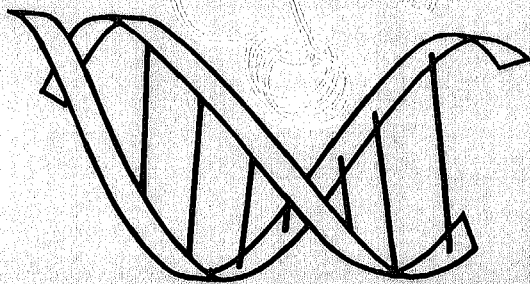


# ÚVOD DO MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Stanislav Rosypal



Díl třetí

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE VIRŮ, MUTAGENEZE,  
KANCEROGENEZE A REKOMBINACE • OPRAVY POŠKOZENÉ DNA

---

BRNO 2000

TŘETÍ INOVOVANÉ VYDÁNÍ

# OBSAH

## TŘETÍHO DÍLU

Předmluva ke třetímu dílu třetího vydání této učebnice.....	608
<b>8 REPLIKACE A EXPRESE VIROVÉHO GENOMU V BAKTERIÁLNÍ BUŇCE.....</b>	<b>609</b>
<b>8.1 Základní informace o virech.....</b>	<b>609</b>
<b>8.2 Základní informace o bakteriálních virech.....</b>	<b>615</b>
<b>8.3 Bakteriální viry s dvouřetězcovou DNA.....</b>	<b>616</b>
8.3.1 Bakteriofág T4.....	616
8.3.2 Bakteriofág T7.....	617
8.3.3 Bakteriofág lambda.....	619
<b>8.4 Bakteriální viry s pozitivní RNA.....</b>	<b>637</b>
8.4.1 Bakteriofágy MS2 a Qbeta.....	637
<b>9 REPLIKACE A EXPRESE VIROVÉHO GENOMU V ŽIVOČIŠNÉ BUŇCE.....</b>	<b>639</b>
<b>9.1 Živočišné viry s dvouřetězcovou DNA.....</b>	<b>641</b>
9.1.1 Papovaviry.....	642
9.1.2 Adenoviry.....	643
9.1.3 Herpesviry.....	655
<b>9.2 Živočišné viry s jednořetězcovou DNA.....</b>	<b>665</b>
9.2.1 Parvoviry.....	665
<b>9.3 Živočišné viry s dvouřetězcovou RNA.....</b>	<b>668</b>
9.3.1 Reoviry.....	668
<b>9.4 Živočišné viry s pozitivní ssRNA.....</b>	<b>671</b>
9.4.1 Pikornaviry a togaviry.....	671
<b>9.5 Živočišné viry s negativní ssRNA.....</b>	<b>673</b>
9.5.1 Ortomyxoviry (viry chřipky).....	673

9.5.2	Viry s negativní segmentovanou dvojsmyslnou RNA	692
9.5.3	Viry s negativní nesegmentovanou RNA	695
<b>9.6</b>	<b>RNA-viry se zpětnou transkriptázou</b>	<b>700</b>
9.6.1	Virus HIV-1	701
9.6.1.1	Virus HIV-1 ve vztahu k AIDS	701
9.6.1.2	Struktura genomu viru HIV-1	704
9.6.1.3	Životní cyklus viru HIV-1	708
9.6.1.4	Zpětná transkripce genomu viru HIV-1 a jeho integrace do genomu infikované buňky	711
9.6.1.5	Exprese genomu viru HIV-1 v infikované buňce	714
<b>9.7</b>	<b>DNA-viry se zpětnou transkriptázou</b>	<b>720</b>
9.7.1	Virus HBV	720
9.7.1.1	Úvodní charakteristika	720
9.7.1.2	Struktura virionu HBV a jeho genomu	721
9.7.1.3	Exprese genomu viru HBV v hostitelské buňce	725
<b>10</b>	<b>MOLEKULÁRNÍ PODSTATA MUTAGENEZE</b>	<b>729</b>
<b>10.1</b>	<b>Spontánní mutace</b>	<b>732</b>
10.1.1	Tautomerní změny bází	732
10.1.2	Kolísavost v párování bází	735
10.1.3	Depurinace a depyrimidinace	735
10.1.4	Deaminace cytozinu, adeninu a guaninu	735
10.1.5	Inkorporace uracilu do DNA během její replikace	738
10.1.6	Oxidativní poškození DNA	739
<b>10.2</b>	<b>Reverze</b>	<b>743</b>
10.2.1	Typy reverzí	743
10.2.2	Intergenová supresorová mutace	747
<b>10.3</b>	<b>Indukované mutace</b>	<b>751</b>

	605
10.3.1 Mutace indukované chemomutageny.....	751
10.3.2 Mutace indukované fyzikálními faktory .....	764
<b>11 MOLEKULÁRNÍ PODSTATA REKOMBINACE .....</b>	<b>771</b>
<b>11.1 Obecná rekombinace .....</b>	<b>772</b>
11.1.1 Hollidayův model obecné rekombinace.....	772
11.1.2 RecA-protein (RecA-rekombináza).....	778
<b>11.2 Specifická rekombinace .....</b>	<b>789</b>
11.2.1 Epizomové plazmidy a proviry.....	789
11.2.2 T-DNA .....	789
<b>12 MOLEKULÁRNÍ PODSTATA TRANSPOZICE .....</b>	<b>795</b>
<b>12.1 Transpozony nevyznačující se retropozicí.....</b>	<b>798</b>
12.1.1 Bakteriální transpozony.....	798
12.1.2 Eukaryotické transpozony nevyznačující se retropozicí.....	799
<b>12.2 Retroelementy .....</b>	<b>802</b>
12.2.1 Virové retroelementy .....	802
12.2.2 Nevirové retroelementy.....	802
12.2.3 Mobilita intronů.....	804
<b>13 OPRAVY POŠKOZENÉ dsDNA .....</b>	<b>805</b>
<b>13.1 Úplná oprava .....</b>	<b>806</b>
13.1.1 Fotoreaktivace DNA.....	806
13.1.2 Oprava alkylovaného guaninu, tyminu a alkyl- fosfotriesterů.....	807
<b>13.2 Excizní opravy.....</b>	<b>810</b>
13.2.1 Bázová excizní oprava.....	810
13.2.2 Nukleotidová excizní oprava.....	812

13.2.3	Oprava chybného párování.....	814
<b>13.3</b>	<b>Tolerantní opravy.....</b>	<b>816</b>
13.3.1	SOS-odpověď.....	816
13.3.2	Oprava mezer v dceřiném řetězci .....	819
<b>14</b>	<b>MOLEKULÁRNÍ PODSTATA KANCEROGENEZE.....</b>	<b>821</b>
<b>14.1</b>	<b>Základní informace o kancerogenezi.....</b>	<b>821</b>
14.1.1	Vývoj maligního nádoru.....	822
14.1.2	Některé rizikové faktory kancerogeneze .....	824
<b>14.2</b>	<b>Protoonkogeny a onkogeny.....</b>	<b>827</b>
14.2.1	Protoonkogeny.....	827
14.2.2	Onkogeny.....	831
14.2.2.1	Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů růstové faktory.....	832
14.2.2.2	Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů receptory růstových faktorů.....	832
14.2.2.3	Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů Ras-proteiny.....	834
14.2.2.4	Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů nereceptorové tyrozinproteinkinázy .....	835
14.2.2.5	Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů transkripční faktory.....	836
14.2.2.6	Dědičný onkogen RET.....	837
<b>14.3</b>	<b>Nádorové supresorové geny.....</b>	<b>839</b>
14.3.1	Obecná charakteristika nádorových supresoro- vých genů.....	839
14.3.2	Exprese nádorového supresorového genu dědič- ného retinoblastomu.....	840
14.3.3	Exprese nádorového supresorového genu TP53.....	845

14.3.4	Nádorové supresorové geny dědičného poly- pózního a nepolypózního kolorektálního nádoru.....	848
14.3.5	Expresse nádorových supresorových genů dědičného Wilmsova nádoru .....	851
14.3.6	Expresse nádorových supresorových genů dědičného nádoru prsu a vaječníku .....	851
<b>14.4</b>	<b>Příklady dalších dědičných nádorů.....</b>	<b>852</b>
14.4.1	Geny dědičného melanomu.....	852
14.4.2	Dědičnost defektů v opravách DNA.....	853
<b>14.5</b>	<b>Onkogenní viry.....</b>	<b>854</b>
14.5.1	Přehled onkogenních virů.....	854
14.5.2	Neoplastická transformace uskutečňovaná retroviry.....	854
14.5.3	Neoplastická transformace navozená virovými geny.....	861
14.5.4	Viry a rakovina lidí.....	862
14.5.4.1	T-leukemie dospělých způsobená virem HTLV-1.....	862
14.5.4.2	Rakovina jater způsobená virem HBV.....	863
14.5.4.3	Rakovinná onemocnění způsobená virem Epsteina a Barrové.....	864
14.5.4.4	Rakovinná onemocnění způsobená papi- lomaviry.....	867
14.5.4.5	Kaposiho sarkom a lidský herpesvirus 8 (HHV-8) .....	870
<b>15</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>871</b>
<b>16</b>	<b>TERMINOLOGICKÝ REJSTŘÍK K TŘETÍMU DÍLU.....</b>	<b>877</b>

# 8

## REPLIKACE A EXPRESE VIROVÉHO GENOMU V BAKTERIÁLNÍ BUŇCE

### 8.1 ZÁKLADNÍ INFORMACE O VIRECH

*Dříve než začneme s popisem replikace virového genomu a jeho exprese v bakteriální buňce, je nutné úvodem učinit několik obecných poznámek ve smyslu základních informací o vlastnostech, které viry charakterizují obecně.*

*Viry jsou částice velmi nepatrných rozměrů (25 až 400 nm), které se vyznačují schopností infikovat buňky a reprodukovat se v nich. Jsou **intracelulárními parazity**, neboť svou reprodukci jsou na hostitelské buňce zcela závislé a touto reprodukcí hostitelské buňky poškozují.*

*Každá virová částice sestává z jedné nebo více molekul nukleové kyseliny téhož druhu (buď DNA, nebo RNA) a proteinů, které kolem nukleové kyseliny tvoří **obal (kapsid)**. Tento ribonukleoproteinový komplex se označuje též jako **nukleokapsid**. Kolem nukleokapsidu může být ještě další obal, tvořený lipoproteiny, které virus získává z plazmatické membrány během uvolňování z buňky (to se týká většinou živočišných virů). Takové viry se označují jako **viry obalené**. Jednotlivá virová částice, schopná infikovat hostitelskou buňku a množit se v ní, se označuje jako **virion**. Její nukleokapsid může mít tvar pravidelného dvacetistěnu neboli **ikozaedru** nebo může být tvaru vláknitého, kulovitého, oválného atd.*

*Nukleová kyselina obsažená ve virionu má funkci **genoforu** (nosiče genů, viz str. 149 a 150 - 152), neboť se vyznačuje těmito vlastnostmi:*

- ◆ *Jsou na ní lokalizovány **strukturní geny** kódující proteiny kapsidu nebo proteiny, které mají vlastnosti (ne však u všech virů) enzymů, např. DNA- nebo RNA-polymeráz.*

- ◆ *Má **vlastnosti replikonu**.*

*U valné většiny virů **genofor** představuje celý genom viru. Proto u virů můžeme většinou klást rovnítko mezi genomem a genoforem. V dalším textu budeme proto používat termín "genom"; termín "genofor" použijeme jen v případech, kdy je třeba vzhledem k popisovanému jevu tyto termíny přesně rozlišit (a to se zrovna týká následující věty).*

*Některé viry (např. retroviry) obsahují dvě kopie stejného genoforu nebo*

několik nehomologických genoforů (např. virus chřipky), které dohromady tvoří genom viru. Genom viru složený z více nehomologických genoforů se označuje jako **genom segmentovaný**.

*V genomu viru nejsou geny pro rRNA a tRNA a také ne strukturální geny kódující ribozomové proteiny! Je tedy zřejmé, že syntéza nových virových proteinů, k níž dochází po infekci hostitelské buňky, je zcela závislá na translačním systému buňky. V tom je molekulární podstata intracelulárního parazitizmu, kterým je virus charakteristický. Z této skutečnosti vyplývá následující definice pojmu "virus":*

*Virus je nukleoproteinová částice vyznačující se schopností infikovat hostitelskou buňku a v ní se reprodukovat v závislosti na jejím translačním systému.*

*Viry mohou infikovat jen ty buňky, které ve svém povrchu mají receptory k některému proteinu virového kapsidu. Virus se svými proteiny váže (adsorbuje) na receptor v povrchu buňky, který je pro daný druh (kmen) viru nebo příbuzné druhy (kmene) specifický. Nemá-li buňka receptor pro příslušný druh viru, není tímto virem přirozeně infikována. Buňka se specifickým receptorem pro příslušný druh viru je vzhledem k tomuto viru **buňkou hostitelskou**. Podle hostitelských buněk pak lze všechny viry rozdělit do dvou hlavních skupin:*

◆ ***Bakteriální viry**, které infikují bakteriální buňky a v nich se množí. Označují se též jako bakteriofágy, případně zkráceně fágy.*

◆ ***Eukaryální viry**, které infikují a množí se v eukaryálních buňkách. Dělí se podle typu hostitele, ve kterém se reprodukují, na **viry hub** (tzv. **mykofágy**), **viry rostlinné** a **viry živočišné**. Viry živočišné můžeme ještě dále dělit na **viry obratlovců**, **bezobratlých**, **viry člověka** atd.*

*Nukleová kyselina, která tvoří genom viru, je buď DNA, nebo RNA (nikdy ne obě současně). Podle toho rozlišujeme viry na **DNA-viry** a **RNA-viry**. Strategie reprodukce obou těchto základních skupin virů se liší v těchto směrech:*

**1. Vlastní infekce DNA-virionem** spočívá v tom, že se virion naváže na receptor buňky a do buňky vnikne jen jeho DNA, přičemž kapsid zůstane vně buňky. Tento způsob infekce je typický pro bakteriální viry. Je možný i ten způsob (např. u živočišných virů), že do buňky vnikne celý virion, ale brzy se zbaví kapsidu. V obou případech však reprodukce viru v buňce začíná volnou DNA, která se replikuje v hostitelské buňce a její negativní řetězce pak slouží jako matrice pro syntézu molekul mediátorové RNA překládané na ribozomech hostitelské buňky do virových stavebních či strukturálních (kapsidových) proteinů nebo nestavebních či nestructurních proteinů (s enzymovou nebo jinou nestructurní funkcí). Stavebními proteiny se obalují zreplikované molekuly DNA, čímž se vytvoří viriony, které svými vlastnostmi jsou stejné jako virion, kterým byla buňka infikována.

**2. Začátek infekce buňky RNA-virionem** je stejný jako u infekce buňky



*DNA-virionem. RNA se v buňce replikuje a její pozitivní řetězce se překládají do virových proteinů stavebních (kapsidových), případně nestavebních (např. enzymů). Stavebními proteiny se obalí zreplikované molekuly RNA za tvorby virionů. Nestavební proteiny mají podobnou funkci jako u DNA-virů. Je nutno však přesně rozlišovat pozitivní (+) a negativní (-) genomovou RNA.*

*Za pozitivní genomovou RNA (+RNA) viru se považuje genomová RNA, která jednak má přímo funkci mRNA a jednak se přes negativní RNA replikuje do pozitivní RNA s funkcí genomu, přičemž molekul pozitivní RNA vzniklých touto replikací se též využívá ve funkci mRNA. Negativní RNA má vzhledem k pozitivní genomové RNA opačný směr fosfodiesterových vazeb (obr. 382).*

*Za negativní genomovou RNA (-RNA) viru se považuje, pokud tato RNA není dvojsmyslná (viz dále), genomová RNA, která se přepisuje do RNA s funkcí mRNA a replikuje do RNA s funkcí antigenomu; obě RNA mají vzhledem k negativní genomové RNA opačnou orientaci fosfodiesterových vazeb. Jako antigenom se pak označuje pozitivní RNA, která slouží jako matrice pro replikaci do negativní RNA s funkcí genomu, přičemž pozitivních RNA při této replikaci se též využívá ve funkci mRNA (obr. 382).*

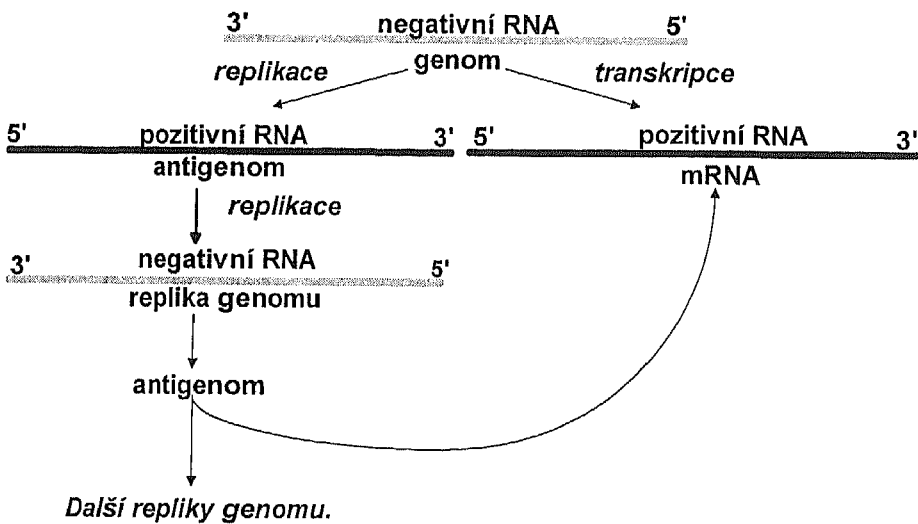
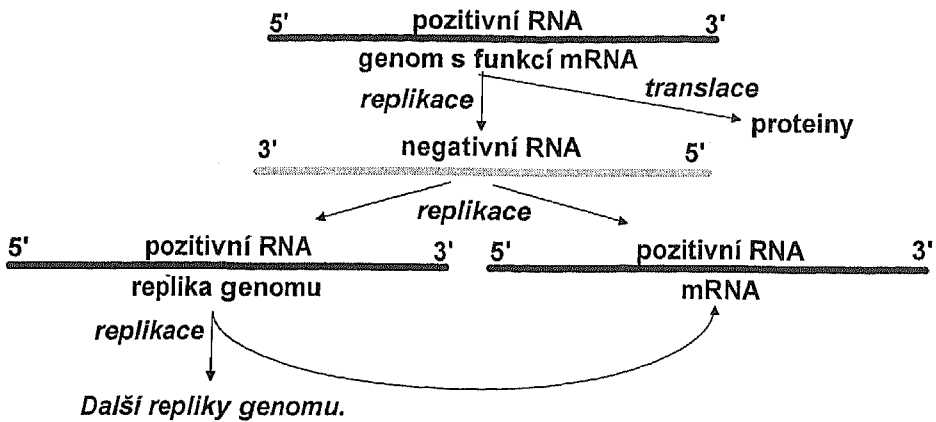
*Rozdíly mezi negativní a pozitivní RNA zde byly uvedeny v tzv. prvním přiblížení. Budou postupně ještě objasňovány na konkrétních příkladech v dalším textu.*

*Některé rody virů, jejichž genom je segmentovaný, mají genom složený z negativní dvojsmyslné RNA. Jako negativní dvojsmyslná genomová RNA neboli -RNA dvojího smyslu se označuje genomová negativní RNA, která obsahuje genetickou informaci překládanou ze dvou z ní odvozených molekul mRNA navzájem opačného smyslu, tj. z pozitivní a negativní mRNA. Pozitivní mRNA vzniká přímou transkripcí negativní genomové RNA, zatímco negativní mRNA se vytvoří transkripcí antigenomu vzniklého replikací genomové negativní RNA (obr. 383).*

*Konkrétní příklad dvojsmyslné RNA je uveden na obr. 440 a 441.*

*Základním kritériem, podle kterého se viry rozdělují do hlavních taxonomických skupin, je typ nukleových kyselin tvořících jejich genom. Jsou to tyto typy nukleových kyselin:*

- ◆ *dsDNA lineární nebo kružnicová;*
- ◆ *ssDNA lineární nebo kružnicová;*
- ◆ *dsRNA segmentovaná;*
- ◆ *pozitivní ssRNA lineární nesegmentovaná;*
- ◆ *negativní ssRNA lineární nesegmentovaná;*
- ◆ *dvojsmyslná negativní ssRNA segmentovaná;*



Obr. 382  
Produkty pozitivní a negativní RNA

- ◆ RNA zpětně přepisovaná do DNA;
  - ◆ DNA přepisovaná do RNA a tato zpětně do DNA.
- Viry s příslušným typem genomu budeme označovat podle tab. 35.  
Všimneme si dále, jaký je obecně charakter infekce hostitelské buňky virem. Je v podstatě dvojit:

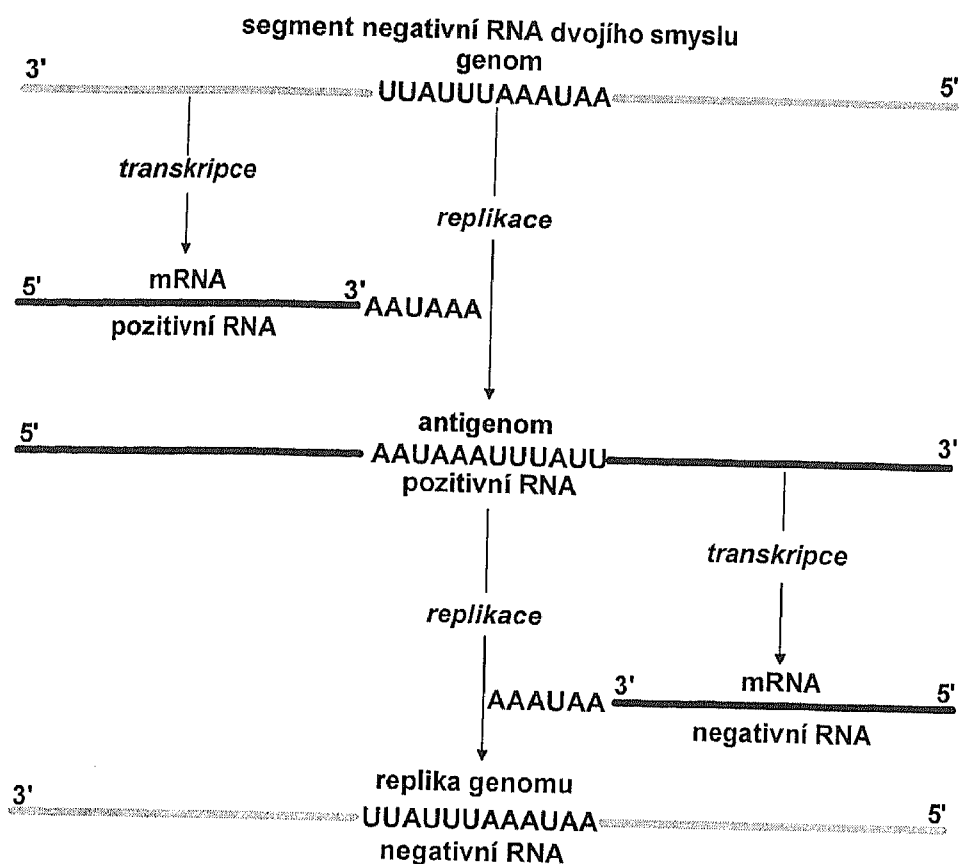
1. Jestliže se buňka pod vlivem reprodukce a syntézy nových virionů

**Tab. 35**  
**Názvy hlavních skupin virů podle typu jejich genomu**

Typ virového genomu	Označení skupiny virů s příslušným genomem
dsDNA lineární nebo kružnicová	dsDNA-viry
ssDNA lineární nebo kružnicová	ssDNA-viry
dsRNA	dsRNA-viry
pozitivní ssRNA	+ssRNA-viry
negativní ssRNA	-ssRNA-viry
RNA určená ke zpětné transkripci v hostitelské buňce do DNA, jejíž kopie po replikaci slouží jako matrice pro syntézu virového RNA-genomu	RNA-viry se zpětnou transkriptázou
DNA určená k transkripci v hostitelské buňce do RNA jako matrice pro zpětnou transkripci do DNA opět s funkcí virového genomu	DNA-viry se zpětnou transkriptázou
<b>Vysvětlivky</b>	
<p><i>dsDNA = dvouřetězcová DNA,</i>  <i>ssDNA = jednořetězcová DNA,</i>  <i>dsRNA = dvouřetězcová RNA,</i>  <i>ssRNA = jednořetězcová RNA.</i>  Zkratky (symboly) pro názvy virů s příslušným genomem uvedené ve druhém sloupci tabulky se čtou tímto způsobem:  <i>dsDNA-viry = viry s dvouřetězcovou DNA,</i>  <i>ssDNA-viry = viry s jednořetězcovou DNA,</i>  <i>dsRNA-viry = viry s dvouřetězcovou RNA,</i>  <i>+ssRNA-viry = viry s pozitivní RNA,</i>  <i>-ssRNA-viry = viry s negativní RNA.</i>  Názvy posledních dvou skupin virů se čtou tak, jak je uvedeno ve druhém sloupci, tedy:  <i>RNA-viry se zpětnou transkriptázou,</i>  <i>DNA-viry se zpětnou transkriptázou.</i></p>	

částečně nebo úplně rozpadne nebo se rozpustí či zlyžuje, hovoří se o **lytické infekci**. Vhodný je též termín **produktivní infekce**, který vyjadřuje, že hostitelská buňka zcela podlehla realizaci programu kódovaného virovým genomem a přeorganizovala svůj program na produkci virionů.

2. Jiný způsob infekce spočívá v tom, že se v buňce po infekci virem, jehož genom je tvořen DNA, vytvoří nové viriony, ale nukleová kyselina viru se replikuje volně, aniž se buňka poškodí (tedy infekci přežije) nebo se virová nukleová kyselina (DNA) začlení do některého chromozomu hostitelské buňky, v níž se pak replikuje jako součást tohoto chromozomu. DNA (nikoli RNA!) viru



Obr. 383  
Produkty RNA dvojího smyslu

začleněná do chromozomu hostitelské buňky se označuje jako **provirus**. Přesněji řečeno, provirus je genom DNA-viru, který se začlenil do některého chromozomu hostitelské buňky a po tomto začlenění se v jejím potomstvu koordinovaně s tímto chromozomem replikuje a dědí jako jeho součást.

V obou případech se zreplikovaná nukleová kyselina viru, ať už je volná nebo integrovaná ve stavu proviru do genomu hostitelské buňky, přenáší do buněk dceřiných. Takový způsob infekce se označuje jako **latentní infekce**. Geny ve stavu proviru se nevyjadřují nebo jen velmi omezeně, takže nedochází k poškození buňky.

Z latentního stavu může být však virus reaktivován, což vede buď k částečné, nebo úplné expresi virových genů a k poškození buňky. Často právě provirus se může reaktivovat, což se projeví jeho uvolněním z chromozomu, takže se pak může volně replikovat a produkovat masivně viriony poškozující buňku jako při produktivní infekci.

## 8.2 ZÁKLADNÍ INFORMACE O BAKTERIÁLNÍCH VIRECH

Bakteriální viry (bakteriofágy, fágy) rozlišujeme podle způsobu infekce na **virulentní**, které způsobují lyzi buňky, zatímco **mírné** způsobují buď lyzi, nebo se jejich DNA začlení do chromozomu buňky, což má za následek, že buňka nelyzuje a infekci přežije. Je-li tedy buňka infikována mírným fágem, je před dvěma alternativami. Za daných okolností se uskuteční toliko jedna z nich:

- ◆ fágový genom se v ní replikuje, a proto buňka zlyzuje, jako kdyby byla infikována virulentním fágem;
- ◆ fágový genom přejde do stavu profága a buňka infekci fágem přežije.

**Profágem** se rozumí provirus ve formě fágového genomu.

Bakteriální buňka obsahující profága se označuje jako **lyzogenní**. **Lyzogenií** pak označujeme stav bakteriální buňky, v němž obsahuje profága. Souhrn pochodů, rozvíjejících se po infekci bakteriálních buněk mírným fágem a směřujících k jejich přeměně na buňky lyzogenní, se nazývá **lyzogenizací**.

Lyzogenní buňky se liší od nelyzogenních ve vlastnostech, které jsou podmíněny přítomností profága. Jsou to:

1. Schopnost syntetizovat viriony fága stejného typu jako je ten, kterým byly lyzogenizovány buňky, z nichž daný lyzogenní kmen pochází. Tato schopnost se projevuje tím, že se profág může z chromozomu bakterie uvolnit a přejít do stavu, v němž se volně a nezávisle na chromozomu bakteriální buňky replikuje a kóduje syntézu svých proteinů, takže buňky nakonec zlyzují vlivem syntézy nových virionů. Uvolnění profága z chromozomu bakterií lze indukovat některými fyzikálními nebo chemickými faktory (UV-záření, mitomycin C atd.). Vlivem těchto faktorů zlyzují téměř všechny buňky lyzogenní kultury. Od indukované lyze je třeba odlišovat spontánní lyzi, která probíhá v některých buňkách při nízkých frekvencích náhodně (bez pozorovatelného vlivu vnějších faktorů).

2. Imunita vůči infekci fágem, jehož genom je homologický s profágem. Podstata této imunity spočívá v tom, že profág kóduje syntézu **imunitního represoru**, který specificky zastavuje syntézu proteinů potřebných k syntéze virionů fága, jenž je s ním homologický nebo blíže příbuzný.

Podle typu genomu patří většina bakteriálních virů do těchto skupin:

- ◆ bakteriální viry s dvouřetězcovou DNA (dsDNA-viry),
- ◆ bakteriální viry s jednořetězcovou DNA (ssDNA-viry),
- ◆ bakteriální viry s dvouřetězcovou segmentovanou RNA (dsRNA-viry),

- ◆ *bakteriální viry s pozitivní jednořetězcovou RNA (+ssRNA-viry).*  
*Ostatní skupiny virů nebyly u bakterií zatím zjištěny. Jsou uvedeny jen některé příklady dsDNA- a +ssRNA-bakteriálních virů. Podrobněji je vyložena exprese genomu bakteriofága λ v bakteriální buňce. Je to z těchto důvodů:*
- ◆ *bakteriofága λ se používá jako klonovacího vektoru,*
- ◆ *znalost regulačních mechanismů jeho genové exprese je poučná pro studia regulací též jiných virů a organismů,*
- ◆ *jeho studium ukazuje, jakým způsobem se může virový genom začlenit do chromozomu hostitelské buňky,*
- ◆ *vyznačuje se transkripcí přes terminátory transkripčních jednotek (anti-terminace).*

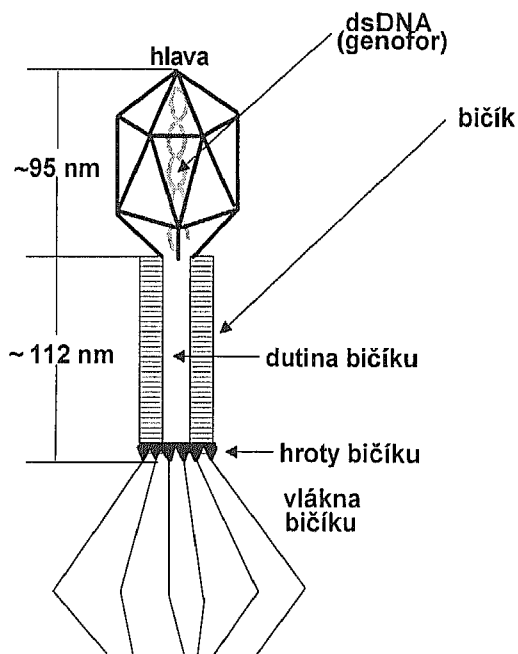
*Z uvedených důvodů se řada publikovaných prací z oboru molekulární biologie odvolává na výsledky studií tohoto bakteriofága.*

## 8.3 BAKTERIÁLNÍ VIRY S DVOUŘETĚZCOVOU DNA (dsDNA-BAKTERIÁLNÍ VIRY)

### 8.3.1 Bakteriofág T4

**GENOM BAKTERIOFÁGA T4.** Bakteriofág T4 je virulentní. Na obr. 384 je uveden hrubý popis jeho virionu. Množí se v buňkách *E. coli* a jeho genom je tvořen lineární dvoušroubovicovou DNA o délce 160 kbp. Genetická mapa tohoto fága je však kružnicová, jelikož je založena na cyklické permutaci genů, k níž dochází během replikace jeho genomu (tento jev zde neprobíráme). DNA fága T4 však místo cytozinu obsahuje **hydroxymethylcytozin**. Je na ní lokalizováno kolem 300 genů, z nichž 30 svou expresí zajišťuje poměrně rychlou replikaci fágové DNA v hostitelských buňkách. *Některé geny fága T4 obsahují introny.*

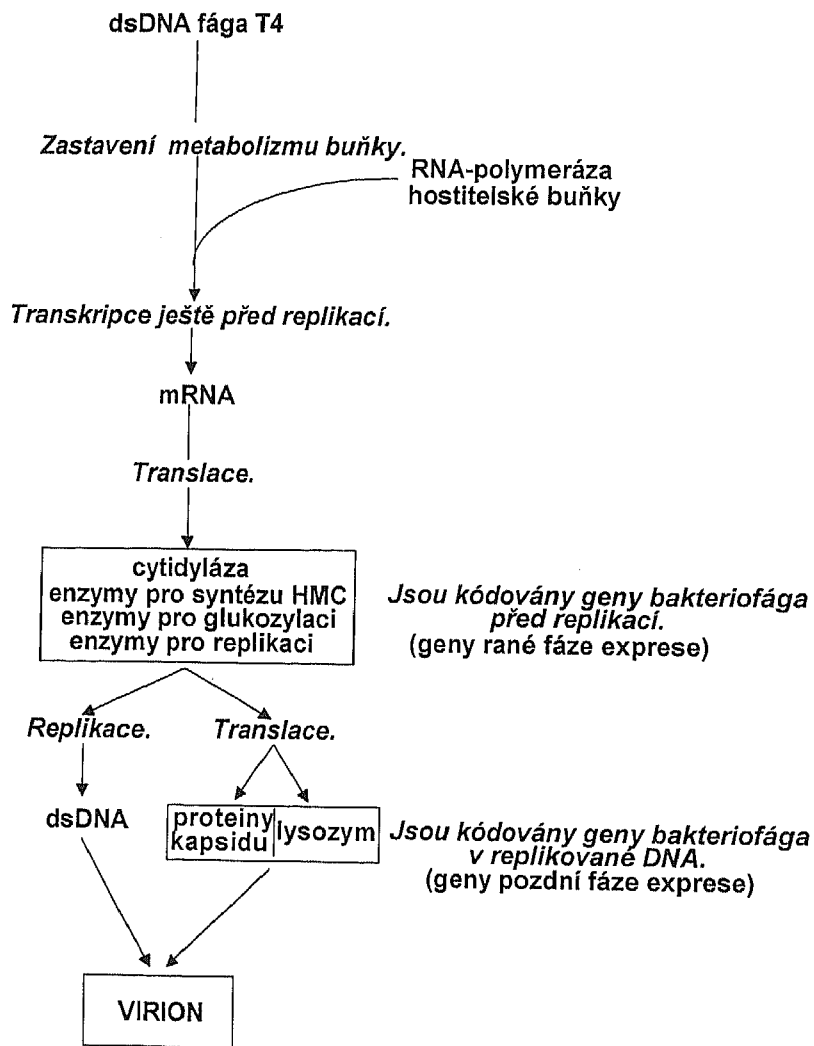
**EXPRESE GENOMU BAKTERIOFÁGA T4.** V hostitelské buňce se viriony fága T4 nejdříve naadsorbují na povrch buňky a pomocí proteinu obsaženého v bičkových hrotech se spojí se specifickým receptorem. Kontrakcí bičíku, který je stažitelný, je umožněna injekce DNA do buňky. Ihned po infekci buňky zastavuje fág T4 syntézu hostitelské DNA, RNA a proteinů. Avšak než se jeho DNA začne replikovat, dochází působením RNA-polymerázy hostitelské buňky k transkripci **genů rané fáze exprese**, které kódují syntézu enzy-



Obr. 384  
Schéma virionu fága T4

mů rozkládajících hostitelskou DNA na nukleotidy a **cytidylázu hydrolyzující volné nukleotidy dCTP** (obr. 385). Tím se zabrání, aby se do DNA tohoto fága při její replikaci zařazoval dCTP, aniž byl jeho cytozin modifikován na **hydroxymetylcytosin (HMC)**. Ostatní nukleotidy přecházejí do intracelulární rezervy a asi 1/3 z nich se spotřebuje na syntézu fágové DNA. Dále se geny fága T4 ještě vyjadřují v syntéze **enzymů pro syntézu HMC** a **enzymů pro napojování glukózy (glukozylace) na DNA**. Touto glukozylací je DNA fága chráněna proti účinku restričních endonukleáz v hostitelských buňkách. Další skupina enzymů, které se tvoří translací mRNA přepsané z genů rané fáze exprese, jsou **enzymy pro replikaci fágové DNA**. Teprve po syntéze těchto enzymů začne probíhat replikace fágové DNA. V replikovaných molekulách DNA jsou přepisovány **geny pozdní fáze exprese** za tvorby mRNA, která je překládána do proteinů, jimiž jsou za tvorby virionů obalovány zreplikované molekuly fágové DNA. Vlivem lysozymu dochází k lyzi hostitelských buněk.

### 8.3.2 Bakteriofág T7



Obr. 385  
Expresce genomu bakteriofága T4

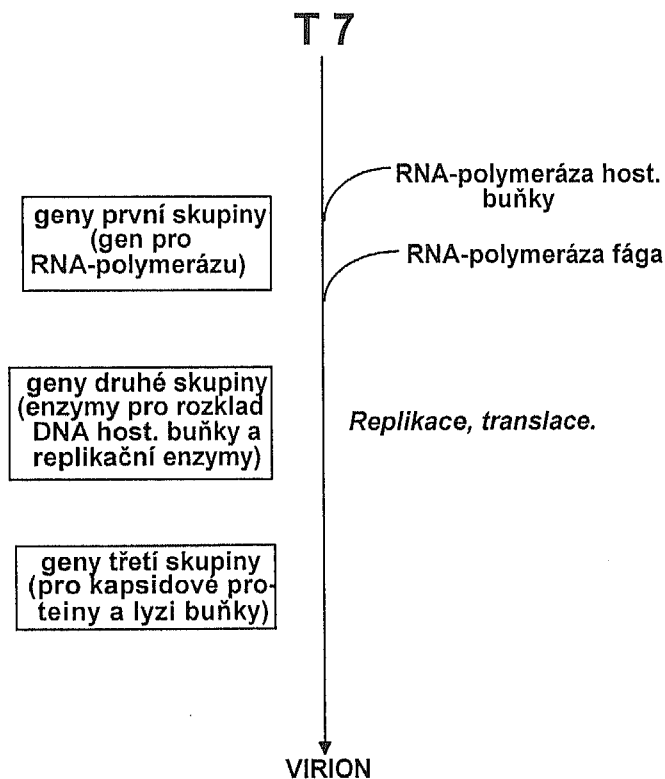
Je také virulentní. Strategie exprese genomu fága T7 je založena na logickém sledu tří skupin genů, které se přepisují podle pořadí uvedeném na obr. 386. Jsou to **geny první skupiny**, tj. *geny brzké rané fáze exprese*, **geny druhé skupiny**, tj. *geny pozdější rané fáze exprese* a **geny třetí skupiny**, tj. *geny pozdní fáze exprese*. Geny první skupiny jsou přepisovány RNA-polymerázou hostitelské buňky na ještě nereplikované fágové DNA. Jedním z těchto genů je i gen, který kóduje vlastní fágovou RNA-polymerázu, kterou jsou přepisovány geny druhé a třetí skupiny. Geny druhé skupiny zahrnují geny



kódující enzymy pro rozklad DNA hostitelské buňky a geny kódující enzymy potřebné k replikaci fágové DNA. Do třetí skupiny patří geny kódující proteiny kapsidů (obr. 386).

### 8.3.3 Bakteriofág $\lambda$

**GENOM FÁGA  $\lambda$ .** Bakteriofág  $\lambda$  (dále lambda) je fág mírný a patří pro něj, co bylo uvedeno na straně 615. Jeho hostitelskými buňkami jsou buňky kmene *E. coli* K12 ( $\lambda$ ). Lyzogenní kmen *E. coli* nesoucí profága lambda se označuje jako *E. coli* ( $\lambda^+$ ). Genom fága lambda je tvořen molekulou dsDNA, která má kohezní konce. Jako **kohezní konce** označujeme *vzájemně komplementární jednořetězcové 5'-konce vyčnívající z dvouřetězcové molekuly DNA, které se mohou párovat*. Má však lineární tvar jen uvnitř virionů. V hostitelské buňce se přeměňuje ve tvar kružnicové dsDNA. V tomto tvaru se též v hostitel-



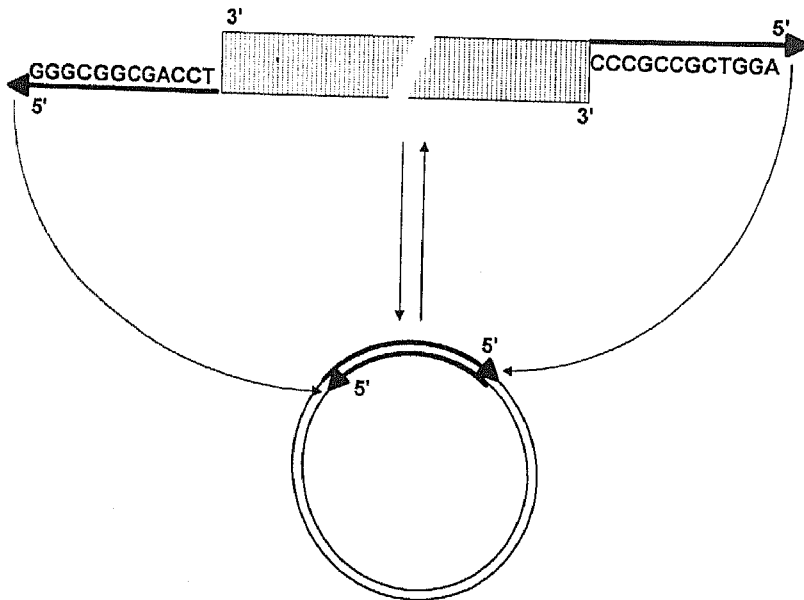
Obr. 386

Základní strategie exprese genomu fága T7

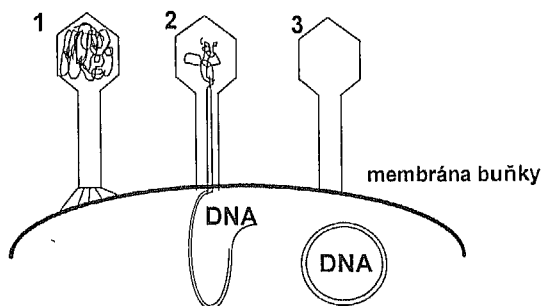
ské buňce replikuje. Jestliže se jeho replikace zastaví, může se začlenit (integrovat) do chromozomu hostitelské buňky.

Kohezní konce jsou dlouhé 12 nukleotidů. Vstoupí-li DNA s kohezními konci do hostitelské buňky, přemění se brzy ve tvar kružnicové dsDNA, jelikož se mezi komplementárními bázemi vyčnívajících konců vytvoří vodíkové vazby. 3'-konec a 5'-konec každého řetězce se pak kovalentně spojí působením ligázy (obr. 387).

**REPLIKACE GENOMU FÁGA LAMBDA.** Infekce hostitelské buňky fágem lambda začíná obvyklým způsobem (obr. 388). Virion se adsorbuje na receptor v povrchu buňky. Pak následuje injekce lineární dsDNA fága do buňky. Po realizaci těchto dějů přechází lineární dsDNA fága do kružnicové formy a replikuje se způsobem otáčivé kružnice za tvorby konkatemerů (str.180 - 183). *Nutnou podmínkou pro to, aby se DNA fága lambda integrovala ve formě profága do genomu hostitelské buňky, je zastavení její replikace.* Jestliže replikace fágové DNA pokračuje dále, navozují se postupně procesy, které vedou k lyzi buňky (obr. 389). To proto, že replikující se molekuly DNA fága jsou přepisovány do mRNA, která se překládá do stavebních proteinů, ze kterých se tvoří



Obr. 387  
Konverze lineární DNA fága lambda v kružnicovou

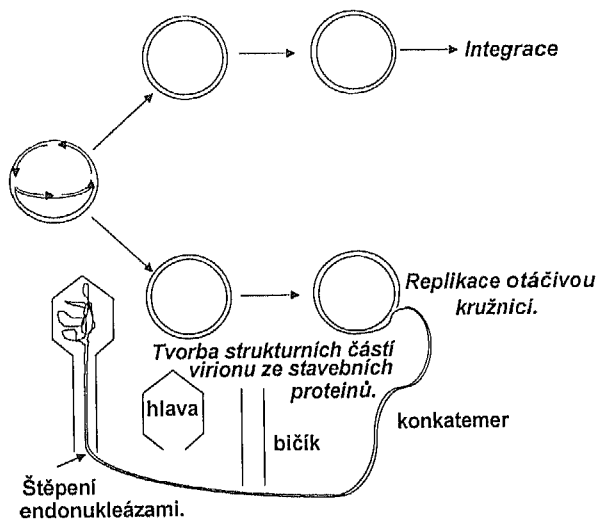


1. Adsorpce fága na povrch buňky.
2. Injekce fágové DNA do buňky.
3. Vytvoření kružnicové DNA na kohezních koncích - cos.

Obr. 388

## DNA fága lambda bezprostředně po infekci buňky

strukturní části virionů. Konkatermer vznikající replikací otáčivou kružnicí se štěpí na molekuly DNA, které svou délkou odpovídají genomu fága. Štěpení konkatermeru se uskutečňuje v procesu tvorby virionů, kdy koncový protein bičíku virionu má funkci endonukleázy, která se označuje jako **termináza** (obr. 389).



Nutnou podmínkou pro navození lyzogenního stavu je zastavení replikace fágové DNA.

Obr. 389

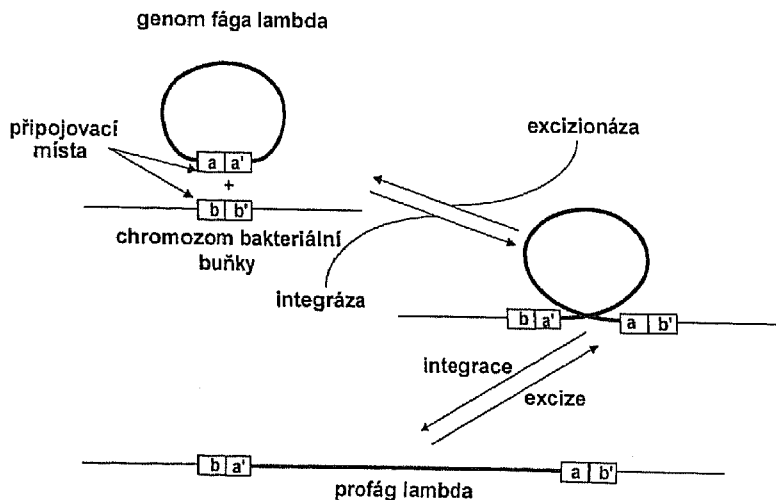
## Replikace DNA fága lambda vedoucí k tvorbě virionů a lyzi buňky

**INTEGRACE A EXCIZE DNA FÁGA LAMBDA.** Fágová DNA se začleňuje do chromozomu buňky jednoduchým crossing-overem podle schématu na obr. 390 pomocí připojovacích míst *att.aa'* na DNA fága a *att.bb'* na chromozomu bakteriální buňky. Tato místa jsou navzájem homologická. Integrace se uskutečňuje jednoduchým crossing-overem a je specificky katalyzována **integrázou**, která přesně spojí konec a s b' a a' s b. Excize probíhá opačným pochodem a je katalyzována **excizionázou**.

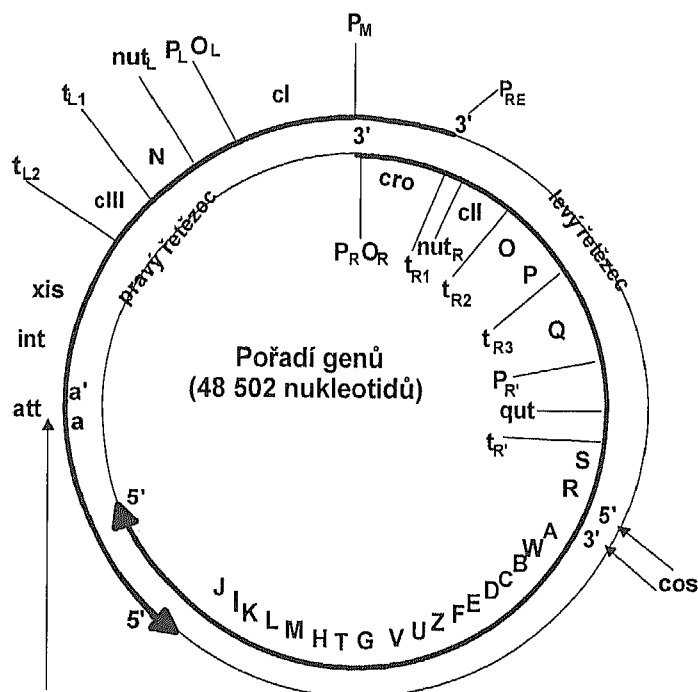
**GENETICKÁ MAPA BAKTERIOFÁGA LAMBDA.** Genetická mapa bakteriofága lambda je uvedena na obr. 391. Jsou na ní lokalizovány :

- ◆ geny (viz níže) kódující regulační proteiny, které řídí životní cyklus fága lambda (lyzi a lyzogenizaci);
- ◆ geny kódující proteiny, které katalyzují rekombinaci genomu fága  $\lambda$ ;
- ◆ geny O, P, které kódují proteiny katalyzující replikaci DNA fága lambda;
- ◆ geny S, R, které kódují proteiny uplatňující se při lyzi buňky;
- ◆ geny A, W, B, C,  $N_{II}$ , D, E, F kódující stavební proteiny hlavy fága a geny Z, U, V, G, T, M, N, L, K, I, J kódující stavební proteiny bičíku fága.

**GENY ŘÍDÍCÍ ŽIVOTNÍ CYKLUS FÁGA LAMBDA.** O tom, zda buňka infikovaná fágem lambda bude lyzovat nebo v ní bude navozen stav lyzogenie,



Obr. 390  
Integrace a excize genomu fága lambda



V tomto místě rekombinuje s bakteriálním chromozomem. DNA-řetězce jsou označeny jako levý a pravý ve shodě se směrem transkripce.

Tučnými šipkami je vyjádřen směr transkripce. V kružnicové formě se DNA fága lambda nachází během replikace. V této formě dochází též k její transkripci. V lineární formě se nachází jen ve stavu profága. V tomto případě je pak zakončena na jednom konci sekvencí att<sub>b</sub> a na druhém att<sub>a</sub>.

Obr. 391  
Genetická mapa bakteriofága lambda

rozhodují geny kódující regulační proteiny. Jsou lokalizovány do společného úseku. Jsou to:

- ◆ P<sub>L</sub>, levý promotor, z něhož se začíná přepisovat levý DNA-řetězec genomu fága lambda, na němž jsou lokalizovány geny N a cIII;
- ◆ O<sub>L</sub>, levý operátor překrývající se částečně s P<sub>L</sub>;
- ◆ P<sub>R</sub>, pravý promotor, z něhož se přepisuje pravý DNA-řetězec genomu fága lambda zahrnující geny cro, cII a další až po gen Q;
- ◆ O<sub>R</sub>, pravý operátor překrývající se částečně s P<sub>R</sub>;
- ◆ P<sub>M</sub>, promotor, z něhož se přepisuje gen cI teprve až první molekuly imu-

nitního represoru vzniklé transkripci, která byla zahájena z promotoru  $P_{RE}$ , obsadí operátor  $O_R$ ;

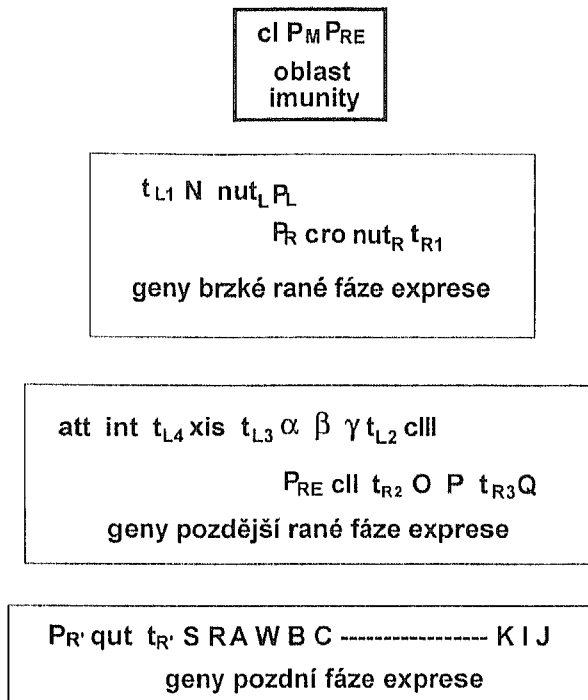
- ◆  $P_{RE}$ , promotor, ze kterého se přepisuje gen *cI* pro tvorbu prvních molekul imunitního represoru;
- ◆  $P_R$ , promotor, z něhož se přepisují geny pro lyzi, hlavu a biččík;
- ◆ *cI*, gen kódující negativní regulační protein (imunitní represor), který se váže na operátory  $O_L$  a  $O_R$  a zastavuje tak transkripci z  $P_L$  a  $P_R$ ;
- ◆ *cII*, gen kódující pozitivní regulační protein, který aktivuje promotor  $P_{RE}$ ;
- ◆ *cIII*, gen kódující protein, který stabilizuje (chrání proti rozkladu) protein kódovaný genem *cII*;
- ◆ *N*, gen kódující antiterminátor terminátoru  $t_{L1}$  a  $t_{R1}$ ;
- ◆ *cro*, gen kódující protein, který se váže na  $O_R$  a blokuje tak vstup imunitního represoru do tohoto místa;
- ◆ *Q*, gen kódující antiterminátor podobný proteinu kódovanému genem *N*. Aktivuje transkripci z  $P_R$  a působí jako antiterminátor terminátoru  $t_R$ .

**GENY PRO REKOMBINACI.** Jsou to především:

- ◆ *att*, tj. připojovací místo podmiňující integraci genomu fága lambda do chromozomu hostitelské buňky;
- ◆ *int*, tj. gen kódující integrázu;
- ◆ *xis*, tj. gen kódující excizionázu;
- ◆  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  aj.

#### POŘADÍ EXPRESE GENŮ FÁGA LAMBDA V HOSTITELSKÉ BUŇCE.

Po adsorpci virionu fága lambda na povrch hostitelské buňky vstupuje do buňky lineární DNA fága, která se na kohezních koncích spojí do kružnicové konformace pomocí DNA-ligázy hostitelské buňky (obr. 388). RNA-polymerázou hostitelské buňky *E. coli* začne ihned po infekci od promotorů  $P_L$  a  $P_R$  transkripce genů **brzké rané fáze exprese** (geny *N* a *cro*) a zastavuje se na terminátorech  $t_{L1}$  a  $t_{R1}$  (obr. 392). Výsledkem této transkripce jsou po translaci dva proteiny, *N* a *Cro*. Protein *N* umožňuje pak transkripci **genů pozdější rané fáze**, které se vyjadřují při vstupu do lyzogenního stavu a při rekombinaci. *V této fázi se rozhoduje, zda infikovaná buňka vstoupí do lytického nebo lyzogenního stavu.* Jestliže padne rozhodnutí pro vstup do lytického stavu, aktivuje protein *Q* transkripci **genů pozdní fáze exprese**, což se projeví lyzí buňky a tvorbou nových virionů. V opačném případě, tj. při rozhodnutí pro vstup do lyzogenního

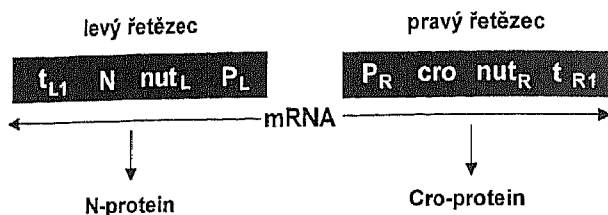


Obr. 392  
Schéma rozložení genů fága lambda podle jednotlivých fází jejich exprese

stavu, se vyjadřují geny  $cII$  a  $cIII$ , které aktivují transkripci genu  $cl$ , jehož produkt - imunitní represor - se váže na operátory  $O_L$  a  $O_R$ . Tímto dějem se zastavuje transkripce genů pozdní fáze exprese a pozdější rané fáze. Pomocí produktu genu  $int$ , který se vytvořil ještě před rozhodnutím buňky pro vstup do lyzogenního stavu, se genom fága lambda integruje do chromozomu hostitelské buňky.

**TERMINACE NA TERMINÁTORECH  $t_{L1}$  A  $t_{R1}$ .** Sledujte nyní průběh terminace a antiterminace transkripce podle obr. 393 a vybavte si normální průběh transkripce v bakteriální buňce. RNA-polymeráza hostitelské buňky se váže prostřednictvím sigma-faktoru na sekvenci -35 k promotorům  $P_L$  a  $P_R$  a přepisuje geny  $N$  a  $cro$ . Sigma-faktor již nadále není k transkripci potřebný a je nahrazen **NusA-proteinem**. Na mRNA vznikající transkripcí se váže protein ró-faktor sestávající ze šesti protomerů, který se pohybuje směrem k terminátorům. Na terminátorech  $t_{L1}$  a  $t_{R1}$  se RNA-polymeráza zastaví a reaguje pak prostřednictvím NusA-proteinu s ró-faktorem, který mezi tím dorazil k terminátorům. *Důsledkem interakce ró-faktoru s NusA-proteinem je odvíjení mRNA*

## a) terminace



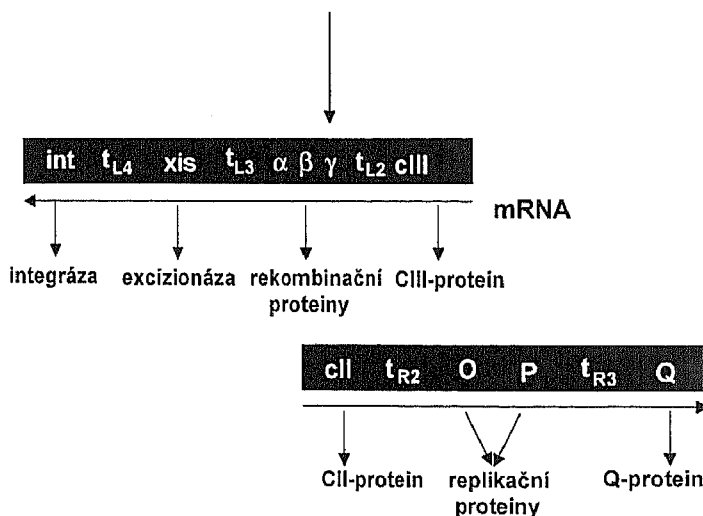
*N-protein a Cro-protein jsou výsledkem transkripce, která končí na  $t_{L1}$  a  $t_{R1}$ . Účinek obou terminátorů je závislý na přítomnosti  $\rho$ -faktoru, který se od začátku transkripce posouvá směrem k 3'-konci až k terminátoru.*

*RNA-polymeráza na terminátoru se zastaví.*

*Součástí RNA-polymerázy je místo sigma-faktoru NusA-protein, na který se váže  $\rho$ -faktor. Tento faktor působí jako helikáza a odvine na terminátoru mRNA z DNA a umožní uvolnění RNA-polymerázy z terminátoru. Tím se zakončí transkripce.*

## b) antiterminace

*Antiterminace, která proběhne na  $t_{L1}$  a  $t_{R1}$  však umožní, že se skuteční transkripce genů pozdější rané fáze exprese.*



Obr. 393

Globální pohled na transkripci genů brzké rané fáze v důsledku terminace a genů pozdější rané fáze v důsledku antiterminace

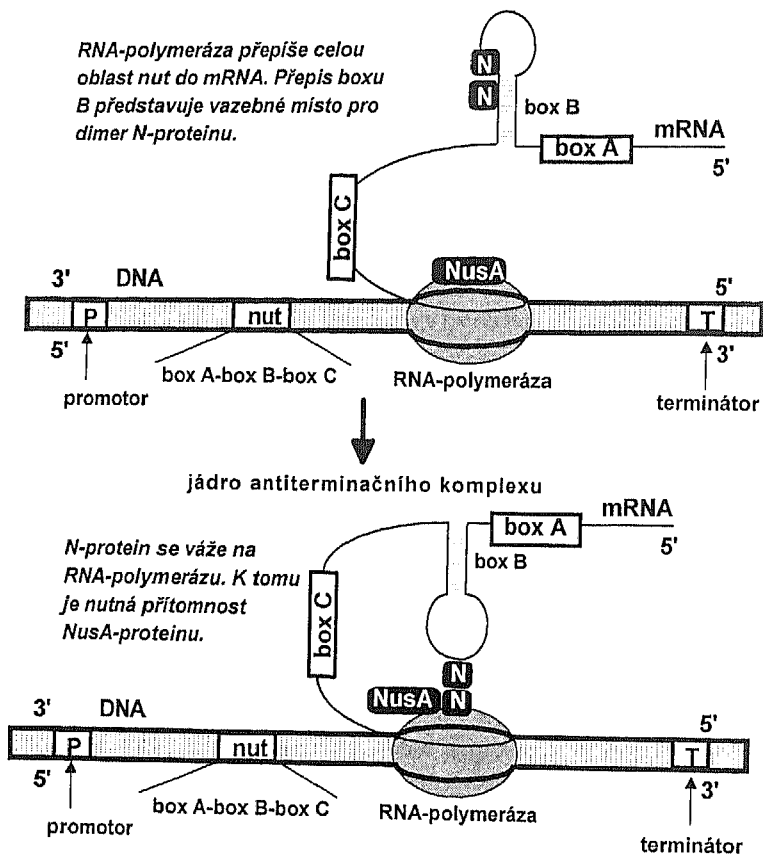


z DNA fága vlivem helikázové aktivity *ró*-faktoru a uvolnění RNA-polymerázy. To samozřejmě vede k zakončení transkripce.

**ANTITERMINACE.** Mediátorová RNA vznikající touto transkripcí se překládá do proteinů N a Cro. Protein N je **antiterminátor**, což znamená, že umožňuje **antiterminaci**, tj. pokračování transkripce přes terminátory. N-protein interaguje s proteinem NusA a blokuje tak interakci RNA-polymerázy s *ró*-faktorem na terminátorech  $t_{L1}$  a  $t_{R1}$ , takže RNA-polymeráza může v transkripci pokračovat přes další terminátory  $t_{L2}$ ,  $t_{L3}$ ,  $t_{L4}$  a  $t_{R2}$ ,  $t_{R3}$  za přepisu genů pozdější rané fáze exprese, jejichž translační produkty jsou uvedeny na obr. 393.

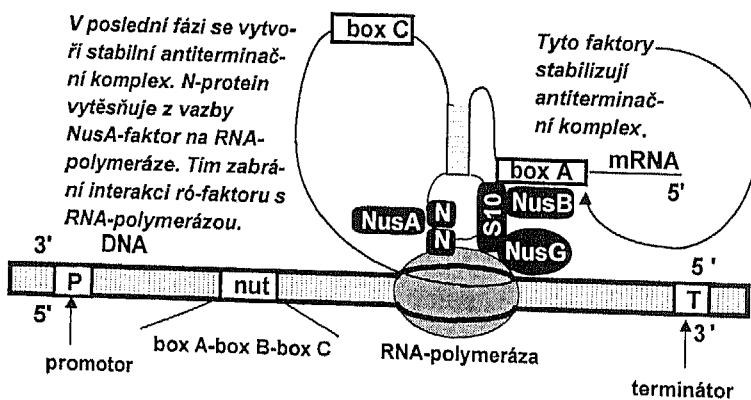
**STABILNÍ ANTITERMINAČNÍ KOMPLEX.** Antiterminační účinek proteinu N je však závislý na existenci sekvence *nut<sub>L</sub>* na levém řetězci a *nut<sub>R</sub>* na řetězci pravém. Tato sekvence je složena ze tří kratších sekvencí označovaných jako **box A**, **box B** a **box C** (obr. 394). Pro antiterminační účinek je nutné, aby tyto tři sekvence byly přepsány do mRNA. Jakmile se totiž v prvních transkripčních, kdy se ještě neuplatňuje antiterminace, vytvoří protein N v dostatečné koncentraci, váže se pak ve formě dimeru na přepis boxu B a navozuje změnu konformace mRNA. Změněná konformace mediátorové RNA umožní pak jeho vazbu na RNA-polymerázu a NusA-protein. Touto vazbou se NusA-protein vytěsni ze svého vazebného místa a je nahrazen N-proteinem. Komplex, který tímto vznikne, představuje **jádro antiterminačního komplexu**. V další fázi se na mRNA a RNA-polymerázu vážou další proteiny, tj. proteiny S10, NusB a NusG, které stabilizují celý komplex mRNA se všemi uvedenými proteiny (obr. 395). Výsledný komplex uvedených proteinů a RNA-polymerázy je pak **stabilní antiterminační komplex**, který umožňuje antiterminaci na terminátorech  $t_{L1}$ ,  $t_{L2}$ ,  $t_{L3}$ ,  $t_{L4}$  a  $t_{R1}$ ,  $t_{R2}$ ,  $t_{R3}$ , jelikož pro vazbu *ró*-faktoru chybí na RNA-polymeráze NusA-protein.

**NAVOZENÍ LYZOGENNÍHO STAVU V BUŇCE.** Klíčovou úlohu při navozování lyzogenního stavu v buňce infikované fágem lambda sehrává protein CII kódovaný genem *cII*. Tento protein podléhá snadno rozkladu HflA-proteinem produkovaným hostitelskou buňkou. Před rozkladem je však chráněn proteinem genu *cIII*. Za těchto podmínek se váže na promotor  $P_{RE}$ , který může vázat RNA-polymerázu jen tehdy, když je na jeho sekvenci v rozsahu -25 až -45 navázán protein CII, který působí jako aktivátor tohoto promotoru. Jakmile RNA-polymeráza rozezná na promotoru  $P_{RE}$  protein CII, začne intenzivní transkripci, která probíhá proti směru transkripce genu *cro* zahajované z promotoru  $P_R$ . Mediátorová RNA, která vzniká transkripcí z promotoru  $P_{RP}$  je komplementární k mRNA vznikající přepisem genu *cro* a proto se s ní hybridizuje a blokuje tak její translaci. Transkripce z promotoru  $P_{RE}$  pokračuje až do



Obr. 394

Vytvoření jádra antiterminačního komplexu



Obr. 395

Stabilní antiterminační komplex

genu *cI*, který silně přepisuje (obr. 396). Molekuly translačního produktu tohoto genu se dimerizují. Dimerní molekula představuje pak aktivní imunitní represor, který se váže nejdříve na operátorové vazebné místo  $O_{R1}$  a  $O_{L1}$ . Přítomností represoru na těchto operátorech se silně zvýší síla operátorových podjednotek  $O_{R2}$  a  $O_{L2}$ , na které se pak může navázat další dimer. Takto se dvěma dimery obsadí dvě operátorové podjednotky, zatímco  $O_{R3}$  a  $O_{L3}$  zůstanou neobsazeny.

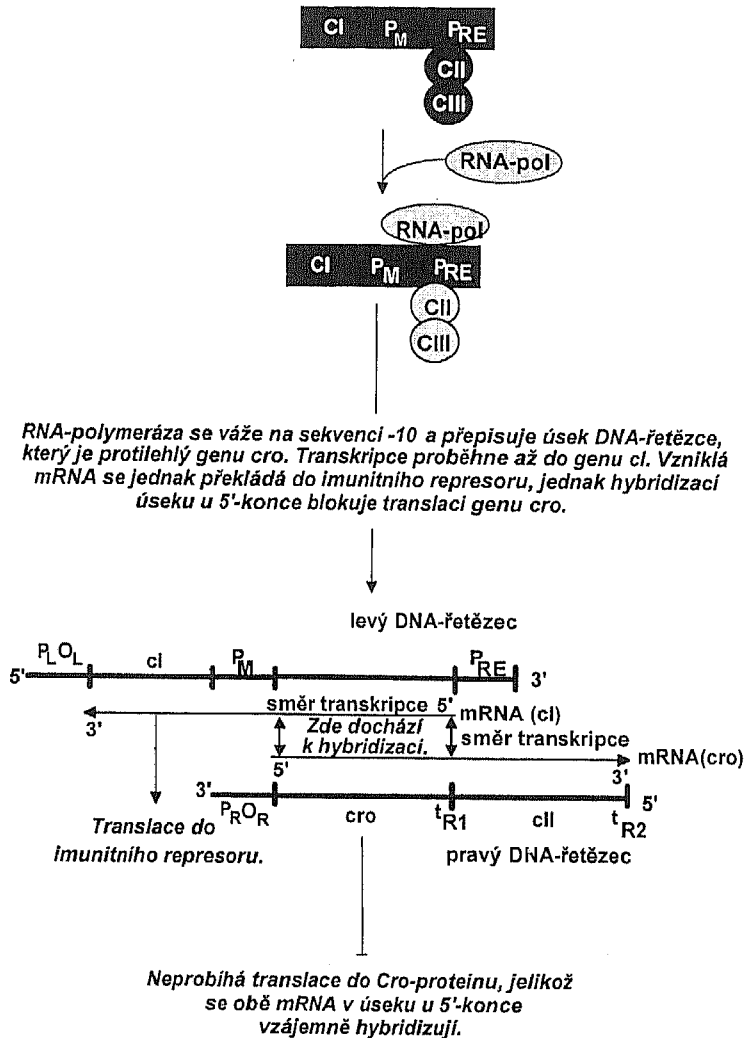
*Obsazením těchto operátorů molekulami imunitního represoru se zastaví transkripce řízená z promotorů  $P_{L}O_L$  a  $P_{R}O_R$ . Represor vázaný na  $O_{R2}$  pak aktivuje  $P_M$  k vazbě RNA-polymerázy, která pak zahájí transkripci genu *cI* (obr. 397). Další syntéza molekul imunitního represoru je již řízena z promotorem  $P_M$ .*

*Uvedenými procesy se navozuje lyzogenní stav buňky. Jeho dosažením se zastaví transkripce na levém i pravém řetězci. Zastaví se i syntéza antiterminátoru  $Q$ , a proto nemůže dojít ani k lyzi buňky, ani k tvorbě nových virionů.*

**STABILIZACE LYZOGENNÍHO STAVU BUŇKY.** Lyzogenie navozená výše popsanými pochody se může stát stabilní teprve tehdy, jestliže v buňce dochází k permanentní produkci imunitního represoru a jeho regulaci. Nezbytným předpokladem k tomu je integrace fágového genomu do genomu hostitelské buňky. Integrace je katalyzována integrázou, která se po antiterminaci vytvořila jako jeden z produktů genů pozdější rané fáze. Integrací se dovrší pochody lyzogenizace. V lyzogenních buňkách *imunitní represor vázaný na  $O_{R2}$  působí pak permanentně jako aktivátor transkripce z promotorem  $P_M$* . Zvýší-li se koncentrace represoru nad kritickou hodnotu, váže se represor i na operátory  $O_3$ . Jelikož vazebné místo  $O_{R3}$  se překrývá s vazebným místem pro polymerázu na  $P_M$ , zastaví se transkripce z tohoto promotoru. To trvá tak dlouho, dokud neklesne koncentrace represoru v buňce opět pod kritickou hodnotu. Pak opět probíhá transkripce genu *cI*. Tímto způsobem je vlastně autoregulována transkripce tohoto genu (obr. 397).

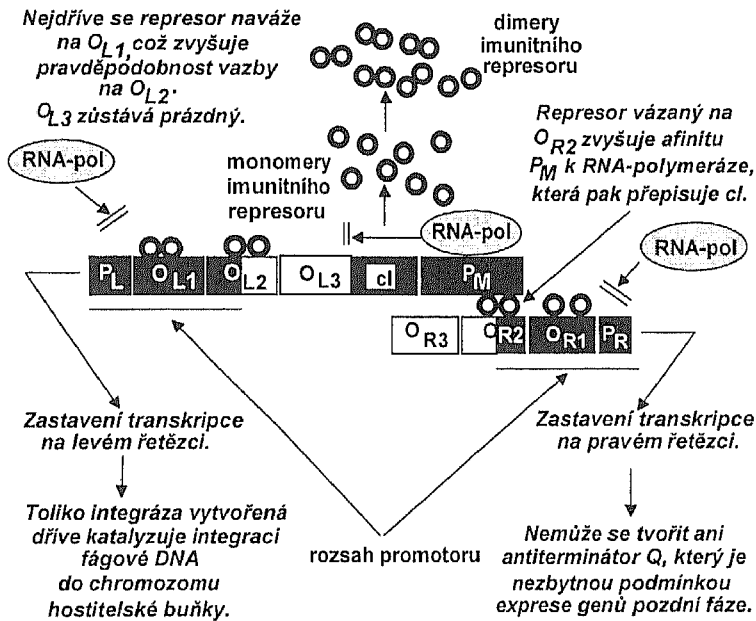
**NAVOZENÍ LYZE HOSTITELSKÉ BUŇKY.** Zde klíčovou úlohu sehrává protein Cro kódovaný genem *cro* (obr. 398). Tento protein se silně váže na  $O_{R3}$  a blokuje tak vazbu RNA-polymerázy na promotor  $P_M$ . Méně častěji obsazuje ostatní vazebná místa, což vede k tomu, že pak probíhá transkripce s nízkou účinností z promotorů  $P_R$  i  $P_L$  na obou řetězcích, jelikož zbylá vazebná místa operátoru stačí k navázání RNA-polymerázy. Teprve při vyšší koncentraci Cro-proteinu jsou tímto proteinem obsazena všechna vazebná místa, což má za následek zastavení transkripce všech genů na levém i pravém řetězci kromě genů pozdní fáze exprese. Transkripce těchto genů začíná z promotorem  $P_R$ , který je aktivován produktem genu *Q* působícím současně jako antiterminátor na  $t_R$ . Místo **qut** zde má podobný význam jako *nut*. *Expese genů pozdní fáze umožňuje replikaci fágové DNA, vede k tvorbě virionů a k lyzi buňky.*

Na promotor  $P_{RE}$  se váže CII-protein (na sekvenci -35). Snadno se však rozkládá působením proteinu HflA hostitelské buňky. Tomuto rozkladu brání přítomnost proteinu CIII vázajícího se na CII. Promotor  $P_{RE}$  může být rozeznán RNA-polymerázou, jen když se na něj nejdříve naváže CII.

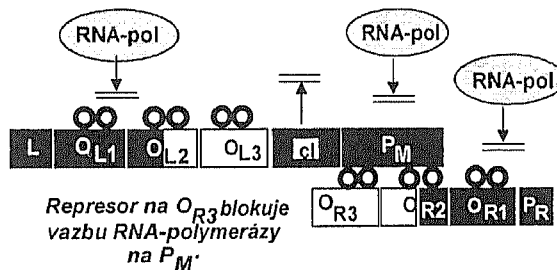


Obr. 396  
Navození lyzogenního stavu v buňce

*Produktem genu  $cl$  je protein, který se dimerizuje. Teprve tento protein představuje aktivní imunitní represor, který se váže na operátory překrývající se s promotory  $P_L$ ,  $P_M$ ,  $P_R$ . Každý operátor má tři vazebná místa pro represor. Na každé z nich se váže dimer.*



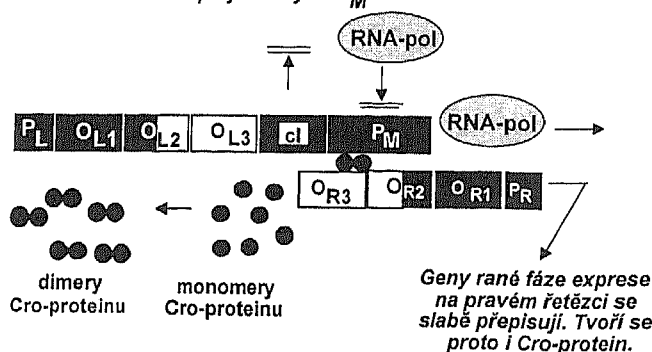
*Při vysoké koncentraci imunitního represoru nastane tato situace:*



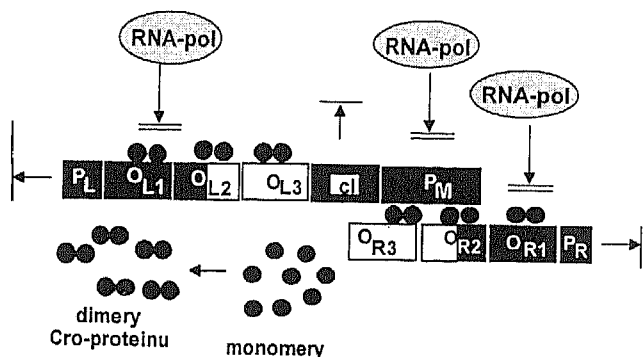
*Jestliže se sníží koncentrace represoru, nastane opět situace uvedená v horní části tohoto schématu.*

Obr. 397  
Vazba imunitního represoru na operátory  $O_L$  a  $O_R$

*Cro-protein má podobnou strukturu jako imunitní represor. Váže se silně na  $O_{R3}$ , slaběji na  $O_{R2}$  a  $O_{R1}$ . Vazbou na  $O_{R3}$  blokuje navázání RNA-polymerázy na  $P_M$ .*



*Při vyšší koncentraci Cro-proteinu jsou tímto proteinem obsazena všechna operátorová vazebná místa. Proto se zastaví transkripce všech genů rané fáze exprese na levém i pravém řetězci. Toliko Q-protein může z  $P_R$  uskutečnit antiterminaci a umožnit transkripci z tohoto promotoru všech genů pozdní fáze exprese.*



Obr. 398  
Vazba Cro-proteinu na operátory  $O_L$  a  $O_R$

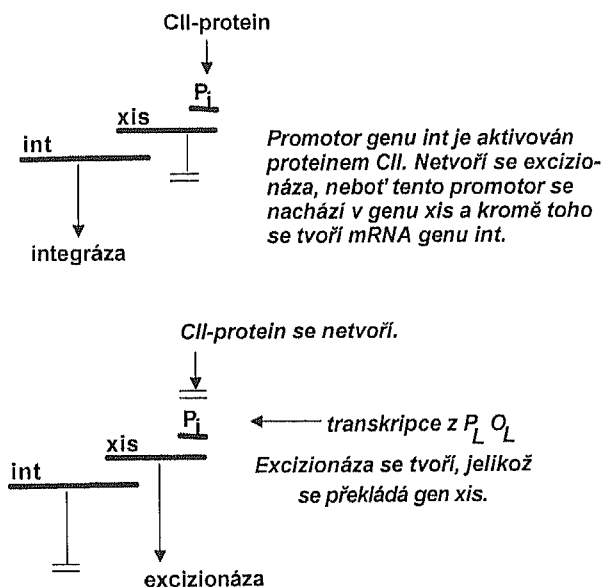
**ÚLOHA GENŮ *xis* A *int*.** Tyto geny se uplatňují při integraci genomu fága lambda do chromozomu hostitelské buňky a jeho excizi. Gen *int* se překrývá svým koncem se začátkem genu *xis*. Součástí genu *xis* je také promotor  $P_x$ , který však je aktivní, jen když se na něj naváže protein CII tvořený v pozdější rané fázi exprese genů fága lambda. Transkripce zahájená z tohoto promotoru pak zabrání tomu, aby se přepisoval gen *xis*; přepisuje se jen gen *int*, jehož mRNA se překládá do integrázy. Tento enzym se tvoří jen krátkou dobu a katalyzuje integraci DNA fága lambda do chromozomu hostitelské buňky. Integráza se přestane tvořit, jakmile imunitní represor obsadí  $O_L$  a  $O_R$ . Teprve po inaktivaci imunitního represoru, která způsobí, že se molekuly imunitního

represoru uvolní z obou operátorů, se po antiterminaci přepisuje gen *xis*. Gen *int* je inaktivní, neboť se jeho část přepisuje jako *xis* (obr. 399).

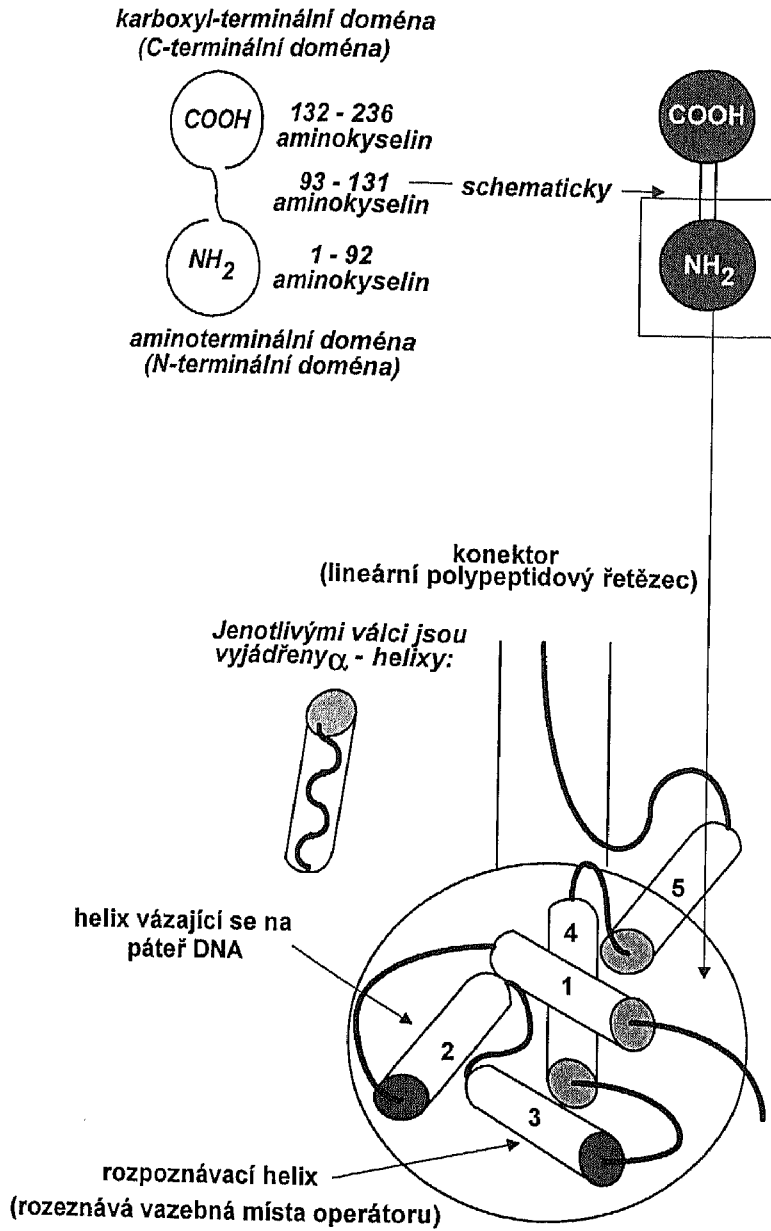
**IMUNITNÍ REPRESOR.** Molekula imunitního represoru je dimer, který sestává ze dvou stejných polypeptidových řetězců - podjednotek represoru. *N-terminální a C-terminální konec obou polypeptidů je globulární.* Globulární charakter N-terminální části je poměrně dobře objasněn. O C-terminální části je v tomto směru málo znalostí. Globulární N-terminální část sestává z pěti  $\alpha$ -helixů, které jsou propojeny lineárními úseky polypeptidu. Helix 2 je položen v úhlu napříč velkého žlábků a helix 3 je přibližně kolmo k němu. Oba helixy spojuje krátký úsek polypeptidového řetězce. Jde o motiv proteinu **helix-otáčka-helix**, se kterým jsme se již seznámili. Další popis je zřejmý z obr. 400.

V motivu helix-otáčka-helix má helix 3 **rozpoznávací funkci** a váže se *vodíkovými vazbami k cílovým nukleotidovým sekvencím operátoru.* **Helix 2** se obdobně váže k páteři DNA. Tento kontakt helixu 2 je důležitý pro celkové umístění helixů ve větším žlábků.

Obě podjednotky se spojují v dimer prostřednictvím vazeb v karboxylové části (obr. 401). Teprve tento dimer má funkci imunitního represoru, který se pomocí helixů 3 váže k vazebným místům operátorů  $O_L$  a  $O_R$ , která jsou umístěna ve větším žlábků (obr. 402). V těchto místech se mohou tvořit vodíkové vazby (obr. 403).

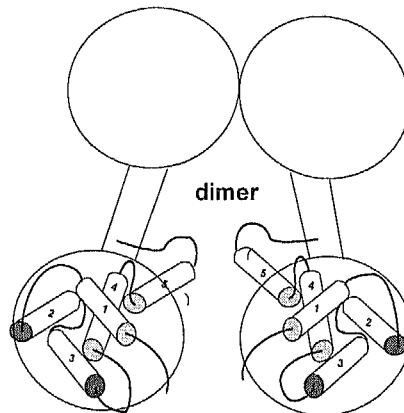


Obr. 399  
Syntéza integrázy a excizionázy

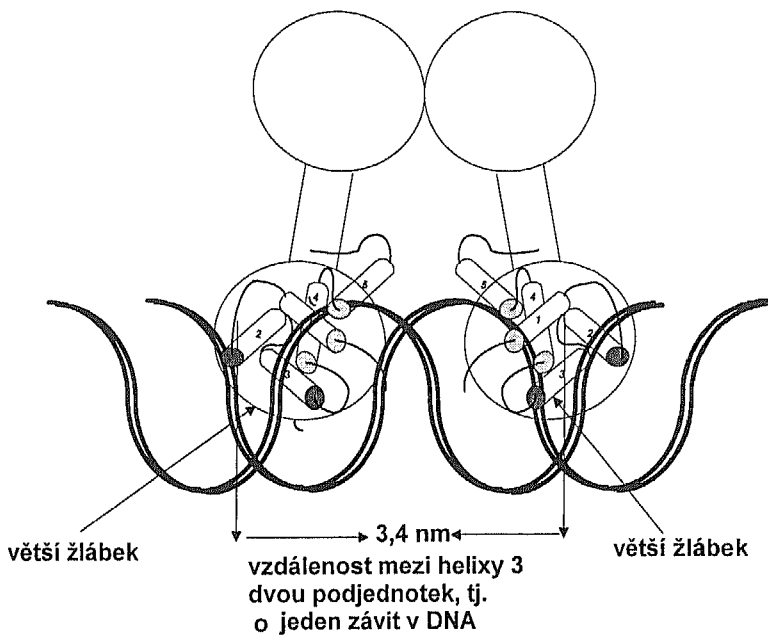


Obr. 400  
Protomer (podjednotka) imunitního represoru



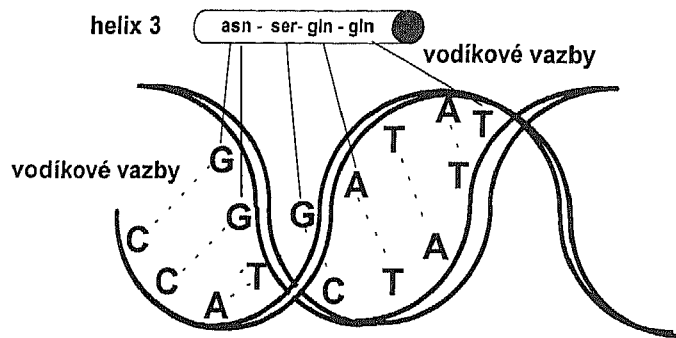


Obr. 401  
Molekula imunitního represoru



*Helix 3 rozpoznává specifická vazebná místa operátorů a váže se na ně určitou sekvencí aminokyselin.*

Obr. 402  
Rozpoznávání operátoru  $O_L$  a  $O_R$  imunitním represorem

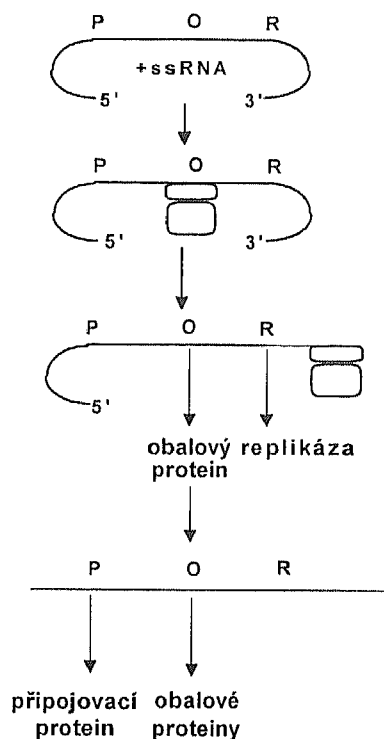


Obr. 403  
Rozpoznávání sekvencí operátoru helixem 3 imunitního represoru  
(zjednodušené schéma)

## 8.4 BAKTERIÁLNÍ VIRY S POZITIVNÍ RNA (+ssRNA-BAKTERIÁLNÍ VIRY)

### 8.4.1 Bakteriofágy MS2 a Q $\beta$

Bakteriofágů s genomem RNA je poměrně málo. Patří mezi ně např. viry MS2 a Q $\beta$ . Po vstupu do bakteriální buňky (*E. coli*) se genom těchto virů, obsahující gen O pro obalový protein, gen R pro RNA-replikázu a gen P pro připojovací protein, ještě nereplikuje. Nejdříve, jelikož je tvořen pozitivní RNA, působí jako mRNA, takže se na něj může připojit ribozom, a to na místo, které je obsazeno genem O pro obalový protein. Translací tohoto genu se pak uvolňuje vlásenka blokující původně překlad na genu R. Po uvolnění vlásenky je umožněn vstup ribozomu na gen R, takže se může tvořit RNA-replikáza. Pozdě-



**Obr. 404**  
Strategie replikace a exprese genomu  
RNA-bakteriofágů

ji může začít též syntéza připojovacího proteinu na genu P. RNA-replikáza katalyzuje replikaci pozitivní RNA na negativní a negativní na pozitivní. Na část molekul pozitivní RNA se nejdříve připojí jedna molekula připojovacího proteinu a pak proteiny obalové za tvorby kompletních virionů. Syntéza RNA-replikázy je regulována koncentrací molekul obalových proteinů. Při jejich kritické koncentraci se syntéza RNA-replikázy zastaví (obr. 404).

## REPLIKACE A EXPRESE VIROVÉHO GENOMU V ŽIVOČIŠNÉ BUŇCE

*Místo, kterým živočišný virus vstupuje do svého hostitele, se označuje jako brána vstupu. Je to:*

- ◆ **Kůže.** Celkově je kůže značnou překážkou pro vstup viru do organismu. Její vnější vrstva (epidermis) sestávající z mrtvých buněk není vhodným prostředím pro replikaci virového genomu. Aby mohl virus do organismu proniknout kůží, musí být kůže nejdříve poraněna (bodnutím způsobeným hmyzem, kousnutím nebo subkutánní injekcí).
- ◆ **Sliznice.** Sliznice oka a urogenitálního ústrojí jsou pro vstup viru do hostitele nejprůzračnější. Výrazem toho je značný počet virových infekcí přenášených pohlavně.
- ◆ **Zažívací trubice.** Viry mohou infikovat zažívací trubici přes ústa, orofarynx, střeva nebo konečník. Viry, které infikují střeva přes ústa jako bránu vstupu, musí projít žaludkem, který je však pro ně velmi nepříznivým prostředím (nízké pH a vysoká koncentrace trávicích enzymů). Proto teprve ty viry, které projdou touto bariérou, mohou způsobit infekci střevního epitelu.
- ◆ **Dýchací ústrojí.** Je nejčastější branou vstupu virové infekce. Viry, které infikují dýchací ústrojí hostitele, pochází z aerosolu produkovaného kýchaním a kašláním z jiného hostitele, jak je to výstižně vyjádřeno anglicky "Coughs and sneezes spread diseases".

*Přírodní prostředí je pro virovou infekci značnou překážkou. Většina virů je citlivá k teplotě, slunečnímu světlu, jehož složkou je UV-záření atd. Jen málo virů je rezistentních k těmto faktorům. Některé viry však unikají těmto nepříznivým vlivům tím, že jsou přenášeny z hostitele na hostitele vektory, což bývá obvykle nějaký druh hmyzu. Ve vektoru se virus může nebo nemusí pomnožit. Viry, které nejsou přenášeny vektory, uskutečňují přenos z hostitele na hostitele těmito způsoby:*

- ◆ **Horizontálním přenosem,** tj. přímým přenosem viru z hostitele na hostitele.
- ◆ **Vertikálním přenosem,** tj. přenosem viru z rodičovské generace na potomstvo. To se nejdříve uskutečňuje infekcí fétu při porodu nebo krátce po

porodu (během kojení). Jen vzácněji se děje tento přenos zárodečnou linií buněk. Na rozdíl od horizontálního přenosu je vertikální přenos založen na dlouhodobé perzistenci viru v hostiteli.

Po svém vstupu do hostitele pokračuje virus v infekci vstupem do vnímatelných buněk, kde se nejdříve primárně replikuje. Tato počáteční interakce viru s hostitelem určuje, zda infekce bude lokalizována do brány vstupu, nebo se rozšíří v hostiteli a stane se **systémovou infekcí**, tj. infekcí postihující více orgánů mnohobuněčného organismu. Průběh této infekce má několik stupňů:

1. Virus se pomnoží v místě vstupu.

2. Z místa vstupu se šíří lymfatickými cestami.

3. Pomnoží se v regionálních lymfatických uzlinách, což je zdrojem **primární virémie**. Jako **virémie** se označuje přítomnost viru v krvi ve formě virionů nebo infikovaných krevních buněk.

4. Z regionálních lymfatických uzlin přechází do retikuloendoteliálního systému (játra, slezina, kostní dřeň), který je zdrojem **sekundární virémie**.

5. Přechází do krve a odtud do cílového orgánu (CNS, kůže, svalstvo).

6. Vylučuje se z hostitele respiračními sekrety, stolicí, kůží nebo močí.

Celkově infekce obratlovců včetně člověka může probíhat v těchto formách:

◆ Jako **abortivní infekce**. Tak se nazývá infekce, během níž se v hostitelské buňce syntetizují některé nebo všechny složky viru, aniž se tvoří viriony. Označuje se též jako **neproduktivní infekce** a dochází k ní obvykle v hostitelských buňkách, které nejsou pro virus permissivní, tj. snázející infekci virem.

◆ Jako **akutní infekce**. Je to infekce vyznačující se krátkým průběhem, intenzivní replikací viru a tvorbou virionů v infikovaných buňkách, které v důsledku toho podlehnou úplnému rozpadu nebo lyzi.

◆ Jako **chronická infekce**. Tato infekce se vyznačuje tím, že virus je aktivní jen v některých infikovaných buňkách. Část těchto buněk vlivem produkce virionů odumírá lyzí nebo jsou natolik poškozeny, že infekci virem nepřežijí. Další část buněk infekci virem přežije a dělí se normálně. Chronická infekce je vleklá a organizmy, které jí trpí, jsou nositeli viru.

◆ Jako **perzistentní infekce**, tj. infekce vyznačující se neustálou přítomností viru v infikovaných buňkách. Genom toho viru často bývá integrován do genomu hostitelské buňky. Existují tři druhy této infekce:

a) virus setrvává v buňce, aniž se z ní uvolňuje,

b) virus se uvolňuje z buňky sporadicky,

c) virus se neustále z buňky uvolňuje, aniž ji lyzuje.

◆ Jako **latentní infekce**. Je to stav perzistentní infekce bez pozorovatelných symptomů onemocnění a produkce virionů z infikovaných buněk. Tento stav bý-

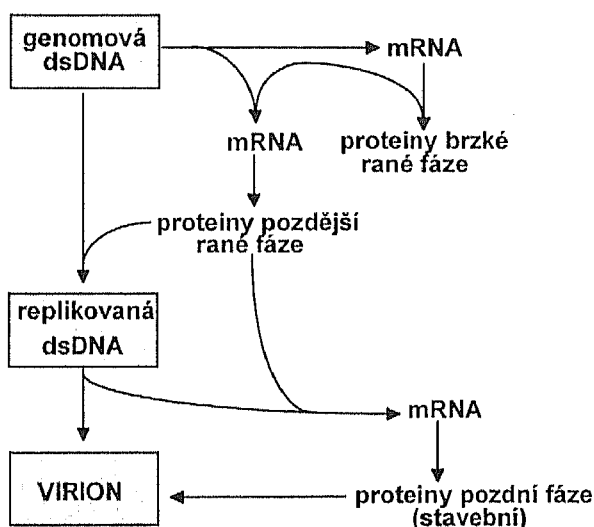
vá často způsoben integrací virového genomu do genomu hostitelské buňky. Přitom transkripce integrovaného genomu (proviru) a translace mRNA viru je buď velmi snížena, nebo vůbec neprobíhá.

