

Sborník textů

Vybrané aspekty lékařské genetiky

Projekt Metabolické vzdělávací centrum
CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048

Ústav dědičných metabolických poruch
Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Praha 2008

Obsah

Buněčný cyklus a mitóza (Eduard Kočárek).....	5
Pohlavní rozmnožování a meióza (Eduard Kočárek).....	7
Spermatogeneze a oogeneze (Eduard Kočárek).....	9
Centrální dogma molekulární biologie (Eduard Kočárek).....	11
Genetický kód (Eduard Kočárek).....	13
Struktura DNA (Eduard Kočárek).....	15
Struktura genu a genová exprese (Eduard Kočárek).....	17
Replikace DNA (Eduard Kočárek).....	19
Transkripce (Eduard Kočárek).....	21
Struktura RNA (Eduard Kočárek).....	23
Posttranskripční úpravy RNA u eukaryot (Eduard Kočárek).....	25
Translace (Eduard Kočárek).....	27
Mutace a mutagenese (Eduard Kočárek).....	29
Vliv mutace na funkci proteinu (Eduard Kočárek).....	31
Reparace poškozené DNA a mutátorové geny (Eduard Kočárek).....	33
Polymorfismy, jejich podstata a význam (Eduard Kočárek).....	35
Molekulární podstata a identifikace polymorfismů DNA (Eduard Kočárek).....	37
Dědičnost a proměnlivost – základní vlastnosti živých organismů (Eduard Kočárek).....	39
Genové interakce a dědičnost kvantitativních znaků (Eduard Kočárek).....	41
Genotyp a fenotyp (Eduard Kočárek).....	43
Mendelovy zákony.....	45
Autozomově dominantní choroby (Eduard Kočárek).....	47
Autozomově recesivní choroby (Eduard Kočárek).....	49
Kodominance a dědičnost krevních skupin (Eduard Kočárek).....	51
Multifaktoriální dědičnost (Eduard Kočárek).....	52
Epigenetika, metylace, genomový imprinting (Gabriela Čalounová).....	54
Syndromy Prader-Williho a Angelmanův (Gabriela Čalounová).....	57
Mitochondriální DNA a mimojaderná dědičnost (Eduard Kočárek).....	60
Chromozomové určení pohlaví (Eduard Kočárek).....	62
Chromozom X (Eduard Kočárek).....	64
Zešíkmení inaktivace chromozomu X u žen (Jakub Minks, Martin Hřebíček, Lenka Dvořáková).....	66
Syndrom fragilního chromozomu X (Eduard Kočárek).....	68
Chromozom Y a pseudoautozomové regiony (Eduard Kočárek).....	69
Syndromy chromozomové instability (syndromy lomivosti chromozomů) (Eduard Kočárek).....	71
Mikrodeleční syndromy (Eduard Kočárek).....	73
Mikrodelece chromozomu 22q11 (asociace CATCH22) (Eduard Kočárek).....	75
Subtelomerické aberace chromozomů (Eduard Kočárek).....	77
Genová terapie (Eduard Kočárek).....	79
Problémy a omezení genové terapie (Eduard Kočárek).....	81
Genetické mapování a genová vazba (Eduard Kočárek).....	82
Genetická podstata onkogeneze (Eduard Kočárek).....	84
Onkogeneticky významné geny (Eduard Kočárek).....	86
Populace z genetického hlediska (Eduard Kočárek).....	88
Hardyho-Weinbergův zákon (Eduard Kočárek).....	90
Změny genetické struktury populace (Eduard Kočárek).....	92
Genomika a příbuzné disciplíny (Eduard Kočárek).....	94
Projekt lidského genomu a současné perspektivy genomiky (Eduard Kočárek).....	96

Buněčný cyklus a mitóza

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Schopnost reprodukce (rozmnožování) je jednou ze základních vlastností živých systémů. Cílem tohoto procesu není jen prosté rozmnožení či zachování druhu, ale také **udržení kontinuity genetické informace**. Je proto pochopitelné, že základním procesem, umožňujícím pohlavní i nepohlavní rozmnožování, je buněčné dělení, přesněji dělení buněčného jádra. Tento zdánlivě jednoduchý proces v sobě skrývá složitý molekulární mechanismus, jehož jakákoli porucha má zpravidla fatální následky.

Pozorujeme-li buňku v průběhu delší doby, zjistíme, že jednotlivá dělení neprobíhají nepřetržitě za sebou, ale jsou přerušena poměrně dlouhými obdobími, kdy se uvnitř buňky zdánlivě nic neděje. V této době je buněčné jádro ohraničeno jadernou membránou a jednotlivé chromozomy v jeho nitru nelze pozorovat. Toto období nazýváme **interfáze**, čímž jej odlišujeme od doby, kdy probíhá jaderné dělení neboli **M-fáze** (zkratka „M“ je odvozena od slova mitóza, anglicky mitosis). Interfáze a M-fáze vytvářejí dohromady **buněčný cyklus**, tj. soubor procesů, k nimž dochází od konce jednoho jaderného dělení do konce následujícího jaderného dělení.

Během interfáze probíhají v buňce klíčové děje, bez nichž by příští dělení nemohlo proběhnout. Tyto procesy na sebe vzájemně navazují. Podle nich rozdělujeme interfázi do **tří samostatných fází**:

1) G₁-fáze začíná po ukončení jaderného dělení. Zkratka „G“ pochází z anglického výrazu gap neboli mezera. Během ní má buňka možnost opravit prostřednictvím tzv. **reparačních mechanismů** ty části molekul DNA, které byly předtím poškozeny **mutacemi**. Reparační procesy jsou pro další vývoj buňky velmi důležité, neboť zajišťují, aby mateřská buňka vstoupila do dalšího dělení s nepoškozenou genetickou informací a předala ji svým dceřiným buňkám.

Součástí G₁-fáze je **kontrolní bod** označovaný jako **hlavní kontrolní bod buněčného cyklu**. Umožňuje, aby reparační mechanismy měly dostatek času na odstranění poruch v DNA. Proto také G₁-fáze trvá zpravidla nejdéle ze všech fází buněčného cyklu. Existenci kontrolního bodu podmiňují složité mechanismy na molekulární úrovni. Pokud tyto mechanismy selžou, mutace se neodstraní a následným dělením se vytvoří defektní dceřiné buňky. V některých případech takto vznikají dokonce **buňky nádorové**. Ty se vyznačují rychlým, nekontrolovaným dělením a většinou i výrazným zkrácením G₁-fáze.

2) S-fáze (též syntetická fáze) je obdobím, kdy probíhá **syntéza neboli replikace molekuly DNA**. Během tohoto děje se z jedné molekuly DNA vytvářejí dvě nové, které nesou zcela shodnou genetickou informaci. Následkem replikace DNA dochází ke zdvojení chromatidy a vytvoření **dvouchromatidového chromozomu**. Každá z chromatid pak nese jedno z nově vytvořených vláken DNA.

3) G₂-fáze je přípravou na jaderné dělení. Dochází v ní mimo jiné k syntéze specifických proteinů umožňujících průběh mitózy. Také v G₂ fázi mají reparační mechanismy možnost opravit některé mutace, proto se zde nachází další (oproti G₁ fázi však zřejmě méně významný) **kontrolní bod buněčného cyklu**. G₂-fázi končí období interfáze a buňka vstupuje do M-fáze.

4) Mitóza neboli **M-fáze** je ze všech fází buněčného cyklu časově nejkratší. Lze ji rozdělit do čtyř po sobě následujících fází:

a) Profáze je počátkem mitotického dělení. Jaderná membrána se postupně rozděluje na drobné měchýřky, takže chromozomy opouštějí jádro. V této fázi je pozorujeme jako tenké, nitkovité útvary, které se postupně zkracují a ztlušňují. Současně vznikají kolem zvláštních tělísek, tzv. **centriol**, nová vlákna budoucího dělicího vřeténka. Jsou tvořeny

proteinem označovaným jako **tubulin** a nazývají se **mikrotubuly**. Závěrem profáze se mikrotubuly připojují k centromerám chromozomů.

b) V metafázi lze již pozorovat typické **dělicí vřeténko**, na jehož opačných koncích (pólech) jsou centrioly. Uprostřed dělicího vřeténka leží chromozomy seřazené v centrální neboli **ekvatoriální rovině**. Termíny „póly“ a „ekvatoriální rovina“ vycházejí z přirovnání dělicí se buňky k zeměkouli – na severním a jižním „pólu“ jsou protilehlé vrcholy dělicího vřeténka (centrioly), zatímco v rovníkové oblasti (latinský výraz pro rovník je *equator*) leží chromozomy. V metafázi jsou chromozomy maximálně kondenzované, takže je lze velmi dobře odlišit a spočítat. To má velký význam zejména v klinické cytogenetice.

c) V anafázi se vlákna dělicího vřeténka postupně zkracují. Jejich tahem tak dochází k rozdělení každého dvouchromatidového chromozomu na **dva jednochromatidové chromozomy**, které se pak přesouvají k opačným pólům buňky. Každá z budoucích dceřiných buněk tak získá jeden z těchto geneticky shodných jednochromatidových chromozomů. Tento proces zajišťuje, aby do každého z budoucích dceřiných jader přešla zcela shodná genetická informace, jaká byla v původní mateřské buňce.

d) Telofáze je závěrem jaderného dělení. Chromozomy na opačných pólech buňky se opět protahují (dekondenzují, resp. despiralizují) a jsou postupně obkloповány jadernou membránou. Vznikají tak dceřiná jádra. Dělicí vřeténko se rozpadá.

Po jaderném dělení zpravidla následuje **vlastní dělení buňky** neboli **cytokineze**. Teprve úplným rozdělením buněčné membrány a cytoplazmy vznikají nové dceřiné buňky. U **živočichů** probíhá tento proces zaškrcením mateřské buňky. Po jejím obvodu se vytvoří zvláštní proteinový prsteneček, který se postupně zužuje, až buňku zcela rozdělí. V některých případech začíná cytokineze již v průběhu telofáze, jindy následuje až po jejím zakončení.

Z genetického hlediska je mitóza významným procesem, jenž umožňuje, aby dceřiné buňky získaly identické molekuly DNA. Udržuje se tak kontinuita genetické informace při vývoji organismu a v případě nepohlavního rozmnožování se tímto mechanismem přenáší i z generace na generaci.

Každá buňka prochází během svého vývinu větším počtem následných buněčných cyklů. V určité fázi svého vývoje však po ukončení mitózy vstoupí do tzv. **G₀-fáze**, v níž může setrvat až do konce života. V této fázi již neprobíhá replikace DNA ani buněčné dělení, jádro je trvale obaleno membránou a chromozomy nejsou pozorovatelné. Vstup do G₀ fáze může být podmíněn **diferenciací buňky**. Znamená to, že buňka je již zralá a začíná zastávat určitou funkci v organismu.

Buněčný cyklus je regulován složitými mechanismy, jichž se účastní velký počet různých proteinů (např. protoonkogenů, tumor-supresorů a dalších molekul). Mutace genů kódujících tyto proteiny může způsobit poruchu regulace těchto procesů a následný vznik nádorové buňky (blíže viz samostatný text).

Pohlavní rozmnožování a meióza

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Pro pohlavní (sexuální) rozmnožování je charakteristické **oplodnění** neboli **fertilizace**. Pod tímto pojmem rozumíme splynutí dvou **pohlavních buněk** neboli **gamet**, z nichž každá pochází od jiného rodiče. U člověka je samičí gametou **vajíčko** (velká, zpravidla kulovitá buňka) a samčí gametou **spermie** (malá buňka opatřená dlouhým bičíkem, který jí umožňuje rychlý pohyb). Jejich splynutím vzniká **zygota**.

V zygotě dochází ke kombinaci mateřské a otcovské genetické výbavy. Její jádro získá **dvě sady chromozomů**, z nichž každá pochází od jiného rodiče. Znamená to, že každý chromozom v jádře zygoty je přítomen ve dvou „vyhotoveních“, tedy v páru. Párové chromozomy mají stejnou morfologii a obsahují stejné geny, proto je označujeme jako **homologické**. Tento zdvojený počet chromozomů se nazývá **diploidní** a používá se pro něj zkratka **2n**. Stejný počet chromozomů mají i další buňky, které vzniknou mitotickým dělením zygoty. Proto jsou embryo, plod a posléze i celý organismus tvořeny tělními neboli somatickými buňkami o diploidním počtu chromozomů.

Při pohlavním rozmnožování získává nový jedinec vždy jeden homologický chromozom od otce a druhý od matky. Znamená to, že od **každého genu získá dvě alely**, z nichž **ovšem každá pochází od jiného rodiče**. Pokud má matka a otec rozdílné alely, vznikne u potomka nová kombinace alel, která se může projevit odlišným utvářením příslušného znaku. Tento proces je podkladem geneticky podmíněné variability a má evoluční význam. V klinické genetice lze tak vysvětlit složitý dědičný přenos některých chorob, které se neprojevují u rodičů, ale mohou postihnout potomky.

Z genetického hlediska je důležitý zejména **vznik pohlavních buněk** neboli **gametogeneze**. Protože somatické buňky mají diploidní počet chromozomů, je třeba, aby byl počet chromozomů v gametách **poloviční** neboli **haploidní** – zkráceně „n“.

Potřebnou redukcí počtu chromozomů z diploidního (2n) na haploidní počet (n) zajišťuje zvláštní jaderné dělení zvané meióza. Dochází k němu při gametogenezi, proto je v pohlavních buňkách každý chromozom reprezentován pouze jedním homologem.

Každému meiotickému dělení předchází normální G_1 , S a G_2 fáze buněčného cyklu. Stejně jako v případě mitózy vstupují i do meiózy diploidní buňky s dvouchromatidovými chromozomy. Meióza se však skládá ze dvou po sobě následujících jaderných dělení, jejichž některé fáze mají poněkud odlišný průběh.

První meiotické dělení označujeme jako **heterotypické** neboli **redukční**. Na jeho počátku stojí diploidní buňka s dvouchromatidovými chromozomy. Z genetického hlediska zaslouží pozornost zejména **profáze prvního dělení** (též profáze I), která probíhá poněkud složitěji než u mitózy.

Během první profáze se homologické chromozomy k sobě přikládají. Jejich propojení zprostředkuje tzv. **synaptonemální komplex**, proteinový aparát, který je někdy přirovnáván k zipu u oděvů. Úplným spojením homologických chromozomů vznikají tzv. **bivalenty**. Název „bivalent“ vychází ze skutečnosti, že útvar je tvořen dvěma chromozomy. V bivalentech dochází k významnému procesu nazývanému **crossing-over** (čti „krosing-ouvr“). Při tomto ději se vzájemně vyměňují části chromatid mezi homologickými chromozomy, takže dochází i k novým kombinacím alel. V závěru první profáze se homologické chromozomy od sebe začínají oddělovat a synaptonemální komplex zaniká. Současně se rozpadá i jaderný obal.

V **metafázi prvního dělení** se páry homologických chromozomů (původní bivalenty) shromažďují v ekvatoriální rovině a připojují na vznikající dělicí vřeténko podobně jako při mitóze. Rozchod chromozomů během **anafáze** však probíhá jinak než v případě mitotického dělení. Vlákna dělicího vřeténka od sebe neoddělují chromatidy dvouchromatidových chromozomů, ale celé chromozomy z bývalých bivalentů. **Do nových dceřiných jader tak přechází vždy jeden homologický chromozom z původního páru.**

Telofáze prvního meiotického dělení probíhá stejně jako u mitózy. V jejím závěru vznikají dvě nová dceřiná jádra, z nichž každé obsahuje haploidní počet dvouchromatidových chromozomů.

Dceřiné buňky pak vstupují do **druhého meiotického dělení** označovaného též jako **homeotypické** nebo **ekvační**. Jde v podstatě o mitózu, sloužící k rozdělení dvouchromatidových chromozomů na jednochromatidové.

Po profázi druhého dělení, které probíhá stejně jako u mitózy, se chromozomy opět shromáždí v ekvatoriální rovině. Dělicí vřeténko je pak **rozdělí na jednochromatidové chromozomy**, které putují k opačným pólům. V telofázi vzniknou nová dceřiná jádra, z nichž každé obsahuje haploidní počet jednochromatidových chromozomů. **Z jedné mateřské diploidní buňky vzniknou po dvou meiotických děleních čtyři dceřiné haploidní buňky.**

Vzhledem k tomu, že v gametách je každý chromozom přítomen jen v jedné kopii, **získává zygota od každého rodiče jeden z homologických chromozomů.** V jejím jádře se kombinuje polovina genetické výbavy od matky a polovina genetické výbavy od otce. **Zygota se při svém dalším vývoji dělí mitoticky**, takže genetická výbava vzniklá při oplození zůstává zachována ve všech buňkách organismu.

Výběr jednotlivých homologických chromozomů do gamet je zcela náhodný a připomíná tažení čísel v loterii. Možnosti kombinací rodičovských chromozomů v zygotě jsou tak velmi široké. Spolu s chromozomy se vzájemně **kombinují také jednotlivé alely**. Proto vykazuje potomstvo **výraznou variabilitu**. Dalším procesem, jenž přispívá ke vzniku nových kombinací alel, je **crossing-over**.

Poruchy meiózy mohou být příčinou vzniku chromozomových aberací, které pak postihují potomstvo. K častým defektům patří zejména tzv. **nondisjunkce**, neboli chybný rozchod chromozomů v prvním, resp. druhém meiotickém dělení. Nondisjunkce vedou ke vzniku gamet o abnormálním počtu chromozomů. Nejčastějšími aberacemi jsou **dizomie** (daný chromozom je přítomen ve dvou kopiích, a proto gameta má o jeden chromozom více) a **nulizomie** (daný chromozom chybí a gameta má o jeden chromozom méně).

Oplodněním gamety s abnormálním počtem chromozomů normální gametou vzniká zygota a posléze i jedinec s chromozomovou aberací. Chybění jediného chromozomu či přítomnost nadbytečného chromozomu způsobí většinou závažné vývojové poruchy, které mohou vést ke spontánnímu potratu nebo k narození těžce postiženého dítěte.

Poruchy struktury chromozomů způsobuje tzv. **nerovnoměrný crossing-over** – případ, kdy mezi homologickými chromozomy nedojde k výměně stejně dlouhých segmentů. Znamená to, že po tomto nreciprokém crossing-overu bude určitý úsek na jednom chromozomu chybět, zatímco na druhém bude zdvojený (duplikovaný). Tyto změny vedou v některých případech ke vzniku tzv. **mikrodelečních syndromů**.

Spermatogeneze a oogeneze

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

U člověka je samičí gametou **vajíčko** (velká, zpravidla kulovitá buňka) a samčí gametou **spermie** (malá buňka opatřená dlouhým bičíkem, který jí umožňuje rychlý pohyb). Samčí i samičí pohlavní buňky vznikají stejným mechanismem, jehož základem je meióza. U každého pohlaví má však konkrétní průběh meiotického dělení svá specifika a odlišnosti, které se netýkají jen morfologie dceřiných buněk, ale také časového průběhu jednotlivých fází.

Spermatogeneze

Pod pojmem **spermatogeneze** rozumíme vznik samčích pohlavních buněk neboli **spermii**. U mužů začíná tento proces v období puberty a pokračuje zpravidla až do konce života. Výchozí buňkou je diploidní **primární spermatocyt**. Prvým meiotickým dělením vznikají dva haploidní **sekundární spermatocyty**. Druhým meiotickým dělením se z každého z nich vytvoří dvě nezralé pohlavní buňky zvané **spermatidy**. Ty postupně získávají charakteristický tvar (aniž by se dále dělily) a přeměňují se na **funkční spermie**. Výsledkem meiotického dělení jednoho primárního spermatocytu jsou **čtyři spermie**.

Oogeneze

Vajíčko neboli **oocyt** vzniká procesem zvaným **oogeneze**. Na rozdíl od spermatogeneze začíná oogeneze u ženy již před jejím narozením. Diploidní **primární oocyty** přítomné ve vaječnících plodu vstupují do profáze prvního meiotického dělení, v jejímž závěru se však meióza zastaví. V tomto tzv. diktyotenním stádiu setrvávají oocyty velmi dlouhou dobu. Po dosažení pohlavní dospělosti začíná probíhat **menstruační cyklus**. Během tohoto cyklu obnovuje zpravidla jeden z primárních oocytů (nebo několik primárních oocytů) meiotickou aktivitu a dokončuje první dělení. V jeho závěru vznikají (na rozdíl od spermatogeneze) dvě značně odlišné haploidní buňky. Prvou z nich je **sekundární oocyt**, jenž vstupuje do druhého meiotického dělení. Druhou dceřinou buňkou je nevelké **první pólové tělísko**, které zůstává na povrchu oocytu (u člověka se toto pólové tělísko již nedělí).

V metafázi druhého meiotického dělení je sekundární oocyt schopen oplození. Po vstupu spermie dokončí jeho jádro meiózu. Vzniká **zralý oocyt** a **druhé pólové tělísko**, které stejně jako první pólové tělísko zůstává na povrchu oocytu. Ani jedno z pólových tělísek však nemá význam jako pohlavní buňka.

Uvnitř oplozeného oocytu dochází ke splynutí obou rodičovských jader a vzniká **zygota**. Pokud sekundární oocyt není oplozen, zaniká, aniž by dokončil druhé meiotické dělení. Výsledkem meiotického dělení primárního oocytu je (na rozdíl od spermatogeneze) pouze **jediná funkční pohlavní buňka a dvě pólová tělíska**.

Riziko nondisjunkčních vad

Z klinického hlediska je důležité, že se **stoupajícím věkem ženy se u primárních oocytů zvyšuje riziko meiotické nondisjunkce** (tj. chybného rozchodu chromozomů do dceřiných buněk). Příčinou je zřejmě značná časová prodleva od započetí vývinu vajíčka až k jeho dozrání. Jak je známo, všechny primární oocyty vstupují již před narozením dívky do prvního meiotického dělení a v diktyotenní fázi setrvávají tak dlouho, dokud neproběhne ovulace. Do té doby může vývin vajíčka ovlivnit mnoho negativních faktorů, takže pravděpodobnost

chybného rozchodu chromozomů stoupá. To je také důvod, proč se dítě s Downovým syndromem (trizomií 21) narodí častěji starším matkám. Podobné závislosti byly pozorovány i u jiných chromozomových aneuploidií (např. u Edwardsova a Patauova syndromu). Toto riziko stoupá zejména **po 35. roce života**, proto se všem těhotným ženám od tohoto věku výše navrhuje možnost **prenatálního chromozomového vyšetření plodu**. Pokud se týká věku otce, zdá se, že má na výši rizika nondisjunkčních vad daleko menší vliv.

Centrální dogma molekulární biologie

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Genetická informace je obsažena v molekule DNA. Každý gen je **úsekem DNA** o konkrétní sekvenci **nukleotidů**. Podle tohoto „návodu“ se vytvoří příslušná ribonukleová kyselina neboli **RNA**, která opouští buněčné jádro. RNA má podobnou polynukleotidovou strukturu jako DNA, je však zpravidla jednořetězcová a liší se zčásti i v chemickém složení: Místo deoxyribózy obsahuje monosacharid ribózu (odtud přívlastek „ribonukleová“) a thymin je v RNA nahrazen jinou pyrimidinovou bází – konkrétně uracilem (blíže viz text o struktuře RNA).

V cytoplasmě se na molekulu RNA připojují ribozomy, v nichž se podle informací obsažených v RNA vytváří molekula určité bílkoviny. Vlákno RNA tedy slouží jako předloha neboli **matrice pro** syntézu polypeptidového řetězce. **Znamená to, že každý gen obsahuje informaci ke tvorbě konkrétního proteinu.** Výjimkou jsou geny kódující specifické funkční molekuly RNA (např. ribozomovou RNA a transferovou RNA).

Z předchozího textu vyplývá, že **genetická informace se přenáší z DNA do RNA a odtud do molekuly proteinu.** Zpětný přenos informace z proteinu do molekuly nukleové kyseliny není možný. Tyto poznatky jsou základem postulátu, který se nazývá **ústřední (též centrální) dogma molekulární biologie**. Tok informace mezi jednotlivým informačními makromolekulami lze vyjádřit jednoduchým schématem:

DNA ← DNA → RNA → protein

První šipka (←) značí syntézu neboli **replikaci DNA**, při níž dochází k přenosu genetické informace mezi molekulami DNA. Tento proces probíhá během S-fáze buněčného cyklu. Semikonzervativní průběh replikace (blíže viz samostatný text) zajišťuje, aby se do obou dceřiných jader dostaly shodné kopie DNA, tedy shodná genetická informace.

Druhá šipka (→) značí syntézu RNA podle předlohy (matrice) DNA. Tento proces se nazývá přepis neboli **transkripce**. U bakterií vzniká touto cestou přímo mediátorová RNA (mRNA), u eukaryot vzniká primární transkript (zvaný heterogenní nukleární RNA), z něhož dalšími úpravami vzniká funkční mRNA.

Třetí šipka (→) značí tvorbu proteinu podle matrice RNA. Tento proces se nazývá překlad neboli **translace**. Procesem tvorby proteinů neboli **proteosyntézou** se blíže zabývají samostatné texty věnované transkripci a translaci.

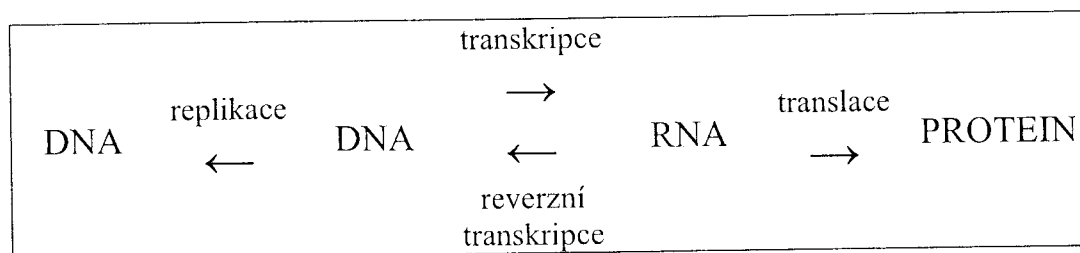
Ve výše uvedené podobě publikoval ústřední dogma v roce 1958 Francis H. Crick. Ačkoliv pozdější objevy tento postulát zpřesnily a doplnily (viz níže), jeho základní princip zůstává stále platný.

Za zmínku stojí, že výraz „dogma“ (pocházející od F. H. Cricka) byl v tomto slova smyslu použit ne-li chybně, pak přinejmenším nepřesně. Crick tímto pojmem míní poznatek, který je zjevně dokazatelný. Ve skutečnosti se však výraz „dogma“ (řecky δόγμα) používá spíše pro teologickou nebo filosofickou tézi, která je přesně formulována a nepřipouští žádné další námitky (a v podstatě ani nemusí být vědeckými postupy dokazatelná).

Reverzní transkripce

Objev **retrovirů** v roce 1970 poněkud rozšířil vžitou představu o ústředním dogmatu molekulární biologie. Ukázalo se, že po vstupu retroviru do buňky se **podle matrice virové RNA vytváří komplementární vlákno DNA**. Tento proces se nazývá zpětná neboli **reverzní transkripce** a je katalyzován zpětnou neboli **reverzní transkriptázou**. Tento enzym patří do skupiny DNA-polymeráz (lze jej rovněž označit jako RNA-dependentní DNA-polymerázu). Vzniklá dvojřetězcová DNA se většinou začleňuje do DNA hostitelské buňky

jako tzv. **provirus**. Podle provirové DNA se vytvářejí vlákna RNA, z nichž některá slouží k syntéze virových proteinů, jiná jako genofory budoucích virových částic (tzv. virionů). Buňka zpravidla dlouhodobě přežívá, ale stává se trvalým zdrojem infekce. K nejznámějším a nejnebezpečnějším retrovirům patří virus HIV způsobující obávané onemocnění AIDS. Objevem reverzní transkripce bylo zpřesněno a rozšířeno **ústřední dogma molekulární biologie** do této podoby:



Podle této představy probíhá přenos genetické informace nejen z DNA do RNA a dále do molekuly proteinu, ale také z RNA do DNA. To zároveň podporuje hypotézu, že prvotní organismy na Zemi mohly jako nosiče genetické informace využívat pouze RNA (jde o většinově akceptovanou hypotézu RNA světa). Teprve později se (zřejmě prostřednictvím reverzní transkripce) vytvořila DNA, jejíž význam u většiny organismů postupně převážil. Přesto je genofor některých virů tvořen pouze molekulami RNA.

Další upřesnění centrálního dogmatu

Ani výše uvedené schéma centrálního dogmatu však není zcela kompletní. Je třeba poznamenat, že RNA viry (s výjimkou retrovirů) jsou schopny syntetizovat svoji vlastní RNA. Jde o proces analogický replikaci DNA.

Další šipka by mohla existovat mezi DNA a proteinem, neboť v laboratorních podmínkách (in vitro) lze dokonce připravit proteiny přímo podle matrice DNA (bez spoluúčasti mRNA).

Závažným zásahem do příliš zjednodušeného schématu centrálního dogmatu byl rovněž objev **editování RNA**. Tento jev byl poprvé prokázán u lidského parazita *Trypanosoma brucei* a u příbuzného prvoka *Crithidia fasciculata*, který je jako neškodný komensál nalézán v tělech much. Editování RNA je proces, při němž dochází k dodatečné úpravě primárního transkriptu RNA prostřednictvím zvláštních molekul **gRNA** (*guide RNA*). Během této editace dojde k zařazení nových nukleotidů do molekuly RNA, takže vzniklá funkční mRNA pak již svojí sekvencí vůbec neodpovídá původnímu genu. Většina odborníků se shoduje v názoru, že jde o evolučně velmi starý proces dokumentující význam RNA při vzniku a vývoji živých systémů.

Genetický kód

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Při translaci (viz samostatný text) jsou aminokyseliny zařazovány do polypeptidového řetězce na základě informace obsažené v mRNA. Tato molekula obsahuje kódující trojice nukleotidů (tzv. kodony), k nimž nasedají svými antikodony molekuly tRNA nesoucí příslušné aminokyseliny. Znamená to, že každý kodon v mRNA kóduje zařazení určité konkrétní aminokyseliny do polypeptidového řetězce.

Tento systém přiřazení dané aminokyseliny k určitému tripletu se nazývá **genetický kód**. Jeho rozluštění se stalo základem moderního biologického poznání.

Genetický kód lze přirovnat k Morseově abecedě. Na rozdíl od morseovky však pracuje s větším počtem znaků (namísto čárek a teček má 4 nukleotidy, které rozlišujeme podle heterocyklických bází) a také podoba výsledného sdělení je odlišná. Kombinací čtyř nukleotidů můžeme vytvořit až $4^3 = 64$ **různých tripletů**. Proteosyntetický aparát však pracuje pouze s **20 aminokyselinami**. Níže uvedená tabulka, která udává výčet všech možných tripletů mRNA kódujících příslušné aminokyseliny, ukazuje, že jednotlivé aminokyseliny nejsou kódovány pouze jedním, ale většinou **dvěma až šesti různými triplety**. Výjimkami jsou methionin a tryptofan, jejichž zařazení řídí jediný kodon (AUG, resp. UGG).

Naopak žádný triplet nemůže kódovat více než jednu aminokyselinu. Tento stav se nazývá **degenerace genetického kódu**.

Pojem „degenerace“ nelze v tomto případě chápat jako úpadek. Jde o matematický termín, který vyjadřuje skutečnost, že pro každou aminokyselinu existuje zpravidla více než jeden specifický kodon. Např. v teoretické fyzice označujeme jako degenerovaný takový kvantový mechanický systém, který má pro dané hlavní kvantové číslo více různých vlnových funkcí.

Ne všechny triplety však slouží k zařazení aminokyselin. Trojice nukleotidů UAA, UAG a UGA mají význam jako koncové neboli terminační kodony označující závěr translace. Když ribozom dospěje k tomuto signálu (nazývanému též STOP kodon), polypeptidový řetězec se odpojí.

Zvláštní význam mezi triplety má také **kodon AUG**, který je **bifunkční**. Kromě toho, že kdekoli uvnitř řetězce mRNA kóduje zařazení metioninu, slouží také jako tzv. **iniciační kodon**. Označuje totiž na mRNA místo, odkud má v ribozomu začít translace. Proto je u eukaryot a archebakterií zařazován na počátek každého nově syntetizovaného polypeptidového řetězce právě methionin. U bakterií se na iniciační kodon AUG váže zvláštní **iniciační tRNA**, která přenáší **N-formylmethionin**. Tato aminokyselina je zde specifická pouze pro začátek polypeptidového řetězce.

Další významnou vlastností genetického kódu je jeho **univerzalita**. Znamená to, že přiřazení aminokyselin k jednotlivým tripletům je u všech organismů bez ohledu na fylogenetické zařazení stejné. Přesto byly vzácně zjištěny drobné odchylky. Příkladem jsou mitochondrie, kde kodon UGA zpravidla nemá terminační význam, ale je zde překládán jako tryptofan. Proto od univerzálního genetického kódu odlišujeme ještě tzv. **standardní genetický kód**, který je používán naprostou většinou organismů.

Výrazné shody v genetickém kódu u všech organismů podporují předpoklad, že **genetický kód se v průběhu evoluce vyvinul pouze jednou**. Většina teorií předpokládá, že se vytvořil zřejmě v období, kdy vznikly první živé organismy (tj. asi před třemi miliardami roků) a kdy

ještě nedošlo k rozrůznění organismů do jednotlivých říší a kmenů. Proto lze vznik genetického kódu dokonce ztotožnit se vznikem života.

Teorie vysvětlující mechanismus vzniku genetického kódu jsou velmi složité a každá má své příznivce a odpůrce. K častěji akceptovaným patří představa, že proteiny, resp. peptidy původně vznikaly přímo na vláknech RNA, a to spíše náhodně. Podle vlastností vzniklých peptidů však probíhala selekce praorganismů s těmito molekulami, přičemž úspěšné varianty byly evolučně konzervovány. K jejich konzervaci zřejmě přispěl vznik enzymů schopných rozpoznávat příslušný triplet a přiřadit k němu konkrétní aminokyselinu. Podle jiných představ genetický kód nevznikl postupnou evolucí, ale poměrně rychlou, snad náhodnou kombinací všech základních komponent translace (jde o hypotézu „náhodného zamrznutí“).

Genetický kód. Tabulka uvádí jednotlivé kodony v mRNA, zkratkami jsou zapsány jednotlivé aminokyseliny. Terminační kodony jsou označeny slovem STOP, iniciační kodon zkratkou „inic.“.

1. báze	2. báze				3. báze
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met., inic.	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Struktura DNA

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Základní molekulou umožňující uchování i přenos genetické informace je u organismů s buněčnou stavbou **deoxyribonukleová kyselina** (DNA). Nachází se v buněčném jádře i v některých dalších organelách. I když je (díky objevu německého chemika Johanna Friedricha Mieschera) známa již od druhé poloviny 19. století, její chemická struktura i klíčový význam pro přenos genetické informace byly objeveny daleko později.

DNA obsahuje **cukernou složku** (monosacharid 2-deoxy- β -D-ribózu), **dusíkaté báze** a **fosfátové skupiny** (PO_4^{3-}). Od 2-deoxy- β -D-ribózy, zkráceně **deoxyribózy**, získala DNA část svého názvu.

Základem molekuly DNA je **polynukleotidový cukrfosfátový řetězec**, v němž jsou částice deoxyribózy navzájem propojeny fosfátovými skupinami. Přitom je na každou částici deoxyribózy připojena jedna z dusíkatých bází.

