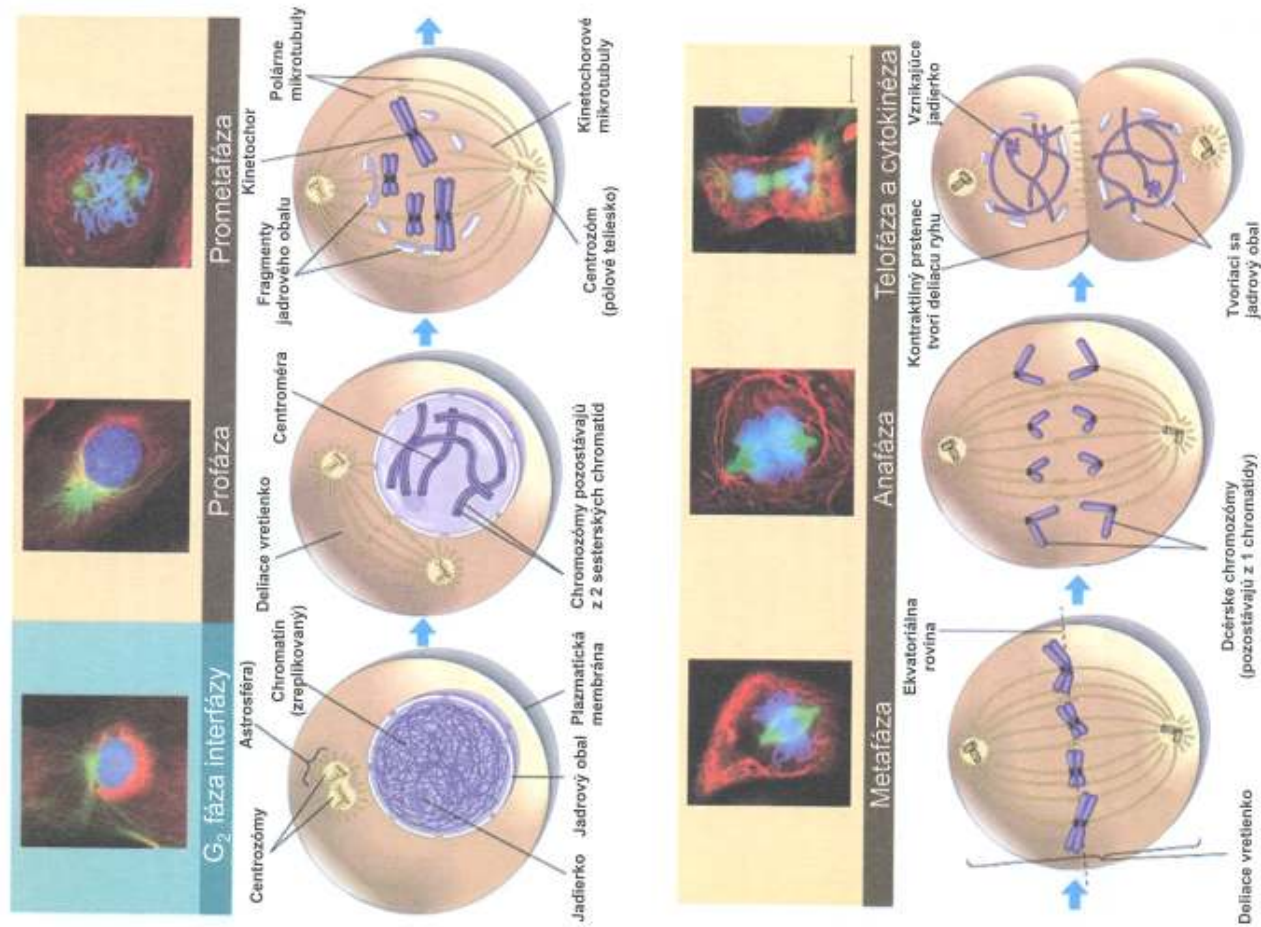
- kondenzácia všetkých chromozómov
- vznik mitotického aparátu z mikrotubulov

Chromozómy sa kondenzujú a sú viditeľné ako dlhé, tenké štruktúry pozostávajúce z páru geneticky identických sesterských chromatíd. Cytoplazmatické mikrotubuly depolymerizujú na molekuly tubulínu, ktorý je použitý na tvorbu **mitotického aparátu bunky**.

Organizačným centrom pre mikrotubuly mitotického aparátu je **centrozóm**. Pokiaľ sa bunka nedelí, nachádza sa v blízkosti jadra. Centrozóm sa zdvojuje na konci interfázy a v profáze sa replikované centrosómy od seba vzdialujú a zaujímajú miesto na protifaľných póloch bunky. Súčasťou centrosómu väčšiny buniek sú **centrioly**, ktoré sa skladajú z dvoch kolmo na seba postavených sústav krátkych mikrotubulov (vyššie rastliny centrioly nemajú a ich úlohu nahrádzajú plazmatické čiapočky na póloch bunky). Okolo centriolov sa nachádza beztvárá zrnitá oblasť plazmy – **centrosféra**, z ktorej vystupujú lúčovito usporiadané mikrotubuly, ktoré sa označujú ako **astrálne mikrotubuly** a ich sústava ako **astrosféra (aster)**.

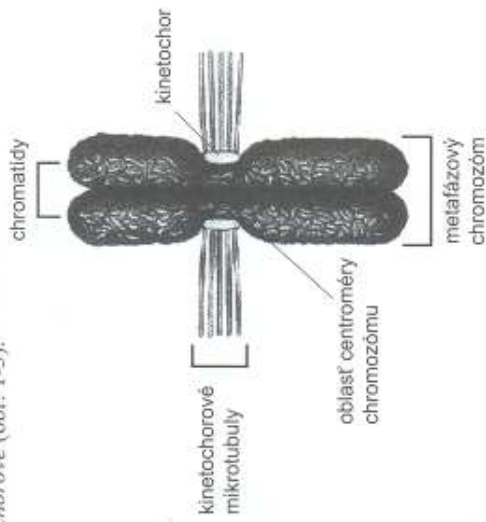


Iné mikrotubuly - *polárne mikrotubuly*, smerujú k opačnému centrosómu, vzájomne sa prekrývajú a sú základom *deliaceho vretienka*.



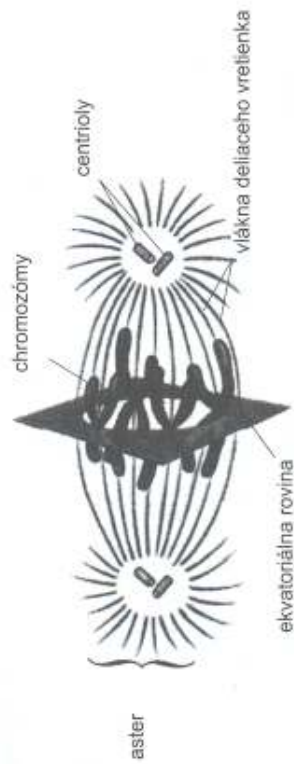
Obrázok 1-2. Jednotlivé štádiá mitózy.

Na začiatku **prometáfázy** sa náhle rozpadne jadrový obal a bielkovinový komplex jadrových pórov. Súčasne s rozpadom jadrového obalu sa v oblasti centrosómu na každej zo sesterských chromatíd vytvára malé teliesko, nazývané *kinetochor*. Na kinetochor každej chromatídy sa v prometáfáze pripájajú niektoré polárne mikrotubuly vretienka, ktoré sa potom označujú ako *kinetochorové* (obr. 1-3).



Obrázok 1-3. Kinetochory. Kinetochorové mikrotubuly sa pripájajú na centrosómu.

V **metáfáze** dochádza k posunu chromozómov do ekvatoriálnej roviny, t. j. do roviny kolmej na os deliaceho vretienka, ktorá leží v strede medzi centrosómami. Chromozómy sú maximálne kondenzované, preto je toto štádium výhodné na analýzu chromozómov. Sesterské chromatídy sa od seba oddeľujú, ale zostávajú spojené v oblasti centrosómu. Každá zo sesterských chromatíd sa kinetochorovými mikrotubulmi pripája k opačnému pólu deliaceho vretienka (obr. 1-4).



Obrázok 1-4. Usporiadanie chromozómov do ekvatoriálnej roviny v metafáze.

**Anafáza** začína v okamihu, keď sa od seba úplne oddelia obe sesterské chromatídy doteraz spojené v oblasti centrosómu a každá z nich sa začína posúvať k opačnému pólu. Táto migrácia chromozómov trvá zvyčajne len niekoľko minút (je to časovo najkratšia fáza mitózy). Sesterské chromatídy sa po oddelení v anafáze stávajú nezávislými dcérskymi chromozómami. Na konci anafázy sú dcérske chromozómy rozdelené na dve rovnaké skupiny, ktoré sa nachádzajú na opačných póloch deliaceho vretienka.



V **telofáze** kinetochorové mikrotubuly zanikajú, polárne mikrotubuly sa ešte predlžujú až do doby, kým sa okolo nich nevytvorí jadrový obal, ktorý sa postupne obnovuje. Jadrový obal sa vytvorí okolo každej sady dcérskych chromozómov a vznikajú tak dve dcérske jadrá. Na konci telofázy chromozómy v obidvoch jadrách dekonduziu, obnovuje sa transkripcia génov a rekonštruje sa jadričko. Deliace vretienko postupne zaniká, ale jeho zánik čiastočne zasahuje až do delenia samotnej bunky – cytokinézy.

Výsledkom mitózy sú dve dcérske jadrá s rovnakým počtom a kvalitou chromozómov ako malo jadro materskej bunky.

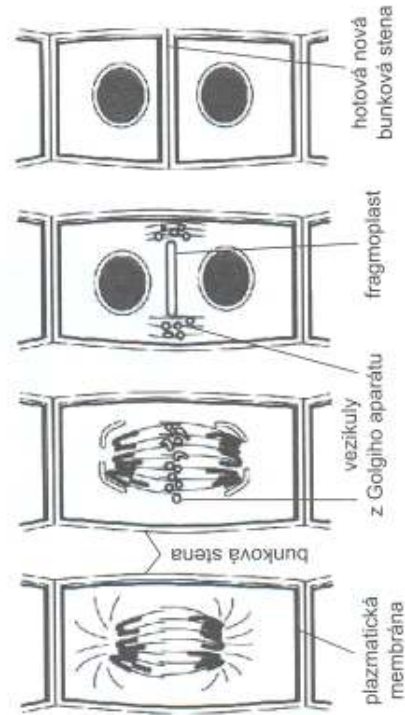
## 1.2. Cytokinéza

Cytokinéza je proces, pri ktorom sa materská bunka rozdelí na dve bunky schopné samostatnej existencie. Cytokinézu považujeme za samostatnú fázu bunkového cyklu, pretože nemusi stále prebiehať na konci M-fázy, ale môže byť, z hľadiska časového rozvrhu cyklu, „preradená“ do priebehu až nasledujúceho cyklu alebo sa nemusí vôbec uskutočniť (vznikajú tak viacjadrové bunky).

Mechanizmus cytokinézy je odlišný v bunkách živočíchov a v rastlinných bunkách s celulózovou bunkovou stenou.

V živočíšnych bunkách dochádza k zaškrtenu bunky pomocou *kontraktilného prstenca*. Je to zväzok antiparalelne prebiehajúcich mikrofilamentov uložených pod cytoplazmatickou membránou, ktoré sú na ňu napojené. Kontraktilný prstenec sa nachádza približne v mieste ekvatoriálnej roviny.

Mechanizmus cytokinézy rastlinnej bunky je odlišný. Nová bunková stena sa začína vytvárať v cytoplazme medzi obidvomi sadami segregovaných chromozómov na začiatku telofázy. Vznik bunkovej steny je riadený útvarom, ktorý sa nazýva *fragmoplast* (obr. 1-5). Ten sa formuje zo zvyškov polárnych mikrotubulov, ktoré zostávajú v mieste ekvatoriálnej roviny starého mitotického vretienka. Z Golgiho aparátu sú k fragmoplastu transportované mechúrky naplnené polysacharidmi a glykoproteínmi potrebnými pre matrix novej bunkovej steny. Tie sa opakovanou fúziou zlievajú do štruktúry podobnej disku obklopenému membránou, ktorá rastie smerom k povrchu bunky, až kým sa nespojí s cytoplazmatickou membránou a pôvodnou bunkovou stenou a nerozdelí tak bunku na dve dcérske bunky. Nová bunková stena je ukončená pripojením celulózových mikrofibril.

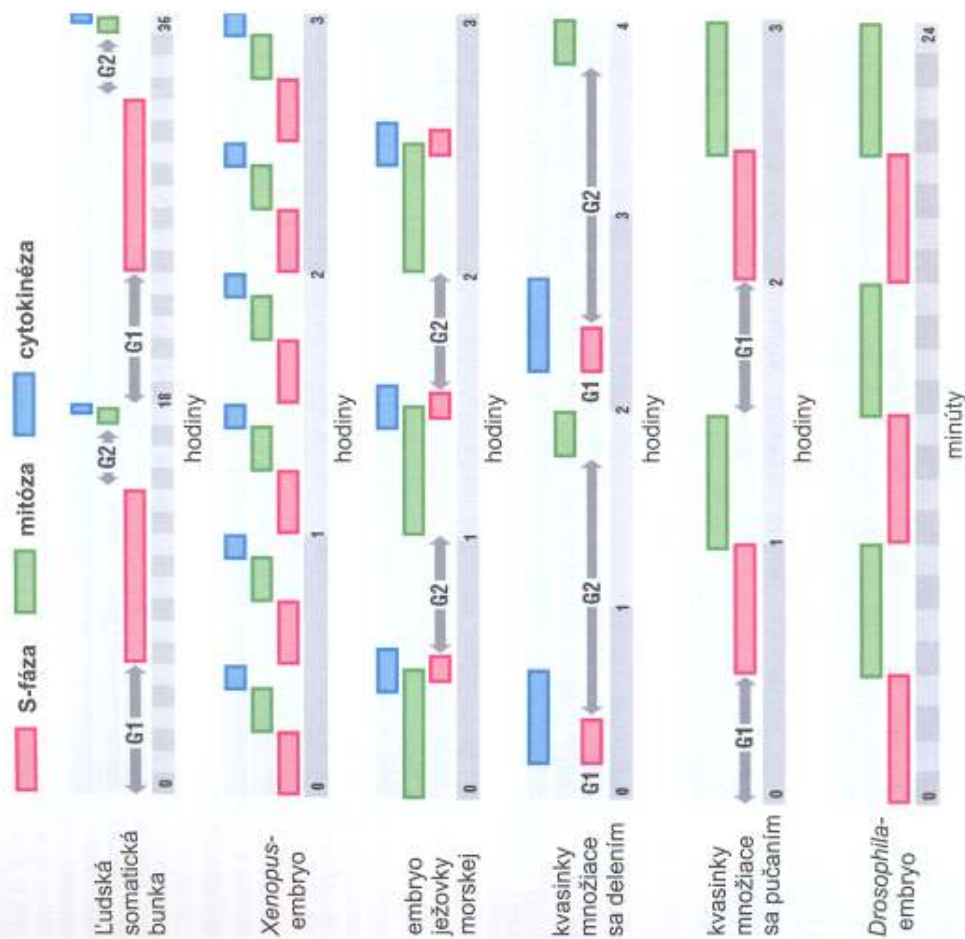


Obrázok 1-5. Cytokinéza rastlinnej bunky.

## Modifikácie bunkového cyklu

Aj keď vo väčšine eukaryotických buniek jednotlivé štádiá bunkového cyklu nasledujú v poradí podľa uvedenej základnej schémy – G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> a M – v určitých vyvinutých štádiách, či typoch buniek niektorých druhov existujú odlišnosti a modifikácie tohto poradia fáz.

V začiatkových štádiách ontogenézy mnohých živočíšnych druhov (napr. z rodu *Xenopus*) sa pomerne veľké oploďnené vajíčko rýchlo mitoticky delí na stovky až tisíce jednotlivých buniek. Medzi jednotlivými bunkami pretrvávajú určitý čas na povrchu typické ryhy – preto sa toto včasné delenie nazýva *ryhovanie*. Medzi jednotlivými deleniami bunky v tomto období nedochádza k rastu buniek a časovému predĺženiu (alebo len minimálnemu) medzi replikáciou chromozómov a delením jadra a buniek. Bunka teda postupuje priamo z S-fázy do M-fázy a vzápätí vstupuje do ďalšej S-fázy atď... V daných prípadoch sa častokrát DNA replikácia nasledujúceho cyklu začína uskutočňovať ešte pred ukončením M-fázy predchádzajúceho cyklu a bunkový cyklus je obmedzený na striedanie iba dvoch fáz – S a M.



Obrázok 1-6. Príklady modifikácie bunkového cyklu v bunkách rôznych organizmov.

Vo väčšine živočíšnych buniek obe štádiá M-fázy – mitóza a cytokinéza – nasledujú bezprostredne za sebou ešte pred vstupom bunky do nasledujúcej G<sub>1</sub>-fázy. V niektorých typoch buniek (napr. v embryonálnych bunkách ježovky, či v niektorých kvasiniek) je však cytokinéza relatívne pomalý proces, ktorý nie je ukončený



este dlho po uskutočnení mitózy a k úplnému dokončeniu cytokinézy dochádza až po S-fáze nasledujúceho cyklu. V daných prípadoch môžeme za koniec bunkového cyklu považovať ukončenie mitózy a G<sub>1</sub>-fázy (ak vôbec existuje) môžeme definovať ako obdobie medzi koncom mitózy a začiatkom S-fázy.

Dalšiu modifikáciu poradia fáz bunkového cyklu nachádzame vo väčšných štádiách embryonálneho vývinu ovocných mušiek (*Drosophila melanogaster*). Bunkové cykly v týchto embryách nie sú ukončené cytokinézou, ale po rozdelení jadier vstupuje bunka do ďalšieho cyklu. Výsledkom je vznik mnohobudových buniek (*synchronum*). Až po 13-násobnom delení jadier sa začíná okolo jednotlivých jadier formovať cytoplazmatická membrána, dochádza k rozdeleniu cytoplazmy a vzniku samotných buniek v procese cytokinézy.

Vo väčšine buniek M-fáza nasleduje bezprostredne po S-fáze, ale je oddelená G<sub>2</sub>-fázou, v ktorej sa bunka „pripravuje“ na delenie jadra. U niektorých kvasiniek rodu *Saccharomyces* sú tieto „pripravné“ procesy na mitózu (napr. zostavenie deliaceho vretienka) uskutočňované ešte pre ukončenie DNA syntézy. V týchto bunkách preto nenachádzame jasne definované štádium G<sub>2</sub>-fázy, ktoré by oddelovalo S- a M-fázu.

Pre úspešnú reprodukciu buniek je vo všeobecnosti v rámci jedného cyklu potrebná len jedna duplikácia chromozómov (S-fáza) a bunkových organel a následne jedno rozdelenie zreplikovaných chromozómov a ostatného obsahu bunky do dvoch dcérskych (M-fáza). V niektorých špecializovaných typoch buniek sa však v rámci jedného bunkového cyklu môžu vyskytovať S- alebo M-fáza opakovane viackrát. V bunkách larválnych štádií drosofil, ale i v mnohých iných typoch buniek ostatných živočíchov, častokrát dochádza k procesu **endoreduplikácie** – mnohonásobnému opakovaniu S-fázy bez uskutočnenia M-fázy. Dôsledkom tejto endoreduplikácie je vytváranie mnohonásobných (až tisícov) kópií genómu daného organizmu. To pravdepodobne umožňuje i následné zvýšenie produkcie jednotlivých génov. V niektorých bunkách tieto zmnosené kópie DNA ostávajú spolu paralelne uložené vytvárajúc tak *polytémne chromozómy* jasne pozorovateľné v svetelnom mikroskope.

Špecializovaným typom bunkového cyklu je i meiotický cyklus vzniku haploidných gamét, v ktorom dochádza len raz k replikácii DNA (S-fáza), ale k rozdeleniu jadier a obsahu buniek (M-fáza) dochádza dvakrát za sebou. Väčšina buniek daných organizmov je diploidná; to znamená, že obsahujú dve verzie každého chromozómu (homologické chromozómy). Meiotickým delením vznikajú haploidné bunky s počtom chromozómov redukovaným na polovicu (z každého páru homologických chromozómov obsahujú len jeden).

### 1.3. Meióza

Meióza je teda špecifické delenie, ktorým vznikajú haploidné bunky – gaméty. Fázy bunkového cyklu meiózy sú podobné mitóze. Meióza sa skladá z dvoch po sebe nasledujúcich bunkových delení, ktoré sa označujú ako I. a II. meiotické delenie. Prvé meiotické delenie sa označuje aj ako **heterotypické** (redukčné) a druhé ako **homotypické** (ekvačné).

#### I. meiotické delenie

##### Profáza I

Prvé meiotické delenie sa od mitózy odlišuje hlavne profázou, ktorá je komplikovaná, prebieha v jadre so zachovaným jadrovým obalom a jadierkom a jednotlivé páry homologických chromozómov podliehajú zložitým zmenám. Profáza I zaberá časovo asi 90% z celého priebehu meiózy a jej priebeh je rozdelený na päť štádií:

- 1) **Leptotén**. Chromozómy sa čiastočne kondenzujú, stávajú sa viditeľnými, sú ešte stále tenké a dlhé a svojimi koncami sú prichytené na určité miesto jadrového obalu.
- 2) **Zygotén**. Homologické chromozómy sa párujú, pozdĺžne sa k sebe prikladajú, čím dochádza k tzv. **synapsii** a vytvárajú sa tzv. **bivalenty**. V synapsii sú k sebe priložené homologické centroméry aj zodpovedajúce homologické lokusy. Chromozómy sú spojené **synaptonémalným komplexom** (zložitý systém proteínov). Počet bivalentov sa rovná počtu chromozómov v jednej sade.
- 3) **Pachytén**. Pokračuje kondenzácia chromozómov. Na každom bivalente sú už rozlíšiteľné štyri chromatídy, ktoré spoločne označujeme ako **tetráda**. Nesesterské chromatídy v rámci

tetrád sa okolo seba špirálovito obíacajú čím dochádza k ich vzájomnému prekríženiu. V týchto miestach prekríženia, ktoré sa sa označujú ako **chiazmy**, môže dôjsť k pretrhnutiu, následnej výmene a znovuzpojeniu určitých úsekov nesesterských chromatíd medzi homologickými chromozómami. Tomuto procesu hovoríme **crossing-over**. Výmena homologických úsekov medzi nesesterskými chromatídami má za následok rekombinácie (viď väzba génov).

4) **Diplotén**. Zaniká synaptonémálny komplex a začína postupné oddeľovanie homologických chromozómov.

5) **Diakínéza**. Pokračuje kondenzácia chromatíd, chiazmy sa posúvajú ku koncom chromatíd (*terminalizácia chiazem*), centrozómy dosiahli opačné póly bunky. V tomto štádiu dochádza k rozpadu jadrového obalu a miznutiu jadierka. Tvori sa mitotický aparát.

#### Metafáza I

Tetrády sa usporadúvajú do ekvatoriálnej roviny. Centroméry homologických chromozómov sú náhodne orientované k opačným pólom bunky. Podľa tejto náhodnej orientácie sa potom mikrotubuly deliaceho vretienka pripájajú na kinetochory centromér tak, že z každého pólu dosahujú vždy k jednému z homologických chromozómov so zdvojenými chromatídami. Takto je umožnená následná náhodná segregácia (rôzne kombinácie pôvodne materských a otcovských) chromozómov do gamét a vytvorenie rekombinovanej chromozómovej sady.

#### Anafáza I

Homologické chromozómy z každého páru sa od seba oddeľujú a bivalenty zanikajú. Oddelené chromozómy na rozdiel od mitózy sa skladajú z dvoch chromatíd, ktoré sú spojené centromérou. Takéto dvochromatídové chromozómy (dyády) sú prítahované mikrotubulami deliaceho vretienka na opačné póly. Na každý z opačných pólův bunky sa dostáva kompletná sada chromozómov kombinovaná z chromozómov pôvodne materských a otcovských. Počet chromozómov sa tak redukuje na polovicu, ale v každom chromozóme je ešte diploidné množstvo DNA. Po rozdelení má každá bunka haploidný počet chromozómov. Rozchod párových chromozómov je náhodný. Zodpovedá Mendelovmu zákonu o voľnej kombinovateľnosti. Vyplyva z toho, že pôvodne paternálne a maternálne chromozómy vytvárajú náhodné kombinácie. Počet možných kombinácií chromozómov v gamétach človeka (23 párov) je 2<sup>23</sup>. Genetická variabilita sa ešte navyše zvyšuje rekombináciami nesesterských chromatíd v dôsledku crossing overu.

V anafáze I a II môžu vzniknúť chyby pri rozchode chromozómov na opačné póly bunky. Porucha rozchodu (nondisjunkcia) homologických chromozómov v anafáze I alebo chromatíd v anafáze II je príčinou numerických chromozómových aberácií (genómové mutácie). Gaméty s odlišným počtom chromozómov môžu byť príčinou spontánnych poratov alebo vzniku syndrómov.

#### Telofáza I

Prebieha čiastočná dekonenzácia chromozómov a cytokinéza, po ktorej vzniknú dve bunky s haploidným počtom chromozómov (dyád – pozostávajúci z dvoch chromatíd).

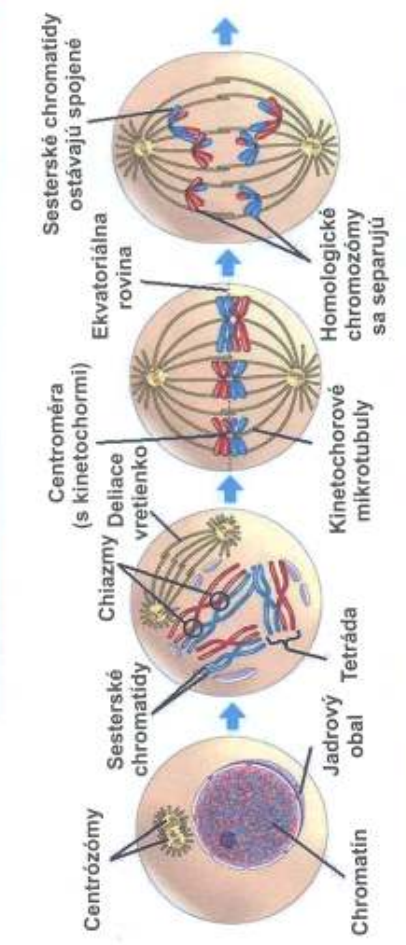
Počas nasledujúcej krátkej **interfázy II** (*interkinéza*) sa chromozómy len nepatrne dekonenzujú, neprebíha však S-fáza, teda nedochádza k replikácii DNA.

**II. meiotické delenie** je podobné mitóze, ale vstupujú do neho bunky s haploidným počtom chromozómov. Centroméry sesterských chromatíd sa oddelia, sesterské chromatídy (monády) už ako dcérske chromozómy sa pomocou mikrotubulov deliaceho vretienka dostávajú na opačné póly bunky. Po II. telofáze a cytokinéze vznikajú štyri haploidné bunky.

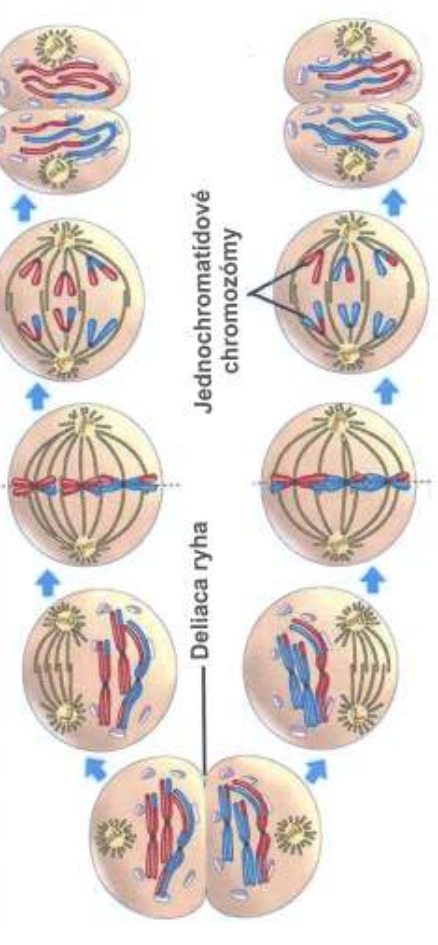


šte dlho  
ytku. V  
óbec ex  
ývnu o  
yokiné  
umek  
yoplaz  
yokiné  
unka -p  
a mitó  
unkách  
hromoz  
ostanéh  
rámcí je  
ádi dvo  
ndoredú  
ndoredú  
navdep  
množné  
ozorvan  
S  
amé, v  
uniek (n  
y znam  
feiotick  
olovicu

**INTERFÁZA** **MEIÓZA I: Separácia homologických chromozómov**  
**Profáza I** **Metafáza I** **Anafáza I**



**MEIÓZA II: Separácia sesterských chromatid**  
**Telofáza I a cytokinéza**  
**Profáza II** **Metafáza II** **Anafáza II**



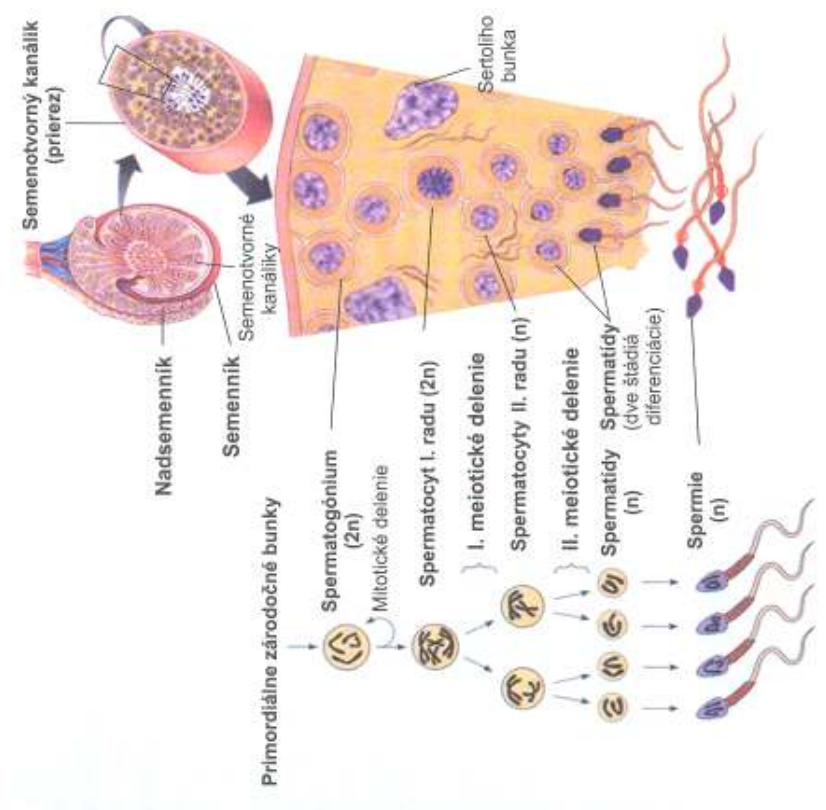
Obrázok 1-7. Jednotlivé štádiá meiotického delenia buniek.

**1.4. Ľudská gametogenéza**

Pohlavné bunky človeka sa vyvíjajú v pohlavných žľazách – gonádach, ktoré sú zároveň miestom pre ich výživu a ochranu.  
 Primordiálne zárodočné bunky asi v 4. týždni embryonálneho vývoja nie sú lokalizované priamo v embryu, ale v endoderme žltkového vaku. Odtiaľ migrujú k urogenitálnej lište tvoriac spolu so somatickými bunkami primitívne gonády, ktoré sa neskôr (okolo 46. dňa po oplodnení) diferencujú na semenníky alebo ovária v súlade so svojou genetickou konštitúciou.

Vo vývoji spermií a vajíčok existujú dôležité rozdiely a preto hovoríme zvlášť o vývoji spermií – spermiogenéze a vývoji vajíčok – oogenéze.  
**Spermiogenéza**

Spermiogenéza (spermatogenéza, vývoj mužských pohlavných buniek) prebieha v semenotvorných kanálikoch mužských semenníkov. Začína sa v puberte, presnejšie od času pohlavnej zrelosti, pod vplyvom zvyšujúcej sa produkcie mužských pohlavných hormónov.



Obrázok 1-8. Ľudská spermiogenéza

**Spermatogóniá** viacerých typov sú umiestnené na periférii kanálikov. Vznikajú z kmeňových buniek (ktoré sa sústavne mitoticky delia) a postupne sa sledom mitóz cez viaceré formy stávajú **spermatocytmi I. radu** (primárnymi spermatocytmi). Spermatocty I. radu už vstupuje do I. meiotického (redukčného) delenia. Rozdelí sa na dva **spermatocyt II. radu** (sekundárne spermatocyt), z ktorých každý obsahuje 23 chromozómov. Tieto bunky rýchlo prechádzajú do II. meiotického delenia a z každej vzniknú dve **spermatio** (obr. 1-8). Spermatio dozrievajú bez ďalšieho delenia na **spermie**, ktoré sa uvoľňujú do lúmenu kanálikov. Tento proces sa označuje ako **spermiogenéza**. Spermatio v priebehu dozrievania získavajú tvar a funkcie, ktoré sú nevyhnutné pre preniknutie k vajíčku a jeho

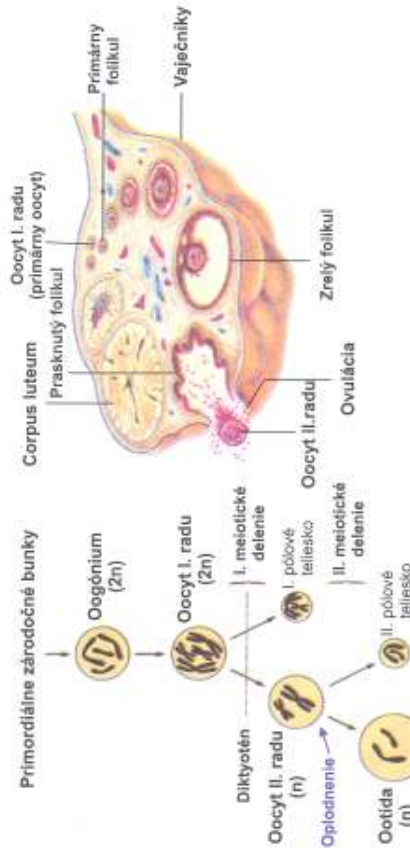


oplodnenie. Skoro celá hlavička spermie je vyplnená bunkovým jadrom. Smerom od centriolu sa vytvára bičik, ktorý sa postupne predlžuje. Mitochondrie v krčku spermie zabezpečujú oxidatívnu fosforyláciu energiu potrebnú na pohyb bičika. Z Golgiho komplexu sa vytvára akrozómový vaček, ktorého enzýmy sú dôležité na preniknutie spermie do vajíčka. Chromozómy jadra veľmi silne kondenzujú. DNA je fixovaná do kryštaloidnej formy bázickými proteínmi – protaminmi, ktoré nahrádzajú históny v chromozómoch spermie. Génová expresia je potlačená. Po dokončení histogenézy sa spermie uvoľňujú do lúmenu kanálikov a sú pasívne unášané do nadsemeníkov. Vlastný aktívny pohyb spermii možno pozorovať, až keď spermie opustia pohlavný trakt muža. Všetky štádiá trvajú dovedna 65 – 75 dní (od začiatku meiózy až po zrelé spermie).

Produkcia spermii je mimoriadne veľká. V jednom ejakuláte môže byť vyše 200 miliónov spermii. Na sústavnú a dlhodobú tvorbu takéhoto množstva sú potrebné stovky a stovky po sebe nasledujúcich bunkových delení. Čím je muž starší, tým väčší počet replikácií DNA prekonal jeho zárodočné bunky, a tým aj narastá pravdepodobnosť, že pri replikácii DNA vznikne chyba (mutácia). Čím je otec v čase plodenia starší, tým viac stúpa riziko, že odovzdá dieťaťu poškodenú gamétu.

### Oogenéza

Na rozdiel od spermatogenézy sa oogenéza (ovogenéza) začína už počas vnútro maternicového vývinu u embrya ženského pohlavia. Vajíčka sa vyvíjajú z **oogónii**, drobných buniek kôrovej vrstvy ovária, ktoré vznikli mnohými mitotickými deleniami z primordiálnych zárodočných buniek. Každé oogónium sa nachádza v strede vyvíjajúceho sa folikulu. Asi v 3. mesiaci prenatalného vývoja sa oogónie embrya začínajú vyvíjať na **oocyty I. radu (primárne oocyty)**, a niektoré z nich vstupia do profázy I. meiotického delenia. Proces nie je synchronizovaný, a tak vo fetálnom ovári nájdem vedľa seba časné i neskoršie vývojové štádiá. Oocyty I. radu prejdú leptoténym, zygoténym, pachyténym a diploténym štádiom a zosiaľujú v „kludovom štádiu“, tzv. **diktyoténe**, až do dosiahnutia pohlavnej zrelosti, dokiaľ sa morfológicky príliš nemenia.



Obrazok 1-9. Ľudská oogenéza.

Meiotické delenie oocytov pokračuje od puberty subežne s dozrievaním jednotlivých folikulov v ±28-dňových cykloch počas celého reprodukčného obdobia ženy. Príslušné oocyty I. radu vstupujú do rastovej fázy, počas ktorej dochádza k mnohonásobnému zväčšovaniu ich jadra a hlavne cytoplazmy (*cytoplazmatický ras*). I. meiotické delenie sa dokončí asi v čase ovulácie, čo môže byť 12 – 50 rokov od začiatku delenia.

Oocyt I. radu dokončí I. meiotické delenie tak, že každá dcérska bunka dostane 23 chromozómov. Ale len do jednej dcérskej bunky sa dostane väčšina cytoplazmy a stane sa z nej **oocyt II. radu**, pričom z druhej bunky sa stane **prvé pólové teliesko (pólocyt) II.** meiotické delenie sa začína takmer bezprostredne potom a pokračuje počas cesty vajíčkovodom. Dokončí sa až po oplodnení. Oplodnenie zvyčajne nastane (ak vôbec nastane) ešte skôr ako oocyt II. radu doputuje do maternice (v období II. metafázy). Druhým meiotickým delením vzniká zrelé **vajíčko (ovum)** prakticky so všetkou cytoplazmou a **druhé pólové teliesko** (obr. 1-9). Prvé pólové teliesko sa tiež môže homotypicky rozdeliť na dve.

Najvyšší počet zárodočných buniek má päťmesačné ženské embryo (asi 7 miliónov). Do pôrodu klesá tento počet na 2 milióny, do puberty pod 200 tisíc, z ktorých v priebehu reprodukčného veku dozrie asi 400, ostatné degenerujú. Na vznik všetkých ženských zárodočných buniek stačí seria 23 mitóz.

Dlhé trvanie meiózy u ženy (12 – 50 rokov) môže byť v dôsledku akumulácie mutagénnych vplyvov kauzálne späté so zvýšeným rizikom meiotickej nondisjunkcie so stupňujúcim vekom matky (neschopnosť konjugovaných chromozómov oddeliť sa).

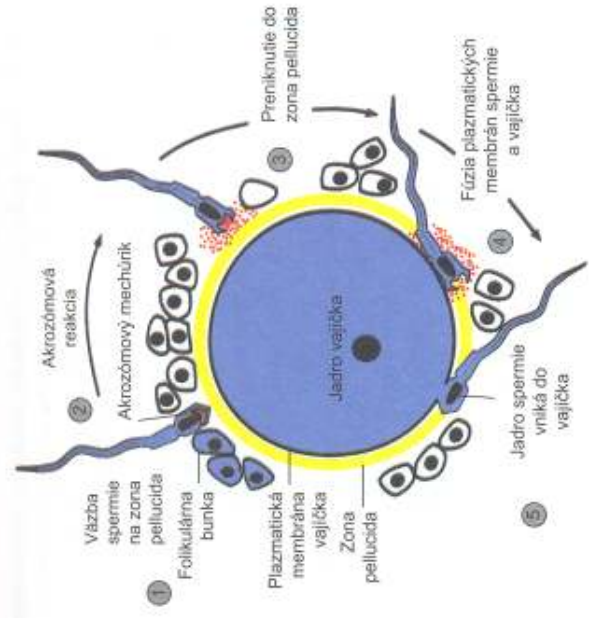
### 1.5. Oplodnenie

Oplodnenie je splynutie dvoch gamét s haploidnými jadrami do zygoty, ktorej obe haploidné jadrá splyvajú (tzv. *amfimizia*) do diploidného jadra. Vajíčka a spermie mnohobunkových živočíchov môžu vzájomne splynúť zvyčajne len v rámci toho istého druhu a sú chránené pred možnosťou fúzie s gamétami iných druhov. U vajíčka je to zabezpečené prítomnosťou špeciálnej vrstvy z vonkajšej strany plazmatickej membrány – **zona pellucida**, ktorou môžu preniknúť iba spermie vlastného druhu. Schopnosť oplodniť len vajíčko vlastného druhu v prípade spermii je podmienená ich **kapacitáciou**. Je to zložitý proces podporený sekretnými vajíčkovodu vlastného druhu. Pri kapacitácií dochádza k zmenám v lipidovom a glykoproteínovom zložení plazmatickej membrány spermie, zvyšuje sa intenzita jej metabolizmu a pohyblivosti. Iba kapacitovaná spermia dokáže preniknúť vrstvou folikulárných buniek, ktoré obaľujú vajíčko a viazať sa na hlavný glykoproteín zona pellucida. Zona pellucida cicavčích vajíčok funguje ako bariéra proti preniknutiu spermii iných druhov a skladá sa z troch glykoproteínov: ZP1, ZP2, ZP3. Dva z nich, ZP2 a ZP3 vytvárajú filamenty, ZP1 ich priečne spája do trojzložernej siete. ZP3 funguje aj ako receptor pre väzbu spermie na zona pellucida, čím sa indukuje **akrozómová reakcia** (obr. 1-10).

Aby spermia mohla preniknúť do vajíčka je potrebné enzymatické narušenie zona pellucida, ktoré sa uskutočňuje hydrolytickými enzýmami (proteázami a hyaluronidázami). Tie sú, podľa všetkého, súčasťou vnútornej akrozómovej membrány v akrátnej časti hlavičky spermie. Až keď sa narúši ochranný obal vajíčka, môže plazmatická membrána hlavičky spermie splynúť (fúzovať) s plazmatickou membránou vajíčka. Štruktúra chromozómov spermie sa rýchle mení z kryštalickej formy na typickú formu s histónmi. Paternálne chromozómy sa tak aktivujú a môžu sa replikovať.



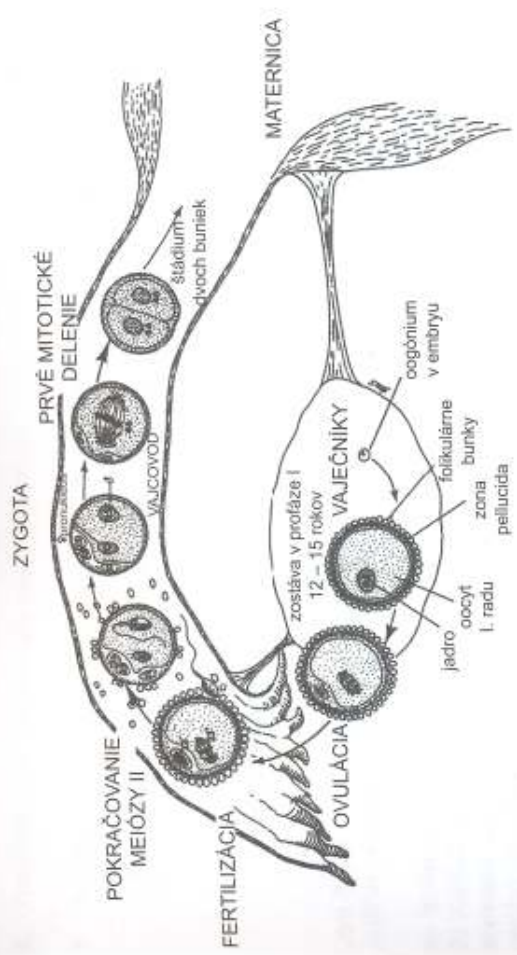




**Obrázok 1-10.** Akrozómová reakcia pri oplodnení cicavčieho vajíčka. Hlavička spermie po preniknutí zona pellucida fúzuje s povrchom vajíčka, s jeho plazmatickou membránou.

Vajíčko je chránené proti **polyspermii** (vniknutiu väčšieho počtu spermii) dvoma mechanizmami. Prvý, tzv. **primárny blok**, spočíva v rýchlej depolarizácii plazmatickej membrány vajíčka po fúzii s prvou spermiou. Veľmi skoro po oplodnení sa však membránový potenciál vracia na pôvodnú hodnotu a nastupuje **sekundárny blok** polyspermie, tzv. **kortikálna reakcia**. Zvýšená koncentrácia  $Ca^{2+}$  v cytoplazme vajíčka aktivuje exocytózu kortikálnych granúl vajíčka do zona pellucida, pričom dochádza k modifikácii proteínu ZP3 a k čiastočnej degradácii proteínu ZP2. Výsledkom je celková molekulová prestavba zona pellucida na tzv. **oploďňovaciu membránu**, ktorá definitívne zabráni preniknutiu ďalších spermii do vajíčka. Po fúzii membrán oboch gamét vniká do vajíčka hlavička s jadrom a krčok spermie a vzniká **zygota**. U cicavcov jadrá oboch gamét (tzv. **prvojadrá**) nespývajú hneď po oplodnení. Najprv sa k sebe približia a zostávajú intaktné až do rozpadu jadrových obalov pred prvou mitózou. V materskom aj otcovskom prvojadre (*pronucleus*) dochádza k replikácii DNA, takže pred začiatkom profázy prvého mitotického delenia obe prvojadrá obsahujú chromozómy zložené z dvoch chromatíd. Okrem DNA prináša spermia do zygoty centriol, ktorý v cicavčích vajíčkach chýba. Tie obsahujú iba centrozóm bez centriol. Splynutie oboch genómov (*amfimizácia*) sa uskutočňuje až v priebehu prvej mitózy, počas ktorej sa chromozómy oboch gamét pripájajú na jedno spoločné deliace vretienko. Vytvorením zygoty sa aktivuje vývojový program. Už prvý kontakt spermie s plazmatickou membránou vajíčka indukuje zvýšenie proteosyntézy. Rozchodom centriolov na protipólne póly bunky sa odštartuje prvá mitóza a zaháji sa ryhovanie zygoty.

Oplodnenie prebieha za normálnych okolností vo vajíčkovoде v deň ovulácie alebo v nasledujúci deň (obr. 1-11). Celý proces trvá asi 24 hodín. V každom menštruačnom cykle sa obvykle uvoľní len jedno vajíčko, kým spermii je obrovské množstvo. No len čo jedna spermia vnikne do vajíčka, spustí sa reťaz biochemických reakcií, ktoré zvyčajne zabráni preniknutiu každej ďalšej spermie.



**Obrázok 1-11.** Priebeh oogenézy, fertilizácie a brázďovania.

**Oplodnenie in vitro**

Oplodnenie vajíčka, aj ľudského, sa môže uskutočniť aj mimo materského organizmu v systéme *in vitro*. U cicavcov sa táto technika využíva už mnoho rokov pri asistovanej reprodukcií a v šľachtiteľstve, kde umožňuje použiť na oplodnenie spermie a vajíčka izolované zo šľachtiteľských perspektívnych zvierat a zabezpečiť tak ich reprodukciu alebo ďalší výskum. V súčasnej dobe oplodnenie *in vitro* nachádza uplatnenie i v humánnej medicíne, kde umožňuje otehotnieť ženám s určitým typom sterility. Po predchádzajúcej stimulácii ovárií sa niekoľko oocytov laparotomicky odoberá z Graafových folikulov. Po zhodnotení ich kvality a zrelosti sa vhodné oocyty oplodnia *in vitro* spermiami zvoleného partnera alebo darcu. V systéme *in vitro* prebiehajú aj prvé štádiá ryhovania a v štádiu 4 - 8 blastomét sa zárodek preniesie do matrice. Po úspešnej nidácii (implantácii, zahniezdení) nasleduje úplný fyziologický vnútramaternicový vývoj embrya.

Nové mikromanipulačné techniky tiež umožňujú:

- zvýšenie úspešnosti fertilizácie (metódou ICSI – intracytoplazmatická injekcia spermie do oocytu, ktorá umožňuje oplodnenie oocytov v prípadoch, kedy sa to, napr. z dôvodu nedostatočného počtu spermii, nedá uskutočniť iným spôsobom)
- zvýšenie úspešnosti nidácie embrya (metódou AH – asistovaný „hatching“ („ľahnutie“), kedy sa narušením zona pellucida uľahčí nidácia embrya)
- odber buniek z embryí na uskutočnenie špeciálnych vyšetrovacích metód pred samotnou implantáciou (predimplantačná genetická diagnostika)

oploďnenie sa vytvá oxidatívni akrozóm Chromoz bázické Génová kanálko pozorova dní (od z P miliónov a stovky replikáci riziko, že Oogené N vnútrn dlobný z primon folikulu radu (p nie je s vývojov i diploé obľavn

Oocy Oplod Ootid (n) Ovu (n) Obráz



## Úlohy

1. Popíšte procesy, ktoré prebiehajú v jednotlivých štádiách mitózy.
2. Porovnaj teľofázu mitózy u rastlín a živočíchov vzhľadom na cytokinézu.
3. Popíšte všetky kontrolné uzly v priebehu bunkového cyklu.
4. **Pozorovanie jednotlivých štádií mitózy na roztlakovom preparáte zo špičky koreňka cibule.**

**Materiál a pomôcky:** naklíčená cibuľa (*Allium cepa*) s koreňkami dĺžky cca 5 mm, fixačný roztok, maceračný roztok, destilovaná voda, acetoorcein, hodinové sklíčko, podložné a krycie sklo.

**Postup:** Odrežeme špičku koreňka cibule o dĺžke 3 – 5 mm. Fixujeme 10 minút vo fixačnom roztoku, potom prenieseme koreňky do maceračného roztoku na ďalších 10 minút. Koreňky opláchneme vo vode a farbíme 15 minút acetoorceinom. Koreňok prenieseme na podložné sklo, prikryjeme krycím sklíčkom, na ktoré zatlačíme palcom cez štvorček buničitej vaty tak, aby sa bunky koreňového pletiva rozprestrelí do plochy.

**Výsledok:** Bunky cibule sú vhodným objektom na pozorovanie mitotického delenia jadra, pretože sú veľké. Chromozómy sú takisto veľké a dobre rozlíšiteľné v mikroskope (2n = 16). Roztlakový preparát prezrieme najprv pri malom zväčšení (100 x) a jednotlivé fázy mitózy zakreslíme pri 400-násobnom zväčšení.

5. **Pozorovanie jednotlivých štádií mitózy v kostnej dreni myši a potkana.**

**Materiál a pomôcky:** trvalý preparát kostnej drene myši a potkana, mikroskopické pomôcky.

**Postup:** Pri 400 násobnom zväčšení nájdeme jednotlivé štádiá mitózy a zakreslíme.

6. **Pozorovanie ľudských chromozómov v štádiu metafázy.**

**Materiál a pomôcky:** trvalý preparát periférnych lymfocytov človeka po kultivácii *in vitro*, mikroskopické pomôcky.

**Postup:** Prezrieme preparát pri 100 násobnom zväčšení, vyhladáme tzv. c–metafázy a zakreslíme zostavu 46 metafázových chromozómov pri 1000 násobnom zväčšení.

7. **Stanovenie mitotického indexu zo 100 hodnotených buniek periférnych lymfocytov človeka po kultivácii *in vitro*.**

**Materiál a pomôcky:** trvalý preparát periférnych lymfocytov človeka po kultivácii *in vitro*, mikroskopické pomôcky.

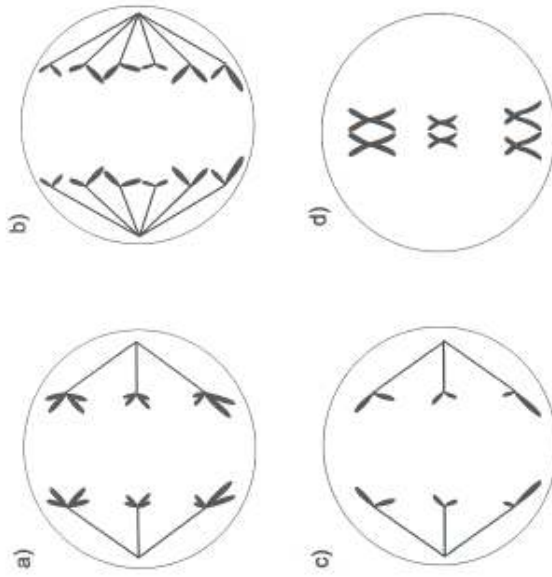
**Postup:** V tabuľke zaznamenáme počet buniek v mitóze zo 100 analyzovaných a vypočítame mitotický index.

Počet buniek v mitóze	Počet hodnotených buniek	MI = N mit / Nt

MI = mitotický index; N mit = počet buniek v mitóze; Nt = počet hodnotených buniek

8. Porovnaj výsledné produkty meiózy a mitózy.

9. Na obrázku sú bunky získané od toho istého jedinca.
  - a) Určte fázy mitotického resp. meiotického delenia.
  - b) Aký je diploidný počet chromozómov?
  - c) Ak ide o cicavčie bunky, aké je pohlavie jedinca?



10. Vysvetlite uvedené pojmy:

- a) synapsia
- b) bivalenty
- c) chiazmy
- d) crossing-over
- e) sesterské chromatídy
- f) tetrády
- g) dyády
- h) monády

11. Porovnaj spermiogézu a oogenézu. Viete vysvetliť význam ich rozdielov?

12. Vysvetlite význam predĺženej profázy I. meiotického delenia a prečo meióza významne podmieňuje genetickú variabilitu a mitóza nie.

13. Ak má určitý organizmus diploidný počet chromozómov  $2n = 16$  v oocyte:

- a) koľko tetrad je v profáze I?
- b) koľko dyád je v profáze II?
- c) koľko monád migruje ku každému pólu počas anafázy II?

14. Koľko chromozómov a chromatíd je prítomných v týchto štádiách meiózy u človeka:

- a) v spermatogóniách pred S fázou?
- b) v primárnych spermatocytoch v I. metafáze?
- c) v sekundárnych spermatocytoch v II. metafáze?
- d) v spermatidách?
- e) v spermiiach?



15. Koľko spermií vznikne:

- z jednej spermatogónie ?
- z jedného sekundárneho spermatocyту ?
- z jednej spermatidy ?
- z jedného primárneho spermatocyту ?

16. Koľko ľudských vajíčok vznikne:

- z jednej oogónie ?
- z jedného primárneho oocyту ?
- z ootidy ?
- z pólóveho telieska ?

17. Vysvetlite dôsledky dlhého trvania diktyoténneho štádia súvisiaceho so stúpajúcim vekom matky.

18. Koľko chromozómov má maľ, ktorý pochádza z kríženia koňa (64 chromozómov) a somára (62 chromozómov)?

19. V somatických bunkách myši je 40 chromozómov.

- Koľko chromozómov získala myš od svojho otca?
- Koľko autozómov je prítomných v myších gamétach?
- Koľko pohlavných chromozómov je vo vajíčku myši?
- Koľko autozómov je v somatických bunkách samičky?

20. Počas oogenézy u organizmu s haploidným počtom  $n = 6$  došlo v priebehu II. meiotického delenia k nondisjunkcii, pričom do vajíčka sa dostala 1 nerozdelená dyáda?

- Koľko chromozómov je v zrelom vajíčku?
- Koľko chromozómov je v sekundárnom pólocyte?
- Čo vznikne po fertilizácii hore uvedeného vajíčka s normálnou spermiou?
- Ako tento stav označujeme?

21. Diploidná bunka obsahuje tri páry chromozómov označených A, B a C. Každý pár tvorí jeden maternálny a jeden paternálny chromozóm ( $A^m, A^p$  atď).

- Ktoré chromatídové (chromozómové) kombinácie sú možné v metafáze mitózy? Ktoré kombinácie sú na každom póle bunky na konci anafázy?
- Aké chromatídové (chromozómové) kombinácie sú možné na konci profázy I (bez crossing-overu)?
- Zakreslite všetky možné kombinácie chromatíd na konci anafázy II.
- Ak v priebehu meiózy II došlo k nondisjunkcii chromatíd chromozómu C, aké to bude mať následky a čo vznikne?

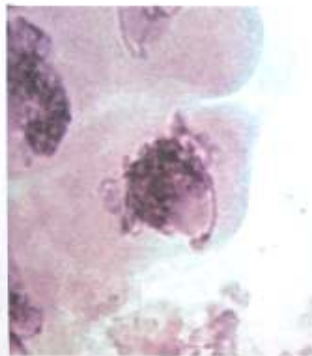
22. Pozorovanie jednotlivých štádií meiózy na trvalom preparáte testes myši.

**Materiál a pomôcky:** trvalé preparáty testes myši farbené acetoorceínom

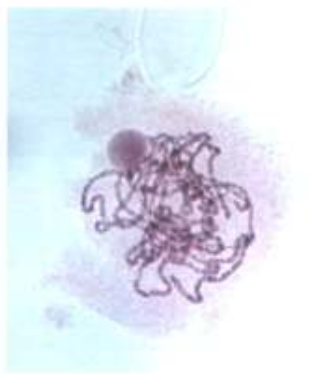
**Postup:** Na trvalých preparátoch pri 400 násobnom zväčšení vyhladáme jednotlivé štádiá meiózy a zakreslime do protokolu. Obvykle je ťažko odlišiť štádiá leptoténne a zygoténne. Vyhládajte bunku v štádiu diakinézy a stanovte počet chromozómov resp. bivalentov. V diploténnom štádiu je možné pozorovať chiazmy na chromozómoch.

**Obrázok 1-10.** Jednotlivé štádiá profázy I. meiotického delenia:

- leptoténne, resp. zygoténne štádium
- pachyténne štádium
- diploténne štádium
- diakinéza



a) leptoténne, resp. zygoténne štádium



b) pachyténne štádium



c) diploténne štádium



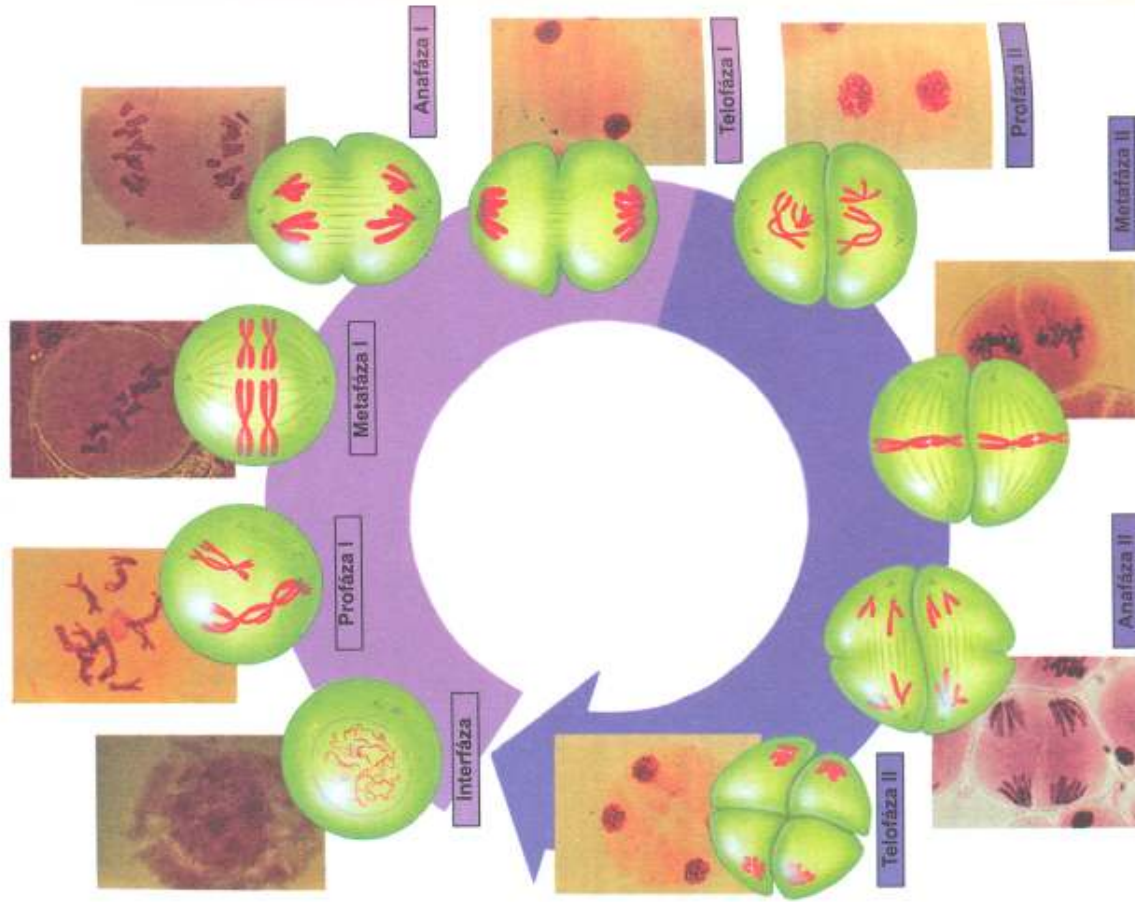
d) diakinéza



23. Pozorovanie jednotlivých štádií meiózy na roztlakovom preparáte testis rovnokrídlovcov (*Orthoptera*) a na rozterovom preparáte peľnice ľalie (*Lilium sp.*).

**Materiál a pomôcky:** trvalé preparáty testes rovnokrídlovcov a peľnice ľalie

**Postup:** Na preparátoch pri 400 násobnom zväčšení nájdeme jednotlivé štádiá I. a II. meiotického delenia a zakreslíme do protokolu.

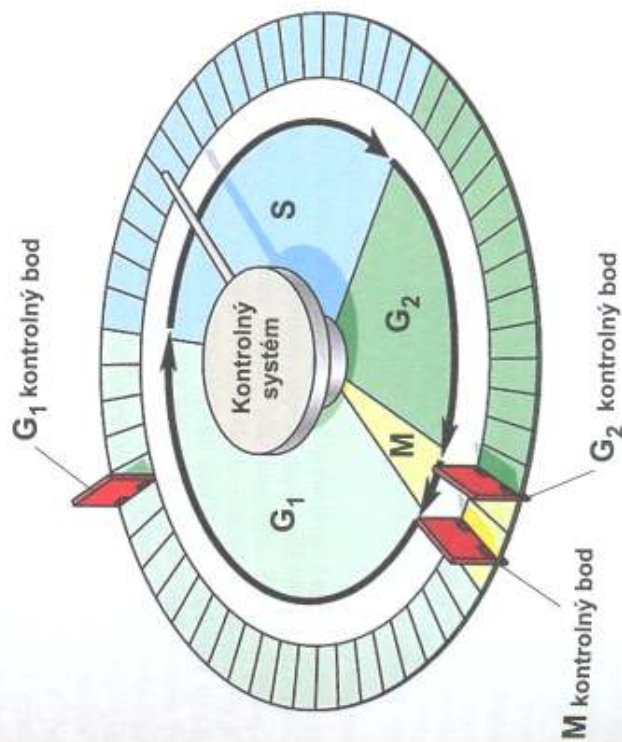


## 2. Regulácia bunkového cyklu

Jednotlivé udalosti bunkového cyklu sa objavujú v presne určenom poradí a časovej následnosti. Ak začneme replikáciou DNA (S-fáza), po nej nasleduje G<sub>2</sub>-fáza, na ňu naväzuje mitóza a cytokinéza (M-fáza) a po nej ďalšia prestávka (G<sub>1</sub>-fáza), po ktorej dochádza k ďalšej replikácii, a tak ďalej. Systém regulácie bunkového cyklu musí v správnom čase aktivovať enzýmy a iné proteíny nevyhnutne pre uskutočnenie každého procesu a po dokončení daného procesu ich musí deaktivovať. Musí tiež zaistiť, aby bol každý krok cyklu dokončený skôr ako začne nasledujúci krok. Na komplexnej činnosti riadiaceho systému sa podieľajú mechanizmy s protichodným účinkom, ktoré jednak stimulujú a jednak inhibujú bunkovú proliferáciu, a ktoré sú podmienené pôsobením vnútorných i vonkajších činiteľov. Pre správnu reguláciu bunkovej proliferácie je potrebná rovnováha stimulujúcich a inhibujúcich mechanizmov. Ak takáto rovnováha neexistuje, dôsledkom môže byť nekontrolované delenie buniek, ktoré u mnohobunkových organizmov môže dospieť až napríklad k vzniku nádorov.

K jednotlivým udalostiam bunkového cyklu musí teda dochádzať v určitej postupnosti a táto postupnosť musí byť zachovaná aj vtedy, ak jeden krok trvá dlhšie ako obvyčajne. Napríklad celková jadrová DNA musí byť zreplikovaná skôr než dôjde k rozdeleniu jadra, čo znamená, že kompletná S-fáza musí stále predehňovať M-fázu. V štandardne prebiehajúcim bunkovom cykle je regulácia zaistená predovšetkým zastavením a kontrolou cyklu v špecifických úsekoch – v takzvaných **kontrolných bodoch**, resp. **uzloch**. Kontrolných bodov je viacero, ale hlavné kontrolné body sa nachádzajú v:

- G<sub>1</sub> fáze, kde sa rozhoduje o tom či bunka vstúpi do ďalšieho bunkového cyklu a bude sa deliť a následne či dôjde k replikácii DNA (postup G<sub>1</sub>/S – kontrolný uzol pre replikáciu)
- G<sub>2</sub> fáze, kde sa rozhoduje o tom, či prebehne delenie jadra (postup G<sub>2</sub>/M – kontrolný uzol pre karyokinézu)
- M fáze, na rozhraní metafázy a anafázy, kde sa rozhoduje o tom, či sa rozdelí i samotná bunka (prechod mitóza/cytokinéza – kontrolný uzol pre cytokinézu)





Až po prekonaní týchto bodov môže dôjsť k prechodu bunkového cyklu do ďalšej fázy. Na kontrole bunkového cyklu v kontrolných bodoch  $G_1$ ,  $G_2$  a  $M$  fázy sa podieľajú faktory, ktoré pôsobia vo vnútri bunky prostredníctvom spätnej väzby tak, že regulačný systém nedopusťi navodenie nasledujúcej fázy, pokiaľ neboli ukončené reakcie predchádzajúcej fázy. Príkladom môže byť zastavenie bunkového cyklu vo fáze  $G_2$ , pokiaľ nebola ukončená replikácia DNA. Regulačné mechanizmy môžu zastaviť priebeh bunkového cyklu aj v prípade porušenia bunkových štruktúr, napríklad DNA, resp. v prípade nesprávne vytvoreného mitotického vretienka, či nesprávneho napojenia chromozómov na mitotické vretienko. Súčasťou každého kontrolného bodu je detekčný systém, ktorého úlohou je odhaliť abnormálne (aberantné) alebo neúplné procesy v rámci bunkového cyklu, ako je napr. poškodenie DNA. Ďalšou jeho súčasťou sú signálne dráhy, ktorými je signál prenesený na výkonnú, poslednú zložku – efektor, ktorý môže vyvolať zastavenie bunkového cyklu až do času, kým sa problém nevyrieši.

Kontrolné body sú dôležité aj z iného dôvodu – regulačný systém musí brať ohľad na podmienky prostredia a u mnohobunkových organizmov musí regulačný systém reagovať na signály od ostatných buniek. Práve v kontrolných bodoch bunkového cyklu môže byť systém regulovaný aj signálmi od ostatných buniek, ako sú rastové faktory a iné extracelulárne signálne molekuly, ktoré môžu bunkové delenie stimulovať, alebo inhibovať.

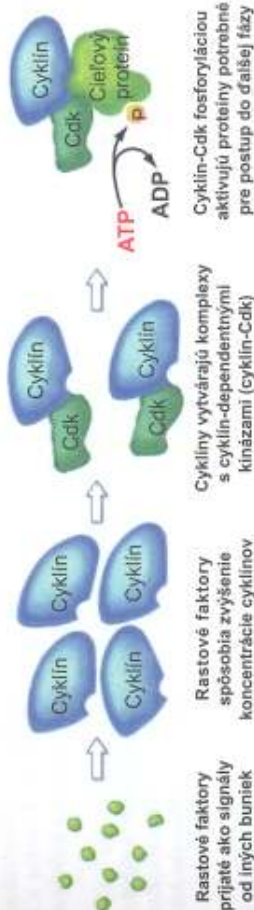
Najradikálnejšie rozhodnutie, ktoré musí systém regulácie bunkového cyklu uskutočniť, je, či sa vôbec bunka bude alebo nebude deliť. Je to rozhodnutie, ktoré je úplne odlišné od ostatných, kde sa rozhoduje už len o prípadnom zastavení už spusteného cyklu potrebného k zvládnutiu dočasného oneskorenia. Toto radikálne rozhodnutie je obzvlášť dôležité u mnohobunkových organizmov. Napríklad v ľudskom tele väčšina nervových buniek a buniek kostrového svalstva sa nedeli po celú dobu života jedinca, kým iné bunky, ako napr. bunky pečene sa normálne delia raz za rok až dva, a určité bunky epitelu sa delia dokonca viac než dvakrát denne.

Rozhodujúcim regulačným bodom, ktorý ovplyvňuje dobu trvania bunkového cyklu, je kontrolný bod v neskej  $G_1$  fáze označovaný aj ako **hlavný kontrolný bod** (u kvasiniek, kde bol prvýkrát identifikovaný, označovaný ako **START**, v živočíšnych bunkách označovaný ako tzv. **restrikčný bod** – bod, z ktorého už niet návratu). Bunky, ktoré sa ďalej nedelia v  $G_1$  kontrolnom bode prechádzajú do tzv. kľudového štádia, ktoré sa odlišuje od ostatných fáz bunkového cyklu a označuje ako  $G_0$  fáza („G zero“). Proteosyntéza je v tejto fáze redukovaná, často až na 30% hodnoty ostatných fáz proliferujúcich buniek. Zastavená je predovšetkým expresia génov potrebných pre reguláciu a ďalšie pokračovanie bunkového cyklu. Dĺžku pozastavenia bunkového cyklu v tomto bode ovplyvňujú pozitívne i negatívne signály, ktoré prichádzajú predovšetkým z vonkajšieho prostredia bunky. Pre cicavce bunky sú pravdepodobne na prekonanie  $G_1$  bodu a ďalšie pokračovanie bunkového cyklu potrebné signály od ostatných buniek – rastové faktory, tzv. mitogény. Ak tieto signály nemajú, bunkový cyklus sa zastavuje v  $G_1$  kontrolnom bode a bunky vstupujú do stavu  $G_0$ . Ak už raz bunka prejde  $G_1$  kontrolným bodom je predurčená k dokončeniu celého bunkového cyklu a jeho zbytok väčšinou prebehne veľmi rýchlo.

## 2.1. Proteíny riadiaceho systému bunkového cyklu

Systém regulácie bunkového cyklu je založený na fosforylácii kľúčových proteínov, ktoré iniciujú alebo regulujú replikáciu DNA, mitózu a cytokinézu. Fosforylácia a defosforylácia patria k najbežnejším spôsobom, ktorými bunka mení aktivitu proteínov. Fosforylačné reakcie, ktoré regulujú bunkový cyklus, uskutočňuje určitá skupina **proteínkináz**, ktoré sú v deliacej sa bunke prítomné v priebehu celého cyklu a ich

koncentrácie sú relatívne konštantné. Aktivované sú však len v určitej dobe cyklu a potom sú rýchlo deaktivované. Aktivita týchto kináz teda vzrastá a klesá cyklickým spôsobom. Niektoré z týchto proteínkináz sú napr. aktivované ku koncu  $G_1$ -fázy a spôsobujú prechod bunky do  $S$ -fázy, iné sú aktivované tesne pred  $M$ -fázou a riadia vstup bunky do mitózy. Za aktiváciu príslušných proteínkináz v určitej fáze bunkového cyklu sú zodpovedne hlavne proteíny z druhej skupiny zložiek regulačného systému, tzv. **cyklíny** (názov odvodený od toho, že koncentrácia väčšina z nich sa cyklicky mení od minima po maximum v závislosti od štádia bunkového cyklu). V jednotlivých fázach bunkového cyklu sú prítomné len určité typy cyklínov a ich prítomnosť v danej fáze je kontrolovaná extracelulárnymi i intracelulárnymi faktormi. Cyklíny sami osebe nemajú žiadnu enzýmovú aktivitu, ale ich naviazanie na kinázy bunkového cyklu je nevyhnuté pre enzýmovú aktiváciu týchto kináz. Kinázy systému regulácie bunkového cyklu sa preto nazývajú **cyklín-dependentné proteínkinázy (Cdk)**.



Koncentrácia každého typu cyklínov vzrastá a následne v určitej fáze bunkového cyklu prudko klesá. Nárast koncentrácie každého typu cyklínov umožňuje aktiváciu svojho Cdk-partnera a po ich rýchлом poklese (degradácii v proteozómoch) sa Cdk vráti do kľudového stavu. Každý komplex cyklín-Cdk ovplyvňuje odlišnú skupinu bunkových proteínov, ktoré sú potrebné pre spustenie a realizáciu príslušnej fázy bunkového cyklu. Výsledkom je, že každý komplex riadi prechod iným bodom cyklu. Tvorba cyklín-Cdk komplexov je však len zahájením celej kaskády týchto procesov.

Po naviazaní cyklínov na Cdk proteínkinázy je výsledný komplex cyklín-Cdk väčšinou inaktívny. Na jeho aktiváciu je potrebná fosforylácia Cdk molekúl **Cdk-aktivačnými kinázami (CAK)**, resp. v prípade existencie inhibičnej fosforylácie (viď nižšie) je na opätovnú aktiváciu Cdk nevyhnutná ich defosforylácia **Cdc25 fosfatázami**. Okrem toho je aktivita Cdk proteínkináz závislá i na úrovni koncentrácie **Cdk inhibičných proteínov**, ktoré inhibujú príslušných Cdk udržiavajú bunky zablokované (zabrzdené) v príslušných kontrolných uzloch.

Aktivita Cdk proteínkináz je teda regulovaná na troch úrovniach: asociáciou s cyklínmi, fosforyláciou, resp. defosforyláciou vlastných molekúl a interakciami s inhibičnými Cdk proteínkináz.

### Cyklín dependentné kinázy

Cyklín dependentné kinázy (Cdk) patria do rodiny proteínkináz, ktorej členovia sú malé proteíny (34–40 kDa). Cdk (ako už bolo vyššie spomínané) sa vyznačujú tým, že ich enzýmatická aktivácia si vyžaduje naviazanie regulačnej podjednotky – cyklínu. Vo väčšine prípadov je pre úplnú aktiváciu Cdk nevyhnutná fosforylácia v blízkosti jej aktívneho miesta.

Účinok aktivovaných Cdk je sprostredkovaný fosforyláciou veľkého počtu proteínov v bunke. Napr. počas mitózy, kedy je pozmenených mnoho aspektov bunkovej architektúry a metabolizmu, cyklín-Cdk fosforylujú stovky rozličných proteínov. Cieľovými substrátmi aktivovaných Cdk môžu byť proteíny podieľajúce sa priamo na replikácii DNA, rozpad jadrovej membrány, kondenzácii chromozómov, tvorbe mitotického aparátu a pod., ale i proteíny regulujúce expresiu príslušných génov (transkripčné faktory), ktorých produkty sa zúčastňujú na regulácii bunkového cyklu.



Aj keď pôvodne boli Cdk identifikované ako enzýmy regulácie bunkového cyklu, členovia rodiny Cdk sa podieľajú i na iných bunkových procesoch. Napr. v živočíšnych bunkách, ktoré obsahujú najmenej deväť rôznych Cdk (Cdk1-9), len štyri z nich (Cdk1, 2, 4 a 6) sú priamo zahrnuté v kontrole bunkového cyklu.

Funkcia Cdk sa v procese evolúcie skoro vôbec nemenila. V prípade nahradenia génu Cdk1 u kvasiniek ľudským génom Cdk1 proliferácia ostala zachovaná a prebiehala normálne. Tento a mnoho ďalších dôkazov poukazujú na fakt, že systém regulácie bunkového cyklu aj po stovkách miliónov rokov ostáva v podstatnej časti nezmenený.

## Cykliny

Koncentrácia väčšiny cyklinov v bunke sa, na rozdiel od Cdk, počas bunkového cyklu dramaticky mení, čo spôsobuje zmeny v aktivite príslušných Cdk a je základom kontroly bunkového cyklu. Regulácia koncentrácie cyklinov, primárne realizovaná zmenami v génovej expresii a deštrukcii cyklinov v procese proteolýzy, preto patrí k najdôležitejším procesom v rámci kontroly bunkového cyklu.

Cykliny, podobne ako Cdk, sa okrem procesu regulácie bunkového cyklu podieľajú i na mnohých iných procesoch v bunke. Cykliny zahrnuté v kontrole bunkového cyklu môžeme rozdeliť na základe načasovania ich expresie a funkcie počas bunkového cyklu do štyroch tried – G<sub>1</sub>/S cykliny, S cykliny a M cykliny – sa priamo podieľajú na regulácii udalostí bunkového cyklu. Štvrtá trieda, G<sub>1</sub> cykliny, sa podieľa na kontrole vstupu bunky do bunkového cyklu v rámci reakcie na extracelulárne faktory.

Koncentrácia G<sub>1</sub>/S cyklinov (cykliny E a stavovcov, aktivujú Cdk2) stúpa v neskorer G<sub>1</sub>-fáze a klesá v skorer S-fáze. Primárnou funkciou G<sub>1</sub>/S cyklin-Cdk komplexov je spustenie postupu cez štart a iniciácia procesov vedúcich k DNA replikácii, predovšetkým znášaním účinkov rozličných brzdiacich systémov, ktoré potláčajú aktivitu S-Cdk v G<sub>1</sub>-fáze. G<sub>1</sub>/S cykliny tiež iniciujú procesy skorých fáz bunkového cyklu, ako napr. duplikáciu centrozómu u stavovcov.

Vzostup hladiny G<sub>1</sub>/S cyklinov je sprevádzaný zvýšením hladiny S cyklinov (cykliny A a stavovcov, aktivujú Cdk1, 2), pričom dochádza k vytváraniu S-cyklin-Cdk komplexov, ktoré sú priamo zodpovedné za stimuláciu replikácie DNA. Hladiny S cyklinov zostávajú zvýšené počas S-fázy, G<sub>2</sub>-fázy i skorer mitózy, kedy v niektorých typoch buniek napomáhajú zahájeniu počiatočných procesov mitózy.

M cykliny (cykliny B u stavovcov, aktivujú Cdk1) sa objavujú ako posledné v poradí, ich koncentrácia stúpa v čase, keď bunka vstupuje do mitózy a vrcholí počas metafázy. M cyklin-Cdk komplexy sú zodpovedné za prevratné zmeny vedúce k zostaveniu kompletného mitotického aparátu a usporiadanie duplikovaných chromozómov v centrálnej rovine deliaceho vretienka počas metafázy. Zámek M cyklin-Cdk komplexov v čase anafázy vedie k ukončeniu mitózy a cytokinéze.

G<sub>1</sub> cykliny (cykliny D 1, 2, 3 u stavovcov, aktivujú Cdk4, 6) napomáhajú koordinovať rast buniek s ich vstupom do nového cyklu. V mnohých typoch buniek sú nevyhnutným podnetom pre stimuláciu vstupu bunky do nového cyklu v G<sub>1</sub> kontrolnom bode. G<sub>1</sub> cykliny sa od ostatných cyklinov líšia v tom, že ich hladiny sa nemenia periodicky počas bunkového cyklu, ale stúpajú postupne ako reakcia na rast buniek a rastové regulačné signály z okolia mimo bunky.

Rozdelenie cyklinov do štyroch tried je užitočné zjednodušenie, ale nedá sa aplikovať univerzálne. Rovnaký cyklin môže plniť rozdielne funkcie a mať rôzne načasovanie expresie v rôznych typoch buniek, a tiež sa môže podieľať na kontrole viac ako len jedného z procesov v rámci bunkového cyklu. Napr. v bunkách embryí mušiek a žiab, kde v rámci bunkového cyklu rozoznávame len S- a M-fázu a nie je jasný kontrolný bod štart, hladina cyklinov E ostáva zvýšená počas celého cyklu a účinkujú ako S cykliny (u stavovcov ako G<sub>1</sub>/S), kým cykliny A sa správajú ako M cykliny (u stavovcov ako S).

## Kontrola aktivity Cdk prostredníctvom fosforylácie

Ako už bolo spomínané – naviazanie cyklinov samotých nestačí na úplnú aktiváciu Cdk zahrnutých v regulácii bunkového cyklu. Kompletná aktivácia Cdk a plnenie normálnej funkcie Cdk v bunkách si vyžaduje fosforyláciu v blízkosti aktívneho miesta príslušnej kinázy. Fosforylácia v danom mieste je katalyzovaná enzýmami nazývanými Cdk-aktivačné kinázy (CAK).

U stavovcov je hlavnou CAK komplex-trimer pozostávajúci z Cdk7, cyklima H a tretej podjednotky Mat1. Okrem funkcie v rámci kontroly bunkového cyklu komplex cyklin H-Cdk7-Mat1 zohráva dôležitú úlohu aj v kontrole bázelej transkripcie génov prostredníctvom ovplyvňovania funkcie RNA polymerázy II.

Aktivita CAK je udržiavaná počas celého bunkového cyklu na konštantne zvýšenej hladine a nie je regulovaná žiadnou doposiaľ známou regulačnou dráhou. V cicavčích bunkách sa fosforylácia Cdk môže uskutočniť až po naviazaní cyklinov. Limitujúcim krokom v aktivácii Cdk je teda naviazanie sa cyklinov a nie aktivačná fosforylácia.

Pretože aktivačná fosforylácia Cdk prostredníctvom CAK nie je regulovaná, dôležitú úlohu v regulácii Cdk aktivít bude zohrávať, okrem aktivačnej, i inhibičná fosforylácia, ktorá napríklad spôsobuje zablokovanie Cdk aktivít. Píne aktívny cyklin-Cdk komplex tak môže byť inhibovaný ďalšou fosforyláciou v jednom alebo dvoch miestach aktívneho miesta enzýmu. Enzým zodpovedný za inhibičnú fosforyláciu jedného miesta je Wee1 a vyskytuje sa (pod rozličnými názvami) u všetkých eukaryot. U stavovcov nachádzame i druhú proteínkinázu, Myt1, ktorá katalyzuje inhibičnú fosforyláciu na dvoch miestach aktívneho miesta Cdk.

V rámci regulačných mechanizmov môže byť táto inhibícia Cdk aktivít fosforyláciou odstránená následnou defosforyláciou. Defosforylácia inhibičných miest je uskutočňovaná Cdc25 fosfatázami.



Zmeny vo fosforylácii príslušných miest v molekule Cdk teda umožňujú „zapínanie“ a „vypínanie“ určitých Cdk a sú dôležité predovšetkým pri aktivácii M-Cdk na začiatku mitózy. Uplatňujú sa však i pri regulácii aktív Cdk pri odpovedi na pôsobenie faktorov ako je napr. poškodenie DNA.

## Regulácia aktivity Cdk inhibičnými proteínmi

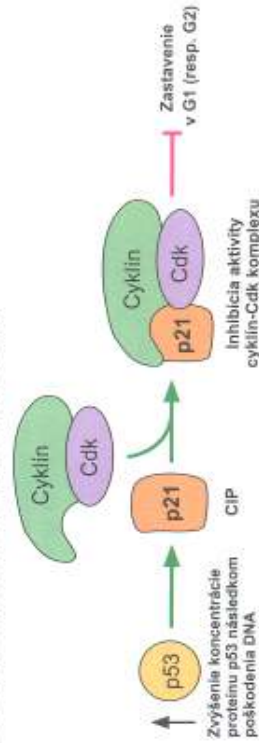
V aktívne sa deliacich bunkách je v skorer G<sub>1</sub>-fáze aktivita väčšiny Cdk proteínkináz potlačená, čoho výsledkom je prechodné stabilné obdobie kedy bunka rastie. Aktivita Cdk počas G<sub>1</sub>-fázy je, okrem iných mechanizmov posilovaná i Cdk-inhibičnými proteínmi (CIP), ktoré viažu a vo všeobecnosti inaktivujú cyklin-Cdk komplexy. Tieto proteíny tiež zohrávajú dôležitú úlohu v procese zastavenia bunkového cyklu v G<sub>1</sub>, resp. G<sub>2</sub>-fáze v rámci odpovede bunky na nepriaznivé podmienky v jej okolí alebo v jej vnútri (napr. poškodenie DNA).

Cdk-inhibičné proteíny, ktoré sa nachádzajú v cicavčích bunkách delíme do dvoch skupín podľa ich inhibičného účinku na Cdk:

- INK4 (Inhibitors of Kinase 4)** – členovia (p15, p16, p18, p19) tejto rodiny CIP sú striktnými inhibítormi a naviažu sa špecificky a preferenčne len na kinázy Cdk4 a Cdk6, čím blokujú ich interakciu s cyklinmi D a vstup bunky do ďalšieho cyklu
- CIP/KIP (Cdk Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein)** – členovia (p21, p27 a p57) tejto rodiny CIP interagujú skoro všetky cyklin-Cdk komplexy a to ich interakciou s oboma podjednotkami cyklin-Cdk komplexov – s Cdk i s cyklinmi. Aj keď primárnou funkciou týchto proteínov je blokovanie progresie bunkového cyklu inhibičiou G<sub>1</sub>/S-a S cyklin-Cdk komplexov, na druhej strane podporujú vstup bunky do nasledujúceho cyklu aktiváciou G<sub>1</sub> cyklin-Cdk komplexov. Na rozdiel od ostatných cyklin-Cdk komplexov, v rámci G<sub>1</sub>-cyklin-Cdk komplexu sa cyklin D a Cdk4 alebo Cdk6 viažu len s veľmi nízkou afinitou. Na zvýšenie tejto afinity, zostavenie a stabilizáciu cyklin D-Cdk4,6 komplexov je nevyhnutná prítomnosť CIP/KIP proteínov, ktoré zosilňujú ich väzbu interakciou s oboma podjednotkami komplexu.

Tento fakt, že CIP/KIP proteíny môžu aktivovať G<sub>1</sub>-cyklin-Cdk komplexy, ale zároveň sú schopné inhibovať G<sub>1</sub>/S- a S-cyklin-Cdk komplexy, má zaujímavé implikácie pre reguláciu rozličných Cdk.

Mechanizmus účinku Cdk-inhibičných proteínov si môžeme demonštrovať na situácii, keď poškodenie DNA spôsobí zastavenie bunkového cyklu v G<sub>1</sub>-fáze, čím sa zabráni jej replikácii. Poškodená DNA spôsobuje zvýšenie koncentrácie a aktivity regulačného proteínu p53. Aktivovaný p53 následne stimuluje transkripciu génu kódujúceho Cdk-inhibičný proteín (CIP) p21, čím dochádza k zvýšeniu jeho koncentrácie. Proteín p21 sa viaže na komplex cyklinov s Cdk, ktorý je zodpovedný za prechod do S-fázy, a blokuje tak jeho funkciu. Zastavenie bunkového cyklu v G<sub>1</sub>-fáze poskytuje bunke čas na opravu DNA pred jej samotnou replikáciou. Podobne môže dôjsť i k zastaveniu v G<sub>2</sub>-fáze bunkového cyklu.



Zvýšenie koncentrácie proteínu p53 následkom poškodenia DNA



## Regulačné mechanizmy riadenia aktivity Cdk počas bunkového cyklu

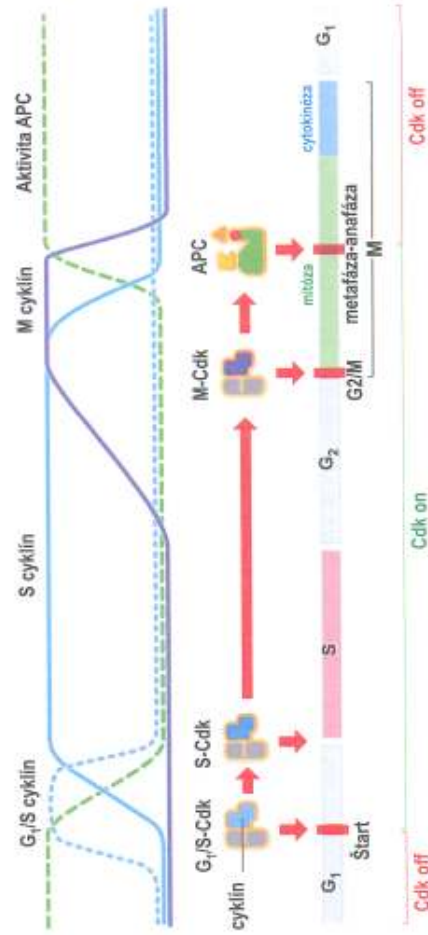
Rôzne komplexy cyklin-Cdk spúšťajú rôzne kroky bunkového cyklu a podľa toho ich môžeme označiť ako  $G_1$  (cyklin *D-Cdk4, 6*),  $G_1/S$  (cyklin *E-Cdk2*),  $S$  (cyklin *A-Cdk1, 2*) a  $M$  (cyklin *B-Cdk1*) cyklin-Cdk komplex. V priebehu každého cyklu sa o ďalšom postupe bunkového cyklu rozhoduje predovšetkým v kontrolných bodoch:

Na začiatku  $G_1$ -fázy sú skoro všetky Cdk proteínkinázy inaktívne. Pohlacenie (supresia) ich aktivity je uskutočňované tromi mechanizmami. Dva z nich sa týkajú cyklinov: génová expresia cyklinov je potlačaná inhibičnými regulačnými proteínmi a degradácia cyklinov je zvýšená prítomnosťou aktivovaného proteínového komplexu APC (anaphase-promoting complex), ktorý zvyšuje degradáciu S a M cyklinov. Tretím mechanizmom supresie aktivity Cdk proteínkináz je vysoká koncentrácia Cdk inhibítorov v  $G_1$ -fáze. Týmto mechanizmom je zabezpečené, že bez splnenia určitých podmienok (veľkosť buniek), či odbrázenia extracelulárnych signálov, nedôjde k začiatku bunkového cyklu.

Vstup bunky do nového bunkového cyklu začína v okamihu, keď signály zvonku (napr. mitogény) spôsobia zvýšenie exprese  $G_1$  cyklinov (príp. v niektorých bunkách dôjde k aktivácii ich latentnej formy). Následne vytvorené  $G_1$  cyklin-Cdk komplexy sú aktivované asociáciou s CIP/KIP proteínmi (p27, p21), čím zároveň dochádza k odblokovaniu inhibičného účinku CIP/KIP na  $G_1/S$  a S cyklin-Cdk komplex. Aktívne  $G_1$  cyklin-Cdk komplexy iniciujú inaktíváciu regulačného inhibítora pRb jeho fosforyláciou a dochádza k postupu cez  $G_1/S$  kontrolný bod (Start). Spúšťa sa expresia génu  $G_1/S$  a S cyklinov, dochádza k aktivácii  $G_1/S$  cyklin-Cdk komplexu, ktorý následne aktivuje S cyklin-Cdk komplex a spolu iniciujú procesy, ktoré vedú k realizácii replikácie DNA (S-fáza), duplikácie centrozómov a ďalších skorých procesov bunkového cyklu.

$G_1/S$  a S cyklin-Cdk komplexy napomáhajú aktivácii M cyklin-Cdk komplexu, ktorý riadi postup bunky cez druhý  $G_2/M$  kontrolný bod. M cyklin-Cdk komplex fosforyluje proteíny, ktoré podmieňujú tvorbu deliaceho vretienka a bunka vstupuje do metafázy.

Postup bunky cez tretí hlavný kontrolný bod v  $M$ -fáze (postup z metafázy do anafázy) je umožnený vtedy, keď M cyklin-Cdk komplex navodí opätovnú aktiváciu enzýmu APC. Aktiváciou tohto enzýmu sa spustia procesy, ktoré spôsobia oddelenie a rozpad sesterských chromatíd, rozpad deliaceho vretienka, dokončenie mitózy a realizáciu cytokinézy.



