

# ROZLUŠTĚNÝ LIDSKÝ GENOM – A CO DÁL

Jaroslav Masopust

**26. červen 2000** byl význačný den: v Bílém domě ve Washingtonu bylo slavnostně oznámeno, že už je konečně v hrubých rysech známo základní složení lidského genomu, což je právem považováno za jeden z největších milníků pokroku ve vývoji lidstva. Tehdejší americký prezident Bil Clinton to komentoval slovy: „*Začínáme se učit jazyku, kterým Bůh stvořil život*“.

Na slavnostním shromáždění byl také přítomen *James Watson* - jeden z dvojice (Crick a Watson), která rozpoznala už v roce 1953, jak vypadá struktura deoxyribonukleové kyseliny, v které jsou důmyslně seřazeny slabiky nukleotidových bazí v kombinaci 4 písmen A (adenin), T (thymin), C (cytosin) a G (guanin), popisující stránky obrovské knihovny, v které je napsáno co, kdy a jak mají buňky našeho těla dělat. Tato knihovna, obsahující 3 miliardy ( $3 \times 10^9$ ) slov tj. nukleotidů, poskytujících celkem 30 000 – 35 000 ( $3$  až  $3,5 \times 10^3$ ) příkazů tj. genů a vytvářející velmi tenký (0,34 nm), ale téměř 2 m dlouhý pásek DNA, je stěsnána do buněčného jádra, zhruba kulovitého tvaru o průměru 5 – 8  $\mu\text{m}$ . (Pro srovnání je to jako tenisový míček, do něhož je vtěsnáno 20 km velmi tenké nitě). Většina buněk obsahuje ještě malinkou příruční knihovničku, umístěnou v mitochondriích jako mitochondriální DNA (mtDNA); obsahuje jen 16 568 párů bazí (bp), což je 10 000krát méně než jich je v jádře. Obrazně řečeno: známe prakticky celý text lidského genomu tj. řadu tří miliard písmen, což představuje 750 megabytů digitální informace, která by přibližně vyplnila knihovnu o 4 000 knih běžného formátu; 1 gen by přitom zaplnil v průměru 5 stran, 1 lidský chromosom by byl vepsán do 200 svazků, při tom by se celá informace o jedinci vešla na 1 DVD-disk; ale kdybychom chtěli celou knihovnu nahlas předčítat, potřebovali bychom k tomu celý lidský život.

Knihovna i knihovnička ale fungují jako čítárna; žádný svazek si z ní nelze odnést, ale uložené údaje, které jsou podrobnou instrukcí, jak vyrobit nástroj pro určitou funkci buňky, je možno pouze opsat respektive přepsat (říká se tomu *transkripce*) do podoby informace, která je přenesena (říká se tomu *translace*) na určité buněčné organely v buňce (drsné endoplasmatické retikulum), kde se podle přenesené instrukce vytváří specifický protein jako nástroj provádění určité buněčné funkce. Souhrn informací pro vykonávání životních pochodů v buněčném jádře – **genom** – má tedy svého výkonného partnera v obrovském komplexu buněčných proteinů (odhaduje se jich na 500 000), který dostal název **proteom**.

Genetické informace v „DNA knihovně“ nejsou k dispozici každému. Použití instrukce pro tvorbu určitého proteinu vyžaduje nabuzení určitého genu (úseku DNA) specifickým požadavkem přineseným ze vzdálených buněk organismu (kupř. hormonem), ze sousedních buněk (kupř. cytokiny) anebo z vlastní buňky. Příkaz (signál) převezme buď příslušný receptor na povrchu buněčné membrány anebo uvnitř buňky. Tím je zahájena jakási „tichá pošta“, kterou se signál přenáší, někdy velmi složitou cestou přes řadu mezičlánků (*signální transdukce*), až dorazí k poslednímu článku – k *transkripčnímu faktoru*. Ten jej předá na příslušné místo (určitý úsek DNA - promotor), jenž je součástí genu, který má být aktivován (*exprese genu*). Následuje přepsání genetické informace do vytvářeného nového řetězce nukleové kyseliny. Místo deoxyribosy obsahuje ribosu a nazývá se proto ribonukleová kyselina, respektive informační RNA (*iRNA*); od DNA se ještě liší tím, že místo thyminu (T) obsahuje v řetězci nukleotidových bazí uracil (U). Takto je připravena instrukce (*iRNA*), která po přenesení do cytoplasmy – do drsného endoplasmatického retikula, řídí na zvláštních organelách – *ribosomech* tvorbu polypeptidového řetězce. Sled jednotlivých aminokyselin je určen trojicí (triplet) bazí poskládanou z A, U, C, G. Toto třípísmenkové uspořádání určující druh aminokyseliny (vybírání se z 20 resp. 21) se nazývá kodon. Tak vzniká na polyribosomu, jako v továrně na běžícím pásu, kde se na každém jednom místě přikládá jedna aminokyselina

