

## Molekulární medicína

Význam biotechnologií a molekulárních přístupů k jejímu dosažení

- I. Základní úvahy
- II. Základní přístupy k dosažení molekulární úrovně medicíny (biomedicíny)
- III. Současné znalosti versus realita molekulární medicíny – některé příklady
- IV. Závěrečné poznámky

Milan Elleder

Ústav Dědičných Poruch Metabolismu, UK 1LF

Vyšlo v souboru přednášek, vydaných nakladatelstvím Gsalen v r.2008 (ISBN 978-80-7262-535-2).

### I. Základní úvahy

Jak lze dnes správně chápat termín molekulární medicína. Především změnou termínu. Myslím, že mnohem výraznějším a objektivnějším je *molekulární úroveň medicíny*. Mnohem lépe naznačuje, že nejde o nic speciálního, odtrženého od běžné medicíny, ale že představuje a objasňuje na molekulární úrovni jevy, které jinak vnímáme na různých strukturálně a funkčně definovaných úrovních známých doposud jako klasické obory. Obory jak převážně *orgánově vymezené* (hepatologie, kardiologie, nefrologie, neurologie, atd.) nebo globálně *strukturálně* nebo *funkčně* definované (anatomie, histologie, fyziologie, patofyziologie), nebo odvozené z *analytických* studií in vitro (chemie, však zejména biochemie). Molekulární úroveň není preferencí žádného z těchto rutinních nebo výzkumných přístupů. Při detailním studiu jakéhokoliv oboru se dostáváme od finálních stavů a komplexních vztahů naprosto nevyhnutelně na molekulární a supramolekulární úroveň. Anatomii jakožto vědu strukturální, lze snadno posunout z úrovně makroskopické na úroveň mikroskopickou, submikroskopickou, supramolekulární a zcela jednoznačně až na úroveň molekulární. Stejně tak fyziologii z úrovně orgánových na úroveň budoucí – molekulární. V existujícím spektru oborů je molekulární medicíně nejbližší molekulární biologie. Ta je však v podstatě omezena na normální situace,

zatímco molekulární medicína má těžiště významně, nebo vlastně výlučně posunuté na chorobné procesy. V současnosti je propojení obou jasné. Jakékoliv snahy odtrhovat tyto dva směry od sebe je naivní a nezodpovědné. Molekulární medicína musí vycházet z molekulární biologie a molekulární biologie začíná těžit ze studia lékařsky významných procesů, zejména geneticky podmíněných. Dnes již klasickým příkladem je identifikace desítek neznámých proteinů vazebnými a asociačními studii, které odkrývají molekulární podstatu celé řady genetických syndromů, studovaných na klinicko patologické úrovni. Proto je logickým kompromisem termín molekulární biomedicina naznačující propojení, které je perspektivou rozvoje na obou stranách.

**Na molekulární medicínu (biomedicinu) je tedy nutno pohlížet dle definice jako na dysfunkci molekulárních systémů za určitého chorobného procesu, molekulárních systémů, jejichž funkce za normálního stavu je definována (nebo by definována měla být v optimálním případě).** Vzhledem k stávající fragmentární znalosti v této oblasti (jak medicínské, tak čistě biologické), přesahuje složitost cíleného stavu naši představivost. Důvodem může být i skutečnost, že současná medicína má, přes veškerý nesporný pokrok, stále jako dominantní znak popisný, empirický charakter a že hlavní intelektuální kapacita výzkumně pracujících lékařů je stále koncentrována na diagnosu a zevní projevy onemocnění, což je z hlediska zdravotnického srozumitelné. Možná, že si stále malé procento lidí uvědomuje, jak málo vlastně známe o podstatě nemocí, které diagnostikujeme, léčíme a o kterých učíme. Dosavadní výzkumné tendence lze charakterizovat jako studium kausálních vztahů mezi dvěma jevy/procesy. Výsledkem jsou relativně spolehlivé údaje, které jsou v mnoha případech klasifikovány jako statisticky významné. Do reality na molekulární úrovni je však stále daleko. Představíme-li si nemoc jako souvislý řetězec projevů vznikající na molekulární - „**funkční**“ - úrovni (jinak řečeno nepostřehnutelné dnešními prostředky), postupující celou řadou následných kroků regresivního a kompenzačního charakteru na tzv. "**organickou**" úroveň

(vnímatelnou stávajícími diagnostickými přístroji) až po pokročilou fázi hrubých orgánových změn známých z oboru klinická patologie, pak je nutno přiznat, že se pohybujeme stále, znalostmi i způsobem myšlení, na zmíněné "úrovni organické". Myslím, že není osoba angažovaná přímo nebo nepřímo v medicíně, která by si neuvědomovala význam pojmu molekulární medicína. Domnívám se však, že je málo těch, kteří vidí zároveň nezbytnost tento termín plně v budoucí praxi naplnit. Molekulární medicína je cíl, ke kterému spěje veškerý moderní biomedicinský výzkum. Molekulární medicína se bude vyznačkovat schopností diagnostikovat onemocnění na biologické (subklinické, preklinické) úrovni. Vznikne tedy nepochybně nutnost revidovat definici zdraví a nemoci.

Významným přínosem rozvinuté molekulární medicíny bude nejen informace o probíhajících procesech na molekulární úrovni, ale i o mechanismech, kterým jsou tyto procesy realizovány. Tímto se objasní mechanismy procesů, realizované mezimolekulárními interakcemi a které vysvětlí dosavadní klasické termíny příčina – následek, objasňující kausalitu v medicíně.

Kausalita sama je velmi cenný poznatek. **Zásadní význam však bude mít objasnění mechanismů na molekulární úrovni, kterými je tento kausální vztah realizován.** To bude mít nepochybně význam též pro možnost včasné diagnosy a snad i pozitivního terapeutického ovlivnění. Ve studiu a objasnění mezimolekulárních interakcí, ve kterých budou hrát významnou roli nekovalentní interakce, bude hrát hlavní roli fyzika a fyzikální chemie. Ta představuje budoucnost molekulární medicíny.