Pri vstupe bunky do nového bunkového cyklu po mitogénnej stimulácii sa aktivujú  $G_1/S$ -Cdk proteínkinázy (v spolupráci s  $G_1$ -Cdk komplexmi) prakticky okamžite, pretože  $G_1/S$ -cykliny nie sú degradované prostredníctvom APC a dochádza k odstráneniu Cdk inhibičných proteínov z komplexov  $G_1/S$  cyklin-Cdk.  $G_1/S$  cyklin-Cdk komplexy priamo iniciujú niektoré počiatočné procesy bunkového cyklu, ale ich hlavnou funkciou je aktivácia S-Cdk – primárne spustením degradácie Cdk-inhibičných proteínov a inaktíváciou APC. S cyklin-Cdk komplexy následne fosforylujú proteíny, ktoré iniciujú duplikáciu chromozómov v S-fáze. Počas pokračujúcej S-fázy  $G_1/S$ -Cdk stimuluje degradáciu  $G_1/S$ -cyklinov a redukciiu ich génovej exprese, čím dochádza k zníženiu aktivity samotných  $G_1/S$ -Cdk.

Na konci S-fázy dochádza k spusteniu génovej exprese M-cyklinov, čo vedie k zvýšeniu ich koncentrácie a k akumulácii M-Cdk-cyklin komplexov počas  $G_2$ -fázy. Vo väčšine typov buniek je tento

komplex spočiaku udržiavaný v inaktívnom stave inhibíciou fosforyláciou Cdk podjednotky. Na začiatku mitózy dochádza k jej defosforylácii, čo spôsobí aktiváciu M-Cdk proteínkináz a postup bunky cez  $G_2/M$  kontrolný bod. Začína sa tvorba deliaceho vretienka a spolu s ďalšími udalosťami skoré mitózy dochádza k usporiadaniu duplikovaných chromozómov do ekvatoriálnej roviny počas metafázy.

Okrem vstupu do metafázy, M-Cdk-cyklin komplex stimuluje i aktiváciu APC komplexu, ktorý spúšťa procesy vedúce k postupu bunkového cyklu z metafázy do anafázy. Primárnou funkciou APC komplexu v tejto fáze je stimulácia destrukcie proteínov, ktoré držia sesterské chromatidy spolu. APC zapríčňuje tiež destrukciu S- a M-cyklinov, čo vedie k inaktívácii všetkých hlavných Cdk proteínkináz v neskoréj mitóze. V tejto časti mitózy dochádza k zníženiu génovej exprese S- a M-cyklinov a zvyšovaniu produkcie Cdk-inhibičných proteínov. Výsledná inaktívacia príslušných Cdk proteínkináz umožní defosforyláciu ich cieľových molekúl, čo následne vedie k rozpadu deliaceho vretienka a dokončeniu mitózy. Nízke hladiny aktivity Cdk proteínkináz sú udržiavané až do nasledujúcej neskoréj  $G_1$ -fázy, kedy opätovné zvýšenie  $G_1/S$  Cdk aktivít môže spôsobiť vstup bunky do ďalšieho cyklu.

## 2.2. Faktory stimulujúce proliferáciu a rast buniek

Jednobunkové organizmy majú tendenciu množiť sa tak rýchlo ako to len je možné a rýchlosť ich proliferácie je závislá predovšetkým na nutričných zdrojoch v okolí. U mnohobunkových organizmov musí byť proliferácia buniek regulovaná tak, aby sa jednotlivé bunky delili len vtedy, keď je to potrebné – napr. pri raste, obnove, imunitnej odpovedi a pod.. Aby tieto bunky proliferovali, nestačí k tomu len živiny. Musia tiež odbrázať stimulujuce chemické signály od ostatných buniek.

Priebeh bunkového cyklu živočíšnej bunky je najčastejšie pozastavený v kontrolnom bode  $G_1$  až dovtedy, kým bunka neodbrázi promitotické signály vyslané ostatnými bunkami a/alebo signály z vlastného vnútra. Tieto signály pomôžu bunke prekonať antiproliferatívnu vnútrbunkovú reguláciu. Extracelulárnymi signálmi regulujúcimi bunkový cyklus a diferenciáciu môžu byť najrôznejšie činitele: v prvom rade rozmanité **signálne molekuly**, ale rozhodujúcu úlohu zohrávajú napr. aj charakter kontaktu s okolitými bunkami, zloženie extracelulárnej matric, saturačné pomery dýchacích plynov či nízkomolekulové metabolity.

Z historického hľadiska je dôležité poznamenať, že v literatúre sa dodnes často stretávame s pojmami ako rastové faktory, stimulačné faktory, cytokíny, diferenciácie faktory, transformujúce faktory, tkanivové hormóny, a iné. Tieto pojmy vznikali postupne počas objavovania účinkov biomolekúl na bunky a tkanivá. Veľmi často sa stávalo, že prvý objavený vplyv nejakej biomolekuly sa považoval za jej špecifickú biologickú funkciu a často dal molekule aj názov (napr. *transformujúci rastový faktor beta*, pojem ktorý nám už dnes nič nehovorí). Dnes vieme, že medzi uvedenými skupinami „faktorov“ nie sú z biologického hľadiska v podstate žiadne rozdiely, hovoríme preto všeobecne o **signálnych molekulách**. Každá signálna molekula môže v bunke ovplyvňovať až desiatky rôznych signálnych dráh, mení expresiu desiatok najrozličnejších génov, a ovplyvniť množstvo pro-aj anti-proliferatívnych regulačných okruhov zároveň. Výsledný efekt je daný sumáciou všetkých vplyvov pôsobiacich na bunku v danom čase. Nie je preto prekvapujúce, že prídanie tej istej signálnej molekuly k bunkovým kultúram rôznych typov môže vyvolať úplne odlišný efekt. V súčasnosti preto prevláda klasifikácia signálnych molekúl podľa *ontologickej príbuznosti* genetickej sekvencie (hovorme o superrodine IGF- $\beta$ , rodine FGF...) a biologický efekt popisujeme vždy len pre daný typ buniek.

V prípade stimulácie bunkového cyklu, bunka, ktorá je v kľudovom štádiu  $G_0$ , rastie alebo opúšťa toto štádium a vstupuje do ďalšieho bunkového cyklu. U aktívne deliacich sa buniek, stimulovaná bunka ani vôbec nemusí v kontrolnom bode  $G_1$  vstúpiť do bodu  $G_0$ , ale priamo pokračuje cez  $G_1/S$  a celým bunkovým cyklom končiacim jej rozdelením. V najjednoduchšom prípade platí, že kým je „rastový faktor“ prítomný v dostatočnom množstve, delenie buniek pokračuje. V opačnom prípade sa dostane bunka do kľudového štádia  $G_0$ . Niektoré nádorové bunky sa tejto kontrole bunkového cyklu vymykajú. Pochopiteľne, s takouto jednoduchou reguláciou sa stretávame iba zriedkavo a pochopenie komplexnosti bunkových regulácií patrí medzi priority moderného výskumu.

Keďže predmetom tejto kapitoly sú vo všeobecnosti faktory stimulujúce rast a proliferáciu buniek budeme v ďalšej časti textu pre zjednodušenie používať (v literatúre často používaný) všeobecný pojem **rastové faktory (growth factors – GF)**.



Rastové faktory u človeka sú väčšinou *glykozylované proteíny*, ktoré sú produktom rôznych typov buniek – buniek mezenchymového pôvodu, makrofágov, granulocytov, lymfocytov a pod. Ich pôsobenie je rôznorodé, ale vždy začína ich naviazaním na *špecifické membránové receptory*, prevažne s enzýmovou aktivitou.

Tieto receptory môžu mať charakter *proteínkináz*, ktoré (ako už bolo spomínané) fosforylujú príslušné proteíny alebo môžu mať charakter *fosfatáz*, ktoré naopak fosfátovú skupinu z vnútrobunkových signálnych proteínov odštiepujú. Proteínkinázy a fosfatázy manipulujú s fosfátovou skupinou väčšinou na zvyškoch tyrozínu, menej často serínu a treonínu.

Väzba príslušnej signálnej molekuly na receptor aktivuje jednu alebo viac signálnych dráh, ktorými sa signál prenáša až k cieľovej molekule, ktorou je väčšinou molekula DNA, resp. jej špecifický úsek - gén. V konečnom dôsledku sú teda rastové faktory, ako signály, prevedené na génovú úroveň, teda aktivujú expresiu príslušných génov podliehajúcich sa na vstupe bunky do bunkového cyklu a jeho ďalšom postupe.

Niektoré rastové faktory pôsobia *špecificky* len na veľmi úzky okruh cieľových buniek. Napr. NGF (nervový rastový faktor) stimuluje proliferáciu len niektorých nervových buniek, podobne IL-2 (interleukín 2) spôsobuje množenie iba T-lymfocytov. Naproti tomu iné rastové faktory pôsobia *pleiotropne* na viacero typov bunkových populácií. Napr. PDGF (doštičkový rastový faktor), EGF (epidermálny rastový faktor) alebo IGF-I a II (inzulínu podobné rastové faktory) majú široký okruh cieľových buniek a modulujú rast a proliferáciu rôznych typov buniek.

Názov rastových faktorov je odvodený buď od ich funkčného prejavu, alebo podľa bunkovej populácie, na ktorú pôsobia, prípadne podľa buniek, ktoré ich produkujú. V súčasnosti je známych okolo 50 rastových faktorov.

Tabuľka 2-1. Typické rastové faktory a ich funkcie.

Faktor	Zloženie	Funkcia
Doštičkový rastový faktor (PDGF)	Dva reťazce v kombinácii: AA, BB, AB; A-125 aminokyselín B-160 aminokyselín	Mitogén pre bunky spojivových tkanív, bunky hladkej svaloviny, nediferencované bunky neuroglie a pod. Zohráva významnú úlohu v priebehu embryonálneho vývoja, alebo pri hojení rán.
Epidermálny rastový faktor (EGF)	53 aminokyselín (amk)	Mitogén mnohých buniek ektodermového pôvodu a mezodermového pôvodu
Inzulínu podobný rastový faktor I (IGF-I)	70 aminokyselín; 70% homológia s inzulínom	Sprostredkuje účinnok rastového hormónu
Transformujúci rastový faktor b (TGFb)	2 reťazce, každý 112 aminokyselín	Potencuje alebo inhibuje odpoveď väčšiny buniek na iné rastové faktory; reguluje diferenciáciu niektorých buniek
Fibroblastový rastový faktor 2 (FGF-2)	146 aminokyselín	Mitogén pre viac typov buniek ako sú fibroblasty, endotelové bunky, myoblasty; indukuje embryonálny mezoderm
Erythropoetín (EPO)	Glykoproteín (proteín – 165 amk)	Mitogén špecificky stimulujúci len proliferáciu prekursorov erytrocytov
Interleukín 2 (IL-2)	153 aminokyselín	Mitogén pre T-lymfocyty
Nervový rastový faktor	2 reťazce po 118 aminokyselín	Podporuje rast axónov a prežívanie niektorých špecifických neurónov

Väčšina rastových faktorov stimuluje súčasne rast buniek aj bunkovú proliferáciu, ale niektoré stimulujú len jednotlivé uvedené procesy. Môžu tak stimulovať rast buniek, ale nepustia bunku cez G<sub>1</sub> kontrolný bod (napr. neuróny zablokované v G<sub>0</sub> fáze), a naopak, iné umožňujú prechod bunky cez G<sub>1</sub> regulačný bod, ale neovplyvňujú bunkový rast.

Rastové faktory pôsobia na proliferáciu buniek skôr v špecifických kombináciách, ako samotné, pričom pôsobia v nízkych koncentráciách. Tak môžu rôzne kombinácie relatívne malého počtu rastových faktorov selektívne regulovať proliferáciu viacerých typov buniek.

Okrem bunkovej proliferácie a rastu buniek rastové faktory môžu ovplyvňovať aj diferenciáciu buniek v priebehu embryogenézy, zrenie buniek, ich migráciu i funkciu. Rastové faktory podporujúce proliferáciu (delenie buniek) sa nazývajú *mitogény*; iné podporujúce rast a prežívanie buniek sú *trofické faktory*; faktory umožňujúce pohyb buniek – to sú *chemoatraktanty*.

Niektoré rastové faktory sa dostávajú do krvného obehu a pôsobia *endokrinne* na vzdialené tkanivá. Ďalšie účinkujú ako lokálne mediátory, a to buď priamo na susedné cieľové bunky (*parakrinne* pôsobenie), alebo sa späť naviažu na bunku, ktorá ich vyprodukovala (*autokrinne* pôsobenie).

Gény, ktoré zodpovedajú za syntézu rastových faktorov, ich receptorov alebo ďalších peptidov, ktoré sa podieľajú na proliferácii alebo diferenciácii buniek, dostali názov *proto-onkogény* (podrobnejšie o nich pojednáva kapitola 3.).

Iná skupina génov, ktorá produkuje molekuly brzdiace aktivity proto-onkogénov sa nazývajú *tumor-supresorové gény*.

Produkty oboch skupín génov musia byť v rámci správneho fungovania regulácie bunkového cyklu v dynamickej rovnováhe. Akákoľvek ich zmena (alterácia) preto môže spôsobiť nekontrolované množenie buniek a viesť k vzniku a rozvoju nádorov.

### 2.3. Faktory inhibujúce proliferáciu a rast buniek

Medzi faktory inhibujúce bunkovú proliferáciu u vyšších organizmov patrí predovšetkým *nedostatok rastových faktorov* a prítomnosť *produktov tumor-supresorových génov*.

S nedostatkom rastových faktorov úzko súvisí jav tzv. **kontaktnej inhibície**. Proliferácia buniek v bunkovej populácii sa zastaví v prípade, ak hustota populácie je taká vysoká, že sú plazmatické membrány susedných buniek v tesnom kontakte. Tento jav doposiaľ nie je úplne preskúmaný, ale predpokladá sa, že príčinou inhibície proliferácie je obmedzená prístupnosť rastových faktorov, prípadne uvoľňovanie rozpustných rastových faktorov, dotyk špecifických povrchových glykoproteínov, alebo aktivácia bunkových fosfatáz.

**Tumor-supresorové gény** (TSG) sú gény, ktorých produkty potláčajú proliferáciu a rast buniek. Napr. **produkt Rb génu, protein pRb**, hrá kľúčovú úlohu v regulácii postupu bunky cez G<sub>1</sub> kontrolný bod a obsahuje 16 potenciálnych miest pre fosforyláciu. V skoré G<sub>1</sub>-fáze, kedy je pRb v slabo (hypo) fosforylovanom stave, sa viaže na regulačný proteín – transkripčný faktor E2F/DP za vzniku komplexu pRb-E2F/DP a inhibuje tak jeho aktivitu. Transkripčný faktor E2F/DP je zodpovedný za indukciu transkripcie génov nevyhnutných pre S-fázu a replikáciu DNA. Po mitogénnej stimulácii bunky dochádza k indukcii príslušných cyklinov a následnej tvorbe a aktivácii príslušných *cyklin-Cdk komplexov*, ktoré fosforylujú pRb. Fosforylácia pRb spôsobí zmenu jeho konformácie a následné uvoľnenie transkripčného faktoru E2F/DP, ktorý tak môže aktivovať gény potrebné pre S-fázu a bunkovú proliferáciu.



### 3. Karcinogenéza

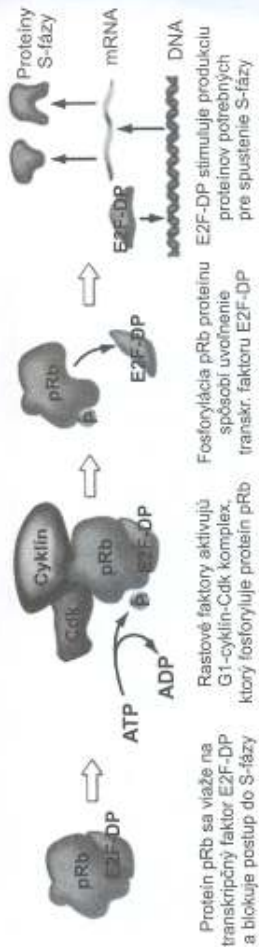
Vo všeobecnosti sa pojmom „rakovina“ (nádor, novotvar, neoplazma) označuje novú a abnormálnu tkanivo (resp. bunky v prípade difúzných typov neoplázií) v mnohobunkovom organizme. Od normálnej somatickej bunky sa nádorová bunka líši predovšetkým narušením regulačným mechanizmom delenia a diferenciácie. Pokiaľ ide o schopnosť infiltrácie do iných tkanív a proliferácie v nich za tvorby nového nádoru, teda schopnosť metastazovania (ak vylúčime difúzne typy neoplázií), rozlišujú sa nádory benigne/nezhubné, ktoré sa metastaticky nešíria, a nádory maligne/zhubné, so schopnosťou invázie (opustenia východzieho ložiska) a infiltrácie do myš tkanív.

#### 3.1. Vývoj maligného nádoru

Vlastnou príčinou neoplastického transformácie bunky sú zmeny na molekulovej úrovni, prevažne kvalitatívne a kvantitatívne zmeny v sekvencii DNA. Vo väčšine prípadov ide o somatické zmeny (postihujúce somatické bunky počas života), ktoré vznikajú buď spontánne (endogénne chyby v replikačnom procese), alebo sú indukované faktormi prostredia - chemickými, fyzikálnymi resp. biologickými.

Množstvo experimentálnych ako aj klinických štúdií uskutočnených v priebehu posledných desaťročí potvrdilo model, podľa ktorého je klinicky rozoznateľný nádor výsledkom viacsťupového procesu nadobúdania alterácií (zmien) v génoch kontrolujúcich proliferáciu, diferenciáciu a smrť buniek (viaczásahová teória karcinogenézy, obr. 3-1). Tento proces trvá niekoľko mesiacov až mnoho rokov, v niektorých prípadoch aj značnú časť dĺžky života. Ide o tzv. latentnú fázu vývoja nádoru, podmienenú tým, že iniciálny podnet nevyvolá tvorbu nádoru v jednom stupni, ale geneticky pozmení bunku (prvotná genetická udalosť, zmena v určitom kritickom géne) v zmysle získania selektívnej výhody - v proliferácii resp. prežívani. Dochádza k tzv. klonálnej expanzii (vytvoreniu populácie). Jedna alebo viac buniek v tejto populácii (nezávisle od seba) neskôr získa ďalšiu mutáciu umožňujúcu prežiť susedné bunky a vytvoriť tak *subklon*. Subklonálna genetická heterogenita nádoru je odrazom postupujúceho vývoja nádorového tkaniva - ďalšie fázy hromadenia alterácií a klonálnej expanzie eventuálne môžu viesť k vzniku subklonu s ich dostatočným počtom („dostatočným počtom zásahov“), čím tento subklon nadobudne maligný fenotyp. Počet nutných zmien je v prípade väčšiny ľudských malignit odhadovaný na 2-20. V transformovaných bunkách sa postupne objavujú ďalšie zmeny v génovej expresii, ide napr. o iniciáciu exprese génov pre angiogénne faktory, stratu exprese adhezivných molekúl, či iné alterácie majuce za následok zmenu biologických vlastností bunky a prispievajúce k vyššiemu stupňu jej autonómnosti. Pravdepodobne väčšina nádorov (ak nie všetky) časom získava rezistenciu k apoptotickým mechanizmom a súčasne aktivuje niektorý z mechanizmov predĺžovania telomerických sekvencií, čo má za následok imortalizáciu (nesmrteľnosť buniek). Posledne spomínané procesy však môžu prebehnúť už v prvých fázach vývoja nádoru a predstavovať tak jeden z mechanizmov získavania selektívnych výhod. Na selekciu subklonu, ktorý je schopný invazívneho rastu a tvorby metastáz, sa podľa tiež tlak prostredia (imunita, terapia).

Približne 5-10% nádorov vzniká na základe predispozície dedenej vo forme mutácií určitých typov génov v zárodočných bunkách (*familialné nádory*). Proces karcinogenézy v týchto prípadoch je urýchlený (počet nutných krokov n-1), avšak v princípoch zhodný s opísaným procesom vzniku *sporadických typov nádorov*.



Obrázok 2-1. Mechanizmus účinku proteínu pRb v regulácii bunkového cyklu.

**Proteín p21<sup>CIP1</sup>** (Cdk-inhibičný proteín, ktorého transkripcia je regulovaná proteínom p53) inaktivuje G1/S-Cdk komplex, ktorý je hlavnou mierou zodpovedný za fosforyláciu pRb a môže tak inhibovať ďalší postup bunkového cyklu.

V dôsledku mutácií tumor-supresorových génov môže dôjsť k porušeniu prirodzenej rovnováhy stimulačných a inhibičných faktorov regulácie bunkového cyklu a následne k nekontrolovanej proliferácii, rastu buniek a vzniku nádorov. Názov tumor supresorového génu je preto väčšinou odvodený z názvu príslušného nádoru, ktorý sa vyvíja v dôsledku jeho mutácie, napr. retinoblastóm - Rb gén, Wilmsov nádor - WT-1 gén, neurofibromatóza typu 1 - NF 1 a typu 2 - NF 2 gény,....atd.

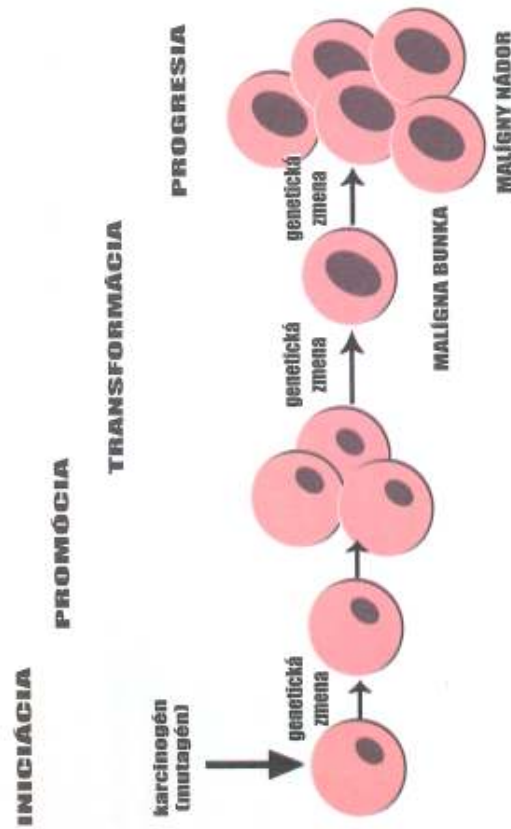
Regulácia bunkového cyklu je komplexný proces, ktorý je ovplyvňovaný mnohými faktormi vonkajšieho i vnútorného prostredia. Kontrolný systém bunkového cyklu zahŕňa spätno-väzobné mechanizmy a ostatné regulačné interakcie, ktoré môžu viesť k ireverzibilnej aktivácii alebo inaktivácii väčšiny Cdk-cyklinových komplexov. Interakcie medzi rozdielnymi Cdk-cyklinovými komplexami zabezpečujú ich správne načasovanie a vzájomnú koordináciu. Aktivácia a inaktivácia každého Cdk-cyklinového komplexu je zabezpečená viacerými mechanizmami, čo umožňuje správne fungovanie systému za rôznych podmienok a v prípade zlyhania niektorého z faktorov. Regulačný systém bunkového cyklu je adaptabilný, čo znamená jeho schopnosť zmeny a prispôbenia načasovania a spustenia príslušných procesov na základe intracelulárnych a extracelulárnych signálov.

Komplexy cyklin-Cdk proteinkináz v spolupráci s mnohými ďalšími faktormi (inhibítory a stimulatory) môžu v určitej fáze bunkového cyklu pôsobiť stimulačne a v inej inhibične. Žiaden z týchto komplexov, či faktorov neovplyvňuje reguláciu bunkového cyklu samostatne, ale dôležité sú vzájomné pomery, asociácie a interakcie príslušných faktorov. Takýmto spôsobom môžu rôzne špecifické kombinácie relatívne malého počtu faktorov selektívne regulovať tak zložité procesy ako sú proliferácia, rast a diferenciácia buniek v mnohobunkových organizmoch.



Predpokladá sa že v rámci latentnej fázy vývoja nádoru pôsobia v uvedenom poradí dva typy faktorov:

1. **iniciátory**, ktoré pôsobia genotoxicky a ireverzibilne poškodzujú DNA. Ide teda o genotoxické karcinogény (mutagény).
2. **promočné faktory**, ktoré podporujú expanziu buniek zmenených iniciátormi. Jedná sa o negenotoxické karcinogény a patrí sem napr. mnoho hormónov. Promočné faktory samy o sebe nie sú schopné vyvolať malignu transformáciu, môžu ju iba podporiť. Pre stimuláciu iniciovaného klonu musí intenzita promočných mechanizmov dosiahnuť určitý stupeň, v opačnom prípade sa môže proces karcinogenézy spomaliť až zastaviť.



### klonálna/ subklonálna expanzia

Obrázok 3-1. Schematické znázornenie procesu karcinogenézy. Blížšie vysvetlenie v texte.

#### 3.1.1. Mutagénne faktory prostredia

##### Chemické látky

Chemické mutagény zahŕňajú zlúčeniny pôsobiace *primo* – deaminačné ( $\text{HNO}_2$ ,  $\text{HSO}_3$ ; výsledkom sú substitúcie), alkylačné (alkylsulfáty, N-nitrozozlúčeniny; alkylácia prebieha na atómových dusíka a kyslíka, a blokuje alebo mení párovanie báz → substitúcie) a iné vysokoreaktívne látky.

Väčšina zlúčenín však mutagénne účinky nadobúda až po svojej *transformácii* metabolickou aktiváciou v organizme (napr. benzo[*a*]pyrén → B[*a*]P-7,8-diol-9,10-oxid, aflatoxín-B<sub>1</sub> → 8,9-dihydro-9-hydroxy-AFB<sub>1</sub>). Jedná sa teda o *promutagény*, z ktorých

konečné mutagény vznikajú až ako vedľajší medziprodukt metabolizmu cudzorodých látok (xenobiotik). Pri metabolickej aktivácii/detoxifikácii chemických zlúčenín sa uplatňuje individuálna, dedične podmienená metabolická kapacita, pre ktorú je typická veľká interindividuálna variabilita (rozdíly medzi jedincami - na génovej (alelovej) a následne aj na proteínovej, teda metabolickej úrovni). Táto dispozícia ovplyvňuje vitavnosť jedince a chemicky indukovanú mutagenézu/karcinogenézu.

Poškodenie DNA môžu okrem exogénnych (promutagénov zapríčiniť tiež reaktívne oxidačné zlúčeniny (hydroxylový radikál, superoxid), ktoré vznikajú počas endogénnych procesov.

##### Fyzikálne faktory

Ziarenie (ionizujúce, UV) podobne ako chemické mutagény zvyšuje riziko výskytu niektorých typov nádorov na základe výsledných zmien v DNA.

**Ionizujúce žiarenie** (Rtg, X, častice s vysokým obsahom energie) pôsobí priamo alebo prostredníctvom rozkladu vody za tvorby hydroxylových radikálov a má za následok vznik krížových väzieb (kovalentných väzieb medzi protifašnými nukleotidmi) alebo zlomov v jednom resp. v oboch komplementárnych reťazcoch. Konečným následkom sú možné prestavby chromozomov (translokácie, delécie a pod.).

**UV žiarenie** v závislosti od vlnovej dĺžky (UVA > 320 nm, UVB 290-320 nm, UVC 200-290 nm; bázy nukleových kyselín majú absorpčné maximum v oblasti 260-280 nm) spôsobuje predovšetkým dimerizáciu dvoch susedných pyrimidínových (T-T, T-C) báz v rovnakom polynukleotidovom reťazi (kovalentné spojenie do cyklobutánového kruhu). Následkom sú chyby v replikačných a transkripčných procesoch v prípade absence korektnej opravy (DNA-repair). Je tiež pravdepodobné, že UV žiarenie prispieva k vzniku excitovaných stavov v molekulách báz s prechodom do ich nestabilných tautomérnych foriem (ktoré umožňujú odchýlky od Watson-Crickovho pravidla párovania báz), čo následne zvyšuje frekvenciu spontánnych mutácií.

##### Biologické vplyvy

Jedným z faktorov, ktoré vyvolávajú neoplastickú transformáciu alebo tento proces „pozitívne“ ovplyvňujú sú vírusy rôznych taxonomických skupín, tzv. „onkogénne vírusy“. **Transformácia vírusom môže byť definovaná ako zmena biologických vlastností bunky, ktorá je výsledkom ovplyvnenia regulácie bunkového cyklu vírusovými gémi resp. ich produktmi, a ktorá udeľuje infikovanej bunke určité vlastnosti charakteristické pre nádor. Tieto zmeny často (nie však vždy) vyplývajú z integrácie vírusového genómu do genómu hostiteľskej bunky.**

Existujú dve známe triedy onkogénnych vírusov, dsDNA vírusy (resp. ds/ssDNA) a ssRNA vírusy, účasť ssDNA a dsRNA vírusov na onkogenéze zatiaľ preukázaná nebola.

##### DNA vírusy:

Podľa spôsobu interakcie buniek s DNA vírusom ich možno rozdeliť na permissívne a nepermisívne. Pri infekcii permissívnych buniek sú exprimované všetky časti vírusového genómu, čo vedie k produktívnej infekcii s vírusovou replikáciou a následnou lýzou bunky. V nepermisívnych bunkách sa exprimuje iba časť vírusového genómu. Ide o skoré kontrolné gény, napr. gén pre veľký T-antigén. K expresii génov pre štruktúrne proteíny nedochádza a teda sa negenerujú ani nové kompletne vírusové častice. Transformácia je preto možná len u



nepermissívnych buniek, resp. u permissívnych buniek v prípade infekcie defektným vírusom (replikačný defekt).

Mechanizmus onkogenézy v prípade infekcie DNA vírusmi primárne spočíva v inhibícii tumor-supresorových proteínov (zvlášť pRb a p53) produktmi vírusových génov (napr. papilomavírusové produkty E6, E7; adenovírusové E1A, E1B proteíny; veľký T-antigén SV-40). V širšom kontexte ide o ovplyvnenie väčšieho počtu rôznych celulárnych (bunkových) molekúl, vrátane produktov protoonkogénov (viď ďalej). Podobne produkcia proteínov s transaktivačným účinkom (transkripcia aktivácia, t.j. aktivácia expície bunkových génov) môže prispievať k narušeniu kontroly bunkového cyklu, a teda aj proliferácie, resp. apoptózy. Integrácia vírusovej DNA do hosťiteľského genómu nie je pre samotnú replikáciu vírusu nevyhnutná, takéto „integranty“ sú však u transformovaných buniek časté (prícom samotný mechanizmus integrácie môže účinkovať v zmysle „inzerčnej mutagenézy“, a teda ovplyvniť expresiu niektorého z kritických génov kontroly bunkového cyklu, viď ďalej v texte).

V mnohých prípadoch je ale vírusovo-indukovaná karcinogenéza multifaktoriálna proces a teda podobne ako v prípade RNA vírusov je jej súčasťou tiež nepriamy mechanizmus - rozvoj chronickej, vírus-specifickej imunitnej odpovede (chronický zápal, degeneračné a regeneračné procesy, ktoré môžu účinkovať synergicky s priamym mechanizmom onkogenézy).

DNA vírusy s preukázaným alebo pravdepodobným vzťahom k malignej transformácii zahŕňajú skupinu **papovavírusov** (HPV, SV-40), **hepadnavírusov** (HBV), **herpesvírusov** (HHV-4/EBV, HHV-8/ Kaposi's Sarcoma Herpes Vírus), **adenovírusov** a **poxvírusov**.

## RNA vírusy:

**Retrovírusy:** Ich genóm (ssRNA) sa integruje (nevyhnutne) do niektorého z hosťiteľských chromozómov (po prepise do dsDNA reverznou transkriptázou, ktorá je súčasťou infekčnej vírusovej častice; vzniká tzv. provírus). Retrovírusy sa na onkogenéze zúčastňujú priamo alebo nepriamo:

### Priama onkogenéza

skupina 1: patria sem napr. cicavce a vtáče retrovírusy typu C, *obsahujúce vo svojom genóme onkogén*, s ktorým sa integrujú do genómu hosťiteľskej bunky. Veľmi rýchle indukujú „polyklonálne“ nádory („single-hit carcinogenesis“, transformácia iniciovaná v každej infikovanej bunke) a účinne tiež transformujú bunky v *in vitro* kultúrach. Jedná sa o tzv. **transdukciu** („**transducing retrovírusy**“), ktorá umožňuje prenos génov prostredníctvom vírusu z donora na recipienta - pri infekcii donora vírus získa určitý gén z genómu hosťiteľskej bunky a následnou infekciou ho preniesie do genómu recipienta. Retrovírusy predstavujú zatiaľ jedinú skupinu vírusov, ktorá týmto spôsobom môže získať protoonkogény z hosťiteľskej bunky a aktivovať ich na onkogény (systémom mutačných zmien počas replikácie, retrovírusy sa vyznačujú vysokou mutabilitou).

skupina 2: retrovírusy, ktoré *neobsahujú vo svojom genóme onkogén* a teda ho ani neprenášajú. Môžu však aktivovať k transkripcii bunkový protoonkogén, vedľa ktorého (alebo do ktorého) sa integrovali, a to prepisom z vlastného promotóru („**cis-acting/nontransducing retrovírusy**“). Ide o tzv. **inzerčnú aktiváciu (mutagenézu)**.

Eventuálne, nemožno vylúčiť ani inzerčnú inaktiváciu napr. niektorého z TSG (tumor-supresorový gén, viď ďalej). Fenomén inzerčnej mutagenézy (aktivácie resp. inaktivácie) však možno zovšeobecniť pre retrovírusy ako také (teda nielen skupiny 2), keďže súčasťou retrovírusovej replikácie je integrácia do hosťiteľského genómu.

Tento typ vírusov indukuje nádory po dlhšom latentnom období (monoklonálny pôvod). Transformácia je však zriedkavá, keďže aj inzercia blízko potenciálneho onkogénu je málo častá.

skupina 3: retrovírusy *obsahujúce vo svojom genóme regulačné gény* (napr. Tax), ktorých produkt je schopný transaktivovať promotory vírusových génov a v súčasnosti s celulárnymi transkripcijnými faktormi resp. ďalšími signálnymi molekulami tiež ovplyvniť reguláciu cyklu bunky (o.i. napr. inaktivovať proteín p53, aktivovať D-cykliny, Cdk2, Cdk4/6). Transformačná účinnosť je nízka, a zvyčajne až po dlhom latentnom období („**trans-activating/nontransducing long-latency retrovírusy**“). Možno sem zaradiť napr. HTLV-1, HTLV-2.

**Nepriama úloha** retrovírusov v onkogenéze spočíva v tom, že indukujú procesy vedúce k funkčným zmenám v imunitnom systéme, čím sa zvyšuje riziko vzniku niektorých typov nádorov, napr. HIV - indukovaná imunosupresia zvyšuje riziko vzniku Kaposiho sarkómu (v súčasnosti s HHV-8 infekciou) a lymfómov non-Hodgkin ako aj Hodgkin typu.

**Flavivírusy** sú ďalšou skupinou potenciálne onkogénnych RNA vírusov. Nedisponujú reverznou transkriptázovou aktivitou, ich ssRNA genóm sa teda neintegruje do genómu bunky. Ako príklad možno uviesť HCV-asociovaný hepatocelulárny karcinóm. Mechanizmus onkogenézy nie je celkom objasnený, podľa určitých indícii však HCV infekcia indukuje tvorbu mutácií a zlomov v DNA, pravdepodobne cez zvýšenie produkcie reaktívnych oxidáčných zlúčenín.

Existujú napr. experimentálne dôkazy o aktivácii expície génu pre inducibilnú NO-syntetázu (iNOS) prostredníctvom NS3 proteínu HCV, čo má za následok tvorbu oxidu dusnatého (NO) s viačermi fyziologickými funkciami v organizme, zároveň však ide o voľný radikál so schopnosťou poškodzovať DNA.

### 3.1.2. Epigenetické zmeny

Pojem „epigenetický“ možno preložiť ako „modifikujúci DNA sekvenciu bez introdukcie (zavedenia) zmien do poradia nukleotidov“ (v širšom zmysle ide o akúkoľvek reguláciu expície či nemutačné modifikácie). K známym a relatívne dobre preštudovaným epigenetickým procesom patri napr. **metylácia** a **acetylácia**. **Metylácia** (katalyzovaná DNA-metyltransferázami) sa vzťahuje na cytozín v sekvencii CpG, teda časti reťazca, kde je cytozín v DNA väzbovane guaninom (metyluje sa C5, vzniká 5-metylcytozín). Regióny DNA s vyššou koncentráciou CpG miest sa označujú ako **CpG ostrovcy** („**CpG islands**“), tieto regióny sú obsiahnuté v 5'-regulačných sekvenciách veľkej časti génov v cicavčom genóme. Ďalším z epigenetických procesov je modifikácia štruktúry chromatinu prostredníctvom (**de**)**acetylácie** histónov, tento mechanizmus je propojený aj s metylačným statusom. Stav, kde je mechanizmom metylácie/deacetylácie potlačená expícia jednej alebo oboch alel génového páru sa označuje ako **imprinting**. Epigenetické procesy sú v zásade normálne a esenciálne pre mnoho funkcií v organizme. Počas ranej embryogenézy dochádza k tzv. „epigenetickému reprogrammingu“, metylácii špecifických génov, resp. alel týchto génov, často v závislosti od maternálneho resp. paternálneho pôvodu. Tento genómový metylačný status sa relatívne stabilne prenáša na nasledujúce bunkové generácie, podľa nových poznatkov však tento status (a podobne acetylačný status histónov) podlieha zmenám v súvislosti so starnutím a environmentálnou expozíciou. Spomenuté zmeny, teda *de novo* vznikajúce epigenetické modifikácie sekvencie DNA v somatických bunkách môžu byť jednou z príčin, resp. jedným zo sekvenčných krokov vedúcich k neoplastickej transformácii bunky.



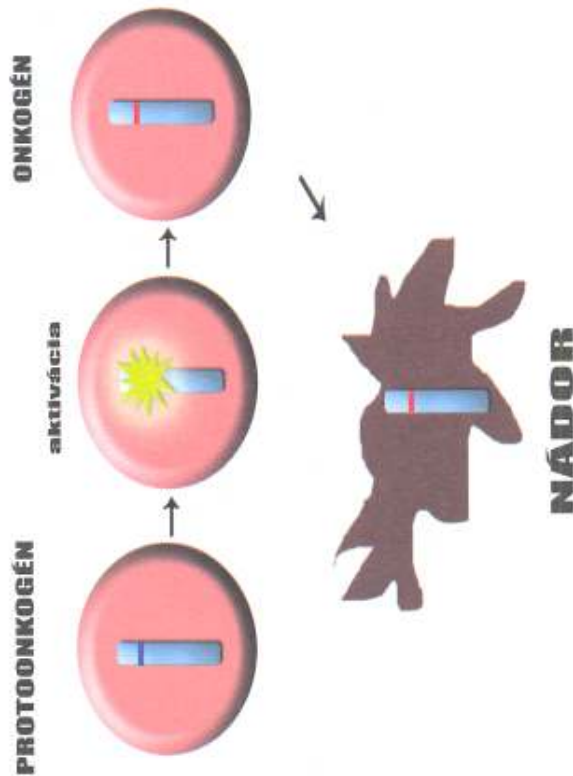
Metylácia promótorov ako mechanizmus utlmenia exprese bola dosiaľ preukázaná u značného počtu tumorsupresorových génov (Rb1, VHL, MLH1, p16<sup>INK4a</sup> a ďalších). Noopak hypometylácia a histónová hyperacetylácia sú zmeny asociované so zvýšením transkripcijnej aktivity a možnou aberrantnou nadexpresiou (napr. protoonkogénov).

### 3.1.3. Gény v procese karcinogenézy

V opísanom procese postupného nadobúdania genetických alterácií počas vývoja maligného nádoru patria k najdôležitejším skupinám cieľových (postihovaných) génov **protoonkogény** a **tumor-supresorové gény**, nepriamo tiež gény kontrolujúce stabilitu genómu (**gény pre DNA repair**), ďalej tzv. **modifikujúce gény** a v prevencii vzniku týchto alterácií aj gény metabolizmu xenobiotík (spomenuté v časti Mutagénne faktory prostredia).

#### Protoonkogény

Ako **protoonkogén** sa označuje štruktúrny gén eukaryotickej bunky, ktorého produkt sa funkčne podieľa na regulácii rastu, proliferácie a diferenciácie. Prítomnosť protoonkogénov v bunke je preto z hľadiska týchto funkcií esenciálna (nevyhnutná). Ich mutačné zmeny môžu viesť k deregulácii týchto procesov a v konečnom dôsledku prispievať k malignej transformácii bunky. Takto zmenené protoonkogény sa označujú ako **onkogény**, proces zmeny sa označuje ako **aktívacia** (obr. 3-2). Možno tiež povedať, že každý protoonkogén je potenciálny onkogén. Účinnok onkogénnej varianty na fenotyp bunky je dominantný, tzn. uplatňuje sa aj v prípade prítomnosti štandardnej protoonkogénnej alely.



**Obrázok 3-2.** Schematické znázornenie procesu aktivácie protoonkogénu (znázornená iba jedna alela). Blížšie vysvetlenie v texte.

Protoonkogény sa často označujú skratkou **c-onc**, kde za „onc“ sa dosadzuje konkrétne označenie príslušného protoonkogénu (napr. c-src, c-myc, c-ras). V označení onkogénu sa vypúšťa c-, resp. sa miesto neho použije skratka v- ak sa jedná o onkogén prenášaný retrovírusom (napr. v-fos, v-myb). Onkogény sa (až na výnimky) nededia, a teda sa ani neuplatňujú vo familiálne dedenej predispozícii na nádorové ochorenia. Konverziou protoonkogénov na onkogény sa mení aktivita nimi kódovaných produktov (protoonkoproteíny → onkoproteíny). V tabuľke 3-1 sú uvedené vybrané onkogény, funkcia ich produktov, typ aktivácie a uplatnenie v patogeneze niektorých ľudských nádorov.

Z mechanizmov aktivácie celulárnych protoonkogénov sú známe nasledujúce:

- **bodová mutácia:** zmena zmyslu kodónu následkom nukleotídovej substitúcie, známa napr. v prípade protoonkogénu c-ras
- **amplifikácia** (vznik mnohonásobných kópií) protoonkogénu s následným zvýšením kvantity produktu bola dokázaná napr. u c-erbB, c-myc. Amplifikované sekvencie sa môžu vyskytovať v dvoch formách: ako súčasť existujúcich chromozómov resp. ako samostatné „double-minute chromozómy“.
- **translokácia:** protoonkogén sa môže dostať pod vplyv promótoru intenzívne exprimovaného génu (jedným z najčastejších partnerov v tomto type translokácií je IGH lokus). Ďalšou možnosťou je vznik fúzneho génu prepisovaného do príslušného hybridného transkriptu. Známym príkladom je translokácia c-abl (chromozóm 9) k lokusu bet na chromozóme 22 za vzniku tzv. chromozómu Philadelphia v prípade chronickej myeloidnej leukémie. Vzniká hybridný bet-abl produkt s konštitutívnu aktivitou cytoplazmatickej tyrozinkinázy.
- **inzerčná mutagenéza** (napr. v prípade c-myc) a **deje spojené s retrovírusovou transdukciou** (napr. v-src) (bližšie rozobrať v časti Onkogénne vírusy).

Onkoproteíny sú v zásade veľmi podobné až zhodné s odpovedajúcimi protoonkoproteínmi, odlišujú sa kvalitatívnymi resp. kvantitatívnymi rozdielmi na funkčnej úrovni. Podľa celulárnej funkcie ich možno rozdeliť do viacerých tried:

(1) **rastové faktory:** aktivácia protoonkogénov kódujúcich rastové faktory nie je častá. Jedným z príkladov je v-sis, ktorý kóduje proteín p28, príbuzný s B-podjednotkou rastového faktora PDGF (významný mitogén buniek mezenchymálneho pôvodu). Onkogén v-sis môže byť do bunky vnesený genómom retrovírusov. Jeho produkt tvorí homodimer, štruktúrne a funkčne analogický BB-forme PDGF, na rozdiel od príslušného protoonkoproteínu je však jeho syntéza konštitutívna (s príslušnými dôsledkami na proliferáciu). Systémom autokrínnej stimulácie môže rastový faktor uvoľnený príslušnou bunkou po väzbe na odpovedajúce receptory stimulovať k proliferácii tú istú (teda materskú) bunku.

(2) **receptory rastových faktorov:** najčastejšie ide o membránové receptory s tyrozinkinázovou aktivitou (fosforylácia Tyr-zvyškov v cieľových proteínoch). Za fyziologických okolností tieto receptory po väzbe príslušného ligandu a následnej dimerizácii prenášajú signál aktiváciou jednej alebo viacerých signálno-transdukčných kaskád. Protoonkogén c-erbB-2 (kódujúci jeden z EGF-receptorov) sa môže aktivovať na onkogén bodovou mutáciou s výslednou Val → Glu zámenou v transmembránovej doméne produktu.



Tým dochádza k stabilizácii receptora do diméru a jeho konštitutívnej aktivity (a teda generovaniu intracelulárneho signálu aj za neprítomnosti ligandu). Ďalšou možnosťou aktivácie c-erbB-2 je amplifikácia, tento mechanizmus je častý u ľudských nádorov

Tabuľka 3-1.

GÉN/ LOKALIZÁCIA	FUNKCIA PRODUKTU	TYP AKTIVÁCIE, TRANSLOKAČNÍ PARTNERI	NADOROVÉ SYNDRÓMY/ SPORAD. NADORY
c-ret (RET) / 10q11	receptorová tyrozínkináza	bodová mutácia translokácia/ GOLGA5 (14q32), RFP (6p21), TRIM33 (1p13), TIF1 (7q32)	syndróm mnohopočetných endokrinných neoplázií (MEN2A, MEN2B), karcinóm štítnej žľazy
c-erbB-2 (ERBB2) / 17q12	receptorová tyrozínkináza	amplifikácia	karcinóm prsníka, ovária
c-src (SRC) / 20q12	nereceptorová tyrozínkináza	bodová mutácia	karcinóm kolorekta, prsníka, lymfómy
c-abl (ABL) / 9q34	nereceptorová tyrozínkináza	translokácia/ BCR (22q11)	leukémie (CML, AML, ALL)
c-H-ras (HRAS) / 11p15	G-protein	bodová mutácia	rôzne typy solídnych nádorov a hematolymfoidných malignít
c-K-ras (KRAS) / 12p12			
c-N-ras (NRAS) / 1p13			
c-myc (MYC) / 8q24	transkripčný faktor	amplifikácia bodová mutácia translokácia/ IGH (14q32), IGK (2p12), IGL (22q11), BTG1 (12q22)	rad solídnych a hematolymfoidných malignít
CCND1 (cyclin-D1) / 11q13	G1-cyklín	amplifikácia translokácia/ IGH (14q32)	lymfómy, karcinómy, retinoblastóm
BCL2 / 18q21	inhibícia apoptózy	translokácia/ IGH (14q32)	lymfómy, karcinómy
MDM2 (HDM2) / 12q14	ubikvitín-ligáza, proteolytická degradačia p53	amplifikácia	sarkomy, gliómy

(3) intracelulárne transducery (prenášače) signálu: do tejto triedy možno zaradiť viaceré odlišných typov molekúl zapojených do intracelulárnych signálnych kaskád, jednou z nich sú tzv. G-proteíny. Protoonkogény c-ras (c-H-ras, c-K-ras, c-N-ras) kódujú monomérne G-proteíny (p21<sup>ras</sup>) vyznačujúce sa GTP-ázovou aktivitou. Tieto proteíny prenášajú signál z membránových receptorov na cieľové proteínkinázy a sú esenciálne pre normálny rast a proliferáciu buniek. Ras-onkoproteíny sú schopné naďalej viazať GTP a interagovať s cieľovými proteínmi, strácajú však schopnosť hydrolyzy GTP na GDP. V takomto prípade je ras-proteín v trvale aktívnej (GTP-viazanej) forme, a jeho stále pôsobenie na cieľový proteín môže indukovať, resp. prispievať k malignej transformácii bunky.

Ras-proteíny sa vyznačujú vnútornou (vlastnou) GTPázovou aktivitou, ktorá je však slabá a sama o sebe nepostačujúca k rýchlej hydrolyze GTP, a teda k inaktivácii ras-proteínu v GTP-viazanej forme. Táto vnútorná GTPázová aktivita sa silne zvyšuje interakciou s GAP-proteínom („GTPase activating protein“, proteín aktivujúci GTPázu). Ras-onkoproteín sa k účinku GAP stáva rezistentným, teda stráca schopnosť hydrolyzy GTP aj za prítomnosti GAP.

Podstatou aktivácie ras protoonkogénov sú missense mutácie postihujúce špecifické kodóny. Ďalšími protoonkogénmi tejto skupiny s preukázanou aktiváciou na onkogény sú napr. c-src (trieda tzv. nereceptorových (cytoplazmatických, solubilných) tyrozínkináz), a c-raf (serin/threonin proteínkinázy).

(4) nukleárne (jadrové) transkripčné faktory: protoonkogény c-jun a c-fos kódujú časť transkripčného faktora AP-1, ktorý iniciuje transkripciu množstva génov. Predpokladá sa, že intenzívna expresia týchto protoonkogénov po mitogénnej stimulácii trvá relatívne krátku dobu, a produkty sa vyznačujú vnútornou nestabilitou. Aktivácia na onkogény umožňuje konštitutívnu, na mitogénnej stimulácii nezávislú expresiu, resp. zvýšenie stability produktov. K ďalším protoonkogénom tejto skupiny možno zaradiť napr. c-myc, c-ets, c-rel.

(5) proteíny kontrolujúce bunkový cyklus: do tejto kategórie možno zaradiť napr. gény pre cyklíny a cyklín-dependentné kinázy (Cdk), v rôznych typoch nádorov postihované spektrom alterácií (bodové mutácie, génové amplifikácie, translokácie).

(6) iné molekuly, napr. s antiapoptotickou funkciou (Bcl-2), modifikujúce proteolýzu (Mdm2) a ďalšie.

### Tumor-supresorové gény (TSG)

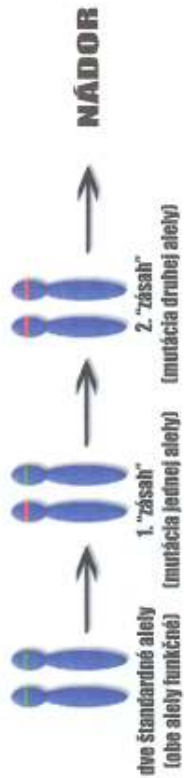
TSG spolu s protoonkogénmi predstavujú najdôležitejšiu skupinu génov podieľajúcich sa na procesoch regulácie bunkového cyklu, a teda aj neoplastickej transformácie. Na rozdiel od (proto)onkogénov, produkty kódované TSG majú antiproliferačný účinok, podporujú diferenciáciu a apoptózu.

Pojem „tumor-supresorový“ nie je z odborného hľadiska absolútne exaktný, v zásade označenie „tumor“ znamená akékoľvek zväčšenie, teda nie iba nádorového pôvodu. Presnejší je preto pojem „nádor-supresorový“, z historického hľadiska sa však podstatne častejšie používa pojem „tumor-supresorový“.

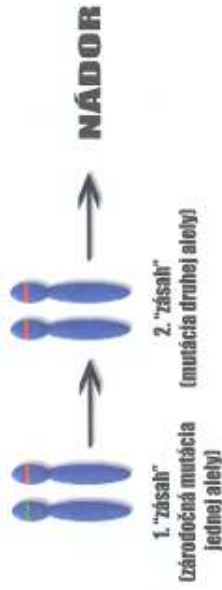
Vo všeobecnosti možno povedať, že mutácie tumor-supresorových génov majú recesívny charakter, teda k poruche bunkového cyklu vedie až inaktivácia oboch alel určitého TSG (s výnimkou „dominantne negatívnej mutácie“ v géne p53, resp. ďalších TSG; vysvetlené v ďalšom texte). S tým súvisí tzv. „dvojzášahová teória“ (obr. 3-3), ktorú ako prvý formuloval A. G. Knudson (1971) pri objasňovaní vzniku hereditárneho (dedičného) retinoblastómu. V prípade častejšej sporadickej formy ide o postupnú, avšak náhodnú somatickú inaktiváciu/elimináciu oboch alel v jednej bunke siete, u hereditárnej formy (familiálny typ nádoru) sa jedna mutovaná alela dedí prostredníctvom zárodočných buniek. Príslušný jedinec je teda heterozygot, vo všetkých svojich bunkách obsahujúci štandardný ako aj inaktívovaný typ alely, následkom čoho je predispozícia k neoplastickej transformácii. V heterozygotnom stave sa dominantne uplatňuje účinok štandardnej alely, teda jej inhibičný účinok na proliferáciu, a zdedená predispozícia sa zatiaľ neprejavuje. K fenotypovému efektu - iniciácii rozvoja nádorového klonu buniek siete (resp. iných typov tkanív) dochádza až po inaktivácii/eliminácii zvyšnej intaktnej (funkčnej) alely. Tento proces je známy ako *strata heterozygotnosti* (LOH, „loss of heterozygosity“). Medzi LOH mechanizmy možno zaradiť deléciu, nondisjunkciu samotnú resp. v kombinácii s duplikáciou, mitotickú rekombináciu, génovú konverziu a v širšom zmysle tiež bodovú mutáciu.



### "SPORADICKÝ" TYP NÁDORU



### "FAMILIÁLNY" TYP NÁDORU



**Obrázok 3-3.** Schematické znázornenie procesu vzniku sporadického a familiálneho (hereditárneho) typu nádoru prostredníctvom inaktívácie TSG. Blížšie vysvetlenie v texte.

Väčobecné akceptovaný „*dvójzásahový model*“ je narušený zvyšujúcim sa počtom dôkazov o tom, že mutácie v TSG nie sú vždy kompletne recesívne (po objavení fenoménu *haploinsuficencie* a vzrastajúcu počtu *haploinsuficijných TSG* - ide o neschopnosť jednej alely zabezpečiť plnú funkčnosť definovanú prítomnosťou dvoch nemutovaných, „wild-type“ alel). Teda za špecifických okolností môže byť „jeden zásah“ (inaktívacia/eliminácia len jednej alely) dostatočný pre expresiu aberantného fenotypu, napr. urýchlenie procesu karcinogenézy.

Alterácie **Rb1** génu sú podobne ako zmeny génu **p53** nachádzané u širokého spektra ľudských nádorov. Produkt génu, nukleárny fosfoprotein (pRb), je hlavným negatívnym regulátorom bunkového cyklu (regulácia prechodu G1/S, indukcia diferenciácie) - pRb v defosforylovanom/hyposforylovanom stave asocjuje s niekoľkými transkripčnými faktormi, čím inhibuje ich transaktivačné funkcie. Z tejto skupiny má najväčší význam E2F (resp. heterodimér E2F/DP). Defosforylácia teda navodzuje aktivitu pRb, naopak hyperfosforylovaná forma je inaktívna (dochádza k uvoľneniu E2F a stimulácii delenia aktiváciou transkripcie cieľových génov, esenciálnych pre prechod do S-fázy a replikáciu DNA).

Okrem už uvedených mechanizmov inaktívacie/eliminácie **Rb1** génu je v prípade infekcie buniek určitými typmi vírusov možná tiež inaktívacia jeho produktu niektorými vírusovými proteínmi (papilomavírusový E7 proteín, adenovírusový E1A proteín, T-antigén SV-40), s uvoľnením E2F a príslušnými dôsledkami na bunkový cyklus. Zmeny postihujú tiež gény kódujúce pRb regulátory (cyklíny, Cdk, INK4-inhibitory Cdk).

Dráha INK4/Cdk4(6)/D(1-3)pRb (Rb-dráha) je deregulovaná vo veľkej časti ľudských nádorov, pričom mutácie postihujúce túto dráhu sú charakteristické vzájomne sa vylučujúcim vzorcom výskytu - nádory s deficitom p16<sup>INK4a</sup> majú zvýšenú normálnu pRb expresiu, zatiaľ čo nádory s pRb defektom ďalej exprimujú p16<sup>INK4a</sup>. V prípade normálnej expzie oboch uvedených génov sa často zistuje aktivácia génu pre Cdk4 resp. cyklín D1. Amplifikácia Cdk4 génu bola pozorovaná v niektorých typoch sarkómov a gliómov, kým mutácie, ktorých následkom je rezistencia k INK4-sprostredkovanej inhibícii boli zaznamenané v prípadoch sporadického ako aj dedičného melanómu. Z génov pre D-cyklíny je u ľudských nádorov jediným frekventne aktivovaným gén pre cyklín D1.

Treba poznamenať, že za *in vitro* podmienok samotná deregulácia Rb-dráhy neudelfuje bunkám selekčnú výhodu urýchlenej proliferácie. Na druhej strane však znížená odpoveď na extracelulárne rasi-inhibičné signály môže mať za následok únik od terminálnej diferenciácie, resp. senescenčných procesov (súvisiacich so starutím). Vo všeobecnosti však deregulácia Rb-dráhy iniciuje kompenzátny (na p53-závislý) transkripčný program a teda v konečnom dôsledku inhibíciu bunkového cyklu resp. apoptózu. Následné zlyhanie p53 funkcie akýmkoľvek spôsobom (vrátane zmen v expresii/funkcii ktoréhokoľvek z esenciálnych prirných alebo nepriarných modifikátorov p53) umožní pokračovanie v proliferácii a tým abnormálne predĺženie životnosti, s možnosťou hromadenia ďalších alterácií.

**Tabuľka 3-2.**

GÉN/ LOKALIZÁCIA	AKTIVITA, PRODUKTU (PRODUKTOV)	NADOROVÉ SYNDRÓMY/ SPORADICKÉ NÁDORY
<b>p53 (TP53)/ 17p13</b>	transkripčný faktor, regulácia bunkového cyklu a apoptózy, kontrola integrity genómu	<i>Li-Fraumeni syndróm</i> , väčšina sporadických nádorov
<b>RBI/ 13q14</b>	nukleárny fosfoprotein, regulácia prechodu G1/S vzhľadom na E2F	<i>hereditárny retinoblastóm</i> , mnoho sporadických nádorov
<b>INK4a/ARF (CDKN2A)/ 9p21</b>	regulácia bunkového cyklu, nepriama aktivácia pRb a p53	<i>hereditárny melanóm</i> , <i>Li-Fraumeni syndróm</i> , mnoho sporadických nádorov
<b>SMAD4 (DPC4)/ 18q21</b>	transkripčný faktor, mediátor TGF- $\beta$ signálnej transdukcie (prenosu)	<i>syndróm juvenilnej gastrinovesimálnej polypózy</i> , pankreatické, kolorektálne nádory
<b>APC/ 5q21</b>	regulácia aktivity $\beta$ -katenínu a Wnt-signalnej transdukcie	<i>syndróm familiálnej adenomatóznej polypózy (FAP)</i> , kolorektálne nádory
<b>VHL/ 3p25</b>	regulácia proteolýzy HIF („hypoxia-inducible factor“)	<i>Von Hippel-Lindau syndróm</i> , renálny karcinóm
<b>NFI/ 17q11</b>	proteín aktivujúci GTPázu (GAP), regulácia aktivity ras-proteínov	<i>Neurofibromatóza I (Von Recklinghausen)</i> , sarkómy, gliómy
<b>PTEN (MMAC1)/ 10q23</b>	fosfatáza, stimulácia apoptózy inhibíciou PI3K-PKB/Akt signálnej dráhy	<i>Cowdenov syndróm</i> , glioblastómy, karcinómy rôznych typov
<b>WT1/ 11p13</b>	transkripčný faktor, modulácia expzie p53 responzivných génov	<i>Wilmsov tumor (hereditárny nefroblastóm)</i>
<b>CHK2/ 22q11</b>	Ser/Thr proteínkináza, esenciálna fosforylácia p53	<i>Li-Fraumeni syndróm</i>

Funkčná molekula proteínu **p53** je tetramér, pôsobiaci ako transkripčný faktor, ktorý suprimuje (potlača) proliferáciu v odpovedi na stresové stimuly (poškodenie DNA, hypoxia, teplotný šok, metabolické zmeny, expozícia určitým cytokinom, aktivácia protoonkogénov). V normálnych bunkách sa proteín p53 vyskytuje v nízkych koncentráciách pri veľmi krátkom polčase rozpadu. Jeho aktivácia po DNA poškodení zahŕňa komplex sekvencie-spcifických pozitraslačných modifikácií (fosforylácia, acetylácia), čím sa dosiahne dlhšia životnosť ako aj konformácia schopná väzby na DNA a transaktívacie príslušných génov. K transkripčným cieľom p53 patrí množstvo génov pre proteíny signálnych dráh vedúcich k inhibícii bunkového cyklu alebo apoptóze, vrátane p21<sup>CIP1</sup> (CIP/KIP rodina inhibítorov Cdk), Bax



(indukcia apoptózy), GADD45 (inhibícia cyklu väzbu na proliferáciu nukleárny antigén PCNA) a ďalších.

Inaktivácia p53 génu býva jedným z prvých krokov, vedúcich k malignej transformácii pri vývoji rady nádorových ochorení. Pacienti s **Li-Fraumeni syndrómom** dedia jednu inaktívnu alelu prostredníctvom zárodočných buniek. Z hládiska „klasickej“ knudsonovskej teórie sa fenotypový efekt, podobne ako v prípade Rb génu, prejaví až po strate funkcie druhej intaktnej alely (LOH). Klinicky rozpoznateľný nádor sa objavuje (ako už bolo spomenuté) po určitej latentnej dobe vývoja, avšak kratšej než v prípade sporadických typov nádorov.

Ak vezmeme do úvahy spomínaný fenomén *haploinsuficiencie*, je možná expresia fenotypu, teda urýchlenie procesu malignej transformácie, aj v heterozygotnom stave - podľa niektorých už dostupných údajov môže p53 suprimovať (potlačovať) vývoj nádoru „na dávke-závislým spôsobom“ („gene dosage-dependent manner“). Množstvo génov, vrátane p53, je pleiotropných - zahrnutých v mnohých celulárnych procesoch, pričom niektoré z týchto procesov môžu byť viac „na dávke závislé“ než iné. Pre niektoré špecifické fenotypy preto môže mať inaktivácia/eliminácia jednej alely väčší, pre iné iba malý efekt. Podobne p53 v heterozygotnom stave môže byť haploinsuficientný pre niektoré funkcie, napr. indukciu apoptózy, avšak recesívny napr. pre inhibíciu bunkového cyklu.

Malá časť pacientov s **Li Fraumeni syndrómom** nededi priamo mutáciu v gene p53, ale mutácie v ďalších súvisiacich (interakčných, modifikačných) génoch (napr. v Chk2-proteínkináze aktivujúcej p53 fosforyláciu; v Mdm2 gene s funkciou hlavnej ubiquitín-ligázy p53; alebo v gene p14<sup>ARF</sup> (súčasť INK4a/ ARF lokusu), ktorého produkt inhibuje Mdm2-sprostredkovanú degradáciu p53 (dráha p14<sup>ARF</sup>/Mdm2/p53).

V prípade p53 proteínu je známy tiež fenomén „*dominantne negatívnej mutácie*“ - tvorba komplexov (oligomerizácia) mutaného so štandardným typom proteínu, následkom čoho je inaktivácia funkcie p53 bez straty heterozygotnosti. Tento fenomén sa pravdepodobne uplatňuje v viacerých TSG, ktorých produkty sú funkčné ako oligoméry. Ďalšou možnosťou inaktivácie funkcie proteínu p53 je jeho interakcia s vírusovými onkoproteínmi (E1B, E6, T-antigén).

V tabuľke 3-2 sú uvedené niektoré TSG, s funkciou príslušného produktu a uplatnením v nádorovej patogenéze.

### Gény pre DNA-repair (opravu)

Gény pre DNA-repair (nazývané tiež mutátorové, niekedy priraďované aj k TSG) zodpovedajú za reparáciu poškodenia, resp. opravy chýb v DNA. Na rozdiel od onkogénov a inaktivovaných TSG teda defektné produkty týchto génov neposkytujú bunke priamo schopnosť nekontrolovanej proliferácie (a eventuálnej malignej transformácie), tento proces však nepriamo podporujú zvyšovaním frekvencie zmien v génome (vrátane zmien v spomínaných cieľových génoch). Defekty v génoch pre DNA-repair majú recesívny charakter, teda k fenotypovému efektu pravdepodobne vedie až inaktivácia oboch alel určitého génu (klasický TSG model).

V posledných rokoch však podobne ako v prípade TSG pribúdajú dôkazy o existencii haploinsuficiencie aj v prípade génov pre DNA-repair, uvažuje sa o aditívnom efekte heterozygotného stavu dvoch alebo viacerých génov.

Existuje niekoľko systémov (tried) opravy DNA s veľkým množstvom dosiaľ identifikovaných génov, v tabuľke 3-3 sú uvedené niektoré z nich s eventuálnym názvom dedičného syndrómu, ak bol popísaný.

Jedným z príkladov je hereditárny **nepolypózny karcinóm kolorekta (HNPCC, Lynchov syndróm I)**, v niektorých prípadoch asociovaný so vznikom karcinómov aj v ďalších orgánoch (**Lynchov syndróm II**). Molekulámou podstatou je defekt niektorého z génov triedy „*mismatch repair*“ (**MMR, oprava chybného párovania**) - MSH2, MLH1, MSH6 resp. PMS2. Viedľajším fenotypovým (a súčasne diagnostickým) prejavom je mikrosatelitová instabilita

(nestabilita dĺžky repetitívnych sekvencií v génome), ktorá je prítomná u približne 90% prípadov HNPCC, avšak iba v 15% prípadov sporadických nádorov. Predispozícia (jedna defektná alela niektorého z uvedených génov) sa dedí autozomálne dominantne, priemerný vek manifestácie ochorenia sa pohybuje medzi 45-55 rokmi. Podľa najnovších údajov boli predosle odhady pre penetranciu (pravdepodobnosť vzniku ochorenia) nadhodnotené (80%), súčasné čísla sa pohybuju od 40-50%.

Tabuľka 3-3.

TRIEDA/GÉN	AKTIVITA PRODUKTU, NIEKTORÉ INTERAKCIE	CHROMOZ. LOKALIZÁCIA
<b>Bázový excízny repair (BER)</b> UNG, MBD4, TDG APE1, APE2 POLB LIG3, XRCC1	DNA-glykozylázy AP-endonukleázy, PCNA-dependentný BER DNA-polymeráza β DNA-ligáza (LIG3), ligázový faktor (XRCC1), komplex LIG3/XRCC1	12q23, 3q21, 12q24 14q12, Xp11 8p11 17q11, 19q13
<b>Priama oprava poškodenia</b> MGMT	O <sup>6</sup> -metylG-alkyltransferáza	10q26
<b>Oprava chybného párovania („mismatch repair“, MMR)</b> MSH2, MSH6, MLH1, PMS2	<i>Lynchov syndróm</i> , postreplicačný mismatch repair, heterodimér MSH2/MSH6 a MLH1/PMS2, časť „BASC-komplexu“ („BRCA1-associated genome surveillance complex“)	2p22, 2p16, 3p21, 7p22
<b>Nukleotidový excízny repair (NER)</b> XPC, RAD23B XPA XPB (ERCC3) XPD (ERCC2) XPG (ERCC5) ERCC1, XPF (ERCC4) DDB1, DDB2 CSA (ERCC8), CSB (ERCC6), XAB2	rozpoznanie poškodenia, komplex XPC/RAD23B iniciácia reparatu (súčasť preiniciálneho komplexu) 3'-5' DNA helikáza, podjednotka TFIIH 5'-3' DNA helikáza, podjednotka TFIIH endonukleáza, 3'-incízia, interaguje s PCNA endonukleáza, 5'-incízia, heterodimér ERCC1/XPF väzba na pyrimidinové diméry, heterodimér DDB1/DDB2, defektný u XPE <i>Cockayneov syndróm</i> , s transkripciou prepojený NER, komplex CSA/CSB/XAB2/RNA-polymeráza II	3p25, 9q31 9q22 2q21 19q13 13q33 19q13, 16p13 11q12, 11p12 5q12, 10q11, 19p13
<b>Homologická rekombinácia (HR)</b> BRCA1, BRCA2 NBS1	<i>hereditárny karcinóm prsníka/ovária</i> , reparácia ds DNA zlomov na HR-báze „ <i>Nijmegen breakage</i> “ syndróm, reparácia ds DNA zlomov, časť BASC-komplexu	17q21, 13q12 8q21
<b>Neomologický repair („nonhomologous end-joining“, NHEJ)</b> Ku70 (XRCC6), Ku80 (XRCC5) LIG4, XRCC4	3'-5' DNA helikáza, heterodimér Ku70/Ku80, reparácia ds DNA zlomov a V(D)J rekombinácia na NHEJ-báze DNA ligáza (LIG4), ligázový faktor (XRCC4), LIG4/XRCC4 komplex, NHEJ ligácia	22q13, 2q35 13q33, 5q13

Pozn: XP - *xeroderma pigmentosum*



Defekt v génoch triedy „mukleotidový excízný repair (NER)“ je príčinou autozomálne recesívne (obe zdedené alely príslušného génu defektné) dedičného ochorenia *xeroderma pigmentosum (XP)*. Ide o prekancerózný syndróm s extrémne vysokou citlivosťou na UV-iradiáciu spôsobujúcu poškodenie (totálnou absenciou schopnosti reparovať pyrimidínové diméry), charakterizovaný spektrom klinických symptómov, kde dominuje poškodenie kože so vznikom mnohonásobných benigných a maligných nádorov.

*In vitro* bunková komplementačná analýza demonštrovala, že XP je geneticky heterogénna skupina ochorení (v rámci obmedzenia na NER defekt) - boľí fúzované (spojené) fibroblasty rôznych XP pacientov s následným zhoršením efektivity DNA-repairu po UV-expozícii. Korekcia poškodení naznačila, že každá bunková línia má unikátny NER defekt, toto zistenie viedlo k identifikácii 7 špecifických komplementačných skupín (XPA-G).

K ďalším ochoreniam zapríčineným defektom v niektorom géne systému opráv DNA patria napr. *Cockayneov syndróm*, „*Nijmegen breakage*“ *syndróm*, *Ataxia teleangiectasia*, *Bloomov syndróm*, *Wernerov syndróm*, *Fanconiho anémia*.

### Modifikujúce gény

Idie o širokú skupinu génov, ktorých alterácia môže ovplyvniť vznik a rozvoj nádorového procesu - ich produkty môžu pozitívne alebo negatívne pôsobiť na priebeh karcinogenézy, s interindividuálnou resp. interfamiliálnou variabilitou. Ďalší výskum v tejto oblasti je otázkou budúcnosti, použitím najnovších techník genomiky a proteomiky

## 4. Diferenciácia, starnutie a smrť bunky

Väčšina mnohobunkových organizmov sa skladá z buniek, ktoré sa od seba líšia svojou štruktúrou a funkciou. Napríklad bunky pokožky (epidermy) sú odlišné od buniek, ktoré vytvárajú vnútorné orgány (srdce, pľúca a pod.). V ľudskom organizme sa nachádza asi 200 rozličných typov buniek, ktoré tvoria 4 resp. 5 typov tkanív (epitely, spojivá, svalovina, nervové tkanivo a krv). Všetky tieto typy buniek vznikli v procese individuálneho vývinu z jednej jedinej bunky - oplodneného vajíčka (u niektorých organizmov je nový jedinec schopný sa vyvinúť aj z neoploďneného vajíčka pripadne z inej bunky). Tento proces rozlišovania buniek nazývame **diferenciácia** a špecializované bunky **diferencovanými bunkami**. Diferencované bunky vykonávajú v organizme rôzne funkcie, v priebehu času sa však ich funkcie a výkon znižujú, bunky starnú, opotrebovávajú sa a nakoniec zanikajú.

### 4.1. Diferenciácia buniek

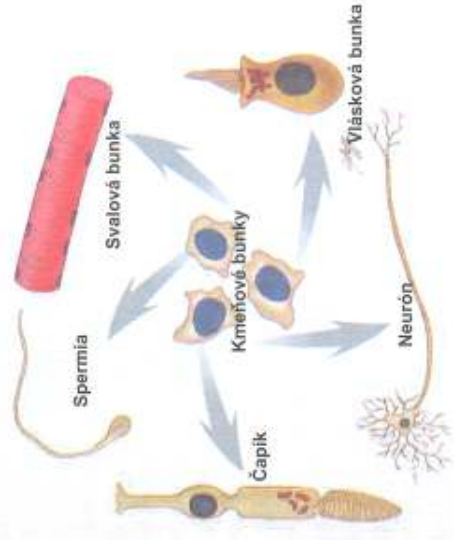
**Diferenciácia** je proces, pri ktorom sa nediferencovaná bunka stáva špecializovanou bunkou v rámci organizmu (napr. svalovou alebo pečevnou bunkou). Proces diferenciácie je pomerne zložito regulovaný, pričom sa doňho zapájajú rozmanité vonkajšie aj vnútorné faktory. Jeho výsledkom je diferencovaná bunka so špecifickými štruktúrami a tvarom, schopná vykonávať určité funkcie. Stupeň diferenciácie buniek je veľmi rôzny a prejavuje sa na rôznych úrovniach. Na molekulovej úrovni sa rôzne diferencované bunky od seba môžu líšiť napríklad prítomnosťou alebo neprítomnosťou molekúl určitých receptorov v plazmatickej membráne. Na biochemickej úrovni môžu byť medzi diferencovanými bunkami veľké rozdiely v enzýmovom vybavení jednotlivých buniek. Diferenciácia na molekulovej a biochemickej úrovni môže mať za následok rozdiely v polarite diferencovaných buniek, ich metabolickej aktivite alebo citlivosti na rôzne signály. Ďalej sa diferencované bunky medzi sebou môžu líšiť na úrovni jednotlivých štruktúr (štruktúrna úroveň), ale aj na bunkovej úrovni svojou veľkosťou a tvarom. Niektoré plne diferencované bunky si zachovávajú schopnosť deliť sa za určitých podmienok, iné svoju delivú schopnosť strácajú. Stupeň diferenciácie, keď bunka stráca schopnosť sa deliť, sa nazýva *terminálna diferenciácia*. Medzi terminálne diferencované typy buniek patria niektoré bunky nervovej sústavy (neuróny) alebo erytrocyty.

Telo cicavcov je tvorené tromi základnými kategóriami rôzne diferencovaných buniek, medzi ktoré patria: *zárodočné bunky*, *kmeňové bunky* a *telové (somatické) bunky*. Každá z týchto buniek má svoju vlastnú kompletnú kópiu génomu (jednu alebo viac). Výnimkou sú určité typy buniek, ktorým po úplnej diferenciácii chýba jadro (napr. erytrocyty u človeka). Väčšina cicavčích telových buniek je diploidná, teda má dve kópie každého chromozómu, a je diferencovaná, teda prispôbená na vykonávanie určitej funkcie v organizme. Skupina zárodočných buniek tvorí líniu buniek, z ktorých vznikajú gaméty - vajíčka a spermie. Kmeňové bunky u cicavcov vytvárajú dve veľké skupiny buniek: *embryonálne*, ktoré sú odvodené z blastocysty a *somatické* kmeňové bunky, ktoré sa nachádzajú v tele dospievajúceho aj dospelého organizmu. Zvláštnosťou týchto buniek je, že sú nediferencované a majú schopnosť sa neobmedzene deliť, pričom si zachovávajú svoj nediferencovaný stav. Pri pôsobení určitých faktorov sú však tieto nediferencované bunky schopné diferencovať sa na špecializované bunky vyvíjajúceho sa alebo dospelého organizmu. Embryonálne kmeňové bunky sú schopné deliť sa a diferencovať sa na akékoľvek špecializované bunky embryonálnych tkanív a v konečnom dôsledku na akýkoľvek typ bunky organizmu. Táto ich skoro neobmedzená schopnosť diferenciácie sa nazýva *pluripotencia* a bunky s takouto schopnosťou *pluripoténne* (obr. 4-1). Primárnou funkciou telových kmeňových buniek je nahrádzať špecializované bunky poškodeného tkaniva alebo zaniknuté



bunky. Podobne ako embryonálne kmeňové bunky aj telové kmeňové bunky sú schopné prakticky neobmedzene sa deliť, avšak schopnosť diferenciácie telových kmeňových buniek je o čosi obmedzenejšia ako u embryonálnych kmeňových buniek a nazýva sa *multipotencia*. *Multipotentné* kmeňové bunky sú schopné diferencovať sa iba na obmedzený počet rozličných bunkových typov (napr. hematopoetické kmeňové bunky sú schopné sa diferencovať na erytrocyty, leukocyty, trombocyty). Pre svoju schopnosť delenia a diferenciácie na akikofvek bunku tela sa kmeňové bunky, hlavne embryonálne, dostali do pozornosti medicínskych výskumníkov. Uvažuje sa o rozmanitých aplikáciách kmeňových buniek, pri ktorých by tieto bunky slúžili ako náhrady buniek poranených tkanív alebo chorobných tkanív. Terapie zahŕňajúce použitie kmeňových buniek by mohli napomôcť liečeniu niektorých úrazov (napr. poškodenie miechy), niektorých degeneratívnych ochorení (napr. Parkinsonova choroba, neurodegeneratívne ochorenia) alebo pri patologických stavoch ako je diabetes mellitus.

Aj keď je diferenciácia buniek vo všeobecnosti *nevrátna*, predsa len nezvratnosť diferenciácie nemá úplnú platnosť. Množstvo pokusov s rastlinami ukázalo, že akákoľvek diferencovaná rastlinná



**Obrázok 4-1.** Kmeňové bunky a ich schopnosť diferencovať sa (pluripotencia).

Diferenciácia buniek

zohráva podstatnú úlohu vo vývine - ontogenéze organizmu. Všetky bunky mnohobunkového organizmu vznikajú mitotickým delením nediferencovanej zygoty. Mitotické delenie zabezpečí, že všetky dcérske bunky vznikajúce delením zygoty budú mať rovnakú a kompletnú genetickú informáciu ako mala materská bunka - zygota. Genetická informácia pre vývin všetkých typov diferencovaných buniek daného organizmu je obsiahnutá už v zygote. To znamená, že všetky štruktúrne gény pre všetky špecializované proteíny diferencovanej bunky sú súčasťou genómu zygoty. Spôčiatku sú bunky vzniknuté delením zygoty nediferencované, po čase sa však začínajú diferencovať na jednotlivé bunkové typy novovznikajúceho organizmu. Diferenciačné procesy u vyšších eukaryotov sú naprogramované ako sled dejov iniciovaný oplodnením. Funkčné a tvarové odlišnosti medzi jednotlivými diferencovanými bunkami sa v priebehu diferenciácie vytvárajú v dôsledku rozdielnej expzie génov genómu v rôznych bunkách. Vo všetkých diferencovaných bunkách sa exprimujú všetky gény kódujúce životne nevyhnutné funkcie (napr. enzýmy glykolyzy). Skupina týchto génov sa nazýva „housekeeping genes“ alebo prevádzkové gény. Keďže

bunka bez ich produktov by nebola schopná prežiť, je ich expresia vo všetkých typoch diferencovaných buniek „zapnutá“. Zostávajúce gény, ktoré kódujú špecializované funkcie diferencovaných buniek, sa exprimujú v rôznych bunkách rozdielne. Tak napríklad gény pre tvorbu hemoglobínu sa exprimujú - sú zapnuté v erytrocytoch, pokiaľ v iných diferencovaných bunkách, ako sú napríklad leukocyty, trombocyty, k expresii týchto génov nedochádza. Keďže nie sú pre funkciu a špecializáciu týchto buniek nevyhnutné, sú vypnuté. **Génový základ regulácie diferenciácie buniek na genetickej úrovni spočíva v postupnom zapínaní a vypínaní rozdielnych génov v rozdielnych bunkách.** K postupnej diferenciácii buniek dochádza tak, že produkty primárne aktivovaných génov pôsobia na expresiu nasledujúcich génov reťazca a ich produkty pôsobia na expresiu ďalších génov v regulačnom reťazci. Takýto spôsob regulácie sa označuje ako *regulačná genová kaskáda*, pričom v rozdielnych bunkách sú gény zapojené do génovej kaskády rozdielne. Expressia odlišného súboru génov v rôznych bunkách v priebehu diferenciácie má za následok funkčnú a tvarovú špecializáciu buniek. Otázkou zostáva aké signály alebo faktory regulujú zapínanie či vypínanie jednotlivých génov pre daný smer diferenciácie?

**4.1.1. Vnútorne a vonkajšie faktory regulácie diferenciácie buniek**

Existencia mnohobunkového organizmu začína vznikom zygoty. Nasleduje jeho ontogenéza (individuálny vývin), ktorá je zakončená jeho zánikom. Ontogenéza alebo vývin je poznačená dvomi veľmi dôležitými udalosťami: *determináciou* a *diferenciáciou* buniek. **Determinácia** je proces, pri ktorom sa bunka stáva predurčenou pre určitý vývinový osud, predurčená pre určitú špecializáciu. Väčšinou je bunka determinovaná ešte pred samotným procesom diferenciácie. **Diferenciácia** je potom proces, v ktorom bunka nadobudne svoj finálny tvar, funkciu a špecializuje sa.

U vyšších eukaryotov sa vývin začína v momente vzniku zygoty, ktorá vzniká splnutím spermie a vajíčka. Vnútro vajíčka je vyplnené heterogénnou cytoplazmou s neuniformnou distribúciou jej komponentov. Po oplodnení a následnom delení majú dcérske bunky vzniknuté zo zygoty rozdielne zloženie cytoplazmy. Rozdielnosť v zložení cytoplazmy dcérskych buniek je dôsledkom nerovnomernej distribúcie komponentov (napr. mRNA a rôznych proteínov) v cytoplazme vajíčka. Rozdiely v zložení cytoplazmy sú zodpovedné za rozdielny vplyv komponentov cytoplazmy na genetickú informáciu v jadrách dcérskych buniek, čo sa odrazí na rozdielnej transkripcii génov dcérskych buniek v priebehu ontogenézy. Jednotlivé bunky rastúceho embrya majú teda rozdielnu cytoplazmu, ktorá rozdielnym vplyvom pôsobí na aktiváciu alebo represiu rozličných génov a tie potom pôsobia aktivačne alebo inhibične na ďalšie gény. Týmto sa spustí kaskáda diferencovanej expzie génov, vedúca k špecializácii jednotlivých bunkových typov a ich diferenciácii. Ako počet buniek v embryu narastá začínajú na genetický materiál buniek pôsobiť okrem zloženia vlastnej cytoplazmy aj vplyvy okolitých buniek, prostredníctvom medzibunkových interakcií. Bunka taktiež reaguje na zloženie a prijíma signály z extracelulárnej hmoty (matrix).

**4.1.1.1. Vnútorne (genetické) faktory regulácie diferenciácie buniek**

Poznatky o regulácii diferenciácie buniek u človeka nie sú doposiaľ úplné, preto sa vo veľkej miere opierame o poznatky získané zo štúdií mnohobunkových modelových organizmov, hlavne drozofily (*Drosophila*) ale aj iných organizmov. Medzidruhové porovnávanie, založené na analýze homologických úsekov DNA, preukázali vysokú konzervovanosť základných mechanizmov regulácie vývinu u vyšších eukaryotov. Predpokladá sa, že tieto mechanizmy vznikali v evolúcii zhruba pred 500 miliónmi rokov.



Môžeme teda predpokladať, že aj u človeka sú mechanizmy regulácie diferenciácie buniek a vývinu analogické.

Gény kontrolujúce vývin u drozofily sa rozdeľujú do dvoch typov: *gény maternálneho efektu* a *gény zygoty*.

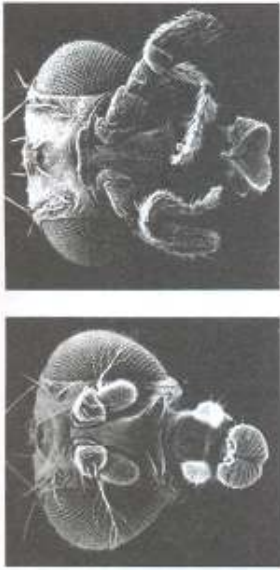
Systém regulačnej kaskády aktivujú produkty **génov maternálneho efektu**. Ich názov je odvodený od toho, že sú súčasťou genómu samic. Gény maternálneho efektu sú exprimované vo folikulárnych bunkách a ich mRNA a proteínové produkty sú transportované do vajíčka. Mnoho z týchto produktov nie je distribuovaných rovnomerne, ale vytvárajú gradient alebo sú koncentrované v špecifických regiónoch vajíčka. Takto sa pomocou gradientu a špecifickej lokalizácie produktov maternálneho efektu tvorí predozadná (anteriornoposteriorná) a chrbtovo-brušná (dorzálno-ventrálna) os zárodka. Produkty génov maternálneho efektu zahŕňajú rôzne transkripčné faktory, receptory a proteíny regulujúce translatáciu. V priebehu embryonálneho vývinu produkty týchto génov aktivujú alebo potláčajú expresiu génov zygoty v čase a priestore.

**Gény zygoty** sa exprimujú až po oplodnení. Ich expresia je závislá na distribúcii produktov génov maternálneho efektu. Gény zygoty sa rozdeľujú do dvoch skupín: **segmentačné gény** a **homeotické gény**.

**Segmentačné gény** sú zodpovedné za vznik segmentov (u drozofily sa vyvíja 14 segmentov: z troch je zložená hlava, z troch hrud' a z ôsmich je zložené bruško) v zárodku a delia sa na: *gap gény*, *pair-rule gény* a *gény polaritý segmentov*.

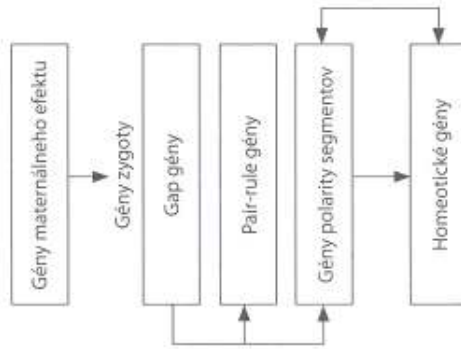
**Gap gény** (gap = medzera) sú aktivované génmi maternálneho efektu. Ich pôsobením sa embryo rozdelí do niekoľkých širokých regiónov. Produkty gap génov sú transkripčné faktory, ktoré aktivujú **pair-rule gény** a tie rozdelia embryo na ešte menšie regióny, čím sa vytvorí hranice jednotlivých segmentov. Produkty pair-rule génov sú transkripčné faktory, pôsobiace na expresiu **génov polaritý segmentov** (*segment polarity genes*). Gény polaritý segmentov ovplyvňujú anteriornoposteriornu polaritu segmentov vytvorených pair-rule génmi. Takto sa kaskádovým pôsobením segmentačných génov vytvorí všetkých 14 segmentov zárodka drozofily. Po zakončení segmentácie sa v jednotlivých segmentoch aktivujú posledné morfogény, ktoré sa nazývajú **homeotické gény**.

**Homeotické gény** (HOX gény) dostali svoj názov kvôli tomu, že ich mutácie môžu spôsobiť zmenu jedného orgánu za iný – homeózu. Expressia homeotických génov určuje aká štruktúra dospelého tela sa z jednotlivých segmentov vyvinie. U drozofily rozhodujú o vytvorení tykadiel, ústneho ústrojenstva, nôh, krídel, hrude a bruška. Spoločným rysom všetkých HOX génov je prítomnosť vysoko konzervovaného úseku DNA o veľkosti 180 bp takzvaného **homeoboxu**. Homeoboxy kódujú sekvenciu 60 aminokyselín, ktorá sa nazýva **homeodóména**. Produkty HOX génov patria medzi proteíny ovplyvňujúce transkripciu génov tým, že sa naväzujú na cis regulačné elementy DNA prostredníctvom homeodómény. U drozofily sú tieto gény zoskupené do dvoch komplexov (klastrov). **Antennapedia komplex** (*Antp-C*) je tvorený 5 génmi ovplyvňujúcimi vývin hlavy a hrude. V **bithorax komplexe** (*BX-C*) sú 3 gény zodpovedné za vývin hrude a bruška. Mutácie v týchto génoch majú za následok vytvorenie určitej časti tela na nezvyklom mieste (na inom segmente). Napríklad mutácia v géne *antennapedia* má za následok vytvorenie nohy na hlave v mieste, kde sa normálne vytvára tykadlo (obr. 4-2).



**Obrázok 4-2.** Mutácia v géne antennapedia. Vľavo hlava normálnej drozofily, vpravo mutantná forma.

Zjednodušene možno povedať, že za diferenciáciu buniek v ontogenéze u drozofily zodpovedajú kaskády génov zložitá ale pritom presne exprimované v určitých bunkách zárodka v určitom čase. Na začiatku kaskády sú produkty génov maternálneho efektu, ktoré vytvárajú predozadnú a chrbtovo-brušnú os zárodka. Na konci kaskády sú homeoboxové gény, ktoré dávajú jedinečnú identitu segmentom vytvoreným segmentačnými génmi (obr. 4-3).



**Obrázok 4-3.** Hierarchia génov podieľajúcich sa na regulácii diferenciácie buniek a vývinu zárodka u drozofily. Produkty maternálnych génov regulujú expresiu prvých troch skupín génov zygoty (gap, pair-rule a génov polaritý segmentov) takzvaných segmentačných génov. Tie následne kontrolujú expresiu homeotických génov.

Mnohé poznatky z posledného obdobia naznačujú, že mechanizmy regulácie diferenciácie buniek u človeka sú v určitej miere analogické s tými, ktoré kontrolujú diferenciáciu buniek u drozofily. Avšak na regulácii diferenciácie buniek u človeka sa podieľa väčší počet génov, preto je regulačná génová kaskáda pravdepodobne o čosi zložitejšia ako u drozofily. Gény homologické ku HOX génom drozofily *paired box* gény boli objavené v množstve rôznych organizmov aj u človeka (obr. 4-4). HOX gény u človeka vytvárajú na rozdiel od drozofily až štyri komplexy (*HoxA*, *HoxB*, *HoxC* a *HoxD*) a obsahujú 39 génov. Podobne ako u drozofily aj u človeka sa produkty týchto génov podieľajú na celkovom



tvorovaní tela a telesných výbežkov. Mutácie v týchto génoch u človeka sú spojené s dedičnými malformáciami končatín. Napríklad mutácia v géne *HOXD13* spôsobuje synpolydaktyliu (tvorba nadpočetných prstov na nohách a rukách a abnormality kostí).

#### 4.1.1.2. Externé faktory kontroľujúce diferenciáciu buniek

Diferenciácia počas embryogenézy ale rovnako aj v tkanivách dospelého jedinca závisí okrem programu diferencovanej expzie génov aj na signáloch prichádzajúcich z vonkajšieho prostredia. Zarádujeme sem signály zo susedných a blízkych buniek, pôsobenie nerozpuštných faktorov z extracelulárnej matrix (ECM) a pôsobenie množstva rozpustných faktorov.

Medzibunkové interakcie a interakcie medzi bunkou a ECM sú dôležité pre indukciu a udržanie diferenciácie mnohých bunkových typov. Aj keď poznatky o týchto procesoch v dnešnej dobe nie sú úplné, v prípade interakcií s ECM zohrávajú podstatnú úlohu povrchové receptory buniek, na ktoré sa viažu jednotlivé komponenty ECM. Väzba ECM komponentov na receptory aktivuje vnútrobunkovú signalizačnú dráhu podobnú tej, ako bola identifikovaná pri polypeptidových rastových faktoroch alebo rastových inhibítoroch.

Rozpustné faktory ovplyvňujúce diferenciáciu buniek sa delia na dve skupiny a to tie, ktoré sa viažu na povrchové receptory buniek a tie, ktoré voľne prechádzajú plazmatickou membránou a viažu sa na receptory v plazme a na jadrové receptory. Do prvej skupiny patria napríklad rastové faktory fibroblastov (FGFs) alebo hematopoetické faktory (CSF-1, G-CSF). Do druhej skupiny patrí kyselina retinová (RA), deriváty RA, estrogén a testosterón. Rozpustné faktory svojou väzbou na receptor a spustením určitej signalizačnej dráhy indukujú alebo naopak inhibujú diferenciáciu niektorých typov buniek (napríklad TGF- $\beta$ =Transforming Growth Factor- $\beta$  stimuluje diferenciáciu keratinocytov alebo epitelových buniek čreva a inhibuje diferenciáciu myoblastov alebo preadipocytov).

## 4.2. Problém starnutia buniek

Existencia mnohobunkových organizmov je obmedzená v čase. Každý organizmus po čase starne a nakoniec prestane existovať, zanikne. **Starnutie (senescencia)** je komplexný biologický proces, ktorý možno pozorovať u všetkých organizmov od najjednoduchších až po človeka. Ide o postupný dlhodobý proces, pri ktorom sú zrejme zmeny v štruktúre a funkcii organizmu prejavujúce sa typickými znakmi vo fenotype jedince. Smrť je potom len neodvratným završením tohto zložitého procesu. Aj napriek intenzívnemu výskumu v oblasti

starnutia sú doteraz známe len niektoré faktory, ktoré môžu byť zahrnuté do procesu starnutia alebo ho môžu ovplyvňovať.