za druhou, primární struktura vznikajícího proteinu; mohli bychom jej přirovnat k polotovaru nebo neopracovanému výrobku – nástroji, který potřebuje buňka ke své každodenní činnosti. Konečnou formu dostává protein na dalším místě, v hladkém endoplasmatickém retikulu, především v cisternách Golgiho aparátu. Zde se na polypeptidový základ napojují účinkem specifických glykosidických enzymů oligosacharidové postranní řetězce, dochází k poskládání molekuly (šroubovice, skládaný list apod.) tvorbou disulfidických a vodíkových můstků, a tím k tvarování (konformaci) do sekundární a terciární struktury. Převědeme-li to do terminologie vyráběného nástroje, pak hrubý výrobek dostává účelný „design“, úpravu k uchopení (držák), popřípadě je upraven do většího balení ve stejném nebo poněkud pozměněném provedení (kvartérní struktura). Všechny tyto úpravy navazující na primární polypeptidový řetězec se nazývají *posttranslační děje*. Umožňují vytvářet varianty stejných proteinů – isoformy, s poněkud odlišnými vlastnostmi a funkcí, takže genetická instrukce obsažená v 30 000 – 35 000 genech může vytvořit až 500 000 různých proteinů; pravidlo „jeden gen – jeden protein“, platí jen asi u 2 % proteinů (genů). Tak jako každý kvalitní výrobek než je expedován, musí být podroben kontrole kvality a poškozené a nedokonalé výrobky jsou zničeny, tak obdobný proces probíhá i v cisternách Golgiho aparátu. Chybná konformace proteinu je rozpoznána a takovýto protein je zadržen interakcí s *chaperonem*; nedojde-li k nápravě, je transportován do lyzosomů a degradován.

Kupř. molekula imunoglobulinu, která se skládá ze 4 polypeptidových řetězců (2 těžké a 2 lehké), syntetizovaných odděleně, je takto formována až v endoplasmatickém retikulu. Neúplná molekula není z cisteren propuštěna, pokud nedojde k narušení této funkce při nadměrné a neuspořádané produkci monoklonálních imunoglobulinů (choroba těžkého řetězce, Bence-Jonesova proteinurie u maligní paraproteinemie).

Někdy může být tento kontrolní mechanismus pro organismus neúčinný. U cystické fibrózy vzniká mutovaný transmembránový protein chloridového kanálu. Určité mutace nemají sice vliv na funkci proteinu (jeho aktivitu), ale pozměněná konformace molekuly nedovolí, aby se protein dostal na vlastní místo určení tj. do plasmatické membrány, ale je degradován v lyzosomech a na buněčné membráně chybí jeho funkce.

Proteiny určené k sekreci jsou v *trans*-segmentu Golgiho sítě modifikovány na svém povrchu tak (acidifikace → zvýšený obsah  $\text{Ca}^{2+}$ ), že dochází k jejich agregaci a zabalení a tím až k 200násobnému zahuštění při sekreci. Transport proteinů v buňce je tedy perfektně organizován, že se mu nevyrovná žádný dopravní systém. V buňkách existuje neustálý proud vezikul, které se odlučují z *trans*-sítě Golgiho aparátu a fúzí s plasmatickou membránou; to je základní *dráha exocytózy*, která dodává nově vytvořené lipidy a proteiny do plasmatické membrány; je také drahou zodpovědnou za růst plasmatické membrány před dělením; tímto způsobem cestují také bílkoviny určené k *sekreci*. Vedle *základní dráhy exocytózy*, která funguje nepřetržitě, existuje také *dráha regulované exocytózy*, a to především v buňkách sekrečních, které produkují speciální látky jako kupř. hormony nebo trávicí enzymy, umístěné v sekrečních váčcích.

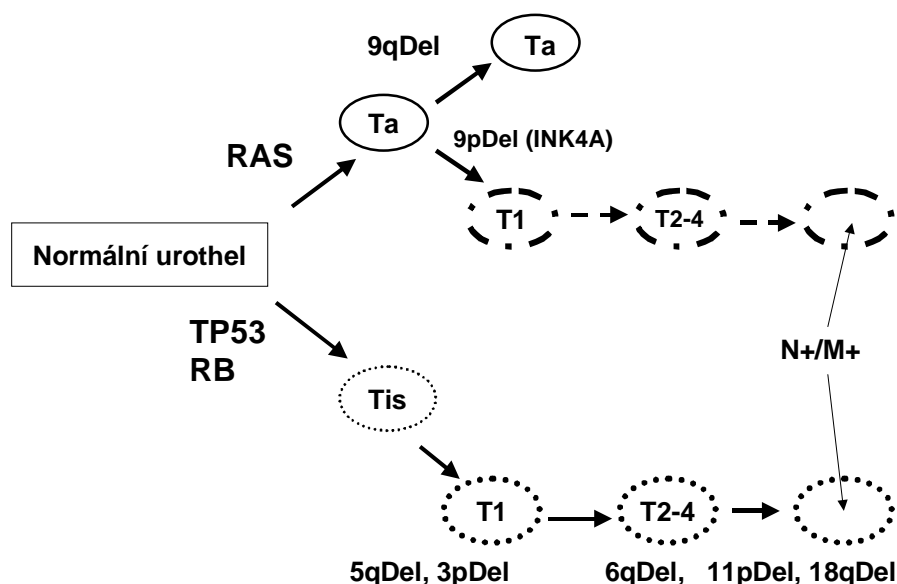
Vyšetřování *genomu* v nejširším slova smyslu se nazývá **genomika**; od toho byly odvozeny další termíny: **transkriptomika** tj. technika studia RNA a způsobu transkripce tedy souboru faktorů označovaných jako *transkriptom*; pomocí iRNA pro určitou bílkovinu lze také identifikovat příslušnou sekvenci komplementární DNA (cDNA), která bílkovinu kóduje.