Z velkého množství virových druhů a kmenů jsme vybrali jako příklady ty skupiny virů, se kterými se člověk v současnosti nejvíce setkává. Současně jsme dbali na to, aby na základě těchto vybraných příkladů ten, kdo z této učebnice studuje, mohl získat obecnější představu o molekulárních mechanismech reprodukce virů.

## 9.1 ŽIVOČIŠNÉ VIRY S DVOUŘETĚZCOVOU DNA (dsDNA-ŽIVOČIŠNÉ VIRY)

Kromě papovavirů všechny ostatní dsDNA-viry mají genofor tvořený lineární dsDNA. Jen genom papovavirů sestává z kružnicové dsDNA. Podle strategie reprodukce v hostitelské buňce můžeme dsDNA-viry rozdělit do dvou skupin (obr. 405):

1. Skupina zahrnující viry, jejichž replikace probíhá výlučně v jádře hostitelské buňky a je relativně závislá na buněčných faktorech. Patří sem **papovaviry**, **herpesviry** a **adenoviry**. Ihned po infekci se geny v jejich ještě nereplikující se dsDNA přepisují do mRNA, která se překládá do **proteinů brzké rané fáze**. Tyto proteiny působí ve funkci transkripčních faktorů a ovlivňují



Obr. 405

Základní strategie replikace a exprese genomu dsDNA-virů

pozitivně v ještě nereplikující se dsDNA zahájení transkripce genů, které se překládají do **proteinů pozdější rané fáze**. Z těch některé katalyzují replikaci dsDNA viru a jiné navozují transkripci genů do **proteinů pozdní fáze**, které působí jako proteiny stavební. Těmito proteiny se obalují replikované molekuly dsDNA viru za tvorby virionů.

2. Skupina zahrnující viry, jejichž replikace probíhá v cytoplazmě hostitelské buňky. Tyto viry jsou schopny syntetizovat všechny proteiny, které potřebují k replikaci a transkripci. *Expresse jejich genomu a jeho replikace je značně nezávislá (není však úplně nezávislá) na molekulárních mechanismech hostitelské buňky*. Patří sem **poxviry** (neštovičné viry). Na rozdíl od virů předchozí skupiny *netvoří tyto viry proteiny brzké rané fáze*. Jinak je exprese jejich genomu podobná virům předchozí skupiny.

Na dalších stránkách jsou blíže popsány papovaviry, adenoviry a herpesviry.

### 9.1.1

## Papovaviry (Papovaviridae)

**OBECNÁ CHARAKTERISTIKA.** Papovaviry se rozdělují do dvou rodů:

1. **Rod Papillomavirus** neboli **papilomaviry**. Klinicky se papilomaviry projevují tvorbou bradavic na kůži a sliznici. Promořenost lidské populace těmito viry je značná. Nejvíce jsou rozšířeny typy papilomavirů, které jsou původci bradavic na ruce a nohou. Ve všech skupinách lidské populace je též značně rozšířen typ papilomaviru, který způsobuje na kůži tvorbu mnohočetných bradavic benigního charakteru (**epidermodysplasia verruciformis**). Některé typy papilomavirů způsobují vznik **kondylomů** (*kožní výrůstky podobné bradavicím*), které mohou přejít do maligního stavu.

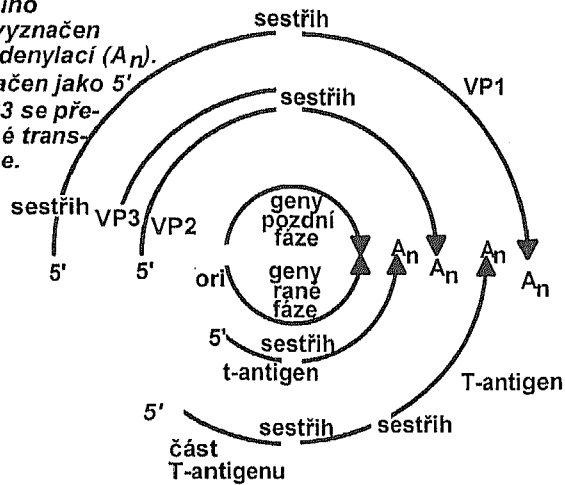
Přenos papilomavirů projevujících se tvorbou bradavic se uskutečňuje ponejvíce v rámci rodiny od věku 5 let, a to přímým kontaktem s infikovanou oblastí kůže nebo s kontaminovanými předměty.

2. **Rod Polyomavirus** neboli **polyomaviry**. Dosud jsou známy dva lidské typy, a to **BK-virus** a **JC-virus**. JC-virus byl izolován z mozku pacienta s iniciálami J. C. BK-virus byl izolován z moče příjemce (s iniciálami B. K.) ledvinového transplantátu. Patogenní význam těchto virů je nepatrný. Většinou způsobují inaparentní infekce. Těžká onemocnění však způsobují jen u pacientů s imunologickými defekty.

Kapsid virionů všech papovavirů je ikozaedrický o velikosti 40 - 50 nm.



Konec primárního transkriptu je vyznačen šipkou a polyadenylací ( $A_n$ ). Začátek je označen jako 5'. Geny VP2 a VP3 se překrývají ve stejné transkripční jednotce.



Obr. 406  
Transkripční mapa viru SV 40

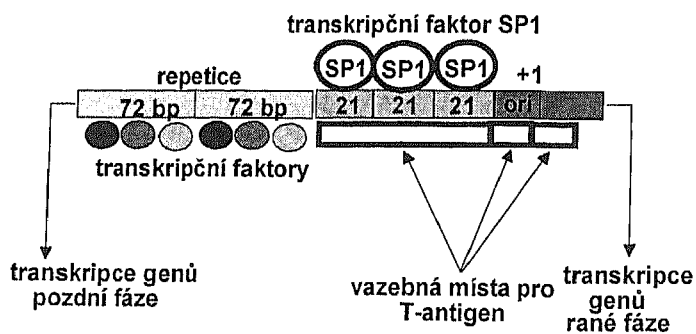
**VIRUS SV40.** Nejlépe je prostudován virus SV40 (tzv. opičí virus), který patří k polyomavirům. Způsobuje inaparentní infekce opic rodu *Cercopithecus*. Replikuje se v různých buněčných kulturách, ale když byl poprvé izolován, projevoval se cytopaticky jen v buněčných kulturách ledvin. Jeho viriony jsou neobalené a ikozaedrické (pravidelný dvacetistěn). Kapsid sestává ze tří proteinů: VP1, VP2 a VP3, DNA je dvouřetězcová a kružnicová. Jsou na ní lokalizovány čtyři překrývající se transkripční jednotky. Transkripční jednotky obsahující gen kódující malý t-antigen a gen kódující velký T-antigen se přepisují do rané mRNA, zatímco transkripční jednotky obsahující geny pro VP1, VP2 a VP3 se přepisují do mRNA pozdní (obr. 406).

V sousedství transkripční jednotky přepisované do rané mRNA se nachází zesilovač transkripce (obr. 407), na který se vážou transkripční faktory kódované geny hostitelské buňky, např. SP1. Tyto faktory zvyšují účinnost transkripce do rané mRNA. Na zesilovač transkripce se váže také T-antigen, který:

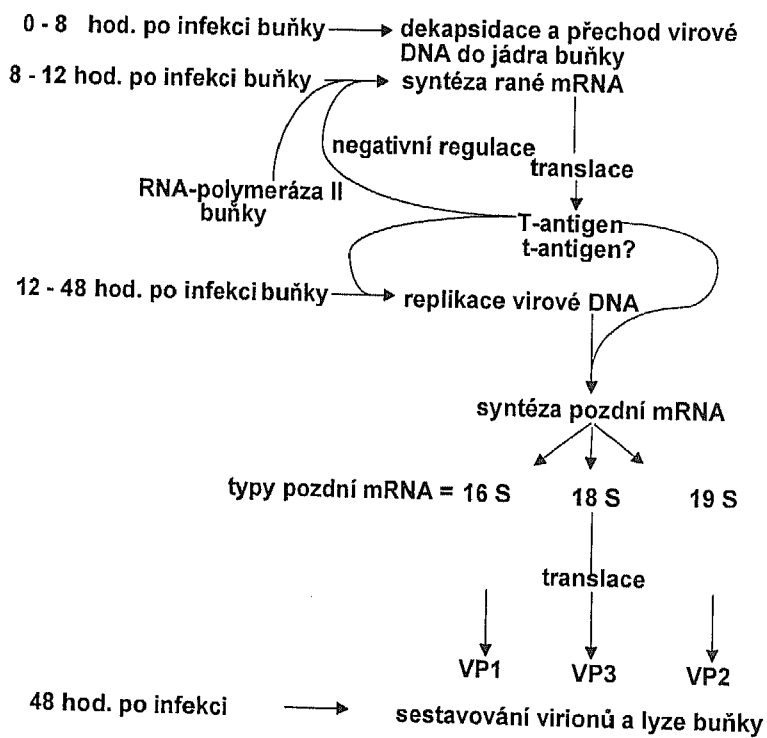
- ◆ vypíná syntézu rané mRNA, tedy i svou,
- ◆ zahajuje replikaci virové DNA,
- ◆ zapíná syntézu pozdní mRNA.

Celková strategie exprese genomu viru SV40 je zřejmá z obr. 408.

## 9.1.2 Adenoviry (Adenoviridae)



Obr. 407  
Zesilovač transkripce viru SV40



Obr. 408  
Strategie exprese genomu viru SV40 po infekci opičích buněk

Čeď Adenoviridae se dělí na dva rody:

◆ **Mastadenovirus**. Hostiteli virů tohoto rodu jsou člověk a jiní savci (pes,

kůň aj.). Dělí se na řadu sérotypů. Typovým druhem je **lidský adenovirus 2**.

- ◆ **Aviadenovirus.** Hostiteli jsou ptáci (drůbež, kachny, husy aj.).

**ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÁ ADENOVIRY.** Adenoviry způsobují značný počet onemocnění. Ve většině případů se jedná o respirační, gastrointestinální a oční infekce. Asi dvě třetiny onemocnění probíhají subklinicky. Přesto však vedou k celoživotní imunitě. Inkubační doba je obvykle 2 až 6 dnů. K nejčastějším onemocněním způsobeným adenoviry patří:

- ◆ **Akutní horečnatá faryngitida (zánět hltanu).** Asi 5 % akutních respiračních infekcí u dětí do stáří 5 let je způsobeno adenoviry. Symptomy těchto onemocnění jsou rýma, katar nosohltanu, kašel, oteklé krční lymfatické uzliny a příležitostně zánět mandlí. Tyto symptomy jsou doprovázeny horečkou, zimničným třesením, bolestmi svalů a hlavy.
- ◆ **Horečka spojená s faryngitidou a konjunktivitidou (zánět očních spojivek).** Vyskytuje se u dětí základní školy a výjimečně u dospělých. Onemocnění se vyznačuje zánětem hltanu, rýmou a horečkou. V těžších případech se vyskytuje i pneumonie (zánět plic). Zdrojem infekce často bývá voda na plovárnách. Onemocnění trvá 3 až 5 dnů.
- ◆ **Akutní respirační syndrom.** Vyskytuje se především u nováčků na vojně v podzimním a zimním období, mnohem méně u civilního obyvatelstva. Onemocnění se vyznačuje horečkou, faryngitidou, kašlem a zánětem nosních mandlí. Komplikací bývá pneumonie, která u dětí může být smrtelná.
- ◆ **Epidemická keratokonjunktivitida.** Vyskytuje se v každém věku, často u dělníků v kovoprůmyslu a též jako nozokomiální infekce na očních klinikách. Je značně nakažlivá. Přenáší se kontaminovanými ručníky ve společných místnostech atd. Inkubační doba je 8 až 10 dní. Po ní následuje bolestivá folikulární konjunktivitida doprovázená slzením.
- ◆ **Konjunktivitida.** Inkubační doba je 6 až 9 dnů. Průběh infekce je velmi mírný. K infekci dochází sporadicky nebo epidemicky v letním období u dětí a mladistvých.
- ◆ **Gastroenteritida.** Vyskytuje se u kojenců a dětí do 4 let. Vyznačuje se průjmy trvajícími až 10 dnů a respiračními potížemi, vzácněji horečkou, zvracením a dehydratací. Viry jsou vylučovány stolicí a přenášejí se fekálně orální cestou. U mnoha dětí probíhá infekce inaparentně (bez klinických příznaků).

Další onemocnění způsobená adenoviry se vyskytují v lidské populaci vzácně.

Patogenita adenovirů spočívá v inhibici replikace DNA hostitelské buňky, translace a přerušení posttranskripčních úprav hnRNA a z toho vyplývající inaktivace mRNA hostitelské buňky. Jejich cílovými buňkami jsou především

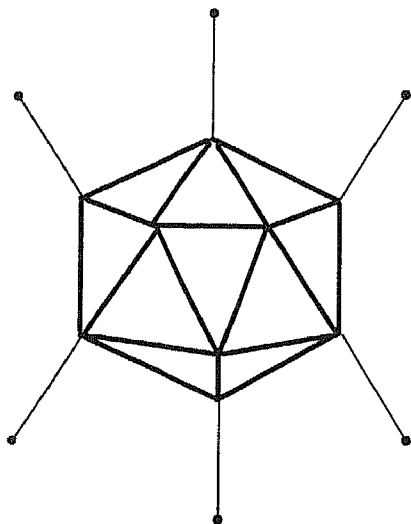
epiteliální buňky očí a sliznice respiračního ústrojí (nosu, hltanu, hrtanu, průdušek a plic), genitálií, gastrointestinálního ústrojí, mozkových plen a lymfatických uzlin. Kromě toho mohou adenoviry řadu let latentně setrávat na mandlích, v polypech a střevních folikulech, aniž by vyvolaly onemocnění a uvolňovaly se z hostitelských buněk. Bez symptomů je též adenovirová reaktivace z latence. Molekulární mechanizmy k udržování latence nejsou známy.

K rozmnožování adenovirů *in vitro* se používají buněčné linie lidského původu, především epitheliální buňky (např. KB-buňky, HeLa-buňky aj). Buňky hlodavců nejsou pro adenoviry permissivní. Mohou však být neoplasticky transformovány.

Přenos adenovirové nákazy se děje výlučně z člověka na člověka jako kapénková infekce přes respirační a oční sekrety. Akutně infikovaný jedinec vylučuje adenoviry slinami, stolicí a močí. Přenos adenovirů je též možný fekálně orální cestou, např. na plovárnách může být přenesena horečka spojená se zánětem hltanu a spojivek.

*Člověk je jediným rezervoárem lidských adenovirů.* Infekce adenoviry se vyskytuje sporadicky nebo se šíří epidemicky. Do stáří 10 let většina dětí prodělala alespoň jednu adenovirovou infekci. Asi 50 % adenovirových infekcí však probíhá inaparentně.

**STRUKTURA A TVAR ADENOVIRIONU.** Virion adenovirů je ikozaedrický vyznačující se 20 trojúhelníkovými plochami a 12 vrcholy (obr. 409).



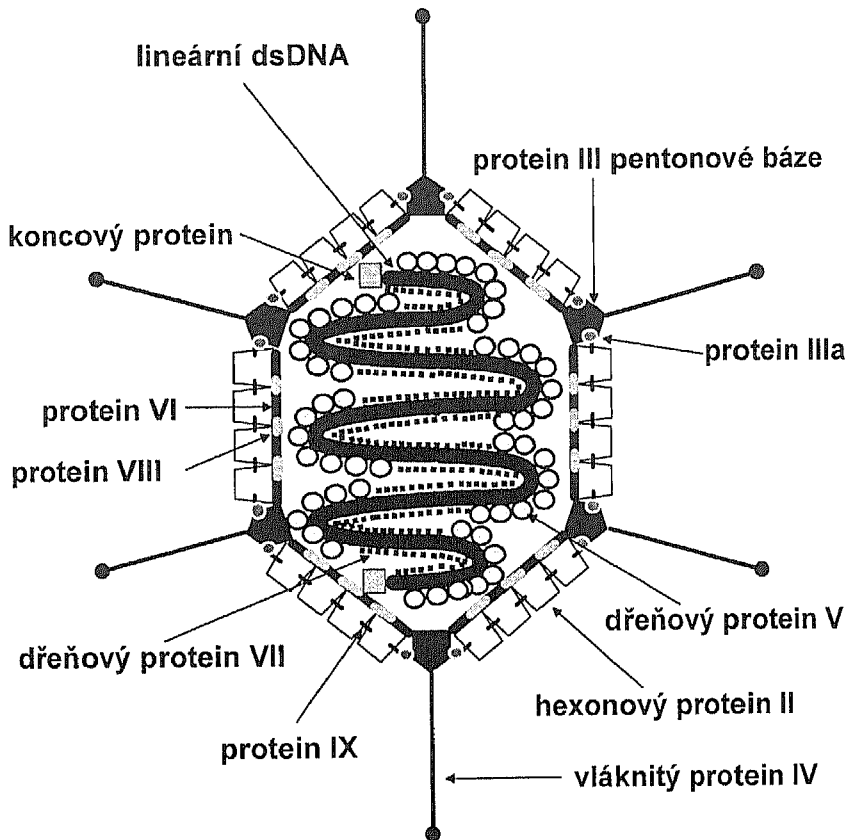
Obr. 409  
Ikozaedrický kapsid adenovirionu

Kapsid je neobalený a vyznačuje se vláknitými výběžky. Sestává z 252 kapsomer. Jako **kapsomery** se označují *morfologické jednotky virionu*, z nichž je sestaven kapsid. Kapsomera složená ze šesti podjednotek se označuje jako **hexon**, z pěti jako **penton**. Kapsid adenovirů tvoří 240 hexonů a 12 pentonů.

Penton sestává z pento-  
nové báze a vláknitého protei-  
nu. **Pentonová báze** je penta-  
mer strukturního **proteinu III**,  
na který se váže **vláknitý pro-  
tein IV** zakončený strukturou  
kulovitěho tvaru. Každý vlák-  
nitý protein je trimer. Další  
protein, který je sdružen s pen-

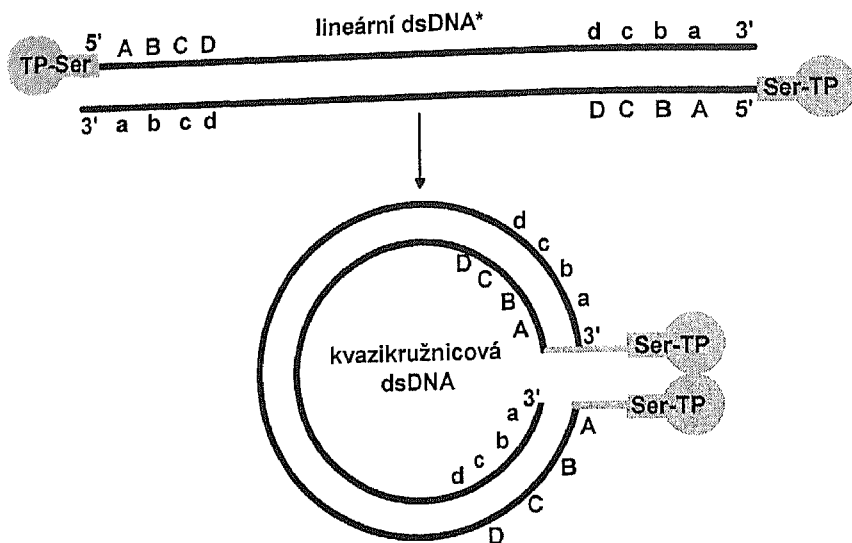
tonovou bází je **protein IIIa**. Každá postranní plocha kapsidu je tvořena dvanácti hexony, z nichž každý je trimerem hexonového **proteinu II**. V místech kontaktu jednotlivých kapsomer jsou **proteiny IX, X, XI a XII**. Na vnitřní straně kapsidu je **protein VI a VIII**. Vnitřek kapsidu tvoří nukleoproteinový komplex sestávající z genomu adenoviru a **proteinů V a VII** (obr. 410). Průměr virionu je 80 - 110 nm.

**GENOM ADENOVIRŮ.** Genom adenovirů tvoří lineární dvouřetězcová DNA, na jejíž oba 5'-konce se přes zbytek serinu váže tzv. **koncový protein** označený jako **TP** (=terminal protein) (obr. 411). Nekovalentními interakcemi se oba proteiny spojí a udrží pak lineární DNA ve stavu podobném kružnicovému (**kvazikružnicový stav**). Kromě toho jsou konce tohoto genomu opatřeny obrácenými repetitivy (viz str. 102).



*Poznámka: Nejsou uvedeny proteiny X, XI a XII.*

Obr. 410  
Schéma adenovirionu



Obr. 411  
Genom adenovirů

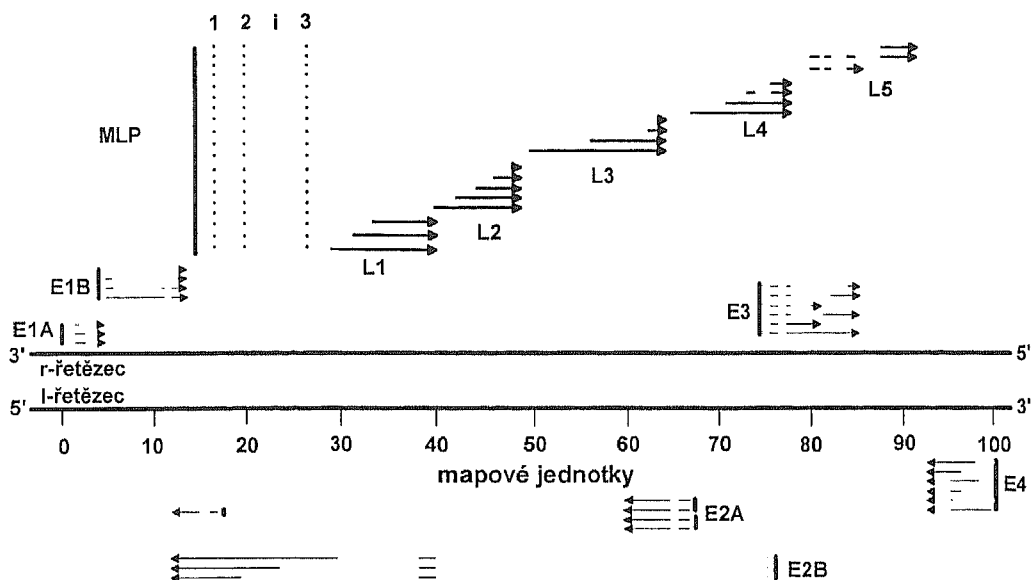
Velikost adenovirové DNA je 36 - 38 kb. Přes tyto malé rozměry je bohatá genetickou informací, neboť kóduje značné množství (60) proteinů. To je způsobeno tím, že:

- ◆ *oba komplementární řetězce této DNA se přepisují ;*
- ◆ *transkripční jednotky, a tedy i geny na obou řetězcích se překrývají;*
- ◆ *primární transkripty se alternativně sestřihují, což vede ke vzniku řady molekul mRNA překládaných do proteinů lišících se v primární struktuře.*

**TRANSKRIPČNÍ MAPA ADENOVIRU 2.** Uvedené tři charakteristiky genomu adenovirů nám přiblíží transkripční mapa adenoviru typu 2 (obr. 412), na níž je 36 500 bp DNA tvořící genom tohoto viru rozděleno do 100 mapových jednotek. *DNA-řetězec, na kterém probíhá transkripce zleva doprava, je na mapě označen jako r-řetězec a DNA-řetězec, na kterém probíhá transkripce zprava doleva, je označen jako l-řetězec.* Z mapy můžeme vyčíst, že genom adenoviru typu 2 je převážně organizován do:

- ◆ **raných transkripčních jednotek (*E1A, E1B, E2A, E2B, E3 a E4*);**
- ◆ **jedné pozdní velké transkripční jednotky, jejíž primární transkript se sestřihuje do pěti skupin (*L1 až L5*) molekul pozdní mRNA.**

Jako raná transkripční jednotka se označuje jednotka přepisovaná z vi-



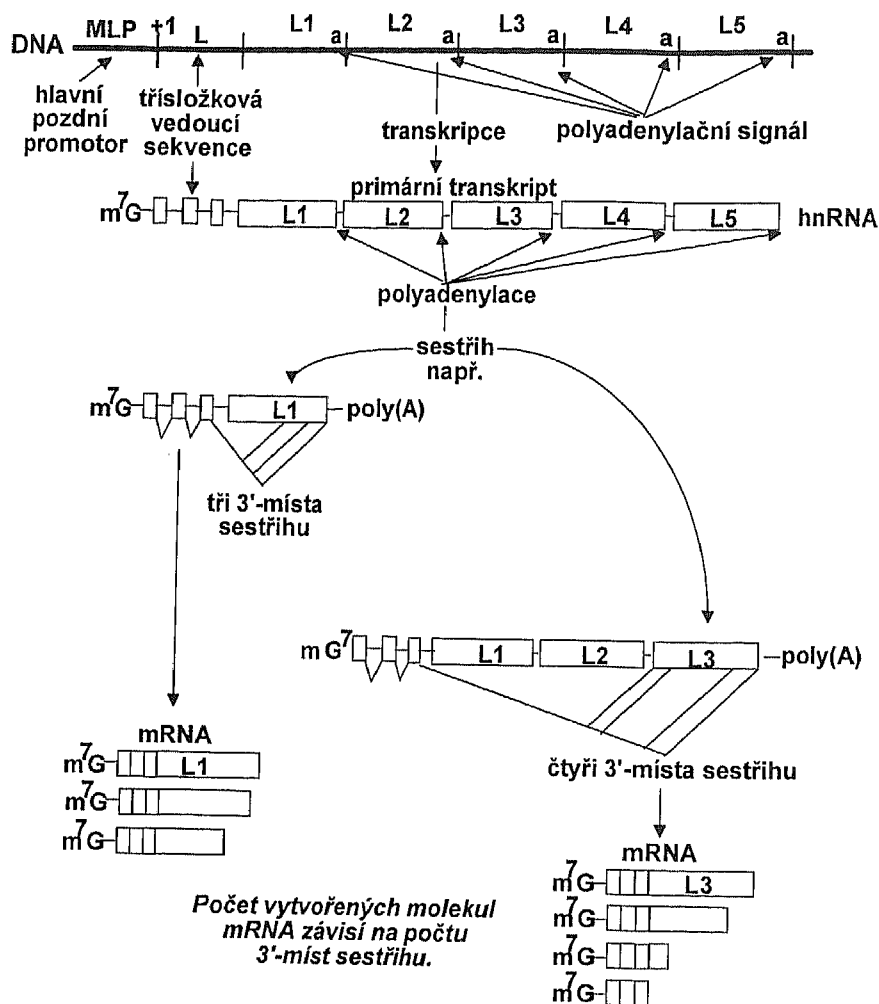
Úsečkami nad DNA-řetězci jsou vyjádřeny molekuly mRNA vznikající sestřihem primárních transkriptů (každému z nich odpovídá transkripční jednotka). Směr transkripce je vyjádřen šipkou na konci každé úsečky. Tenké úsečky představují molekuly mRNA, které vznikly alternativním sestřihem raných primárních transkriptů, kdežto tučné úsečky představují molekuly mRNA vzniklé sestřihem pozdního primárního transkriptu. Promotory transkripčních jednotek jsou vyjádřeny svislými úsečkami. Tečkami za promotory jsou vyjádřeny tři nekódující exony vedoucí sekvence (1, 2, 3), které obsahují některé pozdní mRNA, případně segment (i).

Obr. 412  
Transkripční mapa genomu adenovirů (zjednodušeno)

rového genomu brzy po infekci hostitelské buňky virem, kdežto **pozdní transkripční jednotka** je přepisována později po infekci.

Značnou část r-řetězce pokrývá transkripční jednotka řízená tzv. **MLP-promotorem**, tj. **hlavním pozdním promotorem**. Tato jednotka se začíná přepisovat brzy po infekci hostitelské buňky podle obr. 412 do **primárního transkriptu**, který je **alternativně sestřihován** do molekul mRNA kódujících **stavební proteiny adenovirionu**.

Podle obr. 413 je tato transkripční jednotka rozdělena na pět úseků L1 až L5, z nichž **každý končí polyadenylačním signálem**. Heterogenní jaderná RNA vytvářející se během transkripce této jednotky se jako obvykle štěpí na konci každého úseku za polyadenylačním signálem. **Její transkripce však končí až za polyadenylačním signálem úseku L5**. Segmenty hnRNA uvolněné na polyadenylačních signálech se pak podrobují alternativnímu sestřihu, který je zahájen na přepisu **tříslůžkové vedoucí sekvence** nutné k tomu, aby sestřih probíhal v **určeném pořadí**. Kromě toho mRNA, která má přepis tříslůžkové sekvence, je



*Každá molekula mRNA se překládá do jedné molekuly stavebního proteinu. Mediátorová RNA složená jen ze tříšložkové sekvence (i) se nepřekládá. Úseky L2, L4 a L5 se sestřihují podobně.*

Obr. 413

**Příklad alternativního sestřihu primárního transkriptu transkripční jednotky řízené promotorem MLP adenovíru**

překládána s vysokou účinností. Podobným způsobem jsou upravovány transkripty i jiných transkripčních jednotek.

Molekuly mRNA vzniklé z primárních transkriptů sestřihem se pak rozlišují na **pozdní a rané mRNA** podle toho, zda vznikly sestřihem primárního transkriptu rané nebo pozdní transkripční jednotky. Proteiny, které se vytvořily translací těchto mRNA, se shodně rozdělují na rané a pozdní proteiny.



**EXPRESE GENOMU ADENOVIRŮ.** Není zatím znám receptor, který by umožňoval adsorpci adenovirionů na hostitelské buňky. Ze strany viru se dosahuje specifické interakce s buňkou prostřednictvím jeho kulovité struktury na konci vláknitého proteinu. Proti této části virionu se tvoří protilátky. Po prvních kontaktech s povrchem buňky se stěhuje receptor s navázaným virionem do oblastí cytoplazmatické membrány obsahujících endocytotické vezikuly, kterými je virion zachycen a přenesen do cytoplazmy a odtud po uvolnění kapsidových proteinů do jádra. V jádře pak proběhne transkripce virových genů a replikace virového genomu (DNA). Celý tento proces lze rozdělit do čtyř fází, přičemž regulace a přesný průběh každé fáze jsou nezbytné pro následující fázi. Tyto čtyři fáze jsou:

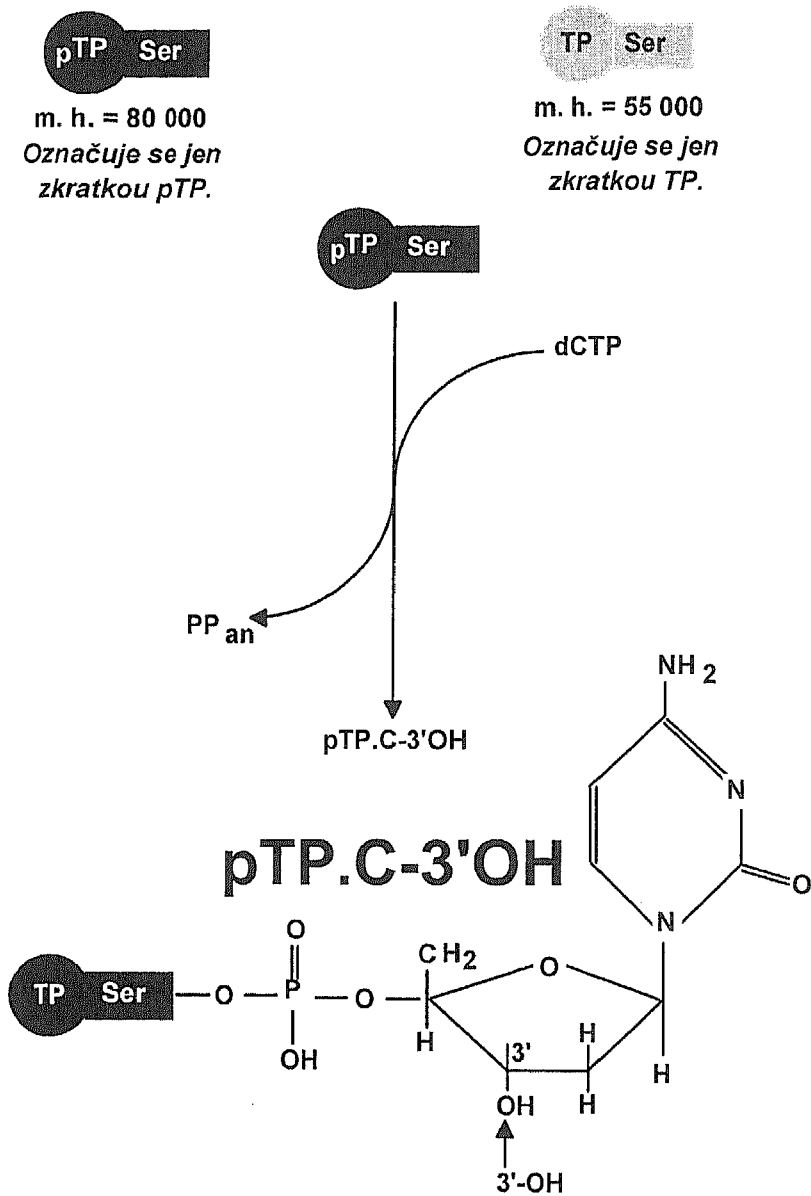
**1. Transkripce raných genů a syntéza raných proteinů.** Hned na začátku zdůrazníme, že *všechny transkripční jednotky pozdní a rané fáze jsou přepisovány RNA-polymerázou II hostitelské buňky*. Jako první jsou touto polymerázou přepisovány geny kódující proteiny **E1A** (obr. 412). Jeden z těchto proteinů působí jako **transaktivátor**, tj. *aktivuje transkripci všech raných transkripčních jednotek*. (Poznámka: co se týče aktivátorů transkripce nalezne čtenář informaci na str. 429 - 432). *Působí jako pozitivní regulátor na expresi transkripčních jednotek rané fáze. Druhý protein E1A působí jako negativní regulátor na expresi transkripční jednotky pozdní fáze*. Promotor transkripční jednotky E1A je konstitutivní, tedy i transkripce transkripční jednotky E1A je konstitutivní.

Transkripční jednotka **E1B** je aktivována k produkci proteinu, který v kooperaci s jedním proteinem aktivní transkripční jednotky **E4** reguluje transport virové RNA z jádra do cytoplazmy. Další transkripční jednotky aktivované transaktivátorem jsou:

- ◆ **E2A** kódující protein vázající se na jeden DNA-řetězec při replikaci virové DNA.
- ◆ **E2B** kódující protein **pTP**, který je jednak prekurzorový pro tvorbu koncevého proteinu kovalentně se vázajícího na 5'-konec DNA-řetězců a jednak působí jako primer při syntéze DNA. Dále *kóduje též DNA-polymerázu*.
- ◆ **E3** kódující několik proteinů, např. protein, který snižuje množství MCI-molekul v povrchu virem infikovaných hostitelských buněk.

**2. Replikace adenovirové DNA.** Z obecného hlediska je tato replikace zajímavá tím, že je *na obou matricových řetězcích kontinuální*. Z toho důvodu *nevzniká ani problém nedoreplikování na 3'-konecích jako u jiných lineárních DNA* (o tom viz str. 342 - 347). Zhruba probíhá podle obr. 414a, b, c:

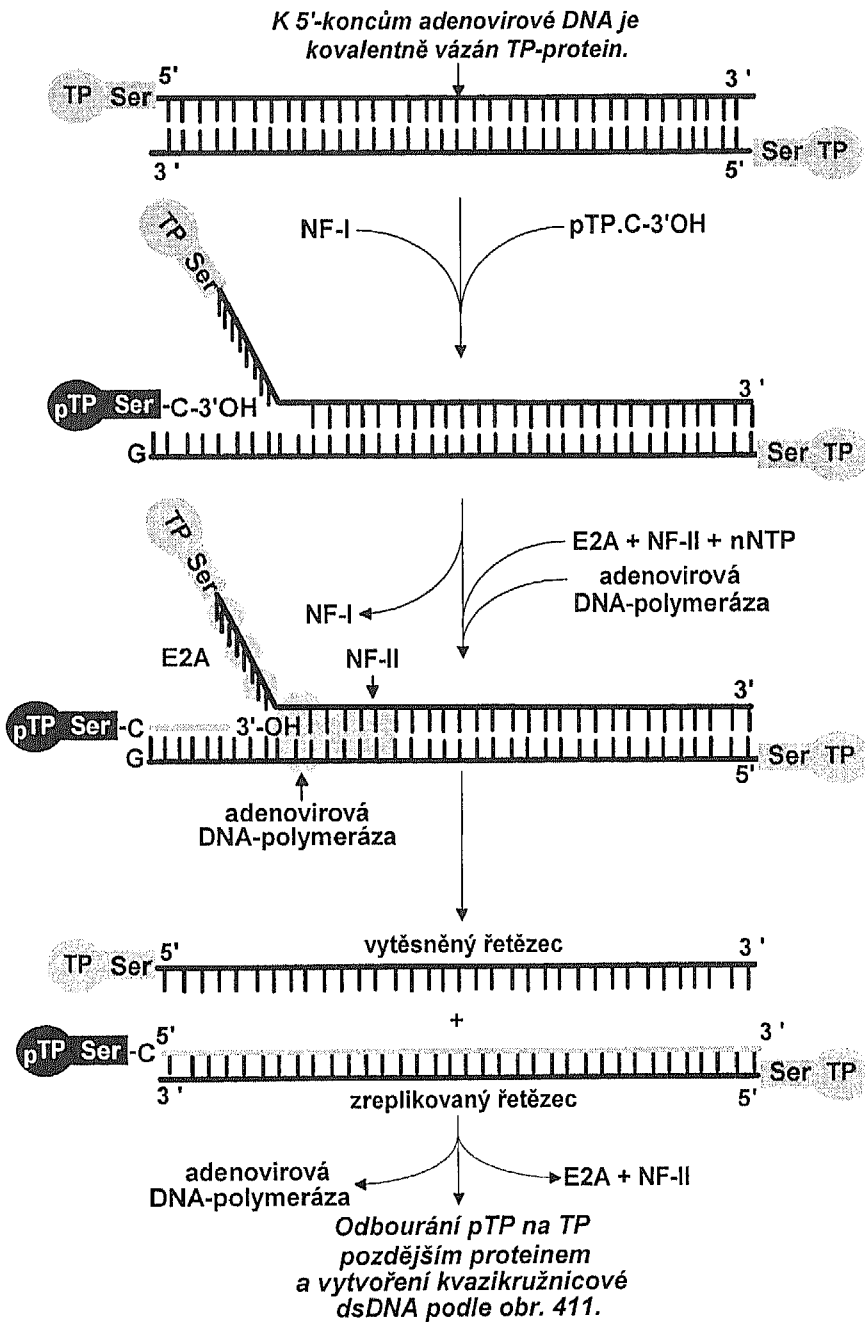
- ◆ **Obr. 414a.** Začíná esterifikací molekuly dCMP  $\beta$ -hydroxylovou skupinou serinového zbytku pTP. Tím se vytvoří **komplex pTP-C-3'OH**, který se vyznačuje silnou afinitou k adenovirové DNA-polymeráze a interaguje se složkami TP, které se kovalentně vážou k 5'-koncům adenovirového genomu. Kro-



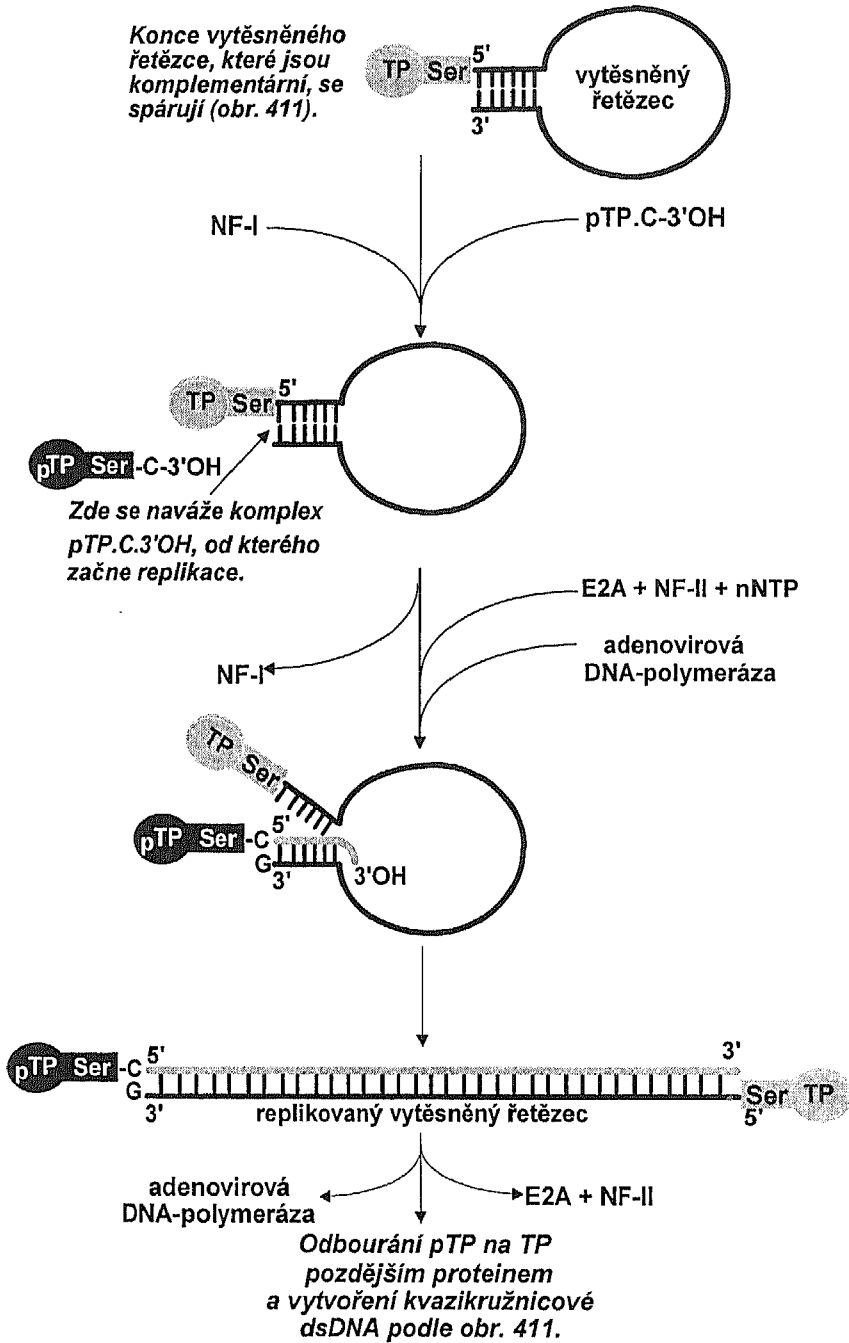
Obr. 414a  
Replikace adenovirové DNA

mě toho působí přes skupinu 3'-OH deoxyribózy molekuly dCMP jako primer pro zahájení syntézy DNA.

- ◆ Obr. 414b. Za účasti jaderných faktorů NF-I, NF-II (tento faktor působí



Obr. 414b  
Replikace adenovirové DNA



Obr. 414c

Replikace adenovirové DNA

jako DNA-topoizomeráza), E2A, pTP-C-3'OH (tímto faktorem je rozeznán TP-protein vázaný na 5'-konec matricového DNA-řetězce) a **adenovirové DNA-polymerázy se replikuje jeden matricový řetězec za vytěšňování druhého.**

◆ **Obr. 414c.** Vytěšňovaný řetězec se replikuje principiálně stejně, jak je popsáno v předchozím odstavci.

**3. Transkripce pozdních genů a syntéza pozdních proteinů.** Jakmile skončí replikace virové DNA, zastaví se transkripce většiny raných genů a aktivuje se pozdní transkripční jednotka, která je řízena promotorem MLP a kóduje kapsidové proteiny.

**4. Morfogeneze.** Tato fáze zahrnuje sestavování virionů z kapsidových proteinů. Přitom též dochází ke štěpení pTP na TP. Hostitelská buňka uvolňuje viriony a odumírá.

### 9.1.3

## Herpesviry (Herpesviridae)

**ROZDĚLENÍ HERPESVIRŮ.** Herpesviry lze na základě jejich patogenity a typu buněk, které infikují, rozdělit do tří podčeledí. V tab. 36 jsou uvedeni jejich nejdůležitější zástupci způsobující infekce u lidí.

**ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÁ VIRY HHV-1 A HHV-2.** Oba druhy virů způsobují recidivující onemocnění nazývané **opar** či **herpes simplex**, které se projevuje *místním zánětem kůže nebo sliznice (případně rohovky) ve formě jednotlivých nebo nakupených malých svědivých nebo palčivých puchýřků, které praskají a zasychají.* Nejčastější forma tohoto onemocnění je **herpes labialis (facialis)** neboli **opar rtu**, který způsobuje HHV-1 a **herpes genitalis**, který se projevuje kožními lézemi na genitáliích a způsobuje je HHV-2.

Oba viry jsou velmi rozšířeny po celém světě a patří k nejčastějším původcům infekčních chorob. Asi 90 % všech dospělých je jimi infikováno. Zvláště charakteristické pro viry HHV-1 a HHV-2 je, že po primární infekci organismu přecházejí do stavu latence, z níž bývají opět reaktivovány k replikaci horečkou, sluněním, menstruací, tělesným nebo duševním stresem atd., což se projeví vzplanutím chorobných příznaků jako při primární infekci, k níž dochází nejčastěji v dětském věku; infekce může probíhat se zjevnými příznaky nebo bez zjevných příznaků.

V průběhu primární infekce se virus HHV množí v místě vstupu (ústní

Tab. 36  
Klasifikace běžných lidských herpesvirů

Podčeleď	Název druhu	Zkrácený název druhu
$\alpha$ -Herpesvirinae ( $\alpha$ -herpesviry)	<b>lidský herpesvirus 1</b> (virus herpes simplex 1)	HHV-1
	<b>lidský herpesvirus 2</b> (virus herpes simplex 2)	HHV-2
	<b>lidský herpesvirus 3</b> (virus varicella-zoster)	HHV-3
$\beta$ -Herpesvirinae ( $\beta$ -herpesviry)	<b>lidský herpesvirus 5</b> (lidský cytomegalovirus)	HHV-5
	<b>lidský herpesvirus 6</b>	HHV-6
	<b>lidský herpesvirus 7</b>	HHV-7
$\gamma$ -Herpesvirinae ( $\gamma$ -herpesviry)	<b>lidský herpesvirus 4</b> (virus Epsteina a Barrové)	HHV-4
	<b>lidský herpesvirus 8</b>	HHV-8

dutina nebo genitál) a vyvolává jen v 5 až 15 % případů tvorbu puchýřků. Inkubační doba je 2 až 12 dnů. V případě, že jde o orální infekci, postupuje virus podél nervů (axonů) ke gangliím trigeminu, replikuje se krátkou dobu v neuronech a zůstává pak v latenci. Po reaktivaci (viz výše) se opět krátkou dobu pomnoží, zničí jen několik buněk a zůstává dále v latenci. Nově vytvořené viriony postupují podél axonů do periferie, kde vedou k recidivě oparu, který však brzy opět zmizí.

Oba viry se vyskytují jen u lidí a jsou po primární infekci i během období latence z organismu vylučovány. Promořenost populace těmito viry je zhruba 90 %. Virus HHV-1 se přenáší většinou orálně (slinami, kapénkami obsahujícími zbytky puchýřků oparu) a virus HHV-2 pohlavním stykem v době pohlavní zralosti. U 50 % všech primárně infikovaných jedinců nedochází však během jejich života k recidivě.

Virus HHV-1 způsobuje kromě herpes labialis tato onemocnění:

- ◆ **Stomatitis aphtosa (gingivostomatitis herpetica).** Vyznačuje se při primární infekci vysokou horečkou, bolestmi a tvorbou puchýřků v celé ústní dutině. U kojenců a malých dětí dochází k exsikóze (vysychání, ztráta vody z organismu).
- ◆ **Eczema herpeticum.** Těžká generalizovaná infekce vyznačující se tvorbou strupů na kůži a vysokou horečkou.
- ◆ **Keratoconjunctivitis herpetica.** Její výskyt je častý spíše u dospělých

než u dětí. Je to infekce rohovky a spojivek vedoucí většinou k poškození epitelu rohovky.

◆ **Encephalitis herpetica.** Ve Střední Evropě představuje asi 50 % encefalitid.

**ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ VIREM HHV-3.** Tento virus způsobuje **plané neštovice (varicella)** postihující zejména děti. Přenáší se přímým stykem. Inkubační doba je 2 až 3 týdny. Projevuje se chřipkovými příznaky a výsevem vyrážek měnicích se později na praskající a zasychající puchýřky. U dospělých způsobuje HHV3 akutní infekci postihující senzoričká ganglia, což se projevuje jako **herpes zoster** neboli **pásový opar**. Většinou však pacienti, kteří trpí pásovým oparem, již prožili primární infekci virem HHV-3, který pak v nich přetrvává ve stavu latence, z níž je občas reaktivován v některém senzoričkém gangliu, což se projevuje neuralgií a výsevem oparu v oblasti kůže z infikovaného ganglia inervované. Jde tedy o reaktivaci latentně perzistujícího viru v některém senzoričkém gangliu.

**ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ VIREM HHV-4.** Tento virus způsobuje **infekční mononukleózu**, která postihuje především mladší osoby a přenáší se přímým kontaktem. Jelikož virus se vylučuje do slin, přenáší se i líbáním. Inkubační doba je průměrně okolo 2 týdnů a může být i kratší nebo delší. Nejčastěji se projevuje horečkou, zduřením mízních uzlin, angínou a někdy mohou být postižena i játra. V krvi se nacházejí atypické lymfocyty. Nemoc probíhá většinou benigně. Není-li léčena, může mít vleklý průběh.

V tropických oblastech (Afrika, Latinská Amerika, Nová Guinea) způsobuje HHV-4 **Burkittův lymfom**, což je druh maligního lymfomu vyskytujícího se obvykle u dětí.

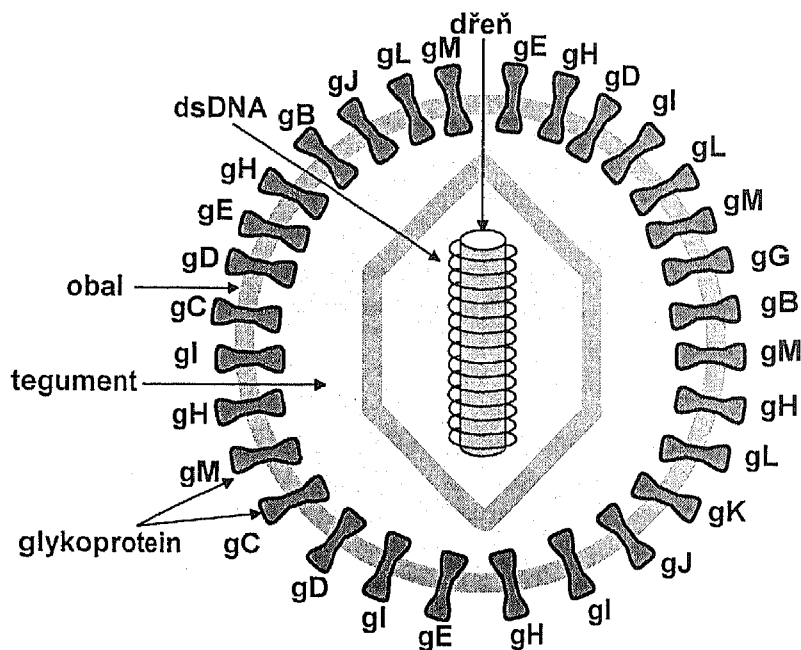
**INFEKCE ZPŮSOBENÁ VIREM HHV-5.** Infekce tímto virem probíhá většinou bez příznaků. Způsobuje však vážné komplikace u nemocných AIDS.

**ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ VIREM HHV-6.** Většinou bývá u malých dětí jako onemocnění nazývané **exanthema subitum** vyznačující se teplotami a vyrážkou. Má lehký průběh. Infikuje též nervové buňky v mozku.

**ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ VIREM HHV-7 A HHV-8.** Úloha HHV-8 v infekčních onemocněních není zatím objasněna. Zdá se, že je v kauzálním vztahu k vývoji Kaposiho sarkomu, což je kožní onemocnění nádorového cha-

rakteru s poměrně benigním průběhem, daleko však zhoubnějším u nemocných AIDS. Problematice Kaposiho sarkomu se věnujeme na str. 874. Infekce virem HHV-7 začíná ve stáří 6 měsíců a převažuje do tří let. U 75% dospělých jedinců je virus též vylučován slinami. Jeho význam v infekčním onemocnění není zatím objasněn. Antigenně je příbuzný s virem HHV-6.

**STRUKTURA VIRIONU HERPESVIRŮ.** Herpesviriony měří v průměru 150 až 200 nm a sestávají z více než 30 stavebních proteinů. Uvnitř virionu je vláknitá dřeň v komplexu s lineární dsDNA (obr. 415). V elektronovém mikroskopu se jeví dřeň jako cívka omotaná vláknem, které odpovídá dvouřetězcové DNA. Dřeň je uzavřena ikozaedrickým kapsidem o průměru 100 nm. Kapsid sestává ze 160 kapsomer, které jsou typu hexonů a pentonů. Prostor mezi kapsidem a obalem viru je vyplněn 20 nestavebními proteiny, které při infekci vnikají současně s DNA viru do buňky. Tento *soubor proteinů vyplňujících prostor mezi obalem virionu a kapsidem* se označuje jako **tegument**. Proteiny tegumentu se svými funkcemi uplatňují v rané fázi infekce buňky virem. Herpesviry jsou opatřeny obalem (obalené viry), v němž je 11 různých glykoproteinů



Obr. 415  
Schéma struktury viru herpes simplex



nů a dva až čtyři neglykosylované polypeptidy, které plní důležité funkce při adsorpci na receptory hostitelské buňky.

**STRUKTURA GENOMU VIRU HHV-1.** Genom herpesvirů je lineární dsDNA. U všech podčeledí, z nichž jsme na předchozích stránkách vybrali typické zástupce, sestává z jedinečných a repetitivních sekvencí, jejichž počtem a uspořádáním se tyto druhy navzájem liší. Popíšeme tento genom jen u druhu HHV-1. Sestává ze dvou složek (obr. 416):

- ◆ **Složka L**, která je tvořena jedinečnou sekvencí  $U_L$  ohraničenou koncovou repeticí  $TR_L$  a obrácenou repeticí  $IR_L$ .
- ◆ **Složka S**, která je tvořena jedinečnou sekvencí  $U_S$  ohraničenou koncovou repeticí  $TR_S$  a obrácenou repeticí  $IR_S$ .

$TR_L$  sestává z několikanásobně se opakujících úseků **a** a z úseku **b**.

$IR_L$  sestává z úseku **b'**, který je obrácenou repeticí vzhledem k **b**, a dále z opakujících se úseků **a'** (lišících se počtem vzhledem k **a** v  $TR_L$ ), které jsou ve vztahu k **a** obrácenými repeticemi.

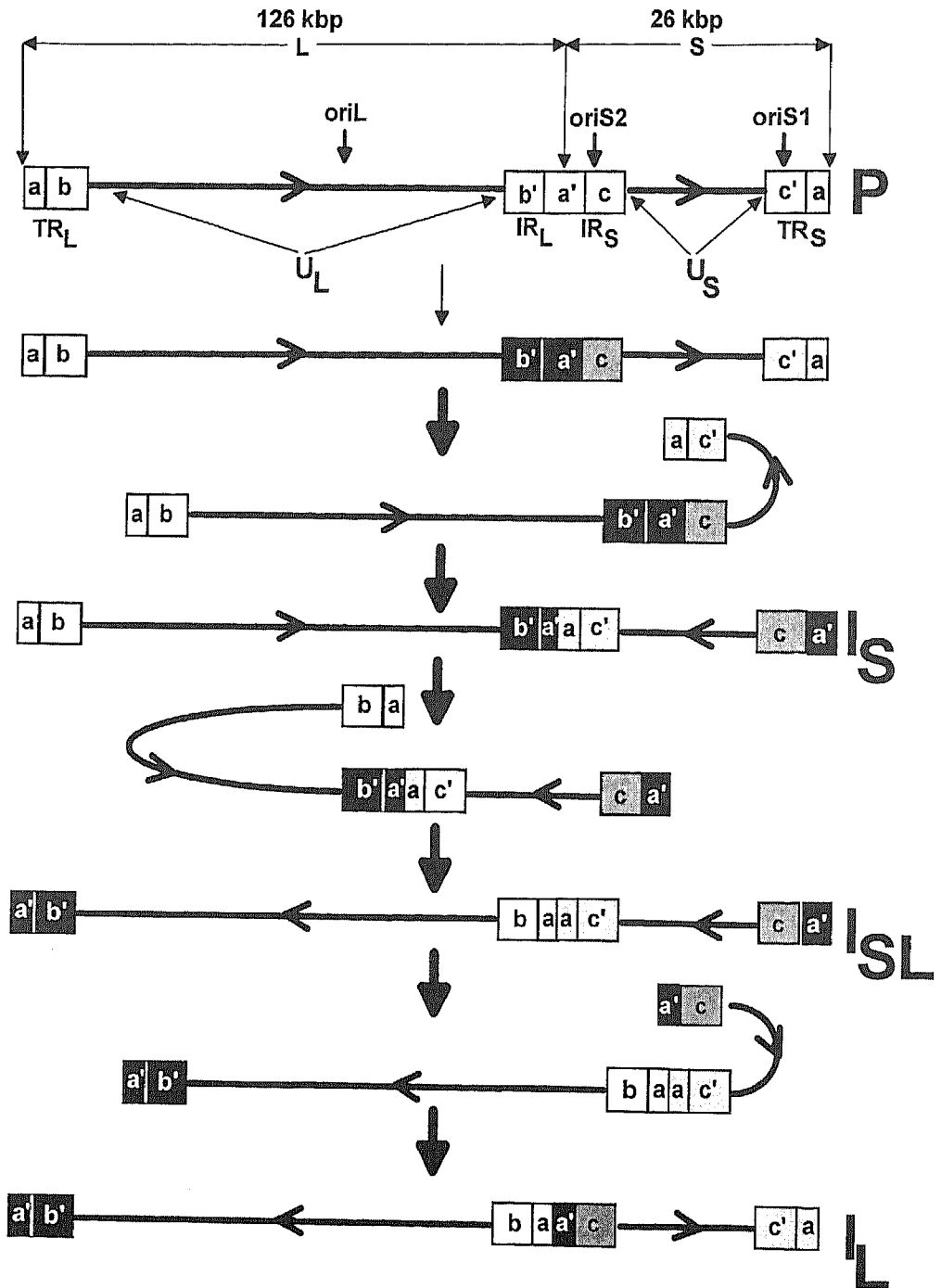
Úseky **c'** a v  $TR_S$  jsou komplementární k **a'** c v  $IR_S$ .

**Poznámka:** Víme, že obrácené repetice na stejném polynukleotidovém řetězci se vyznačují komplementaritou (str. 102), což je ve schématu na obr. 416 vyjádřeno apostrofem u stejného písmene, tedy např. sekvence **a** a **a'** jsou navzájem komplementární.

**REPLIKACE GENOMU HHV-1.** Při replikaci genomu herpesvirů HHV-1 se v hostitelské buňce vytvoří v ekvivalentním množství čtyři **izomery DNA** (25 % připadá na každý izomer), které se navzájem liší vzájemnou orientací složek  $U_L$  a  $U_S$ . Jsou to (obr. 416):

- izomer P
- izomer  $I_S$
- izomer  $I_L$
- izomer  $I_{SL}$ .

*Tyto izomery se vyskytují jako genomy ve virionech; všechny jsou infekční a neliší se navzájem obsahem genetické informace.* Replikace se uskutečňuje v hostitelské buňce po cirkularizaci virového genomu mechanismem otáčející se kružnice (str. 180, 182, 183). Dceřiný DNA-řetězec z kružnice vytlačovaný se po každém replikačním cyklu prodlouží o délku odpovídající jedné molekule dsDNA (jednomu genomu), takže se podobně jako u fága  $\lambda$  vytvoří konkatemer (str. 621, obr. 389), který se při sestavování virionů štěpí na segmenty odpovídající genomu virionů. Přitom vznikají uvedené čtyři izomery DNA, a to intra-



Obr. 416

Vznik čtyř izomerů DNA u herpesvirů

molekulární rekombinací vždy koncového segmentu (genomu) na obrácených repetičích konkatemeru, jak je znázorněno na obr. 416. Jestliže např. první izomer budeme považovat za tzv. prototypový **P**, pak vzhledem k tomuto izomeru je:

- ◆ **izomer  $I_S$**  výsledkem rekombinace vedoucí k inverzi složky  $U_S$ , což se děje rekombinací na izomeru **P**;
- ◆ **izomer  $I_L$**  je výsledkem rekombinace vedoucí k inverzi složky  $U_L$ , což se děje rekombinací na izomeru  $I_{SI}$ ;
- ◆ **izomer  $I_{SI}$**  je výsledkem rekombinace vedoucí k inverzi složky  $U_L$  i  $U_S$ , což se děje rekombinací na izomeru  $I_S$ .

V genomu viru HHV-1 byla identifikována tři místa **ori**, na nichž začíná replikace genomu během lytického cyklu. Místo **oriL** se nachází ve středu oblasti  $U_L$  a další dvě místa **oriS1** a **oriS2** jsou v *c*-sekvenci  $IR_S$  a  $TR_S$ . Pro přesný průběh replikace *musí být přítomno alespoň jedno místo oriS*. Bezpodmínečně není nutný **oriL**.

Kromě výlučně buněčných proteinů je replikace genomu viru HHV-1 zajišťována těmito proteiny, které jsou kódovány virovým genomem:

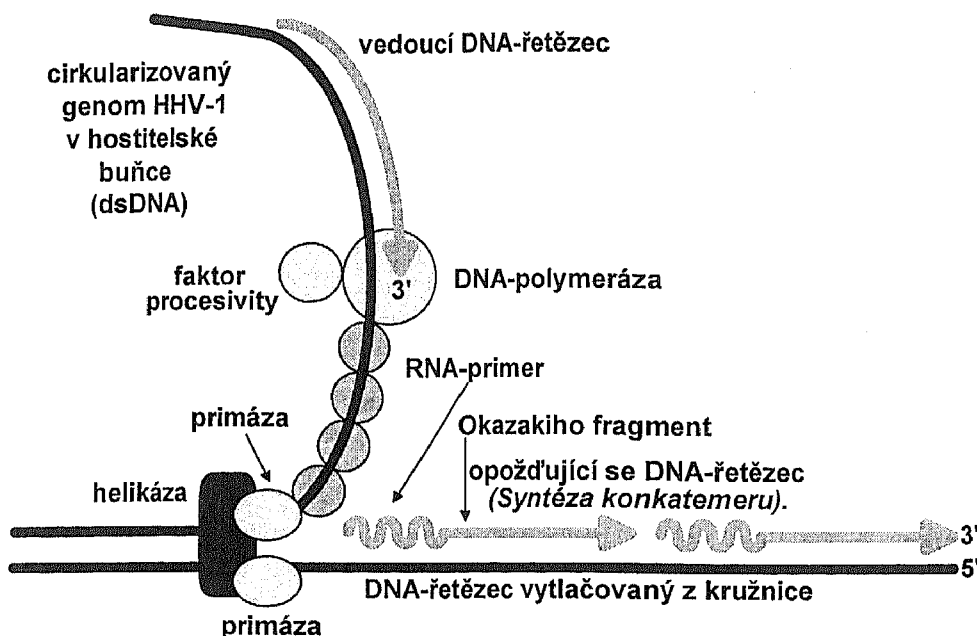
- ◆ **DNA-polymeráza** vyznačující se polymerázovou aktivitou  $5' \rightarrow 3'$  a exonukleázovou  $3' \rightarrow 5'$ .
- ◆ **Faktor procesivity**, který se v komplexu s DNA-polymerázou váže na dvouřetězcovou DNA. Působí pravděpodobně jako posuvná svorka (str. 166).
- ◆ **Komplex DNA-helikázy a DNA-primázy** sestávající ze tří proteinů.

Na obr. 417 je znázorněno schéma uplatnění těchto proteinů v replikaci genomu HHV-1 mechanismem otáčivé kružnice. Pochopení tohoto mechanismu vyžaduje znalosti uvedené o replikaci na str. 161 - 184, 335 - 343.

**EXPRESSE GENOMU VIRU HHV-1 PŘI LYTICKÉ INFEKCI.** Tato exprese je globálně vyjádřena schématem na obr. 418. Virion herpesviru se váže gC-proteinem k receptoru v povrchu hostitelské buňky. Obal virionu a membrána buňky pak splynou a kapsid s tegumentem vniknou do cytoplazmy. Na příjmu herpesviru do cytoplazmy se též podílejí glykoproteiny gB, gD a gH. Každý z těchto proteinů indukuje tvorbu protilátek, které brzdí infekci virem na úrovni jeho penetrace do buňky. Genom přechází do jádra, kde se pak replikuje.

Expresse genomu herpesvirů je poměrně málo závislá na enzymech hostitelské buňky, jelikož řada enzymů katalyzujících syntézu DNA herpesvirů a nukleotidů je kódována jejich genomem. Jeho transkripce, která je *katalyzována RNA-polymerázou II hostitelské buňky*, se tvoří tři kategorie molekul mRNA:

- ◆  **$\alpha$ -mRNA** neboli **rané mRNA**, které se překládají do **raných proteinů**;



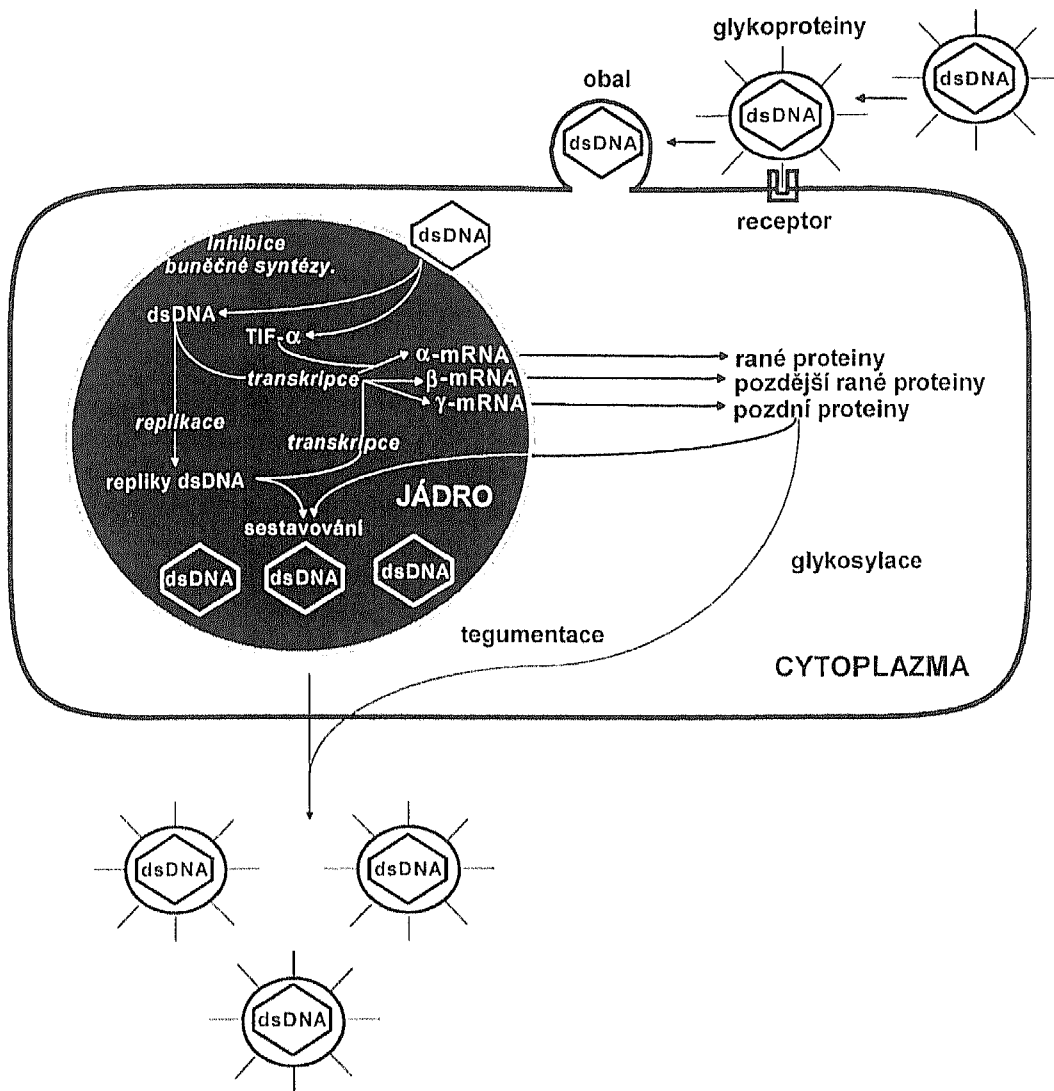
Obr. 417

Proteiny kódované genomem HHV-1, které působí při jeho replikaci uskutečňované mechanismem otáčivé kružnice

- ◆  $\beta$ -mRNA neboli **pozdější rané mRNA**, které se překládají do **pozdějších raných proteinů** (nestavební proteiny a některé stavební);
- ◆  $\gamma$ -mRNA neboli **pozdní mRNA**, které se překládají do **pozdních proteinů** (stavební proteiny).

Viriony herpesvirů obsahují v tegumentu protein  $\alpha$ -TIF (iniciační transkripční faktor), který působí jako *transaktivátor a zesiluje expresi  $\alpha$ -genů přepísovaných do  $\alpha$ -mRNA*. To se děje ihned po infekci buněk. Samotný  $\alpha$ -TIF se však na promotor neváže. Spojí se nejdříve s faktorem C1 do **komplexu  $\alpha$ -TIF/C1**, který se pak váže na na transkripční faktor OCT-1. Tento výsledný komplex pak prostřednictvím transkripčního faktoru OCT-1 rozeznává sekvenci promotoru  $\alpha$ -genů popsanou na str. 355. Tím se umožní interakce  $\alpha$ -TIF s transkripčním faktorem TFIID, který se takto aktivuje, což je nezbytný krok k zahájení transkripce (str. 351 - 360).

Po nahromadění produktů transkripce  $\alpha$ -genů se působení  $\alpha$ -TIF zastaví. Jinými slovy transkripce  $\alpha$ -genů podléhá negativní regulaci. Replikace, která je pozitivně regulována produkty  $\alpha$ -genů, začíná až po expresi  $\beta$ -genů. Stavební proteiny se tvoří překladem mRNA vzniklé přepisem  $\gamma$ -genů. Jejich exprese je pozitivně regulována produkty  $\beta$ -genů a při vyšší koncentraci negativně ovliv-



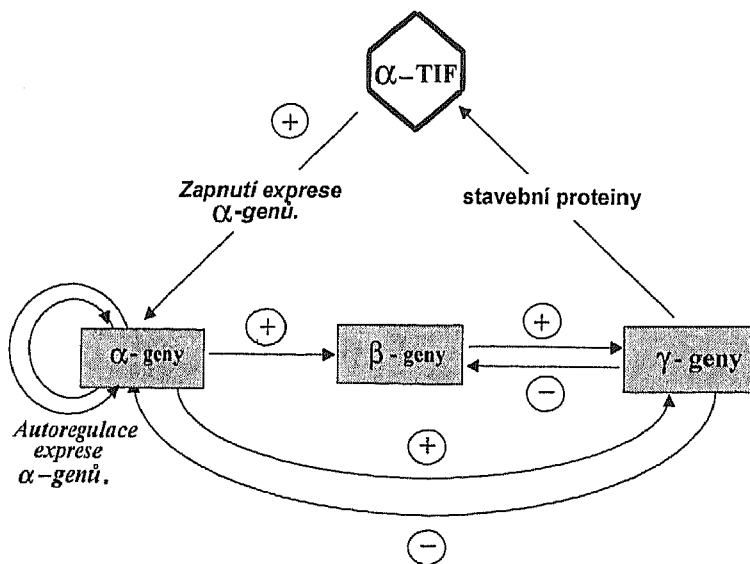
Obr. 418

### Globální schéma genové exprese viru HHV-1 při lytické infekci buňky

ňují expresi jak  $\beta$ - tak i  $\alpha$ -genů. Genová exprese viru HHV-1 je tedy koordinovaně regulována (obr. 419).

### EXPRESSE GENOMU VIRU HHV-1 V OBDOBÍ JEHO LATENCE.

Během latence se repliky DNA viru HHV-1 nacházejí v jádře hostitelské buňky ve stavu extrachromozomálního epizomu. Současně se s genomem hostitelské buňky replikují za katalytické účasti její DNA-polymerázy a přecházejí do dce-



Obr. 419  
Regulace exprese genomu HHV-1

řiných buněk. Produkce infekčních virionů v této fázi je potlačena. Zatím však není známo, jaká je molekulární podstata latence a reaktivace z latence do lytického cyklu.

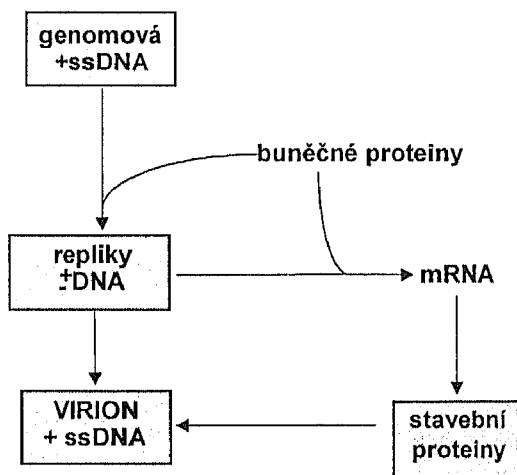
Virus HHV-1 je latentní v neuronech spinálních ganglií. Během primární infekce se virus šíří podél nervových vláken až do ganglií. *Pravděpodobně rané geny ( $\alpha$ -geny) se nemohou v neuronech trvale exprimovat*, jelikož tyto buňky tvoří přidatně k transaktivátorům OCT-1 a OCT-2 specifický protein translací mRNA, která vzniká alternativním sestřihem. Tento protein se totiž také váže na promotory raných genů a zastavuje pravděpodobně transkripci  $\alpha$ -genů.

## 9.2 ŽIVOČIŠNÉ VIRY S JEDNOŘETĚZCOVOU DNA (ssDNA-ŽIVOČIŠNÉ VIRY)

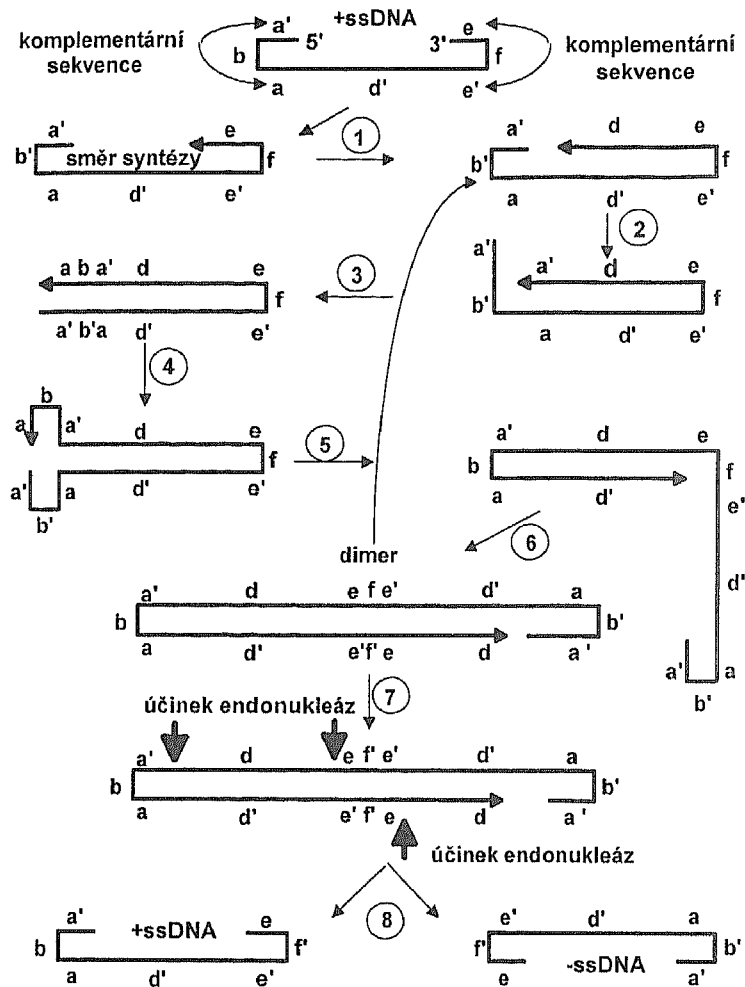
### 9.2.1 Parvoviry (Parvoviridae)

**ONEMOCNĚNÍ U ČLOVĚKA.** Tuto kapitolu zařazujeme do této učebnice hlavně z toho důvodu, aby čtenář získal představu o jednom z možných mechanismů replikace jednořetězcových DNA. Genom těchto virů sestává z *jedné molekuly pozitivní ssDNA*. Patří sem čeleď **Parvoviridae (parvoviry)**. Svými rozměry patří mezi nejmenší viry. V hostitelských buňkách se množí buď autonomě (viry rodu **Parvovirus** a **Erythrovirus**), nebo v závislosti na pomocných virech (mohou to být adenoviry nebo herpesviry). Tyto parvoviry patří do rodu **Dependovirus**. Do rodu *Parvovirus* se řadí např. druh, který způsobuje u koček panleukopenii a **Parvovirus B19** způsobující u člověka tzv. pátou nemoc, což znamená pátá nemoc v pořadí exantémových (tj. projevujících se vyrážkami) infekcí. **Pátá nemoc** neboli **erythema infectiosum** je nápadná splývajícími vyrážkami postihujícími hlavně děti.

**EXPRESE GENOMU PARVOVIRŮ V HOSTITELSKÉ BUŇCE.** Exprese



Obr. 420  
Základní strategie replikace a exprese genomu  
ssDNA-virů



*Dvě stejná písmena rozlišená apostrofem vyjadřují komplementární sekvence.*

**Obr. 421**  
Schéma replikace ssDNA parvoviru

virů této skupiny probíhá v podstatě podle strategie uvedené na obr. 420. Jejich DNA se replikuje v jádře na negativní DNA-řetězec, který slouží jako matrice pro syntézu pozitivního DNA-řetězce (obr. 421). Negativní řetězec se přepisuje do mRNA, která se překládá do stavebních proteinů.

Genom parvoviru B19 a jiných autonomních (nezávislých na pomocných viřech) parvovirů je tvořen ssDNA, která má na obou koncích komplementární sekvence, jež umožňují tvorbu vlásenek (obr. 421). Obsahuje dva otevřené čtečí



ránce, jejichž primární transkripty se sestřihují do molekul mRNA, které se překládají do kapsidových proteinů, helicázy, endonukleázy a transaktivátoru.

Biologický význam vlásenek spočívá v tom, že poskytují 3'-konec, od něhož začíná replikace souvislého řetězce (kontinuální syntéza až do konce), která je katalyzována DNA-polymerázou hostitelské buňky (obr. 421). Když dostoupí syntetizující se řetězec (1) k 5'-vlásence, vytváří struktury (2, 3), které umožní tvorbu vlásenek (4). Po další replikaci (5) se vytvoří repliky (6) ve formě **dvouřetězcového dimeru** s volnými konci **d** a **a'**. Dimer se pak štěpí (7) specifickými endonukleázami, které jsou kódovány parvovirem a rozpoznávány v místech naznačených na obr. 421 šipkou. Výsledným produktem je pozitivní a negativní ssDNA. Do virionů se začleňuje jen DNA-řetězec odpovídající genomu parvoviru.

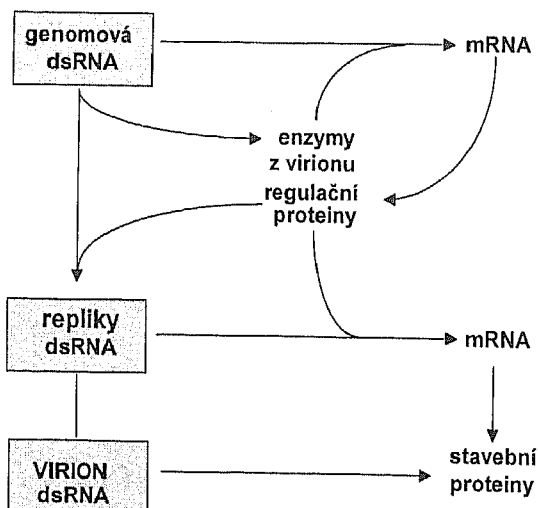
Opakováním kroků 2, 3, 4, 5 a 6 se z dimeru vytvoří **tetramer** a dále až **multimer**. Oba se pak štěpí endonukleázami na příslušný počet výsledných pozitivních a negativních molekul DNA.

## 9.3 ŽIVOČIŠNÉ VIRY S DVOUŘETĚZCOVOU RNA (dsRNA-ŽIVOČIŠNÉ VIRY)

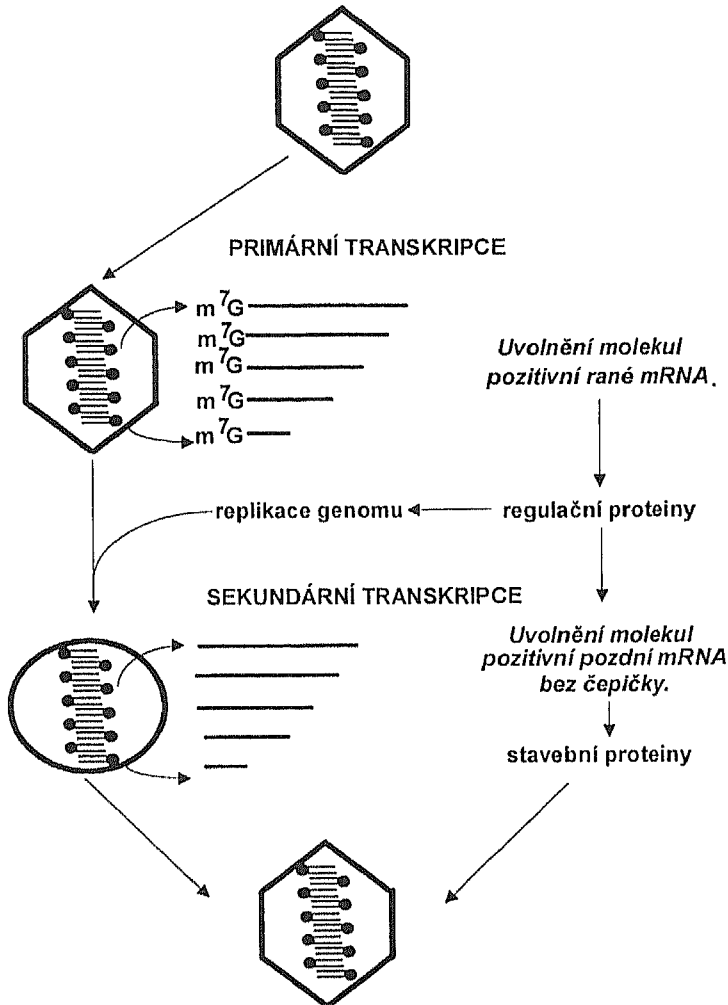
### 9.3.1 Reoviry (Reoviridae)

**GENOM REOVIŘŮ.** Viry, u nichž genom sestává z dvouřetězcové segmentované RNA, patří do čeledi Reoviridae (reoviry). Většina reovirů infikuje respirační a gastrointestinální ústrojí. Ve většině případů probíhá tato infekce asymptomaticky. U dětí mohou způsobovat **gastroenteritidu** a **průjmová onemocnění**. Genom dsRNA-virů je tvořen segmentovanou dsRNA. Každý segment jejich RNA se replikuje zvlášť do monogenní +RNA. *Viriony musí však obsahovat hotovou RNA-dependentní-RNA-polymerázu (RNA-replikáza),* neboť jejich hostitelské buňky ji nemají.

**REPLIKACE A EXPRESE GENOMU REOVIŘŮ.** Základní strategie replikace a exprese genomu reovirů je uvedena na obr. 422, podle něhož se nejdříve RNA genomových segmentů replikuje za účasti RNA-replikázy na +RNA působící jako mRNA, která se překládá do regulačních proteinů. Ty pak



Obr. 422  
Základní strategie replikace a exprese genomu  
dsRNA-virů



Obr. 423  
Expres segmentovaného genomu reoviru

katalyzují syntézu mRNA, která se překládá do stavebních proteinů.

Transkripce probíhá v těchto dvou fázích (obr. 423):

**1. Primární transkripce.** Výsledkem této transkripce je sedm transkriptů opatřených čepičkou, ale nepolyadenylovaných. Každý genomový segment se přepisuje zvlášť. Jako matrice k transkripci se využívá negativní genomový RNA-řetězec, takže výsledný transkript ve funkci mRNA je pozitivní. Modifikace 5'-konce probíhá uvnitř dřeně virionu.

**2. Sekundární transkripce.** Uskutečňuje se již v nových částicích (pre-

kurzorech virionů) vytvořených v infikované buňce. Výsledkem této transkripce jsou na 5'- a 3'-koncích nemodifikované transkripty.

Genomové segmenty se replikují za převahy pozitivních RNA-řetězců, jelikož část těchto řetězců působí jako pozdní mRNA k translaci do stavebních proteinů a další část je matricí pro syntézu negativních řetězců.

Převaha pozitivních RNA-řetězců vzniká tím, že stejný negativní RNA-řetězec působí jako matrice pro tvorbu více dceřiných pozitivních RNA-řetězců.

## 9.4 ŽIVOČIŠNÉ VIRY S POZITIVNÍ ssRNA (+ssRNA-ŽIVOČIŠNÉ VIRY)

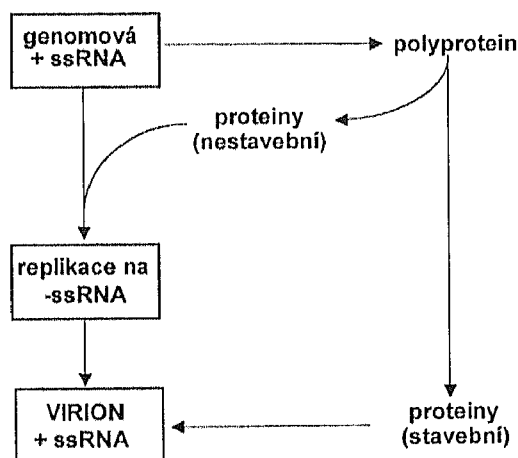
### 9.4.1

#### Pikornaviry a togaviry (Picornaviridae a Togaviridae)

Genom těchto virů je tvořen molekulou pozitivní RNA. Lze je rozdělit do těchto čeledí:

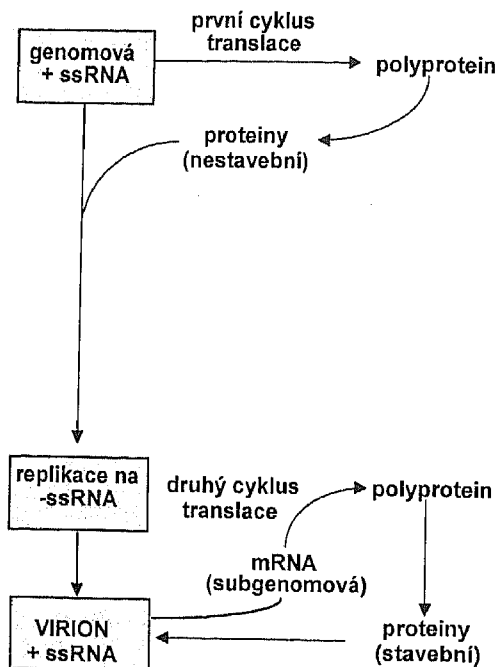
**1. Picornaviridae (pikornaviry).** Patří sem např. virus poliomyelitidy, hepatitidy A, virus rinitidy, slintavky a kulhavky. Jejich genom (pozitivní RNA) obsahující jeden velký gen se po infekci hostitelské buňky přepisuje do mRNA překládané do velkého polyproteinu, který se teprve štěpí do funkčních proteinů (obr. 424). Tyto proteiny jsou jednak stavební, jednak nestavební. Nestavební proteiny katalyzují replikaci pozitivní RNA na negativní a tuto opět na pozitivní.

**2. Togaviridae (togaviry).** Do této čeledi např. patří virus klíšťové encefalitidy, horečky dengue, virus zarděnek aj. K tomu, aby se vytvořila genomová pozitivní RNA jsou u těchto virů nutné dva cykly translace. V prvním cyklu translace ještě před replikací se z genomové RNA, která je pozitivní, tvoří po-



Obr. 424

Základní strategie replikace a exprese genomu pikornavirů



Obr. 425

### Základní strategie replikace a exprese genomu togavirů

lyprotein z genu rané fáze exprese. Tento polyprotein se pak štěpí na nestavební proteiny zahrnující **RNA-replikázu**, která katalyzuje replikaci genomové RNA. Nové kopie RNA, které touto replikací vzniknou, jsou jednak základem genomu virového potomstva a jednak působí jako mRNA překládané do polyproteinu, který se štěpí na stavební proteiny. *Mediátorová RNA, která se překládá do tohoto polyproteinu*, se označuje jako **subgenomová** (obr. 425).

## 9.5 ŽIVOČIŠNÉ VIRY S NEGATIVNÍ ssRNA (-ssRNA-ŽIVOČIŠNÉ VIRY)

Obecným znakem těchto virů je, že jejich genom tvoří lineární negativní RNA a jejich viriony jsou obalené. Podle typu genomu se dělí do tří skupin:

**1. Viry s negativní segmentovanou RNA.** Do této skupiny patří **Orthomyxoviridae (ortomyxoviry)**.

**2. Viry s negativní segmentovanou dvojsmyslnou RNA.** Takovým genomem se vyznačují **Bunyaviridae (bunyaviry)** a **Arenaviridae (arenaviry)**.

**3. Viry s negativní nesegmentovanou RNA.** Tento genom je charakteristický pro **Paramyxoviridae (paramyxoviry)**, **Rhabdoviridae (rabdoviry)** a **Filoviridae (filoviry)**.

Všechny uvedené skupiny se obecně vyznačují přítomností **RNA-dependentní-RNA-polymerázy** neboli **RNA-replikázy** v nukleokapsidech jejich virionů, která *katalyzuje syntézu pozitivního řetězce RNA na matricové negativní RNA*. Přítomnost RNA-dependentní-RNA-polymerázy v nukleokapsidu je pro tyto viry životně důležitá, *neboť jejich hostitelské buňky nemají tento enzym*.

Jako reprezentanti první skupiny budou podrobněji popsány viry chřipky, jako reprezentanti skupiny druhé byly vybrány arenaviry a ze třetí skupiny rabdoviry.

### 9.5.1 Ortomyxoviry (viry chřipky)

Viry způsobující chřipku u člověka patří do dvou rodů čeledi Orthomyxoviridae. Jsou to rody:

◆ **Influenzavirus A, B**, kam patří **virus influenzy A** neboli **virus chřipky A**, který způsobuje chřipku u člověka a onemocnění dýchacích cest koní, ptáků a prasat, kdežto **virus influenzy B** neboli **virus chřipky B** způsobuje chřipku jen u člověka.

◆ **Influenzavirus C**, kam patří **virus influenzy C** neboli **virus chřipky C**. Způsobuje chřipku u člověka, většinou u dětí.

Další rozdíly mezi oběma rody a jejich druhy se postupně uvádějí níže.

**ONEMOCNĚNÍ CHŘIPKOU.** Je to onemocnění dýchacího ústrojí, jehož průběh se mění a může začít asymptomatickou infekcí a končit pneumonií s le-

tálním koncem. Typická pro chřipku je **tracheobronchitida** (zánět průdušnice a průdušek). Inkubační doba je 1 až 5 dní. Prvními příznaky chřipky jsou bolesti hlavy, třesavka, zimnice, vysoká horečka, bolesti svalů a nevolnost. Po dvou až třech dnech dochází zpravidla k poklesu horečky. Kašel a pocity slabosti trvají 1 až 2 týdny. U dětí se průběh chřipky vyznačuje především vysokou horečkou doprovázenou křečemi a častými výskyty gastrointestinálních potíží. Často též dochází k **otitis media** (zánět středního ucha). Nejčastější komplikací je **chřipková pneumonie**, která se vyskytuje jak u dětí, tak i u dospělých osob. Jedná se o **primární atypickou pneumonii**, která začíná krátce po nástupu prvních příznaků chřipky, které během 6 až 24 hodin sílí až k dosažení rozvinutého stavu chřipky charakteristického zrychleným dýcháním, **tachykardií** (zrychlená srdeční činnost, vysoká horečka a hypotonie). Tento stav nemocného může během 1 až 4 dnů končit smrtí. Při neletálním průběhu onemocnění se stav nemocného postupně v průběhu 5 až 16 dní zlepšuje.

Viry chřipky se přenášejí vzdušnou cestou (kapénková infekce). Nakažlivost, zejména virem chřipky A, je vysoká.

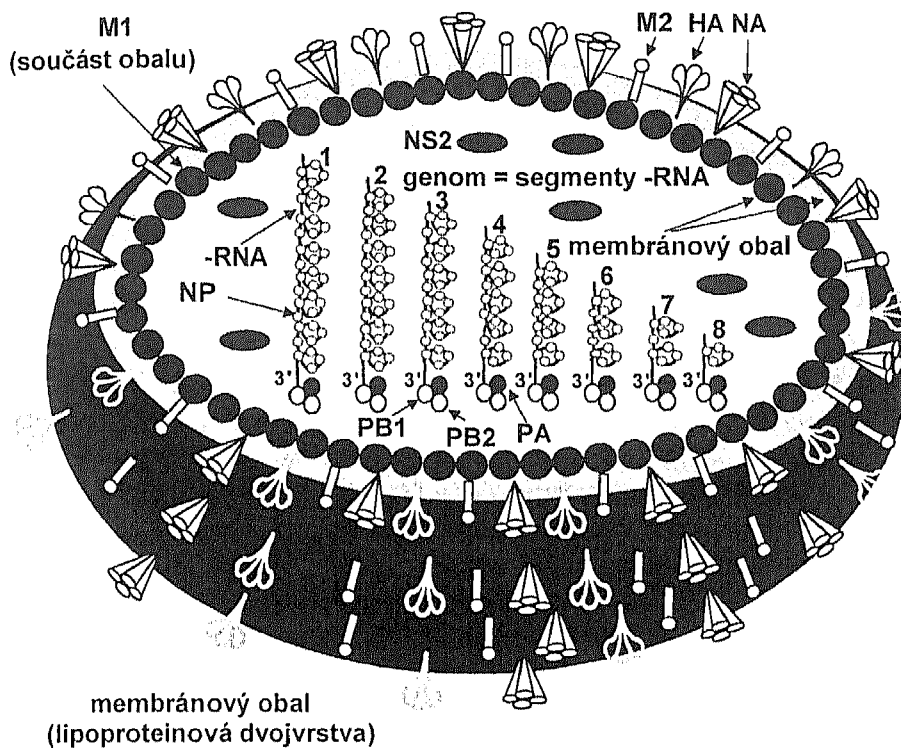
**STRUKTURA VIRIONU VIRŮ CHŘIPKY.** Viry influenzy (chřipky) jako všechny ortomyxoviry patří mezi **viry obalené**, tj. jejich nukleokapsid je obalen lipoproteinovou dvojvrstvou (membránový obal) pocházející z cytoplazmatické membrány hostitelských buněk. Na vnitřní stranu této dvojvrstvy se vážou molekuly **matricového proteinu (protein M1)**. Do virového obalu jsou zanořeny **protein M2, hemagglutinin (HA) a neuraminidáza (NA)**. V nukleokapsidu se též nacházejí v malém množství molekuly **proteinu NS2**. Viriony jsou kulovitého tvaru o průměrné velikosti 120 nm (obr. 426).

Membránovým obalem je obklopen genom viru tvořený negativní RNA, která je u virů chřipky A a B rozdělena do 8 segmentů a u viru chřipky C do sedmi. 3'- a 5'-konce jednotlivých segmentů jsou v krátkých úsecích navzájem komplementární a umožňují tak tvorbu kvazikružnicového stavu, jak jsme již viděli u adenovirů (obr. 411). Význam těchto segmentů spočívá nejen v tom, že kódují proteiny, ale také v tom, že obsahují signální sekvence pro iniciaci transkripce a replikace. Na každý segment se vážou molekuly **nukleokapsidového proteinu** neboli **NP-proteinu**. Jedna molekula tohoto proteinu pokrývá asi 20 nukleotidů v segmentu. Na 3'-konce segmentů se váže RNA-dependentní-RNA-polymeráza. Každý segment většinou kóduje jeden protein. Jen segmenty 7 a 8 u viru A, 7 u viru C a 6, 7, 8 u viru B kódují dva proteiny, které se tvoří překladem mRNA vznikající sestřihem primárních transkriptů.

