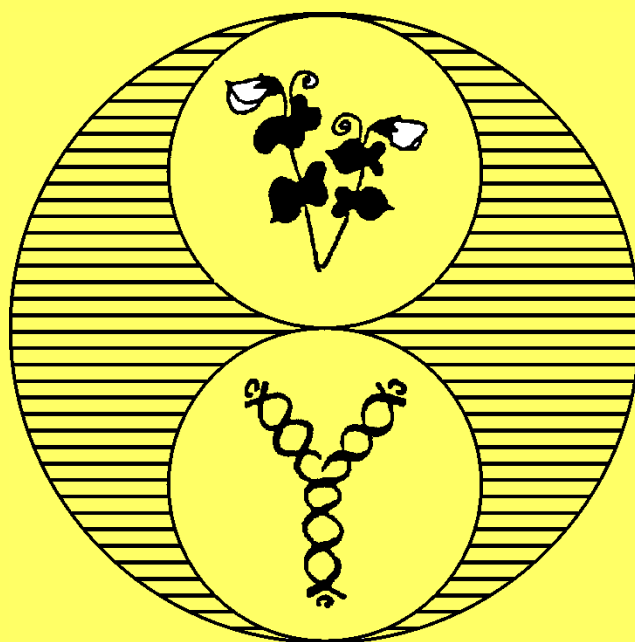


GENETICKÁ SPOLEČNOST GREGORA MENDELA

INFORMAČNÍ LISTY



Číslo 23

Květen 2001

OBSAH

Zápis ze schůze výboru GSGM	1
Vyúčtování hospodaření GSGM za rok 2000	2
Konference GSGM – informace a pozvánka na konferenci 2001	4
Představujeme genetická pracoviště	
Katedra genetiky a molekulární biologie, PřF MU v Brně.....	6
Oddělení lékařské genetiky FN Brno	12
Co nového v genetice.....	15
S. Zadražil: Výzkum a analýza genomu	15
M. Falk: Myotonická dystrofie a trinukleotidové expanze.....	24
J. Relichová: O Mendelově expozici v Brně a v Hynčicích	42
I. Otáhal: Rodný dům Johanna Gregora Mendela ve Vražném – Hynčicích: problém záchrany a regenerace	42
J. Marková: Rodný dům Johanna Gregora Mendela v Hynčicích ve Slezsku	44
J. Marková: Mendelovy Hynčice 2001	45
R. Wood – V. Orel: : Genetic prehistory in selective breeding – A Prelude to Mendel	46
Návrh stanov GSGM.....	47

Informační listy

číslo 23, květen 2001

Vydává Genetická společnost Gregora Mendela

Redakční rada - Výbor GSGM

Výkonný redaktor - Doc. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Katedra genetiky a molekulární biologie

Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně

Kotlářská 2, 611 37 Brno

ISSN 1210-6267

Zápis ze schůze výboru GSGM konané dne 1. listopadu 2000

Přítomni: J. Doškař, E. Miadoková, P. Pikálek, J. Relichová, S. Rosypal, M. Slaninová,
D. Vlček, S. Zadražil.

Omluveni: J. Dvořák, M. Ondřej, J. Timko

Nepřítomen: M. Bezděk

Program:

1. Zhodnocení minulého čísla IL
2. Příprava nového čísla IL (vyjde květen až červen 2001, uzávěrka 15. 3. 2001)
 - Program konference GSGM v r. 2001
 - Genetické pracoviště KGMB PřF MU a gen. odd. FDN Brno
 - Vyúčtování za rok 2000
 - Volby – korespondenčně
 - Definitivní znění stanov
 - Program konference (pozvánka) vč. valného shromáždění
 - Informace o www-stránce
 - Články – S. Zadražil: Analýza genomu, Falk: Molekulární choroby u člověka – expanze trinukleotidů
3. Konference GSGM
 - Termín: 3. až 4. září 2001
 - Téma: Perspektivy genetiky – genomy a genová exprese.
 - Postery – veškerá problematika genetiky.
 - Uvažované přednášky: Zadražil – úvodní, Ondřej nebo Relichová – Arabidopsis, Tomaška nebo Nosek – lineární genofory, Ferák – lidský genom, Michalová – cytogenetika člověka, Hořín – živočišný genom, Vondřejš – sacharomycety, Doškař – bakteriofágy. Jako rezerva Turňa – bakterie.
 - Místo konání: PřF MU Brno.
 - Organizace: Katedra genetiky a mol. biologie PřF MU.
 - Přednášky: 1. den 2+2+ plenárka, 2. den 3+2.
 - Abstrakta z přednášek a posterů vyjdou ve zvláštním čísle IL – uzávěrka – konec července
4. WWW-stránka GSGM je připravena na internetové adrese:
ORION.SCI.MUNI.CZ/GSGM, budou na ní zveřejněny tyto informace:
 - Seznam členů výboru.
 - Seznam členů se zkrácenou adresou pracoviště.
 - Stanovy – poslední verze.
 - Poslední číslo IL.
 - Info o pořádaných akcích.
5. Přípomínky ke Stanovám – par. 8, bod 7 o tajném hlasování, bod e) – upraví P. Pikálek a dva hospodáři
6. Příprava voleb nového výboru
V IL v dubnu – návrhy na nové členy výboru – do konce června
Na konferenci GSGM – vyhlášena kandidátka, bude se volit 15 členů z 25 navržených.
V kandidátce oddělit revizory – volí se dva. Upozornit, že kandidáti se vybírají z platících členů.

Zapsala: J. Relichová

Vyúčtování hospodaření GSGM za rok 2000

Zůstatek k 31.12.1999 20 075,20 Kč
z toho: na účtu KB 19 944,- Kč
. v hotovosti 131,20 Kč

Příjmy v roce 2000

úrok z účtu 96,91 Kč

členské příspěvky: v hotovosti 1 700,- Kč, na účet 4 446,10 Kč

celkem 6 139,88 Kč

Výdaje v roce 2000

a) z účtu:

1. poplatky za vedení účtu 1 140,- Kč 2. poplatky za položky 182,- Kč 3. faktury 6 396,60 Kč

b) v hotovosti:

náklady IL 1820,- Kč

celkem 9 538,60 Kč

Zůstatek ke dni 31. 12. 2000

**na účtu KB 16 768,41 Kč
v hotovosti 11,20 Kč**

Celkem

16 779,61 Kč

Vyúčtoval J. Dvořák, pokladník

Vyúčtovanie hospodárenia slovenskej časti GSGM k 31.12. 2000

<u>Zostatok k 1.1.2000</u>	A- konto	9 546,59 Sk
	B- hotovosť	3 389,80 Sk
A		
Príspevok na Medzinárodnú konferenciu DNA Repair Workshop, Smolenice Október 2000 (dok.1)		- 5 000,00 Sk
Bankové operácie (dok.1)		- 375,91 Sk
Prijmy z členských poplatkov k 31.12. 2000 (dok.1)		+ 2 700,00 Sk
<hr/>		
Zostatok na účte k 31.12.2000 (dok.1)		+6870,68 Sk
B		
Členské príspevky (dok.2)		+ 1 000,00 Sk
Prijmové pokladničné bloky (dok.3)		- 62,00 Sk
<hr/>		
Zostatok hotovosti k 31.12.2000		+ 4 327,80 Sk
Celkový finančný stav k 31. 12. 2000		+ 11 198,48 Sk

Bratislava, 4. 4. 2001

Vyúčtovali: M. Slaninová, E. Miadoková

POZVÁNKA

na genetickou konferenci

Perspektivy genetiky – genomy a genová exprese

3. - 4. září 2001 v Brně
pořádanou Genetickou společností Gregora Mendela
ve spolupráci s
Katedrou genetiky a molekulární biologie
Přírodovědecké fakulty MU

Místo konání: *Přírodovědecká fakulta, MU Brno*

Organizační výbor: předsedkyně RNDr. Jana Řepková, CSc.

a členové z KGMB

Program: vyžádané přednášky na téma Perspektivy genetiky – genomy a genová exprese
prezentace plakátových sdělení ze všech oblastí genetiky

Konferenční poplatek: cca 900 Kč

Abstrakta přednášek a plakátových sdělení budou publikována v českém jazyce ve zvláštním čísle Informačních listů.

Přihlášky zasílejte elektronicky na adresu: repkova@sci.muni.cz nebo poštou na adresu:
RNDr. Jana Řepková, CSc., MU, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno.

V přihlášce uveďte:

Jméno a příjmení (včetně titulů):

Adresa pro korespondenci:

e-mail:

Plakátové sdělení: ano ne (pouze první autor, popř. počet plakátových sdělení)

Ubytování: 2. 9. , 3. 9. , 4. 9.

Konečný termín pro zaslání přihlášek je 30. 6. 2001.

Přihlášeným zájemcům o konferenci budou zaslány další informace do poloviny července.

Pokyny pro zaslání abstraktů plakátových sdělení

Příspěvek pošlete **nejpozději do 31. 7. 2001** elektronickou poštou jako přílohu (dokument Microsoft Word, formát DOC nebo RTF) na adresu : repkova@sci.muni.cz nebo poštou na adresu: RNDr. Jana Řepková, CSc., MU, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno.

V příspěvku uveďte tyto údaje:

Jméno(a) autora(ů)

Název a adresa pracoviště

Název příspěvku

Souhrn

Všechny údaje pište písmem Times New Roman, normální typ písma (ne tučně, ne podtrženě) velikost písma 12, řádkování 1,5. Rozsah příspěvku max. 35 řádků na stránku.

VZOR:

J. Novák, K. Novotný, P. Nový

(Výzkumný ústav genetický, Ulička 67, 123 45 Město).

Studium genů u kukuřice.

V práci byly studovány geny kukuřice

Představujeme genetická pracoviště

Katedra genetiky a molekulární biologie
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně
Kotlářská 2, 611 37 Brno
Tel.: 05-41129543, fax: 05-41129545

Katedra genetiky a molekulární biologie PřF MU v Brně vznikla sloučením oddělení genetiky a molekulární biologie v r. 1991. V jejím čele stáli postupně prof. Stanislav Rosypal, doc. Jaroslav Benedík a prof. Jiřina Relichová, v současné je vedoucí katedry doc. Jiří Doškař. Katedra zajišťuje přednášky a praktická cvičení z genetiky a molekulární biologie pro magisterské studijní obory Molekulární biologie a genetika, Obecná biologie, Biochemie a Biofyzika, pro všechny učitelské kombinace s biologií, a dále pro profesní bakalářský studijní obor Molekulární a buněčná diagnostika. Na katedře jsou v rámci doktorského studijního programu Biologie akreditovány obory Genetika a Molekulární a buněčná biologie.

Personální obsazení katedry:

Vedoucí katedry:

Doc. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Profesoři:

Prof. RNDr. Jiřina Relichová, CSc.

Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc., (emeritní profesor)

Docent:

Doc. RNDr. Jan Šmarda, CSc.

Odborní asistenti:

RNDr. Ing. Karel Chroust, Dr.

RNDr. Petr Kuglík, CSc.

RNDr. Roman Pantůček, Dr.

RNDr. Vladislava Růžičková, CSc.

RNDr. Jana Řepková, CSc.

Vědeckovýzkumná pracovnice:

RNDr. Jana Kailerová, CSc.

Asistent:

Mgr. Pavel Lízal

Technické pracovnice:

Helena Machová

Kateřina Káňová

Sekretářka katedry

Miloslava Konopásková

Učební texty vydané na katedře od r. 1997:

Kuglík, P.: Vybrané kapitoly z cytogenetiky. PřF MU v Brně, 2000.

Relichová, Jiřina - Malina, Jaroslav: Panoráma biologické a sociokulturní antropologie 2: Genetika. Modulové učební texty pro studenty antropologie a "příbuzných" oborů. Editor: Jaroslav Malina. Nadace Universitas Masarykiana v Brně, nakladatelství a vydavatelství Nauma v Brně, 2000. 89 s.

Relichová, J.: Genetika populací. Vydavatelství MU Brno, 179 stran, 1997.

Rosypal S.: Úvod do molekulární biologie. Brno, 1998, Díl I, II, III. Druhé a třetí inovované vydání.

Vědeckovýzkumná činnost:

V rámci Výzkumného záměru MSM 14310008 (řešitelka prof. J. Relichová) a dílčích grantových projektů je výzkumná činnost na pracovišti zaměřena na studium struktury a funkce genomů prokaryotických a eukaryotických organismů a genomu virů a rozvíjí se zejména v těchto oblastech:

1. Molekulární biologie a genetika prokaryot a prokaryotických virů

(J. Doškař, R. Pantůček, V. Růžičková, S. Rosypal, J. Kailerová)

Výzkumná činnost je zaměřena na studium molekulární struktury genomu prokaryotických bakterií, zejména druhů rodu *Staphylococcus*. V rámci tohoto studia je hlavním cílem zpřesnění molekulární taxonomie a klasifikace druhů tohoto rodu, mezi nimiž je řada významných lidských a zvířecích patogenů a průmyslově důležitých druhů. V současné době je pozornost věnována zejména přípravě molekulárních sond pro identifikaci klinicky významných druhů, způsobujících nosokomiální infekce. Součástí tohoto výzkumného zaměření je rovněž analýza molekulární struktury (genomu a proteomu) bakteriálních virů druhu *Staphylococcus aureus*, především bakteriofágů mezinárodní základní řady, které se významně podílejí na změnách biologických vlastností hostitelských kmenů a jsou používány při jejich typizaci, a dále polyvalentních virulentních bakteriofágů, které se využívají při terapii stafylokokových infekcí.

Spolupráce: Univerzita v Tübingenu, BRD

Studenti DPS: Mgr. Jiří Štěpán, Mgr. Pavel Švec, Mgr. Roman Hrstka, Mgr. Petr Kašpárek

Vybrané publikace:

Borecká P., Rosypal S., Pantůček R., Doškař J. (1996): Localization of prophages of serological group B and F on restriction fragments defined in the restriction map of *Staphylococcus aureus* NCTC 8325. FEMS Microbiol. Lett. 143: 203-210.

Doškař J., Pallová P., Pantůček R., Rosypal S., Růžičková V., Pantůčková P., Kailerová J., Klepárník K., Malá Z., and Boček P. (2000): Genomic relatedness of *Staphylococcus aureus* phages of the International Typing Set and detection of serogroup A, B and F prophages in lysogenic strains. Can. J. Microbiol.

Klepárník K., Malá Z., Doškař J., Rosypal S., Boček P. (1995): An improvement of restriction analysis of bacteriophage DNA using capillary electrophoresis in agarose solution. Electrophoresis: 16: 366-376.

Klepárník K., Berka J., Foret F., Doškař J., Kailerová J., Rosypal S., Boček P. (1998): DNA cycle sequencing of a common restriction fragment of the *Staphylococcus aureus* bacteriophages by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrylamide. Electrophoresis 19: 695-700.

Pantůček R., Götz F., Doškař J., Rosypal S. (1996): Genomic variability of *Staphylococcus aureus* and the other coagulase-positive *Staphylococcus* species estimated by macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis. Int. J. Syst. Bacteriol., 46: 216-222.

Pantůček R., Rosypalová A., Doškař J., Kailerová J., Růžičková V., Borecká P., Snopková Š., Horváth R., Götz F., Rosypal S. (1998): The polyvalent staphylococcal phage 812: Its host-range mutants and related phages. Virology 246: 241-252.

- Pantůček R., Sedláček I., Doškař J., Rosypal S. (1999): Complex genomic and phenotypic characterization of the related species *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 941-951.
- Snopková Š., Götz F., Doškař J., Rosypal S. (1994): Pulsed -field gel electrophoresis of the genomic restriction fragments of coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 124: 131-140.
- Wagner E., Doškař J., Götz F. (1998): Physical and genetic map of the genome of *Staphylococcus carnosus* TM300. *Microbiology (UK)* 144: 509-517.

2. Laboratoř molekulární biologie eukaryotické buňky

(J. Šmarda)

Laboratoř se zabývá výzkumem podmínek suprese transformačního účinku onkogenu v *v-myb*. Onkogen *v-myb* viru ptačí myeloblastózy způsobuje akutní myeloblastickou leukémii u kuřat a transformuje myelomonocytické buňky *in vitro*. Strukturně *v-myb* představuje zkrácenou variantu protoonkogenu *c-myb*, který se významnou měrou podílí na správném průběhu krvetvorby. Proteiny *v-Myb* a *c-Myb* fungují jako sekvencně specifické transkripční faktory, které určují účinnost transkripce souboru svých cílových genů. Naším cílem je přispět k poznání mechanismů, které se v buňce podílejí na řízení aktivity proteinu *Myb* a následně jich využít pro cílené potlačení funkce onkoproteinu *v-Myb*. Pro dosažení tohoto cíle využíváme strategie založené na cílené expresi určitých genů v buňkách BM2 (buněčná linie kuřecích monoblastů transformovaných onkogenem *v-myb*) a studiu fenotypových důsledků, které tento zásah buňkám přináší. Dosud jsme v buňkách BM2 úspěšně indukovali expresi deseti různých genů, jako např. *c-Myb*, *RAR*, *RXR*, *CBP*, *v-Fos*, *c-Fos*, *v-Jun*, *c-Jun*, *p53* a vyhodnotili jejich vliv na funkci *v-Myb*. U některých z těchto genů jsme zaznamenali schopnost vyvolat v buňkách BM2 terminální diferenciaci, zpomalení růstu nebo obnovení programované buněčné smrti. Tyto fenotypové změny jsou korelovány se změnami aktivity onkoproteinu *v-Myb*.