Proces starnutia má niekoľko charakteristických rysov. Starnutie je:

1. **Univerzálne** – prebieha u všetkých druhov a u všetkých jedincov druhu, dokonca aj v jednotlivých orgánoch jedinca.
2. **Progressívne** – zmeny pokračujú v závislosti na čase a sú obvykle ireverzibilné. Rôzne orgány však začínajú starnúť v rozličnom čase a ich starnutie napreduje rozličnou rýchlosťou.
3. **Involučné** – schopnosť adaptácie buniek a organizmu sa v čase znižuje.
4. **Programované** – proces starnutia je z určitej časti geneticky naprogramovaný, avšak závisí aj na pôsobení faktorov vonkajšieho prostredia. V prospech genetickej determinácie starnutia svedčí druhová špecifickosť dĺžky života. Každý druh má maximálnu špecifickú dĺžku života, ktorú môžu jedinci druhu za optimálnych podmienok dosiahnuť (u človeka sa maximálna dĺžka života odhaduje na 130-140 rokov).

Biologické teórie starnutia sú väčšinou zamerané na fenotypické prejavy starnutia buniek.

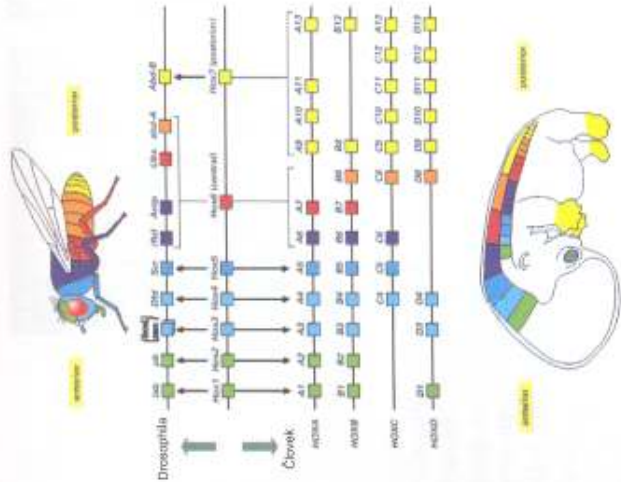
### 4.2.1. Starnutie buniek

S pribúdajúcimi rokmi sa objavujú zmeny v morfológii aj vo funkcii skoro vo všetkých orgánoch a tkanivách. Tieto zmeny majú svoj podklad v starnutí buniek. V mitochondriách sa postupne znižuje kapacita oxidačnej fosforylácie, podobne sa mení syntéza enzýmov a štruktúrnych proteínov ako dôsledok zmien v nukleových kyselinách s narastajúcim vekom. Starnúce bunky majú zníženú schopnosť opravovať poškodenie DNA, znižuje sa ich potreba a spotreba živín aj úroveň metabolizmu. Bunky starého organizmu majú zmenšený obsah vody v porovnaní s bunkami mladšími, cytoplazma má väčšiu viskozitu a akumuluje sa v nej stále väčšie množstvo odpadových látok. Zmeny v bunke sa prejavujú aj na morfologickej úrovni: jadro sa stáva abnormálne laločnaté a nepravidelné, dochádza k vakuolizácii mitochondrií, zmenšuje sa množstvo endoplazmatického retikula a Golgiho aparát sa deformuje. V bunkách sa hromadí lipofuscín (produkt peroxidácie lipidov).

#### 4.2.1.1. Procesy uplatňujúce sa v starnutí buniek

Príčiny starnutia buniek sú **multifaktoriálne**. Zahŕňajú endogénne mechanizmy starnutia, ale aj neustály a vekom sa stupňujúci vplyv vonkajších škodlivých faktorov, ktorý ovplyvňuje životaschopnosť buniek.

Významný pokrok pre štúdium starnutia buniek umožnila technika tkanivových kultúr a možnosť sledovať explantované bunky (bunky odobraté z tela organizmu). Pokusy *in vitro* na tkanivových kultúrach spočíajú o nesmrteľnosti bunkových klonov. Presnejšie pokusy neskor preukázali, že nesmrteľné sú len transformované bunkové klony majúce charakter nádorových buniek. Netransformované bunky sú schopné sa v bunkových kultúrach deliť len obmedzene. Po prekročení určitého počtu delení sa už ďalej nedelia, starnú a zanikajú aj keď sú kultivované v optimálnych podmienkach. Tento „limit“ v počte bunkových delení sa nazýva po svojom objaviteľovi ako „**Hayflickov limit**“. Pre ľudské fibroblasty izolované z embrya je limit asi 50 delení. Vysvetlenie tohto javu, **javu replikačného starnutia**, zatiaľ nie je úplne jasné. Úlohu v ňom môžu zohrávať procesy mutácií alebo straty génov regulácie bunkového cyklu, protoonkogénov (napr. c-fos, c-myc) a tumor-supresorových génov (napr. RB-gén, TP53). **Kumulácia somatických mutácií** nielen v týchto génoch sa pokladá za jednu z možných príčin starnutia buniek. Funkčné dôsledky



Obrázok 4.4. Porovnanie komplexov Hox génov u drozofily a u človeka



génových ale aj chromozómových mutácií závisia na ich lokalizácii, počtosti a type postihnutých buniek. Mutácie môžu narušovať syntézu proteínov, ktoré sú dôležité pre metabolizmus bunky a obnovu jednotlivých štruktúr bunky. Mutácie môžu znižovať adaptačnú schopnosť bunky, spustiť procesy typické pre starnutie bunky či dokonca spôsobiť zánik bunky.

Za ďalšiu príčinu replikačného starnutia buniek sa pokladá proces **postupného skracovania telomér chromozómov**. Teloméry sú koncové časti chromozómov, ktoré hrajú kľúčovú úlohu v stabilizácii terminálnych častí chromozómu. Štruktúra telomér zabráňuje štiepeniu DNA deoxyribonukleázami a fúzii koncov molekúl DNA navzájom. Počas štiepenia delenia, molekulová väčšina nedokáže kompletne doreplikovať 3' koniec DNA vlákna zaoštvávajúceho reťazca. Po vyštiepení posledného príméru dochádza ku skráteniu teloméry v tomto koncovom úseku molekuly DNA zaoštvávajúceho reťazca. Deje sa tak počas každého mitotického delenia bunky. Zakaždým keď sa bunka delí, teloméra sa o kúsok skracuje. Po čase sa teloméry natoľko skráti, že strácajú svoju funkciu a ďalšia proliferácia bunky sa zastaví. Priemerná dĺžka teloméry je teda indikátorom počtu delení, ktoré má bunka za sebou a zároveň naznačuje koľkokrát sa bunka znova môže deliť. Predpokladá sa, že teloméry slúžia ako akési molekulové hodiny odrátavajúce počet delení bunky. Niektorým bunkám v tele organizmu (napr. zárodočné bunky) sa teloméry počas bunkového delenia neskracujú. Je to preto, že exprimujú enzým telomérazu, ktorej funkciou je doplnenie teloméry po každom delení na pôvodnú dĺžku. Tieto bunky sú schopné neobmedzene sa deliť. Podobne je telomérazu aktivovaná aj v niektorých nádorových bunkách. Vo väčšine telových buniek sa však telomérazu neexprimuje, tie absorbujú len obmedzený počet bunkových delení, počas ktorých sa teloméry skráti na kritickú dĺžku. Proliferačia sa potom zastaví.

Jednou z uznávaných teórií starnutia buniek je **poškodzovanie buniek reaktívnymi formami (radikálmi) kyslíka** a dusíka v priebehu života. Bolo dokázané, že reaktívne formy kyslíka spôsobia denne zmenu 10 000 báz DNA v jednej bunke. Voľné kyslíkové radikály katalyzujú oxidačné modifikácie proteínov a enzýmov, čo vedie k ich degradácii. Podobne spôsobujú aj peroxidáciu lipidov, preto sa v bunke hromadí lipofúscín. V boji proti voľným radikálom bunka používa látky, ktoré sa nazývajú antioxidanty. Patria medzi ne známe vitamíny A, C, E ale aj mnohé enzýmy ako superoxididismutáza (SOD), kataláza a glutatiónperoxidáza.

Mutácie v DNA sú opravované DNA reparačnými mechanizmami. **Znižovanie kapacity a spoľahlivosti reparačných mechanizmov** v priebehu života sa podľa niektorých teórií považuje za dôležitú príčinu starnutia bunky. Keď reparačné mechanizmy nestihnajú opraviť poškodenie DNA, dochádza ku kumulácii mutácií v jadrách somatických buniek. To môže mať za následok starnutie bunky alebo transformáciu bunky na bunku nádorovú (viď kapitola 3).

Vekom v bunkách stúpajú aj **postranlačné modifikácie intracelulárnych aj extracelulárnych bielkovín**, čo môže viesť k funkčným aj morfológickým zmenám. Jednou z takýchto modifikácií je neenzýmová glykácia proteínov, pri ktorej vznikajú produkty pokročilej glykácie (AGE produkty- Advanced Glycation End products). Tieto môžu vytvárať prietne väzby („crosslinks“) medzi susednými molekulami.

Ďalším momentom, ktorý sa podieľa na starnutí buniek a skraccovaní ich životnosti, sú **zmeny v indukcii proteínov tepelného šoku** (Heat Shock Proteins), najmä proteínu Hsp70. Proteíny tepelného šoku sú produkované nielen ako odpoveď na stres v podobe tepla. Ich expresia je spustená aj po expozícii ku niektorým toxickým látkam ako sú ťažké kovy a rôzne chemikálie, alebo pri psychologickom strese. Tieto proteíny sú teda dôležitým obranným mechanizmom proti rôznym formám záťaže. Posledné výskumy ukázali, že ich hladina sa v priebehu starnutia mení. Starší jedinci ako odpoveď na stres sú schopní vyprodukovať

nížšiu hladinu Hsp70 ako mladší jedinci. Podobne sa pri kultivácii buniek *in vitro* rapídne znižuje hladina Hsp70 v starnúcich bunkách.

Všetky spomínané procesy a príčiny, ktoré sa určitým spôsobom môžu podieľať na starnutí bunky sa stali podkladom pre vypracovanie niektorých teórií snažiacich sa vysvetliť podstatu starnutia buniek.

#### 4.2.1.2. Teória starnutia buniek

Aj keď sa výskumu starnutia venuje už dlhoročná pozornosť a boli odhalené mnohé procesy a možné príčiny starnutia, doteraz sa neobjavila jedna všeobecne platná teória popisujúca mechanizmy a prejavy starnutia bunky alebo organizmu. Namiesto toho existuje množstvo hypotéz popisujúcich častkové procesy odohrávajúce sa pri starnutí.

Poznatky z molekulovej biológie a genetiky viedli k rozpracovaniu a pokusnému overovaniu množstva teórií, ktoré vysvetľujú starnutie ako dôsledok zmien v štruktúre alebo funkcii nukleových kyselín. Tieto teórie sú súhrne označované ako *genetické*. Ďalšia skupina teórií vychádza z poznatkov o nepriaznivých vplyvoch vonkajšieho prostredia, ktoré v priebehu života trvalo poškodzujú organizmus. Starnutie je potom dôsledkom tohto poškodenia. Vzhľadom na početnosť rôznych teórií o starnutí, ďalej uvedieme len niektoré teórie, ktoré vo svojej dobe zaznamenali najväčší ohlas alebo významne prispeli k rozšíreniu poznatkov o priebehu a príčinách starnutia.

#### Klasické teórie starnutia buniek

##### Teória nenahraditeľnosti súčasťi buniek

Podstatou tejto teórie je predstava, že niektoré dôležité súčasťi bunky (bielkoviny, nukleové kyseliny, lipidy) môžu byť počas života poškodené vplyvom fyzikálnych a chemických procesov. Ak nemá organizmus možnosť tieto poškodené molekuly odstrániť a nahradiť syntézou nových, tak sa tieto molekuly slávajú záťažou pre organizmus a spôsobujú starnutie.

##### Teória somatických mutácií

Teória somatických mutácií vychádza z pozorovaní, že u mnohých starých organizmov bola zvýšená frekvencia porúch DNA. Teória predpokladá, že primárnou príčinou starnutia je vznik a hromadenie mutácií v somatických bunkách.

##### Teória chýb

Patri do skupiny genetických teórií starnutia. Predpokladá, že starnutie je dôsledkom chýb v procese transkripcie a translácie. Hromadenie chýb pri týchto dejoch vedie podľa predstáv k starnutiu buniek.

##### Teória naprogramovaného starnutia

Podľa tejto teórie je starnutie geneticky naprogramované ako neoddeliteľná súčasť vývinu organizmu. Jednotlivé obdobia ontogenézy sú geneticky naprogramované formou expresie určitých génov. Podľa tejto teórie je podobne naprogramované aj starnutie bunky.

##### Teória tvorby priečných väzieb („crosslinking“)

Teória priečných väzieb vychádza z faktu, že počas života organizmu dochádza k chemickým zmenám životne dôležitých makromolekul (nukleové kyseliny, bielkoviny). Tieto zmeny spočívajú najmä v tvorbe priečných väzieb medzi jednotlivými reťazcami makromolekul aj vnútri samotných reťazcov (vznikajú napr. AGEs). U bielkovín spojíva je



dôsledkom tvorby priečných väzieb zhoršenie ich mechanických vlastností. Je predpoklad, že pri DNA môžu tieto pochody viesť k strate informačnej kapacity. Teória tvorby priečných väzieb považuje tento proces za primárnu príčinu starnutia buniek a organizmu.

#### Súčasná teória starnutia buniek

Teória starnutia uznávané v súčasnosti niekedy vychádzajú z poznatkov a predpokladov klasických teórií, poprípade klasické teórie rozvíjajú a obohacujú o najnovšie poznatky spojené s procesmi starnutia.

#### Teória voľných radikálov

Vysoko reaktívne metabolity v podobe voľných radikálov vznikajú v organizme pri mnohých procesoch. Medzi fyzikálne vplyvy vyvolávajúce ich vznik patrí rádioaktívne žiarenie, röntgenové žiarenie a ultrafialové svetlo. Najdôležitejším organickým procesom vzniku voľných radikálov je ich vznik vnútri bunky pri bunkovom dýchaní v mitochondriách. Primárne pôsobia voľné radikály na dôležité makromolekuly, najmä na bielkoviny, tuky a nukleové kyseliny. Reakcie voľných radikálov sú sprevádzané vznikom nových väzieb medzi jednotlivými reťazcami molekúl navzájom i v rámci jednej makromolekuly. Dôsledkom často býva napríklad strata enzymatickej aktivity bielkovín, porušenie alebo strata genetickej informácie DNA, z čoho vyplýva nebezpečenstvo poškodenia a zániku bunky alebo vznik nádorových buniek. Ďalším dôsledkom sú zmeny vlastností bunkových membrán vznikajúce oxidáciou lipidov, ktoré môžu mať za následok porušenie membránových organel bunky a plazmatickej membrány, čo môže nakoniec viesť k poškodeniu a zániku bunky a k poškodeniu tkanív a orgánov.

#### Genetické teórie

Jedným z dôležitých čiasťových mechanizmov zohrávajúcich úlohu v procese starnutia je dedičnosť. Genetické faktory sa uplatňujú pri určovaní dĺžky života, ale zasahujú aj do vlastného priebehu starnutia. Genetické teórie sa spravidla rozdeľujú do dvoch veľkých skupín: *mutačné teórie* vychádzajúce z poznatku, že počas celého života organizmu dochádza v jeho telových bunkách k hromadeniu mutácií a *teórie programovaného starnutia*, vychádzajú z predpokladu, že funkcia jednotlivých génov je časovo ohraničená a dopredu naprogramovaná. Starnutie je podľa týchto teórií len výsledkom realizácie určitého programu, je geneticky dopredu determinované.

V súvislosti s mutačnými teóriami sa v poslednej dobe výskum zamerá aj na reparačné mechanizmy, na ich kapacitu a ich schopnosť opraviť poškodenie v DNA. Genetické teórie starnutia podporuje výskyt niektorých geneticky podmienených syndrémov, spojených s predčasným starnutím (progeria).

#### Neuro-endokrinná teória starnutia

V posledných rokoch sa do pozornosti dostáva neuro-endokrinná teória starnutia. Táto hypotéza predpokladá, že rozhodujúci mechanizmus, ktorý riadi starnutie je súčasťou endokrinného systému. Táto hypotéza ďalej pokladá za hlavné riadiace centrum epifyzu a hlavnú riadiacu látku hormón melatonin. Táto teória patrí do rodiny takzvaných „*pacemakerových*“ teórií starnutia. Melatonin je veľmi dobre rozpustný v tukoch, preto ľahko preniká dovnútra buniek. Samotná prítomnosť melatonínu v bunkách prispieva k zvýšenej ochrane buniek pred voľnými radikálmi. Aj keď nie sú celkom presne známe mechanizmy účinku melatonínu na molekulovej úrovni, predpokladá sa že stimuluje imunitný systém a zlepšuje celkový stav a regeneračné schopnosti organizmu. Celkovo teda melatonin pôsobí ako prostriedok proti starnutiu.

### 4.3. Bunková smrť – zánik buniek

Život mnohobunkového organizmu je z hľadiska tvorby a zániku buniek dynamickým procesom. U človeka každý deň odumierajú milióny opotrebovaných alebo poškodených buniek, ktoré sú nahradzované bunkami novými. Vyvážený vývin mnohobunkového organizmu vyžaduje udržiavanie rovnováhy medzi produkciou nových buniek a zánikom starých buniek. Táto rovnováha závisí predovšetkým na schopnostiach organizmu odstraňovať bunky, ktoré sú nadbytočné, nevhodne lokalizované, závažne poškodené alebo napadnuté baktériami či vírusmi. Homeostáza medzi vznikom a zánikom buniek znamená udržiavanie optimálneho počtu optimálne fungujúcich buniek v jednotlivých orgánoch organizmu.

V priebehu evolúcie mnohobunkových organizmov sa vyvinuli dva hlavné mechanizmy, ktoré zabezpečujú odstránenie bunky – bunkovú smrť: *nekroza* a *apoptóza*. **Nekroza** je smrť bunky, ktorú možno označiť za náhodnú, katastrofickú a neprogramovanú. **Apoptóza** na druhej strane je proces geneticky riadený a presne naprogramovaný. Každá normálna bunka organizmu má vo svojom genome gény, ktorých aktiváciou sa spustí mechanizmus vedúci k smrti bunky (bunkovej „samovražde“). Oba procesy sa od seba odlišujú mechanizmom i priebehom.

#### 4.3.1. Nekroza

**Nekroza** (gr. nekros=mrŕvola) je reakciou na akútnu a nenapraviteľnú poškodenie bunky. Príčiny spôsobujúce nekrozu sú rozmanité. Patrí sem poranenie, infekcia, nádory, pôsobenie toxínov, zápalový proces, anoxia, dlhšie trvajúci nedostatok živín, ionizujúce a tepelné žiarenie a ultrazvuk. Nekroza na rozdiel od apoptózy predstavuje náhodnú a neprogramovanú smrť bunky. Primárne poškodenie jedného dôležitého systému bunky vedie k poškodeniu ďalšieho a ďalšieho systému. Tento „kaskádový efekt“ vedie nakoniec k zániku bunky.

Pri anoxii (absolútnom nedostatku kyslíka) napríklad dochádza k prerušeniu oxidácie fosforylácie a v dôsledku otvorenia iónových kanálov k nahromadenia kationov sodíka a vápnika. To vedie k edému bunky s následným poškodením membránových organel a uvoľnením proteolytických enzýmov hlavne z lyzozómov, do vnútra bunky. Ďalej dochádza k neorganizovaneému štiepeniu bielkovín a DNA. Nakoniec je degradovaná aj plazmatická membrána a obsah bunky sa vylieva do okolia bunky. Tým sa spúšťa zápalový proces, ktorý poškodzuje okolité bunky. Spustenie zápalovej kaskády je pre nekrozu charakteristickým znakom. Pri apoptóze je bunka zlikvidovaná bez vzniku zápalu.

Aj keď obraz nekrozy pri pôsobení jednotlivých letálnych faktorov môže byť odlišný, konečným procesom je najčastejšie rozklad bunkových štruktúr a makromolekul enzýmami, ktoré sa uvoľnia z lyzozómov.

#### 4.3.2. Apoptóza

Apoptóza (gr. apo=od, ptosis=padanie) je jeden z najčastejších typov programovanej bunkovej smrti. Je to proces často popisovaný ako presne organizovaná samovražda bunky. Pojem apoptóza v biológii po prvýkrát použili v roku 1972 Kerr, Willie a Currie. Na rozdiel od nekrozy, ktorá je akútnym patologickým procesom, je apoptóza proces plánovito využívaný bunkou aj za normálnych fyziologických podmienok.

V embryonálnom období zodpovedá za tvorbu a formovanie prstov (odstránenie „blany“ medzi jednotlivými prstami) či telesných dutín, po narodení za prestavbu cirkulácie a v priebehu ďalšieho života za cyklické zmeny počas reprodukčného cyklu ženy



(endometrium) alebo elimináciu nadbytočných aktivovaných B a T lymfocytov. Apoptóza sa uskutočňuje aj v tkanivách, v ktorých dochádza k trvalej obmene buniek (napr. črevný epitel). Proces apoptózy môže zohrávať úlohu pri rozvoji niektorých ochorení, kde môže dochádzať buď k nadmernému alebo nedostatočnému odumieraniu buniek. Medzi tieto ochorenia patria napríklad: Alzheimerova choroba, infarkt myokardu, niektoré autoimúne ochorenia, AIDS.

Apoptóza môže byť spustená genetickým programom bunky alebo medzibunkovými signálmi (cytokíny, hormóny). Tiež ju môžu vyvolať faktory vonkajšieho prostredia, ktoré bunku poškodzujú (žiarenie, oxidačný stres, hypoxia, vírusy). Pravdepodobnosť iniciácie apoptózy sa líši v jednotlivých fázach bunkového cyklu a je ovplyvnená aj genetickou výstavou bunky.

#### 4.3.2.1. Priebeh apoptózy

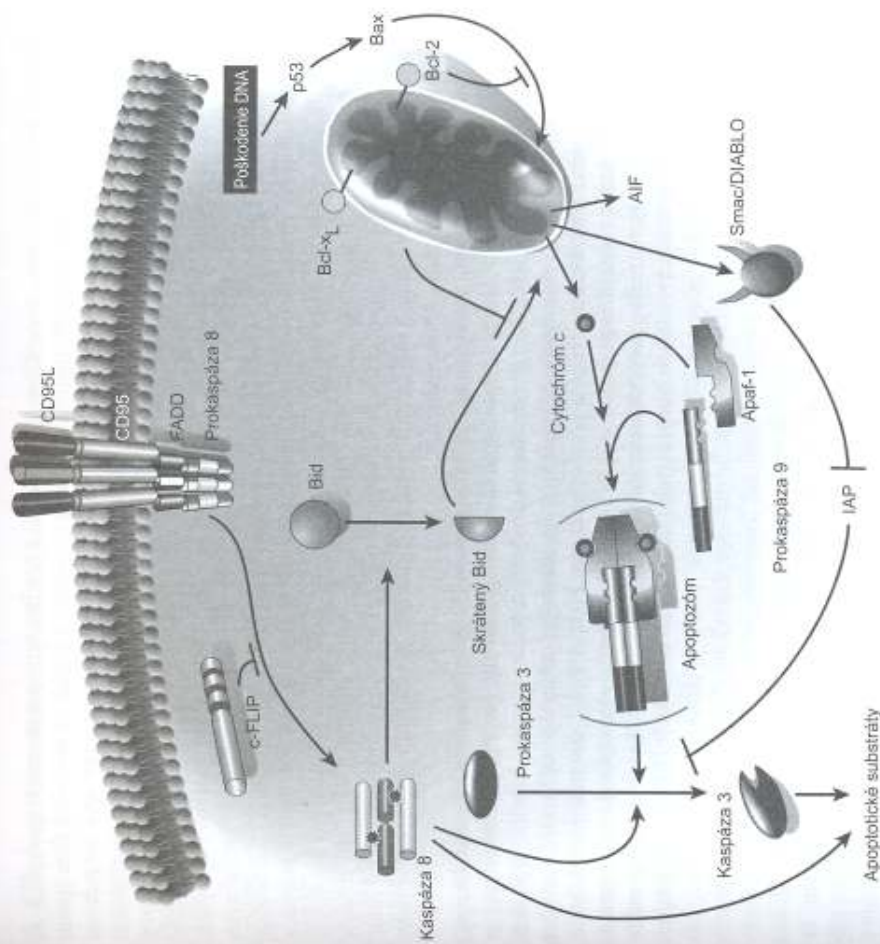
V prvej fáze (*iniciácia apoptózy*) bunka dostane signál, povel, ktorým je odsúdená k smrti. Táto fáza nie je sprevádzaná žiadnymi viditeľnými morfológickými zmenami.

Priebeh druhej fázy (*exekúcia apoptózy*) má uniformný obraz, ktorým sa apoptóza jasne odlišuje od zániku bunky nekrozou. Pri apoptóze zasahujú prvotné zmeny jadro bunky. Chromatin jadra sa kondenzuje a zhromažďuje na periférii jadra. Chromozómy sa uvoľňujú z ukotvenia v jadrovej membráne. Dochádza k postupnému štiepeniu DNA pomocou špecifických endonukleáz na fragmenty o dĺžke 200 bp alebo násobkov tejto dĺžky. Zistilo sa, že DNA je štiepená medzi jednotlivými nukleozómami. Keďže okolo každého nukleozómu sa obtoča DNA s dĺžkou 200 bp, logicky teda, ak dochádza k štiepeniu DNA medzi nukleozómami, vznikajú fragmenty dlhé 200 bp, alebo je veľkosť fragmentov násobkami tejto dĺžky. Na elektroforetogramе možno potom pozorovať charakteristický rebríček tvorený z poštiepených fragmentov (200bp, 400bp, 600bp, 800bp atď.). Mení sa aj štruktúra samotného jadra. Jadro sa rozpadá na viaceré časti, ktoré obsahujú chromozómy. Ostatné organely bunky zostávajú v tejto dobe bez zmeny. Apoptóza je aktívny proces, ktorý vyžaduje energiu vo forme ATP produkovanú mitochondriami. V ďalšom priebehu apoptózy dochádza k zmenám mitochondrií a cytoskeletu. V cytoplazme sa tvoria vakuoly. Mení sa štruktúra fosfolipidovej dvojvrstvy membrán a postupne sú prerušované všetky medzibunkové spojenia. Bunka sa oddeľuje od susediacich buniek, zafuľacuje sa a zmršťuje. Nakoniec sa rozpadá na mnoho častí, ktoré sa nazývajú *apoptotické telieska*. Tie obsahujú aj časti rozpadnutého jadra s chromozómami.

Tretia fáza (*„upratovacia“ fáza*) je pomerne rýchla. Bez známok zápalu sú zvyšky bunky, ktorá spáchala bunkovú samovraždu, apoptotické telieska, rozpoznávané a fagocytované makrofágami a susednými bunkami. Makrofágy sú aktivované špecifickými proteínmi na povrchu apoptotických teliesok. Fagocytované materiály apoptotických teliesok je znova využité.

#### 4.3.2.2. Molekulová podstata apoptózy

Celý proces apoptózy je geneticky kódovaný a má zložitú viacstupňovú riadenie. Proces tohto typu programovanej bunkovej smrti môže byť spustený buď takzvanou *vonkajšou cestou* – stimuláciou špecifických receptorov smrti na povrchu bunky a uvoľnením či aktiváciou niektorých špecifických proteínov a komplexov (Bax), alebo takzvanou *vnútornou cestou*, v ktorej centrálnu úlohu zohráva proteín p53 a mitochondrie (obr. 4-5). Apoptóza je regulovaná aj lokálnymi cytokínmi, modulovaná napríklad steroidmi, glukokortikoidmi alebo niektorými neurotransmitermi.



**Obrázok 4-5.** Dve hlavné apoptotické cesty v bunkách cicavcov. V ľavej časti cesta cez receptory smrti. Dochádza k spusteniu kaspázovej kaskády počnúc aktiváciou prokaspázy 8. V pravej časti mitochondriálna cesta, reagujúca aj na poškodenie DNA. Oboimi signálnymi cestami sa aktivujú exekučné kaspázy (napr. kaspáza 3), ktorých aktivita spôsobí zánik bunky.

#### Vnútrorná signálna cesta

Vnútrorná cesta je aktivovaná poškodením jadrovej DNA vplyvom metabolitov, voľných kyslíkových radikálov, vírusmi alebo inými toxínmi. Kľúčovú úlohu v nej zohráva gén TP53 a nim kódovaný proteín p53. Hlavnou funkciou p53 je rozpoznanie poškodenia DNA a iniciácia následnej opravy DNA. Proteín p53 pri poškodení DNA zastavuje delenie bunky do doby, pokiaľ sa poškodenie neopraví. Ak je poškodenie DNA väčšie ako kapacita reparačných mechanizmov bunky, zvýši sa expresia p53. P53 potom indukuje syntézu proteínov, ktoré poškodzujú mitochondrie. Mitochondrie, ktoré za normálnych okolností zaisťujú energetický metabolizmus bunky, strácajú membránový potenciál, čo sa prejaví zvýšením priepustnosti mitochondriálnych membrán a uvoľnením látok aktivujúcich apoptózu. Patria medzi ne hlavne cytochrom c, Smac/Diablo proteín a AIP (apoptózu indukujúci proteín). Tieto a ďalšie proteíny aktivujú exekučnú zložku apoptózy, ktorou sú proteolytické enzýmy nazývané *kaspázy*. Súčasne sa zvyšuje tvorba kyslíkových radikálov,



## 5. Chromozómová podstata dedičnosti

**Cytogenetika** je odvetvie genetiky, ktoré je aplikáciou genetiky na úrovni bunky. Zaoberá sa štúdiom chromozómov (ich počtom, morfológiou, segregáciou za normálnych i patologických podmienok) a koreláciou týchto náleзов s fenotypom.

Cytogenetika človeka sa začala rozvíjať až koncom 50. rokov. Dovtedy sa predpokladalo, že ľudský karyotyp má 48 chromozómov, tak ako ostatné primáty. V roku 1956 vyvinuli Tjio s Levanom úspešnú metódu chromozómovej analýzy a zistili, že normálny ľudský karyotyp má 46 chromozómov. Prvou chorobou, pri ktorej bola popísaná chromozómová aberácia, bol Downov syndróm (Lejeune, 1959). Cytogenetika postupne dokázala zmeny chromozómov v etiológii vrodených chýb, porúch plodnosti, nádorov atď. Chromozómové vyšetrenie má preto stabilné miesto v diferenciálnej diagnostike a prevencii závažných postihnutí u človeka.

### Organizácia genetického materiálu bunky - bunkový genóm

Terminom *genóm* sa označuje súbor všetkých génov jadra diploidnej bunky. Bunkové štruktúry, ktoré obsahujú génovú DNA sa označujú ako *genofory*. Genofory s najväčším počtom génov sú *chromozómy*; menší počet génov obsahujú plazmidy prípadne iné mimochromozómové genofory. Genóm prokaryotických buniek pozostáva z jedného chromozómu a plazmidov. Genóm eukaryotických buniek pozostáva z viacerých *jadrových chromozómov*, *chromozómov mimojadrových* (mitochondriálnych a v rastlinných bunkách aj chloroplastových) a v niektorých prípadoch aj z plazmidov. Jadrové chromozómy sa označujú ako *jadrový genóm*, súbor nejadrových genoforov ako *plazmóm*. Ak je bunka hositeľom vírusu môže sa v určitých situáciách uplatňovať na determinácii vlastností bunky aj genóm vírusový (napr. pri nádorovej transformácii buniek). U človeka existujú vlastne dva genómy: zložitý **jadrový genóm** a jednoduchý **mitochondriálny genóm**.

### 5.1. Prokaryotické chromozómy

Prokaryotický chromozóm pozostáva z jednej kruhovej dvojvláknovej molekuly DNA, bielkovín a variabilného množstva RNA. Prokaryotické bunky nemajú jadrovú membránu a chromozómy sú uložené v cytoplazme. Chromozóm je vždy pripojený svojim určitým miestom k plazmatickej membráne bunky. Nejde o „čistú“ DNA ale o zložitejší komplex DNA, RNA a bielkovín, ktorý sa označuje **nukleoid**, t.j. jadrový ekvivalent. Charakter prokaryotických chromozómov majú však aj niektoré genofory eukaryotických buniek. Sú to chromozómy mitochondrií a chloroplastov, ktoré vznikli endosymbiózou z pôvodne jednoduchých prokaryotických buniek.

DNA prokaryotických chromozómov je vysoko kondenzovaná. Napr. chromozóm baktérie *Escherichia coli* má cca  $3 \times 10^9$  bp (párov báz - base pairs) a dĺžku cca 1 mm. Vytvára niekoľko desiatok slučiek viditeľných v elektrónovom mikroskope. Bielkoviny prokaryotických chromozómov sú predovšetkým polyamíny (krátke polypeptidy s vlastnosťami polykationov) a enzýmy (napr. polymérazy). Stupeň špiralizácie závisí od funkcie chromozómu. Na metabolicky aktívnych miestach (replikácia, transkripcia) je štruktúra chromozómov uvoľňovaná gyrázami. Množstvo RNA závisí od intenzity transkripcie. Pretože nie je vytvorená jadrová membrána, môže translácia hneď naväzovať na transkripciu. Väčšina génov sa nachádza iba v jednej kópii, iba gény pre rRNA sú vo viacerých kópiách.

ktoré spôsobujú ďalšie mitochondriálne poškodenie a hladina už spomínaných proteínov sa ešte viac zvyšuje. Týmto sa končí signalizačná fáza apoptózy a začína sa nevrátna fáza (point of no return = bod, z ktorého niet návratu), počas ktorej sa aktivuje takzvaná *kaspázová kaskáda*. Názov kaspázy označuje skupinu proteáz, ktoré štípeja proteíny na špecifických miestach (hneď za kyselinou asparágovou). Aktivácia kaspázovej kaskády má kľúčový význam v procese apoptózy a zahŕňa sa ňou druhá fáza apoptózy. Kaspázy sú syntetizované ako neaktívne molekuly (prokaspázy), ktoré musia byť pre svoj výkon aktivované vyššie spomínaným signálnym procesom. Najprv dochádza k aktivácii takzvaných iníciačných kaspáz (kaspáza 8, kaspáza 9), ktoré aktivujú exekučné kaspázy (kaspáza 3, 6, 7). Exekučné kaspázy pôsobia na množstvo bunkových substrátov a ich aktivita má pre bunku smrtiace následky. Kaspázy napríklad inaktivujú enzýmy opravujúce poškodenú DNA a tým ukončujú opravy genetického poškodenia, aktivujú endonukleázy, ktoré štípeja DNA na menšie fragmenty (200bp a násobky), degradujú membrány organel aj cytoplazmatickú membránu, hydrolyzujú bunkové proteíny a ničia cytoskeletárne štruktúry. Kaspázami spôsobené zmeny v konečnom dôsledku končia zánikom bunky.

V celom procese vnútornej cesty majú dôležitú úlohu aj antiapoptotické mechanizmy, schopné apoptózu odvrátiť ešte pred spustením kaspázovej kaskády. Najlepšie preskúmaný je protiapoptotický proteín Bcl-2, ktorý sa nachádza predovšetkým v mitochondriách. Ak je Bcl-2 prítomný v bunke v dostatočnej koncentrácii, blokuje efekt proteínu p53, chráni mitochondrie pred poškodením a bunku pred apoptózou. Proteín Bcl-2 patrí do rodiny bcl-2 proteínov, do ktorej okrem antiapoptotických patria aj proteíny podporujúce apoptózu (proapoptotické). Najznámejší proapoptotický proteín tejto skupiny je Bax. Apoptóza môže byť zastavená aj proteími z iných skupín (inhibitor apoptózy = IAP, FLICE inhibujúci proteín = FLIP).

### Vonkajšia signálna cesta

Vonkajšia signálna cesta sa nazýva aj cesta cez receptory smrti. Zahŕňa sa naviazaním ligandu na receptory smrti. Receptory smrti sú bunkové receptory patriace do skupiny TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor - receptory pre tumor nekrotizujúce faktory). Touto cestou prebieha apoptóza buniek napadnutých vírusmi alebo nádorových buniek pomocou T-lymfocytov. Naviazanie ligandu na receptor vyvolá aktivitu komplexu indukujúceho smrť. K tomuto komplexu sa pripája prokaspáza 8, ktorá je týmto komplexom štípená na aktívnu kaspázu 8. Vytvorenie kaspázy 8 je iníciačným signálom pre spustenie kaspázovej kaskády so všetkými už spomenutými následkami pre osud bunky, ktoré vyvrcholia jej zánikom.

### 4.3.3. Porovnanie nekrózy a apoptózy

Nekróza	Apoptóza
- ovplyvňuje skupinu buniek	- ovplyvňuje jednu bunku
- pasívny proces (ATP nepotrebné)	- aktívny proces (spotreba ATP)
- zápalová reakcia	- bez zápalovej reakcie
- zväčšenie bunky	- zmenšenie bunky
- abnormálne lyzozómy	- neporušené lyzozómy
- náhodné štípenie DNA	- špecifické štípenie DNA (rebríček)
- fragmentovaný chromatin	- kondenzovaný chromatin
- výsledok lýzy bunky	- výsledok apoptotické telieska



### 5.1.1. Plazmidy a epizómy

Okrem hlavného chromozómu môžu prokaryotické bunky obsahovať aj iné cytoplazmatické genofory - *plazmidy* a *epizómy*. Sú to kruhové molekuly DNA a majú podobnú štruktúru ako hlavný chromozóm. Dĺžka plazmidov a epizómov je rozmanitá, od niekoľko kb (kilobáz) až po niekoľko stoviek kb. Obsahujú gény, ktoré sú pre bunku postrádateľné, ale v určitých situáciách umožňujú selekčnú výhodu. Plazmidy sú typické pre prokaryotické bunky, hlavne baktérie, zistili sa však aj v bunkách nižších eukaryotov (kvasinky a plesne).

**Plazmidy** sú definované ako extrachromozómové častice, ktoré sa replikujú nezávisle od hlavného chromozómu a pravidelne sa dedia (obr. 5-1). Všetky bakteriálne plazmidy sú kruhové molekuly dvojvláknovej DNA s charakteristickou superhelikálnou terciárnou štruktúrou.

Dĺžka rôznych plazmidov je veľmi rozmanitá (1,5 tisíc bp – 232,5 tisíc bp, bp = párov báz). Najmenšie plazmidy kódujú iba dva polypeptidy, najväčšie obsahujú viac než 300 priemerné veľkých štruktúrnych génov. Plazmidy sa rozdeľujú na *malé* s molekulovou hmotnosťou do cca  $30 \times 10^6$  a *veľké* s molekulovou hmotnosťou vyššou. **Veľké plazmidy** sú v bunke prítomné zvyčajne len v jednej kópii a replikujú sa iba raz v priebehu jedného bunkového cyklu. **Malé plazmidy** sa replikujú opakovane v priebehu bunkového cyklu a bunka môže obsahovať až niekoľko 100 kópií. Pre svoju veľkú replikačnú schopnosť sa preto často používajú ako vektory v génovom inžinierstve.

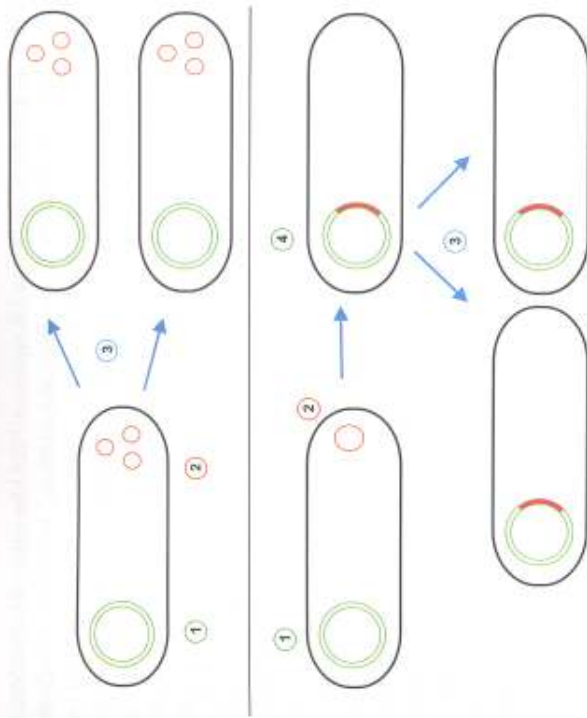
Rôzne druhy plazmidov obsahujú odlišnú genetickú informáciu a majú pre bunku rôzny význam. Všetky plazmidy však obsahujú lokus *ori*, od ktorého sa začína replikácia DNA a *lokus Inc*, ktorým sa pripája plazmid k plazmatickej membráne.

*Plazmidy F* (fertilitné) obsahujú väčší počet génov (napr. gény *tra*), ktoré kódujú proteíny potrebné pre konjugáciu baktérií a odovzdávanie DNA do bunky prijemcu, tzv. faktor F. Baktérie s F faktorom je možné rozpoznať podľa fimbrií (sex pilusov) na ich povrchu. Pomocou týchto vláknien baktéria môže konjugovať s inou baktériou a preniesť do nej časť svojej genetickej informácie. Ide o takzvaný parasexuálny proces. Baktérie s F faktorom označujeme ako F<sup>+</sup>, baktérie bez tohto faktora F<sup>-</sup>. F<sup>+</sup> baktérie môžu konjugovať s F<sup>-</sup> baktériami a odovzdať im kópiu DNA F plazmidu, čím sa baktéria stáva F<sup>+</sup>.

*Plazmidy R* (rezistencia) obsahujú gény, ktoré bunke zabezpečujú rezistenciu voči antibiotikám, chemoterapeutikám, iónom ťažkých kovov a iné. Bežne sa vyskytujú plazmidy obsahujúce združenú rezistenciu voči viacerým antibiotikám súčasne, napr. voči chloramfenikolu, streptomycínu, kanamycínu a sulfonamidom. Ak sú súčasne prítomné gény *tra* (podmieňujúce konjugáciu), umožňujú to šírenie rezistencie v populáciách bakteriálnych kmeňov a predstavuje značné problémy z hľadiska epidemiológie a terapie infekčných chorôb najmä na lôžkových oddeleniach (nozokomiálna infekcia rezistentnými kmeňmi). Prenos je možný nielen medzi bunkami rovnakého druhu (kmeňa), ale aj medzi rôznymi kmeňmi. Čo sa týka obsahu génov, plazmidy sú dostatočne plastické a môžu inkorporovať ďalšie gény, takže sú výhodnými vektormi v génovom inžinierstve.

*Plazmidy Col* obsahujú gény pre tvorbu kolicínov, proteínov, ktoré majú schopnosť usmrcovať iné baktérie toho istého druhu alebo iných druhov. Kolicíny usmrcujú len tie baktérie, ktoré majú pre ne receptory.

Významné sú plazmidy, ktoré umožňujú svojim hositeľom špeciálne metabolické vlastnosti, napr. schopnosť fixácie vzdušného dusíka (gény *nif*) alebo *Ti* plazmidy baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, ktoré prechádzajú z baktérií do rastlinných buniek a spôsobujú vznik nádorov.



**Obrázok 5-1.** 1 – chromozómová DNA, 2 – plazmid, 3 – prenos, 4 – chromozómová DNA s integrovaným plazmidom

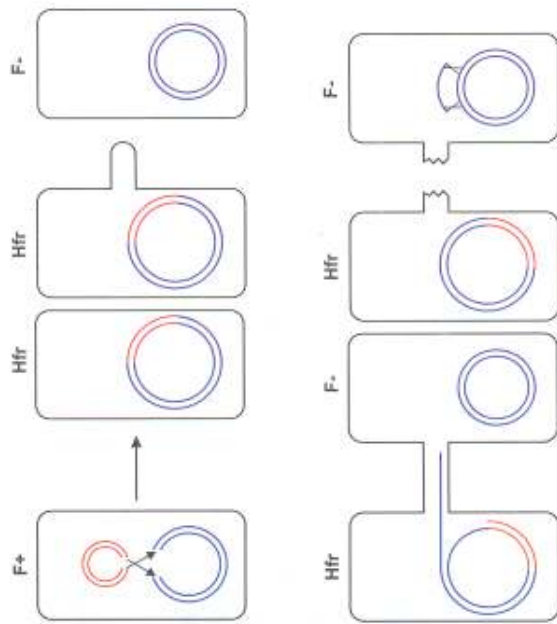
Plazmidy pre svoju genetickú plasticitosť sa často využívajú ako vektory (prenášače) cudzorojnej DNA (napr. ľudskej) do bakteriálnej bunky. Do plazmidu sa začlení cudzoroďá DNA a to tak, že sa plazmid aj cudzoroďá DNA rozštiepi tým istým reštrikčným enzymom a tým sa umožní inzercia fragmentu DNA iného organizmu; vznikne rekombinovaný plazmid, resp. rekombinovaná DNA. Rekombinované plazmidy sa vložia do baktérií, kde sa potom nechajú namnožiť a vytvorí sa klon baktérií, ktoré nesú špecifický fragment cudzorojnej DNA.

Prikladom produktov získaných pomocou rekombinovanej DNA kultivovaním buniek *E. coli*, kvasiniek alebo cicavčích buniek a využívaných v terapii sú:

- Inzulín – pre diabetikov
- Faktor VIII – liečba hemokoagulopatií napr. mužov postihnutých hemofiliou
- Faktor IX – pre liečbu hemofílie B
- Rastový hormón – liečba hypopituitarizmu a nanizmu
- Erythropoetín – pri liečbe anémie
- Tri typy interferónov – liečba vírusových ochorení
- Paratyroidný hormón – liečba hypoparatyreózy
- Vakcína proti hepatitíde B - očkovanie
- Angiostatin a endostatin – proti rakovine
- Adenozin deamináza (ADA) – pre liečbu ťažkej kombinovanej imunodeficiencie (SCID)



**Epizómy** sú plazmidy, ktoré sa inkorporovali do hlavného chromozómu baktérie, a replikujú sa ako integrálna súčasť hlavného chromozómu. Integráciu umožňujú **inzerčné sekvenčie** (IS elementy). Inzerčné sekvenčie (800 – 1400 bp) sú prenosné (transposable) v rámci chromozómu aj medzi chromozómami a plazmidmi. Umožňujú nehomologickú rekombináciu medzi rôznymi chromozómami vrátane inzercie plazmidov do hlavného chromozómu. Inzercia je možná na rôzne miesta chromozómu podľa aktuálnej prítomnosti IS elementu. Príkladom epizómu je *F. faktor* (faktor fertility, obr. 5-2). *F. faktor* môže existovať ako autonómny kruhový chromozóm alebo sa môže integrovať do hlavného chromozómu. *F. faktor* obsahuje gény pre prenos chromozómu pri konjugácii baktérií. Bunky s *F. faktorom* sa označujú *F+* (darcovia), bunky bez *F. faktora* ako *F-* (prijemcovia). *F+* baktérie majú na povrchu zvláštne vláknité výrastky (fimbrié), pomocou ktorých môže táto baktéria konjugovať s inou baktériou. Ak je *F. faktor* súčasťou hlavného chromozómu, je prenos chromozómu pri konjugácii oveľa častejší a takéto bakteriálne kmene sa nazývajú *Hfr* (high frequency of recombination). Pri konjugácii sa vytvorí konjugáčna trubica. Endonukleáza preruší jedno vlákno *F. faktora* alebo *Hfr* chromozómu. Do bunky prijemcu prechádza novosyntetizovaná jednoreťazcová DNA svojím 5' koncom a komplementárne reťazce sa syntetizujú pribežne ako v bunke darcu tak aj prijemcu. *F. plazmid* sa zvyčajne odovzdáva kompletne (prijemca sa stáva *F+*), hlavný chromozóm len sčasti. Medzi chromozómami v bunke prijemcu potom dochádza k rekombinácii.



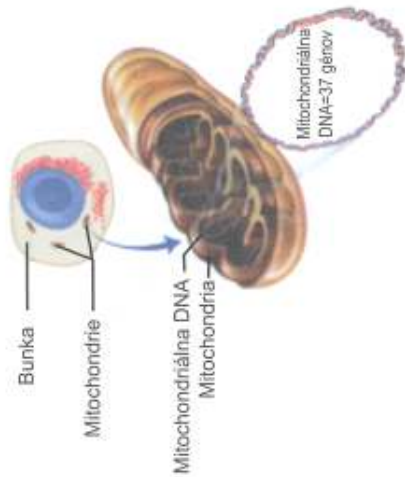
**Obrázok 5-2.** *F. faktor* v *E. coli*: *F-* bunka bez *F. faktora*, *F+* bunka s autonómnym *F. faktorom* a *Hfr* bunka s *F. faktorom*, ktorý sa integroval do hlavného chromozómu.

## 5.2. Chromozómy mitochondrií

Mitochondrie sú cytoplazmatické organely s dvojitou membránou, s vlastnou DNA (mtDNA), obsahujú asi 1 % DNA eukaryotických buniek. Vznikajú len delením už existujúcich mitochondrií (autoreprodukcia). Hlavná biologická funkcia mitochondrií spočíva v syntéze ATP ako hlavného donora metabolickej energie pre väčšinu endergonických procesov v bunke. Svojimi enzýmami zabezpečujú bunkové dýchanie. Energia uvoľnená v

Krebsovom cykle sa prenáša na ATP, ktorý je dôležitý pre biochemické reakcie v bunke. Proteíny mitochondrií sú čiastočne kódované jadrovou DNA, čiastočne mtDNA.

Mitochondrie obsahujú kruhové dvojitákové molekuly DNA (obr. 5-3), tzv. *mitochondriálnu DNA*, ktorá predstavuje *mitochondriálny chromozóm*. DNA nemá intróny, nie je spojená s histónmi, vytvára teda chromozóm prokaryotického typu. Mitochondriálna kruhová DNA sa v mitochondrii nachádza vo viacerých kópiách, v bunkách človeka 5 – 10, v kvasinkách až 50.



**Obrázok 5-3.** Mitochondriálna DNA

Mitochondriálne chromozómy sú uložené v matrix a sú pripojené na vnútornú membránu mitochondrie. Proteosyntetický systém sa podobá prokaryotickému. Genetický kód pre transláciu mitochondriálnej mRNA na mitochondriálnych ribozómoch je podobný, nie však identický s kódom jadrového genómu. Napr. kodón UGA funguje v univerzálnom genetickom kóde ako stop-kodón, v mitochondriách však kóduje tryptofán, kodón AUA nekóduje izoleucin, ale metionín (u rastlín sú však kodóny pre transláciu mitochondriálnej mRNA vhodné s univerzálnymi). Navyše sa mitochondriálny genóm od jadrového genómu líši aj typom dedičnosti, ktorý sa označuje ako **maternálny typ dedičnosti**, to znamená výlučný prenos od matky.

Mitochondriálna DNA človeka obsahuje 37 génov a 16 596 párov báz (bp). Ich postupnosť je presne známa (obr. 5-4). Kóduje dve mitochondriálne rRNA, 22 tRNA a 13 polypeptidov, ktoré sú podjednotkami enzýmov oxidatívnej fosforylácie potrebných pre tvorbu ATP. Ostatné mitochondriálne bielkoviny kóduje jadrová DNA.



Mitochondriálne gény a chromozómy môžu rovnako ako jadrové gény a chromozómy podliehať mutáciám. Mitochondriami sa u človeka prenášajú dve ochorenia: *Lebereova atrofia zrakového nervu* (L. slepota - rýchla nekroza optického nervu má za následok slepotu na začiatku dospelosti) a *mitochondriálna myopatia* (gr. *pathos* - choroba, ochorenie) spojená s morfológickými zmenami svalu, abnormálnym energetickým metabolizmom a svalovou slabosťou, často sprevádzaná dysfunkciou centrálného nervového systému. Leberevova slepota sa neprenáša mendelovským spôsobom. Prenos z muža na muža pravdepodobne nemôže nastať. V rodinách s mitochondriálnou myopatiou (heterogénne generalizované ochorenie, pri ktorom je patológia mitochondrií najvýznamnejším nálezom) sa opisal maternálny spôsob prenosu.

### Transpozóny - pohyblivé elementy v genóme

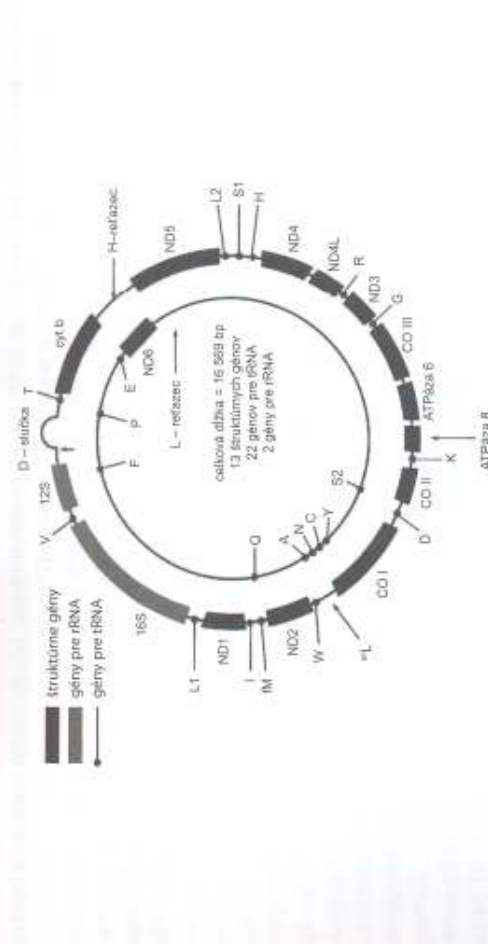
Prokaryotické a eukaryotické chromozómy sú relatívne stále a k ich zmenám dochádza len mutáciami a rekombináciami. Tak prokaryotické ako aj eukaryotické bunky sa vyznačujú schopnosťou premiestňovať (transponovať) nukleotidové sekvencie z jedného miesta genómu na iné. Tieto sekvencie sa nazývajú *pohyblivé elementy* - *transpozóny* (inzerčné sekvencie, skákajúce gény). Transpozóny sa môžu premiestňovať z jednej molekuly DNA do inej alebo z jedného miesta molekuly na iné miesto tej istej molekuly. Pri premiestňovaní sa buď z DNA vyštiepia a začlenia do cieľového miesta, alebo sa najprv skopirujú a do cieľového miesta sa inzeruje ich kópia.

Malé transpozóny, označované aj ako *inzerčné sekvencie*, obsahujú iba gény pre svoju vlastnú transpozíciu, najčastejšie gén pre enzým *transpozáz*, ktorý katalyzuje transpozíciu. Väčšie transpozóny obsahujú aj ďalšie gény, u baktérií najčastejšie gény pre rezistenciu na antibiotiká. Začlenením transpozónov do niektorého génového lokusu dochádza k mutácii, ktorá je zvyčajne nestabilná - gén mutuje naspäť a zmenený fenotyp sa mení do pôvodného stavu. Príkladom sú z medicínskeho hľadiska dôležité zmeny antigénnej štruktúry trypanozómy, spôsobené transpozíciou génov pre povrchové glykoproteíny. Týmto mechanizmom sa môžu meniť v krátkych - niekoľkohodinových intervaloch antigénne vlastnosti parazita a trypanozómy môžu takto odolávať imunitným reakciám hostiteľa.

Zvláštnym typom transpozónov sú tzv. *retrotranspozóny*. Ich transpozícia sa uskutočňuje tak, že transpozónová sekvencia sa najprv prepíše do RNA a podľa nej sa nasynetizuje enzým reverzná transkriptáza. RNA sa reverznou transkripciou prepíše do kópie DNA a táto kópia sa začlení do cieľového miesta. Takáto transpozícia sa označuje ako *retropozícia*. Retrotranspozóny sú pravdepodobne prítomné v genóme všetkých eukaryotických organizmov. Odhaduje sa, že 10% ľudského genómu tvorí retrotranspozóny. Jedna ich kategória, tzv. *Alu sekvencia*, sa nachádza po celom ľudskom genóme v počte asi pol milióna kópií. Alu sekvencie predstavujú asi 5% celého ľudského genómu. Neobsahujú zrejme žiadnu genetickú informáciu okrem vlastnej schopnosti šíriť sa po genóme. Zatiaľ nie je jasné, aký to má význam pre evolúciu ľudského genómu.

### 5.3. Ľudské chromozómy

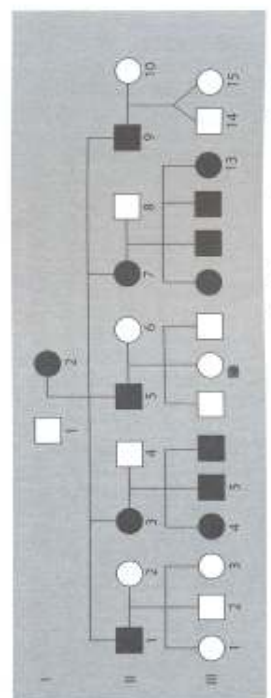
Chromozómy sa nachádzajú v jadre buniek. Obsahujú tri základné biopolyméry: DNA, bázičné bielkoviny a bielkoviny kyslého charakteru. V jadre sa nachádza aj RNA, jej množstvo závisí od intenzity transkripcie. Ľudské chromozómy obsahujú cca  $10^9$  génov, 6 x jedna párův báz a majú celkovú dĺžku DNA cca 2 metre. V každom chromozóme sa nachádza jedna lineárna molekula DNA v komplexe s histónmi (chromatín). Chromozómy možno mikroskopicky pozorovať len počas mitotického, resp. meiotického delenia, pretože chromatinové vlákna sa nachádzajú v týchto dvoch štádiách v kondenzovanom stave.



Obrázok 5-4. Genetická mapa ľudského mitochondriálneho genómu.

Mitochondrie boli v dávnej histórii pravdepodobne samostatne žijúce baktérie a v priebehu vývoja sa vyvinula dedičná symbióza (endosymbióza) s eukaryotickými bunkami.

Mitochondriálny genóm predstavuje určitú časť genetickej pamäti bunky. Pri mitóze sa mitochondrie distribuujú rovnomerne do dcérskych buniek. Všetky mitochondrie sú materského pôvodu a prenesli sa cytoplazmou vajíčka. V ľudskom oocyte je veľké množstvo mitochondrií, mtDNA predstavuje až 30 % bunkovej DNA. V krčku spermie sa nachádza len niekoľko mitochondrií a aj tie po oplodnení zanikajú. Do vytváranej zygoty (oplodneného vajíčka) spermia prispieva len svojim jadrovým genómom, ale nedodáva nič zo svojho mitochondriálneho genómu; mitochondrie dodáva len jeden z rodičov, teda matka a mitochondriálny genóm je pôvodný genóm neoplodeného vajíčka ženy. Matka prenáša mitochondriálny genóm tak na synov ako aj na dcéry, otec ho neprenáša vôbec. Všeobecne nazývame túto dedičnosť ako nemendelovskú (neplatia Mendelove pravidlá) alebo cytoplazmatickú, resp. ako *maternálnu* (matroklinita) (obr. 5-5).

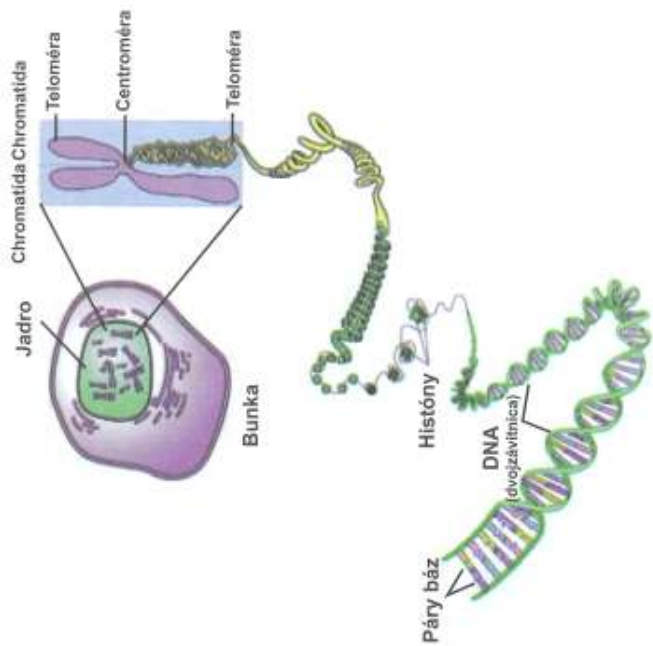


Mitochondrie a ich genóm sa prenášajú z matky na všetkých jej potomkov

Obrázok 5-5. Mitochondriálna dedičnosť a jej prenos.



Z funkčného hľadiska chromozómy v kondenzovanom stave (metafázové) nie sú transkripčne aktívne. Počas interfázy je však väčšina chromatinových vlákien oveľa menej kondenzovaná, a preto mikroskopicky neviditeľná, a stáva sa funkčne aktívnou (obr. 5-6).

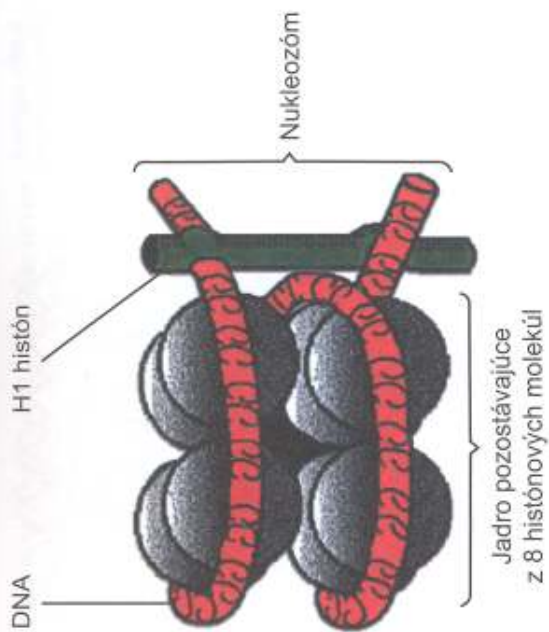


Obrázok 5-6. Usporiadanie genetického materiálu od DNA po chromozómy.

### 5.3.1. Submikroskopická štruktúra chromozómov

Základom každého chromozómu je vlákno, ktoré sa nazýva *chromatinové vlákno*. Chromatín je hmota bunkového jadra farbiteľná zásaditými farbivami. Za elementárnu základnú štruktúru chromatinu možno vo všeobecnosti považovať **nukleozómy** – histónové oktaméry, obsahujúce po dve molekuly bázičických bielkovín typu H2A, H2B, H3 a H4, okolo ktorých sa obíča DNA dĺžky 146 párov báz (obr. 5-7)

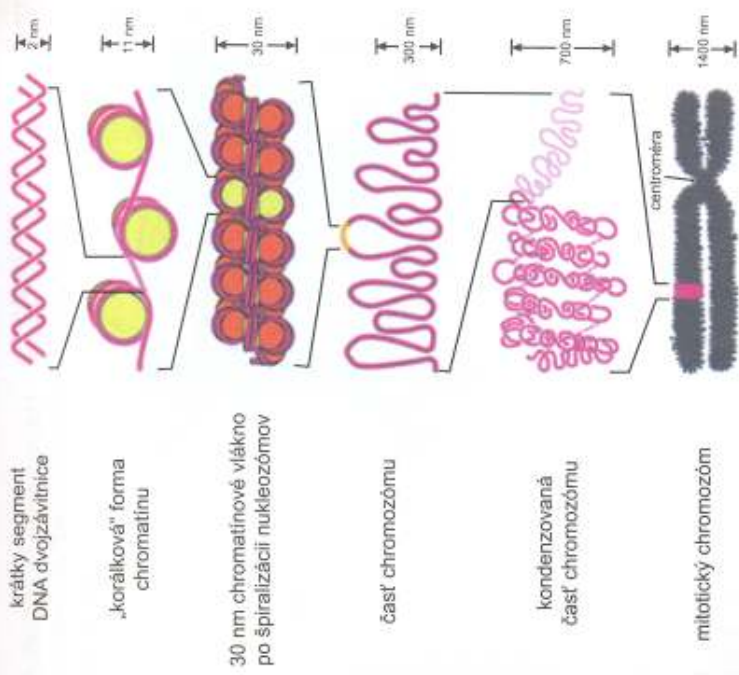
Elektrónovým mikroskopom vidieť tieto častice vo forme retiazky korálok (nukleozómové reťazce). Z bielkovín bunkového jadra tvoria asi 95 % históny a len 5 % bielkoviny nehistónového charakteru. Históny sú bielkoviny, ktoré sú bohaté na bázičné aminokyseliny – lyzín a arginín. Ako polykationy sa viažu relatívne pevne na DNA, ktorá sa správa ako polyanión. Je päť typov histónov: **H1, H2A, H2B, H3 a H4**. Okrem štruktúrnej úlohy a účasti na špiralizácii DNA sa im pripisuje úloha pri regulácii génovej aktivity a tým aj pri regulácii bunkového metabolizmu.



Obrázok 5-7. Štruktúra nukleozómu.

Kyslé proteíny (nehistónové) sú heterogénna skupina veľkého počtu rôznych bielkovín. Ovplyvňujú priestorové usporiadanie DNA v jadre a aktivitu génov. Nukleozómy majú priemer 11 nm. Dĺžka lineárnej časti DNA medzi nukleozómami je druhovo špecifická (8 – 114 bp). Vyššia štruktúra chromozómu vzniká spojením nukleozómov pomocou histónov H1 do 30 nm širokého **chromatinového vlákna**. Chromatinové vlákno vytvára priestorové slučky v spojení s nehistónovými proteínmi (priemer slučiek je 300 nm). Ich ďalšou špiralizáciou v priebehu profázy vznikajú metafázové chromozómy (priemer 1 400 nm) dobre viditeľné v optickom mikroskope. V období metabolickej aktívácie DNA (transkripcia, replikácia) sa DNA dešpiralizuje, vlákno DNA je lineárne (obr. 5-8).





Obrázok 5-8. Usporiadanie DNA do chromatinu a chromozómov.

### 5.3.2. Euchromatín a heterochromatín

Organizácia chromatinu v jadre má dve extrémne formy prechádzajúce plymule jedna do druhej:  
 1. chromatinovú sieť vlákien v interfáze,  
 2. jednotlivé chromozómy počas delenia bunky.

Prvý typ chromatinu, ktorý sa nachádza roztrúsené v prevažnej časti jadra a farbí sa difúzne, sa označuje ako euchromatín. Ostatný chromatin sa skladá z vlákien, ktoré zostávajú v silne kondenzovanom (zvinutom) stave počas celého bunkového cyklu a na chromozóme vytvárajú tmavo sfarbené oblasti; označuje sa ako heterochromatín.

Podľa intenzity sfarbenia chromatinu zásaditými farbivami, stupňa jeho kondenzácie a intenzity transkripcie sa teda chromatin delí na *euchromatín* a *heterochromatín*.

**Euchromatín** sa skladá z unikátnych (t. j. neopakujúcich sa) sekvencií DNA. Väčšina génov sa nachádza v oblastiach euchromatinu, ktorý je transkripcie aktívny.

**Heterochromatín** na rozdiel od euchromatinu sa farbí intenzívnejšie, predstavuje silne špiralizovanú (kondenzovanú) formu chromatinu (euchromatín dekonduzuje) a je v podstate transkripcie neaktívny. Jeho podkladom je neskorosyntetizovaná DNA, geneticky neaktívna alebo veľmi málo aktívna (gény tu uložené sa neprepisujú do RNA). Podstatou heterochromatinu je vysoko repetitívna DNA (utváraná mnohými opakovaniami toho istého sledu dusíkatých báz).

Medzi euchromatinom a heterochromatinom neexistuje však presná hranica. Mnohé oblasti chromatinu sú v skorých štádiách vývinu organizmu euchromatinového a v neskorších heterochromatinového rázu. Z genetického hľadiska to znamená, že väčšinou obsahujú gény, ktoré sú len v skorých štádiách ontogenézy aktívne. Rozlišujú sa dva druhy heterochromatinu: **konštitutívny** a **fakultatívny**.

Ako *konštitutívny heterochromatín* sa označuje chromatin, ktorý je prítomný vo všetkých bunkách jedinca a vo všetkých štádiách jeho vývoja. Je vždy geneticky neaktívny, pretrváva v kondenzovanom stave a neprepisuje sa do RNA v priebehu celého bunkového cyklu (t. j. v interfáze i v priebehu mitózy). Nachádza sa v oblastiach primárnej konštrikcie (centromére) všetkých chromozómov a často tiež v telomérach chromozómov. Okrem toho tvorí veľké heterochromatinové bloky v pericentromerických oblasti dlhých ramien chromozómov 1, 9, 16 a veľkú časť dlhých ramien chromozómu Y (Yq).

*Fakultatívny heterochromatín* môže byť geneticky aktívny alebo neaktívny, závisí to od typu bunky a od jej vývinového štádia. Príkladom je chromatin jedného z dvoch chromozómov X u žien. Vzniká v skorom štádiu embryogenézy kondenzáciou a masívnou metyláciou jedného z dvojice chromozómov X, vrátane jeho euchromatinovej oblasti, čím sa genetická informácia umiestnená na tomto chromozóme stáva nedostupnou. Ide o mechanizmus zabezpečujúci kompenzáciu gémovej dávky (dva chromozómy X u žien a len jeden u mužov – Lyonovej teória inaktívacie chromozómu X).

### 5.3.3. Inaktívacia chromozómu X - lyonizácia, kompenzácia dávky

Aj keď muži majú iba jednu kópiu každého génu na chromozóme X a ženy dve kópie, množstvo produktov týchto génov u muža a ženy je rovnaké. Mechanizmus akým sa dosahuje táto „kompenzácia“ dávky sa dá vysvetliť na základe inaktívacie chromozómu X. Túto inaktíváciu často označujeme **lyonizáciou**, pretože ako prvá ju popísala Mary Lyonová, ktorá študovala genetiku myši. Jej princíp spočíva v troch bodoch:

1. V samičích somatických bunkách cicavcov je transkripcie aktívny len jeden chromozóm X. Druhý chromozóm X je heterochromatický a inaktívny. V interfázových bunkách sa objavuje ako sex chromatin, Barrovo telesko alebo X-chromatín
2. K inaktívácii dochádza vo včasnom štádiu embryonálneho vývoja; u človeka k tomu dochádza na 16. deň.
3. Inaktívacia je náhodná – v každej samičej somatickej bunke môže byť inaktívny chromozóm X paternálneho alebo maternálneho pôvodu. Ak však nastane inaktívacia jedného chromozómu X, všetkých následných generáciách dcérskych buniek, ktoré vzniknú mitotickým delением z tejto bunky, budú mať inaktívovaný rovnaký chromozóm X.

Kondenzovaný (inaktívny) chromozóm X je viditeľný v interfázovom jadre ako plankonvexné telesko pri jadrovej membráne a označuje sa ako **sex chromatín**, **X chromatín** alebo **Barrovo telesko**. Počet Barrových teliesok je n-1 (n = počet chromozómov X). Na základe interfázového vyšetrenia chromatinu X je tak možno určiť počet chromozómov X vo vyšetrovanej bunke.

Ku kondenzácii chromozómu X dochádza asi 16. deň po oplodnení, kedy sa zárodoček skladá asi z 5 000 buniek. Špiralizácia maternálneho resp. paternálneho chromozómu X v jednotlivých somatických bunkách jedincov ženského pohlavia je náhodný dej. Výnimkou sú prípady morfológie zmenených chromozómov X, vtedy sa aberovaný chromozóm inaktívuje prednostne. V línii dcérskych buniek je vždy inaktívovaný ten istý chromozóm.



Žena je z hľadiska väčšiny génov lokalizovaných na X chromozóme mozaikou. V niektorých bunkách je funkčný paternálny, v iných bunkách maternálny chromozóm. Inaktivovaný chromozóm X sa replikuje neskôr v porovnaní s geneticky aktívnym chromozómom X (asynchronna replikácia).

V prípade pacientov s nebalansovanými štruktúrnymi aberáciami chromozómov X (delecie, duplikácie, izochromozóm) je prednostne inaktivovaný ten chromozóm X, ktorý je štruktúrne abnormálny. Táto preferenčná inaktívacia prispieva k tomu, že aberácie chromozómu X sú lepšie tolerované než podobné abnormality autozómov, a preto ich častejšie nachádzame u pacientov.

Inaktívacia chromozómu X nie je absolútna – určité lokusy sú aktívne aj na inaktivovanom chromozóme X. Rozsiahla analýza expície viac ako 250 génov lokalizovaných na chromozóme X ukázala, že asi 10 až 15 percent génov nepodlieha inaktívácii a že sa prepisujú na aktívnom aj inaktívnom chromozóme X. Tieto gény nie sú na chromozóme náhodne rozmiestnené, ale je ich viac na Xp ako na Xq.

#### 5.3.4. Karyotyp človeka, morfológia chromozómov

Pri bunkovom delení – mitóze zaniká jadrový obal, chromatín sa kondenzuje a vznikajú kompaktné útvary – **mitotické chromozómy**. Počet a tvar chromozómov je druhovo špecifický. Cytogenetické vyšetrenie je zamerané na **chromozómy v metafáze**.

46 chromozómov normálnej somatickej bunky človeka vytvára 23 homologických párov. Chromozómy homologického páru sú rovnakej veľkosti, rovnakého tvaru (s rovnako uloženou centromérou) a vo vzťahu ku genetickej informácii, ktorú nesú, sú rovnocenné. To znamená, že majú rovnaké génové lokusy v rovnakom poradí, hoci na ktoromkoľvek lokuse môžu mať rovnaké alebo rozličné alely. Jeden chromozóm z každého homologického páru sa dedí od otca, druhý od matky a len jeden z každého páru sa zasa odovzdáva dieťaťu. 22 párov chromozómov je rovnakých u mužov aj u žien, a preto ich voláme **autozómy**. Ostatný pár, dva **pohlavné chromozómy** (gonozómy, heterochromozómy), je iný u mužov a iný u žien a má rozhodujúci význam pre determináciu pohlavia. Za normálnych okolností sú dva chromozómy jedného páru autozómov mikroskopicky neodlíšiteľné. To isté platí aj o ženských pohlavných chromozómoch. U muža sa pohlavné chromozómy navzájom líšia. Jeden z nich je chromozóm X, rovnaký ako u ženy, ktorý muž dedí od matky a odovzdáva dcéram; druhý, chromozóm Y, dedí muž od otca a odovzdáva ho synom. Keďže ľudské pohlavné chromozómy X a Y sa počas meiózy spájajú prostredníctvom malých úsekov na konci krátkych ramien každého z nich, usudzuje sa, že obsahujú krátky homologický segment. Somatické bunky majú **diploidný** (2n) súbor chromozómov (*diploos*, dvojnásobný), zatiaľ čo gaméty **haploidný** (n) súbor chromozómov (*haploos*, jednoduchý). Niektoré špecializované bunky (napr. bunky pečene) majú polyploidný súbor chromozómov. Za patologických okolností sa môže abnormálny počet chromozómov vyskytnúť v somatických aj zárodočných bunkách. Za normálnych okolností sú však bežné somatické bunky diploidné a gaméty haploidné. Termínom haploidný genóm alebo diploidný genóm sa zvyčajne označuje haploidný alebo diploidný chromozómový súbor v kompletnom genóme.

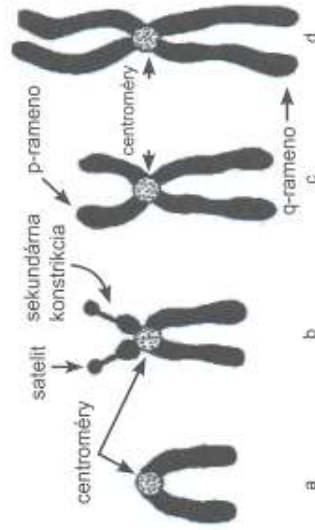
**Metafázový chromozóm** je zložený s dvoch identických **sesterských chromatíd**. V profáze chromatídy k sebe priliehajú po celej dĺžke, v metafáze sa oddeľujú, ale stále sú spojené v oblasti centroméry. **Centroméra** má význam pri rozdelení chromatíd do dcérskych buniek. V oblasti centroméry sa pripájajú mikrotubuly deliaceho vretienka na dve ramená. Obsahuje repetitívne sekvencie DNA. Centroméra rozdeľuje chromozóm na dve ramená, krátke sa označuje ako **p**, dlhé sa označuje ako **q** (obr. 5-9). Konce chromozómov sa nazývajú **teloméry**. Teloméry sú úseky bez génov. Obsahujú telomericú satelitnú DNA (repetitívne

sekvencie bohaté na guanín). Teloméry zabezpečujú stabilitu chromozómov pri bunkovom delení. Pri starutí buniek dochádza ku skrakovaniu telomér.

Skracovanie telomér v eukaryotických bunkách má za následok postupnú stratu replikačnej schopnosti. Je to spojené s *replikatívnym starnutím*, pretože schopnosť buniek deliť sa je obmedzená počtom predchádzajúcich delení. *Nádorové bunky* ale dokážu poškodené teloméry opraviť a ďalej sa deliť.

Podľa polohy centroméry rozlišujeme chromozómy:

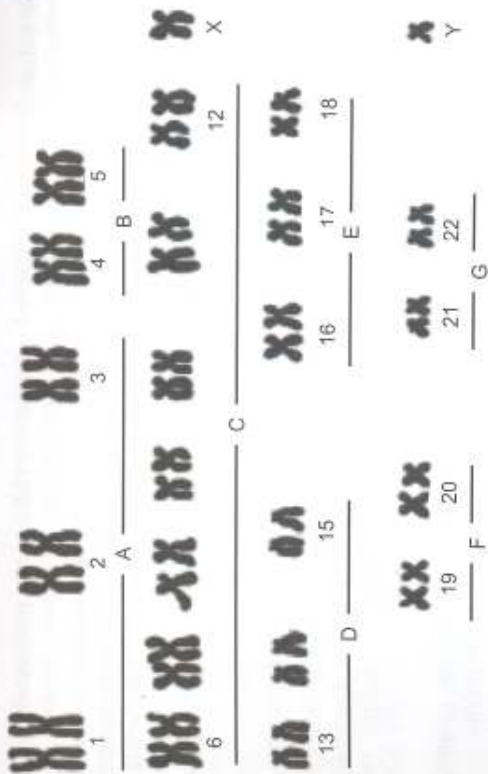
- **metacentrické** – centroméra sa nachádza v strede chromozómu
- **submetacentrické** – centroméra je posunutá od stredu chromozómu
- **akrocentrické** – centroméra je výrazne posunutá ku koncu chromozómu; na krátkych ramenách akrocentrických chromozómov sa nachádzajú repetitívne sekvencie, ktoré vytvárajú cytogenetické útvary – **satelity** (NORY – nukleolárne organizátory)
- **telocentrické** s centromérou umiestnenou na konci chromozómu. Telocentrické chromozómy sa nenachádzajú v ľudskom karyotype.



**Obrázok 5-9.** Typy chromozómov: a) telocentrický, b) akrocentrický so satelitmi, c) submetacentrický, d) metacentrický

Mitotickú figúru analyzujeme napr. tak, že jednotlivé chromozómy vystriháme z mikrofotografie a zostavíme ich do homologických párov podľa štandardnej klasifikácie. Takýto postup sa nazýva **karyotypizácia**. Hotový obrázok metafázových chromozómov zoradených do homologických párov, podľa veľkosti a do 7 morfológických skupín A – G sa volá **karyotyp** (obr. 5-10). Grafický znázornený karyotyp sa označuje ako *idiogram*. Od roku 1961 sa začal používať *Denver*ský systém klasifikácie ľudských chromozómov farbených konvenčnou (homogénnou) metódou, podľa ktorého hodnotiacim kritériom je celková dĺžka chromozómu a poloha jeho centroméry. Chromozómy ľudského karyotypu rozdeľujú podľa ich veľkosti a umiestnenia centroméry do 7 skupín označovaných písmenami A – G (tab.1)





Obrázok 5-10. Normálny karyotyp muža (46,XY, konvenčná metóda, farbenie Giemsovým farbivom).

Tab. 1 Triedenie ľudských chromozómov.

Skupina	Autozómy	Gonozómy	Charakteristika chromozómov	Počet chromozómov	
				muž	žena
A	1-3	-	veľké približne metacentrické	6	6
B	4-5	-	veľké submetacentrické	4	4
C	6-12	X	stredne veľké submetacentrické	15	16
D	13-15	-	stredne veľké akrocentrické	6	6
E	16-18	-	malé metacentrické resp. submetacentrické	6	6
F	19-20	-	najmenšie metacentrické	4	4
G	21-22	Y	najmenšie akrocentrické	5	4
Spolu	44	2		46	46

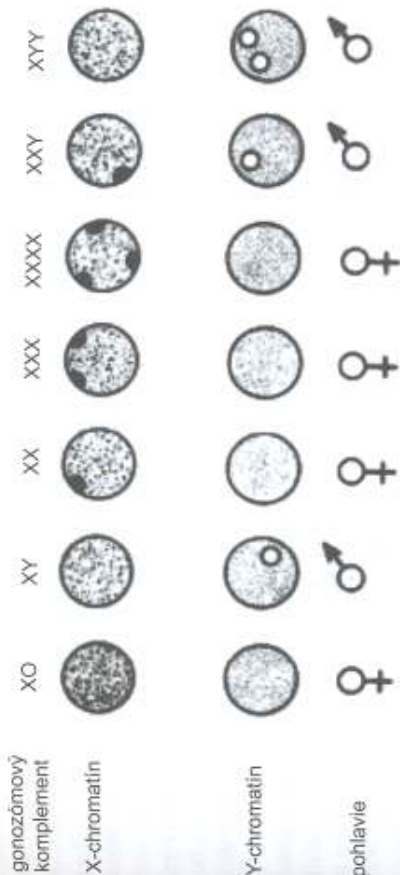
### 5.3.5. Cytogenetické metódy

Chromozómy možno vyšetřovať jednak v priebehu delenia bunky, najvhodnejšie v metafáze (prípadne v prometáfaze) – **chromozómová analýza**, jednak v interfáze – vyšetřenie **X-chromatinu** a **Y-chromatinu**, metódy molekulárnej cytogenetiky – **ISH, FISH**, atď.

Počet X-chromatinových teliesok sa rovná celkovému počtu chromozómov X zmenšenému o 1 (obr. 5-11). Najvhodnejším materiálom na vyšetřenie X-chromatinu je koža (bunky zo stratum spinosum), epitel sliznic (bukálnej sliznice) a vlasové koreňky. Zvlášť

vhodné sú vlasové koreňky, pretože z nich možno urobiť čistejšie preparáty ako z keratinizujúcich buniek bukálnej sliznice, ktoré majú často značnú mikrobiálnu prímes.

Počet buniek s pozitívnym náálezom X-chromatinu dosť kolíše, a to v závislosti od druhu vyšetřovaného materiálu, použitej vyšetřovacej metódy, kvality preparátov, uloženia telieska, veku vyšetřovaného, skusenosti vyšetřujúceho a ďalších faktorov. Pri použití buniek z bukálnych sliznic a farbenia orceinom sa vyskyt X-chromatinu u ženy najčastejšie zaznamenáva v 20 – 30% buniek, u muža od 0 do 3% (nepráva pozitívita).



Obrázok 5-11. Vzťah medzi výskytom chromatinu X a Y a počtom chromozómov X a Y.

Vyšetřovanie **Y-chromatinu** umožnilo zavedenie fluorescenčných metód do klinickej genetiky. Metóda je založená na silnej asociácii a interkalácii fluorescenčného farbiva do heterochromatinového bloku na jeho dlhých ramenách. Časť dlhého ramena chromozómu Y potom intenzívne fluoreskuje aj v interfáze bunkového cyklu. Chromozóm Y má však v celkovej populácii značne variabilnú dĺžku dlhého ramena a aj jeho heterochromatinový úsek môže byť rozlične dlhý. Počet Y-chromatinových teliesok však na rozdiel od X-chromatinových určuje skutočný počet chromozómov Y. Ako materiál na vyšetřenie sa najčastejšie používajú epitelové bunky získané sterom bukálnej sliznice, leukocyty periférnej krvi a fibroblasty pestované v tkanivových kultúrach. Priemerný výskyt fluoreskujúcich Y-chromatinových teliesok je u normálnych mužov v epitelových bunkách bukálnej sliznice okolo 40% a v krvných náteroch okolo 67%.

Súčasným vyšetřením chromatinu X a Y teda získame obraz o gonozómovom komplemente vyšetřovaných buniek, pričom obidve metódy spolu umožňujú **skríningové vyšetřenie chromozómového pohlavia** napr. u športovcov pred rozličnými súťažami, v súdnom lekárstve a pri orientačnom vyšetření pacientov s podozrením na chromozómovú aberáciu niektorého z pohlavných chromozómov. Variabilita Y-chromatinu a frekvencia X-chromatinu však význam týchto vyšetření obmedzujú, preto sa dnes uprednostňujú FISH-testy.

Chromozómová analýza sa zaoberá počtom a mikroskopickým vzhľadom chromozómov, ich segregáciou počas meiotického a mitotického delenia a vzťahom medzi abnormálnymi chromozómovými nálezi a fenotypovými prejavmi (**klinická cytogenetika**).

Chromozómovú analýzu najčastejšie indikuje klinický genetik. Medzi indikácie patri:

- 1) výskyt vrodených vývojových anomálií viacerých systémov u pacienta, ktoré jednoznačne nemožno zaradiť do klinického obrazu známych jednotiek monogénového charakteru,



- 2) anomálie vnútorného a vonkajšieho genitálu, sekundárnych pohlavných znakov, poruchy menštruácie, sterilita, infertilita (treba vyšetriť obidvoch manželských partnerov),
- 3) rôzne stupne oligofrenie v kombinácii s ďalšími vrodenými vývojovými poruchami, malígne hematologické procesy, solídne nádory a i.

### Konvenčná metóda

Keďže najvhodnejším objektom na chromozómovú analýzu sú metafázové chromozómy, nevyhnutným predpokladom je získanie dostatočného počtu buniek v tomto štádiu mitotického delenia. S výnimkou maligných neoplastických buniek a čiastočne aj buniek kostnej drene to možno doceliť iba pestovaním buniek v bunkových kultúrach. Pestovanie buniek in vitro si vyžaduje sterilný odber materiálu, vhodné kultivačné médium, zachovanie optimálnej teploty, pH a pod.

Najčastejším materiálom pri vyšetrovaní chromozómov v somatických bunkách počas mitotického delenia sú bunky periférnej krvi, kostnej drene, fibroblasty kože a bunky plodovej vody. Pre svoju ľahkú dostupnosť sú najvhodnejšie bunky periférnej krvi, presnejšie lymfocyty, ktoré sa stimulujú k mitotickej aktivite pomocou mitogénnych lektínov, napr. extraktom z fazule - fytohemaglutinínom. Na deliace sa bunky potom pôsobíme niektorým z inhibitorov mitózy, napr. kolchicínom alebo jeho derivátom kolcemidom, ktoré inhibujú deliace vretienko. Týmto sa zastavia mitózy všetkých buniek v tzv. c-metafáze (z angl. colchicine metaphase). Na bunky pôsobíme hypotonickým roztokom, ktorý zabezpečí rozptýlenie chromozómov, fixačným roztokom (zmes kyseliny octovej a metanolu) a po nakvapkaní na podložné sklíčka ich zafarbíme. Klasickým farbením Giemsovým farbivom získame homogénne zafarbené chromozómy. Vhodné prehládne zostavy metafázových chromozómov sa fotografujú v mikroskope pri veľkom zväčšení a z fotografií sa potom chromozómy vysiľujú a zostavujú do karyotypu. Okrem lymfocytov môžeme použiť aj iné bunky s vysokou mitoticou aktivitou, napr. bunky kostnej drene, in vitro kultivované fibroblasty, plodové bunky z amniovej tekutiny alebo bunky z trofoblastu choriových klkov. Posledné dve uvedené možnosti sa využívajú v prenatalnej cytogenetickej diagnostike.



Obrázok 5-12. Ľudské chromozómy v štádiu metafázy (konvenčná metóda, farbenie Giemsovým farbivom).

Po zhotovení preparátov pozorujeme v mikroskope **mitotickú figúru** – zostavu metafázových chromozómov ľudskej bunky, ktoré sú rozložené v optickej rovine (obr. 5-12). Nedostatkom konvenčnej metódy je, že neumožňuje presnú diferenciáciu všetkých chromozómov, presnú identifikáciu metafázových chromozómov v rámci skupín (ak sú podobnej veľkosti a tvaru – napr. C skupina), ani identifikovať menšie chromozómové prestavby. Tento nedostatok sa začal veľmi pociťovať v klinickej genetike. Metóda neumožňovala napr. vždy presne určiť, ktorý chromozóm je postihnutý aberáciou.

Významným medzníkom bolo zavedenie **průzkovacích metód** v roku 1970 Casperonom. Tieto techniky umožnili individuálnu identifikáciu jednotlivých chromozómových párov v ľudskom karyotype a neskôr vyšetrovanie prometafázových chromozómov poskytlo vyššiu rozlišovacia schopnosť, ktorá umožňuje rozlíšiť v celom genóme ľudskej bunky až 1200 průzków. Ešte väčšiu citlivosť v rozlišovaní rozdielov medzi chromozómami umožnilo zavedenie molekulárnych metód *hybridizácie DNA* „in situ“ na chromozómoch (FISH metóda).

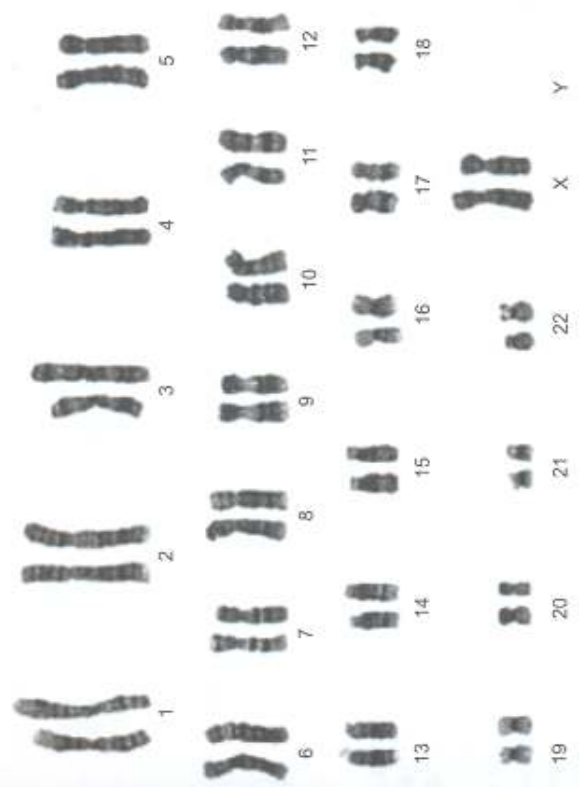
### Průzkovacie metódy

Až do roku 1970 bolo homogénne (konvenčné) farbenie jedinou farbivacou metódou. Odvtedy sa vyvinulo viacero metód, ktorými sa dá dosiahnuť průzkovanie chromozómov. Pre tieto špeciálne farbivacie postupy sa používa termín *diferenciálne farbenie*.

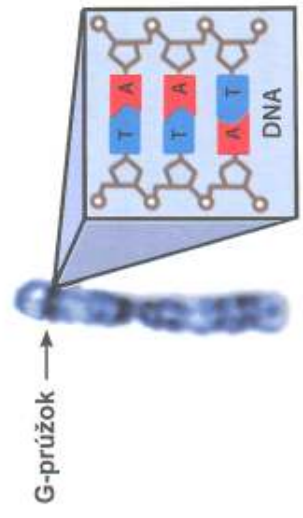
**Průzkovanie** (banding) je technika farbenia chromozómov, pri ktorej charakteristický vzor priečných průzków umožňuje individuálnu identifikáciu jednotlivých chromozómov alebo ich častí. Vzniknuté pásiky sú pre každý chromozóm typické počtom aj umiestnením a vyplývajú z jeho konkrétnej euchromatinovej a heterochromatinovej štruktúry. Pri průzkovacích metódach sa chromozómy denaturujú pred farbením rozličným spôsobom, napr. hypotonickým roztokom chloridu draselného, hydroxidom sodným, používa sa natrávenie trypsinom. Potom sa preparáty farbiva zmesou Giemsovoho farbiva. Zavedenie průzkovacích metód do chromozómovej analýzy si vyžiadalo isté zmeny a doplnky do existujúcej Denverkej klasifikácie. Ich výsledkom je **Parížska klasifikácia (nomenklatúra)**, ktorá umožňuje opis jednotlivých chromozómov (1 – 22, X resp. Y). Parížska konferencia o štandardizácii v humánnej cytogenetike v roku 1971 navrhla spôsob označovania chromozómových průzków. Na obr. 5-13 je schematické znázornenie průzków pozorovaných pri použití G-, Q- a R-farbiacich metód. Q- a G-průžky majú charakter farbenia súhlasný, R-průžky opačný.