Rozdíly mezi viry A, B a C, co se týče přítomnosti jednotlivých proteinů ve virionech těchto virů, jsou uvedeny v tab. 37.

**HEMAGGLUTININ HA.** Hemagglutinin je aktivní jako trimer a představuje





*RNA-dependentní-RNA-polymeráza sestává z proteinů PB1, PB2 a PA.  
Váže se k 3'-konci -RNA.*

*Segment 1 kóduje protein PB2.*

*Segment 2 kóduje protein PB1.*

*Segment 3 kóduje protein PA.*

*Segment 4 kóduje prekurzorový protein, jehož posttranslační  
úpravou se vytvoří monomery trimeru hemaglutininu HA.*

*Segment 5 kóduje nukleokapsidový protein NP.*

*Segment 6 kóduje podjednotku tetrameru neuraminidázy NA.*

*Segment 7 kóduje matricový protein M1 a protein M2.*

*Segment 8 kóduje proteiny NS1 a NS2.*

Obr. 426  
Struktura virionu viru chřipky A

hlavní povrchový antigen viru chřipky A a B. Má tyto tři funkce:

1. Váže se na N-acetylneuraminovou (sialovou) kyselinu ve specifických receptorech hostitelské buňky a připojuje tak virus k jejímu povrchu.

2. Zodpovídá za penetraci virionů přes membránu hostitelské buňky do cytoplazmy tím, že zprostředkovává fúzi membránového obalu viru s endozomální membránou, což má za následek uvolnění nukleokapsidů viru do cytoplazmy.

3. Je hlavním antigenem chřipkových virů indukujícím specifické protilátky v infikovaném organismu.

Globální představa struktury hemaglutininu je znázorněna schematicky na obr. 427.

Místa HA, na která se vážou protilátky, podléhají častým mutacím, což je zdrojem nových antigenních subtypů viru chřipky. Pravděpodobnost těchto mutací je tak vysoká, že prakticky nikdo není proti viru chřipky imunní. Je také zdrojem genetické variability tohoto viru a vzniku chřipkových pandemií vznikajících průměrně po deseti letech.

Existuje 15 subtypů hemaglutininu označovaných jako H1 až H15, které se navzájem částečně v primární struktuře liší a tím i reakcemi na protilátky. *Příslušnost k určitému subtypu v kombinaci se subtypy neuraminidázy (viz níže) je jedna z hlavních charakteristik kmene viru chřipky.*

Tab. 37

Proteiny kódované segmenty genomu virů chřipky A, B a

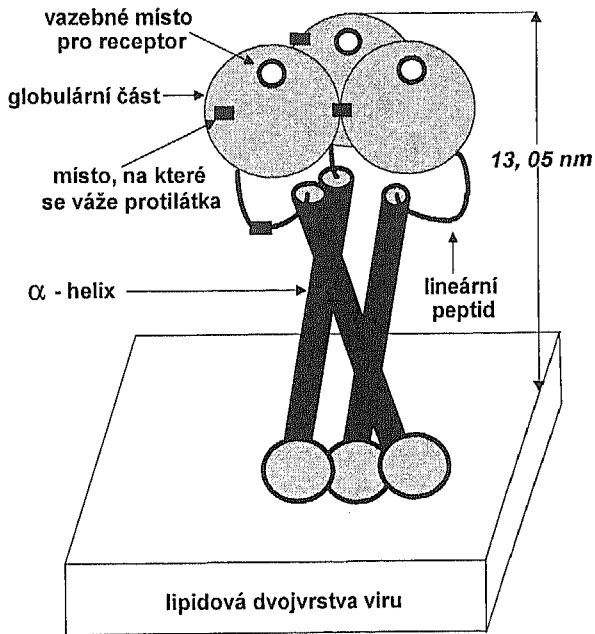
Segment	Virus chřipky A	Virus chřipky B	Virus chřipky C
1	PB2	PB1	P1
2	PB1	PB2	P2
3	PA	PA	P3
4	HA	HA	HEF
5	NP	NP	NP
6	NA	NA, NB	CM2
7	M1, M2	M1, BM2	NS1, NS2
8	NS1, NS2	NS1, NS2	-

*M2, NB a CM2 mají podobné funkce (působí jako iontové kanály). HEF se liší od proteinů virů A a B, co se týče struktury i funkce.*

*Sdružuje v sobě schopnost vazby na receptor s aktivitou neuraminidázy, kterou inaktivuje receptor (N-acetylneuraminová kyselina).*

*BM2 je protein syntetizovaný virem B v cytoplazmě.*

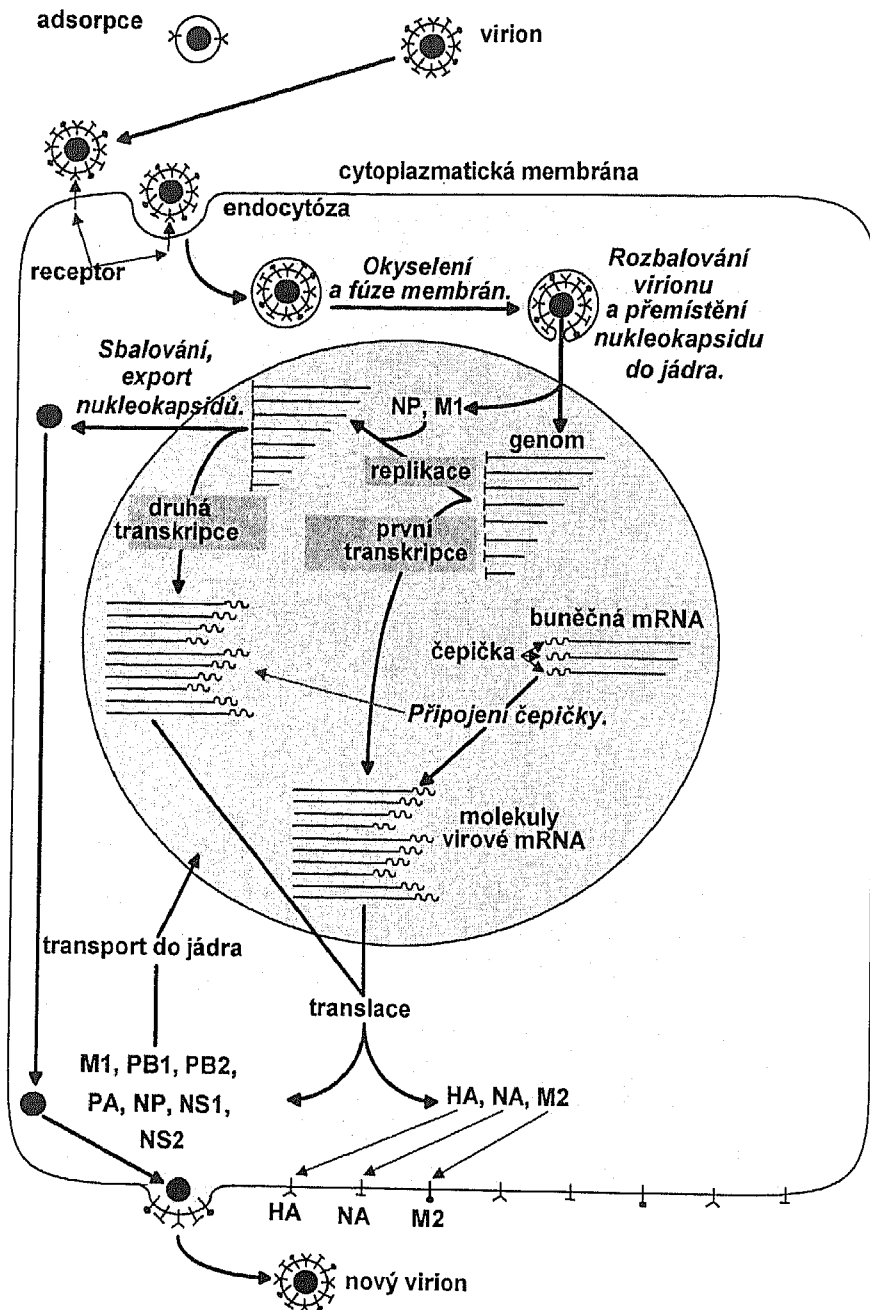
*Jeho funkce není zatím známa.*



Obr. 427  
Schéma molekuly hemagglutininu

**NEURAMINIDÁZA.** Je aktivní jako tetramer. Vedle hemagglutininu je to další důležitý antigen viru. Z receptorů odštěpuje N-acetylneuraminovou kyselinu. To vede k inaktivaci receptoru, což je zvláště důležité při uvolňování viru z buňky, neboť se tím zabraňuje vazbě virionů na receptory v membráně. Existuje celkem 9 subtypů N1 až N9 neuraminidázy, které se částečně navzájem liší v primární struktuře a v kombinaci se subtypy hemagglutininu charakterizují příslušný kmen viru. (Ostatní proteiny virů chřipky budou komentovány při výkladu infekce buňky těmito viry a mechanismu exprese jejich genů).

**INFEKCE BUŇKY VIREM CHŘIPKY A.** Sledujte nyní proces infekce hostitelské buňky virem chřipky a expresi jeho genomu v infikované buňce podle obr. 428. Chřipkové viriony se nejdříve na povrchu buňky navážou HA-proteinem (případně HEF-proteinem) na N-acetylneuraminovou kyselinu. Endocytotickým procesem (endocytóza) jsou pak navázané viriony sevřeny cytoplazmatickou membránou a pojmuty do buněčných vezikul, takže nukleokapsidy virionů jsou pak obaleny dvěma membránami za vzniku struktur označovaných jako **endozomové vezikuly**. Jejich okyselením přechází HA-protein



Obr. 428

Infekce hostitelské buňky virem chřipky a exprese jeho genomu

do aktivní konformace, což se projeví fúzí endozomu s membránovým obalem viru a uvolněním nukleoproteinových komplexů z vezikul do cytoplazmy.

Okyselení přes protonovou pumpu M2-proteinu vede k uvolnění proteinů NP a M1 a k transportu nukleokapsidů přes póry jaderné membrány do jádra. V jádře pak proběhnou následující kroky exprese virového genomu.

**EXPRESSE GENOMU VIRU CHŘÍPKY A V INFIKOVANÉ BUŇCE.** Sledujte dále text v souvislosti s obr. 428, který kombinujte s obr. 429 a 430 v pořadí podle těchto bodů:

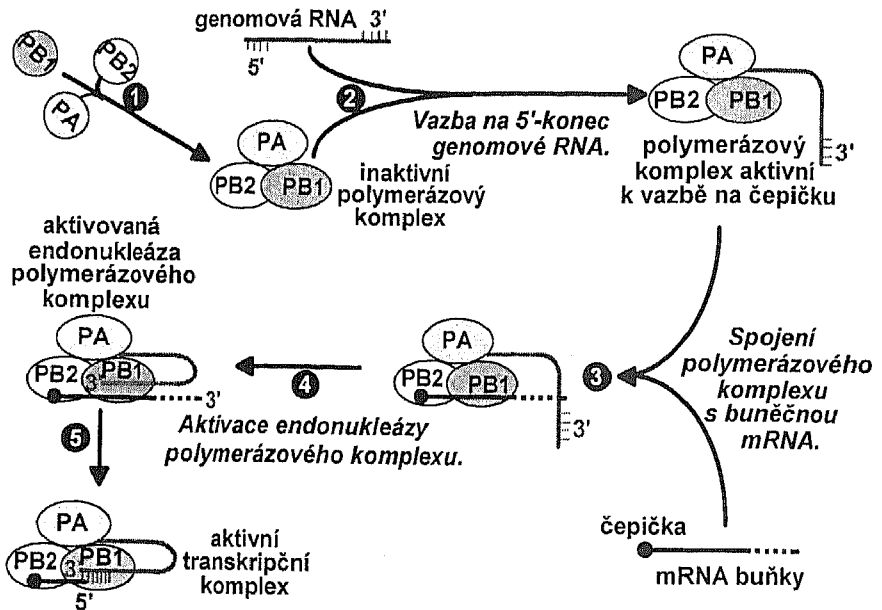
**1. Iniciace transkripce virového genomu.** Promotory se nacházejí v sekvencích 3'-konečů jednotlivých segmentů, které vytvářejí se sekvencemi na 5'-konečích dvouřetězcové struktury. Virová RNA-dependentní RNA-polymeráza však nemůže sama syntézu mRNA začít, dokud 5'-konec této mRNA nebude modifikován čepičkou m<sup>7</sup>G (str. 373). RNA-dependentní-RNA-polymeráza tuto aktivitu nemá. U ortomyxovirů se však vyvinul mechanismus, který umožňuje využít čepičku z mRNA hostitelských buněk. To se děje tak, že se PB2-proteiny, které jsou jako součást nukleokapsidu spojeny s 5'-konci genomových segmentů, spojí s čepičkou (m<sup>7</sup>G) molekul mRNA hostitelské buňky a přenesou ji k 3'-konečům genomových RNA-segmentů. Konečným nukleotidem těchto segmentů je vždy nějaký uridin, s nímž se hybridizuje adenin v prvních 10 až 13 bázích mRNA hostitelských buněk. Jelikož PB2-protein se vyznačuje nukleázovou aktivitou, štěpí hostitelskou mRNA v blízkosti tohoto adeninu za uvolnění čepičky s 3'OH-koncem, který pak může sloužit jako primer k níže popsaným polymerizačním krokům. Tento mechanismus "kradení čepičky" má mimo jiné ten význam, že *se jím přeruší transkripce a translace hostitelské buňky a přepne se na výrobu chřipkových virionů*. Iniciace transkripce genomu viru chřipky A je podrobněji vyložena na obr. 429.

**2. Elongace a terminace transkripce virového genomu.** Prodlužování virové mRNA se zúčastňují proteiny PB1, PB2 a PA RNA-dependentní RNA-polymerázy. Transkripce se ukončí asi 15 až 20 nukleotidů před 5'-koncem genomového segmentu v úseku, kde přechází (vzhledem k tomu, že úseky na 5'-a 3'-konečích genomových segmentů jsou navzájem komplementární) do dvouřetězcové struktury, která pravděpodobně představuje fyzikální bariéru pro postup RNA-polymerázy a zpomaluje proto polymerizaci. Signálem pro polyadenylaci vytvořeného transkriptu je na genomovém segmentu sekvence:

AAUAAA

přepisovaná v transkriptu do UUAUUU. Malé transkripty se upravují částečně sestříhem, kterého se jako kofaktor zúčastňuje NS1-protein. Průběh elongační a terminační fáze transkripce genomu chřipky A je vyloženo na obr. 430.

**3. Translace mRNA viru chřipky A.** Při exportu virové mRNA z jádra do cytoplazmy buňky spolupůsobí buněčné proteiny s NS1-proteinem. Na to na-



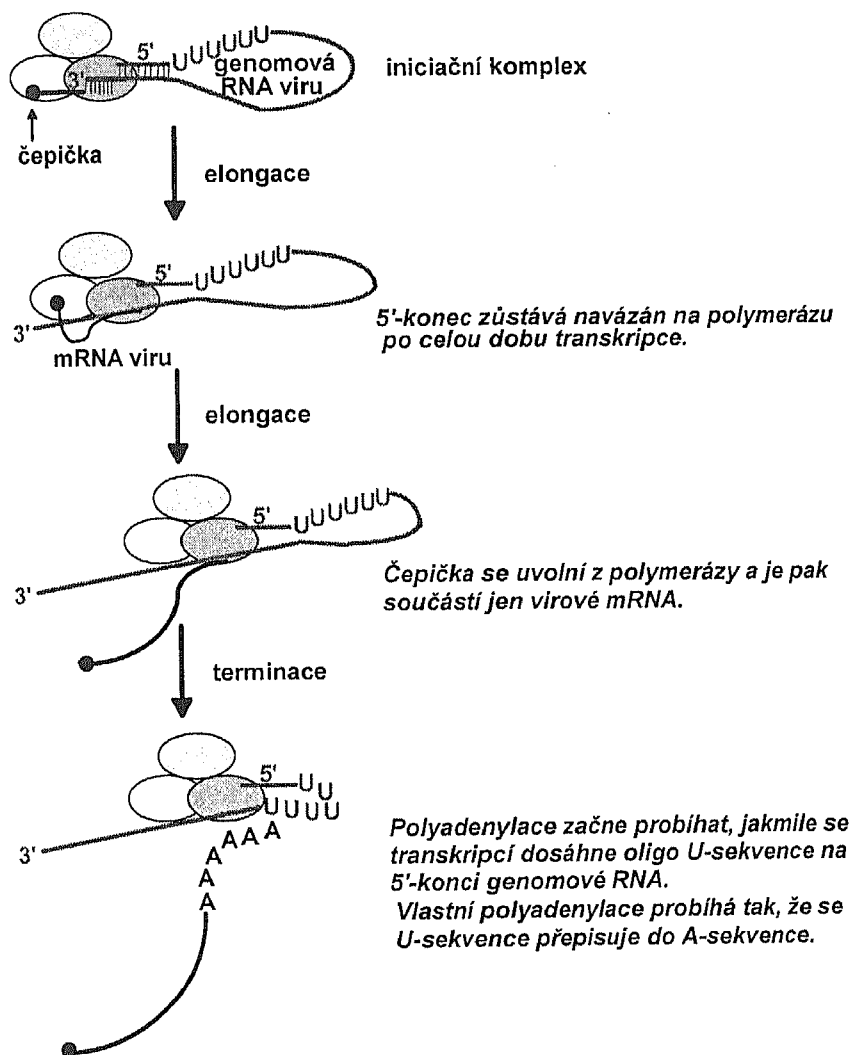
## Poznámky a vysvětlivky

1. Tři polymerázové proteiny se nejdříve seskupí do inaktivního komplexu.
2. Polymerázový komplex se specificky naváže na 5'-konec genomové RNA; tím se aktivuje k vazbě na čepičku buněčné mRNA.
3. S aktivním polymerázovým komplexem se spojí buněčná mRNA modifikovaná na 5'-konci čepičkou.
4. 5'-konec buněčné mRNA se páruje s 3'-koncem genomové RNA viru, která tím změní konformaci do vlásenkové struktury a aktivuje se endonukleáza polymerázového komplexu.
5. Dochází ke štěpení buněčné mRNA endonukleázovou aktivitou polymerázového komplexu za uvolnění čepičky a tvorby aktivního transkripčního komplexu.

Obr. 429  
Sestavení aktivního polymerázového komplexu a aktivního transkripčního komplexu viru chřipky A

vazující translace proteinů membránového obalu viru (HA-protein, případně NA a M2) probíhá na membráně endoplazmatického retikula. Po odstranění signálního peptidu (str. 414) z proteinů HA a M2 se prostřednictvím Golgiho systému tyto proteiny dopravují k buněčnému povrchu. Při tom vytvářejí trimery a tetramery a glykosylují se.  $H^+$ -pumpa aktivního M2-proteinu reguluje v Golgiho systému pH a zabraňuje, aby v něm předčasně nefúzoval s HA-komplexem.

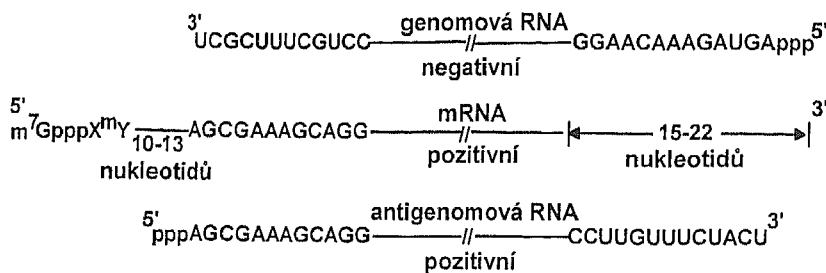
**4. Replikace genomu chřipky A.** Proteiny PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 a M1 obsahují ve svých sekvencích signály pro transport do buněčného jádra, ve kterém pak probíhá replikace genomových segmentů. Aby se však transkripce přepnula na replikační modus, musí se v jádře nahromadit větší množ-



Obr. 430

### Schéma modelu elongace a terminace transkripce u viru chřipky A

ství nově syntetizovaných NP-proteinů. Předpokládá se, že tyto proteiny modifikují polymerázový komplex (PB1, PB2, PA) a tím navozují replikaci, která je však také závislá na primerech. *In vitro* jako primery postačují dinukleotidy **pppApG**, které hybridizují s 3'-konci genomových segmentů a poskytují pak potřebné 3'OH-konce, od nichž se pomocí proteinů PB1, PB2 a PA mohou syntetizovat pozitivní RNA-řetězce. Tyto antigenomy se sdružují s NP-proteiny a využívají se jako matricové řetězce k syntéze negativních RNA-řetězců, na které se vážou proteiny NP, PB1, PB2 a PA za tvorby nukleokapsidů. V dalším



Obr. 431

### Genomová, mediátorová a antigenomová RNA u viru chřipky A

kroku se k nukleokapsidům připojí molekuly M1-proteinu a výsledné komplexy přecházejí pak z jádra do míst cytoplazmy, kde se v cytoplazmatické membráně nachází zvýšené množství molekul HA-, NA- a M2-proteinu.

**TŘI FUNKČNÍ RNA VIRU CHŘIPKY A.** Pozitivní RNA-řetězce vzniklé replikací nejsou využívány jen jako matrice k syntéze negativních řetězců, ale také jako mRNA, a to za předpokladu, že získávají čepičku z buněčné mRNA. U ortomyxovirů se tedy uskutečňuje **první transkripce**, která probíhá na segmentech negativní genomové RNA ještě před její replikací v hostitelské buňce a **druhá transkripce** probíhající na segmentech negativní genomové RNA vzniklých jejich replikací v hostitelské buňce (obr. 428). Základem exprese genomu viru chřipky A jsou tedy tři RNA, které se navzájem liší orientací fosfodiesterových vazeb a sekvencemi na 5'- a 3'- koncích. Jsou to (obr. 431):

- ◆ **Genomová RNA**, kterou se přenáší genetická informace viru do jeho potomstva. Replikuje se, ale nepřepisuje a nepřekládá. Je negativní.
- ◆ **Mediátorová RNA**, která vzniká první nebo druhou transkripcí virového genomu. Je pozitivní a působí jako mRNA, jelikož po transkripci se na 5'- a 3'-koncích upravuje pro translaci. Nereplikuje se.
- ◆ **Antigenomová RNA**. Je to pozitivní RNA vzniklá replikací genomové RNA. Jejím základním znakem je úprava 5'-konce dinukleotidem

pppApG

působícím při replikaci jako primer. Její 3'-konec není polyadenylován.

**OZNAČOVÁNÍ KMENŮ VIRŮ CHŘIPKY.** Kmeny chřipkových virů rodu A se liší svým původem, ekologií a hlavně typem antigenu H a N. H je obecné označení pro antigen hemaglutininu a N pro antigen neuraminidázy. Do označení příslušného kmene viru chřipky pak píšeme v tomto pořadí:

rod - hostitel (uvádí se jen zvířecí, v angličtině) -



- geografické určení - pořadové číslo kmene - rok izolace -
- subtyp antigenu H a N.

Příklad:

A/Hong Kong/1/68/H3N2 =  
 =Influenzavirus A izolovaný v Hong Kongu z člověka v roce 1968,  
 který má antigen subtypu H3N2.

**PŘESKUPOVÁNÍ GENOMOVÝCH SEGMENTŮ.** *Zdrojem vzniku nových kmenů viru chřipky způsobujících epidemie chřipky je přeskupování genomových segmentů.*

Je-li hostitelská buňka infikována dvěma chřipkovými viry, které se geneticky navzájem liší, mohou přeskupením segmentů vzniknout kombinace, které se proti rodičovským liší. Do každého virionu se však musí dostat všech osm segmentů, ale může být např. vyměněn segment 7 za segment 7 nesoucí mutantní alelu určitého genu.

**ANTIGENNÍ ZVRAT U VIRU CHŘIPKY.** *Antigenním zvratem se rozumí náhlá a zásadní změna v antigenních vlastnostech viru, která je výsledkem přeskupení mezi segmentovanými genomy virů stejného druhu lišících se v antigenních vlastnostech.* Lidská populace není připravena imunologicky rozeznat nový antigenní typ a virus má pak volnou cestu ke svému šíření. Jestliže je hostitelská buňka infikována dvěma chřipkovými viry, které se geneticky liší, může se přeskupením mezi dvěma segmentovanými osmicemi genomů vytvořit  $2^8$ , tj. 256 nových kombinací. To je zdroj opravdu úžasné variability a získání nových vlastností viru. Téměř každá nová pandemie chřipky byla vyvolána virem influenzy A vzniklým přeskupením jeho genomových segmentů. Celkem se vystřídaly v lidské populaci tyto pandemie:

- ◆ V roce 1918/1919 to byla pandemie **španělské chřipky**, kterou vyvolal virus s antigeny **H1N1**; tato pandemie si vyžádala 20 miliónů lidských životů. Virus byl přenesen do Evropy americkými vojáky z Kansasu.
- ◆ Virus H1N1 cirkuloval v lidské populaci do roku 1957 (prodělával však mutační změny, viz dále), kdy byl nahrazen novým subtypem, a to **H2N2**, který šířil pandemii nazvanou **asijská chřipka**. Po jejím zdolání cirkuloval v populaci do roku 1968.
- ◆ V roce 1968 nastupuje virus **Hong Kong** s antigeny **H3N2** opět s rozsáhlou pandemií.
- ◆ V roce 1977 se objevuje opět virus **H1N1**. Tento staronový virus byl poprvé zachycen v západní Číně a krátce poté se rozšířil v SSSR až do evropské části a neušetřil ani Kanadu a USA. Epidemie této tzv. **ruské chřipky** postihla

především mladší ročníky, které neměly imunologickou zkušenost s virem H1N1 z konce jeho éry 1918 - 1957. Zatímco nástup asijské chřipky v roce 1957 a viru Hong Kong H3N2 byl doprovázen rychlým vymizením předcházejícího virového kmene z lidské populace, cirkulují v ní poprvé dva virové kmeny současně: **H3N2** a **H1N1**. To je překvapující. Vzhledem k tomu, že *H1N1* je téměř totožný s virem, který cirkuloval v populaci v padesátých letech a liší se jen jednou aminokyselinou (za období od r. 1950 by měl kumulovat více substitucí), je možné, že jde o virus, který unikl z laboratoře.

**REZERVOÁR VIRŮ CHŘIPKY.** Rezervoárem virů influenzy A je vodní ptactvo, především divoké kachny. Virus způsobuje u těchto ptáků bezpříznakové infekce, množí se v jejich střevech, je obsažen v jejich fekáliích a ve vodě znečištěné těmito fekáliemi. U nás se virus přenáší nepřímo z domácích kachen na prasata, u nichž probíhá chřipka podobně jako u člověka. Z nich může být přenesena na obsluhující personál. Není náhodné, že chřipka se šíří z asijských oblastí, především z venkovských oblastí Číny, kde obyvatelstvo žije v těsném kontaktu s domácími zvířaty. Na obr. 432 jsou uvedeny cesty přenosu viru chřipky.

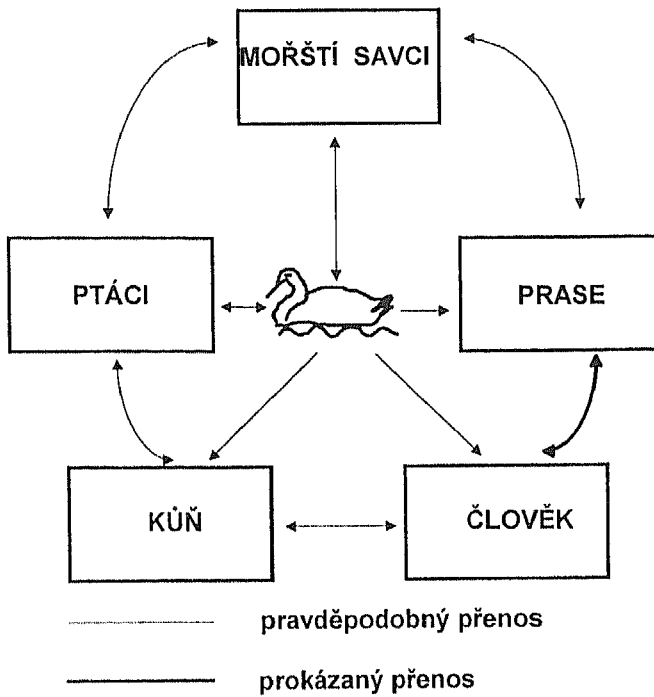
Ve vodním ptactvu se nacházejí všechny antigenní subtypy H a N viru influenzy A, a to ve všech kombinacích. Teprve však pravděpodobně v praseti dochází k přeskupování genomových segmentů mezi viry vodního ptactva a lidskými. Lidský virus se může v praseti zkřížit s ptačím za vzniku nového antigenního typu. Např. virus Hong Kong vznikl křížením v praseti podle obr. 433.

Důkazy podporující tuto úlohu prasete jsou následující:

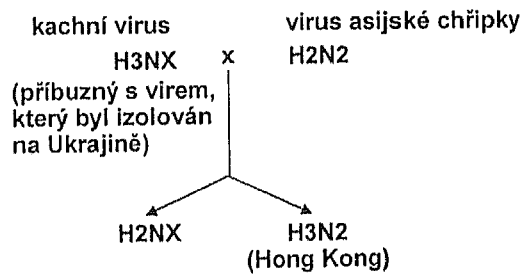
- ◆ Prasata jsou vnímavá na infekci subtypu H1N1 a H3N2 virů chřipky lidských a ptačích a pravděpodobně získávají lidské viry inhalací aerosolů během období těsného kontaktu.
- ◆ Lidé příležitostně získávají viry chřipky z prasat, jako např. v roce 1976 nebo 1988, kdy byly zjištěny případy, že u lidí viry prasečí chřipky způsobily smrt. Asi 10 % osob přicházejících do styku s prasaty vytváří protilátky proti prasečímu viru chřipky.
- ◆ Genetické analýzy ukázaly, že geny viru chřipky kódující většinu jeho vnitřních proteinů sdílí po divergenci z ptačí virové linie geny, které jsou ekvivalentní s geny prasečích chřipkových virů, nikoli však s geny jiných savčích chřipkových virů.
- ◆ Neexistuje důkaz, že by lidé byli citliví k infekci ptačími viry chřipky.

**ANTIGENNÍ POSUN.** Antigenní posun je dalším zdrojem ohromné variability chřipkového viru. Rozumí se jím *postupné hromadění drobných mutací, obvykle charakteru nukleotidových substitucí, ve virovém genomu, které vedou*

REZERVOÁR VIRU INFLUENZY A



Obr. 432  
 Cesty přenosu viru influenzy A ze zvířat na člověka  
 a mezi zvířaty



Obr. 433  
 Schéma křížení dvou chřipkových virů v praseti za  
 produkce viru odpovídajícího antigenními vlastnostmi  
 viru Hong Kong

*jen k nepatrně pozměněným antigenním vlastnostem viru, takže jsou imunitním systémem hostitele jen slabě rozpoznávány.*

O významu antigenního posunu se lépe přesvědčíme, porovnáme-li frekvence mutací viru chřipky s frekvencí mutací u DNA-virů. Např. mutační rychlost DNA-virů (papovaviry) je

4,0 až  $7,8 \times 10^{-8}$  za rok na aminokyselinu.

Mutační rychlost genu pro hemaglutinin je

$6,0 \times 10^{-3}$  za rok na aminokyselinu.

Mutační rychlost pro neuraminidázu je

$5,6 \times 10^{-3}$  za rok na aminokyselinu.

Gen, který kóduje NS-protein a je z hlediska mutací nejlépe prostudován, se mutačně mění při rychlosti

$2,0 \times 10^{-3}$  za rok na bázi.

Samozřejmě, že tak vysoké mutační rychlosti vedou k častým a postupným změnám v antigenní struktuře viru. Po proběhnutí pandemie vyvolané určitým kmenem viru probíhají v důsledku antigenního posunu drobné evoluční změny v antigenních vlastnostech viru. Virus je vystaven selekčnímu tlaku narůstající imunity lidské populace vůči antigenním vlastnostem hemaglutininu. Avšak nové mutanty mohou uniknout tomuto tlaku a vyvolat recidivu chřipkové epidemie. Později jsou vystřídány dalšími mutanty. *Takto vznikají linie virů, které nesou mutace svých předchůdců.*

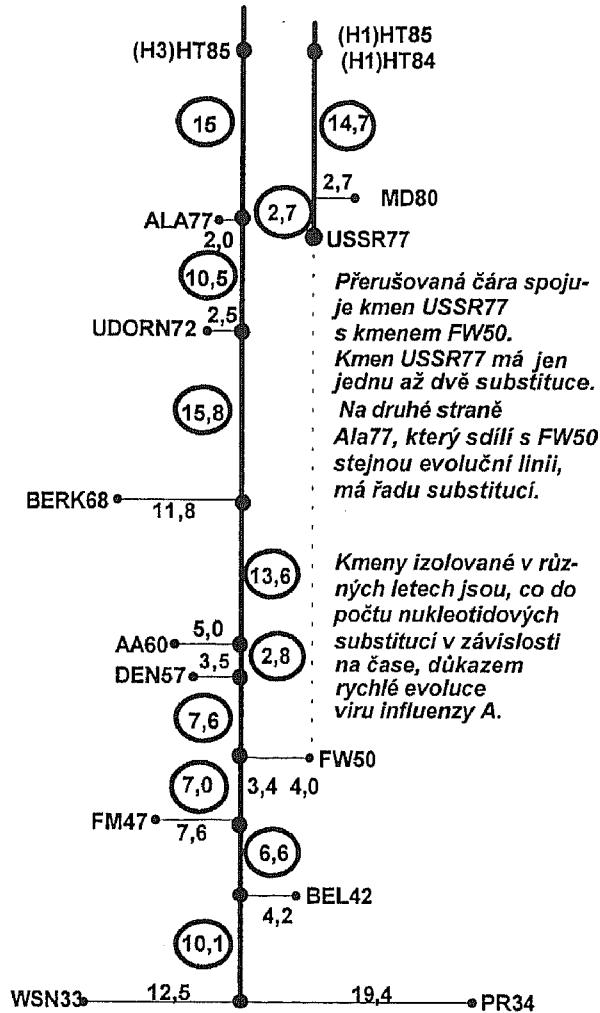
**EVOLUČNÍ LINIE VIRU CHŘIPKY A.** Na základě kumulovaných mutací registrovaných jako aminokyselinové záměny v HA1-podjednotce hemaglutininu lze odvodit evoluční linii virových kmenů z původního předka, případně stanovit divergenci v evolučních liniích. Z obr. 434 je zřejmé, že evoluce této podjednotky probíhala v období 1950 - 1957 po jiné linii než v období od 1977 do 1983. Obě linie však divergovaly ze společného předka.

Zajímavé je sledování evoluce viru chřipky od prvního virového izolátu H1N1 z roku 1933/34. Je to možné na základě mutací kumulovaných v genu NS.

Z obr. 435 je zřejmé, že kmen USSR77, který je H1N1 a vynořil se od roku 1950 až po dvacetí sedmi letech zcela náhle, má jen jednu až dvě aminokyselinové záměny, zatímco za tu dobu výsledný kmen ALA77 sdílející s FW 50 stejnou evoluční linii kumuloval řadu záměn aminokyselin. To vedlo k domněnce, že kmen USSR 77 je kmen, který unikl pravděpodobně z laboratoře.

**RYCHLOST EVOLUCE VIRU INFLUENZY A.** Fylogenetický strom na obr. 435 vyjadřuje také značnou rychlost evoluce viru influenzy A. Jeho hlavní





Čísla vepsaná do kružnice znamenají počet nukleotidových substitucí v intervalu mezi body, z nichž se odvětvují izoláty (kmeny), za jejichž označením poslední dvě číslice znamenají rok izolace a stanovení nukleotidové substituce. Pokud čísla nejsou vepsána do kružnice, pak znamenají počet nukleotidových substitucí charakteristický pro daný izolát (kmen).

Obr.435  
 Evoluce viru influenzy A studovaná u genu kódujícího NS-protein

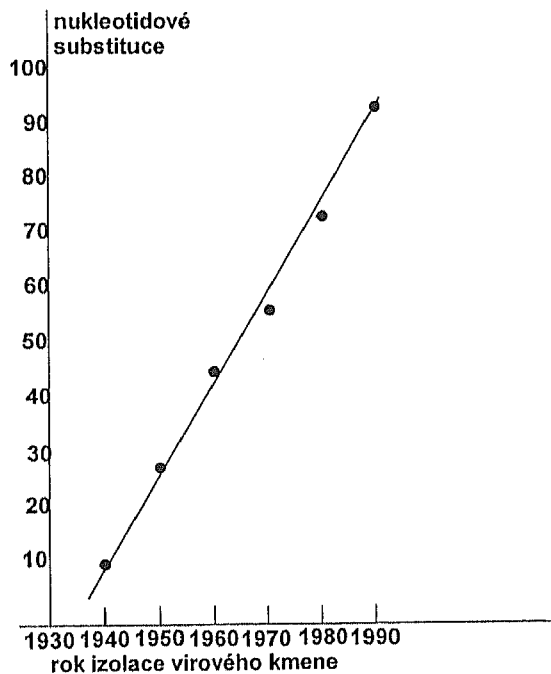
kmen obsahuje změny, které se uchovaly po celou dobu. *Postranní větve však představují jedinečné změny, které jsou potenciálním zdrojem dalších vývojových linií. Závislost mezi počtem nukleotidových substitucí na kmenech*

tvořících hlavní kmen fylogenetického stromu na obr. 435 izolovaných v různé době od r. 1933 až do r. 1985 je lineární. Přímka vyjadřující tuto linearitu má směrnici 1,73 odpovídající 0,08 substitucím za rok (obr. 436).

**RYCHLOST EVOLUCE VIRU INFLUENZY A, B, C.** V genu NS byly stanoveny nukleotidové substituce též u virů influenzy B a C izolovaných v různých letech. Výsledky stanovení byly porovnávány s evolucí viru influenzy A. Celkově lze říci, že:

1. Viry influenzy A se vyznačují rychlou evolucí probíhající ve smyslu Darwinovy selekční teorie, tj. *rodičovský virový kmen vytvoří varianty, z nichž pouze jedna je úspěšná*. Taková evoluce je charakteristická úzkým evolučním stromem, v němž pouze jedna linie se vyvíjí úspěšně tím, že *z předchozího virového potomstva je selektována linie vynucující si v lidské populaci novou imunitní obranu*. Skrytě se tak připravuje nová epidemie či pandemie viru, proti kterému nemá ještě lidská populace obranné látky.

2. Viry influenzy C se vyvíjejí velmi pomalu z různých linií. Selekcční



Obr. 436

Grafické vyjádření lineárního vztahu mezi počtem substitucí genu NS viru influenzy A a rokem izolace virového kmene, v němž byl počet substitucí stanoven

tlak vůči jednotlivým liniím je však slabý, takže jednotlivé evoluční linie cirkulují v lidské populaci současně. Rychlost evoluce u viru influenzy B je také nízká, ale vyšší než u influenzy C.

Je nutno však zdůraznit, že *virus influenzy A se vyznačuje rychlou evolucí pouze v lidské populaci, nikoliv ve vodním ptactvu (v divokých kachnách)*. Důvody jsou následující:

1. Antigenní variabilita viru chřipky A není v kachnách podrobena selektivnímu tlaku protilátkové imunity. Virus se totiž množí v zaživacím ústrojí těchto ptáků a vyvolává jen slabou a krátkodobou imunitní odpověď, což umožňuje reinfekci stejným virem.

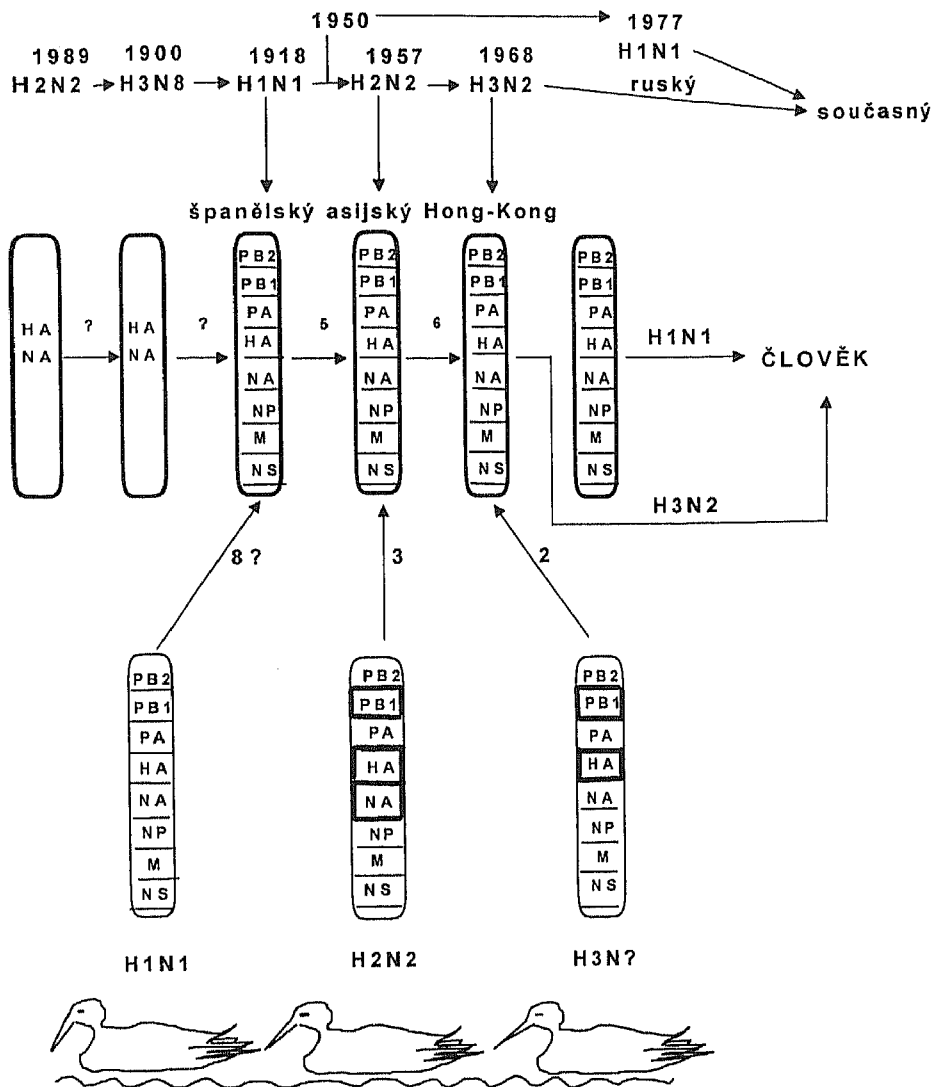
2. Antigenní posun viru influenzy A je u kachen pomalý.

3. Substituce aminokyselin jsou rozloženy do celé molekuly hemaglutininu a neprobíhají v místech, která jsou zodpovědná za protilátkovou odpověď.

**GLOBALNÍ POHLED NA EVOLUCI VIRU INFLUENZY A.** Na základě výše zmíněných údajů a přístupů k řešení problematiky evoluce viru chřipky byl sestaven celkový model evoluce tohoto viru (obr. 437):

- ◆ Ze séroarcheologických údajů lze usuzovat, že v lidské populaci již v letech 1889 - 1900 cirkulovaly viry **H2N2** a **H3N8**.
- ◆ Tyto kmeny byly ještě před rokem 1918 nahrazeny kmenem, který už obsahoval osm genomových segmentů a byl z vodního ptactva a z prasete přenesen do lidské populace. Tento kmen prodělával postupný antigenní posun a do Evropy byl zavlečen americkými vojáky v roce 1918 jako **H1N1** a způsobil rozsáhlou pandemií španělské chřipky.
- ◆ Kmen **H1N1** cirkuloval v lidské populaci do roku 1957, kdy byl nahrazen kmenem **H2N2**. Kmen **H2N2** je výsledkem antigenního zvratu, v rámci kterého kmen **H1N1** získal z ptačího rezervoáru (divoké kachny) tři alely genů **PB1**, **HA** a **NA**, které změnilo jeho antigenní typ, a podržel si pět původních alel. Asijský kmen **H2N2** převládl v lidské populaci, zatímco **H1N1** z ní vymizel.
- ◆ Nový pandemický virus, **H3N2**, se objevuje v roce 1968 v Hong Kongu. Je důsledkem antigenního zvratu, ve kterém získal z kachního viru dvě alely, a to: **PB1** a **H3 (HA)**, zatímco alelu **N2 (NA)** a šest ostatních si podržel z viru **H2N2**. Silným důkazem toho je fakt, že kmen Hong Kong /68 se v **HA** odlišuje jen v sedmi aminokyselinách od asijských ptačích kmenů **H3**.
- ◆ Po objevení se virového kmene Hong Kong **H3N2** nebyl virus **H1N1** detegovatelný v lidské populaci. Vynořuje se opět až v roce 1977, kdy způsobuje tzv. ruskou chřipku. Od tohoto roku působí v lidské populaci virové kmeny **H3N2** a **H1N1**, které skrytě prodělávají antigenní posun a trápí své hostitele. Nezpůsobují však pandemií. Ta by pravděpodobně mohla vzniknout až po novém antigenním zvratu.





Obr. 437  
Model evoluce viru chřipky A

**EXISTUJE EPICENTRUM PRO VIRY CHŘIPKY?** Záznamy o výskytu asijských, Hong Kong a ruských pandemických kmenů viru chřipky v Číně vedou k domněnce, že většina pandemií lidské chřipky od roku 1850 má svůj původ v Číně. Výjimkou se zdá být španělská chřipka, která asi vznikla v Kansasu a byla zanesena do Evropy vojenskými oddíly U. S. A. v roce 1918.

Vyzvedává se možnost, že jižní Čína je epicentrem chřipky. Na rozdíl od mírných a subarktických oblastí světa, kde chřipka u lidí je zimní onemocnění,

v tropických a subtropických oblastech Číny se vyskytuje chřipka po celý rok. V Číně převládají chřipkové viry A všech subtypů v kachnách a ve vodě navštěvované kachnami. Různé subtypy jsou přítomny po celý rok s nejvyšším výskytem v letních měsících. V Číně a v jiných oblastech jižní Asie viry chřipky H1N1 a H3N2 převládají v prasatech po celý rok. Domestikovaná populace kachen je největší v Číně a menší v jiných zemích.

### 9.5.2

#### Viry s negativní segmentovanou dvojsmyslnou RNA

Touto vlastností jsou charakteristické tyto čeledi virů:

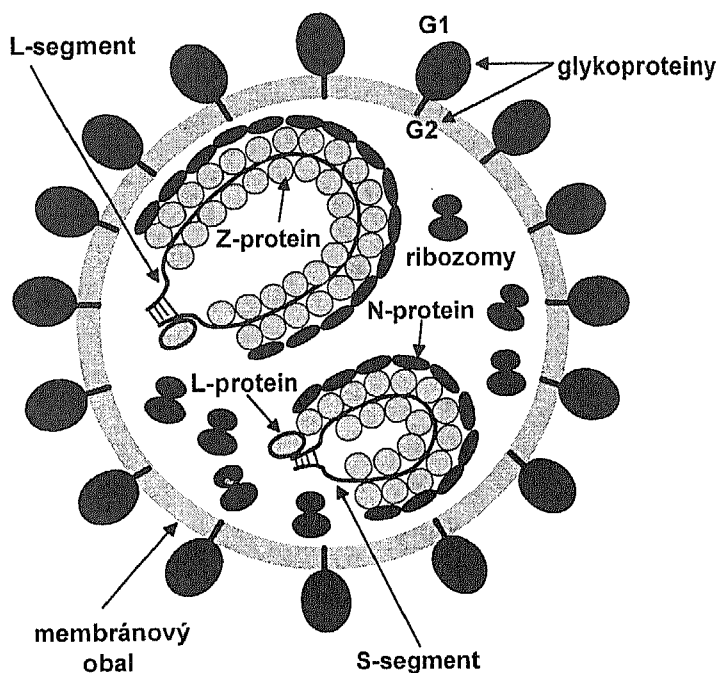
- ◆ **Bunyaviridae (bunyaviry),**
- ◆ **Arenaviridae (arenaviry).**

Bunyaviry infikují savce a přenášejí se členovci. Člověk bývá jen zřídka infikován. Obvykle způsobují u člověka horečnatá hemoragická onemocnění (hemoragie je výstup krve z cév, krvácení). Přenos bunyavirů z člověka na člověka je vzácný a uskutečňuje se hlavně při nozokomiálních infekcích (nozokomiální infekce je nákaza, k níž dochází při hospitalizaci pacienta nebo jeho vyšetřování v nemocnici). Jelikož různé typy bunyavirů jsou odkázány na přenos určitým druhem hmyzu, je jejich výskyt vázán na určité geografické prostředí, kde je tento hmyz rozšířen. Většinou se vyskytuje v tropických a subtropických oblastech. Výjimkou je toliko rod **Hantavirus**, jehož zástupci pronikli do Evropy. Viry tohoto rodu jsou přes exkrementy hlodavců přenosné na člověka, u něhož způsobují horečnaté hemoragické onemocnění doprovázené narušením funkce ledvin (hemoragický nefropatický syndrom).

Arenaviry jsou převážně rozšířeny v Jižní Americe a v Africe, kde způsobují perzistentní infekce u hlodavců, kteří je vylučují močí a slinami. Kontaktem s krví nakaženého zvířete nebo s jeho močí, případně slinami se může nakazit některými druhy arenavirů též člověk.

Molekulární biologii bunyavirů a arenavirů demonstrujeme na **viru lymfocytární choriomeningitidy** neboli **LCMV-viru**. Lymfocytární choriomeningitida je zánět mozkových blan někdy současně provázený encefalitidou.

**STRUKTURA VIRIONU ARENAVIRŮ.** Viriony arenavirů jsou pleomorfní, převážně však kulovitého tvaru o průměru 50 až 300 nm (obr. 438). Jejich genom sestává ze dvou nukleokapsidových segmentů obepnutých membránovým obalem, do něhož jsou zanořeny **glykoproteiny G1 a G2**, které se tvoří proteolýzou z většího prekurzorového proteinu. G2-protein je pevně do membránového obalu zakotven, zatímco G1 je spojen s povrchem membránového obalu nekovalentními vazbami.



Obr. 438  
Struktura virionu arenavirů

Oba proteiny se pravděpodobně v tomto obalu nacházejí ve formě homotetrameru.

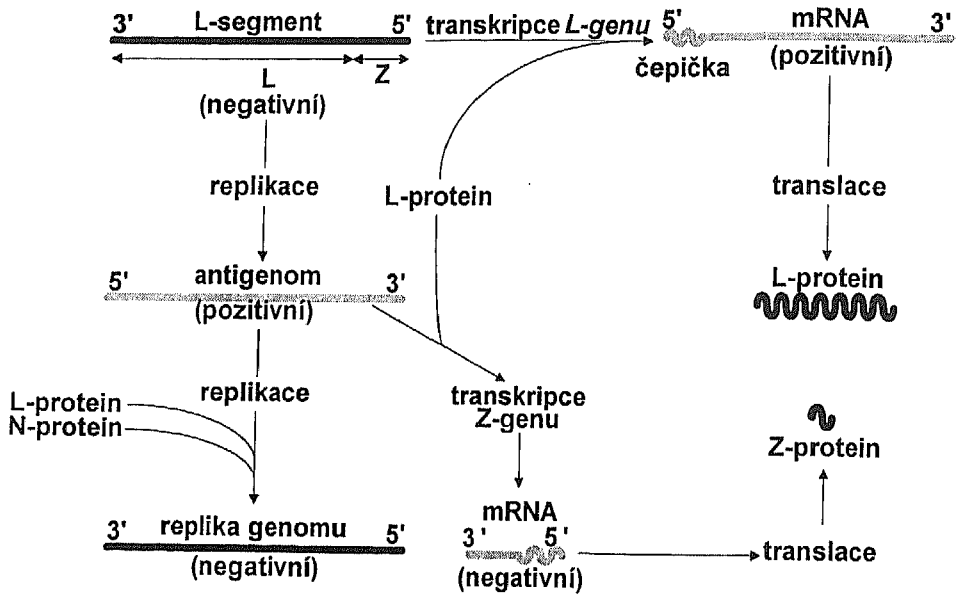
Uvnitř virionu jsou v komplexu s molekulami N-proteinu dva **genomové segmenty S a L**. Dalšími složkami jsou **Z-protein, L-protein** (RNA-dependentní RNA-polymeráza).

Uvnitř virionů arenavirů jsou též ribozomy, které se do virionů dostávají během jejich sestavování a uvolňování z hostitelských buněk.

### EXPRESI GENOMU ARENAVIRŮ V HOSTITELSKÝCH BUŇKÁCH.

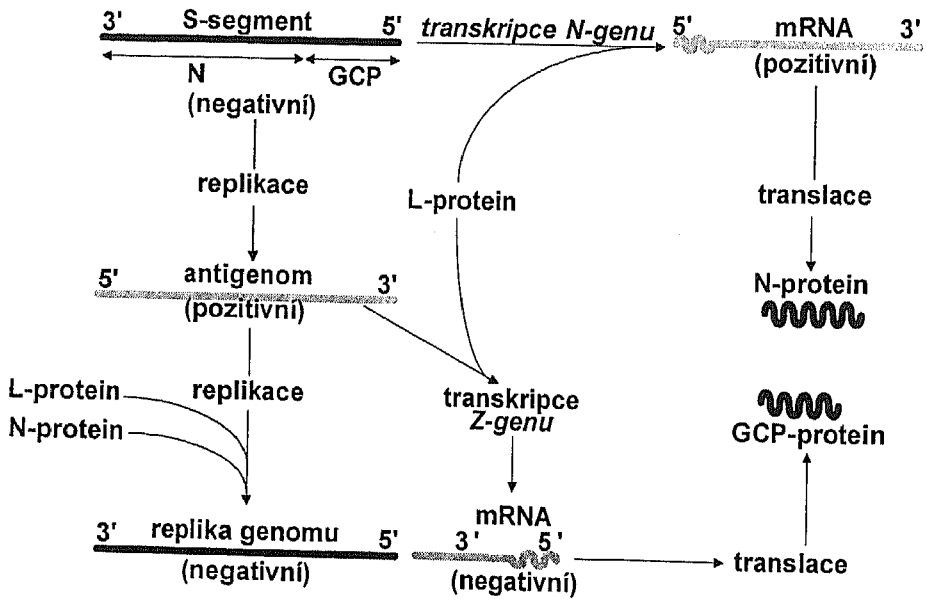
Je vysvětlena schématem na obr. 439 znázorňujícím expresi genomového L-segmentu arenavirů a na obr. 440 znázorňujícím u těchto virů expresi genomového S-segmentu.

Každý genomový segment představuje **negativní dvojsmyslnou RNA** (str. 611). Z obr. 439 a 440 je zřejmé, že *L- a S-segmenty se přepisují do pozitivní RNA, která má funkci mRNA, jelikož se modifikuje na 5'-konci čepičkou*. Transkripce obou segmentů se děje za katalytického účinku L-proteinu (RNA-dependentní RNA-polymeráza), který je součástí virionové sestavy. Vytvořená mRNA se překládá do L- a N-proteinů. Jestliže se pak dosáhne dostatečného



Obr. 439

Expresce genomového L-segmentu arenavirů



Obr. 440

Expresce genomového S-segmentu arenavirů

množství N-proteinu v buňce, následuje tvorba pozitivní RNA nemodifikované čepičkou, která působí jako *antigenom pro tvorbu molekul negativní RNA odpovídajících genomovým segmentům L a S* a jako *matrice pro syntézu negativní RNA, která se modifikuje čepičkou a má funkci mRNA překládané do Z- a GCP-proteinů.*

Genomový segment L sestává tedy ze dvou genů: jednoho delšího genu kódujícího L-protein a druhého kratšího kódujícího Z-protein. Podobně též genomový segment S sestává z delšího genu kódujícího N-protein a kratšího kódujícího prekurzorový protein GCP, který se posttranslačně štěpí na proteiny G1 a G2. V podstatě by mělo ze schémat na obr. 439 a 440 být zřejmé, jaká je strategie transkripce genomových segmentů S a L, při které se vytvoří dvě funkční mRNA s opačnou orientací fosfodiesterových vazeb, tj. pozitivní a negativní. Proč tomu tak je, vysvětluje schéma na obr. 441. K jeho pochopení potřebujete znalosti o zakončení transkripce v eukaryotické buňce uvedené na str. 360 - 361.

Podle obr. 441 první gen každého segmentu (gen L nebo gen N) obsahuje sekvenci 3'-UUAUUU-5', která se přepisuje na úrovni mRNA do polyadenylačného signálu 5'-AAUAAA-3' (viz str. 356). Za touto sekvencí se pak RNA, vznikající transkripcí těchto genů, štěpí a může být překládána do L- nebo N-proteinu. Jelikož však geny kódující proteiny Z a GCP nemají sekvenci 3'-UUAUUU-5', ale sekvenci 5'-AAUAAA-3' (pozor všude na značení konců!), nemohou být překládány z RNA vznikající transkripcí genomových segmentů L a S. Teprve replikací těchto segmentů se vytvoří antigenom, který je jednak replikován a jednak přepisován do RNA, která může být přeložena do proteinů GCP (u genomového segmentu S) a Z (u genomového segmentu L).

### 9.5.3

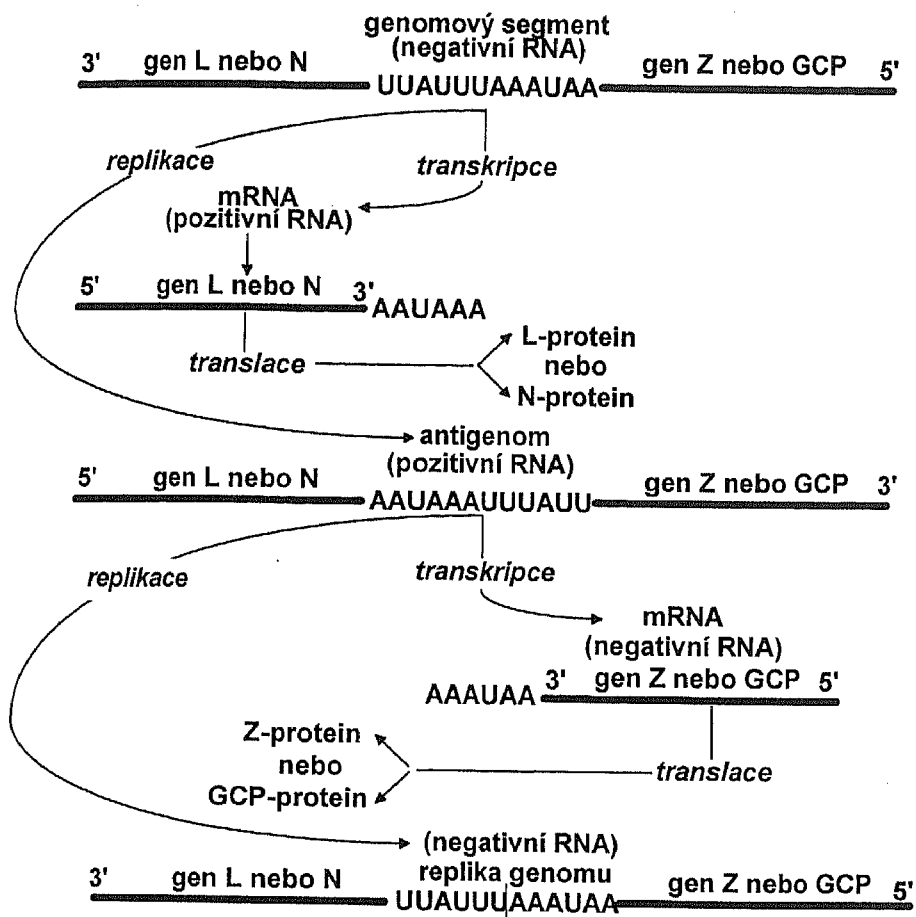
#### Viry s negativní nesegmentovanou RNA

Negativní nesegmentovanou RNA se vyznačují tyto čeledi virů:

- ◆ **Rhabdoviridae (rabdoviry),**
- ◆ **Paramyxoviridae (paramyxoviry),**
- ◆ **Filoviridae (filoviry).**

Molekulární mechanismus reprodukce těchto virů v hostitelských buňkách vysvětlíme jen velmi stručně na viru vztekliny (virus lysy), který patří do čeledi *Rhabdoviridae*.

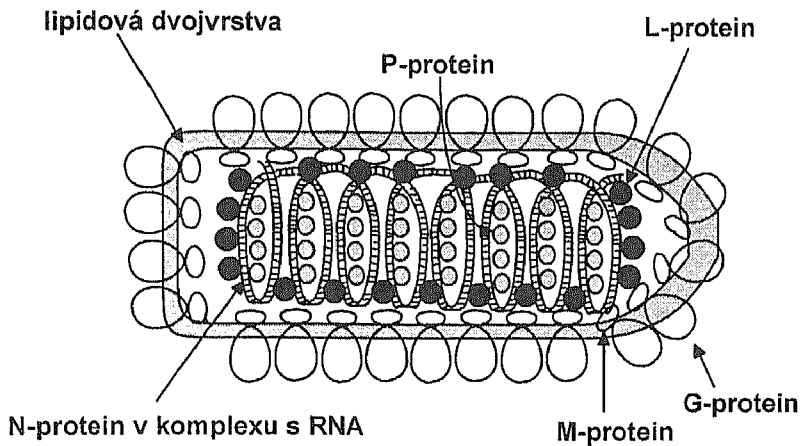
**SLOŽENÍ VIRIONU RABDOVIRŮ.** Struktura virionu rabdovirů je sche-



Obr. 441  
Schematický výklad exprese negativní dvojsmyslné RNA  
na příkladě genomu arenavirů

maticky uvedena na obr. 442, z něhož je zřejmé, že složkou virionu jsou kromě negativní helikálně stočené RNA tyto proteiny:

- ◆ **L-protein.** Je složkou nukleokapsidu a má funkci RNA-dependentní RNA-polymerázy, která též zodpovídá za modifikaci virové mRNA čepičkou a za polyadenylaci.
- ◆ **P-protein.** Je složkou nukleokapsidu. V jednom virionu je zhruba 900 jednotek tohoto proteinu. Pravděpodobně působí jako kofaktor při transkripci.
- ◆ **N-protein.** Je složkou nukleokapsidu. V jednom virionu je zhruba 1 500 jednotek tohoto proteinu. Váže se na RNA a zodpovídá za kondenzaci virového genomu ve virionu.



Obr. 442  
Struktura virionu rabdovirů

- ◆ **M-protein.** Je to matricový protein, který se váže k vnitřní straně virové membrány. Uplatňuje se při sestavování virionů.
- ◆ **G-protein.** Transmembránový glykoprotein, který při infekci hostitelské buňky interaguje s její membránou. Zprostředkovává adsorpci virionů k plazmatické membráně hostitelské buňky.

*Jelikož genom viru je negativní RNA a není na 5'-a 3'-konci upraven, nemůže být překládán.*

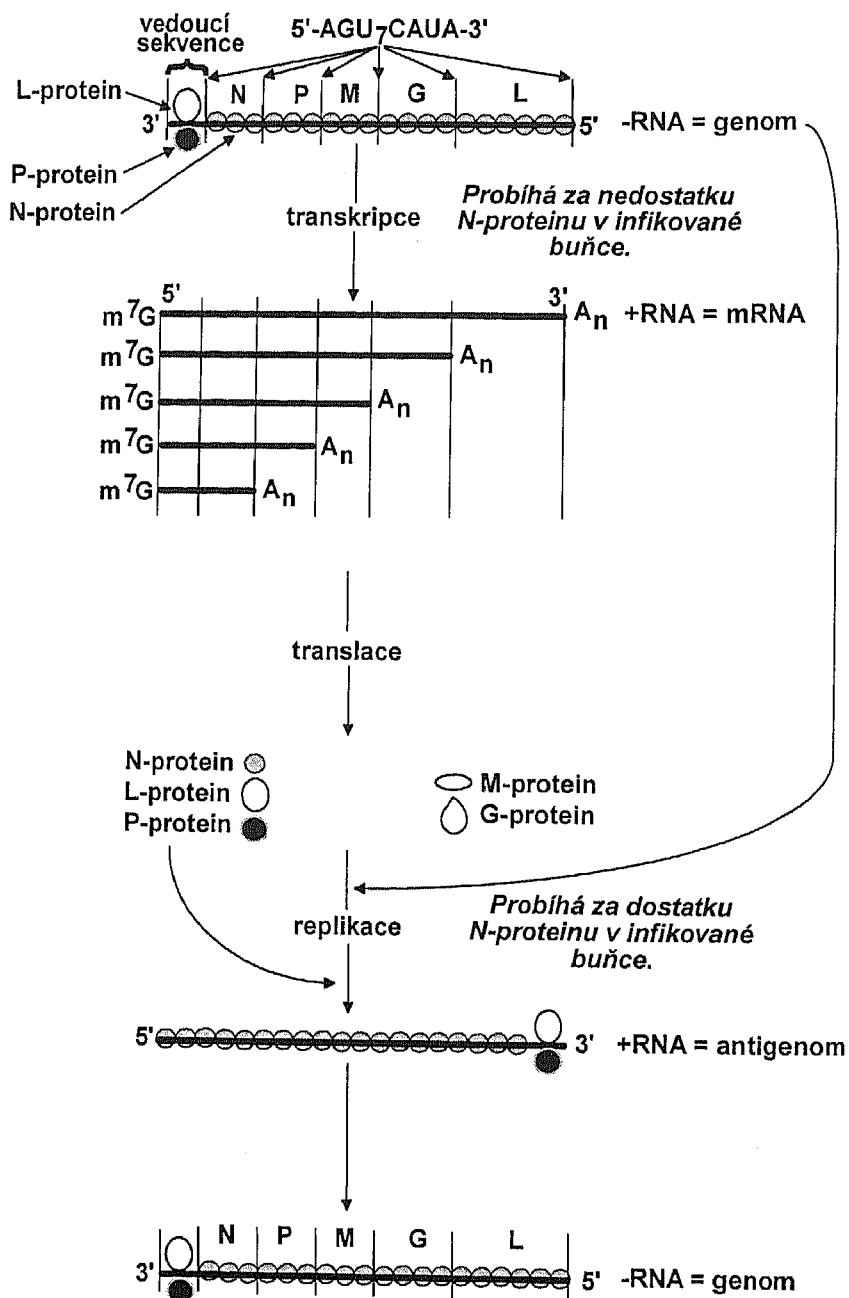
**EXPRESE GENOMU RABDOVIRŮ.** Transkripce virového genomu začíná na 3'-konci genomu (obr. 443). Zde se nachází jediné **iniciační místo** pro syntézu RNA. Nejdříve se syntetizuje jen krátká RNA, která je komplementární k vedoucí sekvenci virového genomu. **Vedoucí sekvence slouží jen pro syntézu krátké RNA, která není upravována čepičkou na svém 5'-konci ani polyadenylována na 3'-konci; nekóduje tedy žádný protein.** Tvoří se však ve velkém množství, přechází do jádra, kde zastavuje transkripci hostitelské buňky, a tím i syntézu buněčných proteinů a replikaci. Od té chvíle slouží metabolismus buňky výlučně reprodukci viru. Transkripce vedoucí sekvence genomu se zastavuje na jejím konci.

Mezi geny genomu rabdovirů se nacházejí mezerníky, které mají tento sled nukleotidů s významem polyadenylačního signálu:

**5'-AGU,CAUA-3'.**

*RNA-dependentní RNA-polymeráza je nepřepisuje. Přejde však do dalšího genu (nejdříve genu N), kde zahájí novou transkripci.*

Na uvedených sekvencích mezerníků transkripce skončí a uvolněný 3'-



Obr. 443  
Schéma exprese genomu rabdovirů



-konec mRNA se polyadenyluje (obr. 443). (Poznámka: význam polyadenylačního signálu pro ukončení transkripce v eukaryotické buňce je uveden na str. 356).

Průchod RNA-dependentní RNA-polymerázy mezerníky a zahájení transkripce dalšího genu nejsou ve všech případech úspěšné, což se projevuje postupným snižováním počtu molekul mRNA jednotlivých genů směrem k 5'-konci přepisovaného genomu. Jelikož mRNA-sekvence se překládají od 3'-konce směrem k 5'-konci, *vyskytují se v infikované buňce v největším množství molekuly N-proteinu, zatímco molekuly L-proteinu v nejnižším.*

**VÝZNAM N-PROTEINU.** Přepnutí z transkripčního modu, vyznačujícího se syntézou jednotlivých monogenních molekul mRNA, na modus replikace, vyznačující se syntézou jedné nepřetržité molekuly RNA působící jako mezi-produkt pro tvorbu nového virového genomu v negativní orientaci, závisí na množství molekul N-proteinu vytvořených v buňce. N-protein totiž interaguje se sekvencemi mRNA během jejich syntézy a zabraňuje, aby se transkripce na koncích genů přerušila, takže pak vzniká jedna nepřetržitá RNA-molekula v pozitivní orientaci, která působí jako antigenom. Na jejím 3'-konci začíná syntéza nových genomů s negativní orientací, které opět vchází do komplexu s N-proteiny. P- a L- proteiny se vážou na negativní RNA a tvoří nukleokapsidy, které v dalším kroku interagují s M-proteiny.

Naložením M-proteinů na nukleokapsidy je indukována kondenzace nukleokapsidu do helikální struktury.

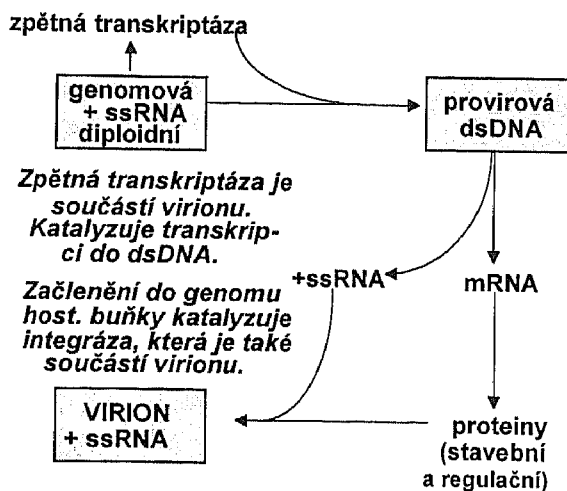
## 9.6

## RNA-VIRY SE ZPĚTNOU TRANSKRIPTÁZOU

RNA-viry se zpětnou transkriptázou se řadí do čeledi *Retroviridae*, která se dělí do těchto rodů:

- ◆ savčí viry typu B,
- ◆ savčí viry typu C,
- ◆ ptačí retroviry typu C,
- ◆ retroviry typu D,
- ◆ retroviry BLV - HTLV,
- ◆ Lentivirus,
- ◆ Spumavirus.

Společnou vlastností těchto virů je, že jejich genom je tvořen pozitivní RNA, která se zpětnou transkriptázou (RNA- dependentní DNA-polymeráza) v hostitelské buňce přepisuje do DNA, integrující se do genomu hostitelské buňky, odkud jako provirová DNA je opět přepisována do pozitivní RNA, z níž část má funkci genomové RNA a část působí jako mRNA. Genomová RNA je diploidní (nachází se v nukleokapsidu viru ve dvou identických kopiích) a neslouží jako mRNA, ale jen jako matrice pro zpětnou transkripci do DNA (obr. 444).



Obr. 444

Základní strategie replikace a exprese genomu RNA-virů se zpětnou transkriptázou

Zpětná transkriptáza se nachází v nukleokapsidu viru. Každý virion obsahuje dvě molekuly tohoto enzymu.

Výše uvedené rody retrovirů se vyznačují specifickými vlastnostmi, kterými se navzájem liší. Jejich popis se vymyká z rámce této knihy. V této kapitole podrobněji rozvedeme, co je pro všechny uvedené rody společné. Je to již zmíněná zpětná transkripce a integrace jejich genomu do genomu hostitelské buňky. Výrazně se touto vlastností vyznačují viry HIV, které podrobněji - již také vzhledem k jejich významu - popíšeme.

## 9.6.1

### Virus HIV-1

#### 9.6.1.1

#### Virus HIV-1 ve vztahu k AIDS

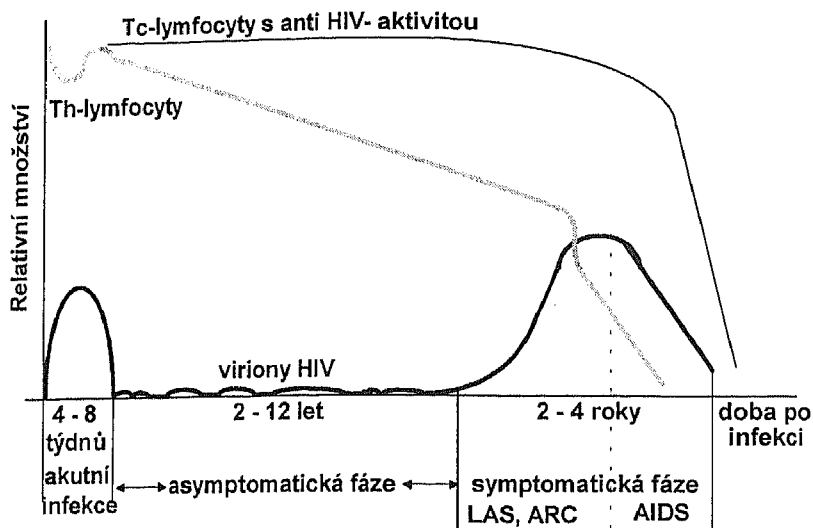
Viry HIV patří do rodu *Lentivirus*. Způsobují chorobu označovanou zkratkou **AIDS** (čti ejds) = **aquired immune deficiency syndrome** nebo **acquired immunodeficiency syndrome** (syndrom získaného selhání imunity). Rozeznávají se dva taxonomické druhy virů, které způsobují toto onemocnění: **virus HIV-1**, izolovaný v roce 1983 ve střední Africe a **HIV-2**, který byl izolován v roce 1986 v západní Africe. HIV je zkratka z angl. *human immunodeficiency virus*. *Genomy obou druhů HIV jsou jen z 50% homologické.*

**CHARAKTERISTIKA AIDS.** Průběh onemocnění způsobeného virem HIV je znázorněn graficky na obr. 445, z něhož je zřejmé, že patogenéza tohoto viru se v infikovaném organismu rozvíjí v těchto stadiích s letálním koncem:

**1. Primární infekce virem HIV.** Primární infekce probíhá často inaparentně. Jen ve 20 až 30 % virem postižených jedinců je spojena se symptomy podobnými chřipce nebo mononukleóze a lze ji charakterizovat jako **akutní infekci**. V této fázi trpí pacient bolestmi hlavy, svalů a krku, nízkou nebo vysokou horečkou. Vyskytuje se též nesvědivá makulární (skvrnitá) erytematózní (erytém je červené zbarvení kůže podmíněné nejčastěji zánětem) vyrážka, která je mezi těmito symptomy velmi cenným diagnostickým znakem, jelikož podle ní lze odlišit primární infekci virem HIV od ostatních typů infekce. Nesnadno se však diagnostikuje.

Dochází k poklesu Th-lymfocytů. *Protilátky proti viru HIV se však v této fázi infekce netvoří.*

**2. Asymptomatická latentní (perzistentní) fáze.** Navazuje na předchozí



Obr. 445  
Průběh patogeneze viru HIV

fázi. Lze v ní prokázat u pacientů protilátky proti viru HIV. Volné viriony HIV a buňky obsahující tyto viriony se v krvi vyskytují jen zřídka. Hostitele viru HIV v tomto období lze charakterizovat jako **asymptomatické nositele viru HIV**, neboť se nevyznačují žádnými klinickými příznaky onemocnění AIDS. Jsou však vzhledem k viru HIV séropozitivní.

Na latentní fázi může na několik týdnů nebo let navazovat **lymfadenopatická fáze (LAS)**, která může přerůst do fáze označované jako **komplex příbuzný s AIDS (zkr. ARC)** vyznačující se horečkou, nočním pocením, zráto na váze a příležitostně začínající oportunní infekcí, jako je např. **kandidióza** (onemocnění vyvolané kvasinkou rodu *Candida*). Protilátky specifické proti viru HIV jsou však v hostiteli přítomny a počet Th-lymfocytů značně poklesne.

**3. Symptomatická fáze** neboli **fáze AIDS**. Vyznačuje se úplným propuknutím AIDS. V tomto období dochází k rychlému poklesu množství Th-lymfocytů a také k poklesu Tc-lymfocytů s protivirovou aktivitou. V důsledku toho dochází k silnému snížení imunity postiženého organismu, který je pak náchylný k oportunní infekci. Navíc v tomto stádiu dochází v krvi k prudkému vzestupu počtu virionů HIV. Tyto viriony představují novou sérologickou variantu HIV vzniklou mutací, která se liší od původní, kterou byl pacient infikován. Je rezistentní k imunitnímu systému hostitele, silně virulentní a vyznačující se rychlou kinetikou replikace. Organismus se takto stává naprosto bezbranný vůči infekci a navíc náchylný k oportunní infekci. **Oportunní infekce** je označení pro infekce, které normálně jsou nepatogenní nebo jen omezeně patogenní.

Onemocnění oportunní infekcí je pro AIDS zvláště charakteristické. Člověk onemocní touto infekcí v důsledku nedostatečnosti svého imunitního systému vyvolané virem HIV. Nejčastěji to bývají tato onemocnění:

- ◆ pneumonie vyvolaná prvokem *Pneumocystis carinii*;
- ◆ toxoplazmóza vyvolaná prvokem *Toxoplasma gondii*;
- ◆ bronchopneumonie, abscesy v mozku a v ledvinách vyvolané plísní *Aspergillus*, stomatitida vyvolaná kvasinkou rodu *Candida*, meningitida vyvolaná druhem *Cryptococcus neoformans*;
- ◆ onemocnění vyvolaná salmonelami;
- ◆ onemocnění vyvolaná viry jako je virus *herpes simplex* a *herpes zoster*;
- ◆ pneumonitida (zánětlivé poškození plicního intersticia způsobující zhoršený přísun kyslíku do organismu a výraznou dušnost); je vyvolána viry.
- ◆ Tuberkulóza způsobovaná atypickými mykobakteriemi *Mycobacterium avium* a *M. kansasii*.

Všechna uvedená onemocnění mají v důsledku selhání imunitního systému vážný průběh. Kromě těchto infekcí však pacient trpí dalšími chorobami. Jsou to:

- ◆ Průjem a jiné gastrointestinální poruchy, které mohou trvat až čtyři týdny.
- ◆ Akutní poruchy CNS (např. encefalitida).
- ◆ Letargie a malátnost, která může trvat několik měsíců.
- ◆ Nádorová onemocnění (Kaposiho sarkom, Burkittův lymfom, invazivní cervikální karcinom aj.)

**BUŇKY VNÍMAVÉ K VIRU HIV.** Virus HIV je polytrofní; infikuje různé typy buněk. Nejvyšší množství tohoto viru však produkují Th-lymfocyty, které jím byly napadeny. V odborných studiích se uvádí, že kolem 50 různých typů buněk je vnímavých k viru HIV. Zde uvedeme jen několik příkladů:

- ◆ Makrofágy, které po infekci virem HIV slouží jako jeho rezervoáry, neustále produkují viriony HIV.
- ◆ Buňky v lymfoidních tkáních (především diferencované makrofágy) jsou prvním místem replikace HIV, který se nejdříve nachází ve sdružení s folikulárními dendritovými buňkami (pravděpodobně neinfikovanými). Těmito buňkami je pak předáván aktivovaným Th-lymfocytům v lymfoidní tkáni.
- ◆ V mozku většina buněk, která byla infikována virem HIV, jsou také

makrofágy a buňky mikrogliové tkáně. Avšak infikovány mohou být též astrocyty, oligodendrocyty a buňky endotelu kapilár.

**PŘENOS VIRU HIV.** Lze jej stručně v hlavních bodech popsat takto:

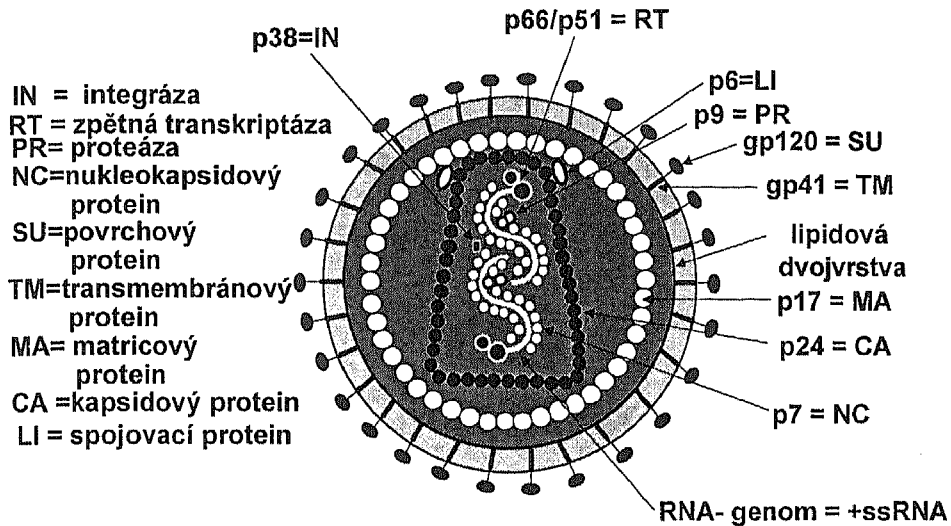
- ◆ Riziko infekce virem HIV se zvyšuje s jeho množstvím v tělních tekutinách a s množstvím kontaktů jedince s těmito tekutinami.
- ◆ Jako zdroj přenosu infekčních virionů HIV slouží především krev, jelikož jich obsahuje nejvíce.
- ◆ Buňky v tekutinách genitálií, infikované virem HIV, jsou hlavním zdrojem jeho přenosu pohlavní cestou. Infekce při této cestě přenosu zahrnuje mukózní buňky střev nebo lymfocyty a makrofágy vyskytující se v konečníku. U žen mohou být infikovány buňky cervixu nebo endometria.
- ◆ Sliny nejsou hlavním zdrojem přenosu, jelikož obsahují látky inhibující HIV. Slzy, moč, pot a ostatní tělní tekutiny nejsou zdrojem virové infekce.
- ◆ Přenos HIV z matky na dítě spočívá v přímé infekci fetu nebo v infekci během porodu a vystavení novorozence mateřské krvi a sekretům. Různé faktory však ovlivňují tento způsob přenosu, zvláště je to množství viru v matce v době porodu. Mateřské mléko může být také zdrojem přenosu HIV na novorozence. Obsahuje však látky blokující infekci virem. Antiretrovirální terapie a jiná preventivní opatření snižují riziko přenosu HIV z matky na novorozence.

**ROZŠÍŘENÍ A ŠÍŘENÍ VIRŮ HIV-1 A HIV-2.** Virus HIV-1 je rozšířen hlavně na Pobřeží slonoviny, HIV-2 v Senegal, Gambii a Guinei. Celá střední a jižní Afrika je promořena oběma viry. Šíření obou virů lze charakterizovat jako pandemii, neboť zachvacuje již více světadílů, šíří se v USA i v Evropě. *Počet osob postižených nemocí AIDS se zvyšuje exponenciálně.*

### 9.6.1.2

#### Struktura genomu viru HIV-1

**STRUKTURA VIRIONU HIV-1.** Virion viru HIV-1 je kulovitého vzhledu, jehož strukturu si lze představit podle schématu příčného řezu virionem uvedeného na obr. 446. Průměr virionu činí 110 nm. Vnější vrstvu nukleokapsidu, který má tvar kužele (homole), tvoří protein p24. Uvnitř nukleokapsidu jsou dvě stejné molekuly pozitivní RNA. Na každou z nich se váže jedna molekula zpětné transkriptázy (RT) tvořená proteinem p66 a p51 a molekula integrázy (IN) tvořená proteinem p38, jedna molekula proteázy (PR) tvořená protei-



Obr. 446

## Schéma příčného řezu virionem HIV-1

nem p9 a dále nukleokapsidový (NC) protein p7. Těsně pod lipidovou dvojitou vrstvou se nachází vrstva molekul proteinu p17, která má jednak funkci matrice pro celou virovou strukturu a jednak je důležitá pro zachování integrity virionu.

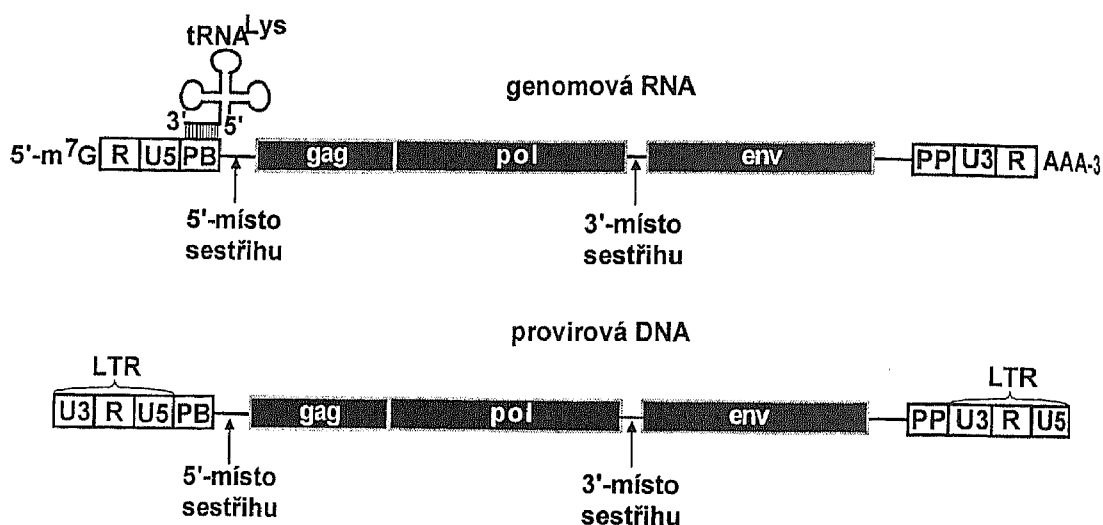
Do lipidové dvojitou vrstvy je zanořen trimer nebo tetramer povrchového (SU) glykoproteinu gp120, který se nachází v 72 kopiích na povrchu virionu. Na gp120 se váže nekovalentně transmembránový (TM) glykoprotein gp41. Glykoprotein gp120 obsahuje vazebná místa pro receptory CD4, které se především vyskytují v povrchu T-lymfocytů.

**GENOM VIRU HIV-1.** Genom viru HIV-1 je tvořen jednořetězcovou pozitivní RNA o průměrné délce 100 nm. Svou stavbou se neliší od genomu ostatních retrovirů. Na 5'-konci je modifikován čepičkou a na 3'-konci je polyadenylován. V blízkosti 5'-konce RNA je sekvence 18 nukleotidů označovaná jako **sekvence PB**, na kterou se váže jedna molekula buněčné tRNA<sup>lys</sup>. Podobně před 3'-koncelem této genomové RNA je polypurinová sekvence označovaná jako **sekvence PP**.

Složkami genomu všech infekčních retrovirů, tedy i genomu viru HIV-1, jsou tři strukturální geny *gag*, *pol* a *env*, které kódují prekurzory funkčních proteinů popsaných dále.

Genom retrovirů, tedy i viru HIV-1, má dvě verze či formy, které se vzájemně liší sekvencemi na 5'- a 3'-konech. Jsou to (obr. 447):

1. **Genomová RNA.** Vzniká transkripcí provirové DNA katalyzovanou



Obr. 447  
Dvě formy genomu viru HIV

*RNA-polymerázou II* hostitelské buňky. Vyznačuje se sekvencemi R-U5 na 5'-konci a sekvencemi R-U3- na 3'-konci.

**2. Provirová DNA.** Vzniká zpětnou transkripcí genomové RNA v hostitelské buňce a integruje se do jejího genomu. Vyznačuje se sekvencemi U3-R-U5 na 5'-konci a na 3'-konci sekvencemi U5-R-U3.

Sekvence U3-R-U5- na 5'-konci a U5-R-U3 na 3'-konci provirové DNA jsou LTR (str. 103). V těchto sekvencích znamená:

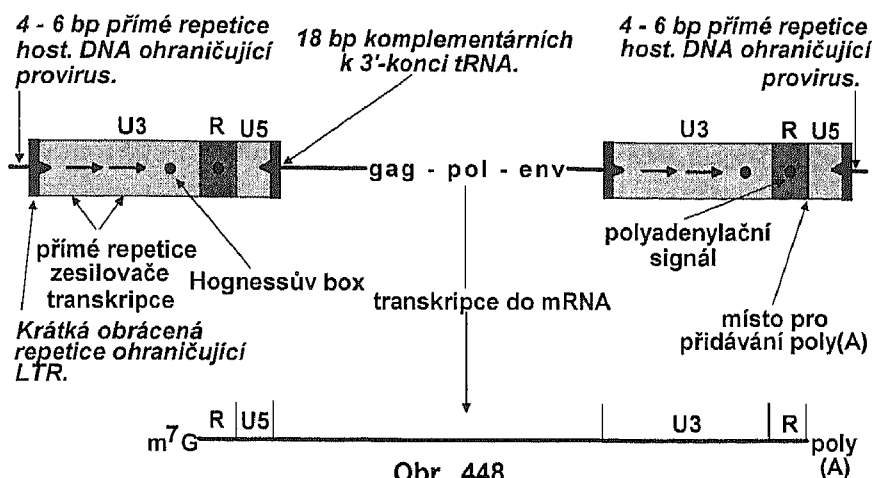
- ◆ R přímou repetici o délce 10 - 80 nukleotidů;
- ◆ U3 a U5 jedinečné sekvence.

Na sekvencích LTR se nacházejí regulační oblasti, které se uplatňují při transkripci provirové DNA. Jsou to v oblasti U<sub>3</sub> dvě přímé repetice zesilovače transkripce a Hognessův box (obr. 448).

Genom viru HIV-1 je však složitější, než jak je uvedeno na obr. 447. Kromě tří genů uvedených na tomto obrázku obsahuje ještě další strukturální geny, které se překrývají s geny *gag*, *pol* a *env* a navzájem. Kódují regulační proteiny, kterými je regulována exprese virového genomu. Na obr. 449 jsou uvedeny exony těchto genů, jejichž prepisy na úrovni mRNA podléhají alternativnímu sestřihu, jehož výsledkem jsou molekuly mRNA překládané do regulačních proteinů.

**GENY VIRU HIV.** Mezi oběma sekvencemi LTR jsou na provirové



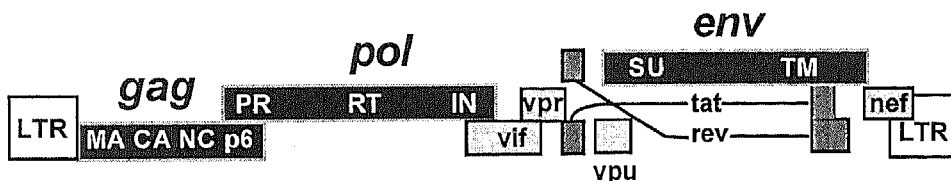


Obr. 448  
Složení sekvence LTR

DNA lokalizovány následující strukturální geny, které kódují proteiny, jež jsou součástí virionu (obr. 449):

- ◆ **Gen gag** kódující Gag-polyprotein p55, který se posttranslačně štěpí na proteiny p17 (MA-protein), p24 (CA-protein), p7 (NC-protein), p6 (LI-protein).
- ◆ **Gen pol** překrývající se prostřednictvím genu **PR** kódujícího *proteázu* s genem **gag**; kóduje větší část polyproteinu p160, která se posttranslačně štěpí na funkční proteiny RT, IN a PR. Sekvence těchto proteinů jsou kódovány genem **pol**.
- ◆ **Gen env** kódující polyprotein p160 (strukturně jiný než předchozí), který se posttranslačně štěpí na funkční proteiny SU a TM.

Dále jsou na genomu viru HIV rozmístěny exony genů, které kódují



*Symbols vif, vpr, vpu, tat, rev a nef jsou označeny exony. Význam ostatních symbolů je vysvětlen na obr. 446 a v textu. Mezery nebo spojnice mezi jednotlivými úseky představují introny.*

Obr. 449  
Schéma překrývání strukturálních genů viru HIV-1 kódujících regulační proteiny

regulační proteiny a překrývají se s genem *pol* a *env*. Tyto proteiny nejsou však složkami virionu. Jsou to:

- ◆ **Protein p9/p14 (Tat-protein)**, který je kódován dvěma exony a v expresi genomu viru HIV-1 působí jako tansaktivátor transkripce.
- ◆ **Protein p14 (Rev-protein)**, který působí jako posttranskripční transaktivátor.
- ◆ **Proteiny Vif, Vpu a Vpr.**

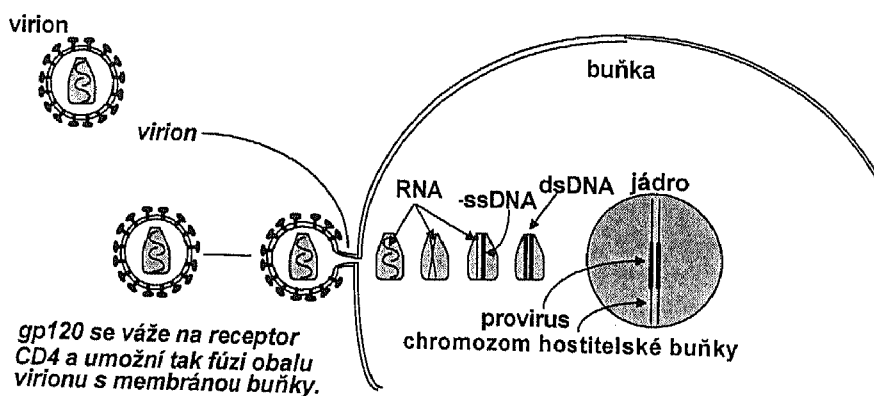
### 9.6.1.3

#### Životní cyklus viru HIV-1

Celý životní cyklus viru HIV můžeme rozdělit do těchto hlavních fází :

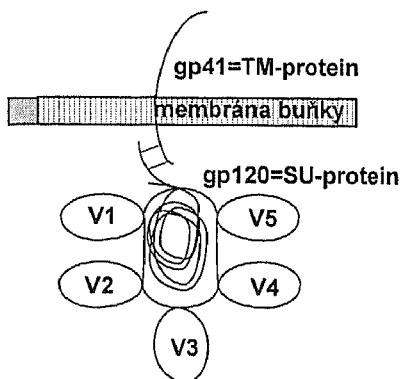
**1. Infekce hostitelské buňky virionem HIV.** Začíná tím, že virion interaguje prostřednictvím gp120 s CD4-receptory na Th-lymfocytech (obr. 450). Touto interakcí dochází ke konformační změně v CD4-receptoru, což má za následek nejdříve fúzi virionu s buňkou a pak jeho vstup do buňky. Protein gp120 (=SU-protein) se kovalentně váže na gp41 (=TM-protein) (obr. 451). Vlákničitá část proteinu gp120 má konstantní primární strukturu a přechází v pět smyček neboli domén (V1, V2, V3, V4 a V5) které, co do primární struktury, jsou značně variabilní a vyčnívají z membrány buňky. Na jednu, tj. V3, se váže protilátka při imunitní odpovědi organismu na infekci virem HIV. Avšak vzhledem k velké variabilitě uvedených domén nelze získat stabilní vakcínu proti viru HIV.

Receptor CD4 vyčnívá taktéž z větší části z membrány buněk a sestává ze



Obr. 450

Infekce buňky virionem HIV a přechod jeho RNA-genomu do provirového stavu



Obr. 451

## Přibližné schéma SU- a TM-proteinů

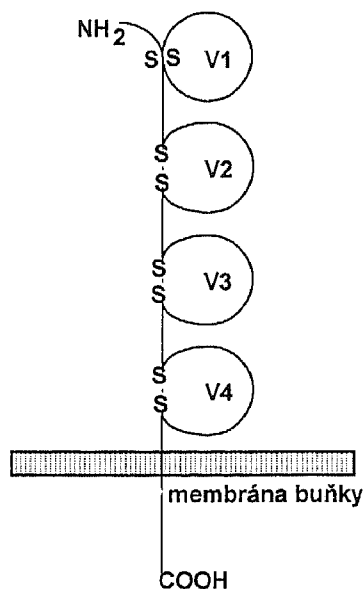
čtyř domén, V1 až V4 (obr. 452). Protein gp120 reaguje s doménou V1. Infekce buňky (Th-lymfocytu nebo makrofága) probíhá v zásadě v těchto krocích:

- ◆ Virion se přiblíží k receptoru hostitelské buňky.
- ◆ Protein gp120 se naváže na receptor.
- ◆ Spojení s receptorem CD4 pak vede ke změně konformace v gp120 a gp-41, kterou se navodí oddělení gp41 od gp120. Protein gp41 se zanoří do membrány hostitelské buňky.
- ◆ Jelikož gp41 je fúzogenní, navodí fúzi membrány buňky s membránou virionu HIV.