Spolupráce: Stanford University, USA; Ecole Normale Supérieure, Lyon, Francie

Studenti DSP: Mgr. Karla Zemanová, Mgr. Sabina Ševčíková, Mgr. Alice Nemažerová,
Mgr. Eva Zahradníčková

Vybrané publikace:

- Pačes, V., Vlček, Č., Šmarda, J., Zdražil, S. and V. Fučík: Tolerated Variations in a genome - The case of closely related *Bacillus* phages PZA, $\phi 29$ and $\phi 15$. A review. *Gene* 54: 155-165, 1987
- Šmarda, J. and J. Lipsick: Dicistronic selection for nuclear proteins in living animal cells. *Gene* 137: 145-149, 1993
- Šmarda, J. and J. Lipsick: *c-Myb* prevents TPA-induced differentiation and cell death in *v-Myb* transformed monoblasts. *Oncogene* 9: 237-245, 1994
- Šmarda, J., Sugarman, J., Glass, C. and J. Lipsick: Retinoic acid receptor α suppresses transformation by *v-myb*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2474-2481, 1995
- Engelke, U., Šmarda, J. and J. Lipsick: By-pass of TPA-induced differentiation and cell cycle arrest by the *c-Myb* DNA-binding domain. *Oncogene* 11: 735-741, 1995
- Zemanová and J. Šmarda: Oncoprotein *v-Myb* and retinoic acid receptor α are mutual antagonists. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 24 (11): 239-250, 1998
- Zemanová and J. Šmarda: A possible cross-talk of retinoic acid- and TPA-driven differentiation pathways. *Folia Biologica* 44: 97-106, 1998
- Šmarda, J., Zemanová, K., Bryja, J., Šmardová, J., Kozubík, A., Hofmanová, J., Nemažerová, A., Ševčíková, S., Kohoutek, J., Vodička, P. Retinoid X receptor suppresses transformation by the *v-myb* oncogene. *J. Leuk. Biol.*, 66: 1039-1048, 1999.

Šmardová, J., Šmarda, J. Klinické důsledky mutací genu CBP. *Časopis lékařů českých* 138 (24): 739-743, 1999.

Vodička, P., Ševčíková, S., Šmardová, J., Souček, K., Šmarda, J. The effects of RAR α and RXR α proteins on growth, viability and differentiation of *v-myb*-transformed monoblasts. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 26 (4): 395-406, 2000 .

3. Genetika rostlin

(J. Relichová, J. Řepková, P. Lízal)

Další část výzkumu zaměřená na eukaryotické genomy využívá při studiu modelovou rostlinu *Arabidopsis thaliana*. Na základě dřívějších výzkumů v této oblasti bylo získáno množství mutantů *Arabidopsis*, a to jak klasickou mutagenézí, tak T-DNA inzerční mutagenézí. U obou typů mutantů se provádí genetická a molekulárně genetická analýza s cílem lokalizovat příslušné geny na genetickou mapu *A. thaliana*. Využívají se přitom metody jak klasického rekombinačního mapování, tak především použití mikrosatelitů jako molekulárních markerů. Speciálně je tento výzkum zaměřen na soubor morfologických recesivních mutantů a soubor embryonálně letálních T-DNA mutantů, a dále na mutace podmiňující pozdní kvetení. Dlouhodobě je monitorován výskyt embryonálně letálních mutací v přírodních populacích *thaliana* z hlediska možného odhadu genetické zátěže lokality.

Vybrané publikace

Gichner, T. - Badayev, S.A. - Demchenko, S.I. - Relichová, Jiřina - Sandhu, S.S. - Usmanov, P.D. - Usmanova, O. - Velemínský, J.: *Arabidopsis* Assay for Mutagenicity. *Mutation Research*, 310, 1, s. 249-256, 1994

Chroust, Karel - Kuglík, Petr - Relichová, Jiřina - Holoubek, Ivan - Čáslavský, Josef - Veselská, Renata Ryšková, Martina - Benedík, Jaroslav: *Drosophila melanogaster*, *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* short-term bioassays in genotoxicity evaluation air and soil samples from sites surrounding two industrial factories in the Czech Republic. *Folia Biologica, Praha* : 43, 2, s. 71-78, 1997.

Kocábek, T., Rakouský, S., Ondřej, M., Řepková, J., Relichová, J. (1999): Identification and mapping of a T-DNA induced flower mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Plant.* 42 (3), 349 - 359.

Kocábek, T., Rakouský, S., Řepková, J., Relichová, J. (1999): Identification and mapping of the T-DNA tagged flower mutation of *Arabidopsis thaliana* revealed the SUPERMAN epigenetic allele. *Biologia, sec. Botany*, 54, suppl. 7, 43.

Lízal, P. (2001): Genetické založení doby do kvetení u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. *Biol. listy* 66 (1): 47-61.

Lízal, Pavel - Relichová, Jiřina: Expression of late flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Vortr. Pflanzenzüchtg. Göttingen*, 2000., s. 16.

Nedělník, J., Řepková, J. (1998): Selekcce rostlin *in vitro* na odolnost vůči vybraným patogenům s využitím sekundárních toxických metabolitů. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 34(2): 69 – 76.

Relichová, J., Řepková, J. (2000): Are the T-DNA mutants amenable to standard recombination analysis? *Biol. Plant.* 43(1), 19 - 23.

Relichová, Jiřina - Bolormaa, Sandujimižid: Somaclonal variation and embryonic lethal mutations in *Arabidopsis*. *Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Masaryk. Brun.*, Biology, Brno Masaryk University, vol. 26, 26, s. 13-16, 1999

Řepková, J., Binarová, P. (1997): Methods of embryo culture and protoplast fusion for interspecific hybridization in *Medicago*, *Trifolium* and *Lotus*. *Genet. a Šlecht.* 33, 215 - 227.

Řepková, J., Nedělník, J. (1998): Selection of embryogenic genotypes of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and their utilisation in the selection of plants resistant to fusaric acid. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 34(2): 45 – 48.

Řepková, J., Nedělník, J. (1999): Současný stav transgenozie pícních leguminóz. *Transgenesis in forage crops (in Czech)*. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 35 (4), 119 – 123.

- Řepková, J., Relichová, J., Doleželová, H. Lukešová, M. (2000): Genetic mapping in *Arabidopsis thaliana*: classical and molecular techniques. *Votr. Pflanzenzüchtg.* 47, 103.
- Řepková, J., Relichová, J., Chytilová, E. (1999): Stability of the T-DNA insertional embryonic lethal mutants in *Arabidopsis*. *Biologia, sec. Botany*, 54, Suppl. 7, 52.

Spolupráce:

Genetique Moleculaire des Plantes, Universite Joseph Fourier, Grenoble Cedex, Francie.

4. Genetika u *Drosophila melanogaster*

(K. Chroust)

Výzkumná činnost je zaměřena na práci s organizmem *Drosophila melanogaster*, který má na KGMB dlouholetou tradici. Od roku 1990 byla práce zaměřena na oblast studia genotoxicity čistých chemických látek, později na vzorky prostředí (vodné, extrakty půdy, vzduch). Od roku 1993 jsme v rámci spolupráce s dr. Jowettem z Univerzity v Newcastle vytvořili několik desítek linií nesoucích některé lidské geny pro metabolizační enzymy. U takto vytvořených transgenních drozofil jsme modelovali některé reakce cizorodých chemických látek s metabolizačními enzymy a sledovali genotoxicitu těchto látek.

5. Molekulární antropologie a genetika člověka

(K. Chroust)

Od roku 1997 se podílíme na výchově studentů studijního oboru Antropologie v oblasti molekulární antropologie, tedy určování pohledu a příbuzenských vztahů u fosilních kosterních pozůstatků nebo kožních derivátů. Od roku 2000 spolupracujeme s FN Bohunice na problematice identifikace mutací souvisejících s prodlouženým QT intervalem (LQT). Identifikujeme mutace v genu *SCN5A*.

Vybrané publikace

- Chroust, K., Kuglík, P., Relichová, Holoubek, I., Čáslavský, I., J., Veselská, R., Ryšková, M., Benedík, J. (1997). *Drosophila melanogaster*, *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* short-term bioassays in genotoxicity evaluation air and soil from sites surrounding two industrial factories in the Czech Republic. *Folia Biologica (Praha)*, 43, 71-78.
- Glatz, Z., Psotová, J., Janiczek, O., Chroust, K., Jowett, T. (1997). Application of covalent chromatography for the purification of glutathione S-transferase. *J. Chromatography*, 3, 688, 239-243.
- Ryšková, M., Chroust, K., Benedík, J., Jowett, T. (1997). Genotoxicity of N-nitroso-N-methylurea and Acetone oxime in the transgenic *Drosophila* carrying the human gene encoding a subunit of Glutathione S-transferase. *Folia Biologica (Praha)*, 43, 19-24.
- Chroust, K., Jowett, T., Papoušková, I. (1997). Transgenic *Drosophila melanogaster* bearing human genes in environmental risk evaluation. *Mutat. Res.*, 379(1), S 160, P XVI B3.
- Chroust, K., Květ, R. (1998). A contribution towards the use of Pascal's triangle in genetics. *Folia Mendeliana*, 33-34, 11-16.
- Cibula, D., Paseka, J., Unzeitig, V., Hořejší, J., Rotta, L., Chroust, K. (2000). Prediction of the effect of the triphasic contraceptive containing Norgestimate on acne. *Ceska Gynekol.*, 65(2), 79-82.
- Chroust, K., Jowett, T., Farid-Wajidi, M.F., Huang, J.Z., Ryšková, M., Wolf, R., Holoubek, I. (2001) Activation or detoxification of mutagenic and carcinogenic compounds in transgenic *Drosophila* expressing human glutathione S-transferase. *Mutat. Res.* (přijato do tisku).

6. Cytogenetika

(P. Kuglík)

Laboratoř molekulární cytogenetiky je společným pracovištěm Katedry genetiky a molekulární biologie PřF MU v Brně a Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno – pracoviště Dětská nemocnice. Činnosť laboratoře je zaměřena na detekci strukturních i numerických chromozomových aberací v lidských buňkách pomocí molekulárně cytogenetických metod. Výzkumná činnost je zaměřena především na rozvoj a využití metod fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) a komparativní genomové hybridizace (CGH) v klinické genetice. Ve spolupráci s Oddělením lékařské genetiky a Oddělením dětské onkologie FN Brno je v laboratoři prováděno cílené vyšetření pro účely prenatální diagnostiky, postnatální cytogenetiky a onkocytogenetiky.

Spolupráce: Laboratoř molekulární biologie a patologie, Univerzita Bordeaux, Francie

Studenti DPS: Mgr. V. Holubová, Mgr. M. Procházková

Vybrané publikace:

- Relichová, J., Kuglík, P., Kozubek, S.: Effects of accelerated iron ions on the mutation distribution in *Arabidopsis thaliana* cells. In: Radiation Biology and its Application in Space Research. S. Kozubek and G. Horneck (Eds.), pp. 114-120, Kiramo 1995.
- Chroust, K., Kuglík, P., Relichová, J., Holoubek, I., Čáslavský, J., Veselská, R., Ryšková, M., Benedík, J.: *Drosophila melanogaster*, *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* short-term bioassays in genotoxicity evaluation of air and soil samples from sites surrounding two industrial factories in the Czech Republic. *Folia Biol. (Praha)* 43, 71-78, 1997.
- Jičínská, H. - Marek, J. - Bryšová, Věra - Gaillyová, Renata - Kuglík, Petr - Tláskal, T. - Litzman, Jiří - Tax, P. - Navrátil, J. *Delece chromozómu 22q11 u vrozených srdečních vad*. Československá pediatrie, Praha : Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, 11, 11, s. 659-664. ISSN 0069-2328. 1998.
- Kuglík, P., Václavík, P., Oltová, A., Popelínská, E., Wernerová, V.: The identification of supernumerary marker chromosomes in five patients by fluorescent *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 85, 39, 1999.
- Procházková, M., Kuglík, P., Štěrba, J.: Detection of prognostic genetic factors in neuroblastoma using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Cells*, J. Berger (Ed.), s. 111, Kopp, České Budějovice, 1999.
- Mlejnek, P., Kuglík, P.: Induction of apoptosis in HL-60 cells by N(6)-benzyladenosine. *J. Cell Biochem.* 77, 6–17, 2000.
- Hájek, R., Žáčková D., Penka M, Krahulcová E., Kořístek Z., Vinklárková., Adler J., Janovská E., Indrák K., Faber E., Doubek M., Kalbusay M., Oltová A., Kuglík P., Dvořáková D., Bourková L., Dušek L., Mareschová I., Mayer K., Vorlíček J.: Autologní transplantace s podáním interleukinem 2 aktivovaného štěpu periferních kmenových buněk nemocným s chronickou myeloidní leukémií. *Klin. Onkol.* 13, 5: 159-166, 2000.

Oddělení lékařské genetiky FN Brno, pracoviště Dětská nemocnice Černopolní 9, Brno

Oddělení lékařské genetiky (OLG) Fakultní nemocnice Brno má jedinečnou možnost rozvíjet vědecký obor v oblasti medicíny ve stejném městě, kde byly položeny i jeho základy.

V Brně se klinickou genetikou zabývalo nejdříve pracoviště Výzkumného ústavu pediatrického – dnešního Výzkumného ústavu zdraví dítěte a na tuto práci navázalo i nově vznikající pracoviště v Dětské nemocnici v roce 1978. Původně začíná pracovat jako malá genetická poradna s cytogenetickou laboratoří. Tehdy mělo oddělení 3 zaměstnance. Od té doby se pracoviště více než desetkrát rozšířilo a ve své činnosti obsahuje všechny oblasti klinické genetiky. Pracoviště prošlo několika stěhováním, vždy do dočasných a provizorních prostor, velkým zlomem a darem klinické genetiky v Brně je jistě její současné působiště v nově vybudované dostavbě Dětské nemocnice FN Brno, které bylo poprvé plánováno jako moderní genetické oddělení. Dnes má oddělení téměř 40 pracovníků, úzce spolupracuje s většinou klinických pracovišť nemocnice, ale i s mnoha dalšími zdravotnickými zařízeními, poskytuje své služby pacientům z oblasti celé jižní Moravy, v oblasti molekulárně genetických vyšetření i pro ostatní oblasti Moravy i celé ČR.

Pracoviště OLG zajišťuje výuku Klinické genetiky pro Lékařskou a Přírodovědeckou fakultu Masarykovy university v Brně, je školícím místem postgraduálního vzdělávání pro střední zdravotnické pracovníky z České republiky a podílí se i na výuce Klinické genetiky pro Jihočeskou universitu v Českých Budějovicích.

Současnou činnost OLG lze rozdělit na ambulantní a laboratorní část.

Genetická poradna poskytuje poradenství v rodinách s výskytem dědičných onemocnění, vrozených vývojových vad, chromozomových aberací, reprodukčních obtíží a dalších.

V genetické poradně je s rodinou plánována další strategie vyšetření, je formulována genetická prognóza a navržen postup dalších vyšetření v rodině a popřípadě další vyšetřovací postup v rámci prenatální diagnostiky.

V roce 2000 bylo provedeno v genetické poradně asi 13 000 konzultací.

Cytogenetické laboratoře

Vedle klasické cytogenetiky dnes narůstá počet specializovaných cytogenetických vyšetření.

Postnatální cytogenetická vyšetření

Postnatální cytogenetická laboratoř provádí stanovení karyotypu u lymfocytů periferní krve u pacientů s podezřením nebo zvýšeným rizikem výskytu vrozených chromozomových aberací, analýzu karyotypu u párů s poruchami reprodukce a dále provádí hodnocení získaných chromozomových aberací u pacientů s rizikem expozice mutagenům zevního prostředí, jakou může být práce s chemikáliemi a zářením nebo terapie cytostatiky a zářením v anamnéze.

Tato laboratoř se také podílí částečně na prenatální diagnostice vyšetřováním a hodnocením karyotypu plodů z fetální krve. Celkem se zde provádí asi 1 500 vyšetření ročně.

Prenatální cytogenetická vyšetření

Prenatální cytogenetická laboratoř zpracovává a vyšetřuje karyotyp plodů z buněk v plodové vodě, z buněk choria a placenty a z kožních fibroblastů. Tato laboratoř úzce spolupracuje s gynekologicko porodnickými pracovišti.

Počty vyšetření v této oblasti dosahují rovněž téměř 1500 vyšetření ročně.