## II. Základní přístupy k dosažení molekulární úrovně medicíny (biomedicíny)

Jinak řečeno , co přispěje k zaplnění bílých míst na mapě současné převážně supramolekulárně vymezené medicíny?

### *1. Obecné přístupy charakterizovatelné jako „screeningové“ (globální)*

Těmito přístupy lze sledovat určité děje ať již spontánní, nebo experimentálně indukované v tkáních, orgánech, buněčných liniích. Takto koncipované přístupy poskytují obrovská kvanta výsledků na zvolené úrovni (transkripce, translace), které odrážejí biologické procesy, které ve studované tkáni probíhají. Kvanta těchto výsledků musí být počítačově zpracovány. Používám záměrně termín „screeningové“ neboť jejich aplikace může odkrýt potenciálně závažné nálezy, které je třeba následně specifikovat.

*Metody studia genové exprese* (transkripční aktivity) kvalitativně i kvantitativně studují a naznačují jak se mění, oproti referenčnímu vzorku, exprese studovaných genů za sledovaného biologického stavu. Může jít o studie v šíři celého genomu (celogenomové studie) nebo o studie cíleně vybrané skupiny genů. Metody studia genové exprese jsou založeny na hybridizaci fluorescenčně nebo jinak vhodně značených transkriptů k sekvenčně komplementárním probám rozmístěným na pevném povrchu (DNA čipy) nebo na metodách založených na masivním sekvenování krátkých úseků cDNA (SAGE, MPSS).

Získané informace naznačují, které ze sledovaných genů jsou významně aktivovány nebo deaktivovány, tedy zvýšeně nebo sníženě přepisovány na RNA. Tato technologie má svá určitá omezení. Především hodnoty transkriptů nemusí vždy korelovat s množstvím příslušného proteinu. Následně jde tedy o to prokázat, že zvýšení transkriptu je provázeno i zvýšením proteinu a je nutno prokázat repetitivní charakter zaměřeného transkripčně – translačního spektra a interpretovat ho v termínech molekulární biologie/patologie buňky. Je nutno mít na zřeteli buněčnou heterogenitu studovaného vzorku v případě že jde o studium vzorku tkáně.

Nejméně jsou v tomto smyslu problematické tkáňové kultury, např. fibroblastů. I zde jsou však dosažené hodnoty způměrovány a nevylučují závažné odchylky mezi jednotlivými buňkami, které pak nejsou detekovatelné. Velmi pravděpodobně bude snaha vyvinout techniku natolik sensitivní, že bude vhodné pro studia jediné buňky.

*Proteomové techniky* jsou komplementární k metodám studia genové exprese. Jejich cílem je stanovit a porovnávat kvalitativní a kvantitativní zastoupení jednotlivých proteinů a jejich různých post-translačně modifikovaných forem ve sledovaném biologickém stavu. Proteomové techniky jsou založeny na rozdělení směsi proteinů pomocí dvourozměrné gelové elektroforézy s následnou detekcí a komparativní analýzou jednotlivých proteinů pomocí vhodného fluorescenčního či jiného značení. Proteiny, které jsou předmětem zájmu jsou z gelu izolovány a identifikovány pomocí hmotové spektrometrie. Alternativou gelové elektroforézy je separace proteinů pomocí jiných chromatografických technik (HPLC, afinitní chromatografie, FPLC ap.) s následnou hmotově spektrometrickou analýzou. S výhodou je v tomto uspořádání využíváno k hmotnostnímu značení proteinů využíváno stabilních izotopů aminokyselin.

*Metabolomové techniky.* Studium profilu malých molekul (peptidů a metabolitů) je nebo lépe řečeno bude nedílnou součástí komplexních genomických studií. Předpokládá se, že zásadní změny musí mít odezvu na úrovni intermediárního metabolismu v souvisejících metabolických drahách, na úrovni signálních molekul, neurotransmiterů ap. Techniky kvalitativního a kvantitativního stanovení metabolitů jsou založeny převážně na kombinaci hmotové spektrometrie s plynovou a kapalinovou chromatografií, případně kapilární elektroforézou.

## 2. Přístupy, které lze charakterizovat jako individualizované

*Metody vazebné a asociační analýzy.* Tyto metody studují segregaci (vazbu) dědičnosti definovaného fenotypu s polymorfní alelou v rodinách nebo asociaci definovaného fenotypu s polymorfní alelou případně kombinací alel (haplotypem) v populaci. V pozitivním případě dojde k identifikaci lokusu který je ve vazbě nebo asociován se studovaným onemocněním, a následně pak mutací onemocnění podmiňujícího genu . Velkou pomocí pro efektivní vazebné a asociační studie je téměř úplná znalost primární struktury lidského genomu a celé řady genetických, haplotypových, fyzických a expresních map které umožňují efektivní výběr kandidátních genů lokalizovaných v definovaných kandidátních lokusech a metodické zázemí umožňující vyšetření statisíců polymorfních markerů a rychlou sekvenační analýzu desítek kandidátních genů . V případě nalezení odchylek (mutací) v některém z kandidátních genů je identifikován genový produkt (RNA, protein) a studována jeho základní biologie – kde, kdy a do jaké míry je gen exprimován, kde, kdy a do jaké míry je lokalizován v jakém buněčném kompartmentu. Přirozeně následují otázky, jaké jsou důsledky jeho vyřazení nebo cílené mutace v modelových organismech? V jaké signální, případně metabolické dráze působí, je součástí nějakého multiproteinového komplexu, jaká je jeho role v těchto drahách nebo strukturách?

Neméně důležitou je otázka jak reaguje buňka případně tkáň či organismus na tuto odchylku?