Molekula deoxyribózy obsahuje 5 atomů uhlíku označených čísly 1' – 5'. Od strukturně velmi podobné ribózy se liší tím, že na uhlíku 2' má místo OH-skupiny navázaný pouze vodík. Na uhlíkové atomy v pozici 3' a 5' jsou navázány kovalentní **fosfodiesterovou vazbou** fosfátové skupiny. Proto má každý konec polynukleotidového řetězce jiné označení – buď 3' nebo 5'. Kromě toho je na uhlík 1' navázána kovalentní **N-glykosidickou vazbou** některá z **dusíkatých bází**.

Báze jsou heterocyklické sloučeniny odvozené od purinu nebo pyrimidinu. K **purinovým bázím** řadíme **adenin** (A) a **guanin** (G). Z **pyrimidinových bází** jsou v DNA obsaženy **cytosin** (C) a **thymin** (T). Spolu s fosfátovou skupinou a dusíkatou bází vytváří každá částice cukru **nukleotid**, což je základní jednotka polynukleotidového řetězce (obr. 3.1).

Podle konkrétní báze rozlišujeme nukleotidy adeninové, guaninové, cytosinové a thyminové.

Nukleotidy jsou v DNA uspořádány za sebou v určitém pořadí neboli **sekvenci**. Každý **gen** lze ztotožnit s určitým **úsekem DNA**, který má specifickou **sekvenci nukleotidů**. Sekvenci polynukleotidového řetězce zapisujeme zkratkami bází, jimiž jsou příslušné nukleotidy tvořeny, např.:

5' A A C T G C G A T G C C C T T A G C T A G G 3'

Čísla 5' a 3' označují volné konce uhlíků deoxyribózy, čímž udávají orientaci řetězce.

Popis stavby polynukleotidového řetězce však ještě zcela nevysvětlil strukturu DNA. Strukturu DNA objasnili roku 1954 americký biolog **James Dewey Watson** (narozen 1928) a britský fyzik **Francis Harry Compton Crick** (1916-2004), kteří společně pracovali v Cambridgi. Dospěli k závěru, že molekula DNA je tvořena **dvěma polynukleotidovými řetězci**, které jsou navzájem propojeny **vodíkovými můstky** mezi dusíkatými bázemi. Adenin se vždy páruje s thyminem (A–T) a guanin s cytosinem (G–C). Proto jsou uvedené báze navzájem **komplementární**. Dvojřetězcový útvar není rovinný, ale je prostorově uspořádán do **šroubovice**.

Polynukleotidové řetězce v DNA jsou **antiparalelní**. Znamená to, že jeden z nich je orientován ve směru 5' – 3', zatímco protější řetězec opačně, tedy ve směru 3' – 5'. Dvojřetězcovou molekulu DNA označujeme zkratkou **dsDNA** (z anglického „*double stranded*“).

Komplementarita bází vysvětluje, proč je v každé dvojšroubovici dsDNA **počet purinových nukleotidů rovný počtu pyrimidinových nukleotidů**. Víme-li, že se adenin páruje

s thyminem, je jasné, že poměrné zastoupení adeninu (resp. adeninového nukleotidu) bude stejné jako zastoupení thyminu (resp. thyminového nukleotidu). Stejně tak se obsah guaninu rovná obsahu cytosinu. Sekvenci obou polynukleotidových řetězců v určitém úseku dsDNA lze proto zapsat:

```

5' A C A T G C G A T G C C C T T A G C T A G G 3'
3' T G T A C G C T A C G G G A A T C G A T C C 5'

```

Číslo 3' a 5' udávají vzájemnou orientaci antiparalelních řetězců (viz výše).

Nukleotid není jen základní složkou DNA, ale stal se i délkovou jednotkou. Délku genu nebo jiné sekvence v DNA zpravidla vyjadřujeme počtem nukleotidových párů. Tyto jednotky označujeme jako **páry bází** (míněny páry komplementárních bází v nukleotidech), zkratkou „bp“ (z anglického „*base pairs*“). Většina genů však dosahuje délky několika tisíc až milionů párů bází, proto v praxi zpravidla pracujeme s odvozenými jednotkami kbp („kilobáze“) nebo Mbp („megabáze“). Převodní vztah je stejný jako u fyzikálních veličin:

$$1 \text{ kbp} = 10^3 \text{ bp}$$

$$1 \text{ Mbp} = 10^3 \text{ kbp} = 10^6 \text{ bp}$$

Podobně vyjadřujeme délku úseků v molekule jednořetězcové RNA v bázích (tj. počtem nukleotidů nesoucích báze). V tomto případě používáme zkratku „b“ (resp. kb nebo Mb).

Vodíkové vazby mezi komplementárními bázemi způsobují, že dvojřetězcová molekula DNA je velmi stabilní útvar. Rozrušení vodíkových můstků a následné úplné oddělení (disociaci) řetězců lze však vyvolat působením **zvýšené teploty** (kolem 94-96 °C). Stejně účinky mají také některé specifické enzymy nebo jiné sloučeniny (např. hydroxidy, močovina, formamid). Kromě uvedených látek se k tomuto účelu v laboratořích často používají tzv. **chaotropní soli**, jejichž ionty rozrušují vodíkové vazby.

Děj, při němž dochází k oddělení polynukleotidových řetězců, se nazývá **denaturace DNA**. Po úplné denaturaci je v roztoku přítomna pouze jednořetězcová DNA neboli **ssDNA** (z anglického „*single stranded*“).

Každá molekula dsDNA má určitou denaturační teplotu, kterou vyjadřujeme hodnotou T_m (z anglického *melting temperature* – doslova teplota tání). Jde o teplotu, při níž je dvojřetězcová molekula DNA denaturována z 50 %.

Pokud denaturační podmínky pominou (např. při ochlazení nebo změně chemického složení roztoku), komplementární řetězce ssDNA se opět spojí a vzniká dsDNA. Dochází k tzv. **renaturaci** (též **reasociaci**) DNA. Proces denaturace a renaturace lze tak vyjádřit jednoduchými rovnicemi:



Procesů denaturace a renaturace se velmi často využívá v **molekulárně biologické diagnostice**. Na jejich bázi jsou založeny např. **hybridizační metody**.

Struktura genu a genová exprese

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Geny lze považovat za **základní jednotky genetické informace**. Jsou tvořeny sekvencemi DNA, podle nichž se syntetizují molekuly ribonukleových kyselin, popř. proteinů. Podle toho dělíme geny do **dvou základních skupin**:

a) Strukturní geny, které obsahují informace o primární struktuře **proteinů**. Patří k nim zejména:

- geny kódující proteiny se **stavební funkcí** (tj. základní složky cytoskeletu a mezibuněčné hmoty; např. tubulin, kolagen, elastin, aktin, myosin atd.);
- geny kódující proteiny s **biochemickou nebo fyziologickou funkcí** (zejména enzymy, buněčné receptory, regulační proteiny, protilátky a některé hormony).

b) Geny pro funkční RNA, jejichž transkripční produkty nepodléhají translaci. Patří k nim především geny kódující transferovou RNA (**tRNA**) a ribozomovou RNA (**rRNA**).

Proces tvorby funkční RNA, resp. proteinu podle dané genové předlohy se nazývá **exprese genu**. U mnohobuněčných organismů je genová exprese velmi složitě koordinována a úzce souvisí s funkcí, kterou daná buňka vykonává. Proto mezi buňkami, resp. tkáněmi existují výrazné rozdíly v aktivitě specifických genů. Některé geny jsou aktivní pouze v určitých typech buněk nebo tkání. V tomto případě jde o tzv. **tkáňově specifické** neboli „**luxusní**“ geny.

Jiné geny mají klíčový význam pro udržení životních funkcí, a proto jsou exprimovány ve všech buňkách bez rozdílu. Tyto geny označujeme jako **provozní**, v angličtině „**housekeeping genes**“.

Struktura genu a regulace genové exprese u eukaryot

Na úrovni DNA je gen ohraničen **regulačními oblastmi**. Počátečním úsekem je **promotor**, jehož sekvence zpravidla není přepisována, ale lokalizuje místo zahájení transkripce.

Promotory obsahují **specifické sekvence** (tzv. **boxy**), které jsou u eukaryot rozeznávány specifickými proteiny souhrnně označovanými jako **transkripční faktory**. Přítomnost těchto proteinů v promotorové oblasti umožňuje nasednutí RNA-polymerázy a zahájení transkripce. Transkripční faktory mají indukční význam a jejich navázání na DNA je nezbytným předpokladem k zahájení syntézy mRNA. Mnohé z těchto proteinů ovlivňují míru transkripce daného genu, takže se uplatňují i při **regulaci genové exprese**.

Promotory luxusních genů obsahují zpravidla tzv. „**TATA-box**“. Tento úsek je tvořen sekvencí 5'-TATAAAA-3' nebo jejími variantami. Nachází se přibližně 26 – 34 bp před místem, kde začíná transkripce. Geny kódující provozní proteiny mají místo toho jeden nebo více „**CG-boxů**“, které obsahují sekvenci 5'-GGGCGG-3', popř. její varianty. Jiným obecným promotorovým prvkem je „**CAAT-box**“ (např. 5'-GGCCAATCT-3'), ležící většinou 80 bp před místem zahájení transkripce. Kromě toho se v různých vzdálenostech od přepisovaného úseku vyskytují také tzv. **enhancerové** a **silencerové** sekvence, na něž se vážou další proteinové regulační faktory, které rovněž interagují s promotorem.

Za promotorem leží vlastní **transkripční jednotka**, která obsahuje informaci k syntéze primárního transkriptu RNA (hnRNA). Lze ji rozčlenit na **exony** a **introny** (blíže viz samostatný text o posttranskripčních úpravách hnRNA).

Transkripční jednotka je zakončena **terminátorem**. Tímto pojmem označujeme další regulační oblast, po jejíž transkripci se RNA-polymeráza od matricového řetězce DNA

odpojí. Stejně jako v případě promotoru se ani terminátorová sekvence neuplatňuje při syntéze proteinové molekuly, neboť jí zpravidla předchází terminační kodon.

Regulace genové exprese u bakterií

U bakterií bývá (na rozdíl od eukaryot) často jediný promotor společný pro několik za sebou následujících genů. Ty pak vytvářejí ucelenou transkripční jednotku, kterou nazýváme **operon**. Při transkripci se z operonu přepisuje jediná molekula mRNA obsahující informace všech genů a teprve v ribozomech dochází k jejímu překladu do molekul jednotlivých proteinů. Geny tvořící operon mají také **společný terminátor**.

Za operonovým promotorem následuje ještě další regulační sekvence zvaná **operátor**. Jde o cílovou oblast, na niž se váže regulační protein zvaný **represor**, jenž za určitých podmínek znemožňuje transkripci. Represor zpravidla blokuje navázání RNA-polymerázy k promotoru nebo zabraňuje jejímu přesunu po matricovém vlákně DNA od promotoru ke strukturním genům. Působení represoru je podmíněno spoluúčastí dalších molekul, které se vážou na jeho molekulu, čímž mění jeho aktivitu. Mezi těmito sloučeninami rozlišujeme:

a) **induktory**, které svojí vazbou represor **inaktivují**, takže po jejich navázání dojde k odpojení represoru od operátorové sekvence a k zahájení transkripce;

b) **korepresory**, jejichž vazba represor naopak **aktivuje**, takže se váže na operátor a zastavuje transkripci.

Funkci induktorů, resp. korepresorů zastávají různé organické sloučeniny, které jsou výchozími složkami nebo naopak produkty biochemických procesů v buňce. Patří k nim např. některé sacharidy nebo aminokyseliny. Tyto látky mají většinou úzký funkční vztah ke genům, které jsou v operonu přítomny. Nežádá se o produkty, vzniklé působením enzymů, jejichž geny jsou součástí příslušného operonu.

Replikace DNA

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Procesem, jenž předchází každému jadernému, resp. buněčnému dělení, je syntéza neboli **replikace DNA**, jež probíhá v **S-fázi** buněčného cyklu. Před jejím zahájením (v G_1 -fázi) dochází k **reparačním procesům** (opravám molekul DNA), které výrazně snižují frekvenci mutací. Současně se v buňce vytvoří velké množství **deoxynukleosidtrifosfátů** (dále jen **dNTP**), které jsou základními kameny pro syntézu nového polynukleotidového řetězce. Pro replikaci DNA jsou nezbytné deoxyadenosintrifosfát (**dATP**), deoxyguanosintrifosfát (**dGTP**), deoxycytidintrifosfát (**dCTP**) a deoxythymidintrifosfát (**dTTP**).

Název „replikace“ pochází od slova „replika“ (tj. otisk, popř. odpověď). V umění rozumíme pod tímto pojmem nově vytvořenou variantu od již existujícího díla (např. novou repliku od dříve vzniklé sochy). Představy o tom, jak se vytváří „replika“ DNA byly v minulosti různé. Původně se předpokládalo, že podle sekvence nukleotidů v molekule mateřské DNA vzniká zcela nová, dceřiná dvojšroubovice, která je přesnou kopií původní molekuly. Experimenty využívající radioaktivně značených dNTP však prokázaly, že **každá dceřiná molekula DNA je tvořena dvěma vlákny rozdílného původu**. Jedno z nich je **původním vláknem mateřské molekuly**, zatímco druhý polynukleotidový řetězec se nově vytváří během replikace.

Proces replikace začíná **oddělením vláken mateřské DNA**. Oba tyto řetězce slouží jako **matrice** neboli **templáty pro tvorbu nových vláken**. Znamená to, že ke každému nukleotidu mateřského řetězce se na základě pravidel o párování bází přiřazuje komplementární nukleotid. Následným spojením těchto nukleotidů vzniká nový řetězec, který spolu s mateřským vláknem vytváří dvojšroubovici. Do každé dceřiné buňky pak přechází **dvojšroubovice tvořená jedním původním a jedním novým řetězcem DNA**. Proto říkáme, že proces replikace DNA je **semikonzervativní**. Tím je zajištěno, aby jádra obou budoucích dceřiných buněk získala **zcela shodnou genetickou informaci**.

Replikace DNA se účastní několik enzymů, z nichž nejdůležitější jsou **DNA-polymerázy**. Tyto enzymy katalyzují vznik nových vláken DNA. Jako zdroje budoucích nukleotidů slouží dNTP, které se při připojení k novému polynukleotidovému řetězci štěpí podle rovnice:



Zkratka **dNMP** označuje deoxynukleosidmonofosfát, který je jakožto nukleotid zařazen do nového polynukleotidového řetězce. Chemickou energii potřebnou k jeho připojení získává buňka současným hydrolytickým odštěpením **pyrofosfátu** ($\text{P} \sim \text{P}$).

Je třeba zdůraznit, že **syntéza DNA probíhá jen v jednom směru**. DNA-polymerázy připojují nový nukleotid vždy jen ke 3'-OH-skupině deoxyribózy, nikdy však k OH-skupině na 5'-konci. Proto syntéza nového řetězce probíhá pouze ve směru $5' \rightarrow 3'$ a nikoli opačně. Vzhledem k tomu, že jsou vlákna DNA antiparalelní, je průběh replikace na každém z nich poněkud odlišný. Na vlákně mateřské DNA orientovaném ve směru $3' \rightarrow 5'$ probíhá syntéza komplementárního polynukleotidového řetězce kontinuálně, neboť nukleotidy nového vlákna se zařazují ve směru $5' \rightarrow 3'$. Toto vlákno označujeme jako **vedoucí řetězec**.

Na opačném mateřském vlákně ($5' \rightarrow 3'$) je však syntéza výrazně pomalejší, neboť komplementární řetězec se vytváří diskontinuálně po drobných, zpočátku oddělených úsecích

zvaných **Okazakiho fragmenty**. Byly pojmenovány po svém objeviteli, jímž byl japonský biolog **Reiji Okazaki** (1930 – 1975).

Každý Okazakiho fragment vzniká ve směru 5'→3' vždy po rozpletení určitého úseku dvojšroubovice. Jednotlivé fragmenty jsou postupně spojovány působením enzymu zvaného **DNA-ligáza**. Proto replikace DNA probíhá **semidiskontinuálně** (na mateřském řetězci 3'→5' kontinuálně, na opačném řetězci diskontinuálně).

Začátek a průběh replikace je u prokaryotické a eukaryotické buňky poněkud rozdílný:

a) Na prokaryotickém chromozomu tvořeném kružnicovou DNA existuje zpravidla jediné místo, tzv. **replikační počátek** neboli lokus **ori** (od anglického „*origin*“). Odtud postupuje syntéza DNA v obou směrech po celém obvodu kružnicové molekuly.

b) U eukaryotických buněk, které mají daleko rozsáhlejší genetickou výbavu, která je navíc segmentována do většího počtu chromozomů, není replikace z jediného počátečního bodu možná. Proto je eukaryotický genom rozdělen na větší počet současně se replikujících jednotek, tzv. **replikonů**, z nichž každý má svůj vlastní replikační počátek.

Na bázi replikace DNA je založena snad nejznámější a nejvyužívanější molekulárně biologická metoda zvaná **polymerázová řetězová reakce** neboli **PCR** (z anglického „*Polymerase Chain Reaction*“). Slouží ke zmnožení neboli **amplifikaci** specifických úseků DNA. V současnosti má klíčový význam při diagnostice mnoha geneticky podmíněných chorob, využívá se však i ve forenzní (soudní) medicíně a při analýze DNA izolované z archeologického materiálu.

Transkripce

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Proteosyntéza je základním procesem, jímž se informace obsažená v DNA převádí do podoby konkrétního znaku. Skládá se ze dvou základních procesů, jimiž jsou:

1. Transkripce – syntéza RNA podle matrice DNA.

2. Translace – syntéza proteinu podle matrice RNA.

Nezbytnými prostředníky jsou při těchto dějích molekuly **ribonukleové kyseliny** neboli **RNA**.

Proces proteosyntézy začíná **přepisem** neboli **transkripcí**. V této fázi se sekvence nukleotidů v daném genu přepisuje (transkribuje) do sekvence tzv. **mediátorové RNA** neboli **mRNA**, resp. jejího prekursoru. Stejným způsobem se syntetizují také další molekuly RNA: tj. **ribosomová RNA (rRNA)** a **transferová RNA (tRNA)**.

Syntéza RNA probíhá v buněčném jádře a katalyzuje ji enzym zvaný **RNA-polymeráza**. U prokaryot existuje pouze jeden typ RNA-polymerázy. U eukaryot známe tyto **tři typy RNA-polymeráz**:

– **Typ I**, jenž transkribuje geny pro rRNA.

– **Typ II**, který transkribuje všechny strukturní geny. Znamená to, že vytváří řetězce RNA (tzv. primární transkripty), které jsou po úpravách (tzv. sestřihu) využity k syntéze proteinů.

– **Typ III**, jenž transkribuje geny pro tRNA a některé molekuly rRNA

Matricí pro tvorbu RNA je jeden z řetězců DNA. Tento řetězec DNA se nazývá **negativní** a označujeme jej znaménkem „–“. Druhý (nepřepisovaný) řetězec odpovídá svojí sekvencí nově syntetizovanému vlákně RNA (pokud pomineme výměnu thyminu za uracil – viz samostatný text o struktuře RNA). Proto jej označujeme jako **pozitivní řetězec** a označujeme znaménkem „+“.

Iniciace (zahájení) transkripce

Signální sekvence DNA před genem, na kterou se váže RNA-polymeráza se nazývá **promotor**. Na promotor (především na vysoce konzervovaný úsek promotoru zvaný TATA box tvořený většinou 25–30 repeticemi TATATAATA) se naváží **transkripční faktory**, což jsou proteiny s regulačním významem. Většinou se uplatňují při spuštění transkripce.

Souhra většího počtu transkripčních faktorů je při zahájení transkripce nezbytná zejména u eukaryotických buněk. S transkripčními faktory vytváří složitý komplex také RNA-polymeráza. Tento komplex pak umožňuje nasednutí RNA-polymerázy na správné místo v templátovém vlákně DNA. Tím je přesně vymezen začátek transkripce.

U eukaryot mají kromě promotorů význam pro iniciaci transkripce RNA také úseky zvané **enhancery**. Jde o krátké konzervované sekvence DNA ležící často v poměrně velké vzdálenosti od přepisovaného genu.

Elongace transkripce

Při transkripci přiřazuje RNA-polymeráza jednotlivým deoxyribonukleotidům DNA **komplementární ribonukleotidy**. Ty vznikají štěpením **ribonukleotidtriofosfátů**: konkrétně adenosintrifosfátu (ATP), guanosintrifosfátu (GTP), cytidintrifosfátu (CTP) a uridintrifosfátu (UTP). Při transkripci se z ribonukleotidtrifosfátu odštěpuje pyrofosfát (P~P) a uvolněná chemická energie je využita k připojení příslušného nukleotidu do řetězce RNA.

Zařazené ribonukleotidy se kovalentně spojují a vytváří se z nich nový řetězec RNA. Podobně jako při syntéze DNA (viz text věnovaný replikaci) se řetězec RNA **prodlužuje ve směru 5'→3'**. U eukaryot se v průběhu elongace RNA-polymeráza na některých místech zastavuje

a transkripce pokračuje až po vazbě regulačního proteinu. Při transkripci dochází působením specifických proteinů také k přechodnému rozvolnění nukleohistonové struktury (tj. oddělení DNA od histonových jednotek).

Terminace (ukončení) transkripce

Když částice RNA-polymerázy dospěje až na konec přepisovaného genu, transkript RNA se odpojí. U eukaryot není přesně vymezený terminátor. Před koncem přepisované sekvence je polyadenylační signál (úsek, jenž se do RNA přepisuje jako AAUAAA). Tento polyadenylační signál se uplatňuje při posttranskripčních úpravách primárního transkriptu RNA.

Další osud molekul RNA

U prokaryot bývá výsledná mRNA polygenní. Znamená to, že jedna její molekula vzniká přepisem většího počtu genů. Tento transkript se již dále neupravuje a většinou je ihned využit jako matrice (tedy mRNA) pro syntézu bílkoviny. Na rozdíl od eukaryotické RNA má mRNA u prokaryot zpravidla jen velmi krátkou životnost, která se odhaduje na několik minut.

U eukaryot vzniká transkripcí tzv. primární transkript označovaný jako hnRNA, popř. pre-mRNA. Tato molekula podléhá ještě v jádře dalším úpravám: připojení methyguanosinové čepičky (na 5' konci), polyadenylace (na 3' konci) a sestřih neboli splicing (odstranění intronů) – blíže viz samostatný text. Polyadenylace a připojení čepičky slouží ke stabilizaci RNA, která pak přechází z jádra do cytoplazmy, kde je využita k syntéze proteinů (tzv. translaci).

Struktura RNA

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Syntéza proteinů neboli **proteosyntéza** je základním procesem, jímž se informace obsažená v DNA převádí do podoby konkrétního znaku. Nezbytnými prostředníky jsou při těchto dějích molekuly **ribonukleové kyseliny** neboli **RNA** (z anglického *ribonucleic acid*).

Podobně jako DNA je také RNA tvořena **polynukleotidovým (cukr-fosfátovým) řetězcem**. RNA však namísto deoxyribózy obsahuje monosacharid **ribózu**, jejíž jednotky jsou stejně jako v DNA navzájem propojeny přes fosfátové skupiny prostřednictvím fosfodiesterových vazeb.

Na ribózovém uhlíku v pozici 1' je navázána **dusíkatá báze**. Od DNA se RNA odlišuje výskytem pyrimidinové báze **uracilu** (zkratka „U“) namísto thyminu. Uracil tvoří stejně jako thymin komplementární pár s adeninem (A-U). Ostatní báze (adenin, guanin, cytosin) jsou v obou nukleových kyselinách stejné.

RNA vytváří velmi rozmanité útvary. Některé molekuly jsou **jednořetězcové a lineární**, jiné mají složitější stavbu, v níž se zčásti uplatňují **dvojřetězcové struktury**. Příkladem je transferová RNA (viz dále).

RNA (zejména díky OH skupinám v poloze 2' i 3') může sama vykonávat i některé enzymatické funkce (např. štěpení esterové vazby, katalýza polymerace). Říkáme, že má funkci **ribozymu**. Tento poznatek vede k předpokladu, že u prvních praorganismů byla nositelkou genetické informace právě RNA a DNA se vyvinula až dodatečně (jde o nejčastěji akceptovanou hypotézu tzv. RNA-světa).

Typy RNA v buňkách

Podle funkce a struktury rozeznáváme tyto **typy RNA**:

1) Mediátorovou neboli informační RNA, ve zkratce **mRNA**; v angličtině též messenger RNA. Tato molekula vzniká transkripcí nukleotidové sekvence z DNA. Jejím hlavním úkolem je přenos genetické informace z jádra do cytoplazmy. Zde slouží jako předloha (templát) pro syntézu proteinů. U eukaryot se transkripcí vytváří nejdříve tzv. primární transkript častěji označovaný jako hnRNA (heterogenní jaderná RNA). Sestřihem této molekuly (tj. odstraněním intronů) vzniká funkční mRNA.

2) Transferovou RNA, ve zkratce **tRNA**. Její funkce je přenos (transfer) aminokyselin do ribozomu při proteosyntéze. Má poměrně složitou sekundární strukturu (tzv. strukturu jetelového listu), v níž se kombinují jednořetězcové a dvojřetězcové útvary. Na každé molekule tRNA proto rozlišujeme několik klíčků a ramen, z nichž nejdůležitější je akceptorové rameno nesoucí příslušnou aminokyselinu navázanou ve formě aminoacylu a antikodonové rameno nesoucí specifickou trojici nukleotidů, tvořící tzv. **antikodon**. Tímto antikodonem se pak páruje s příslušným tripletem na mRNA, jemuž říkáme kodon. Párování antikodonu s kodonem je významným molekulárním mechanismem umožňujícím zařazení správné aminokyseliny podle pravidel genetického kódu.

3) Ribozomovou RNA, ve zkratce **rRNA**. Tvoří stavební složku ribozomových podjednotek. Vyskytuje se několik velikostně odlišných typů. Prekruzorová molekula (pre-rRNA) se u člověka syntetizuje v jadérku, kde dochází k transkripci genů z krátkých ramének

akrocentrických chromozomů. V jádře dochází k její další maturaci vedoucí ke vzniku funkční rRNA. Hotový eukaryotický ribozom obsahuje v průměru 63 % rRNA, zbytek tvoří různé proteiny.

Eukaryotický ribozom je větší než ribozom u prokaryot. Tvoří jej dvě podjednotky:

- **velká 60S^{*)} podjednotka**, obsahující tři ribosomové ribonukleové kyseliny, konkrétně 28S, 5,8S a 5S rRNA a dále 45 % proteinů;

- **malá podjednotka** skládající se z molekuly 18S rRNA a 33 % proteinů.

4) Malé jaderné RNA (snRNA) se nacházejí v jádrech eukaryotních buněk. Se specifickými proteiny tvoří nukleoproteinové částice označované jako **malé jaderné ribonukleoproteiny** (*small nuclear ribonucleoproteins* – ve zkratce **snRNP**; v odborném žargonu též „*snurps*“). Účastní se sestřihu hnRNA a udržování telomer.

5) Malé jadéřkové RNA (snoRNA), které se účastní modifikace a následné maturace molekul rRNA. Geny pro snoRNA se nacházejí v intronech jiných genů.

^{*)} **Poznámka:** Zkratkou S označujeme jednotku zvanou **Svedberg** (je pojmenována podle švédského chemika Theodora Svedberga), v níž se udávají hodnoty sedimentačního koeficientu. Výše sedimentačního koeficientu odpovídá rychlosti sedimentace v gravitačním nebo odstředivém silovém poli a je ve vztahu k velikosti částice (čím vyšší sedimentační koeficient, tím větší částice). V molekulární biologii a biochemii používáme sedimentační koeficient pro vyjádření velikosti některých částic, např. molekul ribosomové RNA nebo samotných ribosomových jednotek.

Posttranskripční úpravy RNA u eukaryot

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

U eukaryot se genetická informace přepisuje z DNA do vlákna RNA, které má charakter **primárního transkriptu**. Znamená to, že jej ještě nelze považovat za „hotovou“ mRNA. Toto vlákno označujeme heterogenní nukleární RNA neboli **hnRNA** (v některých učebnicích též **pre-mRNA**). Teprve následnými **posttranskripčními úpravami** vzniká z hnRNA funkční mRNA, která opouští jádro, vstupuje do cytoplazmy a následně do ribozomu.

Exony a introny

Většina eukaryotických genů obsahuje úseky zvané **introny**, které jsou z vlákna hnRNA vystřiženy ještě před translací. Výraz „intron“ (z latinského *intrō* – dovnitř) odráží skutečnost, že k odstranění těchto sekvencí dochází již **uvnitř buněčného jádra**. Funkční úseky, které nejsou z hnRNA vyštěpeny, a proto se uplatňují při syntéze proteinů, nazýváme **exony**. V mnoha eukaryotických genech nacházíme větší počet střídajících se exonů a intronů. Tyto geny označujeme jako **geny složené**. Odlišujeme je tak od **genů jednoduchých**, jejichž transkripce přímo vzniká funkční mRNA, která neobsahuje introny. Jednoduché geny nacházíme především v buňkách prokaryotického typu (tj. u bakterií a archeí), u eukaryot jsou vzácné.

Výzkum lidského genomu přinesl v posledních letech mnohé překvapivé výsledky. Jedním z nich bylo zjištění, že součet délek exonů se v jednotlivých genech příliš neliší. Přesto analýzy genomové DNA ukázaly, že délky celých genů mohou být značně rozdílné. K nejmenším patří gen kódující jeden z polypeptidových řetězců **hemoglobinu**, jehož délka činí pouhých 0,8 kbp.

Naopak nejdelším dosud identifikovaným lidským genem je **gen pro dystrofin**. Jeho sekvence „měří“ neuvěřitelných 2300 kbp (tedy 2,3 Mbp). Mutace tohoto genu vedou k těžkým svalovým postižením označovaným jako **muskulární dystrofie** (odtud název genu). Analýzy mRNA a proteinového produktu však ukázaly, že exonové sekvence představují pouze necelé 1 % délky dystrofinového genu. Podobných případů, kdy exony tvoří jen nepatrný zlomek celkové délky genu, je u eukaryotických organismů známo daleko více.

Odstranění intronů a zformování funkční molekuly mRNA je složitý proces. Podílí se na něm zvláštní **krátké molekuly jaderné RNA** označované jako **snRNA** (z anglického *small nuclear ribonucleic acid*), které jsou komplementární k intronovým sekvencím v hnRNA. Po jejich navázání dochází k enzymatickému vyštěpení intronu a následnému spojení sousedních exonových konců. Tento proces se nazývá **sestřih hnRNA** (anglicky **splicing**).

Polyadenylace

Před terminátorem eukaryotického genu se nachází zvláštní úsek označovaný jako **polyadenylační signál**. Tato sekvence se do hnRNA přepisuje jako AAUAAA. Asi 10 – 30 nukleotidů za tímto signálem je od hnRNA po sestřihu intronů odštěpena terminátorová sekvence. Na volný 3'-konec RNA připojuje enzym poly(A)-polymeráza 30 – 200 adeninových nukleotidů. Tento proces se nazývá **polyadenylace**.

Modifikace 5'-konce hnRNA

Také opačný, 5'-konec hnRNA prochází posttranskripční modifikací. Napojuje se na něj tzv. „**čepička**“ (anglicky „cap“) tvořená 7-methylguanosem. Tento nukleosid obsahuje metylovaný guanin a k 5'-konci RNA je navázán přes tři fosfátové skupiny. Také báze v následujících prvních dvou nukleotidech hnRNA bývají v některých případech metylovány.

Význam polyadenylace a připojení metylguanosiinové čepičky není zcela jasný. Předpokládá se však, že uvedené úpravy stabilizují mRNA při vstupu do cytoplazmy a chrání její molekulu před degradací působením některých enzymů.

Alternativní sestřih

Existence intronů vyvolává otázku, proč se tyto zdánlivě bezvýznamné sekvence v DNA vůbec vyskytují a proč jsou dokonce přepisovány do hnRNA. Dříve se předpokládalo, že introny jsou evolučními pozůstatky genomů jiných organismů (bakterií nebo virů), které kdysi pronikly do nitra původní eukaryotické buňky. Jeden z novějších výkladů vychází ze skutečnosti, že u některých genů byl prokázán tzv. **alternativní sestřih**. Znamená to, že rozsah úseků vyštěpených z primárního transkriptu není pevně dán. V některých případech jsou vystřiženy všechny introny, jindy jen některé. **Z jednoho genu tak vzniká několik molekul mRNA o různé délce a sekvenci**, takže každá kóduje jiný protein.

Proto transkripční jednotky, u nichž probíhá alternativní sestřih, fungují jako několik genů současně. Tento objev vysvětluje, proč bylo v genomu člověka a dalších eukaryotických organismů nalezeno daleko méně genů, než se původně předpokládalo. Existence alternativního sestřihu zřejmě urychlila evoluci eukaryí, neboť mutace v jediné transkripční jednotce ovlivnila strukturu několika různých proteinových produktů.

Translace

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Proteosyntéza se skládá se dvou základních procesů, jimiž jsou:

1. Transkripce – syntéza mediátorové RNA (mRNA) podle matrice DNA (blíže viz samostatný text).

2. Translace neboli překlad – syntéza proteinu podle matrice RNA.

Translace je konečným procesem proteosyntézy, při němž dochází k vlastní tvorbě proteinu. Pořadí (sekvenci) aminokyselin v proteinovém řetězci udává genetická informace přepsaná z DNA do mRNA.

Iniciace (zahájení) a elongace translace

Molekula mRNA vzniklá transkripcí (u eukaryot modifikovaná posttranskripčními úpravami – viz samostatný text) vstupuje z jádra do cytoplazmy, kde se připojuje k **ribozomům** (viz níže). Každý ribozom nasedá na 5'-konec řetězce mRNA, jenž odpovídá počátku příslušného genu v DNA. Od tohoto místa pak probíhá syntéza proteinové molekuly **podle matrice mRNA**. Tento děj je vlastní **translací neboli překladem genetické informace z nukleových kyselin do primární struktury proteinu**.

Jednotlivé aminokyseliny jsou do ribozomu transportovány prostřednictvím **transferové RNA neboli tRNA**. Název „transferová“ RNA pochází od slova transfer čili přenos. Vlákna tRNA jsou poměrně krátká – tvoří je pouze 74 – 95 nukleotidů. Přesto má tRNA relativně složité utváření. Komplementární nukleotidy jsou místy navzájem propojeny vodíkovými můstky, takže vlákno vytváří čtyři ramena. Tato sekundární struktura tRNA připomíná **jetelový trojlístek**. Jednotlivá ramena a smyčky molekuly se však navzájem přikládají k sobě a ve skutečnosti vytvářejí daleko složitější prostorový útvar – tzv. terciární strukturu.

Při proteosyntéze se uplatňuje tzv. **akceptorové rameno** tRNA, které obsahuje 3'-konec polynukleotidového řetězce. Na něj se před vstupem do ribozomu naváže příslušná aminokyselina. Další významnou strukturou je **antikodonové rameno** s antikodonovou smyčkou. Ta obsahuje trojici nukleotidů označovanou jako **antikodon**. Každý antikodon v tRNA je komplementární k příslušné trojici nukleotidů v mRNA, kterou nazýváme **kodon**. Při proteosyntéze dochází v ribozomu k přechodnému spojení mRNA a tRNA na základě párování antikodonových a kodonových nukleotidů.

Proteosyntézy se účastní minimálně 20 různých molekul tRNA, z nichž každá nese jednu z 20 aminokyselin. Každou tRNA označujeme zkratkou aminokyseliny, k jejímuž přenosu je určena – např. tRNA^{Ala} přenáší alanin, tRNA^{Val} přenáší valin, tRNA^{Leu} přenáší leucinu apod. Zjednodušeně lze říci, že zde platí jednoduchá zákonitost: kolik aminokyselin = tolik druhů tRNA.