**Proteomika** je pak metodika identifikace jednotlivých proteinů a jejich variant pozměněných posttranslačně a kódovaných genomem; soubor všech proteinů v organismu je *proteom*. Další termín *metabolom* zahrnuje všechny substráty, intermediáty a konečné produkty metabolismu; technologie jeho studia je **metabolomika**. Nejnověji se objevil termín *kininom*, což je soubor všech proteinkinás, vyskytujících se v signálních drahách buněk (Bylo jich dosud identifikováno kolem 2000 různých typů, podtypů a variant). Objevují se i další termíny jako **operomika**, která používá technologie genomiky, transkriptomiky i proteomiky při molekulové analýze tkání od DNA přes RNA k proteinu. Obrovské množství údajů, které tyto technologie poskytují je nutno zpracovávat a uchovávat pomocí nejnovější počítačové a informační techniky - **bioinformatiky**.

Z toho co bylo řečeno, vyplývá, že „rozluštěný lidský genom“ znamená „pouze“ určení sledu jednotlivých nukleotidových bazí v řetězci lidské DNA; takže stručně řečeno. Člověk tedy dosáhl první, sice velmi důležité mety, jakéhosi základního tábora, odkud se začíná rýsovat velmi dlouhá obtížná cesta k poznání tajemství života. To je ta *postgenomová éra*. Co nám přinese? Doufejme, lépe řečeno, snažme se, aby to bylo jen to dobré.

Jednou z technik, která přechází z výzkumu do praktické laboratorní praxe, s přímým klinickým využitím je *technologie DNA-mikročipů*. Tato metodika, zakládající se na detekci velkého množství genů a jejich mutací objevených v různých jednotlivých nádorech pomocí genových sond umístěných v malinkých terčících (mikročipy) na ploše destičky, umožňuje rozpoznat přítomnost alterovaných genů ve vzorku vyšetřovaného tumoru. Pomocí vybraných cDNA těchto genů lze připravit biomarkery, jimiž lze rychle a spolehlivě rozlišit podskupiny pacientů s různým histopatologickým a klinickým projevem. Výrazně se tím zlepšila diferenciální diagnostika, určení prognózy, nastavení a monitorování optimální terapie. Příkladem může být *vyšetřování pacientů s karcinomem močového měchýře* z přechodných buněk (urothel-karcinom). Asi 75 % pacientů má povrchový nádor kategorie (TIS, Ta a T1), 20 % proniká do svaloviny (T2 – T4) a 5 % metastazuje už v době diagnózy. Asi 20 % superficiálních tumorů je léčitelných odstraněním nádoru transuretrální cestou, s následnou adjuvantní intravezikální chemoterapií a bez známek reziduální choroby po dobu nejméně 5 let; u 50 – 70 % se objeví reziduální choroba ale bez progresu, u 10 – 20 % progresu nastává a končí letálně; nádor pronikající do svaloviny měchýře nutno léčit cystektomií, systémovou chemoterapií nebo radioterapií. Asi 50 % těchto pacientů má pozdější metastázy. Je proto nutné tyto prognostické podskupiny rozpoznat hned na počátku. Vyšetření určité skupiny biomarkerů pomocí DNA-mikročipů to umožňuje. Vývoj urothel-karcinomu probíhá dvěma směry, podle alterace RAS (superficiální tumory), s následnou delecí 9q (příznivý vývoj) nebo delecí 9p (méně příznivý až nepříznivý vývoj této formy), anebo alterace TP53 a RB (infiltrující tumor) s následnou delecí 5q, 3p, 6q, 11p a 18q (méně příznivá až špatná prognóza).

**Obr.: Genetické alterace (biomarkery) u dvou hlavních směrů vývoje urothelkarcinomu močového měchýře**



Úspěchy v objasnění skladby lidského genomu stejně jako genomu jiných organismů nastartovaly praktické využití těchto poznatků a slogan "*Genomické léky kráčí ke klinice*" se stává realitou. Tak společnost *Human Genome Science* ohlásila, že dostala povolení od FDA začít s fází I klinického testování léku *LymphoRad-131*, což je sloučenina obsahující radioisotop jodu ( $^{131}\text{I}$ ), navržená pro léčení maligního myelomu. Terapeutický účinek je založen na specifické vazebné aktivitě stimulatoru B-lymfocytů (BlyS), který se váže pouze na B-buňky a tumorové B-buňky. Tím je docíleno, že ničící radiace zasáhne pouze B-buňky a v největší míře nádorové, kterých je mnohonásobná převaha. Důležité je, že BlyS se neváže na receptor normálních preB-buněk, které tedy nepodléhají apoptóze a mohou dále diferencovat na aktivní B-lymfocyty. .