Odpověď na tyto otázky nám jsou dnes částečně schopny dát různé genomické techniky.

*KO (knock out) experimenty* jsou běžně používané jako srovnávací studie následku vyřazení genu, prokázané u humánních geneticky podmíněných onemocněních. Jsou prováděny na laboratorních zvířatech standardními postupy. Vzniklý fenotyp je pak srovnáván na všech dostupných úrovních, počínaje klinickým pozorováním žijících zvířat, studiemi na úrovni

orgánové, buněčné i molekulární. Experimenty toho druhu mohou přinést zajímavá srovnání vzniklého fenotypu na všech zmíněných úrovních, které mohou svědčit, a často také svědčí, i pro mezidruhové rozdíly následků vyřazení studovaného genu.

*Klasické experimenty*, zejména ty, zaměřené na objasnění konkrétních mechanismů normálních nebo v nemoci. Tato část nevyžaduje bližší komentář. Je zavedená, klasická a jediné, co je třeba ještě více zdůraznit je fakt, že kritickým momentem pro dokonalou experimentální práci je dnes dostupnost moderní instrumentace, dostatečná koncentrace vynikajících vědeckých pracovníků (fenomén „kritické masy“), interdisciplinární týmy a dostatek času na vědeckou práci, což bude na fakultách vždy náročné zajistit. Spolupráce lékařských fakult s dalšími fakultami bude určujícím momentem (viz též níže). Neměly by se sem počítat čistě odborné studie, byť na vysoké úrovni, popisující např. atypické varianty nemocí, pokud by nebyly osvětleny mechanismy zodpovědné za atypický průběh. Jinak řečeno, cennost studií, ignorující podstatu nemoci, ale věnující se pouze jejím zevním projevům je pro rozvoj molekulární úrovně medicíny omezená. Jejich cena tkví v ve zdokonalování diagnostické profesionální úrovně. Nutno zdůraznit, že shromáždění a podrobná klinicko-biochemická charakterizace je nezbytná pro zdárný úspěch všech vazebných, asociačních a resekvenčních studií. U populačních asociačních studií bude nabývat na významu též hodnocení efektu vnějších faktorů, tedy něčeho, čeho jsou schopni jen lékaři.

*Statistické metody*, které se v biomedicině používají jako jeden z přístupů určení vztahu příčina - následek . Podstatou je definování síly vztahu mezi definovaným faktorem/jevem a chorobným projevem. Čím je zjištěná asociace pevnější , tím přesvědčivější je kausální vztah a tím méně modifikujících faktorů existuje. Vztah, byť pevný je však definovaný na obecné úrovni a následně vyžaduje bližší specifikaci, opět ideálně na molekulární úrovni. Klasickým příkladem je definice vztahu mezi hypercholesterolemii a rozvojem aterosklerosy. Bližší podrobnosti o mechanismech tohoto statisticky významného vztahu jsou však stále nejasné.

*Analýzy na individuální molekulární úrovni.* Sem patří detailní analýzy primární struktury proteinů a jejich konformace. Detailnější pojednání o nich je mimo možnosti toho textu. Zmínil bych se pouze o krystalografických studiích, které jsou ve středu zájmu strukturně biologické analýzy proteinů. Jak známo, molekula proteinu je složena z jednoho nebo více lineárních řetězců aminokyselin, které se musí sbalit („folding“) takovým způsobem, aby plnily své funkce. I když informace o konečné struktuře proteinu je ukryta v jeho primární (lineární) sekvenci aminokyselin, není možné spolehlivě předpovědět sbalení proteinu. Tato informace musí být získána experimentálně. Nejpoužívanějším přístupem je studium rentgenové difrakce krystalovaných proteinů. V posledních letech se krystalizace proteinů posunula z hájenství krystalografů-specialistů do řady laboratoří, které se zabývají biochemií proteinů. Několik tisíc proteinů bylo krystalováno a jejich struktury deponovány v databázích proteinů. Každých pět hodin jsou do proteinové databanky deponovány informace o novém proteinu. Důvodem tohoto zájmu je skutečnost, že konstrukce modelu přesné molekulární topologie proteinu je základním krokem k chápání jeho funkce. Pokud je krystalovaným proteinem enzym, pak je důležitá ko-krystalizace se substrátem nebo inhibitory jeho funkce. Nové inhibitory nebo modulátory funkce enzymu mohou být navrženy modelovými studiemi na základě znalosti vazebného místa a vazby substrátu. Tento přístup má dalekosáhle praktické farmakologické souvislosti.

### **3. Lokalizace in vivo/in vitro**

Naprosto dominantní součástí molekulární biomediciny je snaha integrovat veškeré vznikající poznatky z „in vitro“ molekulární analytické úrovně do živé buňky (tedy in situ in vivo), tedy do přirozeného prostředí studovaného děje, konkrétně do kritické části buňky, jako je jaderný kompartment, cytoplasmatické organely, atd. Je to obtížné vzhledem k tomu, že molekulární úroveň in vivo je v podstatě nepřístupná přímému pozorování, které by umožnilo významně



přiblížit sledovanou molekulu v její přirozené situaci in vivo. Tento přístup je navíc komplikován nutností sledovat dynamiku sledované molekuly a jejího zařazení do širšího biologického kontextu, representovaného molekulárními interakcemi. **Bez velkého přehánění - celá tato tendence se dá definovat jako nadcházející zlatý věk molekulární patologie a biologie buňky.** Je jen smutné, že tento nosný a jednoznačně samostatný obor na českých universitách neexistuje. Přírodovědecké fakulty se soustřeďují na normu, tedy na fyziologické procesy, na lékařských fakultách stále přežívá poněkud archaicky koncipovaná obecná patologie, která je pouze úvodem do klinické patologie, naprosto dominantně pojímané diagnosticky.