Před vstupem do ribozomu se na 3'-konec molekuly tRNA naváže příslušná aminokyselina ve formě aminoacylu. Tato částice vzniká odštěpením skupiny OH z aminokyselinového karboxylu (COOH). Připojení aminokyselin k molekulám tRNA zprostředkují **aminoacyl-tRNA-syntetázy**. Každý z těchto enzymů je specifický pro určitou aminokyselinu, proto známe minimálně 20 různých typů aminoacyl-tRNA-syntetáz. K navázání aminokyseliny na tRNA je zapotřebí chemická energie, kterou získává enzym štěpením adenosintrifosfátu (ATP). Molekula tRNA s navázanou aminokyselinou pak přechází do ribozomu.

Ribozom je složitý nukleoproteinový útvar. Skládá se z **malé a velké podjednotky**, které se při navázání mRNA k menší podjednotce před zahájením translace spojují. V nitru ribozomu pak dochází ke kontaktu mRNA s tRNA a k následnému připojení aminokyseliny do peptidového řetězce. Proto má ribozom několik vazebných míst s rozdílnou funkcí. Patří k nim zejména:

a) **aminoacylové místo** (A-místo), do něhož vstupuje molekula tRNA s navázanou aminokyselinou. Antikodon tRNA se přitom páruje s kodonem mRNA.

b) **peptidylové místo** (P-místo) obsahující předchozí molekulu tRNA, na niž je navázán již vzniklý peptidový řetězec

c) **peptidyltransferázové místo**, kde dochází k připojení nové aminokyseliny ke stávajícímu peptidovému řetězci.

Původní tRNA, k níž byl polypeptidový řetězec navázán a která je nyní „prázdná“, opouští ribozom. Po připojení další aminokyseliny může být opět využita k syntéze bílkoviny.

Při translaci se mRNA v ribozomu postupně posouvá podobně jako magnetofonová páska. K jejím kodonům se přiřazují jednotlivé molekuly tRNA s příslušnými aminokyselinami. Znamená to, že **sekvence mRNA je „čtena“ po trojicích neboli tripletech nukleotidů**. Každý triplet je kodonem, který je komplementární k antikodonu příslušné tRNA. Proto jednotlivé triplety v mRNA určují zařazení konkrétních aminokyselin a jejich sekvence udává pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Tento systém přiřazení dané aminokyseliny k určitému tripletu se nazývá **genetický kód** a je mu věnován zvláštní text. Jeho rozluštění se stalo základem moderního biologického poznání.

Zvláštní význam mezi triplety má **kodon AUG**, který je bifunkční. Kromě toho, že kdekoli vnitř řetězce mRNA kóduje zařazení **methioninu**, slouží také jako tzv. **iniciační kodon**. Označuje totiž na mRNA místo, odkud má v ribozomu začít translace. Proto je u eukaryot a archebakterií zařazován na počátek každého nově syntetizovaného polypeptidového řetězce právě methionin.

U bakterií se na iniciační kodon AUG váže zvláštní iniciační tRNA, která přenáší modifikovanou aminokyselinu **N-formylmethionin**. Tato aminokyselina je u bakterií specifická pouze pro začátek polypeptidového řetězce.

Terminace translace a posttranslační úpravy

Pro závěr translace mají v mRNA klíčový význam kodony UAA, UAG a UGA, které označujeme jako **kodony terminační** (též STOP kodony). Tyto triplety nekódují žádnou aminokyselinu a jsou čteny jako „tečky“, resp. koncové signály. Když ribozom dospěje k některému z těchto signálů, polypeptidový řetězec se odpojí.

Vzniklý polypeptid, resp. protein pak podléhá ještě dalším, tzv. **posttranslačním úpravám**. Ty probíhají u eukaryot především v endoplazmatickém retikulu a v Golgiho aparátu. K nejčastějším posttranskripčním modifikacím patří glykosylace proteinů a také jejich další štěpení na funkční molekuly. Štěpení proteinů může probíhat také extracelulárně (příkladem je přeměna pepsinogenu na pepsin v žaludku a trypsinogenu na trypsin ve dvanáctníku).

Mutace a mutagenese

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Již roku 1901 dokázal holandský badatel Hugo de Vries, že genetická informace není neměnná. Za určitých podmínek může dojít k její změně neboli **mutaci**. Z hlediska vzniku rozlišujeme:

- 1) **spontánní mutace**, k nimž dochází zpravidla náhodně bez jakéhokoliv vnějšího vlivu (např. zařazením chybného nukleotidu při replikaci DNA);
- 2) **indukované mutace**, vyvolané přímým či nepřímým vlivem chemických látek, virů nebo fyzikálních faktorů, které souborně označujeme jako **mutageny**.

Mutageny a mutagenita

Obecně lze za mutagenní považovat všechny faktory, které chemicky mění strukturu DNA, popř. vyvolávají zlomy nebo jiné přestavby jejích molekul. Schopnost způsobit poškození DNA se nazývá **mutagenita** nebo též **genotoxicita**. Podle charakteru dělíme mutageny do tří skupin:

1) **Fyzikální mutageny**, k nimž patří zejména různé UV záření a ionizující záření. Přijetím energie při ozáření dochází k chemické přeměně nukleotidů nebo k rozrušení některých vazeb v DNA. Mutagenní účinek ionizujícího záření byl prokázán již r. 1927 **Hermannem Josephem Mullerem** (1860 – 1967).

2) **Chemické mutageny**, které chemicky modifikují složky DNA (způsobují např. deaminaci bází) a v některých případech se přímo vážou na báze jednotlivých nukleotidů.

3) **Biologické mutageny**, k nimž patří především **viry**. Virová DNA se za určitých podmínek může zařadit do genomu hostitelské buňky a přerušit tak některý z jejích genů.

Mutagenní neboli **genotoxické** účinky mají mnohé chemické látky, s nimiž se setkáváme v běžném životě. K nejběžnějším a nejnebezpečnějším patří **polycyklické aromatické uhlovodíky**, které vznikají jako produkt spalovacích procesů (zejména při spalování pevných paliv nebo při kouření cigaret). Po vstupu do organismu (nejčastěji vdechnutím) dochází k jejich metabolické přeměně na reaktivní produkty (zejména epoxidy), které se kovalentně vážou na báze nukleových kyselin. Mutagenní účinek byl prokázán také u některých **organických rozpouštědel, léků, barviv nebo pesticidů**.

Některé mutageny mají navzdory své nebezpečnosti velký význam pro vědecké poznání. V genetických laboratořích a šlechtitelských pracovištích se kromě **záření** využívají k **cílenému vyvolání mutací** také sloučeniny s prokázaným genotoxickým účinkem. Patří k nim např. **kyselina dusitá** (HNO_2), hydrogensířičitanový anion (HSO_3^-), hydroxylamin (NH_2OH) a také skupina organických sloučenin označovaných jako **alkylační činidla**. Mezi alkylační činidla řadíme deriváty uhlovodíků (alkanů), jejichž uhlovodíkový řetězec (alkyl) se po vstupu do buňky váže na báze nukleových kyselin. Tyto účinky vykazují např. alkylsulfáty, N-nitroso-sloučeniny a také yperit (viz výše). Mutagenní účinky mají rovněž tzv. **vřeténkové jedy** (např. kolchicin), které porušují dělicí vřeténko při mitotickém dělení. Důsledkem je vznik polyploidních buněk.

Testování genotoxicity

Od 60. let 20. století bylo vyvinuto nepřeberné množství metod umožňujících studium mutagenity chemických látek a dalších faktorů. Tyto **testy** využívají různých organismů (např. bakterií, kvasinek, buněčných kultur nebo laboratorních zvířat).

K nejčastějším metodám patří **Amesův test** (čti „Ejmsův“), vyvinutý profesorem Brucem Amesem z USA. Využívá nepatogenní kmen bakterie *Salmonella typhi murium*, jehož buňky

nejsou schopny syntetizovat aminokyselinu histidin. Neschopnost tvorby histidinu je podmíněna mutací v příslušném genu. Opětným působením mutagenní látky lze však u některých buněk vyvolat tzv. **zpětnou (reverzní) mutaci**, která defektní gen opraví. Bakterie tak opět získají schopnost syntézy histidinu.

Při experimentu se suspenze bakterií smísí s testovanou látkou a umístí na agarové **médium, které neobsahuje histidin**. Pokud je látka mutagenní, dojde u některých buněk k reverzní mutaci v histidinovém genu, takže přežijí a vytvoří kolonie. Počet těchto kolonií odpovídá mutagenní aktivitě a koncentraci testované látky. Pokud látka není genotoxická, k reverzní mutaci nedochází a bakterie v médiu bez histidinu zpravidla umírají.

Amesův test umožňuje orientační stanovení potenciálních genotoxických účinků chemických látek a jejich směsí. Využívá se i při studiu mutagenity složek životního prostředí, jako např. pitné vody, půdy nebo aerosolu z oblastí znečištěných průmyslovými zplodinami. Zjištění genotoxicity na bakteriích však nelze považovat za spolehlivý důkaz mutagenního účinku na lidský organismus. Pro zodpovědné posouzení reálného rizika je však třeba otestovat každou látku také jinými metodami.

Následky vzniku mutací

Fatální účinky má často odstranění jediného nukleotidu nebo jeho výměna (substituce) za nukleotid s jinou bází. Dochází tak ke změně genetické informace a hrozí nebezpečí, že příslušný protein bude syntetizován podle špatného „návodu“. Mutovaný gen často vytváří defektní protein, jehož aktivita je snížena, popř. může být i zcela nefunkční.

Někdy se mutace nemusí projevit změnou složení či aktivity proteinu, ale v míře jeho syntézy. Znamená to, že proteinový produkt mutovaného genu je sice funkční, ale vytváří se v abnormálně nízkém nebo abnormálně vysokém množství.

Působením mutací vznikají **nové formy** (alely) daného genu, které ovlivňují projev příslušného znaku. Mnohé mutace jsou škodlivé, neboť způsobují závažná **geneticky podmíněná onemocnění**, těžké vývojové vady, poruchy metabolismu, snížení reprodukčních schopností pacienta, nebo jeho úplnou sterilitu. Jsou známy i tzv. **letální mutace**, které jsou příčinou úmrtí jedince ještě před narozením (tj. ve stadiu embrya nebo plodu). Mutace některých genů mohou indukovat **vznik nádorů**. Proto lze každý prokázaný mutagen považovat za suspektní karcinogen.

Ne všechny mutace však mají negativní důsledky. Některé se vůbec neprojeví nebo způsobí vznik znaku, který nemá žádný negativní ani pozitivní význam (tzv. **neutrální mutace**). Jiné mutace mohou být dokonce pro své nositele přínosem, neboť zvyšují životaschopnost jedince, popř. jeho odolnost vůči nepříznivým vnějším vlivům. Tak se některé mutace **pozitivně uplatňují při evoluci organismů**.

Mutací nemusí být zasažen pouze jediný gen, ale také větší počet genů či dokonce celý chromozom, popř. všechny chromozomy v jádře buňky. Tyto tzv. **chromozomové aberace** jsou zvláštními formami mutací.

Vliv mutace na funkci proteinu

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Za mutaci považujeme jakoukoli náhodnou a neusměrněnou změnu DNA, která může postihnout genetickou výbavu organismu v různém rozsahu. Podle toho dělíme mutace do dvou základních skupin:

a) **Genové mutace** zasahují většinou jediný gen. Výjimkou nejsou ani tzv. **bodové mutace**, které mění pouze jeden nukleotidový pár.

b) **Chromozomové mutace**, kdy dochází ke změně počtu nebo struktury chromozomů (tj. numerické a strukturní aberace). Některé učebnice ještě vymezují jako zvláštní skupinu genomové mutace, které bývají chápány buď jako změna počtu chromozomů, anebo znásobení všech chromozomů.

Metody sekvenování odhalily na molekulární úrovni velké množství mutací, z nichž mnohé mají velmi závažné klinické projevy. Charakter těchto změn může být různý. Na úrovni DNA rozeznáváme čtyři základní typy mutací:

a) **Delece** je ztráta jednoho nebo více nukleotidových párů v DNA.

b) **Inzerce** (též **adice**) je zařazení nadbytečného nukleotidového páru.

c) **Substituce** je nahrazení určitého nukleotidového páru jiným párem nukleotidů.

d) **Amplifikace** je zmnožení určitého nukleotidu nebo znásobení skupiny nukleotidů. Jde v podstatě o zvláštní případ inzerce.

Každá z uvedených mutací může, ale nemusí ovlivnit funkci příslušného proteinu, který je mutovaným genem kódován. Záleží nejen na **rozsahu mutace** (tj. na počtu změněných nukleotidových párů), ale také na její **lokalizaci** a na tom, jak se mutovaná sekvence projeví v primární struktuře proteinu. Z těchto předpokladů vychází i následující klasifikace mutací.

Mutace se změněným smyslem (*missense mutations*)

Substituce často vedou k **mutacím měnícím smysl kodonu** (v angličtině „*missense mutation*“). Mutovaný kodon v tomto případě zařazuje do polypeptidu jinou aminokyselinu než tu, kterou kódoval původní nemutovaný triplet. V některých případech má záměna aminokyseliny v proteinu velmi výrazný fenotypový projev, jindy dochází pouze k nepatrné změně biologické aktivity proteinového produktu. Záleží na tom, zda je mutací zasaženo např. katalytické centrum enzymu nebo jen okrajové partie jeho molekuly.

Případem, kdy substituce jediného nukleotidu působí zásadní změnu struktury proteinu, je autozomově recesivní choroba zvaná **srpkovitá anémie** neboli **drepanocytóza**. Toto onemocnění postihuje zejména obyvatelstvo v rovníkové Africe, vzácněji se vyskytuje i ve Středomoří a v Indii. Červené krvinky pacientů jsou deformované, mají abnormální srpkovitý tvar (odtud název choroby) způsobený přítomností defektní formy hemoglobinu, tzv. **hemoglobinu S**. Příčinou je substituce jediného nukleotidového páru v genu pro beta-globinový řetězec tohoto proteinu. Mutace způsobuje, že šestý kodon (ve směru od začátku transkribované sekvence) je do mRNA přepisován jako GUG namísto původního GAG. Srovnáním s tabulkou genetického kódu zjistíme, že se tím **mění smysl kodonu**, jenž namísto původní kyseliny glutamové kóduje valin. Výsledkem je syntéza hemoglobinu S, který je špatně rozpustný a v krvinkách krystalizuje. U postižených osob dochází k poruchám přenosu kyslíku, k rozpadu erytrocytů (tzv. hemolytické anémii) a ke vzniku krevních sraženin. Ty mohou ucpat cévní řečiště a způsobit závažné, nezřídka smrtelné zdravotní komplikace. Příčinou úmrtí pacientů bývá selhání srdce, četné infekce nebo porucha funkce centrální nervové soustavy (způsobená nedostatkem kyslíku a dalšími doprovodnými změnami).

Rozdílný význam substitucí lze srovnat s chybami v přepisu slov. Pokud ve slově „továrna“ zaměníme koncové „a“ za „y“ („továrny“) nebo „u“ („továrnu“), zůstane smysl sdělení stále pochopitelný. Jestliže však zaměníme počáteční „t“ za „k“, vznikne slovo „kovárna“, jehož význam je značně odlišný.

Mutace beze smyslu (*nonsense mutations*)

Kromě mutací měnící smysl kodonu známe ještě jiné případy substitucí. V některých případech vzniká mutací **terminační triplet** (např. z kodonu UAU pro tyrosin se záměnou koncového nukleotidu vytvoří terminační triplet UAA). Tyto změny označujeme jako **mutace beze smyslu** (v angličtině „nonsense mutations“). Pokud vznikne terminační kodon hned v počátečním úseku kódující sekvence daného genu, dochází při translaci na tomto místě mRNA k zastavení proteosyntézy. Polypeptidový řetězec je oproti nemutovanému produktu výrazně zkrácen a neplní svoji biologickou funkci. Mutovaný gen lze tak přirovnat k nesrozumitelnému slovnímu fragmentu, resp. k nedokončenému slovu, jehož smysl nechápeme.

Mutace se stejným smyslem (*same sense mutations*)

Degenerace genetického kódu způsobuje, že v některých případech vzniká substitucí triplet, jenž kóduje stejnou aminokyselinu jako původní kodon. Tak např. změnou koncového nukleotidu se z tripletu GCU vytvoří triplet GCC, přičemž oba kódují stejnou aminokyselinu (alanin). Tyto substituce označujeme jako **mutace se stejným smyslem** (v angličtině „same sense mutations“).

Posunové mutace (*frame shift mutations*)

Ne všechny mutace mají charakter substitucí. Často dochází k delecím nebo inzercím, které zcela mění čtecí rámec následující genové sekvence. Protože genetická informace je při překladačt čtena po trojicích nukleotidů, může zařazení nebo ztráta jediného nukleotidu způsobit vznik nových kodonů. Tyto mutace označujeme jako **posuny čtecího rámce**, též **posunové mutace** („*frame shift mutations*“). Proto inzerce a delece zpravidla způsobují, že mRNA mutovaného genu je překládána do zcela odlišné sekvence aminokyselin.

Nejvýstižněji lze **důsledek posunu čtecího rámce** ilustrovat na změnách ve větě tvořené pouze třípísmennými slovy. Příkladem je věta, která v původní „nemutované“ verzi zní:

JAN ŠEL DÁL SÁM

Pokud mezi písmena „Š“ a „E“ ve slově „SEL“ zařadíme nové písmeno „A“, vznikne následkem této „inzerce“ zcela nesmyslné sdělení:

JAN ŠAE LDÁ LSÁ M..

Stejný účinek vyvolá vypuštění („delece“) jednoho písmena – např. „E“ ve slově „SEL“:

JAN ŠLD ÁLS ÁM...

Uvedený příklad ukazuje, že posunové mutace patří k nejnebezpečnějším, i když i v jejich případech závisí na tom, ve kterém úseku genu k nim došlo.

Reparace poškozené DNA a mutátorové geny

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

K životně nezbytným funkcím buňky patří uchování kontinuity genetické informace. K tomu slouží nejen poměrně dokonalý replikační aparát, ale také skupina tzv. mutátorových genů, které řídí průběh reparačních mechanismů. Jejich produkty jsou specifické enzymy, které opravují (reparují) nově vzniklé mutace v DNA.

Reparační procesy

Podle charakteru nejčastějších poškození rozlišujeme dva typy reparačních mechanismů:

- opravy chyb v párování bází (*mismatch repair*);
- opravy chemicky poškozených bází, resp. bází s odlišnou chemickou strukturou.

Uvedené procesy se mohou navzájem kombinovat a doplňovat.

Podle samotného mechanismu reparace rozeznáváme **tři základní typy reparačních procesů**:

a) Fotoreaktivace se uplatňuje pouze v případě, kdy působením UV-záření došlo ke vzniku kovalentních vazeb (*crosslinks*) mezi sousedními bázemi v DNA. Nejčastějším produktem jsou **thyminové dimery** (tj. kovalentně propojené částice thyminu). Světlem o vlnové délce 340–400 nm (které je složkou běžného slunečního světla) se aktivuje specifický enzym zvaný **DNA-fotolyáza**, který kovalentní vazby v dimerech štěpí a obnovuje tak původní strukturu nukleotidů. Tento proces se však zřejmě v lidských buňkách neuplatňuje, neboť DNA-fotolyáza byla zjištěna pouze u prokaryot a nižších eukaryot (např. kvasinek).

b) Excizní reparace využívá složitého komplexu enzymů, které eliminují poškozený úsek DNA. Tyto mechanismy slouží k vyštěpení chybně spárovaných bází (*base mismatches*) nebo chemicky modifikovaných bází (včetně thyminových dimerů). Uplatňují se nejen při poškození buňky UV-zářením (popř. jiným mutagenem) ale také při odstranění spontánních mutací, k nimž dochází chybným zařazením nukleotidů v průběhu replikace DNA. Enzymový aparát je schopen příslušnou mutaci nejen vyhledat, ale také vyštěpit poškozenou část řetězce a nahradit ji nově vytvořeným úsekem s původní sekvencí nukleotidů.

c) Rekombinační oprava je prozatím nejméně prozkoumaným reparačním mechanismem. Jeho podstatou je cílená rekombinační výměna poškozených a nepoškozených úseků mezi dvěma molekulami DNA. Tento proces připomíná crossing-over. Jeho výsledkem je jedna zcela opravená molekula DNA, zatímco ve druhé, nefunkční molekule jsou kumulovány všechny mutované oblasti.

Následky poškození mutátorových genů

Mutace v genech řídících reparační procesy mohou být příčinami různých hereditárních i sporadických malignit. I když defekty reparačních enzymů samy nemají přímý vliv na poruchu regulace buněčného dělení, výrazně **zvyšují pravděpodobnost mutací onkogenů a tumor supresorových genů**. Proto pacienti trpí (často opakovaně) **nádorovými chorobami**, které bývají příčinou jejich předčasného úmrtí.

Mutace v různých genech řídících excizní reparaci (zejména v genech MSH2 a MLH1 řídících „*mismatch repair*“) byly nalezeny např. u **hereditárního nepolypózního karcinomu tlustého střeva** neboli **HNPCC** (*hereditary non-polyposis colon cancer*). Tato malignita představuje téměř 15 % všech případů kolorektálních karcinomů (tj. karcinomů střeva a rekta) a jako geneticky podmíněná porucha bývá též popisován jako **Lynchův syndrom**.

Poruchy opravných mechanismů vedou ke kumulaci mutací v celém genomu. Tento jev bývá popisován jako **replikační chyby** neboli **RER** (*replication errors*) a příslušné nádory pak jako „RER-pozitivní“. Zpravidla se však nejedná o poruchy funkce samotné DNA-polymerázy, jak se dříve předpokládalo, ale o již zmíněné geneticky podmíněné defekty reparačních procesů. Replikační chyby se často objevují v krátkých opakujících se sekvencích genomu, zejména v mikrosatelitech (viz též 18.4.). Tento zvýšený výskyt mutací v mikrosatelitních sekvencích se nazývá **mikrosatelitní instabilita** a je typický pro většinu nádorů vzniklých na bázi poruchy reparačních mechanismů.

U některých vzácnějších syndromů vyvolaných poruchami reparace DNA nalézáme dokonce chromozomovou instabilitu, tj. zvýšený výskyt strukturních chromozomových aberací, zejména zlomů. Tyto aberace zpravidla nebývají specifické pro jeden konkrétní chromozom, ale postihují celou chromozomovou sestavu pacienta. Proto označujeme tuto skupinu onemocnění jako **syndromy chromozomové instability**. Vysoký nárůst chromozomových aberací lze pozorovat zejména tehdy, pokud kultivované buňky pacienta vystavíme působení mutagenní látky, popř. záření.

Příkladem syndromu chromozomové instability je onemocnění zvané **xeroderma pigmentosum** (volně přeloženo „pigmentovaná suchá kůže“). Pacienti mají mutaci v jednom z genů řídících syntézu endonukleáz, které vyštěpují chybně spárované či geneticky modifikované báze. Proto jsou extrémně citliví na sluneční světlo, které obsahuje určitý podíl mutagenního UV-záření. Jejich kůže je velmi hrubá, výrazně pigmentovaná a vytvářejí se na ní četné nádory. Většina pacientů umírá v důsledku rozvoje některé z nádorových chorob před dovršením 20 let. Xeroderma pigmentosum má autozomově recesivní přenos, takže k jejímu projevu je nutná mutace obou alel příslušného genu. O dalších syndromech chromozomové instability pojednává zvláštní text.

Polymorfismy, jejich podstata a význam

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol 2. LF UK Praha

Proměnlivost neboli variabilita je jedním z typických znaků živého organismu. Její studium tvoří (spolu s poznáním dědičnosti) základní náplň všech genetických oborů. Každý znak je do určité míry variabilní, což může být podmíněno buď vlivem faktorů vnějšího prostředí, anebo geneticky – tj. **přítomností příslušných alel**. Již Mendelovy pokusy nás přesvědčují o tom, že od každého genu může existovat více alel. Jejich rozdílnost je podmíněna **odchylkami v sekvenci DNA**.

Pokud je od určitého jevu známo více variant, označujeme každou takovou konkrétní variantu jako **polymorfismus**. Znamená to, že i každá alela je polymorfismem daného genu. Výskyt polymorfismů je proto projevem variability. V některých publikacích jsou dokonce pojmy variabilita, proměnlivost a polymorfismus navzájem směřovány.

Mutace a polymorfismy v populaci

Každý nový polymorfismus vzniká změnou DNA – tedy mutací. Přesto bývají termíny polymorfismus a mutace v obecné i klinické genetice odlišovány. **Za polymorfní bývají považovány takové varianty (resp. alely), jejichž populační frekvence (tj. podíl výskytu v populaci) je vyšší než 1 %**. Znamená to, že jde o alely, které zpravidla nepředstavují pro svého nositele žádnou přímou nevýhodu, a proto nejsou nijak selektovány. Osoba většinou není nijak postižena, a proto se může reprodukovat bez jakéhokoliv omezení. Případný negativní účinek polymorfismů se může projevit jen v kombinaci s jinými faktory (např. vlivem faktorů vnějšího prostředí nebo spoluúčastí mutovaných alel jiných genů). Minimální vliv na svého nositele mají neutrální mutace, resp. mutace se stejným smyslem a také mutace v nekódujících oblastech genomu.

Jedním z typických polymorfismů u člověka je X-vázaný (gonozomově recesivní) **deficit enzymu glukóza-6-fosfát dehydrogenázy**, který nijak přímo neohrožuje svého nositele. Způsobuje však citlivost na semena koňského bobu a na některé léky, zvláště na primachin (používaný k léčbě malárie), fenacetin a sulfonamidy. Po požití těchto léků, resp. potravin obsahujících bob dochází u postižených k akutní hemolytické krizi (těžké anémii). Od latinského názvu bobu (*Vicia faba*) pochází i termín „**favismus**“, který se pro tuto poruchu často používá.

Velký počet polymorfních variant je typický také pro **hlavní histokompatibilní komplex** (MHC, resp. HLA), jenž obsahuje tři třídy genů, které mají význam při imunitní odpovědi. 1. třída obsahuje geny HLA-A (23 alel), HLA-B (47 alel) a HLA-C (8 alel); 2. třída HLA-DP (6 alel), HLA-DQ (3 alely) a HLA-DR (14 alel). Protože jejich produkty jsou účinnými a vysoce polymorfními antigeny, mohou vyvolávat závažné problémy při transplantaci orgánů, neboť hrozí nebezpečí, že budou odvrženy imunitním systémem příjemce a celý zákrok bude tudíž neúspěšný. Přitom pravděpodobnost náhodného výskytu odpovídající kombinace HLA v lidské populaci je přibližně 1/200 000, proto bývá nalezení vhodného orgánu k transplantaci velmi obtížné a často trvá dlouhé roky.

U některých alel histokompatibilního systému byla prokázána určitá **asociace s některými (zejména autoimunitními) chorobami**. Znamená to, že osoby s těmito alelami mají ve srovnání s ostatními jedinci zvýšené riziko (avšak nikoli jistotu) vzniku příslušného onemocnění. K nástupu onemocnění však u nich dochází až po zásahu určitých (v mnoha případech ještě neobjasněných) vnějších faktorů. Předpokládá se, že nemalý vliv na rozvoj chorob mají v těchto případech infekce některými konkrétními druhy bakterií nebo jinými patogeny.

Za mutaci (v užším slova smyslu) bývá považována varianta, jejíž populační frekvence je nižší než 1 %. Znamená to, že příslušná mutantní alela snižuje životaschopnost nebo fertilitu příslušného jedince, proto je v daleko menší míře předávána potomkům. V extrémních případech jsou nositelé mutací zcela neplodní nebo umírají před dosažením dospělosti, takže všechny mutantní alely, které se v populaci vyskytují, jsou důsledkem nových mutací (tzv. mutací *de novo*).

Neúplná penetrance monogenních chorob

V současnosti se ukazuje, že mnohé změny DNA, které byly považovány za neutrální a řazeny k polymorfismům, mohou mít na své nositele určitý vliv. Ten byl překvapivě prokázán i u některých mutací se stejným smyslem a u mutací v intronových oblastech. Ukazuje se, že tyto změny mohou například ovlivňovat míru genové exprese a spolu s polymorfními alelami dalších genů ovlivnit rozsah a závažnost určitého postižení. Proto známe i u monogenních chorob různé lehčí, těžší, či netypické formy. Extrémním případem jsou monogenní **choroby s neúplnou penetrancí**. V tomto případě jde o poruchy, které se projeví pouze u některých nosičů mutantní alely. Uvedené skutečnosti ukazují, že hranice mezi mutací a polymorfismem je ve skutečnosti velmi nejistá.

Neúplná penetrance se projevuje zejména u autozomově dominantních chorob. Příklady takových onemocnění jsou hereditární pankreatitida, rozštěpová deformace ruky (ektrodaktylie), nebo neurofibromatóza typu 1 (též neurofibromatóza von Recklinghausen).

Při posouzení přenosu choroby s neúplnou penetrancí se setkáme s nepostiženými jedinci, kteří však museli mutantní alelu zdědit od postiženého předka, neboť ji předali svým rovněž postiženým potomkům.

Míra penetrance se vyjadřuje zpravidla v procentech. Tak např. ektrodaktylie má 70 % penetranci. Znamená to, že 70 % nosičů mutantní alely je postiženo, zatímco zbývajících 30 % nosičů je zdravých.

Molekulární podstata a identifikace polymorfismů DNA

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Geneticky podmíněné polymorfismy jsou tvořeny **variabilními sekvencemi DNA** v daném lokusu. Odlišnosti mezi nimi mohou mít různou molekulární podstatu. Rozeznáváme:

1) Nukleotidové substituce neboli SNP (*single nucleotide polymorphisms*) jsou zpravidla rozdíly na úrovni jediného páru bází. V mnoha případech je lze identifikovat pomocí restričních endonukleáz, neboť substituce jediného nukleotidu může v příslušném úseku vytvořit nebo naopak zrušit restriční (štěpné) místo. V tomto případě hovoříme o tzv. **polymorfismu restričních fragmentů** neboli **RFLP** (*restriction fragment length polymorphism*). Pokud v příslušné polymorfní sekvenci leží cílové místo pro restriční endonukleázu, vytvoří se působením tohoto enzymu dva různě dlouhé fragmenty DNA, které lze identifikovat pomocí elektroforézy. Pokud je naopak přítomna jiná polymorfní sekvence, která restriční místo neobsahuje, vznikne jediný delší fragment. V případě, že je daný polymorfní úsek ve vazbě s genem, jehož mutovaná alela způsobuje určité geneticky podmíněné onemocnění, lze v příslušné rodině identifikovat postižené osoby, popř. přenašeče mutantní alely, aniž bychom znali přesnou lokalizaci a charakter příslušné mutace. Tento předpoklad je podstatou tzv. **nepřímé DNA diagnostiky**. Alternativní štěpná místa poskytují cenné značky neboli **markery pro** mutované alely.

Kromě RFLP rozlišujeme ještě tzv. **nukleotidové substituce (SNP) v užším slova smyslu**, které neobsahují cílové sekvence pro restriční endonukleázy, ale můžeme je identifikovat alelově specifickou hybridizací, popř. pomocí genových čipů. Také tyto polymorfismy lze použít při nepřímé diagnostice geneticky podmíněných onemocnění.

2) Tandemové repetitivní sekvence neboli VNTR (*variable number of tandem repeats*) jsou podmíněny změnou počtu sekvencně shodných úseků (repetic), které se tandemově (za sebou) opakují. Rozdílný počet **repetitivních sekvencí** způsobuje odlišnosti v délce určitého úseku, který tuto polymorfní oblast obsahuje. Pomocí běžných molekulárně biologických vyšetření identifikujeme zejména **minisatelity**, tj. úseky tvořené variabilním počtem repetice dlouhých 15-40 bp.

Od výše popsaných VNTR v užším slova smyslu odlišujeme ještě tzv. **krátké tandemové repetice neboli STR** (*short tandem repeats*). Jsou tvořeny **mikrosatelity**, u nichž délka jedné repetitivní jednotky kolísá mezi 1-4 bp.

DNA fingerprinting

Také tandemové repetice mohou sloužit jako markery při nepřímé diagnostice geneticky podmíněných onemocnění v určitých rodinách. Často se však také využívají ve **forenzní genetice** k identifikaci osob, popř. při paternitních sporech, neboť **rozdílný počet opakování vytváří od daného úseku většinou velký počet „alel“ o různé délce**. Každý jedinec má proto zcela charakteristickou konstituci těchto polymorfních úseků a pravděpodobnost, že by se stejná kombinace vyskytla u jiné osoby, je minimální. Na tomto poznatku je založena skupina metod označovaných jako **DNA fingerprinting**. Název „fingerprinting“ („otisk prstu“) odráží skutečnost, že sekvence bází v genomu každého jedince je stejně unikátní jako otisk prstu. Proto se také v češtině používá překladový název „genetické otisky prstů“, i když uvedené metody nemají se skutečnou daktyloskopií nic společného.

První vyšetření metodou DNA fingerprinting byla založena na analýze minisatelitových polymorfismů typu VNTR. Po enzymatickém rozštěpení (působením restričních endonukleáz) byla vyšetřovaná DNA přenesena Southernovou metodou na membránu.

Hybridizace s radioaktivně značenou sondou umožnila detekci úseků tvořených mnoha VNTR z různých chromozomů. Po aplikaci sondy bylo možné na mebráně pozorovat tzv. **multilokusový fingerprint**, tvořený velkým počtem různě intenzivních a různě vzdálených pruhů. Uspořádání těchto pruhů připomíná čárový kód, jímž jsou označovány výrobky. Tento výsledek umožňuje velmi přesnou identifikaci osob z jakéhokoliv biologického materiálu obsahujícího DNA, což má význam zejména v kriminalistice. U paternitních testů by měl být každý proužek v „čárovém kódu“ dítěte přítomen buď ve fingerprintu matky nebo ve fingerprintu otce. Lze předpokládat, že kromě jednovaječných dvojčat je multilokusový fingerprint pro každou osobu zcela specifický a pravděpodobnost, že by se stejné uspořádání vyskytlo u jiného nepříbuzného jedince, je minimální.

Uvádí se, že pravděpodobnost výskytu stejných fingerprintů u dvou navzájem nepříbuzných osob je v případě optimální kombinace detekčních systémů $1 : 10^{13}$. Přitom současná lidská světová populace dosahuje počtu asi 6 miliard (tj. $6 \cdot 10^9$) jedinců. Lze si proto jen těžko představit, že bychom mohli křivě obvinít osobu, která by náhodně měla stejný výsledek analýzy VNTR jako pachatel trestného činu. Stejně tak bývá výsledek fingerprintu přesvědčivým důkazem paternity.

Zvedení „genetických otisků“ bylo velkým prokrokem ve forenzní medicíně. Přesto se časem objevily různé praktické problémy s reprodukovatelností, srovnatelností a interpretací, což postupně vedlo k omezení využití této metody. Neřešitelnou komplikací byl také požadavek na získání poměrně velkého množství DNA, což nebylo zejména v kriminalistice u mnoha biologických stop možné zajistit. Proto bylo třeba vyvinout nové modifikace, které odstraňují nevýhody původního protokolu.

Nové postupy jsou založeny na **metodě PCR**, která je mnohem citlivější a umožňuje zpracování velmi malého množství vzorku. Základním postupem je většinou amplifikace určitých polymorfních minisatelitních lokusů pomocí PCR.