**G-prúzkovanie.** Pri tejto najviac rozšírenej identifikačnej farbacej metóde sa na chromozómy (na podložnom sklíčku) pôsobí trypsinom, ktorý denaturuje proteíny chromozómov a tie sa potom farbja Giemsovým farbivom. Chromozómy vychytávajú farbivo tak, že vzniknú tmavo a bledo zafarbené prúžky (G-prúžky, obr. 5-14, obr. 5-15, obr. 5-16) pričom tmavé prúžky zodpovedajú svietiacim Q-prúžkom ďalšej prúzkovacej metódy. Je to základná metóda chromozómového vyšetrenia človeka. Mechanizmus tvorby prúžkov nie je celkom jasný. G a Q prúžkovanie zvyrazňuje časti DNA bohaté na A-T páry báz, R prúžkovanie úseky DNA bohaté na C-G páry.

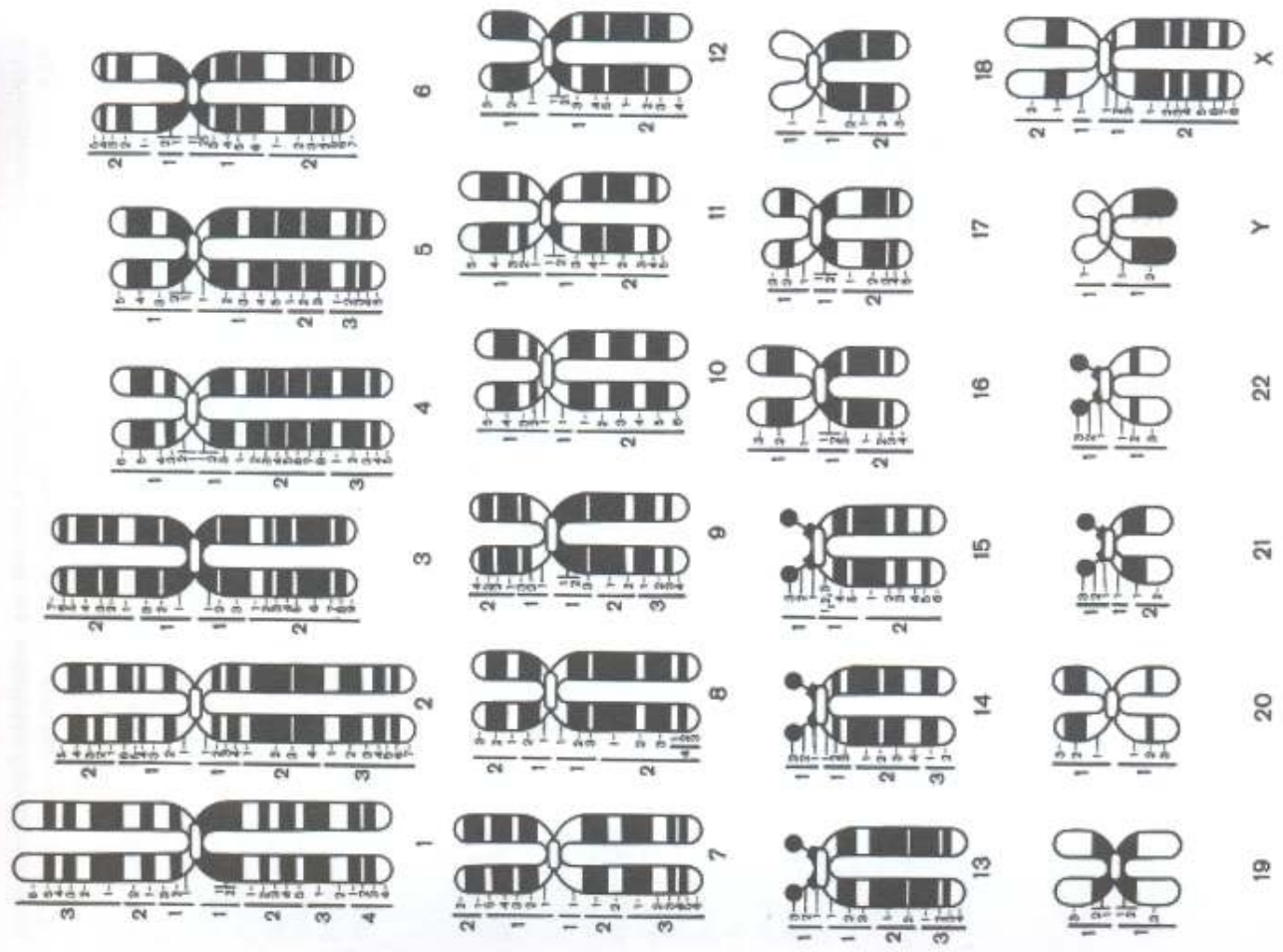


Obrázok 5-14. G-prúzkovacia metóda – karyotyp ženy (46,XX)



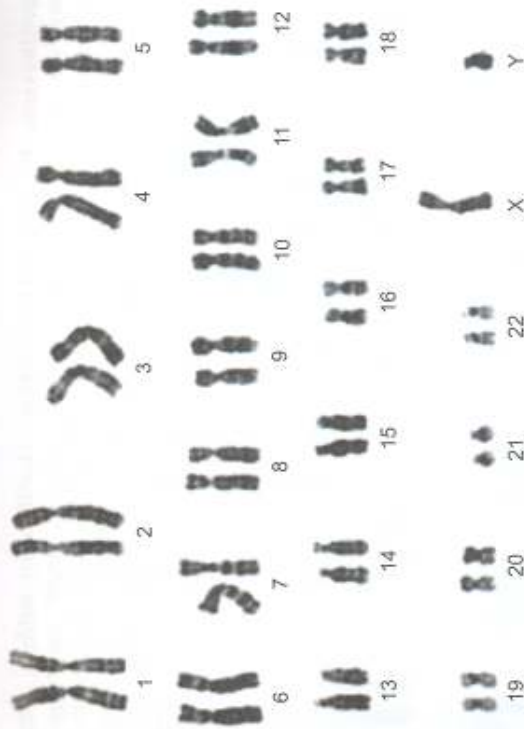
Chromozóm

Obrázok 5-15. G-prúžky bohaté na A-T páry báz.



Obrázok 5-13. Parížska nomenklatura: idiogram ľudských chromozómov. Zobrazuje typy prúžkov a ich číslovanie, ktoré bolo prijaté na Parížskej konferencii (1971).





Obrázok 5-16. G-průžkovacia metóda – karyotyp muža (46,XY)

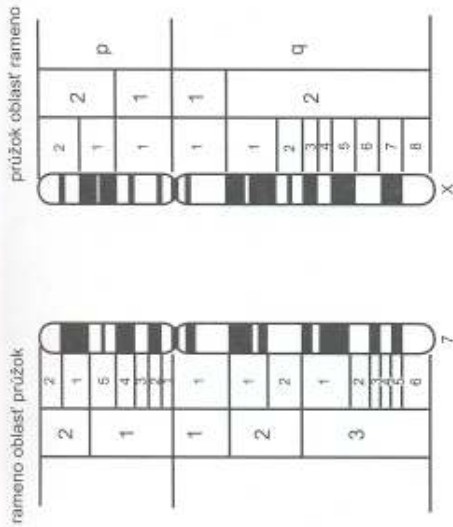
**Q-průžkovanie.** Chromozómy sa zafarbia fluorescenčným farbivom, napr. chinakrínom a pozorujú sa vo fluorescenčnom mikroskope. Chromozómy sú zafarbené špecifickým spôsobom so svetlými a tmavými prúžkami. Q-průžky sa používajú ako referenčné na štandardnú klasifikáciu chromozómov. Používa sa zriedkavejšie, pretože farbenie nie je stále.

**R-průžkovanie.** Ak na chromozómy na podložnom sklíčku pôsobíme alkalickými roztokmi pri 87,5°C a potom sa zafarbia Giemsovým farbivom, dostaneme tmavo a bledo zafarbené průžky, ktoré sú negatívnym obrazom G alebo Q průžkov. R-průžkovanie má rovnakú informačnú hodnotu ako průžkovanie G alebo Q, ibaže je menej rozšírené. Používa sa na zvýraznenie telomér.

**C-průžkovanie.** Táto metóda špecificky farbi centromérovú oblasť a ďalšie úseky, ktoré obsahujú konštitutívny heterochromatín, čiže priamú konštrukciu chromozómov 1, 9, 16 a distálny úsek dlhých ramien chromozómu Y.

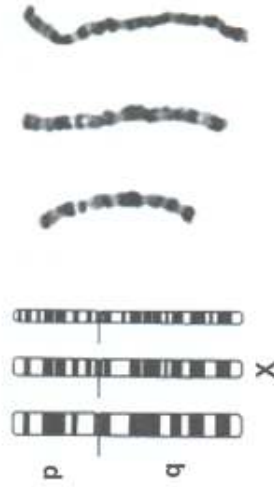
**NOR-farbenie.** Táto metóda využíva dusičnan strieborný, ktorý farbi oblasť organizátorov jadierka na akrocentrických chromozómoch (Nucleolar Organizing Region – NOR). Sú to vlastne mostíky akrocentrických chromozómov so satelitmi, ktoré obsahujú gény pre 28S a 18S ribozómovú RNA.

**Parížska klasifikácia** hodnotí počet a polohu pásov na krátkych (p) a dlhých (q) ramenách každého chromozómu. Každé rameno obsahuje 1 až 6 oblastí a určitý štandardný počet pásov (v závislosti od jeho dĺžky). Číslovať sa začína od centroméry smerom k terminálnemu úseku chromozómu. Na obr. 5-17. je schematické znázornenie průžkov chromozómu č. 7 a X chromozómu pri použití G-farbiacej metódy. Na označenie určitého průžku na niektorom chromozóme treba vždy uviesť číslo chromozómu, symbol pre rameno (p – krátke; q – dlhé), číslo oblasti na príslušnom ramene a číslo vlastného průžku v danej oblasti. Všetko sa píše za sebou bez medzery a bez interpunkcie. Napríklad: 7q33 znamená chromozóm č. 7, dlhé rameno, oblasť 3, průžok 3. Pri použití metódy HRT dochádza k rozpadu pôvodne jedného průžku na niekoľko ďalších průžkov, a tým ich počet stúpa na 800 až 1400. Tak vzniká potreba rozšírenia pôvodnej klasifikácie a jednotlivé průžky sa označujú rozšírením zápisu za bodku, napr. 1q24.12.



Obrázok 5-17. Schematické znázornenie průžkov a oblastí na chromozómoch č. 7 a X po G-průžkovaní.

Mechanizmus tvorby průžkov je objasnený len čiastočne. G a Q průžkovanie zvyčajne časti DNA bohaté na A-T páry báz, R průžkovanie úseky DNA, ktoré sú bohaté na C-G páry. Kvalita vyšetrenia závisí od stupňa špiralizácie pozorovaných chromozómov, to znamená od ich dĺžky a počtu průžkov. V c-metóde rozlišujeme asi 300 průžkov v jednej sade, v prometafáze 1200 průžkov. Bunky v prometafáze získame tak, že zosynchronizujeme bunkové delenie a skrátime pôsobenie kolchicínu. Metóda sa označuje *technika s vysokou rozlišovacou schopnosťou*, HRT (high resolution technique) a umožňuje identifikovať aberácie aj veľmi malého rozsahu (obr. 5-18).



Obrázok 5-18. Chromozóm X: ideogramy a mikrofotografie v metafáze, prometafáze a profáze (zľava doprava)

**Výmeny sesterských chromatíd (SCE).** Touto metódou sa identifikujú výmeny určitých úsekov medzi sesterskými chromatídami jedného chromozómu. Kultivované bunky necháme dvakrát replikovať v brómdeoxyuridíne (BUdR). Ten sa inkorporuje do novosyntetizovanej DNA namiesto tymínu a mení farbitelnosť chromatíd. Napríklad fluorescenčné farbivo Hoechst 33258 farbi tie chromatídy, v ktorých BUdR substituuje iba



jeden reťazec. Ak nastala výmena sesterských chromatíd, dá sa ľahko rozpoznať podľa fluoreskujúcich a tmavých pruhov, ktoré sú usporiadané v smere dlhej osi chromatíd. Frekvencia SCE je veľmi zvýšená pri osobitnej genetickej poruche, tzv. Bloomovom syndróme.

### Molekulová cytogenetika

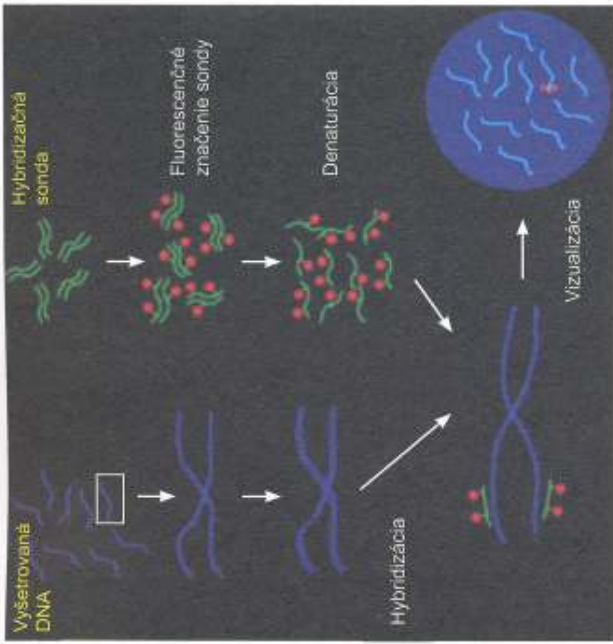
Metódy molekulovej cytogenetiky sú ďalším vylepšením cytogenetických techník. Ich rozvoj sa uskutočnil *zavedením technológií rekombinantnej DNA do cytogenetiky*. Základnou metódou molekulovej cytogenetiky je **hybridizácia in situ (ISH)**, založená na väzbe sekvencií jednoreťazcovej DNA (označovaných ako sondy) s komplementárnymi úsekmi cieľovej DNA, ktoré tiež musia byť jednoreťazcové a sú fixované na mikroskopickom sklíčku. Priprava metafázových chromozómových preparátov je v podstate rovnaká ako pri G-prúžkovaní. Ide tu o využitie kombinácie molekulovej špecificity DNA, resp. RNA a priamej mikroskopickej vizualizácie.

Výšetrovaným materiálom sú metafázové chromozómy, interfázové bunky (jadrá) alebo tkanivové rezy s cieľom identifikovať príslušnú DNA, resp. RNA. Ak sa na vyšetrenie použije DNA, prvým krokom je jej denaturácia – vytvorenie jedného reťazca, na ktorý sa potom naviažu špecifické sondy (molekulová hybridizácia). Uvedený postup je rovnaký ako pri molekulárnej analýze DNA. Aby sondy, a tým i komplementárny úsek cieľovej DNA bolo možné vizualizovať, musia sa sondy označiť. Pôvodne sa na to používali rádioizotopy, neskôr sa zaviedlo neradioaktívne značkovanie, spočívajúce na inkorporácii značkových signálnych molekúl do sond. Robí sa to buď enzymaticky, alebo chemicky a najčastejšie sa používajú fluorescenčné farbivá biotín alebo digoxigenín – **fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH)**, s možnosťou hodnotenia (vizualizáciu signálu naviazanej DNA-sondy) vo fluorescenčnom mikroskope (obr. 5-19, obr. 5-20).

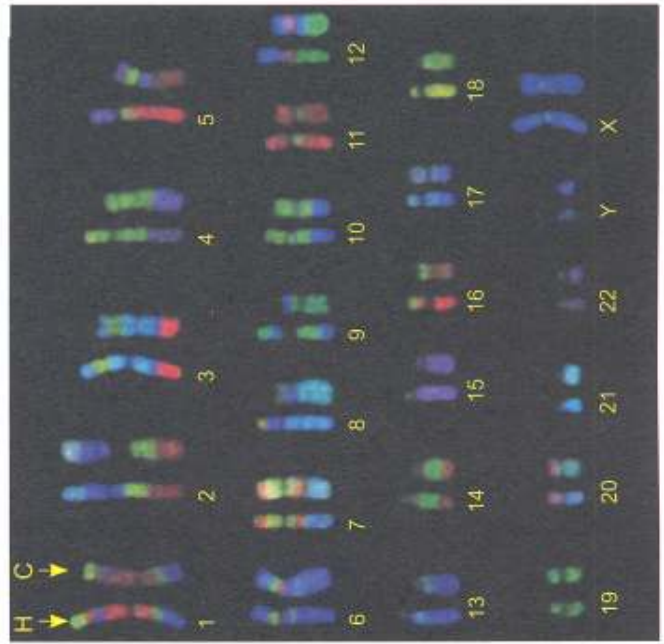
Podľa lokalizácie, špecificity a dĺžky sondy je možné analyzovať:

1. **špecifické chromozómové štruktúry** – napr. satelitné oblasti chromozómov satelitnými sondami, oblasti centromér centromerickými sondami alebo oblasti telomér telomericnými sondami;
2. **špecifické sekvencie DNA**, t. j. oblasti chromozómov, ktoré sú zodpovedné za vznik určitých patologických stavov. Sondy, špecifické pre určitý lokus, umožňujú analýzu štruktúry jednotlivých génov alebo jednotlivé sekvencie v rámci génu – mikrodelečné syndrómy;
3. **celé chromozómy**, pri použití celochromozómových sond.

Veľkou výhodou FISH v porovnaní s klasickými cytogenetickými metodikami je možnosť ich použitia aj v interfáze, čím odpadá proces kultivácie buniek.



Obrázok 5-19. Fluorescenčná hybridizácia in situ (FISH).



Obrázok 5-20. Multifarebná FISH.



## Úlohy

1. Popíšte molekulovú stavbu chromozómov, ich morfológiu a vysvetlite, prečo ich môžeme pozorovať v priebehu mitózy a meiózy.
2. Do tabuľky č. 2 zakreslite jednotlivé typy chromozómov v metafáze a anafáze. Popíšte morfológické rozdiely.

Tab. č. 2

typ chromozómov	metafáza	anafáza
metacentrický		
submetacentrický		
akrocentrický		
telocentrický		

3. Chromozómové vyšetrenie v lymfocytoch periférnej krvi po krátkodobej kultivácii in vitro.

**Materiál:** lymfocyty periférnej krvi kultivované 48 hodín in vitro.

**Postup:** Na blastickú transformáciu a indukciu mitotickej aktivity buniek sme použili fytobemaglutinín. Kultivácia trvala 48 hodín. Pôsobením kolchicínu pridaného 2,5 hodiny pred ukončením kultivácie sme dosiahli kumuláciu mitóz v metafáze. Po skončení kultivácie sme na bunky pôsobili 0,55% roztokom KCl (hypotonický roztok), fixovali fixačným roztokom (metanol a kyselina octová v pomere 3 : 1) a suspenziu buniek sme nakvapkali na podchladené podložné sklá. Preparáty sme farbili Giemsovým farbivom.

**Hodnotenie:** Chromozómovú analýzu robíme pri 1000 násobnom zväčšení. Na hodnotenie sú vhodné iba dobré mitózy, v ktorých sú jednotlivé chromozómy rozprestraté a neprekývajú sa. Vhodné mitózy zakreslíme schematicky do protokolu, určíme celkový počet chromozómov a určíme chromozómové pohľadie jedince.

4. Zostavenie normálneho karyotypu človeka

**Materiál a pomôcky:** mikrofotografia c-metafázy mitózy ľudských lymfocytov po krátkodobej kultivácii, nožnice, lepidlo.

**Postup:** Na reprodukciu mikrofotografie ľudských chromozómov v c-metafáze najprv spočítajte chromozómy. Potom vystrihnite jednotlivé chromozómy, zoradte vystrihnuté chromozómy najprv podľa veľkosti a polohy centroméry do skupín A – G a identifikujte ich podľa morfológických charakteristík podľa Denverkej klasifikácie (konvenčne zafarbené chromozómy), resp. Parížskej klasifikácie (průzkované chromozómy). Po

kontrolu asistentom nalepte chromozómy do protokolu. Stanovte chromozómové pohľadie jedince s daným karyotypom.

5. Vyšetrenie X-chromatínu v bunkách bukálnej sliznice farbených acetoorceínom

**Materiál a pomôcky:** krycie a podložné sklo, Pasteurova pipeta, 2% roztok acetoorceínu, filtračný papier.

**Postup:** Vypláchneme si ústa vodou. Krátkou hranou čistého podložného skla urobíme ster bukálnej sliznice. Materiál z prvého steru nepoužívame. Materiál z ďalšieho steru preniesieme na druhé podložné sklo a zhotovíme náterový preparát podobnou technikou ako pri zhotovení krvného náteru. Náter ponecháme na vzduchu 30 sekúnd, nesmie však vyschnúť. Pridáme dve kvapky farbiva acetoorceínu a farbíme jednu minútu. Opatrne priložíme krycie sklo. Kúskom filtračného papiera odsajeme prebytočné farbivo. Pozorujeme pri 400-násobnom zväčšení.

Na samostatne zhotovenom preparáte vyšetrite 20 bunkových jadier na prítomnosť X-chromatínu.

**Hodnotenie:** X-chromatín sa vyskytuje v interfázových jadrách buniek jedincov ženského pohľadia. U cicavcov samičieho pohľadia, teda i u žien, je jeden z dvoch X-chromozómov geneticky neaktívny, zostáva kondenzovaný a dobre farbiteľný aj v interfáze (lyonizácia) a môžeme ho pozorovať ako plankonvexný útvar (chromatínová hrudka) veľkosti 1 μm nachádzajúci sa na vnútornej strane jadrovej membrány. Dospelé zdravé ženy majú v priemere 20-30 % buniek pozitívnych na prítomnosť X-chromatínu. Pri pozitívite 6 až 10 % jadier považujeme to za dôkaz gonozómového komplementu XX. Pre diagnostické vyšetrenie je nutné vyhodnotiť najmenej 100 bunkových jadier. Nakreslite bunku s pozitívnym a negatívnym nálezom. Hodnotenie X chromatinu (Barrových teliesok) umožňuje orientačné vyšetrenie chromozómového pohľadia v interfázových bunkách. Používa sa ako tzv. sex test u žien pri vrcholových športových súťažiach. Vyšetrenie môže upozorniť aj na odchýlky v počte heterochromozómov X.



## 6. Mutácie

Aj keď jednou zo základných vlastností genetického materiálu je jeho stabilita - nemennosť, t.j. schopnosť presne sa replikovať a tak sa prenášať v idenitckej forme do ďalších generácií, môže dochádzať s väčšou alebo menšou pravdepodobnosťou k jeho zmenám. Tieto zmeny môžu byť indukované rôznymi faktormi prevažne vonkajšieho ale aj vnútorného prostredia organizmu a nazývame ich **mutácie**.

**Mutácia** je náhla, neusmerená a trvalá zmena genetického materiálu, ktorá nie je podmienená segregáciou ani rekombináciou. Faktory, ktoré indukujú mutácie, nazývame **mutagény**. Proces vzniku mutácií sa označuje **mutagenéza**.

**Mutácie sa delia** z viacerých hľadísk:

- 1) z kauzálneho hľadiska sa delia na tzv. **spontánne mutácie** - pričína ich vzniku je neznáma, čo však neznamená, že sa v budúcnosti po zlepšení detekčných možností neodhalí, a **indukované** - je tu kauzálny súvis s určitými exogénnymi faktormi;
- 2) podľa druhu buniek, ktorých DNA postihujú, ide o **mutácie gametické** - vznikajú v priebehu gametogenézy a gamétami sa prenášajú do všetkých buniek potomka, a **mutácie somatické** - vznikajú v somatických bunkách na rôznej úrovni postzygotického intrauterinného vývoja jedince, prenášajú sa na ďalšie generácie dcérskych buniek a výsledkom je **genetická mozaika** - skladba buniek s mutantnou a normálnou DNA;
- 3) podľa charakteru, resp. rozsahu vlastnej poruchy DNA sa mutácie delia na **genómové** - numerické chromozómové zmeny, **chromozómové** - štruktúrne chromozómové zmeny, a **génové** - bodové mutácie. Zatiaľ čo prvé dva druhy mutácií je možno odhaliť mikroskopicky - cytogeneticky (zmeny v počte alebo štruktúre chromozómov), génové mutácie sa dokazujú pomocou molekulevej analýzy DNA, alebo sa na ne usudzuje na podklade fenotypových nálezov alebo výsledkov Amesovho testu;
- 4) z hľadiska významu (selekcie) pre svojho nositeľa môžeme mutácie rozdeliť na: **mutácie výhodné, nevýhodné a neutrálne**. **Výhodné mutácie** zvyšujú reprodukčnú schopnosť svojho nositeľa, **neutrálne mutácie** reprodukčnú schopnosť nositeľa neovplyvňujú. Najčastejšie sú **mutácie nevýhodné**, ktoré obvykle spôsobujú stratu alebo poruchu funkcie génu. Extrémnou formou nevýhodnej mutácie je **mutácia letálna**, ktorá spôsobuje buď smrť jedince alebo neschopnosť jedince sa reprodukovať. Pozorovateľné sú však len mutácie zlučiteľné so životom. Odhaduje sa, že každý jedinec je nositeľom až 12 nevýhodných mutantných recesívnych génov, 3 - 5 letálnych ekvivalentov (génov, ktoré v homozygotnom stave spôsobujú postihnutie, resp. sú letálne);
- 5) podľa vplyvu na životaschopnosť svojho nositeľa mutácie delíme na:
  - a) **mutácie vitálne** - neovplyvňujú životaschopnosť svojho nositeľa
  - b) **mutácie subvitálne** (subletálne) - znižujú životaschopnosť svojho nositeľa (menej než 90% úmrtnosť)
  - c) **mutácie semiletálne** - úmrtnosť 91 - 99%
  - d) **mutácie letálne** - úmrtnosť nositeľov 100%

**Spontánne mutácie** sa vyskytujú nepredvídateľne, veľmi zriedkavo a možno na ne usudzovať len ak sa prejavia vo fenotype, preto ich výskyt je mimoriadne obťažný. Je však známy činiteľ, ktorý zvyšuje výskyt tohto druhu mutácií, a ktorý ukazuje schodnú cestu na ich prevenciu. Je to **zvyšujúci sa vek rodičov pri koncepcii**, ktorý však pôsobí v závislosti na pohľavi špecificky len pri vzniku určitých druhov mutácií. Výskyt trizómií 21 ako aj všetkých ostatných autozómových trizómií a ostatne i všetkých chromozómových aberácií sa **zvyšuje s vekom matky**. Je dokázaný vzostup frekvencie mnohých génových mutácií so **zvyšujúcim sa vekom otca**. Z mnohých monogénových ochorení ide tu napr. o Marfanov syndróm, achondropláziu, Apertov syndróm a i. V týchto prípadoch otec vo veku nad 40 rokov má 5-10-krát vyššie riziko ako otec vo veku okolo 25 rokov. Zaujímavá skutočnosť je v prípade hemofílie A, ktorá má dedičnosť na X-chromozóm viazanú recesívneho typu. I tu frekvencia mutácií stúpa s vekom muža. Pretože však synovia dostávajú od otca chromozóm Y, mutácia génu pre faktor VIII musí nastať u starého otca zo strany matky postihnutého syna a mutantný gén mu odovzdáva matka - prenášačka recesívnej alely.

Základné delenie mutácií vychádza z úrovne, na ktorej zmeny genetického materiálu posudzujeme. Podľa toho rozlišujeme mutácie **génové, chromozómové a genómové**.

### 6.1. Génové mutácie

**Gén** môžeme definovať ako základnú funkčnú jednotku dedičnosti konkrétne danú špecifickým úsekom DNA, ktorý je zodpovedný za syntézu jedného polypeptidového reťazca (proteínu, enzýmu) a je vymedzený iniciálnym a terminálnym kodónom (tripletom). **Génová mutácia** je z molekulového hľadiska kvalitatívna alebo kvantitatívna zmena sekvencie báz príslušnej oblasti DNA (génu), ktorá môže podmieňovať podľa pravidiel genetického kódu zmeny v sekvencii aminokyselín v bielkovinách (enzýmoch). Génové mutácie sú zmeny v sekvencii DNA v rozsahu od jedného nukleotidu až k zmenám tisíciek párov báz, ale vždy v rozsahu príliš malom na to, aby boli viditeľné pri cytogenetickom vyšetrení.

Častým dôsledkom zmien sekvencie aminokyselín v proteínoch (enzýmoch) je strata ich špecifickej funkcie.

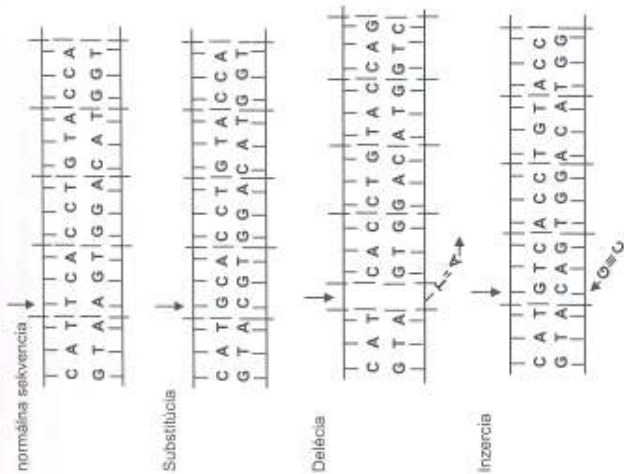
Z molekulového hľadiska podkladom génovej mutácie môže byť **substitúcia** (zámena) jedného nukleotidu za iný, **delecia** (chýbanie) alebo **inzercia** (vsunutie) jedného alebo viacerých nukleotidov (obr. 6-1).

Vzájomná zámena purínových a pyrimidinových báz sa označuje ako **tranzícia** (A x G, C x T), zámena purinovej bázy za pyrimidinovú alebo obrátene sa označuje ako **transverzia** (napr. A x C, G x T a pod., obr. 6-2).

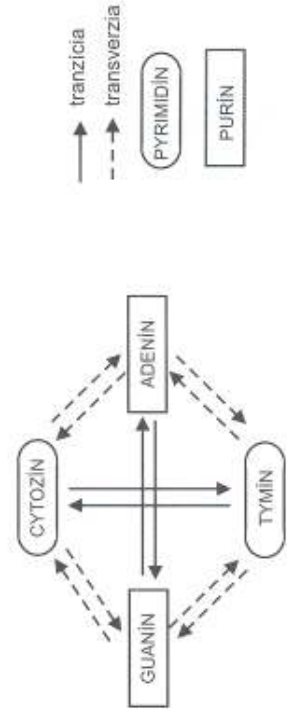
Iné kritérium delenia génových mutácií je podľa typu postihnutej DNA:

- a) mutácie postihujúce kódujúcu DNA (exóny)
- b) mutácie postihujúce nekódujúcu DNA (intróny) - majú význam pre posttranskripčný zosťah mRNA
- c) mutácie v negénových častiach DNA - majú najväčší význam pre vznik polymorfizmov DNA





**Obrázok 6-1.** Typy génových mutácií – prvá báza druhého kodónu je mutovaná substitúciou, deľciou alebo inzerciou bázy.



**Obrázok 6-2.** Štyri možné typy tranzícií a osem možných typov transverzií.

**Substitúcia**

Je záměna nukleotidu alebo páru nukleotidov za iný nukleotid. Môže byť:

- a) **tranzícia** - je záměna purínovej bázy za purínovú alebo pyrimidínovej bázy za pyrimidínovú (A ↔ G, C ↔ T);
- b) **transverzia** - je záměna purínovej bázy za pyrimidínovú a opačne (A ↔ C, G ↔ T, G ↔ C, G ↔ T).

Príkladom substitúcie u človeka je **kosáčikovitá anémia** (drepanocytóza), ktorá vzniká v dôsledku záměny aminokyseliny (neutrálneho valínu za kyslú kyselinu glutámovú) na 6. pozícii od aminokonce v β reťazci hemoglobínu, v dôsledku čoho sa mení normálny

hemoglobín. A na patologický hemoglobín S. Prítomnosť hemoglobínu S v erytrocytoch spôsobuje zmenu ich tvaru z diskovitého na kosáčikovitý a poruchy transportu kyslíka.

Hb A: val-his-leu-thr-pro-glu-glu-lys-  
 Hb S: val-his-leu-thr-pro-val-glu-glu-lys-

Príčinou záměny aminokyselín je substitúcia (transverzia) v 6. kodóne v štruktúrnom géne pre β reťazec:

DNA: CTC → CAC  
 mRNA: GAG → GUG

**Transpozícia** je zmena poradia susediacich nukleotidov.

**Inverzia** je výmena jedného alebo viacerých nukleotidových párov medzi oboma vláknami DNA.

**Inzercia** (adícia) je vsunutie jedného alebo viacerých nukleotidov do reťazca DNA resp. RNA. Zvláštnym prípadom inzercie je **duplikácia** - zdvojenie nukleotidu. Výsledkom je posunová mutácia (frameshift mutácia).

**Deľcia** je strata jedného alebo niekoľkých po sebe nasledujúcich nukleotidov. Príčinou môže byť napr. aj vloženie transpozónu do nukleotidovej sekvencie. Výsledkom je posunová mutácia.

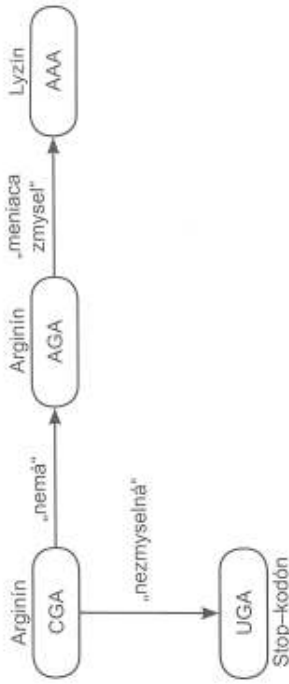
**6.1.1. Rozdelenie génových mutácií podľa dôsledkov na štruktúru polypeptidu**

Podľa toho, aký dôsledok má mutácia na štruktúru polypeptidu, sa rozoznávajú *štyri typy mutácií*:

- a) **mutácie nemeniace zmysel** (nemá mutácia, *silent mutation*) - v dôsledku degenerácie genetického kódu väčšina aminokyselín môže byť kódovaná viacerými tripletmi odlišnej skladby a preto náhrada jednej bázy za druhú sa nemusí prejaviť záměnou aminokyseliny (obr. 6-3);
- b) **mutácie meniace zmysel** (*missense mutation* = chybného zmyslu) - zmena tripletu, ktorý kóduje určitú aminokyselinu, na triplet, ktorý kóduje inú aminokyselinu. Napr. v β reťazci molekuly hemoglobínu je ako šiesta aminokyselina v poradí kyselina glutámová, ktorá má triplet GAG alebo GAA. Pri záměne druhého adenínu za uracil dochádza k záměne kyseliny glutámovej za valín a ku vzniku abnormálneho (fyzikálno-chemicky odlišného) hemoglobínu S, ktorý zapríčiňuje deformáciu červených krviniek na kosáčikovitý resp. polmesiačkovitý tvar a u homozygotov vznik kosáčikovitej anémie;
- c) **nezmyselné mutácie** (*nonsense mutation*, stop mutácia) - v tomto prípade záměna bázy v niektorom triplete má za následok vznik niektorého z troch terminačných kodónov, čo spôsobí predčasné ukončenie syntézy polypeptidu a teda jeho skrátenie. Čím stop-mutácia nastane bližšie k začiatku génu, tým novo vytvorený polypeptid bude kratší a dopad vo fenotype bude závažnejší. Môže nastať aj opačný prípad - predĺženie polypeptidu. Vtedy mutácia spôsobí zmenu terminačného kodónu na triplet, ktorý kóduje nejakú aminokyselinu. Syntézu potom ukončí až nasledujúci normálny terminačný triplet;
- d) **posunová mutácia** (*frameshift mutation*) - tento typ mutácie vzniká deľciou alebo inzerciou odlišného počtu báz ako tri. Pretože podkladom pre kódovací mechanizmus je tripletový systém, po mieste mutácie bude normálne poradie aminokyselín v polypeptide, ale od tohto miesta zmenené usporiadanie báz tripletov zmení ďalšie



poradie aminokyselín. Závažnosť tohto stavu bude podobne ako v predošlom prípade tým výraznejšia, čím je zmenený triplet vzdialenejší od konca génu.



**Obrázok 6-3.** Tri typy substitučných mutácií v kodóne. Ak sa RNA-kodón pre arginín, CGA, zmení na AGA, znova sa kóduje arginín: „nemá“ mutácia. Ak sa CGA zmení na stop-kodón UGA, ukončí sa v tomto mieste syntéza polypeptidu: „nezmyselná“ mutácia. Napokon, ak sa kodón pre arginín AGA zmení v dôsledku substitúcie na AAA, namiesto arginínu sa do polypeptidu začlení lyzín: mutácia „meniaca zmysel“.

Z uvedeného vyplýva, že počet typov mutácií v jednom géne môže byť veľmi veľký. Delécie a inzercie môžu postihovať rôzne dlhé úseky DNA - časť génu, celý gén alebo i väčší úsek DNA, ktorý môže predstavovať až mikroskopicky viditeľnú časť chromozómu. Na úrovni molekuly DNA hranica medzi bodovou mutáciou a štruktúrnou aberáciou chromozómu nie je preto jednoznačná.

Mutácie vznikajú aj v intrónoch (v nekódujúcich úsekoch génu), ďalej v okrajových sekvenciách na 5'- a 3'- konci génu a aj v mimogénových častiach DNA. Nesposobujú zmeny štruktúry polypeptidu, ale nemožno vylúčiť ich vplyv na zmenu intenzity syntézy polypeptidu (najmä v negatívnom zmysle). Zatiaľ jedím výnimku z toho predstavujú mutácie v intrónoch génu pre cystickú fibrózu, ktoré sa zistili v 4% ako podklad choroby. Väčšina mutácií tohto typu však pravdepodobne nemá žiaden dopad na fenotyp, a preto sa označujú ako **neutrálne mutácie**. Majú však veľký praktický význam, pretože ako tzv. polymorfizmus predstavujú dôležité *markery* v *molekulárnej DNA* pre DNA diagnostiku.

Doteraz uvedené mutácie sa týkajú mutácie DNA, môže však k nim dôjsť i v priebehu expície génu - v priebehu transkripcie mRNA, translácie a posttranslačných úprav.

### 6.1.2. Génové mutácie u človeka

Geneticky podmienené patologické stavy predstavujú závažnú kapitolu ľudskej patológie. Primárnou podstatou ich vzniku je zmena (mutácia) genetickej informácie (DNA), ktorá sa prenáša na ďalšie generácie buniek, vznikajúcich z pôvodnej materskej bunky postihutej mutáciou. **Genetický patologický stav** je najširší pojem a označuje všetky chorobné stavy s mutáciou genetickej informácie rôzneho druhu, rozsahu a lokalizácie. **Dedičné (hereditárne) choroby** sú už užším pojmom a ich základnou črtou je prenos mutanej DNA, a tým aj ochorenia z generácie rodičov na generáciu potomkov. Ich podstatou je skutočnosť, že mutaná genetická informácia sa nachádza nielen v somatických, ale aj pohlavných bunkách (gamétach) a ich prostredníctvom sa prenáša na potomkov. S týmto pojmom sa nekryje označenie **familiárne ochorenie**. Familiárny výskyt ochorenia môže mať genetický, ale aj negenetický pôvod (napr. výskyt niektorých infekcií u viacerých členov príslušnej rodiny). Pojem **kongenitálny (vrodený)** označuje len skutočnosť, že sa

patologický stav zisťuje už pri narodení, ale nehovorí nič o jeho etiológii. Okrem geneticky podmienených patologických stavov patria do tejto skupiny aj anomálie negenetického charakteru - poranenia novorodenca pri pôrode a intrauterinne alebo intranatálne získané infekcie. Zásadný rozdiel oproti genetickým patologickým stavom predstavujú patologické stavy vyvolané pôsobením **exogénnych činiteľov nemutagénneho charakteru** na somatické bunky embrya, resp. plodu. Tieto faktory sa podľa klasickej koncepcie označujú ako **teratogény**. U človeka je známych vyše 4000 monogénovo podmienených patologických stavov.

Klasická genetika zaraďuje genetické patologické stavy do troch hlavných skupín:

1. **monogénové, s mendelským typom dedičnosti**
2. **chromozómové**
3. **multifaktoriálne,**
4. **patologickými stavmi podmienenými mutáciami na úrovni somatických buniek** (onkogény, tumor-supresorové gény, ktoré majú za následok rakovinové procesy)
5. **mitochondriálnymi chorobami.**

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. Monogénovo dedičnými nazývame znaky, pri ktorých sú jednotlivé fenotypy podmienené gémi na jednom lokuse. Podľa umiestnenia lokusu na chromozóme rozlišujeme dedičnosť: a) **autozómovú**



b) **gonozómovú,**

ktorá môže byť podľa charakteru zodpovednej alely:

- a) **recesívna**
- b) **dominantná** (resp. kodominantná a intermediárna).

Doteraz sa eviduje asi 1359 patologických stavov s autozómovo dominantným, 1389 s autozómovo recesívnym typom dedičnosti, 249 patologických fenotypov s dominantnou a 313 s recesívnou dedičnosťou viazanou na chromozóm X. Dedičnosť viazaná na chromozóm Y nemá pre klinickú genetiku praktický význam, pretože na chromozóme Y je veľmi málo funkčných génov, mutácia ktorých by zapríčiila vznik nejakého patologického stavu. Z funkčných génov tohto chromozómu je najdôležitejší gén na určenie mužského pohlavia - **TDF** (testes determinujúci faktor), ktorého mutácia zapríčiňuje gonádovú dysgenézu. Preto gonozómová dedičnosť je prakticky dedičnosť viazaná na pohlavný chromozóm X.

Klasifikáciu monogénových chorôb možno robiť z dvoch hľadísk: z **genetickeho** (charakter mutácií) alebo na podklade základného charakteru **konečného génového produktu**. Obidve kritéria majú svoje prednosti, ale zároveň aj svoje nedostatky. Z praktického hľadiska je vhodnejšie vychádzať z funkcie a poslania génového produktu. Na ilustráciu uvádzame typické príklady klasifikácie monogénových chorôb na podklade charakteru génového produktu:

a) **enzymopatie** - ich prejavmi sú podľa funkcie postihnutého enzýmu poruchy metabolizmu aminokyselín, cukrov, lipidov, steroidov, purínov a pyrimidínov (albinizmus,



fenyketonúria, alkaptonúria, galaktózémia, Leschov-Nyhanov syndróm, lyzozómové enzymopatie – Tayova-Sachsova choroba, OXPHOS-enzymopatia);

b) **dedičné poruchy hemoglobínu** (hemoglobinopatie) – kosáčikovitá anémia (drepanocytóza),  $\alpha$ -talasémia,  $\beta$ -talasémia;

c) **hemofília** – hemofília A, hemofília B

d) **imunodeficitné stavy** – agamaglobulinémia, SCID (ťažký kombinovaný deficit),  
e) **myopatie** – Duchenneova svalová dystrofia, Beckerova svalová dystrofia

f) **neuropatie** – Huntingtonova choroba

Na ilustráciu uvádzame niekoľko príkladov monogénno podmienených patologických stavov, s ktorými sa stretnete pri riešení príkladov, s krátkym vysvetlením alebo popisom ochorenia, jeho incidenciou, lokalizáciou génu a pod.

#### 1) Fenyketonúria (PKU)

- vrodená metabolická porucha aminokyseliny fenyalanínu (Phe)
- podmienená autozómovo recesívne, incidencia 1 : 10 000
- porucha aktivity enzýmu **fenylalanínhydroxylázy** (fenylalanín-4-monooxygenáza) determinovaného génom na chromozóme 12q24
- nedochádza k premene Phe → Tyr
- vysoká koncentrácia Phe v krvi
- patologické koncentrácie Phe resp. medziproduktov, ktoré vznikajú vedľajšou metabolickou cestou, zapríčínujú ťažkú poruchu mozgovej činnosti (oligofrenia, krče), z ďalších príznakov bývajú nápadnejšie svetlé vlasy, modré oči, ekzém, charakteristický zápach moču ako po myšiach
- fenyalanín sa mení na kyselinu fenylypyrobroznú, tá sa hromadí v telových tekutinách, na čo sú zvlášť citlivé neuróny
- celá mutácia je príkladom pleiotropného efektu génu
- terapia možná elimináciou diétou (zníženie prívodu exogénneho fenyalanínu), ktorú je potrebné dodržiavať do 12-15 rokov

#### 2) Galaktózémia

- autozómovo recesívne (AR) podmienená blokáda metabolizmu galaktózy
- nedochádza k premene galaktózy na glukózu a jej využitiu
- chyba enzýmu **galaktóza-1-fosfáturydyltransferáza**, gén na chromozóme 9p13
- incidencia (výskyt) 1 : 35 000 - 60 000 živo narodených detí
- vysoká koncentrácia galaktózy v krvi, galaktóza sa zisťuje aj v moči
- hromadí sa toxický galaktóza-1-fosfát
- problémy začínajú pri dojčení dieťaťa (mliečny cukor - laktóza obsahuje galaktózu)
- príznaky: zvracanie, hnačka, nepriberanie na hmotnosti, dystrofia, žltacka, zväčšenie pečene, hypoglykemické ataky, mentálna retardácia
- ak sa nelieči → fatálny koniec
- ochorenie možno liečiť tým, že sa z potravy vylúči galaktóza

#### 3) Albinizmus:

môže byť: a) **okulokutánný** (AR) – vrodené chýbanie pigmentu alebo zníženie jeho množstva v koži, vo vlasoch a v očiach

b) **okulárny** (XR, AR, AD) (XR = X viazaná recesívna dedičnosť, AD = autozómovo dominantná dedičnosť, AR = autozómovo recesívna dedičnosť) – pigmentácia vlasov a kože je zvyčajne normálna, vyskytuje sa len hypomelanoza očí

- dedičný defekt v melanocytoch kože a oka (alebo len oka)
- vrodené chýbanie pigmentu melanínu alebo zníženie jeho množstva v koži (je ružovej farby), vo vlasoch a v očiach (sú nápadne svetlé), v očiach v dúhovke (je modrosivá s červeným reflexom) a na sietnici
- AR, chyba enzýmu **tyrozináza**, gén je na chromozóme 11q
- vyskytuje sa svetloplachosť, poruchy zraku

#### 4) Alkaptonúria

- výskyt vo svete 1:100 000 až 1:1 000 000 obyvateľov → na Slovensku 1:19 000, čo je najvyšší výskyt na svete
- AR dedičná porucha spojivového tkaniva, gén na chromozóme 3q13
- chyba enzýmu **homogentizát-1-2-dioxygenáza**
- v tele sa hromadí kyselina homogentizová
- vylučuje sa močom → tmavé sfarbenie moča
- ukládanie ochranného pigmentu do spojivových tkanív - skléry, chrupaviek, väzív, ďalej do obličiek, pľúc, ušného bubienka
- najťažším príznakom je postihnutie veľkých kĺbov a chrbtice → invalidizuje pacienta medzi 20. - 40. rokom

#### 5) Leschov - Nyhanov syndróm

- dedičnosť viazaná na X chromozóm, recesívneho typu, Xq26-q27
- porucha metabolizmu purínov, zvýšené vylučovanie kyseliny močovej
- chyba enzýmu HPRT → **hypoxantinguanín-fosforibozyltransferáza**
- mozgová dysfunkcia, mentálna retardácia, automutilácia, obrny mozgových nervov, u pacientov sa počas niekoľkých rokov vyvinie dna (arthritis urica)
- opakované a imobilizujúce artritidy, hyperurikémia, depozity urátových kryštálov sa ukladajú v kĺboch a v okolitých tkanivách, prípadne v obličkách

#### 6) Cystická fibróza ( mukoviscidóza)

- najčastejšia dedičná metabolická porucha bielej rasy, AR, lokalizácia génu 7q31
- incidencia 1: 2 500, asi jeden človek z 22 je heterozygotný prenášačel,
- ochorenie predovšetkým hlienotvorných exokrinných žliaz, ktoré tvoria viskózný sekret s obsakom proteínov, vedúci k upchatiu žľazových vývodov
- abnormálne viaceré exokrinné sekrečné funkcie vrátane pankreatických enzýmov, bronchitického sekretu a chloridov v pote (slané deti)
- ochorenie postihuje najmä pľúca a pankreas
- u postihnutých jedincov sú trvajúce a dýchacie problémy, chronický kašeľ, extrémne slasný pot pre neschopnosť kanálikov potných a slinných žliaz reabsorbovať Na a Cl



- chýba špecifický lyzozómový enzým **hexozaminidáza A**, ktorého úlohou je odštiepiť N-acetyl- $\beta$ -galaktozaminový zvyšok od polysacharidového reťazca gangliozidovej molekuly
- ide o teaurizmozú - charakteristickým defektom je hromadenie komplexných substancií
- v normálnych bunkách sa tieto látky odbúrávajú na svoje zložky osobitnými hydrolytickými enzýmami, ktoré sa nachádzajú v lyzozómoch
- sfingolipidozy sú jednou skupinou týchto teaurizmozí, pri ktorých sa hromadia sfingolipidy
- Tayova-Sachsova choroba je teaurizmozá, pri ktorej sa hromadí gangliozid najmä v mozgovom tkanive, je neliečiteľná
- výskyt 1: 360 000, u Židov pôvodu Aškenázi 1: 3 600
- progredujúca slepota

#### 8) Kosáčikovitá anémia = drepanocytóza,

- v súčasnosti je známych asi 700 hemoglobínových variantov

- AR podmienená dedičná porucha hemoglobínu, najčastejšie sa vyskytuje v rovníkovej Afrike, oblasti Stredozemného mora
- prítomný je fyzikálno-chemicky odlišný hemoglobín **Hb S**
- záměna Glu  $\rightarrow$  Val na 6. pozícii  $\beta$  reťazca, ktorý pozostáva zo 146 aminokyselín
- deformácia tvaru červených krviniek na kosáčikovitý tvar
- u homozygotov ťažké prejavy ochorenia: chronická hemolytická anémia a krízové stavy vyvolané upchatím ciev; heterozygoti sú klinicky bez príznakov, ale sú nositeľmi znaku kosáčikovosti (kosáčikovitá črta, bez anémie) a selektne zvýhodnení v podobe rezistencie na maláriu

9) Patologický **hemoglobín Hb E** - je po HbS druhým najčastejším abnormálnym hemoglobínom, ktorý sa vyskytuje od severovýchodnej Indie až po južnú Čínu

- príznaky ako pri talasémii

#### 10) Methemoglobinémie

- AR, zvýšené hodnoty Hb s trojnásobným železom  $Fe^{3+}$  (methemoglobin), čo spôsobuje jeho pevnú väzbu s kyslíkom a znemožňuje odovzdávanie kyslíka tkanivám
- chýba enzým **methemoglobínreduktáza**
- prejavy - cyanóza až bezvedomie
- methemoglobin vzniká napr. aj u dojčiat pri jedení potraviny s obsahom nitrátov

#### 11) Talasémie

- $\alpha$ -talasémia - znížená alebo chýbajúca syntéza  $\alpha$ -reťazca hemoglobínu - keďže reťazce alfa sú základom štruktúry pre Hb dospelých, takéto poruchy zapríčínajú veľmi ťažké hemolytické anémie (napr. tvoria sa iba štyri beta-reťazce - tzv. HbH)
- $\beta$ -talasémia - znížená alebo chýbajúca syntéza  $\beta$ -reťazca hemoglobínu, je častá v oblasti Stredozemného mora

- osobitne závažný je hustý a väzky hlien, ktorý produkujú priedušky, zvyšuje sa tým náchylnosť postihnúťého dieťaťa na pneumóniu, hustý hlien obmedzuje priechodnosť priedušiek a priedušniček

- v dôsledku sekundárnych infekcií dochádza k poškodeniu pľúc, čo je najčastejšou príčinou smrti
- môže byť aj retardovaný rast
- straty chloridov môžu byť natoľko vážne, že v horúcom počasí vznikne tepelný úpal (sirtiasis)

- u pacientov dochádza k upchatiu kanálikov pankreasu, nepostrádateľné enzýmy sa nemôžu dostať do čriev

- upchatie drobných žľezovodov komplikuje trávenie a narúša funkciu pečene - 5% pacientov má aj postihnutú pečeň

- muži bývajú neplodní - udáva sa nad 95% sterilných mužov, je to sekundárny následok abnormálnej hlienovej sekrécie vo vas deferens, ženy majú abnormálny cervikálny hlien

- priemerná doba prežitia je 25 rokov

- ochorenie je podmienené mutáciou génu, ktorý kóduje proteín CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) zodpovedný za transport chloridových iónov cez plazmatickú membránu. Proteín pozostáva z 1480 aminokyselín. Je známych viac ako 1000 rôznych mutácií tohto génu, ktorý tvorí vyše 6 000 nukleotidov rozdelených do viac ako 27 exónov na chromozóme 7.

- produkt génu CFTR je proteín, ktorý reguluje prenos chloridových iónov kanálkami cytoplazmatickej membrány. Mutovaný gen kóduje zmenený proteín a membránové kanálky sú nefunkčné. Zmenená funkcia cytoplazmatickej membrány narušuje výmenu iónov a má za následok patologické poškodenie buniek.

- Najčastejšie formy géovej mutácie:

- v európskej populácii 50 - 80 % mutácií génu CFTR je podmienených deléciou 3 nukleotidov v exone 10, kodón 508, mutácia spôsobuje deléciu fenyalanínu, preto sa označuje ako **deltaF508** -  $\Delta F508$ . Podmieňuje ťažkú formu CF, pretože CFTR proteín sa degraduje už v endoplazmatickom retikule a do plazmatickej membrány sa vôbec nezabuduje

- záměna G za A na 482. pozícii a následná záměna Arg za His na 117. pozícii

- záměna C za T na 1609. pozícii a následná zmena kodónu CAG pre Gln na STOP kodón (TAG)v dôsledku čoho sa vytvára proteín obsahujúci len 493 aminokyselín z normálneho počtu 1480.

#### 7) Tay-Sachsova choroba

- autozómovo recesívne podmienené neurodegeneratívne ochorenie, ktoré sa vyvíja okolo 6. mesiaca veku
- infantilná GM2 gangliozidóza - porucha metabolizmu gangliozidu
- postihnuté deti oslepnú a regredujú mentálne aj fyzicky
- choroba je obvyčajne fatálna vo včasnom detstve



- hlavným laboratórnym nálezom pri talasémiách je pokles celkového množstva hemoglobínu (100 g/l, aj menej), kým počet erytrocytov býva normálny alebo zvýšený
- talasémie sú najčastejšou ľudskou monogénne podmienenou chorobou na svete (Kanada, USA, oblasť Stredozemného mora, Stredný východ, časť Afriky, Indie a Ďalekého východu)

### 12) Hemofília A

- incidencia 1 : 5 000 - 10 000 novonarodených chlapcov, najznámejšia najväčšia geneticky podmienená porucha hemokoagulácie,
- chyba koagulačný faktor VIII pri zražaní krvi, lokalizácia génu Xq28
- X-viazaná recesívna dedičnosť
- prejavuje sa krvácaním do kĺbov a mäkkých tkanív

### 13) Hemofília B

- incidencia 1 : 70 000 chlapcov, ľahšia forma, chýba faktor IX,
- lokalizácia génu Xq27

## 6.2. Štruktúrne chromozómové aberácie

Chromozómy sú relatívne stabilné jednotky prenosu genetickej informácie. Aby mohla vzniknúť ich štruktúrna prestavba, musí byť najprv prerušená kontinuita makromolekuly DNA.

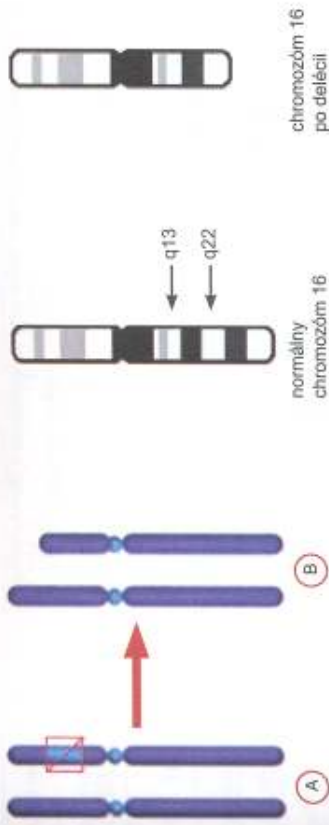
Chromozómové mutácie, častejšie označované ako **chromozómové aberácie**, sú štruktúrne prestavby chromozómov, ktoré vznikli stratou, získaním alebo premiestnením určitej oblasti chromozómu. Mechanizmus vzniku chromozómových aberácií predpokladá, že aberácia vzniká ako dôsledok **zlomu** v určitej oblasti chromozómu, ktorá sa môže alebo nemusí pripojiť oblasťou zlomu na inú časť rovnakého alebo iného chromozómu (teória zlomu a znovuspojovania).

Chromozómové aberácie môžeme deliť na **aberácie chromátidového typu**, ktoré postihujú iba jednu chromátidu chromozómu a **aberácie chromozómového typu**, ktoré sa vyskytujú na určitom mieste oboch sesterských chromátid.

Medzi **základné typy štruktúrnych aberácií** patria: *delécie, inverzie, translokácie, duplikácie, inzercie, multiplikácie, marker chromozóm a izochromozóm.*

### Delécia

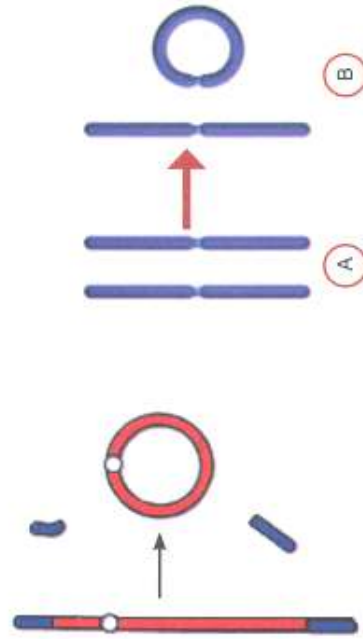
Deléciou rozumieme stratu určitej časti chromozómu; koncové delécie sa označujú aj ako *deficiencie*. Je veľmi závažným typom mutácií, pretože znamená stratu génov. **Terminálna delécia** je strata koncovej časti chromozómu, ktorá vzniká v dôsledku jedného zlomu a následnou stratou acentrického fragmentu. **Intersticiálna delécia** je strata strednej časti chromozómu v dôsledku dvojnásobného zlomu a napojenia terminálnej časti na časť chromozómu s centromérou (obr. 6-4). Časť chromozómu bez centroméry, acentrický fragment, nemôže byť v ďalšom bunkovom delení pritiažený k pólu deliacej sa bunky a resorbuje sa v cytoplazme. Fragment s centromérou sa normálne zúčastňuje mitózy alebo meiózy.



**Obrázok 6-4.** Intersticiálna delécia chromozómu. A. homologický pár chromozómov, B. intersticiálna delécia.

Deléciou vzniká v genóme nevyvážený stav. Typickým prejavom je pseudodominancia. Gény na homologickom úseku párového chromozómu sú v hemizygotnom stave podobne ako väčšina génov na X chromozóme u muža a recesívne alely sa manifestujú aj v jednej dávke. Fenotypový prejav závisí od lokalizácie a veľkosti deletovaného úseku, od počtu a funkcie deletovaných génov.

Zvláštnou chromozómovou prestavbou spojenou s deléciou je **ring chromozóm** (prstencový chromozóm). Vzniká súčasným zlomom oboch ramien chromozómu a ich spojením (obr. 6-5). Terminálne fragmenty bez centroméry sa strácajú. Ring chromozóm bol popísaný u všetkých chromozómov človeka. V anafáze dochádza k prepleteniu prstencov sesterských chromátid s následným zlomom a vznikom ďalších štruktúrnych prestavieb. Ring chromozóm preto spravidla nachádzame len v časti buniek (v mozaike).



**Obrázok 6-5.** Prstencový (ring) chromozóm s deléciou terminálnych úsekov.

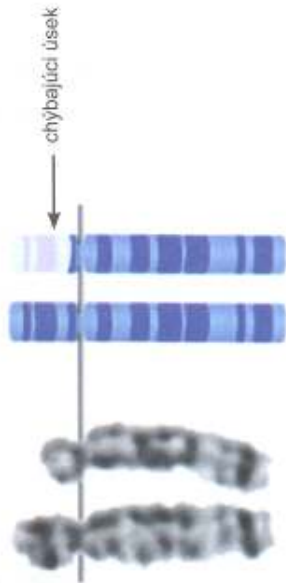
S deléciou je spojený aj vznik **dicentrického chromozómu**. Po súčasnom zlome chromátid dvoch chromozómov môže nastat' ich spojenie a delécia acentrických fragmentov. Vzniknutý chromozóm má dve centroméry a je nestabilný. V anafáze ďalšieho bunkového delenia nastáva jeho „pretrhnutie“ v dôsledku prítáhovania k obojm pólom (vzniká chromozómový mostík).



K deléciám s klinicky dobre definovaným fenotypom u človeka patria:

*Cri du chat syndróm, 46,XX(XY),del(5p), syndróm mačacieho kriku*

Frekvencia je 1 : 20 000. Syndróm je charakterizovaný nízkou pôrodnou hmotnosťou, typickým plačom pripomínajúcim mačacie mňaukanie, psychomotorickú retardáciu, mikrocefáliou a dysmorfiou tváre (obr. 6-6).



chromozóm 5 pri Cri-du-chat syndróme

**Obrázok 6-6.** Terminálna delécia krátkeho ramena chromozómu 5 pri cri du chat syndróme.

*Wolfov syndróm, 46,XX(XY),del(4p)*

Frekvencia je nižšia než u predchádzajúceho syndrómu. K typickým znakom patrí nízka pôrodná hmotnosť, psychomotorická retardácia, „rybie ústa“, rázštep pery a podnebia a vrodené chyby vnútorných orgánov.

*Ring chromozóm 21, 46,XX(XY),r(21)*

Doteraz boli popísané len desiatky prípadov. Klinický nález: psychomotorická retardácia, nízko nasadené ušnice, vrodené chyby končatín a obličiek.

*Delécia krátkych ramien X chromozómu, 46,X,del(Xp)*

Syndróm je charakteristický niektorými znakmi Turnerovho syndrómu v závislosti od rozsahu delécie, hlavne nízkou postavou a poruchou vývoja sekundárnych pohlavných znakov. Plodnosť byva zachovaná.

*Delécia dlhých ramien X chromozómu, 46,X,del(Xq)*

Charakteristické znaky sú ako pri Turnerovom syndróme v závislosti od rozsahu delécie. Habitus je normálne ženský, ale gonády sú rudimentárne, dysgenetické. Postihnuté ženy sú bez menštruácie a sú neplodné.

*Ring chromozóm X, 46,X,r(X)*

Znaky sú ako pri Turnerovom syndróme v závislosti od rozsahu delécie krátkych a dlhých ramien X chromozómu. Je často diagnostikovaný v mozaike s 45,XO. Línia XO vzniká nondisjunkciou ring chromozómu.

## Mikrodelécie

Vyšetrenie prometafázových chromozómov (tzv. high resolution technique, HRT) umožňuje identifikovať menšie štruktúrne zmeny ako klasické pružkovacie techniky. Najmenšie zmeny v štruktúre chromozómov viditeľné v mikroskope zodpovedajú 4 Mbp DNA. Menšie zmeny sa dajú identifikovať metódami DNA analýzy. Príklady syndrómov s mikroskopicky identifikovateľnými mikrodeléciami sú uvedené v tabuľke.

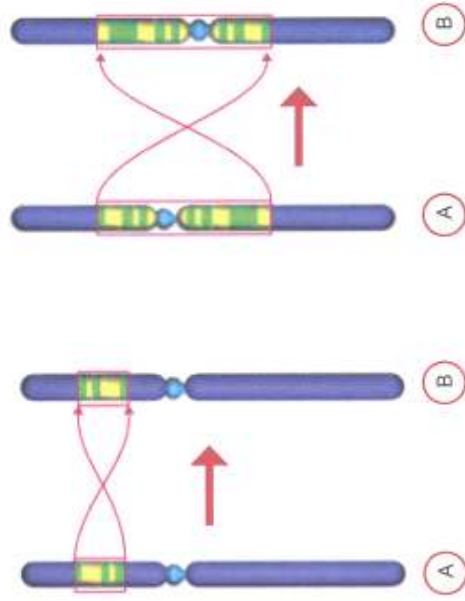
*Prader-Williho syndróm* je podmienený deléciou 15q11 - q13 paternálneho chromozómu a Angelmanov syndróm deléciou rovnakého úseku maternálneho chromozómu. Pre Prader-Williho syndróm je charakteristická obezita, žravosť, nízka postava, hypogonadizmus a mentálna retardácia. Angelmanov syndróm má úplne odlišné príznaky. Deti pripomínajú šťastnú bábiku. Rozdiely vo fenotypovom prejave sa dajú vysvetliť **genomickým imprintingom**.

Syndróm	Delécia	Fenotypový prejav
DiGeorgova sekvencia	22q11	chýbanie týmusu a paratyreoídnych teliesok
WAGR syndróm	11p13	Wilmsov tumor, aniridia, gonadoblastom a retardácia
retinoblastom	13q14	tumor buniek retiny
Prader-Williho syndróm	15q11 - q13	dysmorfický syndróm
Angelmanov syndróm	15q11 - q13	dysmorfický syndróm

## Inverzie

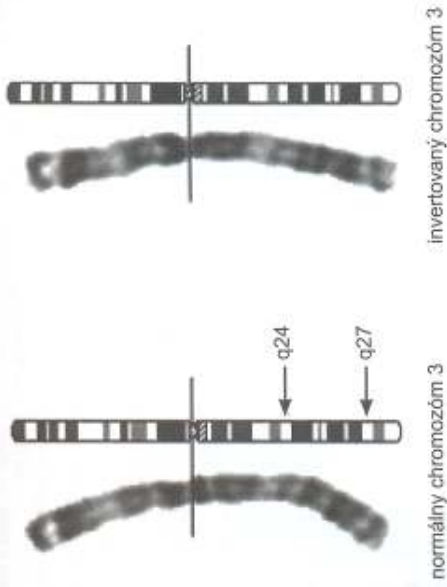
Je to chromozómová aberácia, pri ktorej ja určitý úsek chromozómu otočený o 180°. Inverzia je balansovaná štruktúrna prestavba, pri ktorej dochádza k prerušeniu kontinuity chromozómu dvoma zlomami a pripojeniu odlomenej časti v obrátenom poradí. Inverzia časti chromozómu mimo centroméry sa označuje ako **paracentrická inverzia**, inverzia úseku s centromérou je **pericentrická inverzia** (obr. 6-7, obr. 6-8). Paracentrická inverzia sa dá identifikovať podľa zmien pružkovania, pericentrická inverzia okrem zmeny pružkov mení aj pomer dĺžky ramien chromozómu.

Inverzie obvykle neovplyvňujú fenotyp. Zriedkavo môžu byť spojené so zmenou funkcie génov v mieste zlomu a znovuspojenia (polohový efekt - efekt pozície). Závažné dôsledky môžu mať pre potomstvo. Počas meiózy homologické chromozómy, ktoré sú v synapsii, vytvárajú v úseku inverzie slučku. Inekválnym crossing-overom vznikajú potom chromozómy s nebalansovanou štruktúrou. Osoby s paracentrickou chromozómovou inverziou majú zníženú plodnosť, ale riziko narodenia postihnutých detí s nebalansovanou chromozómovou aberáciou je nízke.



**Obrázok 6-7.** Paracentrická a pericentrická inverzia chromozómov: A - normálny chromozóm, B - invertovaný chromozóm.





**Obrázok 6-8.** Paracentrická inverzia na průřezovanom chromozóme 3.

Pericentrická inverzia má za následok vznik gamét s nebalansovanými prestavbami, s deléciami a duplikáciami časti chromozómu distálne od inverzie. Riziko narodenia postihnutých detí rodičom s pericentrickou inverziou je závislé od veľkosti inverzie - od 1 % do 10 %. Čím je väčšia inverzia, tým je nižšie riziko, pretože nebalansované rekombinanty sú letálne v skorom štádiu vývinu a postihnuté plody sa potracajú.

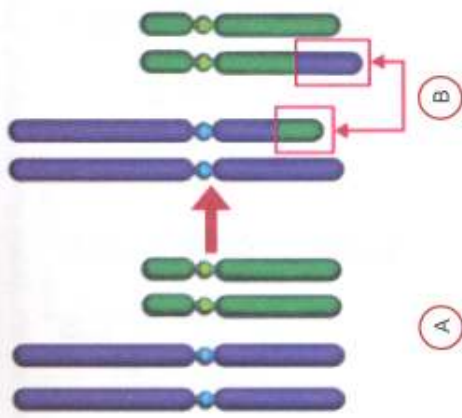
*Inverzia chromozómu 9, 46,XX(XY),inv(9)(p11q12)*

Táto malá pericentrická inverzia heterochromatinovej oblasti sa vyskytuje s frekvenciou 1 : 100. Považuje sa iba za variantu normálneho nálezu, pretože na rozdiel od iných inverzií nie je spojená so zvýšeným rizikom spontánnych potratov alebo vrodených vývinových chýb v potomstve.

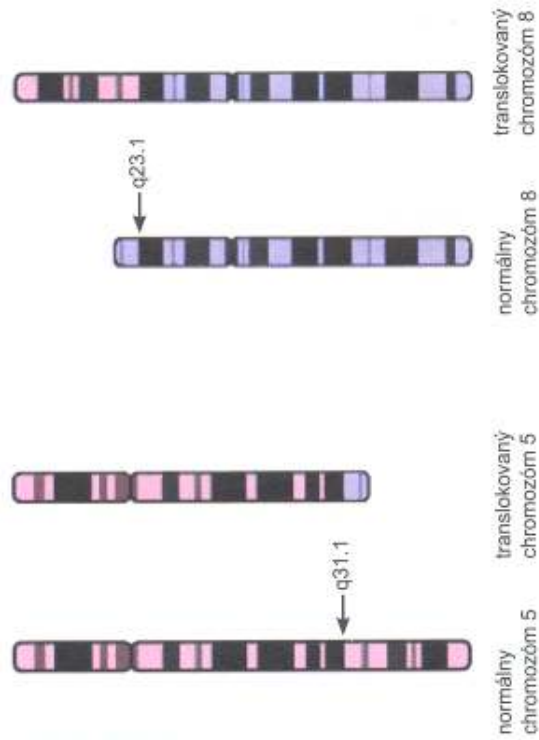
**Translokácie**

Translokácia je štruktúrna prestavba, ktorá vzniká premiestnením určitého úseku medzi nehomologickými chromozómami. Translokácie delíme na recipročné a Robertsonove.

**Recipročná translokácia** (obr. 6-9, obr. 6-10) vzniká súčasným zlomom dvoch nehomologických chromozómov a vzájomnou výmenou oddelených častí chromozómov. Môže vzniknúť aj náhodným crossing-overom medzi nehomologickými chromozómami. Zriedkavo môže vzniknúť aj komplexnou prestavbou za účasti viacerých chromozómov. Recipročné translokácie sú relatívne časté, frekvencia u novorodencov je 1 : 500. Najčastejšie sa diagnostikujú pri vyšetrení manželských dvojíc s opakovanými potratmi alebo po narodení dieťaťa s nebalansovanou chromozómovou prestavbou (t.j. vrodenými chybami).



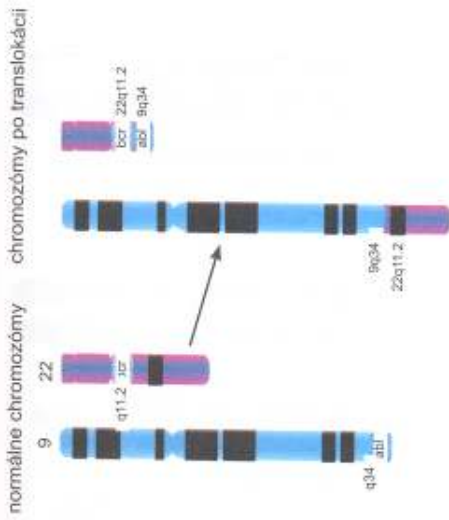
**Obrázok 6-9.** Recipročná translokácia: A – dva páry homologických chromozómov, B – chromozómy po recipročnej translokácii.



**Obrázok 6-10.** Recipročná translokácia s výmenou určitých úsekov dlhých ramien medzi chromozómami 5 a 8.

*Balansovaná recipročná translokácia* je chromozómová prestavba zvyčajne bez fenotypových prejavov. Môže však spôsobiť tzv. efekt pozície. Translokácia určitého génu do riadiacej sféry promotóra iného génu významne ovplyvní jeho funkciu. Príkladom je translokácia t(9;22)(q34;q11), ktorá je príčinou chronickej myeloidnej leukémie (obr.6-11). Onkogén *abl* je translokovaný k promotoru a časti génu *bcr* (break point cluster region) s vysokou transkripčnou aktivitou.

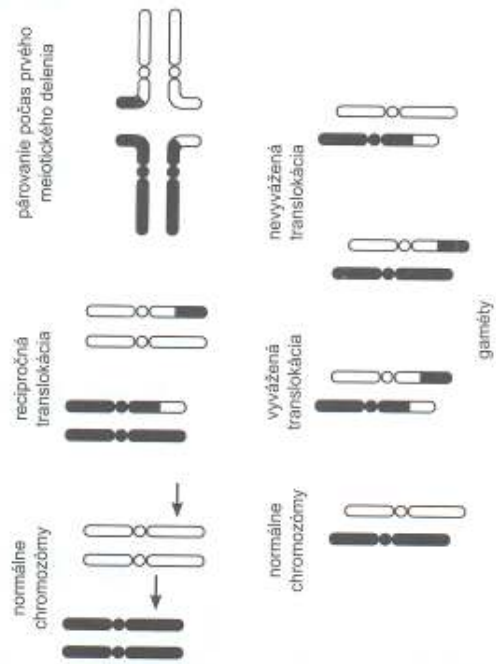




Obrázok 6-11. Recipročná translokácia chromozómov 9 a 22.

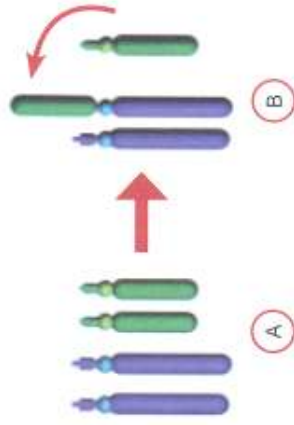
*Burkittov lymfóm* je podmienený translokáciou onkogénu *myc* do oblasti promotóra génov pre tvorbu reťazca imunoglobulínov: t(8;14), t(8;22) a t(2;8). Podobných dôsledkov translokácií je známych viacej.

Na obr. 6-12 je znázornený vznik translokácie – zlomy na dvoch nehomologických chromozómov a restitúcia s výmenou úlomkov. V meióze vzniká figúra tvaru križa (kvadriradiál). V dolnej časti obrázku sú znázornené typy gamét prenášateľá translokácie. Pri alternatívnej segregácii obidvoch zúčastnených chromozómových párov vzniknú gaméty s normálnym alebo vyváženým chromozómovým komplementom. Z normálnych a vyvážených gamét vzniká fenotypovo normálne potomstvo. Nevyvážené gaméty podmieňujú vznik zygoty, ktorá môže byť čiastočne monozomická a čiastočne trizomická. Preto majú rôzne vývinové abnormality.



Obrázok 6-12. Recipročná translokácia a jej následky po meióze.

**Robertsonova translokácia** (centromerická fúzia) vzniká po zlome dvoch akrocentrických chromozómov v oblasti centroméry a následnej fúzii dlhých ramien so stratou krátkych ramien oboch chromozómov (obr.6-13). Vzniknutý balansovaný karyotyp má iba 45 chromozómov. Strata krátkych ramien sa vo fenotype neprejavuje. Na krátkych ramenách akrocentrických chromozómov sú gény pre rRNA, ktoré sú v mnohých kópiách aj na krátkych ramenách ostatných akrocentrických chromozómov. V profáze I zrecieho delenia vytvárajú chromozómy s Robertsonovou translokáciou takisto zložitú útvary s tromi možnými typmi segregácie. Väčšina vzniknutých gamét má nebalansovanú chromozómovú prestavbu (obr. 6-14).

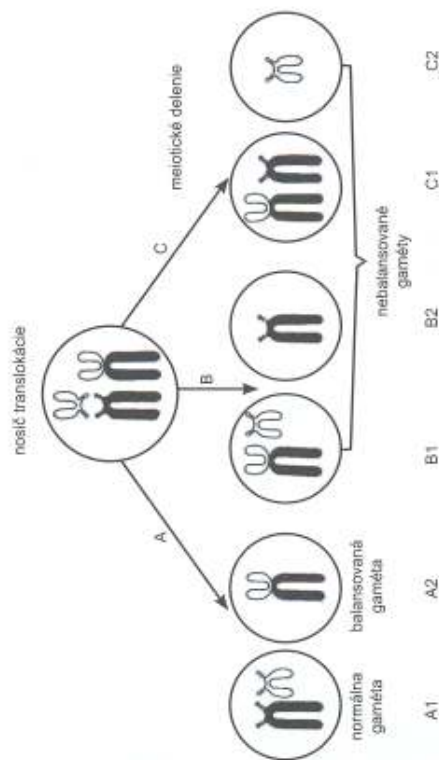
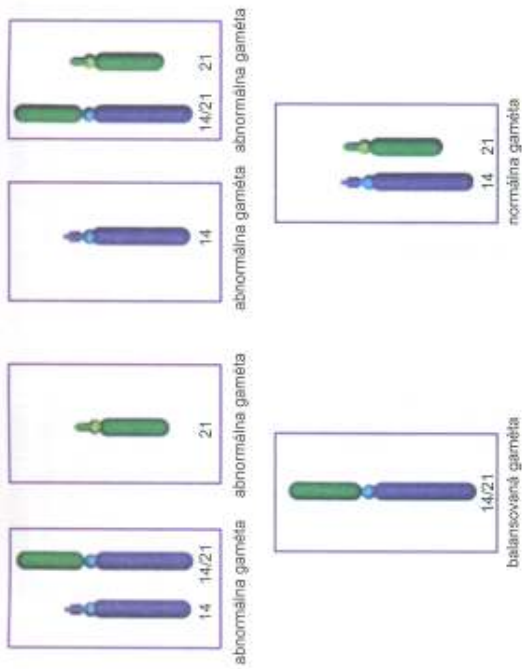


Obrázok 6-13. Robertsonova translokácia. A – dva páry homologických akrocentrických chromozómov, B – fúzia dlhých ramien dvoch nehomologických akrocentrických chromozómov

*Downov syndróm, translokačná forma, 46,XX(XY),t\*(2;21)*

Klinický obraz je zhodný s Downovým syndrómom (DS) podmieneným tzv. voľnou trizómiou 21. Translokovaná forma podmieňuje 5 % prípadov s DS. Dlhé ramená 21. chromozómu sa môžu translokovať na ktorýkoľvek akrocentrický chromozóm (13, 14, 15, 22, 21). U postihnutého je v karyotype 46 chromozómov s triplicáciou dlhých ramien 21. chromozómu, ktorá podmieňuje DS. Gény podmieňujúce typické znaky DS sa nachádzajú v oblasti 21q22.2. Translokácia môže vzniknúť de novo alebo jeden z rodičov je nosičom balansovanej translokácie. Ako vyplýva zo schémy segregácie chromozómov počas gametogenézy (obr. 6-14) je u týchto osôb vysoké riziko vzniku gamét s nebalansovaným karyotypom. Riziko narodenia postihnutého dieťaťa je však podstatne nižšie, pretože väčšina prestavieb je letálna. V týchto rodinách je preto vyššie riziko spontánnych potratov. Ak je prenášateľom balansovanej translokácie muž, je riziko DS nižšie (5 - 7 % podľa typu translokácie) v porovnaní, ak je nositeľkou žena (10 - 15 %). Výnimkou je translokácia t(21q;21q). Rodičovi s týmto typom translokácie sa môže narodiť len dieťa s DS. Súčasne vznikajúca monozómia 21 je letálna.





**Obrázok 6-14.** Gametogenéza u prenášateľa balansovanej Robertsonovej translokácie, t(14q21q).

A1 - normálna sada, 23 chromozómov

A2 - vyvážená chromozómová sada gaméty, 22 chromozómov vrátane t(14q21q)

B1 - abnormálna sada, 23 chromozómov vrátane t(14q21q) a 21

B2 - abnormálna sada, 22 chromozómov bez 21

C1 - abnormálna sada, 23 chromozómov vrátane t(14q21q) a 14

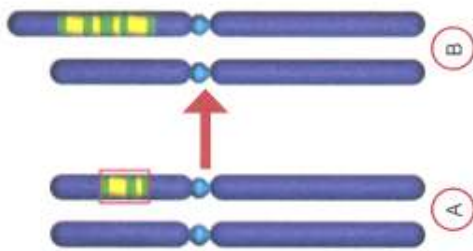
C2 - abnormálna sada, 22 chromozómov bez 14

*Patauov syndróm, translokáčná forma, 46,XX(XY), t(13;7)*

Translokácia chromozómu 13 na iný akrocentrický chromozóm je u pacientov s Patauovým syndrómom (PS) zriedkavá. Prenášatelia balansovanej translokácie sú zvyčajne bez fenotypových prejavov a s nízkym rizikom narodenia dieťaťa s PS. Riziko spontánnych potratov je však veľmi vysoké.

### Duplikácie

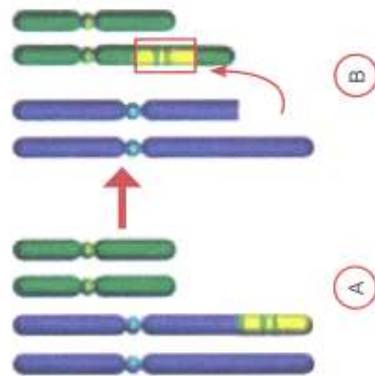
Parciálne duplikácie ramienok vznikajú inekválnym crossing-overom alebo nepravideľnou segregáciou chromozómov s translokáciami (obr. 6-15). Majú menej závažné klinické prejavy ako delécie. Napr. letálne sú spravidla delécie 5 % genómu a väčšie, zatiaľ čo duplikácie 10 % genómu a väčšie. Vo fenotype sa uplatňuje efekt dávky. Klinický obraz postihnutia zodpovedá čiastočne príznakom syndrómu trizómie (tzv. parciálna trizómia) postihnutého chromozómu.



**Obrázok 6-15.** Duplikácia časti krátkeho ramena chromozómu.

### Inzercia

Je to štruktúrna chromozómová aberácia, pri ktorej sa časť ramena jedného chromozómu začlení na určité miesto ramena nehomologického chromozómu (obr. 6-16).



**Obrázok 6-16.** Inzercia terminálneho úseku určitého chromozómu do dlhého ramena iného nehomologického chromozómu.



### Marker chromozóm

Ako marker chromozómy označujeme malé nadpočetné chromozómy, ktoré vznikajú deľciou ramien ktoréhokoľvek chromozómu. Väčšinou sú tvorené iba centromerickým heterochromatínom a neprejavujú sa vo fenotype. Pokiaľ obsahujú aj euchromatínovú oblasť, zodpovedá fenotyp parciálnej trizómií tejto oblasti. Nález marker chromozómu v mozaike je relatívne častý. Ich pôvod sa dá len zriedka identifikovať klasickými metódami farbenia. Významný pokrok priniesli metódy hybridizácie in situ (FISH), ktoré využívajú špecifické sondy na identifikáciu centromerického heterochromatínu.

*Cat eye syndróm, 47,XX(XY),+mar, syndróm načočieho oka*

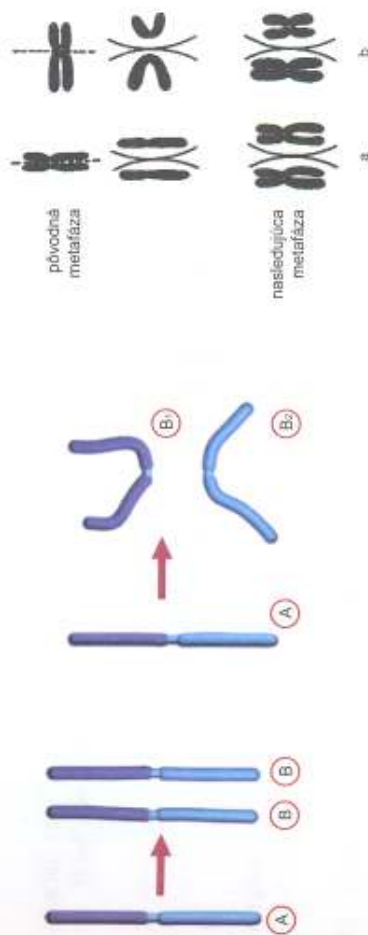
Je to syndróm s variabilnými príznakmi, najčastejšie kolobomom dúhovky (vrodený defekt dúhovky, nevytvorenie určitého tkaniva oka) a atreziou končička. V karyotype je prítomný nadpočetný malý chromozóm, tzv. marker chromozóm. DNA problémy sa dokázalo, že ho tvorí časť chromozómu 22 (22pter - q11). Syndróm je podmienený parciálnou triplicáciou (aj tetraplikáciou) 22. chromozómu.

### Izochromozóm

Izochromozóm je chromozóm tvorený dvoma krátkymi alebo dvoma dlhými ramenami toho istého chromozómu. Vzniká priečnym rozdelením centroméry v II. zrcem delení alebo translokáciou ramien homologického chromozómu v blízkosti centroméry (obr. 6-17). Pacient s izochromozómom má parciálnu monozómiu jedného ramena a parciálnu trizómiu druhého ramena. Isochromozómy boli popísané pre celý rad chromozómov, ale najčastejšie sa vyskytujú pre heterochromozóm X. Častejšie sú prítomné izochromozómy v bunkách nádorov.

*Izochromozóm X, 46,X:(Xq) alebo i(Xp)*

Izochromozóm Xq podmieňuje charakteristické znaky Turnerovho syndrómu. Isochromozóm Xp je vzácnejší, podmieňuje gonádovú dysgénézu bez výraznejších somatických znakov Turnerovho syndrómu.



**Obrázok 6-17.** Vznik izochromozómu: A,B – normálne delenie a vznik dvoch normálnych dcérskych chromozómov, A,B<sub>1</sub>,B<sub>2</sub> – nesprávne rozdelenie a vznik izochromozómu pre dlhé rameno a izochromozómu pre krátke rameno.

### Fragilné miesta

Pri cytogenetickom vyšetrovaní nachádzame na niektorých chromozómoch oblasti, v ktorých nie je chromatin počas mitózy špiralizovaný, chromozómy sú akoby prerušené. Tieto miesta sa označujú ako *fragilné miesta*, miesta zlomov, aj keď nejde o zlomy (breaks). Prítomnosť fragilných miest sa dá mikroskopicky dokázať po kultivácii buniek v médiu s nízkym obsahom kyseliny listovej alebo tymidínu. Najtypickejšie je fragilné miesto na chromozóme X.

*Syndróm fragilného X, fraXq27.3*

Syndróm fragilného X (fraX) je najčastejšou dedičnou formou stredne ťažkej mentálnej retardácie a je na druhom mieste za Downovým syndrómom ako príčina mentálnej retardácie u mužov. Jeho incidencia je 1 : 1500 u chlapcov a 1 : 3000 u dievčat. Pacienti - muži majú charakteristický vzhľad - odstavajúce dlhé ušnice, veľkú hlavu, predĺženú drsnú tvár a veľké testes. Ženy majú len mierne prejavy dysmorfie a len polovica žien s cytogenetickým nálezom je mierne mentálne retardovaná. Syndróm je tak častý, že je nutné ho zvažovať pri diferenciálnej diagnostike mentálnej retardácie mužov aj žien a je jednou z najčastejších indikácií pre DNA-analýzu, genetické konzultácie a prenatalnú diagnostiku

Názov „syndróm fragilného X“ sa vzťahuje na cytogenetický marker na chromozóme X v oblasti Xq27.3. Ide o „fragilné miesto“, na ktorom sa chromatin v priebehu mitózy nekondukuje správne. Ide o poruchu spôsobenú dynamickou mutáciou, masívnou expenziou tripletovej repeticie CGG do prvého exónu génu *FMR1* (Fragile X mental Retardation 1). Normálny počet opakovaní je 60, avšak u pacientov s typickými prejavmi syndrómu nachádzame až niekoľko tisíc opakovaní.

Syndróm fragilného X sa dedí recesívne vo väzbe na chromozóm X, ale štiepne pomery v rodinách sa od štandardných pravidiel dedičnosti odlišujú. 30 % žien prenášačiek je mierne mentálne retardovaných ale bez somatických zmien. 20 % mužov s cytogeneticky dokázateľným fra-X sú prenášači bez klinických príznakov. Dcéry týchto prenášačov sú zdravé, ale synovia a vnuci týchto deér môžu byť mentálne postihnutí. V každej ďalšej generácii je riziko aj závažnosť postihnutia vyššie.

**Tab. 1** Prehľad najčastejšie používaných cytogenetických symbolov (podľa ISCN 1995)

A - G	skupiny chromozómov
1 - 22	čísla autozómov
X, Y	pohlavné chromozómy
/	šikmá zlomková čiara znamená mozaicizmus, napr. 46/47 označuje mozaicizmus s bunkovými líniami, ktoré majú 46, resp. 47 chromozómov
del	delecia
der	derivovaný chromozóm
dup	duplikácia
i	izochromozóm
ins	inzercia
inv	inverzia
mar	marker chromozóm
r	kruhový (ring) chromozóm



t	translokácia
ter	terminálny koniec ramena
p	krátke rameno chromozómu
q	dĺhke rameno chromozómu
cen	centroméra
h	heterochromatín
fra	fragilné miesto
dic	dicentrický chromozóm
:	zlom a strata časti chromozómu distálne od zlomu
::	zlom a spojenie chromozómu
+	pred číslom chromozómu = trizómia
-	pred číslom chromozómu = monozómia
p12	číselné označenie miesta zlomu (podľa G prúžkovania) na krátkom ramene
q13	číselné označenie miesta zlomu (podľa G prúžkovania) na dlhom ramene

### 6.3. Genómové mutácie

Chromozómová sada, ktorá obsahuje odlišný počet chromozómov ako 46, sa označuje ako **heteroploidná**. Presný násobok haploidného počtu chromozómov ( $n$ ) nazývame **euploidia**, kým iný počet chromozómov je **aneuploidia**. V priebehu mitózy a meiózy môže nastať nerovnomerné rozdelenie chromatíd resp. chromozómov do dcérskych buniek. Tento typ zmien označujeme ako **genómové mutácie**. Sú to zmeny v počte chromozómov alebo celých chromozómových sád. Z hľadiska rozsahu zmien a tým aj charakteru postihnúť delíme genómové mutácie na:

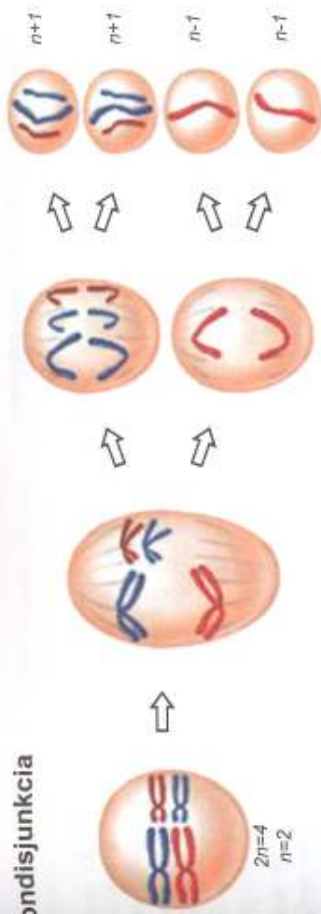
- 1) **aneuploidie** - zmeny v počte chromozómov v sade ( $2n + 1$ ,  $2n - 1$ , atď.)
- 2) **polyploidie** - zmeny počtu celých chromozómových sád ( $3n$ ,  $4n$ , atď.)