*Současné trendy v lokalizaci in vivo/vitro*. Jaké biologické otázky bychom si v roce 2007 měli klást s ohledem na využití existujících a dostupných “state of the art” mikroskopických přístupů? Stručný a zajisté neúplný výčet by mohl být následující: Jaká je prostorová a časová distribuce (i individuálních) molekul v organismu, tkáni, buňce, buněčném kompartmentu či v jeho části? Jaké jsou prostorové a časové inter- a supramolekulární interakce molekul v živých buňkách, tkáních či organismech? Jak naplnit normalitu (fyziologii) pozorování při současném udržení hranice maximálního rozlišení? Jak smysluplně a věrohodně interpretovat mnohdy “vícerozměrná” a značně objemná mikroskopická data?

Když Ernst Abbe (1840-1905) definoval v roce 1876 základní paradigma optické mikroskopie včetně faktorů limitujících rozlišení, s velkou pravděpodobností netušil, že za “pouhých“ 130 let (rok 2001) dojde k prolomení těchto základních tezí technikou STED (Stimulated Emission Depletion) při použití “jeho 130 let starých“ objektivů. Časové období mezi těmito dvěma naprosto zásadními milníky optické mikroskopie by se dalo, velmi pravděpodobně pouze částečně, charakterizovat razantním rozvojem v následujících oblastech.

Celková tendence k maximálně fyziologickému pozorování živých systémů

(buněčných, tkáňových, komplexních organismů) s minimalizací zátěže studovaných objektů a optimalizací reality pozorování ( $xyz$  a časové domény), celkově s převahou fluorescenčních technik

Rozvoj plně “korigovaných” komplexních mikroskopických systémů vybavených objektivy s maximalizovanou numerickou aperturou až za hranici “total reflectance“ pro TIRF (total internal reflectance microscopy) techniky pro pozorování živých dějů na rozhraní buňka/substrátové sklo

Implementace laserových světelných zdrojů, rozvoj ultrasensitivních detektorových systémů, jak na úrovni PMT (photomultiplier), tak i CCD (charged coupled device) kamer, mnohdy dosahujících až single-photon citlivosti rozvoj 3D mikroskopie s vylepšením rozlišení v  $xyz$ – laserová skenovací konfokální mikroskopie, vícefotonová konfokální mikroskopie, super-fast konfokální mikroskopie s využitím „Nipkow spinning disk“ nebo naprosto recentní “swept-field“ konfokální mikroskopie,  $4\pi$  mikroskopie respektive theta mikroskopie využívající paralelně více objektivů . Všechny tyto techniky umožňují dokonalejší rozlišení při současném zachování možnosti pozorování živých dějů v buňce. Bližší podrobnosti budou podány v přednáškách a v seminářích.

Implementace široké škály fluorescenčních značek charakterizovatelných vysokou mírou stability, zúženými excitačními a emisními spektry, biologickou inertností, schopností selektivně *in-vivo* značit buněčné struktury či kompartmenty, popřípadě mapovat fyziologické procesy jako iontové či potenciálové změny na membránách

Konvergencí s molekulárně biologickými technikami došlo k enormnímu “boomu“ značení proteinů pomocí rekombinantních fluorescenčních proteinových značek, modifikovaných pro širokou škálu aplikací

Foerster (nezaměňovat ve zkratce s Fluorescence) Resonance Energy Transfer (FRET)

mikroskopie využívající fyzikální princip neradiativního (nezářivého) přenosu energie mezi molekulami fluoroforů na krátké molekulární (interakční) vzdálenosti dovolující časovou a prostorovou evaluaci molekulárních interakcí, vše v širokém spektru aplikačních variací. Tato metoda otevírá další dimenzi biologických molekulárních interakcí i v živé buňce pomocí optické mikroskopie.

Další F (Fluorescence) metody jako FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) či FLIP (Fluorescence Loss Induced Photobleaching) přispívají k charakterizaci mobility molekul v živých systémech. Jako zásadní se ukazuje být využití dalších fyzikálních parametrů fluorescenčních procesů jako je měření poločasu fluorescence (Fluorescence Lifetime) či komplexních spektrálních charakteristik fluoroforů (ve smyslu spektroskopickém), a dále zcela jiných vizualizovatelných fyzikálních principů, jako například “second harmonic generation microscopy“

Naprostě esenciální pro rozvoj optické mikroskopie v buněčné biologii je oblast analýzy obrazu kombinující rozsáhlé oblasti matematiky a “computer science”, vedoucí k ideálu mikroskopisty jako osoby kombinující obecně biologické, matematicko-fyzikální a programátorské vzdělání. Pouze kombinací těchto oblastí je možné být v roce 2007 inovativní.

Problematika současné optické mikroskopie je mnohvrstevná a multidisciplinární. V zásadě platí, že i na složitou biologickou otázku lze odpovědět jednoduchou metodou. Z tohoto obecně platného principu se však nesmí stát prázdné klišé nereflektující daleko obecnější princip, že optický mikroskop není ničím jiným než zdrojem konvoluce (zkroucení) reality, který stojí mezi pozorovaným objektem a pozorovatelem a má definovatelnou transferovou funkci. V mikroskopii tedy kriticky záleží na schopnosti pozorovatele posoudit míru konvoluce získaného obrazu, který nese mnohdy více informací v lidským okem nepostřehnutelných obsahových rovinách. Neúprosná ekonomická realita bohužel vytváří

nepřímou úměru mezi mírou konvoluce a cenou systému, což ovšem nesmí představovat alibistickou překážku pro práci na úrovni současného stavu poznání (viz. výše).