Molekulární cytogenetika a onkocytogenetika

Molekulárně cytogenetická vyšetření zaznamenávají v posledních letech ohromný nárůst pro možnost diagnostiky specifických chromozomových změn pomocí molekulárně cytogenetických technik. Z těchto důvodů byla v roce 1998 založena specializovaná Laboratoř molekulární cytogenetiky jako společné pracoviště Katedry genetiky a molekulární biologie PřF MU a OLG FN. Vznikem této laboratoře vyvrcholila dlouhodobě úspěšná spolupráce mezi oběma genetickými pracovišti. Činnost laboratoře je zaměřena na analýzy strukturních i numerických chromozomových aberací v lidských buňkách pomocí techniky fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH). V laboratoři je též prováděna praktická výuka pregraduálních studentů magisterského oboru a studentů doktorského studijního programu oborů Genetika a Molekulární a buněčná biologie. Výzkumná činnost je zaměřena na rozvoj a využití metod fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) a komparativní genomové hybridizace (CGH) v klinické genetice.

V oblasti prenatalní diagnostiky umožňují molekulárně cytogenetické metody rychlou diagnostiku nejčastějších vrozených chromozomových aberací u vysoce rizikových těhotenství a při časové tísní. Nejvíce je toto vyšetření zaměřeno na trizomie chromozomů 21,13,18 a vyšetření sestavy a počtu gonozomů X a Y.

V postnatální cytogenetice provádíme s pomocí techniky FISH detekci mikrolečních syndromů jako je syndrom Di Georgeho způsobený mikrodelecí 22q11.2 a syndromy Prader-Williho a Angelmana, podmíněné mikrodelecí 15q11-q13 a další. Tyto submikroskopické změny nelze metodami klasické cytogenetiky identifikovat. Dále lze pomocí techniky FISH analyzovat původ nadbytečného genetického materiálu tzv. marker chromozomů, analyzovat složité chromosomové přestavby a na velkém počtu buněk upřesňovat nálezy cytogenetických mozaik.

Významnou oblastí použití metody FISH je onkocytogenetika. V této oblasti lze pomocí molekulární cytogenetiky odhalovat specifické změny chromozomů v buňkách periferní krve, kostní dřeně nebo nádoru jak u pacientů s onkohematologickým onemocněním tak u pacientů se solidními nádory.

Cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření zde má často význam prognostický, může mít důležitý přínos pro upřesnění diagnózy a volbu terapeutického protokolu nebo monitoruje minimální zbytkovou chorobu.

Ve spolupráci s klasickou onkocytogenetickou laboratoří OLG provádíme u pacientů s hematologickými chorobami detekci typických aneuploidií, detekci specifických translokací, inverzí, inzercí a delecí – tedy chromosomových změn, které se typicky vyskytují u jednotlivých typů maligních onemocnění a jejichž průkaz má pro další péči o pacienta mnohdy zásadní význam.

Pro pacienty se solidními nádory provádíme detekci genových amplifikací (N-myc, c-myc) a delecí.

Počet vyšetření v těchto laboratořích na roste každým rokem. V roce 2000 bylo na tomto úseku provedeno asi 400 vyšetření FISH, 450 vyšetření cytogenetických z periferní krve a kostní dřeně a provedena asi 50x kultivace nádorových buněk pro cytogenetickou analýzu. Meziroční nárůst je téměř 20-30%.

DNA diagnostika

Molekulárně genetická vyšetření se rozrůstají s pokrokem znalostí o lidském genomu téměř každým dnem. Laboratoř DNA diagnostiky na OLG za 10 let své činnosti zaujala přední místo mezi laboratořemi tohoto typu v ČR. Začínala v roce 1991, kdy bylo za rok provedeno asi 150 vyšetření a nyní se jsou počty vyšetření asi desetinásobné.

Laboratoř se specializovala původně na diagnostiku monogenně podmíněných onemocnění, v poslední době je ale výrazný posun i na oblast onkogenetickou, kde

molekulárně genetická vyšetření jsou důležitým přínosem pro upřesnění prognózy, ale i léčby onkologických pacientů.

Naše pracoviště se zabývá molekulárně genetickou diagnostikou Cystické fibrozy, Duchennovy/Beckerovy svalové dystrofie, Myotonické dystrofie, Neurofibromatosis I, Hemofilie A.

Ve spolupráci s I. Interní kardiologickou klinikou se podílíme na řešení grantového úkolu diagnostikou syndromu LQT na molekulární úrovni.

Pracoviště je referenční laboratoří pro Y chromozom. Ve spolupráci především s centrem asistované reprodukce I. ŽK se diagnostikují mikrolece v oblasti genu DAZ a další příčiny mužské sterility na molekulárním základě. U párů s opakovanými fetálními ztrátami se detekuje výskyt Leidenské mutace v genu pro faktor V.

Od roku 2000 se rozvíjí spolupráce s Oddělením dětské onkologie FN Brno.

Spektrum a šíře molekulárně genetických vyšetření se každoročně rozvíjí a rozšiřuje dle aktuálních potřeb, ale i možností pracoviště. Na pracovišti je vybudována DNA banka, ve spolupráci s dalšími laboratořemi u nás i v zahraničí zajišťujeme molekulárně genetická vyšetření pro rodiny pacientů s výskytem vzácných dědičných onemocnění, případně uchováváme materiál k vyšetření v budoucnosti.

Lékařská genetika představuje nesmírně perspektivní obor, který na základě zhodnocování současných poznatků molekulární biologie a genetiky stále více ovlivňuje moderní medicínu. Genetika a genetické poradenství má poskytovat pacientům s genetickým onemocněním a případně jejich příbuzným dostatek informací o charakteru jejich nemoci, o jejím průběhu a léčbě a především o výši rizika opakovaného výskytu stejného onemocnění v rodině. Má nabídnout možnosti a způsoby prevence daného onemocnění.

Je zřejmé, že geneticky podmíněné patologické stavy představují pro člověka velkou zátěž, jak pro svou morbiditu tak i mortalitu, ale i z celospolečenského hlediska. Jejich prevence je velmi důležitá a právě v ní je dosahováno značného pokroku.

Výsledky klinické genetiky nejsou pro pacienta stejné, jako v jiných medicínských oborech, ale spoluprací s dalšími specialisty by genetika měla přinášet pacientům nové možnosti léčby jejich zdravotních potíží.

Renata Gaillyová a Petr Kuglík

CO NOVÉHO V GENETICE

Výzkum a analýza genomu

(Úvod k diskusi o genomice)

Stanislav Zadražil

1. Úvod

Molekulární biologie a genetika a jejich rozvoj

Logický vývoj biologie směřoval historicky od anatomie a morfologie přes fyziologii k buněčné a molekulární biologii organismů. Úkolem molekulární biologie bylo a je zabývat se strukturou a funkcí biopolymerů a jejich interakcemi navzájem a s nízkomolekulárními ligandy, při vysvětlování základních životních dějů a procesů v buňce a organismu na molekulární úrovni. Mezi ně patří především reprodukce a růst, interakce s prostředím, dědičnost a proměnlivost a vztah fenotypu k genotypu. Za jádro molekulární biologie lze pak považovat molekulární genetiku, která se zaměřuje na uspořádání genetického materiálu v genomech, genovou expresi a její regulaci a na molekulární evoluci a mutagenesi.

Podle převládajícího tematického zaměření a používaných metodických přístupů, lze skutečnou molekulární biologii, datovanou od potvrzení genetické funkce DNA (1944–52) a objevení její základní struktury (1953), přibližně rozčlenit na tři následující období. Moderní molekulární biologie 40. a 50. let se věnovala nejvíce objasňování struktury, konformace a funkce nukleových kyselin a charakterizaci modelových organismů, včetně fágů, s využitím výsledků tehdejší fyziky, biochemie, fyzikální chemie, mikrobiologie a genetiky. Období genových manipulací a genomického inženýrství v 60. a 70. letech znamenalo postupně metodické osamostatňování molekulární biologie (molekulární hybridizace, klonování, separace a frakcionace informačních makromolekul) při podrobném studiu metabolismu nukleových kyselin a jeho enzymologie, rekombinace, přenosu genetického materiálu a odpovídající vektorové výbavy, s odhalováním rozdílů mezi prokaryotickou a eukaryotickou buňkou, zvláště na úrovni genové exprese. Molekulární biologie a genetika 80. a 90. let s převažujícím označením jako období genomové analýzy, se zabývala především studiem genomů na buněčné a subcelulární úrovni, založeném bezvýhradně na vlastní metodologii. Vývoj a užití rychlých sekvenačních metod DNA se staly nejdůležitějším základem a spolu s polymerasovou řetězovou reakcí (hlavní metoda klonování molekul DNA), s pulsní gelovou elektroforesou (separace velkých fragmentů DNA až celých malých chromosomů), se zavedením vektorů typu umělých chromosomů (YAC, PAC, BAC, TAC) a s různými technikami genetického a fyzikálního mapování a skládání fragmentů DNA do celistvých kontigů (dlouhá kontinuální sekvence přesahující většinou megabasovou úroveň) vytvořily podmínky pro sekvenování celých genomů bez ohledu na jejich velikost. A konečně uspořádané mikrosoubory DNA (cDNA microarrays) se stávají základem globálního pohledu na „živé“ genomy (genová exprese za různých podmínek).

V tomto období se také poprvé objevilo označení genomika pro tu část molekulární biologie zaměřenou na systematické sekvenování genomu, představujícího úplnou sadu genů v organismu, resp. organele (např. jaderný, mitochondriový a plastidový genom). Bezprostředně potom následovaly jazykové ekvivalenty pro popis dalších obdobných předmětů studia – proteomu (soubor všech p roteínů exprimovatelných a modifikovaných

genomem v průběhu života buňky), transkriptom (obdobný komplement mRNA) atd., t.j. proteomika, transkriptomika, ale i poněkud absurdní pokusy s fenomikou (automatická funkční analýza proteinů zajišťující ch fenotyp) až operomikou (molekulární analýza celé buňky – t.j. DNA, RNA a proteinů). Genomika a proteomika se již dostatečně vžily (i na úrovni časopisů a monografií) a jsou přijímány jako stručné názvy pro samostatné oblasti molekulární biologie a genetiky (či pro samostatné obory?) a nejsou tedy vnímány jako zbytečné komplikace (jak S. Brenner s určitou nadsázkou p řiznává přirovnáním této terminologie k astronomii /genonomie/ s kosmologií a astrologií /genologie/ při pokusu odpovídat stále na otázku zda lze budoucnost člověka číst z jeho genů).

2. Genomika

Nástup a rozvoj genomové analýzy

Genomika jako “nový biologický obor“ nastupuje v roce 1995, kdy jsou publikovány první genomy mikroorganismů, jejichž studium bylo zahrnuto do p rojektů zahájenýc h koncem 80. let. Struktura a uspořádání genomu, jehož velikost se pohybuje nad hranicí jedné megabase, jsou výsledkem vývoje za dobu 4,5 miliardy let, po kterou byla zpracovávána genetická informace organismu (transposibilní elementy a restričně -modifikační systémy, repetitivní tandemové a rozptýlené sekvence, genová duplikace, cis a trans sestřih a tvorba operonů, využitelnost kodonů, horizontální přenos a míchání genů, expanse a degradace genomů, evoluce genomů organel). Výsledkem této evoluce je vysoká specifita sekvence genomů, která se projevuje v rozmanitosti organismů.

Zahájení genomové analýzy bylo vázáno na objevení nových metod sekvenování DNA s vysokou rozlišovací schopností. Technickým základem byly biosyntetické sekvenční metody F. Sangera (dvojnásobný nositel Nobelovy ceny z anglické Cambridge) ze začátku 70. let, které měly vysoký užitný potenciál díky aplikaci vektorů M13 a možnosti automatizace (ABI PRISM 3700 DNA Analyzer z PE Biosystem) a počítačového zpracování. Principiálně stejná sekvenční metoda je používána dodnes pro všechny genomy různé velikosti. Na počátku 80. let, v období kilobasového sekvenování, byla dostatečně ověřena použitelnost a spolehlivost metody při sekvenování plasmidů (pBR322), fágových (ϕ X174, lambda) a virových (SV40, Epstein a Barrové, vakcinie) genomů a prvních chromosomů (chr. III a XI kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v letech 1992-94).

Nejdůležitější součástí genomového sekvenování se tak dále stává volba základní strategie, která určuje možnost buď postupného uspořádaného sekvenování sady subfragmentů, které se vzájemně doplňují (vychází většinou z přístupu „shora dolů“ od větších molekul, s využitím mapování používajícího různých markerů), nebo sekvenování souboru náhodných fragmentů (nejčastěji přístup „zdola nahoru“ a skládání menších molekul do souvislého kontigu). Některé z mapovacích a selekčních metod umožňujících hledání souvislosti mezi analyzovanými fragmenty pro tvorbu kontigů jsou

- procházka pro chromosomu (chromosome walking)
- skákání po chromosomu na určitou vzdálenost (chromosome jumping)
- použití spojovacího primeru (primer walking)
- porovnávání fragmentových fingerprintů (cosmid fingerprinting)
- binární systém hybridizace s náhodnými oligonukleotidy
- použití markerů se sekvenční adresou (sequence tagged site – STS)
- exprimovatelné sekvenční markery cDNA (expressed sequence tags –ESTs)
- řazení fragmentů p odle polohy v radiačním hybridu (X -ozářené lidské buňky fusované s buňkami křeččími)
- a konečně sekvenčně označené spojky (sequence tagged connectors – STC).

Většina z nich umožňuje jednoduchou, často však pomalou analýzu či mapování fragmentu genomu, s výjimkou STC metody, která je aplikovatelná na libovolný genom bez jakékoliv předběžné charakterizace a byla ověřena právě na prvních bakteriálních genomech.

Zkušenosti s aplikací všech dosavadních přístupů k analýze genomů nakonec vedly ke dvěma současným základním strategiím sekvenování, z nichž první je t. zv. strategie řízeného sekvenování, založená na restričním mapování a subklonování DNA ve zvolených vektorech (kosmid, YAC, BAC) se závěrečnou analýzou restričních míst a překryvů. Druhá strategie zahrnuje zcela náhodnou generaci fragmentů z celého genomu (shotgun) a přímou analýzu relativně malých úseků DNA v sekvenčním vektoru. Po opakování a kovaném získávání shodných výsledků je analýza ukončena a fragmenty jsou skládány pomocí složitých počítačových programů do primárních kontigů. Rozdíl mezi oběma metodami je zřejmý. První je „rovnovážná“, na každém stupni si zachovává přehled o postupu sekvenování, druhá je velmi rychlá co do získávání dílčích sekvenčních informací, ale závislá na jejich komplikovaném a dlouhodobém počítačovém zpracování, které vede ke kompletaci celé primární struktury DNA. Obě metody jsou až dosud používány často s postupující preferencí druhé, v některých projektech dokonce současně.

3. Projekt lidského genomu

HGP a asociované projekty modelových organismů

Po získání kontinuálních kilobasových sekvencí na úrovni menších kvasinkových chromosomů (315358 pb a 666448 pb pro chr. III resp. XI *S. cerevisiae*) se zdála být logickou následná analýza bakteriálních genomů (několik megabází), zvláště když *E. coli* a *B. subtilis* představovaly dosud nejlépe prostudované mikroorganismy, používané jako základní modelové organismy. Toto očekávání se nesplnilo a v roce 1985 již začalo, na úrovni DoE vlády USA, jednání o nejmambicióznějším mezinárodním projektu biologie vůbec, srovnatelném jen s největšími projekty atomové fyziky a kosmického výzkumu, sekvenování celého lidského genomu. V roce 1987 byla získána první finanční podpora od DoE a k projektu přistoupily NIH (National Center for Human Genome Research – NCHGR) pod vedením J. Watsona.

Předběžný projekt měl tři hlavní cíle – vytvoření genetické mapy s rozlišovací schopností menší než 1cM (s rokem ukončení 1995) a fyzikální mapy (1997) a získání úplné sekvence genomu s 3,2 Gb (2003). Z toho vyplynulo, že hlavní strategií projektu bylo nejprve mapování a potom řízené sekvenování, postup jasně vedoucí ke snížení počtu chyb, zvláště v oblastech repetitivních sekvencí. Za první část se staly odpovědnými pařížské centrum pro studium lidského polymorfismu a Génethon, které svůj úkol včas splnily. Byly tak vytvořeny, mimo jiné, podmínky pro rozvoj studia dědičných chorob člověka (především monogenních), což byl i počáteční původní záměr celého projektu a k němuž směřovaly i uvedené cíle. Fyzikální mapování, realizované pokrytím celého genomu BAC klony (postupně „fingerprintováním“ genomové BAC knihovny a spojováním klonů do 1246 kontigů) bylo provedeno mezinárodním konsorciem pro mapování lidského genomu a významně přispělo ke „správnému uspořádání konečné hrubé verze genomu“.