Do buňky (Th-lymfocytu) však vstoupí toliko nukleokapsid, tj. genom viru obalený CA-proteinem (obr. 450). Kapsid zůstává ještě během dalších procesů zachován jako zvláštní struktura, i když pravděpodobně vlivem proteázy PR je natolik změněn, že propouští nukleotidy. Obsahuje však vedle CA-proteinů zpětnou transkriptázu (RT), proteázu (PR) a integrázu (IN).

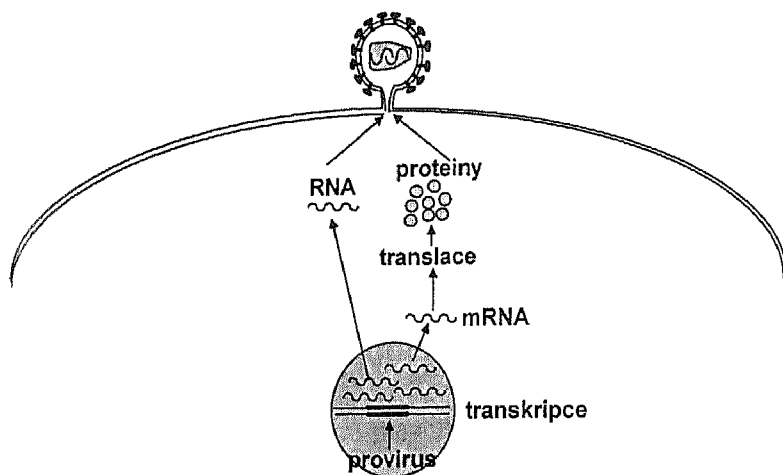
**2. Zpětná transkripce.** Uskutečňuje se v nukleokapsidu a je katalyzována zpětnou transkriptázou, která v nukleokapsidu tvoří komplex s genomovou RNA. Zpětnou transkripcí se vytvoří nejdříve -ssDNA a pak dsDNA se sekvencemi LTR (obr. 450).

**3. Přejít do provirového stavu.** Virový genom přepsaný zpětnou transkriptázou do dsDNA zůstává i nadále ve spojení se složkami nukleokapsidu. Pravděpodobně působením fosforylované formy proteinu p17 (MA) je dopraven do jádra, kde pak probíhá za katalytického účinku integrázy jeho začlenění do genomu hostitelské buňky (Th-lymfocyt) (obr. 450). DNA vzniklá



Obr. 452

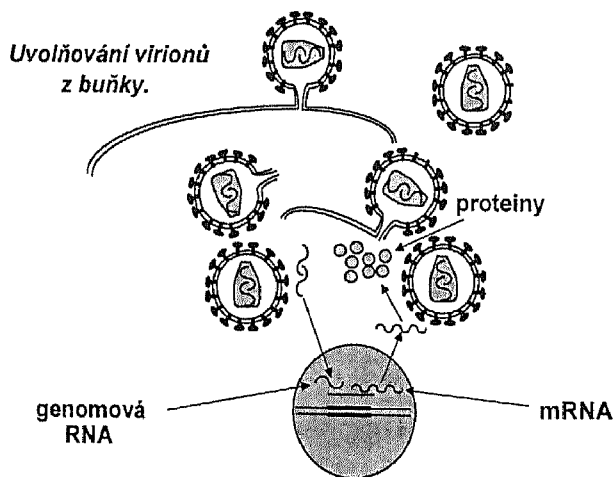
## Schéma receptoru CD4



Obr. 453  
Expres proviru HIV-1

zpětnou transkripcí RNA-genomu viru HIV a začleněná do chromozomu Th-lymfocytu představuje provirový stav (provirus) genomu viru HIV. Zdá se, že místa začlenění jsou náhodná. Provirový stav je však nutnou podmínkou pro transkripci genů viru HIV a tvorbu nových virionů.

4. Produkce nových virionů HIV. Přechod na provirový stav je základem latence viru HIV v Th-lymfocytu. Transkripce proviru buď neprobíhá vůbec, nebo jen velmi slabě v důsledku její negativní regulace. Pokud



Obr. 454  
Aktivace proviru, lyze buňky a produkce virionů

transkripce slabě probíhá, tvoří se v malém množství viriony, které buňku opouštějí, aniž se přitom buňka poškozuje (obr. 453). *K silné transkripci provirových genů dochází až po aktivaci Th-lymfocyту.* Po aktivaci transkripce se tvoří viriony HIV ve velkém množství a uvolňují se přes membránu buňky. Poškozená membrána buňky nestačí regenerovat, což vede k vytékání obsahu buňky vně a k její lyzi (obr. 454).

#### 9.6.1.4

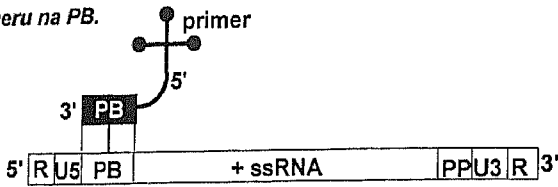
### Zpětná transkripce genomu viru HIV-1 a jeho integrace do genomu infikované buňky

**MECHANIZMUS ZPĚTNÉ TRANSKRIPCE GENOMU HIV.** Zpětná transkripce začíná těmito kroky, které jsou schematicky znázorněny na obr. 455a, b, c:

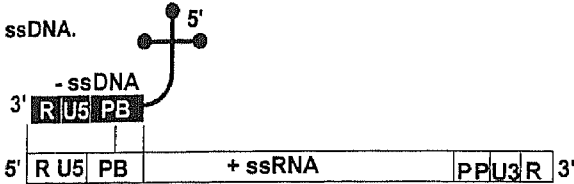
1. Začíná od primeru, který je tvořen 3'-konce m tRNA vázajícím se k místu PB na genomové + ssRNA.
2. Transkripce pokračuje od primeru přes sekvence U5 a R za tvorby -ssDNA z deoxyribonukleotidů.
3. Úsek +RNA, který sloužil jako matrice pro syntézu negativní ssDNA, se postupně odbourává RNAázou H.
4. Dochází k tzv. **prvnímu přeskoku**, což znamená přesun primeru z 5'-konce +ssRNA na její 3'-konec tím, že se R-sequvence primeru a 3'-konec +ssRNA spárují (jsou komplementární).
5. Syntéza negativního ssDNA-řetězce pokračuje až k místu PB na pozitivním ssRNA-řetězci, které se také přepíše do -ssDNA-řetězce.
6. Během syntézy negativního ssDNA-řetězce se odbourává již přepsaný úsek matricové pozitivní ssRNA. Neodbourává se jen segment PP, neboť bude sloužit jako primer k syntéze pozitivního ssDNA-řetězce. To, že se neodbourává, ačkoli ostatní úseky pozitivního RNA-řetězce jsou odbourávány, se vysvětluje tím, že je k účinku RNAázy H rezistentní vlivem jeho polypurinové sekvence.
7. Od nového primeru (segmentu PP, který nebyl rozložen RNAázou H) se syntetizuje +ssDNA-řetězec, jehož matricí je již vytvořený negativní řetězec.
8. RNAáza H odstraní primer, který je tvořený transferovou RNA na PB-místě, které se takto uvolní. Proto může dojít k **druhému přeskoku**, který je **umožněn spárováním PB-míst pozitivního a negativního ssDNA-řetězce**.
9. a 10. Od 3'-konců ssDNA obou řetězců pokračuje syntéza za linearizace a tvorby dsDNA se sekvencemi LTR na obou koncích.

Zpětná transkripce má značný význam pro genetickou variabilitu retrovi-

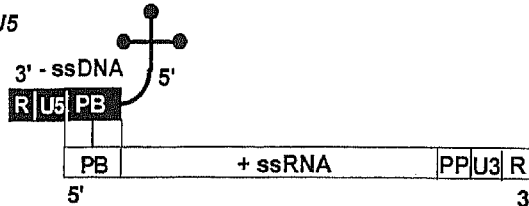
## 1. Vazba primeru na PB.



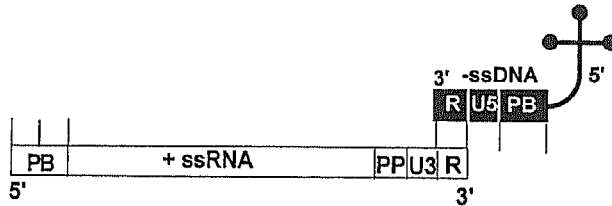
## 2. Začátek syntézy - ssDNA.



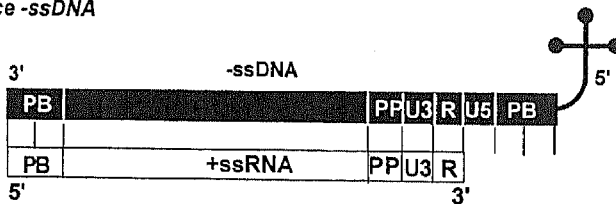
## 3. Odbourání sekvence R-U5 z +ssRNA katalyzované RNAázou H.



## 4. První přeskok.



## 5. Elongace řetězce -ssDNA



Obr. 455a

## Mechanismus zpětné transkripce u retrovirů

ru. Je procesem, který probíhá s chybami, které zpětná transkriptáza neopravuje, jelikož se nevyznačuje reparační katalytickou aktivitou. Jinými slovy, vzniklé mutace zůstávají pak neopraveny. Genetická variabilita zapříčiněná touto skutečností se ještě zvýší, když vezmeme v úvahu fakt, že mezi oběma molekulami, které tvoří genom viru, může probíhat rekombinace.

## 6. Odbourání ce primeru PP p



## 7. Začátek synt



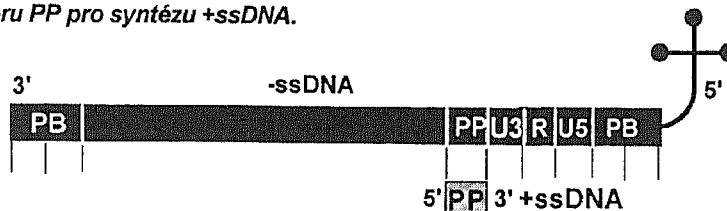
## 8. Odstranění p a druhý přes

## 9. Linearizace.

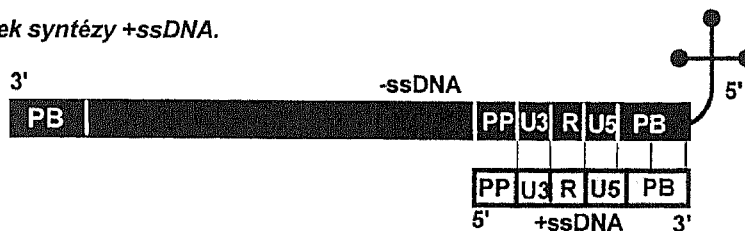


M

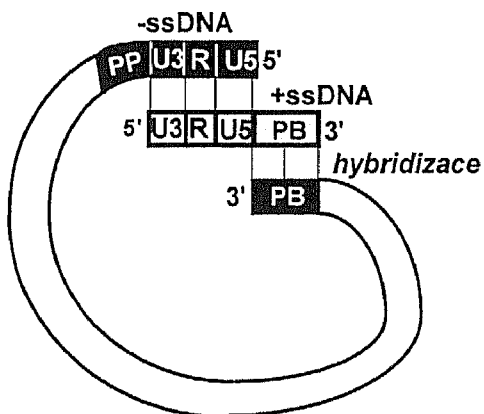
6. Odbourání celé +ssRNA RNAázou H kromě primeru PP pro syntézu +ssDNA.



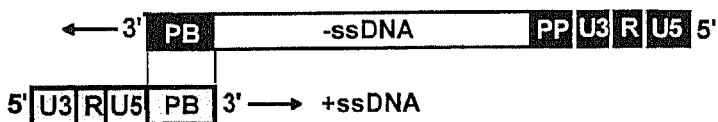
7. Začátek syntézy +ssDNA.



8. Odstranění primeru (tRNA), hybridizace PB-sekvencí a druhý přeskok.

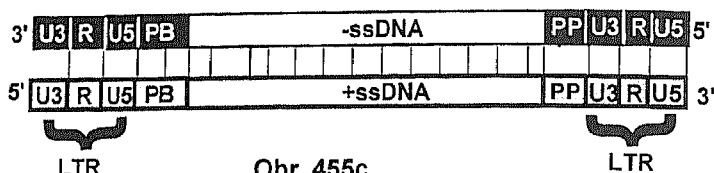


9. Linearizace.



Obr. 455b  
Mechanismus zpětné transkripce u retrovirů

## 10. Tvorba sekvencí LTR.



Obr. 455c  
Mechanismus zpětné transkripce u retrovirů

**MECHANIZMUS PŘECHODU GENOMU VIRU HIV NA PROVIROVÝ STAV.** Dvouřetězcová DNA, která je produktem zpětné transkripce *se začleňuje do chromozomu hostitelské buňky (Th-lymfocyty)* jako lineární DNA a nikoliv jako kružnicová, jak se původně předpokládalo. Jakmile se zpětnou transkripcí vytvoří, přechází ještě v komplexu s nukleokapsidovými proteiny do jádra. Součástí tohoto komplexu je kromě zpětné transkriptázy a RNAázy H ještě integráza. Tento enzym katalyzuje začlenění dsDNA vytvořené zpětnou transkripcí do genomu hostitele (původně se předpokládalo, že zpětná transkriptáza katalyzuje i tento proces). Proces integrace dsDNA katalyzovaný integrázou pak probíhá v těchto krocích (obr. 456):

1. Integráza odstraní dva nukleotidy z 3'-koců virové DNA, takže 5'-konce budou přečnívat.

2. Cílové sekvence jsou tvořeny 4 až 6 nukleotidy a jsou také integrázou štěpeny za odstranění dvou nukleotidů na 3'-kocích a vzniku přečnívajících 5'-koců.

3. Přečnívající konce cílové sekvence se spojí s přečnívajícími konci virové DNA. Oba nespárované dinukleotidy AC na 5'-kocích virové dsDNA se pravděpodobně odstraní reparačními mechanismy hostitelské buňky. Stejnými mechanismy se zaplní i mezery vzniklé v cílových sekvencích.

*Konečným produktem integrace je provirus, který je na obou koncích ohraničen nukleotidy hostitelské DNA.*

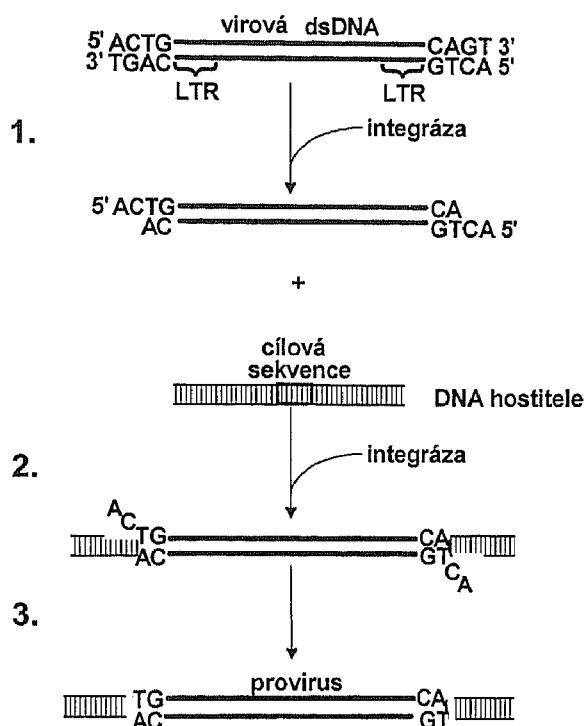
*Integrace genomu viru HIV do genomu hostitelské buňky je základním předpokladem pro jeho expresi (transkripci a translaci).*

## 9.6.1.5

## Exprese genomu viru HIV-1 v infikované buňce

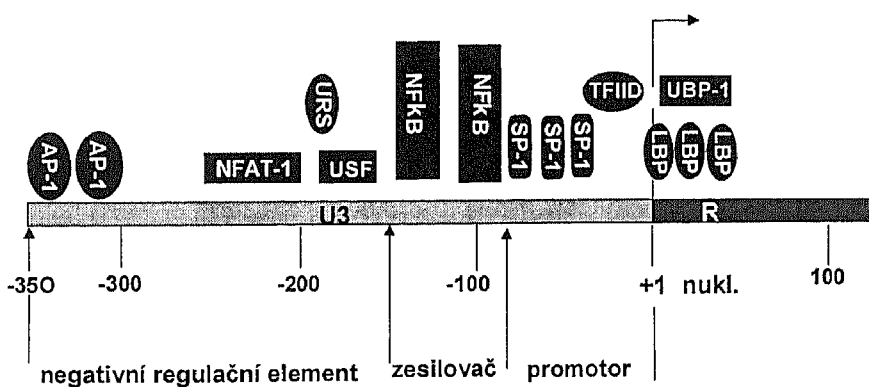
**OBLASTI REGULUJÍCÍ TRANSKRIPCI PROVIRU HIV.** Transkripce proviru HIV je řízena z regulačních oblastí, které jsou umístěny ve složce U3 sekvence LTR. Jsou to (obr. 457):





Obr. 456

Integrace virové dsDNA vzniklé zpětnou transkripcí



Obr. 457

Regulační oblasti řídící transkripci proviru HIV

- ◆ **Promotor**, který se nachází v rozmezí +1 až -79. V promotoru je Hognessův box, na který se váže transkripční faktor **TFIID** a na něj pak RNA-polymeráza II hostitelské buňky. Dále součástí promotoru jsou tři elementy, ke

kterým se váže obecný transkripční faktor SP1 kódovaný hostitelskou buňkou a urychlující proces iniciace transkripce.

◆ **Zesilovač transkripce**, na který se vážou dvě molekuly transkripčního faktoru NF. κB. *Vazbou tohoto faktoru na zesilovač transkripce se mnohonásobně zvýší rychlost transkripce proviru.* Th-lymfocyt začíná syntetizovat NF.κB až po aktivaci. Indukce aktivity promotoru zesilovačem transkripce se tedy uskutečňuje jako výsledek reakce zesilovače s transkripčním faktorem NF.κB.

*Většina transkripčních faktorů uvedených na obr. 457 je potřebná k zajištění bazální transkripce. Rychlost transkripce se mnohonásobně zvýší teprve po aktivaci Th-lymfocytů, jejímž výsledkem je produkce transkripčního faktoru NF.κB, který se váže na zesilovač transkripce.*

**TRANSKRIPCE PROVIRU HIV.** Transkripce proviru HIV se uskutečňuje v jádře hostitelské buňky. Do primárního transkriptu je RNA-polymerázou II Th-lymfocytu přepisován celý genom proviru HIV. Primární transkript pak podléhá běžným posttranskripčním úpravám (m<sup>7</sup>G, polyadenylace). Pokud molekuly primárního transkriptu nejsou sestřihovány, mají funkci **předgenomové RNA**, tj. *RNA, která jako součást virionu HIV bude tvořit jeho genom.* Sestřihem primárního transkriptu, podle toho, zda se sestřih uskuteční v rané nebo pozdní fázi exprese proviru, vznikají tři třídy molekul mRNA (obr. 458):

**1. Molekuly nesestřizené mRNA.** Tato RNA představuje primární transkript proviru HIV, jehož molekuly v případě, že nejsou dále sestřihovány, slouží jako předgenomová RNA, která v počtu 2 molekul přechází do každého sestavovaného virionu, kde pak působí jako jeho genom. Zbylá část molekul primárního transkriptu prochází sestřihem za produkce níže uvedených molekul RNA.

**2. Molekuly mRNA vícenásobně sestřizené.** Jejich délka je asi 2 kb. Produkty jejich sestřihu jsou molekuly mRNA, které se překládají do proteinů Tat, Rev a Nef.

**3. Molekuly mRNA jedenkrát sestřizené.** Jejich délka je asi 4 kb. Produkty jejich sestřihu jsou molekuly mRNA, které se překládají do proteinů Env, Vif, Vpu a Vpr.

Co do množství převládají v hostitelské buňce jedenkrát sestřizené molekuly mRNA.

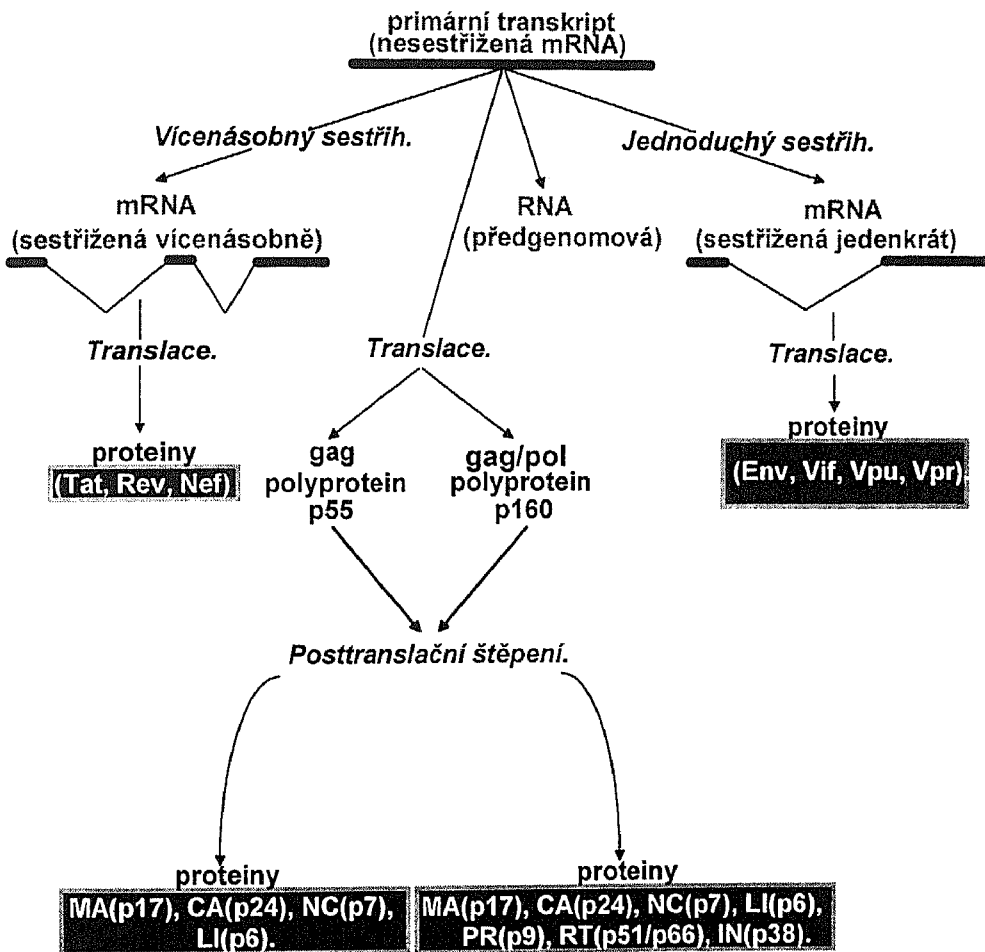
Molekuly mRNA tvořené v buňce infikované virem HIV se též třídí podle toho, zda se vytvořily v rané nebo pozdní infekční fázi. Podle toho:

◆ Molekulami **rané infekční fáze** jsou *molekuly mRNA překládané do proteinů Tat, Rev a Nef.*

◆ Molekulami **pozdní infekční fáze** jsou *molekuly mRNA překládané do polyproteinu gag a gag/pol a do proteinů Env, Vif, Vpu a Vpr.*

*Množství raných a pozdních molekul mRNA exportovaných do cytoplazmy je řízeno Rev-proteinem. Tento protein zprostředkovává export pozdních molekul mRNA do cytoplazmy a omezuje tvorbu raných molekul mRNA.*

**TRANSLACE VIROVÝCH mRNA.** Každá molekula mRNA obsahující přepis genů *gag*, *pol* a *env* se překládá do polyproteinu, který se posttranslačně štěpí na funkční proteiny podle obr. 458. Translační produkty molekul mRNA



Obr. 458

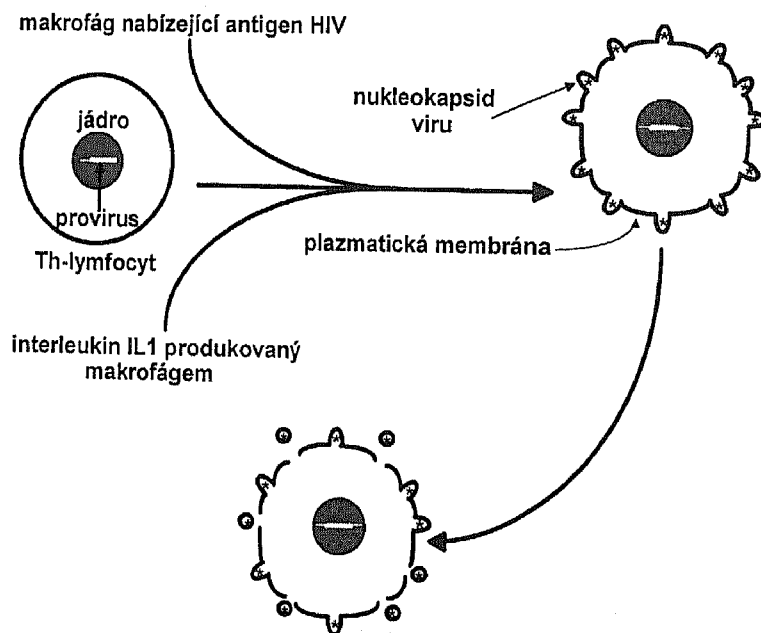
Globální pohled na expresi genomu viru HIV-1

s přepisem genů *tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpr* a *vpr* jsou funkční a nepodléhají posttranslačnímu štěpení.

**REGULACE EXPRESE PROVIROVÝCH GENŮ.** Exprese genů proviru HIV je hlavně regulována proteiny **Tat**, **Rev** a **Nef**. Úloha těchto v regulaci transkripce proviru HIV-1 není ještě dostatečně známa. Jisté však je, že:

- ◆ **Tat-protein** je silný transaktivátor stimulující až stonásobně transkripci všech genů proviru z promotoru LTR.
- ◆ **Rev-protein** zprostředkovává export pozdních molekul mRNA do cytoplazmy.

**AKTIVACE TRANSKRIPCE PROVIRU.** Základním předpokladem aktivace transkripce proviru, která probíhá v Th-lymfocyту, je kontakt Th-lymfocyту s buňkou nabízející antigen viru HIV, a to je makrofág. V souvislosti s virem HIV je nutno si uvědomit, že výsledkem aktivace je mimo jiné produkce transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, který aktivuje jak transkripci genů Th-lymfocytů, tak i



Obr. 459

Produkce virionů HIV v Th-lymfocyту po jeho aktivaci makrofágem

provirových, což vede k masové produkci virionů HIV (obr. 459). Poškozená membrána Th-buněk však nestačí regenerovat a buňky proto odumírají. Jiný důvod pro odumírání těchto buněk je tvorba syncytií, kterou navozuje fúzo-  
genní protein gp41. Virové proteiny gp120 a gp41 se hromadí v membránách buněk, kde umožňují fúzi s ještě neinfikovanými buňkami a jejich infekci. To značně přispívá k šíření viru v organismu.

## 9.7 DNA-VIRY SE ZPĚTNOU TRANSKRIPTÁZOU

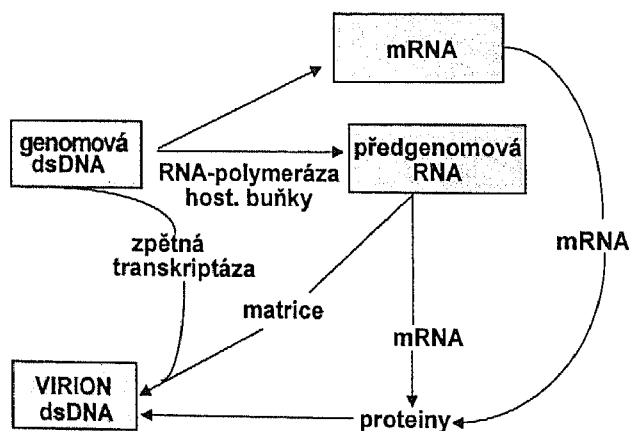
### 9.7.1 Virus HBV

#### 9.7.1.1 Úvodní charakteristika

DNA-viry se zpětnou transkriptázou jsou klasifikovány do čeledi *Hepadnaviridae* (hepadnaviry), která se dělí na rody:

- ◆ **Orthohepadnavirus** s typovým druhem **virus hepatitidy B** neboli **HBV-virus**;
  - ◆ **Avihepadnavirus** s typovým druhem **virus hepatitidy B kachen**;
  - ◆ **Bednavirus** s typovým druhem **virus žluté skvrnivky Commelina**;
  - ◆ **Caulimovirus** s typovým druhem **virus mozaiky kvěťáku**.
- Poslední dva rody patří mezi rostlinné viry.

Z uvedených rodů a druhů probereme v této učebnici toliko virus hepatitidy B. Genom tohoto viru tvoří dsDNA, jejíž negativní řetězec se v hostitelských buňkách přepisuje do pozitivní RNA. Co se týče funkce, rozlišují se dva typy této RNA, a to (obr. 460):



Obr. 460  
Základní strategie replikace a exprese genomu DNA-virů se zpětnou transkriptázou

- ◆ mRNA, která se překládá do virových proteinů,
- ◆ předgenomová RNA, která slouží jako matrice pro zpětnou transkripci do genomové dsDNA.

**ONEMOCNĚNÍ VIREM HBV.** Virus HBV infikuje jaterní buňky a může způsobit akutní hepatitidu. Jeho inkubační doba je zpravidla dva až šest měsíců. U mladistvých a dospělých probíhá 65 % infekce bez symptomů, v 35 % se projeví hepatitidou (zánětem jater). Hlavním příznakem akutní hepatitidy je žloutenka (ikterus). Dalšími symptomy jsou zvětšení jater a jen vzácně narušení krevního obrazu a vyrážka (exantém). Hepatitida trvá zpravidla dva až tři týdny. Jestliže se stav pacienta nelepší, je zde silné podezření, že dochází k chronickému průběhu onemocnění. K tomu dochází asi u 5 až 10 % virem hepatitidy B infikovaných osob. Prenatální infekce vedou v 90 % k chronickým zánětům jater bez akutního onemocnění, u dětí je to asi 50 %. Avšak 60 % chronicky infikovaných zůstává ve stavu asymptomatických, "zdravých" nositelů viru. Symptomatické infekce se histologicky dělí na:

- ◆ chronicky agresivní progredující (postupující) hepatitidu (CAH),
- ◆ chronicky perzistentní hepatitidu (CPH).

CAH může spontánně přejít na CPH. Důsledkem toho je cirhóza jater a jaterní karcinom.

Branou vstupu se virus dostane přes krevní řečiště do jater. Není však cytopatogenní. Narušení jaterních buněk je způsobeno pravděpodobně Tc- pozitivními lymfocyty, které lze prokázat v okolí virem napadených jaterních buněk. Tyto lymfocyty jsou zaměřeny na peptidy pocházející z viru HBV, které jsou v povrchu hepatocytů nabízeny ve sdružení s proteiny MHC I Tc-lymfocytům. Tc-lymfocyty vylučují přitom cytokiny, např. TNF $\alpha$ -faktor, kterými poškozují hepatocyty.

**PŘENOS VIRU HBV.** Virus HBV se přenáší krví, krevními produkty, injekčními jehlami infikovanými krví obsahující virus HBV a pohlavním stykem. Celkově je na Zemi 350 milionů lidí postiženo hepatitidou způsobenou virem HBV. Jeho rezervoárem je výlučně člověk. Je však experimentálně možný i přenos na šimpanze. Viriony HBV se vyskytují v krvi akutně infikovaných osob v různých koncentracích. V 1 cm<sup>3</sup> krve je až 10<sup>9</sup> infekčních virionů a 10<sup>13</sup> neinfekčních. Krev je již před nástupem hepatitidy infekční. Těhotné ženy postižené chronickou hepatitidou nebo ty, které onemocněly akutní hepatitidou před porodem, mohou virus přenést na dítě.

### 9.7.1.2

#### Struktura virionu HBV a jeho genomu

**STRUKTURA VIRIONU HBV.** Existují tři formy virionu HBV. Jsou to (obr. 461):

**1. Daneovy částice.** Tyto viriony jsou infekční a vyznačují se kulovitým tvarem. Jejich genom tvoří částečně dvouřetězcová DNA (viz dále), která je v komplexu s molekulami kapsidového proteinu označovaného jako **dřeňový antigen viru hepatitidy B** neboli **antigen HBcAg**. Tento komplex představuje nukleokapsid Daneových částic a je obalen lipidovou membránou, do níž jsou zanořeny tři formy **povrchového antigenu viru hepatitidy B** neboli **antigenu HBsAg**. Jsou to:

- ◆ velký antigen HBsAg,
- ◆ střední antigen HBsAg,
- ◆ malý antigen HBsAg.

**2. Kulovité neinfekční částice.** Neobsahují genom a do jejich membrány je zanořen toliko malý antigen HBsAg označovaný též jako **australský antigen**.

**3. Vlákňité neinfekční částice.** Taktéž neobsahují genom. Co se týče antigenu HBsAg, obsahují antigen střední, malé množství malého antigenu a nepatrné množství velkého.

*Infekční a neinfekční částice se vyskytují ve velkém množství v krvi osob infikovaných chronicky i akutně.*

**GENOM VIRU HBV.** *Genom viru HBV je dsDNA, která je dvouřetězcová jen částečně (obr. 462). Její tzv. úplný řetězec není uzavřen a je na 5'-konci opatřen koncovým proteinem (TM-protein) vázajícím se na tento řetězec kovalentně. Neúplný řetězec tvoří zhruba 40 až 85 % genomu. Na tento řetězec se nekovalentně váže zpětná transkriptáza. V Daneových částicích je úplný jen negativní DNA-řetězec. Během replikace dochází k transkripci tohoto řetězce. Neúplný řetězec je pozitivní a nekóduje virové proteiny, takže se ani nepřepisuje.*

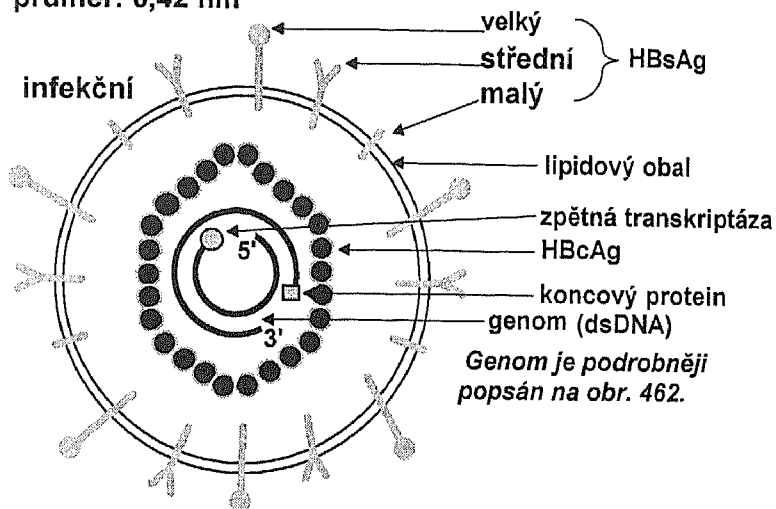
Zvláštností genomu viru HBV je též to, že se v něm nacházejí přímé repetice označované jako **DR1** a **DR2**. Jejich délka je 11 bp a jsou navzájem odděleny 225 bp. Na 5'-konci neúplného řetězce je 17 - 19 nukleotidů dlouhý úsek RNA modifikovaný na 5'-konci čepičkou. Za tímto úsekem následuje sekvence repetice DR2. K 5'-konci úplného negativního řetězce končícího DR1-repeticí se váže **TP-protein**. Asi 20 bp před 3'-koncem úplného řetězce je polyadenylační signál.

**GENY VIRU HBV.** Geny viru HBV jsou lokalizovány do čtyř různých otevřených čtecích rámců, které se více nebo méně překrývají. Jejich primární transkripty (mRNA) mají start v různých místech, končí však na souběžných polyadenylačních signálech. Tyto čtecí rámce jsou (obr. 462):



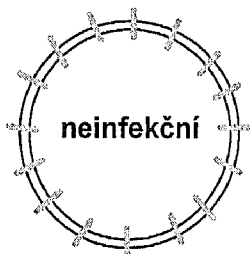
**DANEOVA ČÁSTICE**

průměr: 0,42 nm



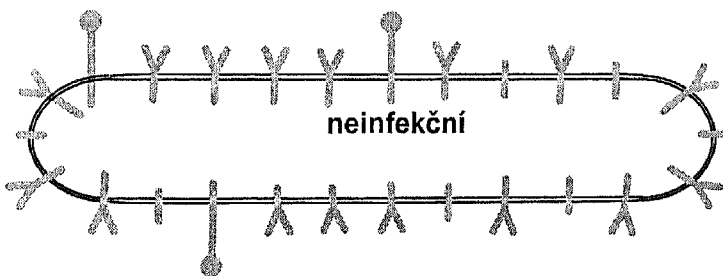
**KULOVITÁ ČÁSTICE**

průměr: 0,22 nm



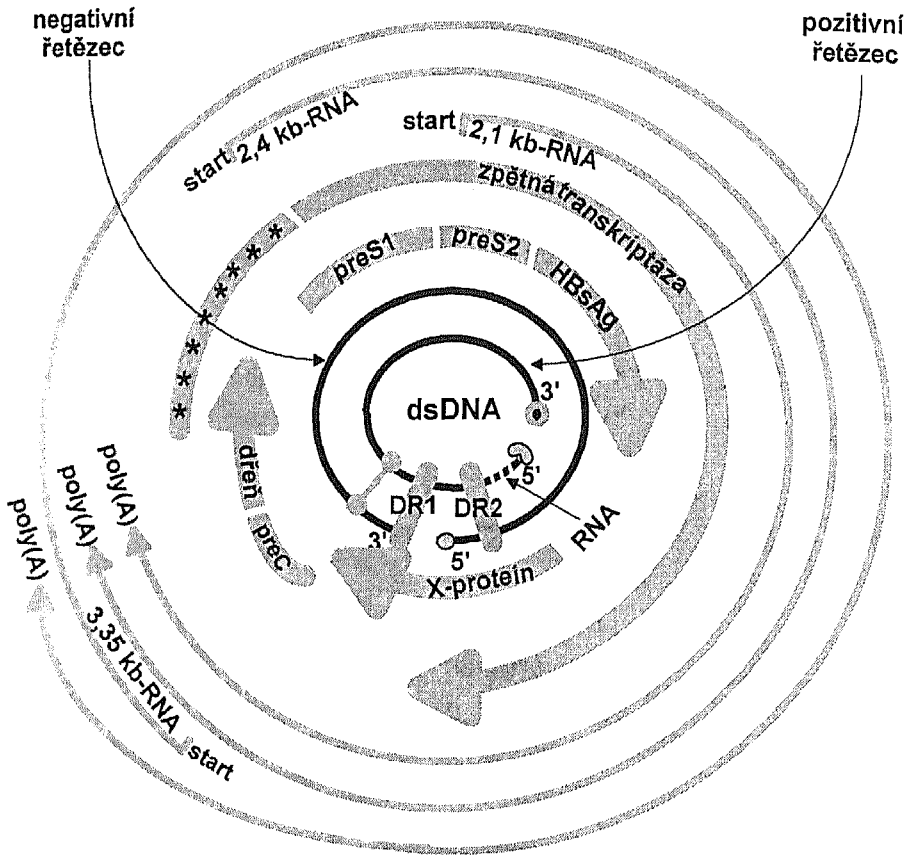
**VLÁKNITÁ ČÁSTICE**

22 x 200 nm



Obr. 461

Schéma různých forem virionu HBV



- = zpětná transkriptáza
- = koncový protein
- ⊂ = čepička
- ⋯ = sekvence polyadenylačního signálu na protilehlých komplementárních řetězcích
- ⋯ = sekvence DR1 a DR2 na protilehlých komplementárních řetězcích
- \*\*\*\* = označení pro sekvenci, která se přepisuje do sekvence na 5'-konci mRNA; tato sekvence váže pak specifický protein.

Tlusté oblouky kružnice zakončené šipkami představují čtecí rámce genomu. Vnější tenké oblouky kružnice jsou primární transkripty (mRNA) genomu. Vnitřní část, tj. oblouky kružnice, jejichž konce jsou označeny jako 5' a 3', představuje vlastní genom viru.

Obr. 462  
Organizace genomu viru HBV

1. Čtecí rámec obsahující geny, které kódují tyto tři formy antigenu HBsAg:

- ◆ velký antigen PreS1-HBsAg,
- ◆ střední antigen PreS2-HBsAg,
- ◆ malý antigen HBsAg.

2. Čtecí rámec obsahující geny, které kódují dřevňový (kapsidový) protein HBcAg a HbeAg. Součástí tohoto čtecího rámce je též sekvence preC, která kóduje signální peptid proteinu HBeAg.

3. Čtecí rámec obsahující gen, který kóduje X-protein, který působí jako transaktivátor virových a buněčných promotorů.

4. Čtecí rámec obsahující gen, který kóduje P-protein působící jako zpětná transkriptáza, a gen kódující TP-protein, který se překrývá s genem pro P-protein. Gen pro P-protein je delší než gen kódující TP-protein.

### 9.7.1.3

#### Exprese genomu viru HBV v hostitelské buňce

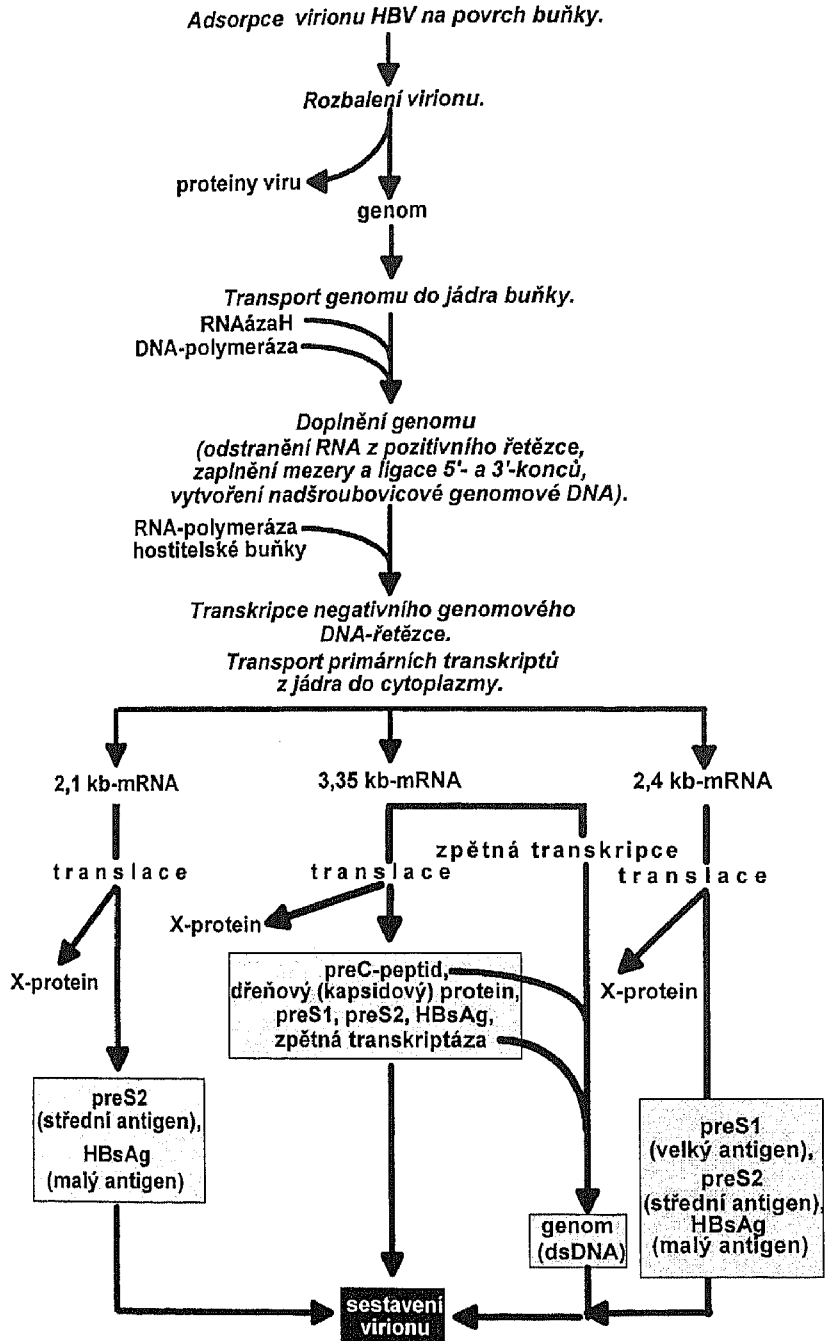
**INFEKCE HOSTITELSKÉ BUŇKY.** Jakým způsobem vchází virus hepatitidy B do hostitelské buňky, není známo. Též o jeho receptoru nejsou znalosti. Více zjištěných fakt se týká jeho projevu v hostitelské buňce. Na obr. 463 je uvedeno schéma shrnující děje, kterými tento virus prochází v hostitelské buňce od začátku její infekce až po tvorbu virionů. Jednotlivé stupně exprese viru v hostitelské buňce lze vyčíst přímo ze schématu s výjimkou zpětné transkripce, které je věnován následující odstavec.

**ZPĚTNÁ TRANSKRIPCE.** Sledujte jednotlivé kroky tohoto děje podle obr. 464:

1. Matricí pro syntézu negativního DNA-řetězce je 3,35 kb-RNA, která se též označuje jako **předgenomová RNA**. Tato RNA je na 5'-konci modifikována čepičkou, na 3'-konci polyadenylována a vyznačuje se značnou koncovou redundancí. Obsahuje přepis přímých repeticí DR1 a DR2 a kromě toho dvě stopky  $\epsilon$  se smyčkou.

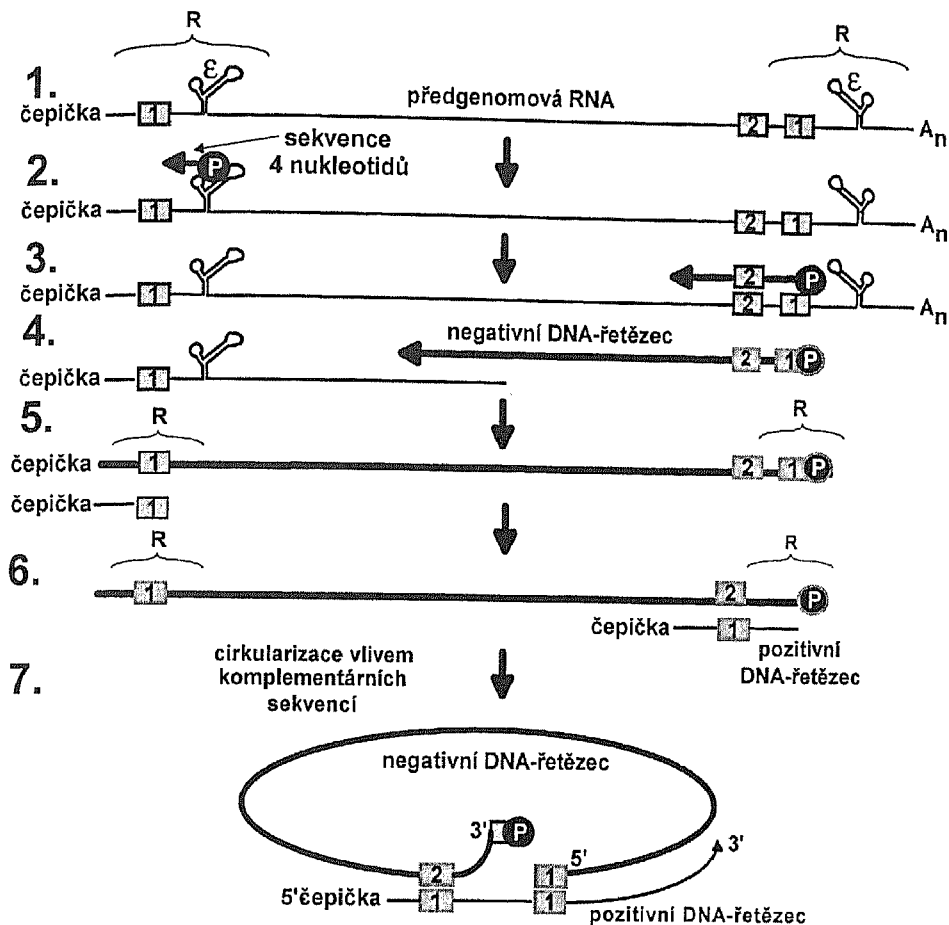
2. Nejdříve se naváže zpětná transkriptáza neboli P-protein na  $\epsilon$ . Zvláštností P-proteinu mimo jiné je, že může působit jako primer pro syntézu negativního DNA-řetězce podobně jako komplex pTP-C3'OH u adenovirů (str. 652). Od tohoto primeru se komplementárně k  $\epsilon$  syntetizuje začátek negativního řetězce o délce čtyř nukleotidů.

3. Čtyřnukleotidová sekvence stopky  $\epsilon$  se smyčkou, podle které se komplementárně syntetizoval počátek negativního DNA-řetězce, se nachází též u DR1 na 3'-konci předgenomové RNA. K ní je pochopitelně komplementární začátek negativního DNA-řetězce a může se s ní proto za katalytické účasti



Obr . 463

Schéma exprese viru HBV v jeho hostitelské buňce



1 = DR1

2 = DR2

P = P-protein = zpětná transkriptáza

R = koncová redundance

Obr. 464

### Schéma zpětné transkripce u viru HBV

P-proteinu spojit. Tím je zahájeno prodlužování negativního DNA-řetězce od 3'-konce předgenomové RNA.

4. Během prodlužování negativního DNA-řetězce dochází k odbourávání předgenomové RNA, což je katalyzováno zpětnou transkriptázou (P-protein), která se vyznačuje též aktivitou RNAázy H.

5. Zpětná transkriptáza dorazí až na 5'-konec předgenomové RNA, přepíše DR1a celý úsek **R** na tomto konci. Přitom již celá předgenomová RNA je odbourána. Zůstává jen čepička s krátkým úsekem **R**.

6. Čepičkou modifikovaná sekvence na 5'-konci je přemístěna zpětnou transkriptázou na DR2, s níž se hybridizuje (DR1 je komplementární k DR2) a bude působit jako RNA-primer pro syntézu pozitivního DNA-řetězce.

7. Od RNA-primeru se prodlužuje pozitivní DNA-řetězec až k 5'-konci matricového negativního DNA-řetězce. Jelikož na 3'-konci negativního DNA-řetězce jsou komplementární R-sequvence, dochází k cirkularizaci genomu a k dokončení syntézy pozitivního řetězce.

# 10 MOLEKULÁRNÍ PODSTATA MUTAGENEZE

*Genetická informace se mění mutacemi, rekombinacemi a transpozicemi. Všechny uvedené typy změn jsou změny dědičné.*

*Mutace je dědičná změna genotypu, jejíž molekulární podstatou je nukleotidová substituce, delece nebo inserce.*

*Nukleotidová substituce je výměna nukleotidů v nukleových kyselinách jednořetězcových nebo nukleotidových párů v nukleových kyselinách dvouřetězcových. Probíhá dvěma způsoby:*

- ◆ *transicí,*
- ◆ *transverzí.*

*Transice představuje výměnu purinového nukleotidu za purinový a pyrimidinového za pyrimidinový. Transverze je výměna purinového nukleotidu za pyrimidinový a naopak pyrimidinového za purinový. Ve strukturních genech může vést substituce ke změně smyslu kodonu nebo ke vzniku terminačního kodonu. Substituce měnící kodon pro určitou aminokyselinu v kodon pro jinou aminokyselinu se označuje jako **mutace měnící smysl kodonu**, např. (zde a též v dalším výkladu jsou kodony vyjádřeny v sekvencích na pozitivním DNA-řetězci):*

*TGG (Trp)----->CGG (Arg).*

*Jestliže se substitucí vedoucí k záměně aminokyseliny za jinou v kódovaném polypeptidovém řetězci nemění jeho konformace, hovoří se o **konzervativní nukleotidové substituci**. Kodon změněný mutací tak, že kóduje jinou aminokyselinu než tu, kterou kódoval původně, se obecně označuje jako **kodon s pozměněným smyslem**, např.:*

*TGG (Trp)----->AGG (Arg).*

*Změní-li se substitucí kodon pro aminokyselinu v kodon nesmyslný (terminační), jde o **mutaci nesmyslnou (beze smyslu)**, např.:*

*TGG (Trp)----->TAG (terminační kodon).*

*V rámci téže kodonové rodiny vedou ke změně smyslu kodonu jen ty substituce, které se týkají prvních dvou nukleotidů.*

*Delece je ztráta jednoho nebo více nukleotidů z nukleotidové sekvence a inserce je naopak vložení jednoho nebo více nukleotidů do nukleotidové sekvence. Mutace způsobená delecemi nebo insercemi, které nejsou násobkem tří nukleotidů a mění proto čtecí rámec, se označuje jako **posunová**. Inserce nebo*

*delece, které jsou násobkem tří nukleotidů, čtecí rámec obnovují. Čtecí rámec se též obnoví, jestliže po jedné inserci následuje jedna delece nebo po jedné deleci jedna inserce.*

*Dále jsou uvedeny příklady, jak inserce nebo delece mění čtecí rámec původní sekvence (čtecí rámec je podtržen):*

TGG|TGG|TGG|TGG|TGG|TGG.

1. *Inserce jednoho nukleotidu (např. G):*

TG**G**|GTG|GTG|GTG|GTG|GTG|G.

2. *Inserce dvou nukleotidů (např. G):*

TG**G**|**GG**T|GGT|GGT|GGT|GGT|GG.

3. *Inserce tří nukleotidů G vede k obnově čtecího rámce:*

TG**G**|**GG**T|**G**GG|TGG|TGG|TGG|TGG.

4. *Delece jednoho nukleotidu G z původní sekvence:*

TGT|GGT|GGT|GGT|GGT|GG.

5. *Delece dvou nukleotidů G:*

TGT|GTG|GTG|GTG|GTG|G.

6. *Delece tří nukleotidů G vede k obnově čtecího rámce:*

TGT|GTG|TGG|TGG|TGG.

7. *Čtecí rámec se též obnoví, jestliže inserce jednoho nukleotidu (např. G v prvním kodonu) se kombinuje s delecí jednoho nukleotidu (např. T ve druhém kodonu):*

TGG|GGG|TGG|TGG|TGG|TGG.

*Geny se mutacemi mění na různé mutantní formy, které je nutno rozlišovat od jejich výchozích forem před mutacemi. Alela příslušného genu převládající v přírodní populaci se označuje jako **standardní alela**. Standardní alela obvykle kóduje funkční polypeptid nebo se přepisuje do funkční RNA (tRNA nebo rRNA). Od ní se odvozuje **alela mutantní**, tj. alela změněná mutací. Organismus nesoucí mutantní alelu se označuje jako **mutanta**.*

*Skutečnost, že produkt standardní alely je funkční a mutantní je funkční jen částečně nebo zcela nefunkční, se odráží ve fenotypu organismu. Ve fenotypu se pochopitelně odráží i funkčnost nebo ztráta funkcí regulační oblasti. Projev standardní alely ve fenotypu označujeme jako **fenotyp standardní**, kdežto projev mutantní alely ve fenotypu jako **fenotyp mutantní**.*

*Jsou však mutantní alely, které se ve fenotypu neprojevují. Jsou výsledkem tzv. **tiché mutace**, tj. mutace spočívající ve změně kodonu, která se neprojevuje ve funkci polypeptidového řetězce. Jejich základem může být:*

- ◆ *nukleotidová synonymní substituce, tj. změna kodonu pro určitou aminokyselinu v jiný kodon stejného smyslu;*
- ◆ *nukleotidová neutrální substituce, tj. substituce nukleotidu, při které*



dochází ke změně smyslu kodonu neprojevující se ve funkci kódovaného polypeptidového řetězce.

Mutace, kterou se inaktivuje funkce genového produktu, případně se zastavuje nebo snižuje jeho syntéza, je **mutace škodlivá**. Většina mutací je tohoto typu. Alely, které těmito mutacemi vznikají, jsou **recesivní**.

Co do směru účinku mutací je nutno rozeznávat:

- ◆ **původní mutaci**, tj. mutaci, kterou se standardní alela mění v mutantní;
- ◆ **zpětnou mutaci**, tj. mutaci, kterou se mutantní alela mění částečně nebo úplně ve standardní.

Při zpětných mutacích dochází k **reverzím**. Tak označujeme úplnou nebo částečnou změnu mutantního fenotypu ve standardní způsobenou zpětnou nebo supresorovou mutací.

Mutace mohou vznikat spontánně nebo jsou indukovány. Jako **spontánní mutace** označujeme mutace vznikající bez pozorovatelného vlivu mutagenu. **Indukované** nazýváme mutace vyvolané mutagenem. Jako **mutagen** se označuje fyzikální faktor nebo chemická látka (**chemomutagen**) vyvolávající mutace. Mutageny mohou být i některé metabolické produkty organismu. Vystavení živých soustav účinku mutagenu se nazývá **mutagenizace**.

Mutageny obvykle poškozují genotyp organismu a vyvolávají tedy škodlivé mutace. Jinými slovy, působí **genotoxicky**. V této souvislosti bychom chtěli zdůraznit, že genetická informace obsažená v genomové DNA organismů a virů je výsledkem jejich dlouhodobé evoluce a většinou zůstala jen ta, která se osvědčila v biologických funkcích proteinů, tRNA, rRNA a jiných funkčních RNA. Změny v genetické informaci, které vznikají v DNA vlivem chemických a fyzikálních mutagenů se většinou ve funkcích proteinů a funkčních RNA projevují negativně, neboť tyto funkce ruší. Protein, který byl např. funkčně aktivní jako enzym, tuto funkci po mutaci svého genu ztrácí. To se pak projeví ve fenotypu určitým defektem. Jestliže je např. u bakteriálního organismu mutací zasažen gen, který kóduje jeden z enzymů katalyzujících syntézu tryptofanu, syntéza tryptofanu se pak neuskuteční a bakterie musí dostávat do živného média tuto aminokyselinu hotovou, aby mohla růst a množit se.

Mutageny bývají též příčinami neoplastické transformace, např. jestliže se jimi aktivují protoonkogeny. Obecně se fyzikální a chemické faktory indukující kancerogenezi označují jako **kancerogeny**. Proto tedy mutageny s kancerogenním účinkem jsou též kancerogeny.

Řada chemických látek není přímo mutagenní. Teprve metabolickou činností organismu se chemicky modifikují na látky s mutagenním účinkem. Takové potenciální mutageny se označují jako **promutageny**. Přesněji řečeno **promutagen** je chemická látka, která se teprve stává mutagenem vlivem metabolické aktivity probíhající v organismu. Jako **metabolická aktivace** se označuje přeměna promutagenu v mutagen enzymovou činností organismu. To platí i pro promutageny s kancerogenním účinkem. Řada kancerogenů též není bez-

*prostředně kancerogenní. Teprve v organismu vlivem jeho metabolické činnosti se přeměňují na deriváty, které jsou nejen vysoce mutagenní, ale i silně kancerogenní. Proto též přeměna prokancerogenu v kancerogen enzymovou činností organismu je metabolickou aktivací. Chemická látka, která se stává kancerogenní vlivem metabolické aktivace, se nazývá prokancerogen.*

## 10.1 SPONTÁNNÍ MUTACE

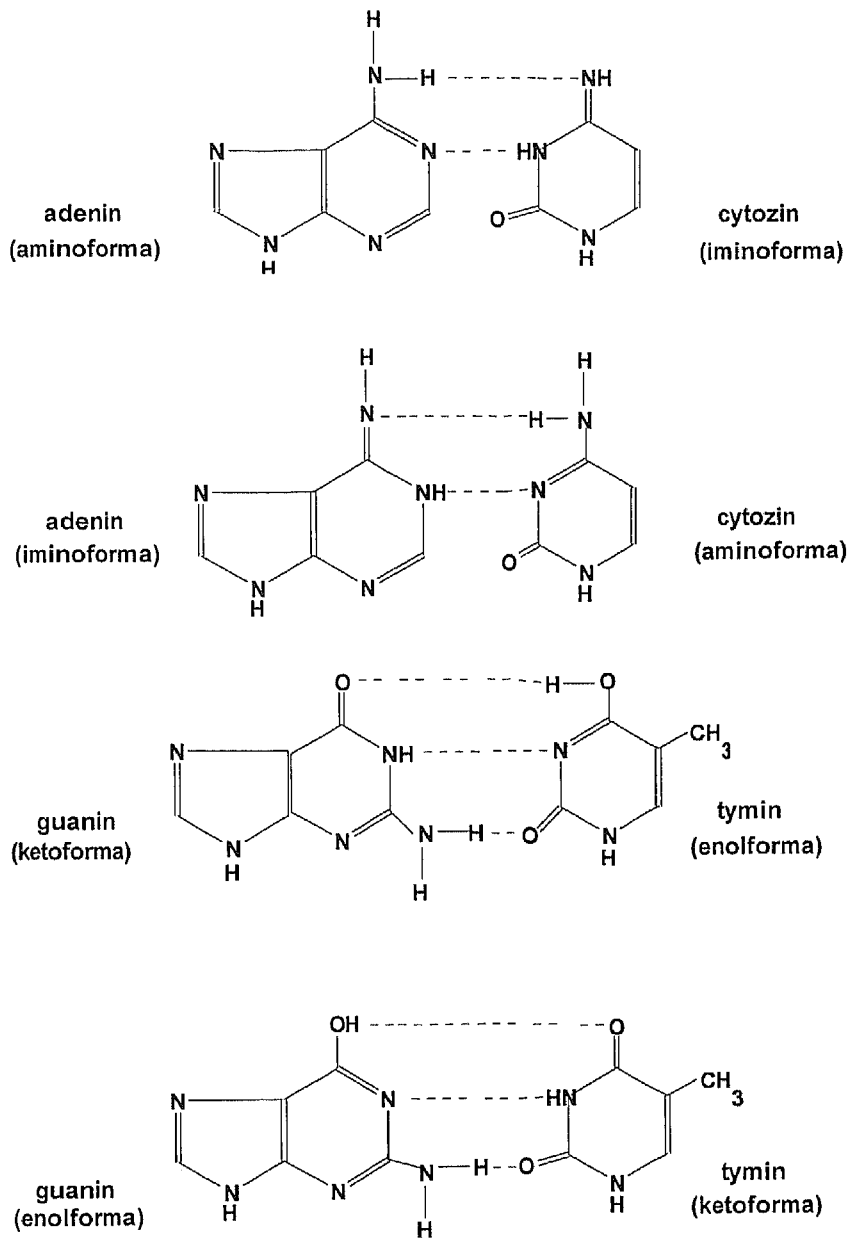
Geny jsou v různé míře mutabilní. Jako **mutabilitu** označujeme *schopnost genu mutovat*. Asi neexistují geny, které by nebyly mutabilní, neboť základem mutability jsou chemické vlastnosti bází, v důsledku kterých se mohou během replikace vytvářet **chybné páry bází**. Tak se označují *páry bází vzniklé při replikaci DNA, které se odchylují od Watsonových-Crickových párů. Jsou přechodné a nestabilní, neboť nevhodně zařazené báze při replikaci jsou např. u bakterií odstraňovány exonukleázovou funkcí DNA-polymerázy III. K chybnému párování bází vedou tyto děje probíhající na bázích:*

1. Tautomerní změny bází.
2. Kolísavost v párování bází.
3. Depurinace a depyrimidinace bází.
4. Deaminace cytozinu, adeninu a guaninu.
5. Inkorporace uracilu do DNA během semikonzervativní replikace.
6. Oxidativní poškození DNA.

Jestliže z chybného páru není 3'-5'-exonukleázovou aktivitou DNA-polymerázy III nevhodně zařazený nukleotid odstraněn, vytvoří se stabilní Watsonův-Crickův pár představující mutační změnu v tomto místě.

### 10.1.1 Tautomerní změny bází

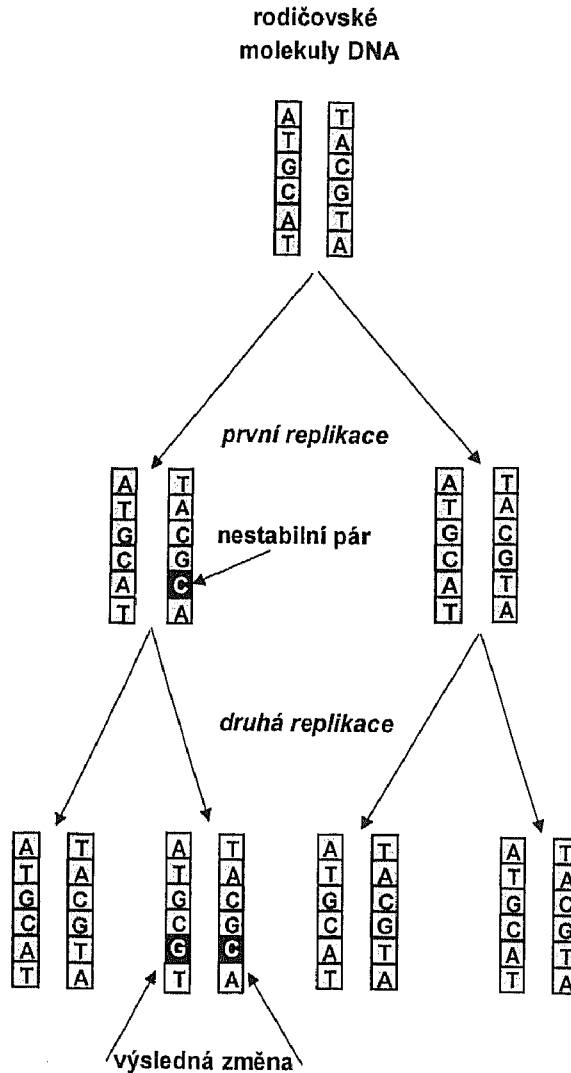
Puriny a pyrimidiny existují v DNA v určitých tautomerních formách. Párování každého pyrimidinu a purinu závisí na atomech v poloze 1 a 6 purinového a 3 a 4 pyrimidinového kruhu. Stabilní tautomery thyminu, adeninu, cytozinu a guaninu a jejich Watsonovy-Crickovy páry v DNA byly již uvedeny na obr. 35, str. 58. Obr. 465 ukazuje, že **nestabilní (přechodné) páry** se vytvoří *mezi adeninem (aminoforma) a cytozinem (iminoforma), guaninem (ketoforma) a tyminem (enolforma), adeninem (iminoforma) a cytozinem (aminoforma), guaninem (enolforma) a tyminem (ketoforma).*



Obr. 465

## Párování bází v nestabilních tautomerních formách

Na obr. 466 je uveden příklad tautomerního posunu vodíku během replikace, v níž A se páruje s C místo s T. Dvoušroubovice, která tím vznikne, se pak dědí dceřinou buňkou. V dalším replikačním cyklu se řetězec, který nese



Obr. 466  
Změna v páru báží AT na GC vlivem přechodu  
adeninu do iminoformy

nesprávnou báží, bude párovat normálně, tj. C se bude párovat s G a DNA pak bude obsahovat pár GC na rozdíl od původní molekuly DNA, která na stejném místě před tautomerním posunem vodíkového atomu měla pár AT.

Na celkový počet správných nukleotidových párů v DNA připadá podíl asi  $10^{-4}$  až  $10^{-5}$  chybných párů s tautomerními bázelemi. Vzhledem k nízkým hod-

notám rychlosti spontánní mutace, tj.  $10^{-9}$  až  $10^{-10}$  se předpokládá, že chybné páry se odstraňují opravnými mechanismy, takže pravděpodobnost spontánní mutace se snížila na uvedené hodnoty  $10^{-9}$  až  $10^{-10}$  na nukleotid a replikační cyklus.

### 10.1.2

#### Kolísavost v párování bází

S kolísavým párováním bází, které se uplatňuje mezi antikodonem tRNA a kodonem mRNA, jsme se již seznámili na str. 133. Jeho uplatnění se uvažuje i při párování v rámci replikace DNA. Kolísavé páry se mohou vytvořit (obr. 110b, str. 137):

- ◆ mezi cytozinem a adeninem,
- ◆ mezi guaninem a adeninem,
- ◆ mezi tyminem a guaninem, které nejsou uvedeny na obr. 110b, ale můžeme si je představit jako párování mezi uracilem a guaninem na obr. 110a, str. 136.

Avšak i zde DNA-polymeráza III odstraní exonukleázovou aktivitou špatně zařazený nukleotid. Ke spontánním mutacím vedou nevhodně zařazené nukleotidy, které nebyly odstraněny touto aktivitou DNA-polymerázy III.

### 10.1.3

#### Depurinace a depyrimidinace

Při vysokých teplotách a za přítomnosti silných kyselin dochází k depurinaci a k depyrimidinaci nukleových kyselin, tj. ruší se glykosidová vazba mezi bází a cukrem, přičemž zůstává zachována fosfoglycidová páteř. K depurinaci a k depyrimidinaci dochází též při nízké pravděpodobnosti za fyziologických podmínek. Odhaduje se, že v genomu savců dochází denně ke ztrátě několika tisíc nukleotidových bází vlivem depurinace a depyrimidinace. Jestliže depurinované a depyrimidinované místo není rychle opraveno, může se proti němu během replikace rychle zařadit jakýkoliv nukleotid. Z dosud neznámých důvodů se proti němu nejčastěji zařazuje dAMP, takže nezvykle často dochází na tomto místě k záměně bází: GC na AT.

### 10.1.4

## Deaminace cytozinu, adeninu a guaninu

Deaminací cytozinu vzniká uracil, který se páruje při replikaci s adeninem (obr. 467). Jde tedy o záměnu:

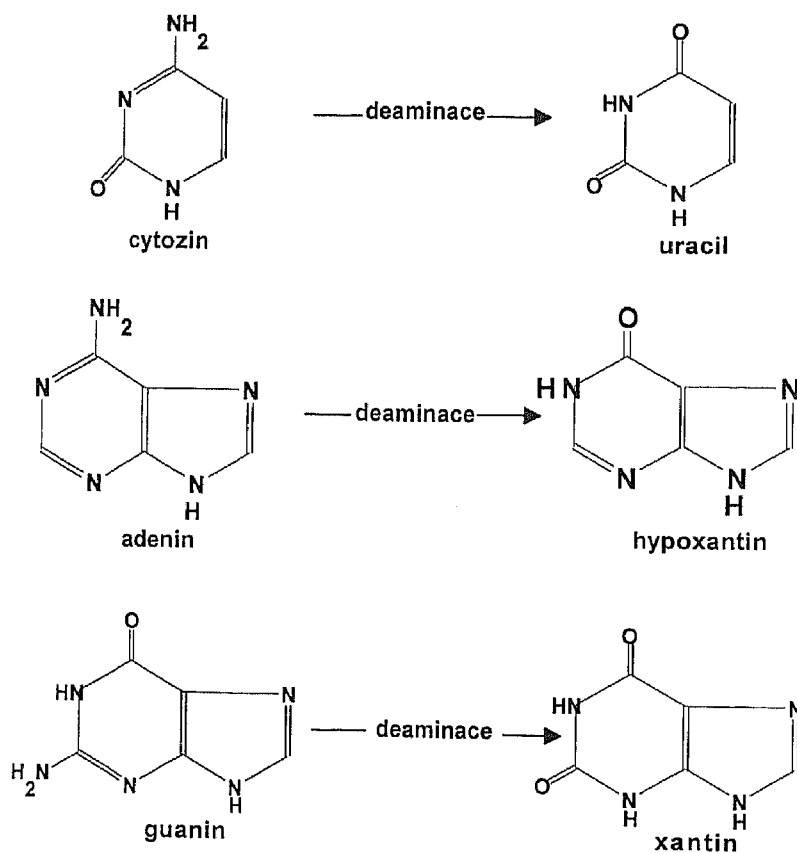
### GC na AT.

Deaminací adeninu vzniká hypoxantin, který se páruje s cytozinem. V tomto případě jde o záměnu:

### AT na GC.

Xantin se však nemůže párovat ani s cytozinem ani s thyminem a vede proto k zastavení syntézy polynukleotidového řetězce na matricovém řetězci.

U savců dochází tímto způsobem v genomu denně asi ke 100 deaminacím cytozinu a k několika deaminacím adeninu. Tento velký počet spontánních mu-



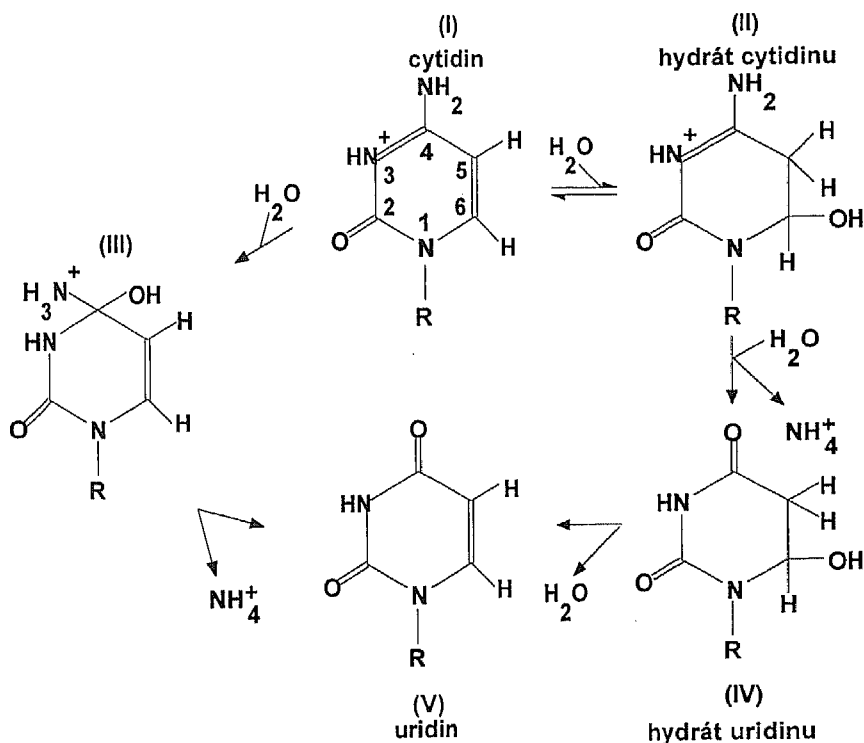
Obr. 467  
Deaminace cytozinu, adeninu a guaninu

tací by měl značný vliv na stabilitu genetické informace, kdyby vzniklá poškození DNA nebyla opravena mechanismy, kterými jsou nepatříčné báze odstraněny z DNA a správné jsou zařazeny.

**HYDROLYTICKÁ DEAMINACE CYTOZINU.** Cytozin se může též podrobovat hydrolytické deaminaci spočívající v tvorbě dihydrocytozinu jako meziprojektu. Může probíhat přímou cestou nebo mechanismem adice a eliminace (obr. 468):

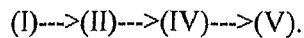
- ◆ **Přímá cesta.** Je podobná hydrolyze amidů a probíhá ve směru (I)--->(III)--->(V).

Je charakteristická přímým napadením pyrimidinového kruhu hydroxylovým iontem v místě 4 za uvolnění amonného kationtu, které vede k tvorbě uridinu.



Obr. 468  
Cesty hydrolytické deaminace cytidinu

- ◆ **Mechanismus adice a eliminace.** Probíhá ve směru



Zahrnuje adici vody na 5,6-dvojně vazbě protonovaného cytidinu za vzniku jeho hydrátu (dihydrocytidinu). Další působení molekuly vody vede k uvolnění amonného kationtu za vzniku hydrátu uridinu (dihydrouridin), který se dehydratuje na uridin.

### 10.1.5

## Inkorporace uracilu do DNA během její replikace

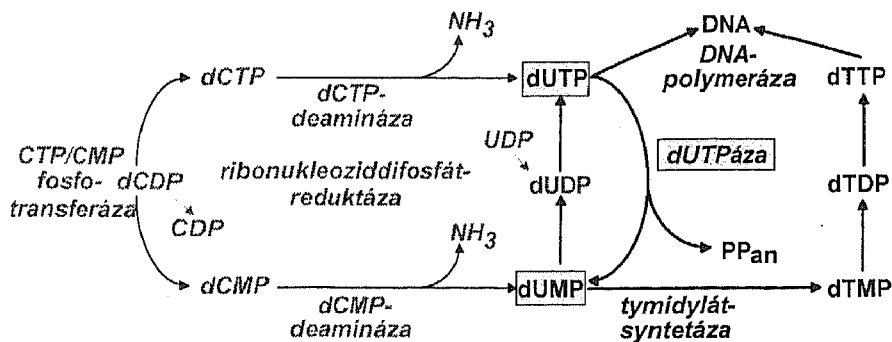
Kromě toho, že uracil může vznikat spontánně deaminací cytozinu, jak bylo uvedeno v předchozím odstavci, může se též inkorporovat do DNA během její semikonzervativní replikace. Zásoba dUTP v cytoplasmě se tvoří z dCTP i z dUDP. V buňkách standardního typu *E. coli* je však množství dUTP nízké ve srovnání s dTTP, jelikož většina dUTP se odbourává dUTPázou na dUMP. Uracil, příležitostně inkorporovaný do DNA, je během její replikace účinně odstraňován **uracil-DNA-glykosylázou**. Proto se běžně v DNA buněk *E. coli* uracil nevyskytuje. Avšak mutanty, v nichž je tento enzym inaktivní, inkorporují dUMP do DNA v četnosti jeden dUMP na 2 000 až 3 000 nukleotidů.

Inkorporace uracilu do DNA byla pozorována u mnoha DNA-virů a dochází k ní též v lidských lymfocytech. Pravděpodobně většina, ne-li všechny organismy, které syntetizují TMP z dUMP, inkorporují malá množství uracilu do své DNA. U bakterií se dUMP tvoří většinou z dUTP (obr. 469) a v savčích buňkách hlavně z dCMP, který se snadno přeměňuje na dUTP.

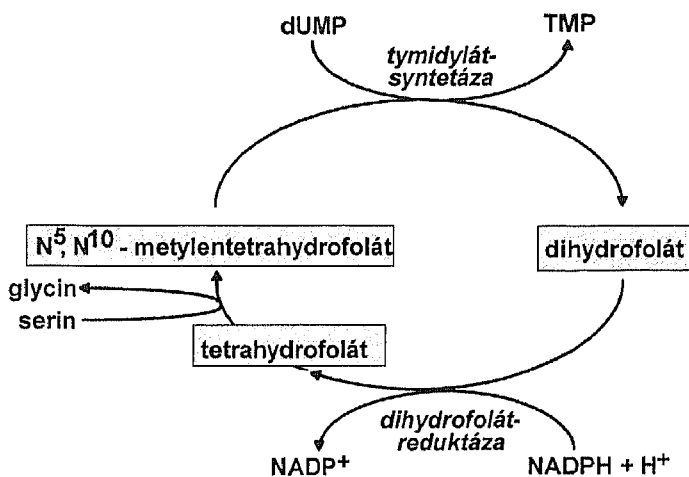
V lidských lymfocytech inhibice biosyntézy dTMP z dUMP zvyšuje zásobu dUTP ve srovnání s dTTP a tím se zvyšuje i pravděpodobnost inkorporace uracilu místo thyminu do DNA. Např. během syntézy dTMP z dUMP usku-tečňované tymidylátsyntetázou se přenáší z metylentetrahydrofolátu metylová skupina na dUMP, takže se metylentetrahydrofolát přeměňuje na dihydrofolát. Pro další syntézu TMP tymidylátsyntetázou je nutná regenerace dihydrofolátu. Tato regenerace je katalyzována dihydrofolátreduktázou, která je inhibována 4-amino-10-metylfolátem (ametopterin; metotrexát). Jetliže se působí na buňky metotrexátem, zastavuje se tvorba TMP, jehož syntéza je katalyzována tymidylátsyntetázou, což pak má za následek zvýšení zásoby dUMP za současného snížení množství dTTP v buňce. V lidských lymfocytech se intracelulární hladina dUMP takto zvýší až tisíceronásobně a nehledě na přítomnost dUTPázy se množství dUTP zvýší o tři řády. Množství dTTP se sníží až padesátinásobně. To vede ke zdatelné inkorporaci dUMP do DNA.



*Inkorporace uracilu z dUTP do DNA během replikace u bakterií.*



*Syntéza TMP z dUMP katalyzovaná tymidylátsyntetázou u savců.*



Obr. 469

**Cesty vedoucí k inkorporaci uracilu do DNA  
během semikonzervativní replikace**

Za přítomnosti volného uracilu, který je inhibítoem uracil-DNA-glykosylázy, se uracil hromadí jako stabilní složka v DNA.

### 10.1.6

## Oxidativní poškození DNA

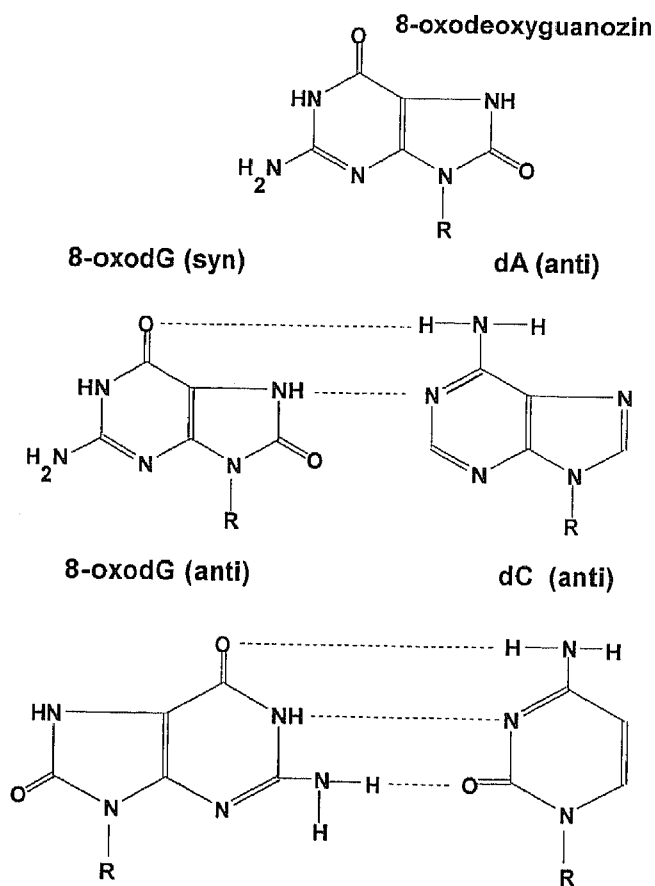
Oxidativní poškození DNA je vyvoláno hlavně hydroxylovým radikálem

$\bullet\text{OH}$ , který vzniká v buňkách z  $\text{H}_2\text{O}_2$  (jako vedlejšího produktu) reakcemi dýchacího řetězce. Z valné části je peroxid vodíku rozložen katalázou a peroxidázou. Přesto určité množství se převádí na hydroxylový radikál.

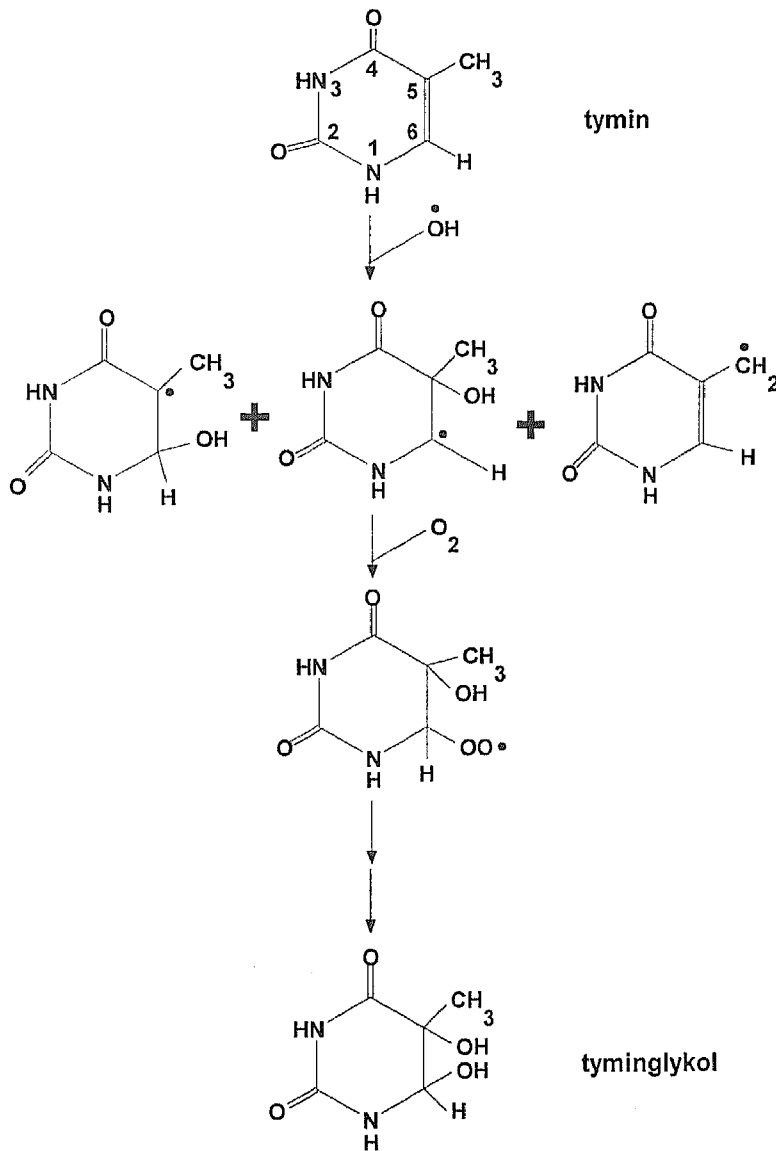
$\text{H}_2\text{O}_2$  nereaguje přímo s DNA, ale přes radikál  $\bullet\text{OH}$ , který vzniká reakcí  $\text{H}_2\text{O}_2$  s DNA, která je v komplexu s Fe:



Reaktivní radikály se tvoří též radiolýzou vody při zásahu buněk ionizujícím zářením. Bylo zjištěno asi sto reakčních produktů odvozených z deoxyribonukleotidů, z nichž pro vznik mutací je nejvýznamnější **8-oxodeoxyguanozin** neboli **8-OxodG**. Tento produkt se tvoří v živočišných a rostlinných buňkách spontánně bez působení ionizujícího záření a je příčinou spontánního

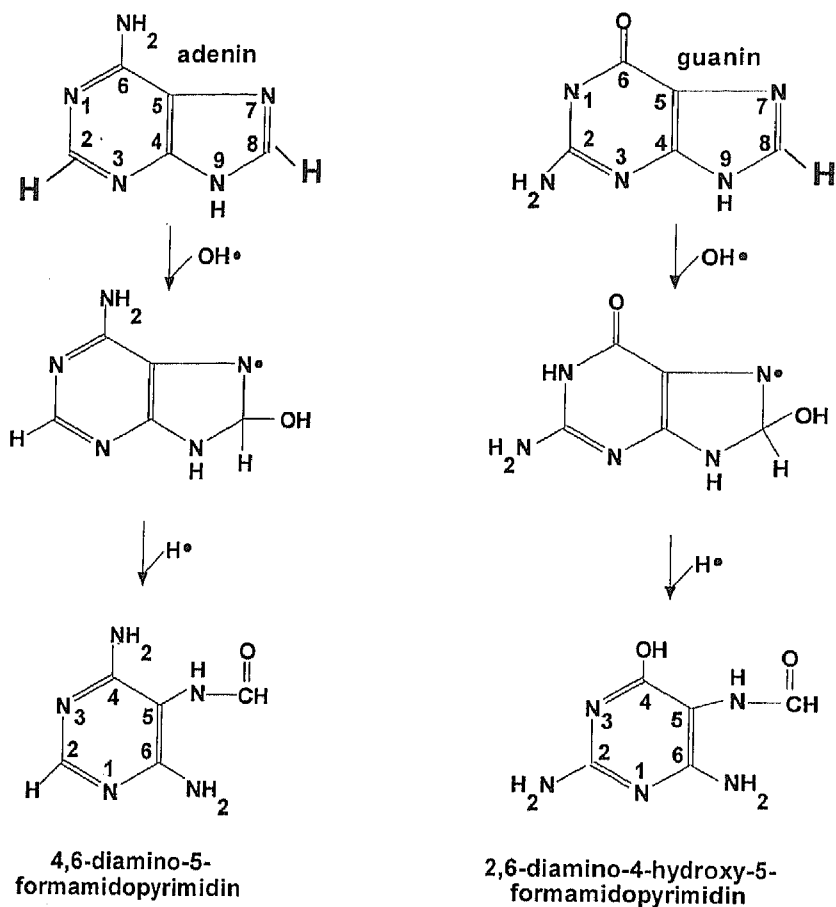


Obr. 470  
8-oxodeoxyguanozin a jeho párování



**Obr. 471**  
**Tvorba tyminglykolu působením radikálu  $\bullet$ OH na tymin**

poškození DNA. Během replikace se může proti jednomu 8-OxodG v maticovém řetězci zařadit nukleotid s cytozinem nebo také, a to přednostně, nukleotid s adeninem. Jde tedy o transverzi GC na AT (obr. 470).



Obr. 472

## Působení hydroxylového radikálu na adenin a guanin

Špatně zařazený 8 - OxodG není během korektury rozeznáván exonukleázou.

Jestliže  $\cdot\text{OH}$  působí na tymin, vzniká **tyminglykol** (obr.471), který pravděpodobně zastavuje v buňkách replikaci DNA a reakcí s adeninem vede k tvorbě **4,6-diamino-5-formamidopyrimidinu** a s guaninem k tvorbě **2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidinu** (obr. 472). Oba produkty poškozují DNA. Mechanismus tohoto poškození není zatím objasněn.

## 10.2 REVERZE

### 10.2.1 Typy reverzí

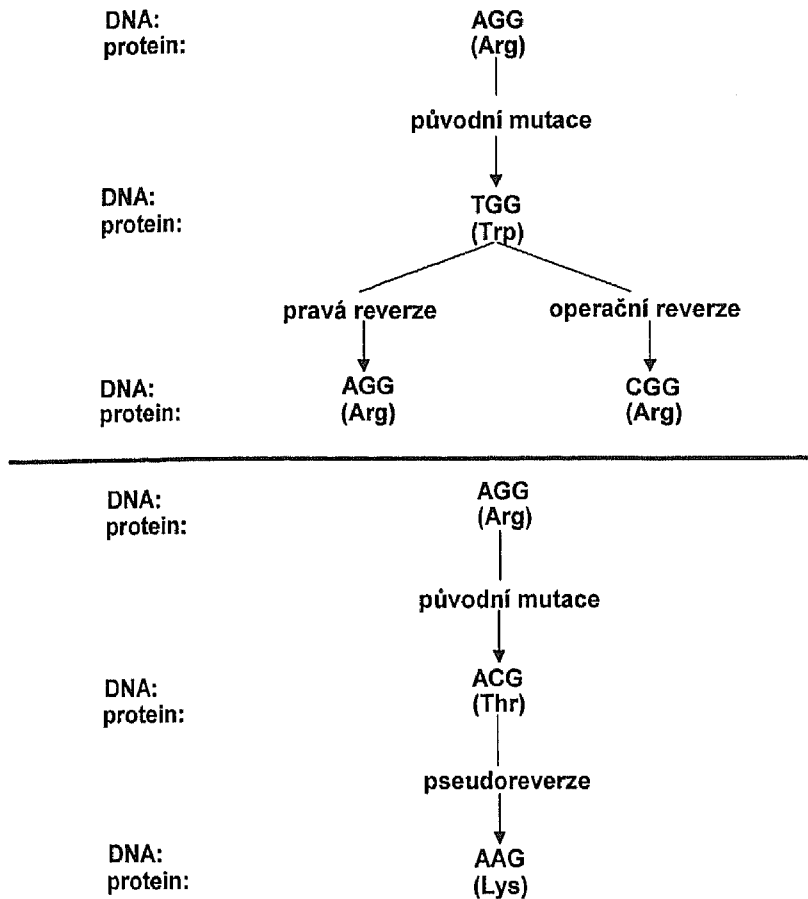
Rozeznáváme několik typů reverzí, které jsou popsány v následujících odstavcích a schematicky vysvětleny na obr. 473.

**PRAVÁ REVERZE.** Je to *reverze spočívající v úplné obnově mutované nukleotidové sekvence na původní*. Při této reverzi se mutantní fenotyp úplně vrací ke standardnímu. Tento jev je charakteristický pro tzv. **bodové mutace**. Jako bodové označujeme *mutace spočívající v substituci jednoho nukleotidu (jednořetězcové nukleové kyseliny), nebo jednoho nukleotidového páru (u dvouřetězcových nukleových kyselin)*. Jestliže původní bodovou mutací vznikne kodon s pozměněným smyslem, polypeptid pak obvykle ztrácí svou funkci. Může však zpětnou mutací této funkce plně nabýt v případě, že se transicí nebo transverzí vymění v kodonu s pozměněným smyslem „nepatříčný“ nukleotid za původní (obr. 473).

**OPERAČNÍ REVERZE.** Je to *reverze spočívající ve zpětné mutaci, kterou se v mutantní alele strukturního genu kodon, změněný původní mutací, změní v kodon, který je synonymní s původním kodonem a obnovuje proto funkci polypeptidového řetězce kódovaného touto alelou*. Při operační reverzi se obnovuje genetická informace ve standardní alele jinou formou jejího zápisu. Proto vede k úplnému návratu mutantního fenotypu ve standardní (obr. 473).

**PSEUDOREVERZE.** *Spočívá ve zpětné mutaci, kterou se v mutantní alele kodon změněný původní mutací změní v kodon, který obnovuje funkci polypeptidového řetězce kódovaného touto alelou, přestože má jiný smysl než původní kodon*. Určité místo polypeptidového řetězce může být obsazeno různými aminokyselinami (nikoli však libovolnými), aniž se mění jeho biologická funkce. Proto na tomto místě některé aminokyseliny při reverzi navozují buď částečně, nebo úplně biologickou funkci polypeptidu, což vede k částečnému nebo úplnému návratu mutantního fenotypu na standardní (obr. 473).

**INTRAGENOVÁ SUPRESOROVÁ MUTACE.** Jako supresorová se označuje *mutace vzniklá po recesivní mutaci, jejíž účinek na fenotyp potlačuje*



Obr. 473

### Pravá reverze, operační reverze a pseudoreverze

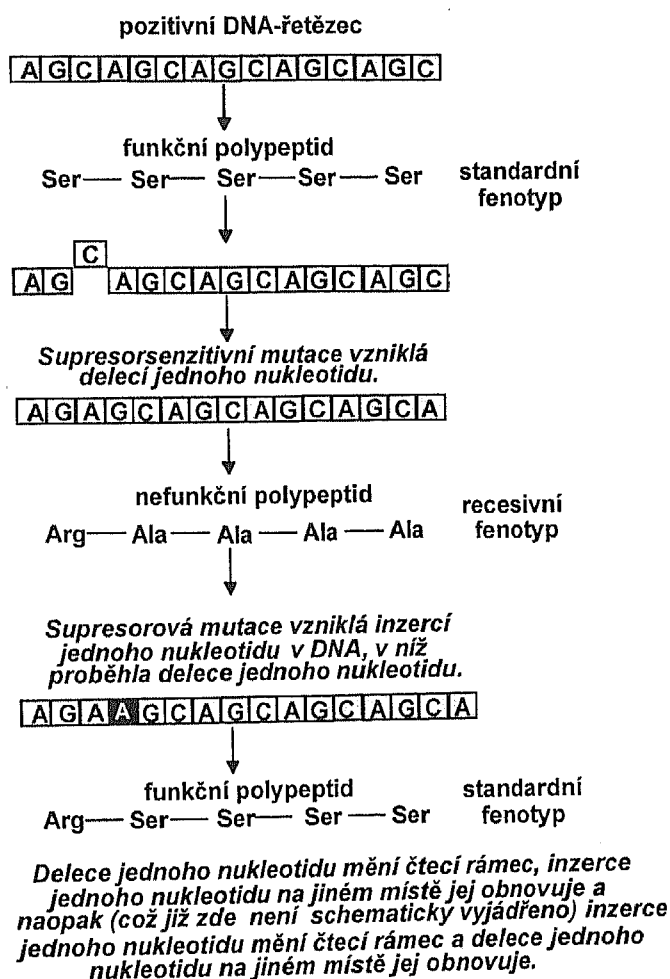
(suprimuje) a obnovuje tedy buď úplně, nebo většinou neúplně původní standardní fenotyp. Původní mutace, jejíž recesivní účinek na fenotyp je potlačován supresorovou mutací, se ve vztahu k této mutaci označuje jako **supresorsenzitivní**. Obecně platí, že supresorová mutace probíhá v jiném místě na chromozomu než mutace supresorsenzitivní. Rozlišují se dva základní typy této mutace:

- ◆ **intragenová supresorová mutace**, vzniklá v témže genu jako supresorsenzitivní mutace;
- ◆ **intergenová supresorová mutace**, vzniklá v jiném genu než supresorsenzitivní mutace. Mutantní alela tohoto genu potlačujícího fenotypový projev supresorsenzitivní mutace se označuje jako **supresor**.