Jaký bude mikroskop za dalších 130 let? V tuhle chvíli je jednoduší předpovědět jaké budou mikroskopy za 1-5 let: s velkou pravděpodobností se bude jednat u integrované systému v nejvyšší třídě většiny výše uvedených kvalit. Vždy s maximálním akcentem pro pozorování živých biologických systémů. Provokativní otázka by tedy mohla znít: má vůbec smysl kupovat mikroskop, když je zastaralý v okamžiku pořízení? Jedna z možných odpovědí by mohla být následující: Ano, má smysl neustále kupovat ty nejdražší systémy, klidně každý rok, ale mělo by být předem zajištěno jejich maximální využití v integrovaných mikroskopických institucionálních centrech s odpovídajícím intelektuálním potenciálem.

Útěchou čtenáři může být fakt, že tato krátká stať pojednává o mikroskopii optické (vlnové délky cca 400-750 nm), stejně “přehledný” by mohl být pohled na mikroskopii elektronovou či tzv. “near-field” skenovací mikroskopii.

Tyto moderní technologie obohacují nebo v mnoha případech substituují klasické techniky diferenciální centrifugace, zatížené vždy dokonalostí separace studovaného buněčného kompartmentu (Golgiho aparátu, mitochondrií, lysosomů, mikrosomů apod.). Moderní mikroskopické technologie mohou zásadním způsobem přispět k rozvoji poznání na poli strukturní biologie za normy i za patologických stavů.

#### **4. Integrace poznatků**

To je součástí komplexnějšího chápání biologických procesů (systémů), což je dnes nazýváno molekulární biologii systémů (systems biology). Jde, mezi jinými, o zpracování shora uvedených masových výsledků genomiky, proteomiky, a dalších výzkumných přístupů (viz shora), a jejich interpretaci která by měla odrážet roli buněčných populací, které se tkáňové reakce zúčastňují, změny organel a samozřejmě specifikovat vše na molekulární úrovni

konkrétních probíhajících procesů. Na přínosnost těchto přístupů existují odlišné názory, kolísající od pozitivních po negativní. Teprve budoucnost zhodnotí efektivitu. Expresní studie *specificky designované* ke sledování určité skupiny genů se zdají být efektivnější pro posouzení konkrétních biologických a patologických procesů.

Jinak v nejobecnějším pohledu je velmi přínosný integrativní a komparativní pohled na studované biologické procesy z hlediska evoluční biologie.

### III. Současné znalosti versus realita molekulární medicíny – některé příklady

*fenomény v lidské patologii známe snad všechny,  
konečně začínáme znát v některých případech i jejich podstatu*

Hlavní oblasti nezbytné pro přiblížení a chápání molekulární úrovně medicíny budou podány v řadě přednášek. Zde bych poukázal pouze na některé příklady z kategorie genetických poruch. Celou situaci lze definovat zcela obrazně jako mapy s více nebo méně specificky ohraničenými oblastmi, kde každá z přesně vymezených oblastí představuje jedno exaktně vymezenou geneticky podmíněnou jednotku. Přesně vymezených jednotek jak na úrovni DNA, tak proteinu je dnes značné množství. V ideálním případě by se dala znalost *všech procesů probíhajících v tkáních* u modelové poruchy na molekulární úrovni přirovnat ke kompletní politické a fyzikální mapě. Opačným stavem, dnes ale naprosto běžným, je přesně ohraničená bílá oblast s několika specifickými hornatými oblastmi relativně dobře viditelnými z vesmíru. Na starých mapách by na těchto bílých místech byly známý nápis „hic sunt leones“. Postupem času mohou být v rámci toho teritoria odkryty i další útvary, specifické pro danou vymezenou oblast. Jejich vzájemná návaznost mezi sebou a navázání na struktury zatím skryté v „bílých místech“ však doposud neexistuje. Myslím, že nejhodnější je prohlášení uvedené jako *moto* této části. Příkladů na toto téma je v současné medicíně obrovské množství.

Klasickým příkladem je situace ve velké skupině genetických poruch, které byly po dlouhou dobu vymezeny svým fenotypem velmi dobře definovaným klinickými genetiky.

Vymezení tedy bylo po dlouhou dobu na úrovni klinické, nebo obecně řečeno makroskopické, neboť definujícím znakem byly tvarové změny orgánů a částí těla. Metodou vazebné analýzy (viz shora) byly identifikovány oblasti chromosomů, které byly ve vazbě, vysoce resistantní na výměny mezi homologními chromosomy, a ze skupiny kandidátních genů, nalézajících se v této oblasti byl identifikován ten, vykazující mutace, segregující s fenotypem ve studovaných rodinách. Tak byly objeveny geny a jimi kódované proteiny. Porucha se tak stala definovatelnou na úrovni genu (DNA) a proteinu. Tím je umožněna identifikace postižených, jde-li o autosomálně recesivní onemocnění je možná i identifikace heterozygotů. Je možná i prenatální diagnosa. Z hlediska čistě zdravotnického je tedy formálně stav uspokojivý. Z hlediska molekulární medicíny je však jasné, že byla identifikovány proteiny, které v mnoha případech nemají enzymovou aktivitu a účastní se procesů, jejichž povaha není zcela jasná. Vymezením geneticky podmíněných poruch ve svých extrémních polohách, tj. defektním genem/genovým produktem na straně jedné a terminálním klinicko patologickým fenotypem" *na straně druhé se tedy pro výzkum automaticky odкрývá obrovský volný prostor, na jehož konci by mělo být objasnění všech*, procesů, které k makroskopicky patrnému narušení tkání vedou. Že při tomto stupni znalostí lze očekávat možnost pozitivního ovlivnění procesu vhodným terapeutickým přístupem je samozřejmé.