Projekt však kromě cíleného experimentálního zaměření zahrnoval i další oblasti činnosti, které byly povinně zařazeny do rozpočtu a za jejichž rozvoj byl zodpovědný. Patřily sem i identifikace a funkce nalezených genů (z počátku na základě strukturních vlastností a zvláštností sekvence – hlavně počítačový přístup a později na základě speciálních a sofistikovaných metodických přístupů – technologie microarrays, vedoucích k rozvoji funkční a srovnávací genomiky a proteomiky). Dále se projekt musel zaměřit na soustavný zájem o rozvoj a přenos základních technologií (kapacita a automatizace sekvenování, vytváření

nových center se školenými pracovníky) a bioinformatiky (rozšiřování veřejných databází, vývoj softwaru a zavedení srovnávací genomiky), zabezpečování zveřejnění a volného přístupu k výsledkům a jako rovnocenná oblast na sledování etických, právních a sociálních důsledků a společenských dopadů řešení projektu. Mimořádný význam však mělo i zaměření na „přidružené“ mezinárodní projekty genomové analýzy vybraných modelových organismů, které mělo pomoci naplňovat a ověřovat postup ve shora uvedeném programu. Samozřejmě, že vznikaly i samostatné projekty, které se s HGP jen doplňovaly a ve smyslu programu se více méně ovlivňovaly.

Mezi modelové organismy byly ze známých důvodů zařazeny *E. coli* (4,5 Mb), *S. cerevisiae* (12 Mb), *Caenorhabditis elegans* (97 Mb), *Drosophila melanogaster* (137 Mb), *Arabidopsis thaliana* (119 Mb) a *Mus musculus* (3000 Mb). Výběr modelových organismů na první pohled splňuje kritéria vhodnosti pro základní výzkum, ale neodpovídá příliš původnímu záměru zabývat se spíše patologickými stavy a jim odpovídajícími genomy. To však bylo později bohatě vynahrazeno, když hned první dva bakteriální genomy vůbec (1995), na kterých se ověřovala nová strategie STC sekvenování (z pracoviště The Institute of Genome Research – TIGR) byly *Haemophilus influenzae* (nejčastější patogen člověka) a *Mycoplasma genitalium* (striktní parazit). Stejně tak byla v průběhu řešení „vyčítána“ projektu přílišná ambicióznost projevující se právě v retardaci obecné i patogenní mikrobiální genomiky, případně analýzy genomu myši (jako vhodného savčího modelu), způsobené prioritou HGP ve financování přesto, že bezprostředně využitelné výsledky lze očekávat právě z asociovaných či samostatných projektů mikrobiální oblasti. Zatím se to však plně nepotvrdilo.

Uvedený TIGR, jako první privátní neziskové centrum pro genomovou analýzu (později přeměněný na ziskovou organizaci Celera), začal již v roce 1992 vnášet do této oblasti prvky, které neodpovídaly plně programu a zásadám HGP, např. patentování ESTs sekvencí, a vyvolal tak roztržku s J. Watsonem, kterého pak nahradil F. Collins, jenž dovedl projekt až do ukončení hrubého nárysu genomu v červnu 2000 (83% celého genomu s 3,2 Gb) a k jeho zveřejnění 15. února t.r. I to bylo kompromisní řešení mezi týmy Collinse (NCHGR) a Ventera (TIGR-Celera), které používaly pro analýzu první, resp. druhou zmíněnou základní strategii pro sekvenování velkých genomů. Podrobná úplná analýza má být ukončena k původně předpokládanému termínu v roce 2003 a není zcela zřejmé, zda k ní přispěje i možnost detailního porovnání obou existujících hrubých sekvencí, jelikož Celera neposkytuje všechny informace veřejně.

4. Příklady analyzovaných genomů a jejich přínos

Za pět let skutečné existence genomiky bylo analyzováno a zveřejněno několik desítek genomů ze všech říší organismů (tří forem života) – bakterie (31), archea (9) a eukarya (5), k jejichž přesnějšímu členění právě genomová analýza nemálo přispěla. Následující seznam, zdaleka ne vyčerpávající, uvádí časový přehled některých zveřejněných genomů s uvedením jejich velikosti (kb resp. Mb) a počtu stanovených otevřených čtecích rámců (ORF), které většinou nahrazují označení gen.

BAKTERIA	kb	ORF	rok
<i>Haemophilus influenzae</i> KW20	1830	1850	1995
<i>Mycoplasma genitalium</i> G-37	580	468	1995
<i>Synechocystis</i> sp.PCC 6803	3573	3168	1996
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129	816	677	1996
<i>Escherichia coli</i> K12-MG1655	4639	4289	1997
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	1667	1590	1997
<i>Bacillus subtilis</i> 168	4214	4099	1997
<i>Borrelia burgdorferi</i> B3	1230	1256	1997
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	4411	3959	1998
<i>Aquifex aelicus</i>	1551	1544	1998
<i>Treponema pallidum</i> Nichols	1138	1041	1998
<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar D	1042	896	1998
<i>Rickettsia prowazekii</i> Madrid E	1111	834	1998
<i>Helicobacter pylori</i> J99	1643	1495	1999
<i>Chlamydia pneumoniae</i> CWL029	1236	1052	1999
<i>Thermotoga naritima</i> MSB8	1860	1877	1999
<i>Deinococcus radiodurans</i> RI	3284	3187	1999
<i>Vibrio cholerae</i> El Tor N16961	4033	3885	2000
<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	1641	2106	2000
<i>Chlamydia pneumoniae</i> AR39	1229	1052	2000
<i>Chlamydia trachomatis</i> MoPn Nigg	1069	924	2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	6264	5570	2000
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	2184	2121	2000
<i>Xylella fastidiosa</i>	2679	2904	2000
<i>E. coli</i> 0157:H7 EDL933	4100	(K12+1387)	2001
<i>Mycobacterium leprae</i>	3268	~2000	2001
ARCHAEA			
<i>Methanococcus jannaschii</i> DSM 2661	1664	1750	1996
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> delta H	1751	1918	1997
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4303	2178	2493	1997
<i>Pyrococcus horikoshii</i> (shinkaj)	1738	1979	1998
<i>Aeropyrum pernix</i> K1	1669	2620	1999
<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	1765	1765	-
EUKARYOTA			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	12,07	6294	1997
<i>Caenorhabditis elegans</i>	97,00	19099	1998
<i>Drosophila melanogaster</i>	137,00	14100	2000
<i>Arabidopsis thaliana</i>	115,40	25498	2000
Lidský genom (Collins)	2693(84%)	31780	2001
Lidský genom (Venter)	2654(83%)	39114	2001

Tyto analýzy totiž zdaleka neznamenají plnou identifikaci či anotaci genu, přibližně 30 -50% stanovených ORF zůstává nepoznaných a jejich počet je pozitivně závislý jak na velikosti genomu, tak na možných zvláštnostech životních podmínek organismu (30-40% ORF u jednotlivých genomů může být jedinečných, bez jakékoli podobnosti s geny jiných organismů).

Zatímco prokaryotické genomy byly sekvenovány úplně a poskytly optimální možnost ke stanovení počtu ORF (v průměru 1 kb na ORF), u eukaryot s velmi rozdílnou velikostí genomu byly většinou zveřejněny pouze hrubé sekvence postrádající informaci o určité části genomu (7% u *S. cerevisiae*, 1% u *C. elegans*, 36% u *D. melanogaster* 1,8% u *A. thaliana* a 16-17% u *H. sapiens*). Jedná se však do značné míry o oblasti se zvláštními, obtížně stanovitelnými sekvencemi (např. vysoce repetitivní oblasti) s vyloučením či nepatrným počtem genů, takže celkový počet genů nebude, po dokončení analýzy, výrazně ovlivněn. Hustota genů se tu značně liší – od 2 kb u kvasinky, přes 5 kb u *C. elegans* a *A. thaliana* a 9 kb u *D. melanogaster* až k 67-83 kb u *H. sapiens* na jeden ORF. Počty ORF či genů jsou tu však pro srovnávání nejméně vhodné, protože jejich počet byl „vypočítáván“ různými způsoby a je třeba vyčkat na větší počet analyzovaných eukaryotických genomů a na ověření identifikovaných ORF experimentálními přístupy v genomové expresi. Počet mRNA a proteinů z jednoho genu však může být velmi různý.

Téměř každý nový genom, i když se jedná např. „jen“ o další bakterii či kmen téhož druhu, přináší stále nové a zajímavé informace o svém uspořádání a expresním systému a jistě tomu nebude jinak ani v budoucnu. Kromě obecných otázek, které jsou většinou vázány k evoluci organismů a které nemohou být jednoznačně zodpovězeny (minimální obsah genů v genomu pro samostatný život, expanse či redukce mikrobiálních genomů s velikostí v rozmezí 0,6-6,3 Mb, existence posledního společného předka, vznik eukaryotické buňky apod.), dochází i ke konkrétním potvrzením či objevu nových, někdy značně překvapivých poznatků. Porovnáním genomů prokaryot dochází často k průkazu horizontálního přenosu genů a míchání genů u zástupců eubakterií a archei. Stejně procesy jasně probíhají i u eukaryot nebo přes hranice říší.

Genomová analýza *Methanococcus janaschii* potvrdila intermediární postavení archei mezi bakteriemi a eukaryoty. Má typicky bakteriální chromosom, geny bez intronů a jejich operonové uspořádání. Sekvence genů jsou však smíšené – u základního metabolismu a buněčného dělení bakteriální a u procesů informační exprese eukaryotické. Striktní parazit *Mycoplasma genitalium* postrádá mnoho genů pro základní metabolismus, ale má značně zmnožené geny pro adhesiny, zajišťující zachycení buněk v hostitelské tkáni. *Helicobacter pylori*, původce žaludečních vředů, má geneticky podmíněnou simulaci antigenů krevních skupin a hlavní antigenní aktivitu ureasy přispívající k přežití v prostředí žaludku. Původce lymfské boreliózy, extracelulární patogenní spirocheta *Borrelia burgdorferi* má lineární genom s až 17 lineárními a cirkulárními plasmidy (dohromady odpovídají asi 60% hlavního genomu a obsahují 430 ORF většinou paralogů k hlavnímu genomu) vždy v poměru 1:1 a s možností kodování virulentních proteinů. Dva cirkulární plasmidy tvořící nezbytný doplněk genomu (kodují např. 5 histonů) byly nalezeny i u *M. janaschii*. Možná se jedná o „zárodek fragmentovaného genomu“, jenž byl potvrzen u *Vibrio cholerae*, obsahujícího dva cirkulární chromosomy s výraznou specializací funkcí obsažených genů (pro růst a virulenci).

Genom nejnámější gram pozitivní bakterie *B. subtilis* je charakteristický expandí rodin paralogů, což se projevuje i v regulaci genomové exprese, využívající až 18 sigma faktorů spíše pro malé skupiny genů. 26% jeho ORF nemá žádnou zřetelnou podobnost s geny dalších genomů, což je spíše průměrná frakce jedinečných ORF (hraniční hodnoty 8% a 45% pocházejí od *Chlamydia trachomatis* resp. *Synechocystis sp.*).

Patogenní kmeny *E. coli* O157:H7, vyvolávající hemorhagické kolitidy a hemolytický uremický syndrom, se při porovnávání s laboratorním kmenem K12 navzájem liší přítomností

ostrovů K (u K12) a O (u O157:H7), které se vzájemně vylučují. Za vznik jsou odpovědné inserce a delece při zachování více méně původní délky s 528 resp. 1387 jedinečnými geny v K resp. O. Některé O ostrovy obsahují geny pro toxiny a tvorbu adhesivních fimbrií, zřejmě zodpovědných za patogenitu a virulenci. Většina DNA těchto ostrovů mohla být získána horizontálním přenosem, popřípadě i delecí části genomu společného předchůdce obou kmenů. Příklad ukazuje potenciál podrobných srovnávacích studií velmi příbuzných kmenů a druhů, které nové výsledky genomiky umožňují.

Genom intracelulárního obligátního parazita *Rickettsia prowazekii* vzbudil velký zájem nejen jako původce tyfu popřípadě i o vši, ale především evoluční příbuzností s mitochondriemi a tedy vývojem eukaryot. Jeho genom prodělal redukci velikosti (1112 kb) i počtu ORF (834) jako důsledek popřípadě i závislého života parazita. Přesto má dosud 10krát více genů než mitochondriový genom a má i nejvíce nekodující DNA (24%) ze všech bakteriálních genomů – geny inaktivované mutacemi nebyly zřejmě z genomu dosud odstraněny.

Podobně bychom mohli pokračovat příklady spojenými s genomy patogenních *Mycobacterium tuberculosis* a *M. leprae* (s nejdělsí růstovou dobou zdvojení ze všech bakterií a redukční evolucí genomu). *Xylella fastidiosa* (pathogen citrusových rostlin, jehož genom byl sekvenován výhradně brazilským konsorciem), *Neisseria meningitidis* (nebezpečný lidský pathogen), *Pseudomonas aeruginosa* (velmi rozšířená bakterie vyvolávající oportunistické infekce u člověka; dosud s největším sekvenovaným genomem bakterií a s vysokým počtem regulačních genů), *Aquiflex aeolicus* (jedna z nejthermofilnějších bakterií) atd.

Nedávno publikované dvě verze hrubé sekvence lidského genomu (mezinárodní konsorcium pro sekvenování lidského genomu vedené F. Collinsem – Nature a společnost Celera vedená C. Venterem) prvního obratlovce a savce, následovaly krátce po zveřejnění předcházejících genomů *A. thaliana* (první rostlina – 2000) a *D. melanogaster* (2000) a přibližně 2 roky po zveřejnění prvního živočišného genomu *C. elegans* (1998). Intermediární místo mezi prokaryoty a těmito genomy tu popřípadě zaujímá první analyzovaný eukaryotický genom kvasinky *S. cerevisiae*, který byl ukončen již v roce 1997. Jejich dosavadní největší význam spočívá ve srovnávacích studiích popřípadě o kvalitu stanovených genů a z toho vyplývajících otázek o evoluci organismu a její genetické determinaci.

U genomu *S. cerevisiae*, složeného ze 16 chromosomů, bylo největším překvapením objevení 53 duplikací rozsáhlých genových shluků, které jsou lokalizovány na všech chromosomech. Ukázalo to na pravděpodobnou obecnou strategii komplexních organismů vytvářet genové rodiny a zajišťovat důležité životní funkce na úrovni paralogů. Později to bylo potvrzeno analýzou dalších genomů, z nichž např. evoluce genomu *A. thaliana* představuje postupnou úpravu úpravy duplikátu (výsledek popřípadě ployploidizace a duplikace genů v různých lokalitách genomu. Současný genom je duplikován z 58% (65,8 Mb) ve 24 segmentech o velikosti minimálně 100 kb. Různé, zvláště multicelulární organismy takto divergují expanzí či ztrátou určitých proteinových rodin, existenčně závislých na kodujících schopnostech upravovaného genomu.

Z přibližně 26 tisíc genů *A. thaliana* je jen 15 tisíc jedinečných a to je jen o málo více než počet genů *D. melanogaster*, ale méně než 19 tisíc genů *C. elegans*. Většina genů *A. thaliana* je součástí obou živočišných genomů, což je potvrzením existence společného předka rostlin a živočichů. Diskrepance v počtu genů a komplexitě organismů je tedy zřejmě dána principem spojování genů do „sítí“ a uplatňování jejich popřípadě ve složitých regulačních a signálních drahách, jejichž složitost právě rozhoduje o komplexitě organismu, snad popřípadě podle hesla „méně bývá někdy více“ (platí o počtu genů). Rozhodující odpověď v tomto směru poskytnou až výsledky proteomiky o úloze individuálních proteinů (často několika odvozených od jediného genu) všech porovnávaných organismů, které

s konečnou platností rozhodnou o strukturní a biochemické diversitě druhů, jakož i o průběhu evolučních změn genů, které tuto diversitu vyvolávají.

Do tohoto obrazu dobře zapadá i obdobné hodnocení hrubé sekvenční lidského genomu, které směřuje k počtu genů v rozmezí 30 až 45 tisíc, tedy pod minimální hranici očekávaných 50 až 100 tisíc. I v evoluci obratlovců se třeba předpokládá, že před 500 miliony let proběhly dvě duplikace celého genomu, což je podporováno skutečností, že mnoho genů člověka se vyskytuje jako skupina 4 homologů (např. čtyři HOX genové shluky na chromosomech 2, 7, 12 a 17). Přesnější potvrzení však dosud neexistuje.