Vztah mezi supresorsenzitivní mutací a supresorovou mutací při intrage-

nové supresorové mutaci lze charakterizovat takto (obr. 474):

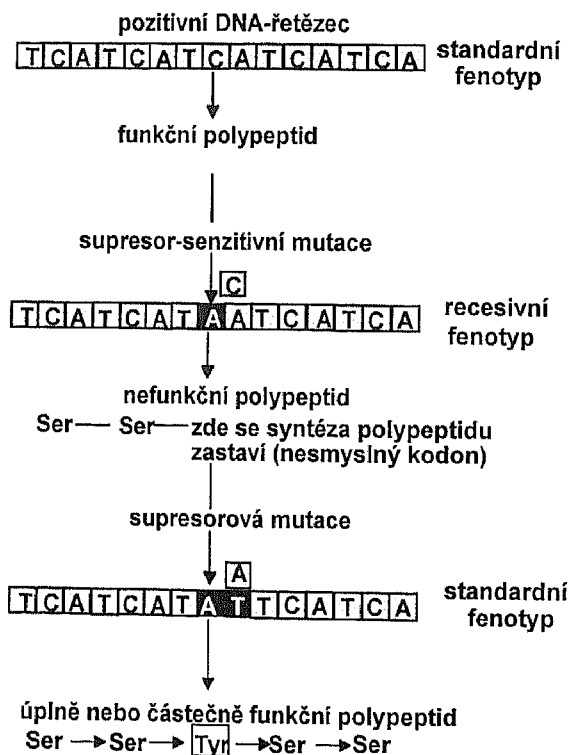
1. Posunová mutace, kterou se mění čtecí rámec genu, je mutací supresorsenzitivní, neboť její účinek na fenotyp může být potlačován inzercemi nebo delecemi tím, že tyto inserce a delece obnovují od určitého místa čtecí rámec genu. Jestliže alespoň částečně obnovují standardní fenotyp, lze je označit jako supresorové mutace. *Účinek supresorsenzitivní mutace na fenotyp, jejímž základem je jedna delece, je potlačován účinkem supresorové mutace, jejímž základem je jedna inserce a naopak účinek supresorsenzitivní mutace, která spočívá v jedné inzerci může být potlačován účinkem supresorové mutace, která*



Obr. 474  
Intragenová supresorová mutace vzniklá inzercí jednoho nukleotidu

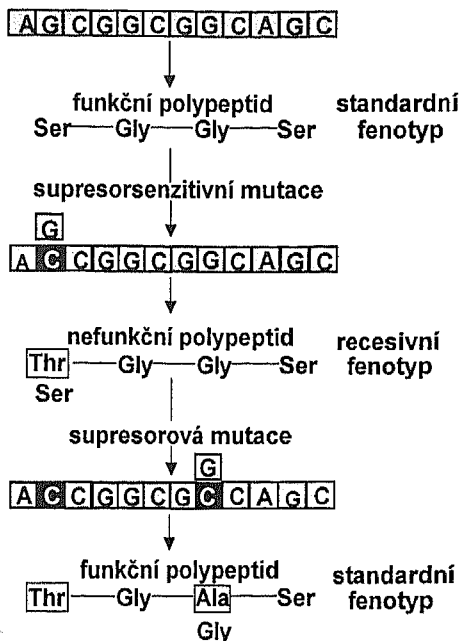
spočívá v jedné delecí. Vztah mezi delecemi a insercemi jednoho nukleotidu a výslednou obnovou čtecího rámce je znázorněn na obr. 474. Vzhledem k tomu, že čtecí rámec a tím částečně i standardní fenotyp se obnovují vlivem posunové mutace, která vznikla v jiném místě genu než je místo, ve kterém proběhla supresorsenzitivní mutace, řadí se takové posunové mutace do kategorie supresorových mutací. Obecně obnovu čtecího rámce genu po posunové mutaci lze považovat za supresorovou mutaci.

Je však účinek supresorsenzitivní mutace vzniklé delecí jednoho nukleotidu suprimován opět delecí jednoho nukleotidu na jiném místě stejného genu? Nikoliv. Zkuste si to rozepsat. *Kombinace dvou delecí jednotlivých nukleotidů a podobně kombinace dvou insercí mění čtecí rámec v genu a navozují recesivní fenotyp. Avšak kombinace tří delecí nebo tří insercí jednotlivých nukleotidů čtecí rámec obnovují. Proto třetí delece vedle dvou původních působí jako supresorová mutace (vede k standardnímu fenotypu) a podobně působí třetí inserce vedle dvou původních insercí.*



Obr. 475  
Intragenová supresorová mutace vzniklá záměnou nukleotidu v terminačním (nesmyslném) kodonu





Obr. 476  
Intragenová supresorová mutace

2. Bodová mutace, kterou vzniká terminační kodon uvnitř genu, je supresorsenzitivní mutací, neboť její účinek na fenotyp může být potlačen druhou bodovou mutací v jiném místě genu převádějící terminační kodon na kodon pro určitou aminokyselinu. Jestliže tato druhá bodová mutace obnoví standardní fenotyp, lze ji považovat vzhledem k první za supresorovou (obr. 475).

3. Bodová mutace, kterou se v genu mění smysl kodonu, může být supresorsenzitivní v případě, že její účinek na fenotyp je potlačován druhou bodovou mutací měnící smysl kodonu v jiném místě genu. Jestliže se touto druhou mutací alespoň částečně obnoví funkce polypeptidového řetězce kódovaného mutovaným genem, a tím i částečně standardní fenotyp, lze tuto mutaci považovat za supresorovou vzhledem k první. Bývá to v případech, kdy enzymová aktivita polypeptidu, zrušená záměnou aminokyseliny v jednom místě, se obnovuje navozením aktivní konformace enzymu záměnou aminokyseliny v jiném místě (obr. 476).

## 10.2.2 Intergenová supresorová mutace

Již bylo uvedeno, že mutantní alela neboli supresor, která vzniká inter-

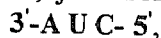
genovou supresorovou mutací, potlačuje účinek mutantní alely jiného genu, která vznikla supresorsenzitivní mutací. Existují dva následující typy supresorových mutací, které se rozlišují podle toho, zda vedou ke vzniku supresoru potlačujícího účinek nesmyslného kodonu vzniklého supresorsenzitivní mutací nebo supresoru kodonu s pozměněným smyslem vlivem supresorsenzitivní mutace.

**SUPRESOR POTLAČUJÍCÍ V GENU ÚČINEK NESMYSLNÉHO KODONU.** *Takovým supresorem je mutantní alela genu pro tRNA, která je přepisována do transferové RNA s antikodonem schopným párovat se s nesmyslným kodonem vzniklým ve strukturním genu supresorsenzitivní mutací. Pro názornější vysvětlení intergenové supresorové mutace tohoto typu uvádíme následující příklad:*

Buňka *E. coli* má supresorsenzitivní mutaci v genu kódujícím alkalickou fosfatázu. V důsledku této mutace se vytvoří z nějakého kodonu kodon UAG, kterým se přeruší překlad mRNA a alkalická fosfatáza pak ztratí aktivitu. Nyní si představme druhou mutaci, tj. mutaci supresorovou, která proběhne v genu pro tRNA<sup>Lys</sup>. Tato mutace neovlivňuje afinitu molekuly tRNA<sup>Lys</sup> pro lyzin, takže se komplex lyzyl~tRNA<sup>Lys</sup> tvoří normálně. Mutace však pozměnila v transferové RNA<sup>Lys</sup> antikodon, takže místo antikodonu

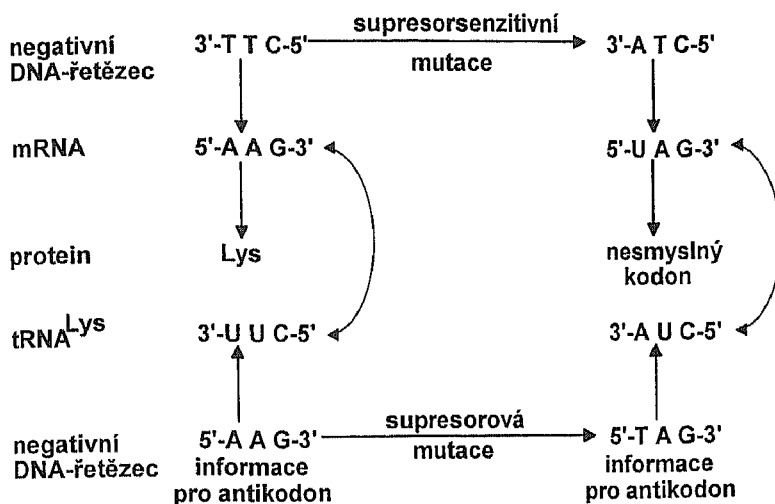


který se páruje s kodonem pro lyzin, tj. 5'-AAG-3', se vytvoří antikodon



kterým se nesmyslný kodon 5'-UAG-3' v mRNA přečte jako lyzin. Alkalická fosfatáza bude obsahovat na stejném místě lyzin jako před supresorsenzitivní mutací, takže aktivita alkalické fosfatázy se obnoví (obr. 477). Celkově lze tedy říci, že intergenovými supresorovými mutacemi tohoto typu se ovlivňují geny pro některé tRNA v tom smyslu, že po těchto mutacích kódují tRNA, které čtou nesmyslný kodon (*amber* nebo *ochre*). Mutantní alely těchto genů, vzniklé supresorovou mutací, se označují jako *sup* na rozdíl od standardních alel *sup*<sup>+</sup> a jsou supresory, neboť tím, že jsou přepisovány do tRNA, které čtou nesmyslný kodon, potlačují či suprimují účinek mutací, jimiž tyto kodony uvnitř genu vznikly.

**SUPRESOR POTLAČUJÍCÍ V GENU ÚČINEK KODONU SE ZMĚNĚNÝM SMYSLEM.** Intergenová supresorová mutace se neomezuje jen na nesmyslné kodony. Byly zjištěny též mutantní formy tRNA, které potlačují účinek mutací měnících smysl kodonu. **Supresorem kodonu s pozměněným smyslem je mutantní alela genu pro tRNA, která se přepisuje do tRNA s antikodonem, který se páruje s kodonem, jehož smysl byl změněn supresorsenzitivní mutací.** Příkladem je mutace, kterou se mění tRNA<sup>Gly</sup> rozeznávající 5'-GGA-3' (kodon



Obr. 477

Schéma vztahu intergenové supresorové mutace k supresorsenzitivní mutaci, kterou vznikl nesmyslný kodon v genu

pro glycin) na tRNA rozeznávající 5'-AGA-3' (kodon pro arginin). Mutantní tRNA zde potlačuje účinek mutace v tryptofansyntetáze, která vedla k záměně *glycinu za arginin* v aktivním místě enzymu. Tento jev si vysvětlíme tak, že tRNA<sup>Gly</sup> se vyznačuje antikodonem 3'-CCU-5', kterým čte kodon 5'-GGA-3' pro glycin. Po supresorové mutaci se mění 3'-CCU-5' na 3'-UCU-5', což umožňuje číst kodon 5'-AGA-3' pro arginin jako glycin (obr. 478).

**KLASIFIKACE SUPRESORŮ.** Kmeny bakterií obsahujících supresor se označují jako *Su*<sup>+</sup>, tj. **supresorpozitivní**, na rozdíl od kmenů *Su*<sup>-</sup>, tj. **supresornegativních** čili neobsahujících supresor.

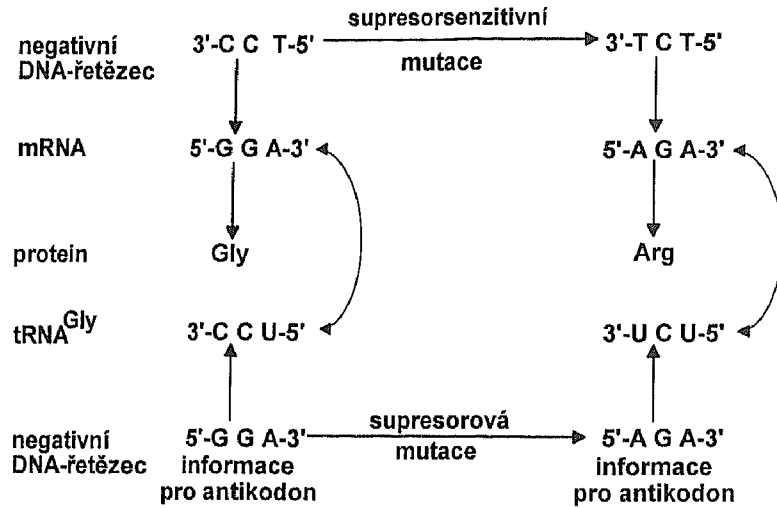
Supresory nesmyslných kodonů se dělí na:

1. **Supresory amber**, tj. *mutantní alely genu pro tRNA přepisované do tRNA s antikodonem, který se páruje s nesmyslným kodonem typu amber.*

2. **Supresory ochre**, tj. *mutantní alely genu pro tRNA přepisované do transferové RNA s antikodonem párujícím se s nesmyslnými kodony typu ochre i amber.*

3. **Supresory opal**, tj. *mutantní alely genu pro tRNA přepisované do transferové RNA s antikodonem párujícím se s nesmyslným kodonem typu opal.*

Transferová RNA vzniklá transkripcí supresoru nesmyslného kodonu se označuje jako **supresorová tRNA**. Skutečnost, že tRNA některých supresorů čtou jen *amber*-kodon a tRNA jiných supresorů čtou *ochre* i *amber*, se vysvětluje kolísavým párováním bází. Na základě tohoto párování reaguje antikodon



Obr. 478

Schéma vztahu intergenové supresorové mutace k supresorsenzitivní mutaci, kterou vznikl v genu kodon se změněným smyslem

3'-AUC-5' jedině s kodonem 5'-UAG-3', neboť C na 5'-konci antikodonu se může párovat jen s G na 3'-konci kodonu. Antikodon 3'-AUU-5' reaguje jednak s kodonem 5'-UAA-3', jednak s 5'-UAG-3', neboť když U je na 5'-konci antikodonu, může se párovat s A i G na 3'-konci kodonu (obr. 108, str. 133). Supresorová tRNA čte také terminační kodony, které nevznikly supresorsenzitivní mutací, tj. kodony, kterými normálně končí strukturální geny. Proto supresorpozitivní kmeny bakterií rostou pomaleji než standardní kmeny.

**KLASIFIKACE SUPRESORSENZITIVNÍCH MUTACÍ.** Existují dva druhy těchto mutací:

- ◆ **ochre-mutace**, kterými vzniká ochre-kodon 5'-UAA-3'. Ochre-kodon je citlivý k ochre-supresorům, čili je potlačován pouze supresory ochre;
- ◆ **amber-mutace**, kterými vzniká amber-kodon 5'-UAG-3'. Amber-kodon je citlivý k amber-supresorům i ochre-supresorům, čili může být potlačován jak ochre-supresory, tak amber-supresory, což lze vysvětlit kolísavým párováním bázi.

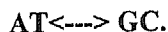
## 10.3 INDUKOVANÉ MUTACE

### 10.3.1 Mutace indukované chemomutageny

**ANALOGY BÁZÍ.** Jako analogy bází se označují *purinové a pyrimidinové deriváty, které jsou strukturálně podobné bázím, jež jsou složkami nukleových kyselin, a mohou se inkorporovat do nascentní nukleové kyseliny místo normální báze.* Tato náhrada báze za jejího analoga může vést k zastavení elongace nukleové kyseliny při její replikaci nebo k mutacím typu transice nebo typu transverze.

Velmi účinným mutagenem v tomto směru je **5-brómuracil** (zkr. **BU**). Je to analog tyminu. Inkorporuje se do DNA a **nahrazuje tymin**, takže páry bází AT se pak mění na A-BU, což lze vysvětlit takto (obr. 479):

V ketoformě se BU nejdříve začleňuje do DNA-řetězce proti adeninu. V následující replikaci se však v enolformě páruje s guaninem, který se při další replikaci páruje normálně s cytozinem, takže vzniká DNA, v níž místo původního páru AT je GC. Existuje ještě jiná možnost, tj. 5-brómuracil se váže v enolformě nejdříve na guanin (G-BU) a při další replikaci v ketoformě se páruje s adeninem, který se v následující replikaci páruje s tyminem, takže původní pár GC je vyměněn za AT. 5-brómuracil indukuje tedy mutace cestou transice v obou směrech (obr. 480):



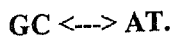
**KYSELINA DUSITÁ (HNO<sub>2</sub>).** Způsobuje oxidativní deaminaci bází, což znamená, že (viz obr. 467):

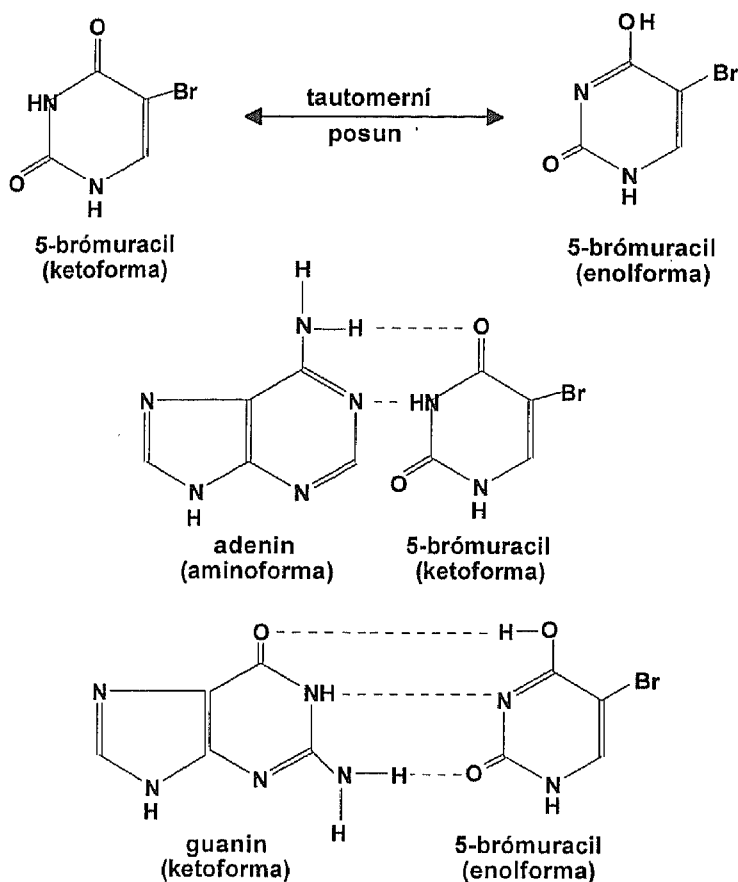
**1. Deaminuje cytozin na uracil**, který se páruje s adeninem a adenin pak v následující replikaci s tyminem; v tomto smyslu způsobuje substituci transicí GC na AT.

**2. Deaminuje adenin na hypoxantin**, který se páruje s cytozinem a ten pak v následující replikaci s guaninem. Způsobuje tedy substituci transicí AT na GC.

**3. Deaminuje guanin na xantin.** Pokud by se xantin v enolformě nevy-skytoval, nemusí vést tato deaminace k mutaci. V enolformě by se xantin pároval s tyminem, takže by pak šlo o substituci transicí GC na AT.

Celkově lze říci, že kyselina dusitá vyvolává substituce v obou směrech, tedy:

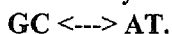




Obr. 479

## Párování 5-brómuracilu

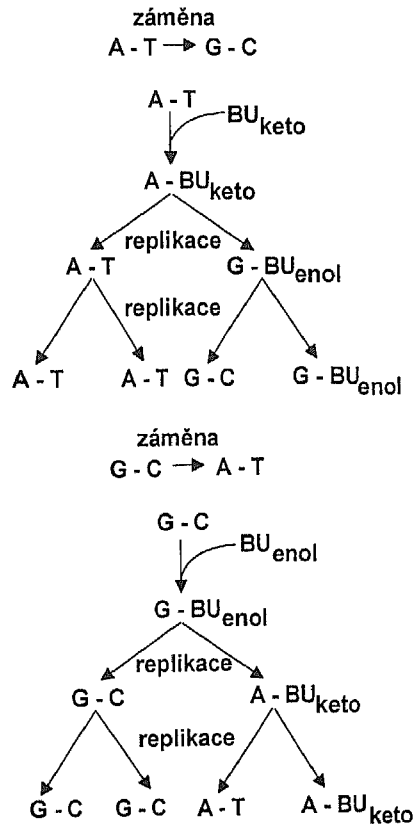
**HYDROGENSIŘIČITAN ( $\text{HSO}_3^-$ ).** Způsobuje deaminaci cytozinu na uracil, který se pak páruje s adeninem. Jde tedy o substituci transicí:



**HYDROXYLAMIN ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ).** Reaguje s adeninem, cytozinem a uracilem, nikoli s thyminem. Reakce s uracilem je však velmi pomalá, významná je pouze při pH 10. Reakce s **cytozinem a adeninem** probíhá při pH 5 až 6 a vede k nahrazení aminoskupiny **hydroxyaminoskupinou**



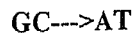
Většinou reaguje *in vivo* s cytozinem. Proto hydroxylamin především uskuteč-



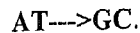
Obr. 480

Záměny párů bází v DNA pod mutagenním účinkem brómuracilu

ňuje substituci:

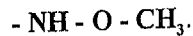


a v menší míře

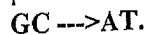


Hydroxylamin je účinnější na jednořetězcovou než na dvouřetězcovou DNA.

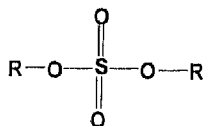
**METOXYAMIN** ( $H_2N-O-CH_3$ ). Reaguje s cytozinem a adeninem. Tato reakce spočívá v nahrazení vodíku aminoskupiny metoxyaminoskupinou



Metoxyamin vyvolává substituce především ve směru

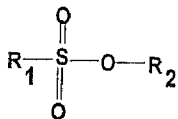
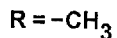


**ALKYLAČNÍ LÁTKY.** Alkylační látky vyznačující se mutagenním účinkem lze rozdělit do těchto skupin (obr. 481):



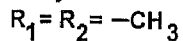
dialkylsulfát

Příklad: dimetylsulfát

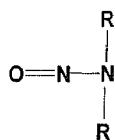


alkyl-alkan-sulfonát

Příklady: metylmetansulfonát

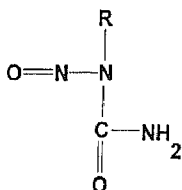
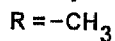


etylmetansulfonát



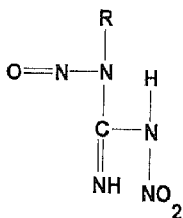
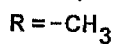
dialkylnitrozamin

Příklad: dimetylnitrozamin



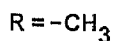
N-alkyl-nitrozomočovina

Příklad: N-metyl-N-nitrozomočovina



N-alkyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidin

Příklad: N-metyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidin

Obr. 481  
Alkylační látky



## 1. Alkylsulfáty.

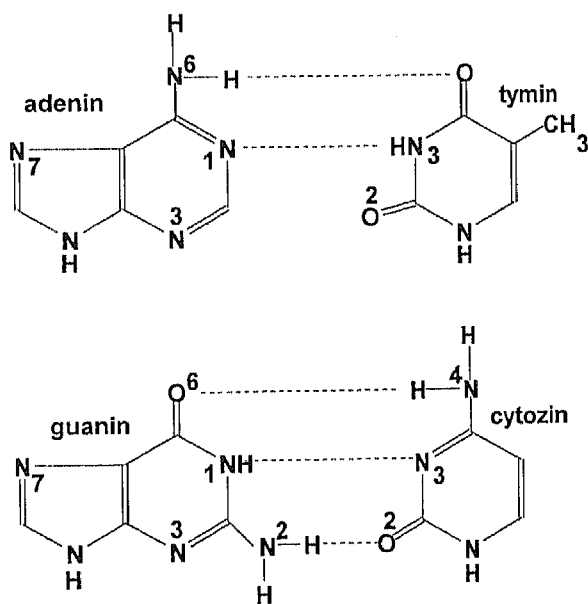
## 2. N-nitrózo-sloučeniny.

**Alkylsulfáty** reagují s dusíkem bází, zatímco N-nitrózo-sloučeniny reagují přednostně s kyslíkem. Etylační látky jsou obecně reaktivnější vzhledem ke kyslíku než analogické metylační látky.

**N-alkyl-N-nitrózaminy** jsou mutageny, které vyžadují metabolickou aktivaci dříve, než působí jako alkylační látky. Jsou to tedy promutageny. Alkylační látky mohou být jednofunkční nebo dvojfunkční. **Jednofunkční alkylační látky mají v molekule jednu reaktivní skupinu a reagují proto na DNA s jedním nukleofilním centrem. Dvojfunkční alkylační látky mají dvě reaktivní skupiny, a proto každá molekula může na DNA reagovat se dvěma nukleofilními centry.** Ve všech čtyřech bázích DNA byla zjištěna početná nukleofilní centra podléhající alkyloce, která probíhá na atomech dusíku a kyslíku, nejčastěji však na dusíku (obr. 482).

Předpokládá se, že alkyloce se blokuje nebo mění párování bází. Bylo zjištěno, že tyto čtyři O-alkylové deriváty vzniklé reakcí mutagenu s bází na DNA, tj. O<sup>6</sup>-alkyl G, O<sup>4</sup>-alkyl T, O<sup>2</sup>-alkyl T, O<sup>2</sup>-alkyl C, mění párování bází. Např. O<sup>6</sup>-metylguanin se páruje s thyminem a O<sup>4</sup>-metylthymin s guaninem.

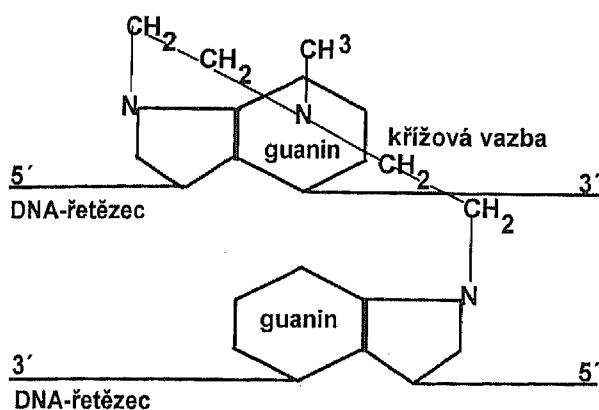
Vraťme se však ještě k dvojfunkčním alkylačním činidlům, která mohou



Atomy, na kterých probíhá alkyloce, jsou očíslovány.

Obr. 482

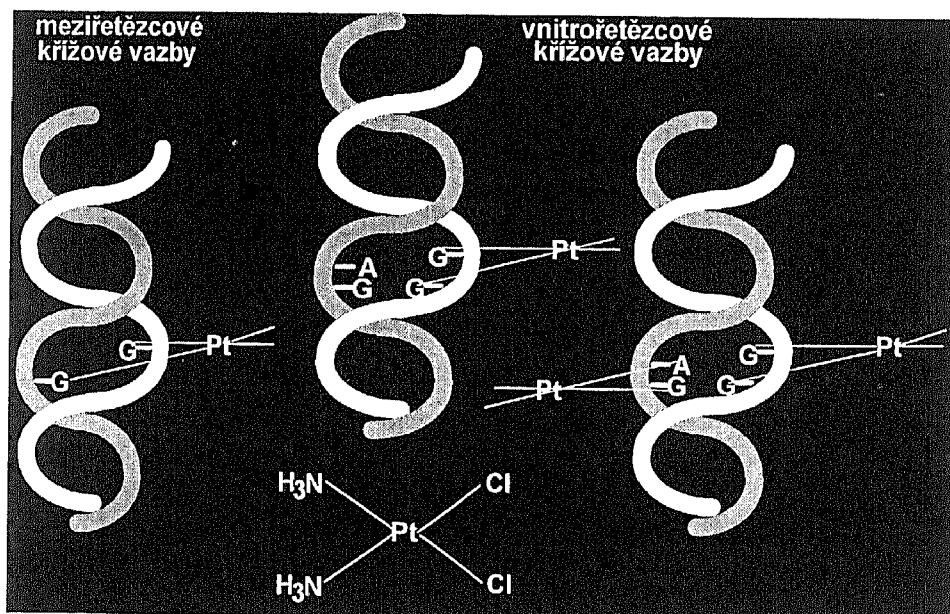
Atomy v párech bází podléhající alkyloce



Obr. 483  
Schematické znázornění meziřetězcové křížové vazby

reagovat s dvěma nukleofilními centry. Jestliže obě centra jsou na opačných DNA-řetězcích, vytvoří se **meziřetězcové křížové vazby** (obr. 483). Jestliže jsou na stejném řetězci, vytvoří se **vnitrořetězcové křížové vazby**.

Meziřetězcové křížové vazby silně poškozují DNA, neboť brání procesu oddělování komplementárních řetězců a blokují tak procesy replikace a transk-

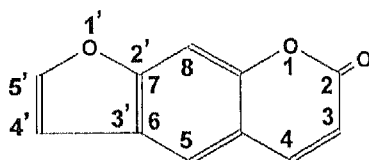


Obr. 484  
Křížové vazby tvořené cis-platinou

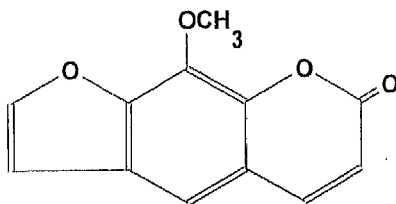
ripce. Takto působí **hořčičný plyn** a různé deriváty platiny, jako je např. **cis-platinum (II) diaminodichlorid** (obr. 483, 484).

**PSORALENY.** Jsou to furokumariny vyznačující se planární tricyklickou konfigurací (obr. 485). Vyznačují se **interkalací** neboli *schopností vmezeřit se v dsDNA mezi dva sousední nukleotidy*. **Látky, které tuto vlastnost mají, se označují jako interkalární.** Pro psoraleny je dále charakteristické, že po interkalaci a následné fotoreaktivaci dlouhovlnným ultrafialovým světlem vytvářejí adukty přes 5,6-dvojnou vazbu tyminu. (Poznámka: jako **adukt** se označuje *adiční molekulární sloučenina*). Psoraleny s úplně planární konfigurací o třech aromatických kruzích (např. 8-metoxypsoralen) reagují za tvorby **monoaduktů** nebo **diaduktů** s pyrimidiny na jednom nebo obou koncích (obr. 486). Diadukty spojují pyrimidin v jednom DNA-řetězci nad rovinou vmezeřeného psora-

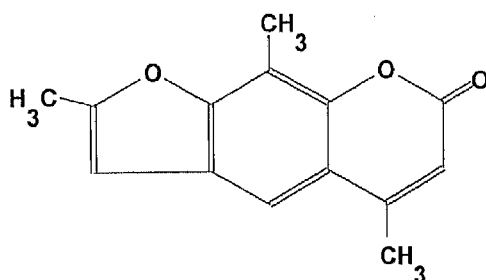
psoralen  
furo [3,2-g] kumarin



8-metoxypsoralen  
(metoxsalen)



4,5',8-trimetylsoralen  
(trioxsalen)

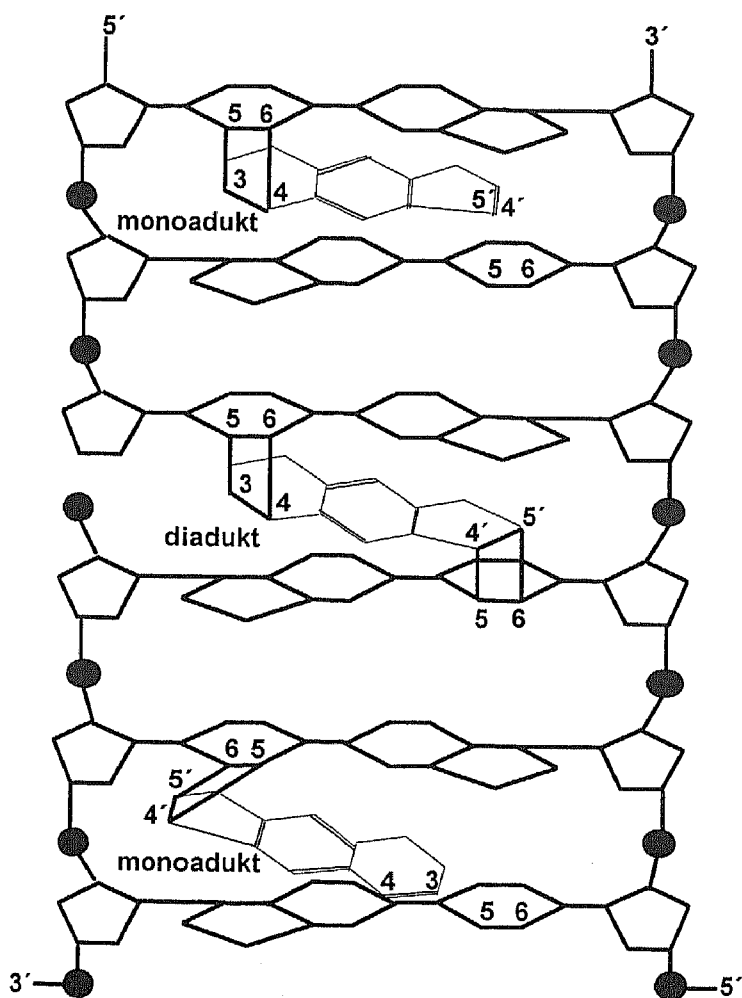


Obr. 485  
Psoraleny a jejich deriváty

lenu s pyrimidinem pod touto rovinou ve druhém DNA-řetězci a vytvářejí tak křížovou vazbu mezi oběma řetězci. To způsobuje, že se dsDNA začne kroutit, vytvářet smyčky a rozmotávat.

Některé furokumariny, např. angelicin, vytvářejí jen monoaddukty, jelikož jeden z konců jejich molekuly není vhodně položen vedle thyminu. Celkově jsou monoaddukty dvojího typu (obr. 486):

- ◆ Monoaddukty, které vznikají reakcí 5,6-dvojně vazby thyminu s 3,4-dvojnou vazbou psoralenu.
- ◆ Monoaddukty, které jsou výsledkem fotoreakce 5,6-dvojně vazby thyminu se 4',5'-dvojnou vazbou psoralenu.



Obr. 486

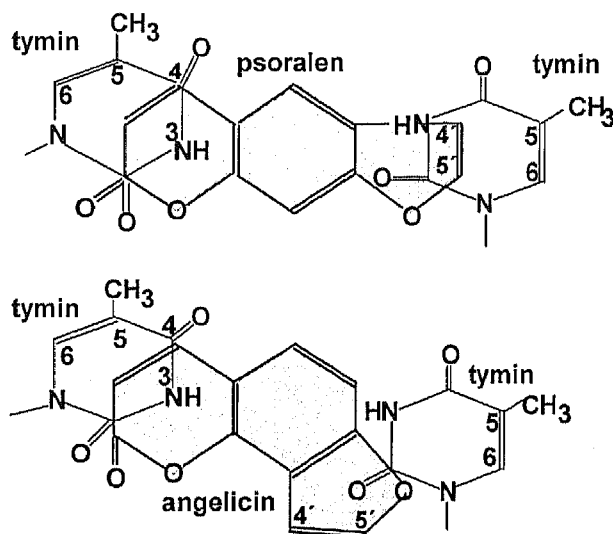
Interakce psoralenu s DNA za tvorby monoadduktů a diadduktů

Na obr. 487 jsou uvedena schémata molekul psoralenu a angelicinu vmezeřených mezi dvěma páry bází v dsDNA. V obou případech jsou molekuly thyminu na protějšcích DNA-řetězcích. Angelicin nemůže tvořit křížovou vazbu, jelikož není vhodně položen vedle thyminu na jednom řetězci.

Psoralenové monoaddukty s thyminem se tvoří mnohem častěji než diadukty s křížovými vazbami. Přesto však především diadukty s křížovými vazbami poškozují DNA bakterií, bakteriofágů a eukaryot. Proto schopnost fotoreaktivovaných psoralenů zastavovat replikaci dělících se buněk umožnila léčit např. psoriázu, nemoc charakteristickou porušením proliferace epitelálních buněk.

**POLYCYKlickÉ UHLOVODÍKY.** Tyto látky vyvolávají mutaci až po metabolické aktivaci, která se uskutečňuje pomocí enzymů cytochromového systému P-450, jejichž biologická funkce je zaměřena na ochranu buňky proti cytotoxickým účinkům tím, že katalyzují přeměnu potenciálně toxických nepolárních látek na látky ve vodě rozpustné a z buňky vylučované. Většina těchto látek je pak pro buňku neškodných. Některé z nich se však přeměňují na produkty, které reagují s nukleofilními centry v DNA a představují pak většinou velmi silné mutageny a kancerogeny.

**Cytochromový systém P-450** je složen z proteinů, které se vážou na endoplazmatické retikulum a vyznačují se oxygenázovou aktivitou. Vyžaduje NADPH a atmosférický kyslík. Počátečním sledem reakcí, které jsou katalyzovány tímto systémem, jsou obvykle metabolizovány hydrofobní nepolární sub-



Obr. 487

Vmezeření psoralenu a angelicinu mezi dvě molekuly thyminu v DNA

stráty na polárnější oxydované meziprodukty a produkty. Tyto pak představují substráty pro sekundární reakce s enzymy, jimiž je katalyzována tvorba konjugátů (obvykle esterů) rychle vylučovaných z organismu.

Jinými příklady enzymů zahrnutých do metabolické aktivace jsou mikrozomální a cytoplazmatické glutation-S-transferázy, sulfotransferázy, acetyltransferázy, UDP-glukuronozyltransferázy a adenylační a metylační enzymy.

**PŘÍKLADY PROMUTAGENŮ A PROKANCEROGENŮ.** Uvedeme nyní příklady metabolické aktivace u několika významných promutagenů a současně prokancerogenů. Jsou to:

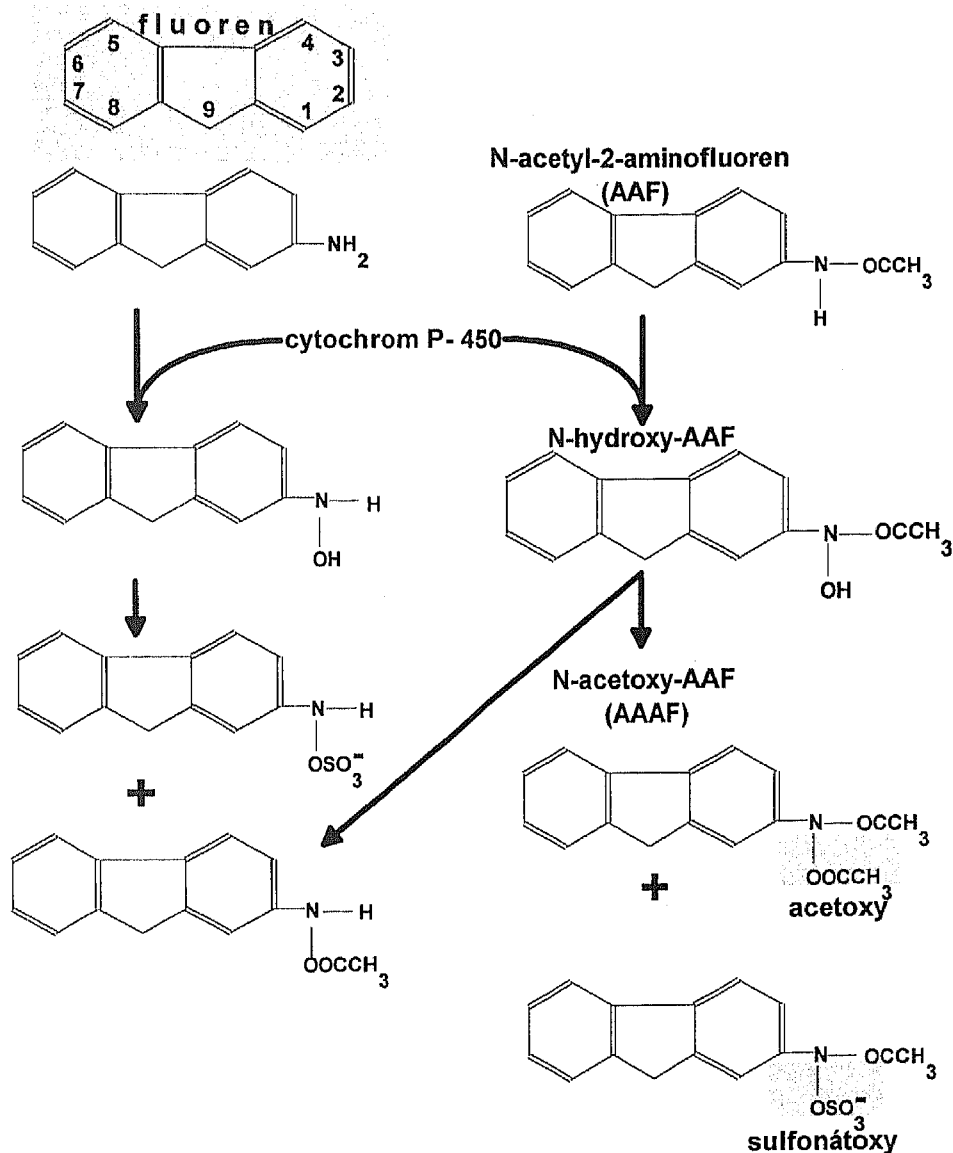
**1. N-acetyl-2-aminofluoren (AAF).** Tento promutagen patří do skupiny aromatických aminů vyznačujících se po metabolické aktivaci kancerogenním účinkem. Prvním stupněm metabolické aktivace těchto látek používaných jako insekticidy je tvorba **N-hydroxy-AAF** katalyzovaná cytochromovým systémem P-450. Tento produkt nazývaný obvykle jako **nejbližší kancerogen** je k DNA relativně inertní, ale jeho přeměna na *sulfátové nebo acetátové estery cytoplazmatickými enzymy vede k N-acetoxy-N-acetyl-2-aminofluorenu (AAAF) jako nejzazšímu kancerogenu*, který působí na DNA jako vysoce účinná alkylační látka (obr. 488) a reaguje s guaninem v nukleotidech na C8 a N<sup>2</sup> za vzniku (obr. 489):

◆ **N-(deoxyguanozin-8-yl)-N-acetyl-2-aminofluorenu** jako hlavního produktu,

◆ **N-(deoxyguanozin-8-yl)-2-aminofluorenu a 3-(deoxyguanozin-N<sup>2</sup>-yl)-N-acetyl-2-aminofluorenu** jako vedlejších produktů.

Normálně C8 guaninu v dsDNA nacházející se v B-konformaci je nepřístupný k hromadění aduktů, jako je např. AAF. Avšak rotace báze kolem N-glykosidové vazby z konformace *anti* na *syn* umožňuje působení na C8 guaninu v B-DNA. Během této konformační změny se modifikovaný guanin přemístí ze svého normálního koplánárního vztahu na sousední báze a do jeho původní pozice se pak může zařadit fluoren. Jestliže je DNA v Z-konformaci, pak je pozice C-8 guaninu velmi přístupná reakci s aktivovaným AAF, jelikož deoxyguanozin v Z-DNA je během párování s deoxycytidinem v konformaci *syn*. Jelikož modifikace deoxyguanozinu promutagenem AAF v DNA způsobuje také rotaci guaninu z konformace *anti* na *syn*, lze předpokládat, že *úseky DNA modifikované AAF, a to zvláště ty úseky, v nichž se střídají páry GC* (str. 86, obr. 68), *způsobují přechod B-DNA do Z-konformace.*

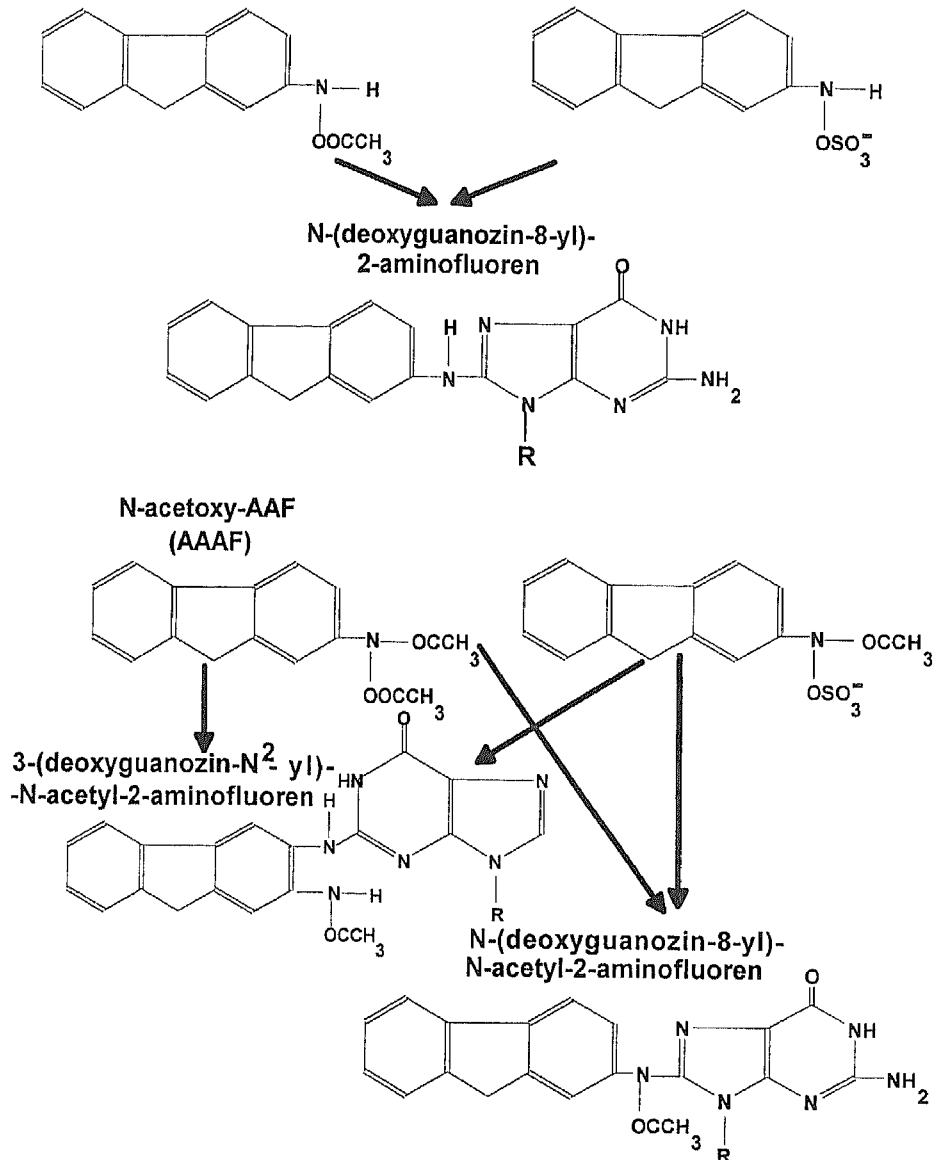
**2. Benzo[a]pyren.** Je to nebezpečný promutagen a prokancerogen nacházející se v cigaretovém kouři a ve výfukových plynech automobilových motorů. Ve své promutagenní a prokancerogenní formě je benzo[a]pyren nereaktivní nepolární sloučeninou vyznačující se planární konfigurací (obr.490).



Obr. 488

Vznik nejbližšího (N-hydroxy-AAF) a nejzáššího (N-acetoxy-AAF) kancerogenu AAF metabolickou aktivací

Složky cytochromového systému P-450, nyní známé jako **arylhydroxylázy**, mohou metabolizovat benzo[a]pyren a jiné polycyklické aromatické uhlovodíky na fenoly a dihydrodioly, které s jejich odpovídajícími esterovými konjugovanými radikály mohou být buňkami vylučovány. Některé produkty metabolismu benzo[a]pyrenu, a to zvláště **epoxydy**, mohou reagovat s nukleofilními



Obr. 489

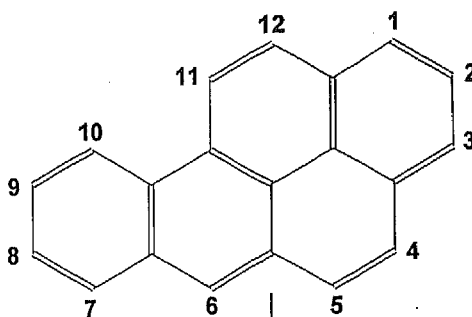
Reakce AAAF a jiných esterů (obr. 488) s guaninem v DNA

centry v DNA. Za nejzášší karcinogenní formu benzo[a]pyrenu se považuje 7,8-diol-9,10-oxid (obr. 490), který po nekovalentní interkalaci do DNA se váže na aminovou skupinu guaninu (obr. 491).

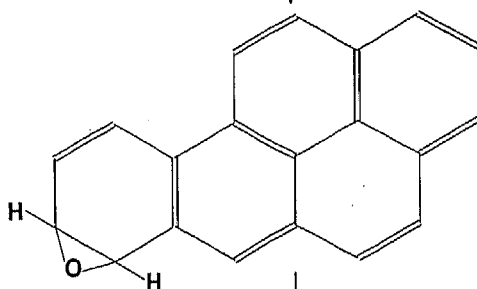
**3. Aflatoxiny.** Patří mezi nejsilnější jaterní prokancerogeny. Jsou to mykotoxiny produkované houbami *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Do



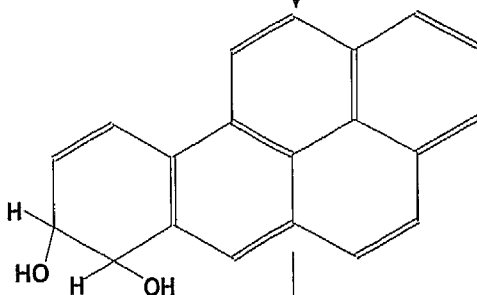
benzo[a]pyren



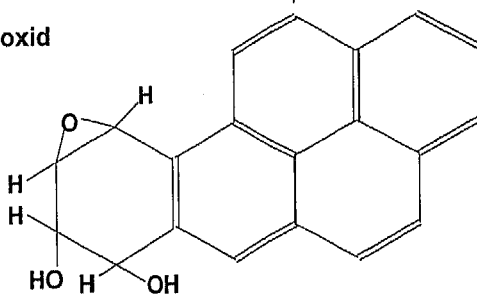
benzo[a]pyren-7,8-oxid



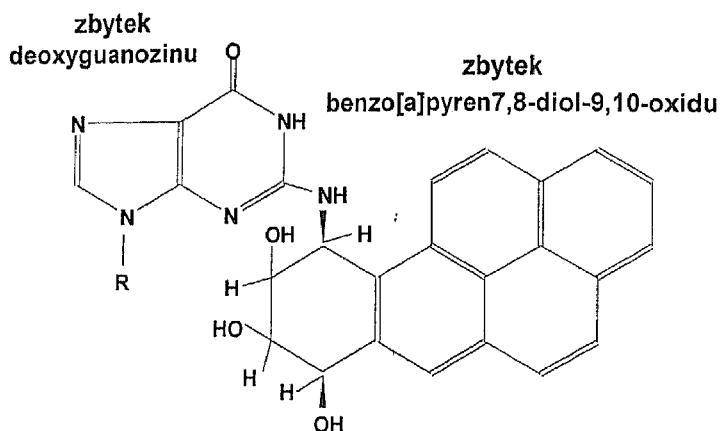
benzo[a]pyren-7,8-diol



benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-oxid



Obr. 490  
Schéma metabolické aktivace benzo[a]pyrenu na nejzazší kancerogen  
7,8-diol-9,10 oxid



Obr. 491

**Tvorba aduktu anti-benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-oxidu  
s aminoskupinou deoxyguanozinu v DNA**

lidského organismu se dostávají potravinami (např. burské oříšky) kontaminovanými těmito houbami. Chemická struktura je uvedena na obr. 492. Mezi aflatoxiny houbového původu patří aflatoxin B<sub>1</sub>. Je to nejsilnější hepatokarcergen.

Aflatoxin B<sub>1</sub> je oxidován oxygenázami cytochromového systému P-450 (obsažený v mikrozomální frakci jaterního extraktu) za tvorby **aflatoxin-B<sub>1</sub>-8,9 - oxidu** jako hlavního produktu (obr. 492), který tvoří s guaninem v DNA adukt **8,9-dihydro-8-(N<sup>7</sup>-guanyl)-9-hydroxyaflatoxin B<sub>1</sub>**.

**4. N-metyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidin.** Jeho reakce se zbytkem cysteinu v glutationu vede k tvorbě produktu, kterým je metylována DNA.

**5. Dimetylnitrozamin a N-metylnitrozomočovina.** Dimetylnitrozamin je demetylován cytochromovým systémem P-450 nebo specifickou mikrozomální aminoroxidázou. N-metyl-N-nitrozomočovina se na tento produkt hydroxyluje neenzymaticky. Dalšími reakcemi se vytvoří reaktivní kation  $\text{CH}_3^+$ , který představuje nejzářší karcergen alkylující DNA.

**6. Dusičnany.** Dusičnany se v těle nejdříve přemění na N-metyl-N-nitrozomočovinu, která se dále přemění na karcergen kationty  $\text{CH}_3^+$  alkylující DNA.

### 10.3.2

#### Mutace indukované fyzikálními faktory

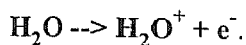


**IONIZUJÍCÍ ZÁŘENÍ.** Ionizující záření (rentgenové paprsky, záření X, protony, neutrony a elektrony o vysokém obsahu energie) působí na atomy vodíku sestávající z protonu a elektronu. Elektrony působí přímo na DNA nebo rozkládají vodu za tvorby hydroxylových radikálů, které poškozují strukturu DNA několika způsoby (obr. 493):

◆ Vedou k tvorbě **křížových vazeb**, což jsou kovalentní vazby mezi protilehlými nukleotidy.

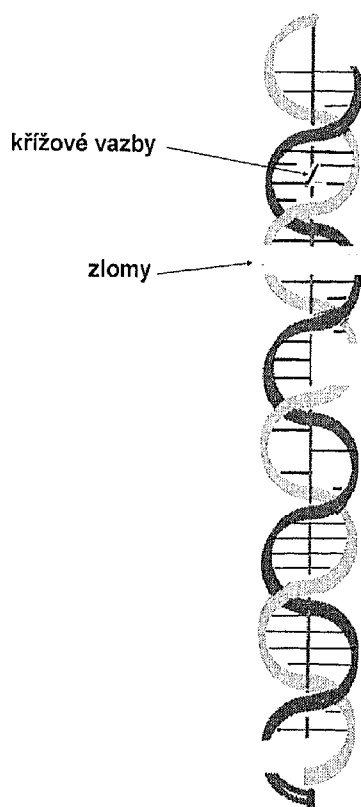
◆ Způsobují zlomy v obou komplementárních řetězcích nebo v jednom.

Bylo zjištěno, že asi 80 % energie uložené v buňkách pochází z odnětí elektronů z vody touto reakcí:



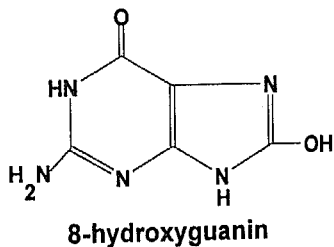
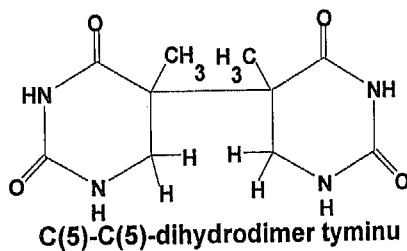
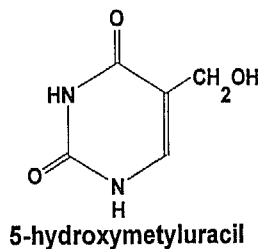
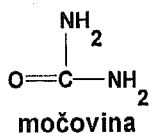
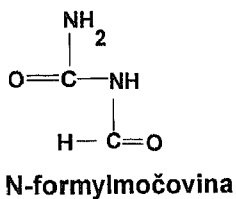
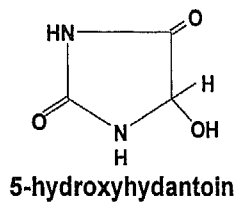
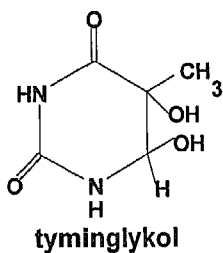
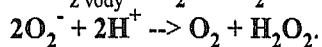
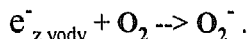
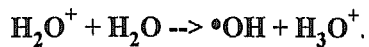
Kromě toho se následujícími reakcemi tvoří **relativně stabilní reaktanty**

•OH,  $\text{O}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



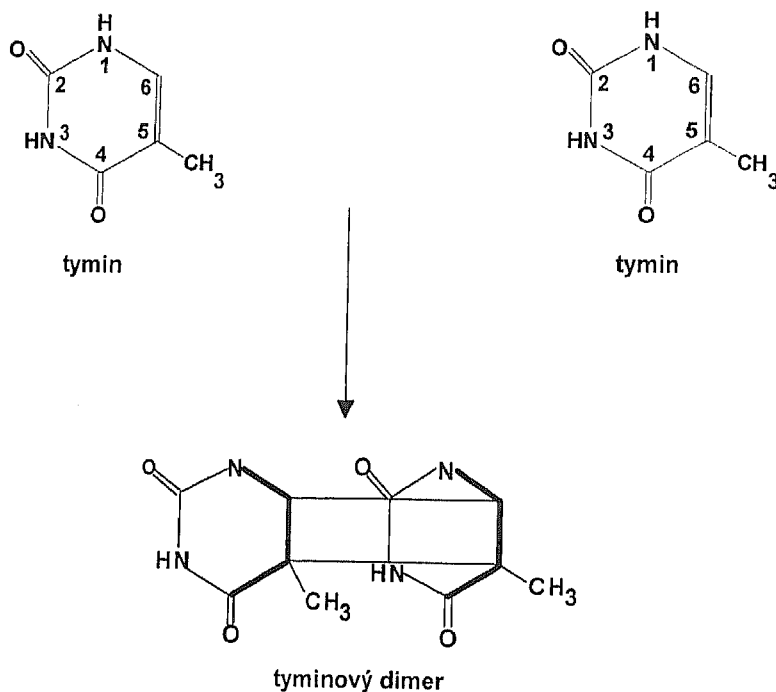
Obr. 493

Účinek ionizujícího záření na DNA



Obr. 494

Změny bází vyvolané ionizujícím zářením za přítomnosti kyslíku



**Obr. 495**  
**Vznik tyminového dimeru**

Asi 65 % poškození je způsobeno hydroxylovými radikály ( $\cdot\text{OH}$ ) a 35 % přímou ionizací. Hydroxylové radikály napadají dvojné vazby mezi  $\text{C5}=\text{C6}$  (obr. 471). Přímý účinek ionizujícího záření vede k vypuzení elektronu z nenasycené vazby  $\text{C5}=\text{C6}$  a výsledný kationtový radikál pak dále reaguje s hydroxylovým iontem. Proto přímé a nepřímé radiační účinky vedou ke stejným produktům. Za aerobních podmínek další reakce s  $\text{O}_2$  vede k produktům uvedeným na obr. 494.

**UV ZÁŘENÍ.** Ozáření DNA ultrafialovým světlem vede ke specifitějšímu účinku než ionizujícím zářením, neboť pohlcovat ultrafialové paprsky mohou jen molekuly, v nichž jsou dvojné vazby; každá taková molekula má své zvláštní absorpční spektrum s maximy při určitých vlnových délkách. Báze nukleových kyselin mají maximum absorpce v oblasti 260 až 280 nm. Ultrafialové paprsky v této oblasti vykazují přímý účinek na nukleové kyseliny.

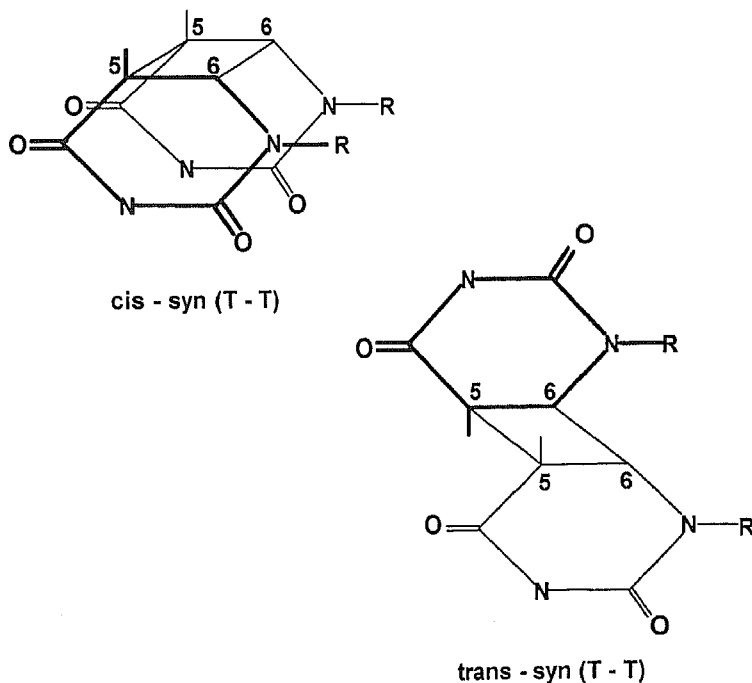
Absorpce UV světla způsobuje v molekule DNA dimerizaci dvou sousedních pyrimidinových molekul nacházejících se na stejném polynukleotidovém

*řetězci*. V dimeru jsou molekuly thyminu spojeny cyklobutanovým kruhem, který se vytvoří aktivací konjugované vazby mezi C5 a C6 sousedících molekul thyminu. **Tyminový dimer** tedy představuje dvě *sousední molekuly thyminu kovalentně spojené v DNA-řetězci do cyklobutanového kruhu vlivem ozáření DNA UV světlem*. Dimery, které se takto po ozáření UV světlem vytvoří, jsou chemicky stabilní a nejsou-li odstraněny, jsou letální, neboť překáží v replikaci a transkripci (obr. 495).

Teoreticky se tyminové dimery mohou vyskytovat ve 12 izomerních formách. Z nich pouze 4 s konfigurací *cis-syn*, *cis-anti*, *trans-syn* a *trans-anti* se získávají ve významném množství. Předpokládá se, že v *B-dsDNA* se tyminové dimery vyskytují jako *cis-syn*. Dimery *trans-syn* se pravděpodobně tvoří ve spojích úseků B-DNA-Z-DNA po jejich ozáření (viz str. 86, obr. 68). Rozdíl mezi oběma konformacemi dimeru je uveden na obr. 496.

Další produkt účinku UV-světla na DNA je dimer thyminu a cytozinu. Tento dimer se tvoří kovalentní vazbou mezi C6 thyminu a C4 sousedního cytozinu a označuje se jako **TC (6-4)-produkt**.

Je pravděpodobné, že UV záření však přispívá ke vzniku excitovaných



Obr. 496

Tyminový dimer (T - T) v konformaci *cis - syn* a *trans - syn*

stavů v molekulách bází, takže pak *elektrony v těchto molekulách přecházejí snadněji do nestabilních tautomerních forem*. Tímto způsobem zvyšuje pravděpodobně UV záření frekvenci spontánních mutací. Zvýšení mutačních rychlostí relativně velkými dávkami UV světla je způsobeno *náhodnými chybami v zařazování nukleotidů, které vznikají během excizních oprav*.



# 11

## MOLEKULÁRNÍ PODSTATA REKOMBINACE

Kromě mutace se na změnách genetické informace podílí též **rekombinace**. Tím rozumíme novou kombinaci nukleotidových sekvencí ve vazbové skupině, která je způsobena crossing-overem. Jako **crossing-over** se označuje výměna nukleotidových sekvencí mezi dvěma homologickými molekulami DNA probíhající zlomem a znovuspojením. **Zlom a znovuspojení** představuje naštěpení dvou paralelních homologických polymukleotidových řetězců a křížové spojení fragmentů vzniklých tímto štěpením. Organismus, jehož změněný genom je výsledkem rekombinace, se označuje jako **rekombinanta**. Obecně se rozeznávají dvě formy rekombinace:

1. **Obecná rekombinace**, tj. rekombinace, která je výsledkem crossing-overu probíhajícího mezi kterýmikoli geny nebo sekvencemi alel homologických vazbových skupin.

2. **Specifická rekombinace**, tj. rekombinace, která je výsledkem crossing-overu uskutečňujícího se mezi homologickými sekvencemi dvou jinak nehomologických vazbových skupin (probíhá jen na určitých místech vazbových skupin).

Obecná rekombinace může být **intergenová**, tj. probíhající mezi geny homologických vazbových skupin, nebo **intragenová**, tj. probíhající mezi nukleotidovými sekvencemi alel téhož genu. Probíhá při nízkých frekvencích u všech organismů, a to:

- ◆ mezi virovými genomy, kterými je infikována hostitelská buňka,
- ◆ při transformaci, transdukci a konjugaci bakterií,
- ◆ během meiózy a mitózy eukaryotických buněk.

Celkově lze na obecnou rekombinaci nahlížet jako na jev, při kterém zlomem poškozené nesesterské chromatidy téhož chromozomového páru se spojí, což je základem výměny alel mezi nimi.

Místně specifická rekombinace je omezena na interakce virového genoforu a plazmidů s DNA chromozomů hostitelských buněk. Při těchto interakcích dochází k integraci a k excizi virových genoforů nebo plazmidů. Jako **integrace** se označuje začlenění virového genoforu nebo epizomového plazmidu do chromozomu hostitelské buňky. Opačným pochodem je **excize**. Obecně se excizi rozumí vyštěpení určité (menší) nukleotidové sekvence z nukleotidové sekvence delší.

## 11.1 OBEČNÁ REKOMBINACE

### 11.1.1 Hollidayův model obecné rekombinace

**POPIS MODELU.** Hollidayův model zatím nejlépe vystihuje proces rekombinace, podle kterého probíhá obecná rekombinace v těchto krocích:

**1. Párování homologických molekul dsDNA** (obr. 497a). Dvě molekuly DNA nebo jejich části, které mají rekombinovat, musí být v těsném kontaktu, do kterého přicházejí např. u eukaryot během meiózy. Další podmínkou je, že musí být dostatečně homologické. Homologickými molekulami DNA se obvykle rozumí molekuly DNA, které jsou součástí homologických chromozomů. Při molekulárním výkladu rekombinace však nevystačíme jen s touto představou homologie, ale budeme muset uvažovat též sekvenční homologii (viz str. 88 a 149) mezi molekulami DNA. K rekombinaci dochází mezi paralelními řetězci dvou homologických molekul DNA. **Paralelními DNA-řetězci** se rozumí *řetězce stejné polarity, tj. vyznačující se stejnou orientací fosfodiesterových vazeb*. Dvě homologické molekuly dsDNA se pak mohou spárovat pomocí paralelních řetězců na principu tzv. **homologického párování** (str. 783).

**2. Vytvoření zlomů v paralelních řetězcích** (obr. 497a). V paralelních řetězcích se vlivem endonukleáz vytvoří zlomy. Není známo, jak k těmto zlomům dochází během meiózy u eukaryot. U bakterií k nim dochází běžně, např. během konjugace. Jejich vznik je však nezbytnou podmínkou k uskutečnění obecné rekombinace jak u prokaryot, tak i u eukaryot. Na obr. 497a jsou znázorněny na protilehlých místech.

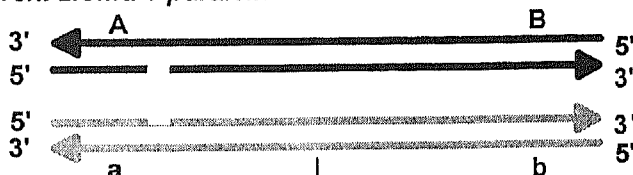
**3. Vzájemné prostupování řetězců, jejich výměna a asimilace** (obr. 497a). *Vzájemným prostupováním řetězců se rozumí proces probíhající mezi dvěma molekulami dsDNA, který je charakteristický tím, že jeden řetězec obou dvouřetězcových molekul DNA se svým zlomeným koncem spojí s paralelním řetězcem druhé dvouřetězcové molekuly DNA. Oba zlomené řetězce si takto vymění matrici, přičemž se vzájemně překříží a svými volnými konci se kovalentně spojí s homologickým řetězcem a spárují se s antiparalelním řetězcem DNA-molekuly, do které vstoupily.* To se označuje jako **výměna DNA-řetězců**. Výsledkem těchto procesů pak je **asimilace DNA-řetězců**, tj. *nahrazení jednoho řetězce dvouřetězcové molekuly DNA homologickým řetězcem jiné molekuly*. Spojení obou molekul dsDNA formou překřížených asimilovaných a homologických DNA-řetězců se označuje jako **Hollidayův spoj** nebo **též chi-struktura**.

**4. Posun Hollidayova spoje** (obr. 497a). Hollidayův spoj se pohybuje

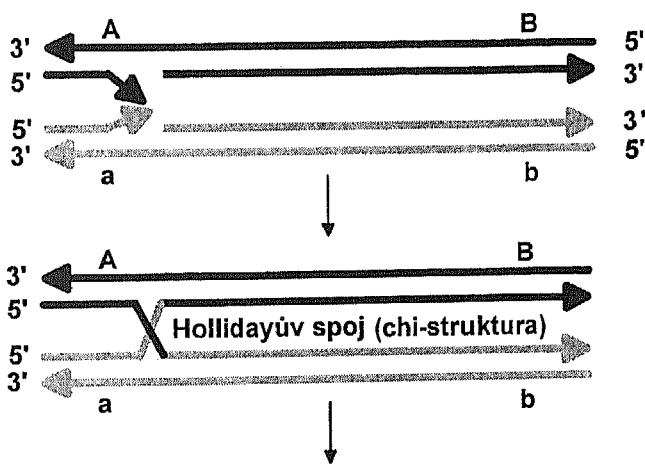
## 1. Párování homologických molekul.



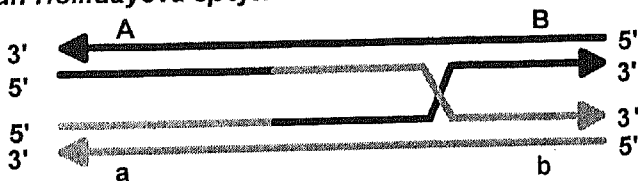
## 2. Vytvoření zlomů v paralelních řetězcích.



## 3. Vzájemné prostupování řetězců, jejich výměna a asimilace.

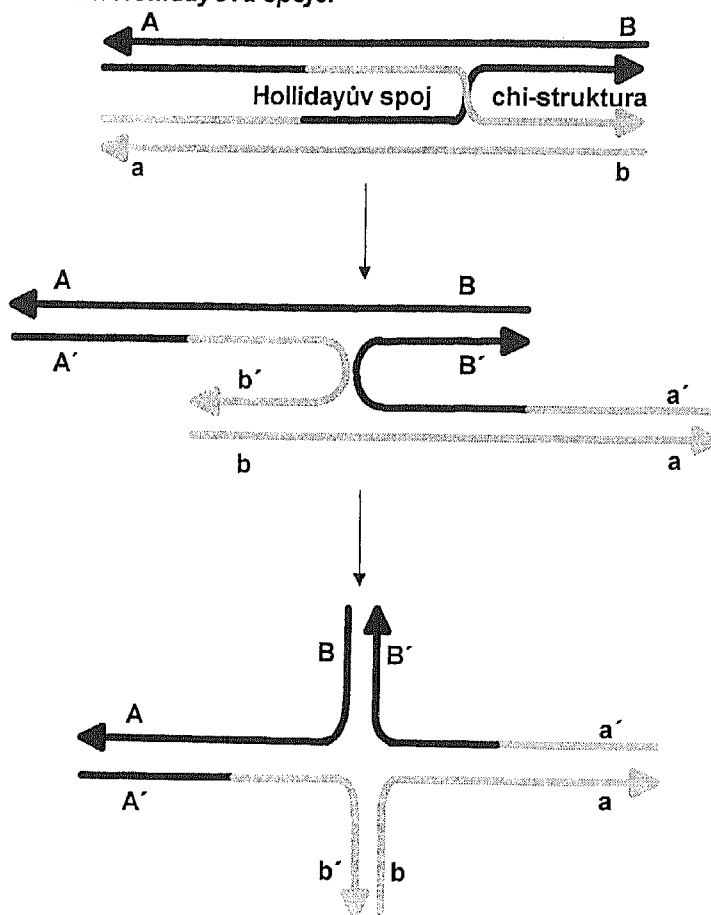


## 4. Posun Hollidayova spoje.



Obr. 497a  
Schéma Hollidayova modelu  
obecné rekombinace

## 5. Roztažení Hollidayova spoje.



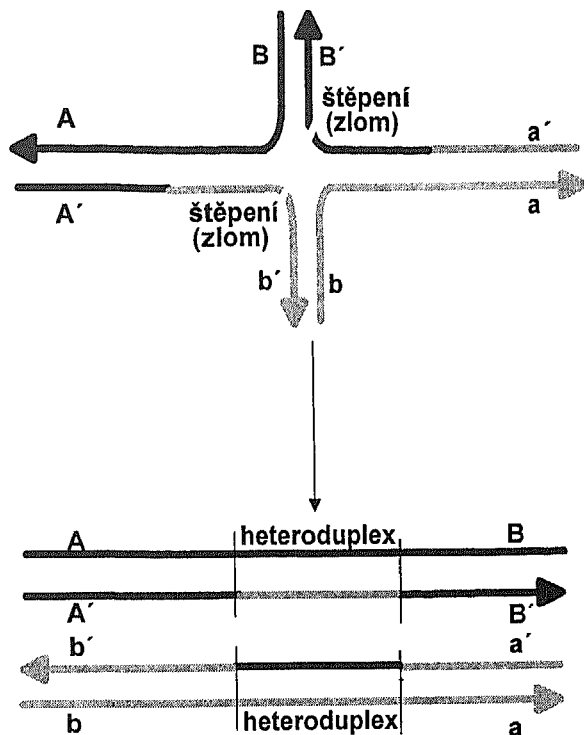
Obr. 497b  
Schéma Hollidayova modelu  
obecné rekombinace

podél dvoušroubovice. Tento pohyb probíhá vlivem otáčení DNA, otevírání a uzavírání vodíkových vazeb mezi komplementárními nukleotidy, aniž se přitom narušuje geometrie a struktura dvojité šroubovice. Tento proces se nazývá **posun Hollidayova spoje** a rozumí se tím *postupné posouvání překřížených DNA-řetězců při rekombinaci*.

**5. Roztažení Hollidayova spoje.** Předpokládá se, že se v konečné fázi posunu Hollidayova spoje tento spoj roztáhne do tvaru, který je schematicky znázorněn na obr. 497b.

**6. Zrušení Hollidayova spoje.** V tomto stavu pochopitelně obě molekuly

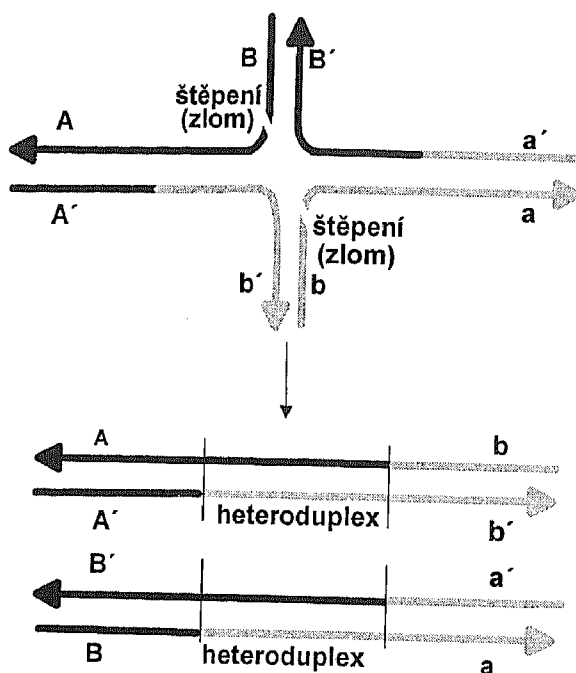
## 6. Zrušení Hollidayova spoje



Obr. 497c  
Schéma Hollidayova modelu  
obecné rekombinace

DNA nemohou zůstat, a proto se štěpí endonukleázami ve dvou různých rovinách za vzniku produktů (obr. 497c a 497d), které lze dokázat jako výsledek rekombinace. *Proces štěpení Hollidayova spoje na výsledné produkty* se označuje jako **zrušení Hollidayova spoje** nebo **zrušení chi-struktury**. Výsledné molekuly DNA jsou charakteristické heteroduplexními oblastmi, v nichž protilehlé úseky DNA nejsou zcela komplementární, jestliže pocházejí z různých alel téhož genu. **Heteroduplex** je *hybridní molekula DNA vyznačující se neúplnou komplementaritou*. Pouze však molekuly vzniklé podle schématu na obr. 497d se liší v kombinaci alel proti původní kombinaci, tj. na jedné molekule DNA jsou kombinace alel **Ab** proti původní **AB** a na druhé **aB** proti původní **ab** (srovnejte obr. 497a s obr. 497c a 497d).

**OBECNÁ REKOMBINACE U PROKARYOT.** U bakterií (*E. coli*) je

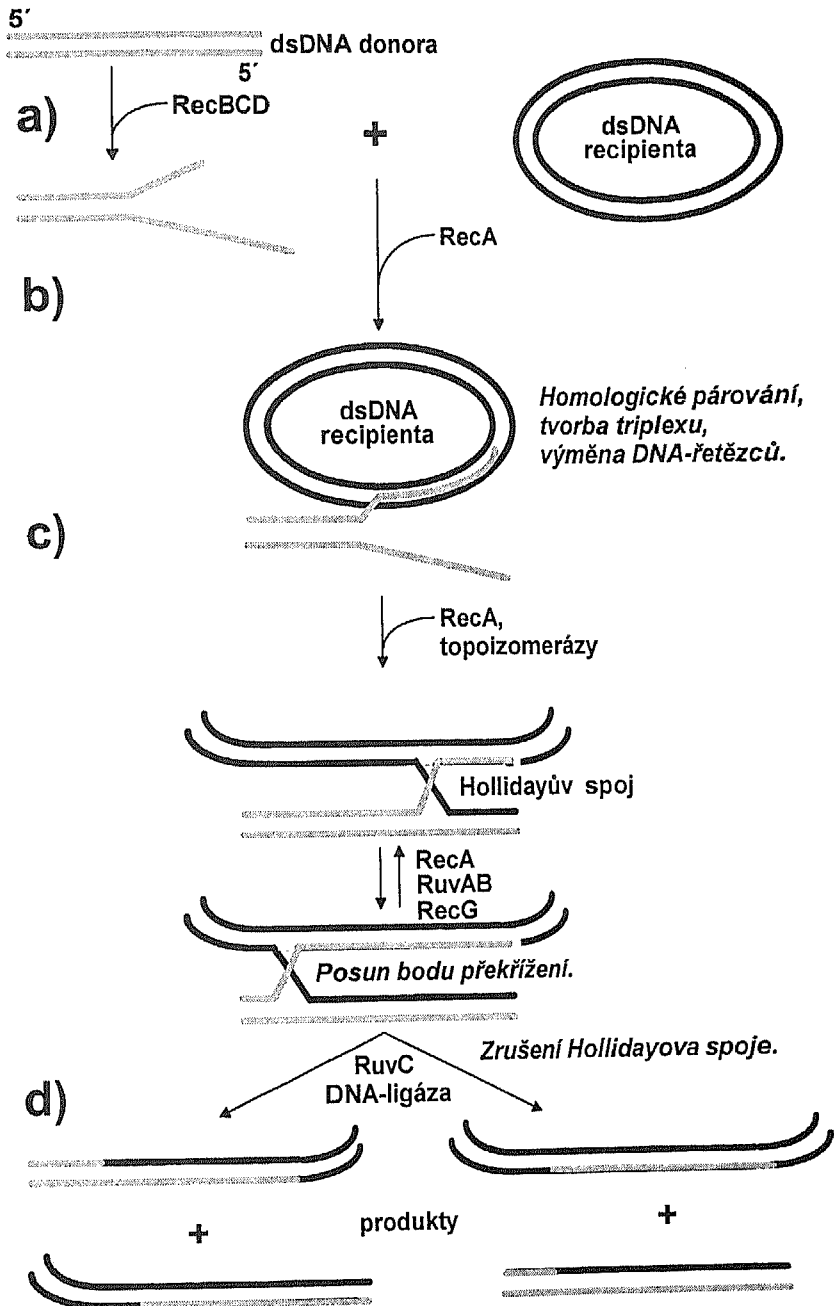


Obr. 497d  
Schéma Hollidayova modelu  
obecné rekombinace

Hollidayův model obecné rekombinace nejlépe propracován. Vzhledem k tomu, že enzymy, které katalyzují tuto rekombinaci, byly zjištěny též u eukaryotických organismů, lze předpokládat, že eukaryotická rekombinace se nebude podstatně lišit od prokaryotické.

U bakterií dochází k rekombinaci běžně při konjugaci (str. 159 a 183). Při této rekombinaci jde o interakci mezi lineární dsDNA z donorové buňky a kružnicovou dsDNA buňky recipientní. Celý proces této rekombinace lze rozdělit do etap, které byly již v podstatě popsány výše. Obr. 498 jen aplikuje tyto etapy na rekombinaci probíhající u *E. coli*. Každá etapa je též charakteristická aktivitou enzymů, které jsou popsány v následujících odstavcích.

**RecA-PROTEIN.** Tento protein představuje vlákno o několika monomerech, které má afinitu k molekulám dsDNA a proto po navázání na 3'-konec dsDNA vtahuje tuto DNA do dvouřetězcových úseků za tvorby triplexu. Kromě této aktivity katalyzuje též homologické párování a výměnu řetězců (obr. 499a,



Obr. 498  
 Obecná rekombinace během konjugace *E. coli*

499b). Podrobněji je tento enzym popsán v kapitole 11.1.2.

**RecBCD-ENZYM.** Vyznačuje se helikázovou, ssDNA- a dsDNA-exonukleázovou aktivitou. Je nutno zdůraznit, že tento proteinový komplex štěpí u *E. coli* DNA-řetězec v sousedství sekvence:



Tato sekvence se opakuje každých 5 kb a po každém jejím štěpení následuje odvíjení a svinování dsDNA katalyzované také RecBCD-proteinem za uvolnění 3'-konce ssDNA, která se takto odvinuje až do několika kb a je pak substrátem pro RecA-protein (obr. 499a). RecBCD-enzym začíná odvinovat dsDNA tím, že se nejdříve naváže na její konec. Podjednotky enzymu RecB a RecD vážou ATP a předpokládá se, že katalyzují translokaci enzymu za hydrolyzy ATP a odvinování řetězců. Je pravděpodobné, že jen jedna podjednotka působí jako helikáza a druhá jako translokáza. Podjednotka RecB uskutečňuje translokaci na DNA-řetězci ve směru 3'→5', zatímco podjednotka RecD se pohybuje po řetězci, jehož polarita je 5'→3'. Obě podjednotky se pohybují různou rychlostí, což vede k tomu, že se na řetězci, kde je rychlost pohybu pomalejší, vytvoří smyčka, která se postupně zvětšuje před podjednotkou RecB.

Globálně je znázorněno působení RecBCD-proteinu na obr. 499b.

**DALŠÍ PROTEINY.** Z nich vybíráme tyto:

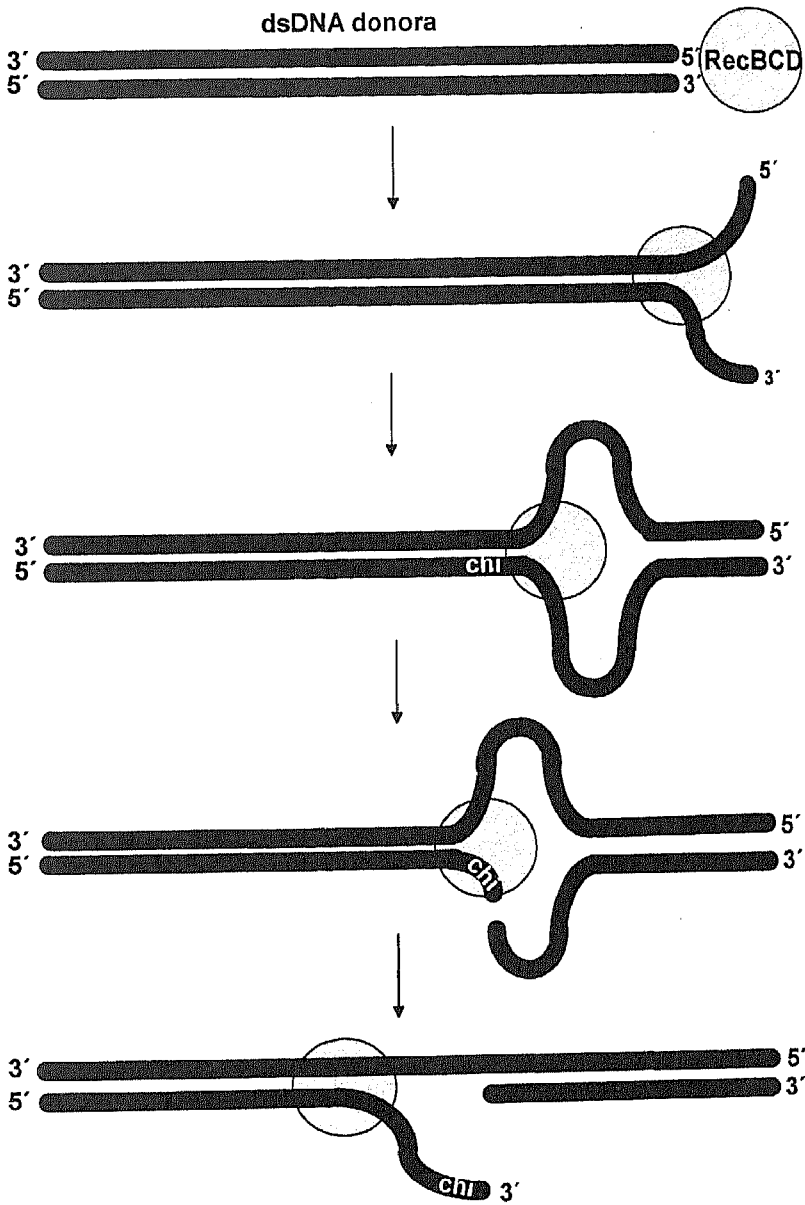
1. **RuvA-protein**, který katalyzuje tvorbu Hollidayovy struktury, její roztažení a působí v součinnosti s RuvB-proteinem.
2. **RuvB-protein** katalyzuje posun bodu překřížení, vyznačuje se aktivitou helikázy a působí v součinnosti s RuvA-proteinem.
3. **RecG-protein**, který také katalyzuje posun bodu překřížení a vyznačuje se aktivitou helikázy.
4. **RuvC-protein** a **Rus-protein** ruší Hollidayovu strukturu jejím štěpením na výsledné produkty rekombinace.

### 11.1.2

#### RecA-protein (RecA-rekombináza)

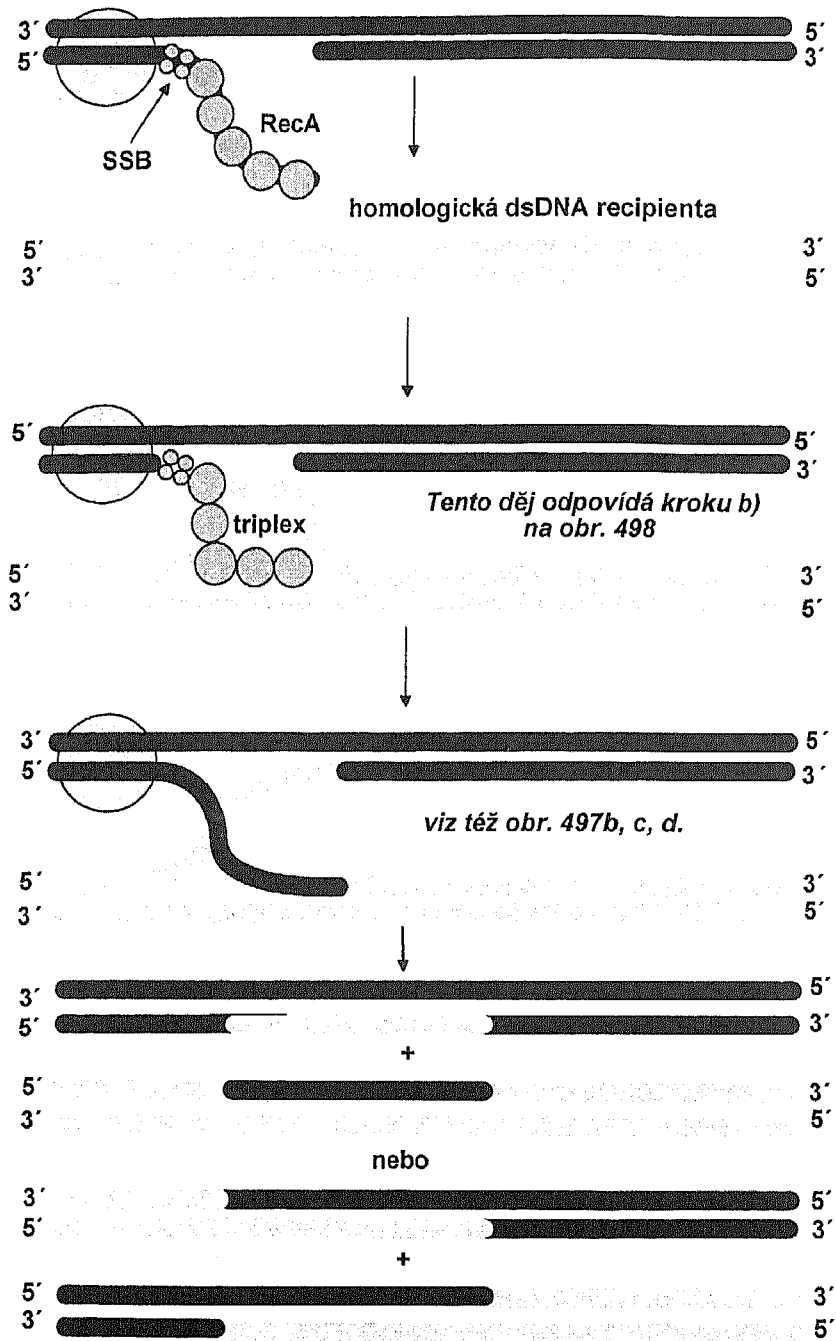
**VLASTNOSTI RecA-PROTEINU.** Je to enzym, který katalyzuje homologické párování mezi rekombinujícími molekulami DNA a výměnu řetězců. Nepůsobí katalyticky jako monomer, ale jako helikální vlákno polymerizované na DNA z monomerů. Má dvě vazebná místa: jedno pro ssDNA a druhé pro ho-





*Děje, které jsou zde schematicky znázorněny, jsou zahrnuty do kroku a) na obr. 498.*

**Obr. 499a**  
**Působení RecBCD-proteinu a RecA-proteinu,**  
**tvorba triplexu**



Obr. 499b

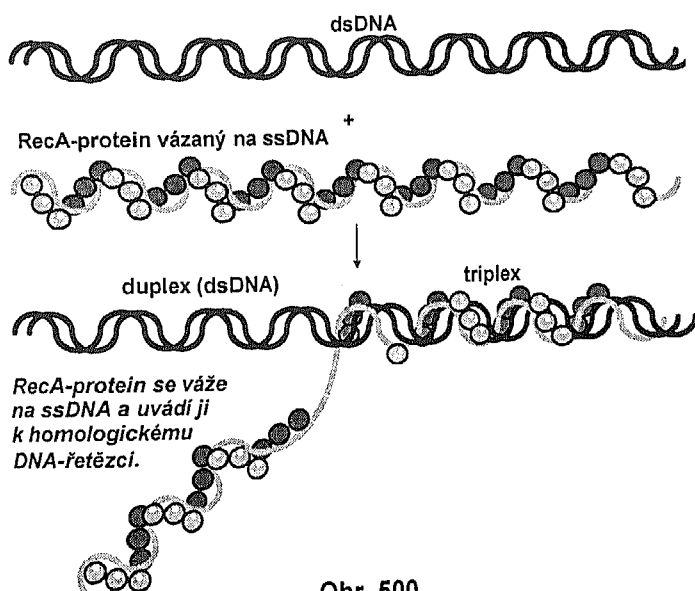
Působení RecBCD-proteinu a RecA-proteinu, tvorba triplexu

mologickou dvoušroubovici dsDNA. Na ssDNA se váže v poměru jeden RecA na tři nukleotidy. Na 3'-konec ssDNA se váže jako tetramer a tvoří tak postupně s ssDNA nukleoproteinové vlákno vyznačující se afinitou k dsDNA. Takové vlákno se vytváří též s molekulami dsDNA, které se vyznačují jednořetězcovými zlomy a katalyzuje pak výměnu rekombinujících DNA-řetězců. Na jeden závit DNA připadá 6,2 monomerů RecA-proteinu.

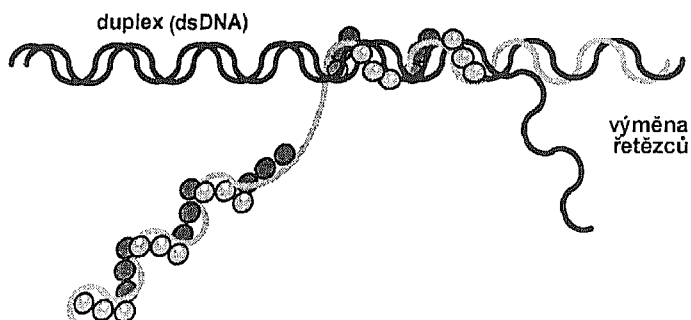
Je nutno tedy rozeznávat nukleoproteinové vlákno **RecA:ssDNA** a **RecA:dsDNA**. V obou vláknech je DNA v B-formě a odvíjí se s účinností 18,6 bp na jeden závit. Odvíjením dsDNA se ve větším žlábků odkrývá úsek s donory a akceptory vodíku, takže pak může proběhnout párování s třetím řetězcem za tvorby triplexu jako meziproductu obecné rekombinace u bakterií.

Při tvorbě triplexu postupuje za tvorby **D-smyčky** 3'-konec nukleoproteinového vlákna RecA:ssDNA homologickou dsDNA (obr. 499b). Jako *D-smyčka* se nazývá oblast v dsDNA, která vzniká vytěsněním většího nebo menšího segmentu jednoho řetězce homologickým segmentem jiného DNA-řetězce nahrazujícím vytěsněný řetězec v párování s jeho komplementárním řetězcem. Odvíjením dsDNA odkrývá RecA-protein oblasti, které jsou homologické s jednořetězcovou DNA tvořící s ním komplex. Odkrývání homologie má za následek, že se ssDNA RecA-proteinu uvnitř dsDNA spáruje s komplementárními sekvencemi, což vede k posunu Hollidayova spoje a k rekombinaci (499b).

Na obr. 500 a 501 je znázorněno rozeznávání homologického úseku dsDNA nukleoproteinovým filamentem RecA-proteinu a též výměna řetězců. Tento děj si představte v krocích a) a b) na obr. 498.



Obr. 500  
Rozeznávání homologie v dsDNA RecA-nukleoproteinem



Obr. 501

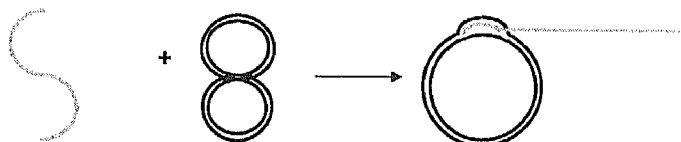
### Výměna řetězců řízená RecA-proteinem

**FORMY REKOMBINACE NAVOZENÉ RecA-PROTEINEM.** RecA-protein katalyzuje *in vitro* homologické párování a výměnu řetězců u různých typů DNA. Jsou to (obr. 502):

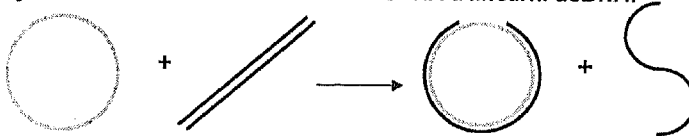
1. **Výměna řetězců mezi lineární ssDNA a nadšroubovicovou kružnicovou dsDNA.** Lineární ssDNA vnikne do nadšroubovicové dsDNA. Výsledkem tohoto procesu jsou homologicky spárované molekuly DNA obsahující D-smyčku. To odpovídá obr. 498b, 499b.