Vzhledem k vlastnímu zaměření, podám příklady stavu vědomostí v oblasti geneticky podmíněných genetických poruch, t. zv. střádacích onemocnění. V současnosti je definováno cca 48 jednotek na biochemické/molekulární úrovni. Jde o skupinu poruch z hlediska čistě diagnostického bezproblémových, vzhledem k dokonalé definici většiny z nich na úrovni molekulárně genetické a biochemické (na úrovni proteinu). Ve všech případech dochází k přeplňování lysosomů látkami, které nejsou, díky defektní enzymové aktivitě degradovány (tedy substráty defektního enzymu). Ve dvou případech se v lysosomech hromadí látky, produkty degradace, a to následkem dysfunkce mutovaných transportérů v lysosomální

membráně (cystin nebo sialová kyselina), které za normální situace zprostředkují přenos do cytosolu a následnou recyklaci. V těchto případech jde o vcelku pochopitelnou situaci.

V několika jednotkách (v osmi k současnému datu), mezi které patří velmi časně jednotky ze skupiny neuronálních ceroidlipofuscinos byly vazebnou analýzou zjištěny zodpovědné geny, kódující do té doby neznámé proteiny, které jsou v určitém, doposud ne zcela jasném vztahu k lysosomálnímu aparátu a zodpovídají za funkci, která je známa pouze ve formě následků narušené funkce. Tato skupina lysosomálních střádacích poruch je zcela logicky předmětem intenzivního výzkumu použitím shora uvedených přístupů (viz část II).

Na doplnění „bílých míst“ čekají i onemocnění u kterých byla biochemická podstata zčásti nebo úplně definována. U nich minimálně zbývá objasnit mechanismus propagace biochemického defektu buňkou, orgánem a v řadě případů i mechanismus vzniku známého biochemického defektu. Patří sem, mimo jiné, jednotky ze skupiny dědičných metabolických poruch způsobených enzymovými deficity, které byly identifikovány díky analýze akumulovaných metabolitů (např. fenyلكetonurie, některé lipidosy), defekty enzymových aktivit oxidativně fosforylačního systému (OXFOS) u řady neurodegenerativních a multiorgánových onemocnění. Studie poruch OXFOS vedlo nejen k základnímu definování řady jednotek, ale i k znalosti biologie mtDNA, asemblačních proteinů komplexů respiračního řetězce, ale zároveň dává tušit obrovské množství problémů, které bude nutno objasnit (např. mechanismy poškození buňky při poruše OXFOS) .

Jako jeden konkrétnější příklad lze uvést vývoj znalostí pojmu *enzymový deficit* u geneticky podmíněných enzymopatií. V případě monomerního enzymu je *ztráta katalytické aktivity* podmíněná ve většině případů mutací, která může zasáhnout katalytické centrum, nebo domény v jeho blízkosti, které změnou konformace interferují s aktivním centrem. Na tíži deficitu se může podílet i *urychlené odbourávání* enzymové molekuly, která má ve své mutantní formě narušenou konformaci, vzdorující chaperonové korekci. Zesílení chaperonové

funkce je předmětem některých studií, s cílem snížit degradaci a umožnit cílení enzymové mutantní molekuly do příslušného funkčního kompartmentu, kde může i ve své mutantní formě zmírnit tíži funkčního deficitu. Další příčinou enzymového deficitu je *porucha posttranslační modifikace*, která vede k *chybnému cílení* enzymové molekuly mimo její cílový kompartment (nejde tedy o deficit v pravém slova smyslu, ale k nedostatku enzymu v správném oddíle buňky). Další z poruch na úrovni posttranslační modifikace je *nevytvoření katalytického centra* pomocí enzymů, které jsou v endoplasmatickém retikulu a které konvertují primární neaktivní doménu na doménu aktivní. Samostatnou kapitolou dosti značného významu se stávají deficity aktivátorů lysosomálních enzymů (sfingolipidhydroláz), což jsou peptidy nezbytné pro optimální interakci enzym – lipidní substrát. Mechanismus jejich účinku však není přesně znám. Klasickým příkladem je deficit glukocerebrosidázy (historická Gaucherova nemoc). Jde buď o mutaci v enzymové molekule samotné, nebo o mutaci v aktivátoru enzymu. Výsledkem je stejný fenotyp, které je v případě deficitu aktivátoru v arteficiálních in vitro testech těžko prokazatelný, protože deficit jeho funkce nahrazují detergencia (skutečný biologický deficit je však přítomen)

Opakem pravých enzymových deficitu je *pseudodeficiencie* nejlépe definovaná u deficiencie Arylsulfatázy A . jde o stav definovaný normální aktivitou enzymu in vivo (v tkáních), nejsou tedy žádné projevy jeho deficitu. Pokud se kultivované (a tedy živé) buňky vystaví náloži příslušného substrátu (v tomto případě sulfatidu, radioaktivně značeného) a je sledována dynamika jeho degradace, je shodná s kontrolními buňkami. Biochemická analýza in vitro, tedy klasickou cestou však ukáže hodnoty katalytické aktivity, které jsou blízké nebo shodné s hodnotami, známými u pravého enzymového deficitu. Jsou známé mutace, které tento stav podmiňují. Není známý mechanismus, kterým k této poruše, manifestující se pouze v arteficiálním prostředí ve zkumavce dochází. Jde tedy o obrácenou situaci proti deficitu aktivátoru (in vivo funkce zachována). Znalost má značný praktický význam. V rodinách



ohrožených metachromatickou leukodystrofií, vyžadující genetickou poradu a prenatální diagnostiku, by neznalost tohoto zvláštního variantního stavu enzymu vedla k tragickým důsledkům. Existují důkazy pro enzymovou deficienci danou mutací v promotoru kódujícího genu, způsobující kvantitativní deficit enzymové molekuly a tím i deficit katalytické funkce. Samostatnou kapitolou jsou enzymové deficiencie multipodjednotkových systémů, klasicky komplexů OXFOS. Vše ukazuje na význam všech podjednotek systému na optimální katalytickou funkci, i když se mohou lišit určitou odlišností významu. Deficit testovaný standardním biochemickým testem nemá tedy v zásadě žádnou podstatnou výpovědní hodnotu. Jako příklad může sloužit t.zv. deficit cytochromoxidázy (COX, komplex IV OXFOS), který může být způsoben mutací jednoho z třinácti podjednotkových proteinů. Ukazuje se však, že i mutace proteinu zodpovědného za inkorporaci molekuly mědi může být příčinou deficitu COX. Zdá se, že takovýchto proteinů může být větší množství. Deficit COX může být sdružen s deficitem jiných komplexů OXFOS, jeli mutována tRNA kodovaná mtDNA, zodpovědná za inkorporaci aminokyselin do podjednotek komplexu OXFOS. Je ještě několik dalších příkladů, které budou zmíněny při přednášce.