K současné syntéze většího počtu polymorfních úseků lze použít metodu **multiplex PCR**. Citlivost analýzy nyní zvyšuje i možnost vyšetření mikrosatelitových VNTR, u nichž jsou rozdíly v délce jednotlivých úseků daleko menší než v případě minisatelitů. Tyto rozdíly lze prokázat automatickou fragmentovou analýzou (např. pomocí kapilární elektroforézy). Určitá nevýhoda analýzy mikrosatelitových VNTR spočívá v jejich vyšší mutabilitě. Znamená to, že se zde více projevují spontánní mutace, které mohou (např. při určení paternity) zkreslit výsledek vyšetření, popř. snížit počet diagnosticky využitelných úseků. DNA fingerprinting lze aplikovat i při **analýze variabilních úseků v mtDNA**, která bývá v některých případech jediným materiálem vhodným k vyšetření.

Dědičnost a proměnlivost – základní vlastnosti živých organismů

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Chceme-li popsat určitého jedince, všímáme si jeho vzhledu, utváření trupu, hlavy a končetin, barvy očí či vlasů, výšky postavy, povahových rysů, inteligenčních či manuálních schopností, zdravotního stavu a mnoha dalších vlastností. Tyto vlastnosti, které můžeme zjistit přímým pozorováním jedince, se nazývají **znaky**.

Každý znak může mít určitou konkrétní podobu. U lidských jedinců například pozorujeme odlišnou barvu očí (modrá – zelená – šedá – hnědá) nebo různou barvu vlasů (černá – světlá – rezavá). Za znak, resp. jeho konkrétní formu lze považovat i přítomnost či nepřítomnost určitého onemocnění, resp. konkrétních patologických změn. Tyto a mnohé další znaky lze hodnotit na základě jejich kvality, tj. přítomnosti či absence určitého projevu. Proto je označujeme jako **znaky kvalitativní**.

Konkrétním znakem charakterizujícím daného jedince je však také výška postavy, popř. hmotnost nebo IQ, tj. vlastnosti, které měříme a vyjadřujeme v číselných hodnotách. V tomto případě jde o **kvantitativní neboli metrické znaky**.

S pokrokem biochemie, imunologie a fyziologie přibyly další parametry, jimiž lze charakterizovat jedince, popř. jeho zdravotní stav. Ačkoli tyto hodnoty zpravidla nemůžeme studovat přímým vizuálním pozorováním, lze je rovněž považovat za znaky. Tak můžeme mezi kvalitativní znaky zařadit např. krevní skupiny (např. AB0, MN systém, Rh–faktor atd.) nebo transplantační antigeny. Mezi kvantitativní znaky naopak patří např. vitální kapacita plic, krevní tlak, hladiny hormonů, enzymů či protilátek v krevním séru, hodnota glykémie, popř. koncentrace jiných biochemicky významných látek.

Každý člověk se v mnoha znacích podobá svým rodičům, popř. dalším příbuzným. Některé znaky jsou společné všem příslušníkům lidského druhu (*Homo sapiens*), jiné jsou úzce individuální, tj. typické pouze pro danou osobu nebo nevelký počet jedinců. Z uměleckých děl a historických pramenů víme, že se příslušníci některých panovnických rodů vyznačovali stejnými obličejovými rysy, měli shodné nebo podobné povahové vlastnosti a schopnosti a nezdá se, že by také trpěli stejnými chorobami. Příkladem jsou potomci britské královny Viktorie, v jejímž rodu se několikrát vyskytla hemofilie (geneticky podmíněná porucha srážlivosti krve).

Schopnost organismů vytvářet potomky se stejnými nebo podobnými znaky se nazývá **dědičnost neboli heredita** a patří k základním vlastnostem všech živých systémů. Znaky, které se přenášejí prostřednictvím dědičných vloh neboli genů z generace na generaci, označujeme jako dědičné neboli hereditární. Dědičnost má význam nejen pro přenos některých úzce vyhraněných vlastností (často specifických jen pro několik příbuzných jedinců), ale zajišťuje především zachování jednotlivých biologických druhů v průběhu mnoha generací.

Geny jsou základními jednotkami dědičné neboli genetické informace, která je zakódována v molekulách nukleových kyselin. U organismů s buněčnou stavbou (člověka nevyjímaje) je nejvýznamnějším přenašečem genetické informace **deoxyribonukleová kyselina neboli DNA** (z anglického deoxyribonucleic acid) obsažená především v buněčném jádře. Její dlouhá vláknitá makromolekula obsahuje přesné informace k syntéze jednotlivých proteinů, které pak přímo či nepřímo ovlivňují utváření konkrétních znaků. Znamená to, že **každý gen lze ztotožnit s určitým úsekem DNA**, podle něhož se vytváří konkrétní protein. Souhrn veškeré DNA v určité buňce, popř. organismu nazýváme **genom**. Zjednodušeně lze též říci, že genom je souborem všech genů (dědičných vloh) daného organismu. Prostřednictvím pohlavních buněk se geny přenášejí z rodičů na potomky.

Zdánlivým protikladem dědičnosti je **proměnlivost** neboli **variabilita**. Tímto pojmem označujeme vzájemnou **odlišnost jedinců jednoho druhu**, popř. jejich **rozdílnou schopnost reagovat na podmínky vnějšího prostředí**. Projevem variability je rozdílné utváření kvalitativních i kvantitativních znaků u jedinců stejného druhu. Existence proměnlivosti je nezbytnou podmínkou k poznání dědičnosti. U člověka tak můžeme např. sledovat, ve kterých znacích se příslušníci jedné rodiny vzájemně liší, které konkrétní formy znaků se vyskytují jen u některých osob a které se naopak přenášejí beze změny.

Konkrétní utváření každého znaku, resp. jeho variabilita, jsou podmíněny dvěma složkami:

a) vnějším prostředím (environmentálně) – u člověka např. množstvím a složením potravy, fyzickou aktivitou, sociálními podmínkami, přítomností původců infekčních onemocnění, koncentrací toxických látek v životním prostředí (tj. ve vzduchu, v půdě, v pitné vodě apod.), užíváním určitých léků atd.

b) geneticky – tj. přítomností a kombinací konkrétních dědičných vloh přenášených z generace na generaci. Téměř každý gen může vytvářet větší množství konkrétních, do určité míry rozdílných **forem**. Podle toho se mohou lišit i vnější znaky organismu, které jsou daným genem podmíněny. Extrémním případem genetické variability jsou mutované geny, které způsobují, že se znak vůbec nevytvoří, nebo se vyvine v abnormální či zcela nefunkční podobě.

Při vyjádření většiny znaků se **vzájemně kombinují obě složky, tj. dědičnost i prostředí**. Také mnohé lidské nemoci jsou podmíněny oběma vlivy zároveň. Znaky, resp. choroby, při jejichž vzniku se společně uplatňuje genetická i environmentální složka (tedy více faktorů), označujeme jako **multifaktoriální**.

Nauka o dědičnosti a proměnlivosti živých organismů se nazývá genetika. Studuje a vysvětluje pravidla, jimiž se řídí přenos dědičných znaků z rodičovské generace na potomstvo. Zabývá se však nejen mechanismem jejich přenosu, ale také objasňuje, proč jsou potomci v mnoha znacích odlišní od svých rodičů a proč se liší navzájem. Název genetika pochází od latinského *genus* (rod). Toto pojmenování zavedl roku 1906 britský badatel **William Bateson** (1861 – 1926).

Genové interakce a dědičnost kvantitativních znaků

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Badatelé dříve předpokládali, že každý znak je podmíněn jedním genem. Ve skutečnosti jsou však takové situace poměrně vzácné a daleko častěji zjišťujeme, že znak vzniká **spolupůsobením většího počtu genů**. Tyto jevy označujeme jako **genové interakce**. O konkrétní podobě znaku pak rozhodují alely všech zúčastněných genů.

Názorným příkladem jednoduché genové interakce je vznik barvy květů u hrachoru (*Lathyrus odoratus*). Bylo zjištěno, že vznik tohoto znaku je podmíněn spolupůsobením dvou genů:

- Dominantní alela genu C řídí tvorbu enzymu, jenž katalyzuje vznik bezbarvého prekursoru květního barviva antokyanu. Recesivní alela c tento enzym nevytváří.
- Dominantní alela druhého genu R řídí tvorbu jiného enzymu, jenž přeměňuje bezbarvý prekursor na sytě červený antokyan. Naopak recesivní alela r příslušný enzym nevytváří.

Z výše uvedeného je zřejmé, že ke vzniku květního barviva je nutná přítomnost dominantních alel obou genů (C i R). Pokud je jeden gen zastoupen pouze recesivními alelami (cc nebo rr), květy jsou bílé bez ohledu na to, že od druhého genu je přítomna dominantní alela. Tato genová interakce se nazývá **komplementarita**.

V určitých případech může být **jeden znak podmíněn různými geny** a k jeho vyjádření zpravidla stačí jediná dominantní alela jednoho z těchto genů. Tento vztah nazýváme **duplicitní interakce**. Geny mají v tomto případě stejnou nebo velmi podobnou funkci a neřídka uvažujeme o jejich shodném evolučním původu. Studie genomů různých organismů ukázaly, že mnohé geny vznikly během vývoje zdvojením neboli duplikací jediného genu (v některých případech došlo k této duplikaci dokonce opakovaně).

Někdy se účinek těchto genů sčítá (kumuluje), pak jde o **kumulativní duplicitní interakci**. Projev znaku je pak ovlivněn počtem dominantních alel obou genů.

Až dosud jsme se věnovali pouze **kvalitativním znakům**, které mají dva nebo více alternativních projevů (např. barva květu, tvar semen, krevní skupiny apod.). Vznik těchto znaků ovlivňují tzv. **geny velkého účinku** (též **majorgeny**).

Součástí fenotypu jedince jsou však také **kvantitativní neboli metrické znaky**, jejichž projev lze vyhodnotit pouze měřením určitých parametrů (např. výšky těla, hmotnosti těla, inteligenčního koeficientu atd.). Jsou řízeny velkým počtem genů – tzv. **polygenů** neboli **genů malého účinku** (též **minorogenů**). Účinek těchto genů se sčítá, takže jde o duplicitní kumulativní interakci. Častěji však používáme obecnějšího názvu **polygenní dědičnost**.

V případě polygenní dědičnosti kvantitativních znaků zpravidla nelze v potomstvu vymezit jednotlivé fenotypově odlišné skupiny a stanovit přesné štěpné poměry, neboť míra projevu znaku plynule stoupá od jedinců s nejnižší hodnotou k jedincům s maximální hodnotou. Hodnotíme-li poměrná zastoupení jedinců s různou intenzitou fenotypového projevu, zjistíme, že jejich proporce odpovídají **normálnímu rozložení četností** charakterizovanému Gaussovou křivkou neboli **normálou**. Pro toto rozložení je typické, že nejméně jsou zastoupeni jedinci s extrémně nízkými nebo naopak extrémně vysokými fenotypovými hodnotami, zatímco nejvyšší podíl tvoří jedinci s hodnotami blízkými průměru.

K hodnocení variability metrických znaků s normálním rozložením používáme **statistické metody**. Z nashromážděných dat počítáme kromě **aritmetického průměru** také **směrodatnou** (standardní) **odchylku**. Tato hodnota charakterizuje rozmezí, v jakém se zjištěné hodnoty odchylují od průměru, a udává tak tvar Gaussovy křivky.

Kombinace určitých polygenů je pouze jedním z předpokladů k vyjádření daného znaku. Jeho konečná podoba je však výrazně formována také vlivem prostředí, např. klimatickými

vlivy, množstvím potravy, přítomností parazitů nebo predátorů. U člověka hraje velkou roli také výchova, sociální zázemí a vzdělání. Proto je naprostá většina polygenních znaků podmíněna **multifaktoriálně** – tj. kombinací genetických vlivů a faktorů vnějšího prostředí. V mnoha případech je třeba posoudit, do jaké míry se při vyjádření určitého znaku uplatňují genetické vlivy. Týká se to nejen běžných metrických znaků ale také mnoha polygenně, resp. multifaktoriálně dědičných chorob. Proto u multifaktoriálně podmíněných znaků stanovujeme **heritabilitu** neboli **dědivost**. Jde o hodnotu, která udává **míru dědičného určení znaku**. Často ji vyjadřujeme jako tzv. **koeficient heritability** označovaný h^2 . Tato hodnota je dána poměrem geneticky podmíněné variability (V_G) a celkové fenotypické variability (V_P), která odráží společný vliv genotypu i faktorů vnějšího prostředí:

$$h^2 = \frac{V_G}{V_P}$$

Hodnoty V_G a V_P určujeme statistickými výpočty jako varianci (V) neboli rozptyl měřených hodnot (jde o druhou mocninu směrodatné odchylky).

Heritabilita, resp. koeficient heritability se vyjadřuje desetinným číslem od nuly do jedné nebo v procentech (0 – 100 %). Čím je dědivost vyšší, tím významnější je role genotypu při vyjádření daného znaku. Naopak nízká heritabilita svědčí o rozhodujícím vlivu faktorů prostředí.

Heritabilitu zkoumaného znaku lze odhadnout na základě **studia jeho výskytu u dvojčat**. U člověka a většiny savců se dvojčata vytvářejí dvěma cestami:

- **Dvojvaječná** neboli **dizygotní dvojčata** vznikají v případě, když v těle matky současně dozrají dvě vajíčka a každé je oplozeno jinou spermií. Z genetického hlediska jsou dvojvaječná dvojčata pouze dva stejně staří sourozenci, kteří mohou být odlišného pohlaví a mají v průměru 50 % shodných alel. Proto se v mnoha znacích liší.
- **Jednovaječná** neboli **monozygotní dvojčata** jsou daleko vzácnější. Vytvářejí se z jediného oplozeného vajíčka. V tomto případě dochází po prvním jaderném dělení zygoty k **úplnému oddělení dceřiných buněk (tzv. blastomer)**. Z každé blastomery pak vzniká nový jedinec. Z genetického hlediska jsou monozygotní dvojčata zcela identická, neboť mají všechny alely shodné. Jejich vzájemné rozdíly v některých znacích jsou podmíněny pouze vlivem prostředí. Pozorujeme-li shody a rozdíly ve výskytu určitého znaku u dostatečného počtu párů jednovaječných i dvojvaječných dvojčat, lze heritabilitu odhadnout podle vzorce:

$$H = \frac{K_{MZ} - K_{DZ}}{100 - K_{DZ}}$$

kde H – heritabilita v procentech, K_{MZ} – konkordance u monozygotních dvojčat (tj. procentuální podíl párů jednovaječných dvojčat, kde se sledovaný znak objevil u obou jedinců), K_{DZ} – konkordance u dizygotních dvojčat (tj. procentuální podíl párů dvojvaječných dvojčat, kde se sledovaný znak objevil u obou jedinců).

Genotyp a fenotyp

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Téměř každý gen má více konkrétních forem neboli **alel**. Soubor všech alel v buňkách daného jedince označujeme jako **genotyp**. Pojem genotyp nelze směšovat s genomem, neboť genom je soubor všech molekul DNA přítomných v dané buňce, resp. v daném organismu.

Vnější projevem genotypu je **fenotyp**. Za fenotyp považujeme konkrétní soubor znaků, které lze zpravidla zjistit přímým pozorováním jedince (např. barva květů, utváření semen, výška postavy atd.).

Pokusy, které provedl **Gregor Mendel** (viz samostatný text) ukázaly, že rodiče nepředávají svým potomkům hotový znak, ale pouze určitou vloh (tj. alelu). Teprve kombinace rodičovských alel u potomka podmiňuje konkrétní podobu znaku, přičemž některé vlohy se ve výsledném fenotypu nemusí projevit.

Známým Mendelovým pokusem bylo křížení bělokvěté a červenokvěté odrůdy hrachu. Gen pro barvu květů se může vyskytnout ve **dvou různých alelách**. Jedna podmiňuje červenou barvu, druhá bílou barvu květu. Protože chromozomy se v somatických buňkách vyskytují v párech, je od každého genu přítomna také **dvojice alel**. Pokud se současně vyskytnou obě alely pro červenou barvu, bude mít rostlina červené květy. Stejně tak pár alel pro bílou barvu podmíní vznik bílých květů. Pokud se však vyskytnou v genotypu jedince dvě odlišné alely, uplatní se při vzniku znaku pouze alela pro červený květ, kterou označujeme jako **převažující** neboli **dominantní** (z latinského *dominus* – pán), zatímco alela pro bílý květ je **ustupující** neboli **recesivní** (z latinského *recedere* – ustupovat). Lze též říci, že červená barva květu je **dominantní znak**, zatímco bílá barva květu je **znakem recesivním**.

Dominantní alely zpravidla označujeme velkým písmenem (C), zatímco výskyt recesivní alely v genotypu zapisujeme malým písmenem (c). Jedinec tak může mít v genotypu:

- a) **Obě dominantní alely (CC)** – v tomto případě jde o **dominantního homozygota** a rostlina má červené květy.
- b) **Obě recesivní alely (cc)** – v tomto případě jde o **recesivního homozygota** a rostlina má bílé květy.
- c) **Jednu dominantní a jednu recesivní alelu (Cc)** – v tomto případě jde o **heterozygota**. Květy rostliny budou červené (stejně jako u dominantního homozygota) neboť alela C je dominantní vůči alele c.

Využití v klinické genetice

Termíny dominantní homozygot, recesivní homozygot a heterozygot používáme v genetice zcela obecně. Platí to i pro **genetiku klinickou**, pokud posuzujeme výskyt mendelovsky dědičných chorob v příslušné rodině. Podle způsobu dědičného přenosu také dělíme monogenní choroby na recesivní a dominantní. Podle toho, zda je příslušný gen, jehož mutace chorobu způsobuje, vázán na autozomu nebo pohlavním chromozomu, rozlišujeme:

- **Choroby autozomově dominantní** (např. achondroplázie, Huntingtonova chorea, polycystóza ledvin atd.);
- **Choroby autozomově recesivní** (např. cystická fibróza, hyperfenylalaninemie, alkaptonurie, albinismus atd.);
- **Choroby X-vázané dominantní** (např. hypofosfatemická rachitis);
- **Choroby X-vázané recesivní** (např. syndrom fragilního chromozomu X, daltonismus, hemofilie, Duchennova a Beckerova muskulární dystrofie);
- **Choroby holandrické** (tj. vázané na chromozom Y) – až na několik klinicky nevýznamných abnormalit (např. ochlupení ušního lalůčku – tzv. „*hairy ear syndrome*“)

u člověka neznáme choroby, které by se tímto způsobem přenášely z generace na generaci (závažnější mutace genů na chromozomu Y totiž způsobují sterilitu).

Choroby vázané na pohlavní chromozomy se rovněž označují jako gonozomové. Fakticky tímto pojmem však rozumíme pouze choroby vázané na chromozom X. Proto místo X-vázaná recesivní choroba často používáme výrazu „choroba gonozomově recesivní“ a podobně X-vázané dominantní choroby označujeme jako „gonozomově dominantní“. O autozomově a gonozomově vázaných chorobách blíže pojednávají samostatné texty.

Příklad 1

Zdravým rodičům se narodilo dítě s cystickou fibrózou (mukoviscidózou). Určete genotypy rodičů i postiženého dítěte.

Řešení: Cystická fibróza je autozomově recesivní choroba. Označme si dominantní alelu písmenem „A“ a recesivní alelu (způsobující cystickou fibrózu) písmenem „a“. Postižené dítě je v každém případě recesivním homozygotem (aa).

Postižené dítě muselo získat recesivní alelu od každého z rodičů. Protože jsou ale rodiče zdraví, musí mít ve svém genotypu také alelu dominantní. Je tedy zřejmé, že rodiče jsou heterozygoti – Aa. V klinické genetice používáme pro zdravého heterozygota také termín „přenašeč“ (tento pojem se však nepoužívá jen u přenašečství mutantních alel, ale stejně označujeme např. v cytogenetice nepostižené jedince nesoucí balancovanou chromozomovou přestavbu).

Příklad 2

Partnerům postiženým achondroplázií se narodilo zdravé dítě. Vysvětlete tuto situaci a určete genotypy všech zmíněných členů rodiny.

Řešení: Achondroplázie je autozomově dominantní choroba. Označme si dominantní alelu (způsobující achondroplázií) písmenem „B“ a recesivní („zdravou“) alelu písmenem „b“. Protože je dítě zdravé, je zřejmé, že žádnou dominantní alelu v genotypu nemá – jeho genotyp je tedy bb (recesivní homozygot). Jeho rodiče mu proto museli předat tuto „zdravou“ alelu. Protože jsou ale oba postižení, je zřejmé, že druhá alela v jejich genotypu bude mutantní (tj. dominantní alela B). Rodiče jsou proto zřejmě heterozygoti (tj. Bb).

Poznámka: U příkladu 2 lze na heterozygotní konstituci okamžitě usoudit i z faktu, že se rodiče postižení dožili reprodukčního věku. Dominantně homozygotní konstituce alel (BB) je v případě achondroplázie (a mnoha dalších autozomově dominantních chorob) prenatalně, resp. perinatálně letální.

Mendelovy zákony

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK

Roku 1865 proslovil Mendel na zasedání Přírodovědného spolku v Brně přednášku na téma „Pokusy s rostlinnými kříženci“ (*Versuche über Pflanzenhybriden*), v níž formuloval základní pravidla dědičnosti, která byla později zformulována jako Mendelovy zákony. O rok později vyšel text přednášky tiskem. Práce měla na svou dobu neobvyklou koncepci. Mendel jako jeden z mála tehdejších přírodovědců výsledky svých pokusů nejen podrobně popsal, ale také matematicky vyhodnotil. Zajímaly jej přesné početní poměry kříženců s jednotlivými vlastnostmi. Díky tomu mohl exaktní úvahou vyvodit, že **každý znak je podmíněn párem vloh** (viz též zvláštní text).

Mendel si k pokusům vybral velmi vhodný objekt – **hrách setý** (*Pisum sativum*). Tato rostlina se dá velmi dobře pěstovat i křížit, vytváří poměrně velký počet semen a navíc od ní známe mnoho odrůd s různými geneticky podmíněnými znaky.

První Mendelův zákon o uniformitě hybridů

Známým Mendelovým pokusem je křížení bělokvěté a červenokvěté odrůdy hrachu. Vloha, resp. alela pro červený květ je dominantní (C), zatímco vloha pro bílý květ je recesivní (c). Mendel při svém pokusu zkřížil rostliny, z nichž jedna byla dominantním homozygotem (červené květy, genotyp CC) a druhá recesivním homozygotem (bílý květ, genotyp cc). Tyto rostliny představují rodičovskou neboli **parentální generaci** (P). Ukázalo se, že jejich veškeré potomstvo označované jako **první filiální generace** (generace F1) má pouze červené květy. U potomků se tedy projevil pouze jeden z rodičovských znaků. Znamená to, že všichni příslušníci generace F1 jsou heterozygoti (Cc) a protože červená barva květů je dominantní vůči barvě bílé, bude jejich fenotyp shodný s fenotypem rodiče, který je dominantním homozygotem. Tento poznatek označujeme jako **zákon o uniformitě kříženců** v první generaci.

Druhý Mendelův zákon o štěpení vloh

Při následujícím pokusu Mendel vzájemně křížil uniformní hybridy z generace F1. Ukázalo se, že v jejich potomstvu označovaném jako druhá filiální generace (též generace F2) sice převažovaly červenokvěté rostliny, ale v určitém podílu byli přítomni také bělokvětí jedinci. Podstatu tohoto **štěpení neboli segregace vloh** v generaci F2 vysvětluje následující kombinační čtverec a schéma:

Kombinace alel rodičů z generace F1		1. rodič	
		C	c
2. rodič	C	CC	Cc
	c	Cc	cc

Výsledné genotypy generace F2:	CC	Cc	Cc	cc
Výsledné fenotypy generace F2:	červený	červený	červený	bílý
Genotypový poměr:	1CC	2Cc		1cc
Fenotypový poměr:	3 červenokvěté		:	1 bělokvětá

Křížením heterozygotů z generace F1 tedy získáváme dominantní homozygoty (CC), heterozygoty (Cc) a recesivní homozygoty (cc) v **genotypovém početním poměru**

1 CC : 2 Cc : 1 cc. Dominantní homozygoti mají stejně jako heterozygoti červené květy, zatímco bílé květy se objeví pouze u recesivních homozygotů. Proto **fenotypový početní poměr** červenokvětých a bělokvětých rostlin je 3 : 1 (75 % jedinců má dominantní fenotyp a 25 % jedinců recesivní fenotyp). Uvedené poznatky jsou náplní Mendelova **zákona o segregaci alel** a jejich kombinaci ve druhé generaci kříženců.

Dědičnost barvy květů u hrachu je příkladem **dědičnosti s úplnou dominancí**. Pod tímto pojmem rozumíme stav, kdy se ve fenotypu heterozygotů projeví pouze dominantní alela. U některých jiných organismů však byly popsány případy, kdy se při vzniku znaku uplatňují obě alely. Příkladem je rostlina kejklířka skvrnitá (*Mimulus guttatus*), jejíž dominantní homozygoti mají červené květy, zatímco recesivní homozygoti mají květy žluté. Křížením dominantního a recesivního homozygota vznikne uniformní generace F1, jejíž příslušníci však mají květy oranžové, tedy jakýsi „přechod“ mezi dominantním a recesivním znakem. Tento případ označujeme jako **dědičnost s neúplnou dominancí**. Provedeme-li křížení heterozygotů z F1 generace, bude v F2 generaci fenotypový štěpný poměr roven genotypovému poměru, neboť heterozygoty lze odlišit od homozygotů. Příklad neúplné dominance ukazuje, že vzájemnou kombinací různých alel může vzniknout nová podoba znaku, která se u rodičů nevyskytuje.

Třetí Mendelův zákon o volné kombinovatelnosti alel, dihybridismus

Kromě barvy květů lze u hrachu studovat dědičnost barvy a tvaru semen. Každý z těchto znaků je podmíněn jiným genem. Barva semen může být buď žlutá (dominantní znak podmíněný alelou G) nebo zelená (recesivní znak podmíněný alelou g). Tvar semen může být buď zaoblený (dominantní znak podmíněný alelou R) nebo svařštělý (recesivní znak podmíněný alelou r). V obou případech jde o dědičnost s úplnou dominancí.

Křížíme-li dvojitého dominantního homozygota (GGRR), jenž vytváří žlutá zaoblená semena, s dvojitým recesivním homozygotem (ggrr), jehož semena jsou zelená a svařštělá, získáme uniformní generaci F1. Její příslušníci (dvojití heterozygoti GgRr) mají oba dominantní znaky (tj. žlutá zaoblená semena). Tyto potomky označujeme jako **dihybridy**, neboť jde o křížence ve dvou sledovaných znacích.

V generaci F2 vzniklé vzájemným křížením heterozygotů GgRr získáme **genotypový štěpný poměr**:

1 GGRR : 2 GGRr : 1 GGrr : 2 GgRR : 4 GgRr : 2 Ggrr : 1 ggRR : 2 ggRr : 1 ggrr.

Z něho vyplývá **fenotypový štěpný poměr**:

9 (G-R-) : 3 (G-rr) : 3 (ggR-) : 1 (ggrr).

Znamená to, že 9/16 jedinců bude vykazovat oba dominantní znaky, 3/16 budou mít žlutá, ale svařštělá semena, 3/16 budou mít zelená, ale zaoblená semena a 1/16 potomků bude dvojitými recesivními homozygoty se zelenými svařštělými semeny.

Výsledky křížení dihybridů ukazují, že **alely segregují v potomstvu nezávisle na sobě**. Kdybychom sledovali štěpení pouze jednoho z obou znaků, zjistili bychom stejné poměry jako v případě křížení rostlin s odlišnou barvou květů (tj. genotypový poměr 1:2:1, fenotypový poměr 3:1). Tento poznatek je náplní Mendelova **zákona o volné (nezávislé) kombinovatelnosti alel**.

Autozomově dominantní choroby

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

K nejčastějším monogenním chorobám patří **autozomově dominantní onemocnění**. Znamená to, že se příslušná porucha dědí jako **dominantní znak**. Postižené osoby jsou **většinou heterozygoti**, neboť k projevu choroby stačí přítomnost jediné mutantní alely. Jedinci s autozomově dominantní chorobou mají v mnoha případech **alespoň jednoho postiženého rodiče**, který jim mutantní alelu předává. Pravděpodobnost, že se osobě s touto chorobou narodí po sňatku se zdravým recesivním homozygotem stejně postižené dítě, je 50 %. Pokud se postižený potomek narodí oběma zdravým rodičům, znamená to, že jde o nově vzniklou mutaci neboli **mutaci *de novo***, k níž došlo v gametách jednoho z rodičů.

Achondroplázie (chondrodystrofie)

K autozomově dominantním onemocněním patří **achondroplázie** způsobená mutací genu **FGFR3**. Tento gen řídí syntézu receptoru, jenž váže tzv. fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor neboli **FGF**). Tato interakce umožňuje správnou koordinaci růstu a diferenciaci chondrocytů (tj. buněk tvořících chrupavku). V případě mutace genu FGFR3 je růst chrupavkové tkáně výrazně omezen a pacienti se rodí s nápadně zkrácenými končetinami i dalšími poruchami vývoje kostí.

K mutaci v genu FGFR3 dochází poměrně často, proto u 80 – 90 % jedinců s achondroplázií nalézáme tuto mutaci *de novo*. Asi 3 – 5 % pacientů s tímto postižením umírá neočekávaně během prvního roku života. Všichni pacienti, které potkáváme v genetických poradnách, jsou heterozygoti, neboť výskyt mutantních alel v homozygotní sestavě je perinatálně letální (dominantní homozygoti umírají těsně před narozením, v době porodu, popř. krátce po porodu). Reprodukce postižených osob (heterozygotů) je možná, výjimečné nejsou ani sňatky mezi stejně postiženými partnery.

Huntingtonova choroba

Klinicky velmi závažná je **Huntingtonova** (čti „Hantyngrtonova“) **choroba**. Jde o neurodegenerativní poruchu, která se rozvíjí zpravidla až po dosažení věku 30 – 40 let (vzácněji i později). Zpočátku se projevuje poruchami koordinace pohybů, neobvyklými grimasami a mimovolnými záškuby. Proto se tato porucha označuje také jako **Huntingtonova chorea**. Pod pojmem chorea (odvozeným z řeckého *choreia* – tanec) rozumíme obecně jakékoliv onemocnění projevující se mimovolnými, nekoordinovanými pohyby (včetně tzv. „tance svatého Víta“). U pacientů s Huntingtonovou chorobou postupně dochází k těžkému postižení nervové aktivity, což vede k rozsáhlým poruchám psychiky, svalové činnosti a nakonec k úmrtí pacienta. Příčinou je defekt genu HD způsobený **amplifikací opakovaných tripletových úseků (CAG)**. U normálních osob je v genu HD přítomno maximálně 26 těchto repetit. Zvýšení jejich počtu nad 36 je považováno za mutaci, která postihuje funkci genového produktu, jímž je protein huntingtin. Huntingtonova chorea tak patří spolu se syndromem fragilního X (k chorobám způsobeným amplifikací repetitivních tripletových sekvencí).

Známost osobností postiženou tímto onemocněním byl americký folkový zpěvák **Woody Guthrie** (1912 – 1967). Jeho život byl silně poznamenán tím, že stejnou chorobou trpěla také matka Nora Guthrie. Po celý život vzpomínal na zvláštní záchvaty své matky, kdy podle jeho vlastních slov „její obličej zrudl, vycenila zuby, ústa se zkrivila; začala křičet hlubokým hrubým hlasem a křičela stále hlasitěji a hlasitěji, dokud to její hlasivky vydržely; ruce se jí smýkaly u boků, potom za zády a nakonec se kroutily všemožným způsobem.“ Roku 1927 založila matka v domě požár. Proto byla umístěna v psychiatrickém sanatoriu. Když Woody

po čase svoji matku v léčebně navštívil, pokročila její choroba již natolik, že svého syna nepoznávala. Osamocený Woody si začal přivydělávat, jak se dalo. Hrál po ulicích písničky, žebrol a příležitostně se nechával najmout na různá pochybná zaměstnání. Jezdil nákladními vlaky napříč Amerikou a sbíral přitom cenné zážitky a zkušenosti, které později ztvárnil ve svých písních. Ve 40. a 50. letech 20. století se vypracoval na jednoho z nejlepších amerických folkových zpěváků. Ani on však neunikl osudu, který mu připravila zákeřná mutace v genu HD zděděná od matky. V roce 1951 se začaly projevovat první známky choroby. Jeho povaha se výrazně změnila – stal se divoce žárlivým a násilnickým. Již v září roku 1952 lékaři vyslovili podezření na Huntingtonovu choreu. V dalších 15 letech se jeho stav stále zhoršoval. Podle svědectví jeho známých a přátel se u něj nejprve projevovaly podivné, jakoby taneční pohyby rukou, pokračovalo chorobné hubnutí vedoucí až k úplnému vyčerpání. Současně se začala prohlubovat výrazná ztráta intelektu vedoucí až k úplné demenci. 3. října 1967 Woody zemřel. Brzy po jeho smrti se zjistilo, že symptomy Huntingtonovy choroby se začínají projevovat i u dvou Guthrieových dcer z prvního manželství.

Molekulárně biologická analýza umožňuje v současnosti bezpečně zjistit mutaci způsobující Huntingtonovu chorobu. Testy jsou založeny na izolaci kritického úseku genu HD, jenž obsahuje repetitivní sekvence. Fragmenty lze získat např. pomocí PCR nebo vyštěpením analyzovaného úseku pomocí restrikčních endonukleáz. Úsek HD se zmnženými repetitivními sekvencemi je výrazně delší než normální úsek, kde k amplifikaci nedošlo. Proto lze oba fragmenty úspěšně rozlišit pomocí gelové elektroforézy.

Molekulární biologie sice zajistí spolehlivé vyšetření, ale nepomůže vyřešit **etické otázky** týkající se komunikace s rodinami, u nichž se choroba vyskytla. Huntingtonova chorea je jedním z modelů, na jehož příkladě lze demonstrovat nejen možnosti, ale také omezení genetického poradenství a s ním související DNA diagnostiky. Problematické je zejména **testování neplnoletých dětí**, které nemají možnost posoudit závažnost situace a nejsou způsobilé k právním úkonům. Proto se podle současných etických norem **mutace u dětí nevyšetřují**, pokud se u nich neprojeví klinické symptomy.

Další příklady autozomově dominantních chorob

Jinými příklady autozomově dominantních poruch jsou **polydaktylie** (výskyt nadpočetných prstů na horní nebo dolní končetině), **familiární hypercholesterolémie** (zvýšená hladina cholesterolu v krevním séru vedoucí často k infarktům myokardu a dalším komplikacím) nebo **adultní forma polycystických ledvin** (výskyt mnohočetných cyst v ledvinách u pacientů v dospělém věku).

Autozomově recesivní choroby

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Mnohé monogenní choroby se dědí jako **recesivní znak**. Znamená to, že **postižený jedinec je recesivním homozygotem**, protože má v genotypu obě mutantní alely. Jeho rodiče jsou většinou **zdraví heterozygoti**. Druhá, nemutovaná alela je totiž dominantní a vytváří funkční protein, který postačuje pro zachování normální (nepatologické) formy daného znaku. Heterozygotní osoby označované též jako **přenašeči** však mají 25 % pravděpodobnost, že se jim narodí dítě s autozomálně recesivní chorobou (viz zvláštní text o Mendelových zákonech). Protože geny pro uvedené choroby leží na autozomech, označujeme všechna onemocnění s tímto typem dědičnosti jako **autozomově recesivní**. Stejně jako u autozomově dominantních chorob platí, že muži a ženy jsou postiženi stejným dílem.