#### Aneuploidie

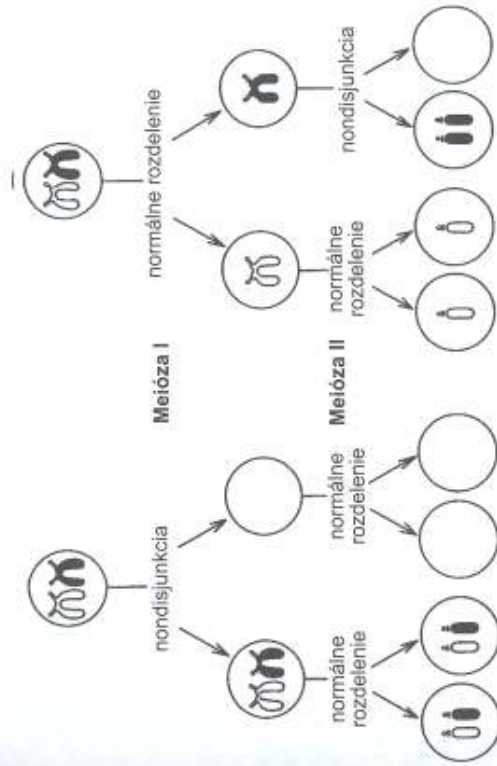
Aneuploidie predstavujú stratu (monozómia, nullizómia) alebo prebytok jedného alebo viacerých chromozómov (trizómia, tetrazómia) v genóme bunky. Plod, ktorý nemá normálny (euploidný) počet chromozómov, sa potraca vo včasných štádiách embryonálneho vývoja. Jediné aneuploidie, ktoré obvykle prežívajú až do pôrodu, sú trizómie chromozómov 21 (Downov syndróm), 18 (Edwardsov syndróm), 13 (Patauov syndróm) a trizómie pohlavných chromozómov - 47,XXX, 47,XXY, 47,XYY. Monozómie sú všetky letálne okrem monozómie X chromozómu - 45,X (Turnerov syndróm), pretože dochádza k expresii recesívnych mutovaných alel pre rôzne patologické stavy.

Najčastejšou príčinou vzniku aneuploidii u človeka je porucha segregácie homologických chromozómov (nondisjunkcia) v I. meiotickom delení alebo chromatíd v II. meiotickom delení (obr. 6-18, 6-19). Dve tretiny aneuploidii, zistených u plodov alebo novorodencov, majú pôvod maternálny (z nich dve tretiny v I. meiotickom delení). Pokiaľ nastane nondisjunkcia až po oplodnení, sú v rastu organizmu zastúpené línie buniek s rôznym počtom chromozómov - vzniká **chromozómová mozaika**. Monozómie môžu byť spôsobené aj stratou chromozómov v priebehu anaézy mitotického bunkového delenia.

### Nondisjunkcia



Obrázok 6-18. Nondisjunkcia chromozómov v anaéze I.



Obrázok 6-19. Schématické znázornenie nondisjunkcie chromozómov v anaéze I a nondisjunkcie sesterských chromatíd v anaéze II a ich následky.

Riziko postihnúť plodu trizómiou stúpa s vekom matky v dobe oplodnenia. Závislosť vzniku aneuploidii od veku otca nebola jednoznačne dokázaná. Príčina tohto rozdielu je pravdepodobne v odlišnom časovom slede fáz meiózy počas oogenézy a spermatogenézy. Profáza I. meiotického delenia vajíčok začína v 12. týždni fetálneho vývoja. V priebehu desiatok rokov existencie vajíčka (v dikyotótnom štádiu) sa môžu uplatniť rôzne mutagénne vplyvy (žiarenie, chemické látky, vírusy) ako aj vplyv hormonálnych porúch regulácie oogenézy. Dozrievanie spermií trvá 72 dní.



## Syndrómy podmienené aneuploidiou gonozómov

*Downov syndróm - 47,XX(XY), +21*

Priemerne riziko narodenia dieťaťa s Downovým syndrómom je 1 : 700 a výrazne závisí od veku matky. Syndróm je možné diagnostikovať už prenatálne (USG, cytogeneticky), resp. inčf po narodení. K typickým znakom patrí guľatá tvár, široké (mongoloidné) očné štrbiny, riasy na hornom viečku (epikantý), široký koreň nosa, veľký jazyk. Prsty na rukách sú krátke, malíčky rohľokovité s jednou ohybovou ryhou a na dlaniach sú charakteristické priečne ohybové ryhy („optické“). Psychomotorický vývoj je oneskorený v rôznom stupni. Dĺžku prežitia môžu ovplyvniť vrodené chyby srdca a ďalších orgánov. V priemere sa dožívajú 25 - 30 rokov.

*Edwardsov syndróm - 47,XX(XY), +18*

Pravdepodobnosť narodenia dieťaťa s Edwardsovým syndrómom je 1 : 6 000 a závisí od veku matky. Novorodenec má zvyčajne mnohoperčné chyby - rúžstep pery a podnebia, ustupujúcu bradu, rôzne vrodené chyby srdca, obličiek, deformity prstov, dysplastické, nízko nasádzajúce ušnice, atypické dermatoglyfy. Psychomotorický vývoj je ťažko oneskorený. Postihnuté deti sa spravidla nedožívajú jediného roka veku.

*Patauov syndróm - 47,XX(XY), +13*

Väčšina plodov s trizómiou 13 sa potráca v I. trimestri gravidity. Výskyt tejto trizómie u živonarodených novorodencov sa odhaduje 1:10 000. Syndróm je charakteristický mnohoperčnými vrodenými chybami centrálného nervového systému, srdca, obličiek a pohlavných orgánov, rúžstepom pery a podnebia, polydaktyliou. U postihnutých jedincov je ťažká retardácia psychického a somatického vývinu a 86 % z nich zomiera v kojeneckom veku (do konca 1. roku). Tretina sa rodí predčasne a pôrodná hmotnosť aj načas narodených detí je menšia ako normálne. Pacienti majú atypické dermatoglyfy - priečnu ryhu, distálny posun axiálneho triadáru, esovitý fibulárny oblúk na haluxe.

## Syndrómy podmienené aneuploidiou gonozómov

*Turnerov syndróm - 45,X*

Frekvencia syndrómu je 1:10 000 pôrodov dievčat. Syndróm sa dá diagnostikovať ultrazvukom už v priebehu fetálneho vývoja, kedy je plod postihnutý rozsiahlymi lymfédémami hlavne v oblasti krku. Po ich resorpcii zostávajú na krku trvalo nápadné kožné riasy - pterigia coli. Lymfédémy pretrvávajú po narodení po nožičkách. V detstve a dospelosti je charakteristický malý vzrast (do 150 cm v dospelosti), široký hrudník, nízka vlasová hranica na krku. Vrodené chyby vnútorných orgánov sú ojedinelé. Intelekt je normálny. Ovaria sú normálne založené, postupne sa však menia na väzovité pruhy. Nedostatok ženských pohlavných hormónov spôsobuje poruchu dospievania a sterilitu. Podávaním ženských pohlavných hormónov a rastového hormónu možno stimulovať rozvoj sekundárnych pohlavných znakov a vzrast. Časté sú moznaky (napr. 46,XX,45,X0; 45,X0/46,XX/47,XXX) a štruktúrne prestavby X chromozómu (izochromozóm) s miernejšími prejavmi syndrómu a niekedy aj normálnou plodnosťou.

*Syndróm XXX - 47,XXX (superfemalé)*

Frekvencia syndrómu je 1 : 1 000, avšak zriedkavo býva diagnostikovaný. Nemá typický fenotypový prejav. K nekonzistentným znakom patrí ľahká psychomotorická retardácia, nepravidielnosť dospievania, častejšie spontánne potraty.

*Klinefelterov syndróm - 47,XXY (zriedkavejšie 48,XXXY a pod.)*

Frekvencia syndrómu je 1 : 1 000. Postihnutí chlapci zvyčajne nemajú zvláštne problémy až do dospievania. V dospelosti majú eunuchoidné rysy, malé tuhé testes, azoospermii. Dôvodom chromozómového vyšetrenia je neplodnosť. Pacienti s tromi a viac X chromozómami majú vrodené chyby vnútorných orgánov, radiolouárnu synostózu a sú duševne zaostalí.

*Syndróm YY - 47,XY (supermale)*

Frekvencia syndrómu je 1 : 1 000, avšak je zriedka diagnostikovaný. K príznakom patrí väčšia výška (nad 180 cm) a väčšia agresivita. Inteligencia a plodnosť sú niekedy znížené. Chovanie je možné ovplyvniť výchovou.

## Polyploidia

Striedanie haploidie a diploidie v reprodukčnom cykle je jedným z mechanizmov rekombinácie a naopak stability druhov. Chyby pri redukčnom delení alebo endoreduplikácia

majú za následok zmnženie chromozómových sád - **polyploidiu**. Polyploidia spôsobuje u človeka potrat v skorom štádiu embryogenézy.

Z hľadiska pôvodu chromozómových sád delíme polyploidiu na **autopolyploidiu** (sady toho istého druhu) a **alloploidiu** (sady rôznych druhov, napr. pri hybridizácii somatických buniek). Podľa počtu sád rozlišujeme **triploidiu** (3n), **tetraploidiu** (4n) atď.

**Triploidia** u človeka môže vzniknúť poruchou I. meiotického alebo II. meiotického delenia pri vzniku vajíčka alebo spermie a následného oplodnenia. Ďalším mechanizmom je oplodnenie vajíčka dvoma spermiami (dispermia). Fenotypové prejavy závisia od pôvodu nadpočetnej sady. Ak je nadpočetná sada materských chromozómov, je postihnutý predovšetkým vývoj plodu a dochádza k potratu. Ak je nadpočetná sada otcovských chromozómov, dochádza k nadmernému rastu trofolblastu s tvorbou dutín (parciálna mola hydratidosa) a vývoj plodu zaostáva.

V bunkách kompletnej moly hydratidosy, kedy plod nie je vôbec vytvorený, nachádzame karyotyp 46,XX. Obe sady chromozómov sú identické, paternálneho pôvodu. Príčinou vzniku kompletnej moly je oplodnenie vajíčka bez jadra spermiov s karyotypom 23,X a zdvojenie sady chromozómov spermie. Z moly môže vzniknúť choriokarcinóm (malignita, ktorá vychádza z tkaniva plodu, a nie matky) pokiaľ sú určité onkogény v homozygotnom stave.

**Tetraploidia** je vždy 96,XXXX alebo 96,XXYY a vzniká teda poruchou prvého mitotického delenia zygoty. Je veľmi letálna. Fyziologicky je polyploidia prítomná v somatických bunkách človeka s vysokou metabolickou aktivitou (pečerové bunky) alebo špecifickými funkciami (nervové bunky).

Polyploidizácia sa výrazne uplatňovala v evolúcii ako jeden z mechanizmov duplikácie génov. Typická je u kultúrnych rastlín (obilniny, ryža, cukrová repa, ľan). U druhov s diferencovanými pohlavnými chromozómami patrí polyploidia k letálnym mutáciám. Pri vzniku triploidie sa počas meiózy vytvárajú trivalenty a chromozómy segregujú do dcérskych buniek nepravidielne. Prekážkou vzniku tetraploidného druhu sú chromozómy X a Y. Pri hypotetickom krížení samca s chromozómovou konštitúciou 4n XXYY so samičou 4n XXXX by vznikalo uniformné potomstvo 4n XXXY. Či už by bolo pohlavie samčie, samičie alebo intersex, ďalšia reprodukcia by nebola možná.

## Prevenčia mutácií

Prevenčia *spontánnych mutácií* je veľmi problematická. Ako jediná možnosť tu prichádza do úvahy už uvedené plánované rodičovstvo a reprodukcia v optimálnom veku, ktoré znemožňujú nepriaznivé účinky pôsobenia zvyšujúceho sa veku rodičov na vznik spontánnych mutácií.

Väčšie možnosti pre prevenciu sú pri *indukovaných mutáciách*. Z praktického hľadiska v rámci prevencie mutácií z titulu ionizujúceho žiarenia je nutné znížiť riziko vzniku mutácií, ktoré prináša so sebou rozvoj tzv. modernej civilizácie, využívaním nových poznatkov, zachovávaním všetkých bezpečnostných opatrení, vývojom účinnejších prístrojov s menším nebezpečím mutagénneho pôsobenia (napr. pri aplikácii gama a X-lúčov na rádiagnostické, resp. terapeutické účely u pacientov a u zdravotníckeho personálu, pri práci s rádioizotopmi, pri využívaní jadrovej energie v priemysle) a predovšetkým zákazom výroby, pokusných výbuchov a použitia jadrových zbraní. Po ožiarení mužských gonád možno oplodnenie odporúčať až po uplynutí najmenej 8 - 12 týždňov. Takisto ochrana ženy pred vznikom mutácií z ožiarenia má trvať najmenej 8 týždňov pred oplodnením a samozrejme musí byť zvlášť prísna v dobe okolo oplodnenia.

Nevyhnutným predpokladom pre úspešnú prevenciu mutácií indukovaných chemickými látkami je spoľahlivé odhalovanie chemických mutagénov v životnom prostredí. K tomu účelu dnes slúžia tzv. krátkodobé metódy dôkazu mutagénnych účinkov, ktoré predstavujú základ nového toxikologického odvetvia - *genetickej toxikológie*. Z nich sú



dôležité metódy, ktoré detegujú mikroskopické zmeny na úrovni chromozómov a prioritné miesto zaujímajú testy odhaľujúce mutagénny účinok na bakteriálnej úrovni (Amesov test). Objasnenie nových, zatiaľ neznámych poznatkov o tejto problematike možno očakávať od využitia molekulevej analýzy DNA. Praktická stránka výskumu mutácií vo všeobecnosti a ich prevencia je dnes v pracovnej náplni *geneticko-toxicologických pracovníkov*. Návod na prevenciu mutácií indukovaných chemickými látkami je v podstate jednoduchý - zabrániť expozícii známym i suspektným mutagénnym faktorom predovšetkým v období pred a okolo koncepcie.

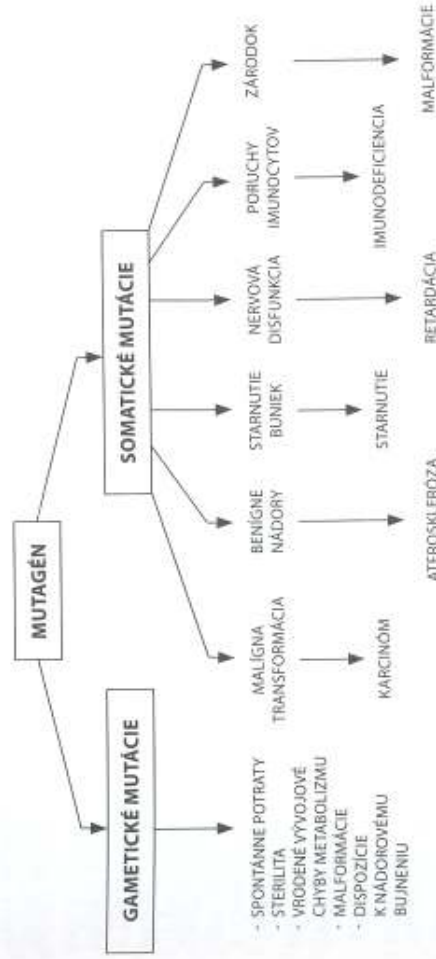
K podobným záverom možno dôjsť i v rámci prevencie mutagénov *biologického charakteru*. Tu však je predsa určitý rozdiel, pretože postupným zlepšovaním celého ekosystému, úpravou životného štýlu a stravovania ľudí možno docieľiť zvýšenie obranyschopnosti organizmu a súčasne účinným očakovaním priaznivo ovplyvniť prevenciu mutagénneho pôsobenia infekčných činiteľov na človeka.

## 6.4. Somatické a gametické mutácie

Mutácie indukované v somatických bunkách organizmu označujeme ako **somatické** (obr. 6-20). Dôsledky pre mnohobunkový organizmus sú rôzne. Za predpokladu, že si mutantná somatická bunka zachová schopnosť delenia, potom, čím skôr v priebehu ontogenézy je indukovaná, tým väčší počet somatických buniek ďalších bunkových generácií ju obsahuje (napr. gynandromorfia). Mutantný fenotyp má len časť tela

Ako **gametické mutácie** označujeme mutácie, ktoré sú prítomné alebo vznikajú v gamétach. Gametická mutácia sa po oplodnení stáva súčasťou génovej výbavy zygoty a pokiaľ vývoj budúceho organizmu prebieha normálne, všetky somatické bunky obsahujú túto mutáciu.

Jednou z príčin starnutia buniek v organizme môže byť nahromadenie neletálnych somatických mutácií v bunkách v priebehu života jedinca, predovšetkým génových mutácií (chromozómové aberácie sa zvyčajne eliminujú). Tento šum v genetickej informácii bunky môže mať za následok stratu jej proliferačnej činnosti v zmysle zastavy bunkového cyklu. To by mohlo byť aj príčinou dysfunkcie tkaniv a orgánov a tým aj starnutia celého organizmu. Starnutie organizmu a jeho zánik podľa týchto predstáv by bol spôsobený neopraviteľným znehodnotením genetickej informácie somatických buniek.



Obrázok 6-20. Dôsledky vzniku mutácií pre človeka.

## Letálne gény

Letálne gény sú gény, ktoré svojmu nositeľovi spôsobujú smrť. Dominantne letálny gén vymizne z populácie ihneď po svojom vzniku, pretože jeho nositeľ zomrie aj keď je heterozygot. Recesívne letálny gén spôsobuje smrť svojho nositeľa len v homozygotnej kombinácii a prostredníctvom heterozygotov sa udržuje v populácii a prenáša z generácie na generáciu.

Nové dedičné varianty vznikajú mutáciou. Nový gén (jeho nositeľ) sa nazýva **mutant**. Mutácie sú jediným zdrojom evolúcie, pri ktorom sa uplatňuje prirodzený výber na zachovanie zdatných a vylúčenie menej súcich mutantov.

Mutácie obvykle spôsobujú stratu alebo poruchu funkcie génu, len zriedkavo láto náhodná zmena génu znamená jeho vylepšenie. Preto sú mutácie vo veľkej väčšine znevýhodňujúce. Mnohé mutácie sú letálne, takže spôsobujú smrť jedinca, ktorý je ich nositeľom. V populačnom zmysle je letálna aj taká mutácia, ktorá spôsobuje zlyhanie reprodukčnej schopnosti postihnutého jedinca. Z genetického hľadiska je teda rovnako letálna ako mutácia, ktorá má za následok potrat vo včasnej fáze embryonálneho vývoja. Ďalšie môžu byť subletálne. Väčšina mutácií, ktoré pozorujeme u človeka, má menej zhubné následky. Je to spôsobené tým, že môžeme pozorovať len tie mutácie, ktoré sú zlučiteľné so životom, a to primárne do času pôrodu.

**Letalita génov** je jav, keď mutácia niektorých génov (resp. ich alel) spôsobuje v konečnom dôsledku zmeny nezlučiteľné so životom gamét, do ktorých segregovali (*letalita gamétová*), alebo znemožňujú dokončenie normálneho vývinu zygoty (*letalita zygotová*). Podstatou je mutácia, ktorá spôsobuje porušenie funkcie pre bunku úplne nevyhnutného proteínu alebo vzniká proteín s pozmenenou regulačnou funkciou a s letálnym efektom. Pri zygotovej letalitě nastáva smrť vyvíjajúceho sa zárodku. Oboje sa musí premeniť ako odchýlka od teoreticky predpokladaného štepneho pomeru možných genotypov a fenotypov. Letálny efekt môže mať alela dominantná alebo recesívna. V prípade dominantnej alely ide vždy o čerstvú mutáciu, ktorá so smrťou svojho nositeľa zaniká a nemôže sa prenášať do ďalšej generácie. Pri recesívnej alele sa letálny efekt prejaví iba v homozygotnom stave a tiež v tomto prípade sa nemôže prenieť do ďalšej generácie. V heterozygotnej konštitúcii svojho nositeľa nepoškodzuje, ale prechádza do jeho gamét a v ďalšom potomstve sa prejaví smrťou vyštiepených recesívnych homozygotov.

Ak označíme letálnu recesívnu alelu  $a^+$ , potom sa teoreticky z križenia dvoch heterozygotov  $Aa^+$  vyštiepi v genotypovom štepnom pomere  $AA : Aa^+ : a^+ : a^+ = 1 : 2 : 1$ . Vo fenotype sa však prejaví iba dominantná alela v genotypovom pomere  $AA : Aa^+ = 1 : 2$ .

Počet generácií, v ktorých mutácia pretrvávajúce dokvete, kým sa nevytráti a neprejde už na ďalšiu generáciu, závisí tiež od selekčného tlaku proti mutácii. Zvýhodnenie heterozygota môže viesť k pretrvávaniu alebo až k zvýšeniu výskytu mutácie, ktorá je v homozygotnom stave nevyhľadná (letálna). Klasickým príkladom je odolnosť voči malárii pri kosáčikovitej črte. Určitú ochranu pred maláriou poskytuje aj Hb C, talasémia, deficiencia G6PD a alela Fy systému krvných skupín Duffy. Predpokladá sa, že podobná nateraz neznáma výhoda môže byť zodpovedná za vyššiu frekvenciu génu pre cystickú fibrózu (mukoviscidózu) v kaukazskej populácii (predpokladá sa zvýhodnenie heterozygotov proti tuberkulóze).

**Genetická smrť** znamená neschopnosť mutácie prejsť do ďalšej generácie vzhľadom na jej fenotypové následky.

Geneticky letálny je gén alebo geneticky podmienený znak, ktorý spôsobuje zlyhanie reprodukčnej schopnosti postihnutého jedinca.

## Príklady letálnych génov

- Tyrozinémia - zriedkavé autozómovo recesívne (AR) letálne hepatálne ochorenie včasného detstva, porucha metabolizmu tyrozinu v dôsledku deficitu



enzýmu p-hydroxyfenylpyruvatoxidázy, ochorenie časté v izoláte u francúzskych Kanadánov - Quebec, frekvencia prenášateľov 1 : 30.

- Cystická fibróza - AR podmienená porucha exokrinných žliaz, ktorá končí väčšinou smrťou v detstvom veku, výskyt 1 : 2000 (1 : 500 - 1 : 3800 v rôznych populáciách, frekvencia heterozygotov 1 : 22), prežívajú maximálne do 20-30 rokov, muži sú neplodní.
- Tayova - Sachsova choroba - AR podmienené neurologické degeneratívne ochorenie, ktoré končí smrťou vo včasnom detstve.
- Duchenneova muskulárna dystrofia - X-viazaná recesívna dedičnosť, ťažké a progresívne svalové ochorenie končiacie letálne, ktoré postihuje chlapcov, od 10. roku na invalidnom voziku, pacienti sa len s malou pravdepodobnosťou dožívajú 20 rokov.
- Achondroplázia - autozómovo dominantne podmienená porucha osifikácie kostí, ktorá má za následok trpasličí vzrast (disproporciálny nanizmus, 140 cm). Charakteristická je kombinácia nápadne krátkych končatín, väčšej hlavy a normálnej veľkosti trupu, so zvyčajne zachovanou normálnou inteligenciou. Homozygoti pre achondropláziu nie sú schopní života. Výskyt je 5 až 15 : 100 000 pôrodov.

- Agamaglobulinémia švajčiarskeho typu - X-viazaná recesívna dedičnosť, ťažká kombinovaná imunodeficiencia, dedičná dysplázia týmusu, výrazné zmeny na lymfatických orgánoch, klinické prejavy sa vyvíjajú už v priebehu 1. týždňa života v podobe infekcii kože, dýchacej a tráviacej sústavy, prípadne sepsy, priebeh je fatálny.

Príkladom letálnych mutácií sú:

- všetky monozómie okrem monozómie X chromozómu (45,X0)
- všetky trizómie okrem trizómie 13, 18, 21, XXX, XYY, XXY.
- chromozómové aberácie väčšieho rozsahu

## Úlohy

1. Nasledujúca sekvencia aminokyselín je súčasťou určitého proteínu. Je uvedená normálna sekvencia a jej štyri mutované formy. Pomocou tabuľky genetického kódu stanovte zodpovedajúcu sekvenciu nukleotidov v dvojitávinitici DNA, ktorá zodpovedá normálnemu génu. Ktoré vlákno je kódujúce? Aká by bola výsledná sekvencia mRNA? Aký je najpravdepodobnejší typ mutácie, ktorý spôsobil zmeny v jednotlivých mutovaných formách?

- normálne poradie: -lys-arg-his-his-tyr-leu-
- mutácia 1: -lys-arg-his-his-cys-leu-
- mutácia 2: -lys-arg-ile-ile-ile-
- mutácia 3: -lys-glu-thr-ser-leu-ser-
- mutácia 4: -asn-tyr-leu-

2. Stanovte typ mutácie z nasledujúceho poradia aminokyselín:

- normálne poradie: -phe-asn-pro-thr-arg-
- mutácia 1: -phe-asn-pro-
- mutácia 2: -phe-asn-ala-his-thr-
- mutácia 3: -phe-his-pro-thr-arg-

Ktorá z mutácií by mohla teoreticky spôsobiť najmiernejšie príznaky choroby?

3. Stanovte typ mutácie z nasledujúceho poradia aminokyselín:

- normálne poradie: -glu-cys-met-phe-trp-asp-
- mutácia 1: -glu-cys-ile-phe-trp-asp-
- mutácia 2: -glu-val-cys-ser-gly-thr-
- mutácia 3: -glu-cys-met-phe-
- mutácia 4: -glu-met-tyr-val-leu-gly-

4. Delícia jedného nukleotidu v DNA zmenila sekvenciu aminokyselín v bielkovine:

...lys-ser-phe-cys-asn-leu-ala-ala-lys...

na sekvenciu:

...lys-val-phe-ala-ile...

Podľa tabuľky genetického kódu zapíšte zodpovedajúcu mRNA pre normálnu bielkovinu, pre pozmenenú bielkovinu a zistite deléciu, ktorá uvedenú zmenu spôsobila.

5. Keď centroméru predstavuje písmeno „o“, ktorá z nasledujúcich sekvencií reprezentuje pericentrickú inverziu chromozómu s poradím génov:

- A B E o F G H I J
- A B C D G F o E H I J
- A B D C E o F G H I J
- A B C D E o F G H



6. Ak centroméru predstavuje písmeno „o“, ktorá z nasledujúcich sekvencií nie je intersticiálnou deléciou:
- A B E o F G H I J
  - A B C D G H I J
  - A B C D E o H I J
  - A B C D E o F G H
7. Aký je rozdiel medzi chromozómovou a génovou mutáciou?
8. Porovnaj te somatické a gametické mutácie a ich následky pre jedinca.
9. Aký je rozdiel medzi génovou mutáciou typu tranzície a transverzie? Pomocou DNA báz (A, T, C, G) zapíšte štyri typy tranzícií a osem typov transverzií.
10. Väčšina mutácií v diploidných organizmoch je recesívna. Prečo?
11. Porovnaj te mutagénne účinky deaminačných látok, alkylačných látok a analógov báz.
12. Prečo je X-žiarenie účinnejší mutagén ako UV žiarenie?
13. Porovnaj te indukciu mutácií pôsobením UV žiarenia a X-lúčov.
14. Popíšte nasledovné mutácie a uveďte rozdiely medzi jednotlivými dvojicami:
- aneuploidia / euploidia
  - monozómia / trizómia
  - Patauov syndróm / Edwardsov syndróm
  - autopolyploidia / allopolyploidia
  - autotetraploidia / amfidiploidia
  - polyténia / endopolyploidia
  - paracentrická inverzia / pericentrická inverzia
15. Kofko chromozóm je prítomný v jadrách somatických buniek jedincov určitého druhu s  $2n = 18$ , ktorí sú:
- haploidní
  - triploidní
  - tetraploidní
  - trizomicí
  - monozomicí
16. Ako zdôvodnite tvrdenie, že Downov syndróm je častejšie výsledkom nondisjunkcie počas oogenézy než počas spermatogenézy?
17. Ako vysvetlite skutočnosť, že aneuploidia u ľudí je častá pri koncepcii, ale zriedkavá u novorodencov?
18. Porovnaj te schopnosť fertility u jedincov s allotetraploidiou, autotriploidiou a autotetraploidiou.
19. Znáorníte schematicky aké gaméty vzhľadom na trizómiu chromozómu č. 21 môže tvoriť žena s Downovým syndrómom.
20. Znáorníte nondisjunkciu jedného chromozómového páru:
- v meióze I oogenézy
  - v meióze II oogenézy
- Porovnaj te s rovnakou nondisjunkciou v priebehu spermiogenézy.
21. Znáorníte stratu jedného chromozómu z určitého homologického páru počas:
- meiózy I spermiogenézy
  - meiózy II spermiogenézy
22. Aká zygota vznikne po fertilizácii vajíčka s dizómiou chromozómu č. 21 spermiiou s nullizómiou chromozómu č.21?
23. V určitej rodine sa narodilo viac detí s Downovým syndrómom. Ako to môžeme vysvetliť?
24. Zriedkavo sa vyskytujú prípady jednovajčkových dvojčiat, z ktorých jedno je normálne a druhé s Downovým syndrómom. Ako to môžeme vysvetliť?
25. Farbosleposť bola zistená u ženy s Turnerovým syndrómom a muža s Klinefelterovým syndrómom, pričom obe matky aj otcovia mali normálny farbocit. Môžeme na základe toho uviesť, kde vznikla nondisjunkcia u rodičov? Predpokladajme, že nejde o novú génovú mutáciu.
26. Kofko Barrových teliesok môžeme nájsť v bunkách uvedených jedincov:
- ženy s normálnym karyotypom
  - muža s normálnym karyotypom
  - ženy s Turnerovým syndrómom
  - ženy s karyotypom 46,XY s čistou gonádovou dysgenézou
  - ženy s karyotypom 46,XX s androgénnym insenzitívnym syndrómom
  - muža s karyotypom 46,XX s pseudohermafroditizmom
  - ženy s karyotypom 46,XY s pseudohermafroditizmom
  - jedinca s karyotypom 46,XX a mužským sociálnym pohlavím
27. Najčastejším typom mozaicizmu u mužov s Klinefelterovým syndrómom je XXV/XY. Uveďte dva možné typy mutácií v postzygotickom vývine, ktoré sú príčinou tohto mozaicizmu.
28. Zapíšte všetky spôsoby, ako môže vzniknúť zygota s chromozómovou konštitúciou 47,XXY rodičom s normálnym karyotypom. Ktorý spôsob je najviac pravdepodobný?
29. Zapíšte všetky možné spôsoby ako môže vzniknúť zygota 47,XXY rodičom s normálnym karyotypom.
30. Prečo sú fenotypové rozdiely medzi jednovajčkovými dvojčatami ženského pohlavia väčšie ako medzi jednovajčkovými dvojčatami mužského pohlavia?



31. Manželský pár v rámci plánovaného rodičovstva prichádza do genetickej poradne nakolko z manželovej strany sa v predchádzajúcich troch generáciach vyskytlo viacej mŕtvonarodených plodov, resp. sa narodilo niekoľko detí s vrodenými anomáliami, ktoré zomreli vo včasnom detstve. Pri cytogenetickom vyšetrení manžela sa zistilo, že má normálny počet chromozómov 46, XY, ale prízkovacia metóda odhalila, že jeden chromozóm č. 1 je s pericentrickou inverziou, ktorá zahŕňa asi 70 % dĺžky tohto chromozómu. Druhý chromozóm č. 1 je v poriadku.

- Ako vysvetlite vysoký výskyt mŕtvonarodených plodov v rodine manžela?
- Aké je riziko narodenia dieťaťa s vrodenými vývojovými chybami v uvedenej rodine?
- Čo môžete poradiť týmto manželom, ktorí chcú predísť uvedeným komplikáciám?

32. Žene s normálnym karyotypom sa narodil syn s Klinefelterovým syndrómom, pričom otec je postihnutý anhydrotickou ektodermálnou dyspláziou (X-viazaná recesívna porucha). Pokožka ženy je bez anomálií, ale jej syn má oblasti na pokožke, ktoré sú normálne a oblasti, ktoré sú bez potných a mazových žliaz.

- Ktorý z rodičov je pôvodcom abnormálnej gaméty?
- Popíšte, pri ktorom meiotickom delení vznikla uvedená chyba.

33. U ženy sa zistila pri cytogenetickom vyšetrení chromozómová prestavba medzi druhým a tretím chromozómom.

- Aký typ chromozómovej aberácie je uvedený na obrázku?
- Ako sa tieto chromozómy môžu párovať počas meiózy?
- Žena je fenotypovo normálna. Vyskytli sa však u nej dva spontánne potraty. Pýta sa na príčiny potratov a pravdepodobnosť, že môže mať životaschopné dieťa.



34. Akým typom mutácie môže byť zmenený metacentrický chromozóm na akrocentrický?

35. Napíšte dva spôsoby, ako môže vzniknúť triploidný jedinec.

36. Vysvetlite rozdiel medzi mutáciami vitálnymi, subletálnymi, semiletálnymi a letálnymi. Ako sa prejavujú?

37. Znázornite schematicky dôsledky nondisjunkcie autozómového chromozómového páru: a) počas oogenézy pri I. meiotickom delení b) počas oogenézy pri II. meiotickom delení

38. Niektoré ženy s Downovým syndrómom môžu mať deti.

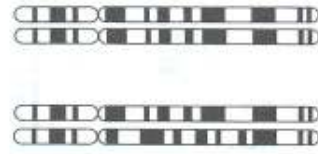
- Znázornite schematicky meiózu I. a II. vzhľadom na voľnú trizómiu chromozómu č. 21.
- Aké je teoretické riziko, že dieťa bude postihnuté rovnakým syndrómom ako jeho matka?

39. Znázornite schematicky všetky typy gamét jedinca s Robertsonovou balansovanou translokáciou chromozómu 21 na 14 - karyotyp: 45,XY,der(14;21)(q10;q10). Vyjadrite teoretickú pravdepodobnosť výskytu jednotlivých karyotypov u novorodencov po spojení týchto gamét s normálnou gamétou.

40. Aké je teoretické riziko narodenia postihnutých detí v potomstve jedinca s Robertsonovou balansovanou translokáciou chromozómov 13-21?

41. Aké je teoretické riziko narodenia postihnutých detí v potomstve jedinca s Robertsonovou balansovanou translokáciou chromozómov 21-21?

42. Manželský pár sa už niekoľko rokov pokúša mať dieťa. Konzultovali lekára a cytogenetickým vyšetrením sa zistilo, že u manžela je abnormálny chromozóm číslo 12.



manžel manželka

- Aký typ chromozómovej abnormality je u manžela?
- Aké dôsledky vyplývajú z toho pre potomstvo uvedených manželov?

43. Rodičovský pár nemôže mať životaschopné dieťa. Žena mala dva potraty a jedno ťažko poškodené dieťa, ktoré zomrelo čoskoro po narodení. Cytogenetická analýza pružkových chromozómov otca, matky a dieťaťa ukázala, že všetky chromozómy sú normálne s výnimkou chromozómového páru číslo 6 u otca a dieťaťa.

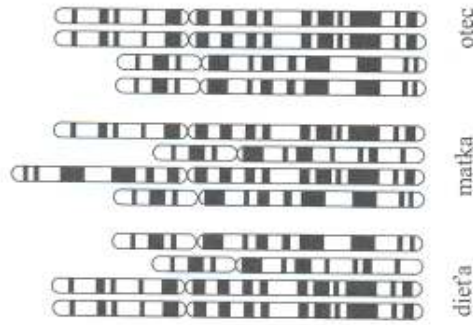


dieťa matka otec



- a) Ktorý z rodičov má abnormálny chromozóm č. 6?  
 b) Stanovte typ chromozómovej mutácie.  
 c) Prečo dieťa nie je fenotypovo normálne?  
 d) Aká je prognóza pre ďalšie potomstvo tohto páru?

44. Manželský pár sa pokúša už niekoľko rokov mať dieťa. Žena mala niekoľko potratov a minulý rok sa jej narodilo dieťa s mnohopočetnými kongenitálnymi chybami. Dieťa zomrelo v priebehu niekoľkých dní po narodení. Výsledky cytogenetickej analýzy ukázali, že všetky chromozómy sú v poriadku okrem chromozómu č. 6 a č. 12. Průzkované chromozómy jednotlivých členov rodiny sú uvedené na obrázku (chromozómy č. 6. sú dlhšie).



- a) Ktorý z rodičov má abnormálny karyotyp?  
 b) Stanovte typ chromozómovej aberácie.  
 c) Prečo je dieťa fenotypovo postihnuté?  
 d) Aká je prognóza pre potomstvo uvedeného rodičovského páru?

45. Vysvetlite, čo označujú nasledovné karyotypy:

- 47,XXY
- 47,XXX
- 47,XYY
- 45,X
- 48,XXXX
- 47,XY,+13
- 47,XY,+21
- 47,XY,+mar
- 47,XY,+21/46,XY
- 45,X/46,XX/47,XXX
- 46,XX,del(5)(p13)

- 46,XY,del(5)(q15q22)
- 46,XY,inv(3)(p21q26)
- 46,XX,inv(2)(p13p24)
- 46,XX,t(2;18)(p13;q21)
- 46,XX,t(2;5)(q21;q31)
- 46,XY,r(9)(p24q34)
- 46,XX,r(18)(p11q22)
- 45,XY,der(21;21)(q10;q10),+21
- 46,XY,der(21;21)(q10;q10),+21
- 45,XX,der(14;21)(q10;q10)
- 46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21
- 46,XX,der(13;14)(q10;q10),+13
- 46,XY,t(9;10)(p22;q24)
- 46,XX,del(13)(q22)
- 46,Xi(X)(q10)
- 46,XX,t(17)(q10)
- 46,Yfra(X)(q27)
- 46,XX,der(2;t(2;5)(q21;q31)
- 46,XY,dup(14)(q22q24)

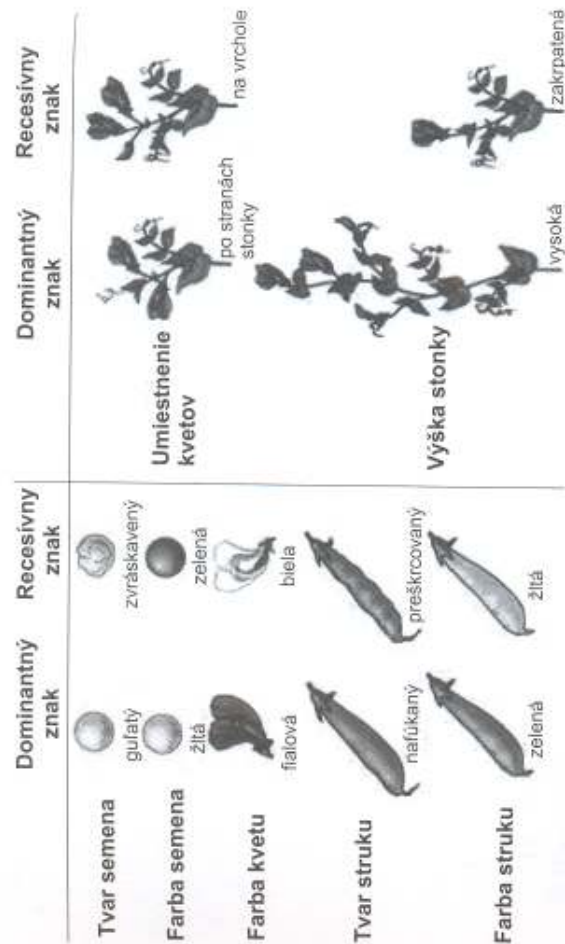
46. Zapište karyotyp:

- a) muža s trizómiou chromozómu 22
- b) muža s terminálnou deléciou krátkeho ramena chromozómu 4
- c) ženy s Edwardsovým syndrómom
- d) muža s vyváženou formou Robertsonovej translokácie chromozómov 13 – 14
- e) ženy s nevyváženou formou Robertsonovej translokácie chromozómov 14 – 21
- f) ženy s recipročnou translokáciou medzi chromozómami 4 a 9
- g) muža s intersticiálnou deléciou krátkeho ramena chromozómu 3
- h) jedinca s Turnerovým syndrómom
- i) muža s paracentrickou inverziou chromozómu 10
- j) ženy s pericentrickou inverziou chromozómu 6
- k) jedinca s Klinefelterovým syndrómom
- l) jedinca s trizómiou chromozómu X
- m) ženy s terminálnou deléciou krátkych ramien chromozómu X
- n) muža s monozómiou chromozómu 21
- o) ženy s trizómiou chromozómu 21
- p) ženy s mozaikovou formou Downovho syndrómu
- q) ženy s izochromozómom X pre q ramená
- r) muža s izochromozómom pre dlhé ramená chromozómu 21
- s) muža s recipročnou translokáciou chromozómov 2 a 5
- t) muža s prstencovým chromozómom 2
- u) ženy s Patauovým syndrómom



## 7. Mendelove pravidlá dedičnosti

Genetika ako vedný odbor sa začala systematicky rozvíjať v dvadsiatom storočí. Základné princípy dedičnosti odvodil brnenský opát Johann Gregor Mendel (1822 – 1884) na základe výsledkov experimentov, v ktorých krížil rastliny hrachu (*Pisum sativum*) líšiace sa v jednom a viacerých pároch alternatívnych znakov. Pri hybridizačných pokusoch s brachom si Mendel vybral sedem párov odlišných znakov, napríklad guľaté alebo zvráskavené semená, vysoké rastliny a zakrpatené, červené a žlté kvety, zelené a žlté semená atď (obr. 7-1)



**Obrázok 7-1.** Sedem dvojíc znakov hrachu, s ktorými Mendel experimentoval.

Johann Gregor Mendel sa narodil roku 1822 v Hynčiciach na Morave. Vystudoval gymnázium a seminár, bol vysvätený za kňaza a stal sa členom brnenského augustiánskeho kláštora. Na viedenskej univerzite študoval prírodné vedy, fyziku a matematiku. Pôsobil ako pedagóg v Brne. Svoje známe genetické pokusy s brachom (*Pisum sativum*) začal r. 1857 a výsledky týchto pokusov predniesol na jar r. 1865 na schôdzi brnenskej prírodovednej spoločnosti a neskôr publikoval v časopise tejto spoločnosti. Práca zaslala 35 rokov nepovšimnutú vedeckou verejnosťou. Mendel sa následne zaoberal analýzou jednotlivých znakov a dosiahol nepopísateľnú matematickú, čo bol postup v polovici minulého storočia v biologických vedách neobvyklý. Technika hybridizačných pokusov bola jednoduchá. Mendel na nerozkvitnutom kvete urobil semikastráciu odstránením tyčínok a pomocou štetca preniesol peľové zrnka odrody, s ktorou robil kríženie. Takto ošetrovaný kvet chránil pred prenesením nežiaduceho peľu hmyzom. V prípade kríženia F<sub>1</sub> generácie bolo použité samoopelenie a kvety opäť chránené pred prenesením nežiaduceho peľu.

Mendel vychádzal z kríženia rodičov, ktorí tvorili parentálnu generáciu a boli to jedinci dvoch rozdielnych tzv. čistých línii. Výsledky pre všetkých sedem sledovaných znakov boli rovnaké, bez ohľadu na to, ktorý z rodičov poskytol samčie a ktorý samičie gaméty. Potomstvo prvej filialnej (lat. filii = potomkovia) generácie bolo zhodné s jedným z rodičov a tieto vlastnosti sa označujú ako vlastnosť dominantná (lat. dominus = pán). Po samoopelení jedincov prvej filialnej generácie dochádzalo v tejto druhej filialnej generácii ku štiepeniu, kedy sa u 1/4 jedincov objavila vlastnosť, ktorá bola v predchádzajúcej generácii potlačená. Táto vlastnosť sa nazýva ako recesívna. Činitele, ktoré umožnili Mendelovi vysvetliť tieto výsledky sám označil termínom (dedičný) faktor. Závery jeho hybridizačných pokusov sa stali základom genetiky a na jeho počesť sa označujú

Mendelove zákony. Mendel však svoje výsledky nezhlml do pravidiel, sám ich popisoval dost' obšírne a v čase, keď boli publikované, nezbudili žiadnu mimoriadnu pozornosť. Tzv. Mendelove zákony boli formulované až neskôr po znovuoobjavení Mendelových pokusov na začiatku 20. storočia. Toto vysvetľuje aj skutočnosť, že rôzne učebnice formulujú tieto zákony nielen rozdielne, ale aj v rôznych počtoch.

### 7.1. Základná terminológia klasickej genetiky

**Fenogenetika** je nový názov pre najstaršiu časť genetiky, ktorej zakladateľom je J. G. Mendel. Tento odbor sa označuje aj ako *formálna genetika* alebo **klasická genetika**. Názov fenogenetika je odvodený od základnej metódy, podľa ktorej na základe pozorovaného fenotypu usudzujeme, aký je genotyp jedincov.

**Vloha** je všeobecne používaný abstraktný pojem, označujúci tú časť genetickej výbavy organizmu, ktorá sa dedí a ktorá podmieňuje vývoj znaku alebo vlastnosti. Materiálnou podstatou vlohy je **gén** alebo súbor génov. Gén je časť molekuly DNA, ktorá obsahuje genetickú informáciu pre syntézu špecifického polypeptidového reťazca. Konkrétny pozorovateľný prejav génu označujeme pojmom **znak**. Sekvencia nukleotidov v géne je do určitej miery variabilná, čoho dôsledkom je, že gén pre určitý konkrétny znak môže existovať vo viacerých formách. Napr. gén pre farbu kvetu môže determinovať farbu bielu alebo červenú. Táto konkrétna forma génu je označovaná ako **alela**.

Každý gén má minimálne dve alelické formy (funkčný alebo nefunkčný gén), poznáme však aj gény, ktoré majú viacero alelických foriem, napr. krvno-skupinový systém ABO má tri alelické formy a pri génoch leukocytárnych antigénov (HLA) poznáme 10 – 40 rôznych alel konkrétneho génu.

Gény sú lokalizované v chromozómoch, konkrétne miesto génu na chromozóme sa nazýva **lokus**.

Súbor všetkých génov v bunke označujeme ako **genotyp**. Genotyp sa obvyčajne používa vo vzťahu ku konkrétnemu lokusu, je to dvojica alel toho istého génu na homologických chromozómoch. Genotyp eukaryotickej bunky pozostáva z génov lokalizovaných v jadre – **genómu** a génov lokalizovaných v mimojadrových organelách – **plazmómu**. Týmto organelami s vlastnou DNA môžu byť mitochondrie alebo plastidy a gény v nich obsiahnuté bývajú označované aj ako chondrióm resp. plástóm. Realizáciou genotypu v konkrétnych podmienkach prostredia vzniká **znak** – prejav génu.

**Znak** predstavuje z genetického hľadiska každú definovateľnú vlastnosť organizmu. Napr. krvnú skupinu, farbu očí, výšku, polydaktýliu (nadpočetné prsty), rásťper pery alebo podnebia a pod. Na molekulárnej úrovni je znakom už funkčný proteín. Znaky, ktoré má organizmus v rámci normálnej fyziologickej situácie, sa označujú ako *znaky normálne* alebo *štandardné*. Znaky, ktoré vybočujú z charakteristiky druhu a poškodzujú biologickú kvalitu svojho nositeľa, sú *znaky patologické*.

Súbor všetkých znakov organizmu tvorí **fenotyp**. Na konkrétnom prejave fenotypu sa podieľajú faktory genetickej ale aj faktory negenetickej. Fenotyp je teda výsledkom spolupôsobenia genotypu a faktorov vonkajšieho a vnútorného prostredia.



### 7.1.1. Alelové a nealelové interakcie

V diploidnom organizme je každý gén najčastejšie zastúpený jedným alelickým párom, alely sú nesené dvoma homologickými chromozómami v identických lokusoch. Jedinec, ktorý má pre určitý znak na obidvoch chromozómoch rovnaké alely sa nazýva **homozygot**. Ak má jedinec pre znak rôzne alely, hovoríme, že je **heterozygot**. Medzi alelami toho istého génu môžu existovať rôzne funkčné vzťahy. Dve alely môžu byť navzájom vo vzťahu nadradenosti a podradenosti, kedy jedna alela svojim účinkom potláča účinnok druhej alely. Takýto alelický vzťah sa označuje ako vzťah **dominance** a **recesivity**. Pri úplnej dominancii prítomnosť jednej dominantnej alely v organizme stačí na to, aby sa úplne manifestoval dominantný fenotyp. Ak je vzťah dominance a recesivity neúplný hovoríme o tzv. **intermediarite**. V tomto prípade heterozygotná konfigurácia dvoch rôznych alel podmieňuje vznik fenotypu, ktorý je prechodom medzi fenotypom dominantného a recesívneho homozygota. Ako príklad možno uviesť gén pre farbu kvetu u *Antirrhinus major* (papuľky väčšej). U tohto druhu je červená farba kvetu podmienená dominantnou alelou *A*, biela farba recesívnou alelou *a*. Jedince s dominantne homozygotnou konštitúciou *AA* majú červené kvety, s recesívnou *aa* sú bielo kvetúce a heterozygoti *Aa* majú ružové kvety.

V iných prípadoch môže byť sila prejavu dvoch rôznych alel toho istého génu rovnaká, to znamená, že alely sú rovnocenné a génový produkt oboch alel sa prejaví vo fenotype. Tento typ alelického vzťahu označovaný ako **kodominancia** sa často vyskytuje pri génoch determinujúcich antigény. Napr. pri krvnoskupinovom systéme MN nachádzame u osôb s genotypom MN na povrchu erytrocytov antigény typu M aj N, zatiaľ čo homozygoti MM a NN vytvárajú len jeden typ antigénu M resp. N.

Pri mnohonásobnom alelizme, t.j. ak príslušný gén má viac ako dve alelické formy, môžu byť vzťahy medzi jednotlivými alelami rôzne. Ako príklad možno uviesť gén krvnoskupinového systému AB0, ktorý má tri alelické formy – A, B a 0. Medzi alelami A a B je vzťah kodominancie, avšak vzťah alel A a B k alele 0 má charakter dominance a recesivity.

Podobný funkčný vzťah akým je dominancia a recesivita medzi alelami v rámci určitého lokusu, môže existovať aj medzi alelami prípadne genotypmi dvoch rôznych lokusov, vtedy ide o **epistázu** a **hypostázu**. Gén, ktorý môže potlačiť prejav iného génu sa označuje ako **epistatický** a gén, ktorý je potlačený ako **hypostatický**.

Jedným z mála príkladov epistázy u človeka je interakcia medzi génmi lokusu AB0 a génmi lokusu H, h pri utváraní krvnej skupinovej špecificity. Alela *h* je v homozygotnom stave epistatická nad alelou AB0 lokusu, čiže ide o **recesívnu epistázu**. Najdlhšie známym príkladom dominantnej epistázy u človeka je vzťah medzi génmi zodpovedajúcimi za krvnú skupinu Lewis (*Le*) a faktorom sekretor (*Se*). V rámci obidvoch párov *Le*, *le* a *Se*, *se* je dominancia. Dominantný fenotyp *Le* možno zistiť iba v erytrocytoch jedinca, ktorý je recesívne homozygotný na lokuse sekretor, čiže má genotyp *se se*. Teda alela *Se* je epistatická nad alelou *Le*.

### 7.1.2. Expresivita, penetrancia

Štúdium dedičnosti u človeka by bolo oveľa jednoduchšie, keby každému genotypu vždy zodpovedal jeden a ten istý fenotypový prejav. Mnohé gény a genotypy vedú naozaj k utvoreniu konštantného fenotypu za všetkých známych podmienok vnútorného aj vonkajšieho prostredia. Sú to napr. gény zodpovedné za utvorenie krvnej skupinovej špecificity, za pigmentáciu očnej dúhovky, za mnohé dedičné ochorenia – tieto znaky sú

u všetkých jedincov rovnakého genotypu rovnaké. Väčšinou však nie je medzi genotypom a fenotypom taký jednoznačný vzťah. Často jeden a ten istý genotyp utvára u rozličných jedincov rozličné, kvantitatívne, či kvalitatívne odlišné varianty znaku. Hovoríme, že gén (alebo genotyp) má **variabilnú expresivitu** na úrovni znaku.

Fenotypový prejav istého genotypu často závisí od interakcie s inými génmi, ako aj od faktorov prostredia, ktoré obklopuje vyvíjajúceho sa jedinca v jednotlivých obdobiach jeho života. Nie je to iba vonkajšie fyzické prostredie obklopujúce jednotlivca v postnatálnom vývine, ale aj organizmus matky obklopujúci vyvíjajúce sa embryo.

Variabilná expresivita sa najčastejšie objavuje u heterozygotných genotypov. Dôležitý je aj vek objavenia sa prvých príznakov dedičných chorôb, môže sa stať, že dospelý jedinec zomrie skôr, než sa uňho prítomný gén fenotypovo manifestuje. Napr. prvé symptómy Huntingtonovej choroby sa objavujú väčšinou až v dospelom veku, neraz sa stáva, že jedinec s príslušným genotypom zomrie z iných príčin skôr, než sa vyvinie ochorenie.

Variabilná expresivita génu zodpovedného za Huntingtonovu choreu je príčinou javu, ktorý sa nazýva **neúplná penetrancia**. Penetrancia génu (alebo genotypu) sa vyjadruje percentom nositeľov príslušného znaku alebo choroby spomedzi všetkých jedincov s daným genóm (genotypom). Teda, ak gén vedie k utvoreniu znaku u všetkých jedincov, ktorí majú tento gén, penetrancia je stopercentná, ak sa znak utvoril iba u 90 % jedincov s týmto genóm, penetrancia génu je deväťdesiatpercentná a pod. Podobne ako s variabilnou expresivitou aj s neúplnou penetranciou sa stretávame najčastejšie u heterozygotných genotypov.

### 7.1.3. Heterogenita, pleiotropia, fenokópia

Často sa stáva, že nealelické gény (t.j. gény na rozmanitých lokusoch) vyvolávajú veľmi podobný alebo zhodný fenotypový prejav, napr. rovnaký druh ochorenia. Tento jav sa nazýva genetická **heterogenita**. V medicíne sa stretávame s heterogenitou pomerne často.

Dobrym príkladom genetickej heterogenity sú svalové dystrofie – skupina dedičných svalových ochorení. Sú známe štyri hlavné typy tohto ochorenia

- Duchenneova forma svalovej dystrofie je podmienená recesívnym genóm lokalizovaným v X chromozóme, postihnutí sú iba chlapci, prognóza je veľmi nepriaznivá
- Recesívne autozómovo dedičná forma postihuje rovnako často chlapcov aj dievčatá
- Beckerova forma svalovej dystrofie je podmienená autozómovo recesívnym genóm, má lepšiu prognózu ako predchádzajúce dva typy
- Tzv. fácio-skapulohumerálny typ vyvoláva dominantný autozómový gén, postihnuté sú svaly pletenca hornej končatiny, progres je veľmi pomalý, prognóza dobrá.

Heterogenita môže mať podklad už na **molekulej úrovni**, vtedy, keď sa molekula bielkoviny, ktorá je podkladom znaku skladá z dvoch alebo viacerých polypeptidov kódovaných rozličnými génmi.

Inokedy má heterogenita podklad na **biochemickej úrovni**. Konečný produkt série biochemických reakcií je často pre organizmus potrebný, jeho nedostatok vyvolá špecifický patologický stav. Sériu reakcií však najčastejšie katalyzuje väčší počet enzýmov, ktoré sú determinované rozličnými génmi. Deficit ktoréhokoľvek enzýmu môže viesť k nedostatku výsledného produktu, a teda k príslušnému patologickému stavu. Príkladom tohto mechanizmu



je okukolujúny albinizmus – stav vyvolaný neprítomnosťou melanínu v dúhovke, v koži a v jej derivátoch. Nedostatok melanínu býva najčastejšie zapríčinený nedostatkom tyrozínázy.

Heterogenita má aj morfológický podklad. Dve alebo viac morfológických abnormalít môže viesť k rovnakým funkčným dôsledkom, k rovnakému ochoreniu. Napr. funkčná schopnosť sluchového orgánu závisí od správneho vývinu jeho jednotlivých zložiek, okrem iného kochley a sluchového nervu. Defektná kochlea a neporušený nerv práve tak ako defektný sluchový nerv a dobre vyvinutá kochlea majú rovnaký funkčný dôsledok – hluchotu. Správny vývin kochley a normálny vývin sluchového nervu riadi viac rozličných génov – mutácia ktoréhokoľvek z nich vyvoláva hluchotu.

S pojmom heterogenita súvisí pojem **fenokópia**. Vzniká vtedy, ak zásah z vonkajšieho prostredia vedie k vytvoreniu takého istého fenotypu aký je vyvolaný genetiky. Tento zásah môže nastať v ktoromkoľvek období ontogenézy. Napr. počas včasnej embryogenézy niektoré teratogénne látky vyvolávajú vrodené vývinové chyby nerozoznatelné od podobných porúch determinovaných genetiky. Poškodenie ústrednej nervovej sústavy počas pôrodu vyvoláva niekedy prejavy, ktoré sa nedajú rozoznať od príznakov dedičných ochorení nervovej sústavy.

Každý gén má len jeden primárny účinok, ktorým reguluje syntézu polypeptidového reťazca. Z tohto primárneho účinku však môže vzniknúť mnoho ďalších následkov. To znamená, že jeden gén môže ovplyvňovať priamo či nepriamo viac znakov. Mnohostranné účinky jedného génu sa označujú ako **pleiotropia**. Napr. pri fenylketonurii, autózómovo recesívnej metabolickej poruche, je nedostatok enzýmu fenylalaninhydroxylázy. Primárnym následkom je špeciálny enzýmový defekt u recesívnych homozygotov. Z neho vyplýva mnoho sekundárnych stavov, najmä ťažká mentálna retardácia, vylučovanie fenylketónov do moču a porucha pigmentácie. Podobne pri galaktózemii sa za primárny účinok homozygotného recesívneho génu považuje chýbanie enzýmu galaktózo-1-fosouriditransferázy. To ústi do druhotných účinkov, ktoré zahŕňajú galaktozúriu, mentálnu retardáciu, pečeneňovú cirhózu a kataraktu.

## 7.2. Mendelove princípy

Pri pohlavnom rozmnožovaní odovzdávajú rodičia svojim potomkom genetickú informáciu prostredníctvom haploidných gamét. Každý potomok je, čo sa týka génov a teda aj znakov, kombináciou svojich rodičov.

Mendel študoval dedičnosť niektorých kvalitatívnych monogénových znakov. *Štatistickou analýzou* hybridných populácií pochádzajúcich z križenia rastlín, tzv. *hybridologickej analýzy*, dospel k poznaniu základných zákonitostí dedičnosti mnohobunkových organizmov, ktoré sa slovné vyjadrujú v podobe táz a označujú ako Mendelove zákony. Aj keď Mendel v čase, keď robil experimenty, nemohol ešte vedieť o existencii chromozómov, logicky predpokladal prítomnosť určitých jednotiek, pomocou ktorých sa vlohy prenášajú do gamét a pri oplodnení sa náhodne rekombinujú. Dnes vieme, že *vloha* nesie genetickú informáciu jedného génu a to čo Mendel nazýval vloha, dnes označujeme ako *alela*. Chromozómy boli objavené Waldeyerom (1888) a až začiatkom 20. storočia T. H. Morgan (1910) dokázal, že gény sú umiestnené v chromozómoch.

Ak sa rodičia líšia len v jednom znaku ( len v jednom páre alel toho istého génu), hovoríme o **monohybridizme**. Keď sledujeme dedičnosť dvoch párov alel (dvoch znakov), hovoríme o **dihybridizme**.

### 7.2.1 Monohybridné križenie

V hybridizačnom pokuse Mendel sledoval jeden pár znakov, napr. sfarbenie semien (žlté a zelené). **Parentálna generácia (P)** bola vždy čistá línia (homozygoti) pre sledovaný znak. Križením jedincov parentálnej generácie získal hybridov **prvej filialnej generácie (F<sub>1</sub>)** a ich križením potomstvo **druhej filialnej generácie (F<sub>2</sub>)**. Vo všetkých pokusoch sa rastliny F<sub>1</sub> generácie vždy podobali iba na jedného z rodičov. F<sub>1</sub> generácia bola vždy **uniformná**. Uniformita F<sub>1</sub> generácie sa označuje ako **1. Mendelov zákon dedičnosti**.

Potomok z križenia genotypovo rozdielnych rodičov sa nazýva križenec (hybrid). Križenci zo vzájomného križenia homozygotných rodičov sú v danom alelickom páre vždy *heterozygotní*. Výplýva to z toho, že potomok dostáva od každého rodiča prostredníctvom jeho haploidnej bunky vždy len jednu rodičovskú alelu. Ak označíme genotyp jedného z rodičov symbolom AA a genotyp druhého homozygotného rodiča aa (dominantné alely sa zvyčajne označujú veľkými písmenami a recesívne alely zodpovedajúcimi malými písmenami abecedou), potom pohlavné bunky prvého rodiča môžu niesť vždy len alelu A a pohlavné bunky druhého rodiča naopak vždy len alelu a. Po ich spojení vzniká výhradne heterozygot genotypu Aa.

**P-generácia** AA X aa  
**Gaméty** A a  
**F<sub>1</sub>-generácia** Aa

Už dávnejšie sa zistilo, že výsledky križení sú identické bez ohľadu na to, či nositeľom sledovaného znaku je materský alebo otcovský organizmus (reciproké križenie). Táto skutočnosť neplatí, keď sú gény lokalizované v pohlavných chromozómoch.

Pri vzájomnom križení heterozygotných jedincov medzi sebou vzniká generácia potomkov, ktorí sú genotypovo rôznorodí. Genotypovo heterogénne potomstvo zo vzájomného križenia heterozygotov sa nazýva *druhá filialná generácia (F<sub>2</sub>)*. Vznik druhej filialnej generácie môžeme znázorniť nasledujúcou schémou (kombinačným štvorcem), ktorá sa označuje aj ako mendelistický štvorec:

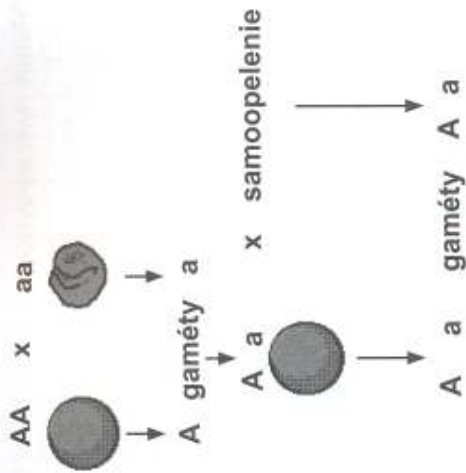
**F<sub>1</sub>-generácia** Aa X Aa  
**Gaméty** A,a A,a  
**F<sub>2</sub>-generácia**

gaméty	A	a
A	AA	Aa
a	Aa	aa

Ak sa na oplodnení zúčastňujú oba typy gamét s rovnakou pravdepodobnosťou, potom v F<sub>2</sub> generácii môžu vznikaf s 25 % pravdepodobnosťou zygotické kombinácie AA (homozygotne dominantné), s 50 % pravdepodobnosťou zygotické kombinácie Aa (heterozygotné) a s 25 % pravdepodobnosťou kombinácie aa (homozygotne recesívne). V F<sub>2</sub> generácii dochádza ku genotypovému štiepeniu alebo segregácii, pričom vzniká charakteristický *genotypový pomer 1 AA : 2 Aa : 1 aa*. Genotypovej segregácii zodpovedá aj segregácia fenotypová a v F<sub>2</sub> generácii môžeme nájsť charakteristický *fenotypový štiepny pomer 3 : 1* (obr 7-2).

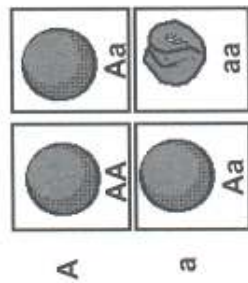


### Parentálna generácia



### F1 generácia

### F2 generácia



Obrázok 7-2. Monohybridné kríženie.

Vzájomné pomery jednotlivých genotypov v potomstve špecifického kríženia sa nazývajú *štepne čiže segregčné pomery* (potomstvo sa „štepí“ na viaceré typov). Znaky, pri ktorých sa spôsob dedičnosti zakladá na genotypových segregčných pomeroch sa nazývajú znaky *mendelistickej dedičné*. Všeobecne sa to týka monogénovej autozómovej dedičnosti.

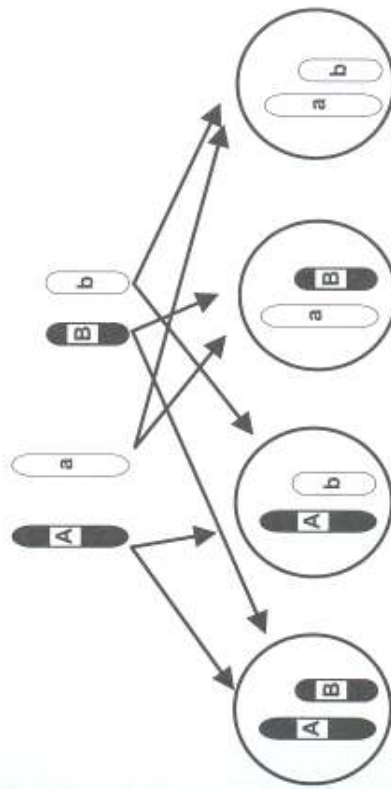
Kríženie jedincov F<sub>1</sub>-generácie s jedincom rodičovskej (parentálnej) línie sa nazýva **spätným krížением**. Pri krížení F<sub>1</sub> generácie s recesívne homozygotným rodičom vyšťupia jednotlivé fenotypy v pomere 1:1.



### 7.2.2. Dihybridné kríženie - zákon o voľnej kombinovateľnosti alel

Základný genotypový štepny pomer 1.AA : 2.Aa : 1.aa (resp. základný fenotypový štepny pomer 3.A : 1.a) je typickým segregčným pomerom pri sledovaní kombináčnych vzťahov F<sub>2</sub> generácii v rámci jedného páru alel (pri monohybridnom krížení, to znamená vzájomnom krížení jedincov heterozygotov pre jeden pár alel - monohybridov). Pri sledovaní kombináčnych vzťahov v F<sub>2</sub> generácii vo viacerých pároch alel súčasne (pri dihybridnom, trihybridnom alebo všeobecne polyhybridnom krížení) sú segregčné pomery zložitejšie. Vždy je však možné tieto vzťahy odvodiť od uvedených základných štepnych pomerov.

Voľnú kombinovateľnosť alel pri vzniku gamét a pri splynutí samičích a samičích pohlavných buniek môžeme demonštrovať na príklade **dihybridného kríženia**, pri ktorom sa rodičia odlišujú v dvoch znakoch, resp. sledujeme súčasne kombináciu vzťahy dvoch párov alel A/a a B/b (kríženie rastlín hrachu s hladkými A a žltými semenami B s rastlinou so zvráskavenými a zelenými semenami b). Hybridné potomstvo F<sub>1</sub> generácie je uniformné a fenotypovo zhodné s dominantným rodičom. Heterozygotný jedinec s genotypom **AaBb** (dihybrid) môže vytvárať 4 geneticky rozdielne typy haploidných gamét, a to **AB, Ab, aB, ab**. Kombinácie alel oboch génov v gamétach závisia od toho, akým spôsobom sa rozchádzajú v I. anafáze príslušné párové chromozómy do dcérskych buniek. Pretože smer rozchodu homologických chromozómov z bivalentov k jednému resp. druhému pólu bunky je pri meióze náhodný, vznikajú uvedené 4 možné gametické kombinácie s rovnakou pravdepodobnosťou (obr. 7-3).



Obrázok 7-3. Princíp náhodnej kombinácie chromozómov z rozdielnych homologických párov v gamétach dihybrida.

Ak sa všetky tieto gaméty uplatňujú pri vzájomnom krížení dvoch dihybridov a pri oplodnení s rovnakou pravdepodobnosťou, v F<sub>2</sub>-generácii môže vzniknúť **16 zygotických kombinácií**. Schematicky je to možné znázorniť kombináčným štvorcem:

<b>P-generácia</b>	AABB	x	aabb
<b>Gaméty</b>	AB		ab
<b>F<sub>1</sub>-generácia</b>	AaBb	x	AaBb
<b>Gaméty</b>	AB, Ab, aB, ab		AB, Ab, aB, ab

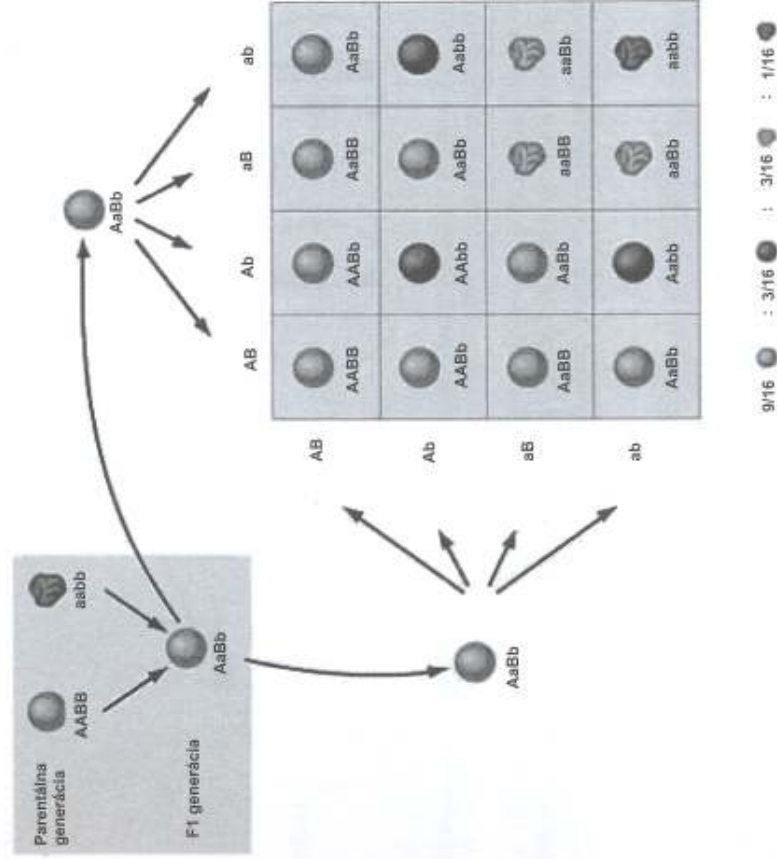


F <sub>2</sub> -generácia		gaméty	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

**Genotypový štiepny pomer** je: 1 AABB : 2 AABb : 1 AAbb : 2 AaBB : 4 AaBb : 2 Aabb : 1 aaBB : 2 aaBb : 1 aabb, to znamená, že v F<sub>2</sub> generácii vzniká **9 rôznych genotypov**.

Medzi alelami oboch sledovaných génov sa uplatňuje *princíp voľnej kombinovateľnosti*, podľa ktorého môže pri vzájomnom krížení viacsobne heterozygotných krížencov (polyhybrídov) vzniknúť toľko zygotickej kombinácií, koľko je teoreticky možných matematických kombinácií medzi vzájomne nezávislými veličinami.

Pri úplnej dominancii vznikajú v F<sub>2</sub> generácii **4 triedy fenotypov a fenotypový štiepny pomer 9 : 3 : 3 : 1** v F<sub>2</sub> generácii dihybrída zodpovedá spojeniu dvoch nezávislých základných fenotypových štiepných pomerov **3 A : 1 a** a **3 B : 1 b**, ktoré môžeme z dihybrídneho kombinačného štvorca odvodiť pre jedno aj pre druhé monohybridné kríženie (obr. 7-4).



Obrázok 7-4. Dihybridné kríženie.

Poznatky, ktoré Mendel získal na základe hybridizačných pokusov sa najčastejšie formulujú následovne:

*Uniformita hybridov v prvej fliďnej generácii.* Ak sú obidvaja rodičia homozygotní pre určitý sledovaný znak, ich potomkovia sú uniformní genotypovo aj fenotypovo. Potomkovia dominantného a recesívneho homozygota sú všetci heterozygoti, t. j. *hybridi*. Vo fenotype (znaku) sa prejaví iba dominantná alela.

*Štiepne znakov v potomstve hybridov.* Pri krížení dvoch heterozygotov sa v potomstve vysťepujú znaky rodičov (hybrídov) v pomere jednoduchých celých čísel.

*Náhodná segregácia alel do gamét.* Ak je znak jedinca (kvalitatívny) determinovaný dvoma alelami toho istého génu, jedna alela tohto génu pochádza od jedného rodiča a druhá alela od druhého rodiča. Pri tvorbe gamét sa tieto alely rozchádzajú tak, že do každej gaméty segreguje len jedna alela daného alelového páru.

*Nezávislá kombinácia alel.* Pri segregácii alel do gamét sa alely rôznych génov (na rôznych lokusoch) kombinujú v každej gaméte nezávisle od seba. Neskôr sa tento Mendelov záver upresnil tak, že platí iba pre gény, ktoré sú umiestnené na rôznych chromozómoch.

Prvé dva z uvedených zákonov sa označujú aj ako *zákony fenotypové*, tretí a štvrtý ako *genotypové*. Moderná genetika potvrdila alebo upresnila všetky Mendelove závery, prevzala ich a na ich základe boli urobené ďalšie zásadné objavy.

Štiepne pomery pri krížení heterozygotov získal Mendel na experimentálnych súbороch s veľkým počtom jedincov. Zákonitosti odvodené z Mendelových pokusov majú štatistický charakter a platia iba v súboroch s vysokým počtom jedincov. Sú podkladom pre stanovenie genetickej prognózy vo forme určitej pravdepodobnosti výskytu daného znaku. Tá môže byť v krajných prípadoch rovná 1 alebo 0 a potom vyjadruje istotu výskytu alebo chýbania znaku. Ak vypočítaná pravdepodobnosť výskytu znaku sa nerovná 1 alebo 0, v žiadnom prípade nie je možné predpovedať jeho prítomnosť u určitého jedinca s istotou.

### 7.3. Dedičnosť kvalitatívnych a kvantitatívnych znakov

Znaky podmienené monogénne sa prevažne vyskytujú v určitých konkrétnych formách, ktoré ich možno jednoznačne popísať z hľadiska kvality a frekvencie (napr. farba kvetu, krvná skupina). Znaky charakterizované kvalitou označujeme ako **znaky kvalitatívne**. Čím viac génov určitý znak podmieňuje, tým variabilita určitého znaku stúpa a hranice medzi jednotlivými formami znaku prestávajú byť rozlišiteľné. Formy znaku nadobudajú spojitú krivku, ktoré možno charakterizovať parametrami – aritmetický priemer a smerodajná odchýlka a sú preto označované ako **znaky kvantitatívne**.

Gény, ktoré sa podieľajú na utváraní kvantitatívnych znakov sa označujú ako gény malého účinku – tzv. **minor gény**. U znakov monogénne podmienených hovoríme potom o génoch veľkého účinku tzv. **majoor génoch**.

Na vzniku kvantitatívnych znakov sa okrem veľkého počtu tzv. minoritných génov z rozličných lokusov podieľajú aj exogénne (epigenetické) faktory. Epigenetické sú tie faktory, ktoré vplyvajú na expresiu minoritných génov a tak ovplyvňujú prejav znaku, alebo jeho formu. Medzi epigenetické faktory patria napr. hormonálny profil organizmu, zložky potravy, denný režim, celková životospráva, vek matky, nákaza vírusom, účinok škodlivín a pod.).

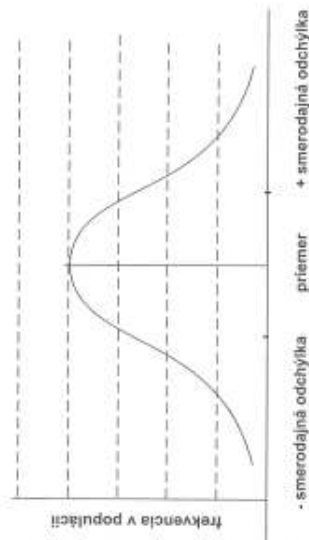
Genetická zložka podmieňajúca tieto znaky je označovaná ako tzv. **genetická predispozícia**. Možno ju vysvetliť tým, že aj minoritné gény sú na chromozómoch



a odovzdávajú sa z rodičov na potomstvo. Ich fenotypový prejav nie je taký jednoznačný ako u majoritných génov, ktoré podmieňujú monogénne dedičné znaky.

**Kvantitatívne znaky** sa vyjadrujú v definovaných jednotkách (napr. kg, cm a pod.). Zarádujeme tu napr. výšku, hmotnosť tela, krvný tlak, IQ a pod. Náhodnosť distribúcie genotypov v populácii a pôsobenie epigenetických faktorov spôsobujú, že u týchto znakov pozorujeme postupné prechody foriem znaku (tzv. kontinuálna distribúcia), ktorú označujeme **variabilita – premenlivosť**.

U normálnych multifaktoriálne podmienených kvantitatívnych znakov poznáme tzv. normálnu distribúciu (obr. 7-5). Výskyt znaku v populácii je charakterizovaný priemernou hodnotou a smerodajnými odchýlkami. Samotná krivka sa nazýva podľa autora ako Gausova alebo Pearsonova. U znakov s najvyššou frekvenciou výskytu hovoríme o tzv. extrémoch – napr. telesná výška u dospelých mužov pod 160 a nad 210 cm. Ale ešte stále je to len prejav fyziologickej variability znaku.



**Obrázok 7-5.** Normálna distribúcia multifaktoriálne podmieneného znaku.

Patologické hodnoty formy kvantitatívneho znaku presahujú toto rozmedzie a zvyčajne sú podmienené monogénno dedičným patologickým znakom. Takže ak má jedinec výšku do jedného metra ide o achondropláziu, naopak, ak je niekto vysoký 230 cm, je to najčastejšie dôsledok poruchy tvorby somatotropného hormónu.

**Kvalitatívne znaky** sa vyjadrujú opisom alebo porovnaním. Normálne kvalitatívne multifaktoriálne podmienené znaky tiež vykazujú istú formu variability (napr. tvar hornéj pery alebo zmeny v organizme spôsobené starnutím). Avšak, ak je forma znaku tak odlišná, že ju považujeme za patologickú ide o tzv. **prahový efekt**. Znamená to, že sa forma znaku zmenila „skokom“ na inú patologickú kvalitu. Príkladom sú palatinálne výbežky, ktoré utvárajú podnebie, ak rastú príliš pomaly, skôr ako sa podnebie uzatvorí, vrasť medzi ne jazyk, vzniká rászlep podnebia.

Formy znaku, ktoré sú prejavom variability teda považujeme za normálne a pri tomto type dedičnosti za „podprahové“. Samotná genetická predispozícia teda nepodporuje patologickú formu znaku.

Patologické formy znaku sa označujú ako „nadprahové“. Predispozícia sa môže prejavíť 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 (zúženie „vrátnika“ svalu, ktorý „dávkuje“ tráveniu zo žalúdka do dvanástnika). U mužov sa vyskytuje 5 x častejšie ako u žien. Ženy sú pred týmto ochorením chránené estrogénmi.

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. rászlep pery a podnebia, rászlep nervovej rúry, vrodené chyby srdca, vrodená luxácia bedrového kĺbu).

Ďalším typom sú tzv. „civilizačné“ choroby (ateroskleróza, esenciálna hypertenzia, niektoré typy cukrovky, schizofrénia a pod.).

Stanovenie rizika výskytu multifaktoriálne podmieneného patologického znaku alebo stanovenie pravdepodobnosti narodenia sa posunutého dieťaťa je vzhľadom na zložitý spôsob dedičnosti obtiažny. Nie je tu možné orientovať sa podľa štipných pomerov ako pri znakoch monogénne podmienených. Riziko výskytu multifaktoriálne podmieneného ochorenia sa určuje empiricky na základe skúsenosti alebo populačných štúdií. Výška rizika závisí od frekvencie daného znaku v populácii, od stupňa príbuznosti rodičov, od počtu prípadov v rodine a od závažnosti formy ochorenia. V niektorých prípadoch závisí aj od pohlavia, napr. pylorostenóza a rászlep pery a podnebia sú zriedkavejšie u žien, naopak vrodené vyklbenie bedrového kĺbu je u žien častejšie.

## Dedičnosť duševných vlastností a schopností

Medzi kvantitatívne znaky patria i duševné vlastnosti. Všeobecná inteligencia u človeka sa obvyčajne hodnotí intelligenčným kvocientom – IQ, ktorému odpovedá priemerná populačná hodnota 100. Vplyv genotypovej zložky sa predpokladá až 70 %. Rovnako tak sa predpokladá významné uplatnenie genotypu pre rôzne typy nadaní. Presvedčivým dôkazom je napr. familiárny výskyt hudobných nadaní (Mozart, Bach, Beethoven, Strauss, Weber), maliarstva (Mánes, Tizian), prírodovedného nadania a pod. Atraktivnosť otázok dedičnosti týchto znakov často vedie k podceňovaniu vplyvu prostredia na ich rozvoj. Je treba vziať do úvahy, že napr. rodinné prostredie, v ktorom deti vyrastajú výrazne ovplyvňuje (pozitívne i negatívne) prejav dedičného základu. Je preto veľmi dôležité študovať vplyv prostredia na rozvoj kvantitatívnych znakov. Ich poznanie umožňuje človeku cielene ovplyvňovať ich expresivitu, to znamená vytvárať pre rozvoj priaznivých znakov (napr. nadania) optimálne prostredie a naopak nepriaznivé vlohy v ich prejave potláčať.



## Úlohy

- 1) Vysvetlite pojmy alela, gén, lokus, vloha, genotyp, fenotyp.
- 2) Vysvetlite rozdiel medzi homozygotom a heterozygotom.
- 3) Aké sú alelové interakcie a nealelové interakcie? Čo je to pleiotopia?
- 4) Zapište aké typy gamét vytvára jedinec s genotypom AABb, AABb, Aabb, AaBb, AaBbCc, AaBBcc, AaBbCc, aaBBccDdeeff.
- 5) Napište, koľko typov gamét vytvára:
  - a) monohybrid
  - b) dihybrid
  - c) tetrahybrid
  - d) n-násobný hybrid
  - e) trihybrid
- 6) Predpokladáme, že gén B má dve alely, dominantnú – B a recesívnu – b. Zapište všetky kríženia (rodičovské genotypy), z ktorých sa môže narodiť heterozygotné dieťa. Z ktorého kríženia bude najvyššie zastúpenie heterozygotných potomkov? Z ktorého kríženia dostaneme v potomstve iba jeden genotyp? Zapište všetky kríženia, z ktorých dostaneme v potomstve iba dva genotypy.
- 7) Predpokladáme, že pravdepodobnosť narodenia chlapca = pravdepodobnosti narodenia dievčaťa = 1/2. V potomstve štyroch detí aká je pravdepodobnosť:
  - a) že sa nenarodí žiadne dievča
  - b) že sa narodí jedno dievča
  - c) že sa narodí aspoň jedno dievča
  - d) že sa narodí aspoň dve dievčatá
  - e) že bude ideálne rozdelenie pohlavia (dva chlapci a dve dievčatá)?
- 8) U človeka je farba očí výsledkom interakcie alel niekoľkých génov, ktoré determinujú tvorbu a ukládanie pigmentu v dúhovke. Zjednodušené predpokladáme, že tvorba a ukládanie pigmentu v dúhovke sú determinované jedným génom, pričom alela pre hnedú farbu očí B je dominantná nad alelou pre modrú farbu očí b.

- a) Hnedooký muž sa oženi s modrookou ženou a majú 8 hnedookých detí. Aké sú genotypy všetkých členov rodiny?
- b) Hnedooký muž, ktorého obaja rodičia boli hnedookí, sa oženi s hnedookou ženou, ktorej otec bol hnedooký a matka modrooká. Majú jedno modrooké dieťa. Aké sú genotypy všetkých členov rodiny?

9) Klasický albinizmus je spôsobený chýbaním enzýmu, ktorý je potrebný pre syntézu pigmentu melanínu. Syntéza enzýmu je podmienená dominantnou alelou, to znamená, že jedinci s genotypom C/C a C/c majú normálnu pigmentáciu a recesívni homozygoti c/c sú albini. Fenotypovo normálnym rodičom sa narodilo albinotické dieťa. S akou pravdepodobnosťou:

- a) ich ďalšie dieťa bude albinotické
- b) ich ďalšie dve deti budú albinotické
- c) sa im narodí dve deti, jedno albinotické a druhé s normálnou pigmentáciou?

10) Aké potomstvo a v akom percentuálnom zastúpení môžeme očakávať v rodine, kde žena je normálne pigmentovaná a muž je albin?

11) Žena s normálnou pigmentáciou kože a muž albin majú deväť normálne pigmentovaných detí a jedného albina. Aký je najpravdepodobnejší genotyp ženy? Ak normálne pigmentovaná žena a albinotický muž majú desať normálne pigmentovaných detí a žiadneho albina, aký je najpravdepodobnejší genotyp ženy?

12) Rodičia sú heterozygoti pre albinizmus. Predpokladáme, že majú päť detí. Aká je pravdepodobnosť, že deti budú mať nasledujúce fenotypy v uvedenom poradí: 1. dieťa = normálne, 2. dieťa = albin, 3. dieťa = normálne, 4. dieťa = albin, 5. dieťa = normálne.

- a) Aká je pravdepodobnosť, že z piatich detí tri budú s normálnou pigmentáciou a dvaja albini (v ľubovoľnom poradí)?
- b) Koľko rôznych kombinácií je možných pre tri normálne a dve albinotické deti?
- c) Aká je pravdepodobnosť, že všetkých päť detí bude normálnych?
- d) Aká je pravdepodobnosť, že aspoň jedno dieťa bude albinotické?

13) Jana má normálnu pigmentáciu kože, ale jej brat je albin a takisto manžel. Aká je pravdepodobnosť, že jej prvé dieťa bude albin? Ak jej prvé dieťa bude albin, aká je pravdepodobnosť, že druhé dieťa bude tiež albin?

14) Obaja rodičia sú prenášačmi recesívnej alely pre vrodennú hluchotu podmienenú autozómovou recesívnou. Aká je pravdepodobnosť:

- a) že prvé dieťa bude postihnuté hluchotou
- b) že ich päť detí bude zdravých
- c) že dve z piatich detí budú postihnuté hluchotou?



15) Pre zriedkavú autozómovo dominantnú chorobu je pravidlom, že dominantní homozygoti sa v potomstve nikdy nevyskytujú. Jednou z príčin môže byť tá skutočnosť, že tento genotyp je letálny v skorom období fetálneho vývinu a je eliminovaný spontánnym potratom. Predpokladáme situáciu, kde genotyp: B/B je letálny v priebehu intrauterinného vývinu, B/b prežijú, ale jedinec je postihnutý, b/b prežijú a jedinec je zdravý. Aké genotypy a v akom percentuálnom zastúpení môžeme očakávať medzi živými narodenými deťmi z kríženia B/b x B/b?

16) Zapište všetky možné genotypy jedinca pre gén, ktorý determinuje beta reťazec hemoglobínu, ak berieme do úvahy štyri alely tohto génu: Hb<sup>A</sup>, Hb<sup>S</sup>, Hb<sup>E</sup>, Hb<sup>C</sup>. Aby zápisy genotypov boli prehľadnejšie, použite na zápis len horný index každej alely (napr. A/A, A/S, S/E atď.) Koľko genotypov je homozygotných a koľko heterozygotných?

17) Zapište genotypy jedincov pre beta reťazec hemoglobínu a pravdepodobnosť ich výskytu v potomstve z nasledujúcich krížení:

- A/A x A/S
- A/C x A/S
- A/E x C/S

18) Šeroslepotu je podmienená autozómovo dominantne. Zdravý muž sa oženil s postihnutou ženou. Majú jedno zdravé a jedno postihnuté dieťa.

- Aké sú genotypy všetkých členov rodiny?
- Aká je pravdepodobnosť, že ďalšie dieťa bude zdravé?

19) Fenyketonúria (porucha metabolizmu fenylalanínu) a jedna zo zriedkavých foriem agamaglobulinémie švajčiarskeho typu (má zvyčajne za následok smrť do 6 mesiacov po narodení) sú podmienené autozómovo recesívnymi génmi. Aká je pravdepodobnosť narodenia zdravých detí v rodine, v ktorej obaja rodičia sú heterozygotní pre oba patologické gény?

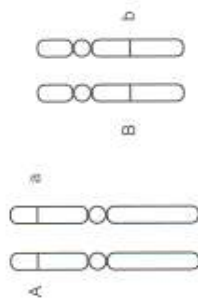
20) V rodine, kde obaja rodičia dobre počuli a jeden z nich mal hladké vlasy a druhý kučeravé sa narodil hluchý syn s hladkými vlasmi. Ich druhý syn dobre počul a mal kučeravé vlasy. Aká je pravdepodobnosť narodenia hluchého kučeravého dieťaťa v tejto rodine, ak je známe, že alela podmienajúci kučeravé vlasy je dominantná nad alelou pre hladké vlasy a hluchota je geneticky podmienená recesívnou alelou, pričom tieto gény sú lokalizované na rôznych autozómoch?

21) Zjednodušene predpokladáme, že u človeka je hnedá farba očí dominantná nad modrou a pravicťvo nad ľavicťvom.

- Modrooký pravák, ktorého otec bol ľavák, sa oženil s hnedookou ženou ľavicťkou, ktorej príbuzní boli po viac generácií všetci hnedookí. Aké deti možno očakávať v tomto manželstve?
- Hnedooký muž sa oženil s modrookou ženou. Obaja boli praváci. Ich prvé dieťa malo modré oči a bolo ľavák. Aké deti sa môžu narodiť v tomto manželstve a s akou pravdepodobnosťou?

## 8. Vázba génov

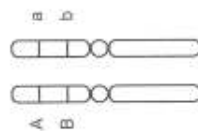
Mendelove pravidlo o nezávislej kombinácii vlôh neplatí univerzálne. Platí iba pre gény, ktoré sa nachádzajú na rôznych chromozómoch, prípadne pre gény umiestnené na tom istom chromozóme, ale v dostatočnej vzdialenosti (obr. 8-1).



Obrázok 8-1. Voľná kombinovateľnosť génov – dihybrid AaBb.

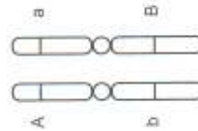
Gény sú úseky DNA lokalizované na chromozómoch. Gény umiestnené na rovnakom (na tom istom) chromozóme segregujú spoločne. Na každom páre homologických chromozómov je stabilná sada génov. Gény majú na chromozóme svoju presnú lokalizáciu (svoje lokusy). Súbor génov (lokusov) jedného chromozómového páru tvorí **vázbovú skupinu**.

Vázbu medzi dvoma génmi môžeme sledovať u dvojnásobného heterozygota (AaBb). Alely dvoch génov môžu mať na homologických chromozómoch odlišnú pozíciu. Na jednom chromozóme sa môžu nachádzať dominantné alely oboch génov (A a B) a na párovom homologickom chromozóme recesívne alely (a a b). Toto usporiadanie alel sa zapisuje výrazom **AB/ab**. Nazýva sa **vázbová fáza cis** (starší názov coupling, obr. 8-2).



Obrázok 8-2. Vázbová fáza cis – dihybrid AB/ab.

Druhá možnosť sa nazýva **vázbová fáza trans** (repulsion) a genotyp dvojnásobného heterozygota zapisujeme **Ab/aB** (obr. 8-3). Znamená umiestnenie dominantnej alely jedného génu a recesívnej alely druhého génu na tom istom chromozóme.



Obrázok 8-3. Vázbová fáza trans – dihybrid Ab/aB.



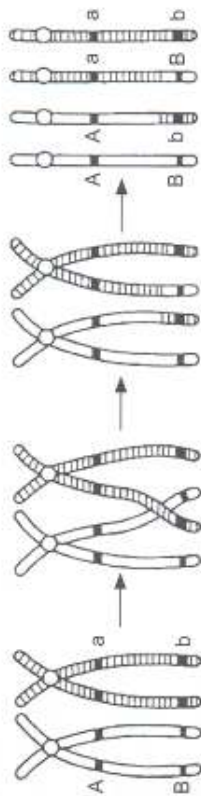
Pokiaľ sú gény jednej väzbovej skupiny umiestnené na chromozóme do určitej vzdialenosti, dedia sa spoločne častejšie ako to zodpovedá náhodnej segregácii génov do gamét. Pre tieto gény neplatí Mendelov zákon o náhodnej segregácii génov do gamét. Pokiaľ by nedochádzalo v profáze I. meiotického delenia ku crossing-overu, dedili by sa gény jednej väzbovej skupiny vždy spoločne.

### 8.1. Crossing-over a väzba génov

Crossing-over medzi nesesterskými chromatídami homologických chromozómov má za následok výmenu genetického materiálu. Výsledkom sú rekombinované úseky chromozómov. V dôsledku crossing-overu môže na chromozóme vzniknúť iná kombinácia alel, než aká bola na chromozóme rodičov. V dôsledku rekombinácií môže mať ďalšia generácia inú kombináciu znakov (iný fenotyp) než jeho rodičia. Pravdepodobnosť vzniku crossing-overu medzi dvoma gémi závisí od ich vzdialenosti. Čím je väčšia vzdialenosť, tým je väčšia pravdepodobnosť, že v tomto úseku vznikne chiazma, a teda crossing-over. Percento rekombinácií však nie je lineárnou funkciou vzdialenosti, lebo čím väčšia je vzdialenosť, tým častejšie vzniknú v tomto úseku súčasne dve chiazmy, a vtedy rekombinanty nevzniknú. Lokusy, ktoré sú na jednom chromozóme, ale sú od seba veľmi vzdialené, správajú sa ako keby neboli vo väzbe.

#### Rekombinácie

Frekvencia rekombinácií je meradlom pre silu väzby. Testovacie kríženie umožňuje stanoviť relatívnu vzdialenosť dvoch génov matematickým vyhodnotením zastúpenia fenotypových tried (obr. 8-4).