2. **Výměna řetězců mezi kružnicovou ssDNA a lineární dsDNA.**

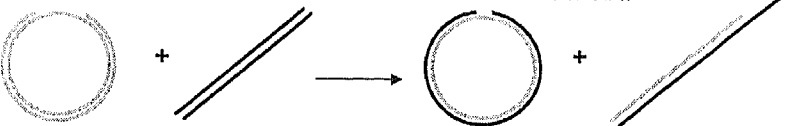
1. **Výměna řetězců mezi lineární ssDNA a nadšroubovicovou dsDNA.**



2. **Výměna řetězců mezi kružnicovou ssDNA a lineární dsDNA.**



3. **Výměna řetězců mezi kružnicovou dsDNA a lineární dsDNA.**



Obr. 502

Výchozí molekuly DNA pro homologické párování a výměnu řetězců řízenou RecA-proteinem

Párování kružnicové ssDNA s lineární dsDNA umožňuje úplnou výměnu DNA-řetězců za tvorby *dsDNA se zlomem v jednom řetězci a lineární ssDNA*.

**3. Výměna řetězců mezi kružnicovou dsDNA a lineární dsDNA.** Základem tohoto procesu je spojení dvou molekul dsDNA za vzniku *jedné molekuly dsDNA se zlomem v jednom řetězci a lineární dsDNA s přečnivajícím koncem*.

Heteroduplexní produkty, které vznikají těmito výměnami, tvoří **plektonemicky spojené molekuly**, ve kterých *vnikající řetězec se proplétá s jemu komplementárním řetězcem způsobem Watsonovy-Crickovy dvoušroubovice a je stabilní za nepřítomnosti RecA-proteinu*. Opačný případ jsou **paranemicky spojené molekuly**, ve kterých jsou obě komplementární sekvence *sduženy navzájem vedle sebe, aniž jsou propleteny do dvoušroubovice a jsou za nepřítomnosti RecA-proteinu nestabilní*. Jejich výskyt je výjimečný a pokud se vyskytují, pak pravděpodobně jsou prekurzorovým stadiem plektonemicky spojených molekul.

**HOMOLOGICKÉ PÁROVÁNÍ.** Toto párování se uskutečňuje v rámci třířetězcových úseků (v triplexu, obr. 498, 499b, 502). Samozřejmě to předpokládá, že se ještě před uskutečněním rekombinace vytvoří jednořetězcová DNA. Tento předpoklad byl experimentálně potvrzen u bakterií (viz **a** a **b** na obr. 498) a je pravděpodobné, že platí i pro eukaryota.

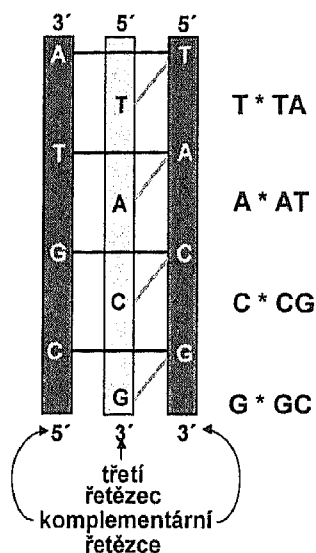
*Řetězec, který se v triplexu páruje homologicky s jedním řetězcem dvouřetězcové DNA, budeme nazývat třetím řetězcem; oba další řetězce se párují Watsonovým-Crickovým způsobem.*

Na základě experimentálních údajů a počítačového modelování byly pro triplex, ve kterém probíhá rekombinace, navrženy tyto způsoby párování (obr. 503, 504a, b, c):



Báze označené hvězdičkou jsou báze třetího řetězce. Všechny báze tohoto řetězce jsou v konformaci *anti* vyjma A v triádě  $A^*AT$  na obr. 504b. Od Hoogsteenova párování bází, které se též uskutečňuje v triplexu, se homologické párování zásadně liší v tom, že jsou navzájem též spárovány stejné báze, kdežto podle Hoogsteenova párování nikoliv (obr. 37, str. 62). Homologické párování  $A^*AT$  (obr. 504c) je však možné též podle obráceného Hoogsteenova párování (str. 63, obr. 38).

Triplex, v němž probíhá homologické párování při rekombinaci, nelze ztotožňovat s triplexy, které jsou popsány na str. 90 - 91 (obr. 71, 72). Hlavním důvodem pro toto tvrzení je skutečnost, že tyto triplexy se tvoří *in vitro* neenzymaticky v úsecích s homopurinovými a homopyrimidinovými sekvencemi.

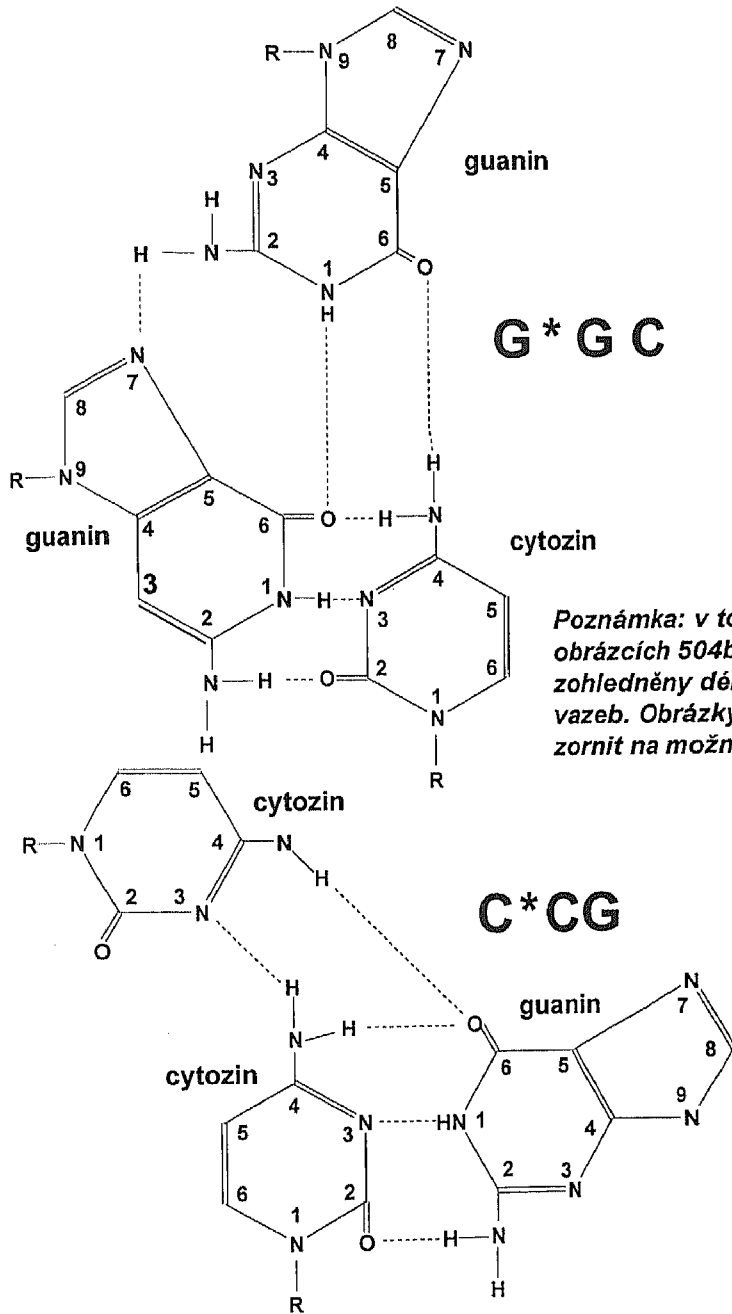


**Obr. 503**  
Homologické párování

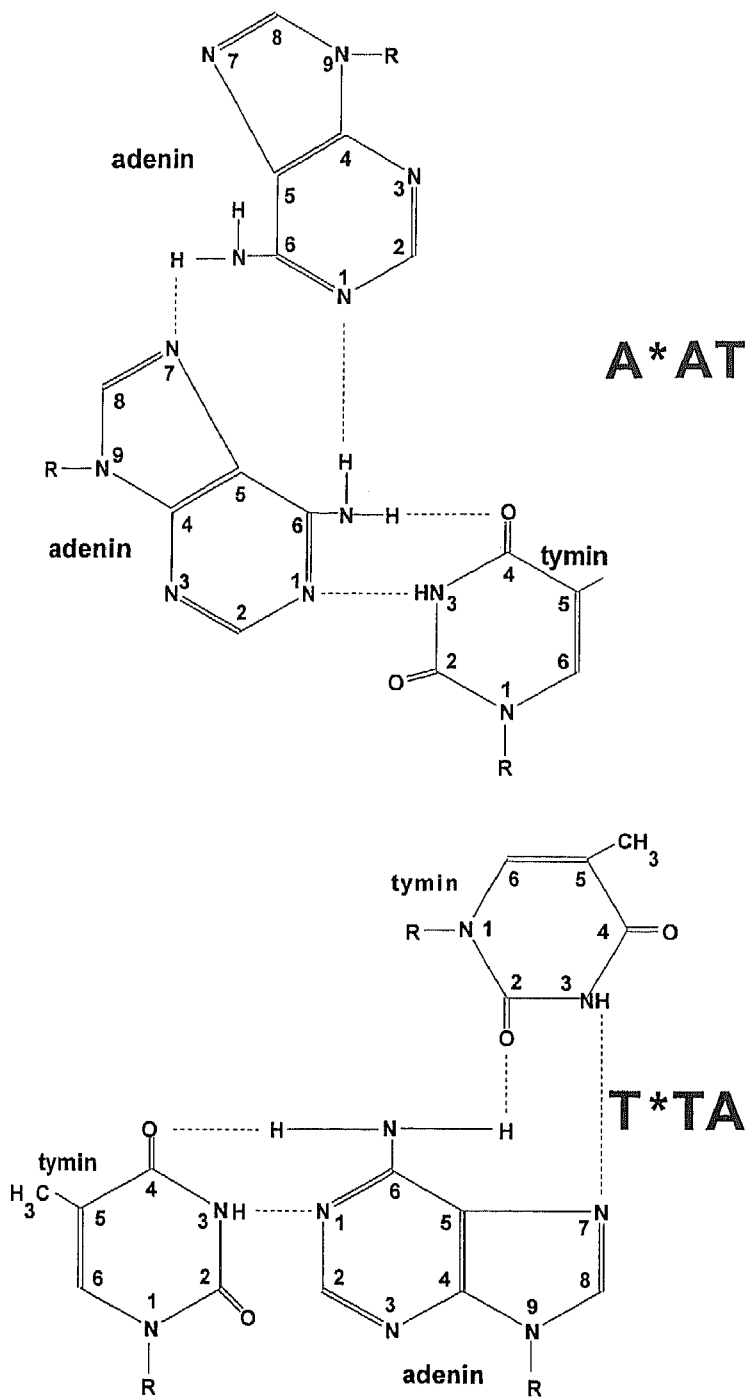
Umístění třetího řetězce v dvoušroubovici je znázorněno na obr. 505, ze kterého je zřejmé, že tento řetězec leží ve větším žlábkdu dvoušroubovice, kde interaguje vodíkovými vazbami s donory a akceptory vodíku (obr. 505).

**OBEČNÁ REKOMBINACE U EUKARYOT.** Řada experimentálních údajů dokazuje, že rekombinace má značný význam u eukaryot v prvním meiotickém dělení při segregaci chromozomů. V této době také dosahuje nejvyšší četnosti. Bylo zjištěno, že průměrně na každý homologický pár chromozomů při každém průchodu jádra prvním meiotickým dělením připadá jedna rekombinace. Četnost rekombinace na chromozom v meiotickém jádře je podobná četnosti rekombinace probíhající v rámci konjugace bakterií. Původně se předpokládalo, že párování chromozomů při meióze není výsledkem interakcí DNA mezi chromozomy. Avšak na základě současných znalostí se soudí, že pochodu párování chromozomů předchází pochod vyhledávání sekvenční homologie, která zprostředkovává vlastní párování chromozomů. Avšak na rozdíl od *E. coli* se pravděpodobně uskutečňuje v kvadruplexu, ve kterém párování může probíhat podle obr. 41 a 42 na str. 65. Vzniklé páry bází jsou pravděpodobně stabilizovány RecA-proteinem. Podporuje to zjištění, že tento protein *in vitro* spojuje dvě dvouřetězcové molekuly DNA za tvorby čtyřřetězcové molekuly (kvadruplexu).

U kvasinek a pravděpodobně u všech ostatních organizmů se v meiotické

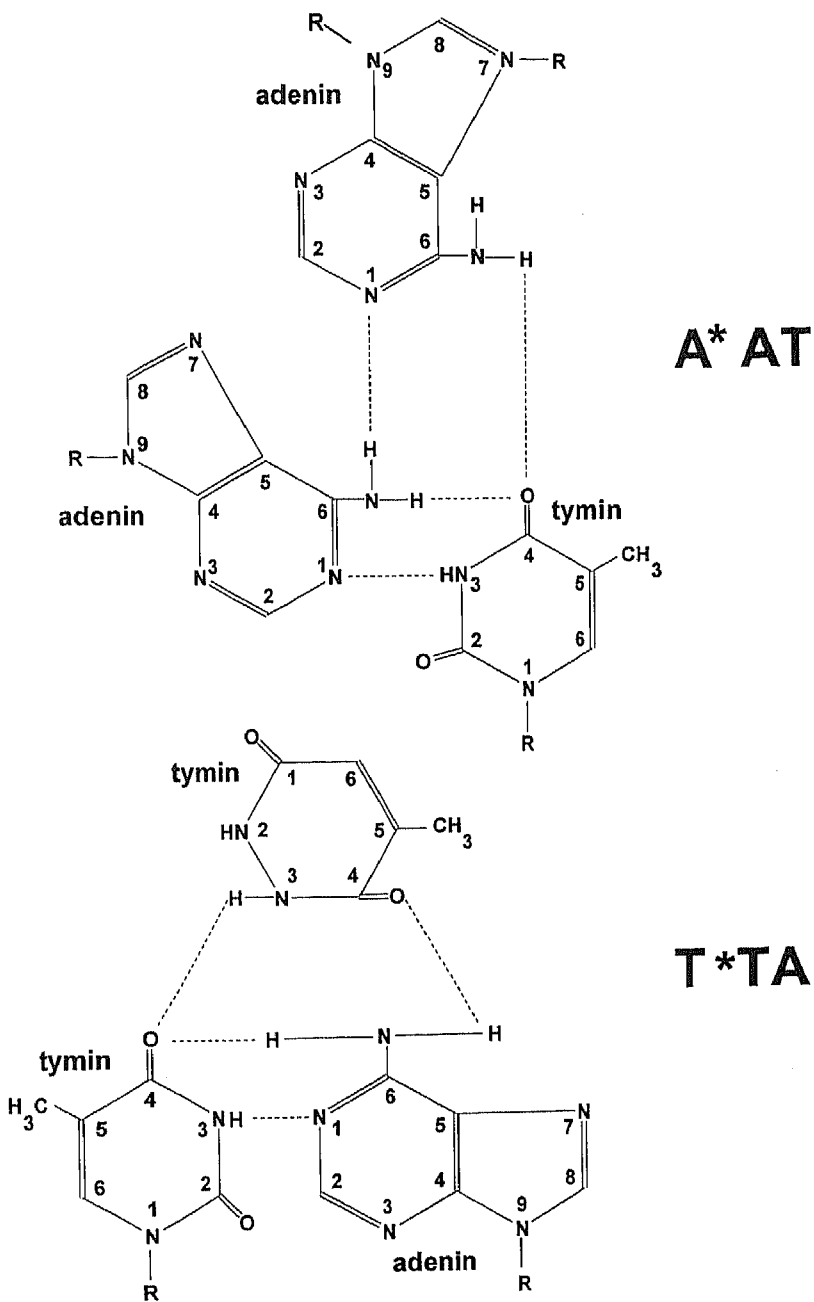


Obr. 504a  
Homologické párování v triplexu

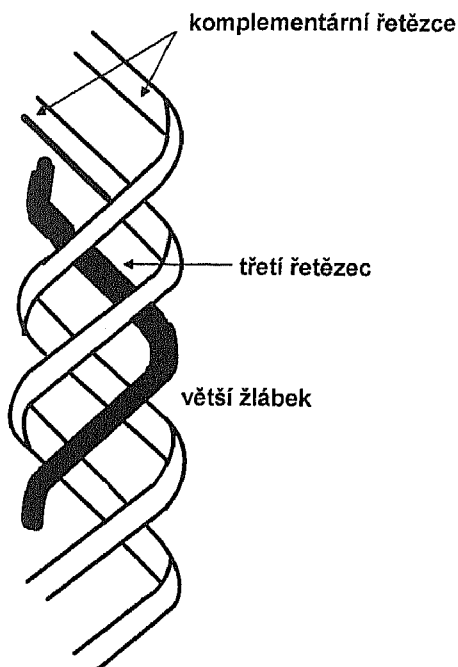


Obr. 504b  
Homologické párování v triplexu





Obr. 504c  
Homologické párování v triplexu



*Třetí řetězec je homologický s jedním řetězcem dvoušroubovice, s nímž se páruje.*

**Obr. 505**  
**Triplex, v němž probíhá homologické párování**

profázi uskutečňuje přechodně dvojitý crossing-over, a to v tzv. horkých místech. Tato místa, v nichž probíhá crossing-over u eukaryot, jsou štěpena nespecifickými endonukleázami. To je rozdíl proti bakteriím, u nichž crossing-over probíhá na chi-sekvencích.

Zlomy vytvořené dvojitým crossing-overem jsou upravovány exonukleázami za tvorby dsDNA s 3'-převisy, které jsou dlouhé až několik set bází. Jako **převís** se obecně označuje (jí) *konec (ce) dsDNA, ve kterém jeden řetězec je delší (z dvoušroubovice vyčnívající) než druhý*. Na uvedené převisy vytvořené exonukleázami ve zlomech po dvojitém crossing-overu se váže pravděpodobně protein podobný prokaryotickému RecA-proteínu.

## 11.2 SPECIFICKÁ REKOMBINACE

### 11.2.1 Epizomové plazmidy a proviry

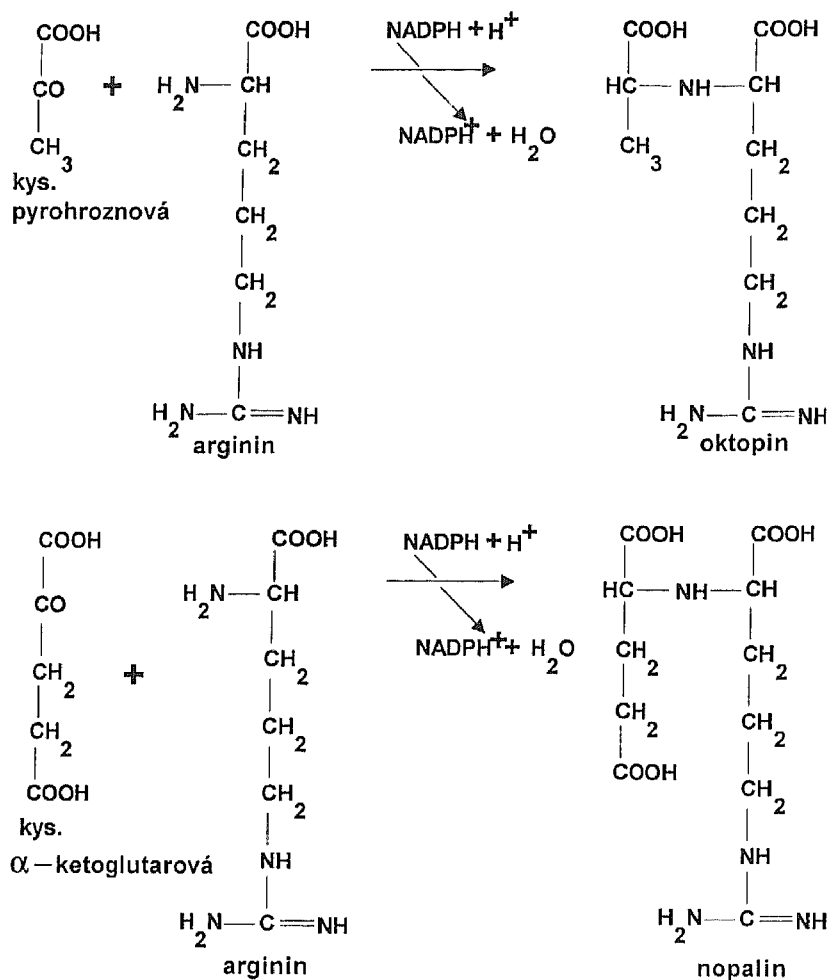
Specifická rekombinace se týká integrace genomu mírných fágů a jiných virů do chromozomu hostitelské buňky a byla již popsána v tomto díle učebnice v souvislosti s integrací fága lambda, retrovirů, zvláště viru HIV do chromozomu hostitelské buňky.

Specifická rekombinace se však neomezuje jen na interakce virové DNA s chromozomem hostitelské buňky. Probíhá též mezi epizomovými plazmidy a chromozomem bakteriální buňky. Jako **epizomový** se označuje *plazmid přecházející reverzibilně ze stavu autonomního do stavu integrovaného*. V autonomním stavu se plazmid replikuje volně v cytoplazmě hostitelské buňky. Ve **stavu integrovaném se nachází jako součást jejího chromozomu**. Epizomový konjugativní *F*-plazmid se integruje do chromozomu prostřednictvím *IS*-elementů. Integrace je založena na tom, že mezi *IS*-elementem na plazmidu a homologickým *IS*-elementem na chromozomu probíhá jednoduchý crossing-over, který vede k integraci plazmidu do chromozomu. Crossing-overem se z chromozomu plazmid též vyčleňuje (excize plazmidu). Nachází-li se na plazmidu více *IS*-elementů, které jsou homologické s *IS*-elementy na chromozomu, může se konjugativní *F*-plazmid integrovat do různých míst chromozomu.

### 11.2.2 T-DNA

**Ti-PLAZMID, Ri-PLAZMID A OPINY.** *T-DNA je oblast na Ti-plazmidu a Ri-plazmidu integrující se do jaderné DNA rostlinných buněk*. Přírodním hostitelem *Ti*-plazmidu jsou bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a *Agrobacterium rhizogenes*; tento plazmid indukuje tzv. **krčkový nádor** (mezi kořenem a stonkem) integrací *T-DNA* do genomu dvouděložných rostlin. Exprese genů *T-DNA* se projevívá tvorbou nádoru, v němž dochází k syntéze opinů, jichž agrobakterie využívají jako zdroje uhlíku, dusíku a energie. Geny pro syntézu opinů jsou vneseny do rostlinných buněk jako součást *T-DNA* a geny pro katabolismus opinů jsou lokalizovány na jiné části *Ti*-plazmidu a jsou aktivní v bakteriálních buňkách. Celkově tedy lze říci, že rostlinné nádory indukované působením *A. tumefaciens* syntetizují specifické látky - **opiny**. *Jsou to deriváty zásaditých aminokyselin, především argininu a lyzinu*.

Opiny se rozdělují do dvou skupin (obr. 506):



Obr. 506  
Opiny

1. Opiny oktopinového typu, tj. sloučeniny aminokyselin s pyruvátem.
2. Opiny nopalinového typu, tj. sloučeniny aminokyselin s  $\alpha$ -oxoglutarátem.

Pro informaci uvádíme, že existují ještě další typy opinů (manopiny a agrocinopiny).

Podle typu opinů se rozlišují i Ti-plazmidy:

1. Nopalinový typ Ti-plazmidu obsahuje geny pro syntézu nopalinů.
2. Oktopinový typ Ti-plazmidu obsahuje geny pro syntézu oktopinů.

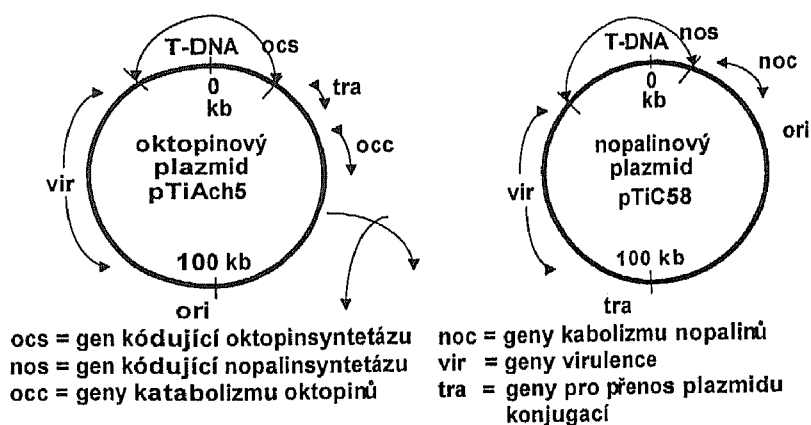
Mapa obou typů plazmidů je v zjednodušené formě uvedena na obr. 507.

T-DNA je také součástí **Ri-plazmidu**, tj. plazmidu druhu *Agrobacterium rhizogenes*, který indukuje tzv. vlasatost kořenů integrací T-DNA do genomu dvouděložných rostlin.

**STRUKTURA T-DNA.** T-DNA oktopinových plazmidů sestává ze dvou částí, z nichž každá je ohraničena přímou repeticí 25 párů bází. Levá část se označuje jako T<sub>L</sub>-DNA a pravá jako T<sub>R</sub>-DNA. T-DNA nopalinových plazmidů nemá takto definovanou pravou a levou část, ale je jako celek ohraničena přímými repeticemi na levém a pravém konci.

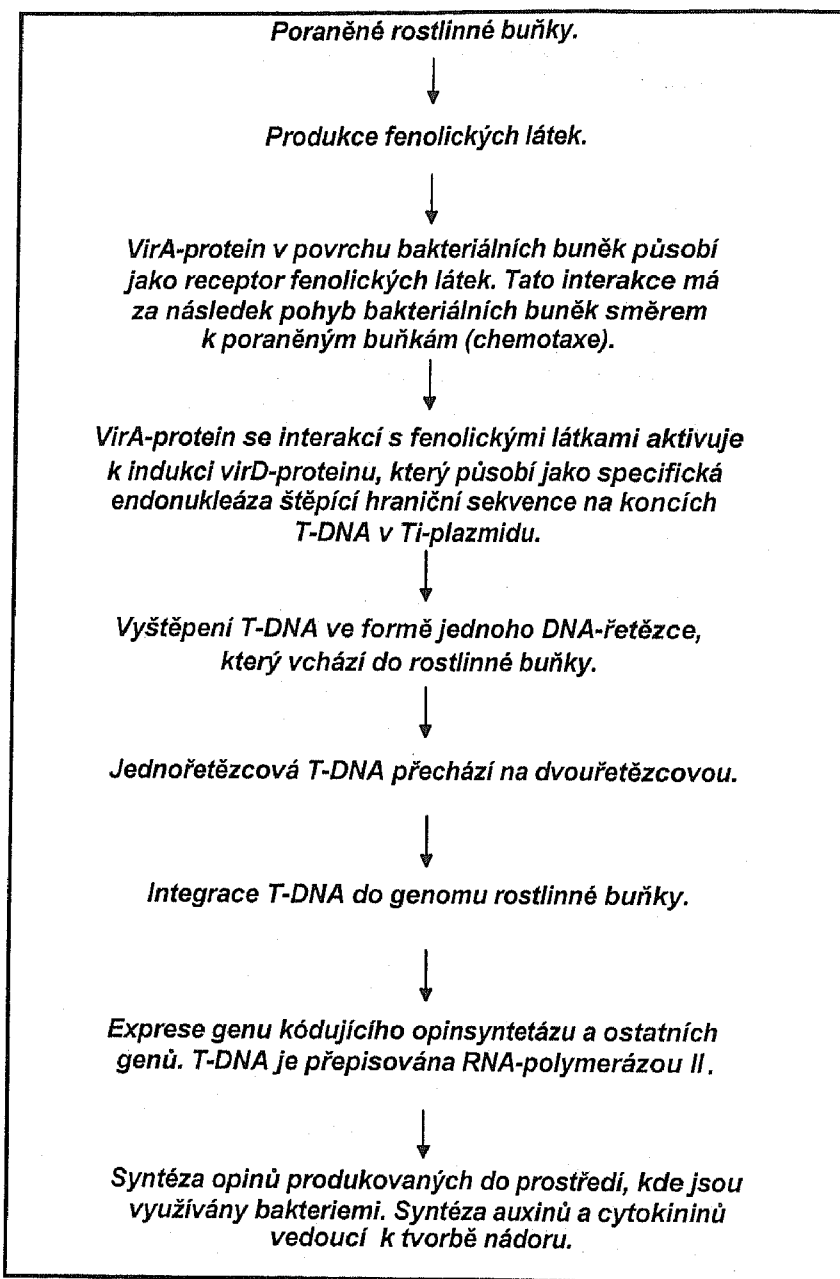
T<sub>L</sub>-DNA zodpovídá za nádorový fenotyp v infikované rostlině, kdežto T<sub>R</sub>-DNA za syntézu opínů. Na T<sub>L</sub>-DNA se nacházejí tyto geny:

- ◆ **Gen 1 (iaaM).** Kóduje tryptofan-2-monooxygenázu, která se podílí na syntéze auxinů.
- ◆ **Gen 2 (iaaH).** Kóduje indolacetylamidhydrolázu, která se také podílí na syntéze auxinů.
- ◆ **Gen 3 (ocs).** Kóduje oktopinsyntetázu, která katalyzuje syntézu oktopinu z argininu a pyruvátu.
- ◆ **Gen 4 (ipt Z).** Kóduje izopentyltransferázu, která se podílí na syntéze cytokininů.
- ◆ **Gen 5.** Podílí se na syntéze auxinů.
- ◆ **Gen 6a.** Ovlivňuje sekreci opínů.

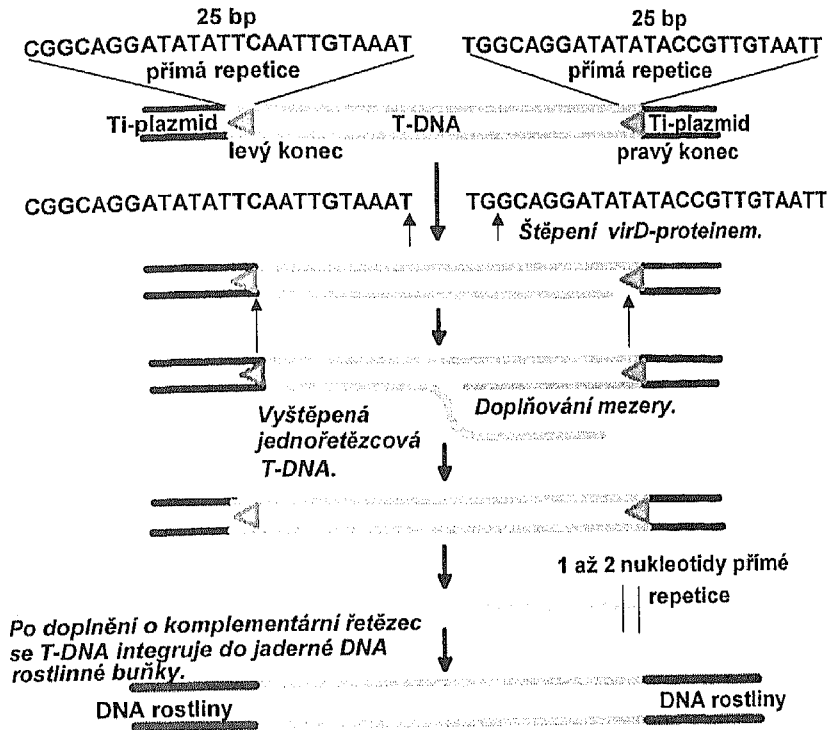


Obr. 507

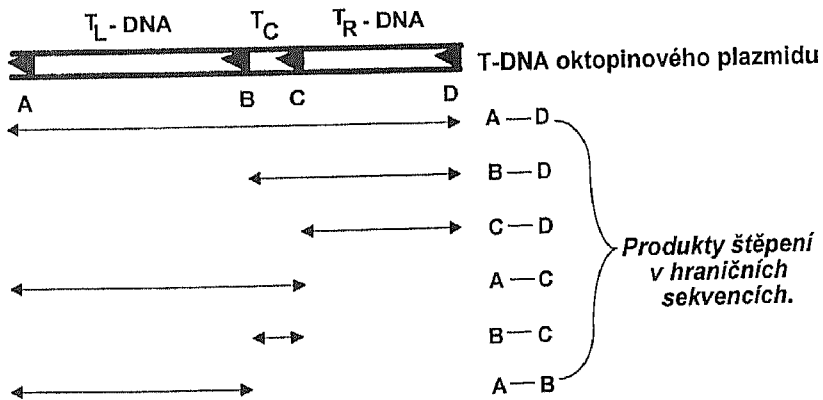
Mapa ukazující na přibližné umístění některých genů na dvou reprezentativních Ti-plazmidech



**Obr. 508**  
 Globální pohled na základní pochody vedoucí k integraci  
 a k expresi T-DNA v rostlinné buňce



Obr. 509  
Vyštěpení T-DNA z Ti-plazmidu a její integrace do jaderné DNA rostlinné buňky



Obr. 510  
Hypotetická představa vyštěpování T-DNA z oktopinového Ti-plazmidu a možné produkty pro integraci do jaderné DNA rostlinné buňky

- ◆ **Gen 6b.** Kóduje receptor pro cytokininy.
- ◆ **Gen 7.** Jeho funkce ještě není známa.

**GENY VIRULENCE.** Na Ti-plazmidu mimo T-DNA jsou umístěny geny virulence, které kódují proteiny, jejichž funkce lze charakterizovat takto:

- ◆ rozeznávají svými produkty signální molekuly poraněných rostlin,
- ◆ kódují specifickou endonukleázu, kterou štěpí hraniční sekvence T-DNA,
- ◆ uplatňují se svými produkty při přenosu T-DNA do rostlinné buňky a její integrace do chromozomu.

Na bakteriálním chromozomu jsou geny, které podmiňují vazbu agrobakterií na rostlinné buňky během infekčního procesu.

#### PROCES INFEKCE A INTEGRACE T-DNA DO ROSTLINNÉ BUŇKY.

Poraněná rostlina produkuje fenolické látky, např. **acetosyringon**, tj. **4-acetyl-2, 6-dimetoxyfenol**, které indukují transkripci genů virulence. Nejdříve jsou rozeznány proteiny genu *virA*, které se nacházejí v povrchu bakteriálních buněk. Pak se štěpí jeden řetězec v hraničních sekvencích, který se pak integruje do chromozomu rostlinné buňky. Po integraci dochází k expresi jeho genů, která se projeví tvorbou krčkového nádoru a syntézou opinů. Geny T-DNA jsou přepisovány RNA-polymerázou II (obr. 508).

Tvorba jednořetězcové T-DNA je znázorněna na obr. 509, podle kterého se nejdříve endonukleolytickým působením proteinu *virD* štěpí přímá repetice, která tvoří pravý konec T-DNA. Po tomto štěpení zůstanou 1 až 2 páry bází na pravém koci T-DNA i po její integraci do rostlinné buňky. Pro přenos a integraci T-DNA do rostlinného genomu je přímá repetice na pravém konci asi podstatná, jelikož její štěpení probíhá přesně. Štěpení na levém konci je variabilní. Do jaderné DNA rostlinné buňky se začlení jedna i více kopií T-DNA.

K problematice integrace T-DNA do rostlinné buňky je nutno dodat, že integrace oktopinových T-DNA, tj.  $T_L$ -a  $T_R$ -DNA, je poněkud složitější než nopalínové T-DNA. Nopalínová T-DNA má dvě přímé repetice jako hraniční sekvence, které jsou jedinými cílovými sekvencemi pro její vyštěpování z molekuly Ti-plazmidu. Naproti tomu pro vyštěpení T-DNA z oktopinového Ti-plazmidu existuje asi šest možností za vzniku produktů, které se nezávisle integrují do jaderné DNA rostlinné buňky (obr. 510).



# 12

## MOLEKULÁRNÍ PODSTATA TRANSPOZICE

Jako *transpozice* se označuje proces přemístění DNA-sekvence z jednoho místa, tzv. *donorového*, do jiného, tzv. *cílového*. DNA-sekvence schopná transpozice se nazývá *transpozon*. Podle toho, zda transpozice probíhá na stejné molekule DNA nebo mezi dvěma různými molekulami DNA, rozlišují se tyto druhy transpozice:

- ◆ *transpozice intermolekulární*, která probíhá mezi donorovou molekulou DNA a recipientní (např. mezi plazmidem a chromozomem);
- ◆ *transpozice intramolekulární*, která probíhá mezi donorovým místem transpozonu a cílovým místem na téže molekule DNA, tj. na stejném replikonu (chromozomu nebo plazmidu, mitochondriovém genoforu atd.).

*Donorovým místem pro transpozon* se rozumí místo na DNA obsazené transpozonem před jeho transpozicí, kdežto *cílové místo* nebo *těž recipientní* je místo, do něhož se vložil transpozon nebo jeho kopie. Molekula DNA (replikon), obsahující transpozon před jeho transpozicí, se označuje jako *donorová molekula (donorový replikon)*. Naproti tomu molekula DNA (replikon), do které se vložil z donorové molekuly transpozon nebo jeho kopie, se označuje jako *recipientní (cílová) molekula, recipientní (cílový) replikon*.

Kromě schopnosti transpozice, což je společná vlastnost všech transpozonů, vyznačují se transpozony zpravidla ještě těmito vlastnostmi:

1. Cílová místa, do kterých se transpozony vkládají, nejsou s transpozony homologická. Cílovým místem pro transpozon může být i gen, který se tím, že se do něho transpozon vložil, mutačně změnil. Proto přítomnost transpozonu může být jedním z faktorů, které vyvolávají změny v genetické informaci genomu. Během transpozice může dokonce docházet k větším strukturním změnám genomu, k jeho přestavbám.

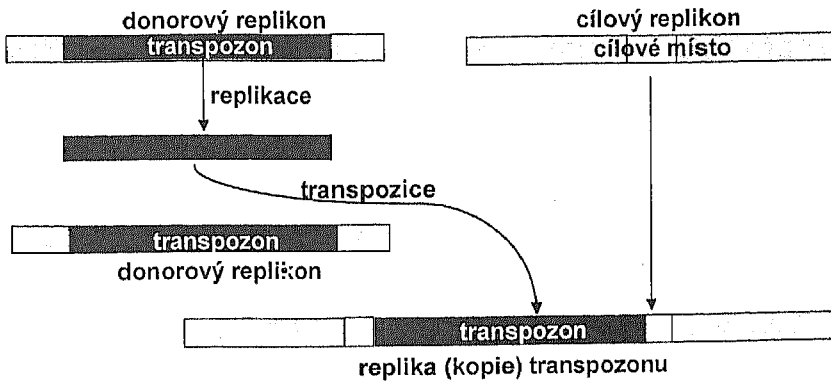
2. V místě inserce transpozonu se zdvojují ve stejném směru sekvence DNA, takže transpozon je na obou svých koncích ohraničen přímými repetitivními. Toto zdvojení sekvencí je důsledkem způsobu inserce transpozonu v cílovém místě a je vysvětleno na obr. 511.

3. Transpozony obvykle inaktivují geny do nichž se přemístily; jejich excizi, pokud tato excize proběhne přesně, se původní funkce genu obnovuje.

Co do způsobu, kterým se transpozice uskutečňuje, se rozeznává :

- ◆ *Konzervativní transpozice*. Touto transpozicí se realizuje excize trans-



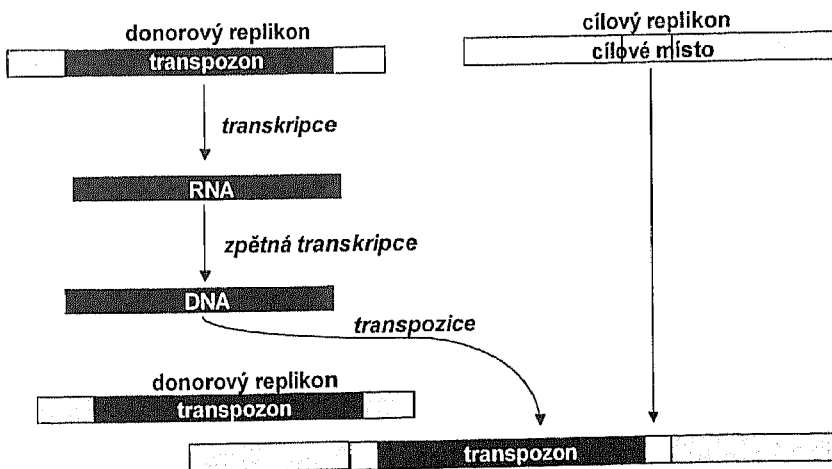


Obr. 513  
Replikativní transpozice

skriptázou přepíše do DNA vkládající se do cílového místa. Retropozice je tedy transpozice uskutečňující se zpětnou transkripcí. Transpozony schopné retropozice se označují jako **retroelementy** (obr. 514).

Na základě uvedených způsobů transpozice rozdělíme transpozony do dvou skupin:

- ◆ skupina transpozonů, které uskutečňují transpozici konzervativně nebo replikativně a nevyznačují se retropozicí;
  - ◆ retroelementy, tj. skupina transpozonů vyznačujících se retropozicí.
- Transpozony se vyskytují jak u bakterií, tak u eukaryot.



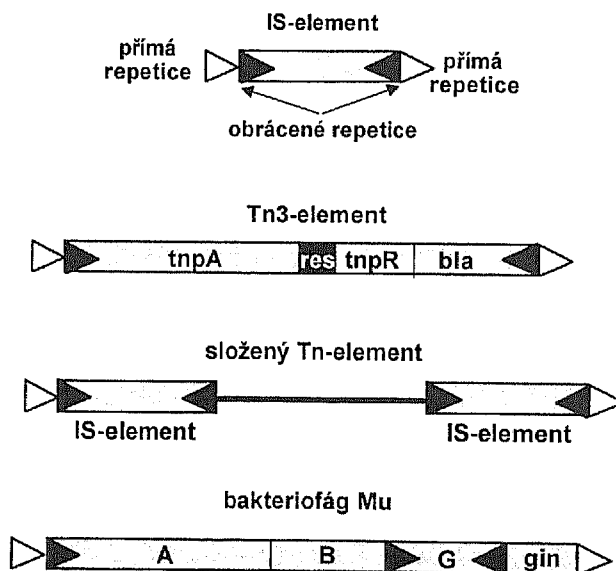
Obr. 514  
Retropozice

## 12.1 TRANZPOZONY NEVYZNAČUJÍCÍ SE RETROPOZICÍ

### 12.1.1 Bakteriální transpozony

**IS-ELEMENTY.** Vyznačují se délkou 650 až 1 600 bp. Jejich základní vlastností je, že obsahují jen geny pro svou vlastní transpozici, což je obvykle gen kódující transponázu (gen *tnp*). *Transponáza* je enzym, který katalyzuje transpozici. Všechny IS-elementy mají na svých koncích obrácené repetice, které jsou rozeznávány transponázami (obr. 515). Transponázy se vyznačují touto aktivitou:

- ◆ rozeznávají koncové obrácené repetice transpozonu,
- ◆ štěpí cílové sekvence, do kterých se vkládá transpozon,
- ◆ po uskutečnění transpozice spojují cílové sekvence s vloženým transpozonem.



Obr. 515  
Schéma struktury bakteriálních transpozonů

**Tn-ELEMENTY.** Tn-elementy jsou *bakteriální transpozony, které mimo geny pro svou vlastní transpozici obsahují ještě další strukturní geny projevující se ve fenotypu bakteriální buňky.* Obvykle jsou to geny, které kódují enzymy inaktivující antibiotika. Proto jestliže se Tn-elementy nacházejí na plazmidu nebo chromozomu bakteriální buňky, udílejí jí rezistenci na příslušné antibiotikum. Všechny Tn-elementy podobně jako IS-elementy mají na koncích obrácené repetice. Tn-elementy se klasifikují do těchto skupin (obr. 515):

**1. Tn3 a příbuzné elementy.** Tn3 obsahuje dva geny, jejichž produkty jsou využívány v procesu transpozice. Jsou to geny *tnpA* kódující transponázu a *tnpR* kódující rezolvázu; kromě těchto genů je na Tn3 specifické místo *res*, na které se váže rezolváza při rozkladu kointegrátu. *Rezolváza je enzym, který katalyzuje rozklad kointegrátu, což je meziproduct při intermolekulární transpozici (mezi plazmidem a chromozomem) vzniklý fúzí donorového a recipientního replikonu.* Zbytek transpozonu je obsazen genem *bla*, který kóduje  $\beta$ -laktamázu (enzym hydrolyzující  $\beta$ -laktamová antibiotika, např. penicilin). Produkt genu *tnpR* má dvě funkce: působí jako rezolváza a také jako represor regulující vlastní syntézu i syntézu transponázy. K uskutečnění transpozice jsou potřebné obě obrácené repetice Tn3-elementu.

**2. Složené Tn-elementy.** Jsou to *Tn-elementy, jejichž konce jsou tvořeny IS-elementy.* Centrální část takového transpozonu může být obsazena genem, jehož produkt je příčinou rezistence bakteriální buňky k antibiotiku; např. Tn10-element obsahuje v centrální části gen udílející buňce rezistenci k tetracyklinu (obr. 515).

Tn-elementy se mohou přemísťovat z plazmidu na chromozom a naopak. Mohou být přeneseny konjugativním plazmidem do recipientní buňky a v ní pak z tohoto plazmidu na jiný nebo na chromozom buňky. Jsou proto asi nejvýznamnějším faktorem šíření rezistence k antibiotikům, zvláště u patogenních bakterií, neboť jsou na nich lokalizovány geny kódující enzymy, jimiž jsou antibiotika inaktivována.

**BAKTERIOFÁG Mu.** Genom bakteriofága *Mu* je schematicky v hrubých rysech naznačen na obr. 515. Měří asi 38 kb a sestává z genů *A* a *B*, které jsou potřebné jak k transpozici, tak i k jeho replikaci. Segment *G* je ohraničen obrácenými repeticemi. Gen *gin* má podobnou funkci jako gen *tnpR*. Jako i jiné transpozony způsobuje fág *Mu* duplikaci sekvencí v cílovém místě recipientního replikonu, neobsahuje však na koncích obrácené repetice. Produkt genu *A* je transponáza.

### 12.1.2

## Eukaryotické transpozony nevyznačující se retropozicí

**TRANSPOZICE JAKO PODSTATA ANTIGENNÍCH ZMĚN TRYPANOSOM.** Pro trypanozomy je příznačné, že unikají imunitní odpovědi svých hostitelů tím, že mění své povrchové antigeny. V povrchu krevní formy trypanozom se antigenními vlastnostmi vyznačuje glykoprotein označovaný jako *VSG*. Trypanozoma může tvořit asi 1 000 *VSG*, které se částečně liší v sekvenci aminokyselin, takže protilátky hostitele proti jednomu *VSG* nereagují účinně na ostatní *VSG* v repertoáru trypanozomy.

V krvi hostitele je vnější povrch *T. brucei* pokryt obalem, který je tvořen molekulami *VSG* o stejné sekvenci aminokyselin a který představuje jedinou strukturu na povrchu. Tato struktura se však změní, je-li povrch trypanozomy obsazen *VSG* o jiné sekvenci aminokyselin. Trypanozoma může proto přetrvávat v hostitelském organizmu několik měsíců a může se vyznačovat parazitěmií, v rámci které se objevují v sedmidenních až desetidenních intervalech vlny sérologicky odlišných parazitů. Toto střídání antigenních vlastností je podmíněné postupnou expresí genů kódujících *VSG* o různé sekvenci aminokyselin, a tedy i o různých antigenních vlastnostech, což umožňuje, že trypanozomové populace mohou odolávat imunitním reakcím hostitele.

Geny pro celý repertoár *VSG* jsou v každém kmeni trypanozomy, ať už dochází k jejich vyjádření, nebo nikoli. Jsou seskupeny v rodinách. V jedné buňce trypanozomy se nachází asi 1 000 genů kódujících *VSG*. Těmito geny je obsazeno asi 10 % DNA trypanozomy. Vyznačují se vlastnostmi transpozonů, neboť jejich exprese je podmíněna jejich duplikací (zdvojením) a transpozicí zdvojeného genu do tzv. **expresivních míst** poblíže telomer. V daném čase se do příslušného expresivního místa umístí jen jeden *VSG*-gen. Je velmi pravděpodobné, že v expresivním místě se spojí přemístěný gen s promotorem, ze kterého se pak přemístěný gen přepisuje do mRNA překládané do primární struktury příslušného *VSG*. Transpozice *VSG*-genu bývá doprovázena též chromozomovými přestavbami v blízkosti expresivních míst. Počet expresivních míst není znám.

**P-ELEMENTY JAKO DETERMINANTY DYSGENEZE HYBRIDŮ *DROSOPHILA MELANOGASTER*.** Dysgenezi hybridů se rozumí *syndrom korelovaných genetických abnormalit, které jsou v určitých kmenech *Drosophila melanogaster* indukovány v jedné linii jejich hybridů (samčí nebo samičí) vzniklých křížením kmenů samčího typu obsahujícího P-element a samičího neobsahujícího tento element*. Tyto abnormality se týkají vysoké frekvence částečné nebo úplné sterility, samčí rekombinace, viditelné nebo letální mutace, reverze, mutace nestabilních alel, chromozomových přestaveb, chromozomové nondisjunkce a modifikace samčích rekombinačních frekvencí. Omezují se jen na zárodečnou linii buněk a nevyskytují se v somatických buňkách. Celkem existují dva typy kmenů, jejichž křížení vede ke vzniku dysgeneze hybridů. Jsou to **P (otcovský) kmen** a **M (mateřský) kmen**.

Kmeny P se liší geneticky od kmenů M v tom, že obsahují transpozony označované jako *P*-elementy, které jsou rozptýleny po všech chromozomech. Jsou to transpozony vyznačující se vysokou frekvencí transpozice. Způsobují dysgenezi, když se dostanou do kmenů M (cytotyp M), a v kmenech P ji nezpůsobují.

**ELEMENTY McCLINTOCKOVÉ.** *Jsou to transpozony Zea mays způsobující nestabilní mutace pozorovatelné v aleuronu, endospermu a perikarpu kukuřičné obilky. Inzerce elementu McClintockové do genu vede k nestabilní alele tohoto genu. Nestabilita alely příslušného genu, způsobená elementem, se projevuje v tom, že mutačně změněný gen mutuje zpět na původní standardní typ. Například vlivem elementu McClintockové přechází gen **Bz** projevující se tvorbou antokyanového pigmentu na alelu **bz-m1**, která se projevuje hnědým zbarvením obilky. Excizí elementu z alely **bz-m1** dochází k reverzi na fenotyp vyznačující se tmavě pigmentovanými sektory na hnědě zbarveném podkladě. Tmavě pigmentující sektory v aleuronové vrstvě obilky tvoří vlastně klony buněk, z nichž každý pochází z jedné buňky, v níž nestabilní alela **bz-m1** revertovala na dominantní alelu **Bz**.*

Elementy McClintockové se klasifikují do dvou skupin:

**1. Autonomní elementy, které jsou geneticky nestabilní, jelikož v genu, v němž se vyskytují, podléhají při vysoké frekvenci excizi a transpozici.**

**2. Neautonomní elementy, které jsou geneticky nestabilní pouze za předpokladu, že se v genomu nachází též autonomní element.**

*Autonomní element se vyznačuje funkcí, která je potřebná k aktivaci excize, transpozice a chromozomových přestaveb způsobovaných neautonomními elementy. Recesivní mutace způsobená inzercí neautonomního elementu do příslušného genu je stabilní za nepřítomnosti autonomního elementu.*

## 12.2 RETROELEMENTY

### 12.2.1 Virové retroelementy

Provirovou DNA u RNA-virů se zpětnou transkriptázou (retroviry) lze považovat za retroelement, jehož transpozice do genomu jiné buňky se uskutečňuje tak, že se provirová DNA přepíše do RNA, která má funkci genomu viru a v další hostitelské buňce po její infekci se RNA přepíše zpětnou transkriptázou do DNA integrující se do genomu hostitelské buňky. Pro virové retroelementy je ze strukturního hlediska charakteristická přítomnost sekvencí LTR obsahujících promotory a genu exprimujícího se do zpětné transkriptázy a integrázy.

### 12.2.2 Nevirové retroelementy

**RETROTRANSPOZONY.** Mají LTR, zpětnou transkriptázu a integrázu. Jejich replikační a integrační mechanismus se podobá retrovirům. Nejlépe jsou prostudovány *Ty*-elementy a *copia*-elementy drozofily. Strukturní podobnost mezi provirovou DNA retrovirů a retrotranspozony vede k domněnce, že retroviry se vyvinuly z retrotranspozonů nebo naopak, že retrotranspozony představují defektní formy retrovirů. Základní rozdíl mezi retrotranspozony a retroviry spočívá v tom, že *retrotranspozony se nevyskytují mimo buňku a nejsou proto ani infekční*. Je známo několik retrotranspozonů; z nich jako příklady vybíráme *Ty*-elementy a *copia*-elementy.

◆ *Ty*-elementy jsou retrotranspozony kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Na haploidní genom kvasinky připadá 30 až 35 *Ty*-elementů. Bylo zjištěno, že mohou měnit expresi strukturních genů v případě, že jejich cílovými místy jsou sekvence v regulačních oblastech těchto genů. Mezi *Ty*-elementy dochází často k rekombinaci, což vede v místě rekombinace k přestavbě genomu.

◆ *Copia*-elementy jsou retrotranspozony *D. melanogaster*. Na haploidní genom drozofily připadá 30 až 50 kopií *copia*-elementů. Zdá se, že počet těchto kopií je regulován. Bylo zjištěno, že *copia*-elementy podobně jako *Ty*-elementy mohou aktivovat k expresi některé geny tím, že se vloží do jejich regulačních oblastí.

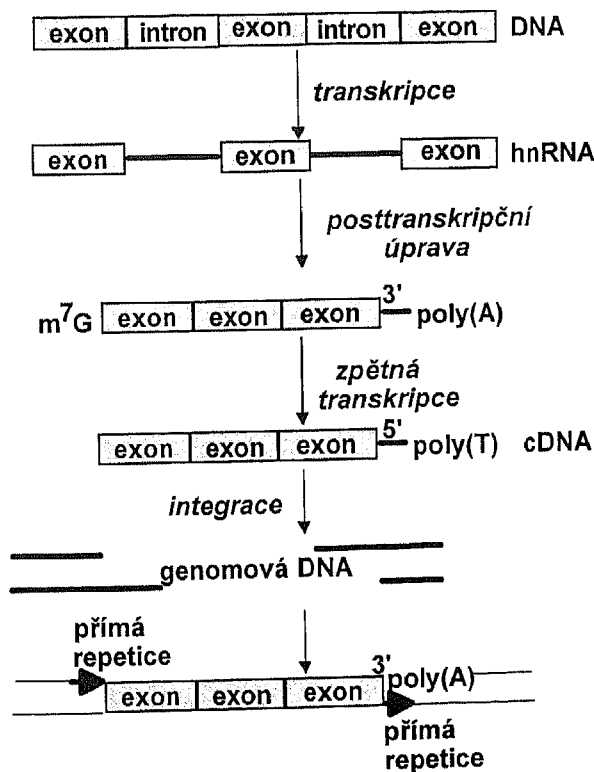


**RETROPOZONY.** Nemají LTR, mají však zpětnou transkriptázu a integrázu. Typickými představiteli jsou **krátké (SINE)** a **dlouhé (LINE)** rozptýlené repetice.

**RETRONY (msDNA).** Nemají LTR a integrázu, proto nejsou schopny transpozice. Kódují však zpětnou transkriptázu. Retrony se vyskytují u mykobakterií, např. *Myxococcus xanthus*.

**RETROSEKVENCE (cDNA-GENY).** Nemají LTR, zpětnou transkriptázu ani integrázu. Vznikly však zpětnou transkripcí RNA-transkriptů strukturních genů. Jsou výsledkem retropozice genu obsahujícího introny do cílového místa. V cílovém místě pak již přemístěný gen introny neobsahuje a má na 3'-konci sekvenční poly(A). Tato retropozice zahrnuje následující děje (obr. 516):

1. *Transkripce genu obsahujícího introny do hnRNA.* Tento gen vlastně představuje retrosekvenci v donorovém místě.



Obr. 516  
Původ retrosekvencí

2. *Posttranskripční úpravu hnRNA, při níž se vyloučí přepisy intronů (úprava sestřihem).*

3. *Zpětnou transkripcí posttranskripčně upravené hnRNA (tj. mRNA) do DNA a její začlenění jako retrosekvence do cílového místa.*

*Každá retrosekvence má tedy svůj protějšek, tj. gen v donorovém místě.*

Retrosekvence jsou dále charakteristické těmito znaky:

- ◆ nemají introny,
- ◆ jsou zakončeny poly(A),
- ◆ mají na obou koncích krátké přímé repetice, které jsou důsledkem jejich inserce do cílového místa,
- ◆ jsou na jiném místě než je gen, z něhož jsou odvozeny.

Existují dva typy retrosekvencí. Jsou to:

1. **Upravené geny neboli retrogeny.** To jsou *funkční retrosekvence produkující protein, který je identický nebo přibližně identický s proteinem genu, z něhož jsou odvozeny.*

2. **Upravené pseudogeny neboli retroseudogeny.** Jsou to retrosekvence, které ztratily svou funkci. Patří sem např. *Alu-sekvence*. Je to krátká (asi 300 bp) rozptýlená repetice v genomu člověka citlivá k endonukleáze *Alu II*. Její četnost v genomu člověka je zhruba 500 000. Jsou to retroseudogeny odvozené z genů přepisovaných do 7SL RNA.

### 12.2.3

#### Mobilita intronů

Introny první a druhé skupiny se nevyznačují jen ribozymovou aktivitou, kterou katalyzují svůj vlastní sestřih, ale jsou též mobilní, tj. podobně jako transpozony mění svou lokalizaci. Avšak na rozdíl od transpozice a retropozice, při kterých se transpozon nebo retroelement umísťuje do cílového místa, které není homologické s donorovým místem, *je přemístění intronu místně specifické a děje se při křížení mezi alelami stejného genu. Jinými slovy intron nacházející se v alele určitého genu se může přemístit do alely stejného genu, která tento intron nemá. Tento proces je vyloženě jednosměrný a byl označen jako intronový návrat domů, jelikož intron, který dočasně opustil alelu příslušného genu, v níž byl umístěn, se opět vrací do alely téhož genu, která neobsahuje intron.* U intronu první skupiny je intronový návrat domů řízen specifickou endonukleázou, která je kódována samotným intronem a je místně specifická, tj. rozeznává alelu stejného genu neobsahující intron. U intronů druhé skupiny je tento proces řízen proteiny, které vykazují podobnost se zpětnou transkriptázou. Mechanismus procesu intronového návratu domů však zatím není znám.

# 13

## OPRAVY POŠKOZENÉ dsDNA

V živých soustavách se vyvinuly mechanismy, kterými se úplně nebo do jisté míry poškození a chyby v genomové DNA opravují a odstraňují. Označujeme je jako *opravy DNA* a rozumíme tím enzymové odstranění chyb v DNA, které vznikly během replikace, rekombinace nebo působením vnějších vlivů. Celkově se odstraňují nebo opravují tyto chyby a poškození v DNA:

1. **Chybné párování**, tj. zařazení nekomplementárního nukleotidu při replikaci DNA.

2. **Mezera v DNA**, tj. trhlinka o rozsahu jednoho nebo více nukleotidů uvnitř jednoho polynukleotidového řetězce dvoušroubovicové DNA. Proces zaplňování mezery v DNA nukleotidy podle matricového nepoškozeného řetězce, který je katalyzován DNA-polymerázou a ligázou, se označuje jako *opravná syntéza*.

3. **Zlom**, tj. přerušení fosfodiesterové vazby mezi dvěma sousedními nukleotidy v nukleové kyselině způsobené endonukleázami. Zlomy mohou být:

- ◆ **jednořetězcové**, tj. zlomy v jednom polynukleotidovém řetězci dvouřetězcové DNA;
- ◆ **dvouřetězcové**, tj. zlomy v obou polynukleotidových řetězcích dvouřetězcové DNA.

Jestliže dvouřetězcové zlomy vznikají štěpením obou řetězců dvouřetězcové DNA na různých, ale blízkých místech, označují se jako *posunuté*. Zlomy vznikající štěpením obou řetězců dvouřetězcové DNA na protilehlých místech jsou tzv. *zarovnané zlomy*.

Existuje několik způsobů, kterými se poškozená místa v DNA opravují. Jsou to:

1. **Úplná oprava**, tj. oprava poškozeného místa na původní stav. Uskutečňuje se např.:

- ◆ fotoreaktivací,
- ◆ opravou alkylovaného O<sup>6</sup> guaninu, O<sup>4</sup> tyminu a alkylfosfotriesterů.

2. **Excizní oprava**, tj. vyštěpení poškozeného místa v DNA. Uskutečňuje se:

- ◆ *bázovou excizní opravou,*
- ◆ *nukleotidovou excizní opravou,*
- ◆ *opravou chybného párování.*

**3. Tolerantní oprava, která spočívá v obnově funkce DNA, aniž by z ní bylo odstraněno původní poškození. Při této opravě se poškození v matrici, uskutečněné zlomy a rekombinací, obchází replikací.**

*Představa o různých způsobech opravy poškozené DNA vyplynula ze studií E. coli. Proto též následující kapitoly se opírají především o výsledky, kterých bylo dosaženo v rámci těchto studií.*

## 13.1 ÚPLNÁ OPRAVA

### 13.1.1 Fotoreaktivace DNA

Existují tři způsoby fotoreaktivace: přímá fotoreaktivace, sensitizovaná fotoreaktivace a fotoreaktivace nepřímá.

**PŘÍMÁ FOTOREAKTIVACE.** Tato oprava DNA spočívá ve štěpení tyminových dimerů **fotolýzou**, tj. *enzymem, který po aktivaci světlem o vlnové délce 340 - 400 nm štěpí v DNA tyminové dimery.* Je to jediný mechanismus, kterým se opravuje DNA viditelným světlem a který probíhá v jednom enzymovém stupni. Pro svou relativní jednoduchost se vyznačuje nejmenší pravděpodobností způsobit chyby při opravě DNA. Působí specificky jen na tyminové dimery a závisí přímo na vlnové délce světla. Štěpení tyminových dimerů fotolýzou se uskutečňuje přes 5,10-metylentetrahydrofolát, který přijímá energii slunečního světla a přenáší elektrony na FAD, jehož redukovaná forma FADH<sub>2</sub> poskytuje elektrony pro štěpení cyklobutanových kruhů. Tím se obnoví původní stav DNA. Také eukaryota obsahují fotolýzu jako složku opravného systému. K fotoreaktivaci dochází také na RNA, která byla poškozena UV světlem.

**SENSITIZOVANÁ FOTOREAKTIVACE.** Při tomto způsobu fotoreaktivace dochází ke štěpení tyminových dimerů nezávisle na fotolýze. Uskutečňuje se přenosem elektronů z excitovaného indolového kruhu tryptofanu na dimer, který se pak monomerizuje.

**NEPŘÍMÁ FOTOREAKTIVACE.** Bylo zjištěno, že mutanty *E. coli*, které mají inaktivní fotolyázu, přežívají, když po vystavení UV-světlu vyvolávajícímu tvorbu tyminových dimerů jsou následně ozářeny při vlnové délce 334 nm. Světlo o této vlnové délce nevede k monomerizaci tyminových dimerů, ale nepřímo inaktivuje molekuly tRNA tím, že v nich vyvolává tvorbu křížových vazeb. To vede k dočasnému zastavení růstu a dělení těchto mutantních buněk, což pak umožňuje *excizní opravu, ještě než se začne DNA replikovat.*

### 13.1.2

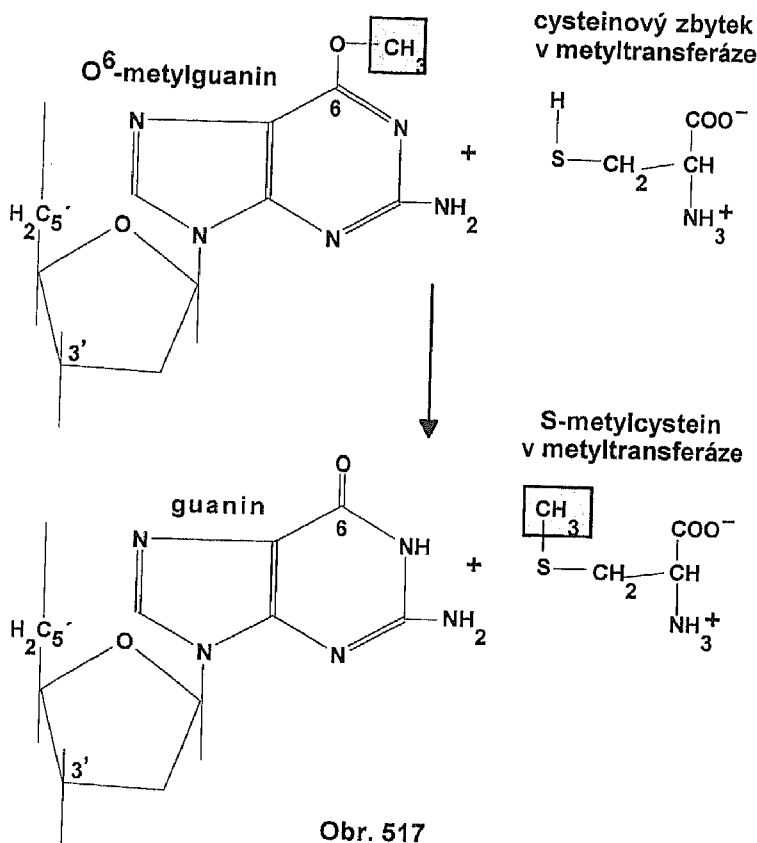
#### Oprava alkylovaného

#### O<sup>6</sup> guaninu, O<sup>4</sup> tyminu a alkyfosfotriesterů

**ADAPTACE *E. COLI* NA POŠKOZENÍ DNA VYVOLANÉ ALKYLAČNÍMI LÁTKAMI.** Jak již bylo uvedeno, jednofunkční alkylační látky, např. **N-metyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG)**, **N-metyl-N-nitrozomocovina (MNU)** a v menší míře **metylmetsulfonát (MMS)**, reagují s DNA za tvorby O-alkylovaných a N-alkylovaných produktů. O<sup>6</sup>-alkylguanin a O<sup>4</sup>-alkyltymin se při replikaci DNA vyznačují chybným párováním. Původně se předpokládalo, že O<sup>6</sup>-alkylguanin tvoří stabilně chybné páry s tyminem, zatímco O<sup>4</sup>-alkyltymin je tvoří s guaninem. Avšak další studie ukázaly, že chybný pár O<sup>6</sup>-alkyl-GT se čte DNA-polymerázami jako AT a chybný pár O<sup>4</sup>-alkyl-TG se jimi čte jako CG. V buňkách *E. coli* však mohou být oba chybné páry úplně opraveny. Jestliže se buňky *E. coli* vystavují delší dobu nízkým koncentracím alkylačních látek, stanou se postupně rezistentní k jejich mutagennímu a letálnímu účinku při vysokých koncentracích. To se děje indukci opravných procesů, označovaných souhrnně jako **adaptivní odpověď na alkylační poškození**. Tím se rozumí *oprava alkylací poškozené DNA indukovaná alkylačními látkami.*

Regulace adaptivní odpovědi nezávisí na SOS-reparaci (str. 816). Jsou známy dva různé enzymy, které jsou indukovány během adaptivní odpovědi. Jedním z nich, který popíšeme, je **O<sup>6</sup>-methylguanin-DNA-metyltransferáza** katalyzující úplnou opravu chybných párů obsahujících O<sup>6</sup>-guanin, O<sup>4</sup>-tymin a též fosfotriestery.

**O<sup>6</sup>-METYLGUANIN-DNA-METYL-TRANSFERÁZA I *E. COLI*.** Tento enzym se symbolizuje zkratkou **O<sup>6</sup>-MGT I** a označuje se též jako **Ada-protein**. *Odstraňuje metylové skupiny z O<sup>6</sup>-guaninu a O<sup>4</sup>-tyminu tím, že je přenáší na zbytek cysteinu vlastního proteinu (obr. 517).* Kromě toho odstraňuje také metylové skupiny z metylfosfotriesterů vznikajících alkylací DNA (obr.518). Je kó-

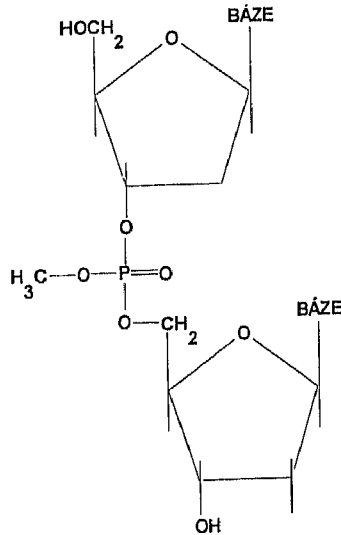


Obr. 517

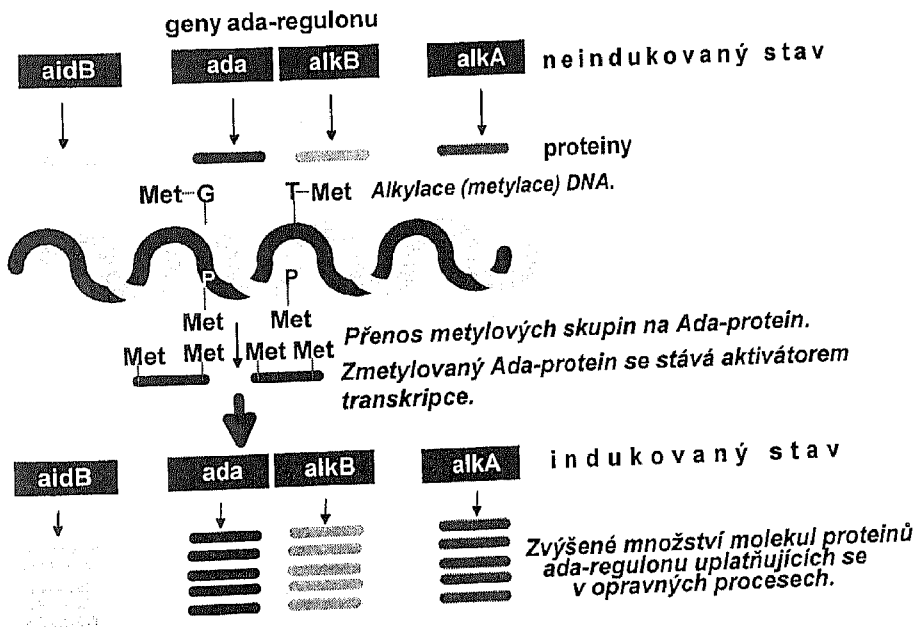
**Přenos metylové skupiny z O<sup>6</sup>-metylguaninu v DNA  
O<sup>6</sup>-metylguanin-DNA-metyltransferázou na cysteinový zbytek  
v proteinu**

dován genem *ada*. Jeho regulaci v rámci adaptivní odpovědi na alkylační poškození ukazuje obr. 519:

1. Po vystavení buněk *E. coli* metylačnickým látkám se jejich DNA alkyluje na více místech (na O<sup>6</sup>-guaninu, O<sup>4</sup>-tyminu a fosfátových zbytcích páteře DNA).
2. Ada-protein katalyzuje přenos metylových skupin z fosfotriesterů na cystein (Cys-69) a z O<sup>6</sup>-alkylguaninu nebo O<sup>4</sup>-alkyl-tyminu na cystein Cys-321.
3. Alkylace Cys-69 vede ke konformační změně proteinu a přeměňuje jej na silný aktivátor transkripce, který se váže na promotory genů regulonu Ada. Výsledkem tohoto děje je zvýšená transkripce a translace.
4. Zvýšená koncentrace Ada-proteinu a produktů jiných genů má za následek zesílení opravy DNA poškozené alkylacemi.



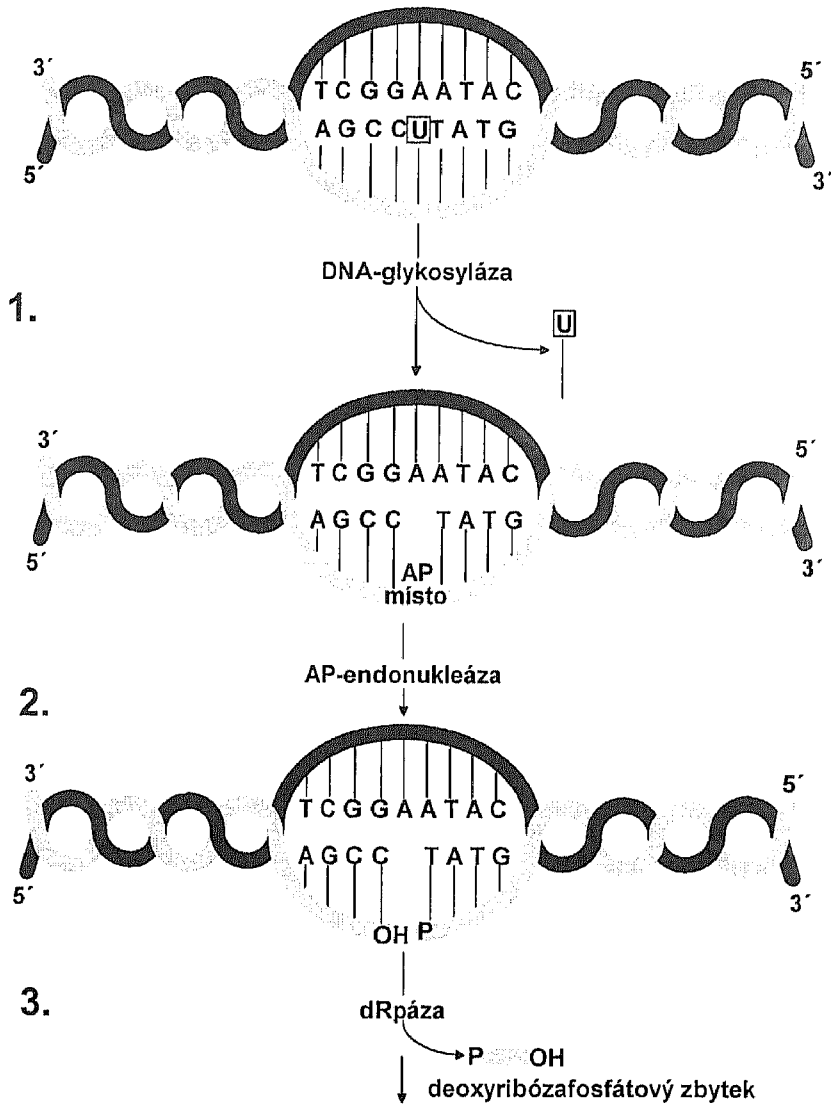
Obr. 518  
Metylfosfotriester



Obr. 519  
Schéma regulace adaptivní odpovědi na alkylační látky

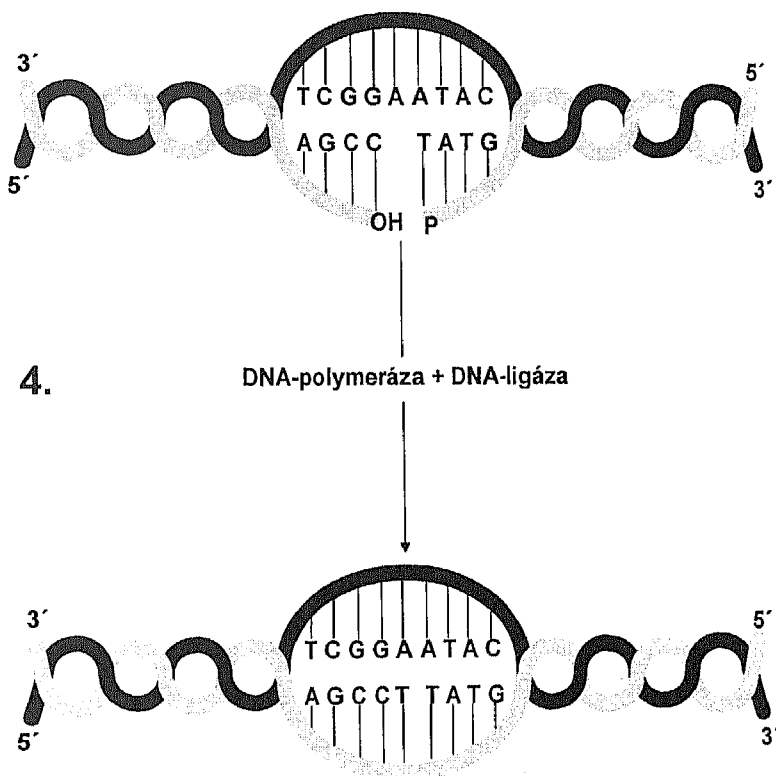
## 13.2 EXCIZNÍ OPRAVY

### 13.2.1 Bázová excizní oprava



Obr. 520a  
Schéma bázové excizní opravy





Obr. 520b  
Schéma báze excizní opravy

**DNA-GLYKOSYLÁZY.** Excize některých forem poškození bází v DNA je zahájena enzymy označovanými jako DNA-glykosylázy, které katalyzují hydrolyzu N-glykosidových vazeb spojujících chemicky pozměněné báze nebo nevhodné báze s páteří DNA. Excizní oprava, která je zahájena DNA-glykosylázami, se nazývá **bázovou excizní opravou**, jelikož chemicky modifikovaná báze se vyštěpuje jako volná báze. DNA-glykosylázy rozeznávají jen určitou formu poškození báze nebo nevhodnou bázi (např. uracil inkorporovaný do DNA během její replikace). Většina běžně známých DNA-glykosyláz byla izolována z *E. coli* a vyskytuje se i v eukaryotech. Jsou to malé monomerní proteiny působící bez kofaktorů. Počátečním výsledkem působení DNA-glykosyláz během excizní opravy je jiný typ poškození DNA, a to je **AP-místo** neboli **apurinové/-apirimidinové místo** (viz níže), které vzniká v páteři DNA tím, že z ní byla odstraněna purinová nebo pyrimidinová báze. Je specificky rozeznáváno a štěpeno AP-endonukleázami navozujícími excizní reparaci. **AP-endonukleázy** jsou enzymy, které způsobují v dsDNA zlomy hydrolyzou fosfodiesterové vazby na 5' a 3' straně AP-místa.

**PRŮBĚH BÁZOVÉ EXCIZNÍ OPRAVY.** Základní kroky této opravy jsou (obr. 520a, b):

1. Poškozená báze nebo nevhodná báze je rozeznána specifickou DNA-glykosylázou, která katalyzuje excizi báze hydrolyzou N-glykosidové vazby. Touto reakcí v DNA vzniká AP-místo (520a).
2. Napadení AP-místa 5'-AP-endonukleázou způsobuje v DNA-řetězci zlom s 5'-deoxyribózafofosfátovým koncovým zbytkem (obr. 520a).
3. 5'-deoxyribózafofosfátový koncový zbytek je vyštěpen DNA-deoxyribofosfodiesterázou (dRpáza) (obr. 520a).
4. Výsledná jednonukleotidová mezera se zaplní opravnou syntézou, která je dokončena DNA-ligázou. Zaplnění opravnou syntézou je realizováno vložením komplementárního nukleotidu k matricovému, což je katalyzováno DNA-polymerázou (obr. 520b).

### 13.2.2

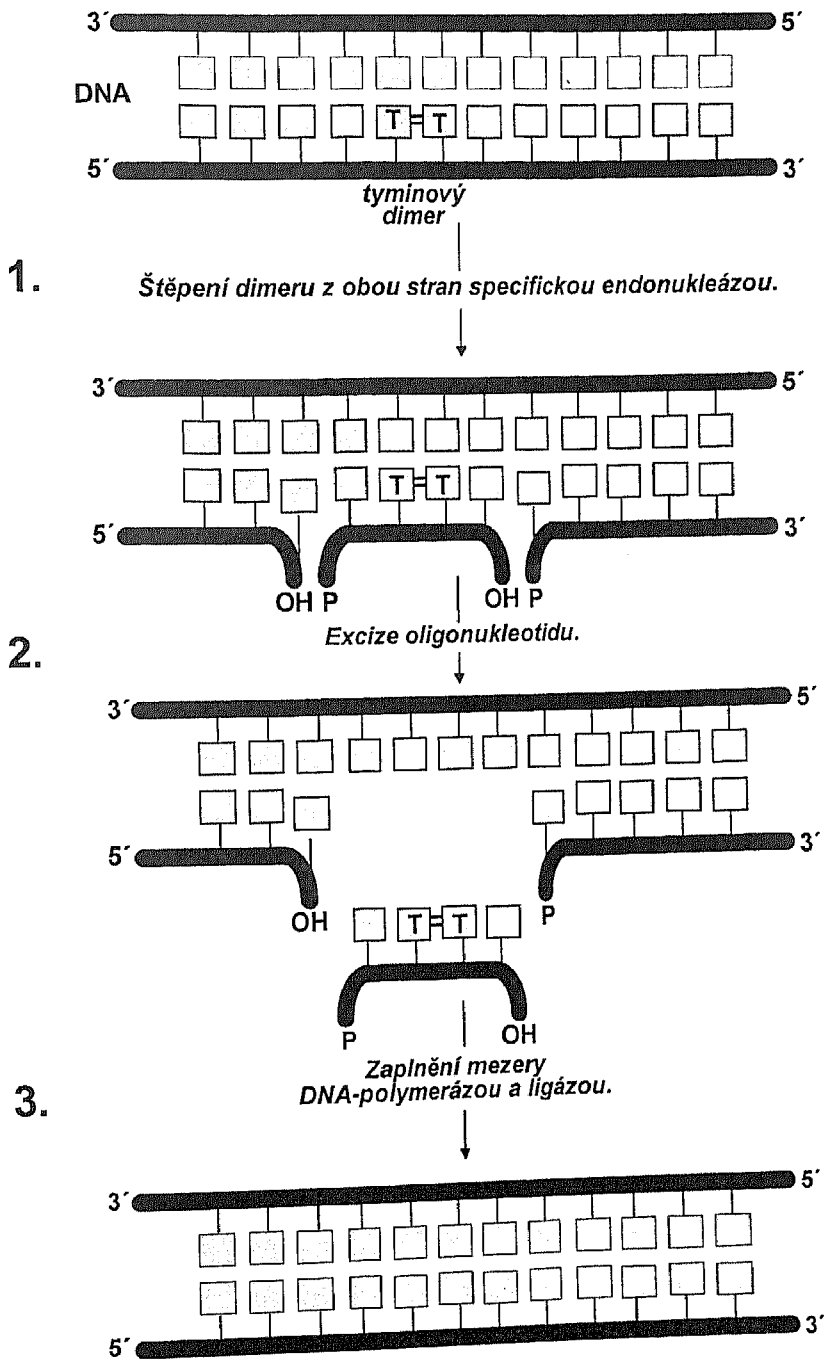
#### Nukleotidová excizní oprava

**NUKLEOTIDOVÁ EXCIZNÍ OPRAVA U *E. COLI*.** *Nukleotidová excizní oprava je proces, kterým se UV-světlem poškozené báze ve formě pyrimidinových dimerů a jiných fotoproduktů enzymaticky vyštěpují z DNA jako součást oligonukleotidů. Složkami opravných pochodů jsou u *E. coli* proteiny UvrA, UvrB, UvrC a UvrD. V zásadě má nukleotidová excizní oprava tento průběh (obr. 521):*

1. Pyrimidinový dimer je rozeznáván specifickou endonukleázou, která vyštěpuje dimer jako součást oligonukleotidového fragmentu.
2. Oligonukleotidový fragment se uvolní a vzniklá mezera se opravnou syntézou zaplní.
3. Opravný proces končí působením DNA-ligázy jako u báze excizní opravy.

**NUKLEOTIDOVÁ EXCIZNÍ OPRAVA U ČLOVĚKA.** Je podobná *E. coli*. Celkově probíhá takto:

1. Poškození (pyrimidinové dimery) v DNA je rozeznáváno XPA-proteinem.
2. XPA-protein v kooperaci s proteiny XP-B a XP-D, které mají funkci DNA-helikázy, uskutečňuje excizi poškozeného místa.
3. Opravná syntéza je katalyzována DNA-polymerázou.



Obr. 521  
Schéma nukleotidové excizní opravy

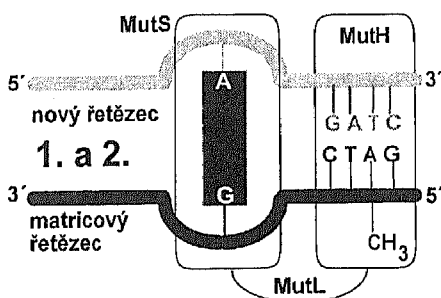
## 13.2.3

## Oprava chybného párování

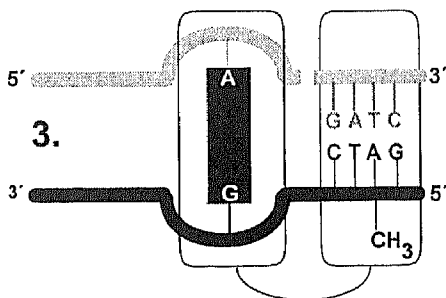
**KOREKTURA CHYBNÉHO PÁROVÁNÍ USKUTEČŇOVANÁ DNA - POLYMERÁZOU III.** Odhaduje se, že při replikaci dochází k chybnému zařazování bází při pravděpodobnosti  $10^{-6}$  na gen a generaci. Korektorská funkce DNA-polymerázy III se uskutečňuje tak, že rozezná chybný pár, odstraní z něj svou 3'-5'-exonukleázovou funkcí nesprávný nukleotid a nahradí jej správným. *Enzymové odstraňování chybně zařazených nukleotidů při replikaci se označuje jako korektura.*

**POSUN JEDNOŘETĚZCOVÉHO ZLOMU.** Je to proces *postupného napojování nukleotidů na 3'-konec, který ohraničuje v DNA jednořetězcový zlom z jedné strany, a proces odbourávání nukleotidů z 5'-konce, který tento zlom ohraničuje z druhé strany, takže se zlom posouvá ve směru napojování nukleotidů.* Proces je katalyzován DNA-polymerázou I.

Rozpoznání sekvence GATC MutH-proteinem.



Štěpení nemetylovaného řetězce MutH-proteinem.



Obr. 522a  
Oprava chybného párování  
řízená metylací

**REPARACE CHYBNÉHO PÁRU BÁZÍ ŘÍZENÁ METYLACÍ.** I přesto, že působí korektorské mechanismy, které jsme právě popsali, dochází při polymeraci tak velkého počtu nukleotidů k chybám. Jestliže chybný pár unikl korektuře, která je katalyzována DNA-polymerázami, pak zapříčiní ve dvoušroubovici místní deformaci. V takovém chybném páru je na matricovém řetězci báze správná a v jemu komplementárním novém (dceřiném) řetězci je báze chybná. Opravný systém musí nyní uskutečnit rozlišení mezi oběma řetězci. Musí proto v novém řetězci odstranit chybnou bázi a opravit ho. To probíhá v těchto krocích u *E. coli* (obr. 522a, b):

1. V nově syntetizovaném DNA-řetězci *E. coli* se nachází sekvence GATC a v matricovém

její komplementární protějšek **CTAG**, v němž adenin se metyluje cytoplazmatickým enzymem **Dam-metylázou** (obr. 522a).

2. V dvoušroubovici potom MutS-protein nesprávný pár rozezná (obr. 522a).

3. MutH-protein spojený přes MutL-protein s MutS-proteinem pak rozeznává nemetylovanou sekvenci **GATC** a štěpí řetězec, ve kterém se tato sekvence nachází. Ta může být vzdálena i několik tisíc nukleotidů od chybného páru (obr. 522a).

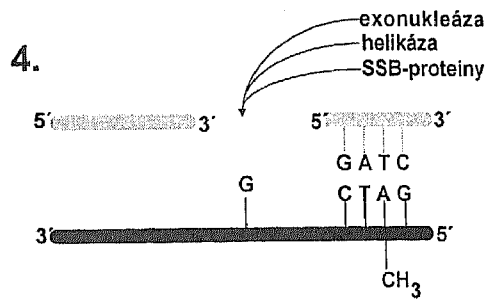
4. Exonukleáza v kooperaci s helikázou a SSB-proteiny odstraňuje postupně až k chybnému páru úsek DNA v nemetylovaném řetězci, kde se nesprávně zařazený nukleotid vyštěpí (obr. 522b).

5. Mezera vzniklá vyštěpením úseku nemetylovaného řetězce až po místo, kde byl vyštěpen chybný nukleotid, je zaplněna nukleotidy DNA-polymerázou III (obr. 522b).

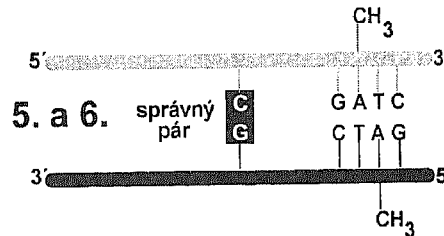
6. Opravená molekula dsDNA je pak zmetylována i v dceřiném řetězci (obr. 522b).

Uvedené proteiny byly dokázány i u člověka. Mutace genů, které kódují tyto proteiny, zvyšují riziko rakoviny.

*Odstranění úseku s chybnou bází.*



*Zaplnění mezery DNA-polymerázou III a ligázou.*



**Obr. 522b**  
**Oprava chybného párování**  
**řízená metylací**

## 13.3 TOLERANTNÍ OPRAVY

### 13.3.1 SOS-odpověď

*Jako SOS-odpověď se označuje koordinovaná syntéza enzymů a činnost odpovídajících opravných mechanismů indukovaná poškozením DNA. Tato oprava je dobře prostudována u *E. coli*. Lze ji charakterizovat takto:*

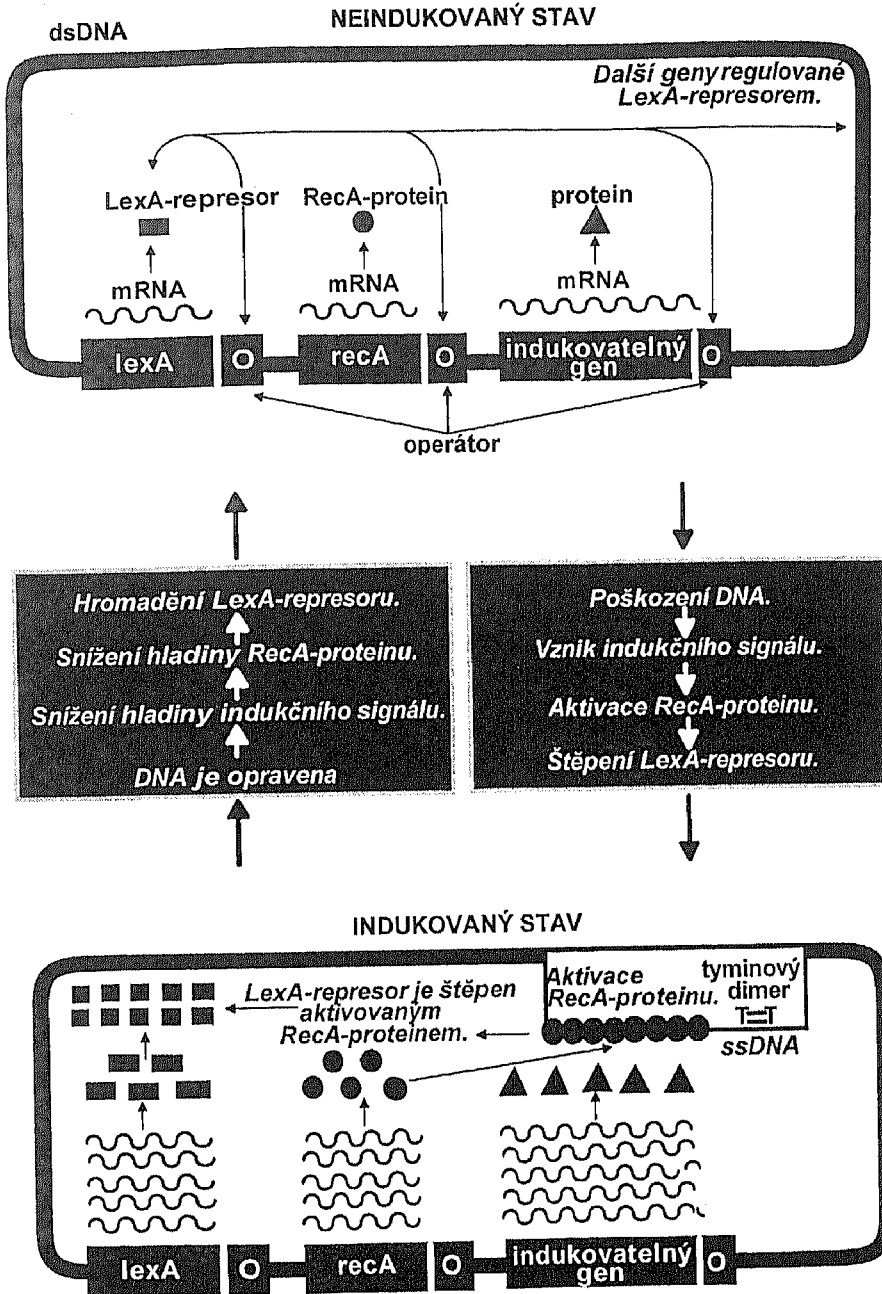
V neindukované buňce *E. coli* působí produkt genu *lexA*<sup>+</sup> jako represor asi 20 genů (včetně genů *recA*<sup>+</sup> a *lexA*<sup>+</sup>) tím, že se váže na sekvence operátoru těchto genů. Operátorové sekvence vázané LexA-proteinem se nazývají **SOS-boxy**. Mnohé z těchto 20 genů, tzv. **SOS-geny**, včetně *recA*<sup>+</sup> a *lexA*<sup>+</sup>, se vyjadřují do významných koncentrací svých produktů i v reprimovaném stavu. Zvláště *recA*<sup>+</sup> kóduje protein RecA v neindukovaných buňkách zhruba do koncentrace 7 200 molekul na buňku, což je koncentrace postačující pro jeho funkci při obecné rekombinaci.

V případě, že genom *E. coli* je poškozen nebo je inhibována replikace DNA, vytváří se intracelulární signál k indukci SOS-odpovědi. Tento signál sestává z úseků jednořetězcové DNA, které se tvoří, když se buňka snaží replikovat poškozenou matrici nebo když je normální proces replikace přerušena. Vazbou na tyto úseky jednořetězcové DNA za přítomnosti nukleosidtrifosfátu se RecA-protein přeměňuje na aktivní formu často označovanou jako RecA. Molekuly LexA-proteinu pak difundují k aktivovanému RecA-proteinu a reagují s ním způsobem, který vede k tomu, že se LexA štěpí přibližně uprostřed své molekuly v místech, kde se nachází Ala-Gly. Aktivovaný RecA-protein reaguje též s jinými proteiny, které jsou příbuzné s LexA, např. λ-represor.

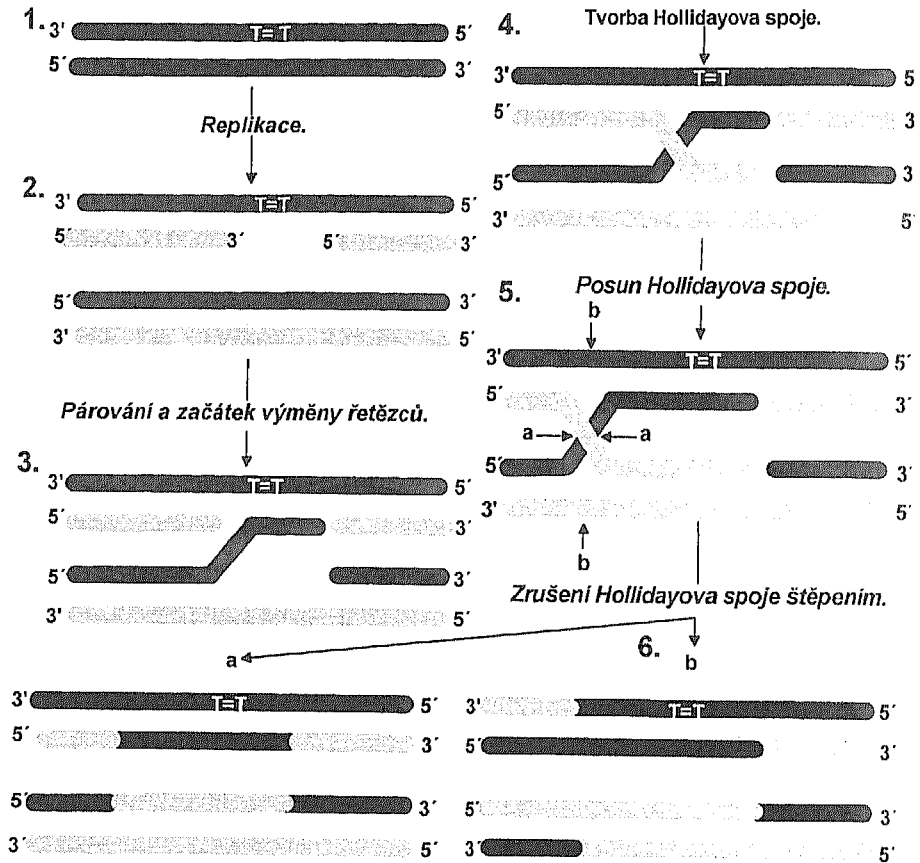
Štěpením způsobeným RecA-proteinem se LexA inaktivuje jako represor. S postupujícím štěpením LexA-proteinu se jeho množství v buňce snižuje, takže dochází k expresi různých SOS-genů včetně *recA*<sup>+</sup>-genu. Úseky jednořetězcové DNA pak postupně mizí vlivem různých opravných procesů a RecA-protein přechází opět do neaktivního stavu.