*BlyS* má však též vztah jednak k autoimunitním chorobám jako je revmatoidní artritida, lupus erythematodes, jednak k různým imunodeficientním stavům (kupř. IgA deficiencie). Jeho podávání stimuluje B-buňky k větší produkci protilátek; naopak monoklonální protilátka namířená specificky proti BlyS může imunitní systém ovlivnit tak, že tlumí nadprodukcii autoprotilátek u pacientů s lupusem; v klinickém testování je přípravek *LymphoStat-B*.

Jinou klíčovou molekulou, která se vyskytuje na povrchové membráně maligně transformovaných buněk řady solidních tumorů je *TRAIL-1 receptor*. Tento receptor, který patří do velké rodiny receptorů tumor-nekrotizujících faktorů (TNF-R), obsahuje tzv. smrtící doménu. Léčebné podávání samotného faktoru TRAIL jako ligandu pro tento receptor, se ukázalo neúčinné; jednak pro krátkou životnost TRAIL v cirkulaci, jednak proto, že je také vyvazován "decoy" receptory (DcR1, DcR2 a osteoprotegerin). Ideální by bylo, kdyby humanizovaná monoklonální protilátka proti TRAIL a TNF receptorům, které navozují buněčnou smrt ale též proliferaci, se vázala pouze na buňky tumorové a kdyby přenášený signál podpořil jen apoptózu nikoliv rozvoj. Bylo testováno téměř 100 000 klonů buněk s hledanou protilátkovou aktivitou a byl vybrán jeden, který tvoří protilátku napodobující žádaný efekt TRAIL.

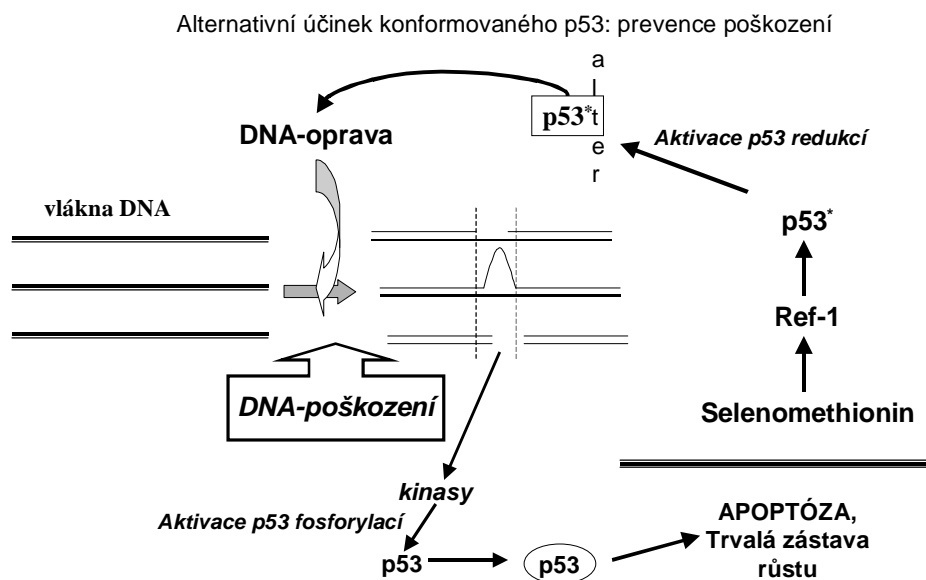
*Repifermin* - keratinocytový růstový faktor-2, náležející do velké rodiny fibroblastových růstových faktorů stimuluje proliferaci, diferenciaci a migraci epitelových buněk, je v klinické fázi II při testování terapeutického účinku na hojení epitelových defektů (chronické bérkové vředy), vředová choroba tlustého střeva nebo zánět sliznic provázející terapii maligních nádorů transplantací kostní dřeně.

*Lp-PLA2-inhibitor* je nízkomolekulovým inhibitorem fosfolipasy A2 sdružené s lipoproteiny; tato fosfolipasa se účastní tvorby aterosklerotických plátů. Pomocí genové technologie byl vyroben čistý enzym, vůči němuž bylo vyzkoušeno několik tisíc substancí s inhibiční aktivitou. Na konec byla vybrána sloučenina s pracovním označením *SB-435495*, která se testuje na inhibiční účinek vůči Lp-PLA2 in vivo.

Preparát firmy Millenium Pharmaceuticals Inc. a Abbott Laboratories pod označením *MLN4760* je nízkomolekulový inhibitor, který potlačuje enzymovou aktivitu specifické karboxypeptidasy a brání tak rozvoji obezity navozované dietou a podporuje zvýšení citlivosti na insulin.

Protein p53 je další možnou cílovou molekulou, jejíž ovlivnění může přispět kupř. k terapii nádorových onemocnění. Protein p53 je klíčovou molekulou zasahující do regulace cyklu buněčného dělení; umožňuje pozdržení průběhu cyklu, než je opravena případná chyba v řetězci DNA vzniklá mutací. Jeho hlavním úkolem je udržení stability genomu (strážce genomu). Pozměněný p53 v důsledku mutace jeho genu, zvyšuje riziko vzniku řady maligních nádorů (přeměna adenomu tlustého střeva na adenokarcinom nebo přeměna folikulárního karcinomu štítné žlázy na velmi zhoubný anaplastický karcinom). Je proto snaha ovlivnit nepříznivý efekt mutovaného p53 nebo usměrnit a potencovat jeho protinádorový mechanismus podáváním sloučenin selenu, jako je selenomethionin. Selen v této kombinaci prostřednictvím faktoru Ref-1 navodí konformační změny v molekule proteinu p53 (redukci

cysteinu v pozici 275 a 277), která pak nepůsobí jako normální p53, nedošlo-li k opravě, přechodnou zástavu postupu cyklu při poškození DNA a následnou apoptózu postižené buňky, ale iniciuje rychlé navození DNA-opravného mechanismu, které už nevyžaduje pozastavení cyklu ani indukci apoptózy.