Tento výčet naznačuje pokrok v chápání enzymového deficitu a vysvětluje stále více a více používaný termín jako definice chorobného procesu na molekulární úrovni, nahrazující původní diagnostiku nemoci na úrovni biochemické. Tento vývoj je sledován farmaceutickými firmami, které se velmi intenzivně zabývají vývojem terapeutických přístupů „na molekulární úrovni“.

Velmi zavedeným přístupem je aplikace rekombinantních lysosomálních enzymů u lysosomálních enzymopatií. Tyto enzymy jsou aplikovány nitrožilně a vychytávány (receptorem zprostředkovanou endocytosou) buňkami před hemoencefalickou bariérou.

Alternativní cestou je aplikace malých chaperonových molekul, které do určité míry mohou korigovat abnormální konformaci proteinů (na př. katalytických), snížit tak jejich degradaci a umožnit jejich transport do funkčního kompartmentu .

Tady bych se omezil na zjednodušený úvod soustředěný na **molekulární anatomii proteinové molekuly**. Protein nutno přestat vnímat jako pouhou sekvenci aminokyselin. V největší stručnosti je v dnešním *biologickém* pohledu nezbytné rozlišovat N konec (místo iniciální syntézy) a C konec. Pomineme-li problém „leader peptidu“ a isoform proteinu, daných sestřihovými variantami kódujícího genu, pak je to existence domén nebo motivů, určených krátkou sekvencí aminokyselin, které mají speciální biologický význam v biologické existenci proteinu. Jen jako příklad – jsou to sekvence aminokyselin, které určují, místo posttranslačních modifikací (např. glykosylace, regulované proteolýzy) sekretorických proteinů, dále domény, určující po syntéze transport molekuly do určitých buněčných kompartmentů (signální sekvence), na př. do mitochondrií, jádra, peroxisomů, lysosomů, atd.

Řečeno souhrnně, sekvence aminokyselin (primární struktura) určuje konformaci proteinu (sekundární až kvartérní strukturu). Problému konformace proteinu a faktorech, které ji ovlivňují je věnována stále větší a větší pozornost, neboť se ukazuje, že hraje zásadní roli pro funkci daného proteinu. Byly identifikovány mechanismy, které kontrolují konformaci proteinu a v případě poruch, nastartují mechanismy vedoucí k degradaci proteinu (proteasom, lysosom).

Dále jde o procesy popisně definované jako posttranslační modifikace nejrůznějšího druhu, představované jednak modifikacemi v endoplasmatickém retikulu v průběhu pasáže syntetizované molekuly určené k sekreci, inserci do buněčné membrány, transportu do lysosomálního systému jako je regulovaná proteolýza, glykosylace, sulfonace atd. Dále jsou to posttranslační modifikace *in situ* v místě funkčního prostoru příslušné molekuly, které mohou mít reversibilní charakter (fosforylace – defosforylace, acetylace – deacetylace, palmitoylace – depalmitoylace).

Zde je možné shrnout kroky, které následují po objevení nového proteinu, resp. genu (viz metody vazebné a asociační analýzy), jehož mutace je zodpovědná za genetickou poruchu, definovanou do té doby pouze fenotypem (t.j. klinicko patologickým obrazem, biochemickými

nálezy, mechanismem přenosu). Gen identifikovaný vazebnou analýzou (viz shora), vykazující mutace proti genu v kontrolách je klonován, t.j. jeho cDNA je ve formě vektoru vnesen do určité buněčné linie, kde je prepisován (transkripce), překládán (translace) a výsledný protein izolován. Ten je pak podroben molekulární analýze, zahrnující identifikaci jednak primární struktury celkové (sekvenční nebo hmotnostní analýza), ze které vyplyne i přítomnost možných domén, jejich případný vztah k N- či C konci. Ideální je určení dalších úrovní struktury krystalografickými studii (viz krystalografické studie). Vše následné by mělo objasnit funkci proteinu, jeho funkci za normálních okolností (nezapomenout, že by identifikován za situace vzniklé jeho porušenou funkcí !). Vždy pak následuje studium jeho lokalizace v buňce buď pomocí *ad hoc* připravených protilátek nebo jeho značení fluorescenčním proteinem (konstrukt cDNA proteinu a fluorescenčního proteinu) – vytvoření rekombinantního fuzního proteinu v transfekované buňce (viz lokalizace in vivo/in vitro) . Tímto je možno shora zmíněnými technikami analyzovat osud takového proteinu v buňce a to buď ve statické formě (třírozměrně konfokálním mikroskopem) nebo dokonce v čase. K jeho dokonalé charakterizaci patří i informace o jeho konservaci v průběhu evoluce. Jak již zmíněné shora, touto exaktní definicí biologické podstaty studované nemoci se otevírá obrovské pole mechanismů, jimiž se tato porucha v buňce a tkáních propaguje.