Přesto, že analýza tohoto genomu bude ještě dále upřesňována, lze již teď na základě získaných informací uvést některé podrobnosti, které upřesňují naše poznatky. Distribuce a lokalizace základních charakteristik sekvenční (kodující oblasti, obsah GC, výskyt CpG ostrovů a frekvence rekombinace) se výrazně podél genomu mění. Určitý počet lidských genů (stovky?) byl získán horizontálním přenosem z bakterií na určitém stupni vývoje obratlovců a menší množství (desítky?) pochází z transpozibilních elementů, zatímco polovina celého genomu je z nich odvozena (jejich celková aktivita se však u hominidů postupně ztrácí a DNA transposony a LTR retrotransposony jsou inaktivovány úplně). Pericentromerické a subtelomerické oblasti chromosomů obsahují „nedávné“ duplikace sekvenčních segmentů z různých částí genomu a tato duplikace je mnohem častější než u kvasinkového a obou živočišných, dosud analyzovaných genomů. Specifické Alu repetice jsou pravidelně lokalizovány v GC-bohatých oblastech genomu a jsou pro hostitele výhodné (selekční mechanismus je dosud neznámý). Cytogenetická analýza sekvenovaných klonů potvrdila shodu dlouhých sekvencí chudých na GC s tmavými G pruhy karyotypu. Meiotické mutace jsou asi 2krát častější u mužů než u žen a rekombinační rychlost je značně vyšší ve vzdálených oblastech kratších ramen chromosomů (asi 20 kb); rekombinace při tom probíhá alespoň jednou v každé meiose. A konečně, v lidském genomu bylo identifikováno více než 1,4 miliony jednonukleotidových polymorfismů (SNPs), které jsou zodpovědné za fenotypovou variabilitu v populaci (ovlivnění individuálních antropometrických charakteristik, rizika onemocnění a reakce prostředí). Mapa SNPs, v níž jsou zahrnuty i popisované geny a jiné vlastnosti genomu, usnadní posílení klonování a identifikaci odpovědných genů důležitých pro diagnostiku a terapii.

Tyto příklady ukazují, jak účinná je genomová sekvenční informace a jak podrobně a v jakých směrech může ovlivnit nejen aktivitu a kreativitu v základním výzkumu, ale i řešení konkrétních úkolů v mnoha biologických oborech, zvláště v biomedicině.

5. Závěr

Není jistě náhodné, že hrubá sekvenční lidského genomu byla zveřejněna na přelomu 20. a 21. století, přesně 100 let od znovuobjevení Mendelových zákonů a téměř 50 let po odhalení dvoušroubovicové struktury DNA. Není to jasný doklad toho, že 20. století je opravdovým stoletím genetiky? I když nejdůležitější aktivity pro rozvoj genetiky jsou časově rozděleny velmi nerovnoměrně, lze charakterizovat jednotlivá čtvrtstoletí jako období chromosomů (buněčný základ dědičnosti), dvoušroubovice DNA (molekulární základ dědičnosti), mechanismu čtení genové informace a zavedení technologie rekombinantní DNA (informační základ dědičnosti) a odhalení primární struktury jednotlivých genů a genomů (genomový základ dědičnosti). Pokračováním této cesty bude postup od sekvenční k funkci genomu, charakterizovaný přesnou anotací všech genů a jejich vzájemných vztahů. V rámci genomiky, převážně strukturní (což znamená i návrat ke konformační analýze a její rozšíření) budou sekvenovány další modelové genomy (myš, potkan, zebříčka, rýže, atd.). Funkční charakteristiky genomů budou so učásti stále více se rozvíjející oblasti funkční a srovnávací

genomiky na hranici s proteomikou. Samozřejmě, že bude na zřeteli stále více i původní cíl HGP objasňovat molekulární mechanismy nemocí a zasahovat více i genovou terapii a preventivní medicínu. Stále bude co objevovat a řešit, ať již pod názvem molekulární biologie a genetika, genomika, proteomika nebo biomedicina.

Poznámka: tento stručný, heslovitý a značně zjednodušující text je určen především k vyvolání čtenářské odezvy ve formě dalších diskusních i kritických a polemických příspěvků, které budou postupně uveřejňovány.

Literatura: k dalšímu, značně náročnějšímu čtení lze nejlépe využít běžná a především specializovaná čísla časopisu *Nature*, *Science*, *Current Opinion in Genetics and Development* (věnovaná genomice) a internetových stránek, na něž je v této literatuře odkazováno. Seznam může být dodán autorem, který rovněž z těchto zdrojů čerpal.

MYOTONICKÁ DYSTROFIE A TRINUKLEOTIDOVÉ EXPANZE

Martin Falk

(student Doktorského studijního programu biologie, oboru Genetika na PřF MU v Brně)

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

9835@mail.muni.cz

ÚVOD DO PROBLEMATIKY NESTABILNÍCH REPETIC

S prohloubením poznání sekvence lidského genomu během 90. let došlo k bouřlivému rozvoji humánní genetiky a objevu nových mutačních mechanismů, projevujících se expanzemi základního motivu repetitivních sekvencí. Jejich kauzální role se dotýká stále rostoucího množství závažných chorob, zejména neurodegenerativního a neuromuskulárního charakteru (Pekařík, Tvrdíková, 1998). Jejich klinický obraz je často značně variabilní a jednotlivé příznaky se vyskytují paralelně u mnoha z nich a diagnostika, založená pouze na fenotypu pacienta bývá značně obtížná. Po objasnění molekulární podstaty těchto patologických stavů je kladen značný důraz na zavedení metod umožňujících jednoznačnou diferenční diagnostiku.

Před rozvojem molekulární biologie plnila diagnostickou úlohu imunohistochemická a morfometrická analýza svalové tkáně. Dnes, kdy je již možné detegovat kauzální mutace genů u stále rostoucího počtu patologických stavů, nabývají stále většího významu molekulární metody DNA diagnostiky. Současný stav vědomostí týkajících se expanzivních mutací zejména trinukleotidových repetitivních sekvencí je nastíněn v následujícím textu.

1. Trinukleotidové repetice

Po celém lidském genomu jsou široce rozptýleny tzv. STR (*Short Tandem Repeats*), krátké repetitivní sekvence tvořené opakujícím se dvou až šesti nukleotidovým motivem (Plassart, Fontaine, 1994; Watkins, 1995; Gordenin, Kunkel, Resnick, 1997), známé též jako mikrosatelity. Vyskytují se přibližně jednou na každých 30 kb (Watkins et al., 1995), přičemž TR (trinukleotidové repetice) se objevují zhruba po každých 300 až 500 kb (Plassart, Fontaine, 1994; Timchenko et al., 1996). TR se však na rozdíl od ostatních mikrosatelitů vyskytují nejen v intronech, ale i uvnitř otevřených čtecích rámců (ORF), a to jak v překládaných, tak i v prepisovaných ale nepřekládaných tzv. UTR -oblastech (*untranslated region*) genů (Watkins et al., 1995). STR se nevyskytují pouze v genomu člověka, nýbrž obecně u všech organismů, často v homologických genech. Počet opakování v repetici se však mezi druhy může lišit (Rubinsztein et al., 1994) a kolísá i mezi jedinci téhož druhu (Plassart, Fontaine, 1994). To vede k vysokému stupni polymorfismu a heterozygotnosti STR-lokusů v populaci. Díky těmto vlastnostem byly STR-sekvence již dříve široce využívány jako markery při genetickém mapování, určování evolučních vztahů mezi organismy a jejich populacemi, paternitních sporech a identifikaci jedinců v soudním lékařství, v humánní medicíně při testování shody transplantátů, v onkologii atd. Značnou pozornost však na sebe TR upoutaly poté, co byl prokázán mutační mechanismus vedoucí k jejich expanzím (TRE – Triplet Repeat Expansions), v souvislosti s velice závažnými patologickými stavy člověka (Timchenko et al., 1996). Díky zvláštnímu genetickému chování a zejména závažnosti asociovaných, často fatálních chorob, staly se TRE „žhavým“ tématem nejen klinické genetiky, ale i základního výzkumu.

Velmi zajímavé je, že byt' byly tyto repetice nalezeny i u jiných organismů, expanze a s nimi spojené chorobné stavy nebyly mimo lidský genom detegovány a jsou tedy charakteristické pouze pro člověka (Plassart, Fontaine, 1996).

2. Genetická nestabilita trinukleotidových repetitiv, patologické stavy způsobené jejich expanzí

Typickým rysem trinukleotidových repetitiv, kterým se od stabilně děděných mikrosatelitů liší, je jejich nestabilita a z ní plynoucí patogenní potenciál. Pokud není překročena fyziologická hranice počtu trinukleotidů v repetitiv, řídí se dědičnost klasickými Mendelovskými principy (Harris et al., 1996). Překročí-li však počet trinukleotidů v repetitiv kritickou mez, dochází během přenosu destabilizované alely na potomstvo k délkovým změnám repetitive, zejména k jejímu prodlužování, vedoucímu k patologickému projevu genu (Tapscott et al., 1998, Harris et al., 1996). Jelikož s každou mutací vedoucí k expanzi TR roste pravděpodobnost další expanzivní mutace, byl tento genetický, teprve nedávno objevený fenomén, nazván jako dynamické mutace (*dynamic mutations, mutable mutations*) (Brook et al., 1992; Fu et al., 1992; Jansen et al., 1994; Shutler et al., 1994).

TRE zodpovědné za patologické stavy se podařilo prokázat na mnoha lidských chromosomech a v současné době je minimálně třináct chorob a pět fragilních míst spojováno s těmito expanzími (tab. 1, tab. 2). Tento stav není pravděpodobně konečný a je známo již mnoho dalších chorob, jejichž příčina by také mohla spočívat v expanzích trinukleotidů (Margolis et al., 1997).

TR jsou velmi starobylou konzervativní součástí genomu organismů a patrně zastávají nějakou důležitou úlohu v regulaci genové exprese a možná i jiných procesů jako např. rekombinace, signalizace pro DNA vazebné proteiny, genovou konverzi a dalších (Mitas et al., 1995). Jejich přesná funkce je však doposud neznámá. Přenos alel s fyziologickým počtem trinukleotidů probíhá dle Mendelových zákonů (Harris et al., 1996). Dojde-li však u člověka k mutaci, díky které jejich počet překročí fyziologickou hranici, rostoucí nestabilita predisponuje alelu k dalším mutacím během přenosu genetické informace z rodičů na potomky a dědičnost přestává odpovídat Mendelovým pravidlům (Harris et al., 1996; Tapscott et al., 1998). Mutabilita je totiž funkcí velikosti expanze, přičemž nestabilita alely pozitivně koreluje s velikostí expanze (Gacy et al., 1995; Samadashwily et al., 1997; Lia et al., 1998;). Nositelé alel s počtem opakování mírně nad fyziologickou hodnotou tzv. premutace (též protomutace) jsou většinou asymptomatictí, nebo jen velmi mírně postižení, u jejich potomků se však může choroba plně exprimovat vzhledem ke zvýšení počtu trinukleotidů v nestabilní repetitivní sekvenci. Posloupnost, asymptomatický nebo minimálně postižený prarodič, rodič s mírným, avšak zřetelným klinickým projevem a potomek s velice těžkým průběhem choroby, je pro patologické stavy způsobené TRE charakteristická. Toto zhoršování klinického projevu s následnými generacemi a snižování věku postiženého se nazývá anticipace (obr. 1) (Ashizawa et al., 1994; Jansen et al., 1994). Progrese TRED v následujících generacích (*Triplet Repeat Expansion Diseases*) byla po dlouhou dobu naprostou záhadou a teprve v posledním desetiletí, kdy byla objevena korelace mezi počtem trinukleotidů, závažností choroby a věkem exprese prvních příznaků, byla jako příčina prokázána pokračující expanze alel (Ashizawa et al., 1994).

Přestože podstatou všech těchto patologických stavů jsou TRE, jednotlivé charakteristiky jako např. genetické chování a typ dědičnosti, lokalizace repetitive v genomu a oblasti genu, nestabilita TR a z ní vyplývající počet trinukleotidů nutný k vyvolání klinického projevu, původ nestability rodičovské alely atd., jsou velice rozmanité (tab.1, tab. 2). Podle lokalizace TRE můžeme choroby rozdělit do dvou základních skupin (Hofferbert et al., 1997; Reddy et al., 1997). Do první skupiny řadíme patologie, reprezentované např. Huntingtonovou choreou, jejichž příčina spočívá v expanzi CAG trinukleotidů uvnitř kódující oblasti genu a všechny se vyznačují progresivním úbytkem neuronů (Reddy et al., 1997). Translace této sekvence do polyglutaminového „traktu“ vede k narušení správné konformace proteinu, a tím

i jeho fyziologické funkce. Do skupiny druhé potom spadají choroby s TR lokalizovanou vně ORF, a to buď v 3' -UTR, 5' -UTR, nebo intronové oblasti genu, např. myotonická dystrofie, syndrom fragilního X a další. Mechanismy patogenního působení expanzí, stejně jako klinické projevy, jsou u tohoto typu chorob velice rozmanité a často ne zcela jasné (Reddy et al., 1997), patrně však rozličnými způsoby snižují, inaktivují, nebo jinak ovlivňují expresi genu, ve kterém se nacházejí, případně i některých genů dalších.

3. Současné teorie vzniku expanzí a kontrakcí

Teorií, vysvětlujících nestabilitu TRE a mechanismy jejich vzniku je několik, žádná z nich ale nevysvětluje všechny aspekty vzniku dynamických mutací, což ukazuje na složitost problému. Je však jasné, že nestabilita TR závisí nejméně na čtyřech hlavních faktorech: na typu sekvence, délce repetitivní sekvence, na přerušení TR vmezeženou nerepetitivní sekvencí a na orientaci sekvence ve směru k počátku replikace (Leefflang, 1995; Wells, 1996; Gordenin et al., 1997). Stupeň nestability repeticce je závislý na trinukleotidové sekvenci, přičemž výskyt expandovaných CTG trinukleotidů je devětkrát častější ve srovnání s ostatními trinukleotidy (Wells, 1996).

Závislost mutačního mechanismu na sekvenci trinukleotidů ukazuje na důležitou úlohu sekundární struktury TR v těchto procesech, která patrně hraje klíčovou úlohu v iniciaci dynamických mutací (Gacy et al., 1995). TR a zejména TRE jsou totiž, vzhledem ke své sekvenci, velice náchylné k tvorbě netypických sekundárních struktur, zejména vlásenek, případně interřetězcových nebo intrařetězcových triplexů, využívající „non Watsonova-Crickova“ párování bazí (např. H oogsteenovo párování: C⁺-G-C, T-A-T apod.) (Gacy et al., 1995; Hancock a Santibáñez-Koref, 1998). Prvotní a hlavní příčinou TR expanzí (popř. kontrakcí) je pravděpodobně právě výskyt komplikovaných sekundárních struktur, jak bylo pozorováno i při *in vitro* amplifikaci (PCR), kdy při průchodu polymerasy repetitivním traktem dochází k inhibici syntézy dlouhé repetitivní sekvence vytvořenými vlásenkami (Cheng et al., 1996; Warner et al., 1996; Wells, 1996). Důkaz existence vlásenek v dlouhých repetitivních traktech poskytla i elektronová mikroskopie. Bylo prokázáno, že čím delší expanze je, tím stabilnější je i vlásenka a tím větší je i pravděpodobnost jejího vzniku (Gacy et al., 1995). S větším počtem vlásenek pak roste nestabilita alely a pravděpodobnost její expanze nebo kontrakce, díky větší pravděpodobnosti zastavení postupu replikační vidlice vlásenkovou strukturou. Následná několikanásobná replikace nebo naopak přeskocení vlásenky zablokovanou polymerasou vede k expanzím nebo delecím TR (obr. 2). Utvoří-li se vlásenka na templátovém opožďujícím se řetězci, dochází během syntézy nového řetězce k delecí. K expanzi vede vytvoření vlásenkové struktury v Okazakiho fragmentu indukujícím vzájemný posun řetězců vyúsťující v opětovnou replikaci určitého úseku templátové DNA (Kang et al., 1995; Wells, 1996).

Další možností je štěpení vlákna DNA v oblasti vlásenky a následná opravná syntéza (Hancock a Santibáñez-Koref, 1998). Expanze vznikají, je-li štěpen řetězec naproti vlásence, proběhne-li štěpení uvnitř vlásenky, vzniká delece (Jansen et al., 1994).

Novější teorie do procesů dynamických mutací zahrnují i reparační systém, ovlivnění struktury chromatinu repetitivním „traktem“ (Gordenin et al., 1997) apod. Sama existence více teorií ukazuje na komplexitu daného jevu a teprve další experimenty objasní, které všechny mechanismy jsou ve vzniku expanzí a delecí zahrnuty. Složitost patologických mechanismů TRED lze přiblížit na myotonické dystrofii.

4. Myotonická dystrofie, příčina choroby na úrovni genu a její genetické rysy

Myotonická dystrofie (MIM*160900, dystrophia myotonica, myotonia atrophica, Steinertova nemoc, Curschmannova-Steinertova nemoc) je nejčastějším neuromuskulárním onemocněním dospělého věku s prevalencí 1:8000 (Goldman et al., 1994; Zatz et al., 1995). Klinicky se jedná o velice variabilní multisystematické onemocnění, postihující zejména svaly a centrální nervový systém (obr. 3) (Wieringa, 1994).

MD je autosomálně dominantní choroba s neúplnou, ale vysokou, cca 92% penetrancí a velice variabilní expresivitou (Brook et al., 1992; Ranum et al., 1998, Tapscott et al., 1998). Projev mutantního genu je značně pleiotropní (Ashizawa et al., 1994), jak je zřejmé z rozmanitosti klinických projevů (Lazarus et al., 1999).