Obrázok 8-4. Rekombinácia počas meiózy u dvojnásobného heterozygota AB/ab

Testovacie kríženie (backcross) je kríženie dvojnásobného heterozygota (AaBb) s dvojnásobným recesívnym homozygotom (aabb). Pomocou testovacieho kríženia sa mapová vzdialenosť (sila väzby = p) vypočíta delením počtu rekombinantov celkovým počtom potomkov násobeným kráť sto.

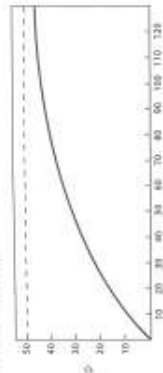
$$p = \frac{\text{súčet rekombinantov}}{\text{celkový počet jedincov}} \times 100$$

### 8.2. Jednotka mapovej vzdialenosti

Jednotkou mapovej vzdialenosti medzi lokusmi je centimorgan (cM), nazvaný podľa objaviteľa väzby Thomasa Morgana (1911), nositeľa Nobelovej ceny. Jedna mapová jednotka, jeden centimorgan (1cM), zodpovedá jednému percentu crossing-overov resp. jednému percentu rekombinácií medzi nesesterskými chromatídami pri meióze.

Pre lokusy vzdialené menej ako 20 cM je mapová vzdialenosť približne totožná s frekvenciou rekombinácií, pre vzdialenejšie lokusy je však mapová vzdialenosť väčšia ako

rekombinácia frekvencia (obr. 8-5). Závislosť mapovej vzdialenosti na  $\theta$  je vždy exponenciálna, pretože počet dvojitých a viacnásobných crossing-overov vzrastá so stupňujúcou mapovou vzdialenosťou.



Obrázok 8-5. Grafické znázornenie vzťahu medzi frekvenciou rekombinantov (p) a mapovou vzdialenosťou ( $\theta$ ).

Mapová vzdialenosť medzi terminálnymi bodmi určitého chromozómu sa nazýva mapová dĺžka chromozómu. Nepriamymi metódami, hlavne štúdiom distribúcií počtu chiazem v meiotických chromozómech sa zistilo, že mapová dĺžka najkratšieho ľudského chromozómu – č. 21 je u mužov vyše 50 cM a najdlhšieho chromozómu – č. 1 približne 200 cM, u žien sú mapové dĺžky cca o 90 % väčšie. Priemerná mapová dĺžka celého ľudského genómu sa odhaduje na 3000 cM. Keďže celý genóm sa skladá z  $3 \cdot 10^9$  párov nukleotidov, jednému centimorganu zodpovedá v priemere  $10^6$  bp, t.j. 1 000 kilobáz.

Morgan formuloval dve pravidlá, ktoré sa niekedy označujú ako Morganove zákony a vyjadrujú princípy génovej väzby:

- 1) Gény sú na chromozóme usporiadané lineárne za sebou.
- 2) Je toľko väzbových skupín, koľko je chromozómov v jednej haploidnej sade.

Medzi gémi, ktoré sú od seba vzdialené, nastáva pravidelne crossing-over. Dôsledkom toho je 50 % pravdepodobnosť vzniku rekombinantov (mapová vzdialenosť 50 cM). V takom prípade dvojnásobný heterozygot vytvára štyri typy gamét (AB, Ab, aB, ab) s rovnakou 25 % pravdepodobnosťou. Segregácia génov do gamét je nezávislá.

Pri kratšej vzdialenosti génov sa zmenšuje pravdepodobnosť vzniku crossing-overu. V dôsledku toho počet rekombinantov klesá. Frekvencia rekombinácií sa pohybuje medzi 0 a 50 percentami v závislosti od vzdialenosti lokusov. Nulové zastúpenie rekombinantov znamená, že ide o úplnú väzbu génov, to znamená, že medzi gémi nevzniká crossing-over. Dvojnásobný heterozygot tvorí len dva typy gamét so zhodnou väzbovou fázou na homologických chromozómech ako u jeho rodičov.

Pri neúplnej väzbe génov sa frekvencia rekombinantov pohybuje medzi 0 a 50 %. Dvojnásobný heterozygot vytvára štyri typy gamét, ich zastúpenie sa však odlišuje od pomeru 1:1:1:1, ktorý je typický pre voľnú kombinovateľnosť vlôh. Častejšie sú zastúpené rodičovské kombinácie alel.

V tabuľkách je znázornené testovacie kríženie (backcross – Bc) vo väzbovej fáze cis (AB/ab x ab/ab) pri mapovej vzdialenosti 0 cM, 10 cM a 50 cM. Číselné hodnoty uvedené pod symbolmi gamét sú ich frekvencie pre príslušné mapové vzdialenosti. Genotyp je zapísaný v zlomku vzhľadom na postavenie alel na homologických chromozómech.

#### Mapová vzdialenosť 0 cM

Heterozygot	
gamety	AB
ab	(0,5)
Recesívny homozygot	AB/ab
ab	ab/ab
(1,0)	

Fenotypy: znak A a B má 50 % jedincov, 50 % jedincov tento znak nemá. Nevznikajú rekombinácie.



### Mapová vzdialenosť 10 cM

		Heterozygot	
Gamety	AB (0,45)	Ab (0,45)	aB (0,05)
Recesívny homozygot	ab (1,0)	Ab/ab	aB/ab

Fenotypy: znak A aj B má 45 % jedincov, znak A má 5 % jedincov, znak B má 5 % jedincov, znak A a B nemá 45 % jedincov. Celkový počet rekombinantov je 10 %.

### Mapová vzdialenosť 50 cM

		Heterozygot	
Gamety	AB (0,25)	Ab (0,25)	aB (0,25)
Recesívny homozygot	ab (1,0)	Ab/ab	aB/ab

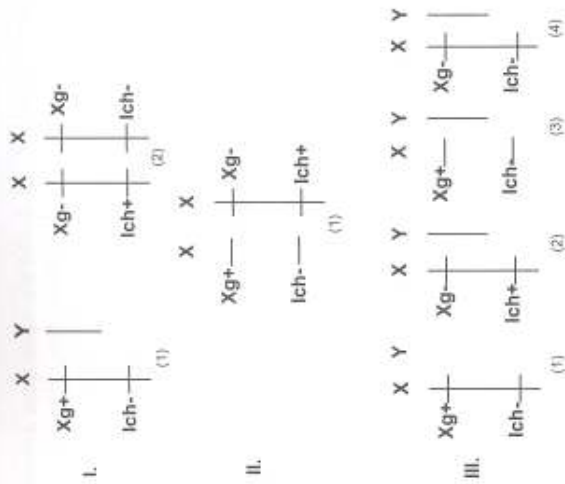
Fenotypy: znak A aj B má 25 % jedincov, znak A má 25 % jedincov, znak B má 25 % jedincov a znak A aj B nemá 25 % jedincov.

## 8.3. Väzba génov a diagnostika

Stanovenie väzbových skupín na homologických chromozómoch má význam v genetickom poradenstve. Spoločná segregácia dvoch lokusov väzbovej skupiny je v klinickej genetike dôležitý diagnostický parameter. Ak poznáme lokalizáciu jedného génu na chromozóme, môžeme tento gén využiť na stanovenie lokalizácie ďalších génov, ktoré patria do jednej väzbovej skupiny. Gén, pomocou ktorého získavame informácie o polohe a vzdialenosti iného génu, označujeme ako **marker gén**. Pri posudzovaní prenosu mutovanej alely do ďalšej generácie sa využíva prítomnosť marker génu, ktorý je na chromozóme umiestnený v blízkosti génu, ktorého mutovaná alela podmieňuje dedičnú chorobu. Ako marker gén sa vyberá polymorfny a dobre dokazateľný gén, napríklad gén, ktorý kóduje krvnoskupinový antigén. Čím je mapová vzdialenosť medzi lokusom marker génu a lokusom sledovaného génu menšia, tým je stanovenie genotypu presnejšie. Presnosť stanovenia genotypu ovplyvňuje vznik rekombinantov.

Túto situáciu môžeme demonštrovať na segregácii alel krvnej skupiny Xg (monogénová dedičnosť) a Ich génu, ktorý podmieňuje kožné ochorenie *ichthyosis vulgaris*. Pre toto ochorenie je charakteristická suchá, šupinatá a tenká pokožka. Tieto gény sa nachádzajú blízko seba na X chromozóme (obr. 8-6).

Alela *Ich*<sup>+</sup> je dominantná, alela *Ich* je recesívna. *Ich* je mutovaná forma génu, ktorá podmieňuje ochorenie *ichthyosis vulgaris*, ktoré sa dá diagnostikovať kožným vyšetrením. Pozitívitu alebo negatívnitu krvnej skupiny Xg môžeme určiť imunologickým testom.



Obrazok 8-6. Segregácia alel krvnej skupiny Xg a Ich génu.

Muž I/1 je Xg pozitívny a postihnutý ichtyózou. To znamená, že spolu s mutovanou alelou *Ich* segreguje dominantná alela Xg<sup>+</sup>. Jeho žena je Xg negatívna a nie je postihnutá. Ich dcéra, žena II/1, je zdravá a Xg pozitívna. Je prenášačkou mutovanej alely *Ich*<sup>+</sup>, ktorú zdedila od otca. Jej synovia III/1 a III/3 sú Xg pozitívny a postihnutí. Syn III/2 je Xg negatívny a nie je postihnutý ichtyózou. Podľa fenotypov synov (1), (2) a (3) môžeme určiť väzbovú fázu alel u matky II/1 a predpokladať genotyp jej matky I/2. Xg pozitívita je markerom pre ochorenie ichtyózy. Dedi sa spoločne s mutovanou alelou *Ich*. U syna III/4 nastala v dôsledku crossing-overu rekombinácia segmentov chromozómov. U muža v I. generácii, ženy v II. generácii, a ich synov (1), (2) a (3) boli alely génov Xg a Ich vo fáze trans. K zmene pozície alel došlo v profáze I. meiotického delenia u ženy II/1 v dôsledku crossing-overu. Pre gény umiestnené na X chromozóme platí, že rekombinácie vznikajú len u žien. Pre diagnózu, ktorá je založená na väzbe sledovaného génu s marker génom, je potrebné z rodokmeňovej schémy zistiť väzbovú fázu medzi génmi a ich mapovú vzdialenosť.

### Mapovanie a sekvenovanie genómu

Zisťovanie miesta uloženia génov (lokusov) na chromozómoch nazývame mapovanie a jeho výsledok potom **chromozómová mapa**. Na chromozómoch tvorených cirkulárnou DNA, t. j. chromozómoch prokaryotických, sú chromozómové mapy kruhové, na chromozómoch eukaryotických sú lineárne. **Mapovanie** znamená určenie miesta genových lokusov na chromozómoch. **Sekvenovanie** znamená určenie poradia (sekvencie) párov nukleotidových báz. Mapovanie a stanovenie poradia nukleotidových báz má bezprostredný význam pre medicínu. Poznatky o umiestnení génov na chromozóme sú nevyhnutné pre DNA diagnostiku. Sekvenovanie umožňuje určiť štruktúru génu a identifikovať prípadné mutácie v danom géne.

**Fyzická (skutočná) mapa** udáva v absolútnych hodnotách pozíciu genových lokusov, ich vzdialenosť je vyjadrená počtom párov báz.

**Genetická mapa** udáva relatívnu pozíciu genového lokusu podľa frekvencie rekombinácií. Vzdialenosť génov sa udávajú v rekombinačných jednotkách - centimorganoch. Pri známej veľkosti genómu človeka a pri odhadovanej „dĺžke“ tohto



genómu 3 000 cM, môžeme vypočítať, že 1 cM sa v priemere rovná asi  $10^6$  párov báz, niekoľko haploidný genóm predstavuje  $3 \times 10^9$  párov báz. Priemerná dĺžka chromozómu človeka je asi 120 cM. Vzťah medzi genetickou mapovou jednotkou a skutočnou vzdialenosťou lokusov (fyzickou dĺžkou) nie je lineárny. Napríklad v oocytoch sa rekombinácie vyskytujú asi 2x častejšie ako v spermatoocytoch a preto je u žien rekombinačná mapa o 40 % dlhšia ako u mužov. Genetická mapa schematicky znázorňuje lokalizáciu jednotlivých génov na chromozóme.

Pre DNA diagnostiku je významná aj **reštrikčná mapa**. Reštrikčná mapa je mapa reštrikčných miest pre jednu alebo viacej reštrikčných endonukleáz na určitej DNA molekule.

V roku 1986 vznikol medzinárodný projekt na identifikáciu ľudského genómu. Jeho cieľom je zostaviť ako fyzické, tak aj genetické mapy všetkých 22 autozómov a heterochromozómov. Má umožniť identifikáciu génov a ich lokalizáciu. Jedným z vedeckých programov zaoberajúcich sa touto problematikou je projekt HUGO (Human Genome Organization).

#### Príklady na úplnú väzbu génov u človeka:

chromozóm **6p** – 6 génov – HLA systém – A, B, C, DP, DQ, DR  
 chromozóm **1p** – 3 gény – Rh systém – C, D, E  
 chromozóm **4q** – 2 gény – MN a Ss krvný systém  
 chromozóm **6p** – 4 gény – zložky komplexu – Bf, C2, C4A, C4B  
 chromozóm **1p21** – 2 gény – pankreatická amyláza a slinná amyláza

#### Príklady na neúplnú väzbu génov u človeka:

eliptocytóza – Rh systém, 3 cM (1p)  
 Lutheran – Sekretor, 10 cM (č.19)  
 ABO systém – syndróm necht-jabléko, 10 cM (9q)  
 hemofília A – farbosleposť, 6 cM (Xq)  
 Rh systém – Duffy krvnoskupinový systém (1p – 1q)  
 Rh systém – Scianna systém, 13 cM (1p)  
 hemofília A – daltonizmus (deuteroanopia) – 3 cM  
 hemofília A – daltonizmus (protanopia) – 6 cM  
 (protan a deutan sú 2 gény, ktoré kontrolujú tvorbu proteínu opsín, ktorý pohlcuje svetlo jeden v červenej oblasti a druhý v zelenej oblasti spektra)

#### Tabuľka 8-1. Príklady na lokalizáciu génov u človeka

Chromozóm č.	Gén
1	slinná amyláza (AMY 1), 1p21 pankreatická amyláza (AMY 2), 1p21 krvnoskupinový systém Rh, 1p32-36 p36.2 – p34 krvnoskupinový systém Duffy (Fy), 1q12-21 krvnoskupinový systém Scianna, p36.2 – p22.1 eliptocytóza, p36.2 – p34
2	krvnoskupinový systém Kidd (Jk), 2q interferón typ 1
3	somatostatín retinitis pigmentosa (AD), niektoré rodiny 3q21-24

4	krvnoskupinový systém MN, Ss, q28-31 fibrinogén, q31 alkohol dehydrogenáza alfa fetoprotein dentinogenesis imperfecta (AD) Huntingtonova chorea (AD), p16 polypóza hrubého čreva (AD), familiárny výskyt, q21 – 22 interferón typ 2
6	HLA systém (5 génov), p21 – 3 prolaktín
7	cystická fibróza (AR), q31 – 32 trypsín, q32 – qter
8	koagulačný faktor VII, q34
9	krvnoskupinový systém ABO, q34 nail-patella syndróm galaktózmia, 9p11
11	inzulín, p15 kosáčkovitá anémia hemoglobín, beta reťazec, p15 pepsinogén A, q13 protrombín (koagulačný faktor II) fenylalanín hydroxyláza (PKU, fenylketonúria) retinoblastóm, q14
15	Marfanov syndróm (AD), 15q21 Tay-Sachsova choroba (AR) – chýba hexozaminidáza A, q22-25
16	polycystické obličky (AD), p13 hemoglobín, alfa reťazec
17	neurofibromatóza, typ 1 (AD), q11
19	krvnoskupinový systém Lewis krvnoskupinový systém Lutheran Sekretor
22	myotonická dystrofia (AD), 19q H antigén – Bombaj fenotyp (hh) neurofibromatóza, typ 2, q rameno krvná skupina P
Xp	krvnoskupinový systém Xg Duchennova muskulárna dystrofia, Xp21 Beckerova muskulárna dystrofia ichtyóza okulárny albinizmus retinitis pigmentosa, Xp11, Xp21* hereditárna hypofosfatemická rachitída (XD), Xp22
Xq	hemofília A, Xq28 hemofília B, Xq28 červeno-zelená farbosleposť, Xq28 Leschov-Nyhanov syndróm, Xq27 Hunterov syndróm, Xq27 fragilný X-syndróm, Xq27 favizmus – chýbanie G6PD
Y	identifikovaných 13 génov SRY – kóduje testis-determinujúci faktor, Yp YRRM – regulátor spermatogenézy, Yq11 SMCY – kóduje antigén H-Y

AD = autozómovo dominantný znak, AR = autozómovo recesívny znak, \* dva lokusy,  
 XD = X viazaná dominantná dedičnosť



## Úlohy

1. Uveďte spôsob, akým dokážete, že dva alelové páry A/a a B/b sú:
  - a) voľne kombinovateľné (AaBb)
  - b) vo väzbe úplnej (AB/ab, Ab/aB)
  - c) vo väzbe neúplnej (AB/ab, Ab/aB)
2. Urobte kríženie typu AaBb x aabb za predpokladu, že oba alelové páry sú:
  - a) v polohe cis neúplne viazané,  $p = 5 \text{ cM}$
  - b) v polohe trans neúplne viazané,  $p = 5 \text{ cM}$ Aké bude zastúpenie genotypov v potomstve z oboch krížení?
3. Ak jedinec vznikol z kríženia rodičov Ab/Ab x aB/aB a je späťne krížený s dvojnásobným recesívnym homozygotom, ako štiepi potomstvo pozostávajúce z 1 850 jedincov, ak je sila väzby medzi génmi A a B 40 % rekombinácií?
4. U človeka sa lokus pre Rh faktor nachádza na chromozóme č. 1 a je vo väzbe s lokusom determinujúcim tvar erytrocytov a je od neho vo vzdialenosti 3 cM. Rh pozitívna a eliptycózna (erytrocyty sú elipsovitého tvaru) sú podmienené autozómovo dominantne. Jeden z manželov je heterozygotom pre obidva gény, pričom Rh<sup>+</sup> faktor zdedil od jedného svojho rodiča a eliptycózou od druhého. Druhý z manželov je Rh<sup>-</sup> a má normálny tvar erytrocytov.  
Zistite percentuálne zastúpenie pravdepodobných genotypov a fenotypov u detí v tejto rodine.
5. Muž s eliptycózou, ktorého matka mala normálny tvar erytrocytov a bola homozygotná v alelickom páre pre Rh faktor a ktorého otec bol Rh<sup>-</sup> a heterozygotný v alelickom páre pre eliptycózou, sa oženil so zdravou Rh<sup>+</sup> ženou.  
Aká je pravdepodobnosť, že ich prvé dieťa bude Rh<sup>+</sup> s eliptycózou?  
Ak prvé dieťa je Rh pozitívne, aká je pravdepodobnosť, že bude tiež postihnuté eliptycózou?
6. Katarakta (šedý zákal) a polydaktylia (viacprstosť) sú u človeka podmienené dominantnými autozómovými génmi, ktoré sú v úplnej väzbe.  
Žena získala alelu pre kataraktu od svojej matky a alelu pre polydaktyliu od otca. Jej manžel je zdravý. Aké potomstvo môžeme očakávať v tejto rodine?  
Aké potomstvo môžeme očakávať v rodine, v ktorej muž je zdravý a žena je heterozygotom pre obidva gény, pričom je známe, že jej matka bola postihnutá obidvoma anomáliami a otec bol zdravý.

Aké potomstvo môžeme očakávať v rodine, v ktorej rodičia sú heterozygoti pre obidva znaky a pritom je známe, že matky obidvoch manželov boli postihnuté kataraktou a otcovia polydaktyliou?

7. Syndróm deformovaných nechťov a pately (syndróm unguis-patella, nechť-jablčko) je podmienený autozómovo dominantne (N). Ide o zriedkavú AD dedičnú malformáciu charakterizovanú variabilným stupňom dystrofie nechťov, chýbaním alebo redukciou pately, inými dyspláziami kostí a príležitostne nefropatiou. Tento gén sa nachádza vo vzdialenosti 10 cM od ABO lokusu na chromozóme č. 9. Muž s uvedeným syndrómom a krvnou skupinou AB uzavrel manželstvo so zdravou ženou (n/n) s krvnou skupinou 0. Ich tri deti sú zdravé a majú krvnú skupinu A, jedno dieťa s krvnou skupinou B je postihnuté.
  - a) Určte väzbovú fázu u muža – dvojnásobného heterozygota.
  - b) Žena je opäť tehotná, pričom podľa červených krviniek zistili u plodu krvnú skupinu A. Aká je pravdepodobnosť, že bude bez tejto malformácie (predpokladajme tú istú väzbovú fázu ako v prípade po a)?
  - c) Aká je pravdepodobnosť, že bude dieťa bez malformácie, ak by malo krvnú skupinu B?
8. Zo späťného kríženia potkanov s genotypom Cc Hb<sub>A</sub>Hb<sub>B</sub> x ccHb<sub>B</sub>Hb<sub>B</sub> sme získali 504 potomkov. Z nich bolo:
  - 24 jedincov pigmentovaných s hemoglobínom typu A a B,
  - 228 jedincov pigmentovaných s hemoglobínom typu B,
  - 224 albinov s hemoglobínom typu A a B,
  - 28 albinov s hemoglobínom typu B.Zistite, či oba alelové páry C/c a Hb<sub>A</sub>/Hb<sub>B</sub> patria do jednej alebo dvoch väzbových skupín. V prípade väzby genov zapíšte väzbovú fázu u rodičov a vypočítajte silu väzby oboch genov (C – dominantná alela pre pigmentovanú srst', c – recesívna alela pre albinizmus, Hb<sub>A</sub> – alela pre hemoglobín typu A, ktorá je kodominantná voči alele Hb<sub>B</sub> pre hemoglobín typu B).
9. Klasická hemofília a daltonizmus sú geneticky determinované recesívnymi alelami, ktoré sú lokalizované na chromozóme X vo vzdialenosti 3 cm.
  - a) Žena, ktorej otec bol súčasne postihnutý hemofíliou a daltonizmom a matka bola zdravá, vydala sa za zdravého muža. Zistite pravdepodobné genotypy a fenotypy u detí z tohto manželstva.
  - b) Žena, ktorej matka bola postihnutá daltonizmom a otec hemofíliou, vstupuje do manželstva s mužom, ktorý je postihnutý obidvoma anomáliami. Zistite pravdepodobnosť narodenia detí s hemofíliou aj daltonizmom.
10. Predpokladajme dva gény A/a a B/b viazané na X chromozóm. Peter mal obidva recesívne znaky a všetky jeho dcéry mali obidva dominantné znaky. Dcéry mali spolu 40 synov (Petrovi vnuci); 15 z nich mali obidva recesívne znaky, 17 obidva dominantné



znaky a 8 z nich mali prvý dominantný a druhý recesívny, resp. naopak. Aký je genotyp Petrových dcér? V akej vzdialenosti na X chromozóme sa nachádzajú tieto dva gény?

11. Aké typy gamét a v akom zastúpení bude vytvárať jedinec, ktorý vznikol z vajíčka obsahujúceho alely A a B a spermie obsahujúcej a b alely, ak tieto dva lokusy sa nachádzajú:
  - a) na odlišných chromozómoch (nehomologických)
  - b) na tom istom chromozóme v tesnej blízkosti jeden pri druhom
  - c) na tom istom chromozóme vo vzdialenosti 8 mapových jednotiek

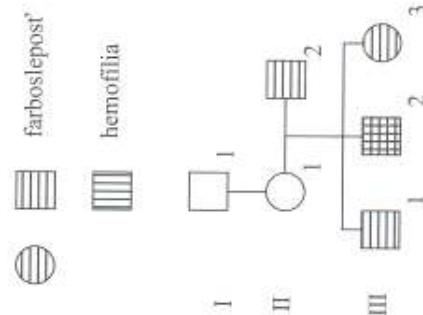
Aké je percentuálne zastúpenie rekombinácií v každom jednom prípade?

12. Aké typy gamét a v akom zastúpení môže vytvárať dvojnásobný heterozygot v cis fáze (coupling) AB/ab, ak lokusy A a B sú od seba vzdialené 80 mapových jednotiek?

13. Žena s normálnym farbicom je heterozygotom vo fáze cis pre X-viazané gény pre deuteranomáliu (deuteranopia, G/g) a protanomáliu (protanopia, R/r). Lokusy sú od seba vzdialené 6 mapových jednotiek. Aká je pravdepodobnosť, že jej synovia budú mať normálny farbic? Riešte túto situáciu pre prípad, že žena je dvojnásobný heterozygot vo fáze trans (repulsion).

14. Zapište genotypy jedincov uvedených v rodokmeni.

- a) Ktorý jedinec je rekombinantom?
- b) Aká je pravdepodobnosť pre jedince III-3, že má genotypy H/H, H/h a h/h pre hemofíliu?
- c) Predpokladajme, že gén pre červeno-zelenú farbosleposť a gén pre hemofíliu A sú od seba vzdialené 3 mapové jednotky.



## 9. Dedičnosť a pohlavie

Organizmy, ktoré sa rozmnožujú pohlavne, majú pohlavné orgány diferencované na samčie a samičie. Mnohobunkové organizmy, ktoré produkujú buď samčie alebo samičie pohlavné bunky, sa nazývajú **gonochoristi**. Organizmy, ktorých jedinci produkujú súčasne samčie i samičie pohlavné bunky, sa nazývajú **hermafroditické**. U živočíchov sa diferencujú samčie a samičie pohlavné orgány už v priebehu embryonálneho vývoja a predstavujú **primárne pohlavné znaky**. Všetky ostatné morfológické a funkčné rozdiely medzi jedincami oboch pohlaví u gonochoristov sú **sekundárne pohlavné znaky**. Pohlavie väčšiny gonochoristických živočíchov je určené chromozómami a existujú štyri možnosti tohto určenia:

### 1. XX/XY

U cicavcov vrátane človeka a mnohých ďalších živočíchov určujú pohlavie kombinácie pohlavných chromozómov X a Y (heterochromozómy, gonozómy) tak, že *heterogametické pohlavie je samčie (XY) a homogametické (XX) samičie*. Tento typ determinácie pohlavia sa označuje ako **typ vtáči** alebo typ *Abraaxas*.

### 2. ZW

U vtákov, motýľov, niektorých rýb, obojživelníkov a plazov je tomu naopak. *Homogametické pohlavie je samčie (ZZ) a heterogametické pohlavie je samičie (ZW)*. Tento typ determinácie pohlavia sa označuje ako **typ vtáči** alebo typ *Abraaxas*.

### 3. XX/X0

U niektorých druhov rovnokridleho hmyzu a ploštic je systém X0, kde konštitúcia *X0 určuje samčie pohlavie a XX samičie pohlavie*.

### 4. Haplodiploidia

Ďalším typom je určenie pohlavia *početom chromozómov*, samičky sa vyvíjajú z oplodnených vajíčok a sú diploidné, kým samčekovia vznikajú partenogeneticky (z neoploďneného vajíčka) a sú haploidní. Tento typ, kde sa pohlavný chromozóm Y nevyskytuje, je u niektorých skupín sociálneho hmyzu.

Pohlavie môže ovplyvňovať dedičnosť rôznymi spôsobmi. Preto rozoznávame:

### 1. dedičnosť viazanú na pohlavie

je determinovaná génmi, ktoré sa nachádzajú na pohlavných chromozómoch. Možeme ju rozdeliť na:

a) *dedičnosť úplne viazanú na pohlavie* – platí pre gény, ktoré sú lokalizované na heterologických úsekoch pohlavných chromozómov X a Y (alozóm). Tieto gény nemôžu byť vzájomne rekombinované a vykazujú úplnú väzbu. Znaky, ktoré podmieňujú sa nazývajú znaky na pohlavie úplne viazané, pričom rozoznávame znaky úplne viazané na chromozóm X a znaky úplne viazané na chromozóm Y.

b) *dedičnosť neúplne viazanú na pohlavie* – dedičnosť je determinovaná génmi, ktoré sa nachádzajú na krátkych homologických úsekoch X a Y chromozómu, niekedy označovaných aj ako pseudautosomálne oblasti. Gény týchto oblastí vytvárajú počas meiózy synapsie, preto sa môžu navzájom rekombinovať. Zároveň bolo zistené, že tieto gény nepodliehajú X-inaktivácii. Príkladom takto dedeného génu je gén SHOX (Short stature homeobox gene), ktorý sa podieľa na regulácii vývinu a ktorý, keď je mutovaný alebo prítomný len v jednej kópii, spôsobuje nízky vzrast.

### 2. dedičnosť pohlavím ovládanú a ovplyvnenú

je determinovaná génmi, ktoré sa nachádzajú na autozómoch.

### 3. mitochondriálnu dedičnosť

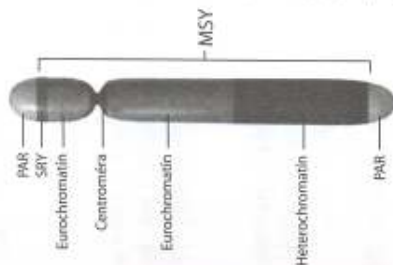




## 9.1. Dedičnosť viazaná na pohlavie

Gény lokalizované na pohlavných chromozómoch nesegregujú v rodokmeňoch rovnomerne medzi mužmi a ženami. Gény „viazané na pohlavie“ môžu byť viazané na chromozóm X alebo na chromozóm Y.

### 9.1.1. Y-chromozóm



Ludský pohlavný chromozóm Y na rozdiel od X chromozómu bol dlhý čas veľkou neznámou. Súčasná analýza odhalila množstvo génov a regiónov s potenciálnou genetickou funkciou. Na obidvoch koncoch Y chromozómu sa nachádzajú tzv. **pseudoautosomálne regióny (PARs)**, ktoré vykazujú homológiu s oblasťami na X chromozóme. Tieto oblasti vytvárajú synapsie a rekombinujú sa počas meiózy. Zvyšných 95% chromozómu Y nevytvára synapsie a nerekombinuje sa, preto táto časť bola pomenovaná ako **nerkombinujúci sa región Y chromozómu (NRY)**. V súčasnosti je táto časť nazývaná **MSY** ako **male-specific region of the Y**. Aj v tejto oblasti sa nachádzajú niektoré gény vykazujúce homológiu s génmi na chromozóme X. Tesne pod PAR oblasťou krátko ramienka Y chromozómu sa nachádza **oblasť determinujúca pohlavie** označovaná ako **SRY** (sex determining region Y). Produkt tejto oblasti bol pomenovaný ako **testes determinujúci faktor (TDF)**.

Schopnosť dnešných molekulovo-biologických metód identifikovať prítomnosť alebo absenciu určitých sekvencií DNA v raritných prípadoch, keď genotyp jedince nesúhlasí s prejavom pohlavných znakov, potvrdila už spomínanú úlohu SRY oblasti. Napr. u mužov s dvoma X chromozómami a žiadnym Y chromozómom, je často pozorovaná translokácia časti Y chromozómu obsahujúca SRY oblasť na X chromozóm. Tiež boli popísané prípady žien, ktorých genotyp bol XY. V týchto prípadoch bola zistená delícia regiónu SRY.

Pod záštitou HUGO projektu sa Davidovi Pageovi a jeho kolegom podarilo v roku 2003 osekvenovať a popísať celú oblasť MSY. Zistili, že táto oblasť má 23 miliónov bázových párov a je možné ju rozdeliť do troch oblastí (tab. 9-1)

Tabuľka 9-1. Stručná charakteristika MSY oblasti.

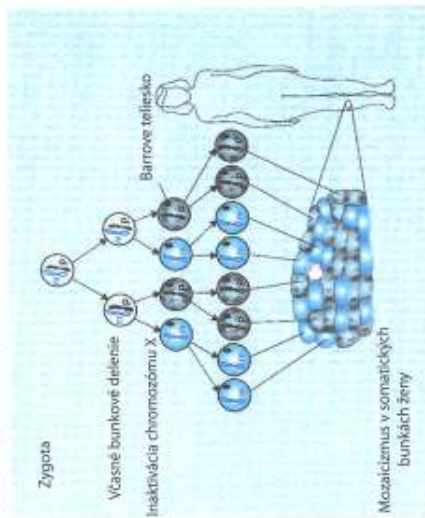
Oblasť	% z MSY	Počet génov	Poznámka
X-transponovaná	15	2	99% identita s regiónom Xq21
X-degeneratívna	20	27, funkčných 14	Okrem SRY sú gény exprimované vo všetkých tkanivách
Amplikónová (Y-jedinečná)	65	9 génových rodín	Produkty ovplyvňujú rozvoj a funkciu pohlavných orgánov a fertilitu mužov

Gény viazané na Y chromozóm v heterologickej časti sa vyznačujú **holandrickou dedičnosťou**. To znamená, že znak prechádza z generácie na generáciu výlučne *po mužskej línii*, od postihnutého otca na všetkých synov, no nie na dcéry. Príkladom holandrickej dedičnosti je napr. ochlopenie ušného boltca alebo niektorých typov azoospermii (úplná neprítomnosť spermií v ejakuláte).

### 9.1.2. X-viazaná dedičnosť

Žena môže byť vo vzťahu ku génom viazaným na chromozóm X homozygotná alebo heterozygotná (prenášačka). Medzi autozómovou a X-viazanou dedičnosťou je dôležitý rozdiel. Pri autozómových alelách sú obidve alely páru geneticky aktívne, ale **u ženy je geneticky aktívny len jeden chromozóm X** z páru pohlavných chromozómov. Druhý X chromozóm sa v jadre somatických buniek 15.-16. deň po oplodnení spiralizuje (vytvára X-chromatín) a väčšina jeho génov je inaktivovaná. Po zafarbení ho vidíme ako pohlavný chromatín (X-chromatín, Barrovo teliesko) v interfázovej bunke (obr. 9-1). Takto sa kompenzuje nerovnováha v počte X chromozómov u muža a ženy.

Teda u ženy aj u muža je geneticky aktívny len jeden chromozóm X. U heterozygotnej ženy je vecou náhody, či je v danej bunke funkčný chromozóm X od otca alebo od matky resp. chromozóm nesúci patologickú alelu alebo alelu normálnu. Ak je žena heterozygotná pre mutovaný X-viazaný gén, približne polovica jej buniek má ako funkčnú normálnu alelu a polovica abnormálnu alelu, ale tento pomer nemusí byť zachovaný, preto sú prejavy **znakov viazaných na pohlavný chromozóm X u prenášačiek variabilné**.



Obrázok 9-1. Proces inaktivácie X-chromozómu.

Maternále (m) aj paternálne (p) X-chromozómy sú aktívne v skorých štádiách embryogenézy. Inaktivácia jedného z X-chromozómov spôsobí, že v bunke je aktívny len jeden X-chromozóm, buď maternálny alebo paternálny.

Muž je vo vzťahu ku génom viazaným na chromozóm X hemizygot. **Hemizygot** – je diploidný jedinec, ktorý nemá párovú alelu určitého génu. Ak sa gény nachádzajú na pohlavných chromozómoch, musíme brať do úvahy rozdiely medzi homogametickým pohlavím (ženy – XX) a pohlavím heterogametickým (muži – XY). Otec odovzdáva X chromozóm všetkým svojim deťom, Y chromozómom synom. Matka odovzdáva X chromozóm tak synom ako aj deťom s 50% pravdepodobnosťou pre každý X chromozóm.

Keďže ženy majú pár chromozómov X a muži iba jeden, sú možné tri druhy genotypov u žien a len dva u mužov.

Muži	Ženy
$X_H Y$	$X_H X_H$
$X_h Y$	$X_H X_h$
	$X_h X_h$



### 9.1.2.1. X-viazaná recesívna dedičnosť

X-viazané recesívne choroby sú prakticky obmedzené výlučne na mužov, kým u žien sa vyskytujú len veľmi zriedkavo, ak sa vôbec zjavia. X-viazaný recesívny znak je vyjadrený u všetkých mužov, ktorí majú tento gén (prejavuje sa pseudodominantný efekt alely), zato u žien je to tak, len ak sú homozygotné. Ženy sú zvyčajne zdravé prenášačky X-viazaných recesívnych ochorení, postihnuté sú len zriedkavo. **Pseudodominancia** – je fenotypový prejav recesívnej alely spôsobený neprítomnosťou párovej alely dominantnej (napr. u hemizygoty).

#### Kritériá recesívnej viazanej na pohlavný chromozóm X

1. Incidencia choroby je oveľa vyššia u mužov ako u žien.
2. Znak prechádza od postihnutého muža prostredníctvom všetkých jeho dcér na polovicu ich synov.
3. Znak sa nikdy neprenáša priamo z otca na syna.
4. Znak sa môže prenášať cez sériu prenášačiek, ak sa tak stane, sú postihnutí muži v rodokmeni navzájom prepojení prostredníctvom žien.
5. Prenášačky majú variabilnú expresivitu znaku.

#### Niektoré modelové situácie:

Nasledujúci kombinačný štvorec ukazuje potomkov **postihnutého muža a zdravej ženy**:

$$P: X_h Y \times X_H X_H$$

$X_H$	$X_H$	$X_H$
$Y$	$X_H X_h$	$X_H X_h$

**Dcéry:** zdravé, ale všetky heterozygotné prenášačky

**Synovia:** všetci zdraví

Postihnutý muž neprenáša alelu ani na jedného syna, ale odovzdáva ju všetkým dčeram, ktoré sú preto prenášačky.

Potomkovia **prenášačky a zdravého muža**, môžu mať nasledovné genotypy:

$$P: X_H Y \times X_H X_h$$

$X_H$	$X_H$	$X_h$
$Y$	$X_H X_H$	$X_H X_h$

**Dcéry:** 1/2 zdravé, 1/2 zdravé prenášačky

**Synovia:** 1/2 zdraví, 1/2 postihnutí

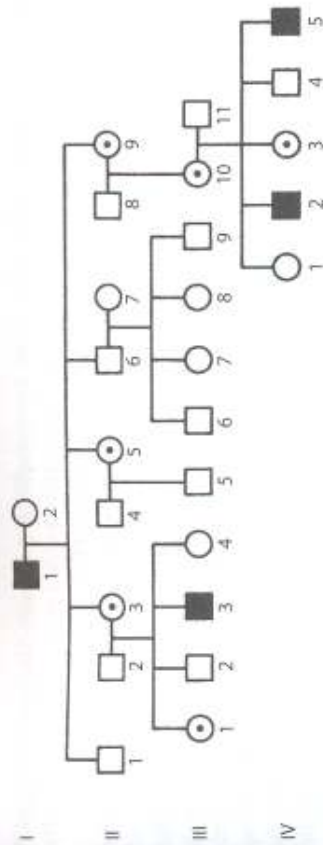
V prípade **prenášačky a choreho muža** je situácia nasledovná:

$$P: X_h Y \times X_H X_h$$

$X_h$	$X_H$	$X_h$
$Y$	$X_H X_h$	$X_h X_h$

**Dcéry:** 1/2 zdravé prenášačky, 1/2 postihnuté

**Synovia:** 1/2 zdraví, 1/2 postihnutí



Obrázok 9-2. Typický rodokmeň X-viazanej recesívnej dedičnosti.

Na obr. 9-2 je znázornený typický rodokmeň s charakteristickými vlastnosťami recesívnej dedičnosti viazanej na chromozóm X. Recesívny znak viazaný na chromozóm X starého otca z matkinej strany (1-1) sa nemanifestoval v jeho bezprostrednom potomstve, ale prejavil sa u jeho vnuka (III-3) a jeho pravnukov (IV-2, IV-5). Dcéra prenášačky má 50 % pravdepodobnosť, že je tiež prenášačka. X-viazaný recesívny znak sa môže náhodne prenášať aj cez niekoľko generácií len z prenášačky na prenášačku, kým sa prejaví u postihnutého muža.

#### Príklady X-viazanej recesívnej dedičnosti

**Hemofília A** je najvážnejšia a najčastejšia geneticky podmienená porucha hemokoagulácie (80% prípadov). Deficitný je antihemofilický globulín (faktor VIII). Incidencia ochorenia je asi 1 : 10 000 novorodencov mužského pohlavia. Gén pre faktor VIII sa nachádza na dlhom ramene chromozómu Xq28. Mutácie spájajúce sa s hemofiliou A sú napr. nonsense a missense mutácie ako aj inverzie (45% všetkých prípadov). Ochorenie sa prejavuje neustávajúcim krvácaním i z nepatrnej rany, pretože fibrinová zrazenina je veľmi slabá a nedokáže uzavrieť postihnuté krvácajúce tkanivo (nevytvorí sa tzv. krvný koláč). Znížená zrážanlivosť krvi má za následok spontánne krvácanie do tkanív a kĺbov, zväššené krvácanie po poranení alebo po chirurgických zákrokoch.

Ešte začiatkom 60-tych rokov minulého storočia bola hemofília pokladaná za vážne smrteľné ochorenie. Pacienti sa zvyčajne nedoživali ani 20 rokov. V súčasnosti je pacientom intravenózne podávaný rekombinantnými technikami pripravený faktor VIII a priemerný vek pacientov je 68 rokov. 10-15% všetkých pacientov (zvyčajne s nulovou hladinou prirodzeného faktora VIII) však vytvára proti rekombinovanému faktoru VIII protilátky.

**Hemofília B** sa klinicky nedá rozlíšiť od hemofílie A. Je podmienená znížením aktivity alebo chýbaním koagulačného faktora IX. Má miernejšiu formu a je zriedkavejšia (20% prípadov). Ochorenie je možné regulovať podávaním deficitného faktora IX získaného od darcu.

**Duchenneova svalová dystrofia (DMD)** je dedičné ochorenie, ktoré primárne postihuje svaly (muskulárna dystrofia) s výškym 1 : 3 500 novonarodených chlapcov. Obyčajne sa prejaví v čase, keď chlapec začína chodiť a nezadržateľne progreduje, takže okolo 10. roku veku je pacient odkázaný na vozík a len s malou pravdepodobnosťou sa dožije 20 rokov. Choroba je letálna (smrť nastáva v dôsledku zlyhania srdcovej činnosti a dýchania), takže v podstate je prevenciou vlastného prenosu prostredníctvom postihnutých mužov. Môžu



ju však prenášať ženy – prenášačky, ktoré samy majú len zriedkavo klinické príznaky DMD. Okrem toho sa tento gén vyznačuje vyššou frekvenciou mutácií (gén je veľký). Jedna tretina všetkých prípadov vzniká ako dôsledok novej mutácie.

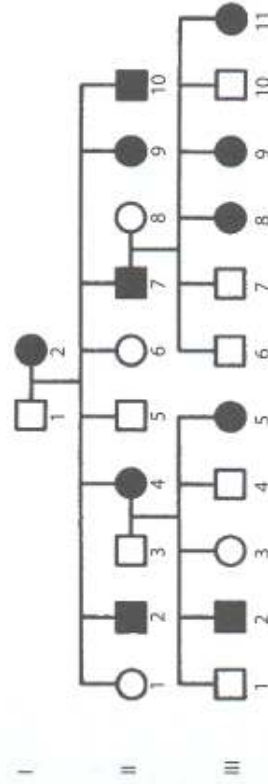
**Beckerova svalová dystrofia (BMD)** sa začína neskôr, je miernejšia a 10-krát zriedkavejšia ako DMD.

Obidve choroby sú spôsobené odlišnými mutanými alelami génu (interalélová heterogenita), ktorý sa nachádza na krátkom ramene chromozómu X (Xp21.2) a je zo všetkých v súčasnosti známych génov najdlhší. Génovým produktom je *dystrofin* – proteín s molekulovou hmotnosťou 427 kD, preto sa gén pre DMD/BMD označuje ako *dystrofin-gén*. Z mutácií ide približne v 60 – 65 % prípadov DMD a BMD o deléciu, v 5 % o duplikácie a v ostatných prípadoch prichádzajú do úvahy bodové mutácie rôzneho charakteru. Dystrofin (cytoskeletárny proteín) sa nachádza vo svaloch, ale v menšom množstve ho možno získať aj z lymfocytov. **U pacientov s DMD dystrofin absentuje**, a preto sa vyšetrením nedeteguje. Pri BMD sú pozorované zmeny charakteru alebo množstva dystrofinu.

**Červeno-zelená farbosleposť (daltonizmus)** – porucha, pri ktorej je oslabená schopnosť rozlišovať červenú a zelenú farbu. 8% mužov je farboslepých, z nich približne 75% má defekt rozpoznávania zelenej farby a 25% rozpoznávania červenej farby. Jedna žena zo 150 je farboslepá.

### 9.1.2.2. X-viazaná dominantná dedičnosť

V tomto prípade sa príslušná alela nachádza na chromozóme X a je dominantná. Zatiaľ čo recesívne X-viazané znaky sa typicky prejavujú len u mužov, zriedkavé X-viazané dominantné znaky sú približne **dvakrát častejšie u žien ako u mužov**. Postihnutý muž prenáša gén (a znak) na všetky dcéry, ale ani na jedného syna (obr. 9-3). Ak má postihnutý muž čo len jedinú zdravú dcéru alebo čo len jediného postihnutého syna, príslušný gén nemôže byť X-viazaný ale je autozómový. Ženy sú oveľa častejšie postihnuté ako muži, ale keďže sú prakticky všetky heterozygotné, majú väčšiu miernejšiu (alebo variabilnú) expresiu znaku.



**Obrazok 9-3.** Typický rodokmeň X-viazanej dominantnej dedičnosti.

### Základná charakteristika X-viazanej dominantnej dedičnosti (XD)

1. Gén sa nachádza na chromozóme X a má dominantný charakter.
2. Prenos z otca na syna nie je možný.
3. Postihnuté heterozygotné ženy prenášajú ochorenie na polovicu svojich detí obidvoch pohlaví.

### Príklady X-viazanej dominantnej dedičnosti

Príkladom X-viazanej dominantnej dedičnosti normálneho fyziologického znaku je **krvná skupina Xg**. Klinickogenetické jednotky s X-viazanou dominantnou dedičnosťou sú zriedkavé. Ako príklad môžeme uviesť inkontinenciu pigmentu, hereditárnu hypofosfatemickú rachitídu rezistentnú na vitamín D, deficit ornitíntranskarbamylázy, Aarskogov syndróm.

**Hereditárna hypofosfatemická rachitída rezistentná na vitamín D** má väčšinou postavenie v skupine familiálnych hypofosfatemických rachitíd. Táto dominantne dedičná forma krivice vzniká aj pri dostatočnom príjme vitamínu D. Príčinou je znížená reabsorpcia fosforu v proximálnom tubule obličky až na 42 – 72 % (referenčné hodnoty sú 85 – 95 %), ktorá spôsobuje nízku hladinu fosforu v sére a krivicu kostí. Oproti krivici z nedostatku vitamínu D nie je pozorovaná hypokalcémia (nízka hladina vápnika v krvi). Ženy sú postihnuté 2-krát častejšie ako muži. Vyskyt ochorenia je 1-10 : 1 000 000 pôrodov.

### 9.2. Dedičnosť pohlavím ovládaná a ovplyvnená

**Dedičnosť pohlavím ovládaná** – znamená, že gén je lokalizovaný na **autozóme**, ale manifestuje sa **iba u jedného pohlavia**.

Z normálnych znakov sú takto dedené **sekundárne pohlavné znaky**. Z patologických znakov je to napr. *pubertas praecox*. U heterozygotov mužského pohlavia sa vyvíjajú druhotné pohlavné znaky vrátane adolescentného rastového špurtu už okolo štyroch rokov veku, niekedy dokonca skôr. Ochorenie nevznikne u heterozygotných žien. Postihnutí chlapci sú od začiatku vyšší ako ich vrstovníci, ale pre skoré uzatvorenie rastových štrbín epifýz dlhých kostí rýchlo prestanú rásť a zakrpatieť.

**Dedičnosť pohlavím ovplyvnená** – znamená, že gén sa nachádza na **autozóme**, ale prejavuje sa ako dominantný znak u jedného pohlavia a ako recesívny u druhého pohlavia. Ako znaky ovplyvnené pohlavím označujeme tie, ktoré sú **vyjadrené u príslušníkov obidvoch pohlaví**, ale vo výrazne odlišnom pomere. U človeka je takým príkladom **plešatosť**, ktorá je častejšia u mužov ako u žien. Normálne recesívna alela pre predčasné vypadávanie vlasov sa môže exprimovať aj v heterozygotnej konštitúcii pod stimulačným vplyvom mužských pohlavných hormónov a prejavuje sa v tomto prípade ako dominantná. U žien sa neprejavuje vplyv mužských pohlavných hormónov a preto sa prejavuje ako recesívna (predčasné vypadávanie vlasov môže ale nastať vplyvom homozygotnej kombinácie alely).

### 9.3. Mitochondriálna dedičnosť

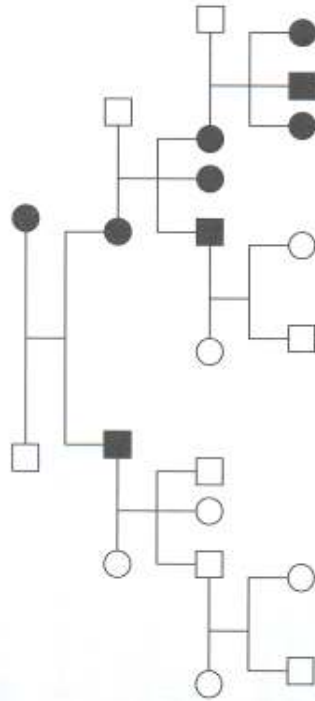
Veľká väčšina genetických ochorení je spôsobená mutáciami jadrovej DNA, menšie množstvo ochorení je zapríčinené mutáciami v mitochondriálnej DNA (mtDNA). Každá ľudská bunka (okrem spermii) obsahuje v cytoplazme niekoľko stoviek stoviek mitochondrií. Hlavnou úlohou mitochondrií je produkcia energie viazanej v ATP v procese nazývanom oxidatívna fosforylácia. Energia je nevyhnutná pre bunkový metabolizmus to znamená, že je dôležitá pre prežívanie buniek.

Ľudská mitochondriálna DNA je dvojitá cirkulárna molekula obsahujúca 16 569 bp a kóduje 37 génov bez intrónov. Bližšia charakteristika mitochondriálnej DNA je uvedená v kapitole 5. Prenos mitochondriálnej DNA na potomkov sa deje po **matérnej línii**, pretože mitochondrié spermii nie sú inkorporované do embrya. **Výskyt mutácií v**



mitochondriálnej DNA je 10-krát častejší ako v nukleárnej DNA. Príčinou je zvýšená koncentrácia voľných radikálov pochádzajúcich z procesov oxidatívnej fosforylácie ako aj nižšia efektívnosť reparačných mechanizmov v mitochondriách v porovnaní s reparačiou nukleárnej DNA.

Ďalšou zvláštnosťou je, že pri delení bunky nedochádza k žiadnej kontrolovanej segregácii mitochondrií do dcérskych buniek. Preto mtDNA je medzi nové bunky distribuovaná síce rovnomerne, ale náhodne. Dcérske bunky tak môžu získať úplne rozdielny počet normálnych, či naopak mutáciami zatážených mitochondrií. Stav, keď bunka obdrží len normálne mitochondrie, či len mitochondrie s mutovanou mtDNA sa nazýva **homoplazmia**. Stav, keď sa do bunky dostane zmes mitochondrií sa nazýva **heteroplazmia**. Nefunkčnosť mitochondrií je nezlučiteľná so životom, ale vzhľadom na to, že fenotypový prejav závisí na podiele normálnych a mutovaných mitochondrií v bunke, je život jedinca s heteroplazmiou možný. V prípade malého počtu zmutovaných mitochondrií sa ochorenie nemusí prejaviť vôbec. Preto sa u pacientov s mutáciami v mtDNA stretávame s **variabilnou expresivitou** choroby a jej **neúplnou penetranciou**. Navyše medzi jadrovou a mitochondriálnou DNA existujú rôzne interakcie, ktoré v rodokmeni môžu vykazovať črty AD či AR dedičnosti.



**Obrázok 9-4.** Rodokmeň znázorňujúci dedičnosť ochorenia spôsobeného mutáciou v mtDNA s úplnou penetranciou.

Každé tkanivo potrebuje k životu určité množstvo ATP. Hoci menšie odebýtky v hladine ATP môžu byť tolerované, väčšie výkyvy vedú k degenerácii a smrti buniek. Preto orgány s najväčšou spotrebou ATP bývajú v prípade mitochondriálneho ochorenia najviac postihnuté. Napr. centrálny nervový systém spotrebuje až 20% z celkovej produkcie ATP v tele.

Missense mutácie mtDNA spôsobujú napr. **Leberovu optickú neuropatiu**. Ochorenie je typické náhlou a rýchlou nekrózou optického nervu a následnou stratou zraku zvyčajne v druhej až tretej dekáde života. Jednonukleotidová mutácia v géne pre tRNA mitochondriálnej DNA zapríčiňuje **myoklonickú epilepsiu** spojenú s demenciou a myopatiami. Delécie v mtDNA môžu spôsobiť **hluchotu**. Niektoré mutácie sú asociované s Alzheimerovou chorobou. Predpokladá sa, že hromadenie mutácií v mtDNA ovplyvňuje aj procesy starnutia.

## Úlohy

1. Vysvetlite pojem heterogametické a homogametické pohlavie.
2. Vysvetlite Lyonovej hypotézu.
3. Čo je Barrovo teliesko?
4. Aký počet Barrových teliesok nájdeme v interfázových bunkách u jedincov s:
  - a) Klinefelterovým syndrómom
  - b) Turnerovým syndrómom
  - c) karyotypom 47, XYY
  - d) karyotypom 48, XXXX
  - e) karyotypom 47, XXX
5. Vzhľadom na Lyonovej hypotézu, aká bude sietnica ženy, ktorá je heterozygotná pre farbosleposť?
6. Aké sú možné príčiny pomeru ženského a mužského pohlavia 1,40:1,60 pri narodení u ľudí?
7. Zakreslite nondisjunkciu počas oogenezy u ženy, ktorá je príčinou vzniku Klinefelterovho a Turnerovho syndrómu po fertilizácii normálnou spermiou?
8. U ľudí neschopnosť rozlišovať červenú a zelenú farbu je vrodená ako na X-chromozóm viazaná porucha. Žena s normálnym farbocitom, ktorej otec bol farbosllepý, sa vydala za muža s normálnou schopnosťou rozlišovať červenú a zelenú farbu. Aké je riziko narodenia postihnutých detí?
9. Muž a žena majú normálny farbocit, hoci obaja ich otcovia sú postihnutí farbosleposťou. Aká je pravdepodobnosť, že ich prvé dieťa bude:
  - a) syn a bude rozlišovať červenú a zelenú farbu,
  - b) dcéra, ktorá bude mať normálny farbocit,
  - c) syn a bude zároveň postihnutý,
  - d) dcéra, ktorá bude postihnutá?
10. Ak rodičia, obaja s krvnou skupinou A a normálnym farbocitom, majú postihnutého syna s krvnou skupinou O, aká je pravdepodobnosť, že ich ďalšie dieťa bude dcéra, ktorá bude mať normálny farbocit a krvnú skupinu O?
11. Na povrchu buniek sa nachádza Xg antigén, determinovaný génom na X-chromozóme. Na Y-chromozóme sa nachádza žiadna ekvivalentná forma tohto génu. Tento gén má dve alternatívne formy – dominantnú alelu  $Xg^+$  a recesívnu  $Xg^-$ . Žena s genotypom  $Xg^+/Xg^-$  sa vydala za muža s genotypom  $Xg/Y$ . Narodil sa im syn s Klinefelterovým syndrómom s genotypom  $Xg^+/Xg^+/Y$ . Od ktorého rodiča pochádza nadpočetný X-chromozóm a počas ktorého meiotického delenia vznikla nondisjunkcia?
12. Daltonizmus (farbosleposť) je dedične podmienený recesívnou alelou, ktorá je lokalizovaná na heterologickým úseku X-chromozómu.



- a) Normálne vidiaci otec mal farbosllepého syna. Aké sú genotypy oboch rodičov?
- b) Manželom sa narodil jeden farbosllepý syn a normálne vidiaci dcéra, ktorá sa vydala za zdravého muža. Narodili sa im siedmi synovia, z ktorých štyria boli farboslpeí a traja mali normálny zrak. Aké boli genotypy ich rodičov a starých rodičov?
- c) Aká je pravdepodobnosť pre syna, ktorého otec je daltonik, že bude postihnutý rovnakou poruchou farbcitu za predpokladu, že matka nie je prenášačkou recesívnej alely?
- d) Aká je pravdepodobnosť narodenia farboslpeého syna matke, ktorá je prenášačkou ( $X^0X^b$ ) a otec nie je daltonik?

13. Klasická hemofília (hemofília A) je geneticky podmienená recesívnou vlohou viazanou na X-chromozóm.

- a) Muž hemofilik, sa oženil so ženou, ktorá je zdravá. Narodili sa im zdravé dcéry a synovia, ktorí do manželstva vstúpili s nepostihnutými osobami. Zistite, aká je pravdepodobnosť objavenia sa hemofílie u vnúčat?
- b) Muž postihnutý hemofiiliou vstupuje do manželstva so zdravou ženou, ktorej otec bol hemofilik. Určte pravdepodobnosť narodenia zdravých detí v tejto rodine.

14. Žena, ktorej otec bol hemofilik, ale sama mala normálnu zrážanlivosť krvi, sa vydala za zdravého muža.

- a) Aká je pravdepodobnosť, že ich deti budú mať hemofíliu?
- b) Ak sa dcéra z tohto manželstva vydá za zdravého muža, aká je pravdepodobnosť, že ich deti budú mať hemofíliu?
- c) Predpokladáme, že títo rodičia chcú mať dvoch synov. Aká je pravdepodobnosť, že obaja budú mať normálnu zrážanlivosť krvi?

15. Hereditárna hypofosfátémická rachitída rezistentná na vitamín D je dedične podmienená dominantnou alelou génu, ktorý je lokalizovaný na heterologickom úseku X-chromozómu.

- a) Manželstvo uzavrie chorá žena a zdravý muž. Môže sa im narodiť zdravý syn?
- b) Manželstvo uzavrie zdravá žena a chorý muž. Akého pohlavia budú zdravé deti? Ak neskôr potomok z tohto manželstva uzavrie manželstvo so zdravým partnerom, môže sa im narodiť zdravé dieťa?

16. Albinizmus (porucha v tvorbe pigmentu melanínu) je podmienený autozómovo recesívnym génom. Anhydrotická ektodermálna dysplázia (vrodená suchosť kože, vzácne gonozómovo recesívne ochorenie s takmer úplným chýbaním potných žliaz u postihnutých mužov), je geneticky podmienená recesívnou alelou viazanou na X-chromozóm. V rodine, kde obaja rodičia sú zdraví, sa narodil syn s obidvoma anomáliami.

- a) Aká je pravdepodobnosť, že ich ďalšie dieťa bude dcéra a zároveň bude zdravá?
- b) Aká je pravdepodobnosť, že ich ďalšie dieťa bude syn a zároveň bude zdravý?

17. Farbosllepý muž má aj muskulárnu dystrofiu skapulohumerálneho typu (autozómovo recesívna dedičnosť). So svojou ženou, ktorá má normálny zrak i svalovú funkciu, má farboslpeú dcéru s muskulárnou dystrofiou. Určte genotypy rodičov a dieťaťa.

18. Primárna porucha matrice zubnej skloviny sa dedí gonozómovo dominantne (väzba na chromozóm X). Zuby sú žlté až hnedé, niekedy až polopriesvitné.

- a) Manželstvo uzavreli žena so zdravým chrupom a muž postihnutý uvedeným defektom. Aká je pravdepodobnosť pre dcéru, že bude zdravá? Aká je pravdepodobnosť pre syna, že bude bez uvedeného defektu?

b) Manželstvo uzavreli zdravý muž a žena s primárnou poruchou zubnej skloviny. Chcú mať štyroch synov a jednu dcéru. Aká je pravdepodobnosť, že u žiadneho dieťaťa sa nevykrytne defekt zubov, ktorý má matka?

19. Úplná anodoncia (chýbanie skoro všetkých zubov) je zriedkavá X-viazaná recesívna porucha. a) Snúbenci, ktorí chcú uzavrieť manželstvo, majú obidvaja zdravý chrup, ale otec snúbence mal úplnú anodanciu. Aká je pravdepodobnosť, že sa im narodí syn s uvedeným defektom?

b) Snúbenci, ktorí chcú uzavrieť manželstvo, majú obidvaja zdravý chrup, ale dedo z matkinej strany snúbence mal úplnú anodanciu. Aká je pravdepodobnosť, že sa im narodí syn a bude postihnutý?

20. Prikladom dedičnosti pohlavím ovplyvnenej je u človeka plešatosť. U muža je predčasná plešatosť podmienená dominantnou alelou P. Aby sa plešatosť mohla prejavíť u ženy, musí byť alela P v homozygotnom stave (PP). U muža sa plešatosť prejavuje aj v heterozygotnom stave (Pp), pravdepodobne kvôli prítomnosti pohlavných hormónov.

a) Plešatý muž, ktorého otec mal normálne vlasy, sa oženil so ženou, ktorá mala normálne vlasy, ale jej matka a všetci bratia boli plešatí. Aké deti sa môžu narodiť z tohto manželstva?

b) Manželstvo uzavreli zdravý muž a zdravá žena, ktorej otec bol farbosllepý a matka plešatá. Aké deti sa môžu narodiť z tohto manželstva?



## 10. Základy imunológie a imunogenetiky

**Imunológia** je náuka o obranných schopnostiach organizmu. Zaoberá sa bunkovými a molekulovými mechanizmami, ktorými sa organizmus bráni proti poškodeniu cudzorodými látkami vonkajšieho prostredia (virusy, baktérie, huby, chemické látky), ako aj prostredia vnútorného (spôdniny metabolizmu, vlastné starúce, odumreté či mutáciami zmenené alebo transplantované bunky).

**Imunogenetika** sa zaoberá genetickými mechanizmami, ktoré kontrolujú imunitu, to znamená zákonitostami dedičnosti tvorby antigénov a protilátok. Študuje stavbu, funkciu a genetickú kontrolu štruktúr, ktoré sa uplatňujú pri imunitnej obrane organizmu.

Prvoradou úlohou imunitného systému je odlišiť „vlastné“ od „cudzieho“. Protivlastným zložitým systémom za fyziologických podmienok nereaguje. Pôsobenie imunitného systému proti cudzej štruktúre (bunke, molekule) označujeme ako **imunitnú reakciu**. Imunitná odpoveď na cudzí materiál (napr. patogén) začína jeho rozpoznávaním a pokračuje rozvojom imunitnej reakcie, ktorá má za cieľ jeho zneškodnenie.

### 10.1. Antigény

Každá štruktúra, ktorá je schopná vyvolať imunitnú odpoveď, sa nazýva **antigén** (Ag, antitbody generator). Dnes sa podstata antigénu vyjadruje presnejšie takto: **antigén** je akákoľvek substancia alebo molekula, ktorú môžu špecificky rozpoznávať bunky imunitného systému (T a B lymfocyty). Dôsledkom je aktivácia týchto lymfocytov a celý rad bunkových a látkových interakcií, ktoré vyúsťujú do imunitnej odpovede, **bunkovej** alebo **humorálnej**. Organizmus má svoju individuálnu, špecifickú antigénnu výbavu, ktorá je súčasťou jeho integrity a ktorou sa zároveň odlišuje od iných organizmov. Každý antigén má určité vlastnosti: molekulová hmotnosť je obvyčajne väčšia než 10 000, z chemického hľadiska ide o proteín alebo polysacharidy. Jedinec zvyčajne reaguje imunitnou odpoveďou iba proti tým antigénom, ktoré sám nemá. Nereagovanie imunitného systému na vlastné makromolekuly sa nazýva **prírodná imunologická tolerancia**, pričom sa predpokladá, že organizmus sa „naučí“ nereagovať na vlastné antigény zhruba v dobe narodenia, keď je imunitný systém ešte nezrelý. V určitých situáciách môže imunitný systém sám spôsobiť poškodenie organizmu. Ak imunitný systém chybné rozpoznáva vlastné antigény hovoríme o **autoimunitnej reakcii**. V prípade defektu niektorej zo zložiek imunitného systému vzniká **imunodeficiencia**. Ak imunitná odpoveď spôsobí väčšie poškodenie než patogén alebo cudzia látka hovoríme o **hypersenzitívite**.

Antigény sa v prírode vyskytujú vo veľmi komplexnej podobe. Bunky baktérií, virusy, peľové zrnka a pod. predstavujú mozaiku molekúl, ktoré môžu byť antigénmi. Ako cudzia nie je však rozpoznávaná celá makromolekula, ale iba jej časť, napr. úsek niekoľkých desiatok aminokyselín alebo štruktúra reťazcov polysacharidov. Táto časť sa nazýva **epitop** alebo **antigénny determinant** a zúčastňuje sa väzby antigénu s membránovými receptormi a voľnými protilátkami. Receptory a protilátky sú teda špecifické pre epitopy. Antigény sú všeobecne organické makromolekuly. Ich veľkosť je dôležitá, pretože existujú nízkomolekulové substancie - **hapteny**, ktoré môžu viazať protilátky, ale imunitnú odpoveď indukujú iba v tom prípade, ak sú viazané na makromolekulový nosič. Ako antigén najlepšie fungujú proteíny, ktoré ako jediné vyvolávajú odpoveď T-lymfocytov. Ostatné antigény aktivujú hlavne B-lymfocyty. Polysacharidy sú slabšie antigény, zatiaľ čo čisté lipidy a nukleové kyseliny nevyvolávajú imunitnú odpoveď.

Antigény po vstupe do organizmu prechádzajú radom zmien, hlavne tie, ktoré rozpoznávajú T-bunky. Imunitnú odpoveď vyvolávajú iba v tom prípade, ak vniknú do organizmu parenterálnou cestou. Pri perorálnom podaní sa enzymaticky štiepia ešte skôr, než

sa dostanú do krvi. Antigény môžeme posudzovať a triediť z rôznych hľadísk. Na základe genetickej rozdielnosti medzi darcom a príjemcom môžeme antigény rozdeliť na:

- **aloantigény** - rôzne antigény odlišujúce jedincov toho istého druhu
- **xenoantigény** - antigény odlišujúce jedincov rôznych druhov
- **autoantigény** - sú vlastné zložky organizmov, ktoré vyvolávajú imunitnú odpoveď iba v abnormálnych situáciách.

#### 10.1.1. Krvnoskupinové antigény

Poznáme veľké množstvo rozličných antigénnych substancií, ktoré sa nachádzajú na povrchu erytrocytov. Veľká časť z nich (240) bola **Medzinárodnou spoločnosťou pre krvnú transfúziu- ISBT** (ISBT - International Society of Blood Transfusion) zatriedená do 29 polymorfných systémov - **krvných skupín** (tab. 10-1.), hoci tento počet nemožno považovať za konečný. Z chemického hľadiska sú krvnoskupinové antigény sacharidy alebo proteíny pripojené na rôzne komponenty plazmatickej membrány červených krviniek (obr.10-1.). Jeden systém predstavuje súbor antigénnych vlastností, ktoré sú všetky podmienené alelami jediného lokusu, prípadne alelami komplexu tesne viazaných lokusov. Prítomnosť antigénov sa najčastejšie určuje sérologickými testami. Protilátky proti niektorým erytrocytárnym antigénom sa nachádzajú prirodzene v sére. Bežne sú rozšírené protilátky proti A a B antigénom systému AB0. Protilátky proti iným antigénom sa zväčša získavajú imunizáciou vhodného objektu príslušným antigénom. Takáto imunizácia nastáva napríklad aj po transfúzii krvi alebo v dôsledku prechodu fetálnych erytrocytov do krvného obehu matky.

Antigény červených krviniek (krvné skupiny) sa s úspechom využívajú ako markery pri familiálnych a populačných štúdiách a pri analýze genetickej väzby. Je to hlavne preto, že krvné skupiny sa dajú ľahko rozdeliť na rôzne fenotypy, majú jednoduchý spôsob dedičnosti (monogénová mendelovská dedičnosť) a nerovnaké populačné frekvencie. V širšom zmysle možno každý polymorfizmus krvi nazvať krvnou skupinou (vrátane HLA systému). Ale všeobecne sa tento termín používa výhradne pre antigény červených krviniek.

Niektoré krvné skupiny majú mimoriadny klinický význam pri transfúzii krvi, transplantácii tkaniv a hemolytickej chorobe novorodencov. Klinický význam jednotlivých systémov krvných skupín závisí predovšetkým od toho, či sú protilátky systému schopné skrátit prežívanie červených krviniek v obehu (u plodu alebo u pacienta po transfúzii) a v akom množstve sa takéto protilátky vyskytujú. V prípade všetkých pacientov musí byť darca kompatibilný v AB0 systéme. Všetky Rh-negatívne ženy musia v reprodukčnom veku dostávať výlučne Rh-negatívnu krv.

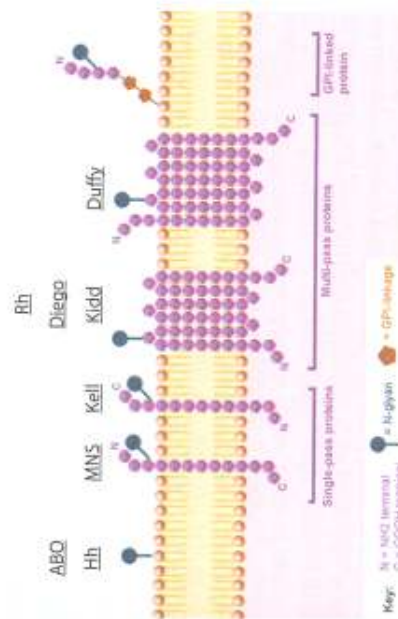
Biologický význam niektorých erytrocytárných antigénov nie je známy. Známe sú asociácie medzi krvnými skupinami a niektorými chorobami, napr. jedinci s krvnou skupinou 0 majú vyššiu pravdepodobnosť ochoreť na dvanásnikový vred ako ostatní jedinci; pozorovaná bola aj asociácia medzi skupinou A a rakovinou žalúdka, medzi skupinou A a diabetes mellitus a mnohé iné. Hoci sú tieto asociácie pozoruhodné a intenzívne sa študujú, niet zatiaľ ucelenej hypotézy, ktorá by ich interpretovala. Ani najrozsiahlšími výskumami sa však nepodarilo preukázať medzi nositeľmi jednotlivých krvných skupín rozdiely v priemernej dĺžke života, vo fertilitate, celkovej chorobnosti a v analogických ukazovateľoch. To do istej miery svedčí proti hypotéze o selektívnej nerovnocennosti jednotlivých krvných skupín.

Dosť všeobecne sa akceptuje hypotéza, podľa ktorej závisí virulencia patogénnych baktérií a vírusov od podobnosti ich povrchových antigénov s krvnoskupinovými antigénmi hostiteľa. *Yersinia pestis* má napr. antigén podobný ľudskému krvnoskupinovému antigénu H, vírus kiahní antigénu A. Možno, že v čase rozsiahlych epidémií mala príslušnosť k určitým krvným skupinám nemalý selektívny význam. Likvidáciou epidémií a ťažkých infekčných ochorení vymizli selektívne rozdiely, ale génové frekvencie sa zachovali.



Tabuľka 10-1. Krvnoscupinové systémy človeka.

Názov	ISBT symbol	ISBT číslo	Génový symbol	Poznámky
AB0	AB0	001	AB0	Mimoriadny klinický význam
MNS	MNS	002	GYP A, GYPB	Užitočný marker; malý klinický význam
P	P1	003	P1	
Rh	RH	004	RHD, RHCE	Mimoriadny klinický význam
Lutheran	LU	005	LU	Lutheran-Sekretor bola prvá známa genetická väzba na autozomoch
Kell	KEL	006	KEL	Klinický významný
Lewis	LE	007	FUT3	Má vzťah k systému Hh
Duffy	FY	008	DARC	Ako prvý bol lokalizovaný na chromozóme
Kidd	JK	009	SLC14A1	Klinický významný
Diego	DI	010	SLC4A1	Marker na ďalekom východe
Yt	YT	011	ACHE	acetylcholinesteráza
Xg	XG	012	XG	X-viazaný
Sciama	SC	013	ERMAP	
Dombroek	DO	014	DO	
Colton	CO	015	AQP1	
Landsteiner-Wiener	LW	016	ICAM4	
Chido-Rodgers	CH/RG	017	C4A, C4B	aktivácia komplementu
Hh	H	018	FUT1	Vzťah k systému AB0 a Lewis
Kx	XK	019	XK	
Gerbich	GE	020	GYP C	
Cromer	CROM	021	DAF	
Knops	KN	022	CR1	
Indian	IN	023	CD44	
Ok	OK	024	BSG	
Raph	RAPH	025	MER2	
JMH	JMH	026	SEMA7A	
I	I	027	GCNT2	
Globoside	GLOB	028	B3GALT3	
GIL	GIL	029	AQP3	



Obrázok 10-1. Schéma membrány erytrocytu. Znárodné sú rôzne typy antigénov krvnoscupinových systémov.

10.1.1.1. Terminológia krvnoscupinových systémov

Symbolika, ktorá sa v literatúre používala na označovanie krvnoscupinových génov, alel, antigénov, protilátok atď., bola dlhý čas nejednotná, predovšetkým pri systémoch popísaných dávnejšie. Novoroobjavené systémy krvných skupín sa označovali alfabeticky alebo podľa osôb, u ktorých sa prvý raz zistila produkcia protilátky (napr. Duffy a J. Kidd). Na označenie ich génového lokusu sa použila skratka alebo časť priezviska, resp. rodného mena (Duffy – Fy, J. Kidd – Jk). V roku 1980 *Medzinárodná spoločnosť pre krvnú transfúziu* (ISBT- International Society of Blood Transfusion) navrhla *terminológiu*, kde každý krvnoscupinový systém ako aj krvnoscupinový antigén má číslo. Každému krvnoscupinovému antigénu podľa ISBT prislúcha šesťmiestne číslo. Prvé tri čísla identifikujú krvnú skupinu (napr. AB0 má číslo 001, Rh číslo 004) a ďalšie tri čísla identifikujú antigén podľa poradia objavenia. Napr. antigén A systému AB0 má číslo 001.001, antigén B 001.002.

10.1.1.2 Systém AB0

(ISBT symbol: AB0; ISBT číslo: 001; Symbol génu: AB0)

Tento krvný systém bol prvýkrát, ale neúplne popísaný v r. 1901 *raľským vedcom Karlom Landsteinerom* pri skúmaní aglutinácie ľudských krvinek, za čo mu bola udelená aj Nobelova cena. Avšak v roku 1921 americká lekárska komisia uznala prvenstvo v objavení krvných skupín českému lekárovi *Jánovi Janskému*, ktorý v roku 1907 popísal nie tri, ale **štyri základné krvné skupiny**.

Systém AB0 je geneticky determinovaný jedným génom (monogénová mendelovská dedičnosť), ktorý sa nachádza na chromozóme č. 9. Tento gén má tri základné alely (mnohonásobný alelizmus), ktoré sa označujú A, B a 0. Pritom alely A a B sú dominantné voči alele 0, no ich vzájomný vzťah je kodominantný. Tieto tri alely utvárajú šesť rozličných genotypov, tri homozygotné a tri heterozygotné, ktoré určujú štyri fenotypy – štyri krvné skupiny označované A, B, AB a 0. Zvláštnosťou systému AB0 je recipročný vzťah medzi antigénmi na červených krvinkách a protilátkami, ktoré sa nachádzajú prirodzene v plazme zdravých osôb (tab.10-2).

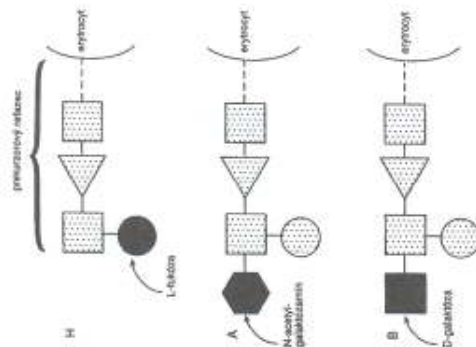
Tabuľka 10-2. Genotypy, fenotypy a protilátky krvnoscupinového systému AB0.

Krvná skupina	A	B	AB	0
Genotypy	AA a AO	BB a BO	AB	OO
Antigény	A antigény	B antigény	A a B antigény	ani A, ani B (H)
Protilátky v krvi	Anti-B	Anti-A	ani anti-A ani anti-B	Anti-A a anti-B

**Alela A** podmieňuje syntézu enzýmu *N-acetyl-galaktosaminyl-transferázy* (A-transferáza), ktorá pripája k prekurzorovej **H substancii** N-acetyl-galaktosamin a vytvára tak **antigén A**. Génovým produktom **alely B** je enzým *D-galaktosyl-transferáza* (B-transferáza), ktorá pripája k prekurzoru koncovú galaktózu a vytvára tak **antigén B**



(obr. 10-2). Produktom alely  $0$  je inaktívny enzým, ktorý nie je schopný pripojiť cukor na H substanciu. Teda alela  $0$  ponecháva prekursor nezmenený. Preto majú jedinci s krvnou skupinou  $0$  na povrchu erytrocytov iba H antigén.



**Obrázok 10-2.** Schematické znázornenie oligosacharidových štruktúr antigénov H, A a B. Na reťazec H pripájajú špecifické glykozyltransferázy N-acetyl-galaktózin (skupina A) alebo D-galaktózu (skupina B). U osoby s krvnou skupinou AB sa pripájajú obidva cukry na rôzne H reťazce toho istého erytrocytu.

Alely A a B sa od seba líšia iba v siedmich nukleotidových substitúciách, ktoré majú za následok zmenu 4 aminokyselín v peptidovom reťazci. Toto sa prejavuje v rôznej špecifite A a B transferáz. Sekvencia nukleotidov alely  $0$  je identická s alelou A, ale na pozícii 261 sa zistila delcia jedného nukleotidu, ktorá má za následok posun (frameshift) v čítaní genetickej informácie a výsledkom je defektný (afunkčný) enzým.

Vhodnými diagnostickými metódami sa dá zistiť, že alela A má viac foriem, z ktorých sa však vo väčšine populácií vyskytujú iba dve -  $A_1$  a  $A_2$ . Rozdiely medzi  $A_1$  a  $A_2$  alelami spočívajú v nerovnakkej expresii genu, to znamená, že podskupiny sa odlišujú počtom antigénov na povrchu erytrocytov a preto sa pri určovaní krvnej skupiny môžeme stretnúť s rôzne silnou sérologickou (hemaglutinačnou) reakciou. V podskupine  $A_1$  je najviac antigénu A a prakticky nijaký antigén H. V ostatných podskupinách klesá sila antigénu A, ale je viac antigénu H. Slabé varianty skupiny A ( $A_3$ ,  $A_4$ ) môžu pri rutinnom testovaní uniknúť detekcii. Asi 80% jedincov s krvnou skupinou A sú  $A_1$ , asi 20%  $A_2$ .

Teda v systéme AB0 sú zvyčajne štyri alely - A, B a  $0$ , ktoré určujú 10 rozličných genotypov. Fenotypov je iba šesť:  $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$ ,  $A_2A_2$ ,  $B_1B_1$ ,  $B_1B_2$ ,  $B_2B_2$ , pretože alela  $0$  je dominantná nad  $A_1$ . Alela  $A_2$  je teda recesívna voči  $A_1$ , obe sú kodominantné vo vzťahu k alele B a všetky tri sú dominantné nad  $0$ .

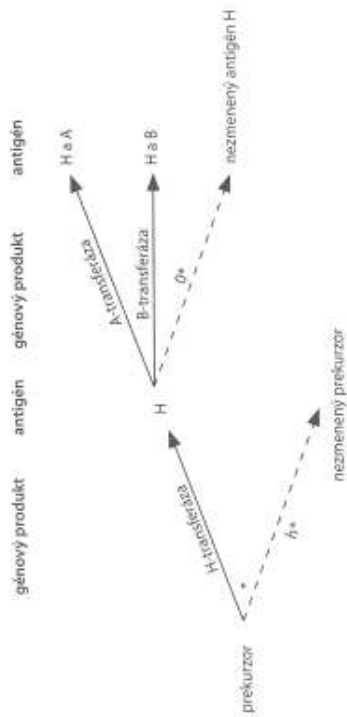
Avšak niektoré ochorenia (napr. talasémia, nekrotizujúca infekcia, hematologické nádory a pod.) môžu viesť k dočasnej modifikácii či „strate“ AB0 antigénov.)

### 10.1.1.3 Krvnoskupinový systém Hh

(ISBT symbol: H; ISBT číslo: 018; Symbol génu: FUT1 (lokus H) a FUT2 (lokus sekretor)

H antigény sú glykoproteíny alebo glykolipidy nachádzajúce sa buď na membráne erytrocytov alebo vo forme glykoproteínov v sekrétoch (sliny, mlieko, pankreatická šťava, žalúdočná šťava). H antigény slúžia ako prekursorové molekuly pre prezentáciu epitopov AB0 a Lewis systému. Prekursorové molekuly sú nepriamymi produktami dvoch tesne viazaných lokusov označovaných ako FUT1 (H) a FUT2 (Se) ležiacich na chromozóme 19.

Gén FUT1, ktorý je preferenčne exprimovaný v erytrocytoch má dve alely - H, h. Dominantná alela H kóduje enzým *fukozyltransferázu*, ktorá pripojením fukózy katalyzuje finálny krok syntézy tzv. H antigénu (H substanciu). Na H substanciu sa potom pripája pomocou glykozyltransferáz terminálny cukor, ktorý určuje AB0 fenotyp. H substanciu je teda nevyhnutným prekursorom pre tvorbu antigénov A a B na membráne červených krviniek (obr. 10-3).



**Obrázok 10-3.** Schéma syntézy antigénov H, A a B. Hviezdičkami sú označené recesívne alely h a  $0$ , ktoré v recesívnej konštitúcii nevytvárajú žiaden detekovateľný produkt.

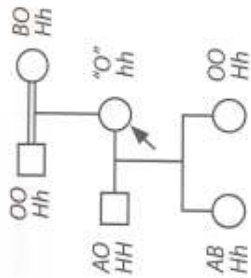
### Bombaj fenotyp

Pre expresiu antigénov AB0 systému na erytrocytoch je potrebná silna niekoľkých génov. Sú to predovšetkým dva nezávislé génové lokusy AB0 (chromozóm č. 9), ale tiež lokusu H (chromozóm č. 19, gén FUT1). Dominantná alela H kóduje enzým *fukozyltransferázu I*, ktorý je zodpovedný za utvorenie prekursorového oligosacharidového reťazca nutného pre prezentáciu antigénov AB0 systému. Veľmi zriedkavo sa vyskytujú prípady, keď jedinci sú recesívni homozygoti pre lokus H - hh. Takito jedinci následne nie sú schopni vytvárať antigény A a B napriek tomu, že v genotypy sú tieto alely prítomné. Ich fenotyp je vytvárať antigény  $0$  s protilátkami anti-A, anti-B ale aj anti-H v krvi, nezávisle od ich genotypu na AB0 lokuse. Tento fenotyp sa označuje  $0_h$ , „0“ alebo *Bombajský fenotyp*. Prvýkrát bol tento vzácný mutantný fenotyp zistený u Indov v Bombaji, ale neskôr bol dokázaný aj inde. Preto označenie bombajský fenotyp nie je celkom presné. Klasický bombaj fenotyp (Tyr316Ter) je spôsobený tzv. nonsense mutáciou, kedy je do čítacieho rámca zavedený stop kodón. Bombay fenotyp znevýhodňuje jedinca pri transfúzii krvi. Keď pacient s anti-H protilátkou v sére obdrží transfúziu krvi s H antigénom (napr. krvná skupina  $0$ ), môže u neho dôjsť k akútnej hemolytickej transfúznej reakcii. Darcom krvi môže byť len osoba s rovnakým fenotypom, najčastejšie najbližší príbuzní.

Vzťah spomínaných dvoch génov (*AB0 a FUT1*) je príkladom *recesívnej epistázy* u človeka. Recesívna alela h je v homozygotnom stave epistatická nad alelami lokusu AB0.

Na obr. 10-4. je jeden z prvých známych rodokmeňov s fenotypom AB. Takýto prípad má probandka so zdánlivou krvnou skupinou  $0$  dieťa so skupinou AB. Takýto prípad v dedičnosti krvných skupín systému AB0 nemôže nastať, keďže antigény A a B sú determinované rozličnými navzájom kodominantnými alelami toho istého lokusu. Túto anomáliu vysvetľuje práve epistatické pôsobenie genotypu hh: probandka má v skutočnosti genotyp  $0_h$ , čiže jej fenotyp je  $0_h$ .





Obrázok 10-4. Rodokmeň ženy s Bombaj fenotypom (genotyp hh).

Status sekrétorstva

Gén FUT2, ktorý je exprimovaný v sekrečných žľazách kóduje fukozyltransferázu 2. Aj tento gén má dve alely *Se* a *se* medzi ktorými je vzťah dominance a recesivity. Tento gén sa podieľa na tvorbe prekurzorovej molekuly čím umožňuje prezentáciu antigénov AB0 systému v telových tekutinách (sliny, mlieko, pankreatická šťava, žalúdočná šťava, atď.) ako aj prezentáciu epitopov krvnioskupinového systému Lewis. Antigény AB0 sa v sekretoch vyskytujú vo forme glykoproteínov, ktoré sú rozpustné vo vode. Asi 80% ľudí sú tzv. sekrétori s genotypom *SeSe* alebo *Sese*, to znamená, že antigény AB0 systému sa dajú u nich dokázať aj v telových tekutinách. Recesívni homozygoti *sese* sú nevyučovateľia (*nonsekrétori*). Znamená to, že antigény AB0 systému majú len na povrchu erytrocytov a povrchu ostatných somatických buniek, teda vo forme nerozpustnej vo vode.

Medzi lokusom *Sekrétor* a lokusom pre *AB0* krvnioskupinový systém je vzťah nealelovej interakcie typu *recesívnej epistázy*. Recesívna alela *se* je v homozygotnom stave epistatická nad alelami lokusu *AB0*.

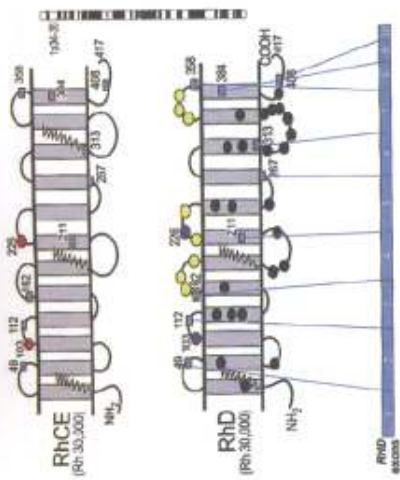
10.1.1.4 Systém Rh

(ISBT symbol: Rh; ISBT číslo: 004; Symbol génu: RHD a RHCE; počet antigénov: 49)

Objav tohto systému sa prisudzuje *Landsteinerovi* a *Wienerovi*, ktorí v roku 1940 v snahe objaviť nové krvné skupiny imunizovali kráľkov krvinkami opice *Macacus rhesus* a získali protilátku, ktorá aglutinovala krvinky 85% Američanov bielej rasy. Rok pred týmto pokusom bola *Landsteinerovým* kolegom *Levinom* a *Stetsonom* popísaná reakcia matky, ktorá porodila mŕtve dieťa a potrebovala transfúziu. Tejto pacientke bola poskytná krv jej manžela, s rovnakou *AB0* krvnou skupinou ako mala ona. Napriek tomu darovaná krv jej vyvolala akútnu hemolytickú transfúziu reakciu. Jej sérum obsahovalo protilátky, ktoré aglutinovali červené krvinky u 80% ľudí. Na základe podobnosti reakcii, ktoré boli pozorované pri pokusoch s krvinkami *Macacus rhesus*, bola protilátka získaná od pacientky nesprávne pomenovaná ako anti-Rh faktor. Neskôr sa ukázalo, že matkine protilátky reagovali na odlišný typ antigénu, napriek tomu pomenovanie krvnej skupiny ostalo nezmené.

Rh systém je vysoko imunogénny preto má podobne ako systém *AB0* značný praktický význam a to pri transfúzií krvi, ale najmä v súvislosti s hemolytickou chorobou novorodencov. Antigény Rh systému sa nachádzajú iba na erytrocytoch pričom špecifitu antigénu určuje sekvencia aminokyselín.

RH lokus je lokalizovaný na dlhom ramene chromozómu 1. Podľa hypotézy *Tipeta* (1986), ktorá bola neskôr potvrdená, sa RH lokus skladá z dvoch tandemovo usporiadaných génov *RHD* a *RHCE*. Väzba medzi nimi je taká silná, že len zriedkavo dochádza k rekombinácii. Preto sa kombinácia alel týchto dvoch génov prenáša z generácie na generáciu ako celok – tzv. **haplotyp**. Každý z týchto génov kóduje transmembránový proteín, ktorý prechádza membránou 12x (obr. 10-5).



Obrázok 10-5. RhCE a RhD antigény s vyznačenými najdôležitejšími epitopmi.

**RhD** proteín nesie viac než 30 epitopov, no klinicky najvýznamnejšia je prítomnosť resp. neprítomnosť tzv. **D epitopu**. Jeho prítomnosť je podmienená dominantnou alelou **D** a určuje Rh pozitívitu (Rh<sup>+</sup>). Rh negatívni jedinci (Rh<sup>-</sup>) sú recesívni homozygoti (genotyp dd, bez ohľadu na ďalšie alely). Sérologicky sa u nich nedá dokázať antigén D na povrchu erytrocytov. Neprítomnosť D epitopu je spôsobená deléciou v RHD géne. **RhCE** antigén sa od RhD antigénu odlišuje 35 aminokyselinami. RHE gen má 4 možné alely (**CE, Ce, cE, ce**) a s nimi súvisiace epitopy. Epitop **C** alebo **c** sa nachádza na druhej extracelulárnej slučke; **E** alebo **e** na štvrtéj extracelulárnej slučke. **C** od **c** epitopu sa líši v zastúpení jednej amk na pozícii 103 peptídového reťazca. Rozdiel medzi **E** a **e** epitopom je pozorovaný na 226 pozícii proteínu. Všetky epitopy okrem **d** možno detekovať príslušným antisérom (protilátkou – anti-C, anti-c, anti-D, anti-E, anti-e).

Frekvencie jednotlivých haplotypov v rozličných populáciách kolíšu, no kombinácia **cDe**, **Cde** a hlavne **CDE** a **CdE** sú takmer všade veľmi zriedkavé, zriedkavejšie, než by zodpovedalo očakávanej početnosti pri náhodnej kombinácii. Veľká väčšina všetkých Rh negatívnych osôb má genotyp **cde/cde**. Frekvencie Rh haplotypov pre našu populáciu sú uvedené v tab. 10-3.

Vo väčšine populácií bielej rasy sa početnosť haplotypu **cde** pohybuje okolo 40 %, čomu zodpovedá početnosť Rh negatívnych jedincov asi 16 %. Pozoruhodnou výnimkou sú španielski Baskovia, u ktorých je početnosť Rh negatívneho fenotypu asi 30 %. Toto etnikum sa odlišuje od ostatných európskych populácií aj vo frekvencii iných krvnioskupinových a ďalších génov. V kaukazskej populácii je približne 15% jedincov Rh a 85% jedincov Rh<sup>+</sup>. Antigény C, c, E, e nie sú tak silne a významne ako antigén D, napriek tomu môžu v prípade inkompatibility vyvolať tvorbu protilátok.

V Rh systéme neexistujú na rozdiel od systému *AB0* prirodzene sa vyskytujúce protilátky. Protilátky anti-Rh sa vytvárajú v prípade inkompatibility, napr. pri opakovaných transfúziách krvi alebo po opakovaných graviditách s inkompatibilitou medzi matkou a plodom.

Tabuľka 10-3. Zastúpenie haplotypov Rh systému v slovenskej populácii.

Haplotyp	Frekvencia v populácii
CDe	0,419
cDe	0,023
cDE	0,120
CDE	0,004
Cde	0,029
cde	0,400
CdE	0,005
CdE	0,000



### Inkompatibilita matky a plodu v Rh systéme

Táto situácia vzniká, ak matka je Rh<sup>-</sup> a plod Rh<sup>+</sup>. Plod zdedil alelu D od Rh<sup>+</sup> otca. Takéto tehotenstvo sa považuje za rizikové. Ak sa erytrocyty plodu dostanú do krvného obehu matky, stimulujú antigény D tvorbu protilátok anti-D. Materské protilátky (IgG) prechádzajú placentou a spôsobujú hemolýzu erytrocytov plodu. Senzibilizácia Rh matky nastáva väčšinou po pôrode. Pri pôrode dochádza ku krvácaniu v dôsledku oddeľovania placenty a určité množstvo fetálnej krvi preniká do krvného obehu matky. Preto vo väčšine prípadov nedochádza k postihnutej krvi dieťaťa, ale riziko sa zvyšuje pri ďalších inkompatibilných graviditách. Malé množstvo fetálnej krvi môže však preniknúť do krvného obehu matky už v priebehu tehotenstva, ak sa poruší placentárna bariéra. Toto množstvo je väčšinou príliš malé, takže stimulácia matky nepredstavuje veľké nebezpečenstvo pre plod. Matka môže byť senzibilizovaná aj pri predchádzajúcich potratoch Rh<sup>-</sup> plodu alebo transfúziách Rh<sup>+</sup> krvi. V takýchto prípadoch môže byť poškodené už prvé dieťa.