#### **IV. Závěrečné poznámky**

Co bude ovlivňovat rozvoj molekulární biomedicíny. *Bude to především uvědomění si nezbytnosti soustředění zájmu o hlubší studium mechanismů na molekulární úrovni. Na lékařských fakultách tedy bude muset dominovat „zájem o nemoc po stanovení diagnózy“.* Čím více bude tento postulát převládat, tím efektivnější bude dosažení molekulární úrovně medicíny. Je těžko zpochybnitelné, že prostředí lékařských fakult je tím nejvhodnějším prostředím pro soustředění moderního výzkumu tohoto typu. Bude to vyžadovat dokonalou znalost

biologických procesů na všech úrovních (molekulární, buněčné, vývojové, ap.), dokonalý systém vědecké výchovy, přístupnost a obeznámení se všemi dostupnými technologiemi. Dále to bude co nejužší propojení mezi lékařskými fakultami a fakultami přírodovědně zaměřenými (biologie, matematika, fyzika), se sdílením výzkumných témat. Tím bude zajištěná příprava na přípravu na „postbiologickou“ éru, ve které budou středem pozornosti biofyzikální charakteristiky molekul a mechanismy mezimolekulárních interakcí. Takovéto propojení zajistí shora rozvoj „molekulárního“ a interdisciplinárního způsobu myšlení na lékařských fakultách, které by se měly do budoucna diferencovat na fakulty zdravotnický zaměřené a fakulty zaměřené výzkumně. Zvláště ty druhé by měly mít vynikající biomedicínské zázemí tvořené kapacitními „preklinickými“ ústavami, mám-li použít současné terminologie. Jedině ty budou moci garantovat výzkum v biomedicině a budou mít možnost zajistit nejdokonalejší způsob výuky, tak jak je tomu v řadě vyspělých zemí.

Vše, co neumožní shora zmíněné přístupy, bude kontraproduktivní. Bude to například i představa, že bude stačit rozšiřování rutinních vyšetření na molekulární úrovni. Na překážku bude i převažující komerční motivace výzkumu. Velkou překážkou bude neschopná koncepce podpory vědy na universitách, která nebude rozlišovat školy podle kvality

Pro další generace studentů moderně koncipované medicíny (biomedicíny) bude skoro rozhodující soustředit se na obecné aspekty, vyjádřené biologickým pohledem na lékařství a snahou získat maximum informace o mechanismech procesů a to nejen literatury, ale zejména od svých vysokoškolských učitelů. Místo, resp. vedle běžné (a správné) klasické otázky *proč* to bude stále více otázka *jak*. Pro vysokoškolské učitele to bude velmi náročné absorbovat veškeré nové poznatky jdoucí do molekulární úrovně, absorbovat a být schopen přesvědčivě tlumočit a přenášet biologicky integrované poznatky z molekulární úrovně studentům. Proces lze přirovnat k biologickému trvalému „odhalování“, odkrývajícím nové aspekty a nové souvislosti, takže odkrývaný studovaný proces/jev se stává stále více definovaný a dokonaleji chápaný.

Nutno stále více zdůrazňovat, že vedle biologického (molekulárně biologického) pohledu nabývá stále více a více na významu pohled fyzikální, resp. biofyzikální, který umožní chápání nekovalentních interakcí, toto obrovské bílé pole biomedicíny zahrnující interakce mezi molekulami nejrůznějšího druhu a jejichž definování přesahuje možnosti molekulární biologie. Není sporu o tom, že to je a bude stále více a více doménou fyziky (biofyziky). Zcela na konec připojuji stať doc. Pavla Hobzy (UOCHAB, AVČR), průkopníka problému nekovalentních interakcí v biologii, o kterou jsem ho požádal pro závěr toho pojednání.

*„Nekovalentní interakce jsou mnohem slabší (o jeden až dva řády) než chemické kovalentní interakce. Navzdory tomu a nebo spíše právě proto nekovalentní interakce hrají zcela zásadní úlohu v biodisciplínách. Nekovalentní interakce jsou odpovědné za existenci kapalných fází a přirozeně též za existenci vody. Připomeňme, že vznik života je velmi úzce spjat s existencí vodné fáze. Nekovalentní interakce určují také strukturu biomakromolekul jako DNA, RNA a bílkovin a velmi úzký vztah mezi strukturou a funkcí biomakromolekul je velmi dobře znám. Nekovalentní interakce hrají zcela klíčovou roli při molekulárním rozpoznání kde zajišťují vysokou přesnost při tvorbě např. komplementárních párů basí DNA a tak při přenosu genetické informace. Výjimečná úloha nekovalentních interakcí spočívá v tom, že musí být současně dostatečně silné aby zajistily preferenční vazbu v molekulovém komplexu a současně dostatečně slabé aby mohlo dojít k rozpojení komplexů. Klasickým případem je DNA: Vazba v komplementárním páru (guanin...cytosin a adenin...thymin ve Watsonově a Crickově uspořádání) je silnější než v jakémkoliv nekomplementárním páru. Tato nekovalentní vazba je mimořádně silná, v případě guanin...cytosin páru je to více než 30 kcal/mol (energie kovalentní vazby je zhruba 100 kcal/mol) a přesto DNA se relativně snadno rozpojí aby mohlo dojít ke tvorbě dceřiných DNA molekul s identickou genetickou informací. Nekovalentní interakce určují strukturu i funkci biomakromolekul a pro tuto náročnou funkci je třeba velká variabilita a šíře těchto interakcí. Rozlišujeme několik typů interakcí: elektrostatické, indukční, dispersní a*

„charge-transferové“. Dále existují různé typy nekovalentních vazeb jako vazby vodíkové, iontové či hydrofobní. Uvědomíme-li si, že v chemii existuje jen jeden typ kovalentních interakcí pochopíme komplexitu biologických procesů a systémů. Kromě energetického zabarvení se nekovalentní interakce odlišují od interakcí kovalentních ještě rolí entropie. V biologických procesech je entropie vždy významná a nikdy ji nelze zanedbat. Pouze v biologii tak máme procesy které jsou řízeny jednak enthalpicky (energeticky) ale také entropicky. Musíme proto vždy uvažovat změnu volné (Gibbsovy) energie a nemůžeme se omezit jen na změnu enthalpie či dokonce energie“.