**MECHANIZMUS REGULACE LexA-RecA-REGULONU.** Tento mechanismus je vysvětlen modelem schematicky znázorněným na obr. 523 a zahrnuje tyto pochody:

1. V neindukovaném stavu se LexA-represor syntetizuje v malém množství, váže se na *lexA*-operátor a na operátory genu *recA* a jiných genů regulo-



Obr. 523  
Schéma SOS-opravy v buňkách *E. coli*



Obr. 524  
Oprava mezery v dceřiném řetězci dsDNA zakončená  
zrušením Hollidayova spoje bez jeho štěpení

vaných LexA-represorem. Tyto geny se exprimují v malých množstvích proteinů. Proto se RecA-protein nachází též v neindukovaných buňkách.

2. Vlivem poškození DNA (např. vznikem pyrimidinových dimerů blízko replikační vidlice) se aktivuje RecA-protein. Tato aktivace se uskutečňuje vazbou RecA-proteinu na jednořetězcové úseky v mezerách vytvořených diskontinuální syntézou DNA za dimery.

3. Interakce LexA s aktivovaným RecA-proteinem vede k proteolytickému štěpení LexA.

4. V indukovaném stavu vede dereprese *recA*<sup>+</sup>- genu k produkci velkého množství RecA-proteinu. Též jiné geny, které jsou regulovány LexA-proteinem, jsou dereprimovány.

5. Když indukční signál zmizí (pravděpodobně opravou jednořetězcových



mezer), množství aktivního RecA-proteinu klesne, LexA-represor se hromadí a geny regulované LexA-represorem jsou opět reprimovány.

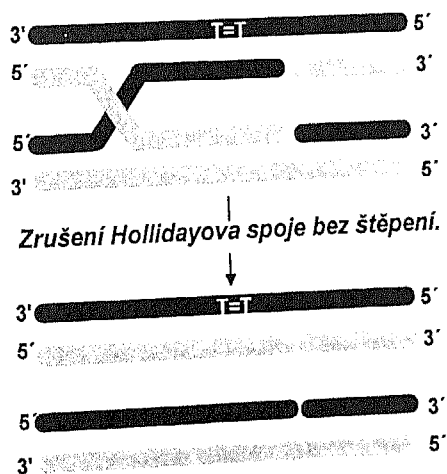
Indukovatelné geny na obr. 523 jsou např. geny *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, jejichž produkty jsou tyto proteiny:

- ◆ **UvrA-protein**, který se váže na DNA ozářenou UV-světlem; tvoří komplex s UvrB-proteinem.
- ◆ **UvrB-protein**, který se váže na UvrA-protein. V komplexu s tímto proteinem má helikázovou funkci.
- ◆ **UvrC-protein** působící v komplexu s UvrB-proteinem jako endonukleáza.
- ◆ **UvrD-protein** působící jako 3'-5'-helikáza II.

### 13.3.2

#### Oprava mezer v dceřiném řetězci

Tato oprava se často označuje jako postreplikační, což není adekvátní termín, *neboť jde o toleranci původního poškození v matricovém řetězci DNA nikoli však o jeho opravu. Opravují se totiž mezery v dceřiném řetězci, které vznikají jako důsledek toho poškození.* Je to zřejmé z obr. 524, který ukazuje na to, že při replikaci matricového řetězce poškozeného např. tyminovým dimerem T-T, se tvoří proti dimeru v dceřiném řetězci mezera, v níž se vytvoří



Obr. 525  
Oprava mezery v dceřiném řetězci dsDNA zakončená zrušením Hollidayova spoje bez jeho štěpení

Hollidayův spoj. Všechny další kroky jsou stejné jako na obr. 497 a 499, včetně homologického párování. Hollidayův spoj je v konečné fázi zrušen, jak je vyjádřeno na obr. 524 štěpením v místech **a** nebo **b**. Oba způsoby štěpení vedou k tvorbě molekuly dsDNA bez tyminového dimeru a k molekule dsDNA zahrnující původní řetězec s tyminovým dimerem.

Hollidayův spoj může být také zrušen, aniž by se štěpil. Znázorňuje to model na obr. 525.

## MOLEKULÁRNÍ PODSTATA KANCEROGENEZE

Dříve než přistoupíme k vlastnímu výkladu látky, o které má tato kapitola pojednávat, seznámíme Vás s některými termíny a pojmy, které budeme v této souvislosti používat. **Kancerogeneze** je proces vzniku nádoru. Obecně se jako **nádor** či **tumor** nebo též **neoplazma (novotvar)** označuje nová a abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která se dělí neregulovaným způsobem. Od normální somatické buňky se nádorová buňka liší hlavně v tom, že je v ní narušen regulační mechanismus jejího dělení a diferenciaci. V nádorech, vzniklých z kmenových nebo jiných buněk, které se ještě nesespecializovaly, je normální diferenciaci zcela redukována nebo neprobíhá. Co do schopnosti infiltrovat se do jiné tkáně a proliferovat v ní za tvorby nového nádoru, tedy co do schopnosti **metastaze**, se rozlišují: **nádor zhoubný (maligní)**, který se v těle šíří metastazí a infiltruje se do jiné tkáně a **nádor nezhooubný (benigní)**, který se nešíří v těle metastazí.

Zhoubný nádor vzniklý z epiteliálních buněk se označuje jako **karcinom** na rozdíl od zhoubného nádoru vzniklého z podpůrných nebo pojivových tkání, který se označuje jako **sarkom**. Přeměna somatické buňky v nádorovou se označuje jako **neoplastická transformace**.

Rakovina je nesporně nejrozšířenější choroba a navzdory zvyšujícímu se úsilí ji porozumět a zvládnout, je její výskyt stále větší. Hlavní příčinou toho je těsná korelace počtu případů rakoviny se zvyšujícím se věkem lidské populace. Vlivem pokroků ve zdravotnictví a zlepšujících se sociálních podmínek počet starších lidí roste. Dříve se předpokládalo, že s přibývajícím věkem se zvyšuje vnímavost (náchyllost) k rakovině. Nové poznatky však směřují k jinému vysvětlení. Ukazuje se totiž, že doba požadovaná k nahromadění kritického počtu genetických změn potřebných k propuknutí rakovinného procesu dosahuje s prodlužujícím se věkem svého optima.

Rakovina může zasáhnout kterýkoli orgán nebo tkáň. Nejčastěji bývají zasaženy plicí, kůže, střeva aj. Přes 90 % případů rakoviny se týká epiteliálních tkání. To nikterak nepřekvapuje, neboť značný počet kancerogenních účinků pochází z radiace a epiteliální buňky jsou v první linii obrany vůči nepříznivým faktorům prostředí, k nimž právě radiace patří.

### 14.1

## ZÁKLADNÍ INFORMACE O KANCEROGENEZE

### 14.1.1 Vývoj maligního nádoru

**RAKOVINA JAKO GENETICKÁ CHOROBA.** Rakovina je v podstatě genetickou chorobou. *Je ve většině případů způsobena somatickými mutacemi, které vznikají buď spontánně, nebo jsou indukovány fyzikálními nebo chemickými kancerogeny. Jako kancerogen se označuje látka nebo fyzikální faktor vyvolávající rakovinu.* Aby kancerogen uskutečnil změny v příslušném genu, které by se projeví tvorbou ireverzibilního maligního nádoru, musí mít mutagenní účinky a platí pro něj proto poznatky o mechanismech účinku mutagenů uvedené v kapitole 10. Označuje se jako **genotoxický kancerogen**, neboť *vyvolává tvorbu maligního nádoru v somatických buňkách většinou genovými mutacemi.*

Jen asi 5 % různých typů nádorů vzniká mutacemi v zárodečných buňkách. Dispozice k těmto nádorům se pak dědí přes pohlavní buňky.

Od genotoxických kancerogenů je třeba odlišovat **negenotoxické kancerogeny**. Těmi se rozumí *kancerogeny, které neindukují genové mutace a tudíž DNA nepoškozují, ale na druhé straně podporují rozmnožování (expanzi, tj. rozšíření) potenciálních nádorových buněk vzniklých vlivem genotoxického kancerogenu.* Působí tedy jako tzv. promotory, zatímco genotoxické kancerogeny působí jako iniciátory (viz další odst.).

**VÝVOJ MALIGNÍHO NÁDORU.** Každý jednotlivý maligní nádor není výsledkem jen jedné somatické mutace, ale *několika po sobě jdoucích mutací, což je vyjádřeno tzv. vícezásahovou teorií kancerogeneze* (viz dále). Obecným znakem kancerogeneze totiž je, že *mezi aplikací kancerogenního podnětu (stimulu) a vynořením se klinicky rozpoznatelného nádoru uplyne dosti dlouhé časové období.* To se označuje jako **latentní fáze ve vývoji nádoru**, která trvá několik měsíců až mnoho roků. Tato fáze je podmíněna tím, že *kancerogenní faktor (podnět) nevyvolá tvorbu nádoru v jednom stupni, ale geneticky pozmění normální buňku v tom smyslu, že tato buňka se vyznačuje zvýšenou rychlostí dělení, kterou využívá proti sousedním normálním buňkám a prochází tak fází, která se označuje jako klonální expanze. Buňky pomnožené během této fáze jsou citlivější k dalším změnám.* Jedna z těchto buněk později prodělá další mutaci umožňující přerůst sousední buňky a snad i vytvořit malý nezhoubný nádor. Další fáze klonální expanze a mutace vedou případně ke vzniku buňky s dostatečným počtem mutací ("zásahů"), které udělí buňkám z ní vznikajícím maligní fenotyp; *tyto buňky pak napadají okolní tkáň a metastazují do jiných orgánů.*

Předpokládá se, že v rámci latentní fáze působí v uvedeném pořadí tyto dva typy faktorů:

**1. Iniciátory**, které působí genotoxicky a ireverzibilně poškozují DNA.

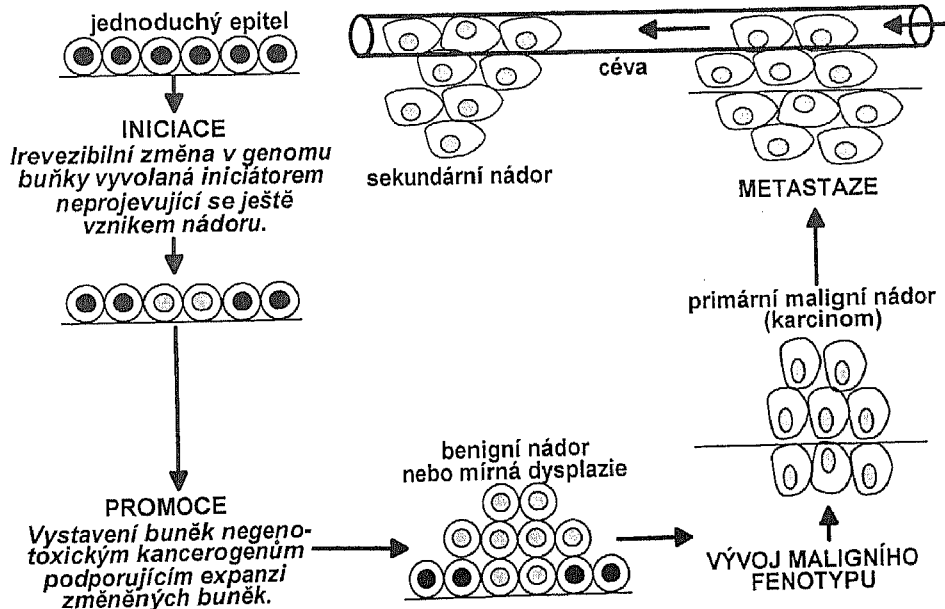
Mohou to být genotoxické kancerogeny nebo viry. *Fáze vývoje nádoru, ve které iniciátory působí, se označuje jako iniciace.*

**2. Promotory, které podporují expanzi buněk změněných iniciátory.** Jsou to negenotoxické kancerogeny (např. 12-o-tetradekanoylforbol-13-acetát, zkr. TPA) a řada hormonů. *Fáze vývoje nádoru, ve které promotory působí, se označuje jako promoce.*

Kancerogeneze jako vícestupňový proces je znázorněna schematicky na obr. 526.

**HISTOGENETICKÁ KLASIFIKACE NÁDORŮ.** Nejužitečnější způsob klasifikace nádorů je založen na jejich tkáňovém původu a buněčném typu. V tomto smyslu názvosloví některých benigních nádorů je uvedeno v tab.38 a maligních v tab.39.

**BENIGNÍ NÁDORY.** Benigní nádory jsou charakteristické odlišitelným okrajem a lokálním růstem potlačujícím rozšiřování okolní tkáně. Jsou snadno chirurgicky odstranitelné. Nešíří se do jiných tkání a symptomy, které mohou způsobit, jsou lokálního charakteru (tlak na nerv, uzavření cévy aj.). Typické benigní nádory rostou pomalu, což se projevuje nízkým počtem mitóz jejich buněk.



Obr. 526  
Schéma znázorňující na jednoduchém epitelu  
vícestupňový vývoj maligního nádoru

Tab. 38

## Histogenetická klasifikace benigních nádorů

Normální tkáň	Vzniklý benigní nádor
Žláznový epitel	adenom
Povrchový epitel	papilom
Fibroblasty	fibrom
Chrupavka	chondrom
Kosterní sval	rhabdomyom
Hladký sval	leiomyom
Krevní cévy	hemangiom
Tuková tkáň	lipom
Kostní tkáň	osteom
Jaterní tkáň	hepatom

**METASTAZE.** Jak již bylo uvedeno, maligní nádory se vyznačují schopností metastazovat. Metastaze je hlavní příčinou smrti pacienta postiženého tvorbou maligních nádorů. *Potenciální maligní nádor v původní tkáni se označuje jako nádor primární. Jeho implantát v nové tkáni se označuje jako sekundární nádor.*

## 14.1.2

## Některé rizikové faktory kancerogeneze

**KOURENÍ.** Statistiky kouření jako příčiny předčasné smrti jsou otřesné. V USA 40 % úmrtí na rakovinu je způsobeno kouřením. Podobné údaje jsou i v jiných zemích. Tato čísla se týkají velkého počtu lidí, kteří zemřeli zbytečně a vyhlídka do budoucna u lidí, kteří si přivodili rakovinu plic, je chmurná. A ještě horší je fakt, že nekuřáci jsou vlastně pasivními kuřáky, neboť jsou nuceni inhalovat ze vzduchu produkty tabáku.

Pozornost je, co se týče kouření, většinou zaměřena na rakovinu plic. Zvýšena je však i rakovina úst, faryngu, ezofagu, močového měchýře a ledvin. Inhalované kancerogeny totiž vstupují do krevního proudu přes plíce a jsou vylučovány ledvinami a močovým měchýřem. Oba orgány jsou kancerogeny cigaretového kouře postiženy. Asi 40 potenciálních kancerogenů bylo izolováno z tabáku včetně benzopyrenu a nitrozaminů. Největší riziko onemocnění rakovinou plic se týká kuřáků, kteří vykouří více než 30 cigaret denně. Mezi touto

Tab. 39

## Histogenetická klasifikace maligních nádorů

Normální tkáň	Vzniklý maligní nádor
Epitel	karcinom
Pojivová tkáň	sarkom
Kostní dřevina	leukemie
Žláznový epitel	adenokarcinom
Skvamózní epitel	skvamózní karcinom
Fibroblasty	fibrosarkom
Chrupavka	chondrosarkom
Kosterní sval	rhabdomyosarkom
Hladký sval	leiomyosarkom
Endotel	angiosarkom
Tuková tkáň	liposarkom
Kostní tkáň	osteosarkom
Jaterní tkáň	hepatocelulární karcinom
Kůže - melanocyty	maligní melanom
Myeloidní kmenové buňky	myeloidní leukemie
Plazmatické buňky (plazmocyty)	mnohočetný myelom
Lymfatická tkáň	lymfom (Hodgkinova choroba)
Sympatické neurony (neuroblasty)	neuroblastom
Endotel	Kaposiho sarkom
Ledvina	nefroblastom (Wilmsův nádor)
Retina	retinoblastom
Mužské zárodečné buňky	seminom
Ženské zárodečné buňky	dysgerminom

spotřebou cigaret a změnami na plicích způsobených rakovinou je rozpětí 20 let. Toto rozpětí je delší u lidí, kteří během stejného období nikdy nekouřili.

**OSTATNÍ FAKTORY.** S řadou genotoxických kancerogenů jsme se již setkali v kapitole 10, kde zejména byl vyložen mechanismus, kterým poškozují DNA. Některé další jsou uvedeny v tab. 40.

**Tab. 40**  
**Některé kancerogeny s vysokým rizikem**

<b>Kancerogen</b>	<b>Postižený orgán</b>
<b>Aromatické aminy</b>	močový měchýř
<b>Sloučeniny arzenu</b>	kůže, plíce, játra, močový měchýř
<b>Azbest</b>	plíce, pohrudnice
<b>Ionizující záření</b>	plíce, kosti
<b>Polycyklické uhlovodíky</b>	kůže, plíce
<b>UV-záření</b>	kůže
<b>Alkylační činidla</b>	močový měchýř, kostní dřev
<b>Estrogeny</b>	endometrium, prsní žláza
<b>Aflatoxin</b>	játra
<b>2-naftylamin</b>	močový měchýř
<b>Poznámka</b> <i>Do kancerogenů jsou zahrnuty jak genotoxické, tak i negenotoxické kancerogeny.</i>	



## 14.2 PROTOONKOGENY A ONKOGENY

### 14.2.1

#### Protoonkogeny

**POJEM PROTOONKOGENU A ONKOGENU.** Velmi často vzniká nádor mutacemi protoonkogenů. Jako **protoonkogen** se označuje *strukturní gen eukaryotické buňky, který kóduje protein podílející se funkčně na regulaci dělení buněk a jejich diferenciaci*. Přítomnost protoonkogenů v buňce je jednou z hlavních podmínek jejího normálního růstu, dělení a regulované diferenciaci. Změny, např. mutace, které proběhnou v protoonkogenu, se projeví ztrátou těchto funkcí. Dělení a diferenciaci buněk jsou pak neregulované a vedou k tvorbě maligního nádoru. Protoonkogeny takto změněné byly nazvány onkogeny. **Onkogen** je tedy *varianta protoonkogenu vyvolávající neoplastickou transformaci buňky*. *Přeměna protoonkogenu v onkogen se označuje jako aktivace protoonkogenu*. Lze také říci, že *každý protoonkogen je potenciální onkogen*.

Protoonkogen i onkogen jsou vlastně dvě alelické formy téhož strukturního genu. Z toho důvodu i expresi a funkci protoonkogenu pochopíme, srovnáme-li ji s expresí jeho "onkogenní" alely. V této souvislosti je nutno zdůraznit, že *účinek onkogenu na fenotyp buňky je dominantní*. Onkogen působí dominantně na fenotyp i za přítomnosti své "protoonkogenní" alely.

Protoonkogeny se obvykle vyjadřují zkratkou **c-onc**, kde za onc se dosazuje konkrétní označení příslušného protoonkogenu, např. *c-fos, c-myb* atd. V označení onkogenu se vypouští písmeno **c**, tedy pak se použije jen **onc**, nebo místo **c** se použije **v**, jde-li o onkogen přenášený retroviry, tedy **v-onc**, např. *v-fos, v-myb* atd.

*Onkogeny se nedědí* (až na určité výjimky, např. onkogen *RET*). Proto se neuplatňují ve familiálních dědičných chorobách.

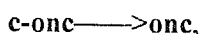
Poznámka: Používáme termínu "familiální", i když se v naší odborné literatuře místo termínu "familiální" používá termín "familiární". Myslím, že tento termín není adekvátní skutečnosti, kterou má vyjádřit, tj. "rodinné dědičné choroby" (dědičné choroby vyskytující se v rodině). Byl zřejmě nesprávně převzat z anglického "familiar". V angličtině se však rozlišuje význam slova "familiar" znamenající "důvěrný", "přátelský" od "familial" znamenající "rodinný". Proto v anglické odborné literatuře jsou genetické choroby označovány jako "familial diseases", např. "familial cancer syndromes" atd.

Konverzí na onkogeny se mění aktivita proteinů kódovaných protoonkogeny. Proto se také obecně *proteiny kódované onkogeny nazývají onkoproteiny* na rozdíl od *protoonkoproteinů*, tj. *proteinů kódovaných protoonkogeny*.

Protoonkoproteiny mají v buňce své specifické umístění. Stejně umístění mají i onkoproteiny. V tab. 41 je uvedena základní charakteristika onkogenů a jimi kódovaných onkoproteinů dokázaných při neoplastické transformaci uskutečňované retroviry.

V této souvislosti však poznamenáváme, že retroviry přenášejí už aktivované protoonkogeny tedy onkogeny (nikoli na člověka, ale u ptačích a zvířecích druhů). O tom podrobněji píšeme v kapitole 14.5.

**AKTIVACE PROTOONKOGENŮ.** Obecně bychom mohli vyjádřit konverzi protoonkogenů na onkogeny symbolicky takto:



kde **c-onc** = protoonkogen kódující protoonkoprotein, **onc** = onkogen kódující onkoprotein. V tomto smyslu jsou známy následující způsoby aktivace protoonkogenů, tj. jejich konverze na onkogeny:

- ◆ **Aktivace protoonkogenů mutací.** Změna smyslu kodonu navozená nukleotidovou substitucí v protoonkogenu vede k jeho aktivaci. Je to známo u protoonkogenů *c-ras*. Každý protoonkogen *c-ras* může dát vznik onkogenu bodovou mutací, která má za následek aminokyselinovou záměnu v jeho translačním produktu (tab. 42). Přítomnost takového onkogenů může pak vyvolat vznik nádoru v organismu. Takto změněný protoonkogen bývá často přenesen přes genom retrovirů v rámci jejich životního cyklu.
- ◆ **Aktivace protoonkogenů amplifikací.** Amplifikací protoonkogenů se vytvoří jeho kopie na chromozomu, což samozřejmě vede k zesílení jeho exprese. Tab. 43 uvádí příklady amplifikace některých protoonkogenů.
- ◆ **Aktivace protoonkogenů translokací.** U člověka zahrnuje translokace obvykle chromozom 8 a 14, na kterém je IgH-lokus. Jestliže se lokus *c-myc* translokují do IgH-lokusu, aktivuje se, což je spojeno s přeměnou buňky na nádorový stav. Jiný příklad aktivace protoonkogenů translokací byl zjištěn na chromozomu typu Philadelphia. Chronická myeloidní leukemie je sdružena s translokací mezi chromozomem 22, kde se nachází gen *bcr* a chromozomem 9, kde se nachází protoonkogen *abl*. Translokace probíhá tak, že *c-abl* se přemístí k *bcr* za vzniku **chromozomu Philadelphia**, v němž *c-abl* a *bcr* se dostanou do těsné blízkosti a přepisují se jako jednotka do stejného sfúzovaného transkriptu překládaného do jedné molekuly proteinu. Jelikož sfúzovanému proteinu schází přepis kinázové regulační domény, syntetizuje se tento protein, vyznačující se tyrozinproteinkinázovou aktivitou, konstitutivně (syntéza není regulována).
- ◆ **Inzerční mutagenese a děje spojené s transdukcí retrovirů.** Této problematice je věnována kapitola 14.5.1 a 14.5.2. Všechny uvedené způsoby aktivace protoonkogenů mají pro fenotyp buňky tento důsledek: *aktivované protoonkogeny (onkogeny) se uvolňují z buněčné regulace, kterou je omezoována exprese neaktivovaných protoonkogenů. Jejich exprese je tedy deregulována a*

Tab. 41

## Charakteristika některých retrovirových onkogenů a jejich produktů

Onkogen v-onc	Zdroj v-onc	Onkoprotein v-onc	Aktivita onkoproteinu	Nádor	Umístění v buňce
<b>src</b>	kuře	pp60 <sup>src</sup>	PK(tyr)	sarkom	plazmat. membrána
<b>fps</b>	kuře	P130 <sup>gag-fos</sup>	PK(tyr)	sarkom	plazmat. membrána
<b>yes</b>	kuře	P90 <sup>gag-yes</sup>	PK(tyr)	sarkom	plazmat. membrána
<b>abl</b>	myš	P90-P160 <sup>gag-abl</sup>	PK(tyr)	leukemie PreB-buněk	plazmat. membrána
<b>erbA</b>	kuře	P75 <sup>gag-erbA</sup>	Receptor tyroidního hormonu	?	cytoplazma
<b>erbB</b>	kuře	gp65 <sup>erbB</sup>	Receptor EGF	erytroblastóza a sarkom	plazmat. membrána
<b>kit</b>	kočka	P80 <sup>gag-kit</sup>	PK(tyr)	sarkom	plazmat. membrána
<b>fos</b>	myš	pp55 <sup>fos</sup>	TF	osteosarkom	jádro
<b>mos</b>	myš	P37 <sup>env-mos</sup>	PK(Ser,Tyr)	sarkom	cytoplazma
<b>sis</b>	opice	P28 <sup>env-sis</sup>	PDGF B-řetězec	sarkom	sekrece
<b>myc</b>	kuře	P110 <sup>gag-myc</sup>	vazba DNA	sarkom, karcinom a myelocytom	cytoplazma
<b>crk</b>	kuře	p47 <sup>gag-crk</sup>	Fosfolipáza C	sarkom	cytoplazma
<b>jun</b>	kuře	P65 <sup>gag-jun</sup>	TF	sarkom	jádro
<b>myb</b>	kuře	P45 <sup>myb</sup>	TF	myeloblastóza	jádro
<b>rel</b>	krocán	P64 <sup>rel</sup>	TF	retikuloendotelióza	jádro
<b>raf</b>	myš	gP90 <sup>gag-raf</sup>	PK(Ser,Thr)	sarkom	cytoplazma
<b>Ha-ras</b>	krysa	pp21 <sup>ras</sup>	GTPáza vázající GTP	sarkom a erytroleukemie	plazmat. membrána
<b>Ki-ras</b>	krysa	pp21 <sup>ras</sup>	GTPáza vázající GTP	sarkom a erytroleukemie	plazmat. membrána

ets	kuře	P135 <sup>gag-ets-myb</sup>	TF	myeloblastóza	jádro
<b>Vysvětlivky</b> PK = proteinkináza, TF = transkripční faktor					

Tab. 42

**Onkogeny vzniklé bodovými mutacemi protoonkogenů c-ras člověka**

Protoonkogen a jeho onkogeny	Nádor	Pořadové číslo kodonu v proteinu	
		12	61
<b>c-Ha-ras-1</b>	žádný nádor	Gly	Gln
<b>Onkogeny Ha-ras-1</b>	karcinom močového měchýře	Val	
	plicní karcinom		Leu
	karcinom prsu	Asp	
<b>c-Ki-ras-2</b>	žádný nádor	Gly	Gln
<b>Onkogeny Ki-ras-2</b>	plicní karcinom	Arg	
	plicní karcinom	Lys	
	plicní karcinom		His
	střevní karcinom	Val	
	karcinom močového měchýře	Arg	
	neuroblastom	Cys	
<b>c-N-ras</b>	žádný nádor	Gly	Gln
<b>Onkogeny N-ras</b>	neuroblastom		Lys
	teratokarcinom	Asp	
	fibrosarkom		Lys
	melanom		Lys
	plicní karcinom		Arg
	leukemie	Asp	
	rhabdomyosarkom		His

je konstitutivní. Vyznačují se zvýšenou aktivitou, která není závislá na fyziologických signálech, jak je tomu za normálních podmínek. Pro neaktivované protoonkogeny platí přesně opak.

Tab. 43

Některé příklady aktivace protoonkogenů jejich amplifikací

Protoonkogen c-onc	Přibližné násobky c-onc	Lidský nádor
<i>c-myc</i>	20	promyelocytická leukemie
	40	karcinom tlustého střeva
N-myc	5 - 1 000	neuroblastom
<i>c-myb</i>	10	karcinom tlustého střeva
	5 - 10	akutní myeloidní leukemie
<i>c-erbB</i>	30	karcinom vulvy
N-ras	5 - 10	karcinom prsu
<i>c-Ki-ras-2</i>	4 - 20	plicní karcinom
		kolorektální karcinom
		karcinom močového měchýře

**KLASIFIKACE PROTOONKOGENŮ.** Protoonkogeny lze rozdělit do následujících skupin podle funkce protoonkoproteinů, které kódují. Jsou to pak:

- ◆ protoonkogeny kódující růstové faktory;
- ◆ protoonkogeny kódující receptory růstových faktorů;
- ◆ protoonkogeny kódující G-proteiny;
- ◆ protoonkogeny kódující nerekceptorové proteinkinázy;
- ◆ protoonkogeny kódující transkripční faktory.

### 14.2.2 Onkogeny

Onkogeny lze rozdělit podle jejich původu, tj. podle toho, ze kterých protoonkogenů byly odvozeny procesem aktivace. Musíme si však být vědomi toho, že onkogen kóduje onkoproteinovou formu neboli onkoprotein produktu kódovaného protoonkogenem. V tomto smyslu pak rozeznáváme:

- ◆ **Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů růstové faktory.** Jsou odvozeny z protoonkogenů kódujících růstové faktory.
- ◆ **Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů receptory růstových faktorů.** Jsou odvozeny z protoonkogenů kódujících receptory růstových faktorů.
- ◆ **Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů Ras-proteiny.** Jsou odvozeny z protoonkogenů kódujících Ras-proteiny.
- ◆ **Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů nerekceptorové tyrozin-**

**proteinkinázy.** Jsou odvozeny z protoonkogenů kódujících nереceptorové tyrozinproteinkinázy.

♦ **Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů transkripční faktory.** Tyto jsou odvozeny z protoonkogenů kódujících transkripční faktory.

Z každé skupiny byly jako příklady vybrány jen "reprezentativní" onkogeny, které v dalším textu blíže popisujeme.

#### 14.2.2.1

##### Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů růstové faktory

**ONKOGEN *v-sis*.** *Onkogen v-sis* kóduje protein *p28*, který je velmi příbuzný s *B-podjednotkou růstového faktoru PDGF*. Přirozený PDGF (růstový faktor pocházející z trombocytů, str. 456) je důležitý mitogen buněk mezenchymálního původu. Je složen ze dvou příbuzných polypeptidových řetězců **A** a **B**, které se mohou spojovat do homodimerů **AA**, **BB** nebo heterodimeru **AB**. (Poznámka: místo A a B je možné použít řeckých písmen  $\alpha$  a  $\beta$ ). Jim odpovídají i příslušné receptory schopné je vázat. PDGF stimuluje endoteliální a epitelální buňky k proliferaci kolem poraněných míst na kůži. Jeho produkce se zastaví, jakmile se tato místa zacelí. Kdyby se však tvořil permanentně a konstitutivně, byly by buňky poraněného místa neustále stimulovány k dělení. K tomuto efektu vede *onkogenní varianta v-sis odvozená z protoonkogenu c-sis*. Onkogen *v-sis* může být do buňky vnesen genomem retrovirů. *Produkt onkogenu v-sis tvoří homodimer analogický strukturálně a funkčně BB-formě PDGF*. Avšak na rozdíl od proteinu kódovaného protoonkogenem *c-sis*, je jeho syntéza konstitutivní. Kromě toho je silně mitogenní vzhledem k buňkám, které mají PDGF-receptor. Tvoří se ve vysoké koncentraci a stimuluje růst stejné buňky, která jej právě vyprodukovala, což je jev, který se označuje jako **autokrinní stimulace**. Při autokrinní stimulaci růstu buněk *růstový faktor uvolněný příslušnou buňkou se váže na receptory této buňky a po této vazbě ji stimuluje k proliferaci* (viz též str. 445). Onkogen *v-sis* nejenže transformuje buňky v buněčné kultuře, ale také indukuje způsobem autokrinní stimulace PDGF-receptorů nádory v pokusných zvířatech.

Nadprodukce PDGF však není obecná pro lidské nádory. Nicméně to, že existuje, je povzbuzující v tom směru, že poukazuje na základní vlastnost nádorů - jejich schopnost neustálé proliferace vymykající se regulaci.

#### 14.2.2.2

##### Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů receptory růstových faktorů

**ONKOGEN *v-erbB-1*.** Existuje značný počet protoonkogenů, které kódují

receptory růstových faktorů nebo hormonů. Jsou to např. *c-erbB-1*, *c-erbB-2*, *c-erbB-3*, *c-fms* a *c-erbA*. Tyto protoonkogeny, ať už mutují na onkogeny u rychle transformujících retrovirů inzerční mutagenezí nebo vlivem chemických kancerogenů, se mění v onkogeny, jejichž fenotypový projev má tento společný rys:

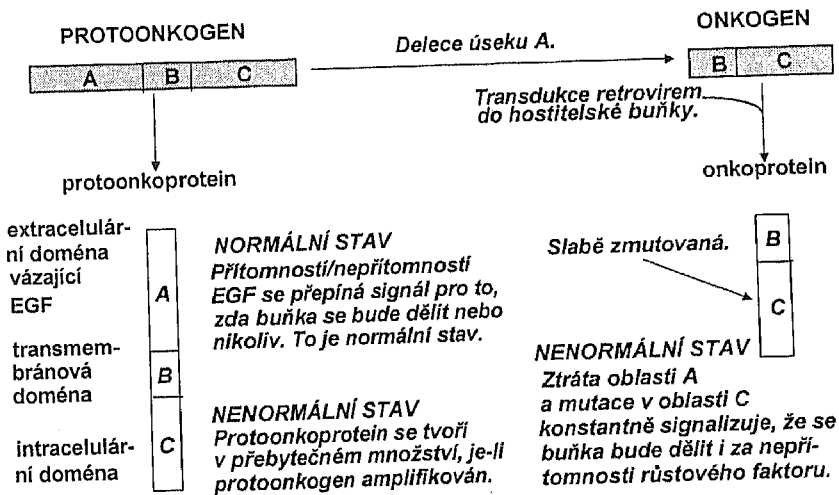
*Kódují chybné receptory, které se chovají, jakoby se na ně vázal stimulační ligand, takže stimulují buňku k dělení za všech okolností, i když to není pro ni vhodné.*

Např. retrovirový **onkogen *v-erbB-1*** viru ptačí erytroblastózy (ALV-virus) kóduje onkoprotein odpovídající **tyrozinproteinkinázovému receptoru epidermálního růstového faktoru EGF** zkrácenému o extracelulární doménu (poznámka: základní informace o těchto receptorech naleznete na str. 462, obr. 299a). Přestože onkoproteinovému receptoru chybí většina vazebné domény pro ligand, může generovat intracelulární signály za nepřítomnosti ligandu. **Protoonkogen kódující normální receptor epidermálního růstového faktoru, z něhož byl odvozen onkogen *v-erbB* viru ALV, se označuje jako *c-erbB-1*.**

Na obr. 527, který navazuje na str. 462 a obr. 299a, jsou vysvětleny možné mechanismy onkogenní aktivace protoonkogenu kódujícího EGF-receptor:

- ◆ Mutací tohoto protoonkogenu vzniká onkoprotein, který přenáší proliferující signály bez ohledu na přítomnost EGF.
- ◆ Amplifikace protoonkogenu (zvýšení počtu jeho kopií) nebo deregulace exprese protoonkogenu vede ke vzniku velkého množství receptorového proteinu stimulujícího růst buněk. Tento mechanismus je obvyklý u lidských nádorů.

Jak již bylo uvedeno na str. 463, je aktivní tyrozinproteinkinázový recep-



Obr. 527  
Aktivace protoonkogenu kódujícího EGF - receptor

tor dimerem dvou proteinů. Tento dimer se tvoří v závislosti na koncentraci růstového faktoru. Za jeho nepřítomnosti se netvoří. Avšak, *je-li protoonkogen kódující proteinkinázový receptorový protein aktivován na onkogen, vytváří se tento dimer konstitutivně. Za těchto okolností je receptor aktivní i za nepřítomnosti růstového faktoru.*

**ONKOGEN *v-erbB-2*.** Receptor kódovaný protoonkogenem *c-erbB-2* (u krysy se nazývá jako *c-neu*) je příbuzný s receptorem kódovaným protoonkogenem *c-erbB1*. V transmembránové doméně onkoproteinu (receptoru) kódovaném jeho onkogenem je bodovou mutací nahrazen valin glutamovou kyselínou. Tato mutace stabilizuje receptor do dimeru, *což se projevuje jeho zvýšenou aktivitou.* U lidí je však tato aktivace bodovou mutací vzácná; ukazuje se, že základem zvýšené aktivity tohoto receptoru je spíše amplifikace protoonkogenu *c-erbB-2*. Avšak ať už je základem této zvýšené aktivity receptoru bodová mutace nebo amplifikace, výsledkem je vždy zvýšená aktivita receptoru, která může být u člověka příčinou některých maligních nádorů.

#### 14.2.2.3

#### Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů Ras-proteiny

**ONKOGENY *Ha-ras, Ki-ras, N-ras*.** Jak již jsme uvedli na str. 461, patří Ras-proteiny do třídy monomerních G-proteinů. Protoonkogeny *c-ras* kódují Ras-proteiny, *kteřé se zúčastňují řízení normálního růstu buněk* (str. 461, obr. 298). Mutanty obsahující onkogen *ras* nehydrolyzují GTP. Proto v takovém případě je Ras-protein v trvale aktivní (GTP-vázané) formě *a jeho neustálé působení na cílový protein navozuje onkogenní proces.* Onkogeny *ras* byly zjištěny u dvou retrovirů známých pod jmény **virus Harveyova myšího sarkomu** a **Kirstenova myšího sarkomu**. Jejich protoonkogeny u savců byly mapovány na různých chromozomech a označují se jako:

- ◆ *c-Ha - ras,*
- ◆ *c-Ki - ras,*
- ◆ *c-N - ras.*

Poslední onkogen byl dokázán v neuroblastomu po transfekci retrovirem.

*Onkoproteiny  $p21^{ras}$  kódované těmito onkogeny vážou také GTP jako  $p21^{ras}$  kódované protoonkogeny, ale jejich GTPázová aktivita je nižší, takže jen slabě hydrolyzují nebo vůbec nehydrolyzují GTP a jsou proto v trvale aktivní (GTP-vázané) formě a jejich neustálé působení na cílový protein navozuje onkogenní proces.* Základem přeměny *c-ras* na *ras*-onkogeny jsou bodové mutace v kodonech 12 a 61. Onkoproteiny vzniklé těmito mutacemi vyvolávají tvorbu nádorů uvedených v tab. 41 a byly dokázány též v různých nádorech člověka (tab. 42). Změny způsobené v proteinu  $p21^{ras}$  bodovou mutací mají za následek, že tento Ras-protein *se sice i nadále vyznačuje schopností vázat GTP*



a interagovat s cílovými proteiny, jako je např. Raf-proteinkináza (str. 476, obr. 308), ale ztrácí schopnost hydrolýzy GTP i za přítomnosti GAP; stává se rezistentní k účinku GAP a v důsledku toho se v buňce hromadí v aktivní GTP-vázané formě a působí na cílové proteiny.

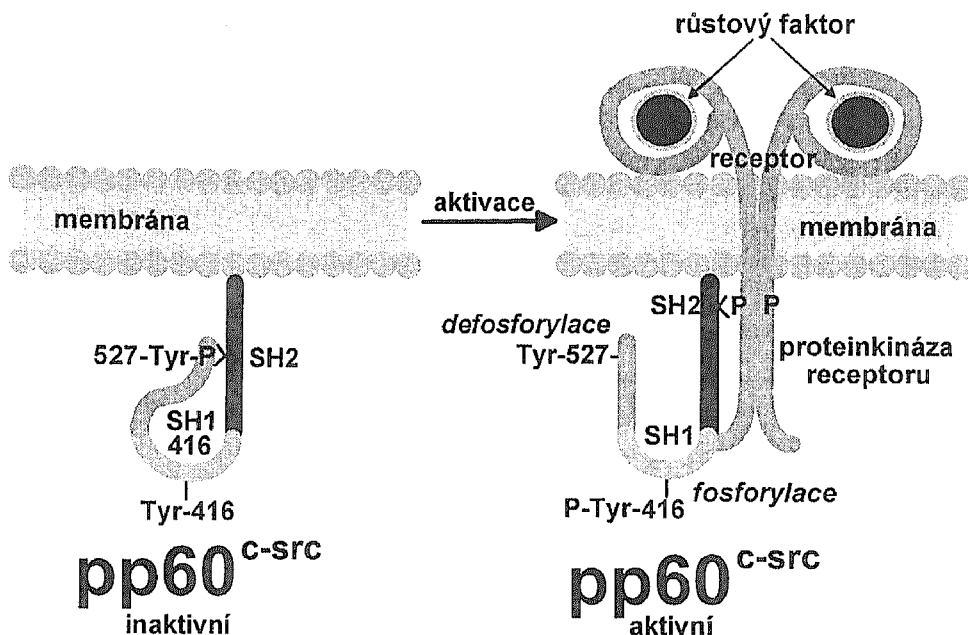
(Poznámka: připomínáme podle str. 461 a obr. 298, že Ras-proteiny se vyznačují vnitřní GTPázovou aktivitou, která je velmi slabá a sama o sobě nepostačující k rychlé hydrolýze GTP, tedy k inaktivaci Ras-proteinu v GTP-vázané formě. Tato GTPázová aktivita Ras-proteinu se silně zvýší interakcí s GAP-proteinem (protein aktivující GTPázu), který specificky rozeznává Ras-protein v GTP-vázané formě a působí v součinnosti s GTPázovou aktivitou Ras-proteinu.

#### 14.2.2.4

#### Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů nereceptorové tyrozinproteinkinázy

**ONKOGEN ROUSOVA SARKOMU.** Onkogenem protoonkogenem *c-src* je *v-src*, který kóduje onkoprotein *pp60v-src*. Přenáší se do buněk kuřat prostřednictvím viru Rousova sarkomu (RSV-virus). Liší se od svého protoonkoproteinu delecí několika aminokyselin. Protoonkoprotein *pp60c-src* je *in vivo* fosforylován Csk-proteinkinázou na Tyr-527, kdežto onkoprotein *pp60v-src* je fosforylován v kinázové doméně Tyr-416. (Poznámka: Csk-proteinkináza fosforyluje zbytky tyrozinu v rodině Src-proteinkináz).

**KINÁZOVÁ DOMÉNA Tyr-416 PROTOONKOGENU *c-src*.** Struktura a funkce nereceptorových tyrozinproteinkináz byla vyložena na str. 449 - 451 a obr. 290 a 291. Kromě toho na str. 464 - 466 jste se dozvěděli, že nejsou přímo složkou receptorů, ale jsou s nimi funkčně sdruženy (receptory s přidruženou tyrozinproteinkinázovou aktivitou). Jako příklad byla uvedena nereceptorová tyrozinproteinkináza *pp60<sup>c-src</sup>*, která je kódována protoonkogenem *c-src*. Je-li 527-Tyr této proteinkinázy fosforylován na 527-Tyr-P, blokuje se její kinázová aktivita (tato aktivita je určena doménou SH1) vazbou fosforylovaného tyrozínu na doménu SH2 (obr. 291, str. 451). Ke zrušení této blokady a tím i k navození aktivity *pp60<sup>c-src</sup>* může dojít např. tak, že se 527-Tyr-P spojí s SH2-doménou jiného proteinu. Je-li tímto proteinem proteinkináza, která je součástí receptoru, pak v případě, že tento receptor je aktivován růstovým faktorem, dochází k aktivaci *pp60<sup>c-src</sup>* v závislosti na koncentraci růstového faktoru v prostředí, ve kterém se buňky dělí. Základem této aktivace nereceptorové tyrozinproteinkinázy *pp60<sup>c-src</sup>* je aktivace její kinázové domény SH1 fosforylací 416-Tyr na 416-Tyr-P receptorovou proteinkinázou a defosforylace 527-Tyr-P na 527-Tyr (obr. 528). Takto aktivovaná *pp60<sup>c-src</sup>* může aktivovat fosforylací další proteinkinázy (např. Raf-proteinkinázu aj.).



Obr. 528  
Aktivace nereceptorové proteinkinázy pp60<sup>c-src</sup>

Bylo zjištěno, že pp60<sup>c-src</sup> nabývá onkogenní aktivity (mění se v onkoprotein) po mutacích, které vedou k záměnám aminokyselin v místě 527-Tyr za předpokladu, že místo Tyr-416 zůstává nezměněno.

#### 14.2.2.5

#### Onkogeny kódující ve formě onkoproteinů transkripční faktory

**VÝZNAM TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ JAKO ONKOPROTEINŮ.** Význam transkripčních faktorů při regulaci genové exprese v eukaryotické buňce je klíčový, neboť jsou to proteiny, kterými je v eukaryotické buňce řízena transkripce. Tento význam zvláště vzrostl poznáním, že mnohé z nich jsou kódovány protoonkogeny a slouží jako cílové proteiny mitogenních signálů. Jsou to např.:

- ◆ Fos - protein kódovaný protoonkogenem *c-fos*,
- ◆ Jun - protein kódovaný protoonkogenem *c-jun*,
- ◆ Ets - protein kódovaný protoonkogenem *c-ets*,
- ◆ Myc - protein kódovaný protoonkogenem *c-myc*,
- ◆ NF- κB - protein kódovaný protoonkogenem *c-rel*.

*Aktivací těchto protoonkogenů mohou vznikat onkogeny, jejichž exprese je charakteristická silnou proliferací a neoplastickou transformací postižených*

*buněk*. Tím, že získaly schopnost konstitutivní exprese, nejsou závislé na mitogenní stimulaci růstovým faktorem. Všimněme si dále v tomto směru transkripčních faktorů kódovaných protoonkogeny *c-fos* a *c-jun*. Tuto kapitolu ukončíme ještě krátkým popisem transkripčního faktoru kódovaného protoonkogenem *c-rel*.

**TRANSKRIPČNÍ FAKTORY KÓDOVANÉ PROTOONKOGENY c-FOS A c-JUN.** Z obr. 293 (str. 457) je zřejmé, že po přidání růstových faktorů obsažených v séru se prudce zvýší hladina transkripčních faktorů kódovaných protoonkogeny *c-fos* a *c-jun*. Pak se rychle sníží. Protoonkogen *c-myc* má delší dobu exprese, která se však také sníží po delší době růstu buněk (to není uvedeno v grafu na obr. 293). Celkově však lze říci, že exprese těchto protoonkogenů na vyšší hladině transkripce trvá jen krátkou dobu. Je to pravděpodobně z toho důvodu, že jejich pokračující exprese by měla onkogenní účinek. Brání tomu však vnitřní nestabilita produktů kódovaných těmito geny. Transkripční faktory kódované protoonkogeny *c-fos* a *c-jun* navozují vstup do G<sub>1</sub>-fáze buněčného cyklu a přechod z G<sub>1</sub>-fáze do S-fáze. V nádorech se často vyskytují ve vysokých a neregulovaných koncentracích a působí v nich zřejmě jako onkoproteiny. Hovoří pro to skutečnost, že onkoproteiny kódované onkogeny *v-fos* a *v-jun* transformují normální buňky na nádorové. Předpokládá se, že aktivace protoonkogenů *c-jun*, *c-fos* a *c-myc* vede k onkogenům, jejichž produkty jsou stabilní a neustále tedy stimulují buňky k dělení.

**TRANSKRIPČNÍ FAKTOR NF-κB JAKO ONKOPROTEIN.** NF-κB je transkripční faktor, jehož podjednotka p64 je kódována protoonkogenem *c-rel*. Je dimerem dvou podjednotek p64 a p50. Obě podjednotky jsou v dimeru drženy regulačním proteinem I-κB. Teprve po uvolnění I-κB z tohoto dimeru, vstupuje NF-κB do jádra a aktivuje transkripci genů, jak jsme již uvedli na str. 556, obr. 368. Onkogen *v-rel* kóduje onkoprotein v-Rel, který zůstává v jádře. Předpokládá se (hypotéza), že nemůže být do cytoplazmy exportován, jelikož pro tuto funkci ztratil potřebné sekvence při konverzi z *c-rel* na *v-rel*. Zůstává však v jádře, kde se konstitutivně váže na promotory příslušných genů.

#### 14.2.2.6

### Dědičný onkogen RET

Všechny dosud popsané onkogeny u člověka se jeví jako nedědičné. Onkogen protoonkogenu RET je však mezi nimi výjimkou v tom smyslu, že je zatím jediným známým onkogenem (*RET-onkogen*), který se dědí. U člověka zodpovídá za (tab. 44):

- ◆ **familiální medulární karcinom štítné žlázy (zkr. FMTC),**

Tab. 44

## Klinické formy MEN 2A, MEN 2B a FMTC

Novotvary/abnormality	MEN 2A	MEN 2B	FMTC
Medulární karcinom	+	+	+
Hyperplazie C-buněk	+	+	+
Feochromocytom	+	+	-
Hyperplazie paratyreoidey	+	-	-
Paragangliom (ganglioneurom)	-	+	-
Abnormality v kostře	-	+	-
Abnormality v očích	-	+	-

**Vysvětlivky**

**Medulární karcinom** = nádor štítné žlázy z tzv. parafolikulárních buněk, které produkují kalcitonin.

**Feochromocytom** = nádor dřene nadledvin, který produkuje velká množství katecholaminů (adrenalinu nebo noradrenalinu).

**Hyperplazie paratyreoidey** = hyperplazie příštítného tělíska, tj. žlázy produkující tzv. parathormon, který zvyšuje obsah vápníku v krvi.

**Paraganglion** = orgán nervového původu, který se nachází v oblasti sympatických nervových pletení (v okolí břišní aorty).

◆ **mnohočetné endokrinní neoplazie (zkr. MEN), které se vyskytují jako typ MEN 2A a MEN 2B.**

RET-protoonkogen je lokalizován v lokusu 10q11. Jeho délka je zhruba 20 kb a je složen z 20 exonů. Kóduje receptor s tyrozinproteinkinázovou aktivitou (str. 462). Exprimuje se v různých tkáních (ve štítné žláze, v nervových tkáních a v nadledvinách). Mutace RET-protoonkogenu vede k onkogenu kódujícímu protein se změněnou primární strukturou. Vedle familiálních dědičných nádorů, u nichž lze mutační změny dokázat v kmenových buňkách, vyskytují se též somatické mutace ve sporadických nedědičných klinických formách MTC, a to na stejných místech jako u familiálních dědičných nádorů. Protoonkogen RET se aktivuje v onkogen dvěma mechanismy:

- ◆ mutacemi (bodové mutace a delece),
- ◆ chromozomovými translokacemi.

Nejčastější formou aktivace jsou mutace s chybným smyslem, které vedou k syntéze proteinu se změněným pořadím aminokyselin.

## 14.3 NÁDOROVÉ SUPRESOROVÉ GENY

### 14.3.1

#### Obecná charakteristika nádorových supresorových genů

Na procesu regulace buněčného cyklu se kromě protoonkogenů podílí ještě další, a to zcela odlišná skupina genů. Jsou to tzv. **nádorové supresorové geny** nebo též **antionkogeny**, které svými proteiny, jež kódují, v normálních somatických buňkách proliferaci nevyvolávají, ale naopak proliferaci buněk potlačují a udržují buňku ve stadiu klidu ( $G_0$ ). Produktem jednoho z nádorových supresorových genů je např. protein p53, jehož funkce v regulaci buněčného dělení spočívá v tom, že pozitivně aktivuje CDK-inhibitor p21. Ztráta p53 se pak projevuje tím, že se tvoří nedostatečné množství tohoto inhibitoru. Pak samozřejmě vypadne přirozená brzda průběhu buněčného cyklu, což má za následek neregulovanou proliferaci buněk.

Co je to "nádorový supresorový gen" pochopíme blíže, když shrneme v následujících bodech hlavní rozdíly mezi mutantními formami (inaktivními alelami) nádorových supresorových genů a onkogeny:

1. Onkogeny se od nádorových supresorových genů liší především v tom, že vznikají jako mutantní formy protoonkogenů v somatických buňkách, nikoliv v zárodečných (s výjimkou onkogenu *RET*). Na rozdíl od nich mutantní formy nádorových supresorových genů vznikají v zárodečných buňkách (vajíčko nebo spermie) a jsou dědičné. Dítě, které získalo mutantní formu nádorového supresorového genu, je celý život ohroženo možností onemocnět rakovinou (tvorbou příslušného nádoru).

2. Onkogeny vznikají aktivací protoonkogenů. Protoonkogen aktivovaný v onkogen se projevuje silným účinkem na dělení buňky, které se stává vlivem onkogenu neregulovaným. U mutantních alel nádorových supresorových genů je tomu naopak. Standardní alela nádorového supresorového genu je aktivní a funkční (inhibuje svým produktem dělení buňky). Mutací se standardní alela nádorového supresorového genu inaktivuje a vzniká tak mutantní alela, která je nefunkční, neaktivní (neinhibuje dělení buňky).

3. Onkogeny se vyznačují dominantním účinkem na fenotyp buňky, kdežto mutantní alely nádorových supresorových genů jsou ve svém účinku na fenotyp buňky recesivní. Onkogen působí dominantně na fenotyp i za přítomnosti protoonkogenu jako své alely. U nádorových supresorových genů se v heterozygotu (standardní alela / mutantní alela) uplatňuje dominantně účinek standardní alely na fenotyp, tj. její inhibiční účinek na dělení buňky. Proto teprve v homo-

zygotu (mutantní alela / mutantní alela) vlivem ztráty heterozygotnosti dochází k neregulované proliferaci buněk za vzniku nádoru (je zrušen inhibiční účinek standardní alely nádorového supresorového genu na fenotyp). Ztráta heterozygotnosti se vysvětluje na str. 843.

4. *Onkogeny se nedědí (výjimkou je RET-onkogen). Proto se neuplatňují ve familiálních dědičných chorobách. To je podstatný rozdíl proti mutantním alelám nádorových supresorových genů, které, jak již bylo uvedeno, se dědičně přenášejí v rámci familiálních dědičných forem nádorů a vyskytují se ve všech somatických buňkách. Onkogeny vznikají v somatických buňkách aktivací protoonkogenů a vyskytují se v buňkách tkáně, v níž k aktivaci protoonkogenu došlo.*

V tab. 45 jsou uvedeny nádorové supresorové geny, jejichž mutace se projevují u člověka tvorbou nádorů. Charakteristika jednotlivých nádorových supresorových genů je uvedena v dalších kapitolách.

### 14.3.2

#### Expresse nádorového supresorového genu dědičného retinoblastomu

**NÁDOROVÝ SUPRESOROVÝ GEN RB1.** Dítě, které získalo mutantní formu nádorového supresorového genu RB1, je celý život ohroženo možností onemocnět retinoblastomem. **Retinoblastom je choroba dětí a projevuje se jako nádor na sítnici.** Vyskytuje se jednak jako dědičný znak, jednak jako somatická mutace spojená s delecí pruhu q14 lidského chromozomu 13. V této oblasti je lokalizován nádorový supresorový gen RB1. *Retinoblastom vzniká v případě, že se inaktivují obě kopie genu RB1.* Při dědičné formě této choroby nese jeden rodičovský chromozom změnu v této oblasti, obvykle delecii. *Teprve však somatická mutace v buňkách sítnice, kterou se inaktivuje druhá kopie (alela) genu RB1, vede k tvorbě nádoru.* Tento gen sestává ze 27 exonů.

Bylo zjištěno, že gen RB1 kóduje tzv. **Rb-protein** neboli **pRb**. Je to protein, který se vyskytuje v jádře v silně fosforylované nebo slabě fosforylované formě. Defosforylace silně fosforylovaného Rb-proteinu navozuje jeho aktivitu. **V slabě fosforylované formě (hypofosforylovaná forma) je aktivní, což se projevuje jeho inhibičním účinkem na dělení buněk a replikaci DNA. Silně fosforylovaná (hyperfosforylovaná) forma je inaktivní a projevuje se stimulací buněčného dělení.**

Poznámka: normální funkce Rb-proteinu v buněčném cyklu byla vysvětlena na str. 481 - 485 (obr. 313, 314, 316).

#### **BLOKOVÁNÍ FUNKCE Rb-PROTEINU VEDE K TVORBĚ NÁDORU.**

**Tab. 45**  
**Nádorové supresorové geny,**  
**jejichž mutace vedou u člověka k tvorbě nádorů**

Gen	Chromozom	Nádor
APC	5q21 - 22	familiální adenomatózní polyposis coli
BCNS	9q31	meduloblastom
BRCA1	17q12 - 21	karcinom prsu a vaječníku
BRCA2	13q12 - 13	karcinom prsu
CMAR/CAR	16q	karcinom prsu a prostaty
DCC	18q21	karcinom střeva
INHA	2q33 - qter	nádory gonád
MEN1	11q13	nádor paratyreoidey, pankreatu a hypofýzy
NF1	17q11.2	neurofibromatóza typu 1 (neurofibrom)
NF2	22q12	neurofibromatóza typu 2 (schwannom, meningiom)
NM23	17q21.3	neuroblastom, karcinom střeva
p16/MLM/MTS	9p21	melanom, adenokarcinom pankreatu, plicní karcinom
TP53	17p13.1	karcinomy prsu, střeva a plic, osteosarkom, astrocytom aj.
RB1	13q14	retinoblastom, osteosarkom, karcinomy prsu, močového měchýře a plic
VHL	3p25	von Hippel-Lindauův syndrom (karcinom ledvin, feochromocytom, hemangiom)
WT1	11p12	Wilmsův nádor

#### Vysvětlivky

V této tabulce jsou vysvětleny jen ty termíny, které nebyly vysvětleny v předchozím textu nebo tabulkách.

**Adenomatózní polyposis coli** = mnohočetné adenomatózní polypy tlustého střeva. **Meduloblastom** = rychle rostoucí nádor nervové tkáně.

**Neurofibromatóza typu 1** = dědičné onemocnění s mnohočetnými nádorky na kůži a v nervovém systému. **Meningiom** = pomalu rostoucí benigní nádor vycházející z obalů mozku a míchy.

Je zřejmé, že mutace v genu RB1 musí ovlivnit aktivitu Rb-proteinu. Mutantní alela RB1 kóduje inaktivní Rb-protein. *To má za následek neustálou interakci transkripčního faktoru E2F s promotory genů, které kódují enzymy buněčného cyklu, což buňky nutí k permanentnímu vstupu do S-fáze.* Dělení buněk se tím stává neregulované.

Některé viry syntetizují proteiny, které se v infikovaných buňkách vážou přednostně k Rb-proteinu a vytěsňují jej z jeho komplexu s E2F; E2F se pak váže ke svým responzivním místům na promotorech a otevírá permanentně vstup buňky do S-fáze, což vede k neregulované replikaci DNA a dělení buňky. Proteiny s takovým účinkem jsou:

- ◆ E1A (protein adenovirů),
- ◆ E7 (protein lidských papilomavirů),
- ◆ T-antigen viru SV40.

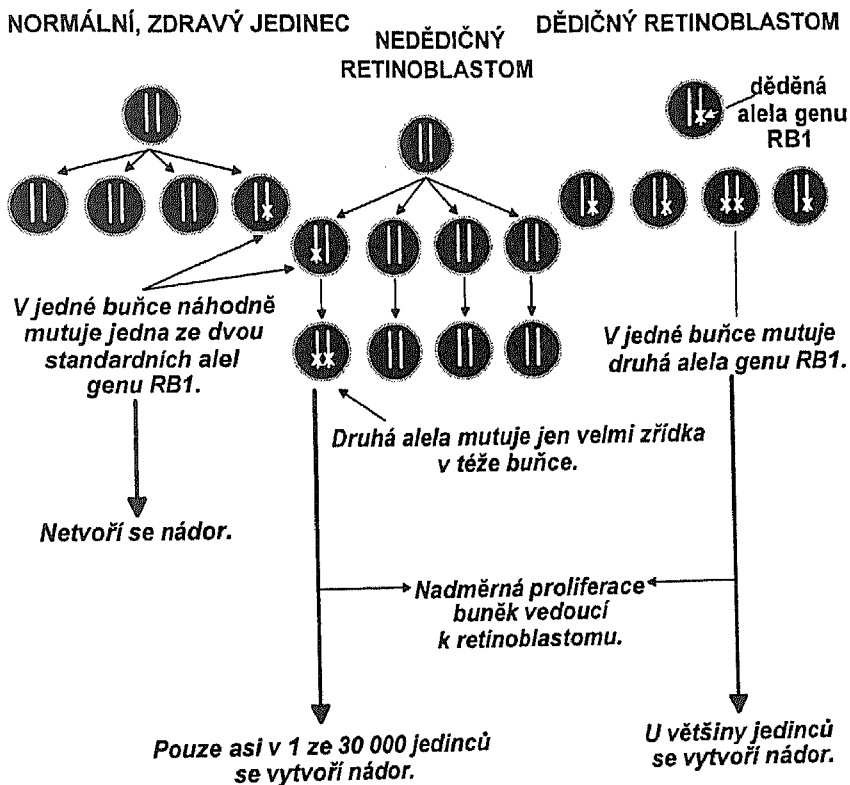
**DĚDIČNÁ A NEDĚDIČNÁ FORMA RETINOBLASTOMU.** Retinoblastom se vyskytuje v dětství a tvoří se z prekursorových nervových buněk v sítnici. Je jím postiženo jedno z 20 000 dětí do čtyř let po narození. Z genetického hlediska existují dvě formy této choroby: **dědičná a nedědičná.**

Dědičná forma retinoblastomu je charakteristická tvorbou nádorů, které se tvoří obvykle nezávisle v obou očích. Při nedědičné formě retinoblastomu se tvoří jeden nádor v jednom oku. Nádor se však vytvoří teprve tehdy, když obě alely genu RB1 téhož chromozomového páru (**chromozom 13**) jsou v tomto genu inaktivovány mutacemi. *To platí pro dědičnou i nedědičnou formu retinoblastomu. Základní rozdíl mezi oběma formami je především v tomto:*

- ◆ U dědičné formy retinoblastomu dědí dítě (samozřejmě prostřednictvím zárodečných buněk) jednu alelu genu RB1, která je inaktivována mutací a druhá je standardní, tedy normálně funkční. Mutací, kterou se inaktivuje nebo deletuje standardní alela genu RB1, se tvoří inaktivní Rb-protein, nebo se vůbec protein genu RB1 netvoří, čímž se ruší přirozený regulátor (inhibitor) vstupu buněk do S-fáze buněčného cyklu. Dělení buněk je pak neregulované a vzniká nádor. Tato druhá mutace, která je somatická, probíhá přibližně v poměru 1: 10<sup>6</sup> buněk sítnice. Výrazným znakem dědičné formy retinoblastomu však je, že *nejen buňky nádorové, ale také všechny nenádorové somatické buňky organismu nesou na chromozomu 13 inaktivní alelu genu RB1 a jí odpovídající standardní alelu.*

- ◆ U nedědičné formy retinoblastomu se mutantní alela genu RB1 nepřenáší prostřednictvím zárodečných buněk. Teprve ve stejné somatické buňce musí vzniknout minimálně dvě somatické mutace inaktivující gen RB1, tj. po jedné mutaci v obou jeho alelách. V tomto případě však *pouze nádorové buňky mají mutaci v obou alelách genu RB1, kdežto všechny nenádorové buňky mají standardní (normální) alely tohoto genu.*





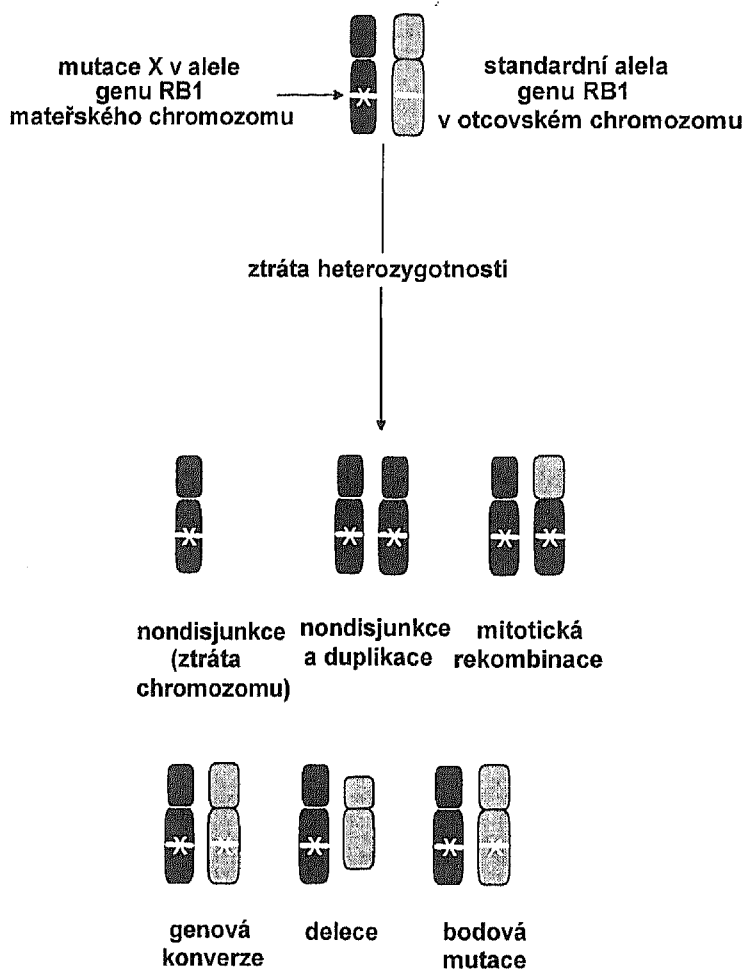
Obr. 529

## Schematické znázornění vzniku retinoblastomu

Možnosti vzniku retinoblastomu a rozdíly mezi jeho dědičnou a nedědičnou formou jsou znázorněny schematicky na obr. 529.

**ZTRÁTA HETEROZYGOTNOSTI.** Druhá (somatická) mutace inaktivující standardní alelu genu RB1 může být bodová nebo typu delece, kterou se ztrácí postranní úseky chromozomu 13 nebo celá alela, případně je tato alela nahrazena druhou alelou genu RB1 (která je také mutantní). Těmito změnami se ztrácí původní kombinace mateřské a otcovské alely genu RB1, což se označuje jako **ztráta heterozygotnosti** (zkr. LOH). Tento jev byl prokázán u 70 % pacientů trpících retinoblastomem. Existuje celkem 6 způsobů, které vedou ke ztrátě heterozygotnosti. Jsou uvedeny schematicky na obr. 530.

V této učebnici se dále popisují z dědičných (familiálních) nádorových onemocnění, jejichž základem jsou mutace v nádorových supresorových genech, jen některé. Jsou to:



Obr. 530  
Šest možných způsobů ztráty heterozygotnosti

- ◆ retinoblastom,
- ◆ kolorektální nádor,
- ◆ melanom typu 1 (základem jeho tvorby je mutace v nádorovém supresorovém genu jen pravděpodobná),
- ◆ nádor prsu a vaječníku,
- ◆ Wilmsův nádor.

Všechny uvedené typy nádorů vznikají i mutacemi v somatických buňkách, které se dědičně nepřenášejí na potomstvo. Celkově se však odhaduje, že 5 - 10 % onemocnění těmito nádory je dědičného charakteru.

### 14.3.3

## Exprese nádorového supresorového genu TP53

**GEN TP53.** Gen TP53 je lokalizován do krátkého ramene chromozomu 17 v oblasti 1 a pruhu 3, tedy do úseku 17p1. Je dlouhý 20kb a sestává z 11 exonů a 10 intronů. Přepisuje se do mRNA dlouhé 2,2 až 2,5 kb a kóduje jaderný protein p53 obsahující 393 aminokyselinových zbytků. Tento protein zastavuje G<sub>1</sub>-fázi buněčného cyklu lidského organismu po účinku ionizujícího záření. Inaktivace tohoto genu delecí nebo bodovou mutací vede k neoplastické transformaci a vzniku nádorů různého typu. Bylo zjištěno asi 51 nádorů různého typu, v nichž byla prokázána mutace genu TP53. Týká se to 70 % kolorektálních nádorů, 50 % plicních nádorů a 40 % nádorů prsu.

Rozmanitost těchto nádorových onemocnění napovídá, že TP53 neurčuje nějaký tkáňově specifický děj, ale má obecnější a širší dosah týkající se regulace buněčného dělení. Vyplývá to i z toho, že mutace v genu TP53 je příčinou **Li-Fraumeniho-syndromu**, kterým trpí asi 100 rodin na světě. Jedinci postižení touto chorobou mají nádory v různých tkáních, tedy nádory různého typu (nádor prsu, mozku, osteosarkom, leukemie). Dispozice k tomuto syndromu se dědí prostřednictvím jedné alely genu TP53, která má bodovou mutaci. Jedinci s touto dispozicí umírají velmi brzy na rakovinu, která propukne po ztrátě heterozygotnosti, tj. delecí druhé alely genu TP53. Ztrátou této alely se gen TP53 inaktivuje.

**BIOLOGICKÁ FUNKCE PROTEINU p53.** Protein p53 je jaderný protein. Nachází se ve všech tkáních a jeho funkce je mnohostranná. Byl obrazně nazván jako "strážce genomu", jelikož chrání DNA před poškozením radiací a chemickými kancerogeny. Této ochrany genomu dosahuje tím, že koordinovaně zastavuje dělení buňky se stimulací oprav DNA a apoptózy.

Na regulaci buněčného cyklu se podílí tím, že prostřednictvím p21 brzdí vstup buňky do G<sub>1</sub>-fáze buněčného cyklu. Bez této zábrany ze strany proteinu p21, jehož produkce je regulována proteinem p53, by se buňky dělily neomezeně a byly by neustále v nádorovém stavu. V tomto směru je funkce proteinu p53 již podrobněji vysvětlena na str. 483 - 485, na které navazujeme v této kapitole.

V normálních buňkách se protein p53 vyskytuje v nízkých koncentracích. V některých buňkách se pravděpodobně vyskytuje v latentní, transkripčně inaktivní formě. Teprve po jeho aktivaci, což bývá poškození DNA rentgenovým zářením nebo UV-zářením nebo jinými faktory, se jeho množství v buňkách silně zvýší. Základem toho je vazba C-terminální domény p53 jednak na krátké sekvenci nukleotidů nezávislé jednořetězcové oblasti DNA (o délce menší než 40 nukleotidů) a jednak na báze, které se chybně spárovaly vlivem krátkých delecí nebo inzercí o délce 1 - 3 nukleotidů. Interakcí C-terminální domény

ny p53 s takto poškozenými úseky na DNA se aktivuje sekvenčně specifická střední doména p53, čímž nabývá aktivity ke stimulaci transkripce genů cílových pro protein p53. Povaha interakce p53 s poškozenými úseky na DNA není zatím jasná. Její důsledek však jasný je. Je to zastavení dělení buněk nebo apoptóza. Která z těchto alternativ se uskuteční, závisí na tom, *ve které fázi buněčného cyklu došlo k poškození DNA*:

- ◆ *Je-li to na začátku G<sub>1</sub>-fáze, pak spouští p53 pochody, kterými je blokován vstup do dalších fází. To pak umožní, že DNA se opraví dříve, než buňka vstoupí do S-fáze.*
- ◆ *Je-li již buňka ve stadiu dělení, pak p53 zapne program apoptózy.*

**MECHANIZMUS EXPRESE GENU TP53 VYVOLANÝ POŠKOZENÍM DNA IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM.** Celý tento poměrně složitý proces rozložíme do několika kroků, abychom pochopili jeho obsah. Jsou to:

1. Ionizující záření způsobuje v DNA zlomy, které vedou ke zvýšení hladiny p53 v buňce. Poškozením DNA, např.  $\gamma$ -zářením nebo jinými stresy, se indukuje aktivace některých proteinkináz, které pak fosforylují p53. Touto fosforylací se p53 aktivuje, stabilizuje a v důsledku toho se zvýší i jeho koncentrace v buňce.

2. Aktivovaný p53 působí pak jako aktivní transkripční faktor těchto genů:

- ◆ Genu kódujícího protein **p21** (str. 483 - 485). Zvýšená koncentrace proteinu p21 zastavuje činnost Cyc.CDK, a tím přispívá k zastavení vstupu buněk do G<sub>1</sub>-fáze buněčného cyklu.
- ◆ Genu kódujícího protein **GADD45**, který brzdí přechod buňky do S-fáze, a to pravděpodobně vazbou na PCNA, což vede k inhibici replikace DNA. (Poznámka: funkce PCNA-proteinu při replikaci DNA je vysvětlena na str. 341).
- ◆ Genu kódujícího protein **MDM2**, který inhibuje aktivitu p53 dvojným způsobem: navozuje jeho rozklad nebo inhibuje přímo jeho transkripční aktivitu. Se vzrůstající koncentrací p53 v buňce se zvyšuje i koncentrace MDM2, a tím i pravděpodobnost inhibice aktivity p53. Jde tedy o zpětnovazebný proces.

3. Aktivovaný transkripční faktor p53 kromě toho, že po poškození DNA ionizujícím ozářením zastavuje dělení buňky v G<sub>1</sub>-fázi buněčného cyklu, může navodit v některých typech buněk apoptózu. Úplná představa navození apoptózy pod vlivem aktivovaného p53 zatím není. Z rodiny apoptotických genů je jen jeden gen, jehož produkt v buňce může být indukován ionizujícím zářením. Je to **gen bax**, jehož produktem je **Bax-protein** urychlující realizaci programu smrti buňky, tedy apoptózu. Tato aktivita je však neutralizována produktem genu **bcl-2**, který působí antiapoptoticky, tj. *zvyšuje pravděpodobnost přežití ozářených (ionizující záření) buněk*. Pravděpodobnost přežití buňky po apoptotickém stimulu pak závisí na poměru proteinu Bcl-2 ku proteinu Bax. Zdá se tedy, že apoptóza inhibuje proces přechodu buněk do nádorového stavu. Když se

aktivací genu *bcl-2* apoptóze zabrání, pak tyto buňky přežijí, aniž by podlely apoptóze. Tyto závěry, ačkoli velmi pravděpodobné, je nutno však ověřit ještě dalšími pokusy.

4. Realizací kroků 1 a 2 (nikoli kroku 3) je vlivem p21 inhibována fosforylace proteinu pRb, takže se vytvoří komplex pRb.E2F. Vytvořením tohoto komplexu je transkripční faktor E2F blokován ve své funkci aktivovat geny, jejichž produkty řídí přechod z  $G_1$ -fáze do S-fáze. (Poznámka: odkazujeme též na str. 481 - 485).

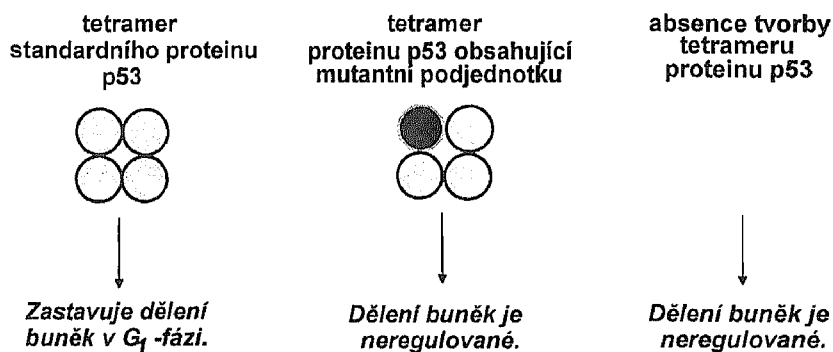
Pochopitelně mutantní p53 takto nefunguje. Jsou-li mutacemi porušeny úseky, kterými se p53 váže k DNA, ztratí tento protein schopnost vazby k DNA. Nemůže se tedy uplatnit jeho normální funkce, tj. *vázat se na jednořetězcové úseky DNA*. Důsledkem toho je, že nedochází k jeho interakci s promotory genů kódujících p21 a GADD45. Nedostatek p21 má pak za následek vstup buňky do  $G_1$ - a S-fáze. K tomu přispívá i to, že se netvoří protein kódovaný genem GADD45, takže se neuskuteční jeho vazba s PCNA-proteinem, čímž se ruší inhibiční účinek GADD45 na replikaci DNA.

**PROTEIN p53 JAKO FUNKČNÍ A NEFUNKČNÍ TETRAMER.** Mutantní protein p53, který je produktem alely s bodovou mutací, může ve stejné buňce vytvořit komplex s proteinem p53, který je produktem alely standardního typu, což vede k inaktivaci funkce p53 bez ztráty heterozygotnosti. V takovém heterozygotu dochází k vytvoření tetrameru sestaveného podjednotkami standardního a mutantního typu. V tetrameru tohoto typu však přítomnost podjednotky mutantního typu mění konformaci proteinu na konformaci, kterou se zabrzdí účinek podjednotek standardního typu a uplatní se účinek podjednotky mutantního typu, což se projeví neregulovaným dělením buněk. Protein p53 je totiž pravděpodobně funkční ve formě tetrameru tvořeného identickými podjednotkami, které jsou kódovány standardní alelou. V podstatě dochází ke třem typům tetrameru (obr. 531):

- ◆ Tetramer sestavený z podjednotek p53 standardního typu, který zastavuje dělení buněk v  $G_1$ -fázi. To je normální situace, kterou se vyznačují homozygoti, jejichž obě alely genu TP53 jsou standardního typu.
- ◆ Tetramer obsahující podjednotku p53 mutantního typu kódovanou mutantní alelou genu TP53. Tetramer tohoto typu je inaktivní, což se projeví neregulovaným růstem buněk. *Mutace, která v heterozygotu dominantně ovlivňuje fenotyp prostřednictvím defektního proteinu brzdícího funkci proteinu kódovaného standardní alelou, se označuje jako negativně dominantní mutace.*
- ◆ Tetramer se vůbec netvoří, což vede též k neregulovanému růstu buněk.

**INAKTIVACE PROTEINU p53.** Probíhá třemi způsoby:

1. **Ztrátou heterozygotnosti.** To se děje bodovou mutací v jedné alele a např. delecí celé druhé alely.



Obr. 531

## Vliv proteinu p53 na dělení buněk

2. Tvorbou komplexů s virovými onkoproteiny. Typickými virovými onkoproteiny v tomto směru jsou velký T-antigen viru SV40, E1B-protein adenovirů, E6-protein papilomaviru aj.

3. **Negativně dominantní mutací.** Produkt mutantní alely genu TP53 inaktivované bodovou mutací může vytvořit s produktem standardní alely podle obr. 531 inaktivní komplex bez ztráty heterozygotnosti.

## 14.3.4

## Nádorové supresorové geny dědičného polypózního a nepolypózního kolorektálního nádoru

**ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA.** Kolorektální nádor vzniká z epitelu tlustého střeva a konečníku. Začíná obvykle **adenomem**. Tento nádor postupně vytváří **adenomatózní polyp**. Předpokládá se, že adenomatózní polypy jsou prekuzory většiny kolorektálních nádorů. Vývoj od polypů k malignímu nádoru zahrnuje období 10 až 35 let. Odstraní-li se polypy chirurgicky u lidí ještě ve věku 50ti let, sníží se následně velmi značně pravděpodobnost vzniku kolorektálního nádoru.

Čím je polyp větší, tím je i větší pravděpodobnost, že bude obsahovat nediferencované buňky (rakovinné buňky), které v pozdějších stádiích metastazují do lymfatických uzlin, jater, plic a jiných tkání.

70 % kolorektálních nádorů má mutace v nádorovém supresorovém genu, který kóduje protein p53, 50 % má bodovou mutaci v kodonu 12 protoonkogenu *Ki-ras*. Několik málo procent připadá na mutace probíhající v jiných protoonkogenech.

**FAMILIÁLNÍ ADENOMATÓZNÍ POLYPOSIS COLI (zkr. FAP).** Vy-

skytuje se při četnosti 1/5 000 až 1/7 500. Vyznačuje se tvorbou několika set až tisíc adenomatózních polypů podél tlustého střeva. Polypy se začínají tvořit mezi čtyřicátým až padesátým rokem věku jedince. Jestliže nejsou odstraněny, přeměňuje se jeden nebo několik polypů v maligní nádor.

Na vzniku FAP se podílejí tyto geny:

**1. APC-gen.** Základem FAP je mutace v genu APC, která se dědí a druhá (somatická) mutace, kterou se inaktivuje standardní alela tohoto genu. Tento gen se označuje jako **nádorový supresorový gen adenomatózní polyposis coli** (zkr. **APC-gen** nebo **gen APC**). Je lokalizován na dlouhém rameni chromozomu 5 (5q21-5q22). Přepisovaná oblast genu měří 8,5 kb a je organizována do 15 exonů. Nejdelší exon je patnáctý a kóduje asi 75 % primární struktury proteinu, který je cytoplazmatický a váže se na katenin.

Jedinci trpící FAP-syndromem mají mutaci v APC ve všech somatických buňkách. Z pacientů s kolorektálním nádorem, kteří nemají FAP-syndrom, má více než 65 % podobné mutace v buňkách nádoru, nikoli však v jiných tkáních.

Mutace jsou v genu APC rozptýleny po exonech 5 až 15, většinou v 6, 9 a 13, především však v exonu 15. Jsou typu inzercí, delecí a bodových mutací. Vlivem inzercí a delecí dochází ke změně čtecího rámce a často též k předčasné tvorbě terminačního kodonu, což vede k syntéze krátkého a chybného APC-proteinu. Bodovými mutacemi se mění nebo ruší smysl kodonů.

Změny v genu APC způsobují též vznik sporadických zhoubných novotvarů, které jsou nedědičného charakteru. Jsou to nádory v tlustém střevě, žaludku, pankreatu a v tenkém střevě. Základní rozdíl mezi těmito nádory a nádory FAP spočívá v tom, že *mutace v genu APC, které jsou základem FAP, jsou (vzhledem k jejich dědičnému charakteru) prokazatelné ve všech buňkách včetně buněk kmenových, zatímco mutace, které zodpovídají za vznik sporadických nádorů jsou somatické a vyskytují se jen v nádorových tkáních.*

**2. DCC-gen.** DCC je zkratkou pro **gen deletovaný v kolorektálním nádoru**. Patří mezi nádorové supresorové geny. Jeho název pochází ze zjištění, že jedna z párových alel tohoto genu je deletována v nádorech a v pozdějších adenomech tlustého střeva. Nachází se v chromozomu 18 (úsek 18q21.1). Jeho velikost je značná, jelikož sestává z 29 exonů. Přepisuje se do mRNA o délce 12 kb, která se překládá do proteinu složeného z 1 447 aminokyselinových zbytků.

Ukazuje se, že některé úseky genu DCC jsou značně konzervativní. Protein, který tento gen kóduje, je membránový a sestává z dlouhé extracelulární části, krátké membránové a krátké intracelulární části. Extracelulární část tvoří 1 100 aminokyselinových zbytků a podobá se proteinům, které patří do rodiny adhezních molekul nervových buněk (zkr. NCAM). Na základě podobnosti s NCAM se předpokládá, že **DCC-protein má důležitou funkci v buněčných kontaktech, kde zodpovídá za buněčnou adhezi**. Buněčné adhezní molekuly (zkr. CAM) zprostředkovávají přenos signálu k diferenciaci buňky.

Ztrátou DCC-proteinu se pravděpodobně (hypotéza) zastavuje přenos signálu k diferenciaci, což nutí buňku do neregulovaného dělení. Genetickým základem toho je ztráta heterozygotnosti v DCC-genu.

Kromě karcinomu tlustého střeva vede ztráta heterozygotnosti v DCC-genu k nádorům žaludku, varlat, plic, pankreatu a vaječníku. Je základem i pro vznik sporadických nádorů podobně jako u ztráty heterozygotnosti v genu APC.

**VÝVOJ FAP.** Odhaduje se, že mutacemi musí být změněno 8 až 10 genů ještě před tím, než z jedné normální epiteliální buňky vznikne rakovinná buňka. Celkový vývoj od normální epiteliální buňky tlustého střeva a konečníku k metastazujícímu nádoru probíhá postupně v těchto etapách:

1. Nejdříve musí proběhnout somatická mutace v APC-genu za ztráty heterozygotnosti. Fenotypově se tato ztráta heterozygotnosti projeví *zvýšením rychlosti dělení buněk střevního epitelu*. Tvoří se **hyperproliferativní epitel**, aniž je tím ovlivněna diferenciaci. V hyperproliferativním epitelu se tvoří **rané adenomy**. Velikost těchto adenomů je menší než 1 cm.

2. O něco později vzniká mutace v jedné alele protoonkogenu *Ki-ras* (str. 830). Vyskytuje se s nízkou četností v malých polypech a častěji v polypech větších. Tyto mutace vedou k narušení diferenciaci. Výsledkem těchto změn jsou **středně pokročilé adenomy** o velikosti větší než 1 cm.

3. Další mutace probíhá v DCC-genu za ztráty jeho heterozygotnosti, což vede k tvorbě **pozdních adenomů**, jejichž velikost je větší než 1 cm.

4. *Teprve však mutace, která vede ke ztrátě heterozygotnosti u genu kódujícího protein p53 v kombinaci s výše zmíněnými, vede ke kolorektálnímu karcinomu.* Další zatím neznámé genové změny vedou k metastazi.

*Mutace v genech APC, ras a DCC mají rozhodující význam asi u většiny kolorektálních nádorů.* Nemusí však probíhat ve stejném pořadí.

**DĚDIČNÝ NEPOLYPÓZNÍ KOLOREKTÁLNÍ NÁDOR (HNPCC).** Zhruba v 15 % případů probíhá vývoj kolorektálního nádoru hned od začátku pod účinkem mutací v jiných genech, než jak bylo uvedeno výše, a tedy *nikoliv v nádorově supresorových genech*. Jsou to mutace v genech

#### **MSH2, MLH1, PMS1 a PMS2.**

*Kromě kolorektálního nádoru zodpovídají tyto mutace za vznik nádoru endometria a nádoru žaludku tím, že inaktivují proces, kterým se opravuje chybné párování bází při replikaci.* Gen MSH2 je homologický s genem, který kóduje v bakteriích protein MutS. Geny MLH1, PMS1 a PMS2 jsou homologické s bakteriálním genem MutH (str. 814).

◆ Gen MSH2 je lokalizován v 2p16. Jeho mutace vede k dědičnému nepolypóznímu kolorektálnímu nádorovému onemocnění typu 1.

◆ Gen MLH1 je lokalizován v 3p21. Jeho mutace vede k dědičnému kolo-



rektálnímu nepolypóznímu nádorovému onemocnění typu 2.

◆ Gen PSM1 je lokalizován v 2q31. Jeho mutace vede k dědičnému kolo-  
rektálnímu nepolypóznímu nádorovému onemocnění typu 3.

◆ Gen PMS2 je lokalizován v 7p22. Jeho mutace vede k dědičnému kolo-  
rektálnímu nepolypóznímu nádorovému onemocnění typu 4.

Všechny uvedené typy nádorových onemocnění jsou kromě kolorektálního  
ho nádoru charakteristické tvorbou nádoru žaludku a endometria.

### 14.3.5

#### Expresse nádorových supresorových genů dědičného Wilmsova nádoru

Je to nádor ledvin, který se týká 8 % dětských nádorů. Vzniká změnami  
ve chromozomové oblasti 11p13, v níž byl dokázán gen **WT1**, který je dvojná-  
sobně defektní u pacientů s Wilmsovým nádorem. **Protein WT1** kódovaný tím-  
to genem obsahuje 4 zinkové prsty a zjevně plní funkci transkripčního faktoru.  
Exprimuje se jen v omezeném počtu tkání, obvykle v embryonálních ledvinách,  
v testes fétu a vaječnicích. Bilaterální nádor se vyskytuje o dva roky dříve než  
sporadický unilaterální, což naznačuje, že Wilmsův nádor je determinován  
mutantní alelou nádorového supresorového genu jako u retinoblastomu, v němž  
bilaterální případy (nádory v obou očích) vznikají v důsledku ztráty heterozy-  
gotnosti genu **RB1**.

Wilmsův nádor je složen z nediferencovaných buněk a vzniká maligní  
transformací ledvinové kmenové buňky, která ztratila schopnost diferenciaci.

### 14.3.6

#### Expresse nádorových supresorových genů dědičného nádoru prsu a vaječníku

Přibližně 5 až 10 % nádorů prsu je dědičného původu. Dvě alely *nádo-  
rového supresorového genu, a to BRCA1 a BRCA2, predisponují jedince k ra-  
kovině prsu a vaječníku.*

**GEN BRCA1.** Nachází se v lokusu 17q21, který se též označuje jako  
**BRCA1**. Zodpovídá za 40 % familiálních případů nádoru prsu a za 80 % fami-  
liálních případů nádorů vaječníku a prsu. Sestává z 21 exonů. Jeho produkt  
obsahuje doménu se zinkovým prstem a má podobnou funkci jako gen **RB1**.

**GEN BRCA2.** Nachází se v lokusu 13q12 - 13. Predisponuje k rakovině  
prsu. Méně rozhodující funkci má při predispozici rakoviny vaječníku.

## 14.4 PŘÍKLADY DALŠÍCH DĚDIČNÝCH NÁDORŮ

### 14.4.1 Geny dědičného melanomu

Kožní maligní melanom je rozšířen po celém světě a jeho četnost se zvyšuje více než u jiných druhů rakoviny. Náchylnost k němu je ovlivňována složením melaninu a faktory prostředí. Avšak 5 až 10 % případů je dědičných. Dědičná forma kožního maligního melanomu je charakteristická výskytem mnohočetných primárních nádorů a tzv. mateřskými znaménky. Vedle dědičné formy onemocnění melanomem, která se začíná obvykle objevovat ve věku 20 až 30 let (příležitostně i v prepubertálním věku) jedince, vyskytuje se též nedědičná forma charakteristická sporadickým výskytem melanomu ve věku 40 až 50 let. Rozlišují se dva typy dědičné formy melanomu:

◆ **Dědičný melanom 1.** Gen (asi nádorový supresorový) určující tuto familiální formu melanomu byl lokalizován na chromozomu 9p21. Označuje se jako **CDKN2A (P16)** a kóduje protein p16, který je příbuzný s proteinem p21, a působí jako inhibitor proteinkinázy závislé (dependentní) na cyklinu.

◆ **Dědičný melanom 2.** Gen pro tuto formu melanomu je umístěn v oblasti 12q13. Kóduje proteinkinázu závislou na cyklinu. Označuje se jako **CDK4**.

Z případů vyznačujících se dědičnými melanomy je asi 50 % výsledkem mutace v genu **CDKN2A** přenášené zárodečnými buňkami.

**Tab. 46**

**Dědičné defekty v opravách DNA způsobující vznik maligních nádorů**

Syndrom	Klinické příznaky	Nádory
<b>Xeroderma pigmentosum</b>	<i>Kůže přecitlivělá ke slunečnímu záření, hojné nádory.</i>	rakovina kůže
<b>Ataxie telangiektázie</b>	<i>Porušení kordinace tělesných pohybů, imunodeficience, náchylnost k neoplázii T-lymfocytů.</i>	lymfomy
<b>Bloomův syndrom</b>	<i>Zpožděný růst, citlivost k slunečnímu záření.</i>	nádory různého typu
<b>Fanconiho anémie</b>	<i>Anémie způsobená ubýváním kostní dřeně.</i>	myeloidní leukemie

### 14.4.2 Dědičnost defektů v opravách DNA

Jelikož vývoj nádoru vyžaduje, aby se nahromadilo více mutací v jedné buňce, lze předpokládat, že budou vznikat též mutace, které se projevují chybami v mechanismech, zahrnutých do oprav poškození DNA nebo mutace projevující se přecitlivělostí k účinkům faktorů poškozujících DNA. Tyto mutace vedou k syndromům, které jsou stručně charakterizovány v tab. 46. Vyskytují se však vzácně.

## 14.5 ONKOGENNÍ VIRY

### 14.5.1 Přehled onkogenních virů

"Onkogenní viry" není taxonomický název pro určitou skupinu virů, ale označení pro ty viry z různých taxonomických skupin, které vyvolávají neoplastickou transformaci nebo jsou jedním z faktorů pozitivně ovlivňujících tento proces.

Zatím bylo zjištěno, že onkogenní jsou zejména tyto viry:

**1. Retroviry, které obsahují ve svém genomu onkogen. Sem patří:**

◆ Mnoho druhů rodu **Savčí viry typu C**, např. *Abelsonův virus myší leukemie (AbMLV)*, *Harweyův virus myšího sarkomu (HaMSV)*, *Kirstenův virus myšího sarkomu (KiMSV)*, *Moloneyův virus myšího sarkomu (MoMSV)*, *Snyder-Theilenův virus sarkomu koček (STFeSV)* aj.

◆ Mnoho druhů rodu **Ptačí viry typu C**, např. *virus Rousova sarkomu (R-SV)*, *virus ptačí leukózy (ALV)*, *virus ptačí myeloblastózy (AMV)* aj.

**2. Retroviry, které neobsahují ve svém genomu onkogen. Sem patří:**

◆ *Virus prsního nádoru myši rodu Savčí viry typu B.*

◆ Všechny druhy rodu **Retroviry BLV-HTLV**, tj. *virus bovinní leukemie (BLV)*, *T-lymfotropní lidský virus 1 (HTLV-1)*, *T-lymfotropní lidský virus 2 (HTLV-2)*, *T-lymfotropní opičí virus (STLV)*.

**3. Hepadnaviry.**

◆ *Virus hepatitidy B (HBV) rodu Orthohepadnavirus.*

**4. Papovaviry.**

◆ Některé druhy rodu **Polyomavirus**, např. *opičí virus 40 (SV40)*.

◆ Některé druhy rodu **Papillomavirus**, např. *lidský virus papilomu (HPV)*.

**5. Herpesviry.**

◆ Patří sem *lidský herpesvirus 4 (HHV-4) neboli virus Epsteina a Barrové (EBV) rodu Lymphocryptovirus* (podčeleď *γ-Herpesvirinae*) a *lidský herpesvirus 8 (HHV-8) rodu Rhadinovirus* (podčeleď *γ-Herpesvirinae*).

**6. Adenoviry.**

V dalších kapitolách se budeme zabývat jen těmi viry, které způsobují prokázaně nebo pravděpodobně rakovinu u lidí. Ostatními viry savců se budeme zabývat jen potud, pokud znalost kancerogeneze, kterou způsobují, přispívá nebo pomáhá vysvětlit proces virové kancerogeneze u člověka. V tom směru jsou především zajímavé retroviry.

### 14.5.2

## Neoplastická transformace uskutečňovaná retroviry

Výsledky výzkumu retrovirů výrazně přispěly k objasnění řady fundamentálních otázek souvisejících s kancerogenezí. Je to především objev onkogenů, který položil základy moderní teorie vzniku rakoviny. Je proto nutné, alespoň v hrubých rysech se seznámit s procesem onkogeneze realizované retroviry.

**TRANSFORMUJÍCÍ RETROVIRY.** Ve vztahu k neoplastické transformaci lze retroviry dělit na dvě skupiny:

**1. Pomalu transformující retroviry.** *Tyto viry neobsahují onkogen a tudíž ho ani nepřenášejí.* Aktivují však k transkripci protoonkogen vedle kterého (nebo do kterého) se integrovaly. Tyto viry indukují nádory u zvířat po dlouhém latentním období.

**2. Akutně transformující retroviry.** *Tyto viry obsahují onkogen, který přenáší a s ním se integrují do genomu hostitelské buňky.* Velmi rychle indukují nádory a účinně transformují buňky v kultuře. Byly izolovány z kuřat, krocana, myši, krys, koček a opic.

**INZERČNÍ AKTIVACE PROTOONKOGENU.** *Pomalu transformující retroviry aktivují protoonkogen způsobem inzerční aktivace spočívající v tom, že DNA těchto virů se v hostiteli začlení vedle protoonkogenu a přepisuje jej ze svého promotoru, který se nachází v provirové sekvenci LTR.* V mnoha nádorech se virus integruje do protoonkogenu *c-myc* mezi jeho exony. Tento protoonkogen sestává ze tří exonů: první představuje dlouhou nepřekládanou vedoucí sekvenci a další dva kódují protein *c-Myc*. Retrovirový genom se může začlenit mezi první a druhý exon (obr. 532). To vede k transkripci druhého a třetího exonu *c-myc*, která je řízena z virového promotoru obsaženého v LTR. *Transkripce c-myc je za těchto podmínek mnohem intenzivnější, neboť promotor v pravé sekvenci LTR je velmi účinný.*

Vysoká hladina proteinu kódovaného aktivovaným protoonkogenem je zřejmě pak příčinou porušení regulace dělení buňky, které se projevuje u postižených zvířat leukemií.