Klasický způsob účinku p53 při poškození DNA

Alzheimerova choroba, strašák seniorů, je neurodegenerativní onemocnění při němž dochází k postupné likvidaci nervových buněk a jejich spojů neurotoxickým účinkem uloženin z agregovaného amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ). Ve zkoušení je speciální vakcína, která se zakládá na myší monoklonální protilátce namířené proti epitopu na malé doméně mezi 6. a 10. aminokyselinou ( $A\beta_{6-10}$ ). Monoklonální protilátka se váže na fibrilogenní fragmenty  $A\beta$  a inhibuje tak toxický účinek protofibrilárních agregátů; kromě toho pravděpodobně ještě rozrušuje už vytvořené agregáty a tím usnadňuje jejich vyplavování z mozku.. Inhibice fibrilogeneze tímto způsobem neprovokuje zánětlivou reakci a vakcína nenapadá normální monomerní fragmenty  $A\beta_{1-40}$ , které jsou potřebné pro normální fyziologii nervového systému. Dalším místem příčiny řady chorob a chorobných stavů jsou *mitochondrie* – hlavní producent metabolické energie buněk. Mitochondrie mají svoji vlastní mitochondriální DNA (mtDNA), která se replikuje nezávisle na jaderné DNA. Dědičné poruchy jsou přenášeny matkou. Hrají také klíčovou úlohu při programované smrti buněk - apoptóze. Fungují totiž jako „rozbuška pro kaspasovou bombu“, jejímž enzymovým účinkem dojde k postupnému roztržení (fragmentaci) život podmiňujících komponent buňky. Nový lék uvažovaný pro léčení osteoartritidy je vyvíjen firmou *MitoKor* pod označením *MITO-402* je založen na jiné strategii, než dosud užívané léky s protizánětlivým účinkem; tlumí totiž progresi onemocnění navozením normální funkce mitochondrií v chondrocytech.

Stabilizace a ochrana mitochondrií před masivním přesunem kalciových iontů do cytoplasmy, kde mohou spustit nežádoucí aktivitu určitých signálních drah. Je už déle známo, že estrogen má neuroprotektivní účinek (kupř. při rozvoji Alzheimerovy choroby). Firma vyvíjí estrogení preparáty (*MITO-4509*), které nemají při této léčbě nežádoucí feminizační účinek (non-hormonální estrogény). Jiný přípravek – *NeuroStat*, což je přírodní estrogen, který přispívá k ochraně myokardu nebo mozkové tkáně postižené náhlou ischemií (akutní infarkt myokardu nebo mozková mrtvice). Zabránění náhlého vtoku  $Ca^{2+}$  do cytosolu pozastaví alespoň na krátkou dobu ničivé důsledky ischemie. Preparát je uvažován jako přípravek první

pomoci ještě před hospitalizací. Stejný význam má pro terapii srdeční ischemie *ranolazin* (*Ranexa*), který je parciálním inhibitorem oxidace mastných kyselin. Převádí tak získávání metabolické energie na glykolýzu, při níž je zapotřebí menší množství kyslíku a nevzniká tolik reaktivních forem kyslíku a dusíku jako při  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin.

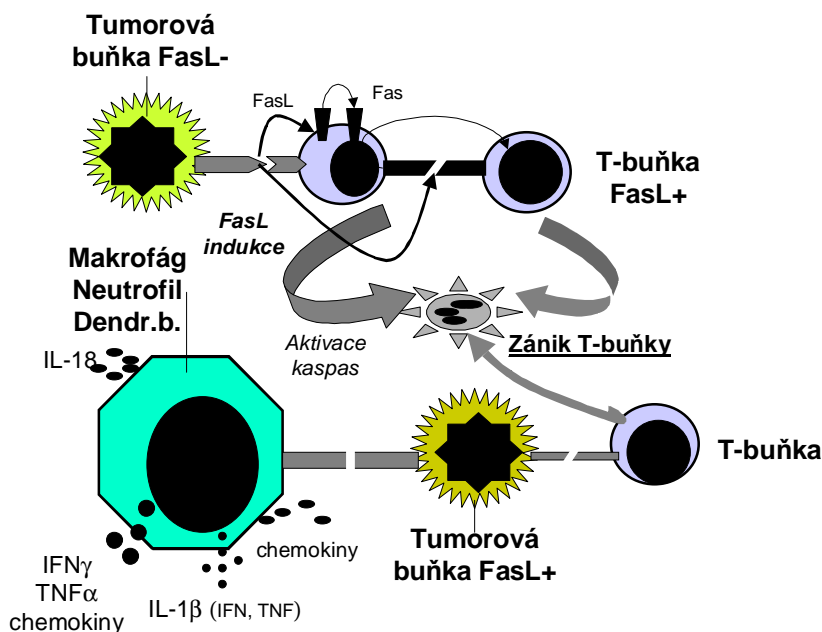
Aplikace látek, které inhibují syntézu nukleových kyselin a tím tlumí proliferaci buněk, především nádorových, je další terapeutický přístup k ovlivnění rozvoje maligních tumorů. Jednou z možností je podávání analog nukleosidů. Samozřejmě je snaha atakovat pouze buňky nádorové, nekontrolovaně proliferující, a přitom nepoškodit buňky normální s vysokým indexem dělení. Nedávno vyvinutý přípravek – *Clofarabin* vykazuje větší rezistentní vůči deaminační degradaci a má vysokou afinitu k deoxycytidinkinase, která je nutná pro přeměnu neaktivního nukleosidu na aktivní nukleotid.; je také rezistentní vůči kyselé žaludeční šťávě a proto je účinný i perorálně. Clofarabin se užívá zejména u leukemií (akutní lymfoblastická anebo myelogenní leukemie); zkouší se též u solidních tumorů.