Metabolické poruchy s autozomově recesivním přenosem

Mnohé autozomově recesivní choroby řadíme do skupiny **dědičných metabolických poruch** označovaných jako **enzymopatie**. Jejich příčinou je ztráta funkce určitého enzymu a následně přerušení příslušné metabolické dráhy. Výsledkem je zpravidla hromadění metabolického meziprojektu, popř. výchozí látky, která ve zvýšené koncentraci začíná vykazovat toxické účinky. Molekulárním mechanismem enzymopatií je zpravidla mutace obou alel genu, jenž řídí syntézu příslušného enzymu.

Nejznámější geneticky podmíněnou metabolickou poruchou je **fenylketonurie** nazývaná též **hyperfenylalaninémie**. Jde o poruchu metabolismu aminokyseliny fenylalaninu. Defekt enzymu způsobí, že se v těle pacienta koncentruje fenylalanin a některé jeho metabolické produkty. Pokud není choroba u novorozence včas rozpoznána, způsobí tyto nahromaděné látky nevratné poškození nervových buněk, takže se u zpočátku zdravého dítěte brzy rozvine těžká mentální retardace. V současnosti se u nás všichni novorozenci biochemicky vyšetřují a pokud je u nich fenylketonurie prokázána, lze vhodnou dietou (užíváním speciální stravy bez fenylalaninu) předejít dalšímu rozvoji choroby.

Známost, i když nepříliš častou metabolickou poruchou je **albinismus**, porucha enzymu, zprostředkujícího syntézu pigmentu melaninu. Albinotické osoby mají nápadně růžovou pokožku, světlé vlasy i ostatní ochlupení a šedomodrou duhovku s červeným odleskem. V mnoha případech trpí poruchami zraku.

Cystická fibróza

Kromě enzymopatií patří do skupiny autozomově recesivních chorob také **cystická fibróza** neboli mukoviscidóza. Jde o jedno z nejzávažnějších a nejčastějších geneticky podmíněných onemocnění. U této choroby dochází k poruše transportu osmoticky aktivních iontů do buněk. Nejvíce jsou postiženy plíce, v jejichž sklípcích se hromadí velké množství hlenu. Postižené děti vyžadují značnou péči a trvalý dohled, neboť se mohou vznikajícím hlenem udusit. Často také dochází k závažným plicním infekcím. Navzdory zdravotnické péči postižené osoby umírají zpravidla do 30 let. V současnosti se díky moderním terapeutickým metodám zlepšuje kvalita života pacientů a také poněkud prodlužuje jejich doba života.

Cystická fibróza je způsobena různými mutacemi v genu **CFTR** na chromozomu 7. Jeho proteinový produkt je součástí tzv. **chloridového kanálu**, jenž u zdravých osob reguluje koncentraci chloridových a sodných iontů v buňce. Poruchy tohoto proteinu vedou k výše zmíněným projevům. Kromě plic je postižena také funkce slinivky břišní (pankreatu), pacienti mužského pohlaví jsou zpravidla neplodní. Většina forem cystické fibrózy se projevuje zvýšenou koncentrací chloridů v potu, což lze využít k diagnostice choroby (tzv. chloridové nebo potní testy).

K nejčastějším mutacím genu CFTR patří delece tří nukleotidů označovaná jako **deltaF508**. Tato změna způsobuje ztrátu aminokyseliny fenylalaninu v proteinovém produktu, který je pak neaktivní. Nalézáme ji u 70 % českých pacientů trpících cystickou fibrózou. V ostatních střeoevropských populacích kolísá záchyt této mutace mezi 50 – 75 %.

Příklad – výpočet rizika pro potomstvo přenašečů

Do genetické poradny se dostavili zdraví manželé, kteří mají dítě postižené cystickou fibrózou. Stanovte obecné riziko pro jejich potomstvo.

Řešení: Označme si dominantní („zdravou“) alelu písmenem „A“ a recesivní („nemocnou“) alelu malým „a“. Dítě je recesivní homozygot (aa), proto muselo získat od každého z rodičů jednu recesivní alelu. Rodiče jsou tudíž zdraví heterozygoti neboli přenašeči (Aa). Pravděpodobnost postižení odvodíme z následujícího kombinačního čtverce udávajícího možné kombinace alel u potomků:

		Otec	
		A	a
Matka	A	AA zdravý dominantní homozygot	Aa zdravý heterozygot (přenašeč)
	a	Aa zdravý heterozygot (přenašeč)	aa postižený recesivní homozygot

Ze čtverce vyplývá, že z možných čtyř potomků bude pouze jeden postižený – a to recesivní homozygot. Riziko lze proto vyjádřit:

- a) zlomkem – tj. $\frac{1}{4}$;
- b) v procentech – tj. 25 %.

Odvozené riziko je plně ve shodě s údajem v úvodním textu k této kapitole.

Kodominance a dědičnost krevních skupin

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

V některých případech nemusí být alely určitého genu ve vztahu dominance a recesivity. Znamená to, že se mohou ve fenotypu jedince uplatnit současně. Typickým příkladem jsou alely genu pro systém AB0.

Mezi krevními skupinami patří **systém AB0** (vyslov „Á-Bé-nula“) ke klinicky nejvýznamnějším. Jako aglutinogeny (struktury na povrchu erytrocytů) zde fungují dvě rozdílné molekuly: jedna z nich podmiňuje vznik **krevní skupiny A**, druhá podmiňuje vznik **krevní skupiny B**. Osoby, u nichž dochází ke tvorbě obou uvedených aglutinogenů, mají **krevní skupinu AB**. Vyskytují se však i jedinci, u nichž se nevytváří ani jeden z aglutinogenů – tyto osoby mají **krevní skupinu 0** (nula).

Vznik konkrétní krevní skupiny AB0 systému je podmíněn genem, který má tři alely. Rozeznáváme **dvě dominantní alely** – I^A a I^B a **jednu recesivní alelu** – i^0 . Jejich vztah blíže objasňuje tabulka:

Genotyp	Krevní skupina
$I^A I^A$	A
$I^A i^0$	A
$I^B I^B$	B
$I^B i^0$	B
$i^0 i^0$	0
$I^A I^B$	AB

Z tabulky vyplývá, že nositel krevní skupiny A může mít v genotypu dvě alely I^A , ale také pár $I^A i^0$. Stejně tak jedinec s krevní skupinou může mít genotyp $I^B I^B$ nebo $I^B i^0$. Naopak nositel skupiny 0 je vždy recesivním homozygotem ($i^0 i^0$). Skupinu AB mají osoby s genotypem $I^A I^B$. Stav, kdy se při vyjádření znaku uplatní rovným dílem obě alely, označujeme jako **kodominanci**.

Identifikace krevních skupin má význam nejen při transfúzi ale v některých případech může rozhodnout paternitní spory. Má-li např. dítě skupinu AB, je jasné, že ani jeden z rodičů nemůže mít skupinu 0. Naopak pokud má dítě skupinu 0, nemůže mít ani jeden z rodičů skupinu AB, neboť v tomto případě by dítěti musel předat buď dominantní alelu I^A nebo dominantní alelu I^B .

Kromě AB0 známe ještě mnoho dalších krevních systémů, jejichž stanovením lze vyloučit nebo naopak nepřímo potvrdit otcovství vyšetřovaného muže. Patří k nim i **systém MN**, který má kodominantní alely pro skupinu M a skupinu N. S „nulovou“, resp. recesivní alelou se zde běžně nesetkáváme. Znamená to, že jedinec se skupinou N má v genotypu dvě alely N a jedinec se skupinou M má v genotypu dvě alely M. Osoby se skupinou MN a mají jednu alelu pro M a jednu alelu pro N.

Multifaktoriální dědičnost

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Nejčastějším typem dědičnosti u lidí je **multifaktoriální dědičnost**, při níž se na vzniku daného znaku (např. určité vrozené poruchy nebo jiné choroby) podílí více genů spolu s faktory zevního prostředí. Znamená to, že kombinace alel určitých genů je pouze jedním z předpokladů k vyjádření daného znaku. Jeho projev (a často i míra jeho projevu) je však výrazně podmíněn také vlivem prostředí, např. klimatickými vlivy, množstvím a složením potravy, přítomností toxických látek, parazitů a jiných infekčních činitelů v okolním prostředí, dále způsobem života, výchovou, sociálním zázemím, vzděláním a mnoha dalšími faktory.

Heritabilita a její výpočet

V mnoha případech je třeba posoudit, do jaké míry se při vyjádření určitého polygenního, resp. multifaktoriálního znaku uplatňují genetické vlivy. Proto stanovujeme v tomto případě **heritabilitu** neboli **dědivost**. Jde o hodnotu, která udává **míru dědičného určení znaku**. Často ji vyjadřujeme jako tzv. **koeficient heritability** označovaný h^2 . Tato hodnota je dána poměrem geneticky podmíněné variability (V_G) a celkové fenotypické variability (V_P), která odráží společný vliv genotypu i faktorů vnějšího prostředí:

$$h^2 = \frac{V_G}{V_P}$$

Hodnoty V_G a V_P určujeme statistickými výpočty jako varianci (V) neboli rozptyl měřených hodnot (jde o druhou mocninu směrodatné odchylky).

Heritabilita, resp. koeficient heritability se vyjadřuje desetinným číslem od nuly do jedné nebo v procentech (0 – 100 %). Čím je dědivost vyšší, tím významnější je role genotypu při vyjádření daného znaku. Naopak nízká heritabilita svědčí o rozhodujícím vlivu faktorů prostředí.

Výpočet heritability na základě studia dvojčat

Heritabilitu zkoumaného znaku lze odhadnout na základě **studia jeho výskytu u dvojčat**. U člověka a většiny savců se dvojčata vytvářejí dvěma cestami:

- **Dvojvaječná** neboli **dizygotní dvojčata** vznikají v případě, když v těle matky současně dozrají dvě vajíčka a každé je oplozeno jinou spermií. Z genetického hlediska jsou dvojvaječná dvojčata pouze dva stejně staří sourozenci, kteří mohou být odlišného pohlaví a mají v průměru 50 % shodných alel. Proto se v mnoha znacích liší.
- **Jednovaječná** neboli **monozygotní dvojčata** jsou daleko vzácnější. Vytvářejí se z jediného oplozeného vajíčka. V tomto případě dochází po prvním jaderném dělení zygoty k **úplnému oddělení dceřiných buněk (tzv. blastomer)**. Z každé blastomery pak vzniká nový jedinec. Z genetického hlediska jsou monozygotní dvojčata zcela identická, neboť mají všechny alely shodné. Jejich vzájemné rozdíly v některých znacích jsou podmíněny pouze vlivem prostředí. Pozorujeme-li shody a rozdíly ve výskytu určitého znaku u dostatečného počtu párů jednovaječných i dvojvaječných dvojčat, lze heritabilitu odhadnout podle vzorce:

$$H = \frac{K_{MZ} - K_{DZ}}{100 - K_{DZ}}$$

kde H – heritabilita v procentech, K_{MZ} – konkordance u monozygotních dvojčat (tj. procentuální podíl párů jednovaječných dvojčat, kde se sledovaný znak objevil u obou

jedinců), K_{DZ} – konkordance u dizygotních dvojčat (tj. procentuální podíl párů dvojvaječných dvojčat, kde se sledovaný znak objevil u obou jedinců).

Multifaktoriální choroby u člověka

V současné době se ukazuje, že přinejmenším 80 % lidské populace trpí některou z multifaktoriálních chorob, resp. poruch. Genetická predispozice byla prokázána i u mnoha onemocnění, u nichž se ještě nedávno jakýkoliv podíl genetických faktorů vylučoval.

K typickým multifaktoriálním vrozeným vývojovým vadám patří např. řada **vrozených srdečních vad**, dále **rozštěpové vady** (tj. rozštěp rtu, patra, páteře, nervové trubice atd.), vrozené vady ledvin a trávicího traktu (např. pylorostenóza), **vrozená luxace kyčlí**, **epilepsie**, **hypospadie** a mnoho dalších poruch. Mezi multifaktoriální choroby řadíme také většinu případů **cukrovky** (diabetes mellitus), **astmatu**, **alergie** a **kardiovaskulárních onemocnění** (zejména ischemické choroby srdeční a hypertenze). Multifaktoriální etiologii mají i mnohé **nádorové choroby**, kde předpokládáme dědičnou predispozici v kombinaci s karcinogenními vlivy vnějších faktorů.

Genetické poradenství je u multifaktoriálních chorob velmi složité. Pokud se taková choroba v rodině vyskytne, lze (na rozdíl od monogenních chorob) jen **obtížně kalkulovat riziko postižení pro další členy rodiny** (tj. nenarozené potomky nebo dosud nepostižené jedince v dětském či mladistvém věku). Empirické riziko většinou stanovujeme na základě populačního výskytu dané choroby a přitom přihlížíme také k tomu, kolik členů rodiny a v jakém věku je danou chorobou postiženo. Je třeba také uvážit, že mnohé multifaktoriální choroby postihují častěji jedno pohlaví a že riziko vzniku těchto onemocnění se zvyšuje u potomstva z příbuzenských sňatků.

Epigenetika, metylace DNA, genomový imprinting

Čalounová Gabriela

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

U eukaryotických organismů existují dva základní systémy dědičnosti. První odpovídá za přenos genetické informace mezi generacemi a řídí se principy mendelovské dědičnosti. Druhý systém je nazýván **epigenetická dědičnost**. Je regulován různými vnitřními a vnějšími faktory, často doprovázen specifickou modifikací DNA (methylace DNA, deacetylace histonů) a dalšími změnami chromatinu. **Epigenetika** hraje základní roli při regulaci transkripce. Jedním z významných epigenetických markerů a důležitou modifikací DNA je **methylace DNA**, která úzce souvisí se stavem chromatinu, a proto i negativně reguluje transkripční aktivitu genů. Methylace DNA je dědičná. Zárodečné buňky podléhají programování na pohlavně závislý vývoj a zrání embrya. Dosud byla methylace DNA jako hlavní regulátor exprese genů nalezena jak v prenatalním, tak postnatalním vývoji člověka, placentačních savců, u vačnatců i v endospermu krytosemenných rostlin. Methylace postihuje převážně repetitivní sekvence a tzv. CpG ostrůvky, které se často vyskytují na 5' konci v promotoru daného genu. Methylace buď brání vazbě transkripčních faktorů nebo umožňuje vazbu inhibičních komplexů. Methylace DNA je kontrolována enzymy metyltransferázami. Hlavní procesy závislé na DNA methylaci jsou: **genomový imprinting, X-inaktivace a onkogenetika**.

Inaktivace chromozomu X v ženských buňkách souvisí s dvěma hlavními geny XIST a TSIX a imprintingovým centrem Xic, kde na rozdíl od dalších případů X-inaktivace zahrnuje rozsáhlou oblast chromozomu.

Vliv imprintingu u nádorů. Deregulace imprintovaných protoonkogenů vede k jejich nadměrné expresi. Inaktivace imprintovaných tumor supresorových genů zase způsobuje vyšší vnímavost k nádorům. Příkladem nádorového onemocnění je Wilmsův tumor, kde polymorfismus imprintingu genu WT1 vede v populaci k predispozici k nádoru.

Genomový imprinting označuje specifickou expresi některých genů ve vztahu k jejich rodičovskému původu. Na rozdíl od mendelovských pravidel dědičnosti závisí exprese těchto genů na pohlaví rodiče. Existují geny, které se exprimují pouze z alely původem mateřské a uplatňuje se zde paternální imprinting a opakem jsou geny pod vlivem maternálního imprintingu, kdy se gen exprimuje pouze z alely otcovské. Genomový imprinting je určen epigenetickou modifikací genů, při které dochází ke změně transkripční aktivity genů, ale ne jejich primární sekvence. Imprintované geny mají tedy monoalelickou expresi, jsou funkčně haploidní, což ruší výhodu diploidie (krytí recesivních negativních mutací). Pro evoluční výhodu tohoto jevu svědčí opakovaný vznik nezávisle v evoluci. Je popisováno několik evolučních teorií vzniku imprintingu. Nejčastěji citovanou je **Teorie rodičovského konfliktu (Genetic conflict hypothesis = GCH)**. Samice musí zajistit své vlastní přežití, kdežto taktika samců je co nejlepší přežití potomků. Většina imprintovaných genů s paternální transkripcí podporuje proliferaci a naopak mateřské aktivní alely růst brzdí. Další teorie uvažují o vzniku imprintingu v souvislosti s udržení sexuální reprodukce a prevencí partenogeneze. Existence imprintingu je také příčinou neúspěchů při klonování, uvádí se vyšší riziko chorob u dětí po in vitro fertilizaci, zvláště při metodě ICSI.

Patologie spojené s poruchou imprintingu

Genomový imprinting je časově, druhově a tkáňově specifický. Imprintované geny mají roli v regulaci buněčného dělení. Porucha imprintingu vede k abnormalitám růstu, vývoje.

Úplné hydatidózní moly vznikají duplikací chromozomů spermie při spojení s vajíčkem bez jádra. Naopak **ovariální teratomy** vznikají z buněk o chromozomálním složení 46,XX, které obsahují pouze chromozomy od matky. Z toho plyne, že genom od otce je důležitý

zejména pro extraembryonální vývoj, kdežto genom matky má především vliv na vývoj plodu.

Porucha imprintingu je spojená s řadou **genetických syndromů**, příkladem jsou syndromy Prader-Williho a Angelmanův či Beckwith-Wiedemannův syndrom. U některých onemocnění se zatím vliv genomového imprintingu pouze předpokládá (Tab č.1).

Je prokázána existence řady genů pod vlivem imprintingu (databáze: www.otago.ac.nz/IGC). Imprintované oblasti v genomu obsahují klastry reciproce imprintovaných genů, které jsou regulovány rozdílně metylovanými oblastmi – tzv. **IC – imprintingovými centry**. Důležité modely pro výzkum imprintingu jsou systém genů H19/IGF2 a syndromy Prader-Williho a Angelmanův.

Tab. 1: Genetické syndromy

Syndromy s geny podléhajícími imprintingu	Lokalizace na chromozómu
Syndrom Beckwith-Wiedemannův	11p15
Wilmsův tumor (ztráta imprintingu IGF2 genu)	
Syndrom Prader-Williho	15q11-q12
Syndrom Angelmanův	15q11-q12
Syndrom Silver-Russellův	7p11-p13, 7q31-qter
Přechodný novorozenecký diabetes mellitus	6q24
Albrightův syndrom, McCune-Albrightův syndrom	20q13
Paraganglioma	11q13
Rettův syndrom (MECP2)	Xq28
Maternální a paternální UPD (uniparentální disomie) 14 syndrom	14
Syndromy, které pravděpodobně zahrnují imprintingové geny	
Turnerův syndrom	X
Familiární pre-eklampsie	10q22
Maternální UPD 2 syndrom	2
Maternální UPD 16 syndrom	16
Komplexní genetická onemocnění s vlivy rodičovského původu	
Astma, atopie	4q35, 11q13, 16q24, 16p12
Autismus	7q22-q31, 15q11-q13
Hirschprungova choroba	10q11
Syndrom Cornelia de Lange	3q26, 5p13
Psoriáza	6p, 16q
Preference jedné strany	2p12-q11
Diabetes mellitus I typu	6p21, 6q25-q27, 10p11-q11, 16q
Diabetes mellitus II typu	5p, 12q, 18p11
Alkoholismus	1, 2, 4, 8, 9, 16
Alzheimerova porucha	10q, 12q
Bipolární afektivní porucha	11q, 2p, 2q, 6q, 13q, 14q, 16q, 18q
Schizofrenie	2p12-q11, 22q12

Literatura:

1. Bóday Á, Maťoška V: Genomový imprinting. Čes-Slov. Pediatr 2000; 55: 33-40.

2. Glaser RL, Ramsay JP, Morison IM: The imprinted gene and parent-of-origin effect database now includes parental origin of de novo mutations. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34(Database issue):D29-31.
3. Morison IM, Ramsay JP, Spencer HG. A census of mammalian imprinting. *Trends Genet.* 2005 Aug;21(8):457-65.
4. Polívková Z.: Imprinting genů a lidská patologie. *Čas Lék čes* 2005; 144: 245-250.
5. Salozhin SV, Prokhorchuk EB, Georgiev GP: Methylation of DNA-one of the major epigenetic markers. *Biochemistry (Mosc).* 2005 May;70(5):525-32.
6. Swales AK, Spears N. Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction.* 2005 Oct;130(4):389-99.
7. Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F. (Eds.) et al.: *Klinická genetika, Kapitola 9.*; Triton, 2001; 6.vydání, str.154-155.

Syndromy Prader-Williho a Angelmanův

Čalounová Gabriela

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Syndromy Prader-Williho a Angelmanův jsou fenotypově zcela odlišná multisystémová onemocnění. Incidence obou syndromů je udávána v indoevropské populaci 1/15-20 tis.

Klinické příznaky **Angelmanova syndromu (AS)** (MIM105830) jsou výrazné, ale nespecifické. Během prvních měsíců až let života je diagnóza z klinického obrazu obtížná a většinou je stanovena až mezi 3.-7. rokem věku, kdy se již manifestuje většina z typických symptomů. Mezi klinické charakteristiky patří opoždění psychomotorického vývoje (retardace vývoje je pozorována až mezi 6.-12. měsícem věku), porucha vývoje řeči, porucha koordinace pohybů, obvykle ataktická, trhavá chůze, ataky neadekvátního smíchu („happy puppet phenotype“), mikrocefalie, epileptické záchvaty jsou popisovány u více než 90 % pacientů, hypopigmentace se objeví asi u 60 % pacientů.

Klinické charakteristiky **syndromu Prader-Williho (PWS)** (MIM176270) jsou snížené pohyby plodu, po narození poruchy sání, hypotonie, nízké váhové přírůstky, neprospívání. Ve věku mezi 1.- 6. rokem nadměrné přibývání na váze, centrální obezita, posedlost jídlem. Charakteristickými obličejovými rysy jsou dolichocefalie, úzký obličej, mandlový tvar očí, svěšené koutky úst („rybí ústa“), dále hypogonadismus, hypopigmentace, malá postava, malé ruce a nohy, mírná či střední mentální retardace, problémy v chování. Terapie je prováděna podáváním růstového hormonu.

Většina případů PWS a AS jsou případy **sporadické**, které spojuje lokalizace v chromozomální oblasti 15q11-q13. Tento úsek DNA je charakteristický tím, že obsahuje i geny, jejichž regulace exprese je pod vlivem genomového imprintingu. Exprese imprintovaných genů oblasti 15q11-q13 je řízena z **imprintingového centra (IC)**. Velikost tohoto centra se odhaduje na 100 kb. Funkční mechanismus není zatím znám. Hlavním kandidátem pro PWS je **gen SNRPN**, u kterého byla sledována jeho monoalelická exprese ve fetálním mozku, v srdci a v dospělém mozku. Za AS genotyp majoritně zodpovídá **gen pro ubiquitin ligázu 3A (UBE3A)**. Byl pozorován specifický imprinting UBE3A genu v mozku oproti bialelické expresi tohoto genu v lymfoblastoidních buněčných liniích a ve fibroblastech.

Etiologickou příčinou zmíněných syndromů je ztráta dědičného materiálu 15q11-q13, buď paternálního (syndrom Prader-Williho) nebo maternálního (syndrom Angelmanův) původu. Absence exprese je nejčastěji (70-80 %) následkem **delecí** o délce cca 4 Mb. Deleční formy PWS a AS vznikají v 99 % de novo. **Uniparentální paternální disomie (UPD)** (hetero- i isodisomie) patnáctého chromozomu se u AS objevuje s četností asi 5 %. U PWS je frekvence maternální UPD (hetero- i isodisomie) vyšší a pohybuje se okolo 20-25 %. Frekvence výskytu **chyb v imprintingovém centru** je nízká (1-5 %). Tito pacienti mají normální biparentální dědičnost chromozomu 15, ale mají abnormální metylační vzorec charakteristický pro oba syndromy. Většina PWS/AS pacientů s imprintingovým defektem jsou případy sporadické bez detekovatelných mutací v IC oblasti na úrovni DNA. U familiárních forem je pravděpodobnost narození dalšího postiženého dítěte 50 %. U Angelmanova syndromu je frekvence **mutací v UBE3A genu** 5-10 %. U této formy AS je rekurentní riziko v rodině probanda 50 %. Přítomnost balancované translokace u rodičů může být predispozicí k abnormální segregaci, v tomto případě je riziko rekurence 25 %.

Existuje široká škála **laboratorních diagnostických možností** k odhalení kauzálních mutací na úrovni cytogenetické, molekulárně cytogenetické a molekulárně genetické. Klasická cytogenetická detekce delecí 15q11-q13 pomocí **G-pruhování** (metafázické chromozomy) je málo citlivá a vyžaduje nejenom kvalitní preparát, ale i zkušené oči cytogenetika. Větší rozlišovací schopnost dává metoda **HRT** (High Resolution Technique), která analyzuje prometafázické, méně kondenzované chromozomy. Další možností analýzy chromozomů je **FISH** (Fluorescenční In Situ Hybridizace). Podstatou metody FISH je hybridizace, navázání DNA sondy na chromozomální DNA vyšetřovaného pacienta. V současnosti můžeme odhalit nebo upřesnit drobné delece, duplikace, translokace, určit původ marker chromozomů a diagnostikovat buněčné linie, které jsou v tkáni nebo krvi zastoupeny jen v malém procentu. U PWS a AS lze detegovat mikrolece chromozomu 15q11-q13 u cca 70 % pacientů s klinickými projevy těchto syndromů.

Z molekulárně-genetických metod se používá **analýza STR** (Short Tandem Repeat), která využívá sledování polymorfních míst extra- či intragenových v oblasti 15q11-q13. Při diagnostice PWS a AS vycházíme z polymorfních lokusů, které se vyskytují v populaci s vysokou heterozygotitou. Rodina je plně (100 %) informativní v případě, že můžeme rozlišit u každé alely otcovský a mateřský původ.

Metoda metylační analýzy studuje bicistronickou oblast SNRPN-SNURF, kde byl jasně prokázán diferenciativní imprinting s paternální transkripcí. Metylační analýza eliminuje závislost na informativitě v rodině (k vyšetření stačí DNA probanda). Metoda je založena na modifikaci genomické DNA použitím hydrogensířičitanu sodného, kdy dochází nejprve k denaturaci dvouvláknové DNA s následnou modifikací cytozinu za uracil, kdy metylovaný cytozin zůstává nezměněn. Následuje PCR konvertované DNA pomocí specificky navržených primerů (maternální primer nasedá na nekonvertovanou (metylovanou) oblast a naopak paternální na oblast konvertovanou). Metoda je schopna odhalit případy delece, UPD (hetero- či isodisomie) a imprintingové defekty. K upřesnění metylační analýzou odhalené absence je potřebné paralelní použití FISH a STR analýzy.

Zcela nová metoda **MS-MLPA** (Methylation Sensitive-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) je také založena na PCR. Využívá specifických primerů, kdy jsme schopni v jedné reakci amplifikovat až 43 lokusů. Princip metody viz www.mlpa.com. K analýze využíváme kit pro diagnostiku syndromů Prader-Williho a Angelmanova od firmy MRC-Holland, který obsahuje 18 kontrolních sond a 25 sond v kritické oblasti 15q11-q12. Varianta MS-MLPA využívá HhaI-metyl senzitivní endonukleázu, která štěpí nemetylovanou DNA a odhaluje metylační vzorec v promotorové oblasti SNRPN a NDN genu. Tato metoda je citlivá, stačí velmi malé množství čisté nativní DNA. Podle výsledků jsme schopni odlišit delecí formu syndromu od uniparentální disomie, což doposud umožnila pouze kombinace metod molekulárně cytogenetické (FISH) a molekulárně genetické (STR). MS-MLPA umožní odhalit imprintingové defekty, ale i případy trisomií.

U pacientů s AS je nutné pamatovat na až 5-10 % výskyt mutací v UBE3A genu, které nejsou diskutovanými metodami odhaleny. V případě negativního výsledku je nutné, aby klinik rozhodl, zda fenotyp probanda odpovídá zcela všem daným kritériím AS, dříve než přistoupíme k finančně i pracovně náročné **mutační analýze UBE3A genu**.

Problematika syndromů PWS a AS se týká zejména neurologů, dětských neurologů, pediatrů, internistů, endokrinologů a genetiků. Znalost klinické symptomatologie PWS a AS a povědomost o možnostech molekulárně genetických vyšetřovacích metod je základem úspěšné diagnostiky.

Literatura:

1. Williams CA, Frias JL. The Angelman ("happy puppet") syndrome. Am J Med Genet. 1982; 11: 453-60.

2. Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O'Riordan MA, Cassidy SB. The changing purpose of Prader-Willi syndrome Clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics* 2001; 108, 92-6.
3. Bóday Á, Maťoška V, Seemanová E, et al.: Detekce delecí a uniparentálních disomií u Praderova- Williho a Angelmanova syndromu. *Čes-slov Pediat* 2000; 55, 1: 3-8.
4. Čalounová G, Bóday A, Havlovicová M, et al.: Diagnostické možnosti syndromů PWS a AS. *Čes a slov Neurol Neurochir* 2005; 68/101, 284-293.
5. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. *Eur J Hum Genet* 1997; 7: 94-8.
6. www.mlpa.com

Mitochondriální DNA a mimojaderná dědičnost

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Molekula mtDNA, vztah jaderného a mimojaderného genomu

Jádro v eukaryotické buňce není jediným nositelem genetické informace. Nevelké molekuly DNA jsou obsaženy také v semiautonorních buněčných organelách, tj. v **mitochondriích** a v případě rostlinných buněk také v **plastidech**. Tyto molekuly DNA vytvářejí tzv. **mimojaderný genom**. Protože obsahují určité specifické geny, které v jaderné DNA chybí, uplatňují se při utváření některých dědičných znaků. Pro jejich přenos je charakteristická tzv. **mimojaderná dědičnost**, která se neřídí Mendelovými pravidly.

Mitochondrie se na rozdíl od ostatních organel v buňce nově nevytvářejí, ale množí se dělením. Mají vlastní **kružnicovou molekulu DNA (mtDNA)**, která se velmi podobá molekulě DNA, jakou známe u bakterií. Mitochondrie mají také **vlastní proteosyntetický aparát**. Jeho součástí jsou ribozomy, které svým utvářením připomínají ribozomy u bakterií. Je zajímavé, že se při proteosyntéze v mitochondriích projevují určité odchylky od standardního genetického kódu, takže některé kodony zde mají jiný význam.

V nitru mitochondrií probíhají biochemické procesy významné pro funkci buňky i pro existenci celého organismu. K nim patří zejména **produkce chemické energie ve formě ATP, oxidace substrátů v citrátovém cyklu a β -oxidace mastných kyselin**. Proto se mutace genů v mtDNA uplatňují při vzniku mnoha závažných chorob. Na rozdíl od těchto mutací však známe i změny mtDNA, které nemají žádný fenotypový projev, a proto se bez jakýchkoliv omezení přenášejí z generace na generaci. Tyto polymorfismy mají význam při srovnávacích antropologických studiích a při identifikaci osob.

Molekulu mtDNA tvoří téměř výhradně jedinečné (neopakované) sekvence. Repetitivní (opakované) sekvence jsou přítomny jen ve velmi malém podílu. Tím se mtDNA výrazně liší od jaderné DNA, která obsahuje až 30 % úseků tvořených repetitivními sekvencemi. Další rozdíly spočívají v délce molekuly a v počtu genů. Molekula mtDNA obsahuje pouze 16 568 párů bazí, což je zhruba 10 000 krát méně než počet nukleotidových párů tvořících jaderný genom.

Také počet genů v mtDNA je ve srovnání s jadernou DNA zanedbatelný. Lidská mtDNA obsahuje pouhých 37 genů, zatímco jaderný genom jich obsahuje asi 30 tisíc. Proto je tvorba některých enzymů nezbytných pro děje uvnitř mitochondrií řízena geny v buněčném jádře. Tyto proteiny se syntetizují v endoplazmatickém retikulu a zvláštními mechanismy jsou transportovány do nitra mitochondrií. Také exprese některých genů lokalizovaných v mtDNA je regulována jadernými geny, takže vzájemný vztah jaderného a mimojaderného genomu je velmi úzký.

Mitochondriální dědičnost

Samčí pohlavní buňka u vyšších živočichů (včetně člověka) zpravidla předává do oplodňované samičí gamety pouze své haploidní jádro, nikoli však mitochondrie. **Nový jedinec proto získává veškerou mimojadernou genovou výbavu pouze od mateřské gamety**. Znaky řízené mitochondriálními geny se proto z mateřských jedinců přenášejí na veškeré potomstvo. Tento způsob dědičnosti označujeme pojmem **matroklinita** (od latinského *mater* – matka a *clinare* – obrátit), popř. **maternální** nebo **matrilinéární dědičnost**. V klinické genetice se též používá pojem **mitochondriální dědičnost**.

Molekula mtDNA je náchylnější ke vzniku mutací než jaderná DNA. Udává se, že ve srovnání s jadernou DNA mutuje desetkrát častěji. Je totiž lokalizována v blízkosti vnitřní mitochondriální membrány, kde vznikají reaktivní kyslíkové radikály, které mají

mutagenní účinky. Na rozdíl od jaderné DNA také není chráněna histony a nemá dostatečné mechanismy, které by mohly mutace opravit (reparovat).

V současné době bylo popsáno více než 30 chorob podmíněných mutacemi mitochondriálních genů. Jednou nejznámějších je **Leberova hereditární neuropatie optického nervu**. Pacienti s touto chorobou se narodí zcela nepostižení, avšak mezi 12. – 30. rokem začínají ztrácet zrak. Příčinou je postupná atrofie optického nervu, která nakonec vede k úplné slepotě.

K chorobám podmíněným mutacemi mtDNA patří také některé těžké poruchy nervové, srdeční nebo pohybové aktivity (epilepsie, encefalomyopatie atd.). Předpokládá se, že mutace mitochondriálních genů se mohou zčásti uplatnit i při vzniku některých forem Alzheimerovy nebo Parkinsonovy choroby.

Heteroplazmie a homoplazmie

Stanovení rizika přenosu mitochondriálně podmíněných chorob z matky na potomky nebývá jednoduché, neboť může být komplikováno tzv. **heteroplazmií**. Pod tímto pojmem rozumíme přítomnost dvou nebo více geneticky odlišných forem mitochondrií v jedné buňce. Znamená to, že mutace pro určitou chorobu může být přítomna pouze v mtDNA některých mitochondrií, zatímco jiné mitochondrie obsahují nemutovanou alelu. Pro postižení nového jedince je pak rozhodující náhodná distribuce mitochondrií do vajíčka při oogenezi. Pokud do oocyty přejdou pouze mitochondrie bez mutované alely, dítě se narodí zdravé. V opačném případě lze předpokládat narození postiženého potomka. Výše postižení ovšem závisí na podílu mitochondrií s mutací a na jejich další distribuci při buněčném dělení. Nezřídka se tak stává, že nepostižená matka, jejíž buňky obsahují mutované mitochondrie jen v nízké frekvenci, má těžce postižené potomky. Opakem heteroplazmie je **homoplazmie**, tj. situace, kdy jsou všechny molekuly mtDNA v buňce, resp. v celém těle jedince geneticky identické.

Význam studia mtDNA v antropologii a v kriminalistice

Při svých výzkumech vkládají antropologové a kriminalisté naději do mtDNA, která je ve srovnání s jadernou DNA stabilnější a v buňce bývá přítomna v daleko větším počtu identických kopií (daných poměrně velkým počtem mitochondrií). Tím se zvyšuje pravděpodobnost, že v materiálu najdeme úseky vhodné k analýze.