**TRANSDUKCE AKUTNĚ TRANSFORMUJÍCÍMI RETROVIRY.** *Onkogen může být přenesen jako součást genomu retrovirů do hostitelské buňky, ve které se současně s tímto genomem integruje do některého jejího chromozomu.* Tento způsob přenosu onkogenu je analogický procesu transdukce uskutečňované např. fágem  $\lambda$  a označuje se proto jako **transdukce**. Transdukci jsou přenášeny geny prostřednictvím viru z donora na recipienta. Zkráceně řečeno v dono-





5. Výsledkem rekombinace je v tomto případě virový genom:

**LTR - gag - pol - onc - LTR.**

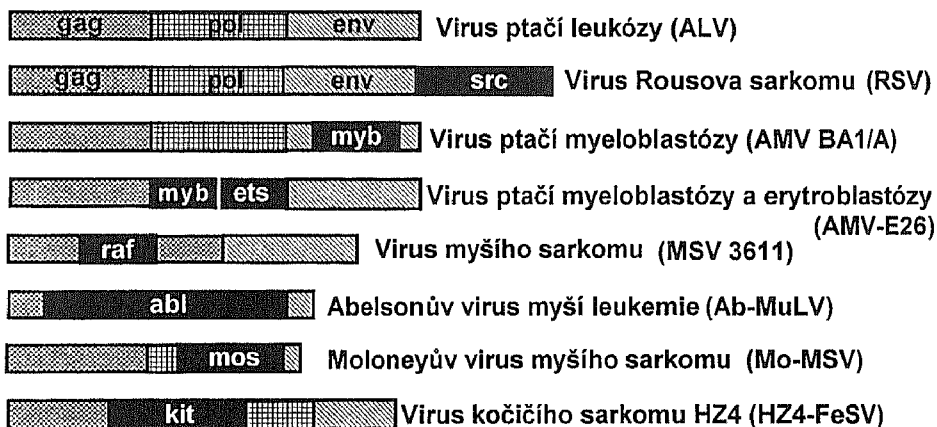
Je samozřejmé, že tento rekombinantní virus je v replikaci v hostitelské buňce defektní. Proto pro jeho reprodukci v hostitelské buňce je nutný nedefektní pomocný virus. *To se týká prakticky všech retrovirů, které získaly nelegitimní rekombinací onkogen.* Výjimkou je virus Rousova sarkomu, který kromě genů *gag, pol, env* má navíc *v-onc*.

6. Protoonkogen *onc* prodělává během replikace viru většinou bodové mutace nebo i delece, kterými se aktivuje v onkogen. Retroviry se vůbec vyznačují vysokou mutabilitou (viz např. virus HIV).

*Onkogeny obsažené v genomu retrovirů se označují symboly v-onc, přičemž za onc se dosazuje specifický symbol, např. v-src, v-abl atd. V tab. 47 jsou uvedeny příklady některých retrovirových onkogenů, které jsou silnými induktory neoplastické transformace.*

Srovnání sekvencí příslušného *v-onc* s jeho homologickým protoonkogenem ukázalo, že *transdukované sekvence bývají poškozené bodovými mutacemi a delecemi a přeměněny tak v aktivované protoonkogeny neboli onkogeny.* Jejich přenos (především retroviry) probíhá u zvířat.

**GENOM A JEHO EXPRESE U VIRŮ RSV A ALV.** Tradičním příkladem akutně transformujících retrovirů je *virus Rousova sarkomu (RSV)*. Obsahuje ve svém genomu onkogen označovaný jako *v-src*. Avšak genomová organizace jiných akutně transformujících virů se v důsledku nelegitimní rekombinace liší od organizace genomu RSV (obr. 534).



*V důsledku nelegitimní rekombinace se genomy retrovirů navzájem liší. Týká se to těch retrovirů, které do genomu pojalý protoonkogen.*

Obr. 534

Příklady odlišností v organizaci genomu různých kmenů retrovirů



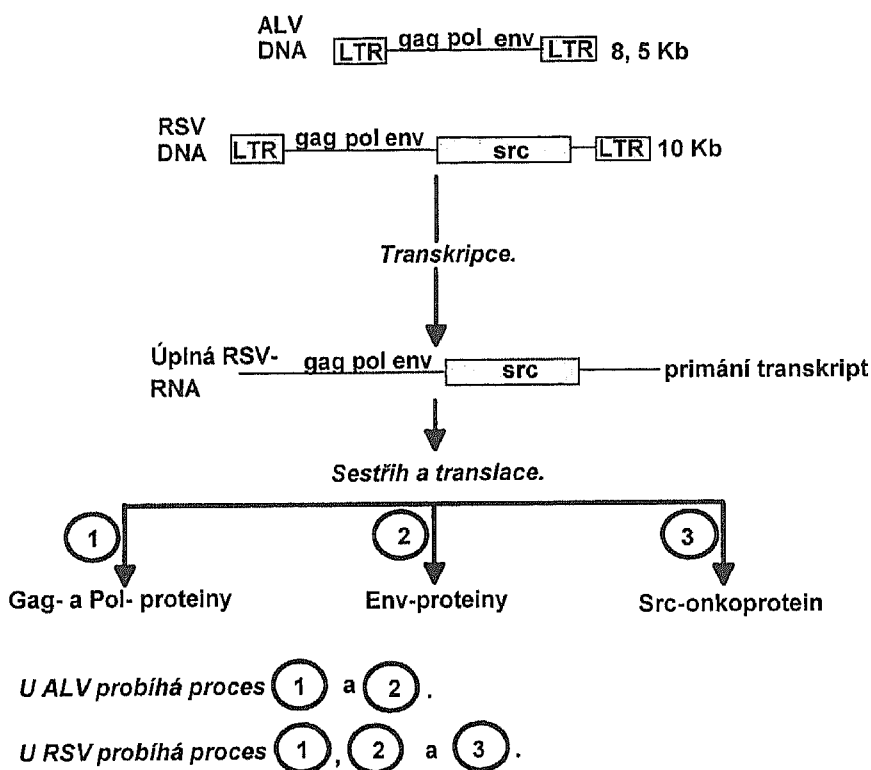
**Tab. 47**  
**Příklady onkogenů přenášených retroviry**

Onkogen	Virus	Nádor	Hostitel
<i>v-abl</i>	Abelsonův virus leukemie Ab-MuLV	leukemie	myš
<i>v-erbB</i>	Virus ptačí erytroblastózy AEV-ES4	erytroblastóza	kuře
<i>v-fms</i>	Virus sarkomu kočky SM-FeSV SSM	sarkom	kočka
<i>v-Ha-ras</i>	Harveyův virus sarkomu krysy HaMSV	sarkom	krysa
<i>v-Ki-ras</i>	Kirstenův virus sarkomu krysy KiMSV	sarkom	krysa
<i>v-jun</i>	Virus ptačího sarkomu S17-ASV	sarkom	kuře
<i>v-myb</i>	Virus ptačí myeloblastózy AMV-BA1/A	myeloblastóza	kuře
<i>v-myb</i>	Virus ptačí myeloblastózy a erytroblastózy AMV-E26	myeloblastóza a erytroblastóza	kuře
<i>v-myc</i>	Virus ptačí myelocytomatózy MCV-29	leukemie	kuře
<i>v-sis</i>	Virus opičího sarkomu SSV	sarkom	opice
<i>v-src</i>	Virus Rousova sarkomu RSV	sarkom	kuře
<i>v-mos</i>	Moloneyův virus myšího sarkomu MoMSV	sarkom	myš
<i>v-kit</i>	Virus kočičího sarkomu HZ4-FeSV	sarkom	kočka

Genom viru RSV je na obr. 535 porovnáván s genomem viru ALV, který je pomalu transformující a nepřenáší tedy onkogen. V genomu RSV je tedy navíc *v-src*. Genom je zde vyjádřen ve stavu proviru, který se celý přepisuje do primárního transkriptu neboli nesestřížené mRNA, která je výchozí molekulou pro posttranskripční úpravy a translaci (str. 717 a obr. 458). Většina běžně studovaných kmenů RSV obsahuje vedle *c-src* všechny geny potřebné pro jejich replikaci. Jsou proto replikace schopné. *Všechny ostatní akutně transformující retroviry jsou v replikaci defektní a musí proto být pomnožovány koinfekcí hostitelské buňky současně s pomocným virem, který obsahuje všechny funkční geny gag, pol a env. Geny pomocného viru pak nahrazují defekt v replikaci akutně transformujícího viru a umožňují tak jeho replikaci.*

*Replikační defekt většiny akutně transformujících virů je důsledkem delece jednoho genu, který byl nahrazen virovým onkogenem. Proto jsou genomy většiny akutně transformujících virů menší než netransformujících. RSV je výjimkou v tomto ohledu; obsahuje větší genom než ALV, neboť v něm nebyly deletovány geny gag, pol a env.*

Všechny tyto viry mají podobnou základní strategii exprese svých onko-



Obr. 535  
Genom viru ALV a RSV

genů, tj. jsou přepisovány z provirové LTR jako část retrovirového genomu. Některé onkogeny, např. *ras*, *fos* a *erbA* se podobně jako *src* vyjadřují jako nezávislé translační produkty *neobsahující kódující sekvence odvozené z virových replikačních genů*. Na rozdíl od toho mnohé jiné onkogeny se vyjadřují jako fúzované proteiny, které obsahují vedle onkogenu kódující sekvence virových replikačních genů; např. sekvence genu *gag* mohou fúzovat s onkogenem. Větší část genu *gag* je u těchto virů deletována a nahrazena sekvencemi onkogenu *abl*, *myc*, *jun*, *erbA* aj. *Některé akutně transformující retroviry obsahují dva odlišné onkogeny, z nichž každý přispívá k indukci vzniku novotvaru.*

### 14.5.3

#### Neoplastická transformace navozená virovými geny

Genom některých DNA-virů obsahuje geny, které kódují specifické virové proteiny narušující v hostitelských buňkách některé dráhy podílející se na regulaci buněčného dělení. V důsledku zásahu těchto proteinů dochází pak ke zvýšené proliferaci buněk (buňky jsou stimulovány ke vstupu do S-fáze buněčného cyklu). *Tyto geny nejsou homologické s žádným genem hostitelské buňky, ani s žádným protoonkogenem.* Virové proteiny, které kódují, však vedou k neoplastické transformaci. *Jejich obecnou vlastností je, že mají schopnost se vázat na proteiny kódované nádorovými supresorovými geny, což pravděpodobně významně přispívá ke kancerogenezi tím, že při tom dochází ke snížení supresivního účinku proteinů kódovaných nádorovými supresorovými geny.*

Těmito vlastnostmi se vyznačují především adenoviry a virus SV40. *Vyvolávají neoplastickou transformaci u zvířat a patří mezi DNA-viry.*

**ADENOVIRY.** Indukují nádory v pokusných zvířatech a transformují savčí tkáňové kultury. Neexistuje důkaz, že by indukovaly nádory u lidí. Transformační aktivita těchto virů je určena dvěma geny: *E1A* a *E1B*. Brzy po infekci buňky dochází k transkripci obou genů a k alternativnímu sestřihu, kterým se vytvoří dva druhy mRNA. Každá z nich je překládána do dvou příbuzných proteinů: *E1A* a *E1B*. *E1A*-protein se lokalizuje v jádře, kde se posttranslačně modifikuje, *E1B*-protein je lokalizován v cytoplazmě. *Oba proteiny kooperují a vedou ke vzniku úplně transformovaných nádorových buněk. E1A-protein je mohutný transaktivátor, který interaguje s transkripčními faktory buňky a zvyšuje účinnost jejich vazby s promotorovými elementy nebo zesilovači transkripce.* Kromě toho vazba *E1A* na *pRb*-protein může modifikovat nebo inaktivovat inhibiční funkce tohoto proteinu. *E1B* se váže na *p53* a může mít podobný účinek. *Těmito účinky na pRb-protein a p53 narušují regulaci vstupu buněk do G<sub>1</sub>- a S-fáze buněčného cyklu a navozují tak neomezené dělení buněk.*

**PAPOVAVIRY, VIRUS SV40.** Virus SV40 syntetizuje brzy po infekci kromě tzv. malého t-antigenu **velký T-antigen**, který se uplatňuje v reprodukci viru a v regulaci jeho genové exprese. Postačuje úplně k vyvolání neoplastické transformace v nepermissivních buňkách. Stimuluje přechod buněk do S-fáze a tvoří komplexy s buněčnými proteiny jako jsou pRb-protein a p53 a *má podobný účinek na dělení buněk jako výše zmíněné proteiny adenovirů.*

#### 14.5.4

### Viry a rakovina lidí

Asi u 20 % lidí nemocných rakovinou je vznik rakoviny vázán na přítomnost virů. Jde především o tyto viry:

- ◆ *virus lymfotropní lidský 1* neboli *virus HTLV-1*,
- ◆ *virus lymfotropní lidský 2* neboli *virus HTLV-2*,
- ◆ *virus hepatitidy B* neboli *virus HBV*,
- ◆ *herpesvirus 4 (HHV-4)* neboli *virus Epsteinova a Barrové* či *virus EBV*,
- ◆ *herpesvirus 8 (HHV-8)*.

Je nutné předem zdůraznit, že ačkoli tyto viry patří mezi retroviry, *nepřenášejí onkogeny, ale neoplasticky transformují své hostitelské buňky vlastními geny, především geny typu transaktivátorů.* To je rozdíl např. proti retrovirům, které onkogeny přenášejí.

#### 14.5.4.1

### T-leukemie dospělých způsobená virem HTLV-1

**T-LYMFOTROFNÍ VIRY LIDSKÉ 1 A 2** neboli **HTLV-1 A HTLV-2.** Budeme se zabývat jen virem HTLV-1 vzhledem k jeho širšímu výskytu a většímu počtu poznatků ve srovnání s virem HTLV-2. Virus HTLV-1 způsobuje **T-lymfom (T-leukemii) dospělých** (zkr. **ATTL**). Pacienti trpící ATTL byli infikováni virem HTLV-1 během porodu nebo kojení. Lze však také předpokládat, že k infekci dochází krevní transfuzí. Po infekci nastává dlouhé latentní období téměř 30 let. Jakmile však choroba propukne, její průběh je pak rychlý (asi do šesti měsíců nastává smrt). *Avšak pouze 1 % infikovaných jedinců onemocní touto zhoubnou chorobou.*

**VÝSKYT VIRU HTLV-1.** Virus HTLV-1 se vyskytuje v jihozápadním Japonsku, v Karibské oblasti a na Středním východě. Způsob jeho přenosu není přesně znám. Do Evropy se virus HTLV-1 dostává prostřednictvím přistěhoval-

ců z endemických oblastí a jeho přenos se děje sexuální cestou z muže na ženu. Výskyt infekce v Evropě je 2 až 13 infikovaných jedinců na 100 000 neinfikovaných.

**EXPRESSE GENOMU HTLV-1 VE VZTAHU K T-LEUKEMII.** Genom viru HTLV-1 kóduje kromě produktů genů *gag*, *pol* a *env* ještě proteiny **p40-tax**, **p27rex** a **p21**, které se tvoří v infikovaných buňkách. Funkční význam proteinu p21 není znám. *Proteiny p40tax a p21rex jsou regulační a mají rozhodující význam v regulaci virové exprese, a tím i možná v mechanismu neoplastické transformace způsobované těmito viry. Protein p40tax transaktivuje jak svoje virové geny, tak i některé buněčné geny. Jsou to především geny kódující IL-2, IL-3, PCNA a také protoonkogeny c-fos a c-sis.*

Protein p40tax immortalizuje T- buňky *in vitro*. Z tohoto hlediska se gen kódující tento protein chová jako onkogen. *Nemá však svůj protějšek tj. protoonkogen a nevzniká z něho aktivací.* Proto se za onkogen nepovažuje.

#### 14.5.4.2

#### Rakovina jater způsobená virem HBV

**HEPATOCELULÁRNÍ KARCINOM.** Virus hepatitidy B (virus HBV) patří k hepadnavirům a způsobuje akutní a chronické infekce, které mohou trvat celý život. *Chronické infekce jsou doprovázeny zcela zřetelně vývojem hepatocelulárního karcinomu. Hepatocelulární karcinom (zkr. HCC) neboli hepatom je jaterní nádor, který je často sdružen s cirhózou. Cirhóza či "ztvrdnutí jater" je jaterní onemocnění charakteristické zmnožením vaziva a uzlovitou přestavbou jaterní tkáně.*

Asi 250 miliónů lidí jsou nosiči viru HBVa dokonce v některých endemických oblastech je až 10 % populace aktivních nosičů tohoto viru. V mnohých oblastech, kde HBV je endemický, jsou jaterní cirhóza a chronická hepatitida hlavními příčinami úmrtnosti.

Hepatocelulární karcinom patří mezi 10 nejčastěji se vyskytujících nádorových onemocnění. Každý rok přibývá značný počet nových případů tohoto onemocnění. V Africe, Číně a jihovýchodní Asii přibývá ročně asi 30 nových případů na 100 000 jedinců, zatímco v západní Evropě je to 5 nových případů za rok. Vyskytuje se častěji u mužů než u žen. Výskyt HCC závisí na věku a dosahuje vrcholu ve věku 30 - 50 let. Všichni pacienti s tímto onemocněním jsou HBsAg-pozitivní. Důkaz příčinného spojení HBV s HCC je přesvědčivý. Nosiči viru mají zvýšené riziko vývoje HCC ve srovnání s neinfikovanými osobami. Asi 80 % případů HCC je sdruženo s infekcí HBV.

**CHRONICKÁ INFEKCE VIREM HBV.** Vznik HCC je spjat s chronickou infekcí virem HBV. Asi 250 000 osob umírá za rok na HCC, u nichž se rozvinula chronická infekce tímto virem. Čím déle trvá chronická infekce, tím je větší pravděpodobnost, že se vytvoří HCC. Kromě toho se HCC nejčastěji vyskytuje v těch zeměpisných oblastech, v nichž je u mnoha osob průběh infekce virem HBV chronický. U osob s chronickou infekcí virem HBV se zvyšuje riziko vzniku HCC až dvěstěnásobně. Prognóza pro mnohé nosiče viru HBV, kteří byli tímto virem infikováni v dospělém věku, je asi taková, že 10 až 25 % jich buď zemře na HCC, nebo na cirhózu, nebo vyžaduje transplantaci jater vlivem rychle postupující nedostatečnosti jater. Je zajímavé, že většina neléčených nosičů viru HBV, kteří byli infikováni v raném věku, neumírá na HCC; s věkem se výskyt HCC u nich snižuje (příčina toho je asi genetická výbava).

**INTEGRACE GENOMU HBV DO GENOMU HOSTITELSKÉ BUŇKY.** Alespoň 80 % nádorů z pacientů pozitivních na antigen HBsAg obsahuje integranty genomu viru HBV v genomu hostitelské buňky. Jako **integrant** se označuje *segment epizomu nebo virového genomu začleněný do chromozomu hostitelské buňky*. DNA viru HBV se začleňuje do více míst genomu hostitelské buňky. Začlenění do jednoho místa je poměrně vzácné. Integrace genomu HBV do genomu hostitelské buňky probíhá buď před začátkem tvorby nádoru, nebo na jeho začátku. Předpokládá se (domněnka), že integranty působí jako inzerční mutageny.

**TRANSKTIKACE PRODUKTU GENU X.** Všechny čtyři promotory viru HBV, včetně promotoru X, jsou v nádorových buňkách aktivovány produktem genu x. Produkt genu x tedy působí jako **transaktivátor**, tj. *aktivuje současně více genů*. Aktivuje též promotor proteinkinázy C a působí proto stimulačně na buněčné dělení. *Brzdí také funkci proteinu p53, což vede k předčasnému vstupu buňky do S-fáze buněčného cyklu*. Inhibice proteinu p53 též způsobuje, že případné poškození DNA nemůže být přesně opraveno.

Transaktivace navozená proteinem x tedy přispívá pozitivně ke vzniku a vývoji hepatocelulárního karcinomu. Není však ještě zcela jisté, zda je příčinou jeho vzniku. Problém molekulární podstaty vzniku hepatocelulárního karcinomu se tedy považuje zatím za otevřený.

### 14.5.4.3

#### Rakovinná onemocnění způsobená virem Epsteinova a Barrové

Virus Epsteinova a Barrové (virus EBV, herpesvirus 4, zkr. HHV 4) je sdru-

žen s řadou nádorových onemocnění, z nichž uvádíme následující čtyři.

**BURKITTŮV LYMFOM** (zkr. **BL**). Je to nádor vzniklý z B-lymfocytů, který začíná v čelistech a postihuje hlavně děti. Vyskytuje se endemicky v Africe v oblastech s malárií. Postihuje za rok ze 100 000 asi 10 dětí. Studie prováděné v Ugandě ukázaly, že asi 70 % případů BL se týká dětí ve věku 5 - 9 let. Výskyt BL v těchto oblastech je ovlivněn teplotou a dešťovými srážkami a s nimi souvisejícím hyperendemickým výskytem malárie. Mimo uvedené endemické oblasti se BL vyskytuje sporadicky při nízké četnosti na celém světě; *tato forma jen sporadicky se vyskytujícího BL je EBV-negativní*. Primární abnormalitou jak u EBV-negativní, tak i EBV-pozitivní formy Burkittova lymfomu je chromozomová translokace, jejímž výsledkem je aktivace protoonkogenu *c-myc* na onkogen vyznačující se zvýšenou expresí. Tento fakt byl základem hypotézy, podle níž EBV je sám o sobě v součinnosti s jinými faktory faktorem působícím jako podmínka a nikoli příčina vzniku BL. Proti tomu však hovoří nedávno zjištěné výsledky prací s některými nádorovými liniemi, které byly z BL odvozeny. Během jejich propagace *in vitro* bylo totiž pozorováno, že virový genom se z některých buněk ztrácí. Izolace EBV-pozitivních a EBV-negativních klonů ze stejné populace buněk ukázala, že s virovým genomem EBV-negativní buňky ztratily svůj maligní potenciál. *Toto zjištění podpořilo hypotézu, podle které virus EBV je původcem BL.*

**HODKINŮV LYMFOM** neboli **HODKINOVA CHOROBA** (zkr. **HD**). Jde o maligní onemocnění lymfatických uzlin, které se projevuje jejich nebolestivým zduřením (často na krku), teplotami, hubnutím a snížením odolnosti. Jde o neobvyklé nádorové onemocnění v tom smyslu, že maligní buňky, tzv. **buňky Reedové a Sternberga** neboli **RS-buňky**, tvoří z celkového počtu buněk nádoru pouze malou část. Jejich původ je nejasný a nelze jednoznačně tvrdit, zda patří k linii T-lymfocytů nebo B-lymfocytů.

HD je mnohem rozšířenější než BL. V západní Evropě a USA se vyskytuje s četností 2 - 4 nemocných na 100 000 osob.

**NAZOFARYNGÁLNÍ KARCINOM** (zkr. **NPC**). Je to maligní epitelový nádor v nosní dutině a je sdružen s infekcí virem EBV. Histologicky se klasifikuje do tří typů:

- ◆ **skvamózní buněčný karcinom (diferencovaný),**
- ◆ **nekeratinizovaný karcinom (částečně diferencovaný),**
- ◆ **slabě diferencovaný nebo nediferencovaný karcinom.**

Výskyt NPC kolísá podle geografického umístění, věku a rasy. Vyskytuje se hlavně (15 - 30 případů na 100 000 obyvatel) v Hong Kongu a jižní Číně. V některých provinciích Číny postihuje především muže, v jiných ženy. Na roz-

díl od BL je NPC chorobou, která postihuje osoby ve věku 50 - 60 let.

Počáteční symptomy NPC jsou velmi často vágní a pacientem nepozorovatelné, dokud nádor nedosáhne pokročilejšího stadia. NPC je rychle rostoucí nádor s tendencí metastazovat do lymfatických uzlin krku a vzdálených míst, jako jsou kosti, játra a plíce. Jelikož nádor je radiosenzitivní, používá se k léčbě radioterapie. Pravděpodobnost přežití 5 let je zhruba 40 %.

Zatím není jasné, zda EBV se uplatňuje při zahájení (počátku) nádoru nebo zda infekce nějaké "kandidátní" nádorové buňky virem pak přináší selektivní výhodu pro růst EBV-pozitivních buněk postupně převládajících během tvorby nádoru.

**KARCINOM ŽALUDKU.** Tento karcinom sdružený s EBV je relativně častý v Japonsku, kde je nejčetnějším druhem rakoviny (asi 95 000 nových případů ročně). Přítomnost viru EBV byla prokázána u 7 % z celkového počtu japonských pacientů, v USA je to 16 % a ve Velké Británii kolem 4 %. Virus se vyskytuje podobně jako u NPC v nediferencovaných karcinomech a je vzácný v diferencovanějších typech. Vyskytuje se též v lymfatických metastatických uzlinách.

**EPIZOMÁLNÍ CHARAKTER GENOMU VIRU EBV.** Jako u ostatních herpesvirů je i genom EBV-viru tvořen lineární dsDNA. Avšak převládající formou tohoto genomu *in vivo* je kružnicová epizomová DNA. Existují důkazy, že ve stejné BL-buňce koexistuje vedle integrované formy DNA viru EBV i její autonomní kružnicová forma. Není však dosud jasné, zda integrovaná forma této DNA je vlastní příčinou maligního nádoru. Je však zcela jisté, že *většina DNA tohoto viru je v nádorových buňkách epizomální.*

**VÝZNAM PROTEINŮ LATENTNÍ FÁZE VIRU EBV PRO IMORTALIZACI BUNĚK BL.** Na rozdíl od ostatních herpesvirů syntetizuje virus EBV během latentní infekce asi devět různých proteinů. Vlivem aktivity těchto proteinů se B-lymfocyty immortalizují, tj. *nabývají schopnosti se neomezeně množit.* Jde především o proteiny označované jako **jaderné antigeny viru Epsteinova a Barrova** neboli **proteiny EBNA1 a EBNA2.** Protein EBNA1 stimuluje replikaci epizomální DNA viru EBV a protein EBNA2 je transaktivátor, který zesiluje expresi genů kódujících CD21 (receptor virionů EBV) a CD23 (receptor růstového faktoru B-lymfocytů). Z dalších proteinů je to **EBNA-LP**, který aktivuje expresi genu kódujícího cyklin D2 a indukuje přechod z G<sub>0</sub>- do G<sub>1</sub>-fáze buněčného cyklu v kooperaci s EBNA2.

Otázka, zda virus EBV je vlastní příčinou uvedených nádorů, není však ještě zodpovězena. Konečný důkaz nepostradatelnosti EBV v nádorových buňkách spočívá v přípravě účinné vakcíny proti němu. Práce na ní pokračuje.



60 let.

entem nepozoro-  
rychle rostoucí  
zdálených míst,  
užívá se k léčbě

očátku) nádoru  
k přináší selek-  
dajících během

3V je relativně  
95 000 nových  
elkového počtu  
n 4 %. Virus se  
ech a je vzácný  
metastatických

ko u ostatních  
řevládající for-  
tují důkazy, že  
viru EBV i její  
grovaná forma  
sté, že *většina*

D IMORTALI-  
virus EBV bě-  
těchto protei-  
ezeně množit.  
u Epsteina a  
muluje replika-  
který zesiluje  
23 (receptor  
P, který akti-  
o G<sub>1</sub>-fáze bu-

řů, není však  
orových buň-  
kračuje.

## 14.5.4.4

## Rakovinná onemocnění způsobená papilomaviry

**ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBOVANÁ PAPILOMAVIRY.** Promoření lidské populace papilomaviry je značné. Též infekce, které způsobují, jsou značně rozšířeny.

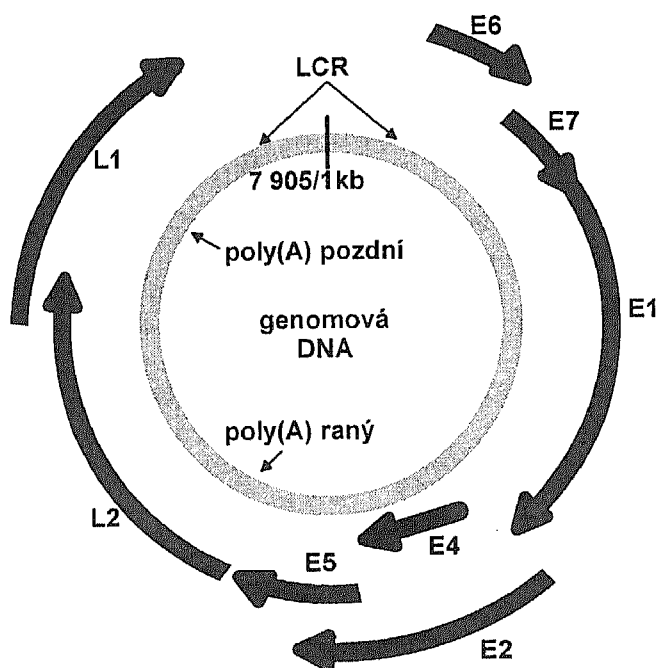
Nejvíce jsou rozšířeny typy papilomavirů, které jsou příčinou bradavic na ruce a nohou. Jinak papilomaviry způsobují tvorbu papilomů. Jako **papilom** se označuje nezhoubný nádor sliznice některých orgánů. Jednotlivé druhy benigního a maligního nádorového onemocnění uvedeme v tomto stručném přehledu:

- ◆ **Plantární (chodidlové) bradavice.** Jednotlivé bradavice především na chodidlech. Jsou benigní.
- ◆ **Obyčejné bradavice.** Nakupení bradavic většinou na ruce. Jsou benigní.
- ◆ **Ploché bradavice.** Nakupení bradavic většinou na rameni, nohou a na obličeji. Jsou benigní.
- ◆ **Laryngální papilom.** Papilom hrtanu většinou u dětí. Je benigní.
- ◆ **Kondylomy.** Jako **kondylom** se označuje *kožní výrůstek podobný bradavici*. Jsou většinou benigní, ale někdy přecházejí na maligní formu.
- ◆ **Karcinom děložního hrdla.** Je to druhé nejčastěji se vyskytující nádorové onemocnění postihující ženské pohlavní orgány. Vyskytuje se u žen obvykle mezi 40 až 55 lety. Výskyt je vyšší mezi ženami z nižších socioekonomických skupin a u žen s častou frekvencí pohlavního styku a střídání partnerů. Je maligní.
- ◆ **Epidermodysplasia verruciformis maligna.** Vzácně se vyskytující onemocnění kůže vyznačující se tvorbou četných bradavic po celém těle. Jsou často maligní.

**LIDSKÉ PAPILOMAVIRY (HPV).** Patří do rodu *Papillomavirus*, ve kterém se dělí na řadu typů označovaných jako HPV s přiřazeným číselným označením typu. O některých typech se zmíníme v souvislosti s popisem příslušného nádorového onemocnění. Morfologie a stavba virionů papilomavirů je stejná jako u polyomavirů. Též genom je podobný. Jako u polyomavirů je tvořen kružnicovou dsDNA o velikosti zhruba 8 kb. DNA se vyskytuje v komplexu s buněčnými histony a tvoří s nimi struktury podobné nukleozomům. Genom lze rozdělit do dvou oblastí (obr. 536):

1. Oblast, kterou tvoří geny kódující **rané proteiny (E-proteiny)**.
2. Oblast, kterou tvoří geny kódující **pozdní proteiny (L-proteiny)**.

**PROTEIN E7.** Protein E7 inhibuje funkci pRb-proteinu. Váže se totiž na



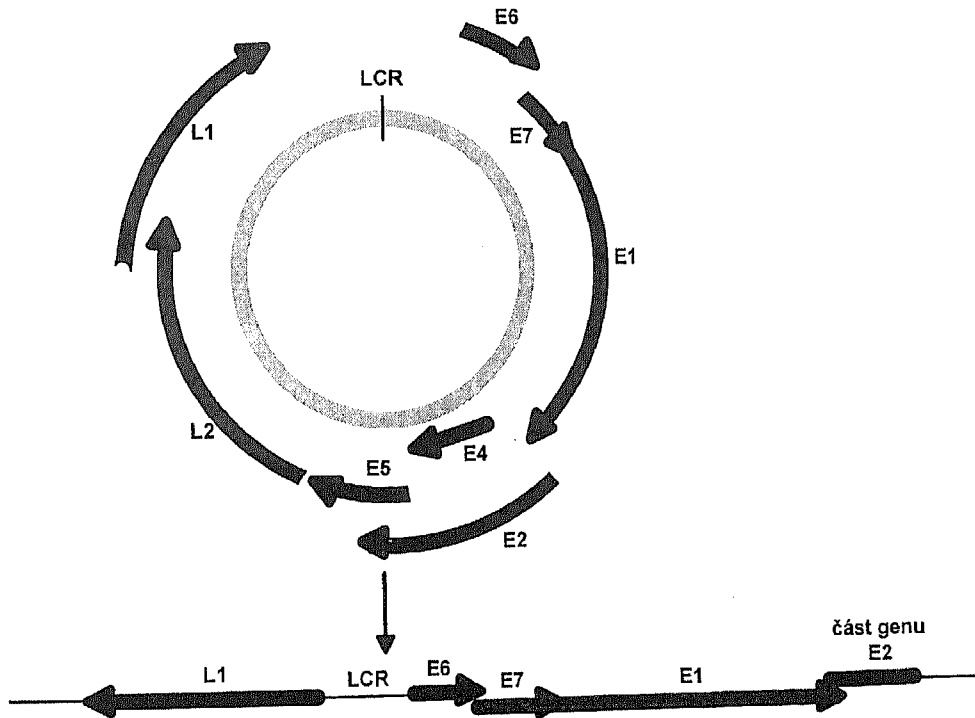
- vnitřní kružnice* = genom (dsDNA)  
*vnější úsečky* = translační produkty  
 LCR = řídicí oblast (promotory, počátek replikace aj.)  
 E1 až E7 = rané proteiny  
 L1, L2 = pozdní proteiny

Obr. 536  
 Mapa genomu papilomaviru HPV-16 a jeho exprese  
 do translačních produktů

nefosforylovaný protein pRb a tím blokuje jeho vazbu na transkripční faktor E2F, který se proto uvolní z komplexu pRB.E2F a může pak aktivovat transkripci genů, jejichž produkty jsou nutné pro vstup buňky do G<sub>1</sub>-fáze buněčného cyklu (obr. 314, str. 484). Proto se uvažuje (hypotéza), že by mohl působit jako onkoprotein. (Poznámka: normální funkce pRb-proteinu jako jednoho z regulátorů buněčného cyklu je vysvětlena na str. 481 - 485).

**PROTEIN E6.** Protein E6 se váže na p53 a inhibuje jeho aktivitu. Normálně p53 indukuje zastavení buněčného cyklu. Avšak za přítomnosti E6 tuto funkci neplní. Buňka tak ztrácí přirozený regulátor svého dělení a dělí se neomezeně. Proto se protein E6 uvažuje (hypotéza) jako jeden z možných onkoproteinů.

**VÝZNAM VIROVÉ INTEGRACE A DEREGULACE GENOVÉ EXPRESE PRO TVORBU NÁDORU.** Dosavadní výsledky vedou k závěru, že na chromozomu hostitelské buňky neexistuje nějaké přednostní místo, které by bylo specifické pro integraci genomu papilomavirů. Genom papilomavirů se integruje do různých míst hostitelského chromozomu. *Vlivem této integrace se pravděpodobně nemění primární struktura genů infikované buňky.* Na druhé straně se však tato integrace vyznačuje specificitou vzhledem k virovému genomu, *jelikož vede k poruše exprese virových genů kódujících proteiny E2 a E1.* Protein E2 totiž působí jako represor transkripce genů kódujících proteiny E6 a E7 (obr. 537). Proto ztráta této funkce vede k deregulaci jejich transkripce. Kromě toho integrací se může deregulovat exprese genů kódujících E6 a E7 také tím, že tyto geny se v důsledku integrace dostanou pod kontrolu promotoru hostitelské buňky v místě integrace.



*Gen kódující E2 je přerušen.  
Tím přestává působit jako represor transkripce genů  
kódujících proteiny E6 a E7.*

Obr. 537  
Účinek integrace genomu papilomavirů do genomu hostitelské buňky

**ZÁVĚR.** Je zřejmé, že onkoproteiny E6 a E7 významně přispívají k vývoji nádorů způsobených papilomaviry, zejména nádoru děložního hrdla, i když pravděpodobně nejsou jedinými faktory ovlivňujícími tento vývoj.

#### 14.5.4.5

### Kaposiho sarkom a lidský herpesvirus 8 (HHV- 8)

**CHARAKTERISTIKA KAPOSIHO SARKOMU.** Kaposiho (čti Kaposi) sarkom (zkr. KS) se projevuje kožními lézemi ve formě nafialovělých papul (pupínky) na kůži, které se šíří po celém těle. V agresivní podobě postupuje do různých orgánů (plíce, lymfatické uzliny, žaludek a střeva). Jsou spory o tom, zda Kaposiho sarkom lze označit jako maligní, jelikož má znaky jak hyperplazie (zvětšení orgánu nebo jeho části v důsledku zvýšení počtu jeho buněk), tak i novotvaru. Vyskytuje se ve čtyřech histologicky identických formách, které se navzájem liší epidemiologicky a prudkostí onemocnění. Jsou to:

- ◆ **Klasický KS.** Vyznačuje se benigními nebo bolestivými nádory často omezenými na končetiny. Jeho výskyt je vzácný. Většinou se vyskytuje u starších mužů italského nebo židovského původu v mediteránní oblasti a v oblasti Středního východu.
- ◆ **Africký či endemický KS.** Vyskytuje se v rovníkové Africe u dospělých, hlavně mužů, ale také u dětí obojího pohlaví. Je mnohem agresivnější než klasický KS, zvláště u dětí, kde zachvacuje lymfatické uzliny a je často smrtelný.
- ◆ **KS spojený s AIDS.** Je to nejlépe popsaná forma KS. Vyznačuje se široce rozsetými kožními lézemi. Postiženy jsou i vnitřní orgány a úmrtnost je značná.

**HERPESVIRUS 8 (HHV-8).** HHV-8 patří do rodu *Rhadinovirus* (podčeleď  $\gamma$ -*Herpesvirinae*). Séroepidemiologická studia vedou k závěru, že s velkou pravděpodobností HHV-8 je příčinou Kaposiho sarkomu. Nebylo sice dosud prokázáno, že je transformující *in vitro*, ale na druhé straně kóduje několik proteinů, které deregulují buněčný cyklus, diferenciaci a inhibují apoptózu, což pravděpodobně přispívá k tvorbě a vývoji nádoru.

# 16

## TERMINOLOGICKÝ REJSTŘÍK K TŘETÍMU DÍLU

### ČESKO-ANGLICKÝ REJSTŘÍK

Rejstřík obsahuje odborné termíny (většinou z oboru molekulární biologie), které byly použity v textu tohoto dílu učebnice. Jsou vysázeny polotučným písmem jako hesla rejstříku. Za termínem ve stejném řádku následují v závorce jeho ekvivalenty v anglickém nebo latinském jazyce. Před každým termínem (heslem) je uvedeno jeho pořadové číslo. Význam tohoto čísla je vysvětlen na str. 893.

V rejstříku jsou termíny seřazeny abecedně podle substantiv (v jednotném čísle, pokud nebylo nutné použít čísla množného). Za každým heslem (termínem) je odkaz jen na stránky (čísla na konci hesla), kde jsou hledané termíny definovány nebo podrobněji vyloženy. Na těchto stránkách jsou většinou polotučně vysázeny. Je-li substantivum specifikováno přívlastkem, pak přívlastek neshodný následuje vždy za substantivem, a teprve po něm přívlastek shodný. Příklad: V literatuře jste našli termín "inzerční aktivace protoonkogenu". V rejstříku u hesla "aktivace protoonkogenu inzerční" najdete odkaz na stránku v textu (str. 855), kde se pojem tímto termínem označený vysvětluje.

Snadno též zjistíte, se kterým termínem je termín, který jste četli v nějakém článku, synonymní. Např. zjistíte, co znamená termín "antionkogen". V rejstříku zjistíte, že tento termín je synonymní s termínem "gen nádorový supresorový". Pod tímto heslem pak naleznete odkaz na str. 839, kde jsou oba termíny definovány a uvedeny jako synonymní.

V odborné literatuře se budete často setkávat se zkratkami termínů. Je zvykem používat anglické zkratky i u českých ekvivalentů anglických termínů. Budete proto chtít vědět, co příslušná zkratka znamená. Např., co znamená zkratka "LOH"? V rejstříku najdete, že "LOH" je zkratkou anglického "loss of heterozygosity", což odpovídá českému vyjádření "ztráta heterozygotnosti". Pod tímto heslem najdete odkaz na str. 843, kde je "ztráta heterozygotnosti" vysvětlena.

Upozorňujeme, že v rejstříku z důvodů abecedního řazení a přehlednosti písemně nejprve substantivum a pak označení (symbol). Např. v textu na str. 846 se píše o "Bax-protein", který se však v rejstříku uvádí jako "protein Bax" atd. Platí pravidlo, že bez ohledu na to, zda symbolické značení v textu je před substantivem nebo za ním, je toto značení v rejstříku uvedeno za substantivem a bez pomlčky. Výjimkou jsou toliko symbolická značení, která tvoří pevné spojení se slovem, např. "T-buněčná leukemie dospělých" atd.

Nakonec je třeba upozornit na to, že zde použité české termíny nejsou vždy přesným překladem termínů anglických. Týká se to obvykle případů, kdy doslovný překlad by v češtině působil nepřirozeně.

#### A

1. AAAF (N-acetoxy-N-acetyl-2-aminofluorene) = N-acetoxy-N-acetyl-2-aminofluoren 760
2. AAF (N-acetyl-2-aminofluorene) = N-acetyl-2-aminofluoren 760
3. acetosyringon (acetosyringone) = 4-acetyl-2,6-dimetoxyphenol 794
4. 4-acetyl-2,6-dimetoxyfenol (4-acetyl-2,6-dimethoxyphenol) 794
5. adenokarcinom (adenocarcinoma) 825
6. adenom (adenoma) 824, 848
7. adenom pozdní (late adenoma) 850
8. adenom raný (early adenoma) 850
9. adenom středně pokročilý (intermediate adenoma) 850
10. Adenoviridae (Adenoviridae) = adenoviry 643
11. adenovirus 2 lidský (human adenovirus 2) 645

12. adenoviry (adenoviruses) 641, 643, 854, 861
13. adukt (adduct) 757
14. aflatoxiny (aflatoxins) 762
15. AIDS (acquired immune deficiency syndrome, acquired immunodeficiency syndrome) = syndrom získaného selhání imunity 701
16. aktivace metabolická (metabolic activation) 731
17. aktivace protoonkogenu inzerční (insertional proto-oncogene activation) 855
18. alkyl-alkan-sulfonát (alkyl-alkane-sulfonate) 754
19. alkylsulfáty (alkyl sulfates) 755
20. analog báze (base analogue) 751
21. anémie Fanconiho (Fanconi's anaemia) 852
22. angelicin (angelicin) 759
23. angiosarkom (angiosarcoma) 825
24. antigen australský (Australian antigen) = antigen viru hepatitidy B povrchový 722
25. antigen HBcAg (HBcAg antigen) = antigen viru hepatitidy B dřeňový 722
26. antigen HBsAg (HBsAg antigen) = antigen viru hepatitidy B povrchový 722
27. antigen HBsAg malý (HBsAg small antigen) 722
28. antigen HBsAg střední (HBsAg middle antigen) 722
29. antigen HBsAg velký (HBsAg large antigen) 722
30. antigen t malý (small t antigen) 643
31. antigen T velký (large T antigen) 643
32. antigen viru hepatitidy B dřeňový (hepatitis B core antigen) 722
33. antigen viru hepatitidy B povrchový (hepatitis B surface antigen) 722
34. antigenom (antigenome) 611
35. antionkogen (antioncogene) = gen nádorový supresorový 839
36. antiterminace (antitermination) 627
37. antiterminátor (antiterminator) 627
38. ARC (AIDS related complex) = komplex s AIDS příbuzný 702
39. Arenaviridae (Arenaviridae) = arenaviry 673
40. arenaviry (arenaviruses) 673
41. arylhydroxylázy (arylhydrocarbon hydroxylases) 761
42. asimilace DNA-řetězců (single-strand assimilation, single-strand uptake) 772
43. ataxie-telangiektázie (ataxia-telangiectasia) 852
44. ATLL (adult T-cell leukaemia /lymphoma) = T-buněčná leukemie dospělých 862
45. Aviadenovirus (Aviadenovirus) 645

## B

46. bakteriofág λ (bacteriophage λ) 619
47. bakteriofág lambda (bacteriophage lambda) = bakteriofág λ 619
48. bakteriofág mírný (temperate bacteriophage) 615
49. bakteriofág MS2 (bacteriophage MS2) 637
50. bakteriofág Mu (bacteriophage Mu) 799
51. bakteriofág Qb (bacteriophage Qb) 637
52. bakteriofág T4 (bacteriophage T4) 616
53. bakteriofág T7 (bacteriophage T7) 617
54. bakteriofág virulentní (virulent bacteriophage) = bakteriální virus virulentní 615
55. bakteriofágy (bacteriophages) = viry bakteriální 610
56. báze pentonová (penton base) 646
57. benzo[a]pyren (benzo[a]pyrene) 760
58. BL (Burkitt's lymphoma) = lymfom Burkittův 865
59. box A (box A) 627
60. box B (box B) 627
61. box C (box C) 627
62. box SOS (SOS box) 816
63. bradavice (verruca, wart) 867
64. 5-bromuracil (5-bromouracil) 751
65. buňka hostitelská (host cell) 610

- 66. buňka lyzogenní (lysogenic cell) 615
- 67. buňky Reedové a Sternberga (Reed-Sternberg cells) 865
- 68. buňky RS (Reed-Sternberg cells) = buňky Reedové a Sternberga 865
- 69. Bunyaviridae (Bunyaviridae) = bunyaviry 673
- 70. bunyaviry (bunyaviruses) 673

## C

- 71. CAH (chronic aggressive hepatitis) = hepatitida agresivní chronická 721
- 72. cirhóza (cirrhosis) 863
- 73. cis-syn (T-T) (cis-syn (T-T)) 769
- 74. cisplatinium (II) diaminodichlorid (cis-platinum (II) diaminodichloride) 757
- 75. CPH (chronic persistent hepatitis) = hepatitida perzistentní chronická 721
- 76. crossing-over (crossing-over) 771
- 77. CTP/CMP fosfotransferáza (CTP/CMP- phosphotransferase) 739

## Č

- 78. částice Daneova (Dane particle) 722
- 79. částice neinfekční kulovité (non-infectious spherical particles) 722
- 80. částice neinfekční vláknité (non-infectious filamentous particles) 722

## D

- 81. Dam-metyláza (Dam-methylase) 815
- 82. dCTP-deamináza (dCTP deaminase) 739
- 83. deaminace (deamination) 736
- 84. deaminace cytozinu hydrolytická (hydrolytic deamination of cytosine) 737
- 85. delece (deletion) 729
- 86. Dependovirus (Dependovirus) 665
- 87. depurinace (depurination) 735
- 88. depyrimidinace (depyrimidination) 735
- 89. diadukt (diadduct) 757
- 90. dialkylnitrozamin (dialkylnitrosamine) 754
- 91. dialkylsulfát (dialkylsulfate) 754
- 92. 4,6-diamino-5-formamidopyrimidin (4,6-diamino-5-formamidopyrimidine) 742
- 93. 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) 742
- 94. dihydrofolát reduktáza (dihydrofolate reductase) 739
- 95. dimer tyminový (thymine dimer) 768
- 96. dimetylnitrozamin (dimethylnitrosamine) 764
- 97. 7,8-diol-9,10-oxid (7,8-diol-9,10-oxide) 762
- 98. DNA-deoxyribosfodiesteráza (DNA deoxyribophosphodiesterase) 812
- 99. DNA fotolyáza (DNA photolyase) = fotolyáza 806
- 100. DNA-glykosylázy (DNA glycosylases) 811
- 101. DNA-polymeráza RNA-dependentní (RNA-dependent DNA polymerase, RNA-directed DNA polymerase, reverse transcriptase) 700
- 102. DNA provirová viru HIV (HIV proviral DNA) 706
- 103. DNA-řetězce paralelní (parallel DNA strands) 772
- 104. DNA-viry (DNA viruses) 610
- 105. DNA-viry rostlinné (plant DNA viruses) 610
- 106. DNA-viry se zpětnou transkriptázou (DNA viruses reverse transcribing) 613
- 107. DNA-viry živočišné (DNA animal viruses) 610
- 108. DNA-viry živočišné se zpětnou transkriptázou (DNA animal viruses reverse transcribing) 720
- 109. doména SH1 (SH1 domain) 836
- 110. doména SH2 (SH2 domain) 836
- 111. dRp-áza (dRpase) = DNA-deoxyribosfodiesteráza 812
- 112. dsDNA-viry (dsDNA viruses) = viry s DNA dvouřetězcovou 613

- 113. dsDNA-viry bakteriální (bacterial dsDNA viruses) = viry bakteriální s DNA dvouřetězcovou 616
- 114. dsDNA-viry živočišné (dsDNA animal viruses) = viry živočišné s DNA dvouřetězcovou 641
- 115. dsRNA-viry (dsRNA viruses) = viry s RNA dvouřetězcovou 613
- 116. dsRNA-viry živočišné (dsRNA animal viruses) = viry živočišné s RNA dvouřetězcovou 668
- 117. dusičnany (nitrates) 764
- 118. dUTP-áza (dUTPase) 739
- 119. dysgerminom (dysgerminoma) 825

## E

- 120. eczema herpeticum (eczema herpeticum) 656
- 121. element autonomní (autonomous element) 801
- 122. element copia (copia element) 802
- 123. element IS (IS element) 798
- 124. element McClintockové (controlling element, control element) 801
- 125. element neautonomní (non-autonomous element) 801
- 126. element P (element P) 800
- 127. element Tn (element Tn) 799
- 128. element Tn3 (element Tn3) 799
- 129. element Tn složený (element Tn composite) 799
- 130. element Ty (element Ty) 802
- 131. encephalitis herpetica (encephalitis herpetica) 657
- 132. endonukleázy AP (endonucleases AP) 811
- 133. enzym RecBCD (enzyme RecBCD) 778
- 134. epidermodysplasia verruciformis (epidermodysplasia verruciformis) 642
- 135. epidermodysplasia verruciformis maligna (epidermodysplasia verruciformis maligna) 867
- 136. epitel hyperproliferativní (hyperproliferated epithelium) 850
- 137. epoxidy (epoxides) 761
- 138. erythema infectiosum (erythema infectiosum) = nemoc pátá 665
- 139. exanthema subitum (exanthema subitum) 657
- 140. excize (excision) 622
- 141. excizionáza (excisionase) 622
- 142. expanze klonální (clonal expansion) 822
- 143. exprese genů fáze pozdní (late gene expression) 617, 624
- 144. exprese genů fáze rané (early gene expression) 616
- 145. exprese genů fáze rané brzké (immediate early gene expression) 624
- 146. exprese genů fáze rané pozdější (delayed early gene expression) 624

## F

- 147. fág mírný (temperate phage) = virus bakteriální mírný 615
- 148. fág virulentní (virulent phage) = virus bakteriální virulentní 615
- 149. fágy (phages) = viry bakteriální (bacterial viruses) 610
- 150. faktor NF-I (factor NF-I) 652
- 151. faktor NF-II (factor NF-II) 652
- 152. faktor transkripční Ets (Ets transcription factor) 836
- 153. FAP (familial adenomatous polyposis coli) = polyposis coli adenomatózní familiální 848
- 154. faryngitida horečnatá akutní (feverish pharyngitis acute) 645
- 155. faryngitida a konjunktivitida s horečkou spojená (pharyngitis and conjunctivitis associated with fever) 645
- 156. fáze AIDS (AIDS phase) = symptomatická fáze viru HIV 702
- 157. fáze infekční pozdní viru HIV (late infectious phase of HIV) 717
- 158. fáze infekční raná viru HIV (early infectious phase of HIV) 716
- 159. fáze latentní (perzistentní) asymptomatická viru HIV (asymptomatic phase of HIV, asymptomatic period of HIV) 701
- 160. fáze lymfadenopatická viru HIV (persistent generalized lymphadenopathy) 702
- 161. fáze symptomatická viru HIV (symptomatic phase of HIV, symptomatic period of HIV) 702
- 162. fáze ve vývoji nádoru latentní (latent phase in tumor development) 822



- 163. **feochromocytom** (pheochromocytoma) 838
- 164. **fibrom** (fibroma) 824
- 165. **fibrosarkom** (fibrosarcoma) 825
- 166. **Filoviridae** (Filoviridae) = filoviry 673, 695
- 167. **filoviry** (filoviruses) 673, 695
- 168. **FMTC** (familial medullary thyroid carcinoma) = karcinom štítné žlázy medulární familiální 837
- 169. **formy bází tautomerní** (tautomeric forms of bases) 732
- 170. **fotolyáza** (photolyase) 806
- 171. **fotoreaktivace** (photoreactivation) 806
- 172. **fotoreaktivace nepřímá** (indirect photoreactivation) 807
- 173. **fotoreaktivace přímá** (direct photoreactivation) 806
- 174. **fotoreaktivace sensitizovaná** (sensitized photoreactivation) 806

## G

- 175. **gastroenteritida** (gastroenteritis) 645, 668
- 176. **gen adenomatózní nádorový supresorový polyposis coli** (tumor-suppressor gene of adenomatous polyposis coli) 849
- 177. **gen APC** (APC gene) = gen adenomatózní nádorový supresorový polyposis coli 849
- 178. **gen bax** (bax gene) 846
- 179. **gen bcl-2** (bcl-2 gene) 846
- 180. **gen BRCA1** (BRCA1 gene) 851
- 181. **gen BRCA2** (BRCA2 gene) 851
- 182. **gen DCC** (DCC gene) = gen v kolorektálním nádoru deletovaný 849
- 183. **gen int** (gene int) 632
- 184. **gen MLH1** (MLH1 gene) 850
- 185. **gen MSH2** (MSH2 gene) 850
- 186. **gen nádorový supresorový** (tumor-suppressor gene) 839
- 187. **gen PMS1** (PMS1 gene) 850
- 188. **gen PMS2** (PMS2 gene) 850
- 189. **gen TP53** (TP53 gene) 845
- 190. **gen upravený** (processed gene) = retrogen 804
- 191. **gen v kolorektálním nádoru deletovaný** (gene deleted in colorectal carcinoma) 849
- 192. **gen WT1** (WT1 gene) 851
- 193. **gen xis** (gene xis) 632
- 194. **genofor virový** (viral genophore) 609
- 195. **genom segmentovaný** (segmented genome) 611, 673, 692
- 196. **genom virový** (viral genome) 609
- 197. **genom viru HIV** (HIV genome, genome of HIV) 706
- 198. **geny melanomu dědičného** (genes of hereditary melanoma) 852
- 199. **geny skupiny druhé** (class II genes) 618
- 200. **geny skupiny první** (class I genes) 618
- 201. **geny skupiny třetí** (class III genes) 618
- 202. **geny SOS** (SOS gene) 816
- 203. **geny viru HIV** (HIV genes) 706
- 204. **geny virulence** (virulence genes) 791
- 205. **gingivostomatitis herpetica** (gingivostomatitis herpetica) 656
- 206. **glutathion-S-transferáza** (glutathione-S-transferase) 765
- 207. **glykoprotein VSG** (VSG-glycoprotein) 800

## H

- 208. **HA** (hemagglutinin) = hemagglutinin 674
- 209. **hantavirus** (Hantavirus) 692
- 210. **HCC** (hepatocellular carcinoma) = karcinom hepatocelulární 825, 863
- 211. **hemagglutinin** (hemagglutinin) 674
- 212. **hemangiom** (hemangioma) 824
- 213. **hepadnaviry** (hepadnaviruses) 854

214. **hepatitida agresivní chronická** (chronic aggressive hepatitis) 721  
 215. **hepatitida perzistentní chronická** (chronic persistent hepatitis) 721  
 216. **hepatom** (hepatoma) = karcinom hepatocelulární 863  
 217. **herpes** (herpes) = opar 655  
 218. **herpes genitální** (herpes genitalis) 655  
 219. **herpes labiální** (herpes labialis) = opar rtu 655  
 220. **herpes simplex** (herpes simplex) = opar prostý 655  
 221. **herpesvirus lidský 1** (human herpesvirus 1) 656  
 222. **herpesvirus lidský 2** (human herpesvirus 2) 656  
 223. **herpesvirus lidský 3** (human herpesvirus 3) 656  
 224. **herpesvirus lidský 4** (human herpesvirus 4) 656  
 225. **herpesvirus lidský 5** (human herpesvirus 5) 656  
 226. **herpesvirus lidský 6** (human herpesvirus 6) 656  
 227. **herpesvirus lidský 7** (human herpesvirus 7) 656  
 228. **herpesvirus lidský 8** (human herpesvirus 8) 656  
 229. **herpes zoster** (herpes zoster) = opar pásový 657  
 230. **Herpesviridae** (Herpesviridae) = herpesviry 655  
 231. **herpesviry** (herpesviruses) 641, 655, 854  
 232. **heteroduplex** (heteroduplex) 775  
 233. **hexon** (hexon) 646  
 234. **HHV-4** (human herpesvirus 4) = herpesvirus lidský 4 862, 656  
 235. **HHV-8** (human herpesvirus 8) = herpesvirus lidský 8 862, 656  
 236. **HMC** (hydroxymethylcytosine) = hydroxymethylcytozin 617  
 237. **HNPCC** (hereditary non polyposis colorectal cancer) = nádor kolorektální nepolypózní dědičný 850  
 238. **HPV** (human papillomaviruses) = papilomaviry lidské 867  
 239. **HTLV-1** (human T-lymphotropic virus type 1) = virus T-lymfotropní typu 1 lidský 862  
 240. **HTLV-2** (human T-lymphotropic virus type 2) = virus T-lymfotropní typu 2 lidský 862  
 241. **hydrogensířičitan** (hydrogen sulfite) 752  
 242. **hydroxylamin** (hydroxylamine) 752  
 243. **hydroxymethylcytozin** (hydroxymethylcytosine) 617  
 244. **hyperplazie C-buněk** (C cell hyperplasia) 838  
 245. **hyperplazie paratyreoidy** (parathyroid hyperplasia) 838

## CH

246. **chemomutagen** (chemical mutagen) 731  
 247. **Chi-struktura** (Chi structure) = Hollidayův spoj 772  
 248. **chondrom** (chondroma) 824  
 249. **chondrosarkom** (chondrosarcoma) 825  
 250. **choroba Hodgkinova** (Hodgkin's disease) = lymfom 825, 865  
 251. **chřipka asijská** (Asian influenza) 683  
 252. **chřipka ruská** (Russian influenza) 683  
 253. **chřipka španělská** (Spanish influenza) 683

## I

254. **ikozaedr** (icosahedron) 609  
 255. **infekce abortivní** (abortive infection) 640  
 256. **infekce akutní** (acute infection) 640  
 257. **infekce latentní** (latent infection) 640  
 258. **infekce lytická** (lytic infection) 613  
 259. **infekce oportunní** (opportunistic infection) 702  
 260. **infekce perzistentní** (persistent infection) 640  
 261. **infekce produktivní** (productive infection) = infekce lytická 613  
 262. **infekce systémová** (systemic infection) 640  
 263. **infekce virem HIV primární** (HIV primary infection) 701  
 264. **influenzavirus A** (influenzavirus A) = virus chřipky A 673  
 265. **influenzavirus B** (influenzavirus B) = virus chřipky B 673

266. **influzavirus C** (influzavirus C) = virus chřipky C 673  
 267. **iniciace v kancerogenezi** (initiation in cancerogenesis) 823  
 268. **iniciátor v kancerogenezi** (initiator in cancerogenesis) 822  
 269. **integráza** (integrase) 622  
 270. **interkalace** (intercalation) 757  
 271. **inzerce** (insertion) 729  
 272. **izomer I<sub>L</sub>** (isomer I<sub>L</sub>) 659, 661  
 273. **izomer I<sub>S</sub>** (isomer I<sub>S</sub>) 659, 661  
 274. **izomer I<sub>SL</sub>** (isomer I<sub>SL</sub>) 659, 661  
 275. **izomer P** (isomer P) 659, 661

**J**

276. **jádro komplexu antiterminačního** (core of antitermination complex) 627  
 277. **jednotka transkripční pozdní** (late transcription unit) 649  
 278. **jednotka transkripční raná** (early transcription unit) 648

**K**

279. **kancerogen** (carcinogen) 731, 822  
 280. **kancerogen genotoxický** (genotoxic carcinogen) 822  
 281. **kancerogen negenotoxický** (nongenotoxic carcinogen) 822  
 282. **kancerogen nejbližší** (proximate carcinogen) 760  
 283. **kancerogen nejzazší** (ultimate carcinogen) 760  
 284. **kancerogeneze** (carcinogenesis) 821  
 285. **kapsid** (capsid) 609  
 286. **kapsomera** (capsomer, capsomere) 646  
 287. **karcinom** (carcinoma) 821, 825  
 288. **karcinom hepatocelulární** (hepatocellular carcinoma) 863  
 289. **karcinom hrdla děložního** (cervical carcinoma) 867  
 290. **karcinom medulární** (medullary carcinoma) 838  
 291. **karcinom nazofaryngální** (nasopharyngeal carcinoma) 865  
 292. **karcinom žaludku** (gastric carcinoma) 866  
 293. **karcinom žlázy štítné medulární familiální** (familial medullary thyroid carcinoma) 837  
 294. **keratoconjunctivitis herpetica** (keratoconjunctivitis herpetica) 656  
 295. **keratokonjunktivitida epidemická** (keratoconjunctivitis) 645  
 296. **kmen M (mateřský)** (maternal M strain) 800  
 297. **kmen P (otcovský)** (paternal P strain) 800  
 298. **kmeny bakterií Su<sup>-</sup>** (bacterial strains Su<sup>-</sup>) = kmeny bakterií supresor negativní 749  
 299. **kmeny bakterií Su<sup>+</sup>** (bacterial strains Su<sup>+</sup>) = kmeny bakterií supresor pozitivní 749  
 300. **kmeny bakterií supresor negativní** (suppressor negative bacterial strains) 749  
 301. **kmeny bakterií supresor pozitivní** (suppressor positive bacterial strains) 749  
 302. **kodon s pozměněným smyslem** (missense codon) 729  
 303. **kointegrát** (cointegrate) 799  
 304. **kolísavost v párování bází** (wobble base-pairing) 735  
 305. **komplex antiterminační stabilní** (stable antitermination complex) 627  
 306. **komplex pTP-C-3'OH** (pTP-C-3'OH complex) 651  
 307. **komplex s AIDS příbuzný** (AIDS related complex) 702  
 308. **konce kohezní** (cohesive ends) 619  
 309. **kondylom** (condyloma) 642  
 310. **konjunktivitida** (conjunctivitis) 645  
 311. **korektura** (proofreading) 814  
 312. **kyselina dusitá** (nitrous acid) 751  
 313. **kyselina ribonukleová genomová negativní dvojího smyslu** (genomic negative and ambisense ribonucleic acid) = kyselina ribonukleová genomová negativní dvojsmyslná 611, 693  
 314. **kyselina ribonukleová genomová negativní dvojsmyslná** (genomic negative and ambisense ribonucleic acid) 611, 693  
 315. **kyselina ribonukleová genomová negativní virová** (viral genomic negative ribonucleic acid,

- genomic negative RNA, genomic (-) sense RNA) 611, 613  
 316. kyselina ribonukleová genomová pozitivní virová (viral genomic positive ribonucleic acid, genomic positive RNA, genomic (+) sense RNA) 611, 613  
 317. kyselina ribonukleová předgenomová (pregenomic ribonucleic acid) 716  
 318. kyselina ribonukleová subgenomová (subgenomic ribonucleic acid) 672  
 319. kyselina ribonukleová transferová supresorová (suppressor transfer ribonucleic acid) 749

## L

320. LAS (persistent generalized lymphadenopathy) = fáze lymfadenopatická viru HIV 702  
 321. látky alkylační (alkylating agents) 753  
 322. látky alkylační dvojfunkční (bifunctional alkylating agents) 755  
 323. látky alkylační jednofunkční (monofunctional alkylating agents) 755  
 324. látky interkalární (intercalating compounds) 757  
 325. leiomyom (leiomyoma) 824  
 326. leiomyosarkom (leiomyosarcoma) 825  
 327. leukemie (leukaemia) 825  
 328. lipom (lipoma) 824  
 329. liposarkom (liposarcoma) 825  
 330. LOH (loss of heterozygosity) = ztráta heterozygotnosti 843  
 331. lymfom (lymphoma) 825  
 332. lymfom Burkittův (Burkitt's lymphoma) 657, 865  
 333. lyzogenie (lysogeny) 615  
 334. lyzogenizace (lysogenization) 615

## M

335. Mastadenovirus (Mastadenovirus) 644  
 336. melanom 1 dědičný (hereditary melanoma 1) 852  
 337. melanom 2 dědičný (hereditary melanoma 2) 852  
 338. melanom maligní (malignant melanoma) 825  
 339. metastaze (metastasis) 821  
 340. metoxyamin (methoxyamine) 753  
 341. metylmetansulfonát (methyl methanesulfonate) 754  
 342. mezera v DNA (gap in deoxyribonucleic acid) 805  
 343. místo AP (AP site) = místo apurinové a apyrimidinové 811  
 344. místo apurinové (apurinic site) 811  
 345. místo apyrimidinové (apyrimidinic site) 811  
 346. místo expresivní (expression site) 800  
 347. místo pro transpozon cílové (target site for transposon) = místo pro transpozon recipientní 795  
 348. místo pro transpozon donorové (donor site for transposon) 795  
 349. místo pro transpozon recipientní (recipient site for transposon) 795  
 350. místo připojovací (attachment site) 624  
 351. model rekombinace Hollidayův (Holliday model of recombination) 772  
 352. molekuly mRNA viru HIV nesestřžené (unspliced mRNA molecules of HIV) 716  
 353. molekuly mRNA viru HIV sestřžené jedenkrát (single-spliced mRNA molecules of HIV) 716  
 354. molekuly mRNA viru HIV sestřžené vícenásobně (multiply-spliced mRNA molecules of HIV) 716  
 355. molekuly paranemicky spojené (paranemic joint of molecules) 783  
 356. molekuly plektonemicky spojené (plectonemic joint of molecules) 783  
 357. monoaddukt (monoadduct) 757  
 358. mononukleóza infekční (infectious mononucleosis) 657  
 359. mRNA  $\alpha$  (mRNA  $\alpha$ ) = mRNA raná 661  
 360. mRNA  $\beta$  (mRNA  $\beta$ ) = mRNA raná pozdější 662  
 361. mRNA  $\gamma$  (mRNA  $\gamma$ ) = mRNA pozdní 662  
 362. mRNA pozdní (late mRNA) 650, 662  
 363. mRNA raná (early mRNA) 650, 661  
 364. mRNA subgenomová (subgenomic mRNA) 672  
 365. mutabilita (mutability) 732

- 366. **mutace** (mutation) 729
- 367. **mutace amber** (amber mutation) 750
- 368. **mutace bodová** (site mutation, point mutation) 743
- 369. **mutace dominantní negativní** (dominant negative mutation) 847
- 370. **mutace indukovaná** (induced mutation) 731, 751
- 371. **mutace nesmyslná**, **mutace beze smyslu** (non-sense mutation) 729
- 372. **mutace ochre** (ochre mutation) 750
- 373. **mutace posunová** (frameshift mutation) 729
- 374. **mutace původní** (forward mutation) 731
- 375. **mutace smysl kodonu měnící** (missense mutation) 729
- 376. **mutace spontánní** (spontaneous mutation) 731
- 377. **mutace supresorová** (suppressor mutation) 743
- 378. **mutace supresorová intergenová** (intergenic suppressor mutation) 744
- 379. **mutace supresorová intragenová** (intragenic suppressor mutation) 743
- 380. **mutace supresorsenzitivní** (suppressor-sensitive mutation) 744, 750
- 381. **mutace škodlivá** (deleterious mutation) 731
- 382. **mutace tichá** (silent mutation) 730
- 383. **mutace zpětná** (back mutation) 731
- 384. **mutagen** (mutagen) 731
- 385. **mutagenese inzercí** (insertional mutagenesis) 828
- 386. **mutagenizace** (mutagenization) 731
- 387. **mutanta** (mutant) 730
- 388. **myelom mnohočetný** (multiple myeloma) 825
- 389. **mykofágy** (mycophages) 610

## N

- 390. **NA** (neuraminidase) = **neuraminidáza** 674
- 391. **N-acetyl-2-aminofluoren** (N-acetyl-2-aminofluorene) 760
- 392. **nádor** (tumor) 821
- 393. **nádor benigní** (benign tumor) = **nádor nezhoubný** 821
- 394. **nádor kolorektální nepolypózní dědičný** (hereditary non polyposis colorectal cancer) 850
- 395. **nádor krčkový** (tumor crown-gall) 789
- 396. **nádor maligní** (malignant tumor) = **nádor zhoubný** 821
- 397. **nádor nezhoubný** (benign tumor) 821
- 398. **nádor prsu a vaječniku dědičný** (familial breast and ovarian carcinomas, familial breast and ovarian cancer) 851
- 399. **nádor Wilmsův** (Wilms' tumor) = **nefroblastom** 825
- 400. **nádor zhoubný** (malignant tumor) 821
- 401. **N-alkyl-N-nitrozaminy** (N-alkyl-N-nitrosamines) 755
- 402. **návrat domů intronový** (intron homing) 804
- 403. **N-(deoxyguanozin-8-yl)-2-aminofluoren** (N-(deoxyguanosine-8-yl)-2-aminofluorene) 760
- 404. **N-(deoxyguanozin-8-yl)-N-acetyl-2-aminofluoren** (N-(deoxyguanosin-8-yl)-N-acetyl-2-aminofluorene) 760
- 405. **nefroblastom** (nephroblastoma) 825
- 406. **nemoc pátá** (fifth disease, erythema infectiosum) 665
- 407. **neoplazie endokrinní mnohočetná typu MEN 2A** (multiple endocrine neoplasia MEN 2A) 838
- 408. **neoplazie endokrinní mnohočetná typu MEN 2B** (multiple endocrine neoplasia MEN 2B) 838
- 409. **neoplazma** (neoplasm) = **novotvar** 821
- 410. **neštovice plané** (varicella) 657
- 411. **neuraminidáza** (neuraminidase) 674
- 412. **neuroblastom** (neuroblastoma) 825
- 413. **N-metyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidin** (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 764
- 414. **N-metyl-N-nitrozomočovina** (N-methyl-N-nitrosourea) 764
- 415. **nopaliny** (nopalines) 790
- 416. **nositel viru HIV asymptomatický** (asymptomatic carrier of HIV virus) 702
- 417. **novotvar** (neoplasm) = **nádor** 821
- 418. **NPC** (nasopharyngeal carcinoma) = **karcinom nazofaryngální** 865

419. nukleokapsid (nucleocapsid) 609

## O

420. obal lipoproteinový (lipoprotein envelope) 609  
 421. odpověď na poškození alkylační adaptivní (adaptive response to alkylation damage) 807  
 422. odpověď SOS (SOS response) 816  
 423. oktopíny (octopines) 790  
 424. O<sup>6</sup>-metylguanin-DNA-metyl-transferáza (O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyl-transferase) 807  
 425. O<sup>6</sup>-MGT I (O<sup>6</sup>-MGT I) = O<sup>6</sup>-metylguanin-DNA-metyl-transferáza 807  
 426. onkogen (oncogene) 827, 831  
 427. onkogen RET (RET oncogene) 837  
 428. onkogeny ras (ras oncogenes) 834  
 429. onkoproteiny (oncoproteins) 827.  
 430. opar (herpes) 655  
 431. opar pásový (herpes zoster) 657  
 432. opar prostý (herpes simplex) 655  
 433. opar rtu (herpes labialis) 655  
 434. opiny (opines) 789  
 435. oprava DNA (DNA repair) 805  
 436. oprava excizní (excision repair, excision of DNA damage) 805  
 437. oprava excizní báze (base excision repair) 810  
 438. oprava excizní nukleotidová (nucleotide excision repair) 812  
 439. oprava mezer v řetězci dceřiném (daughter-strand gap repair) 819  
 440. oprava párování chybného (mismatch repair, repair of mispairing) 814  
 441. oprava páru chybného metylač řízená (methyl-directed mismatch repair) 814  
 442. oprava tolerantní (tolerance of DNA damage) 806  
 443. oprava úplná (reversal of DNA damage) 805  
 444. Orthomyxoviridae (Orthomyxoviridae) = ortomyxoviry 673  
 445. ortomyxoviry (orthomyxoviruses) 673  
 446. osteom (osteoma) 824  
 447. osteosarkom (osteosarcoma) 825  
 448. otitis media (otitis media) 674  
 449. 8-oxodeoxyguanozin, 8-oxodG (8-oxodeoxyguanosine, 8-oxodG) 740

## P

450. Papillomavirus (Papillomavirus) = papilomaviry 642  
 451. papilom (papilloma) 824, 867  
 452. papilom laryngální (laryngeal papilloma) 867  
 453. papilomaviry (papillomaviruses) 642  
 454. papilomaviry lidské (human papillomaviruses) 867  
 455. Papovaviridae (Papovaviridae) = papovaviry 642  
 456. papovaviry (papovaviruses) 641, 642  
 457. Paramyxoviridae (Paramyxoviridae) = paramyxoviry 673  
 458. paramyxoviry (paramyxoviruses) 673, 695  
 459. paraziti intracelulární (intracellular parasites) 609  
 460. párování bází chybné (mismatch base pairing) 732, 805  
 461. párování homologické (homologous pairing) 772, 783  
 462. Parvoviridae (Parvoviridae) = parvoviry 665  
 463. parvovirus b19 (parvovirus b19) 665  
 464. parvoviry (parvoviruses) 665  
 465. páry bází chybné (mismatch base pairs) 732  
 466. páry bází nestabilní (unstable base pairs, unstable base pairs) 732  
 467. penton (penton) 646  
 468. Picornaviridae (Picornaviridae) = pikornaviry 671  
 469. pikornaviry (picornaviruses) 671  
 470. plazmid epizomový (episomal plasmid) 789

- 471. plazmid Ri (Ri plasmid) 791
- 472. plazmid Ti (Ti plasmid) 789
- 473. plazmid Ti typu nopalínového (nopaline Ti plasmid) 790
- 474. plazmid Ti typu oktopinového (octopine Ti plasmid) 790
- 475. plyn hořčičný (nitrogen mustard, mustard gas) 757
- 476. pneumonie atypická primární (primary atypical pneumonia) 674
- 477. pneumonie chřipková (influenzal pneumonia) 674
- 478. Polyomavirus (Polyomavirus) = polyomaviry 642
- 479. polyomaviry (polyomaviruses) 642
- 480. polyp adenomatózní (adenomatous polyp) 848
- 481. polyposis coli adenomatózní familiální (familial adenomatous polyposis coli) 848
- 482. polyprotein (polyprotein) 672
- 483. posun antigenní (antigenic drift) 684
- 484. posun spoje Hollidayova (branch migration) 772, 774
- 485. posun zlomu jednořetězcového (nick translation) 814
- 486. poškození DNA oxidativní (oxidative DNA damage) 739
- 487. poxviry (poxviruses) 642
- 488. produkt-TC (6-4) (TC (6-4) product) 769
- 489. profág (prophage) 615
- 490. prokancerogen (precarcinogen) 732
- 491. promoce v kancerogenezi (promotion in carcinogenesis) 823
- 492. promotor MLP (MLP promoter) = promotor pozdní hlavní 649
- 493. promotor pozdní hlavní (major late promoter) 649
- 494. promotor v kancerogenezi (promoter in carcinogenesis) 823
- 495. promutagen (promutagen) 731
- 496. protein Ada (protein Ada) = O<sup>6</sup>-metylguanin-DNA-metyl-transferáza 807
- 497. protein Bax (protein Bax) 846
- 498. protein Cro (protein Cro) 625
- 499. protein DCC (protein DCC) 849
- 500. protein E2 (protein E2) 869
- 501. protein E6 (protein E6) 868
- 502. protein E7 (protein E7) 867
- 503. protein konceový (terminal protein) 647, 722
- 504. protein L (protein L) 696
- 505. protein M1 (protein M1) = protein matricový 674
- 506. protein M2 (matrix protein) 674
- 507. protein matricový (matrix protein) 674
- 508. protein N (protein N) 625
- 509. protein Nef (Nef protein) 716
- 510. protein NP (protein NP) = protein nukleokapsidový 674
- 511. protein NS1 (protein NS1) 675
- 512. protein NS2 (protein NS2) 674, 675
- 513. protein nukleokapsidový (nucleocapsid protein) 674
- 514. protein NusA (protein NusA) 625
- 515. protein P (protein P) 696, 725
- 516. protein p53 (protein p53) 845
- 517. protein PA (protein PA) 675
- 518. protein PB1 (protein PB1) 675
- 519. protein PB2 (protein PB2) 675
- 520. protein pTP (protein TP) 651
- 521. protein Ras (protein Ras) 831, 834
- 522. protein Rb (protein Rb) = retinoblastomový protein 840
- 523. protein RecA (protein RecA) 776, 778
- 524. protein RecG (protein RecG) 778
- 525. protein Rev (protein Rev) 718
- 526. protein Rus (protein Rus) 778
- 527. protein RuvA (protein RuvA) 778
- 528. protein RuvB (protein RuvB) 778

529. **protein RuvC** (protein RuvC) 778  
 530. **protein RuvG** (protein RuvG)  
 531. **protein Tat** (protein Tat) 718  
 532. **protein TM** (protein TM) = protein koncový 722  
 533. **protein TP** (protein TP) = protein koncový 647, 722, 725  
 534. **protein UvrA** (protein UvrA) 819  
 535. **protein UvrB** (protein UvrB) 819  
 536. **protein UvrC** (protein UvrC) 819  
 537. **protein UvrD** (protein UvrD) 819  
 538. **protein VP1** (protein VP1) 643  
 539. **protein VP2** (protein VP2) 643  
 540. **protein VP3** (protein VP3) 643  
 541. **protein WTI** (protein WTI) 851  
 542. **protein X** (protein X) 725  
 543. **proteiny fáze pozdní** (late proteins) 642  
 544. **proteiny fáze rané brzké** (immediate early proteins) 641  
 545. **proteiny fáze rané pozdější** (early delayed proteins) 642  
 546. **proteiny nestavební** (non-structural proteins) 611  
 547. **proteiny pozdní** (late proteins) 650  
 548. **proteiny rané** (early proteins) 650  
 549. **proteiny stavební** (structural proteins) 610  
 550. **protoonkogen** (cellular oncogene, proto-oncogene) 827  
 551. **protoonkoprotein** (proto-oncoprotein) 827  
 552. **provirus** (provirus) 614  
 553. **přeskok druhý** (second jump) 711  
 554. **přeskok první** (first jump) 711  
 555. **přeskupování segmentů genomových** (reassortment) 683  
 556. **převis** (overhang) 788  
 557. **pseudogen upravený** (processed pseudogene) = retroseudogen 804  
 558. **pseudoreverze** (pseudoreversion) 743  
 559. **psoraleny** (psoralens) 757

## R

560. **rabdoviry** (rhabdoviruses) 673, 695  
 561. **RecA:dsDNA** (RecA:dsDNA) 781  
 562. **RecA:ssDNA** (RecA:ssDNA) 781  
 563. **rekombinace** (recombination) 771  
 564. **rekombinace nelegitimní** (illegitimate recombination) 856  
 565. **rekombinace obecná** (general genetic recombination, homologous recombination) 771  
 566. **rekombinace obecná intergenová** (intergenic general recombination, intergenic homologous recombination) 771  
 567. **rekombinace obecná intragenová** (intragenic general recombination, intragenic homologous recombination) 771  
 568. **rekombinace specifická** (specific recombination) 771  
 569. **rekombinanta** (recombinant) 771  
 570. **rekombináza RecA** (RecA recombinase) = protein RecA 776, 778  
 571. **reoviry** (reoviruses) 668  
 572. **replikon cílový** (target replicon) = replikon recipientní 795  
 573. **replikon donorový** (donor replicon) 795  
 574. **replikon recipientní** (recipient replicon) 795  
 575. **represor bakteriofága lambda imunitní** (immunity repressor of bacteriophage lambda) 615, 633  
 576. **resolváza** (resolvase) = rezolváza 799  
 577. **retinoblastom** (retinoblastoma) 825, 840  
 578. **retinoblastomový protein** (retinoblastoma protein) 840  
 579. **retroelement** (retroelement) 797, 802  
 580. **retroelementy nevirové** (non-viral retroelements) 802  
 581. **retroelementy virové** (viral retroelements) 802



582. **retrogeny** (retrogenes) 804  
 583. **retrony** (retrons) 803  
 584. **retropozice** (retroposition) 796  
 585. **retropozony** (retroposons) 803  
 586. **retropseudogeny** (retropseudogenes) 804  
 587. **retrosekvence** (retrosequences) 803  
 588. **retrotranspozony** (retrotransposons) 802  
 589. **Retroviridae** (Retroviridae) = retroviry 700, 854  
 590. **retroviry** (retroviruses) 700, 854  
 591. **retroviry akutně transformující** (acute transforming retroviruses) 855  
 592. **retroviry pomalu transformující** (slow transforming retroviruses) 855  
 593. **reverze** (reversion) 731  
 594. **reverze operační** (operational reversion) 743  
 595. **reverze pravá** (true reversion) 743  
 596. **rezolváza** (resolvase) 799  
 597. **rhabdomyom** (rhabdomyoma) 824  
 598. **rhabdomyosarkom** (rhabdomyosarkoma) 825  
 599. **Rhabdoviridae** (Rhabdoviridae) = rabdoviry 673, 695  
 600. **Rhadinovirus** (Rhadinovirus) = herpesvirus 8 854  
 601. **RNA antigenomová viru chřipky A** (influenzavirus antigenomic RNA) 682  
 602. **RNA dependentní DNA-polymeráza** (RNA-dependent DNA polymerase, RNA-directed DNA polymerase, reverse transcriptase) 700  
 603. **-RNA genomová dvojího smyslu** (ambisense-RNA) = kyselina ribonukleová genomová negativní dvojsmyslná 611, 693  
 604. **-RNA genomová dvojsmyslná** (ambisense RNA) 611, 693  
 605. **RNA genomová virová negativní** (viral genomic negative ribonucleic acid) 611  
 606. **RNA genomová virová pozitivní** (viral genomic positive ribonucleic acid) 611  
 607. **RNA genomová viru HIV** (genomic RNA of HIV) 705, 706  
 608. **RNA genomová viru chřipky A** (influenzavirus genomic RNA) 682  
 609. **RNA mediátorová viru chřipky A** (influenzavirus mRNA) 682  
 610. **RNA-polymeráza RNA dependentní** (RNA-dependent RNA polymerase, RNA-directed RNA polymerase) 668  
 611. **RNA předgenomová viru HBV** (pregenomic RNA of HBV) 721, 725  
 612. **RNA předgenomová viru HIV** (pregenomic RNA of HIV) 716, 717  
 613. **RNA replikáza** (RNA replicase) = RNA-polymeráza RNA dependentní 668, 672  
 614. **-RNA virová** (viral -RNA) = kyselina ribonukleová genomová negativní virová 611  
 615. **+RNA virová** (viral +RNA) = kyselina ribonukleová genomová pozitivní virová 611  
 616. **RNA-viry** (RNA viruses) 610  
 617. **RNA-viry se zpětnou transkriptázou** (RNA viruses reverse transcribing) 613  
 618. **RNA-viry živočišné se zpětnou transkriptázou** (RNA animal viruses reverse transcribing) 700

## Ř

619. **řetězce DNA paralelní** (parallel DNA strands) 772  
 620. **řetězec l** (l chain, l strand) 648  
 621. **řetězec r** (r chain, r strand) 648

## S

622. **sarkom** (sarcoma) 821, 825  
 623. **sarkom Kaposiho** (Kaposi's sarcoma) 825, 870  
 624. **sekvence Alu** (Alu sequence) 804  
 625. **sekvence tříšložková vedoucí** (tripartite leader sequence) 649  
 626. **seminom** (seminoma) 825  
 627. **smyčka D** (D loop) 781  
 628. **spoj Hollidayův** (Holliday joint, Holliday junction) 772  
 629. **ssDNA-viry** (ssDNA viruses) = viry s DNA jednořetězcovou 613  
 630. **ssDNA-viry živočišné** (ssDNA animal viruses) = viry živočišné s DNA jednořetězcovou 665

631. -ssRNA (-ssRNA) = kyselina ribonukleová genomová negativní virová 611  
 632. +ssRNA (+ssRNA) = kyselina ribonukleová genomová pozitivní virová 611  
 633. -ssRNA-viry (-ssRNA viruses) = viry s ssRNA negativní 613  
 634. +ssRNA-viry (+ssRNA viruses) = viry s ssRNA pozitivní 613  
 635. +ssRNA-viry bakteriální (+ssRNA bacterial viruses) = viry bakteriální s RNA jednořetězcovou pozitivní 637  
 636. -ssRNA-viry živočišné (-ssRNA animal viruses) = viry živočišné s RNA jednořetězcovou negativní 673  
 637. +ssRNA-viry živočišné (+ssRNA animal viruses) = viry živočišné s RNA jednořetězcovou pozitivní 671  
 638. stav integrovaný (integrated state) 789  
 639. stimulace autokrinní (autocrine stimulation) 832  
 640. stomatitis aphantosa (stomatitis aphantosa) 656  
 641. substituce nukleotidová (nucleotide substitution) 729  
 642. substituce nukleotidová konzervativní (conservative nucleotide substitution) 729  
 643. substituce nukleotidová neutrální (neutral nucleotide substitution) 730  
 644. substituce nukleotidová synonymní (synonymous nucleotide substitution) 730  
 645. supresor (suppressor) 744  
 646. supresor amber (amber suppressor) 749  
 647. supresor kodonu s pozměněným smyslem (missense suppressor) 748  
 648. supresor ochre (ochre suppressor) 749  
 649. supresor opal (opal suppressor) 749  
 650. syndrom Bloomův (Bloom's syndrome) 852  
 651. syndrom Li-Fraumeniho (Li-Fraumeni syndrome) 845  
 652. syndrom respirační akutní (acute respiration syndrome) 645  
 653. syndrom získaného selhání imunity (acquired immune deficiency syndrome, acquired immunodeficiency syndrome) 701  
 654. systém P-450 cytochromový (cytochrome P-450-system) 759

## T

655. tachykardie (tachycardia) 674  
 656. T-buněčná leukemie dospělých (adult T-cell leukaemia) 862  
 657. TC (6-4)-produkt (TC (6-4)-product) 769  
 658. T-DNA (T DNA) 789  
 659. tegument (tegument) 658  
 660. teorie kancerogeneze vícezásohová (multi-hit theory of carcinogenesis, multi-stage theory of carcinogenesis) 822  
 661. termináza (terminase) 621  
 662. Togaviridae (Togaviridae) = togaviry 671  
 663. togaviry (togaviruses) 671  
 664. tracheobronchitida (tracheobronchitis) 674  
 665. transaktivátor (transactivator) 651  
 666. transdukce retroviróvá (retroviral transduction) 855  
 667. transformace neoplastická (neoplastic transformation) 821  
 668. transice (transition) 729  
 669. transkripce druhá (second transcription) 682  
 670. transkripce primární (primary transcription) 669  
 671. transkripce první (first transcription) 682  
 672. transkripce sekundární (secondary transcription) 669  
 673. transkripce zpětná (reverse transcription) 711  
 674. transkriptáza reverzní (reverse transcriptase) = DNA-polymeráza RNA-dependentní 700  
 675. transkriptáza zpětná (reverse transcriptase) = DNA-polymeráza RNA-dependentní 700  
 676. transponáza (transposase) 798  
 677. transpozice (transposition) 795  
 678. transpozice intermolekulární (intermolecular transposition) 795  
 679. transpozice intramolekulární (intramolecular transposition) 795  
 680. transpozice konzervativní (conservative transposition) 795

681. transpozice replikativní (replicative transposition) 796  
 682. transpozon (transposon, mobile element, transposable element) 795  
 683. transpozony bakteriální (bacterial transposons) 798  
 684. trans-syn (T-T) (trans-syn (T-T)) 769  
 685. transverze (transversion) 729  
 686. tRNA supresorová (suppressor tRNA) = kyselina ribonukleová transferová supresorová 749  
 687. tumor (tumor) = nádor 821  
 688. tyminglykol (thymine glycol) 767

## U

689. uhlovodíky polycyklické (polycyclic hydrocarbons) 759  
 690. uracil-DNA-glykosyláza (uracil-DNA-glycosylase) 738  
 691. UV-záření (UV radiation, ultraviolet radiation) 768

## V

692. varicella (varicella) = neštovice plané 657  
 693. vazba křížová (cross-link) 766  
 694. vazba křížová meziřetězcová (interstrand cross-link) 756  
 695. vazba křížová vnitřetězcová (intrastrand cross-link) 756  
 696. viremie primární (primary viremia) 640  
 697. viremie sekundární (secondary viremia) 640  
 698. virion (virion) 609  
 699. virion DNA (DNA virion) 610  
 700. virion RNA (RNA virion) 610  
 701. virus (virus) 610  
 702. virus bakteriální mírný (temperate bacterial virus) 615  
 703. virus bakteriální virulentní (virulent bacterial virus) 615  
 704. virus EBV (virus EBV) = virus Epstein a Barrové 854  
 705. virus Epstein a Barrové (Epstein-Barr virus) = herpesvirus 4 854  
 706. virus HBV (virus HBV) = virus hepatitidy B 720  
 707. virus hepatitidy B (HBV virus) 720, 862  
 708. virus herpes simplex 1 (virus herpes simplex 1) = herpes virus lidský 1 656  
 709. virus herpes simplex 2 (virus herpes simplex 2) = herpes virus lidský 2 656  
 710. virus HIV-1 (HIV-1 virus) 701  
 711. virus HIV-2 (HIV-2 virus) 701  
 712. virus Hong Kong (Hong Kong virus, Hong Kong influenza virus) 683  
 713. virus influenzy (chřipky) A (influenzavirus A) 673  
 714. virus influenzy (chřipky) B (influenzavirus B) 673  
 715. virus influenzy (chřipky) C (influenzavirus C) 673  
 716. virus JC (JC virus) 642  
 717. virus opičtí (simian virus) 643  
 718. virus pomocný (helper virus) 860  
 719. virus sarkomu Harveyova myšičho (Harvey murine sarcoma virus) 834  
 720. virus sarkomu Kirstenova myšičho (Kirsten murine sarcoma virus) 834  
 721. virus SV40 (simian virus 40, SV40 virus) 643, 862  
 722. virus T-lymfotropní typu 1 lidský (human T-lymphotropic virus type 1, human T cell leukaemia virus type 1, HTLV-1) 862  
 723. virus T-lymfotropní typu 2 lidský (human T-lymphotropic virus type 2, human T cell leukaemia virus type 2, HTLV-2) 862  
 724. virus varicella zoster (virus varicella zoster) = herpes virus lidský 3 656  
 725. virus VK (VK virus) 642  
 726. viry bakteriální (bacterial viruses, bacteriophages, phages) 610  
 727. viry bakteriální s DNA dvouřetězcovou (double-stranded DNA bacterial viruses, dsDNA bacterial viruses) 615  
 728. viry bakteriální s RNA jednořetězcovou pozitivní (single-stranded positive-sense RNA bacterial viruses, (+) sense ssRNA bacterial viruses) 637

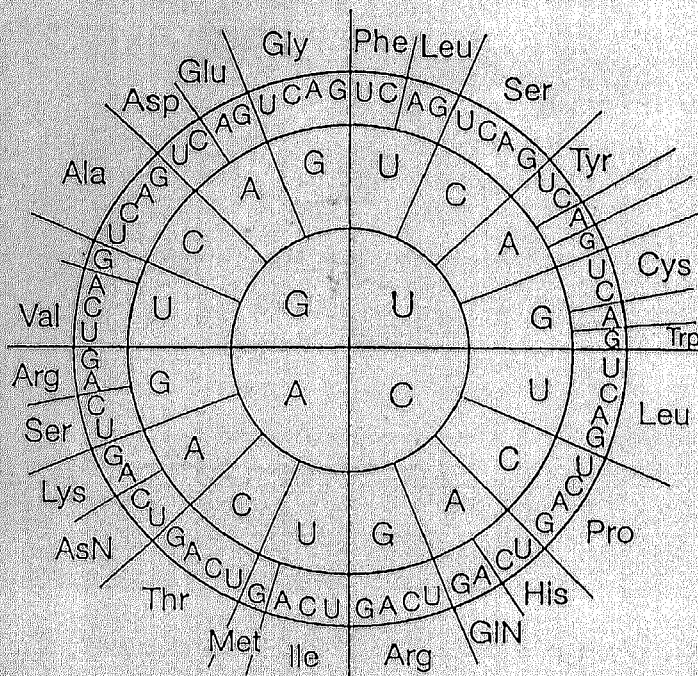
729. viry bezobratlých (invertebrate viruses) 610  
 730. viry člověka (human viruses) 610  
 731. viry eukaryální (eucaryal viruses) 610  
 732. viry obalené (enveloped viruses) 609  
 733. viry obratlovců (vertebrate viruses) 610  
 734. viry rostlinné (plant viruses) 610  
 735. viry s DNA dvouřetězcovou (double-stranded DNA viruses) 613  
 736. viry s DNA jednořetězcovou (single-stranded DNA viruses) 613  
 737. viry s RNA dvouřetězcovou (double-stranded RNA viruses) 613  
 738. viry s RNA negativní (single-stranded negative-sense RNA viruses, (-) sense RNA viruses) 613  
 739. viry s RNA negativní živočišné (negative-sense RNA animal viruses, (-) sense RNA animal viruses) 673  
 740. viry s RNA pozitivní (single-stranded positive-sense RNA viruses, (+) sense RNA viruses) 613  
 741. viry s RNA pozitivní živočišné (positive-sense RNA animal viruses, (+) sense RNA animal viruses) 671  
 742. viry živočišné (animal viruses) 610  
 743. viry živočišné s DNA dvouřetězcovou (double-stranded DNA animal viruses, dsDNA animal viruses) 641  
 744. viry živočišné s DNA jednořetězcovou (single-stranded DNA animal viruses, ssDNA animal viruses) 665  
 745. viry živočišné s RNA dvouřetězcovou (double-stranded RNA animal viruses, dsRNA animal viruses) 668  
 746. viry živočišné s RNA jednořetězcovou negativní (single-stranded negative-sense RNA animal viruses, (-) sense ssRNA animal viruses) 673  
 747. viry živočišné s RNA jednořetězcovou pozitivní (single-stranded positive-sense RNA animal viruses, (+) sense ssRNA animal viruses) 671  
 748. viry živočišné s RNA negativní nsegmentovanou (unsegmented negative-sense ssRNA animal viruses, unsegmented (-) sense ssRNA animal viruses) 673, 695  
 749. viry živočišné s RNA negativní segmentovanou (segmented negative-sense ssRNA animal viruses, segmented (-) sense ssRNA animal viruses) 673  
 750. viry živočišné s RNA negativní segmentovanou dvojsmyslnou (segmented negative ambisense ssRNA animal viruses) 673, 692  
 751. výměna DNA-řetězců (DNA strand exchange) 772

## X

752. xeroderma pigmentosum (xeroderma pigmentosum) 852

## Z

753. zánět hltanu akutní (acute feverish pharyngitis) = faryngitida horečná akutní 645  
 754. zánět průdušnice a průdušek (tracheobronchitis) = tracheobronchitida 674  
 755. zánět spojivek očních a rohovky akutní (acute conjunctivitis and keratoconjunctivitis) 645  
 756. zánět středního ucha (otitis media) = otitis media 674  
 757. záření ionizující (ionizing radiation) 766  
 758. zlom (break) 805  
 759. zlom a znovuspojení (breakage and reunion) 771  
 760. zlom dvouřetězcový (double-stranded break) 805  
 761. zlom jednořetězcový (single-stranded break) 805  
 762. zlomy dvouřetězcové posunuté (double-stranded staggered cuts) 805  
 763. zlomy zarovnané (unstaggered cuts) 805  
 764. zrušení Hollidayova spoje (resolution of the Holliday junction) 775  
 765. zrušení chi-struktury (resolution of the chi structure) = zrušení Hollidayova spoje 775  
 766. ztráta heterozygotnosti (loss of heterozygosity) 843  
 767. zvrát antigenní (antigenic shift) 683



**ÚVOD  
DO  
MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE  
Třetí díl**

**(Molekulární biologie virů, mutagenese, kancerogeneze a rekombinace)**

**Třetí inovované vydání, 2000**

Sazba a ilustrace provedeny autorem v editoru Ami Pro 3.0

**Autor a vydavatel**

Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc.

Vodova 80, 612 00 Brno

Tel.: 05-49 24 66 17

**Tisk**

GRAFEX, Těchov 152, 678 01 Blansko

**ISBN 80-902562-2-8**

**Doporučená cena**

200 Kč