K príznakom poškodenia plodu patri **hemolytická anémia a žltacka**. V krvi sa hromadí bilirubín, ktorý pri prekročení určitej koncentrácie poškodzuje centrálny nervový systém (mozgové jadrá). Odpoveďou na rozpad erytrocytov je zvýšená krvotvorba, pri ktorej dochádza k vyplavovaniu nezrelých erytroblastov. Preto sa uvedené poškodenie označuje **fetálna erytroblastóza**. Poškodeniu plodu je možné predísť podaním anti-D protilátok matke do 72 hodín po senzibilizujúcej dávke Rh<sup>-</sup> erytrocytov (po pôrode).

Súčasná inkompatibilita v AB0 a Rh systéme môže v určitých situáciách zabrániť negatívnym dôsledkom Rh imunizácie. Matka s krvnou skupinou 0, Rh<sup>-</sup> bude svojimi prirodzenými protilátkami anti-A, anti-B spôsobovať deštrukciu erytrocytov plodu Rh<sup>+</sup> s A alebo B antigénmi, ktoré sa prípadne dostanú do jej obehu. V dôsledku toho nevznikne senzibilizácia matky v systéme Rh.

### 10.1.1.5 Systém MNS

(ISBT symbol: MNS; ISBT číslo: 002; Symbol génu: GYPA a GYPB; počet antigénov: 43)

Je geneticky pomerne komplikovaný systém, objavený Landsteinerom a jeho kolegami ako druhý v poradí po AB0 systéme. Prvé antigény tohto systému, M a N, sa podarilo objaviť antisérami (anti-M, resp. anti-N) získanými imunizáciou kráľikov ľudskými erytrocytmi.

Kódovaný je dvoma gémi GYPA a GYPB ležiaci na chromozóme č.4. V blízkosti GYPB sa nachádza ešte tretí gén GYPE, ktorý sa môže podieľať na tvorbe nových variantných alel.

GYPA gén má dve kodované alelické formy MNS1 a MNS2, ktoré produkujú M resp. N antigén. Uvedené antigény sa medzi sebou líšia v dvoch koncových aminokyselinách. Sú možné tri genotypy MNS1/MNS1, MNS1/MNS2, MNS2/MNS2 a tomu zodpovedajúce tri fenotypy M, MN a N.

GYPB gén má tiež dve alely (MNS3 a MNS4), ktoré kódujú antigény S a s líšiacie sa v jednej aminokyseline. V jednotlivých rodokmeňoch sa však S prenáša vždy spolu s M, kým v iných vždy spolu s N; v rámci populácie ako celku je M častejšie asociovaná s S a N s s.

MNS systém kóduje hlavne erytrocytárne antigény, ktoré sú glykoproteínovej povahy (glykoformíny). Tiež je exprimovaný v endotele kapilár obličiek a epitele. Za antigénu špecifickosť je zodpovedná proteínová časť. Glykoformíny A a B môžu slúžiť ako receptory pre cytotoxiny, baktérie a vírusy, ale ich prítomnosť nie je fyziologicky nevyhnutná. Navyše jedinci s raritným fenotypom, ktorý nemajú uvedené glykoformínové antigény sú rezistentní voči infekcii Plasmodium falciparum, spôsobujúcom maláriu.

Aj keď je MNS systém geneticky zaujímavý, má menší klinický význam, pretože ľudia zvyčajne nereagujú silnou imunitnou reakciou na tieto antigény. Pre kodované dedičnosti a pre vhodnú populačnú frekvenciu alel sa však veľmi dobre uplatňujú pri riešení otázok sporného otcovstva. Frekvencie najčastejšie sa vyskytujúcich antigénov MNS systému v kaukazskej populácii sú: M -78%, N -72%, S -55%, s -89%.

### 10.1.1.6 Skupinový systém Lewis

(ISBT symbol: LE; ISBT číslo: 007; Symbol génu: FUT3; počet antigénov: 6)

Antigény Lewis (čítaj luis), ktoré určujeme na erytrocytoch bežným vyšetrením pomocou diagnostických sér, nie sú integrálnou časťou erytrocytov. Majú glykoproteínový charakter a nevytvára ich krvotvorné, ale zŕňavé tkanivo ľudského tela, tvoriace výlučky. Na erytrocyty sú absorbované z plazmy. Epitopy antigénov tejto skupiny sú primárne oligosacharidy, ktorých štruktúra a genetická kontrola syntézy je dobre známa.

Rozpustné plazmatické antigény Le<sup>a</sup> a Le<sup>b</sup> sú geneticky determinované génom FUT3 na chromozóme č. 19, ktorý má dve alely Le a le, medzi ktorými je vzťah dominance a recesivity. Tvorba antigénov Lewis systému je analogická s tvorbou antigénu AB0 systému, kde je potrebná súčasnosť dvoch rôznych lokusov. Na tvorbe antigénov LE systému sa podieľa aj už spomínaný gén FUT2, ktorý kóduje enzým fukozyltransferázu 2 (lokus sekretór). Ak je enzým FUT2 aktívny (genotyp SeSe alebo Sese, fenotyp: sekretór) následná fukozylácia enzýmom FUT3 vedie k vytvoreniu antigénu Le<sup>a</sup>. Ak je enzým FUT2 neaktívny (genotyp sese, fenotyp: nonsekretór) prekurzorová molekula je fukozylovaná len enzýmom FUT3. Takto vytvorený antigén sa nazýva Le<sup>b</sup> (obr.10-6). V prípade inaktívneho enzýmu FUT3 (genotyp: lele), antigény LE systému sa netvorí.

Medzi lokusom Sekretór a lokusom Lewis je vzťah nealelovej interakcie typu **dominantnej epistázy**. Dominantná alela z lokusu Sekretór potláča tvorbu antigénu Le<sup>a</sup> a pretransformuje tento antigén na Le<sup>b</sup>. Fenotyp erytrocytov je výsledkom absorpcie buď antigénu Le<sup>a</sup> alebo Le<sup>b</sup>.

Pôvod fenotypu Lewis na erytrocytoch:

**Nonsekretóri AB0 (se/se)**, ktorí zdedili alelu Le, majú fenotyp erytrocytov **Le(a+b-)**.

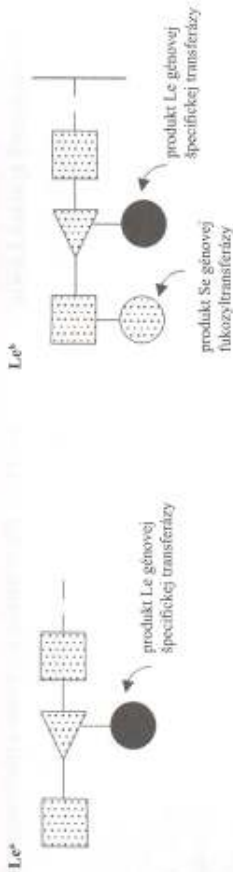
**Sekretóri AB0**, ktorí zdedili alelu Le, majú fenotyp erytrocytov **Le(a-b+)**.

Bez ohľadu na prítomnosť alely Se, ak jedinec má genotyp le/le, fenotyp erytrocytov je **Le(a-b-)**.

	genotyp Le/Le alebo Le/le	genotyp le/le
Nonsekretóri (nevyučovateľia) se/se	Le (a+b-)	Le (a-b-)
Sekretóri (vyučovateľia) Se/se alebo Se/Se	Le (a-b+)	Le (a-b-)

V prípade krvnoskupinového systému Lewis existujú dve protilátky (anti-Le<sup>a</sup> a anti-Le<sup>b</sup>). Protilátky anti-Le<sup>a</sup> a anti-Le<sup>b</sup> majú prirodzený charakter, sú typu IgM a najčastejšie reagujú pri nízkych teplotách.





Obr. 10-6. Schematické znázornenie štruktúr antigénov  $Le^a$  a  $Le^b$ .  
(□ : D-galaktóza Δ : N-acetylglykozamin ○ : L-fukóza)

### 10.1.1.7 Systém Xg

(ISBT symbol: Xg; ISBT číslo: 012; Symbol génu: XG; počet antigénov: 2)

Má mimoriadne postavenie v genetike vďaka lokalizácii zodpovedného lokusu na X-chromozóme. Na tomto lokuse sú dve alely:  $Xg^a$  utvára fenotyp  $Xg(a+)$  a  $Xg$  utvára fenotyp  $Xg(a-)$ , t. j. žiadny detekovateľný antigén. Ide teda o vzťah dominance a recesivity.

Početnosť alely  $Xg^a$  v Európe sa pohybuje okolo 67%. To je súčasne aj početnosť  $Xg(a+)$  mužov, početnosť  $Xg(a+)$  žien je asi 89%. Xg systém nemá žiadny klinický význam, je významný ako fenotypový marker lokalizovaný na X-chromozóme. Krvná skupina Xg je príkladom X-viazanej dominantnej dedičnosti.

Možné genotypy a fenotypy obidvoch pohlaví sú takéto:

Muži		Ženy	
genotypy	fenotypy	genotypy	fenotypy
$Xg^aY$	$Xg(a+)$	$Xg^aXg^a$	$Xg(a+)$
		$Xg^aXg$	$Xg(a+)$
$XgY$	$Xg(a-)$	$XgXg$	$Xg(a-)$

### 10.1.1.8 Systém Kell

(ISBT symbol: KEL; ISBT číslo: 006; Symbol génu: KEL; počet antigénov: 25)

Bol pomenovaný podľa p. Kelleherovej, ktorej sa narodili štyri deti, jedno zdravé, dve zomreli skoro po narodení a štvrté sa narodilo s hemolytickou chorobou novorodencov. Žena, manžel a štvrté dieťa boli  $Rh^+$ . U ženy sa zistila prítomnosť protilátok, ktoré sa označili anti-K a antigén sa označil ako K.

Tento silne imunogénny systém je geneticky veľmi polymorfný čo vedie k tvorbe početných antigénov. Rozlišované sú hlavne dve kodominantné alely  $K$  a  $k$  (predtým známe ako Kell a Cellano). V kaukazskej populácii je nasledovné zastúpenie fenotypov ( $K-k+$ : 91%;  $K+k-$ : 0.2%;  $K+k+$ : 8.8%). Väčšinu v kaukazskej populácii teda tvoria homozygoti  $kk$  (fenotyp  $K-k+$ ). Keď sa títo ľudia dostanú opakovane do styku s pomerne silne imunogénnym antigénom  $K$ , vytvoria protilátka anti-Kell, ktorá pri styku s antigénom Kell vyvolá ťažkú hemolytickú potransfúznú reakciu. Na mnohých transfúzných oddeleniach je preto zavedené vyšetrenie antigénu  $K$  u darcov krvi a príjemcov, aby sa zamedzilo aloimunizácii. Aloimunizácia anti-k je zriedkavá, lebo protilátka môže vytvoriť len jedinec s genotypom

$KK$ , čo predstavuje 0.2%. Tudiž. Systém Kell má klinický význam podobne ako systém  $Rh$  z hľadiska hemolytickej choroby novorodencov.  $K$ -negatívna ( $K-k+$ ) matka môže tvoriť protilátky proti  $K$ -pozitívnym krvinkám plodu čo spôsobí veľmi silnú fetálnu anémiu.

### McLeodov syndróm

Kell glykoproteín sa svojou enzymatickou aktivitou podieľa na vazokonstrikcii čiev. V membráne erytrocytov je kovalentne viazaný na XK proteín, ktorý zohráva úlohu v transporte látok. Ak chýba proteín XK, Kell antigény sú len slabšie prezentované na povrchu erytrocytov. Absencia XK proteínu vedie k multisystémovému syndrómu (tzv. McLeod syndróm). Pacienti s fenotypom McLeod majú akantocytózu (na hemolytickom preparáte majú erytrocyty vzhľad gaštanovej šupky s ostrými výbežkami) a hemolytickú anémiu. Systémové nálezy zahŕňajú: muskulárnu distrofiu, kardiomyopatiu, psychiatrické poruchy, neurologické defekty. XK proteín je v súčasnosti už považovaný za samostatný krvnoskupinový systém, ktorého gén sa nachádza na X-chromozóme.

### 10.1.1.9 Systém Duffy

(ISBT symbol: FY; ISBT číslo: 008; Symbol génu: FY; počet antigénov: 6)

Geneticky je determinovaný génom na q ramene chromozómu č. 1. Na tomto lokuse sa môžu nachádzať tri alely -  $FY^a$ ,  $FY^b$ , ktoré sú navzájom kodominantné a afunkčná alela  $FY$ , ktorá je recesívna k predchádzajúcim alelám a vyskytuje sa takmer výlučne len u Afričanov. Antigény  $FY^a$  a  $FY^b$  sa navzájom odlišujú v jednej aminokyseline.

Genotyp	Fenotyp	Kaukazská p.	Približná frekvencia Černosi
$FY^aFY^a$			
$FY^aFY$	$FY(a+b-)$	0,17	0,09
$FY^bFY^b$	$FY(a+b+)$	0,49	0,01
$FY^aFY^b$			
$FY^bFY$	$FY(a-b+)$	0,34	0,22
$FYFY$	$FY(a-b-)$	nizka	0,68

Duffy antigény sú prítomné na rôznych typoch buniek. Duffy glykoproteín slúži ako receptor pre látky vznikajúce pri zápalových procesoch. Tiež môže fungovať ako receptor pre pôvodcu trojdňovej malárie prvokovi Plasmodium vivax, častým parazitom najmä v subsaharovej oblasti Afriky. Jedinci s fenotypom  $FY(a-b-)$  sú preto pred týmto parazitom chránení. Selektívna výhoda fenotypu  $FY(a-b-)$  v endemických oblastiach malárie spôsobila jeho zvýšenú frekvenciu predovšetkým v západnej Afrike i keď v väčšine iných populácií sveta sa takmer vôbec nevyskytuje. Pravdepodobne ide o dôsledok dlhodobej selekcie, pri ktorej selekčným činiteľom bola malária. Systém  $FY$  má menší klinický význam, pretože ľudia zvyčajne reagujú len mierou reakciou na tieto antigény.

### 10.1.1.10 Systém Kidd

(ISBT symbol: JK; ISBT číslo: 009; Symbol génu: SLIC14A1; počet antigénov: 3)

Ulohou transmembránového proteínu Kidd je transport ury, čím sa podieľa na udržaní osmotickej stability. Nachádza sa v membráne erytrocytov ako aj v obličkách (vasa recta). Ľudia, ktorí nemajú exprimovaný gén pre tento proteín majú zníženú schopnosť koncentrovať moč avšak bez závažných dôsledkov na ich zdravotný stav. Gén sa nachádza na 18 chromozóme a má dve kodominantné alely  $Jk^a$  a  $Jk^b$  spájajúce sa so 4 možnými fenotypmi. Zastúpenie fenotypov



v kaukazskej populácii je nasledovné: JK(a+b+):50%, JK(a-b+):23%, JK(a-b-) veľmi raritný, nájdený u Polynézanov vo frekvencii 0,9%. U jedincov JK(a-b-) bola popísaná protilátka anti-JK3.

Protilátky proti antigénom Kidd systému sú považované za nebezpečné protilátky, pretože sú ťažko detekovateľné pri rutinej križovej skúške. Môžu spôsobiť veľmi silnú oneskorenú hemolytickú transfúziu reakciu, ktorá sa prejaví 1.-14. deň po transfúzii ako aj zvyčajne slabšiu hemolytickú chorobu novorodencov.

### 10.1.1.11 Systém Lutheran

(ISBT symbol: LU; ISBT číslo: 005; Symbol génu: LU; počet antigénov: 19)

Je geneticky determinovaný génom na lokuse chromozómu č. 19, ktorý je súčasťou veľkého klastra viazaných lokusov. Existuje veľa alel systému Lutheran, najvýznamnejšie sú  $L_u^a$  a  $L_u^b$  s kodominantným vzťahom. Alela  $L_u^a$  má frekvenciu 0,04 a  $L_u^b$  0,96. Systém krvných skupín Lutheran je významný z genetického hľadiska, lebo väzba medzi týmto génom a génom Sekretór bola prvou známou väzbou na autozómoch u človeka.

### 10.1.2. Hlavný histokompatibilný systém – HHK

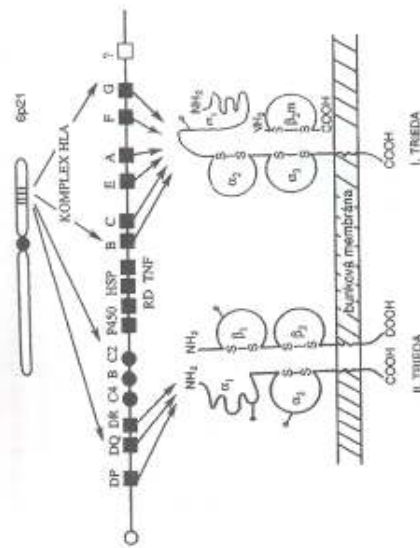
Systém HHK je najzložitejší a najkomplexnejší systém skupinových antigénov. Pre svoju biologickú významnosť sa označuje ako *hlavný histokompatibilný komplex* (Major histocompatibility system-MHC). Názov histokompatibilný (histokompatibilita – tkanivová znášanlivosť) dostal preto, že tieto antigény sa správajú ako transplantácie. HHK sa nachádza len pričinou odvrhnutia tkaniva pri inkompatibilných transplantáciách. HHK sa nachádza len u vyšších živočíchov a u človeka je označovaný ako HLA (Human Leukocyte Antigene), pretože na týchto bunkách bol prvýkrát študovaný. HLA antigény sú glykoproteínové molekuly nachádzajúce sa v membráne ľudských buniek. Charakterizujú individuálnu antigénnu štruktúru-identitu každého jedinca. Fyziologickou funkciou molekúl tohto systému je **predkladanie antigénov** (resp. ich fragmentov) bunkám imunitného systému.

#### 10.1.2.1. Genetika a organizácia HLA systému

HLA systém je determinovaný génmi v silnej väzbe na krátkom ramene chromozómu č. 6. Táto oblasť sa skladá z veľkého počtu lokusov, pre ktoré existuje celý rad odlišných alel (*multialelový alelizmus*) s kodominantnou dedičnosťou. Počet známych alel HLA systému neustále narastá. V januári 2007 bolo v IMGT/HLA databáze (ImMunoGeneTics project-IMGT) popísaných 2 683 alelových sekvencií, pričom databáza je obnovovaná každý mesiac.

Tabuľka 10-4. Počet detekovaných alel v najvýznamnejších HLA lokusoch (január 2007).

Trieda antigénov	Lokus (oblasť)	Počet alel
I	A	506
	B	851
	C	276
II	DR	562
	DP	149
	DQ	115



Obrázok 10-7. Génová mapa HLA komplexu na chromozóme č. 6.

Celý supergén je možné z hľadiska štruktúry a funkcie produktov rozdeliť do troch oblastí alebo tried. Ich poradie v smere od centroméry je II, III, I. Medzi známym počtom funkčných génov sa nachádzajú aj pseudogény. Najdôležitejšie lokusy **I. triedy** sú označované **HLA-A, B, C** (poradie od centroméry B, C, A). Okrem nich sa tam nachádzajú gény označované ako E, F, G. V oblasti **II. triedy** nazývanej **HLA-D** sú najvýznamnejšie podoblasti označované ako E, F, G. Ďalej sú tu podoblasti HLA-DO, DM, DN. Gény I. a II. triedy sú štrukturálne a funkčne príbuzné. Predpokladá sa, že vznikli duplikáciou z pôvodného spoločného génu. Medzi týmito lokusmi sa nachádza oblasť **III. triedy**, ktorá do HHK oblasti bola prenesená chromozómovými prestavbami počas evolúcie. Kóduje napr. zložky komplementu, Hsp (heat shock protein), TNF (tumor necrosis factor) a pod.

#### Nomenklatúra HLA alel

Každá HLA alela má svoje zvyčajne štvormiestne číslo. Počet číslic závisí od sekvencie danej alely. 6 a 8 číslicové formy sú používané len keď je to nevyhnutné. Prvá a druhá číslica označuje typ antigénu tretia a štvrtá číslica označuje subtyp. Alely, ktorých číslice sa líšia na prvých štyroch pozíciách kódujú antigény líšiac sa aspoň v jednej aminokyseline. Substitúcie nukleotidov v kódujúcej oblasti, ktoré nevedú k zámene aminokyseliny (tzv. *tišie mutácie*) sú odlišné od pôvodnej alely zmenou číslic na piatej a šiestej pozícii. *Polymorfizmy v intrónoch a neprekodovaných oblastiach* sú odlišné číslicami na siedmej a ôsmej pozícii. Okrem toho na konci označenia alely sa môžu nachádzať písmena N, L, S, Q (N-nulová alela, L-alela s nízkou expresiou, S-kóduje proteín vyskytujúci sa len v sekrebnej forme, Q-alela s ešte nepotvrdenou expresiou).

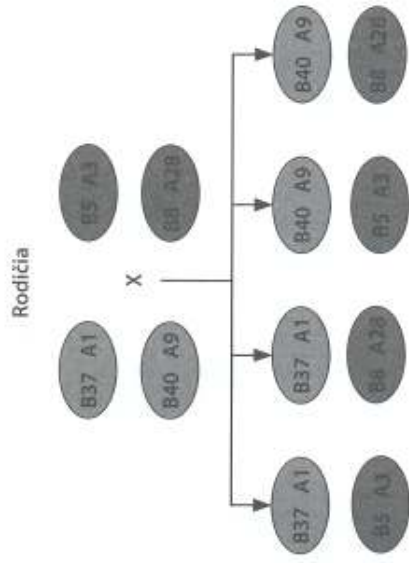
Tabuľka 10-5. Prikklady značenia HLA alel.

Nomenklatúra	Indikácia
HLA	HLA gén
HLA-DRB1	konkrétny HLA lokus, napr. DRB1
HLA-DRB1*13	skupina alel kódujúcich DR13 antigén
HLA-DRB1*1301	špecifická HLA alela
HLA-DRB1*1301N	nulová alela
HLA-DRB1*130102	alela s tichou mutáciou
HLA-DRB1*13010102	alela s mutáciou mimo kódujúcej oblasti



Je dokázané, že v desaťmiliónovej populácii je len malá pravdepodobnosť, že dvaja jedinci budú zhodní vo výbeve HLA antigénov, preto pri transplantácii orgánov je potrebná aj medzinárodná spolupráca. Pri transplantácii je požadovaná zhoda v AB0 antigénoch a čo najvyššia možná zhoda v HLA antigénoch. Transplantovaný orgán nesmie obsahovať silné antigény, ktoré sa nenachádzajú u príjemcu, lebo príjemca proti nim reaguje silnou imunitou odpoďou.

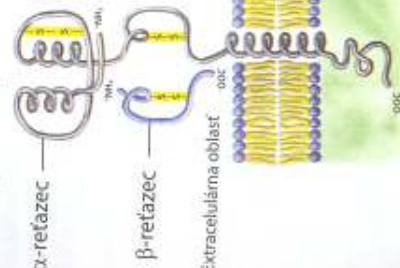
V súčasnosti nepoznáme na nijakom lokuse HLA všetky alely. Z hľadiska genetiky rozoznávame u každého jedinca fenotyp a genotyp. Fenotyp je skladba antigénov, tak ako ich sérologicky určíme na lymfocytoch. Pri obmedzení na tri lokusy to je napr.: HLA-A1, 9; B37, 40; C2. Genotyp udáva dvojicu alel daného lokusu (HLA-A1A9 B37B40 C2C2). Haplotyp je skupina tesne viazaných alel na jednom chromozóme, ktoré sa dedia spolu ako jednotka. Od každého rodiča dedí jedinec jeden haplotyp, celkovo má dva haplotypy. Jedinec s už spomínaným fenotypom môže mať haplotypy HLA-A1B37C2/A9B40C2, ale aj napr. HLA-A1B40C2/A9B37C2. Záleží to od vzájomného usporiadania alel na chromozómech jeho rodičov. Dedičnosť podľa Mendela nie je v systéme HLA absolútna, pretože výnimočne (asi v 3 % prípadov) dochádza v procese gametogenézy ku rekombináciám (crossing-over).



Možné haplotypové kombinácie detí

Obrázok 10-8. Dedičnosť haplotypových kombinácií 2 lokusov HLA systému.

### Molekuly I. triedy HLA



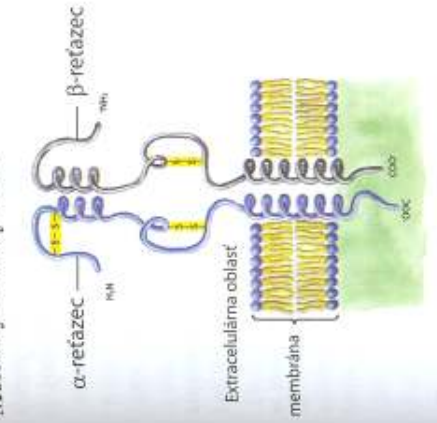
Molekuly HLA-A,B,C sú klasické transplantlačné antigény a sú vysoko polymorfne. Molekuly I triedy HLA ukotvené v membráne všetkých somatických buniek s jadrom. Skladajú sa z dvoch nekovalentne viazaných polypeptidových reťazcov: ťažkého- $\alpha$  a ľahkého beta; mikroglobulinového reťazca -  $\beta_2m$ .

$\alpha$  reťazce sú glykoproteíny o dĺžke 350 amk. Majú tri funkčné oblasti: externú, transmembránovú a cytoplazmatickú. Externá oblasť sa skladá z troch domén:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , pričom domény  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  sú variabilné.  $\beta_2m$  je rozpustný glykoproteín zložený z 99 aminokyselín. Gén pre  $\beta_2m$  neleží v HLA komplexe, ale je lokalizovaný na 5. chromozóme. Jeho primárna štruktúra je evolučne vysoko konzervovaná. Oba reťazce vytvárajú diméry na bunkovom povrchu za vzniku zložitej terciárnej a kvartérnej štruktúry.  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  domény vytvárajú na vrchole molekuly „zliabok“, ktorý je väzbovým miestom.

Molekuly I. triedy prezentujú endogénne syntetizované antigény napr. vírusové proteíny. Tieto proteíny sú v cytoplazme degradované za pomoci proteazómov. Proteazómy sú veľké proteínové komplexy nachádzajúce sa v jadre a v cytoplazme. Ich hlavnou úlohou je proteolytické štiepenie nepotrebných proteínov. Výsledkom degradácie sú zvyčajne molekuly o dĺžke 8-18 aminokyselín.

Takto naštiepené peptidy sú špecificky transportované do endoplazmatického retikula, kde sú spájané s molekulami I. triedy HLA ak majú príslušný sekvenčný motív. Za pomoci ďalších proteínov je komplex stabilizovaný a transportovaný cez Golgého aparát až k cytoplazmatickej membráne.

### Molekuly II. triedy HLA

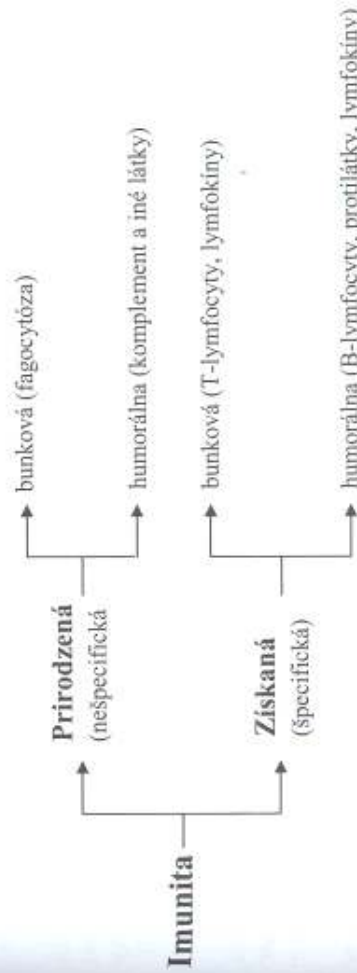


Molekuly II. triedy nemajú takú širokú tkanivovú distribúciu ako HLA I triedy. Ich distribúcia na bunkových povrchoch je obmedzená – vyskytujú sa na niektorých imunokompetentných bunkách: monocytoch, makrofágoch, B-lymfocytoch, dendritických a Langerhansových bunkách ako aj endotelových a epitelových bunkách. Významne sa uplatňujú pri bunkových kooperáciách.

Molekuly II. triedy sú heterodimery zložené z jedného  $\alpha$  reťazca (229-233 amk) a jedného  $\beta$  reťazca (225-238 amk). Oba sa skladajú z externej, spojovacej, transmembránovej a cytoplazmatickej oblasti. Extracelulárna časť je tvorená doménami  $\alpha_1, \alpha_2$ , ako aj  $\beta_1$  a  $\beta_2$ . Domény  $\alpha_1$  a  $\beta_1$  sú variabilné,  $\alpha_2$  a  $\beta_2$  konštantné. Gény pre  $\alpha$  a  $\beta$  reťazce sú súčasťou génov HLA systému.

Molekuly II. triedy HLA prezentujú exogénne antigény, ktoré sa do bunky dostali endocytózou. Endozómy v bunke splyvajú so špecializovanými lyzozómami, kde sú antigénne molekuly čiastočne natrávené. Následne sú špecifické peptidové fragmenty asociované s molekulami II. triedy HLA a zabudované do bunkovej membrány.

## 10.2. Mechanizmy imunitnej odpovede





Rôzne typy imunitných odpovedí môžeme zaradiť do dvoch základných skupín:

- 1) **prírodná, nespecifická, vrodená**, ktorá funguje ako prvá obranná línia proti infekcii. Spočíva v uvoľňovaní interferónov, produkcii antibakteriálnych peptidov, aktivácii komplementového systému, rôznych proteolytických kaskád či aktivácii NK lymfocytov (NK-natural killer cells, prirodzení zabijáci). Fagocytujúce bunky (monocyty, makrofágy, neutrofile) používajú primitívne nšpecifické rozpoznávacie systémy. Naviažu a pohltia (fagocytóza) mikroorganizmy a zneškodnia ich;
- 2) **získaná, špecifická (adaptívna)**, ktorá je vysoko špecifická, nastupuje po určitej dobe po vniknutí cudzodrodých látok do organizmu, ak ich nšpecifické mechanizmy nie sú schopné odstrániť. Uplatňujú sa pri nej hlavne *lymfocyty*, ktoré prostredníctvom svojich receptorov rozpoznávajú antigény mikroorganizmov ako aj nádorových či transplantovaných buniek. Ďalej sa budeme bližšie zaoberať **špecifickou imunitou**.

### 10.2.1. Špecifická imunitná odpoveď

Mechanizmy špecifickej imunitnej odpovede nastupujú až po určitej dobe pretrvávania cudzích látok v organizme, pričom ústredné postavenie v tomto procese majú dve odlišné populácie lymfocytov líšiacich sa pôvodom ako aj funkciou.

Bunky imunitného systému ako aj iné typy buniek charakterizuje súbor antigénov (znakov), ktoré sa objavujú v bunkovej membráne alebo v cytoplazme v určitom vývinovom štádiu, pretrvávajú v nej určitý čas alebo zostávajú ako charakteristický znak až do jej zániku. Pre tieto vlastnosti sa označujú ako *differentiačné antigény* (cluster of differentiation - CD). Niektoré CD sa nachádzajú na všetkých T-aj B-lymfocytoch, iné sú zase špecifické iba pre určitú podskupinu. Okrem toho sa niektoré CD vytvárajú len po aktivácii bunky.

#### 10.2.1.1. Lymfocyty

**T-lymfocyty** sú zodpovedné za **bunkami sprostredkovanú imunitnú odpoveď**, resp. *cytotoxicitu*. Vznikajú z kmeňových buniek v kostnej dreni, ale funkčne dozrievajú v týmuse. V mikroprostredí týmusu dochádza k veľkej diverzifikácii lymfocytov. Vznikajú desiatky miliónov rôznych T-buniek, **líšiacich sa v membránových proteínových receptoroch**, čím je každej T-bunke umožnené špecificky rozpoznať jeden určitý cudzí antigén. Diverzifikácia proteínových receptorov je podmienená molekulovo-genetickým mechanizmom zoskupovania genových segmentov pri tvorbe funkčného genu pre určitý T-receptor. T-lymfocyty majú dôležité úlohy: riadia spoluprácu rôznych buniek imunitného systému, môžu priamo napadať somatické bunky, ktoré boli nainfikované vírusmi alebo sa nádorovo zvrhli a spôsobujú odvrhnutie tkanivových štepov. Z funkčného hľadiska T-lymfocyty delíme na:

- **pomocné (helper)- T<sub>H</sub>-lymfocyty**, označované tiež CD4+ T-lymfocyty (podľa prítomnosti membránových diferenciačných antigénov-CD). Zabávajú imunitnú reakciu rozpoznávaním cudzích povrchových antigénov buniek, proliferujú a vylučujú rozpustné látky lymfokíny, ktoré ovplyvňujú činnosť iných lymfocytov. Sú zodpovedné za spoluaktiváciu B-lymfocytov a tým aj za tvorbu protilátok tým, že ich stimulujú k proliferácii, podporujú funkciu prirodzených zabijáčov (natural killer cells) a makrofágov.

- **cytotoxické - T<sub>C</sub>-lymfocyty**, označované tiež CD8+, ktorých činnosť spočíva v objavovaní a ničení buniek infikovaných vírusmi, baktériami, parazitmi. Vedia rozpoznať nádorové bunky vlastného tela a mutované bunky. Produktujú toxín perforin, ktorý naruša - lyzuje plazmatickú membránu abnormálnej bunky.

- **pamät'ové (memory)- T<sub>M</sub>-lymfocyty**, dľhožijúce bunky (20 - 30 rokov), aktivujú sa v prípade potreby zosilnenia imunitnej odpovede.

- **supresorové - T<sub>S</sub>-lymfocyty**, s dôležitou úlohou pri regulácii imunitnej odpovede, produkujú substancie, ktoré potlačajú hyperaktivitu populácie T-lymfocytov. Vypínajú imunitnú odpoveď, aby nedochádzalo k poškodzovaniu vlastných telových buniek.

**B-lymfocyty** sú zodpovedné za **humorálnu - protilátkami sprostredkovanú imunitu**. Vznikajú a dozrievajú v kostnej dreni. Tu vzniká veľké množstvo B buniek s odlišným povrchovým receptorom. Receptory B-lymfocytov predstavujú protilátky - imunoglobuliny IgM a IgD. Po vyzretí v kostnej dreni B-lymfocyty migrujú do krvi a periférnych lymfatických orgánov. Každý B-lymfocyt je naprogramovaný na tvorbu špecifickej **protilátky**. Po sretnutí s cudzím špecifickým antigénom, ktorý je rozpoznávaný príslušným membránovým receptorom B lymfocytu sa aktivujú a proliferujú v klon plazmatických buniek produkujúcich relatívne idenické protilátky. Plazmatické bunky s výrazne vyvinutým drsným endoplazmatickým retikulom syntetizujú a vylučujú veľké množstvo príslušných protilátok. Protilátky cirkulujú v telových tekutinách, kde sú schopné špecificky sa viazať s cudzím antigénom, ktorý indukoval ich tvorbu pričom do živých buniek neprenikajú. Časť B-lymfocytov sa mení na tzv. *pamät'ové bunky*, ktoré si po prvom stretnutí s cudzou látkou zachovávajú dlhodobé informácie, a preto sú schopné pri opätovnom stretnutí s tým istým antigénom reagovať rýchlejšie a intenzívnejšie.

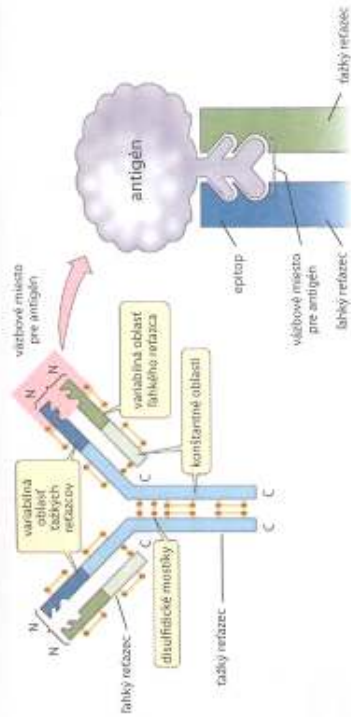
#### 10.2.1.2. Protilátky

Protilátky sú glykoproteíny patriace do veľkej imunoglobulinovej rodiny (Ig). Svoju aktivitou sú schopné špecificky viazať antigén. Ig jednak cirkulujú v telesných tekutinách, jednak sú zakotvené v membránach B-lymfocytov, kde fungujú ako špecifické receptory pre antigény. V krvnom sére sa Ig nachádzajú v gamaglobulinovej frakcii. Vyskytujú sa aj v slinách, nosovom sekréte, pote, materskom mlieku a kolostre. Charakteristickým znakom protilátok je diverzita umožňujúca rozpoznávanie veľkého počtu cudzích molekúl, pričom každá Ig molekula je špecifická pre jeden antigénny determinant.

#### Štruktúra imunoglobulinovej molekuly

Každý Ig obsahuje aspoň jednu základnú štruktúrnu jednotku-monomér, čo je proteín podobný písmenu ypsilon. Monomér je tvorený 4 polypeptidovými reťazcami tj. tetramérmymi proteínmi (obr. 10-9). A to z jedného páru rovnakých dlhých (*ťažkých reťazcov* (H-heavy) a z jedného páru rovnakých krátkych (*ľahkých reťazcov* (L-light)). Reťazce sú navzájom spojené kovalentnými disulfidickými väzbami. Existuje 5 typov ťažkých reťazcov:  $\mu$  (mí),  $\gamma$  (gama),  $\delta$  (delta),  $\alpha$  (alfa) a  $\epsilon$  (epsilon) na základe ktorých rozlišujeme **5 hlavných tried imunoglobulínov** (izotypov).





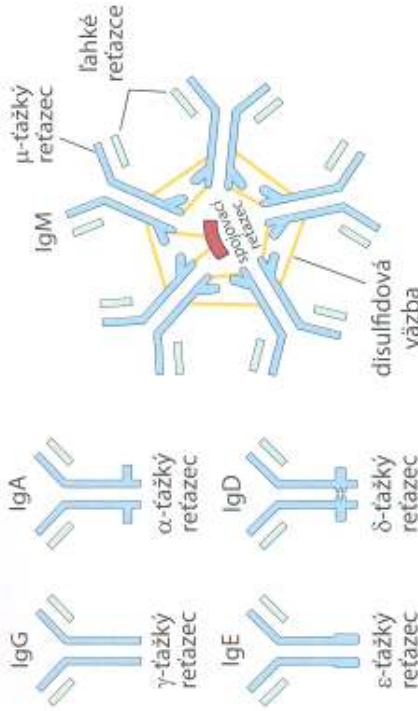
**Obrázok 10-9.** Schematické znázornenie molekuly protilátky. Výsledný tetramér sa skladá z dvoch rovnakých ťažkých reťazcov a z dvoch ľahkých reťazcov. Väzbové miesto pre antigén je vo variabilnej časti ťažkého a ľahkého reťazca.

Ľahké reťazce sú dvojakého typu:  $\kappa$  (kappa) alebo  $\lambda$  (lambda). Ľahké reťazce sú zložené z 220 aminokyselínových zvyškov (amk), ťažké reťazce zo 440-550 zvyškov v závislosti od izotypu. Molekulová hmotnosť ťažkých reťazcov je približne 60 kDa a ľahkých reťazcov okolo 23 kDa. Každý ťažký a rovnako aj ľahký reťazec sa skladá z **konštantnej oblasti (C)** a z **variabilnej oblasti (V)**. Na každom reťazci môžeme preto rozlíšiť dva základné segmenty: konštantnú oblasť (na ťažkom reťazci označovanú ako HC, na ľahkom reťazci LC) a variabilnú oblasť (HV resp. LV). Variabilná oblasť sa nachádza na  $\text{NH}_2$  konci polypeptidových reťazcov (1.-110. amk). Konštantné oblasti ľahkých reťazcov sú tvorené 111. až 220. amk, ťažkých reťazcov 111. až 440. alebo 111. až 550. amk. **Subgén kódujúci konštantnú oblasť určuje zaradenie do hlavnej imunoglobulinovej triedy. Variabilná oblasť je zodpovedná za rozpovednú a väzbu antigénu.** V rámci variabilnej oblasti rozoznávame ešte hypervariabilné úseky CDrs- Complementarity Determining regions.

### Triedy imunoglobulínov

- **IgG** (ťažký reťazec  $\gamma$ ) – najrozšírenejší imunoglobulín, a to najmä v extracelulárnych tekutinách, kde zabezpečuje obranu proti mikroorganizmom a toxínom, prechádza placentou
- **IgM** (ťažký reťazec  $\mu$ ) – utvára pentamérnu molekulu, nachádza sa najmä v intravaskulárnom priestore a produkuje sa zvyčajou pri imunitnej odpovedi, je dôležitým činiteľom prvej obrannej línie proti bakteriám
- **IgD** (ťažký reťazec  $\delta$ ) – je pomerne rozšírený na povrchu lymfocytov a pravdepodobne pôsobí ako receptor pre antigén
- **IgA** (ťažký reťazec  $\alpha$ ) – existuje najmä ako monomér v plazme, ale v sekrétoch sliznice, kde je hlavným imunoglobulínom tvoriacim obranu vonkajších povrchov tela, sa nachádza vo forme diméru spojeného so sekrečným komponentom
- **IgE** (ťažký reťazec  $\epsilon$ ) – je dôležitý pri určitých parazitárnych infekciách a vyvoláva symptómy atopickej alergie.

Odhaduje sa, že ľudský organizmus môže vytvárať viac ako  $10^8$  rôznych molekúl protilátok. Tento počet zrejme je dostatočne veľký, aby bolo pripravené väzbové miesto pre akýkoľvek antigénny epitop, aj keď niekedy s nízkou afinitou. Protilátky sú tak ako všetky proteíny kódované génmi pre každý z reťazcov tetraméru. V genóme človeka sa však podľa najnovších údajov nachádza menej než 30 000 génov kódujúcich všetky proteíny. To, že ľudské telo je schopné vytvárať mnohonásobne viac protilátok, ako má človek génov, vysvetľuje stavebnicový princíp. Stavebnicová organizácia štruktúry protilátok a génov, ktoré ich kódujú.



**Obrázok 10-10.** Triedy imunoglobulínov.

### Diverzita protilátok

Ako prvý bol známy fakt, že embryonálne bunky či iné bunky dospelého jedinca majú väčší podiel genómovej DNA nesúcej gény pre Ig molekuly v porovnaní s bunkami zrejých B-lymfocytov. To znamenalo, že DNA v zrejých B-lymfocytoch musí podliehať reorganizácii, ktorá zahŕňa aj jej odstránenie. Diverzifikácia protilátok spočíva hlavne vo variabilite sekvencií aminokyselín vo väzbových miestach protilátky. Každá protilátka má tak unikátnu väzbovú špecifitu pre určitý antigén. Zdroj diverzity spočíva v štruktúre génu kódujúceho ľahké a ťažké reťazce imunoglobulínov a v schopnosti lymfocytov zostavovať a modifikovať tieto gény zostrihom.

Medzi mechanizmy diverzifikácie protilátok patrí:

### 1. Existencia mnohopočetných subgénov v rámci jednotlivých komplexov génov

- V genóme človeka sa nachádzajú **tri komplexy génov** (každý na inom chromozóme):
- a) pre ťažký reťazec (IGH)
  - b) pre ľahký reťazec kappa (IGK)
  - c) pre ľahký reťazec lambda (IGL)

**Tabuľka 10-6.** Predpokladaný počet funkčných subgénov pre jednotlivé variabilné segmenty IGH, IGK a IGL génových komplexov.

Segment	Ľahký reťazec		Ťažký reťazec
	$\kappa$	$\lambda$	H
V	40	31	51
D	0	0	25
J	5	4	6
Počet kombinácií	200	124	16 218



Každý komplex génov je rozdelený na segmenty, v rámci ktorých rozlišujeme subgény. Génové kóplexy pre ľahké reťazce sú usporiadané do troch odlišných segmentov V-J-C. C segment kóduje konštantnú oblasť, V segment kóduje variabilnú oblasť a J (joining-spojencie) segment kóduje oblasť spájajúcu V a C oblasti. Génový komplex pre ťažký reťazec má štyri segmenty - V-D-J-C. Okrem C, V a J segmentov má ešte D (diversity) segment nachádzajúci sa medzi J a V segmentami.

## 2. Somatická rekombinácia (VDJ resp. VJ rekombinácia)

Ťažké a ľahké reťazce sú kódované tzv. komplexnými génni. Tie sa skladajú z veľkého počtu subgénov, ktoré sa môžu voľne kombinovať. Rozmanitosť protilátok je teda spôsobená kombináciou týchto subgénov. Proces prestavby a spájania subgénov sa uskutočňuje v priebehu diferenciácie B-lymfocytov, ktoré vytvárajú protilátky. Každý nezrelý lymfocyt obsahuje veľké množstvo subgénov pre tvorbu Ig. Z nich však len tri resp. štyri sú prekladané do jazyka bielkovín. Teda po jednom V, J, C subgéne v prípade ľahkých reťazcov a po jednom V, D, J a C v prípade ťažkých reťazcov.

Z tabuľky 10-6. vyplýva, že voľnou kombináciou subgénov môže vzniknúť  $40 \times 5 = 200$  rôznych typov kappa reťazcov. Podľa rovnakého princípu vzniká 124 kombinácií pre reťazec lambda. Výpočet kombinácií pre ťažký reťazec je zložitejší, pretože D-segmenty môžu byť „šitane“ (a teda aj prekladané) vo všetkých troch možných číaciach rámcoch tzn. že celkový počet možných produktov D oblasti by teoreticky mohol byť  $3 \times 25 = 75$ . Avšak v skutočnosti existuje len 53 funkčných číaciach rámcov, pretože niektoré čítacie rámce spôsobujú predčasné zavedenie stop kodónu. Takže výsledný počet možných zoskupení segmentov variabilnej časti ťažkého reťazca je  $16 \times 218 (51 \times 53 \times 6)$  a nie 7650.

## 3. Diversifikácia pri spíjaní

Pri preskupovaní V, D, a J subgénov môže dôjsť k malým modifikáciám v mieste ich vzájomného spájania. Často sú deletované niektoré koncové sekvencie rekombinujúcich sa subgénov, alebo môžu byť niektoré sekvencie pridané.

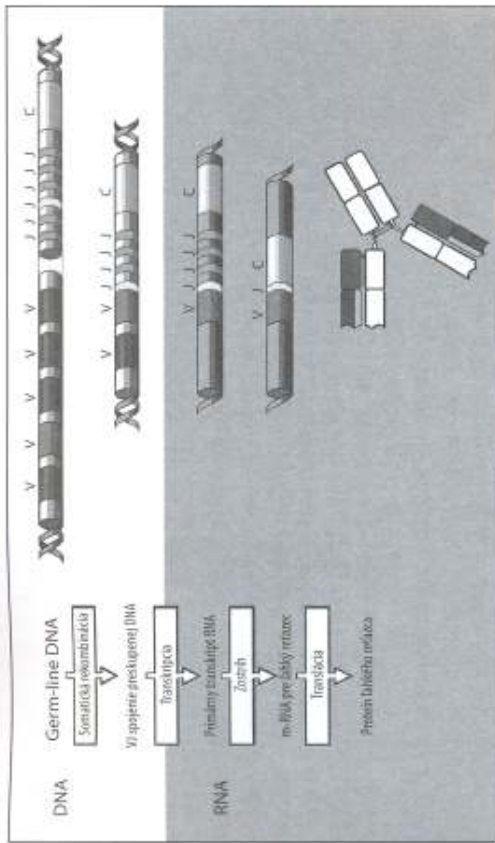
## 4. Mnohonásobné kombinácie ľahkých a ťažkých reťazcov

Ďalším zdrojom rozmanitosti protilátok je spájanie transláciou vytvorených ľahkých a ťažkých reťazcov do molekuly imunoglobulínu.

## 5. Somatické hypermutácie

Po stimulácii B-lymfocytov antigénom dochádza v priebehu ďalšieho diferenciálneho procesu k nahradeniu bodových mutácií v komplexoch kódujúcich V oblasť. Frekvencia mutácií v týchto miestach je zhruba miliónkrát častejšia než frekvencia mutácií v iných génoch.

V každom B-lymfocyte (diploidnom) je spolu 6 komplexných génov (resp. alel — 3 od otca a 3 od matky): dva gény IGH, dva gény IGK a dva gény IGL. Exprimuje sa stále len jeden gén, a to ten, na ktorom prebehla funkčná prestavba, čiže jeden pre ťažký a jeden gén pre ľahký reťazec. Predpokladá sa, že prestavba jedného komplexu génových segmentov pravdepodobne potláča prestavbu druhého komplexu, ktorý kóduje rovnaký typ polypeptidového reťazca. Je to zabezpečené pomocou mechanizmov, ktoré regulujú génovú expresiu len otcovského alebo len materského génového komplexu. Tento jav nazývame **alelová exklúzia**. Okrem toho, jedna bunka môže tvoriť ľahký reťazec len jedného typu (IGK alebo IGL). Tento jav nazývame **izotypová exklúzia**.



Obr.10-11. Schéma vzniku ľahkého reťazca imunoglobulinovej molekuly

## 10.2.2. Imunitná reakcia

Každá imunitná reakcia pozostáva s niekoľkých fáz.

### a) Rozpoznanie cudzích antigénov lymfocytmi a ich spracovanie

Imunokompetentné lymfocyty rozpoznávajú antigénne determinanty pomocou svojich receptorov, ktoré majú väzbové miesto so špecifickou afinitou pre určitý antigén. Receptory sa zvyčajne nachádzajú na povrchu buniek, ale aj na vnútornej strane plazmatickej membrány alebo v cytoplazme. B lymfocytom slúžia ako receptory imunoglobulinové molekuly (IgM, IgD). T bunkový receptor (TCR) je odlišný. T-lymfocyty rozpoznávajú antigén len vtedy, keď je im predkladaný v úzkom spojení s vlastnými HLA antigénmi triedy I. alebo triedy II. na **bunkách prezentujúcich antigén (APC)**. Tento jav sa nazýva **HHK restriktia**. Bunky prezentujúce antigén sú špecializované bunky v lymfatických uzlinách, slezine a koži. Makrofágy a B-lymfocyty tiež môžu slúžiť ako antigén prezentujúce bunky.

V širšom význame môžu byť za APC bunky považované aj akékoľvek somatické bunky infikované vírusom, ktoré prezentujú vírusové antigény v spojení s I triedou HHK.

Väzba medzi receptorom a epitopom sa uskutočňuje prostredníctvom nekovalentných interakcií medzi väzbovým miestom a ligandom. Čím viacej si epitop a receptor priestorovo odpovedajú, tým väčší počet väzieb môže vzniknúť a tým je aj väčšia celková pevnosť výslednej väzby. Spracovanie antigénu znamená jeho degradáciu na peptidové fragmenty. Tento dej sa odohráva v intracelulárnych organelách pôsobením proteolytických enzýmov. V bunke sú fragmenty asociované s molekulami HHK a následne vystavené na bunkový povrch.

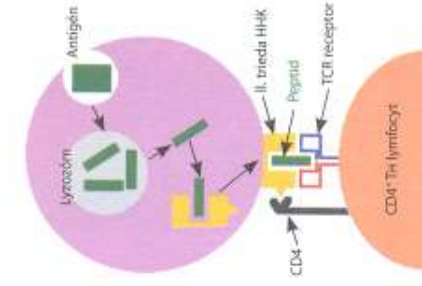
### b) Aktivácia lymfocytov

Po rozpoznaní antigénu sú lymfocyty aktivované. Vznikajú antigén-sPECIFICké bunkové klon, lymfocyty sa diferencujú do terminálnych efektorových buniek, ktoré sú schopné antigén z organizmu eliminovať.

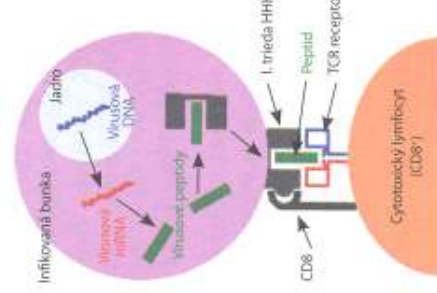


### c) Efektorová fáza

Efektorové bunky (plazmatické bunky a cytotoxické lymfocyty) eliminujú antigén z organizmu. Mnohé efektorové bunky potrebujú aj účasť nelymfoidných buniek a obranných mechanizmov podieľajúcich sa na nešpecifickej imunite (napr. komplementový systém, cytokíny).



už spomínaná väzba s antigénom a signály, ktoré dodávajú potrebné signály B-lymfocytom. Takže k aktivácii B-lymfocytov je potrebná proliferovať a produkovať protilátky typu IgM s rôznou afinitou k antigénu. Prežívajú len tie B-lymfocyty, ktoré viažu antigén najsilnejšie. Zároveň môže dôjsť k zmenám v génom segmente pre konštantnú oblasť ťažkého reťazca už preskupeného IGH génu, ktoré vedú k záмене jedného izotypu (triedy Ig) za iný. Túto zmenu konštantnej oblasti pri zachovaní existujúcej variabilnej oblasti nazývame prepínanie tried imunoglobulínov (class switching). Lymfocyty tým dokončia svoj vývoj na plazmatické bunky produkujúce špecifické protilátky. Časť B-lymfocytov sa stáva pamäťovými bunkami.



**Bunkami sprostredkovaná imunitná reakcia** je definovaná ako odpoveď, pri ktorej protilátky nezohrávajú dôležitú úlohu. Hlavným zameraním bunkami sprostredkovanej odpovede je eliminácia buniek infikovaných vírusom. Efektorovými bunkami sú T<sub>C</sub>-lymfocyty, ktoré sa vyvíjajú z prekursorov po kontakte s antigénom. Ako už bolo spomínané antigén po vniknutí do organizmu je spracovávaný APC bunkami. T<sub>C</sub>-lymfocyty svojim receptorom a za pomoci molekuly CD8 rozpoznávajú antigény ak sú prezentované spolu s molekulami I. triedy HHK. Doplnujúce signály zaoštrávajú adhezívne molekuly ako u B-lymfocytov. Zrelé T<sub>C</sub>-lymfocyty sa viažu na cieľovú bunku a prostredníctvom hydrolytických enzýmov a proteínov bunku zabíjajú. Cytotoxický lymfocyt tento akt preživa a môže zabíjať ďalšie cieľové bunky.

## Úlohy

- Muž má krvnú skupinu B, pričom jeho matka mala krvnú skupinu 0, žena má krvnú skupinu A, jej otec mal krvnú skupinu B. Aké krvné skupiny môžeme očakávať u ich detí a v akom percentuálnom zastúpení?
- V spornom otcovstve má dieťa krvnú skupinu 0 a matka krvnú skupinu A. Mužov s akou krvnou skupinou môžeme vylúčiť z otcovstva?
- V úlohe sú uvedené fenotypy rodičov (1 – 5) pre AB0, MN a Rh krvnoskupinové systémy. Z každého kríženia pochádza jeden z piatich potomkov (a – e). Správne priradiť jedného potomka k jednotlivým manželským párom:

Fenotypy rodičov:

1. A, M, Rh<sup>-</sup> x A, N, Rh<sup>-</sup>
2. B, M, Rh<sup>-</sup> x B, M, Rh<sup>+</sup>
3. 0, N, Rh<sup>+</sup> x B, N, Rh<sup>+</sup>
4. AB, M, Rh<sup>-</sup> x 0, N, Rh<sup>+</sup>
5. AB, MN, Rh<sup>-</sup> x AB, MN, Rh<sup>+</sup>

Deti:

- a) A, N, Rh<sup>-</sup>
  - b) 0, N, Rh<sup>+</sup>
  - c) 0, MN, Rh<sup>-</sup>
  - d) B, M, Rh<sup>-</sup>
  - e) B, MN, Rh<sup>+</sup>
4. Antigény A a B u ľudí s genotypom Se/Se a Se/se sa môžu nachádzať v rozpustnej forme v telových tekutinách, ako napr. v slinách, ale nie sú prítomné v rozpustnej forme u homozygotov se/se. V populácii podľa toho rozlišujeme jedincov „sekrétorov“ (vylučovateľov) a „nonsekrétorov“.

Zapíšte možné genotypy a fenotypy z kríženia jedincov s krvnými skupinami AB a 0, pričom obaja sú Se/se.

Ako bude tento výsledok ovplyvnený, ak obaja rodičia sú heterozygoti (Hh) pre gén determinujúci tvorbu H antigénu?

5. Doplňte do tabuľky krvné skupiny detí:

Krvné skupiny rodičov		Krvné skupiny, ktoré možno očakávať u ich detí	Krvné skupiny, ktoré nemožno očakávať u ich detí
Fenotyp	Genotyp	Fenotypy	Fenotypy
0 x 0			
0 x A			
A x A			
B x B			
0 x B			
A x B			
A x AB			
AB x AB			



6. Doplňte tabuľku:

Matka	Dieťa	Možný otec	Vylúčený otec
0	A		
0	B		
0	AB		
A	A		
A	0		
B	A		
B	AB		
B	0		
AB	A		
AB	0		
AB	AB		

7. Doplňte tabuľku:

Matka	Otec	Dieťa
A <sub>2</sub>	B	
0	A <sub>1</sub>	
0		A <sub>2</sub>
B		A <sub>2</sub> B
B		0
	A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>
	A <sub>1</sub> B	B
	0	A <sub>1</sub>
A <sub>1</sub> B	A <sub>2</sub> B	
A <sub>2</sub> B	0	

8. Muž s krvnou skupinou A<sub>1</sub> mal so ženou s krvnou skupinou 0 dvoch synov s krvnou skupinou A<sub>1</sub>B a dcéru s krvnou skupinou 0. Matka bola pre krvnoskupinový systém AB0 homozygotná

Doplňte:

- genotyp muža s fenotypom A<sub>1</sub>:
- genotyp ženy s fenotypom 0:
- genotyp synov s fenotypom A<sub>1</sub>B:
- genotyp dcéry s fenotypom 0:

9. Dieťa sa narodilo s hemolytickou chorobou novorodencov, hoci matka aj dieťa sú Rh pozitívne. Vysvetlite príčinu choroby.

10. Gény determinujúce Rh a Duffy krvnoskupinové systémy sa nachádzajú na chromozóme č. 1 vo vzdialenosti viac ako 50 mapových jednotiek. Aké typy gamét tvorí heterozygot Df<sup>y</sup><sup>o</sup>/dF<sup>y</sup><sup>o</sup> a v akom percentuálnom zastúpení?

11. Doplňte chýbajúce genotypy krvného systému Xg:

- a) pre syna
- b) pre dcéru

Matka	Otec	Dieťa
Xg <sup>a</sup> Xg	Xg <sup>a</sup> Y	a) ) b) )
Xg <sup>a</sup> Xg <sup>a</sup>	Xg <sup>a</sup> Y	a) ) b) )
XgXg	Xg <sup>a</sup> Y	a) ) b) )
Xg <sup>a</sup> Xg	Xg	a) Xg <sup>a</sup> Y b) XgXg, Xg <sup>a</sup> Xg a) Xg <sup>a</sup> Y, XgY b) Xg <sup>a</sup> Xg <sup>a</sup> , Xg <sup>a</sup> Xg

12. Budú jedinci s Bombay fenotypom:

- a. vhodnými darcami krvi
- b. schopní prijať transfúziu krvi bez problémov?

13. Rodičia 61 detí s hemolytickou chorobou novorodencov (zapríčinenou inkompatibilitou v Rh systéme) mali krvnú skupinu 0 a AB. Avšak iba v dvoch prípadoch mala matka krvnú skupinu 0 a otec AB. Vysvetlite túto skutočnosť.

14. Určte genotypy členov rodiny ak sú ich fenotypy nasledovné:

otec: A1,2, B8,9  
matka: A3,7,B5,6  
dcéra: A1,7,B5,8  
syn: A1,3, B6,8

Otec má haplotypy A2B9/A4B7 a matka A3B14/A9B5

15. Určte, aké krvné skupiny a s akou pravdepodobnosťou možno očakávať u detí rodičov krvných skupín: AB x AB, AB x 0, A x 0, B x 0.

16. Aké deti vzhľadom na krvné skupiny sa môžu narodiť v týchto manželstvách:

- A MN Rh<sup>+</sup> x AB M Rh<sup>-</sup>
- AB MN Rh<sup>-</sup> x B N Rh<sup>+</sup>
- 0 MN Rh<sup>+</sup> x AB M Rh<sup>-</sup>
- A MN Rh<sup>+</sup> x 0 N Rh<sup>-</sup>

17. Hypokalcifikácia je porucha mineralizácie zubov. Sklovina je mäkká a lámavá, dentín sa postupne obnažuje. Defekt sa dedí autozómovo dominantne. Manželstvo uzavreli: žena so zdravým chrupom a krvnou skupinou 0, MN, Rh<sup>+</sup> a muž s hypokalcifikáciou, AB, N, Rh<sup>-</sup>. Aké deti môžeme očakávať z tohto manželstva?

18. Dieťa má krvnú skupinu A, N, matka 0, MN. Zapište kombinácie krvných skupín ABO a MN krvných systémov u mužov, ktorí sú z otcovstva vylúčení.

Manželstvo uzavreli: žena s krvnou skupinou 0 a muž s krvnou skupinou A. Narodilo sa im dieťa s krvnou skupinou AB. Rodičia ženy (príbuzenský sobáš): otec mal krvnú skupinu 0, matka krvnú skupinu B. Nakreslite rodokmeň a napíšte možné genotypy všetkých členov rodiny.



19. Do tabuľky doplňte HLA haplotypy génov A, B, C, ktoré sú v úplnej väzbe:

HLA genotypy	HLA haplotypy
Otec: A1 A3 B8 B15 C1 C1	
Matka: A1 A23 B7 B8 C2 C4	
Dieťa: A1 A23 B7 B15 C1 C4	
Otec: A2 A2 B5 B38 C3 C4	
Matka: A11 A26 B12 B18 C1 C2	
Dieťa: A2 A26 B18 B38 C2 C3	

20. HLA systém je geneticky determinovaný génmi, ktoré sú v úplnej väzbe (nízke percento rekombinácií), preto sa HLA haplotypy prenášajú z rodičov na potomkov ako celok. Preto sa určovanie HLA antigénov využíva pri paternitných sporoch. V tejto úlohe sa serologicky určili iba HLA-A a HLA-B antigény. Doplňte genotypy a rozhodnite, či označený muž môže byť biologickým otcom dieťaťa alebo nie.

Fenotypy	Genotypy
Matka: A3,7 B7	
Dieťa: A1,3 B7,8	
Označený muž: A1,24 B8,12	
Záver:	

Matka: A2,32 B13,35	
Dieťa: A1,32 B8,35	
Označený muž: A2 B7,13	
Záver:	

Matka: A11,36 B8	
Dieťa: A3,11 B5,8	
Označený muž: A1,3 B5	
Záver:	

Matka: A1,2 B7	
Dieťa: A1,2 B7	
Označený muž: A2 B7,8	
Záver:	

21. Porucha tvorby zubnej skloviny je determinovaná dominantnou alelou (D) s lokusom na autozóme. Jedinci s týmto defektom majú žltobnedé zuby s tenkou, mäkkou sklovinou. Manželstvo uzavreli: muž s krvnou skupinou AB, N, u ktorého bola zistená uvedená porucha a zdravá žena, ktorej otec mal krvnú skupinu AB, M a matka 0, N, pričom obaja rodičia mali normálnu zubnú sklovinu. Aké deti môžeme očakávať z tohto manželstva?

22. Manželstvo uzavreli: muž s krvnou skupinou 0 (genotyp 00) a žena s krvnou skupinou B (genotyp BB). Narodili sa im jednovajčkové dvojčatá, dievčatá s krvnou skupinou 0. Napíšte možné genotypy všetkých členov rodiny a vysvetlite.

23. Aké je možné vysvetlenie skutočnosti, že fetálna erytroblastóza zapríčinená inkompatibilitou v Rh systéme vzniká častejšie ak sú matka a dieťa kompatibilní v AB0 systéme (napr. otec 0, matka AB) než pri inkompatibilitě v AB0 systéme (napr. otec AB, matka 0).

24. Manželstvo uzavreli: muž nesekrétor, Le(a+b-), žena sekrétorka, Le(a-b-). Narodili sa im tri deti:

- Le(a+b-)
- Le(a-b-)
- Le(a-b+)

Zapíšte genotypy všetkých členov rodiny pre sekrétorstvo antigénov AB0 krvného systému a krvnospupinový systém Lewis.

25. Doplňte genotypy resp. HLA haplotypy k zadaným fenotypom HLA systému v rodokmeni. U ktorej osoby došlo k rekombinácii a ktorej osoby sa rekombinácia prejavila vo fenotype?



26. Ktoré z uvedených genotypových kombinácií Rh systému manželských párov môžu spôsobiť inkompatibilitu matky a plodu?

Rh genotyp ženy	Rh genotyp muža	Výsledok
1. cDe/Cde	cDe/cde	
2. CDE/cDe	cde/cde	
3. Cde/Cde	CDE/CDe	
4. cDE/Cde	cDE/cde	

27. Manželstvo uzavreli dvaja sekrétori, obaja s rovnakým fenotypom Le(a-b-). Narodili sa im dve deti:

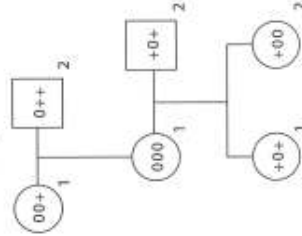
- Le(a+b-)
- Le(a-b-)

Napíšte genotypy všetkých členov rodiny pre sekrétorstvo antigénov AB0 krvného systému a krvnospupinový systém Lewis.

28. V značkách pre zostavenie rodokmeňa je zaznačená reakcia každej osoby s protilátkami v poradí: anti-A

- anti-B
- anti-D

Zapíšte genotypy a fenotypy jedincov pre AB0 a Rh krvnospupinové systémy. (0 – negatívna reakcia, + znamená pozitívnu reakciu).





## 11. Genealógia

Štúdium dedičnosti u človeka predstavuje pre genetiku celý rad objektívnych problémov:

- 1) Z etických dôvodov nemôžeme u človeka aplikovať základnú metódu experimentálnej genetiky – hybridizačný pokus.
- 2) Ľudia sú relatívne dlhovekí, vek pozorovaného jedinca je približne rovnako dlhý ako vek pozorovateľa. Z toho dôvodu môžeme zvyčajne pozorovať iba tri generácie.
- 3) Počet potomkov v jednej rodine je z genetického hľadiska nízky.

Medzi základné metódy používané v genetike človeka patria *genealogická*, t. j. rodokmeňová metóda, *gemetologická*, čiže štúdium dvojčiat, špecificky zamerané *biochemické metódy*, *prenatálna diagnostika*, *molekulová analýza DNA*, metódy *populačnej genetiky* a *cytogenetické metódy*.

**Genealógia** sa v genetike človeka používa ako základná metóda, jednak v základnom výskume genetických zákonitosti prenosu určitého znaku a jednak pri praktickej aplikácii najmä v oblasti poradenskej činnosti klinickej genetiky. **Cieľom** vlastnej analýzy je na tomto podklade zhodnotiť výskyt sledovaných patologických prejavov v rodine, podľa možnosti urobiť **záver o type dedičnosti** a na jeho základe stanoviť **genetickú prognózu**.

**Genealogická metóda** je založená na zostavení rodokmeňov sledovaných rodín, do ktorých sa zaznamenávajú údaje o výskyte sledovaného znaku (najmä patologického), úmrtí, potratov a pod. V rodokmeni sa vyjadrujú príbuzenské vzťahy medzi jedincami a zaznamenávajú sa sledované fenotypové znaky všetkých jeho členov. Rodokmene sa zapisujú zvyčajne pomocou štandardných symbolov do *genealogickej schémy*. Osoba, od ktorej začíname štúdium rodokmeňa sa nazýva **proband**. Obvyčajne je to prvý presne zistený nositeľ daného znaku. V genealogickej schéme rozlišujeme *dve horizontálne línie* – *rodčovú* a *súrodeneckú*, a *linie vertikálne* – *rodové*.

**Cieľom genealogickej analýzy je zistiť:**

- 1) či sledovaný znak (choroba) je dedičný,
- 2) o aký typ dedičnosti sa jedná, prípadne ako sa uplatňuje penetrancia a expresivita,
- 3) aká je genetická prognóza – pravdepodobnosť výskytu daného znaku (choroby) v potomstve.

**Obmedzenia genealogickej metódy štúdia dedičnosti:**

- 1) Pri analýze určitého znaku sú väčšinou na priame pozorovanie dostupné len 2 až 3 generácie. Informácie o vzdialenejších príbuzných sú zatažené vysokou hladinou informačného šumu.
- 2) Mnoho klinických diagnóz, hlavne tie staršie, zahŕňa pod rovnakým názvom znaky sice podobné, ale vo svojej etiopatogenéze rôzne. Týmto nepresnostiam možno predchádzať DNA analýzou, alebo analýzou proteínov typických pre danú poruchu.
- 3) Pri každej genealogickej analýze musíme mať na pamäti, že približne v 5 % v rodokmeni udávaný otec nie je biologickým otcom.

Podstatou rodokmeňovej analýzy je veľmi podrobne urobená rodinná anamnéza, v ktorej sa údaje o rodine zaznamenávajú a vyhodnocujú podľa dohodnutých pravidiel.

Základom genealogickej metódy sú:

- 1) genealogická schéma
- 2) genealogická legenda

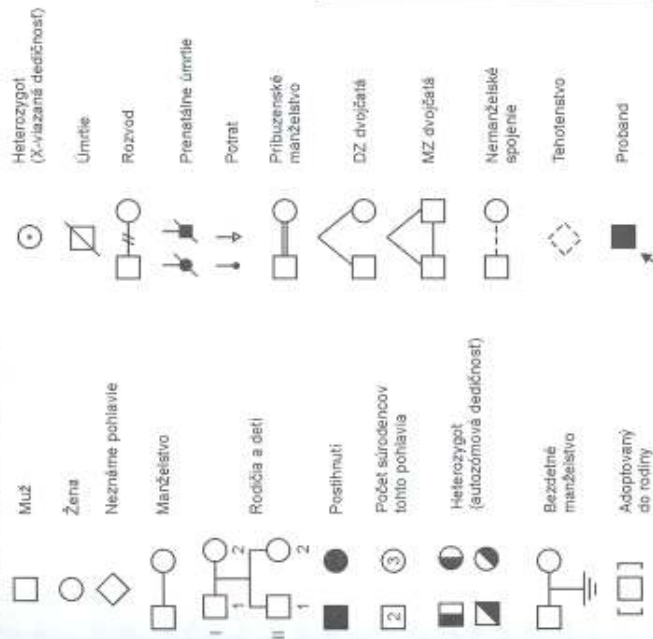
**Genealogická schéma** je náčrt rodokmeňa pomocou štandardných medzinárodne platných značiek. Neurčité údaje sa zaznamenávajú bodkovane, overené údaje plnou čiarou. Muž sa označuje štvorcíkom a žena krúžkom. Generáciu označujeme vľavo rímskou číslicou,

konkrétneho jedinca arabskou číslicou. Rodokmeň sa vždy zakresľuje od probanda, jedinca, u ktorého bol znak (choroba) po prvý raz zistený v danej rodine (obr. 11-1). Pri výskume dedičnosti určitej choroby je probandom ten jedinec, ktorý bol ako prvý zachytený pri vyšetrovaní. Manželskú a súrodeneckú čiaru spája zvislá rodová čiara. Hodnota každej genealogickej schémy je tým väčšia, čím je podrobnejšia a širšia.

V genealogickej schéme môžeme graficky zachytiť jeden, nanajvýš niekoľko málo znakov, aby nebola porušená názornosť tejto metódy. Ďalšie podrobnejšie údaje sa zaznamenávajú do **legény** príslušného rodokmeňa.

**Genealogická legenda** obsahuje všetky zistené genealogické údaje usporiadané podľa genealogického čísla daného jedinca (napr. I/2, II/3), to znamená údaje o zdravotnom stave, prípadne úmrti jednotlivých členov, výskyt potratov, mŕtvonarodených plodov, sterility a iné z hľadiska lekárskej genetiky dôležité poznatky (napr. príbuzenské vzťahy medzi rodičmi, adopcia, rozvod).

Pri zostavovaní genealogickej schémy (rodokmeňa) sa používajú štandardné symboly (značky) uvedené na obr. 11-1.



**Obrázok 11-1.** Štandardné genealogické symboly

Z výskytu znaku v rodokmeni môžeme často určiť typ jeho genetickej determinácie. Predpokladom toho je však analýza veľkého súboru rodokmeňov

V klinickej praxi spočíva hlavný význam genetiky v tom, že genetické činitele zohrávajú úlohu v etiológii veľkého množstva chorôb. Prakticky každý znak je výsledkom kombinácie účinku génov a faktorov vonkajšieho prostredia. Pre lepší názornosť delíme choroby z tohto hľadiska na tri skupiny. Po prvé sú to choroby s primárnou poruchou genetickej informácie, po druhé tie, pri etiológii ktorých predpokladáme najmä vplyvy prostredia (vrátane intrauterinného), a nakoniec tie, za ktoré je zodpovedná kombinácia genetickej konštitúcie a vplyvov prostredia.



V prvej skupine, čiže medzi chorobami s primárnou poruchou genetickej informácie, rozlišujeme tri hlavné typy:

- 1) monogénovo podmienené choroby
- 2) choroby spôsobené chromozómovými aberáciami (štruktúrnymi alebo numerickými)
- 3) multifaktoriálne podmienené choroby.

**Monogénovo podmienené** choroby sú spôsobené mutáciami génu. Mutácia sa môže vyskytnúť len na jednom chromozóme z homologického páru alebo na obidvoch chromozómoch. Rodokmene pacientov s monogénovo podmienenými chorobami sú obyčajne nápadné a typické.

V prípade **chromozómových aberácií** choroba vzniká v dôsledku zmien v štruktúre chromozómu alebo v počte chromozómov, čo ruší normálnu vyváženosť genómu.

**Multifaktoriálny spôsob dedičnosti** pozorujeme pri mnohých bežných chorobách, obzvlášť pri vývojových poruchách, ktoré majú za následok kongenitálne malformácie.

Znaky podmienené monogénovo môžu byť **autozómového** alebo **gonozómového** typu a vyskytujú sa v týchto základných formách dedičnosti:

- 1) dominantná
- 2) kodominantná
- 3) neúplne dominantná
- 4) recesívna

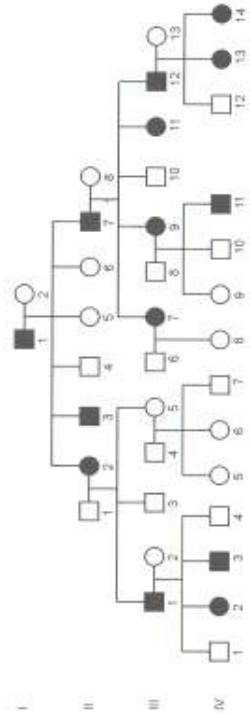
V ďalšom texte uvádzame príklady mendelovskými dedičných chorôb a výpočet pravdepodobnosti výskytu ochorenia.

### 11.1. Autozómový typ dedičnosti

Znaky sú podmienené génmi, lokalizovanými na autozómoch. Charakteristické pre autozómový typ dedičnosti je, že znak sa vyskytuje u jedincov oboch pohlaví približne s rovnakou frekvenciou a môže byť prenášaný aj z otca na synov.

#### 11.1.1. Autozómovo dominantný typ dedičnosti (AD)

Pre tento typ dedičnosti je charakteristické, že sa ochorenie väčšinou vyskytuje v každej generácii rodokmeňa (vertikálny prenos znaku). Postihnutí sú rovnako muži i ženy. Postihnutý jedinec má aspoň jedného rodiča postihnutého. Riziko pre ďalšie dieťa je 50 %. Riziko postihnutia detí u postihnutého jedinca (v prípade úplnej penetrancie génu) je riziko postihnutia detí nulové (Obr. 11-2). Typické choroby: chondrodystrofia (jeden typ trpasličieho vzrastu), polydaktylia (jeden typ viacprstosti), brachydaktylia (AD krátkoprstosť), otoskleróza (porucha sluchu), polycystické obličky (určitý typ), jeden typ polykozy hrubého čreva, hyperlipoproteinémia (určitý typ poruchy metabolizmu lipidov).



**Obrázok 11-2.** Štandardný rodokmeň znázorňujúci prenos zriedkavého znaku vyvolaného dominantným autozómovým génom – autozómovo dominantná dedičnosť

### Niektoré autozómovo dominantné ochorenia

#### Polycystická choroba obličiek

Ochorenie má za následok vznik cyst v obličkách, pečeni, pankrease, slezine. Cysty v obličkách sú väčšinou asymptomatické až do zlyhania obličiek alebo do nástupu hypertenzie (v štvrtéj dekáde života). Je možná presymptomatická diagnóza ultrazvukom, prenatalná a presymptomatická diagnóza molekulárnymi genetickými metódami. Výskyt ochorenia je 1/1 000.

#### Hypercholesterolemia

Je heterogénne determinované ochorenie. Jedna z foriem je AD ochorenie spôsobené mutáciou génu, ktorý determinuje receptor pre lipoproteíny s nízkou densitou, napr. cholesterol. Mutácia receptora je príčinou hromadenia lipoproteínov. Okrem iného vzniká ischemická srdcová choroba. Ochorenie nastupuje medzi 30. až 40. rokom. Výskyt je 1/500.

#### Huntingtonova chorea

Ochorenie sa vyznačuje neúčelnými polybmi a progresívnou demenciou. Nástup ochorenia je variabilný. Iba polovica ľudí z tých, ktorí zdedili mutovaný gén ochorie do 40. roku života. Výskyt je 1/10 000 – 20 000 jedincov.

Uvedené autozómovo dominantne choroby sa väčšinou manifestujú až na konci reprodukčného obdobia. Mutovaná alela sa môže prenášať do ďalšej generácie osobami, ktoré v priebehu reprodukčného veku nevedeli, že sú nosičmi mutovaného génu.

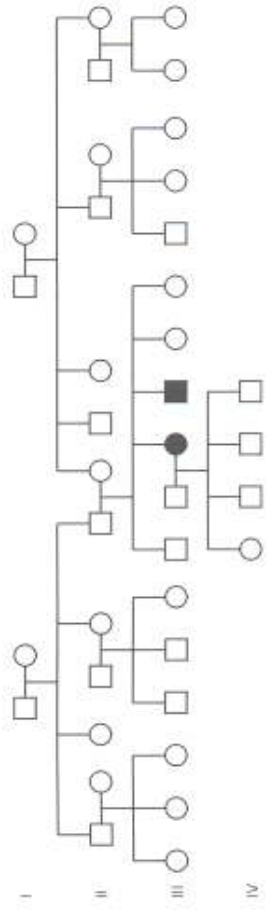
#### Neurofibromatóza

Neurofibromatóza je relatívne bežné autozómovo dominantne podmienené ochorenie nervového systému. Jeho frekvencia sa v populácii zvyšuje častým výskytom nových mutácií. Mutácie podmieňujú vznik benigných (nezhubných) nádorov – neurofibromov. Pre ochorenie je typický výskyt svetlohnedo zafarbených škvŕn na pokožke hlavne na trupe. U pacientov s neurofibromatózou je zvýšené riziko vzniku maligných (zhubných) nádorov. Výskyt je 1/3 500.

#### 11.1.2. Autozómovo recesívne choroby (AR)

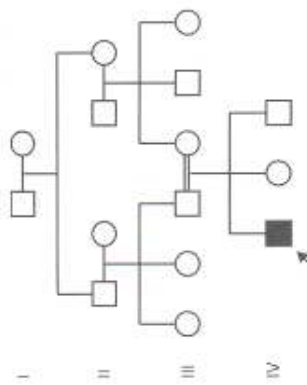
AR choroby sa manifestujú len u recesívnych homozygotov. Pre choroby podmienené AR platí, že zdravým rodičom sa môže narodiť postihnuté dieťa. To znamená, že obaja rodičia sú heterozygoti pre daný gén. Zdravý súrodeneц postihnutého dieťaťa môže byť heterozygotom alebo dominantným homozygotom pre sledovaný gén. Dvom heterozygotom sa narodí postihnuté dieťa s 25 % pravdepodobnosťou, čo vyplýva z Mendelovho pravidla o segregácii génov do gamét a náhodnej kombinácii gamét pri oplodnení. Pri pribuzenských sobášoch sa výskyt AR ochorenia zvyšuje. Rodokmeň s výskytom AR ochorenia je znázornený na obr. 11-3.

a)





b)



**Obrázok 11-3.** Štandardný rodokmeň pri autozómovo recesívnej dedičnosti (a). Charakteristické je konsangvinné manželstvo medzi rodičmi postihnutého, ktoré sa však vyskytuje len u časti prípadov (b).

#### Niektoré autozómovo recesívne ochorenia

##### Fenylketonúria

Fenylketonúria sa prejavuje zvýšením koncentrácie fenylalanínu v krvi, čo poškodzuje CNS a spôsobuje mentálnu retardáciu. Ochorenie je spôsobené nedostatkom enzýmu fenylalanínhydroxylázy, ktorý katalyzuje premenu fenylalanínu na tyrozín. Vyšetrenie všetkých novorodencov ihneď po narodení (skriming) umožňuje včasnú terapiu v prípade postihnutia dieťaťa. Ak je hladina fenylalanínu u postihnutého dieťaťa upravená diétou (mimimálny obsah fenylalanínu v strave, zvýšené množstvo tyrozínu), jeho vývoj je normálny. V prípade neliečenia má choroba za následok ťažké mentálne defekty. Výskyt je 1/10 000 narodených detí.

##### Alkaptonúria

Alkaptonúria je spôsobená chýbaním enzýmu homogentizát-1,2-dioxygenázy, v dôsledku čoho sa v organizme hromadí medziprodukt metabolizmu fenylalanínu a tyrozínu – kyselina homogentisová, ktorá sa ukladá do chrupiek a väzív, čo vedie k postupnému poškodeniu kĺbov, ktoré invalidizuje pacientov vo veku 30-40 rokov. Výskyt ochorenia na Slovensku je podľa predbežného výskumu 1/25 000 novorodencov.

##### Cystická fibróza

Cystická fibróza je jedno z najčastejších AR ochorení človeka v európskej populácii, pri ktorom je postihnutá najmä činnosť žliaz s vonkajšou sekréciou. Výskyt cystickej fibrózy je 1/2 500 narodených detí. Narušená je najmä funkcia pľúc a pankreasu. V pľúcach sa vyskytuje množstvo hustého hlienu, ktoré obmedzuje priechodnosť priedušiek a priedušíniek. V dôsledku sekundárnych infekcií dochádza k poškodeniu pľúc, čo je najčastejšou príčinou smrti. U 85 % pacientov dochádza k upchatiu kanálikov pankreasu sekretom. Nevyhnutné tráviace enzýmy sa preto nemôžu dostať do čriev. U 5 % pacientov je postihnutá aj pečeň. Upchatie drobných žľazovodov znemožňuje trávenie a narušuje funkciu pečene. Priemerná doba prežitia je 25 rokov. Ochorenie je spôsobené mutáciou génu CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Produktom génu CFTR je proteín, ktorý reguluje prechod chloridových iónov kanálíkmi bunkovej membrány. Mutovaný gén kóduje pozmenený proteín a membránové kanálíky sú nefunkčné. Zmenená funkcia plazmatickej membrány narušuje výmenu iónov a má za následok patologické poškodenie buniek.

## 11.2. Gonozómový typ dedičnosti

Znaky sú podmienené gémi, lokalizovanými v heterologickej oblasti gonozómov. Charakteristické pre tento typ dedičnosti je, že znak sa vyskytuje s rôznou frekvenciou v závislosti na pohlaví.

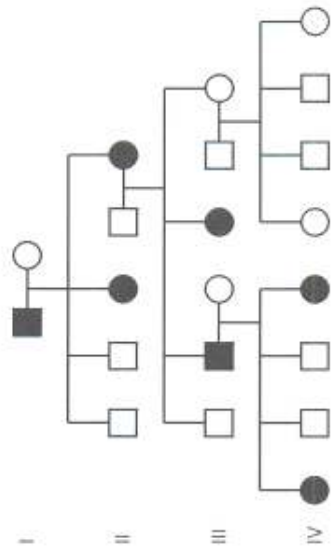
### 11.2.1. Holandrický typ dedičnosti (Y-viazaná gonozómová dedičnosť)

Gény lokalizované v heterologickej časti chromozómu Y sú odovzdávané len z otca na syna v nepretržitej vertikálnej línii. U človeka boli zatiaľ spľahliivo identifikované gény pre antigén H-Y (charakteristický antigén bunkových membrán jedincov heterogametického pohlavia, ktorý sa vyskytuje u všetkých stavovcov) a AZF (azoospermický faktor) na ramene q a na ramena p génu TDF (testis determinujúci faktor). Všetky tieto gény sa podieľajú na riadení deferenčiacie a funkcie mužských pohlavných orgánov. Literatúra uvádza, že v niektorých populáčnych skupinách (predovšetkým v Indii) sa pravdepodobne v gonozóme Y nachádza gén podmieňujúci nadmerné ochlpenie ušnice. V každom prípade, dedičnosť znakov viazaných na Y chromozóm je výlučne patrilineárna (t.j. prenáša sa z otcov na synov a u žien sa príslušný znak nikdy nevyskytuje). Pretože pre gonozómovu determinované znaky sú muži hemizigotní, príslušný znak sa vo fenotype nositeľ a vždy manifestuje.

Keďže počet známych štruktúrnych génov v Y-chromozóme človeka je zatiaľ veľmi malý, terminom gonozómová dedičnosť sa bežne označuje dedičnosť znakov, podmienených gémi viazanými na chromozóm X. V tomto zmysle používa termín aj ďalej.

### 11.2.2. Gonozómovo dominantný typ dedičnosti (GD)

Pri tomto type dedičnosti sa príslušný nachádza na chromozóme X a má dominantný charakter. Prenos z otca na syna nie je možný. Znaky podmienené dominantnou alelou na X chromozóme sa manifestujú nielen u mužov, ale aj u heterozygotných žien. Heterozygotná žena má s 50 % pravdepodobnosťou postihnuté deti. Ak je postihnutý muž, sú postihnuté všetky dcéry a všetci synovia sú zdraví. V prípadoch zriedkavých patologických dominantných znakov viazaných na chromozóm X vyskytujú sa postihnuté ženy (heterozygotné) dvojnásobne častejšie ako postihnutí muži (hemizygoti), ale majú miernejšiu formu choroby, pretože „normálny“ gén pôsobí tlmiivo na expresiu patologického génu. U mužských pacientov naopak možno očakávať ťažší až letálny priebeh ochorenia (Obr. 11-4). Klinickogenetické jednotky s týmto typom dedičnosti sú zriedkavé. Ako príklad možno uviesť Aarskogov syndróm, hereditárnu hypofosfatemickú rachitidu rezistentnú na vitamín D, deficit ornitíntranskarbamylázy, atď.



**Obrázok 11-4.** Štandardný rodokmeň pri X-chromozómovo dominantnej dedičnosti. Všetky dcéry postihnutého muža sú postihnuté, synovia sú zdraví.

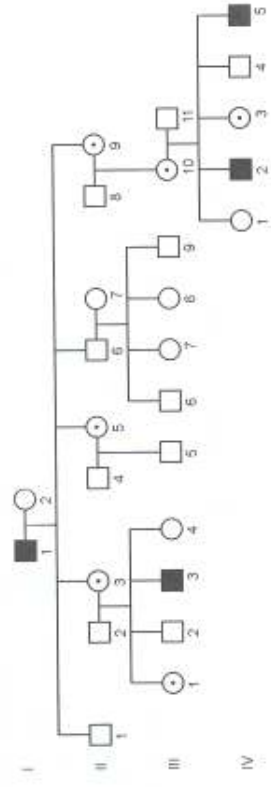


**D-vitamínová rezistentná krivica – postihnutie skeletu**

Táto dominantne dedičná forma krivice vzniká aj pri dostatočnom prijímaní vitamínu D. Normálny príjem vitamínu D nezlepšuje stav pacienta. Príčinou je znížená reabsorpcia fosforu v proximálnom tubule obličky až na 42-72%, ktorá spôsobuje nízku hladinu fosforu v sére. Hoci sú postihnuté obidve pohľavia, je u heterozygotných žien menej znížená hladina fosforu a klinický obraz rachitidy je menej ťažký ako u mužov.

**11.2.3. Gonozómovo recesívny typ dedičnosti (GR)**

V prípade génov lokalizovaných na pohlavných chromozómoch musíme zobrať do úvahy rozdiel medzi homogametickým pohlavím (ženy – XX) a heterogametickým pohlavím (muži – XY). Otec odovzdáva X chromozóm všetkým deťom, Y chromozóm odovzdáva synom. Matka odovzdáva X chromozóm jednak synom ako aj deťom s 50 % pravdepodobnosťou pre každý z X chromozómov.



**Obrázok 11-5.** Štandardný rodokmeň pri X-chromozómovo recesívnej dedičnosti. Charakteristické je „preskočenie“ generácie.

GR ochorenia postihujú prevažne mužov (Obr. 11-5). U mužov sa prejavuje **pseudodominantný efekt génu** (hemizygotný stav). Ženy sú obvykle zdravé prenášačky X viazaných GR ochorení, postihnuté sú len veľmi zriedkavo (t. j. recesívne homozygotky).

**Niektoré gonozómovo recesívne ochorenia**

**Hemofília, typ A**

V prípade hemofílie A je znížená aktivita alebo chýbanie koagulačného faktora VIII. Znížená zrážanlivosť krvi má za následok spontánne krvácanie do tkanív a kĺbov, zvýšené krvácanie pri poranení alebo chirurgickom zákroku. Výskyt je 1/10 000 narodených chlapcov. Ženy sú prenášačkami.

**Hemofília, typ B**

Hemofília B je zriedkavejšia forma poruchy hemokoagulácie (1 : 30 000 novonarodených chlapcov) ale klinicky nerozlišiteľná od hemofílie A. Je podmienená znížením aktivity alebo chýbaním koagulačného faktora IX. V oboch prípadoch je možné ovplyvniť ochorenie intravenóznym podávaním deficitného faktora.

**Červeno-zelená farbosleposť (daltonizmus)**

Farbosleposť je geneticky podmienená porucha, pri ktorej je oslabená schopnosť rozlišovať červenú a zelenú farbu. Osem percent mužov populácie je farboslepých, jedna žena zo 150 je farboslepá.

**Deficiencia enzýmu glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G6PD)**

Enzým G6PD je dôležitý pre bunkový metabolizmus, premieňa glukóza-6-fosfát na 6-fosfálglukonát, energiu potrebnú na tvorbu NADPH. Ten je dôležitý na tvorbu glutatiónu

a peroxidu vodíka, ktoré dodávajú vodíkové radikály nielen pre Hb, ale aj pre oxidačné procesy v erytrocytarnej membráne. Chýbanie enzýmu G6PD v červených krvinkách ľudí môže mať za následok hemolýzu červených krviniek, keď užívajú lieky, ako acylpyrín či antibiotiká, alebo po požití potravín (bôbu) či chemických látok, ktoré majú oxidačný účinok na molekulu Hb (spotrebujú veľa vodíka). Postihnutí sú zvyčajne muži. Heterozygotné ženy sú zdravé, aj keď majú redukované množstvo enzýmu v červených krvinkách. Choroba sa vyskytuje endemicky (iba na určitom území), napr. v oblasti Stredozemného mora a v populácii černoškého obyvateľstva. Endemický výskyt sa vysvetľuje selekčným zvýšením červených krviniek s bodovou mutáciou génu G6PD pri ochorení na maláriu.