Molekulárně biologickou analýzou lze však identifikovat mutace, popř. polymorfismy mtDNA a zjištěných poznatků využít ke studiu evoluce zkoumaného organismu. Tak studie mtDNA ukázaly, že vývojová linie dnešního člověka (dříve označovaného *Homo sapiens sapiens*) se od ostatních příslušníků rodu *Homo* oddělila asi před 150 – 200 tisíci roky. U jejího zrodu stála nevelká skupina žen, možná dokonce jediná žena. Tato tzv. „**mitochondriální Eva**“, od níž jsme získali naši mimojadernou genovou výbavu, žila pravděpodobně na území afrického kontinentu.

Také v **kriminalistice** provádíme sekvenční analýzu krátkých hypervaribilních úseků mtDNA izolované z lidských pozůstatků, eventuálně biologických stop. To lze využít při identifikaci osob a zčásti i k objasnění jejich příbuzenských vztahů.

Chromozomové určení pohlaví

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Karyotyp somatické buňky člověka obsahuje celkem 46 chromozomů, z nichž 22 párů tvoří autozomy a jeden pár **pohlavní chromozomy neboli gonozomy**. Chromozom X a Y jsou výrazně morfologicky i geneticky odlišné: chromozom X je výrazně větší a obsahuje nepoměrně více genů než chromozom Y. Pro odlišné utváření jsou pohlavní chromozomy také označovány jako **heterochromozomy**. Jejich kombinace rozhoduje o tom, jaké pohlaví se u jedince vyvine.

Savčí typ pohlavní determinace (*Drosophila*)

Chromozomové určení pohlaví člověka je **savčího typu**, jenž bývá rovněž označován jako **typ *Drosophila*** (neboť stejné určení pohlaví má i octomilka - *Drosophila melanogaster*). Znamená to, že **ženy jsou homogametním pohlavím** (v jejich karyotypu nacházíme dva pohlavní chromozomy X), zatímco **mužské pohlaví je heterogametní** (karyotyp muže obsahuje dva odlišné gonozomy – X a Y). O významu obou gonozomů blíže pojednávají samostatné texty.

Kombinace gonozomů při oplodnění

Sledujeme-li rozchod gonozomů při meiotickém dělení u muže, zjistíme, že **početní poměr spermií s gonozomem X a spermií s gonozomem Y je v závěru spermatogeneze přesně 1:1** (z jednoho primárního spermatocyty vzniknou dvě spermie s chromozomem Y a dvě spermie s chromozomem X). Proto je **pravděpodobnost narození chlapce i dívky zcela shodná (50 %)**. Ověřit si to můžeme i následujícím kombinačním čtvercem:

		Otec	
		Gonozomy v gametách	
Matka	X	XX dcera	XY syn
	X	XX dcera	XY syn

Srovnáme-li dlouhodobé statistiky vycházející z velkého počtu dat, dojdeme k překvapivému zjištění, že **početní poměr pohlaví novorozenců je zhruba 1,05 : 1 ve prospěch mužského pohlaví**. Důvod tohoto nevelkého rozdílu spočívá zřejmě v odlišné hmotnosti gonozomů. Spermie nesoucí větší a tedy těžší chromozom X je poněkud méně pohyblivá než spermie s nevelkým chromozomem Y. Ve vyšších věkových skupinách se však poměr pohlaví vyrovnává, neboť muži mají ve srovnání s ženami vyšší mortalitu.

Ptačí typ pohlavní determinace (*Abraxas*)

U mnoha zástupců hmyzu (mimo již zmíněné octomilky a dalších dvoukřídlých), ale také u většiny plazů a ptáků se však setkáváme se zcela opačným typem pohlavní determinace. Samice jsou heterogametní (mají gonozomy XY neboli ZW) a samci naopak homogametní (mají gonozomy XX neboli ZZ). Podle motýla pídalky angreštové (*Abraxas grossulariata*) se tento způsob určení nazývá **typ *Abraxas*** nebo též **ptačí typ**.

Pohlavní determinace typu Protenor

U některých živočichů známe ještě jiné způsoby chromozomového určení pohlaví. Např. samečkům určitých druhů ploštic a kobytek chromozom Y zcela chybí, takže jejich pohlaví je určeno pouze jedním gonozomem X. Samičky těchto zástupců hmyzu však mají dva chromozomy X stejně jako octomilka (*Drosophila*). Tento způsob určení pohlaví je charakteristický pro **typ Protenor**. Pojmenování pochází od ploštiny *Protenor belfragii*.

Pohlavní determinace u rostlin

Pohlavní chromozomy byly zjištěny u některých druhů **dvoudomých rostlin**, např. u chmele otáčivého (*Humulus lupulus*), kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*), šťovíku kyselého (*Rumex acetosa*), konopí setého (*Cannabis sativa*) a několika dalších. Až na výjimky je v těchto případech samičí pohlaví homogametní a samčí heterogametní.

U jiných dvoudomých rostlin (např. u bažanky roční – *Mercurialis annua*) však heterochromozomy neexistují a pohlaví je určeno pouze kombinací alel některých specifických genů.

Chromozom X

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Lidský gonozom X je středně velký submetacentrický chromozom, který řadíme do morfologické skupiny C. Obsahuje 165 MB DNA. Ještě před započítáním projektu lidského genomu (HGP) patřil chromozom X k nejlépe zmapovaným lidským chromozomům. Již v roce 2001 na něm bylo identifikováno téměř 200 genů s plně objasněnou funkcí. V současnosti známe na tomto gonozomu 1098 genů. Nacházejí se zde geny ovlivňující tvorbu pohlavních znaků a především geny řídící mnohé fyziologicky významné procesy (např. metabolické děje, funkci svalů, nervovou činnost, zrakové schopnosti, srážení krve a další).

X-vázaná recesivní dědičnost

Choroby, podmíněné mutacemi genů na chromozomu X, se vyznačují **pohlavně vázanou dědičností**. Její nejčastější formou je **X-vázaná recesivní dědičnost** zvaná též **gonozomově recesivní dědičnost**. Toto označení vyplývá ze skutečnosti, že recesivní alela se u žen většinou neprojeví, neboť je kompenzována dominantní alelou na druhém chromozomu X. Proto bývají ženy **zdravými přenašečkami** příslušné alely. **Postižení jsou téměř výhradně muži**, neboť chromozom Y neobsahuje (až na několik genů v oblastech PAR) odpovídající genové lokusy. Proto defektní alela na chromozomu X není v konstituci XY kompenzována. Tento fakt výrazně odlišuje gonozomově recesivní choroby od autozomově dominantních a autozomově recesivních znaků, které se rovným dílem projevují u obou pohlaví.

K velmi častým recesivním poruchám vázaným na chromozom X patří **daltonismus**. Jde o nejčastější formu **barvosleposti**, kdy postižená osoba není schopna rozlišit červenou a zelenou barvu (obě zpravidla vnímá jako šedou).

Méně frekventovaným gonozomálně recesivním onemocněním je **hemofilie**. Ve většině případů jde o tzv. **hemofilii A**, která je způsobena mutací genu F8, jenž leží na dlouhých raménkách chromozomu X (konkrétně Xq28). Tento gen řídí syntézu **faktoru VIII**. Přítomnost tohoto specifického proteinu je nezbytná pro vytvoření krevní sraženiny a k zástavě krvácení.

U hemofiliků se faktor VIII následkem mutace buď vůbec nevytváří, nebo je produkován jen v defektní formě, která má sníženou aktivitu. Postižení proto dlouho krvácejí i z velmi nepatrných ran, mívají pod kůží četné krevní podlitiny a trpí bolestivými výrony krve do kloubů. Často umírají na nezadržitelné vnitřní krvácení. Těžká neléčená forma hemofilie vede k závažnému postižení pohybového aparátu a k trvalé invaliditě.

Kromě hemofilie A je známa ještě vzácnější **hemofilie B**, která je způsobena mutací genu F9, jenž obsahuje informaci pro syntézu faktoru IX (tzv. *Christmas factor*), jenž se rovněž účastní srážení krve. Také tento gen je lokalizován na chromozomu X (Xq27.1-q27.2) a projevy onemocnění jsou podobné jako u hemofilie A.

Dalšími chorobami recesivně vázanými na chromozom X jsou **Duchenneova a Beckerova muskulární dystrofie**. Obě jsou způsobeny mutacemi dystrofinového genu (DMD) ležícího v pruhu Xp21.2. Rozsah a lokalizace mutací rozhoduje o tom, zda se vyvine těžší forma – Duchenneova dystrofie, která má letální průběh (progresivní myopatie vedoucí k úplné degeneraci svalů a úmrtí pacienta), nebo lehčí forma – Beckerova dystrofie, jejíž projevy lze do určité míry upravit vhodnou rehabilitací.

Kromě uvedených poruch známe ještě mnoho dalších gonozomálně recesivních onemocnění. Z nich připomeňme **X-vázanou ichthyózu**. Jde o poruchu vývinu kůže, která se rozvíjí již v dětství. K typickým projevům patří hyperkeratóza, přičemž granulární vrstva kůže (*stratum granulosum*) je výrazně zesílena. U pacientů se mohou objevit i další změny, jako např. bílé

skvrny na oční rohovce, nesestouplá varlata i mentální retardace. U 90 % postižených zjišťujeme molekulárně cytogeneticky mikrolepci genu STS (Xp22.3) řídícího syntézu steroidní sulfatázy.

X-vázaným recesivním onemocněním je také **Kallmanův syndrom**, k jehož nejtypičtějším projevům patří hypogonadismus spojený s částečnou nebo úplnou sterilitou. Gen pro Kallmanův syndrom je lokalizován v těsné blízkosti genu pro X-vázanou ichthyózu, proto vzácně dochází k současné delecii obou lokusů a ke kombinaci uvedených postižení.

K nejznámějším a nejfrekventovanějším X-vázaným chorobám patří **syndrom fragilního chromozomu X**, o němž pojednává samostatný text.

X-vázaná dominantní dědičnost

U některých vzácnějších chorob pozorujeme **X-vázaný dominantní** neboli **gonozomově dominantní přenos**. Příslušná alela se v tomto případě projeví i u žen, neboť stačí, aby byla přítomna jen na jednom z chromozomů X. Postižení muži pak předávají alelu všem svým dcerám, které jsou rovněž postiženy.

Příkladem gonozomálně dominantní choroby je **vitamin D-rezistentní** neboli **hypofosfatemická rachitis**. Jde o zvláštní formu křivice, která je způsobena mutací genu, jenž řídí syntézu receptoru pro vitamin D.

Další významnější poruchou s gonozomově dominantním přenosem je **Rettův syndrom**. Je způsoben mutací genu MECP2 na chromozomu X (Xq28). Hlavním a zvláště těžce postihujícím příznakem tohoto těžkého onemocnění je apraxie (též dyspraxie), tj. neschopnost ovládat tělo a provádět tak motorické pohyby. K dalším závažným projevům patří autistické rysy a celkové opoždění vývoje. Toto onemocnění pozorujeme zpravidla jen u dívek, u chlapců je prenatálně nebo perinatálně letální.

Zešíkmení inaktivace chromozomu X u žen

Jakub Minks, Martin Hřebíček, Lenka Dvořáková

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Inaktivace chromozomu X (X inaktivace) je mechanismus, jakým ženy (i samice ostatních placentálních savců) vyrovnávají dvojnásobnou dávku genů kódovaných na gonosomech. Chromosom Y totiž nese kromě genů zodpovědných za „mužství“ poměrně zanedbatelný počet genů v porovnání s chromosomem X; přibližně 50 vs. 1000 genů.

K X inaktivaci dochází v časném embryonálním stádiu, při počtu řádově desítek buněk, je řízena **X-inaktivačním centrem (XIC)**, které se nachází v oblasti Xp13 a sestává se z několika genů kódujících netranslatované sestřihávané mRNA transkripty a z jejich regulátorů. V důsledku X inaktivace je v každé ženské somatické buňce transkripčně aktivní právě jeden chromosom X. Druhý gonosom je pomocí epigenetických modifikací na úrovni DNA (která je specificky metylována) a histonů (které jsou jednak kovalentně modifikovány a jednak nahrazeny speciálními histony macroH2A) inaktivován a tvoří superkompaktní heterochromatin, který známe také jako **Barrovo tělísko**.

Průběh zejména časných stádií inaktivace je dodnes poněkud zahalen tajemstvím a ukazuje se, že populární myši model je v případě X inaktivace v mnohém od člověka odlišný. Rozdíly se týkají jednak struktury samotného XIC, časování jednotlivých událostí v průběhu inaktivace a v neposlední řadě způsobu inaktivace. Zatímco u žen je inaktivace chromozomu X v extraembryonálních tkáních (např. placentě) náhodná a jsou tedy zastoupeny jak buňky s aktivním X po otci (Xp), tak po matce (Xm), u myši je inaktivace imprintovaná a ve všech extraembryonálních tkáních je inaktivován Xp! Proto by hypotetické prenatální enzymologické vyšetření březí myši mohlo vést k nesprávným závěrům. Jelikož u primitivnějších savců (klokan, ptakopysk) je inaktivace imprintovaná (opět je inaktivován vždy Xp) i v somatických tkáních, lze se domnívat že evolučně progresivnější se ukázala být inaktivace náhodná. Jistě, náhodná inaktivace totiž umožňuje ženám – přenašečkám, které by nesly na Xm mutaci, aby se tato mutace alespoň v části buněk, které mají inaktivován Xm neprojevila. Naproti tomu samice klokana, která by zdělila Xm s mutací, by byla chorobou stížena stejně jako hemizygotní samec, neboť všechny „zdravé“ chromosomy Xp by byly inaktivovány.

V průběhu **inaktivace u člověka** se tedy každá z embryonálních buněk náhodně inaktivuje buď Xp, nebo Xm a všechny dceřinné buňky mají inaktivován stejný chromosom X, jako buňka mateřská. Jelikož je tento proces náhodný a nezávislý na ostatních buňkách, má většina žen v populaci zhruba polovinu buněk s neaktivním Xp a polovinu s neaktivním Xm. Existují však i ženy, které mají ve většině buněk aktivní buď Xp, nebo Xm a X vázané geny se u nich exprimují téměř monoalelicky. Míru odchylky od průměrného zastoupení (tedy v 50 % buněk aktivní Xp a v 50 % buněk aktivní Xm) poté označujeme jako „zešíkmení inaktivace“.

U **heterozygotek pro gonosomálně vázaná onemocnění** se může tíže choroby projevit v závislosti na tom, zda je preferenčně aktivní mutovaná, či zdravá varianta genu, či zda jsou buňky nesoucí mutaci a buňky bez mutace zastoupeny zhruba stejně. Nastane-li nepříznivá kombinace, kdy má žena preferenčně aktivní ten X chromosom, který nese mutovaný gen, může se onemocnění projevit se stejnou intenzitou jako u hemizygotních mužů. Skutečně, vliv zešíkmení inaktivace na průběh mnoha gonosomálních onemocnění u heterozygotek byl opakovaně prokázán.

Cílem naší práce je uvést metody pro **vyšetření zešíkmení X inaktivace** jako pomůcku při komplexním genetickém vyšetření heterozygotek na Ústavu dědičných metabolických poruch.

Od roku 1994 je nejpoužívanější technikou při vyšetření X-inaktivace **metoda HUMARA**. Vychází z toho, že DNA neaktivního X chromozomu je v CpG dinukleotidech metylována, zatímco DNA aktivního X metylována není. Pomocí chemické modifikace gDNA lze selektivně konvertovat nemetylované cytosiny na thyminy. Získáme tak dvě populace DNA z nichž jedna odpovídá původně aktivním X chromosomům a druhá původně neaktivním X. Abychom mohli určit míru zešíkmení, tedy zda je preferenčně aktivní Xp či Xm, musíme být schopni rozlišit navíc, zda DNA pochází od otce či od matky. K tomu využíváme častého polymorfismu v počtu opakování (CAG)_n trinukleotidu v promotoru genu pro lidský androgenní receptor (proto HUMARA). Tento úsek amplifikujeme pomocí fluorescenčně značených primerů pro aktivní a neaktivní X a po elektroforetické separaci jsme schopni rozlišit čtyři hlavní píky – aktivní Xp a Xm a neaktivní Xp a Xm. Z jejich poměru lze usuzovat na míru zešíkmení inaktivace.

Abychom ověřili parametry metody a zároveň metodu zavedli, provedli jsme **studii** na 100 náhodně vybraných zdravých ženách, z nichž 67 bylo pro metodu informativních (počet opakování (CAG)_n trinukleotidu se lišil tak, že jsme byli schopni píky kvantitativně odlišit). gDNA byla izolována z leukocytů periferní krve. Ověřili jsme přesnost a správnost metody a zjistili, že asi 7,5 % žen má zešíkmení $\geq 80 : 20$, což odpovídá výsledkům jiných skupin.

Ověřili jsme dále, nakolik výsledky vyšetření zjištěné v krvi korespondují se zešíkmením v ostatních somatických tkáních, které mohou mít na progresi choroby zásadnější vliv, ale které jsou z etických i praktických důvodů k vyšetření typicky nedostupné. Izolovali jsme gDNA z celkem 21 tkání u 5 žen. Získaná data naznačují, že ačkoliv se hodnoty zešíkmení v jednotlivých tkáních mohou lišit až o 30 %, základní trend (zešíkmení ve prospěch Xp, Xm či zhruba 50 : 50) zůstává zachován.

Zjišťovali jsme dále, nakolik zešíkmení X inaktivace skutečně odpovídá preferenční expresi alely z Xp či Xm. Jinými slovy, je-li v určité tkáni 40 % buněk s aktivním chromosomem X po mamince, za to také znamená, že 40 % určitého proteinu je tvořeno z transkriptů pocházejících z Xm. Pro rozlišení otcovské a mateřské alely sloužily časté jednonukleotidové polymorfismy (SNP) ležící v kódujících oblastech genů na chromozomu X. Kvantifikací zastoupení alel v mRNA pro 10 různých genů na chromozomu X u 64 žen a porovnáním „zešíkmení exprese“ těchto genů se zešíkmením inaktivace jsme zjistili, že přibližně pro 95 % hodnot se výsledky neliší o více než 20 %.

Stanovení zešíkmení inaktivace v leukocytech metodou HUMARA poskytuje užitečné vodítko při odhadu průběhu choroby u žen heterozygotních pro některá gonosomální onemocnění. Je však třeba mít na paměti možnou odchylku míry zešíkmení v jednotlivých orgánech. Stejně tak míra exprese jednotlivých genů z Xp a Xm nemusí plně kopírovat míru zešíkmení inaktivace.

Syndrom fragilního chromozomu X

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Syndrom fragilního chromozomu X patří k nejčastějším hereditárním formám mentální retardace u mužů. Jeho populační frekvence se odhaduje na 1/2000 – 5000 mužů. Předpokládá se, že touto poruchou je postiženo až 5 % mužů s mentální retardací. Dříve byl syndrom diagnostikován pouze cytogeneticky. Postižení mají totiž na dlouhých raménkách chromozomu X (Xq27.3) zřetelné **fragilní místo** označované jako **FRAXA**.

Fragilní místo FRAXA je folát-senzitivní. Znamená to, že pro jeho diagnostiku je třeba lymfocyty pro chromozomovou analýzu kultivovat v médiu se sníženým obsahem kyseliny listové (folátu) nebo s přidavkem látek, které jsou v metabolických drahách jejími antagonisty (např. metotrexátu nebo fluorodeoxyuridinu). **Přesto má cytogenetické vyšetření omezenou výpovědní hodnotu.** I po dodržení specifického kultivačního postupu lze fragilní místo nalézt pouze ve 4 – 60 % buněk postižených mužů. U žen, které jsou přenašečkami (tj. mají pouze jeden fragilní X), nelze fragilní místo prokázat vůbec, nebo jen v několika jednotkách procent mitóz.

Vzhledem k omezené spolehlivosti cytogenetické analýzy se v současnosti k vyšetření syndromu fragilního X využívají pouze **molekulárně biologické metody**. Ty jsou zpravidla založeny na identifikaci kauzální mutace, kterou je **amplifikace repetitivních tripletových sekvencí** v genu FMR1. Tento gen leží v regionu FRAXA a jeho 5'-nekódující konec obsahuje repetice tripletu CCG. Pokud je počet těchto tripletů nižší než 50, jde o normální alelu. Zvýšení na 50-200 kopií svědčí o premutaci, která však zpravidla nemá fenotypový projev. Další expanze repetitivních tripletů (nad 200 – 230) vede k **plné mutaci**, jež způsobuje typické projevy syndromu. Fragilní místo tedy není (na rozdíl od většiny ostatních strukturních aberací) přímým důsledkem chromozomových přestaveb, ale projevem **dynamické mutace** příslušného genu.

Pacienti se syndromem fragilního X trpí **mentální retardací** různého stupně. Z dalších fenotypových znaků je nápadně protáhlý obličej, velké ušní boltce a výrazně zvětšená testes (tzv. makroorchismus). Většina postižených je hyperaktivní a má různé poruchy chování. U novorozenců pozorujeme hypotonii. Projevy syndromu však vykazují značnou variabilitu, která souvisí zejména s počtem repetic (čím vyšší amplifikace, tím závažnější postižení).

Protože **plná mutace je mitoticky nestabilní**, dochází při dělení buněk v embryu, resp. plodu ke vzniku **mozaiky** obsahující buňky s výraznou amplifikací spolu s buňkami s normálním počtem repetic. Početní poměr těchto buněk výrazně koreluje s fenotypem pacienta.

Dalším faktorem, jenž může ovlivnit rozsah postižení, je **metylace genu FMR1**. Bylo prokázáno, že zejména jeho hypermetylace ve všech buňkách pacienta vyvolává závažnější postižení než v případech, kdy je gen FMR1 metylován pouze v některých buňkách, což je případ tzv. **metylačního mozaicismu**.

Dědičnost syndromu fragilního X je gonozomálně recesivní. Znamená to, že postižení bývají téměř výhradně muži. Ženy jsou zpravidla zdravými nebo méně postiženými přenašečkami, protože v jejich genotypu je defektní alela genu FMR1 kompenzována normální nemutovanou alelou na druhém chromozomu X.

Přesto lze i u mnoha přenašeček prokázat určité abnormální projevy: zejména zvětšená ovaria a v mnoha případech též určitý mentální deficit (poruchy učení apod.). Rozsah postižení u žen je rovněž ovlivněn mnoha faktory. K nejvýznamnějším patří míra amplifikace a metylace repetice FMR1; na rozdíl od mužů se však výrazně uplatňuje také inaktivace chromozomu X.

Czepulkowski B.: Analyzing Chromosomes. Bios, Oxford, (2001)

Chromozom Y a pseudoautozomové regiony

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Na rozdíl od chromozomu X je chromozom Y nepoměrně menší a svým tvarem (nápadně zkrácenými raménky p) připomíná chromozomy akrocentrické. Ve skutečnosti jde spíše o **malý submetacentrický chromozom**. Obsahuje přibližně 60 Mb DNA.

Gonozom Y obsahuje ve srovnání s ostatními chromozomy daleko méně funkčních genů. Jeho převážnou část tvoří úseky tzv. **nekódující DNA**, která obsahuje repetitivní sekvence bez jakýchkoliv genů. Velkou část jeho dlouhých ramének představuje tzv. **heterochromatinový blok** tvořený těmito satelitními sekvencemi. Rozsah heterochromatinového bloku je velmi variabilní a pro každého muže do určité míry specifický. Toho bylo dříve využíváno i při testech paternity.

Na chromozomu Y známe v současnosti 78 genů. Část z nich se nachází v pseudoautozomových regionech (PAR), které jsou na obou gonozomech shodné (viz níže). Pohlavní diferenciaci proto ovlivňuje poměrně nepočetná skupina genů. Z nich má klíčový význam gen **SRY** (z anglického *Sex determining Region on Y*). Je lokalizován v pruhu Yp11.3. Jeho proteinový produkt způsobí během vývoje plodu přeměnu nezralých (ambivalentních) gonád na varlata, která začnou produkovat testosteron. Tento hormon ovlivní další utváření mužských pohlavních znaků. Pokud není SRY přítomen (nebo je mutován), vytvoří se z nezralých gonád vaječníky.

Další geny ovlivňující spermatogenezi jsou lokalizovány na dlouhých raménkách v pruhu Yq11. Z nich mají význam zejména geny **AZF1** (**A**zoospermia **F**actor **1**), **DAZ** (**D**eleted in **A**zoospermia) a **USP9Y** (specifická proteáza ubikvitinu). Mutace, resp. úplná delecce většiny z nich vede k těžkým poruchám reprodukce, popř. k úplné sterilitě způsobené azoospermií.

Holandrická dědičnost

Vedle X-vázané dědičnosti lze teoreticky předpokládat také **dědičnost vázanou na chromozom Y** neboli **holandrickou dědičnost**. Vzhledem k tomu, že u člověka mají nepočetné geny ležící mimo PAR téměř výhradně význam pro spermatogenezi a jejich mutace vede k ztrátě reprodukční schopnosti, jsou Y-vázané znaky, které by se přenášely z otce na syny, velmi vzácné. Holandrická dědičnost se předpokládá např. u histokompatibilitního membránového antigenu H-Y. Kromě toho pozorujeme holandrickou dědičnost u klinicky bezvýznamného ochlupení ušního lalůčku (někdy též nazývaného „*hairy ear syndrome*“).

Pseudoautozomová dědičnost

Ačkoli jsou gonozomy X a Y odlišné, leží na obou koncích jejich p- a q-ramének geneticky shodné **pseudoautozomální oblasti**, tzv. **PAR** (z anglického *pseudoautosomal regions*). V těchto úsecích se chromozomy X a Y spolu párují během profáze prvního meiotického dělení. Může zde dojít i ke crossing-overu.

Velký pseudoautozomový region (PAR1) má velikost přibližně 2,7 Mb a vyskytuje se na krátkých raménkách chromozomů X a Y. Obsahuje 24 genů. Při meiotickém dělení u muže je místem obligátního crossing-overu, který je potřebný pro správnou meiotickou segregaci.

Malý pseudoautozomový region (PAR2) leží na dlouhých raménkách chromozomů X a Y. Je velmi krátký (330 kb). Zatím bylo v této oblasti identifikováno jen 5 genů a několik

pseudogenů. Crossing-over mezi chromozomem X a Y v tomto místě není příliš častý a není ani důležitý pro správný průběh meiózy u muže.

Pro alely genů lokalizovaných v pseudoautozomálních oblastech chromozomů X a Y je typická tzv. **pseudoautozomální dědičnost**. Přenos těchto znaků je podobný jako u autozomálně dominantních, resp. autozomálně recesivních forem dědičnosti, záleží však na tom, zda je mutantní alela lokalizována na chromozomu X nebo chromozomu Y. Příkladem takto dědičného onemocnění je **dyschondrosteóza**, skeletální dysplázie charakterizovaná malou postavou a deformitou předloktí. Předpokládá se, že je způsobena mutací genu SHOX v oblasti PAR. Mutantní alela je dominantní, proto se choroba může přenést nejen z otce na syny, ale také z matek na dcery. U některých forem dyschondrosteózy prokazujeme mikrolece nebo jiné strukturní přestavby v oblasti PAR na Xp22. Mnohé z těchto aberací lze prokázat molekulárně cytogeneticky, vzácněji i základním vyšetřením chromozomů.

XX-muži a XY-ženy

Při meióze dochází k párování pohlavních chromozomů v oblastech PAR, z nichž významější je PAR1 na krátkých raménkách. Při crossing overu v tomto segmentu může někdy dojít k nereciproké výměně chromozomového materiálu, takže na chromozom X může být spolu s částí či celým PAR také translokován region SRY. Výsledkem této přestavby je vznik deletovaného chromozomu Y a chromozomu X s translokovaným segmentem obsahujícím region SRY.

Pokud je deletovaný chromozom Y kombinován při oplození s normálním chromozomem X, vzniká sterilní jedinec ženského pohlaví, avšak zpravidla se zachovanými sekundárními pohlavními znaky. Jde o tzv. **XY-ženu**.

Pokud se naopak kombinuje normální chromozom X s derivovaným chromozomem X obsahujícím SRY, vzniká většinou sterilní muž, avšak bez nápadného fenotypu. Jde o tzv. **XX-muže**.

Syndromy chromozomové instability (syndromy lomivosti chromozomů)

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Jde o zvláštní skupinou geneticky podmíněných onemocnění, k jejichž typickým projevům patří různé chromozomové aberace. Tyto změny zpravidla nepostihují specifické chromozomy, jak je tomu u výše popsaných syndromů, ale mohou se projevit u kteréhokoli chromozomu v karyotypu (výjimkou je ataxia telangiectasia, u níž nacházíme zvýšenou frekvenci vzájemných translokací chromozomů 7 a 14). Nejčastějším projevem instability je zvýšená hladina chromozomových zlomů, popř. složitějších strukturních přestaveb (tj. zvýšený podíl buněk, u nichž byly zjištěny aberace). Některé z uvedených poruch (např. Bloomův syndrom) se projevují zvýšenou frekvencí **výměn sesterských chromatid**.

Výměny sesterských chromatid a jejich diagnostika

Výměny sesterských chromatid neboli SCE (z anglického „*Sister Chromatide Exchanges*“) jsou intrachromozomové přestavby, při nichž dochází ke vzájemné výměně chromozomových segmentů mezi dvěma chromatidami stejného chromozomu. V naprosté většině případů nemají tyto procesy žádné následky pro pacienta, jejich zvýšená frekvence však indikuje poruchu replikačních mechanismů. Zvýšení hladiny SCE nastává také následkem působení mutagenních látek, proto studium výměn sesterských chromatid není pouze vyšetřovací metodou, ale patří také k **základním testům genotoxicity**.

Výměny sesterských chromatid lze pozorovat s využitím specifické kultivační metody. Krev pacienta kultivujeme v přítomnosti **bromodeoxyuridinu (BrdU)**, který se při syntéze DNA inkorporuje do polynukleotidového řetězce místo thymidinu. Přítomnost BrdU mění chromatinovou strukturu a tím i barvitelnost chromatid některými barvivy (např. Giemsou nebo některými fluorescenčními barvivy, popř. jejich vzájemnou kombinací). Po aplikaci BrdU jsou v mitózách druhé generace buněk sesterské chromatidy všech chromozomů odlišně barvitelné, takže lze pozorovat jejich případné vzájemné výměny.

Etiologie a přehled syndromů chromozomové instability

Příčinou syndromů chromozomové instability je defekt některého z genů, jenž řídí replikaci, popř. reparaci DNA. Postiženy mohou být např. geny pro ligázu I a II, helikázu I a II, popř. topoizomerázu I. Tyto poruchy působí ve svých důsledcích četné zdravotní komplikace. Pacienti v mnoha případech trpí poruchami růstu a vývoje. Časté bývají defekty funkce imunitního systému a kostní dřeně. Klinicky nejzávažnějším rizikem je **predispozice ke vzniku nádorových onemocnění**.

Tabulka: Příklady nejběžnějších syndromů chromozomové instability

Syndrom (populační frekvence)	Hypersenzitivita; imunodeficiencie	Cytogenetický nález, chromozomové abnormality	Riziko nádorového onemocnění (výše rizika; typy malignit)
Ataxia telangiectasia (1:30 000 – 100 000)	Rentgenoterapie, ionizační záření, UV; snížená hladina IgA, IgG, IgE	Časté translokace chromozomů 7 a 14, zvýšení frekvence chromozomových gapů a zlomů, popř. dalších chromozomových přestaveb	1:8; akutní lymfocytické leukémie, dále se mohou projevit lymfomy, epiteliální karcinomy, gliomy a nádory prsu
Nijmegen breakage syndrom (1:70 000 – 150 000)	Radioterapie, chemoterapie radiomimetickými léky	Vysokou hladinu chromozomových aberrací lze pozorovat následkem působení ionizujícího záření, popř. mutagenů	akutní lymfocytická leukémie, lymfomy, mozkové tumory, gonadoblastomy; děti mají zpravidla dobrou vitalitu
Bloomův syndrom (1:1 000 000)	UV, cytostatika: snížená hladina IgA, IgM, popř. též IgG	12-15krát vyšší frekvence SCE, vyskytují se i jiné přestavby chromozomů, gapy a zlomy	1:5-8; leukémie, lymfomy, adenokarcinomy atd.
Fanconiho anémie (1:200 000 – 400 000)	UV, chemoterapeutika používaná pro imunosupresi, diepoxybutan a další činidla způsobující propojení vláken DNA (tzv. „DNA- crosslinking agents“)	Zvýšená frekvence gapů and zlomů, 30 % z nich bývá mezi nehomologickými chromozomy, vyskytují se i klony buněk s určitými translokacemi	Aplastická anémie: pancytopenie, leukémie (zejména akutní myeloidní leukémie), karcinom dlaždicových buněk atd.
Xeroderma pigmentosum (1:2 000 000)	UV-záření	Zvýšená frekvence gapů a zlomů, po expozici UV záření nastává rovněž zvýšení frekvence SCE	1000-krát zvýšené riziko kožních poruch, maligního melanomu, keratoakanthomu a dalších

Mikrodeleční syndromy

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Pro malé, základní cytogenetickou analýzou zpravidla neidentifikovatelné přestavby chromozomů se dnes často používá termín „**submikroskopické aberace**“ nebo „**kryptické aberace**“. Do této skupiny zahrnujeme zejména mikrodelece, mikroamplifikace a translokace malých chromozomových segmentů. Lze je zpravidla zjistit pouze molekulárně biologickými, popř. **molekulárně cytogenetickými metodami** (např. pomocí FISH). Mikroskopicky jsou (při použití konvenčních pruhovacích metod) pozorovatelné jen výjimečně a ve velmi omezeném počtu případů.

Tyto aberace vznikají nejčastěji následkem **nereciprokého crossing-overu** při prvním meiotickém dělení (tj. v bivalentu při výměně chromozomových segmentů nestejné délky). Výsledkem neronoměrné výměny genetického materiálu mohou být **delece, resp. duplikace** příslušných chromozomových úseků.

Nejčastější a klinicky nejzávažnější jsou tzv. **mikrodeleční syndromy** způsobené (jak název napovídá) intersticiálními mikrodelecemi různých chromozomů. Při fenotypovém vyjádření těchto chromozomových změn se uplatňují mikrodelece (haploinsuficience) většího počtu genů, ležících v chybějícím segmentu. Proto mikrodeleční syndromy řadíme mezi „syndromy sousedících, resp. na sebe navazujících genů“ – v angličtině **contiguous gene syndromes**. Tyto geny mohou mít značně odlišné funkce, takže se vytváří spektrum symptomů v různých lokalizacích.

Naprostá většina mikrodelečních syndromů má **autozomálně dominantní dědičnost** s variabilní expresivitou, převážnou část případů však představují pacienti s delecemi *de novo*. Situace, kdy se delece vyskytla ve více generacích, jsou ovšem velmi vzácné.

Pro mnohé mikrodeleční syndromy je typická rozsáhlá variabilita, resp. **velmi rozdílná expresivita fenotypových projevů**.

Rozsah delece u mikrodelečních syndromů

Podobně jako v případě syndromu cri du chat, popř. Wolf-Hirschhornova syndromu byly také u pacientů s mikrodelečními syndromy zjištěny delece různého rozsahu, avšak (na rozdíl od předchozích dvou syndromů) jen zřídka mikroskopicky pozorovatelné. Z tohoto hlediska lze mezi mikrodeleční syndromy řadit rovněž některé případy syndromů cri du chat, resp. Wolf-Hirschhornova (viz dále). Srovnáním rozsahu delecí byl u většiny syndromů vymezen tzv. **minimální kritický region**, tj. nejmenší úsek, jehož delece postačuje k charakteristickému fenotypovému vyjádření daného syndromu.