Předpověď rizika výskytu *adenokarcinomu mléčné žlázy* se už provádí prakticky, a to u familiárního karcinomu prsu vyšetřováním přítomnosti mutovaného genu s označením BRCA1 a BRCA2. Byl však objeven nový prognostický marker, kterým je *cyklin E*. Jde o známý klíčový regulátor buněčného cyklu (v komplexu s cyklin-dependentní kinasou 2 = CDK2), který fosforyluje RB-protein, a tím rozhoduje, zda buňka bude replikovat DNA a následně se dělit, anebo podstoupí apoptózu. Pacienti s nízkou hladinou cyklinu E mají velmi příznivou prognózu a nemusí podstoupit příliš radikální terapii. Naproti tomu pacienti s vysokým cyklinem E potřebují přídatnou adjuvantní antihormonální nebo cytotoxickou terapii kupř. tamoxifenem, anthracykliny nebo taxany.

O renesanci *Burnetovy a Thomasovy hypotézy o imunologickém dohledu nad maligně transformovanými buňkami* v organismu se zasloužily nové experimenty na myších ve vztahu k novým poznatkům molekulové biologie. Účinek imunitního systému postiženého organismu se označuje novým termínem „cancer immunoediting“, které má 3 fáze: (1) *V eliminační fázi* nejprve buňky přirozené imunity (NK, NKT,  $\gamma\delta$ T) rozpoznávají antigeny vzniklých nádorových buněk, jejichž počet překročil určitý minimální práh; dalším krokem je stimulace tvorby IFN $\gamma$ , který startuje kaskádu reakcí přirozené imunity za vzniku angiostatických chemokinů (CXCL10, CXCL9 a CXCL11), které blokují neovaskularizaci vznikajícího nádůru; také podněcují tvorbu dalších NK-buněk, dendritických buněk, makrofágů a dalších efektorových buněk v místě nádoru za vzniku dalších molekul IFN $\gamma$  a dále ještě interleukinu 12 (IL-12). To má za následek zánik některých tumorových buněk; vzniklá buněčná drť je fagocytována dendritickými buňkami, které putují do lymfatických uzlin. Růst nádoru je hlídán cytotoxickou aktivitou NK-buněk a aktivovaných makrofágů, zatímco v lymfatických uzlinách diferencují CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty se specifitou vůči nádorovým antigenům a putují podle chemokinového gradientu do místa nádoru, kde rozpoznávají a ničí nádorové buňky, exprimující příslušný nádorový antigen. (2) *Fáze ekvilibrační* se vyznačuje tím, že některé nádorové buňky (odlišné varianty) přežijí a jsou vystaveny selekčnímu tlaku protinádorového imunitního mechanismu. Vznikají nové klony, které musí imunitní systém hostitele rozpoznávat jako cizí, aby je mohl odstranit. NK-buňky a makrofágy infiltrující nádor se vzájemně aktivují a produkují další molekuly IFN $\gamma$  a IL-12 a ničí nádor navozením apoptózy prostřednictvím signální dráhy tumor-nekrotizujícího faktoru (TNF $\alpha$ ), perforinu a reaktivních forem kyslíku a dusíku. Pokud je růst a vývoj nádorových buněk vyvážen s imunitní obranou organismu, nádor zůstává lokalizován. a může v tomto stavu setrvávat i léta. Selekční tlak však obvykle vytváří nové varianty – klony tumorových buněk, které začnou být rezistentní vůči destrukčním účinkům hostitele a nádor přechází do dalšího stádia – (3) *fáze vymanění*, kdy určitý klon nádorových buněk uniká rozpoznání a destrukci, ale dokonce ničí cytotoxické T-lymfocyty tím, že exprimuje Fas-ligand, který navodí apoptózu T-buněk s Fas-receptorem; nastává nekontrolovaný růst

tumoru a jeho šíření do okolí i na vzdálená místa a jeho klinická manifestace. Nové pojetí protinádorového imunologického dohledu má řadu neobjasněných míst, musíme je však vzít v úvahu při výběru a časovém nasazení léčby; příliš agresivní terapie v určité fázi může poškodit více obranyschopnost organismu než nádorové buňky, a tím podpořit rozvoj choroby.