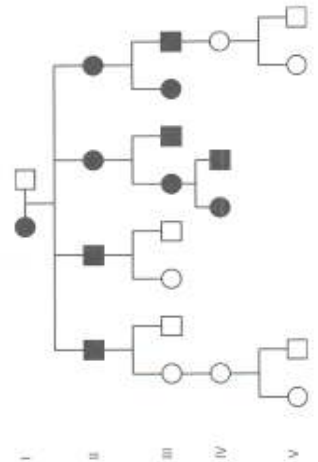
**Duchenneova svalová dystrofia**

Duchenneova svalová dystrofia je dedičné ochorenie, ktoré primárne postihuje svaly. Je podmienená mutáciou (častočnou deľciou) génu kódujúceho proteín *dystrofin*, ktorý ovplyvňuje reakcie všetkých typov svalov. Ochorenie sa začína prejavovať v detstve. Prvým príznakom je kolísavá chôdza, problémy pri chôdzi po schodoch, progresívna slabosť. Okolo 10. roku sú postihnutí jediní nepohybliví a odkázaní na invalidný vozík. Svalové ochabnutie postupne pokračuje, smrť nastáva okolo 20. roku v dôsledku zlyhania srdcovej činnosti a dýchania. Aj keď chlapi zomierajú, recesívna alela sa v populácii prenáša prostredníctvom zdravých heterozygotných žien. Okrem toho sa tento gén vyznačuje vyššou frekvenciou mutácií, pretože je veľký. Jedna tretina všetkých prípadov vzniká ako dôsledok novej mutácie. Výskyt je 1/3 000 narodených chlapcov.

**11.3. Mitochondriálne genetické ochorenia**

Pre dedičné ochorenia, pri ktorých prichádzajú do úvahy mutácie na úrovni mtDNA, možno považovať za charakteristické:

- 1) maternálny typ dedičnosti
  - 2) základným rozdielom medzi mitochondriálnou a na X-chromozóm viazanou dedičnosťou dominantného typu je, že v prvom prípade neexistuje prenos od otca na potomstvo
  - 3) prejavu poruchy oxidačno-fosforjačných procesov (OXPHOS) a teda produkcie ATP v CNS, svaloch, srdci, pečeni a obličkách
  - 4) segregáciu mitochondrií v priebehu mitózy s výskytom prahového efektu a fenotypovými prejavmi na úrovni tkanív (v rozličných tkanivách daného jedinca môžu byť rozlične stupne respiračnej nedostatčnosti) ako aj v priebehu meiózy.
- Sú to niektoré neuropatické a neuromuskulárne choroby, napr.: Leberevova hereditárna optická neuropatia (degenerácia očného nervu), mitochondriálna myopatia, encefalomyopatia, laktátová acidóza a t.



**Obrázok 11-6.** Štandardný rodokmeň pri mitochondriálnej dedičnosti.

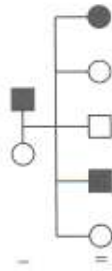






5) V nasledujúcim rodokmeni sledujeme autozómovo recesívny znak.

- Aký je genotyp matky?
- Aký je genotyp otca?
- Aké sú genotypy detí?
- Aké je riziko narodenia postihnutých detí?

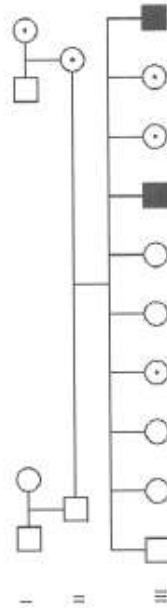


6) Tayova-Sachsova choroba je autozómovo recesívne podmienená porucha metabolizmu, ktorá má za následok smrť postihnutého jedinca do veku dvoch rokov. Fenotypovo normálni rodičia sa pýtajú na riziko objavenia sa tejto choroby u ich detí, pretože muž mal prvostupňovú sesternicu (z otcovej strany), ktorá zomrela na túto chorobu a žena mala strýka (z matkinej strany) s touto chorobou.

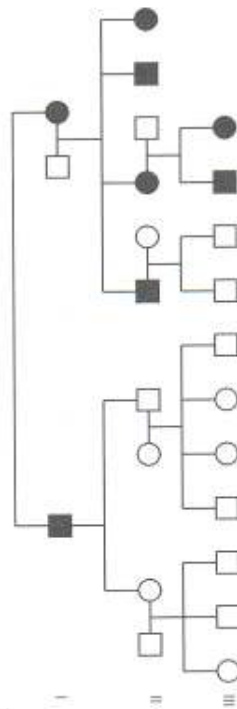
- Zakreslite rodokmeň tejto rodiny.
- Aká je pravdepodobnosť, že obaja rodičia sú prenášачi mutančnej alely?
- Aká je pravdepodobnosť, že ani jeden z nich nie je prenášачom?
- Aká je pravdepodobnosť, že sa im narodí postihnuté dieťa?
- Aká je pravdepodobnosť, že jeden z rodičov je prenášачom a druhý nie je?

7) Urobte rozbor uvedených rodokmeňov a určte pravdepodobné typy dedičnosti sledovaných znakov.

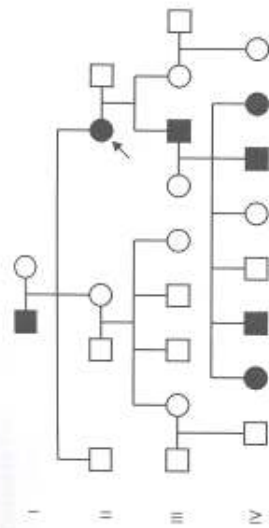
rodokmeň 1



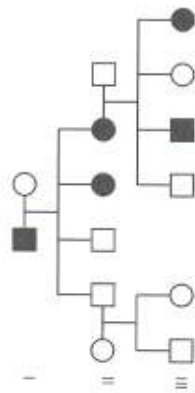
rodokmeň 2



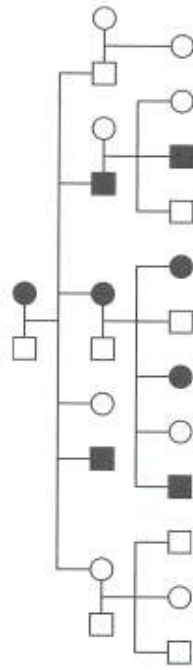
rodokmeň 3



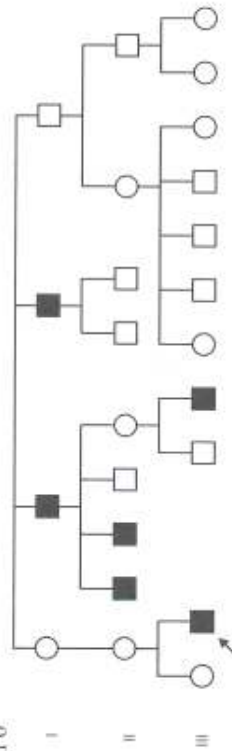
rodokmeň 4



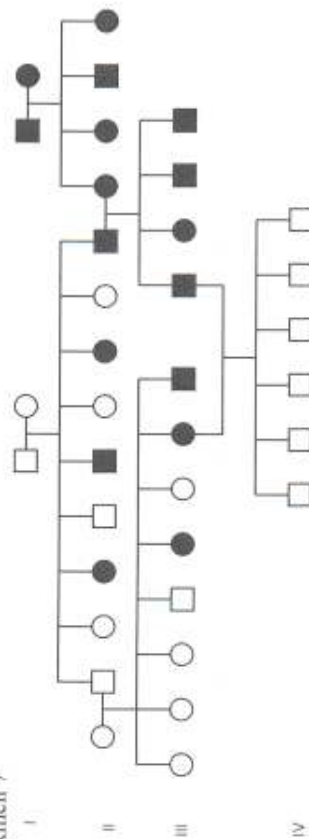
rodokmeň 5



rodokmeň 6



rodokmeň 7





8) Žena, ktorej brat bol postihnutý cystickou fibrózou (mukoviscidóza, porucha funkcie exokrinných žliaz, AR), sa vydala za bratranca z matkinej strany, ktorého sestru je taktiež postihnutá cystickou fibrózou.

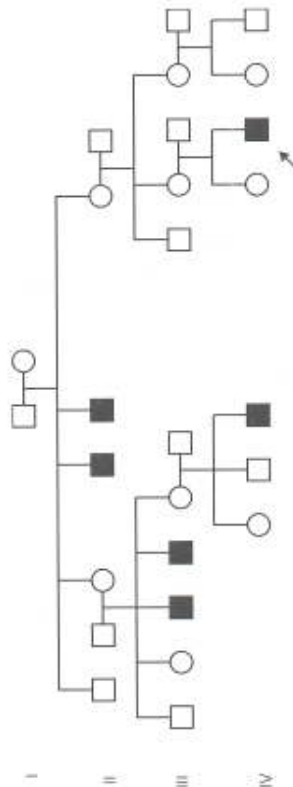
- Znáornite genealogickú schému tejto rodiny.
- Vyjadrite pravdepodobnosť narodenia postihnutého dieťaťa.
- Aký genotyp z hľadiska cystickej fibrózy majú rodičia oboch manželov?

9) Znáornite rodokmeň ženy, ktorej bratranec z matkinej strany (ich matky sú súrodencami) zomrel v detskom veku na Leshov-Nyhanov syndróm (X-viazaná recesívna dedičnosť).

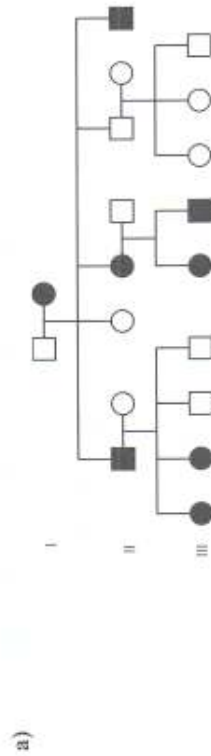
- Aká je pravdepodobnosť, že táto žena je prenášačkou recesívnej alely pre túto chorobu?
- Aká je pravdepodobnosť, že v manželstve so zdravým mužom sa jej narodí postihnuté dieťa?

10) Probandom je muž, ktorý chce uzavrieť manželstvo so svojou sesternicou. Otec muža a matka snúbenice sú súrodenci a majú skrátené články prstov (brachydaktylia, AD). Rovnako bola postihnutá aj ich matka. Snúbenici majú normálnu dĺžku prstov. Nakreslite genealogickú schému tejto rodiny a stanovte riziko narodenia deti s brachydaktyliou v tomto manželstve.

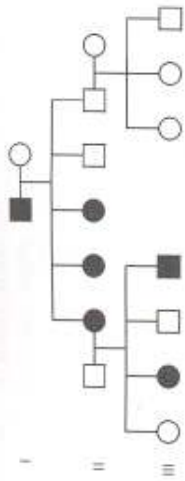
11) Na obrázku je zakreslený rodokmeň rodiny s výskytom Duchenneovej muskulárnej dystrofie. Stanovte typ dedičnosti.



12) V nasledujúcich dvoch rodokmeňoch sledujeme výskyt D vitamínorezistentnej rachitidy s hypofosfatémiou. Analyzujte obidva rodokmeňe a stanovte typ dedičnosti. Je možné určiť typ dedičnosti len na základe I. rodokmeňa?

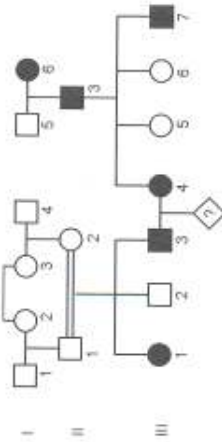


b)



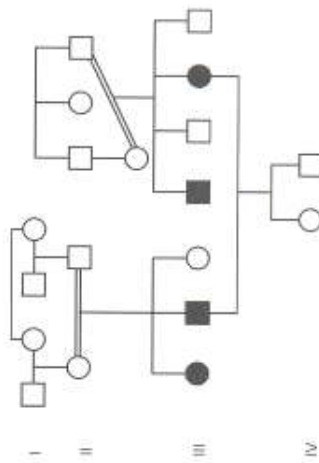
13) Marfanov syndróm je podmienený autozómno dominantnou alelou na chromozóme č. 15 s 80 % penetranciou. Je to dedičná porucha spojivového tkaniva, ktorá má za následok poruchy skeletu (hlavne hrudníka), CNS, kardiovaskulárne, očné, pľúčne atď. Postihnutá žena a zdravý muž uzavreli manželstvo. Príbuzní zo strany ženy: matka zdravá, otec postihnutý, jediný brat postihnutý. Príbuzní zo strany muža: otec zdravý, matka postihnutá, obaja bratia tohto muža sú postihnutí. Túto situáciu znázornite v genealogickej schéme. Aká je pravdepodobnosť, že sa týmto manželom narodí postihnuté dieťa? Ak sa brat uvedenej ženy ožení so zdravou ženou, aké je riziko, že ich dieťa bude postihnuté?

14) V rodokmeni je znázornené manželstvo dvoch osôb postihnutých dedičnou hluchonemou. Aký typ dedičnosti možno predpokladať u manžela III/3 a manželky III/4 a aké riziko z toho vyplýva pre ich potomstvo?



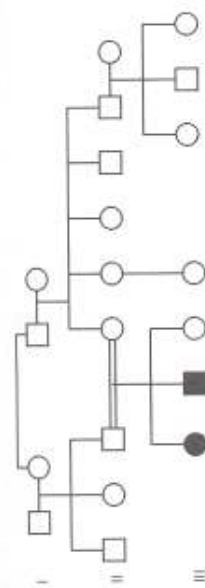
15) Určte typ dedičnosti na základe analýzy uvedených rodokmeňov.

a)

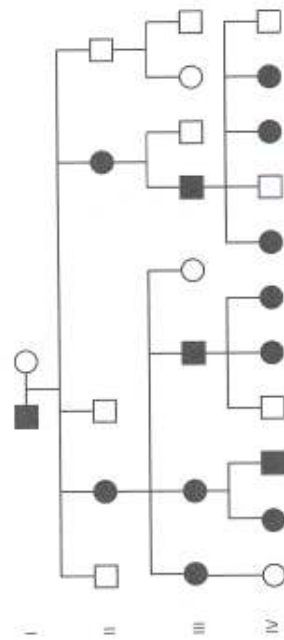




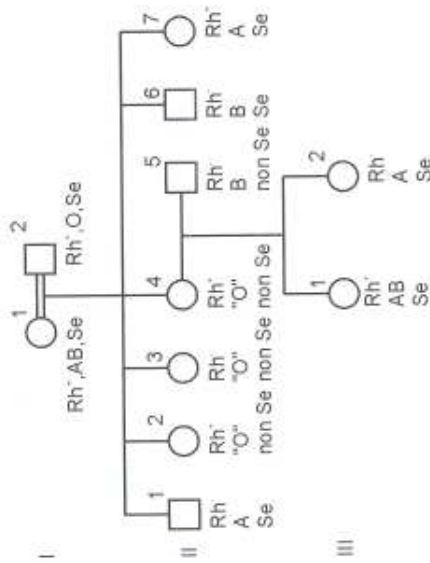
b)



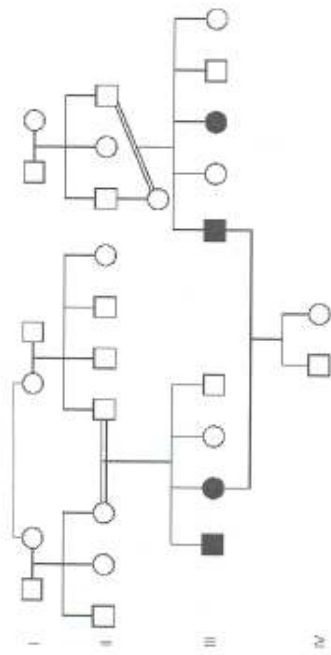
c)



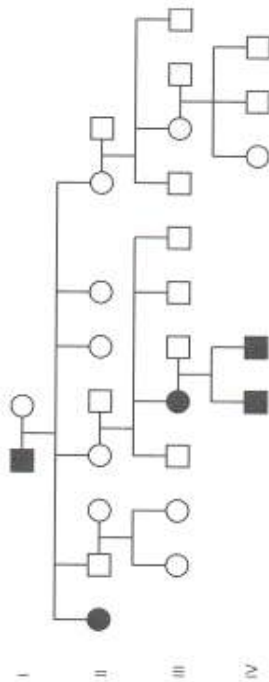
16) Napíšte pre jednotlivých členov uvedeného rodokmeňa genotypy pre krvnospinové systémy ABO, Rh, sekretorstvo a H substanciu.



17) Zapište genotypy jedincov: II/3, II/4, II/10, III/2, III/5, IV/1 a IV/2 pre vrodenú hluchotu. Ako môžete vysvetliť narodenie detí s normálnym sluchom dvom hluchoným rodičom?



18) Na obrázku je uvedený rodokmeň s výskytom polydaktylie u človeka. O aký typ dedičnosti ide a ako môžete vysvetliť nepravidelnosti v prenose génu v uvedenom rodokmeňi?



19) Žena je heterozygotná v géne pre sledovaný znak. Jej manžel nesie len dominantné alely. Narodili sa im 4 deti, 2 dievčatá a 2 chlapci. Nakreslite rodokmeň tejto rodiny a napíšte genotypy rodičov a všetky možné genotypy detí, ak ide o znak:

- gonozómovo recesívny
- autozómovo dominantný
- gonozómovo dominantný
- autozómovo recesívny

20) Žena je heterozygotná v géne pre sledovaný znak. Jej manžel nesie len recesívne alely. Narodilo sa im 7 detí, 2 dievčatá a 5 chlapcov. Nakreslite rodokmeň tejto rodiny a napíšte genotypy rodičov a všetky možné genotypy detí, ak ide o znak:

- gonozómovo recesívny
- autozómovo dominantný
- gonozómovo dominantný
- autozómovo recesívny



## 12. Genetika populácií

**Genetika populácií** študuje javy na úrovni súboru jedincov – na úrovni populácie. Každý organizmus je súčasťou vyššie organizovanej sústavy, ktorá sa nazýva populácia, pričom každú populáciu môžeme charakterizovať z dvoch hľadísk: biologického a genetického. Z biologického hľadiska **populácia** je súbor jedincov jedného druhu, ktorí obývajú určitý prirodzene vymedzený priestor v určitom čase a ktorého členovia sú potenciálne schopní sa navzájom križovať. Z genetického hľadiska populáciu charakterizujeme ako genotypovo heterogénny súbor jedincov toho istého druhu, medzi ktorými sú pribuzenské vzťahy rôzneho stupňa. Súčasná genetika populácií sa sústreďuje predovšetkým na štúdium populácií pohlavne sa rozmnožujúcich druhov, u ktorých sa prenos génov z generácie na generáciu riadi princípmi mendelistickej dedičnosti, preto takéto spoločenstvo označujeme aj termínom **mendelistickej populácie**.

Mendelistickej populácie je reprodukčné spoločenstvo jedincov, ktoré spoločne vlastni komplexnú genetickú informáciu – **genofond**.

**Genofond populácie** (génový fond, génová výbava) je súbor všetkých génov daných lokusov od všetkých jedincov tvoriacich populáciu. Súbor všetkých génov obsiahnutých v gamétach v populácii (vo vajíčkach a spermách) tvorí **gametový fond populácie**. Pri oplodnení však splyávajú iba niektoré gaméty z gametového fondu. Iba niektoré gaméty vytvárajú zygoty. Gény nachádzajúce sa v zygótoch vytvárajú **zygotový fond populácie**. Z hľadiska populačnej genetiky teda možno povedať, že genofond populácie je množina všetkých alelických foriem génov, ktoré jedna generácia populácie „investuje“ vo forme gamét do tvorby zygót zabezpečujúcich vznik ďalšej generácie.

**Genetická štruktúra populácie** je determinovaná zastúpením a frekvenciami génov (alel) v populácii prítomných jedincov. **Génová frekvencia** (presnejšie alelová) je relatívna početnosť (pomerné zastúpenie) určitej alely v súbore všetkých alel rovnakého génu v genóvovom fonde. **Genotypová frekvencia** je pomerné zastúpenie určitého genotypu v súbore všetkých genotypov v populácii.

Populácie z genetického hľadiska môžu byť **geneticky heterogénne** (ak jedinci nemajú rovnaký genotyp), alebo **geneticky homogénne** (všetci jedinci majú rovnaký genotyp). Ak sa genotypové a alelové frekvencie v priebehu generácií nemenia, populácia je geneticky stabilná. Zmena genotypových frekvencií počas generácií má za následok zmenu štruktúry genofondu a recipročne zmena vo frekvencií alel sa prejaví zmenami genotypových frekvencií v ďalších generáciách.

Úlohou genetiky populácií je študovať genetickú konštitúciu – **genofond** – populácie a faktory, ktoré genofond determinujú, resp. počas generácií menia. Zmena genetickej konštitúcie populácie v priebehu mnohých generácií je totožná s evolúciou. Preto genetika populácií tvorí podklad a súčasť náuky o evolúcii. Zmena genofondu populácie užitočných rastlín a zvierat je cieľom šľachtiteľskej praxe. Preto je genetika populácií teoretickým základom šľachtiteľstva. Štúdium tej zložky ľudského genofondu, ktorá je zodpovedná za geneticky podmienené patologické stavy, tvorí náplň lekárskej populačnej genetiky.

Štúdium zákonitostí prenosu genetickej informácie v populácii z generácie na generáciu má dve metodologické roviny – **teoretickú** a **empirickú**. Základnou pracovnou metódou **teoretickej** populačnej genetiky je konštrukcia matematických modelov správania sa populácie, vypracovaných na základe známych princípov dedičnosti. Tieto princípy možno matematicky formulovať a ich správnosť matematicky dokázať. Takéto matematicky odvodené a dokázané tvrdenie je modelom správania sa ideálnej populácie. Základné modely, ktoré vychádzajú z jednoduchých, matematicky odvodených predpokladov sa nazývajú

**zákony**. Úlohou **empirickej** populačnej genetiky je overiť, v ktorých reálnych populáciách príslušné zákony platia, prípadne analyzovať faktory zodpovedné za empiricky zistené odchýlky.

### 12.1. Hardyho-Weinbergov zákon genetickej rovnováhy

V roku 1908 anglický matematik G. H. Hardy a nemecký lekár W. Weinberg formulovali zákon, ktorý vyjadruje vzťah medzi frekvenciou alel a frekvenciou genotypov v populácii. Tento zákon hovorí, že za predpokladu existencie dvoch alebo viacerých alternatívnych alel génu v ideálnej populácii zostáva ľubovoľný výhodiskový pomer jednotlivých alel vo všetkých nasledovných generáciách nezmenený, bez ohľadu na počiatočnú frekvenciu genotypov. Frekvencia genotypov, dosiahnutá v populácii po jednej generácii panmiktického križenia bude v takejto populácii vo všetkých ďalších generáciách stabilná, pokiaľ budú splnené nasledovné podmienky:

- 1) Populácia je panmiktická. Dochádza k náhodnému párovaniu medzi jedincami tej istej populácie.
- 2) Nedochádza k prekrývaniu generácií.
- 3) Jedinci všetkých genotypov majú rovnakú plodnosť. Nepôsobí selekcia proti niektorým genotypom.
- 4) V populácii nedochádza k mutáciám.
- 5) Populácia je uzavretá. Nedochádza k migrácii jedincov medzi rôznymi populáciami.
- 6) Populácia je neohraničene veľká.

#### Použitie Hardyho-Weinbergovho zákona.

Predpokladáme jeden autozómový lokus s alelami **A** a **a**. Frekvencia alely **A** v genofonde určitej populácie je **p** a frekvencia alely **a** je **q**. Pretože na danom lokuse sa vyskytuje buď alela **A** alebo alela **a**, musí platiť:

$$p + q = 1$$

Takáto distribúcia alel sa vyskytuje v gamétach – buď **A** alebo **a**. Po splnutí gamét do zygoty bude potom nasledujúca frekvencia genotypov:

<b>p (A)</b>	<b>q (a)</b>
0,6	0,4

<b>p</b>	<b>p<sup>2</sup></b>	<b>pq</b>
<b>(A)</b>	<b>(AA)</b>	<b>(Aa)</b>
0,6	0,36	0,24
<b>q</b>	<b>pq</b>	<b>q<sup>2</sup></b>
<b>(a)</b>	<b>(Aa)</b>	<b>(aa)</b>
0,4	0,24	0,16

<b>Genotyp:</b>	AA	Aa	aa
<b>Frekvencia:</b>	<b>p<sup>2</sup></b>	<b>2pq</b>	<b>q<sup>2</sup></b>
	<b>p x p</b>	<b>pq + qp</b>	<b>q x q</b>



Rovnaká zákonitosť platí aj v prípade, ak sledovaný gén má viac ako dve alelické formy. Ak napr. frekvencia alel krvnoskupinového systému ABO je:

$$I^A = p, I^B = q, i = r \quad (p + q + r = 1)$$

potom populácia v genetickej rovnováhe bude mať frekvencie genotypov:

$$(p + q + r)(p + q + r) = 1, \text{ t.j.: } p^2 + 2pr + q^2 + 2qr + 2pq + r^2 = 1$$

$$I^A I^A + I^A i + I^B I^B + I^B i + I^A I^B + ii$$

## 12.2. Vývoj genofondu a faktory ovplyvňujúce genetikú rovnováhu populácie

V reálnych populáciách zväčša pôsobia rôzne vplyvy, geneticke aj negeneticke, ktoré ovplyvňujú rovnováhu populácie.

### 12.2.1. Spôsob kríženia

Spôsob, akým dochádza k výberu a párovaniu diploidných organizmov pre pohlavné rozmnožovanie, má pre genetikú štruktúru populácie a jej vývoj v priebehu generácií základný význam. Rozlišujeme štyri základné typy výberu partnera (kríženia):

**Panmixia** je náhodný výber partnera. Každý jedinec s rovnakou pravdepodobnosťou môže mať potomstvo s ktorýmkoľvek jedincom druhého pohlavia tej istej populácie. Genetickým dôsledkom panmixie je náhodné párovanie (kombinovanie) alel genofondu. Panmixia prispieva k zachovaniu stabilnej genetickej štruktúry počas generácií. Ideálnu panmixiu môžeme však predpokladať iba v modelových populáciách, ktoré dokonale spĺňajú presne vymedzené podmienky. Tieto modely sú teoretickým podkladom umožňujúcim poznať faktory, ktoré regulujú vývoj genetickej štruktúry v skutočných populáciách.

V skutočných populáciách dokonalá panmixia neexistuje, pretože výber partnerov je vždy obmedzený. Často dochádza k *nenáhodnému párovaniu*, to znamená, že partneri sa vyberajú podľa určitých znakov. V ľudskej populácii sa pri výbere partnera (partnerky) uplatňujú nielen biologické znaky, ale aj psychické a sociálne vlastnosti. Niektoré znaky majú značný selekčný význam (napr. telesná chyba, malá či nadmerná telesná výška), iné sú naopak pri výbere partnerov neutrálne (napr. krvná skupina, dedičná choroba, ktorá sa prejavuje až po 4. dekáde života).

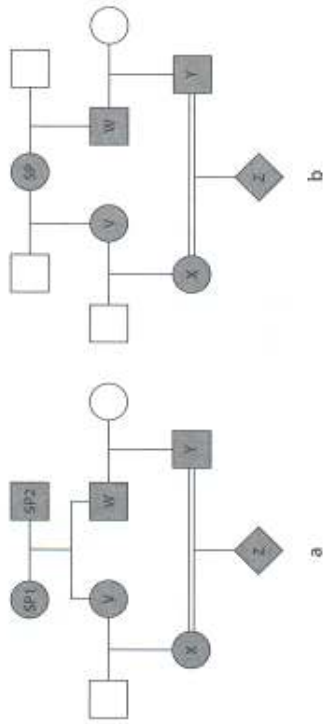
**Asortatívne kríženie** je nenáhodný systém výberu partnera, pri ktorom sa uplatňuje tendencia prednostne sa párovať s jedincom buď podobným – **asortatívne pozitívna (homogamia)**, alebo nepodobným – **asortatívne negatívna**. Asortatívna môže byť podmienená negenetickými faktormi (napr. náboženské) alebo genetikými (napr. jedinci s rovnakými vlastnosťami, rovnakým fenotypom). Ak existuje assortatívna vzhlľadom k vlastnostiam, ktoré sú prevažne geneticke podmienené, bude spôsobovať odchýlky genotypových frekvencií od rovnovážneho stavu. Pozitívna assortatívna spôsobuje homozygotizáciu. Pri negatívnej assortatívne sú vzťahy zložitejšie.

V ľudskej populácii sú sobáše zriedkavo náhodné. Jedinci subpopulácie uzatvárajú častejšie sobáše s jedincami tej istej subpopulácie, ktorá je definovaná rasovými, etnickými a inými kritériami.

**Vonkajšie kríženie** (outbridging) je kríženie jedincov jednej populácie s jedincami odlišnej populácie. Obe populácie sa môžu líšiť genetickou štruktúrou. Vnáša do genofondu

populácie cudzie kombinácie alel alebo nové alely (migrácia). Zvyšuje tým genetikú heterogenitu populácie.

**Príbuzenské kríženie** (inbridging) je kríženie genetiky príbuzných jedincov. V ľudskej populácii sú jeho analógiu príbuzenské sobáše typu bratranec x sesternica, zriedkavo strýko x neter, synovec x teta. Incest je spojenie medzi rodičom a jeho dieťaťom a medzi bratom a sestrou (obe zákonom nedovoľuje). Zvýšená frekvencia príbuzenských sobášov v populácii spôsobuje zmenu genotypových (nie alelových) frekvencií a v populácii sa zvyšuje početnosť homozygotov. Týmto homozygotizačným účinkom sa príbuzenské kríženie podoba autogamii. V prípadoch príbuzenského kríženia je dôležitým údajom **koefficient inbridgingu (F)**, ktorý udáva pravdepodobnosť, s akou mohol potomok zdediť od oboch rodičov identickú alelu génu, pochádzajúcu od spoločného predka. Metóda výpočtu koefficientu inbridgingu v prípade dvoch alebo jedného spoločného predka (Obr. 12-1) je nasledovná:



**Obrázok 12-1.** Výpočet koefficientu inbridgingu

Ak genotyp SP1 je  $A_1A_2$  a SP2 je  $A_3A_4$ ; pravdepodobnosť  $P_1$ , že SP1 odovzdal alelu  $A_1$  jedincovi Z prostredníctvom jedincov V a X ( $SP1 \rightarrow V \rightarrow X \rightarrow Z$ ;  $1/2 \times 1/2 \times 1/2 = 0,125$ ) a zároveň prostredníctvom jedincov W a Y ( $SP1 \rightarrow W \rightarrow Y \rightarrow Z$ ;  $1/2 \times 1/2 \times 1/2 = 0,125$ ) je pravdepodobnosť  $P_{1,2} = 0,125 \times 0,125 = 0,015625$ ; podobne  $P_2$  pre alelu  $A_2$  je  $P_2 = 0,015625$ ; súčet oboch  $P_{1,2} = 0,03125$ ;  $F = P_1 + P_2 = P_3 + P_4$ ;  $F = 0,0625$  alebo  $F = 1/16$ , čo je pravdepodobnosť, že potomok Z je nositeľom dvoch identických alel génu, pochádzajúcich od jedného zo spoločných predkov (SP1 alebo SP2).

Ak majú bratranec a sesternica iba 1 spoločného predka SP,  $F = 0,03125$  alebo  $F = 1/32$ .

Praktický význam si ukážeme na príklade. V populácii sa vyskytuje jeden posilňujúci (aa) s autozómno recesívnou chorobou (napr. fenylketonúriou) na 10 000 zdravých osôb, takže  $q^2(aa) = 10^{-4}$ ;  $q = 10^{-2}$ . V populácii detí z kríženia bratranec x sesternica je frekvencia posilňujúcich daná výrazom  $q^2 + pq \cdot 1/16 = 0,00072 = 7,2 \cdot 10^{-4}$ , kde  $1/16$  je koefficient inbridgingu. To znamená, že pravdepodobnosť narodenia postihnutého je v tomto prípade sedemkrát väčšia ako v ostatnej populácii. To je príčinou známej skutočnosti, že v potomstve z príbuzenských sobášov sa častejšie vyskytujú zriedkavé (vzácné) recesívne choroby.

**Autogamia (samooplodnenie)** – je v podstate extrémna forma inbridgingu, pri ktorej dochádza k splyvaniu gamét produkovaných tým istým jedincom. Tento spôsob rozmnožovania je charakteristický pre samoopelivé rastliny a niektoré hermafroditné nižšie



živočích (predovšetkým parazity). Pri autogamii v populácii v priebehu generácii klesá frekvencia heterozygotov a zvyšuje sa frekvencia homozygotov – dochádza k homozygotizácii populácie. Alelové frekvencie ostávajú pritom nezmenené.

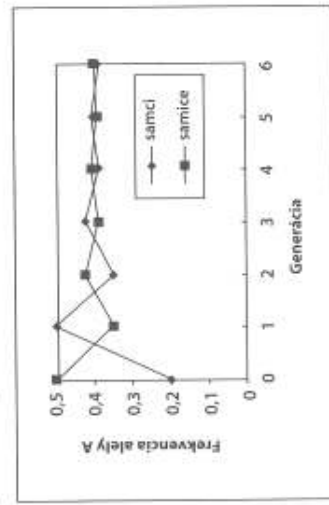
### 12.2.2. Väzbové disekvilibrum

V panmiktickej populácii môže dosiahnuť rovnovážneho stavu trvať aj viac generácií. Je to napríklad v prípade, keď sú sledované gény vo väzbe. Približovanie sa populácie k rovnovážnemu stavu je tým pomalšie, čím je väzba medzi génmi silnejšia. V prípade úplne viazaných génov sa rovnovážny stav nedosiahne vôbec. Príkladom sú známe lokusy zodpovedné za determináciu krvnoskupinových vlastností systému Rh. Tento systém je determinovaný tromi lokusmi *C*, *D* a *E*, z ktorých každý má viacero alel. Tri najčastejšie alely tohto systému *c*, *d*, *e* sa v našej populácii vyskytujú vo frekvenciách 0,55; 0,43 a 0,87. Ak by frekvencia genotypov závisela len od frekvencie jednotlivých alel v genofonde trojnásobne recesívny genotyp *ccdde* by sa v populácii mal vyskytovať vo frekvencii  $0,55^2 \cdot 0,43 \cdot 0,87^2 = 0,04$ . V skutočnosti sa však takýto genotyp v našej populácii vyskytuje v štvornásobne vyššej frekvencii – 0,16, pričom láto hodnota sa z generácie na generáciu nemení. Je to preto, že úplne viazané lokusy CDE sa prenášajú ako jednotka. Pri populačno genetických výpočtoch je preto potrebné považovať za základnú jednotku haplotyp (konkrétnu kombináciu alel viazaných génov).

S väzbovým disekvilibrómom sa stretávame aj pri iných genetických systémoch, ako napr. HLA systéme, alebo génoch pre slinnú a pankreasovú amylázu.

### 12.2.3. Gény na gonozómových lokusoch

Dosiahnutie genetickej rovnováhy v prípade génov, viazaných na chromozóm X môže vyžadovať väčší počet generácií panmiktického kríženia, ak východzie frekvencie alel sú u mužov iné ako u žien. S takýmto nerovnovážnym stavom genotypov na gonozómovom lokuse sa stretávame v populáciách, ktoré vznikli pomerne nedávno zmiešaním dvoch rozdielnych populácií s nerovnakým zastúpením pohlavia. K takémuto typu patria napríklad populácie medzirasových miešančov, v ktorých matky pochádzali z pôvodného obyvateľstva a otcovia z populácie kolonizátorov. Populácia miešančov je po určitý počet generácií v nerovnováhe vzhľadom na X-viazané gény, aj keď je plne panmiktická. Názorne je proces nastolenia genetickej rovnováhy znázornený na obr. 12-2.



**Obrázok 12-2.** Proces dosiahnutia rovnovážneho stavu frekvencie alely génu lokalizovaného na chromozóme X v bisexualnej panmiktickej populácii s nerovnakou počiatčnou frekvenciou alely u samcov a samíc.

### 12.2.4. Mutácie

Mutácia je náhodná trvalá dedičná zmena genetického materiálu. Z hľadiska genetickej štruktúry môže byť mutácia génová, chromozómová, genómová, atď. Mutácia je jedným zo zdrojov genetickej variability.

Z hľadiska významu pre svojho nositeľa môžeme mutácie rozdeliť na: mutácie výhodné, nevýhodné a neutrálne. Výhodné mutácie zvyšujú reprodukčnú schopnosť svojho nositeľa, neutrálne mutácie neovplyvňujú reprodukčnú schopnosť nositeľa. Najčastejšie sú mutácie nevýhodné, ktoré zvyčajne spôsobujú stratu alebo poruchu funkcie génu. Extrémnou formou nevýhodnej mutácie je mutácia letálna, ktorá spôsobuje smrť jedince alebo neschopnosť jedince reprodukovať sa. Pozorovateľné sú však len mutácie zlučiteľné so životom. Odhaduje sa, že každý jedinec je nositeľom až 12 nevýhodných mutančných recesívnych génov, 3 – 5 letálnych ekvivalentov (génov, ktoré v homozygotnom stave spôsobujú postihnutie, resp. sú letálne). Každá mutácia je charakterizovaná mutačnou frekvenciou.

**Mutačná frekvencia** je frekvencia vzniku mutácie na danom lokuse. Vyjadruje sa počtom mutácií na lokus (gamétu) za generáciu. Označuje sa  $\mu$ .

Manifestácia dominantnej choroby vyžaduje mutáciu len na jednom lokuse (len jednej alely z alelového páru). Je dokázané, že frekvencia mutácií pre AD choroby sa zvyšuje so stúpajúcim vekom otca v čase počatia dieťaťa. Mutačná frekvencia pri autozómovo dominantných chorobách je v rozmedzí od  $10^{-6}$  až po  $10^{-4}$ . Pre väčšiu ľudských génov sú mutačné frekvencie v rozmedzí  $10^{-6} - 10^{-5}$ . Z uvedeného vyplýva, že mutácie môžu v priebehu jednej generácie zmeniť frekvenciu alel v genofonde len nepatrne. Sú však neustávajúcimi zdrojom genetickej variability populácie, ktorá je predpokladom pre jeho ďalšiu evolúciu.

### 12.2.5. Selektia a reprodukčná schopnosť.

Selektia je hybnou silou evolúcie genofondu. Overuje životaschopnosť a relatívnu reprodukčnú zdatnosť genotypu (fitness) v populácii a tým aj frekvenciu sledovaného génu. Jedinci s rôznymi fenotypmi majú rôzny počet potomkov. Selektia sa uplatňuje na úrovni:

- **gametickej** – tento typ selektie bol dokázaný u človeka pri chromozómových aberáciách. Gaméty s chromozómovou aberáciou sú znevýhodnené pri fertilizácii.
- **zygotickej** – približne 25 – 35% zygot sa vôbec neimplantuje a približne 45% implantovaných zygot zaniká krátko po implantácii. Asi polovica týchto strát je spôsobená mutačnou záťažou, a to mutáciami na rôznych úrovniach.
- **perinatálnej a perinatálnej** – asi 15% tehotenstiev končí abortom a 3% pôrodom mŕtvonarodeného plodu.
- **postnatálnej** – zo živo narodených detí 2% zomierajú vo včasnom detstve. Do reprodukčného veku zomierajú 3 – 4% jedincov. Asi 20% jedincov nevstupuje do manželstva a asi 10% manželstiev je neplodných.

Selektia preferuje rozmnožovanie jedincov s výhodným genotypom a obmedzuje (prípadne eliminuje) rozmnožovanie jedincov s nevýhodným genotypom. Selektia proti autozómovo recesívnemu fenotypu (*negatívna selektia*) pôsobí iba proti recesívnym homozygotom (aa), nepôsobí proti recesívnej alele a prítomnosť u heterozygotov. Z tohto dôvodu má selektia proti recesívnemu fenotypu menšiu účinnosť, než proti dominantnému fenotypu. Ak by úplná selektia pôsobila proti recesívnemu fenotypu, ktorý sa v populácii vyskytuje vo frekvencii  $q^2$ , v ďalšej generácii by (podľa H-W zákona) bola frekvencia postihnutých  $(q^1)^2 = q^2/(1+q)^2$ . Z uvedenej rovnice vyplýva, že rýchlosť poklesu frekvencie recesívnej alely v populácii pri úplnej negatívnej selekcii závisí od jej počiatčnej hodnoty.



Čím je táto hodnota nižšia, tým je nižší aj medzigeneračný pokles. Hodnotu frekvencie alely po  $n$ -generáciách úplnej selekcie možno vypočítať zo vzťahu  $q^{(n)} = q/(1 + nq)$ , kde  $q$  = východzia frekvencia recesívnej alely,  $q^{(n)}$  = konečná frekvencia recesívnej alely a  $n$  = počet generácií, počas ktorých pôsobí úplná selekcia proti recesívnym homozygotom. Matematickou úpravou rovnice môžeme získať vzťah pre výpočet počtu generácií potrebného pre dosiahnutie želanej frekvencie alely v populácii:  $n = [1/q^{(n)} - 1/q]$ . Ak sa teda negatívna alela vyskytuje v genofonde vo frekvencii 10 % (0,1) a chceme selekciou dosiahnuť jej zníženie na 1 % (0,01), je potrebných  $n = 1/0,01 - 1/0,1$  generácií úplnej selekcie, t.j.  $100 - 10 = 90$  generácií. Ďalšie znižovanie z hodnoty 0,01 na napr. 0,005 by trvalo  $n = 1/0,005 - 1/0,01 = 200 - 100 = 100$  generácií.

V prípade negatívnej selekcie proti autozómovo dominantnému fenotypu nositeľ má zníženú reprodukčnú schopnosť. Úplná selekcia proti dominantnému fenotypu spôsobuje, že dominantná alela v priebehu jednej generácie vymizne. Všetci postihnutí v populácii v ďalšej generácii vzniknú v dôsledku novej mutácie. Neúplná selekcia proti dominantnému fenotypu rýchlo znižuje frekvenciu dominantnej alely. Ak ide o zriedkavé AD alely, prakticky všetci nositelia AD fenotypu sú heterozygoti.

### 12.2.6. Migrácia

Ak sa pôvodne veľká populácia rozdelí do menších subpopulácií, v týchto malých subpopuláciách dochádza v dôsledku odlišných podmienok a náhodných procesoch k zmenám génových frekvencií, takže z genetického hľadiska každá subpopulácia je charakterizovaná odlišnými génovými frekvenciami. Vo väčšine prípadov však nedochádza k absolútnej izolácii populácií, určitý počet jedincov z jednej populácie migruje do inej populácie. Genetickým dôsledkom je **importovanie cudzích alel** do génového fondu danej populácie. Tým sa mení frekvencia alel.

Migrácia môže byť **jednosmerná** alebo **vzájomná**. V novej populácii môže pôsobiť na nositeľov nových alel ná selekcia než v pôvodnej populácii, čo spôsobuje rozdiely v alelových frekvenciách v priebehu generácií. Ak si dve populácie trvalo vymieňajú väčší počet jedincov, môže dôjsť k vyrovnaniu v alelových frekvenciách a ustáleniu rovnakej genetickej štruktúry v oboch populáciách, takže vznikne spoločná väčšia populácia.

Migrácia patrí medzi dôležité evolučné faktory, pretože môže meniť génové frekvencie populácie. Migráciou sa vysvetľujú rozdiely v alelových frekvenciách AB0 krvného systému. V Ázii je vysoká frekvencia alely B, v západnej Európe je naopak nízka. Smerom na západ frekvencia alely B postupne klesá. Zmenami frekvencie alel je možné potvrdiť historické poznatky o sťahovaní národov.

### 12.2.7. Génový posun – drift

**Génový drift** je zmena frekvencie alel v genofonde populácie náhodnými príčinami. Čím je menšia populácia, tým sú väčšie rozdiely v génových frekvenciách medzi populáciami. Génový drift sa v priebehu generácií prejavuje kolísaním početnosti alel, pričom môže dôjsť k fixácii alebo eliminácii niektorých alel, čo by malo za následok celkovú genetickú homozygotizáciu. Génová fixácia je ustálenie jednej alely v populácii ako výsledok eliminácie alternatívnych alel. Génový drift hrá pravdepodobne základnú evolučnú úlohu v tzv. efekte zakladateľa. Ak nová populácia vznikne z malého počtu kolonizujúcich jedincov, týchto niekoľko jedincov samozrejme nemá všetky geny obsiahnuté v genofonde ich materskej populácie. Ak títo jedinci založia inú populáciu, génové frekvencie tejto dcérskej generácie sa budú líšiť od generácie parentálnej. Nová populácia je však v odlišnom prostredí,

pôsobia tu iné selekčné tlaky. Nemôžeme teda povedať, do akej miery je teda genetický rozdiel medzi populáciami spôsobený efektom zakladateľa a do akej miery je spôsobený odlišným selekčným tlakom. V priebehu prvých generácií génové frekvencie veľmi kolísu pôsobením driftu. Keď dcérska populácia zväčší počet svojich jedincov, kolísanie spôsobené driftom sa zmenší.

Efekt zakladateľa vysvetľuje mimoriadne vysoké frekvencie niektorých chorôb v rôznych subpopuláciách. Napr. porfyria variegata (AD choroba, pri ktorej dochádza k veľmi ťažkej až letálnej reakcii na podanie barbiturátov) má vysokú frekvenciu v Juhoafrickej republike a všetkých 30 000 dnes registrovaných nositeľov patologického génu sú potomkami holandských manželov – emigrantov, ktorí sa do Juhoafrickej republiky odsťahovali pred 300 rokmi. Ďalším príkladom je Tayova-Sachsova choroba (AR ochorenie – vrodená porucha metabolizmu s neurologickou symptomatológiou), ktorá má vysoký výskyt u Židov pôvodom z východnej Európy.

## 12.3. Eufenika a eugenika

**Eufenika** je disciplína, ktorá sa vo všeobecnosti zaoberá zlepšovaním fenotypu človeka. V širšom zmysle možno ako eufenické zásahy označiť akékoľvek postupy, ktoré odstraňujú, kompenzujú alebo zmiernujú fenotypové odchýlky a zlepšujú kvalitu života jedinca. V tomto zmysle možno za eufenický zásah považovať aj také zásahy, ako je napr. kompenzácia zrakových chýb optickými pomôckami, kozmetické operácie a pod. Z genetického hľadiska považujeme za eufenické postupy také zásahy, ktoré kompenzujú resp. odstraňujú fenotypový efekt dedičných ochorení, pričom zlepšujú nielen kvalitu života pacienta ale často aj jeho reprodukčnú schopnosť. Do tejto kategórie eufenických postupov možno zaradiť napr. podávanie inzulínu pacientom s diabetes mellitus 2. typu, špeciálne diéty pri geneticky podmienených enzymopatiách, liečba pacientov s kosáčikovitou anémiou, chirurgické úpravy geneticky podmienených rázštepových porúch vývinu a pod. Takéto zásahy majú z hľadiska genetiky populácie **dysgenický efekt** – vo všeobecnosti vedú k zhoršeniu genofondu populácie, pretože umožňujú odovzdávanie mutovaných alel potomstvu a teoreticky k zvýšenej incidencii genetických ochorení v budúcich generáciách. Jednoznačná predikcia vývoja genofondu je však značne obtiažná vzhľadom na frekvenciu výskytu dedičných ochorení, ktorých eufenická kompenzácia je v súčasnosti možná. Otázkami vývoja genofondu ľudstva v „pozitívnom“ smere sa zaoberá odvetvie, označované termínom eugenika.

**Eugenika** je vedná disciplína zaoberajúca sa otázkami zlepšenia skladby ľudskej populácie. Jej zakladateľom bol Francis Galton, ktorý tento termín uviedol v r. 1883 vo svojej knihe „Skúmanie ľudských schopností a ich vývoja“. Galtonove návrhy na zlepšenie genetického stavu populácie získali široký ohlas začiatkom 20. storočia, po znovuobjavení mendelových zákonov dedičnosti. Vznikli odborné spoločnosti v Británii (Britská eugenická spoločnosť, založená v r. 1907 a v r. 1988 premenovaná na Galtonov inštitút), USA (Eugenic Record Office, založený r. 1910 v Cold Spring Harbor Laboratory, NY), Nemecku (Kaiser-Wilhelm-Institut für Anthropologie, menschliche Erblehre und Eugenik, 1927) a ďalších európskych štátoch. Tieto inštitúcie si vytyčili za cieľ monitorovať genetický stav populácie a navrhovať postupy na jeho zlepšenie (zväčša v národnom meradle). Tieto postupy spočívali predovšetkým v obmedzení reprodukcie „geneticky zaťažených“ jedincov, mali teda charakter **negatívnej eugeniky**. Na tomto základe prijali viaceré štáty (USA, Kanada, Nemecko, Švédsko a ďalšie) zákony o nútenej sterilizácii, nezákonosti medzirasových manželstiev a „genetický status“ sa stal aj kritériom imigračného procesu v USA. Počas platnosti týchto zákonov bolo na základe súdneho rozhodnutia v USA sterilizovaných 64 000



## Úlohy

- 1) Incidencia albinizmu (AR) v kaukazsko-eurooidnej rase je 1 : 33 000. Vypočítajte frekvenciu:
  - a) recesívnej mutančnej alely
  - b) normálnej dominantnej alely
  - c) heterozygotov v populácii
  - d) kríženia dvoch heterozygotov
- 2) Na základe výskytu zriedkavých autozómovo recesívnych chorôb v populácii vypočítajte percentuálne zastúpenie heterozygotných prenášačov mutančných alel v daných populáciách:
  - a) 0,0064
  - b) 0,01
  - c) 0,09
  - d) 0,10
  - e) 0,000081
- 3) Ak 4 % jedincov v určitej populácii, ktorá je v genetickej rovnováhe, má recesívny znak, aká je pravdepodobnosť, že sa znak objaví v potomstve dvoch jedincov, ktorí tento znak nemajú ?
- 4) V určitej populácii sa vyskytujú tri genotypy s uvedenými frekvenciami: AA 0,81; Aa 0,18; aa 0,01.
  - a) Aké sú frekvencie alel A a a?
  - b) Aké budú ich frekvencie v ďalšej generácii?
  - c) Aká časť všetkých krížení v tejto populácii bude Aa x Aa?
- 5) Cystická fibróza je relatívne časté autozómovo recesívne ochorenie s frekvenciou 1/2000 novorodencov. Aká je približná frekvencia heterozygotov (prenášačov) pre cystickú fibrózu v danej populácii?
- 6) Talasémia, zhubná anémia, sa vyskytuje aj v pomerne uzavretej juhotalianskej prístavovateckej populácii v USA. U koľkých členov tejto populácie (%) môžeme predpokladať ľahkú formu ochorenia (genotyp Tt), ak na ťažkú formu (tt) zomierajú 4% novorodencov?
- 7) Schopnosť vnímať horkú chuť PTC – fenyliokarbamidú je determinovaná dominantnou alelou T, kým recesívni homozygoti sú „nechutnáči“. Spomedzi 125 študentov 88 boli „chutnáči“ PTC a 37 nevnímali horkú chuť PTC. Aké sú frekvencie alel T a t v tejto populácii? Aké sú frekvencie jednotlivých genotypov?
- 8) Tayova-Sachsova choroba je podmienená génovou mutáciou na chromozóme č. 15, ktorá spôsobuje deficienciu lyzozómového enzýmu hexozaminidázy A a dedí sa autozómovo recesívne. Kým v normálnej populácii je incidencia tejto choroby 1 : 360 000, v populácii Židov vetvy Aškenazi pochádzajúcich zo strednej Európy je incidencia choroby 1 : 3 600. Aká je frekvencia prenášačov mutančnej alely v tejto populácii?
- 9) Achondroplázia je autozómovo dominantná porucha, ktorá má za následok trpasličí vzrast u postihnúťho jedinca. V populácii 50 000 jedincov bolo zistených 5 prípadov s achondropláziou. Traja z postihnutých jedincov mali aj rodičov postihnutých, kým dvaja z postihnutých jedincov mali rodičov normálneho vzrastu. Vypočítajte frekvenciu dominantnej alely pre achondropláziu v uvedenej populácii.

osôb, vo Švédsku 62 000 a nezverejnené počty v iných štátoch. Íšlo predovšetkým o osoby duševne choré ale aj príslušníkov rasových a etnických menšín. V nacistickom Nemecku boli eugenické princípy zneužitá na legalizovanie nielen sterilizácie, ale aj eutanázie a v konečnom dôsledku aj genocídny na rasovom základe. Odsúdenie týchto praktík po druhej svetovej vojne vrhol negatívne svetlo aj na samotný termín *eugenika*.

Podľa zásad populačnej genetiky negatívne eugenické zásahy nemôžu mať výrazný vplyv na zlepšenie genofondu populácie v krátkodobom horizonte, pretože väčšina genetikých ochorení má recesívny charakter a selekcia proti recesívnym homozygotom je len málo účinná. Súčasne negatívna eugenika spočíva predovšetkým v genetickom skríningu (t.j. identifikácii nosičov mutovaných alel génu), genetickom poradenstve a prenatálnej diagnostike. Zvýšenie informovanosti populácie o dedičnosti závažných ochorení, riziku vyplývajúcom pre potomstvo postihnutých alebo prenášačov spolu s metódami modernej antikoncepce a prenatálnej diagnostiky umožňuje rodičom zodpovedne riešiť reprodukčnú stratégiu z hľadiska genetického zdravia potomstva a v konečnom dôsledku aj genofondu ďalších generácií populácie. O efektívnosti takto ponímanej eugeniky svedčia napríklad výsledky skríningu, poradenstva a prenatálnej diagnostiky talasémie (AR hemoglobínopatia) uplatňované od r. 1970 na Cypre, kde sa počet postihnutých detí znížil z hodnoty 1/158 novorodencov prakticky na nulu.

**Pozitívna eugenika** predstavuje opačný prístup k zlepšovaniu genofondu. Pôvodne naivné predstavy Galtona a nasledovníkov vychádzali z chovateľskej praxe, kde do reprodukčného procesu sú vyberaní len najvhodnejší jedinci. Tento prístup sa pokúsil v osemdesiatych rokoch 20. storočia oživiť R.K.Graham, ktorý navrhoval široké využitie umelého oplodňovania s využitím spermií darcov, ktorí dosiahli vysoké spoločenské ocenenie. Ním založená banka spermií (Repository for Germinal Choice, v kalifornskom Escondido) mala zhromažďovať spermie vybraných darcov (vrátane nositeľov Nobelovej ceny) a poskytovať ich na reprodukciu. Celý projekt bol však už v dobe vzniku kritizovaný nielen pre etické problémy, ktoré prináša, ale aj z dôvodov čisto biologických – celospoločenské ocenenie dosahujú ľudia v zrelom až pokročilom veku, teda v dobe, keď genóm ich pohlavných buniek môže niesť celý rad spontánnych mutácií, indukovaných počas života.

V súčasnosti metódy molekulovej analýzy ľudského genómu, asistovanej reprodukcie a preimplantačnej diagnostiky umožňujú pozitívne aj negatívne zásahy do ľudskej reprodukcie a tým aj do genofondu ďalších generácií. Otázky dotýkajúce sa technických, etických aj legislatívnych problémov manipulácie s ľudským genómom, „projektovania“ genotypov potomkov, kritéria výberu „vhodných“ a „nevhodných“ génov a ich kombinácií na úrovni dnešného poznania sú v súčasnosti otvorené širokej diskusii.



- 21) Albinizmus je recesívne dedičné ochorenie, ktoré sa vyskytuje vo frekvencii približne 0,00003. Na koľko generácii by bolo potrebné vyradiť albinov z reprodukcie, aby početnosť recesívnej alely klesla na polovicu terajšej hodnoty? Predpokladáme prítom, že na príslušnom lokuse nevznikajú mutácie.
- 22) Podagra je determinovaná autozómovo dominantne. Penetrancia dominantnej alely u mužov je 20 %, u žien je nulová.
- a) Aká je pravdepodobnosť narodenia dieťaťa postihnutého podagrou v rodine, kde obaja rodičia sú heterozygoti?
- b) Aká je pravdepodobnosť výskytu ochorenia v rodine, kde jeden z rodičov je heterozygot a druhý recesívny homozygot vo vzťahu k tomuto znaku?
- 23) Arachnodaktýlia je podmienená dominantnou autozómovou vlohou s penetranciou 30 %, ľavorukosť recesívnu autozómovou vlohou s úplnou penetranciou. Aká pravdepodobnosť výskytu oboch anomálií súčasne u detí v rodine, kde obaja rodičia sú heterozygotmi pre oba gény.
- 24) Podľa údajov švédskych genetikov sú niektoré formy schizofrenie podmienené dominantnou autozómovou vlohou. Prítom penetrancia dominantnej vlohy u homozygotov je 100 %, u heterozygotov 20 %.
- a) Určte pravdepodobnosť narodenia chorých detí v rodine, v ktorej jeden rodič je heterozygot a druhý recesívny homozygot.
- b) Určte pravdepodobnosť narodenia chorých detí v manželstve dvoch heterozygotov.
- 25) V istej izolovanej populácii má všetkých jej 800 členov krvnú skupinu O. V inej populácii majú všetci krvnú skupinu A. Aká bude frekvencia týchto krvných skupín po jednej generácii náhodného kríženia, ak k prvej populácii pridáme 200 členov druhej populácie?
- 26) Ak približne 10 % mužov je postihnutých farbostepšou (daltonizmom), koľko žien s porušeným farbocitom možno predpokladať v populácii?
- 27) Ktorá z týchto populácií je v Hardyho-Weinbergovej rovnováhe?
- a) AA - 0,70, Aa - 0,21, aa - 0,09  
 b) M - 0,33, MN - 0,34, N - 0,33  
 c) 100 % MN  
 d) AA - 0,32, Aa - 0,64, aa - 0,04  
 e) AA - 0,64, Aa - 0,32, aa - 0,04
- Pre každú populáciu vypočítajte očakávané zastúpenie genotypov po jednej generácii panmixie.
- 28) Výskyt polykozy hrubého čreva v našej populácii je približne 1 : 8 000. Ochorenie je podmienené autozómovo dominantne. Aká je frekvencia tejto alely v populácii?
- 29) Torus palatinus patrí medzi anomálie tvare podnebia. Je to benígny nádor orálnej strany tvrdého podnebia, ktorý môže spôsobovať poruchy reči. Táto autozómovo dominantná anomália sa vyskytuje u 9 % populácie.
- a) Aká bude priemerná frekvencia sobášov medzi jedincami, u ktorých sa torus palatinus vyskytuje?
- b) Ak uzavrú manželstvo dvaja jedinci s normálnym tvarom podnebia, aká je pravdepodobnosť, že sa im narodí dieťa s anomáliou?

- 10) Vypočítajte frekvenciu genotypov AA, Aa, aa po jednej generácii panmixie, ak v súčasnej populácii je frekvencia AA = 0,2; Aa = 0,6; aa = 0,2. Aká bude frekvencia jednotlivých genotypov po dvoch generáciách panmixie?
- 11) Fenylketonúria je choroba podmienená autozómovo recesívne. V populácii sa vyskytuje jedno postihnuté dieťa na 10 000 novorodencov.
- a) Zistite frekvenciu alely pre túto chorobu v populácii.
- b) Koľko percent obyvateľov nesie alelu v heterozygotnej konštitúcii?
- 12) Dedičná methemoglobinémia je geneticky determinovaná autozómovo recesívne. U pôvodných obyvateľov Aljasky sa vyskytuje vo frekvencii 0,09 %. Stanovte genetickú štruktúru analyzovanej populácie z hľadiska génu pre methemoglobinémiu.
- 13) Pri sledovaní obyvateľov južného Poľska bolo zistených 11 163 osôb s krvnou skupinou M, 15 267 s krvnou skupinou MN a 5 134 s krvnou skupinou N. Stanovte frekvenciu alel M a N v populácii obyvateľov južného Poľska.
- 14) Krvnoskupinový systém Kidd je determinovaný dvoma alelami  $K^a$  a  $K^b$ . Alela  $K^a$  je dominantná nad alelou  $K^b$  a jedinci, ktorí ju majú v genotypy sa označujú ako Kidd-positívni. Frekvencia alely  $K^a$  medzi obyvateľmi Krakova je 0,458. Frekvencia Kidd-positívnych jedincov medzi černochoami je 80 %. Aká je genetická štruktúra oboch populácií pre krvnoskupinový systém Kidd.
- 15) V populácii 376 Indiánov kmeňa Navajo zistili 305 jedincov s krvnou skupinou M, 67 s MN a 4 so skupinou N.
- a) Je táto populácia v genetickej rovnováhe?
- b) Vypočítajte frekvenciu alel M a N.
- c) Aká je pravdepodobnosť, že dieťa matky s krvnou skupinou N bude mať rovnaký fenotyp?
- 16) Krvný systém Duffy je determinovaný 3 alelami jedného lokusu:  $Fy^a$ ,  $Fy^b$  a  $Fy$ . Alela  $Fy$  je recesívna a vyskytuje sa iba u černochoov. Alela  $Fy^a$  je kodominantná voči alele  $Fy^b$ . Frekvencia jedincov s antigénom  $Fy^b$  predstavuje 74,53 % v populácii Rusov, 66,46 % u Talianov a 69,9 % u Poliakov. Aká je frekvencia alel  $Fy^a$  a  $Fy^b$  v týchto populáciách.
- 17) Zjednodušené predpokladáme, že vrodené vyklbenie bedrového kľbu je podmienené dominantnou vlohou s penetranciou 25 %. Ochorenie sa vyskytuje s frekvenciou 6 : 10 000. Zistite počet recesívnych homozygotov.
- 18) Podagra (dna, arthritis urtica) sa vyskytuje u 2 % ľudí a predpokladáme, že je podmienená autozómovo dominantne. U žien sa gén podagry neprejavuje, u mužov je jeho penetrancia 20 %. Stanovte genetickú štruktúru populácie pre analyzovaný znak, vychádzajúc z uvedených poznatkov.
- 19) V oblasti s 500 000 obyvateľmi boli zaregistrovaní 4 chorí na alkaptonúriu (AR). Vypočítajte počet heterozygotov pre analyzovaný znak v danej populácii.
- 20) Testovaním schopnosti vnímať horlkú chuť fenyliokarbamidu (PTC) bolo zistené, že v populácii je 70 % „chutnačov“ a 30 % „nechutnačov“. Neschopnosť vnímať horlkú chuť PTC sa dedí autozómovo recesívne.
- a) Vypočítajte frekvenciu alel T a t v populácii (T - z angl. *taster* = chuťnač).
- b) Vypočítajte frekvenciu jednotlivých genotypov v populácii.



### 13. Genetické poradenstvo

Základnou úlohou genetických konzultácií, označovaných aj ako genetické poradenstvo, je poskytnúť pacientom s geneticky podmieneným patologickým stavom alebo ich rodičom, prípadne ďalším príbuzným, dostatok informácií o charaktere tohto patologického stavu, o jeho ďalšom priebehu, o prípadných možnostiach jeho liečby, ale predovšetkým o výške rizika opakovaného výskytu u ďalších príbuzných (detí, súrodencov a iných), ako aj o možnostiach a spôsobe jeho prevencie.

Samotná **genetická konzultácia** sa skladá z niekoľkých častí:

- Určenie diagnózy.** Choroba probanda (prvý vyšetrený) a u všetkých ďalších postihnutých v rodine musí byť precízne a hlavne presne diagnostikovaná. Výsledkom omylu, ktorý môže nastať pri zámene dvoch podobných stavov alebo dedičného ochorenia za nededičné, môže byť úplne chybná prognóza. Určenie diagnózy nie je vecou genetika, ale špecializovaného lekára, ktorý s genetikom spolupracuje.
- Genetická anamnéza** vedie k zostaveniu rodokmeňa. Relevantné údaje sú zbierané všetkými dostupnými spôsobmi, pohovormi s jednotlivými členmi rodiny, ich vyšetrením, štúdiom starších materiálov hlavne chorobopisov, snímok a podobne. Rodokmeň by mal zobrazovať aspoň tri generácie a zahŕňať čo najväčší počet jedincov. Z rodokmeňa sa dá v niektorých prípadoch zistiť aký spôsobom sa dané ochorenie dedí (napr. autozómovo dominantné, gonozómovo recesívne ochorenie a pod.).
- Štúdium literárnych zdrojov** o danej chorobe v dnešnej dobe zahŕňa nielen prácu s dostupnou literatúrou ale aj s databázami na internete a s poznatkami o prípadoch publikovaných v minulosti.
- Vyslovenie genetickej prognózy (predpovede).** Najčastejšie sa jedná o vyslovenie predpovede vzhľadom k možnosti alebo pravdepodobnosti narodenia postihnutého dieťaťa. Prognóza by mala byť zrozumiteľná aj pre laikov, akými vo väčšine prípadov vyšetřovani rodičia sú.
- Návrh opatrení.** Genetik odporučí riešenie situácie napr. prenatálnu diagnostiku v tehotenstve, prerušenie tehotenstva, antikoncepciu, adopciu, ochranný alebo liečebný režim u postihnutého. Ponúknuté by mali byť všetky reálne možnosti, s tým, že konečný výber a riešenie situácie je na rodičoch dieťaťa, v iných prípadoch na pacientovi prípadne na jeho najbližších alebo zákonných zástupcoch.

#### 13.1. Retrospektívne a prospektívne genetické konzultácie

V rámci **retrospektívnej konzultácie** sa riešia situácie, v ktorých sa určitý patologický stav už vyskytol u jedného alebo viacerých rodinných príslušníkov.

**Prospektívne genetické konzultácie** sú zamerané na prevenciu už prvého výskytu genetického patologického stavu v rodine, a preto majú väčší význam ako konzultácie retrospektívne. Možno ich však realizovať len v rodinách, v ktorých už boli identifikovaní genetickí nositelia (heterozygoti pre autozómovo recesívnu patologickú alelu, prenášačky ochorenia s dedičnosťou viazanou na chromozóm X recesívneho typu, nositelia vyvážených chromozómových aberácií), alebo v selektovaných populáciách so zvýšeným výskytom dedičných ochorení závažného charakteru (napr. u Židov pôvodu Aškenázi je to Tayovasachsova choroba, u obyvateľov pobrežných oblastí Stredozemného mora  $\alpha$ -talasémia a pod.). Patria sem napr. aj konzultácie s manželskými partnermi, u ktorých je, pre ich vyšší vek, riziko genómových a chromozómových aberácií zvýšené.

30) Palatoschisis (izolovaný ríazstep podnebia) má v populácii incidenciu 1 na 2 500 zdravých jedincov. Dedí sa autozómovo dominantne. Vypočítajte frekvenciu mutančnej alely v tejto populácii a frekvenciu heterozygotov a dominantných homozygotov v tejto populácii.

31) Trema (medzera medzi špičiakom a rezákom) sa dedí autozómovo dominantne. V populácii má tento znak 10 % jedincov. Vypočítajte frekvenciu dominantnej alely v populácii a frekvenciu heterozygotov a dominantných homozygotov v tejto populácii.

32) Jedna z foriem nanizmu (trpasličí vzrast) je známa ako Ellisov-vanCreveldov syndróm. U postihnutých jedincov je chondrodysplastický nízky vzrast, skrátenie dlhých kostí na rťg snímkach, obojstranná polydaktylia, polymetakarpia, hypoplázia zubov a nechto, vrodené chyby srdca, atď. V určitej komunite bolo zistených 5 postihnutých jedincov na 1000 novorodencov, kým v celej populácii pozostávajúcej z 8 000 jedincov bola zistená incidencia 2 : 1 000. Všetci postihnutí jedinci mali rodičov s normálnym vzrastom. Aký je najpravdepodobnejší typ dedičnosti? Vypočítajte frekvenciu mutančnej alely v populácii a danej komunite a frekvenciu prenášačov za predpokladu, že sú dodržané podmienky platnosti Hardyho-Weinbergovho zákona.

33) Gén CCR5 kóduje bunkový povrchový cytokínový receptor, ktorý umožňuje vírusu HIV (Human Immunodeficiency Virus) vstup do bunky. Deléciou 32 bp vzniká alela  $\Delta$ CCR5, ktorej produktom je nefunkčný proteín. Recesívni homozygoti  $\Delta$ CCR5 /  $\Delta$ CCR5 sú rezistentní voči infekcii HIV, pretože bunky majú na svojom povrchu nefunkčný receptor. V populácii 800 ľudí bolo identifikovaných 650 jedincov genotypu CCR5 / CCR5, 126 heterozygotov CCR5 /  $\Delta$ CCR5 a 24 homozygotov  $\Delta$ CCR5 /  $\Delta$ CCR5.

- Vypočítajte genotypové a alelové frekvencie v danej populácii.
- Je populácia v genetickej rovnováhe?
- Akú frekvenciu alel možno očakávať v nasledujúcej generácii?
- Aký podiel zo všetkých manželstiev budú predstavovať manželstvá heterozygotov?

34) Ehlers-Danlosov syndróm postihuje kožu a spojivové tkanivá, ktoré sú v dôsledku poruchy kolagénu nadmerne elastické a krehké. Pre ochorenie je typická lokusová heterogenita – vyskytuje sa v autozómovo dominantnej, autozómovo recesívnej, ale aj v X-viazanej recesívnej forme. V určitej populácii boli zaznamenané všetky 3 formy tohto ochorenia, každá s frekvenciou 1:3 600.

a) Vypočítajte frekvencie mutovaných alel a frekvenciu heterozygotov pre všetky 3 formy.

b) Proti všetkým 3 formám ochorenia pôsobí selekcia, ktorá významne znižuje fitness postihnutých jedincov. Uvažujte o tom, ako by sa úspešná liečba (zniženie selekčného tlaku) odrazila v alelových frekvenciách. Môže úspešné liečenie genetických chorôb vyvolať ich závažný vzostup v najbližších generáciách?

35) Nakreslite rodokmeň pre najbežnejší typ konsangvinného kríženia – manželstvo bratranca so sesternicou 1. stupňa, ktorí mali rovnakých starých rodičov, teda dvoch spoločných predkov.

- Vypočítajte koeficient inbridingu pre ich potomstvo.
- Ako by sa zmenil koeficient inbridingu, ak by obaja manželia mali spoločného iba jedného predka (napr. spoločnú starú mamu, pričom starí otcovia by boli rozdielni). Nakreslite rodokmeň.



### 13.2. Genetická prognostika

Genetická prognostika je proces, pri ktorom dostane pacient alebo príbuzný s rizikom fakultatívnej dedičnej choroby informáciu o jej následkoch, pravdepodobnosti, s akou sa u nich vyvinie a s akou ju preneste na svoje potomstvo, ako aj o spôsoboch prevencie a možnostiach terapeutického ovplyvnenia.

Osobitnou stránkou genetiky podmienených chorôb je riziko rekurencie (pravdepodobnosť, s akou sa choroba prejaví aj u iných členov rodiny). Pri genetickej prognostike je najčastejšia situácia, že osoby, ktorým poskytujeme genetickú prognózu, sú rodičia, ktorí mali dieťa s geneticky podmieneným patologickým stavom a chcú vedieť viac o chorobe a jej následkoch pre prípadné nasledujúce deti.

Hlavnou úlohou genetických konzultácií je určiť **genetickú prognózu**, t. j. pravdepodobnosť výskytu určitej dedičnej choroby, resp. genetickej poruchy u detí, súrodencov a v širšom príbuzenstve.

**Výška rizika výskytu** genetického patologického stavu vyplýva pri monogénových ochoreniach priamo zo segregančných pomerov (pri autozómovo dominantnom type dedičnosti – 50%, pri autozómovo recesívnom – 25%, pri type viazanom na chromozóm X recesívneho charakteru pre synov prenášačky – 50%), alebo má empirický charakter (multifaktoriálne podmienené patologické stavy, chromozómové aberácie).

Odhad genetickej prognózy sťažujú viaceré okolnosti. Je to napr. genetická heterogenita, fenokópie (genetickým chorobám podobné klinické prejavy sú vyvolané negenetickými príčinami), genokópie (mutácie v rôznych génoch vyvolávajúce rovnaké klinické ochorenie alebo prejavy), gonádový mozaicizmus, zriedkavý a často izolovaný výskyt klinicko-genetických jednotiek, neskorý nástup klinických prejavov, nekompletná penetrancia a variabilná expresivita patologického génu.

Empirické riziko patologických stavov s multifaktoriálnym typom dedičnosti platí len pre danú populáciu, v inej sa môže aj výraznejšie líšiť.

#### Výetrovacie metódy v klinickej genetike:

- 1) Genealogická analýza - štúdium rodokmeňa
- 2) Cytogenetické vyšetrenie - chromozómová analýza – karyotyp  
- prúžkovacie metódy  
- molekulárna cytogenetika – ISH, FISH
- 3) Biochemické vyšetrenie
- 4) Imunologické vyšetrenie
- 5) Antropologické vyšetrenie – dermatoglyfické a somatometrické vyšetrenie
- 6) Molekulárna analýza DNA

### 13.3. Prenatálna genetická diagnostika (PGD)

Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) možno prenatálnu diagnostiku definovať ako „všetky prenatálne aktivity, ktoré majú za cieľ diagnostiku vrodených chýb, za ktoré sú považované všetky anomálie na morfolologickej, štruktúrálnej, funkčnej alebo molekulej úrovni prítomné počas pôrodu (hoci sa môžu prejavíť aj neskôr), vnútorné alebo vonkajšie, s familiálnym alebo sporadickým výskytom, zdedené alebo iné, vyskytujúce sa jednotlivito alebo mnohopočetne.“ Prenatálna diagnostika umožňuje rodinám s rizikom dedičných chorôb a vrodených vývinových chýb plánovať rodičovstvo s vedomím, že postihnutie plodu bude možné zistiť už v priebehu gravidity. V prípade zistenia neliečiteľného postihnutia plodu je rodina v plnej miere informovaná a má možnosť požiadať o ukončenie

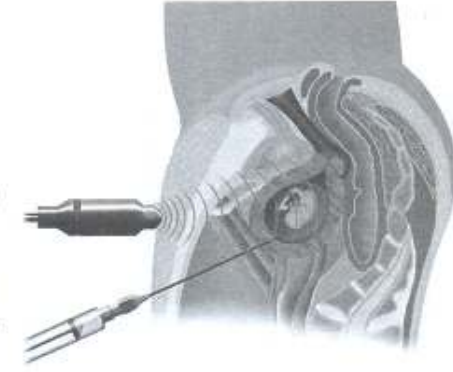
tehotenstva do 24. týždňa gravidity. Ak sa zisti postihnutie plodu, ktoré je nezlučiteľné zo životom (napr. Patauov syndróm), je možné na žiadosť rodiny ukončiť tehotenstvo aj po 24. týždni gravidity. Postupne sa overujú aj možnosti prenatálnej liečby – rozvíja sa fetálna medicína. Gynekológovia posilujú tehotné ženy s rizikom vrodených chýb a dedičných chorôb pre plod, ďalej tehotné, ktoré sú staršie ako 35 rokov, a ženy na základe pozitívnych výsledkov skriningových vyšetrení (ultrazvukových vyšetrení plodu a vyšetrení biochemických markerov zo séra matky) na genetickú konzultáciu a indikáciu prenatálnej diagnostiky. Invasívne vyšetrenie sa robí na základe výsledkov genetickej konzultácie a na základe poučenia a so súhlasom tehotnej ženy (biopsia choriových klkov, amniocentéza, kordocentéza – odber krvi z pupočnej šnúry plodu, fetoskopia).

#### Indikáciu na prenatálnu genetickú diagnostiku je:

- 1) vek 35 rokov a viac a s ním súvisiace zvýšené riziko výskytu chromozómových aberácií u plodov gravidných žien v tomto veku (podľa kapacity príslušného strediska sa veková hranica pre indikáciu prípadne stanoví vyššie), nosičstvo vyváženej reciprokej translokácie alebo chromozómovej mozaiky u jedného z rodičov, výskyt chromozómovej aberácie u predchádzajúceho dieťaťa,
- 2) vybrané dedičné metabolické poruchy,
- 3) ochorenia s typom dedičnosti viazaným na chromozóm X s cieľom určiť pohľavie plodu,
- 4) vybrané klinicko-genetické jednotky diagnostikovateľné pomocou molekulovej analýzy DNA,
- 5) niektoré morfológické anomálie orgánov a tela plodu,
- 6) vybrané klinicko-genetické jednotky diagnostikovateľné z krvi a z tkaniv plodu.

#### Spôsoby vyšetrenia

Na vyšetrenie sa používa:

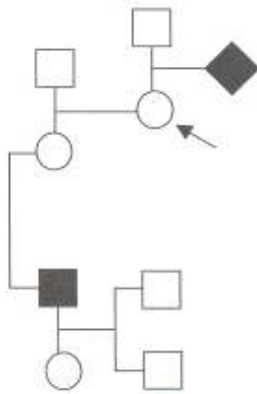


Obrázok 13-1. Amniocentéza.

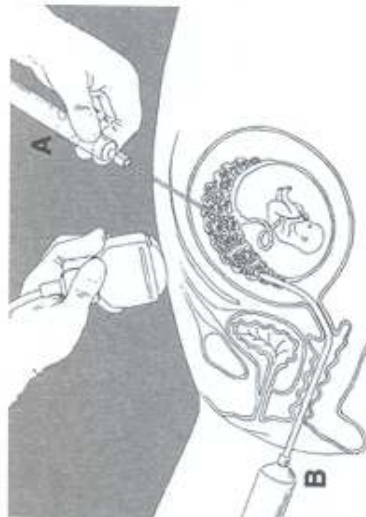
- 1) **Vzorka plodovej vody** (bunky a supernatant) získaná amniocentézou (AMC), punkciou amniovej dutiny, obr. 13-1) najčastejšie v 16. až 18. týždni gravidity. Metóda sa používa už od 60. rokov minulého storočia a v dnešnej dobe je aj pri opakovaní spojená len s minimálnym rizikom (riziko spontánneho potratu je pod 1%). Jedná sa o invazívnu metódu, pri ktorej sa dutou ihlou odoberie asi 10 ml amniovej tekutiny. V tejto tekutine sa vznáša plod a tiež bunky odlupnuté z jeho povrchu, vrátane buniek z dýchacieho epitelu, epitelu z tráviaceho a močopohlavného traktu, ktoré sú s tekutinou v kontakte. Amniocyty, čiže bunky získané z plodovej vody, sú najčastejšie materiálom pre chromozómovú analýzu s cieľom zistiť chromozómové aberácie. Najnovšie sú amniocyty podkladom pre molekulovú diagnostiku DNA. Supernatant sa najčastejšie využíva na kvantitatívne určovanie hladín alfa-fetoproteínu, prípadne acetylcholinesterázy. Ich vysoké hladiny poukazujú na prítomnosť otvorených defektov nervovej trubice u plodu.



## Úlohy

1. Zdraví manželia prišli do genetickej poradne a pýtajú sa na riziko narodenia dieťaťa s fenyketonúriou. Pri rodinnej anamnéze sme zistili, že sťrýko z matkinej strany bol postihnutý touto metabolickou chorobou. Fenyketonúria sa vyskytuje v populácii s frekvenciou 1 : 10 000.
- 
2. Galaktozémia je AR metabolická porucha s frekvenciou heterozygotov 1 : 100 v populácii. Muž, ktorého sestra je postihnutá galaktozemiou, žije v manželstve so zdravou ženou. Aké deti sa môžu manželom narodiť?
  3. Albinizmus sa dedí autozómovo recesívne (AR), frekvencia heterozygotov v populácii je 1/50. Žena s normálnou pigmentáciou, ktorej otec bol postihnutý albinizmom, chce vedieť, aké je riziko výskytu albinizmu u jej detí. Jej manžel nemá uvedenú poruchu pigmentácie.
  4. Zdraví manželia chcú vedieť, aká je pravdepodobnosť narodenia syna, ktorý bude farbosllepý. Matka manžely a brat manžely mali túto poruchu farbocitu (X-viazaná recesívna dedičnosť, XR).
  5. Cystická fibróza (mukoviscidóza) je autozómovo recesívne ochorenie (AR) pankreasu a iných žliaz s vonkajšou sekréciou s frekvenciou heterozygotov 1 : 25 v populácii. Stanovte riziko narodenia dieťaťa postihnutého cystickou fibrózou v manželstve brataranca a sesternice. Sestra babičky týchto manželov bola postihnutá touto chorobou, ostatní členovia rodiny sú zdraví. Porovnajme riziko narodenia postihnutého potomka v tomto manželstve a v normálnej populácii.
  6. Hluchonemosť je podmienená autozómovo recesívne, frekvencia heterozygotov v populácii je 0,04.
    - a) Hluchonemí manželia chcú vedieť, či ich deti budú rovnako postihnuté, alebo či môžu mať aj zdravé deti.
    - b) Podrobnejším vyšetrovaním sa zistil nehereditárny (nededičný) pôvod choroby u muža a hereditárny (dedičný) pôvod u ženy. Stanovte pravdepodobnosť narodenia hluchonemého dieťaťa v tejto rodine.
  7. Manželstvo uzavrela žena so šedým zákalom očné dŕhovky (katarakta, AD) a zdravý muž, ktorého rodičia a dve sestry boli zdraví. Zakreslite rodokmeň tejto rodiny a stanovte prognózu pre deti uvedených rodičov. Katarakta má 80 % penetranciu.
  8. Anna, má okuklutátny albinizmus (autozómovo recesívne dedičná choroba, AR). Jana, dcéra Anninej sestry, sa vydala za Roba, syna Anninho brata a majú spoločné dieťa Karola.

2) **Vzorka choriových klkov** – extraembryonálneho derivátu zygoty – (najoptimálnejší odber je v 9. až 10. týždni gravidity) slúži na vyšetrovanie chromozómov, aktivitu enzýmov, histologické vyšetrenie a v porovnaní s amniocytmi je vhodnejšia na molekulovú analýzu DNA. Odobraté bunky sú životaschopné a pomerne často sa mitoticky delia. Najnovšie sa vyšetrovanie posúva do najskorších štádií gravidity a zavádza sa vyšetrovanie zygoty v predimplantačnom období. Zatiaľ ale len po fertilizácii *in vitro*. Podobne ako pri amniocenteze aj tu sa jedná o invazívnu metódu. Výhodou metódy odberu choriových klkov (CVS – Chorionic Villi Sampling, obr. 13-2) je jej včasnosť, ktorá ušetří rodičom týždne neistoty a obáv a dáva viac času na prípadné opakované analýzy.



**Obrázok 13-2.** Vzorka choriových klkov sa získava dvoma spôsobmi: A: transabdominálne, B: cez vagínu

- 3) **Krv a tkanivá plodu.** Odber sa deje pomocou fetoskopie a ultrasonografie, riziko zákroku je tu však vyššie ako pri amniocenteze. Z pupočníkovej krvi je možné diagnostikovať talasémiu, kosáčikovitú anémiu, chýbanie erytrocytárnych enzýmov a hemokoagulačných faktorov; z geneticky podmienených porúch leukocytov napr. chronickú granulomatózu a iné; z biopptickej vzorky kože dedičné ochorenia, ktoré majú charakteristický histopatologický nálež vo svetelnom alebo elektrónovom mikroskope (napr. epidermolysis bullosa dystrophica).
- 4) **Vizuálne vyšetrenie plodu.** Najdôležitejšie metódy sú: ultrasonografia, fetoskopia (plod je pozorovaný sondou zavedenou cez brušnú stenu), nukleárna magnetická rezonancia a výnimočne počítačová tomografia. Zriedkavo sa používa röntgenové vyšetrenie plodu (nebezpečné ionizujúce žiarenie s mutagénym a teratogénnym vplyvom na plod) a fetálny elektrokardiogram (srdcové a obehové choroby). Uvedené vyšetrenia umožňujú odkryť hrubšie morfológické odchyľky plodu, anomálie CNS ako anencefáliu, encefalokélu, hydrocefalus, mikrocefalus, spinu bifidu, ďalej rozličné typy srdcových chýb, gastrointestinálneho traktu (napr. diafragmaticku herniu, omfalokeľu, atrezie duodéna a jejúna) i anomálie urogenitálneho systému (agenézu obličiek, polycystické obličky, renálne cysty, obštrukčnú uropatiu) i iné odchyľky.
- 5) **Sérum z periférnej vonznej krvi gravidnej ženy.** Najčastejšie sa vyšetruje hladina alfa-fetoproteínu v 15. až 20. týždni gravidity a pri jeho zvýšenej hladine v sére treba predpokladať rásžtep nrovej trubice a inej anomálie potvrdiť cielelným ultrasonografickým vyšetrením, prípadne určením hladiny alfa-fetoproteínu a acetylcholinesterázy v plodovej vode. Naopak, znížené hladiny alfa-fetoproteínu v uvedenom gestačnom období sa zistili v súvislosti s výskytom Downovho syndrómu u plodu.



- a) Zostavte rodokmeň.  
 b) Aká je pravdepodobnosť, že má Karol albinizmus?  
 c) Ak má Karol albinizmus, aké je riziko, že aj ďalšie dieťa Jany a Roba bude mať albinizmus?

9. Aká je pravdepodobnosť, že sa žena, ktorej brat zomrel v detskom veku na cystickú fibrózu (porucha žliaz s vonkajšou sekréciou, AR), narodí rovnako postihnuté dieťa, ak viete, že frekvencia zdravých heterozygotov v populácii je 1 : 25?

10. Zdravá sestra albina (AR) uzavrela manželstvo s nepribuzným mužom a informuje sa, aká je pravdepodobnosť, že jej dieťa bude albín (frekvencia recesívnej alely pre albinizmus v našej populácii je 1 %).

11. Máte vyšetriť dieťa s mnohopočetnými malformáciami a zaoštvávajúce v raste. Indikujete cytogenetické vyšetrenie. Jeho výsledkom je nález delécie dlhého ramena chromozómu 18 v mieste prúžku 21. Potom cytogeneticky vyšetríte rodičov postihnutého dieťaťa. Matka má karyotyp 46,XX, ale otec má recipročnú translokáciu medzi prúžkom q21 chromozómu 18 a prúžkom q23 chromozómu 8.

- a) Načrtnite vzhľad abnormálneho chromozómu.  
 b) Načrtnite derivované chromozómy otca.  
 c) Ktorý z chromozómov - 8, der(8), 18 alebo der(18) odovzdal otec dieťaťu?

- d) Je otcov karyotyp vyvážený alebo nevyvážený?  
 e) Je karyotyp dieťaťa vyvážený alebo nevyvážený?  
 f) Prečo je dieťa postihnuté?  
 g) Ako vyznie genetická prognóza, ktorú poskytnete?

12. Neurofibromatóza je autozómovo dominantné dedičné ochorenie s 80 % penetranciou (postihuje nervový systém v koži, v rôznych vnútorných orgánoch a v mozgu, typickým kožným prejavom sú nádorovité útvary - neurofibrómy). Aká je prognóza pre dieťa pacienta s týmito ochorením?

13. Aká je pravdepodobnosť, že dieťa bude mať kosáčikovitú anémiu (AR), ak túto chorobu má strýko z otcovej strany a teta z matkinej strany?

14. Aká je pravdepodobnosť, že sa albinizmus (AR) objaví medzi deťmi dvoch rodičov s normálnou pigmentáciou, ak ich starý otec (otec otca) mal albinizmus? Recesívna alela pre albinizmus sa vyskytuje v bežnej populácii u jednej z 50 zdravých osôb (Aa). Zakreslite rodokmeň tejto rodiny.

15. Žena, ktorej brat bol postihnutý alkaptonúriou (AR, porucha enzýmu, ktorý katalyzuje oxidáciu kyseliny homogentisovej) sa vydala za muža, ktorý je postihnutý rovnakým ochorením. Aká je pravdepodobnosť, že ich dieťa bude mať alkaptonúriu? Znáornite túto situáciu genealogickou schémou.

16. Aká je pravdepodobnosť narodenie sa albina v bežnej populácii (frekvencia heterozygotov je 2 %, dedičnosť AR) ?

17. Pri skríningových programoch na detekciu prenášateľstva génu pre Tayovu - Sachsovu chorobu (familiárna idiocia, chýbanie lyzozomového enzýmu hexozaminidázy A, AR) v populácii Židov pôvodu Aškenázi sa zistila incidencia asi 0,035. Vypočítajte:

- a) frekvenciu manželstiev, z ktorých sa môže narodiť postihnuté dieťa  
 b) incidenciu Tayovej - Sachsovej choroby v populácii Židov pôvodu Aškenázi (výskyt v iných populáciách je 1 : 360 000)

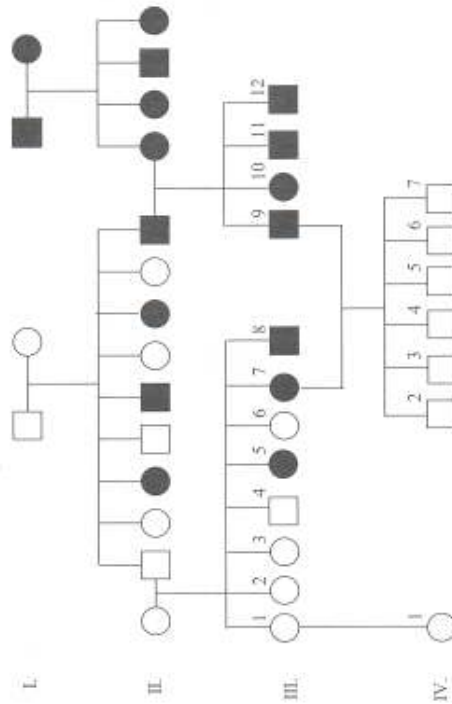
18. Snúbencami sú bratranec a sesternica. Vzhľadom na to, že brat snúbence mal alkaptonúriu (AR), snúbenci sa obávajú, aby ich dieťa nebolo postihnuté rovnakým ochorením. Zakreslite genealogickú schému tejto rodiny a určte riziko narodenia postihnutého dieťaťa.

19. Aká je pravdepodobnosť, že u detí bratranca a sesternice sa objaví hepatolenticulárna degenerácia (Wilsonova choroba, chýbanie ceruloplazminu v krvnej plazme, ukladanie medi do tkanív a najmä do pečene, AR), ktorou je postihnutý ich starý otec? Zakreslite genealogickú schému uvedenej rodiny.

20. Žena má kosáčikovitú črtu a jej partner je heterozygotom pre Hb C. Aká je pravdepodobnosť, že ich dieťa nebude mať abnormálny hemoglobín v erytrocytoch?

21. Zdravý muž sa ožení so zdravou ženou, ktorá je však dcérou pacienta s hemofiiliou. Pýtajú sa na riziko výskytu hemofílie u detí.

22. V uvedenom rodokmeni jedincov s vrodenou hluchotou sú výsledkom manželstva I-3 s I-4 samé hluché deti, rovnako ako v manželstve II-10 s II-11. Zato z manželstva III-7 s III-9 sa rodia len počujúce deti. Určte pravdepodobné genotypy detí IV. generácie. Ak sa jeden z týchto chlapcov (IV/2) ožení s dcérou ženy III/1, aká je pravdepodobnosť, že dieťa bude hluché?



23. Daniel a jeho starý otec z matkinej strany Boris, majú klasickú hemofiliu. Danielova partnerka Diana je dcérou sestry Danielovej matky. Daniel a Diana majú jedného syna Eda, ktorý má hemofiliu, dve dcéry Elenu a Emíliu, ktoré majú tiež hemofiliu a jednu zdravú dcéru Eriku.

- a) Nakreslite rodokmeň.  
 b) Aká je pravdepodobnosť, že Elenin syn bude mať hemofiliu?  
 c) Aké je riziko, že Erikín syn bude mať hemofiliu?





## Literatúra

1. Alberts B. a kol.: Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998
2. Brdička R.: Lidský genom na rozhraní tisíciletí. Grada, Praha 2001
3. Brown, T. A.: Genomes (2-nd edition), BIOS, Oxford, 2002
4. Ďoubal S.: Teorie stárnutí (online), [<http://www.faf.cuni.cz/Gerontology/mechanisms/theory/>], 2000
5. Ferák V., Sršeň Š.: Genetika člověka, Slovenské pedagogické nakladatel'stvo, Bratislava, 1990
6. Goetz P. a kol.: Výbrané kapitoly z lékařské biologie II., Karolinum, Praha, 2002
7. Hengartner M.O.: The biochemistry of apoptosis. Nature 407, 770-776, 2000
8. Kapeller, K., Strákele, H.: Cytomorfologie. Osveta, Martin, 1999
9. Kapras, J., Kohoutová, M.: Kapitoly z lékařské biologie a genetiky. Karolinum, Praha, 1999
10. Křemen, J. a kol.: Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně. Karolinum, Praha 1998
11. Lodish, H. a kol.: Molecular cell biology (4-th edition). W. H. Freeman and Company, New York 2001
12. Masopust J a kol.: Patobiochemie buňky, LF UK Praha, 2003
13. Morgan, D. O.: The Cell Cycle: Principles of Control. Oxford University Press, Northants 2007
14. Nečas O. a kol.: Obecná biologie pro lékařské fakulty. H&H, Jinočany, 2000
15. Rosypal S. a kol.: Úvod do molekulární biologie 1.-4.diel, vlastným nákladem autora, Bmco, 1998-2002
16. Sršeň Š., Sršňová K.: Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata. Osveta, Martin, 2000
17. Topinková E.: Apoptóza – programovaná buňčná smrť a stárnutí, SANQUIS 20 (14), 2002
18. US Dept. Of Health and Human Services: Inside the cell. NIH Publication No. 05-1051, 2005