Příčinou MD je expanze CTG trinukleotidů v 3' -UTR (nepřekládaná oblast) genu *DMPK* (*MDY-1*) nacházejícím se v lokusu 19q13.3 (obr. 4) (Shulter et al., 1994; Wieringa, 1994; Roberts et al., 1997; Ranum et al., 1998, Tapscott et al., 1998). Kromě expanze CTG trinukleotidů nebyla dosud nalezena žádná bodová ani jiná mutace v genu *DMPK*, která by vedla k projevu MD (Harris et al., 1996; Reddy et al., 1997), přesto však možnost takové mutace v exonu nebo intronu nelze vyloučit (Tapscott et al., 1998), jak ukazuje objev bodové mutace v genu *FMRI* vedoucí ke stejnému fenotypu jako expanze trinukleotidů CGG (Plassart, Fontaine, 1994; Meiner et al., 1995). Expanze CTG trinukleotidů v TR genu *DMPK* byla prokázána u 98-99% všech klinicky diagnostikovaných pacientů (Neville et al., 1994; Ranum et al., 1998) a MD se tak dosud jeví jako geneticky velmi homogenní choroba (Shelbourne et al., 1992; Chakraborty et al., 1996).

Vlastnosti TR v genu *DMPK* odpovídají obecným charakteristikám uvedeným v kapitole 2. Fyziologický interval počtu CTG je 5 až cca. 35. Alely v rozmezí 35 – cca. 50 CTG (premutace) jsou geneticky nestabilní a nebývají asociovány s patologickými projevy. Delší alely již vedou k fenotypové expresi choroby, přičemž jejich prodloužení je doprovázeno anticipací. Počet CTG v případě kongenitální MD (CMD) může dosahovat až několika tisíc, což je dosud největší pozorovaná velikost expanze ve srovnání s ostatními trinukleotidovými chorobami. *DMPK* lokus se tak jeví ze všech TR asociovaných s patologickými stavy jako nejvíce nestabilní (Monckton et al., 1995). Distribuce fyziologických alel v normální zdravé populaci je trimodální, s výraznou dominancí alely (CTG)₅ a vysokou frekvencí alel (CTG)_{11–13} (Brook et al., 1992; Watkins et al., 1995). U pacientů s myotonickou dystrofií byla naproti tomu nalezena překvapivě nízká frekvence alely (CTG)₅ (Marchini et al., 2000). Graf 1 demonstruje obdobné výsledky populační studie distribuce alel (CTG)_n pro MD pacienty a skupinu kontrolních zdravých jedinců z oblasti jižní Moravy (Falk et al., 2000)

Z autosomálně dominantního typu dědičnosti MD vyplývá 50% pravděpodobnost přenosu expandované alely na potomka. U postižených žen navíc existuje až 20% riziko narození velmi vážně postiženého novorozence (CMD), zvláště tehdy, vykazují-li již známky neuromuskulárního postižení (Tapscott et al., 1998). Velké úsilí je proto věnováno zavedení rychlých a spolehlivých prenatálních genetických testů. Ačkoliv k expanzím dochází po přenosu alel od matky i otce, nestabilita alel je převážně maternální a nejtěžší kongenitální forma MD (CMD) je přenášena téměř výhradně po mateřské linii, pouze několik případů bylo paternálního původu (Bergoffen et al., 1994; Nakagawa et al., 1994; Harris et al., 1996; Tapscott et al., 1998). Existence těchto případů pravděpodobně vylučuje maternální imprinting, mitochondriální dědičnost nebo transplacentální faktory jako hlavní příčinu CMD (Harris et al., 1996).

Přestože expanze TR jsou oproti delecím daleko častější, zdá se, že se kontrakce alel vyskytují mnohem častěji, než se původně myslelo (Meiner et al., 1995). Martorell et al. (1998) uvádí zkrácení patologických alel v 6,4% transmisí a v kontrastu s dřívějšími pozorováními, která udávají vymizení klinických příznaků po kontrakci alely na fyziologickou délku (Shelbourne et al., 1992). Meiner et al. (1995) poukazuje na případy, kdy projevy choroby přetrvávaly i po snížení počtu CTG, nebo došlo i k jejich zhoršení (Ashizawa

et al., 1994; de Die-Smulders et al., 1994). Martorell et al. (1998) tento jev popisuje ve více než polovině přenosů. To je velice zvláštní, považujeme-li expanzi CTG trinukleotidů za jedinou iniciační příčinu MD. Možným vysvětlením snad může být somatický mozaicismus, případně účast jiných, ještě neobjevených faktorů (Jansen et al., 1994; Wöhrle et al., 1995; Martorell et al., 1997; Martorell et al., 1998). Somatické mozaiky a posun průměrné délky repetice většinou k vyšším hodnotám jsou u MD velice výrazné. Rychlost progresu choroby koreluje s délkou expandované alely a věkem pacienta (Martorell et al., 1998; Tapscott et al., 1998).

Původ „MD -chromosomů“ nesoucích expandované alely je nejistý. Někteří vědci předpokládají jejich vznik z jednoho nebo několika chromosomů, u kterých došlo v minulosti ke spontánní mutaci. *De novo* mutace fyziologických alel nebyly totiž doposud prokázány (Shelbourne et al., 1992; Rubinsztein et al., 1994; Meiner et al., 1995). Mechanismus, který by v populaci udržoval tak vysokou frekvenci patologických alel, i přes sníženou fertilitu a vitalitu postižených jedinců, je při platnosti této hypotézy zatím neznámý. Opačné teorie předpokládají existenci určité zásoby premutovaných, méně stabilních alel v populaci (19–30 CTG), které pak mohou častěji přecházet v plné mutace (Neville et al., 1994; Wieringa, 1994).

5. Gen *DMPK* a jeho produkt

Gen *DMPK* (obr. 4), zvaný též *Mt-PK*, *MDY-1* apod., jehož TRE mutace způsobuje myotonickou dystrofii, byl roku 1989 pomocí pozicního klonování lokalizován na dlouhé raménko 19. chromosomu, mezi markery D19S63 a D19S95. Tento fragment, vyštěpitelný pomocí *EcoRI* je možné detegovat sondou pBB0.7. (Brook et al., 1992). Později byla jeho poloha upřesněna na lokus 19q13.3. Obsahuje 15 exonů a je prepisován směrem od telomery k centromere (Brook et al., 1992). CTG trinukleotidová repetice, jejíž expanze je zodpovědná za projev MD se nachází uvnitř CpG ostrůvku exonu 15, a to na kódujícím řetězci asi 500 bazí od poly(A)-konce mRNA (Harris et al., 1996; Neville et al., 1994; Brook et al., 1992). Za nejdelší ORF Brook et al. (1992) označili úsek genu o velikosti 1747 bp s kódující kapacitou 582 aminokyselin a transkriptem mezi 3,0 – 3,3 kb. Předpokládaná velikost genu je pak 11612 bp (Fu et al., 1993). Kompletní sekvence cDNA je v GenBank uvedena pod číslem M87312 (Fu et al., 1992), případně L08835 (Neville et al., 1994).

Exony 2 – 8 kódují domény s proteinkinasovou aktivitou, exony 9 – 12 sekvenčně odpovídají α -helikální doménám („*coiled coil*“) a exon 15 patří k transmembránové doméně (Neville et al., 1994; Pham et al., 1998). Brook et al. (1992) uvádějí i částečnou sekvenční homologii mezi oblastmi, následujícími za proteinkinasovými doménami a těžkým myosinovým řetězcem kuřete. Dále se zdá, že gen obsahuje i oblast zodpovědnou za vazbu ATP (sekvence s vysokým obsahem G) (Fu et al., 1992).

Produktem genu je protein o molekulové hmotnosti v rozmezí 70–80 kDa, zvaný myotoninová proteinkinasa (dystrophia myotonica *protein kinase*, *myotonin protein kinase*), patřící k serinové/threoninové proteinkinase (Whitting et al., 1995; Timchenko et al., 1996; Pham et al., 1998; Tapscott et al., 1998), úzce příbuzné cAMP dependentním proteinkinase (Wieringa, 1994; Harris et al., 1996). Existuje několik sestřihových forem genu *DMPK*, vzájemně se lišících zejména v 3' a 5' koncových oblastech, které jsou různě silně exprimovány v mnoha tkáních, zejména v kosterní svalovině, srdeční a nervové tkáni (Whitting et al., 1995; Pham et al., 1998), přičemž exony zodpovědné za proteinkinasovou aktivitu jsou zachovány ve všech formách (Fu et al., 1993).

Molekulární mechanismy patologického působení expandované alely jsou doposud nejasné. Velmi zvláštním rysem myotonické dystrofie je její dominantní „mód“ dědičnosti, ačkoliv není ovlivněna primární struktura ani konformace proteinu (*gain of function*

mutation). Nejstarší teorie považují za hlavní příčinu MD haploinsuficienci proteinu DMPK (*loss of function mutation*). Velice variabilní fenotypový projev však ukazuje spíše na mechanismus zahrnující více genů (Winchester et al., 1999). Proto se začalo uvažovat i o ovlivnění transkripce přilehlých genů *DMAHP* a *SIX5* (Tapscott, 1998; Winchester et al., 1999). Některé teorie uvažují i změny uspořádání chromatinu závislé na expandované repetitivní sekvenci. DNA se tak díky nadměrnému „utažení“ nukleosomů stává nepřístupnou pro různé transkripční faktory, což se opět odráží v expresi zmíněných genů (Jansen et al., 1995; Otten et al., 1995; Wang, Griffith, 1995; Harris, 1996; Thornton et al., 1997; Tapscott, 1998). Výsledky týkající se expresivní hladiny genu *DMPK* jsou však rozporuplné (Timchenko et al., 1996; Tapscott, 1998). Mnoho autorů (Wang et al., 1995; Whiting et al., 1995; Bhagwati et al., 1996; Harris et al., 1996; McLaughlin et al., 1996; Timchenko et al., 1996; Klessert et al., 1997; Morrone et al., 1997; Pearson et al., 1997; Philips et al., 1998; Tapscott et al., 1998; Alwazzan et al., 1999; Lu et al., 1999; Timchenko, 1999) proto uvažuje i o dalších molekulárně patologických mechanismech, zahrnujících retenci hnRNA v jádře, vysycení transkripčních faktorů a jiných proteinů vázajících se na CTG motiv (ovlivnění transkripce a posttranskripčních úprav mnoha různých genů), aberantní sestřih, nedostatečnou polyadenylaci RNA atd. Je tedy zřejmé, že objasnění patologických procesů na molekulární úrovni bude vyžadovat ještě mnoho úsilí a času.

6. Klinické projevy myotonické dystrofie, korelace mezi genotypem a fenotypem

Hlavním rysem MD je myotonie, spojená s pomalu progradující slabostí a atrofií svalstva především distálních partií těla (obr. 3). Závažnost postižení kolísá od velice mírné formy, projevující se většinou až v pozdním věku např. pouze šedým zákalem, po velice závažnou a často fatální formu kongenitální, spojenou s celkovou hypotonií, dechovou nedostatečností a poruchami srdeční vodivosti (obr. 3) (Buyse, 1990; Harris et al., 1996). Zajímavá je nižší incidence choroby u národů jižní Asie a Japonců (cca. 1:20000) (Neville et al., 1994; Chakraborty et al., 1996), která je v případě africké negroidní populace téměř nulová (Goldman et al., 1994; Chakraborty et al., 1996).

Dle závažnosti klinického projevu, zejména podle věku projevu prvních příznaků, rozlišujeme tři základní klinické formy: mírnou, středně těžkou (klasická forma) a velmi těžkou (kongenitální forma). Vzhledem k již zmíněné korelaci, byť nepřiliš těsné, mezi počtem CTG trinukleotidů v TRE a závažností klinického projevu (Wieringa, 1994; Martorell et al., 1998; Bhagwati et al., 1999), odpovídají těmto skupinám přibližně i určité intervaly počtu trinukleotidů v repetici. Prognóza vývoje choroby u konkrétního jedince na základě této korelace však není jednoznačná, a má proto jen orientační význam (tab. 3) (Wieringa, 1994; Hamshere et al., 1999). Jednotliví pacienti se stejnou délkou expanze TR se totiž v závažnosti postižení mohou velice významně lišit. Za tento rozdíl jsou patrně zodpovědné somatické mozaiky a individuální genetické pozadí (Wieringa, 1994).

7. Strategie diferenční DNA diagnostiky myotonické dystrofie

Molekulární diagnostika myotonické dystrofie spočívá v určení velikosti patologické expandované alely genu *DMPK* na DNA izolované z lymfocytů periferní krve, v některých případech i ze svalové tkáně. Mutační analýza je dosud prováděna pomocí Southernovy hybridizace se značenou sondou (Barton a Middleton-Price, 1994), která je však časově náročná a kromě dalších nevýhod vyžaduje relativně velké množství kvalitní DNA. Rozšíření metod založených na PCR brání již zmíněné vlastnosti expandované repetitivní sekvence, která inhibuje syntézu patologických alel a není-li užito speciálních modifikací, nelze amplifikovat alely delší než cca. 100 CTG (Warner et al., 1996; Falk, 2000). V poslední době však byly navrženy a do klinické praxe zavedeny modifikované PCR metody,

kteře diferenční diagnostiku myotonické dystrofie značně zjednodušují a urychlují (McConlogue et al., 1988; Cheng et al., 1994a; Cheng et al., 1994b; Cheng et al., 1996; Nanba et al., 1996; Warner et al., 1996; Falk, 2000; Zühlke et al., 2000). Tyto postupy založené na PCR lze dle strategie rozdělit do dvou základních skupin: a/ metody pro syntézu expandované patologické alely, b/ metody pro detekci patologické alely, kde však nedochází k syntéze expandované alely o celé její délce. Metody první skupiny využívají různých modifikací, které zamezují vzniku vlásenek a zlepšují funkci DNA polymerasy, čímž usnadňují syntézu expandovaných alel. Chengová (1996) navrhuje např. substituci dGTP pomocí 7deaza-dGTP a použití primerů vymezujících kolem repetitivní sekvence rozsáhlejší úsek DNA. Metody druhé skupiny obchází problém syntézy expandované alely např. využitím trojice primerů (TP-PCR, Warner et al., 1996), z nichž jeden nasedá na DNA uvnitř repetitivní sekvence v různých vzdálenostech od jejího počátku, vzájemně se lišících o (CTG)_n. Vzniká tak žebříček PCR produktů, který je dále amplifikován s využitím dvou zbývajících primerů, z nichž první primer hybridizuje s DNA v těsné blízkosti před repetitivní sekvencí a určuje specifičnost reakce, druhý se váže k 5'-konci primeru nasedajícího uvnitř CTG repetice. U zdravých jedinců dosahuje délka tohoto „žebříčku“ velikosti delší z (CTG)_n alel, patologická alela je detekována jako postupně slábnoucí „žebříček“ delší než 35 CTG. DNA diagnostický protokol spočívá v detekci patologických alel pomocí PCR metod, Southernova hybridizace se pak provádí pouze u pozitivně testovaných jedinců jako konfirmační vyšetření.

ZÁVĚR

Otázky týkající se vzniku nestabilních trinukleotidových repetice, jejich funkčního a evolučního významu, patologického mechanismu myotonické dystrofie a ostatních TRED, stále odolávají úplnému objasnění. Zatím se nacházíme v situaci, kdy je již díky molekulárně genetickým metodám možná dokonce i presymptomatická diagnostika celé řady chorob, jejich léčba je však stále nemožná. Jelikož se vesměs jedná o choroby s pozdním nástupem klinických příznaků, existuje zde značné riziko přenosu do následující generace. Presymptomatické testování nás zase staví před velice závažné otázky etické. Problematika TRED je tedy stále velmi aktuální a je zřejmé, že nestabilní trinukleotidové repetice lidského genomu budou jedním z významných problémů klinického i základního výzkumu ještě po mnoho let, s vyhlídkou na účinnou genovou terapii.

Za cenné rady a připomínky děkuji RNDr. Marii Vojtíškové, CSc.