**Obr.: Obranná reakce nádorových buněk na imunotoxicitu T-lymfocytů**



Na imunosupresivním účinku *Cyklosporinu A* (CsA) a *glukokortikoidů* participuje inhibice produkce interleukinu 2 (IL-2) ev. dalších cytokinů (IL-4). CsA ovlivňuje signální transdukcii pro IL-2 potlačením kalcineurinu, což je Ca-dependentní fosfatasa, která umožňuje translokaci transkripčního faktoru NF-AT a NF- $\kappa$ B; glukokortikoidy mají mnohočetný účinek, včetně inhibice IL-2 a dalších cytokinů tím, že interferují při vazbě aktivátoru transkripčního faktoru proteinu-1 a NF-AT. Proto stanovení specifické iRNA obsahující informaci pro syntézu těchto cytokinů technikou PCR-RT v reálném čase umožňuje specifické a přesné monitorování farmakodynamického účinku CsA u jednotlivých pacientů.

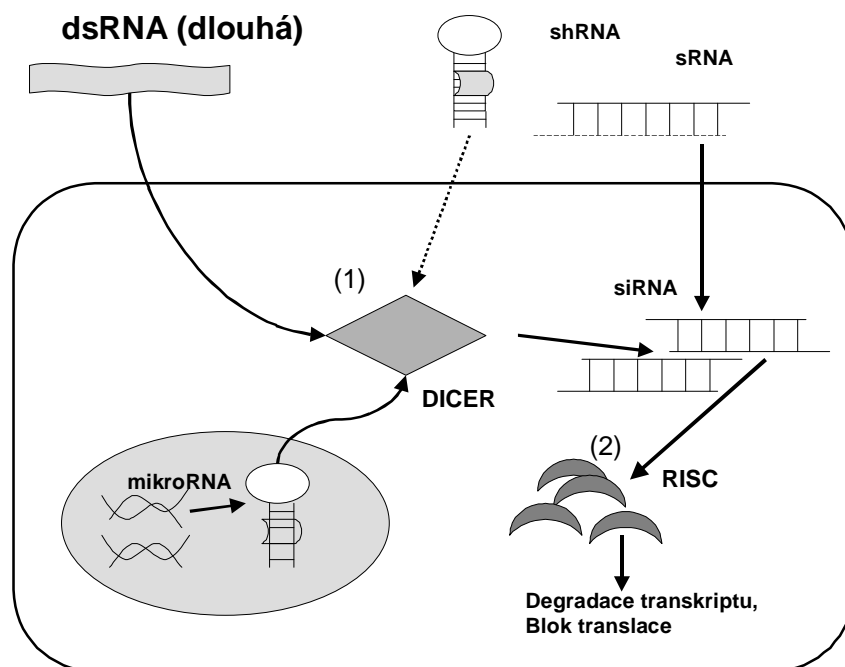
*RNA interference* je mechanismus, při kterém dvouvláknová RNA (dsRNA) tlumí endogenní genovou expresi. a potlačí tak replikaci jako obrana proti infekci genomu; u obratlovců slouží tento mechanismus jako antivirová ochrana už od počátku evoluce. V experimentech bylo prokázáno, že RNAi blokuje retrovirovou infekci RSV a HIV v buněčných kulturách. Důležitou roli hraje přitom faktor označovaný jako DICER, což je multidoménová endonukleasa příbuzná s ribonukleasou III (RNase III-related endonuclease), která odštěpuje z malé dsRNA (21-23 bp) interferující fragmenty (siRNAs), především na koncích dsRNA; také katalyzuje excizi regulačních mikroRNA (miRNA, asi 22 nukleotidů) z prekurzorů; katalýza potřebuje ATP. *RNAi se ukazuje být slibnou technologií nejen pro terapii retrovirových infekcí, ale bude mít značné uplatnění v genovém inženýrství.*

RNAi je dvoustupňový proces, jehož výsledkem je degradace cílové mRNA. V 1.stádiu exogenní dvouvláknová RNA (dsRNA), o velikosti > 21&#x2013;23 bp, se štěpí na menší interferující RNA (siRNA) působením DICER (nukleasa RNA-III rodiny). V 2. stádiu jsou siRNA inkorporovány do komplexu označovaného jako RISC (RNA-induced silencing

complex), který degraduje mRNA homologní s integrální siRNA. Konečným důsledkem je potlačení genové exprese.