Variabilita v rozsahu deletovaného segmentu zřejmě zčásti vysvětluje **velmi rozdílnou expresivitu** většiny mikrodelečních syndromů. Ta byla popsána zejména u mikrodelece chromozomu 22q11, jejíž fenotypové projevy kolísají od nevýrazných rozštěpů patra (neprovázených žádným významnějším postižením) až k rozsáhlým kombinacím těžkých srdečních a imunitních poruch. Zdá se však, že rozsah delece není jediných a často ani rozhodujícím faktorem určujícím míru, popř. formu postižení.

Další faktory ovlivňující fenotypové projevy mikrodelečních syndromů

U některých pacientů se suspektním mikrodelečním syndromem však nelze molekulárně cytogenetickým vyšetřením kryptickou aberaci prokázat. Ukázalo se tak, že v určitých případech může být velmi podobný fenotyp vyvolán pouze bodovými mutacemi některých genů kritického regionu, popř. epigeneticky vlivem vnějších faktorů s teratogenním účinkem.

Fenokopie velmi připomínající některé mikroleční syndromy mohou být vyvolány např. abusem alkoholu během těhotenství, konzumací některých léků s teratogenním účinkem apod. U některých mikrolečních syndromů se výrazně uplatňuje také **genomový imprinting**, popř. **uniparentální dizomie**. Příkladem jsou syndromy Prader-Williho a Angelmanův. Velký význam může mít **spolupůsobení alel jiných genů** lokalizovaných mimo deletovanou oblast. Tyto modifikující alely mohou být přítomny i na zcela jiném chromozomu.

Příklady mikrolečních syndromů

K nejčastějším mikrolečním syndromům řadíme syndrom **DiGeorgeův** včetně příbuzných syndromů (mikrolece chromozomu 22q11 – viz samostatný text), dále syndrom **Prader-Williho** (mikrolece chromozomu 15q12), syndrom **Angelmanův** (mikrolece chromozomu 15q12), syndrom **Williams-Beurenův** (mikrolece chromozomu 7q11.23), **Miller-Diekerův lisencefalický syndrom** (mikrolece chromozomu 17p13.3) a **syndrom Smith-Magenisův** (mikrolece chromozomu 17p11.2).

Mikroleční formy známe také u syndromů **cri du chat** (intersticiální, resp. terminální delece krátkých ramének chromozomu 5) a **Wolf-Hirschhornova** (intersticiální, resp. terminální delece krátkých ramének chromozomu 5). Existují také syndromy, u nichž jsou mikroleční formy poměrně vzácné. Příkladem je syndrom **Rubinstein-Taybiho**, u něhož molekulárně cytogeneticky nacházíme mikroleci chromozomu 16p13.3 jen asi v 10 % případů, u ostatních pacientů se vyskytují spíše mutace menšího rozsahu.

Některé mikrolece postihující tumor-supresorové geny mohou být příčinou vzniku vzniku **nádorových onemocnění**. Tak například mikrolece tumor-supresorového genu RB1 (na chromozomu 13q14) se může vyskytovat u **retinoblastomu**. Mikroleci 11p13 nacházíme u syndromu **WAGR** (Wilmsův tumor, aniridie, genitourinární abnormality, mentální retardace).

Mikrodelece chromozomu 22q11 (asociace CATCH22)

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Intersticiální mikrodelece dlouhého raménka chromozomu 22 (pruh 22q11) je podle některých autorů druhou nejčastější chromozomovou aberací nalézanou u člověka (po volné trizomii chromozomu 21). Současné studie udávají zpravidla incidenci 1:4000 novorozenců, což je výskyt srovnatelný s nejběžnějšími aneuploidii gonozomů.

Mikrodelece chromozomu 22q11 má značně variabilní fenotypové projevy, které bývají dokonce popisovány jako různé syndromy. K nejběžněji uváděným patří syndrom DiGeorge, velokardiofaciální syndrom, resp. Shprintzenův syndrom.

V současnosti jsou fenotypové znaky shrnovány do asociace **CATCH22**. Tento akronym vznikl z počátečních písmen anglických slov popisujících jednotlivé fenotypové projevy:

- **Cleft palate** – rozštěp patra;
- **Abnormal face** – abnormální tvář (tj. faciální stigmatizace – malformované uši, velký, nápadně vyčnívající nos, malá mandibula);
- **Thymic hypoplasia** – hypoplázie thymu (v některých případech snad i úplná geneze), vedoucí k imunodeficienci;
- **Cardiac defects** – srdeční vady (vrozené defekty vývoje srdce a velkých cév, např. defekty síňového i komorového septa, Fallotova tetralogie, truncus arteriosus atd.);
- **Hypoparathyroidism** – hypoparathyreoidismus (porucha vývoje příštítných tělísek vedoucí k neonatální hypokalcémii);
- **22** označuje lokalizaci na chromozomu 22.

Akronym CATCH22 ne náhodou připomíná světoznámý román Josepha Hellera: „Hlava 22“ (anglický titul zní vskutku Catch22). Z etických důvodů se však nezdá únosné, aby byl syndrom spojený s klinicky závažnými projevy často ohrožujícími život pacienta pojmenován stejně jako literární dílo. Mnozí odborníci též namítají, že tento název může na rodiče dětí postižených tímto syndromem působit velmi depresivně. Proto se v současnosti stále častěji uplatňuje nové pojmenování: „**syndrom mikrodelece chromozomu 22q11**“.

Uvedená mikrodelece se v současnosti nejčastěji vyšetřuje metodou FISH. Molekulárně cytogeneticky je prokazatelná u 90 % pacientů s charakteristickými projevy syndromu. Ve zbývajících případech zjišťujeme delece menšího rozsahu, než je rozlišovací schopnost sond pro FISH, popř. též bodové mutace některých genů.

Poměrně běžný je **familiární výskyt mikrodelece 22q11**. Širokými populačními studiemi byl prokázán téměř u 10 % rodin, v nichž se narodilo aspoň jedno dítě postižené touto aberací. Znamená to, že téměř u 10 % postižených dětí byla stejná mikrodelece prokázána u jednoho z rodičů. Je zajímavé, že dokonce mezi rodiči a dětmi, popř. mezi postiženými sourozenci jsou výrazné rozdíly v expresivitě fenotypových znaků.

Poměrně často se např. stává, že matka s nepříliš výraznými symptomy porodí dítě s velmi závažnou srdeční vadou, která vyžaduje okamžitou chirurgickou intervenci. V tomto nemůže být odlišná expresivita případě podmíněna rozdílným rozsahem deletované oblasti (změny rozsahu delece během gametogeneze, popř. jiných procesů nebyly prokázány), takže jediné vysvětlení spočívá ve spolupůsobení dalších genů ležících mimo kritický region a v rozdílném vlivu vnějších faktorů. Velmi překvapující je občas uváděný diskordantní fenotyp u jednovaječných dvojčat postižených stejnou mikrodelecí.

Rodič, který je postižen mikrolecí chromozomu 22q11, může s 50 % pravděpodobností přenést tuto aberaci na své potomky. Přenos syndromu je tedy **autozomálně dominantní**.

Prognóza pacientů s mikrolecí chromozomu 22q11 velmi závisí na rozsahu postižení. V neonatálním období vyžadují někteří pacienti okamžitou operaci vrozené srdeční vady. U novorozenců (byť jen s podezřením na uvedenou afekci) je třeba pravidelně kontrolovat hladinu ionizovaného vápníku (pokud nebyla zavedena parenterální výživa). U dětí s prokázanou mikrolecí zajišťujeme imunologické vyšetření, neboť mohou trpět **imunodeficiencí**. Pokud je defekt imunity prokázán, je třeba zajistit, aby pacienti pokud možno nepřišli do styku s infekcemi (které mohou mít v některých případech fatální průběh), a také, aby nebyli preventivně očkováni (vakcíny vytvořené z oslabených kmenů patogenních organismů mohou způsobit těžké infekce). U postižených dětí se častěji vyskytují **vady řeči** („nosový hlas“ způsobený rozštěpem patra) a **poruchy učení**. Proto je nezbytná pomoc logopeda a psychologa.

Někteří pacienti jsou mentálně retardováni, mohou se objevit i příznaky **schizofrenie, popř. maniodepresivních stavů**. Tyto psychické poruchy souvisejí s delecí genu pro katechol-O-metyltransferázu (COMT), jenž leží v deletované oblasti. Z tohoto důvodu doporučujeme postiženým rodinám konzultaci s psychiatrem. Uvedené skutečnosti jasně dokládají význam časného genetického vyšetření mikrolece chromozomu 22q11. Jeho výsledek výrazně upřesní prognózu pacienta a upozorní na možné závažné zdravotní komplikace v průběhu dalšího života.

Subtelomerické aberace chromozomů

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Současné studie ukazují, že nemalé procento případů mentální retardace může být asociováno se **submikroskopickými přestavbami chromozomů**, zejména v **subtelomerických oblastech**.

Jako mentální retardaci hodnotíme stav, kdy je IQ vyšetřené osoby nižší než 70. Podle toho pak také klasifikujeme stupně mentální retardace (dále jen MR):

- a) **lehká MR** – IQ 50 - 70 (omezená vzdělatelnost, doporučuje se navštěvovat zvláštní školu);
- b) **středně těžká MR** (imbecilita) – IQ 35 - 50 (vzdělatelnost je velmi omezená, jedinci nejsou schopni složitější komunikace a sebeobsluhy);
- c) **těžká MR** (idiotie) – IQ 25-35;
- d) **hluboká MR** – IQ 20-25 (osoby neschopné žít mimo kontrolované prostředí, vyžadují stálou asistenci).

Podle současných údajů lze příčinu mentální retardace objasnit pouze u 50 – 60 % pacientů s touto poruchou.

U některých případů s neobjasněnou příčinou mentální retardace (tzv. **idiopatickou MR**) byly zjištěny **kryptické aberace v subtelomerických oblastech určitých chromozomů**. Dosud publikované práce často uvádějí mikrolece, popř. jiné kryptické aberace v oblasti subtelomer chromozomů 1, 2, 5, 6, 8, 9, 12, 16, 18p, 22q. Jsou však známy i méně časté případy subtelomerických delecí na jiných chromozomech. Také syndrom Wolf-Hirschhornův může být způsoben pouhou kryptickou mikrolecí v subtelomerické oblasti chromozomu 4p. Jak naznačuje předchozí text, nejčastějšími aberacemi v subtelomerických oblastech jsou **delece**. Vzácné však nejsou ani translokace, popř. duplikace. Téměř u 50 % pacientů se subtelomerickými delecemi nalézáme stejnou aberaci (ovšem balancovanou) také u jednoho z rodičů.

Zmíněné aberace lze podobně jako mikroleční syndromy analyzovat metodou FISH pomocí lokus specifických subtelomerických sond. Určitým problémem je však poměrně nízký záchyt pacientů s těmito nálezy – zmíněné aberace lze prokázat zhruba u 5 – 10 % pacientů s neobjasněnou těžkou nebo střední mentální retardací a u 0,5 % pacientů s lehkou mentální retardací.

Struktura subtelomerické oblasti

Struktura subtelomerické oblasti je u většiny chromozomů velmi podobná. Za telomerou (jejíž repetitivní sekvence jsou u všech chromozomů stejné) následují genové lokusy, které se však střídají s regiony TAR (repetitivních sekvencí asociovaných s telomerickými oblastmi chromozomů). Většina komerčně dodávaných sond pro FISH však hybridizuje se subtelomerickými lokusy, které leží až za oblastmi TAR blíže k centroměře. Pro relevantní vyšetření bylo třeba zavést do praxe takové sondy, které by hybridizovaly s geny v oblastech TAR. Analýzu subtelomerických delecí také značně komplikuje fakt, že jde často o aberace velmi malého rozsahu.

Určitým řešením je aplikace dalších molekulárně cytogenetických a molekulárně biologických metod, které umožní citlivější analýzu a tím i vyšší záchyt. Tak např. kombinací metod FISH a CGH byly subtelomerické abnormality nalezeny u 9,6 % pacientů s mentální retardací doprovázenou dysmorfickými rysy. Slibné jsou také genové čipy, umožňující poměrně rychlou a spolehlivou detekci aberací ve velkém počtu lokusů.

Kritéria výběru pacientů pro vyšetření subtelomerických aberací

Navzdory pokroku v poznání subtelomerických aberací zůstane asi dlouhou dobu úkolem kliniků výběr pacientů pro molekulárně cytogenetické (popř. molekulárně biologické) vyšetření subtelomerických přestaveb. Důležité je proto **stanovení spolehlivých kritérií**, aby byl záchyt co nejefektivnější.

Podle současných doporučení by měli pacienti vybraní pro vyšetření subtelomerických aberací splňovat následující kritéria:

- a) Střední až těžká mentální retardace**, resp. problémové chování neznámé etiologie, opakovaný výskyt mentální retardace v rodině;
- b) Prenatálně započatá růstová retardace**, popř. hypotonie nebo nízká porodní hmotnost;
- c) Postnatální růstové abnormality** (včetně výrazného opoždění nebo naopak urychlení růstu) - často malá postava;
- d) Dvě nebo více obličejových dysmorfii** (nosní abnormality, dysmorfické ušní boltce, oční anomálie, mongoloidní či antimongoloidní sklon očních štěrbin).

V odborných pracích jsou tato kritéria často shrnována do zkratky **MR/DD/NDF**, což znamená:

- a) Mental Retardation** (mentální retardace);
- b) Developmental Delay** (opoždění vývoje);
- c) Nonspecific Dysmorphic Features** (nespecifické dysmorfie).

Před vlastní indikací genetického vyšetření je však třeba důkladně zvážit, zda je MR u pacienta vskutku způsobena genetickými vlivy a pokud ano, zda se nejedná o jiný syndrom (např. syndrom fraX, některé metabolické choroby, Angelmanův syndrom, popř. jiné mikrodeleční syndromy apod.). Proto je třeba:

- a) důkladně vyšetřit pacienta s MR (popř. dalšími symptomy) a zjistit podrobnou anamnézu;**
- b) vyloučit negenetické příčiny, tj. poruchy nitroděložního vývoje** (např. vlivem infekce, alkoholu či abrupce placenty), **perinatální poruchy** (např. asfyxie při porodu, poranění při klešťovém porodu) a **postnatální poruchy** (např. infekce a úrazy CNS);
- c) vyloučit degenerativní onemocnění postihující CNS.**

Genová terapie

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Geneticky podmíněná onemocnění lze v současnosti léčit jen **symptomaticky**. Znamená to, že neodstraňujeme podstatu choroby, ale pouze upravujeme některé její příznaky (symptomy). Např. dietou lze výrazně zlepšit prognózu pacientů s fenylketonurií, inhalacemi usnadnit dýchání dětem s cystickou fibrózou a vhodnou rehabilitací zkvalitnit život pacientům s muskulární dystrofií. Také pacienti s hemofilií jsou v současnosti úspěšně léčeni aplikací krevních derivátů obsahujících funkční koagulační faktory VIII, resp. IX. Uvedené terapeutické postupy jsou sice v mnoha případech velmi účinné, avšak neodstraňují samotnou příčinu choroby – tj. mutaci příslušného genu.

Základní metody genové terapie

Rozvoj genového inženýrství a poznatky, k nimž dospěl projekt lidského genomu však dávají naději, že brzy bude možné přímo zasahovat i do genomu pacientů a nahradit jejich mutantní alely normálními funkčními geny. Tento princip je základem **genové terapie**. Předpokládá se, že nejvhodnějšími vektory jsou právě viry, jejichž aparát umožní vstup nukleové kyseliny se zabudovaným funkčním genem do buňky pacienta. Pro tyto účely se hodí zejména **adenoviry** nebo některé **retroviry**, jejichž DNA se začleňuje do genomu hostitele a spolu s ním se dále replikuje. Tak vznikne v těle pacienta permanentní linie zdravých funkčních buněk.

Kromě aplikací virových vektorů byly navrženy i **bezvektorové postupy**, při nichž „zabalíme“ zdravý gen do liposomů anebo jej přímo aplikujeme do buněk (např. pomocí mikroinjekce). Další možnosti genové terapie nabízejí kromě virových vektorů také **lidské umělé chromozomy** (*HAC = Human arteficial chromosomes*).

Aplikaci „zdravých“ genů lze provést dvěma základními způsoby:

a) In vivo, tj. mechanickým vpravením viru s genem nebo samotného genu přímo do cílových buněk v příslušném orgánu.

b) In vitro neboli **ex vivo**, kdy z těla pacienta nejprve odebíráme vhodné buňky, které pak infikujeme modifikovaným virem, v jehož genoforu je začleněn příslušný gen. Možné je rovněž bezvektorové zavedení genu. Takto upravené buňky se vracejí zpět do organismu.

K ověření účinnosti různých postupů již proběhlo mnoho pokusů s laboratorními zvířaty. U člověka byla genová terapie zatím úspěšně praktikována jen v několika případech **těžké kombinované imunodeficiency** (*SCID – severe combined immunodeficiency*). Jde o geneticky podmíněný defekt enzymu adenosindeaminázy, jehož nejzávažnějším projevem je vrozená porucha imunity.

Předpokládá se, že v blízké budoucnosti bude s pomocí genové terapie možné léčit např. cystickou fibrózu, Gaucherovu chorobu (geneticky podmíněný defekt enzymu β -glukosidázy) a snad i některé hereditární formy nádorových onemocnění.

Další možnosti genové terapie

Kromě přímé substituce poškozených genů se v současnosti začíná uplatňovat i další směr genové terapie, který vychází z **možnosti ovlivnění syntézy RNA**. V tomto případě se neuvažuje o nahrazení defektního genu, ale o dodatečnou „opravu“ defektní RNA vznikající jeho transkripcí. Terapeuticky by snad bylo možné ovlivnit zejména tzv. **ribozomy**, což jsou molekuly RNA s autokatalytickou aktivitou, které se v lidských buňkách uplatňují především při sestřihu intronů.

Další možnosti genové terapie je specifické **zastavení syntézy RNA** u defektních genů nebo naopak **indukce syntézy RNA** u genů s nízkou aktivitou. Tyto postupy by měly zřejmě velký

význam při **terapii nádorů**, u nichž dochází k nekontrolovanému dělení buněk následkem poruchy regulace genové exprese. Vhodným zásahem by bylo možné přerušit syntézu RNA u genů, jejichž produkty stimulují buněčné dělení, a naopak ji indukovat u genů, jejichž produkty buněčný cyklus zastavují. Uvažuje se také o **genové terapii AIDS** na základě cílené inhibice replikace viru HIV.

V případě **genové léčby nádorových onemocnění** se také prováděly pokusy se zavedením genu produkujícího protein, který by selektivně usmrtil pouze nádorové buňky. Nezbytnou podmínkou by samozřejmě bylo, aby toxický protein vskutku zasáhl pouze rakovinné buňky a aby zdravé buňky zůstaly nepoškozené. To předpokládá buď velmi selektivní transport „zabíječského“ genu do nádorových buněk anebo zajištění jeho exprese pouze v rakovinných buňkách. Toho lze dosáhnout například tím, že bychom tento gen umístili pod kontrolu promotoru, který je aktivní výhradně v nádorových buňkách.

Jiný způsob likvidace nádorových buněk na bázi genové terapie předpokládá **vnesení genu kódujícího silný antigen**, který by byl snadno a rychle rozpoznáván imunitním systémem pacienta. Znamená to, že nádorové buňky produkující tento antigen by byly automaticky zničeny imunokompetentními buňkami.

Ačkoliv současné poznatky molekulární biologie vedly k návrhu mnoha léčebných postupů založených na genové terapii, jejich skutečné využití v praxi je zatím minimální. Ukázalo se, že aplikace genové terapie s sebou může nést **závažná rizika i špatně překonatelné technické problémy**. Těmto otázkám je věnován samostatný text.

Problémy a omezení genové terapie

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Širšímu uplatnění genové terapie v medicíně zatím brání čtyři základní problémy:

a) Možné patogenní účinky virového vektoru lze v současnosti omezit přípravou geneticky modifikovaných adenovirů ochuzených o geny, zodpovědné za jejich patogenitu. Značným rizikem však zůstává možnost poškození hostitelského genomu začleněním virové DNA.

b) Polygenní charakter mnoha geneticky podmíněných chorob, tj. případy, kdy ke vzniku choroby dochází na základě kombinace mutantních alel několika genů. K léčbě těchto poruch by bylo nutné podat pacientovi několik různých funkčních genů, což by značně zkomplikovalo léčebný postup. Navíc u některých chorob dosud ani neznáme všechny geny, které jsou za jejich vznik zodpovědné.

c) Technické obtíže při zavedení genu do buněk se projevují zejména v případech, kdy lze postižené buňky z organismu jen těžko získat, anebo do nich nelze gen z různých důvodů vpravit. Tento problém se vyskytl např. při pokusech s terapií cystické fibrózy, kdy většina plicních buněk pacientů virový vektor se „zdravým“ genem nepřijala. Ukázalo se, že na rozdíl od jiných tkání mají plicní buňky na svém povrchu jen velmi málo receptorů zprostředkujících kontakt s virovými partikulami, proto se virus na ně nemohl navázat.

d) Omezená životaschopnost cílových buněk – funkční gen prozatím nelze začlenit do všech buněk pacienta, ale pouze do některých buněk postiženého orgánu. Tyto buňky zpravidla po určité době odumírají, takže složitý a nákladný postup je třeba mnohokrát opakovat.

Genová terapie lidských embryí

Jako zdánlivě ideální řešení se jeví **genová terapie lidského embrya**. Tento postup by mohl pomoci rodinám s výskytem geneticky podmíněných chorob, u nichž již předem očekáváme vysokou pravděpodobnost postižení potomků. Genová terapie by v těchto případech následovala ihned po vzniku embrya při mimotělním oplodnění. Jediným mikroinjekčním podáním nemutovaného genu by bylo možné vyléčit všechny buňky embrya, které by tento „zdravý“ gen replikovaly a předaly dalším buněčným generacím. Lze proto předpokládat, že by se nový jedinec narodil s funkčním genem.

Problémem však zůstává začlenění cizí DNA do genomu embrya, což by mohlo způsobit nevratné poškození plodu nebo dokonce narození jedince se závažnými vrozenými vadami (viz výše – bod „a“). Proto je třeba posuzovat snahy o genovou terapii lidských embryí velmi opatrně.

V tomto směru již byly opakovaně vysloveny vážné obavy z **genetických modifikací lidských embryí**. Objevují se totiž spekulace, že během několika málo let bude při asistované reprodukci možné vkládat podle přání rodičů do genomu budoucího jedince „geny inteligence“, „geny uměleckých vloh“, „geny pro vysokou postavu“ nebo jiné příznivé vloh. To vyvolává morální a etické otázky, do jaké míry má člověk právo ovlivnit svoji genetickou výbavu a k čemu by tato „hra na Stvořitele“ nakonec vedla. Jak by asi vypadala společnost tvořená zdánlivě ideálními a zcela dokonalými jedinci vzniklými na základě genetických modifikací?

Ačkoliv vývoj technik asistované reprodukce a rekombinantní DNA postoupil značně kupředu, lze tyto představy prozatím odkázat do říše fantazie. Naprostá většina výše zmíněných znaků (inteligence, umělecké vloh, výška postavy atd.) je totiž podmíněna multifaktoriálně a změna genomu v takovém rozsahu není v současnosti technicky realizovatelná.

Genetické mapování a genová vazba

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Již Thomas Hunt Morgan prokázal svými pokusy s drozofilou, že **geny jsou na chromozomech umístěny lineárně za sebou a jejich umístění je neměnné**. Úsek chromozomu, resp. DNA, na němž je příslušný gen nebo jiný úsek genomu lokalizován, označujeme jako **lokus**.

Ačkoliv zásadní poznatky v oboru mapování genomu organismů přinesly teprve nedávné výzkumy, některé geny se podařilo lokalizovat již v první polovině 20. století. Přispělo k tomu zejména tzv. **genetické mapování**, které vychází z poznatků o genové vazbě. Jde o nejstarší metodu umožňující stanovení přibližné vzdálenosti dvou, popř. více genů.

Genová vazba

Pod pojmem **genová vazba** rozumíme stav, kdy dva, popř. více genů leží na stejném chromozomu. Říkáme, že vytvářejí **společnou vazebnou skupinu**. V případě, že jsou geny na stejném chromozomu, převládají v potomstvu rodičovské kombinace jejich alel. Nové, **rekombinované sestavy alel** mohou vzniknout pouze v případě, když mezi nimi dojde při meiotickém dělení ke crossing-overu. Proto bude jejich zastoupení daleko nižší, v případě velmi těsné blízkosti genů dokonce nulové. Současně však platí předpoklad, že zastoupení rekombinantních sestav stoupá se vzdáleností genových lokusů. Lze proto říci, že **frekvence rekombinantů odpovídá vzdálenosti příslušných genů**.

Morganovo číslo

U organismů, které lze v laboratoři libovolně křížit a které poskytují dostatečné množství potomstva, lze tzv. mapovou neboli genetickou vzdálenost genů stanovit na základě tzv. **zpětného křížení** (*backcross*, zkratka B) dvojnásobného heterozygota (AaBb) s dvojnásobným recesivním homozygotem (aabb). Sledujeme-li segregaci alel dvou genů (A a B), vycházíme z následujícího předpokladu:

Rodičovská generace P: AABB x aabb

První filiální generace F1: AaBb (uniformní)

Zpětné křížení B: AaBb x aabb

(křížíme potomka z generace F1 s recesivním rodičem aabb)

Při volné kombinovatelnosti alel (tak, jak to předpokládá Mendelův zákon – viz samostatný text) by mělo mít potomstvo vzešlé ze zpětného křížení následující složení:

genotypy:	AaBb	Aabb	aaBb	aabb
genotypový poměr:	1	1	1	1
fenotypy:	AB	Ab	aB	ab
fenotypový poměr:	1	1	1	1

Výše uvedený výsledek křížení však platí pouze pro volnou kombinovatelnost alel, tedy pro případ, že geny A a B leží na rozdílných chromozomech. Pokud tomu tak není, budou v potomstvu po zpětném křížení převažovat určité sestavy alel, zatímco rekombinanti budou v menšině a jejich podíl bude odpovídat vzdálenosti genových lokusů. Proto můžeme na základě početního poměru potomků vzniklých tímto křížením vyjádřit tzv. **mapovou vzdálenost** (a tím nepřímo i **sílu vazby**) dvou genů podle jednoduchého vztahu:

$$p = [R / (N + R)] \cdot 100$$

Hodnota **R** udává počet rekombinantních potomků, zatímco symbolem **N** značíme počet potomků s původní rodičovskou sestavou alel. Výsledná hodnota **p** (udávající procento potomků s rekombinovanou sestavou alel) je tzv. **Morganovo číslo**, které vyjadřuje

vzdálenost genů (resp. nepřímou sílu vazby) v **mapových jednotkách** (m.u.) neboli **centimorganech** (cM).

Morganovo číslo udává pravděpodobnost rekombinace mezi dvěma genovými lokusy. Může nabývat hodnot od 0 do 50. Nulová hodnota znamená, že geny jsou v těsném sousedství, proto je crossing-over mezi nimi nemožný. Naopak hodnoty blízké 50 prozrazují buď volnou kombinovatelnost (tj. přítomnost genů na dvou různých chromozomech), nebo značnou vzdálenost genových lokusů.

Výpočet vzdálenosti dvou genů A a B a význam Morganova čísla ilustruje **následující příklad**:

Křížením dvojnásobného heterozygota (AaBb) s dvojnásobným recesivním homozygotem (aabb) bylo získáno potomstvo o následujícím složení:

- 80 jedinců mělo oba dominantní znaky („AB“);
- 20 jedinců mělo dominantní znak „A“ a recesivní znak „b“;
- 20 jedinců mělo recesivní znak „a“ a dominantní znak „B“;
- 80 jedinců mělo oba recesivní znaky („ab“).

Vypočítejte mapovou vzdálenost genů A a B.

Postup výpočtu:

a) K jednotlivým fenotypům potomků doplníme genotypy vyplývající z genotypů rodičů:

fenotyp	AB	Ab	aB	ab
genotyp	AaBb	Aabb	aaBb	aabb
počet jedinců	80	20	20	80
celkem	200 jedinců			

b) Pokud by geny nebyly ve vazbě, byl by poměr potomků 1AB:1Ab:1aB:1ab (v případě 200 jedinců 50:50:50:50). Výrazná převaha jedinců s fenotypy AB a ab ukazuje, že **geny leží na stejném chromozomu**. Jedinci s fenotypy AB a ab mají původní rodičovskou sestavu, zatímco jedinci s fenotypy aB, resp. Ab jsou rekombinanti.

c) Údaje dosadíme do vzorce a vypočteme Morganovo číslo:

$$p = [(20 + 20) / (80 + 80 + 20 + 20)] \cdot 100 = [40 / 200] \cdot 100 = 20$$

Vzdálenost genů A a B je 20 cM neboli 20 mapových jednotek.

Takto vypočtenou **genetickou vzdálenost však nelze jednoduše převést na vzdálenost fyzikální** (tj. na přesný počet nukleotidových párů, které leží mezi oběma geny).

Význam poznatků o genové vazbě v klinické genetice

Poznatky o genové vazbě mají velký význam i v klinické genetice. Ukázalo se například, že v některých rodinách se u postižených jedinců současně vyskytují dvě různá geneticky podmíněná onemocnění. Tuto neobvyklou asociaci bylo možné vysvětlit jen tak, že mutantní alely příslušných genů leží s největší pravděpodobností na stejném chromozomu.

Genová vazba má význam i při molekulárně biologické diagnostice. V případě, když neznáme kauzální mutaci, která příslušné onemocnění způsobuje, můžeme přítomnost mutantní alely sledovat na základě identifikace známého polymorfního úseku, který je ve vazbě s příslušným mutovaným genem. To je princip tzv. **nepřímé DNA diagnostiky**.

Genetická podstata onkogeneze

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

K obávaným onemocněním patří **nádorové choroby** nepřesně označované souborným názvem „rakovina“. V odborné literatuře se pro nádor občas používá výraz „**tumor**“. Společným znakem všech nádorových chorob je porucha buněčného cyklu, která vyústí v **neregulované, abnormální dělení buněk**. Během vzniku a vývoje nádoru ztrácejí postižené buňky svoji původní morfologii a stále intenzivněji se dělí. Jejich rozmnožení a rozšíření po těle mimo primární nádor vede k poruchám činnosti ostatních orgánů, což může být příčinou smrti pacienta.

Statistiky ukazují, že zhoubné novotvary patří v současném civilizovaném světě k nejčastějším příčinám úmrtí. Odhaduje se, že každý den zemře na rakovinu 76 lidí. Nelze se proto divit, že se lékaři i ostatní odborníci snaží nejen vypátrat její příčiny, ale především vyvinout účinnější diagnostické i terapeutické postupy. Výzkum na tomto poli je však velmi složitý, neboť nádorová onemocnění jsou **velmi různorodou skupinou**. Je třeba odlišit nádory podle lokalizace v jednotlivých orgánech a tkáních, podle období, kdy se vytvářejí (nádory dětského věku, resp. nádory u dospělých), podle průběhu a závažnosti onemocnění a podle mnoha dalších hledisek. Navzdory značné heterogenitě nádorů jsou cenným pomocníkem onkologů moderní molekulárně biologické poznatky. Umožňují nejen poznat podstatu těchto chorob, ale přispívají také k jejich diagnostice a stanovení účinného způsobu léčby.

Onkogeneze

Proces vzniku nádoru se nazývá **onkogeneze, tumorigeneze**, popř. **karcinogeneze**. Posledně jmenovaný výraz je odvozen od řeckých slov *karkinos* (rak) a *gennaó* (rodím se, vznikám). Další občas používané synonymum **kancerogeneze** pochází z latinského ekvivalentu *cancer* (rak).

Karcinogeneze probíhá na genetickém podkladě. Jejími příčinami jsou ve většině případů mutace určitých genů. Ke vzniku nádoru může dojít také na základě virové infekce, kdy se mění exprese určitých genů a v některých případech může dojít i k přímému ovlivnění genomu hostitelské buňky (např. začleněním virové partikule).

Vztah mezi vznikem mutace (tj. mutagenezí) a **onkogenezí** je velmi úzký. Mutace v genech ovlivňujících buněčný cyklus, popř. reparaci DNA mohou způsobit, že se buňka začne nekontrolovaně dělit a postupně se změní (transformuje) na **buňku nádorovou**. Ke vzniku nádoru je zpravidla potřeba více mutací v různých genech, v některých případech předpokládáme i spoluúčast negenetických (epigenetických) faktorů.

Transformované buňky se zpravidla velmi rychle rozmnožují. Při jejich překotném a neomezeném dělení dochází k dalším genovým i chromozomovým mutacím. Tak vznikají buňky s výrazně změněným genotypem, popř. karyotypem, které vytvářejí nádor. Během dalšího vývoje se buňky dále dělí a nádor nabývá na objemu. Pokud jde o **zhoubný neboli maligní nádor**, buňky se z něj uvolňují a prostřednictvím krevního řečiště se šíří po celém organismu. V různých orgánech pak vytvářejí druhotná ložiska neboli **metastázy**. Od maligního nádoru odlišujeme **nádor nezhoubný neboli benigní**, který zpravidla zůstává lokalizován v tkáni, kde vznikl, a nešíří se dále po těle. Míra genetických změn je u většiny novotvarů v přímém vztahu k prognóze onemocnění (tj. čím více mutací, tím horší prognóza).

Klasifikace mutací vedoucích ke vzniku a k progresi nádoru

Vznik nádorové buňky i vývoj nádoru je složitý proces, v němž mají mutace jednotlivých genů rozdílný význam a objevují se v různých fázích malignizačního procesu. Proto je klasifikujeme podle různých kritérií.

Podle původu rozlišujeme:

a) Vrozené mutace („germ-line mutations“) – tj. mutace získané od rodičů. Projevují se zejména u **dědičných neboli hereditárních malignit**. Získáním této mutace je jedinec predisponován ke vzniku nádoru. Znamená to, že má zvýšené riziko nádorového onemocnění. V souvislosti s tím byly popsány celé rodiny se zvýšeným výskytem některých malignit. Typickým znakem dědičných nádorových onemocnění je nejen výskyt v rodině (tj. familiární výskyt), ale často též poměrně nízký věk nástupu choroby (v dětství, v pubertě, nebo na počátku reprodukčního věku). Některé vzácnější hereditární malignity, popř. syndromy asociované se zvýšeným rizikem nádorů, se dokonce dědí podle Mendelových zákonů jako autozomově dominantní (vzácněji autozomově recesivní) znaky.

b) Získané mutace – tj. mutace na úrovni somatické buňky. V tomto případě jedinec mutaci nedědí, ale ke vzniku mutované alely dojde pouze v jedné somatické buňce v jeho těle. Tato somatická buňka pak (zpravidla po dalších genetických změnách) vytváří nádor.

Oba typy mutací spolu mohou vzájemně souviset. U jedinců s vrozenými mutacemi jsou ke vzniku nádoru většinou třeba další mutace, které získá během dalšího života (viz dále).