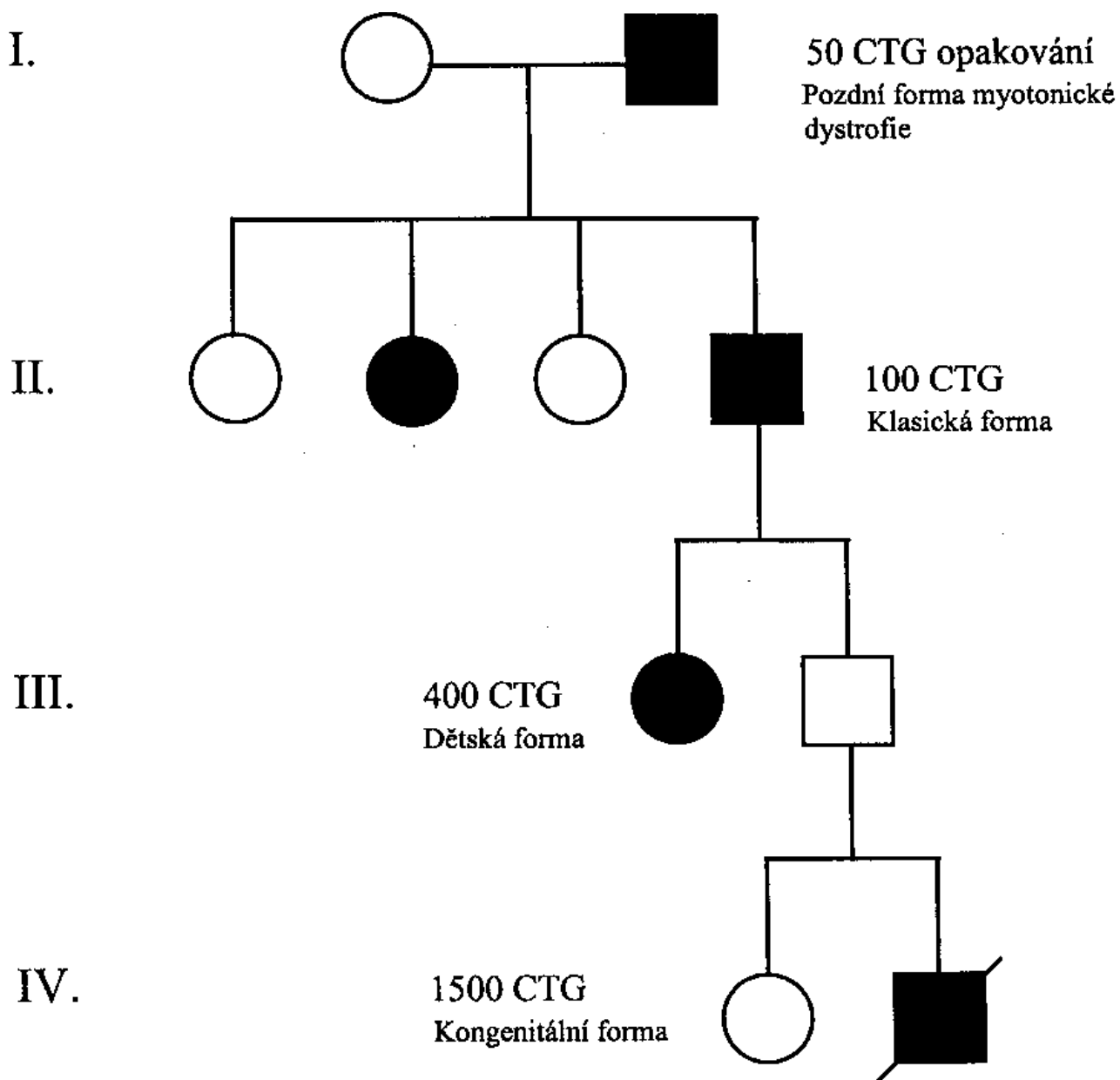
LITERATURA:

- Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M.G. and Brook, D. (1999): Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat; *Hum. Mol. Gen.* 8, 8: 1491-1497.
- Ashizawa, T., Anvert, M., Baiget, M., Barceló, J.M., Brunner, H., Cobo, A.M., Dallapiccola, B., Fenwick, R.G., Jr., Grandell, U., Harley, H., Junien, C., Koch, M. C., Korneluk, R.G., Lavedan, C., Miki, T., Mulley, J.C., López de Munain, A., Novelli, G., Roses, A.D., Se, W.K. (1994): Characteristic of Intergenerational Contractions of the CTG Repeat in Myotonic Dystrophy; *Am. J. Hum. Gen.* 54: 414-423.
- Barton, D. & Middleton-Price, H. (1994): Myotonic Dystrophy; *Workshop 1994 Guidelines*, 17-19, ver. 1.00.
- Bergoffen, J.A., Kant, J., Sladky, J., McDonald-McGinn, D., Zackai, E.H., Fischbeck, K.H. (1994): Paternal transmission of congenital myotonic dystrophy; *J. Med. Genet.* 31: 518-520.
- Bhagwati, S., Ghatpande, A. and Leung, B. (1996): Identification of Two Nuclear Proteins Which Bind to RNA CUG Repeats: Significance for Myotonic Dystrophy; *Biochem. and Biophysic. Res. Communication* 228: 55-62.
- Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.-P., Hudson, T., Sohn, R., Zeman, B., Snell, R.G., Rundle, S.A., Croe, S., June, D. (1992): Molecular Basis of Myotonic Dystrophy: Expansion of a Trinucleotide (CTG) Repeat at the 3' End of a Transcript Encoding a Protein Kinase Family Member; *Cell* 68: 799-808.
- Buyse, M.L. (1990): *Birth Defects Encyclopedia*, 1206-1208, vol. II. A Service of the Center for Birth Defects Information Service, INC.

- de Die-Smulders, C.E.M., Howeler, C.J., Mirandolle, J.F., Brunner, H.G., Hovers, V., Bruggenwirth, H., Smeets, H.J.M., Geraedts, J.P.M. (1994): Anticipation resulting in elimination of the myotonic dystrophy gene: a follow up study of one extended family; *J. Med. Genet.* 31: 595-601.
- Falk, M. (2000): Patologické stavy podmíněné expanzí trinukleotidů. Molekulární diagnostika myotonické dystrofie; Diplomová práce, PFF MU Brno.
- Falk, M., Šilhánová, E. and Vojtíšková, M. (2000): Stable and Unstable Trinucleotide CTG Repeat Alleles in Myotonic Dystrophy Locus; *J. Biomol. Struct. Dyn.* 17: 1161-1162.
- Fu, Y.-H., Friedman, D.L., Richards, S., Pearlman, J.A., Gibbs R.A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman M.B., Scarlato, G., Fenwick, R.G., Caskey C.T. (1993): Decreased Expression of Myotonin-Protein Kinase Messenger RNA and Protein in Adult Form of Myotonic Dystrophy; *Science* 260: 235-238.
- Fu, Y.-H., Pizzuti, A., Fenwick, R.G., Jr., King, J., Rajnarayan, S.D., Dubel, P.W.J., Nasser, G.A., Ashizawa, T., De Jong, P., Wieringa, B., Korneluk, R., Perryman, M.B., Epstein, H.F., Caskey, C.T. (1992): An Unstable Triplet Repeat in a Gene Related to Myotonic Muscular Dystrophy; *Science* 255: 1256-1258.
- Gacy, A.M., Goellner, G., Juranic, N., Macura, S., McMurray, C.T. (1995): Trinucleotide repeats That Expand in Human Disease Form Hairpin Structures In Vitro; *Cell* 81: 533-540.
- Goldman, A., Ramsay, M., Jenkins, T. (1994): Absence of myotonic dystrophy in southern African Negroids is associated with a significantly lower number of CTG trinucleotide repeats; *J. Med. Genet.* 31: 37-40.
- Gordenin, D.A., Kunkel, T.A., Resnick, M.A. (1997): Repeat expansion - all in a flap?; *nature genetics* 16: 116-118.
- Hamshere, M.G., Harley, H., Harper, P., Brook, J.D., Brookfield, J.F.Y. (1999): Myotonic dystrophy: the correlation of (CTG) repeat length in leukocytes with age at onset is significant only for patients with small expansions; *J. Med. Genet.* 36: 59-61.
- Hancock, J.M. and Santibáñez-Koref, M.S. (1998): Trinucleotide Expansion Diseases in the Context of Micro- and Minisatellite Evolution, EMBO Workshop Report, Hammersmith Hospital, April 1-3, 1998; *EMBO* 17, 19: 5521-5524.
- Harris, S., Moncrieff, C., Johnson, K. (1996): Myotonic dystrophy: will the real gene please step forward; *Hum. Mol. Gen.* 5: 1417-1423.
- Hofferbert, S., Schanen, N.C., Chehab, F. and Francke, U. (1997): Trinucleotide repeats in the human genome: size distributions for all possible triplets and detection of expanded disease individuals by Repeat Expansion Detection method; *Hum. Mol. Gen.* 6, 1: 77-83.
- Chakraborty, R., Stivers, D.A., Deka, R., Yu, L.M., Shriver, M.D. and Ferrell, R.E. (1996): Segregation Distortion of the CTG Repeats at the Myotonic Dystrophy Locus; *Am. J. Hum. Gen.* 59: 109-118.
- Cheng, S., Barceló, J.M. and Korneluk, R.G. (1996): Characterization of Large CTG Repeat Expansions in Myotonic Dystrophy Alleles Using PCR; *Hum. Mut.* 7: 304-310.
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, M., and Higuchi, R. (1994a): Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5695-5699.
- Cheng, S., Chang, Ch.-Y., Gravitt, P., Respass, R. (1994b): Long PCR; *Nature* 369: 684-685.
- Jansen, G., Willems, P., Coerwinkel, M., Nillesen, W., Smeets, H., Vits, L., Howeler, Ch., Brunner, H., Wieringa, B. (1994): Gonosomal Mosaicism in Myotonic Dystrophy Patients: Involvement of Mitotic Events in (CTG)_n Repeat Variation and Selection against Extreme Expansion in Sperm; *Am. J. Hum. Gen.* 54: 575-585.
- Jansen, G., Bachner, D., Coerwinkel, M., Wormskamp, N., Hameister, H., Wieringa, B. (1995): Structural organisation and developmental expression pattern of the mouse WD-repeat gene DMR-N9 immediately upstream of the myotonic dystrophy locus; *Hum. Mol. Gen.* 4, 5: 843-852.
- Kang, S., Jaworski, A., Ohshima, K. & Wells, R.D. (1995): Expansion and deletion of CTG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E. coli*; *nature genetics* 10: 213-218.
- Klesert, T.R., Otten, A.D., Bird, T.D. and Tapscott, S.J. (1997): Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP; *nature genetics* 16: 402-406.
- Lazarus, A., Varin, J., Ounnoughene, Z., Radvanyi, H., Junien, C., Coste, J., Laforet, P., Eymard, B., Becane, H.M., Weber, S., Duboc, D. (1999): Relationships Among Electrophysiological Findings and Clinical Status, Heart Function, and Extent of DNA Mutation in Myotonic Dystrophy; *Circulation* 99: 1041-1046.
- Leefflang, E.P. and Arnheim, N. (1995): A novel repeat structure at the myotonic dystrophy locus in a 37 repeat allele with unexpectedly high stability; *Hum. Mol. Gen.* 4, 1: 135-136.
- Lia, A.-S., Seznec, H., Hofmann-Radvanyi, H., Radvanyi, F., Duros Ch., Saquet, C., Blanche, M., Junien, C. and Gourdon, G. (1998): Somatic instability of the CTG repeat in mice transgenic for the myotonic dystrophy region is age dependent but not correlated to the relative intertissue transcription levels and proliferative capacities; *Hum. Mol. Gen.* 7, 8: 1285-1291.
- Lu, X., Timchenko, N.A. and Timchenko, L.T. (1999): Cardiac *elav*-type RNA-binding protein (ETR-3) binds to RNA CUG repeats expanded in myotonic dystrophy; *Hum. Mol. Gen.* 8, 1: 53-60.

- Meiner, A., Wolf, C., Carey, N., Okitsu, A., Johnson, K., Shelbourne, P., Kunath, B., Sauermann, W., Thiele, H., Kupferling, P., Kunert, E. (1995): Direct molecular analysis of myotonic dystrophy in the German population: important considerations in genetic counselling; *J. Med. Genet.* 32: 645-649.
- Margolis, R.L., Abraham, M.R., Gatchell, S.B., Li, S.-H., Kidwai, A.S., Breschel, T.S., Stine, O.C., Callahan, C., McInnis, M.G., Ross, Ch.A. (1997): cDNAs with long CAG trinucleotide repeats from human brain; *Hum. Genet.* 100: 114-122.
- Marchini, C., Lonigro, R., Verriello, L., Pellizzari, L., Bergonzi, P. and Damante, G. (2000): Correlations between individual clinical manifestations and CTG repeat amplification in myotonic dystrophy; *Clin. Genet.* 57: 74-82.
- Martorell, L., Johnson, K.J., Boucher, C.A. and Baiget, M. (1997): Somatic instability of the myotonic dystrophy (CTG)_n repeat during human fetal development; *Hum. Mol. Gen.* 6, 6: 877-880.
- Martorell, L., Monckton, D.G., Gamez, J., Johnson, K.J., Gich, I., Lopez de Munain, A., and Baiget, M. (1998): Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients; *Hum. Mol. Gen.* 7, 2: 307-312.
- McConlogue, L., Brow, M.A.D., Innis M.A. (1988): Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2'-deoxyguanosine; *Nucleic Acids Research* 16, 20: 9869.
- McLaughlin, B.A., Spencer, C. and Eberwine, J. (1996): CAG Trinucleotide RNA Repeats Interact with RNA-Binding Proteins; *Am. J. Hum. Gen.* 59: 561-569.
- Mitas, M., Yu, A., Dill, J., Kamp, T.J., Chambers, E.J. and Haworth, I.S. (1995): Hairpin properties of single-stranded DNA containing a GC-rich triplet repeat: (CTG)₁₅; *Nucleic Acids Research* 23, 6:1050-1059.
- Monckton, D.G., Wong, L.-J.C., Ashizawa, T. and Caskey, C.T. (1995): Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR; *Hum. Mol. Gen.* 4, 1: 1-8.
- Morrone, A., Pegoraro, E., Angelini, C., Zammarchi, E., Marconi, G., Hoffman, E. (1997): RNA Metabolism in Myotonic Dystrophy; *J. Clin. Invest.* 99: 1691-1698.
- Nakagawa, M., Yamada, H., Higuchi, I., Kaminishi, Y., Miki, T., Johnson, K., Osame, M. (1994): A case of paternally inherited congenital myotonic dystrophy; *J. Med. Genet.* 31: 397-400.
- Nanba, E., Ito, T., Kadowaki, K., Makio, A., Nakagawa, M., Yamamoto, T., Yuasa, I., Takeshita, K. (1996). Prenatal diagnosis of congenital myotonic dystrophy in two Japanese families: direct mutation analysis by a non-radioisotope PCR method and haplotype analysis with flanking DNA markers; *Brain & Development* 18: 122-126.
- Neville, C.E., Mahadevan, M.S., Barceló, J.M. and Korneluk, R.G. (1994): High resolution genetic analysis suggests one ancestral predisposing haplotype for the origin of the myotonic dystrophy mutation; *Hum. Mol. Gen.* 3, 1: 45-51.
- Otten, A.D., Tapscott S.J. (1995): Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure; *Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5465-5469.
- Pearson, Ch.E., Ewel, A., Acharya, S., Fishel, R.A. and Sinden, R.R. (1997): Human MSH2 binds to trinucleotide repeat DNA structures associated with neurodegenerative diseases; *Hum. Mol. Gen.* 6, 7: 1117-1123.
- Pekařík, V., Tvrđíková, M. (1998): Expanze trinukleotidových repetitivních sekvencí v DNA – příčina některých dědičných onemocnění; *Biol. listy* 3: 205-222.
- Pham, Y.C.A., thi Man, N., Lam, L.T. and Morris, G.E. (1998): Localization of myotonic dystrophy protein kinase in human and rabbit tissues using a new panel of monoclonal antibodies; *Hum. Mol. Gen.* 7, 12: 1957-1965.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., Cooper, T.A. (1998): Disruption of Splicing Regulated by a CUG-Binding Protein in Myotonic Dystrophy; *Science* 280: 737-741.
- Plassart, E., Fontaine, B. (1994): Genes with triplet repeats: a new class of mutations causing neurological diseases; *Biomed. & Pharmacother.* 48: 191-197.
- Ranum, L.P.W., Rasmussen, P.E., Benzow, K.A., Koob, M.D., Day, J.W. (1998): Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus; *nature genetics* 19: 196-198.
- Reddy, P.S., Housman, D.E. (1997): The complex pathology of trinucleotide repeats; *Current Opinion in Cell Biology* 9, 3: 364-372.
- Roberts, R., Timchenko, N.A., Miller, J.W., Reddy, S., Caskey, C.T., Swanson, M.S. and Timchenko, L.T. (1997): Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13221-13226.
- Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Amos, W., Barton, D.E., Feguson-Smith, M.A. (1994): Myotonic dystrophy CTG repeats and the associated insertion/deletion polymorphism in human and primate populations; *Hum. Mol. Gen.* 3, 11: 2031-2035.