**Obr.: Mechanismus interference**

(dsRNA=dvoušroubovice RNA; shRNA (short hairpin RNA; siRNA=interferující RNA); DICER=nukleasa RNA-III rodiny; RISC=inhibiční komplex navozený iRNA)

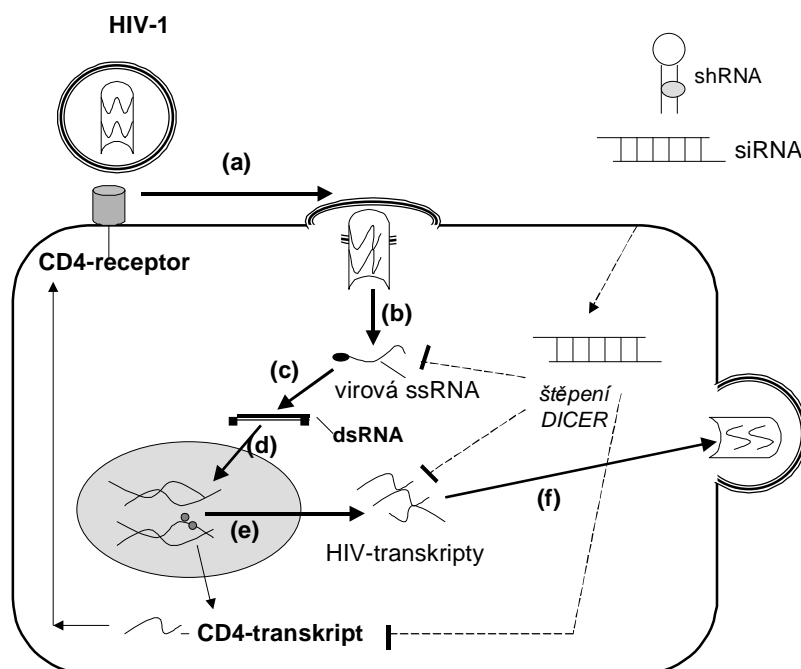


Kompletní spektrum biologických pochodů, v kterých probíhá RNA interference, není zdaleka objasněn. Dosavadní biochemické a genetické studie ukazují, že RNAi byla (a je) velmi důležitým mechanismem obrany rostlin vůči napadení viry. Jednovláčková RNA viru vytváří dvouvláčkovou RNA (dsRNA) jako replikační meziproduct. Rostlinná buňka využívá tento meziproduct jako „endogenní“ dsRNA-spouštěč RNA-interference vůči cílové genomové RNA viru tím, že přeruší replikační cyklus viru a zabrání jeho pronikání do dalších buněk rostliny. Na druhé straně rostlinné viry vyvinuly mechanismus, který potlačuje RNAi-odpověď; podobnou cestou mohou ovlivňovat antivirový obranný systém i živočišné viry. Dále bylo prokázáno, že mnohé rostlinné, a také živočišné viry, mohou exprimovat specifické proteiny, které inhibují antivirovou imunitní odpověď. U savců je antivirová obrana zakonzervována jako alternativní nebo přídatný mechanismus adaptivní imunity. Je zde však určitý problém: ve většině somatických savčích buněk dsRNA o velikosti větší než 30 pb aktivuje signální dráhy, které v konečném důsledku navodí apoptózu infikované buňky. RNAi je však možno (experimentálně nebo terapeuticky) navodit aplikací (transfekcí) uměle připravených jednovláčkových interferujících RNA (siRNA) o velikosti 21 bp, které napodobují štěpné produkty ribonukleasového systému DICER, další možnost je expimace „konstruktů“, které vytvářejí tzv. krátkou vláčenkovou RNA (short hairpin RNA = shRNA) při transkripci *in vivo*. To navodí sekundární tvorbu endogenní interferující RNA, tj. mikroRNA.



### Obr.: Mechanismus infekce HIV-1 a možnost interference RNA

Pochod: (a) infekce buňky virem HIV prostřednictvím exprese receptoru CD4; (b) uvolnění jednovlákné RNA (ssRNA); (c) reverzní transkripce do dvouvláknové RNA (dsRNA); (d) integrace dsRNA do genomu hostitelské buňky; (e) transkripce virogenů; (f) produkce dceřinných virionů a jejich uvolnění z buňky.  
shRNA - hair-pin RNA (vlásenková RNA), siRNA - interferující RNA



Základním problémem při efektivní terapii pacientů s maligními nádory je schopnost rozlišit mezi nádorovou a normální buňkou. Tento problém je často důvodem, že agresivní protinádorová terapie musí být přerušena; proto je snaha nalézt selektivní nádorové destrukční mechanismy. Jednou z možností jsou *chimérové proteiny* tj. produkty chimerických genů, vznikajících při genové translokaci a nalézajících se pouze v nádorových buňkách. Terapeutická inhibice exprese chimérických genů, tzv. "zinc-finger" proteinů, protisměrné RNA nebo "hammer-head" ribozymů. V experimentu je katalytická RNA-podjednotka RNAsy P z *E. coli*, která je schopna specificky rozrušit mRNA přepsanou z fuzovaného genu po translokaci. Je známo, že *adhezí molekula E-kadherin* má značný vliv na diferenciaci a vývoj dvou typů buněk rakoviny žaludku - difúzní nebo intestinální. Byla připravena specifická protilátka blokující mutovanou extracelulární doménu receptoru pro E-kadherin, což zabrání přenosu signálu v nádorových buňkách nikoliv však v buňkách normální žaludeční sliznice.

Na široké využití těchto poznatků v klinické praxi musíme ještě čekat; průměrná doba testování nových léků je nejméně 5 let. Je možné, že v budoucnu to bude kratší, když budeme znát genetickou výbavu léčeného jedince. V každém případě však musíme využít tuto dobu čekání seznamováním se s novými směry a poznatky v medicíně, abychom byli alespoň teoreticky připraveni na to, co jsme se ve škole ještě neučili.