Podle etiologického významu klasifikujeme mutace do dvou skupin:

a) Primární (tj. kauzální) mutace hrají při vzniku nádorové buňky rozhodující roli. Může jít o vrozené mutace, ale také o získané změny, které jsou nezbytné pro vznik nekontrolované se dělící transformované buňky. K završení procesu karcinogeneze je většinou potřeba větší počet mutací. Případy, kdy jediná mutace způsobí přeměnu normální buňky na buňku nádorovou, jsou velmi vzácné, ne-li zcela nemožné.

b) Sekundární mutace vznikají až během progresu nádoru. Primární mutace často způsobí poruchu regulace buněčného cyklu a omezení funkce reparačních mechanismů (nikoli náhodou dochází u nádorových buněk často k výraznému zkrácení fáze G1). Tím se vytvoří příznivé podmínky pro vznik mutací v dalších genech, což následně vede k rychlé eskalaci nových genetických poruch. Nekontrolovaným, zpravidla poměrně rychlým dělením buněk dochází také k poruchám rozchodu chromozomů. Vzácností nejsou ani složité chromozomové přestavby. Proto mají nádorové buňky v pokročilé fázi vývoje větší počet mutací než primární nádorové buňky. Akumulace genových mutací, resp. chromozomových změn zpravidla zvyšuje invazivitu nádoru a představuje horší prognózu pro pacienta.

Velký počet různých mutací provázejících proces karcinogeneze výrazně znesnadňuje molekulárně biologickou diagnostiku malignit. Komplexní vyšetření všech genetických změn bývá proto velmi obtížné. Složitost problematiky dokládá také **velký počet genů**, které mohou být u onkologických onemocnění mutovány. Přehled těchto genů je náplní samostatného textu.

Onkogeneticky významné geny

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Vznik nádoru (onkogeneze, resp. karcinogeneze – viz samostatný text) je zpravidla vyvolán i provázen větším počtem změn na genetické úrovni. V současnosti známe velké množství genů, jejichž mutace může vést ke vzniku nádorové buňky. Podle konkrétní funkce rozdělujeme tyto geny do čtyř skupin:

a) Protoonkogeny

b) Tumor supresorové geny neboli nádorové supresory

c) Geny řídící reparační mechanismy

d) Geny regulující apoptózu

Kromě těchto skupin se při patogenezi nádorů mohou projevit také defekty **genů ovlivňujících replikaci DNA** (např. genů pro DNA-polymerázu, ligázu, helikázu a topoizomerázu). Svůj význam mohou mít také polymorfismy **genů řídících metabolickou přeměnu některých prokarcinogenních látek** na aktivní vysoce karcinogenní produkty. Příkladem je gen pro cytochrom P450 monooxygenázu.

Protoonkogeny a onkogeny

Základní úlohou protoonkogenů je stimulace buněčného dělení. V normálních buňkách je jejich transkripční aktivita kontrolována složitými buněčnými mechanismy. Podle úlohy při buněčné signalizaci rozlišujeme 4 základní typy protoonkogenů:

a) Geny pro růstové faktory, tj. proteiny produkované určitými buňkami zpravidla do mimobuněčného prostředí. Jejich vazbou na buněčné receptory se spouští kaskádová reakce vedoucí ke stimulaci buněčné proliferace.

b) Geny pro receptory růstových faktorů, tj. proteiny zakotvené v buněčné membráně. Vazbou růstového faktoru na receptor se signál přenáší do nitra buňky.

c) Geny pro přenašeče signálu, tj. proteiny, které jsou funkčně přímo nebo nepřímo svázány s receptory růstových faktorů. Přijímají signál z receptoru, vzájemně si jej předávají a v závěru tohoto přenosu aktivují příslušné transkripční faktory.

d) Geny pro transkripční faktory, tj. proteiny, které jsou aktivovány přenašeči signálu. Po aktivaci spouštějí transkripci genů stimulujících mitotickou aktivitu buňky.

Mutací může dojít k přeměně neboli **aktivaci** protoonkogenu **na onkogen**, jenž vytváří větší množství genového produktu, čímž nekontrolovaně stimuluje buněčné dělení. K aktivaci dochází např. **zmnožením (amplifikací) protoonkogenu** nebo **mutací v jeho regulační oblasti (promotoru)**.

Protoonkogen může být aktivován také při **translokaci dvou chromozomů**. Příkladem je reciproká translokace koncových úseků dlouhých ramének chromozomů 9 a 22. Tato získaná chromozomová aberace je zdánlivě nepatrná změna, která navíc není provázena ztrátou nebo zmnožením genetického materiálu. Na chromozomu 9 je však přítomen protoonkogen ABL, který je při translokaci spojen s genem BCR na chromozomu 22. Vytváří se fúzní gen BCR-ABL, který je (vzhledem k silnému promotoru na BCR) velmi často transkribován a stimuluje buňku k proliferaci. Tak může z normální buňky vzniknout buňka nádorová. Translokaci chromozomů 9 a 22 nacházíme především u **leukémií** (tj. nádorových onemocnění krevních buněk).

Tumor supresorové geny

Na rozdíl od protoonkogenů mají tumor supresorové geny (též **nádorové supresory**) **inhibiční význam**. Pozitivně ovlivňují zejména existenci kontrolních bodů buněčného cyklu

a setrvání buňky ve fázích G1, resp. G2. Znamená to, že působením tumor supresorových genů je buněčný cyklus „zastaven“ a specifické kontrolní mechanismy tak získávají čas, aby mohly „přezkoumat“ genetickou výbavu buňky. Podle toho pak může dojít opravě (reparaci) mutací v DNA nebo k indukci tzv. programované buněčné smrti čili **apoptózy** (viz níže).

Mutací tumor supresorových genů dochází k závažným poruchám regulace buněčného cyklu. Následkem je zpravidla porucha či úplná eliminace kontrolních bodů, selhání reparačních mechanismů a ztráta schopnosti navodit apoptózu. Na rozdíl od onkogenů, kdy k projevu často stačí mutace alely na jednom homologickém chromozomu, se mutace tumor supresorových genů projevují většinou až po mutaci alel na obou homologických chromozomech. Znamená to, že **obě kopie tumor supresorového genu musí být mutací vyřazeny z funkce**.

Nemalé procento malignit, u nichž byly mutace tumor supresorových genů prokázány, mělo hereditární charakter. Ukázalo se, že postižení jedinci již zdědili jednu mutovanou alelu od svých rodičů. K mutaci alely na druhém homologickém chromozomu došlo až za jejich života. Proces, kdy dochází k mutaci a následnému vyřazení druhé alely, se nazývá **ztráta heterozygosity** neboli LOH (*loss of heterozygosity*). Výsledkem je vznik dvou neaktivních mutantních alel v „homozygotní“ konstituci (odtud výraz „ztráta heterozygosity“). Molekulárně-biologické testování LOH v příslušných tumor supresorových genech má velký význam pro diagnózu i prognózu vyšetřovaného nádoru.

Jedním z prvně objevených tumor supresorových genů je gen **RB1** na chromozomu 13. Původně se předpokládalo, že jeho mutace je spjatá pouze s retinoblastomem (nádorem sítnice). Později byly jeho mutace prokázány také u karcinomů močového měchýře a respiračního traktu i u dalších nádorů.

Patrně nejznámějším tumor supresorovým genem je **TP53** (též p53) na chromozomu 17. Jeho mutace se objevují u široké škály malignit mnoha orgánů. Vzácností nejsou ani případy, kdy se u postižených osob rozvíjí více nádorů v různých lokalizacích. Tato asociace nádorových onemocnění s mutací TP53 se nazývá **Li-Fraumeni syndrom**.

Geny řídící reparační mechanismy

Tyto tzv. **mutátorové geny** mají v normálních buňkách význam při uchování kontinuity genetické informace. Jejich produkty jsou specifické enzymy, které opravují (reparují) nově vzniklé mutace v DNA. O této tématice pojednává samostatný text.

Geny řídící apoptózu

Proces programované buněčné smrti má za běžných podmínek význam při vývinu určitých orgánových struktur plodu, kdy část buněk v závěrečné fázi zaniká. K apoptóze však buňka přistupuje také v případě, když je její genom poškozen v takovém rozsahu, že reparace všech mutací není možná. K významným genům zastavujícím apoptózu patří gen **bcl2**. Pokud je jeho exprese zvýšena, život buňky se výrazně prodlužuje. Tato zdánlivá výhoda však v sobě nese závažné riziko: S delší dobou života buňky stoupá také pravděpodobnost jiné mutace, čímž roste riziko vzniku nádoru.

Populace z genetického hlediska

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Pod pojmem **populace** rozumíme soubor geneticky vzájemně příbuzných jedinců téhož druhu. Genetická příbuznost je dána nejen tím, že příslušníci dané populace jsou schopni se navzájem křížit, ale také skutečností, že mají společného (historicky nepříliš vzdáleného) předka. S určitou nadsázkou lze populaci přirovnat k velké a rozvětvené rodině, kde jsou si všichni blízcí či vzdáleně příbuzní. Přesto bývají jedinci tvořící populaci po genotypové i fenotypové stránce značně odlišní. Všichni se však podílejí na společném populačním **genofondu**. Pod pojmem genofond (též genový fond) rozumíme **soubor alel všech genů**, které jsou přítomny v gametách a mohou se proto uplatnit v dalších generacích.

Na genofondu mají podíl všichni příslušníci populace schopní rozmnožování bez ohledu na svoji genetickou výbavu. Proto je každá populace **genotypově strukturována**, neboť obsahuje jedince s různými genotypy (dominantní homozygoty, heterozygoty, recesivní homozygoty). Zastoupení genotypů úzce souvisí se **způsobem rozmnožování**, který je pro příslušníky dané populace typický. Z tohoto hlediska rozlišujeme dva základní typy populací:

1) Autogamické populace. Organismy tvořící **autogamické populace** se množí samooplozením neboli autogamií. Znamená to, že **každý jedinec je hermafroditický** a vytváří ve svém těle samčí i samičí pohlavní buňky, které jsou schopny vzájemného oplození. Tyto organismy proto nepotřebují ke svému rozmnožování žádného partnera. Typickými příklady jsou **samosprašné rostliny** a někteří bezobratlí živočichové.

Pro pochopení zákonitostí, jimiž se řídí genotypová skladba populace, je třeba znát nejen aktuální stav, ale také odhadnout, jak se budou měnit frekvence jednotlivých genotypů v následujících generacích. Budeme se zabývat genem, který tvoří pouze dvě alely – dominantní (A) a recesivní (a). Autogamní jedinci, kteří jsou v daném páru alel homozygotní (AA, resp. aa), mohou vytvářet pouze homozygotní potomky. Genotypově různorodé potomstvo produkují pouze heterozygoti. Z druhého Mendelova zákona víme, že samooplozením heterozygota (Aa x Aa) vznikne potomstvo o genotypovém štěpném poměru 1AA : 2Aa : 1aa. Heterozygoti tvoří i v tomto případě pouze polovinu potomků. Proto z generace na generaci výrazně **klesá podíl heterozygotů**, zatímco zastoupení dominantních a recesivních homozygotů stoupá.

Situace, kdy se organismus rozmnožuje výhradně samooplozením, není v přírodě příliš častá. Přesto má poznání genetických procesů v autogamické populaci velký význam zejména pro genetiku člověka a hospodářských zvířat. Člověk ani hospodářská zvířata se sice nerozmnožují samooplozením, avšak k podobným změnám frekvence genotypů dochází při **příbuzenských sňatcích** nebo při **příbuzenské plemenitbě** u zvířat. V genetice se párování příbuzných jedinců obecně označuje anglickým termínem **inbreeding**. V izolovaných populacích, jejichž příslušníci jsou navzájem v různém stupni příbuznosti, výrazně stoupá podíl homozygotů, takže se výrazně **zvyšuje riziko výskytu geneticky podmíněných poruch** (zejména autozomálně recesivních a multifaktoriálních). Tento jev se nazývá **inbrední deprese**.

Příkladem je nerovnoměrné rozšíření alkaptonurie, choroby s autozomálně recesivním přenosem. Její průměrná frekvence výskytu v lidské populaci je 1/500 000 (postihuje jednoho z 500 000 jedinců). Četnost alkaptonurie v některých horských oblastech Slovenska však dosahuje až 1/19 000. Předpokládá se, že na zvýšeném výskytu choroby se určitou měrou podílejí také příbuzenské sňatky podmíněné částečnou geografickou izolací horských obcí.

K podobnému zvýšení frekvence homozygotů docházelo i při **úzce výběrových sňatcích**

v panovnických rodinách. Omezením výběru partnerů na příslušníky nepočetné, společensky privilegované vrstvy, došlo k výraznému nárůstu příbuzenských sňatků. Tím lze vysvětlit zvýšený výskyt vrozených vad a geneticky podmíněných chorob v některých královských a šlechtických rodinách.

2) Alogamické populace. Organismy s odděleným pohlavím (gonochoristé) a hermafroditi neschopní samooplození vytvářejí **alogamické populace**. Genotyp každého potomka je proto určen kombinací alel získaných od dvou různých rodičů. Modelovým případem alogamické populace je **populace panmiktická** (též mendelovská), kde dochází ke zcela náhodnému křížení každého jedince s kterýmkoliv jiným. Pravděpodobnost zkřížení jakýchkoliv dvou jedinců je proto ve všech případech stejná.

Lidskou populaci lze označit za alogamickou, avšak rozhodně ne za panmiktickou. Náhodnému výběru jedinců brání četné bariéry, podmíněné zejména společenským postavením, kulturními, národnostními, náboženskými a etnickými rozdíly. O **nenáhodném výběru partnerů** neboli **výběrových manželstvích** nás přesvědčí i seznamovací inzertní rubriky v novinách. V nich se dočteme, že tělesná výška a stupeň dosaženého vzdělání patří v mnoha případech k základním kritériím při výběru partnera. Je známo, že dívky se jen velmi vzácně vdávají za muže, kteří nedosahují jejich tělesné výšky. Častější jsou také sňatky partnerů se stejným nebo podobným stupněm vzdělání, popř. osob žijících ve stejném městě nebo regionu. Extrémními případy jsou úzce vyhraněné náboženské či etnické komunity, v nichž je svazek s osobou žijící mimo tyto skupiny prakticky vyloučen.

V panmiktické populaci předpokládáme náhodné párování jedinců, tedy spojení jakýchkoliv dvou genotypů. Pokud je populace na počátku sledování tvořena samými heterozygoty, lze snadno odvodit, že po jejich vzájemném křížení klesne v potomstvu zastoupení heterozygotů na 50 %, zatímco zbylých 50 % budou tvořit rovnými díly dominantní a recesivní homozygoti. V dalších generacích však již k poklesu nedojde, neboť noví heterozygoti budou vznikat nejen vzájemným křížením heterozygotů, ale také křížením homozygotů s heterozygoty, popř. křížením dominantních a recesivních homozygotů. Tak **zůstává poměr jednotlivých genotypů v dalších generacích nezměněn**.

Hardyho-Weinbergův zákon

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Britský matematik **Godfrey Harold Hardy** (1877-1947) publikoval výsledky svých úvah o genetické rovnováze již roku 1908 formou krátkého článku v časopisu Science. Jeho studie přinesla nejen první formulaci zákona o genetické rovnováze, ale byla také jednou z prvních aplikací exaktní matematiky při modelování biologických procesů. Je zajímavé, že Hardy nepřipisoval svému objevu žádný význam a dál se věnoval pouze „čisté“ matematice. Ve zhruba stejné době dospěl ke shodným závěrům také německý lékař **Wilhelm Weinberg**.

V panmiktické populaci se podíl jednotlivých genotypů nemění. Říkáme, že populace je v **genetické rovnováze**. Tento jev popisuje **Hardyho-Weinbergův zákon**. Jeho matematické vyjádření vychází z předpokladu, že konstantní je nejen podíl jednotlivých genotypů, ale také frekvence příslušných alel. To lze vyjádřit jednoduchou rovnicí:

$$p + q = 1$$

kde p je frekvence dominantní alely (A) a q frekvence recesivní alely (a).

Tento zápis platí pro případ, když poměrné zastoupení vyjádříme desetinným číslem nebo zlomkem. Pokud bychom vyjádřili frekvenci alel v procentech, můžeme uvedený vztah zapsat:

$$p + q = 100 \%$$

Z frekvence alel můžeme snadno odvodit zastoupení jednotlivých genotypů:

1) Pravděpodobnost setkání dvou gamet nesoucí dominantní alelu je $p \cdot p = p^2$. Proto **hodnota p^2 udává frekvenci dominantních homozygotů (AA)**. Stejně tak **hodnota q^2 udává frekvenci recesivních homozygotů (aa)**.

2) Pravděpodobnost setkání gamet, z nichž jedna nese dominantní a druhá recesivní alelu, je dána vztahem $(p \cdot q) + (q \cdot p) = 2pq$. Tato hodnota zároveň udává **frekvenci heterozygotů v dané populaci**.

Protože zastoupení dominantní a recesivní alely je rovno jedné, musí být roven jedné i součet frekvencí všech genotypů:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Uvedený vztah vyjadřuje genotypovou strukturu populace a je matematickým vyjádřením **Hardyho-Weinbergova zákona**. Jeho odvození lze ověřit i umocněním součtu $p+q$:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Uvedený zákon vyjadřuje genetickou rovnováhu v panmiktické populaci, vyplývající z konstantního zastoupení dominantní a recesivní alely.

Ačkoliv lidská populace není panmiktická, je dostatečně početná, abychom Hardyho-Weinbergův zákon mohli využít k odhadu frekvence jednotlivých genotypů. Týká se to i geneticky podmíněných onemocnění. Využití výše uvedených vztahů dokumentují nejlépe následující dva příklady.

Příklad 1:

V panmiktické populaci bylo zjištěno 9 % recesivních homozygotů (aa). Vypočtete podíl (tj. frekvenci) dominantních homozygotů (AA) a heterozygotů (Aa).

Řešení příkladu 1:

a) Frekvence 9 % neboli 0,09 (vyjádřeno desetinným číslem) odpovídá hodnotě q^2 . Pokud $q^2 = 0,09$, pak frekvence recesivní alely je

$$q = \sqrt{0,09} = 0,3.$$

b) Pro poměrné zastoupení alel v populaci platí, že $p + q = 1$. Frekvenci dominantní alely lze proto vyjádřit jako $p = 1 - q$. V našem případě vypočteme hodnotu p :

$p = 1 - 0,3 = 0,7$
Zastoupení homozygotů činí:
 $p^2 = 0,7^2 = 0,49$.

c) Frekvenci heterozygotů udává hodnota $2pq$:
 $2pq = 2 \cdot 0,3 \cdot 0,7 = 0,42$.

d) Výpočtem jsme zjistili, že poměrné zastoupení genotypů v populaci je 49 % dominantních homozygotů, 42 % heterozygotů a 9 % recesivních homozygotů.

Příklad 2:

Cystická fibróza, onemocnění s autozomálně recesivním přenosem, postihuje zhruba jednoho z 2500 jedinců (znamená to, že frekvence výskytu této choroby v populaci je $1/2500$). Vypočtěte podíl heterozygotů (tj. zdravých přenašečů recesivní alely).

Řešení příkladu 2:

a) Protože postižení jsou recesivní homozygoti, odpovídá frekvence výskytu choroby hodnotě q^2 .

Proto $q = \sqrt{1/2500} = 1/50$.

b) Frekvence dominantní (nemutované) alely je $p = 1 - q = 1 - 1/50 = 49/50$. Hodnota $49/50$ je velmi blízká jedné (podíl zlomku činí 0,98), proto ji lze zaokrouhlit: $49/50 \approx 1$.

c) Frekvence přenašečů (heterozygotů) je $2pq = 2 \cdot 1 \cdot 1/50 = 2/50 = 1/25$. Výsledek ukazuje, že každý pětadvacátý člověk v naší populaci je přenašečem alely pro cystickou fibrózu.

Poznámka: Čísla v příkladu 2 jsou přizpůsobena tak, aby s nimi bylo možné dobře počítat. Ve skutečnosti je podíl jedinců postižených cystickou fibrózou ve středoevropských populacích poněkud nižší.

Změny genetické struktury populace

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Ačkoli Hardyho-Weinbergův zákon předpokládá rovnovážné a v zásadě neměnné zastoupení jednotlivých alel, resp. genotypů, v reálných podmínkách se genetická struktura populace mění působením různých faktorů. K nejvýznamnějším procesům, které vedou ke změnám frekvencí jednotlivých alel, patří:

1) Mutace, které lze považovat za náhodnou a neusměrněnou změnu genotypu. Jejich prostřednictvím se mění dominantní alela na recesivní nebo naopak. Tak se může vlivem náhodné mutace (popř. většího počtu mutací) zvýšit v populaci frekvence jedné z alel.

V některých případech vzniká mutací **nová alela**, která je vůči stávající dominantní alele kodominantní. Příkladem může být krevní skupina B, jejíž alela (I^B) vznikla zřejmě později než alely I^A a i^0 . Dokládá to naprostá absence skupiny B u příslušníků některých kmenů severoamerických a kanadských Indiánů. Předpokládá se, že předkové těchto Indiánů přicestovali Behringovou úžinou na americký kontinent dříve, než se u původní asijské populace vytvořila mutací alela I^B . Uvedený příklad ukazuje, že mutace mohou **zvyšovat genetickou variabilitu populací**.

2) Selektce neboli **výběr** je důležitým faktorem, na jehož evoluční význam upozornili již Charles Darwin a Alfred Wallace. Některé alely vzniklé mutacemi jsou působením selekčních procesů dříve či později z populace eliminovány. Tyto změny se týkají zejména mutací snižujících schopnost jedince přizpůsobit se měnícím podmínkám prostředí nebo omezujících jeho plodnost. Zastoupení mutantní alely se v těchto případech snižuje, zatímco podíl nemutované alely vzrůstá.

Mutací však mohou vzniknout také alely, které svého nositele zvýhodní. Selektční mechanismy v tomto případě mutovanou alelu preferují. Proto se během několika generací frekvence mutované alely v populaci výrazně zvýší. **Selektce tak umožňuje výběr genotypů, které jsou pro přežití populace nejvýhodnější.**

Selekci nepodléhají pouze tzv. **neutrální mutace**, které pro své nositele nemají kladný ani záporný význam. Příkladem mohou být mutace, které sice mění zastoupení jedné nebo několika málo aminokyselin v určitém enzymu, avšak enzymová aktivita zůstává stejná jako u nemutované formy.

3) Migrace (přemísťování, popř. stěhování) jedinců je dalším významným faktorem ovlivňujícím změny frekvence jednotlivých alel. Populace není uzavřený systém a občas se stává, že ji někteří příslušníci opustí (emigrují) nebo ji naopak rozmnoží jedinci z jiných populací. Zastoupení alely se tak může měnit v závislosti na míře **emigrace** jejích nosičů nebo na rozsahu **imigrace** jedinců z jiné populace.

4) Náhodný posun genetické rovnováhy neboli **genetický drift** se uplatňuje v nepříliš početných populacích (tvořených jen několika desítkami až stovkami jedinců). Při nevelkém počtu rodičů vzniká poměrně málo potomků, čímž se zvyšuje pravděpodobnost, že **některé alely nebudou předány do další generace**. Tak se stává, že jedna z alel převládne a druhá po několika generacích vymizí.

Genetický drift lze přirovnat k opakovanému hodu mincí. Sledujeme-li počty vrhů, kdy padne rubová a lícová strana mince, zjistíme, že po tisíci hodech se bude početní poměr „rubových“ a „lícových“ vrhů blížit podílu 1 : 1 (tedy zhruba 500 : 500). Pravděpodobnost, že by 1000krát za sebou padla vždy jen rubová (nebo jen lícová) strana mince, je velmi nízká. Hodíme-li však

mincí pouze 10krát, je tato pravděpodobnost daleko vyšší. Tak může v nepočetných populacích jedna z alel vymizet, aniž by byla eliminována selekcí. Proto Hardy-Weinbergův zákon platí pouze pro velké populace, kde je vliv genetického driftu zanedbatelný.

Rychlost změn podílů jednotlivých alel vlivem mutace, selekce nebo migrace můžeme vyjádřit pomocí zvláštních **koeficientů** (mutačního koeficientu, selekčního koeficientu a koeficientu emigrace, resp. imigrace). Tyto hodnoty nám umožní odhadnout podíl jednotlivých genotypů, resp. alel i po mnoha generacích (v případě, že frekvence příslušných změn zůstává stále konstantní). Naproti tomu genetický drift nelze kvantitativně vyjádřit, neboť jde o proces ryze stochastický.

Genomika a příbuzné disciplíny

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Senzační objevy na přelomu 20. a 21. století vyvolávají dojem, že molekulární biologie již řekla lidstvu vše, co mělo být sděleno, a nyní stačí jen aplikovat nashromážděné poznatky v praxi. Ve skutečnosti však dosavadní výsledky **projektu lidského genomu** (HGP) přinášejí daleko více otázek než odpovědí (viz též samostatný text). Je třeba si uvědomit, že dosud známe pouze z větší části sekvenci lidského genomu, nikoli skutečný význam všech genů. Ačkoli počítačová analýza odhalila v genomu pravděpodobné kódující oblasti (oněch 20 – 30 tisíc genů – viz samostatný text o lidském genomu), nejsme dosud schopni objasnit funkci jejich proteinových produktů. Hledání odpovědí na tyto otázky nebude v žádném případě snadné.

Naše poznání přenosu dědičných znaků komplikuje také skutečnost, že **funkce jednotlivých genů se navzájem doplňují a ovlivňují**. Tak např. biochemické přeměny vedoucí ke vzniku jediné molekuly jsou ovlivňovány sérií genů produkujících příslušné enzymy. Existují také geny, které kódují regulační proteiny, jimiž ovlivňují funkci jiných genů. Tato zjištění značně zkomplikovala pohled na geneticky podmíněné choroby. Ukazuje se, že **čistě monogenních chorob je velmi málo**. Ve většině případů jsou projevy onemocnění výsledkem složitých interakcí alel mnoha genů v kombinaci s faktory vnějšího prostředí. Proto je většina geneticky podmíněných chorob řazena mezi **choroby multifaktoriální** (blíže viz samostatný text).

Genomika a její význam

Molekulárně biologické poznání na tomto poli vedlo ke vzniku moderního vědního oboru zvaného **genomika**, jenž postupně nahrazuje genetiku v původním pojetí. Jeho náplní je studium struktury a funkce celých genomů. Umožňuje komplexní pohled na genom jako na složitou soustavu genů a dokumentuje jejich funkční provázanost. Tím přispívá nejen k ucelení vysvětlení podstaty mnoha geneticky podmíněných chorob, ale také např. k objasnění evolučních vztahů mezi různými organismy (to je náplň tzv. srovnávací nebo komparativní genomiky).

Velký význam bude mít v blízké budoucnosti také **farmakogenomika**, jejímž úkolem bude vyvoj individuálně účinných léčiv, která budou „šita na míru“ konkrétním pacientům. Znamená to, že budou respektovat konkrétní polymorfní formy jejich enzymů a dalších proteinů angažovaných v metabolismu léčiv a v detoxifikačních procesech. V budoucnosti by se proto již nemělo stát, aby se u pacienta po aplikaci léku projevy nežádoucí účinky jenom proto, že příslušný jedinec danou látku (vzhledem ke svému enzymovému vybavení) špatně snáší.

Transkriptomika a proteomika

V současné době umožňují molekulárně biologické metody, zejména expresní genové čipy komplexní vyšetření tzv. **transkriptomu**, tj. souboru všech molekul RNA, vytvořených transkripcí v daném období vývoje buňky. Do této skupiny řadíme nejen molekuly RNA, které slouží jako předloha pro syntézu proteinů, ale také molekuly RNA, které nejsou překládány (zejména rRNA a tRNA). Analýza transkriptomu podává přehled o změnách genové exprese související s diferenciací buněk, s vývinem organismu nebo s patologickými procesy v buňce. V mnoha případech také objasňuje vzájemné funkční vztahy jednotlivých genů. Podrobné studium transkriptomu se stalo náplní nové disciplíny zvané **transkriptomika**.

Kromě transkriptomiky se v současnosti uplatňuje také **proteomika**, disciplína, která zabývá studiem **proteomu**. Pod pojmem proteom rozumíme soubor všech proteinových molekul vzniklých transkripcí RNA v dané fázi vývoje příslušné buňky. Proteomika je důležitým spojovacím článkem mezi biochemií a genomikou, resp. molekulární biologii. Někteří odborníci vyčleňují z proteomu ještě tzv. **metabolom**, tj. soubor všech proteinových molekul (zejména enzymů), které řídí metabolické procesy v dané buňce.

Vztah mezi genomem, transkriptomem a proteomem není jednoznačný. U mnohobuněčných organismů je genom většiny buněk stejný. Výjimku tvoří např. lidské erytrocyty, které buněčné jádro nemají, nebo určité buňky imunitního systému, kde dochází ke specifickým přestavbám některých genů, které umožňují tvorbu specifických protilátek a jiných molekul.

Naproti tomu transkriptom, proteom, popř. metabolom se mohou i v jediném organismu výrazně lišit v závislosti na **morfologii a funkci konkrétní tkáně**. Navíc proteom (metabolom) a transkriptom reprezentují pouhou část „genetické paměti“ buňky, zatímco genom obsahuje také nekódující úseky, které se při syntéze RNA, resp. proteinů nijak neuplatňují.

Projekt lidského genomu a současné perspektivy genomiky

Eduard Kočárek

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

V souvislosti s pokrokem a postupnou automatizací molekulárně genetických metod byl v letech 1985 – 1986 poprvé zformulován záměr prostudovat sekvenci celého lidského genomu. Roku 1990 byl ve Spojených státech odstartován jeden z nejrozsáhlejších vědeckých projektů v historii. V angličtině získal označení „**Human Genome Project**“ (HGP). Hlavním úkolem projektu bylo nejen zmapování lidského genomu a objasnění funkce všech jeho genů, ale také studium genomů některých dalších modelových organismů. Z nich jmenujme bakterii *Escherichia coli*, rostlinu huseniček (*Arabidopsis thaliana*), kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*, octomilku (*Drosophila melanogaster*), hlistici *Caenorhabditis elegans* a myš (*Mus musculus*). Jmenované organismy se již po léta využívají jako experimentální objekty v biologických laboratořích.

Cílem HGP bylo především:

- identifikovat všechny geny v lidské DNA na molekulární úrovni;
- určit pořadí asi 3,2 miliard nukleotidů, které tvoří lidskou DNA;
- uložit získané informace do databází;
- vyvinout rychlejší a výkonnější metody sekvenování;
- vyvinout nástroje pro analýzu získaných dat o lidském genomu;
- zabývat se etickými, právními a sociálními otázkami (*ELSI, ethical, legal, and social issues*), které souvisejí s projektem lidského genomu.

Do studia lidského genomu se zapojilo mnoho laboratoří ve Spojených státech i v zahraničí. Projekt byl koordinován americkým **Úřadem pro energii** (*DOE, U.S. Department of Energy*) a **Národními ústavem zdraví** (*the National Institutes of Health*). Zastřešující organizací celého projektu se stal americký **Národní institut pro výzkum lidského genomu** řízený **Francisem Collinsem** (narozen 1950).

Současně začala pracovat na stejném výzkumném úkolu soukromá americká firma **Celera Genomics** (v Rockville v Marylandu) pod vedením **Johna Craiga Ventera** (narozen 1946).

Projekt HGP byl původně plánován na 15 let, ale technologický pokrok a vzájemná konkurence obou řešitelských skupin vedla k výraznému urychlení prací. Proto již **26. června roku 2000** oznámili představitelé mezinárodního konsorcia a zástupci firmy Celera dokončení předběžné verze sekvence lidského genomu. Tento den bývá označován jako „**den G**“.

V únoru roku 2001 byly v prestižních odborných časopisech *Nature* a *Science* publikovány články obou týmů s prvními ukázkami výsledků. Tyto události bývají označovány za nejvýznamnější milníky vývoje biologického poznání od objevu dvoušroubovicové struktury DNA v roce 1953.

Ačkoliv byl výsledek předběžného přečtení lidského genomu široce medializován a interpretován jako závěr projektu či dokonce jakési završení biologického poznání, skutečnost je poněkud jiná. Ke dni „G“ bylo přečteno 90 % sekvencí bohatých na geny a pouze 70 % sekvencí chudých na geny. Není proto divu, že v údajně přečteném genomu existovaly statisíce „mezer“. Dodatečně bylo zjištěno, že pozice mnoha nukleotidů byla chybně určena a v některých případech došlo dokonce k prohození celých úseků.

Práce na přečtení genomu však velmi rychle pokračovaly i nadále. Proto bylo možno již o necelé tři roky později – v **dubnu 2003** prezentovat výrazně zpřesněnou verzi lidského genomu. K tomuto datu byly sekvence bohaté na geny přečteny z 99 % a sekvence chudé na geny z 80 %. Bylo doplněno mnoho dlouhých úseků tvořených repetitivními sekvencemi. Výrazně se zvýšila přesnost „čtení“ jednotlivých nukleotidů. Přitom mnoho sekvencí dříve

považovaných za geny bylo identifikováno jako **pseudogeny** (tj. sekvence připomínající geny, avšak nevytvářející žádný proteinový produkt ani transkript RNA).

Současný stav poznání lidského genomu

Za genom považujeme soubor všech molekul DNA obsažených v buňce, resp. v organismu. Přitom rozlišujeme:

1. Jaderný genom (tj. soubor všech molekul jaderné DNA).

2. Mitojaderný genom (u člověka a ostatních živočichů soubor molekul DNA přítomných v mitochondriích).

Toto pojetí genomu se výrazně liší od starší definice, podle níž byl genom pouhým „souborem genů“ a někdy byl dokonce velmi nešťastně ztotožňován s genotypem.

Lidský genom je tvořen **3,2 miliardami nukleotidových párů** a obsahuje celkem **20 – 30 tisíc genů** (před započítáním HGP se předpokládalo, že počet genů se pohybuje okolo 100 000). Překvapivý je nejen počet genů, ale také podíl jejich sekvencí v genomu, který nepřesahuje **1,5 %**. Proto se náš genom často metaforicky popisuje jako „**rozsáhlá poušť s oázami genů**“. Zbývajících 98,5 % tvoří nekódující sekvence, z nichž téměř polovina připadá na sekvence repetitivní. V rozdílném rozsahu a sekvenci nekódujících úseků se také nejvýrazněji projevuje individuální variabilita lidských jedinců. Za zmínku také stojí, že v lidském genomu bylo nalezeno až 5 % sekvencí virového původu.

Ani uvedená data však nesvědčí o tom, že by byl lidský genom zcela „přečten“. Problémy působí zejména asi 20 % zbývajících repetitivních sekvencí, jejichž osekvenování není jednoduché. Důležité bude také odhalit nejen proteinové produkty všech nalezených genů, ale zjistit, při kterých procesech se uplatňují a jak interagují s produkty ostatních genů. To je úkolem nově vzniklé vědní disciplíny označované jako **genomika**. Jak je vidět, práce na rozluštění genomu je v současnosti více než dost. Proto se dokončení projektu nepředpokládá ani v roce 2010.

Význam přečtení lidského genomu

Projekt lidského genomu přinesl již nyní přinejmenším dvakrát více poznatků než se původně očekávalo. Využití těchto dat má přirozeně největší význam pro medicínu. Na základě poznatků z HGP se **rozvíjí a zkvalitňuje diagnostika monogenních onemocnění, ale zlepšuje se i včasná diagnostika genetických předpokladů k určitým onemocněním multifaktoriálním**.

Úspěchy HGP však můžeme sledovat nejen na poli diagnostiky, ale také v oblasti léčby. Předpokládá se, že výsledků bude možné využít k rozvoji **nových metod genové terapie**. Současně však rozvoj komplexní poznání genomu umožní **vývoj racionálních léčiv**, která budou působit pouze na postižené orgány a nebudou vyvolávat nežádoucí reakce organismu. Výrazem tohoto pokroku je také vznik nové specializované disciplíny zvané **farmakogenomika**. Jejímž úkolem bude vyvoj **individuálně účinných léčiv**, která budou „šita na míru“ konkrétním pacientům (s ohledem na konkrétní polymorfni formy jejich enzymů a dalších proteinů angažovaných v metabolismu léčiv).