- Samadashwily, G.M., Raca, G. & Mirkin, S.M. (1997): Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo; *nature genetics* 17: 298-304.
- Shelbourne, P., Winquist, R., Kunert, E., Davies, J., Leisti, J., Thiele, H., Bachmann, H., Buxton, J., Williamson, B., Johnson, K. (1992): Unstable DNA may be responsible for the incomplete penetrance of the myotonic dystrophy phenotype; *Hum. Mol. Gen.* 1, 7: 467-473.
- Shutler, G.G., MacKenzie, A.E., Korneluk, R.G. (1994): The 1.5-Mb Region Spanning the Myotonic Dystrophy Locus Shows Uniform Recombination Frequency; *Am. J. Hum. Gen.* 54: 104-113.
- Tapscott, S.J., Klesert, T.R., Widrow, R.J., Stöger, R. and Laird, Ch.D. (1998): Fragile-X syndrome and myotonic dystrophy: parallels and paradoxes; *Current Opinions in Genetics & Development* 8: 245-253.
- Thornton, Ch.A., Wymer, J.P., Simmons, Z., McClain, C. and Moxley III, R.T. (1997): Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene; *nature genetics* 16: 407-409.
- Timchenko, L.T. (1999): HUMAN GENETICS '99: TRINUCLEOTIDE REPEATS, Myotonic Dystrophy: The role of RNA CUG Triplet Repeats; *Am. J. Hum. Gen.* 64: 360-364 .
- Timchenko, L.T., Timchenko, N.A., Caskey, C.T., Roberts, R. (1996): Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implication for myotonic dystrophy; *Hum. Mol. Gen.* 5, 1: 115-121.
- Wang, J., Pegoraro, E., Menegazzo, E., Gennarelli, M., Hoop, R.C., Angelini, C., Hoffman, E.P. (1995): Myotonic dystrophy: evidence for a possible dominant-negative RNA mutation; *Hum. Mol. Gen.* 4, 4: 599-606.
- Wang, Y.-H., Griffith J. (1995): Expanded CTG Triplet Blocks from the Myotonic Dystrophy Gene Create the Strongest Known Natural Nucleosome Positioning Elements; *Genomics* 25: 570-573.
- Warner, J.P., Barron, L.H., Goudie, D., Kelly, K., Dow, D., Fitzpatrick, D.R., Brock, D.J.H. (1996): A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR; *J. Med. Genet.* 33: 1022-1026.
- Watkins, W.S., Bamshad, M., Jorde, L.B. (1995): Population genetics of trinucleotide repeat polymorphisms; *Hum. Mol. Gen.* 4, 9:1485-1491.
- Wells, R.D. (1996): Molecular Basis of Genetic Instability of Triplet Repeats; *The Journal of Biological Chem.* 271, 6: 2875-2878.
- Whiting, E.J., Waring, J.D., Tamai, K., Somerville, M.J., Hincke, M., Staines, W.A., Ikeda, J.-E., Korneluk, R.G. (1995): Charakterization of myotonic dystrophy kinase (DMK) protein in human and rodent muscle and cenral nervous tissue; *Hum. Mol. Gen.* 4, 6: 1063-1072.
- Wieringa, B. (1994): Commentary: Myotonic dystrophy reviewed: back to the future?; *Hum. Mol. Gen.* 3, 1: 1-7.
- Winchester, C.L., Ferrier, R.K., Sermoni, A., Clark, B.J., Johnson, J.J. (1999): Characterization of the expression of DMPK and SIX5 in the human eye and implications for pathogenesis in myotonic dystrophy; *Hum. Mol. Gen.* 8, 3: 481-492.
- Wöhrle, D., Konnerknecht, I., Wolf, M., Enderes, H., Schwemmler, S., Steinbach, P. (1995): Heterogeneity of DM kinase repeat expansion in different fetal tissues and further expansion during cell proliferation in vitro: evidence for a causal involvement of methyl-directed DNA mismatch repair in triplet repeat stability; *Hum. Mol. Gen.* 4, 7: 1147-1153.
- Zatz, M., Passos-Bueno, M.R., Cerqueria, A., Suely, K.M., Vainzof, M. and Pavanello R.C.M. (1995): Analysis of the CTG repeat in skeletal muscle of young and adult myotonic dystrophy patients: when does the expansion occur?; *Hum. Mol. Gen.* 4, 3: 401-406.
- Zühlke, Ch., Atici, J., Martorell, L., Gembruch, U., Kohl, M., Göpel, W. and Schwinger, E. (2000): Rapid detection of expansions by PCR and non-radioactive hybridization: application for prenatal diagnosis of myotonic dystrophy; *Prenat. Diagn.* 20: 66-69.



OBR. 1

Rodokmen rodiny s mnohonásobným výskytem myotonické dystrofie vykazující charakteristickou anticipací

Progresivní expanze patologické alely při přenosu do následujících generací je doprovázena postupným zhoršováním obrazu choroby a snižováním věku projevu prvních příznaků. Zatímco prababička probanda (I. generace, 50 CTG opakování) je postižena jen velice mírně a k projevu choroby došlo až v pozdním věku, proband sám (IV. generace, 1500 CTG opakování) zemřel brzy po porodu. Děd probanda (II. generace, 100 CTG opakování) trpěl klasickou formou myotonické dystrofie s nástupem choroby kolem 40. let. Matka probanda (III. generace, 400 CTG opakování), na rozdíl od svého otce, vykazovala známky myotonické dystrofie již v dětství, se závažnějšími klinickými projevy.

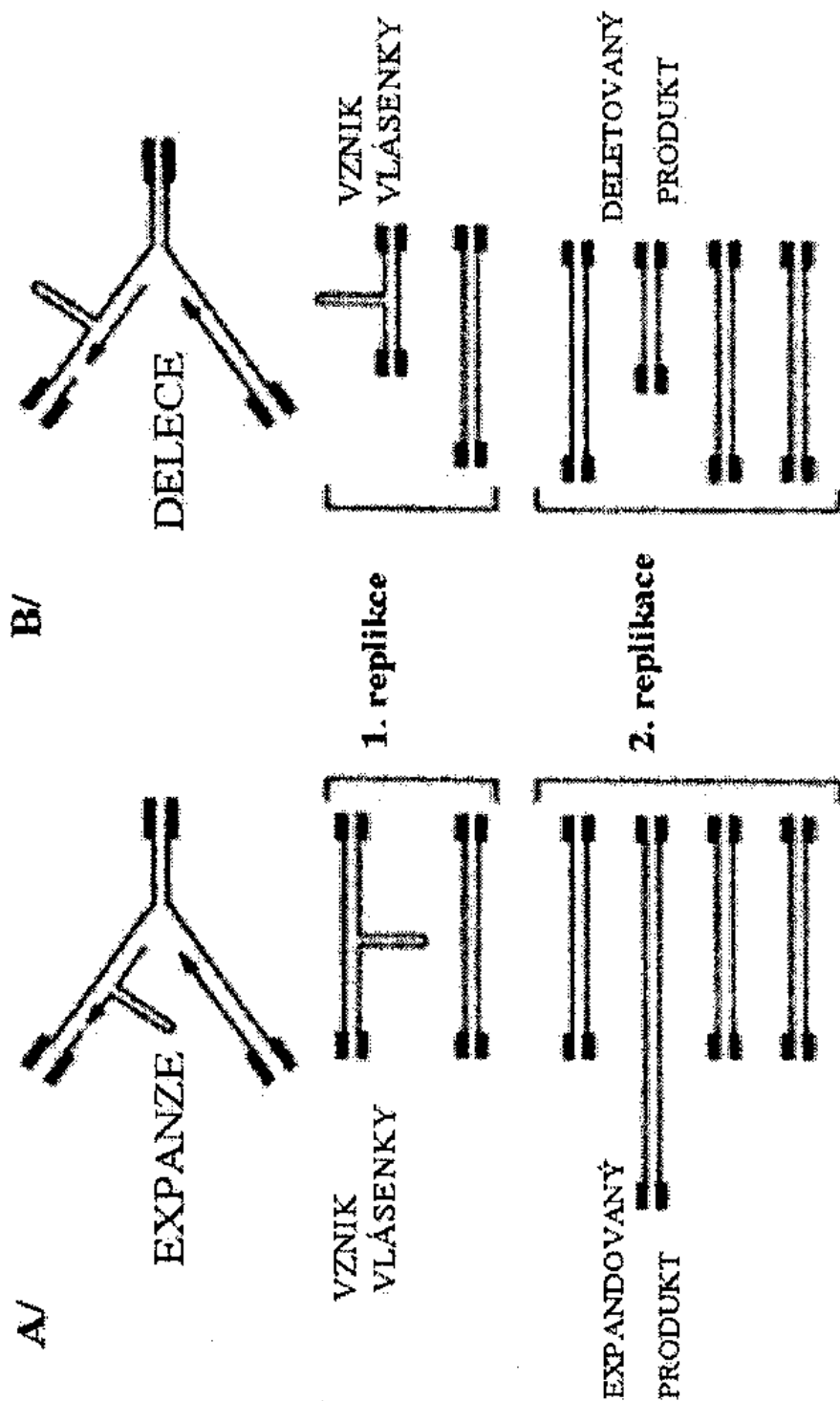
OBR. 2

Mechanismus vzniku vlásenek uvnitř trinukleotidových repetic a následných expanzí nebo delecí.

A.: Vznik expanzí. Vlášenka se po vzájemném posunu opožďujícího se templátového a nascentního řetězce tvoří na nascentním řetězci syntetizovaném pomocí Okazakiho fragmentů. Během replikace pak dochází k opětovné (nebo několikanásobné) syntéze určité části repetitivní sekvence.

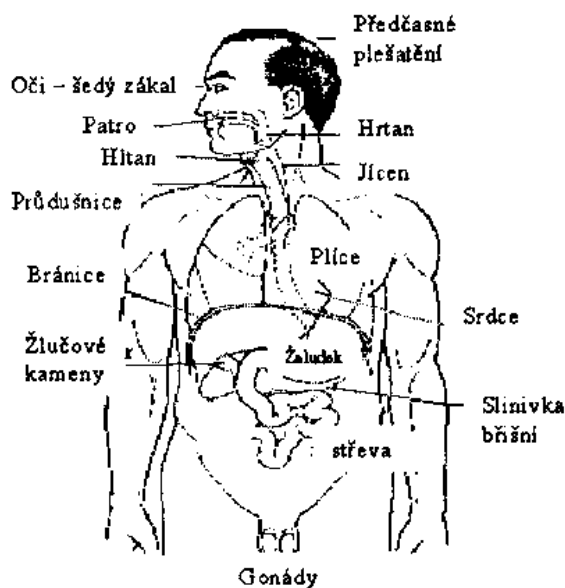
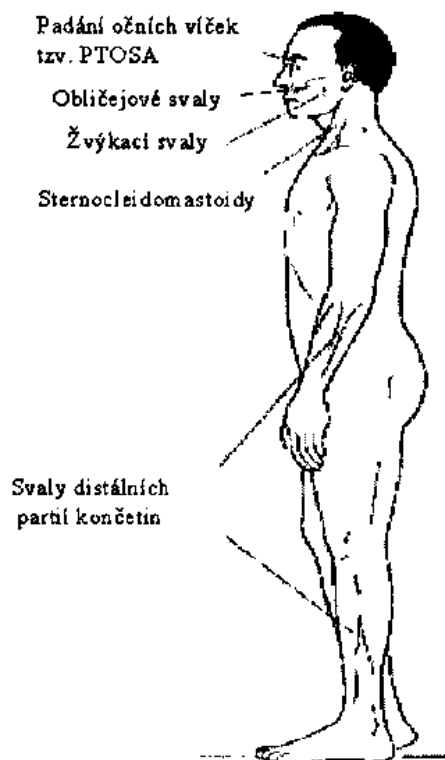
B.: Vznik delecí. K delecím dochází pokud se vlášenka vytvoří na templátovém řetězci. Sekvence zahrnutá ve vlásence se stává nepřístupnou pro replikaci a je polymerasou přeskočena.

□



OBR. 3

Základní klinické projevy myotonické dystrofie



POSTIŽENÉ SVALY

- myotonie – zpožděná relaxace svalů po kontrakci
- atrofie, progresivní slábnutí svalstva
- zhoršování příznaků v chladném prostředí
- změny na EMG

Ochablé obličejové svaly

- typický výraz obličeje, tzv. „maska“
- problémy při pití brčkem, neschopnost udržet vzduch ve tvářích, smích s obtížemi atd.

Svaly očí

- Ptosis – „padání“ víček

Žvýkáci svaly

- „dutý“ výraz tváří
- pootevřená ústa
- dislokace čelisti
- potíže při žvýkání a „cvakání“ zuby

Postižení svalů krku a ramen

(sternocleidomastoidy)

- potíže při zvedání hlavy (zejména v leže), při zvedání paží nad hlavu

Postižení distálních konců končetin

- předloktí a svaly ruky
- svaly kolena, holeně a nohy (nejistá chůze, zakopávání)

POSTIŽENÍ OSTATNÍCH SOUSTAV

Trávicí soustava

Larynx, pharynx, esophagus, jazyk, rty, patro

- nejasná, nosová výslovnost
- dysphagie – potíže při polykání, pocit uvízlé potravy v krku

Dýchací soustava

Trachea, plíce, diafragma

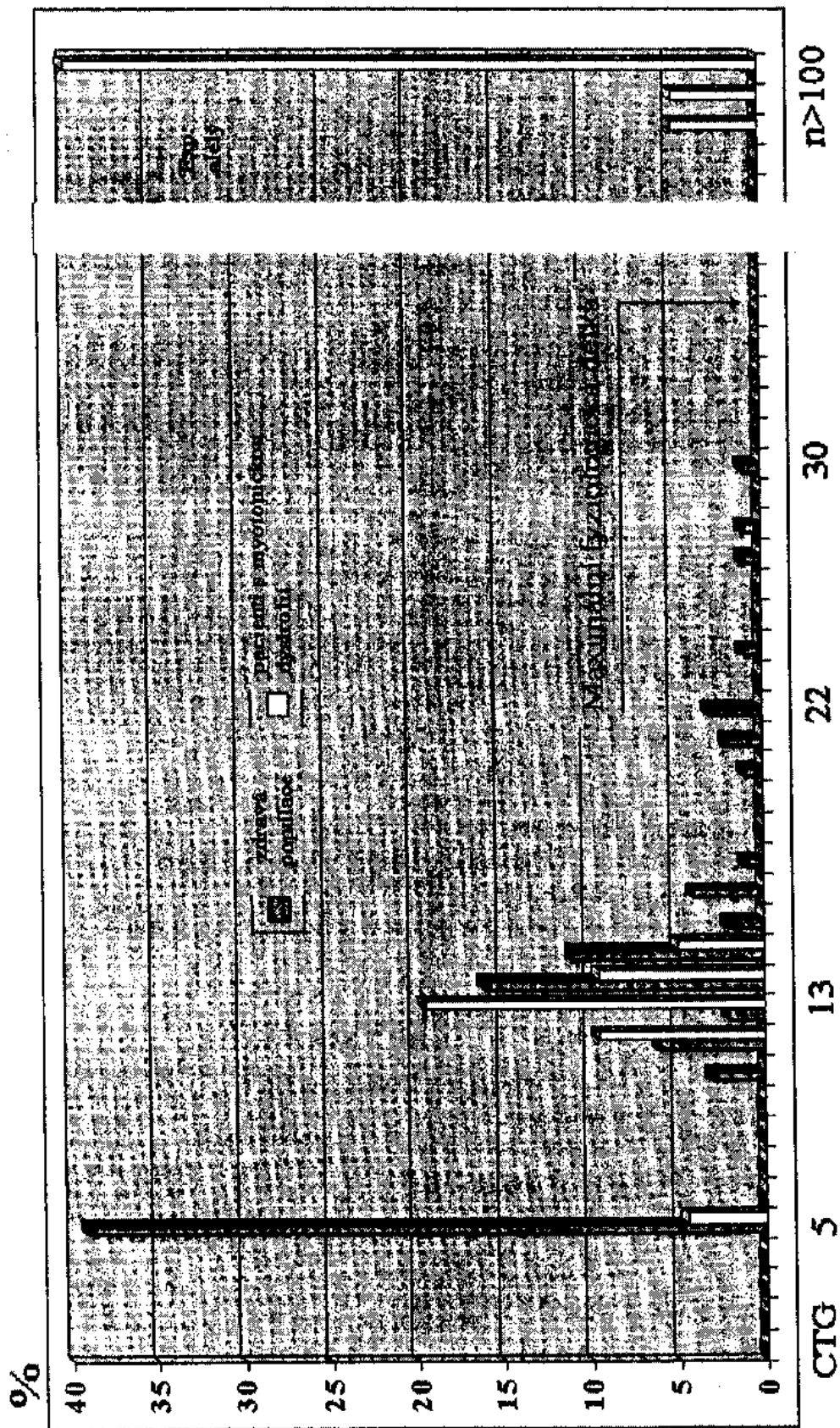
- dechová nedostatečnost, mělké dýchání
- aspirace potravy do plic – časté infekce (až pneumonie)

Endokrinní systém

Atrofie varlat, žlučové kameny, cukrovka

Graf 1

Distribuce (CTG)n alel ve zdravé populaci a skupině pacientů s myotonickou dystrofií z oblasti jižní Moravy (převzato Falk, 2000).
 Tmavě šedé sloupce: zdravá populace, světlé sloupce: pacienti s myotonickou dystrofií. Výrazná je nižší četnost alely (CTG)₅ ve skupině pacientů oproti kontrolní zdravé skupině.



TAB. 1 Choroby způsobené expanzí CTG trinukleotidů uvnitř kódující sekvence

CHOROBY ZPŮSOBENÉ EXPAZÍ TRINUKLEOTIDŮ										
choroba	chromosom	repetice (n)	typická početní variace	počet počet opakování	pozitivní gen	protein	incidence (typická)	typická dědičnost	testovací strategie v genu	
Choroby způsobené expanzí v kódující oblasti genu										
Huntingtonova choroba	4p16.3	CAG	11-34	35-121	IT-15	huntingtin	1:5000 až 1:15000	AD	ORF	
Správně a špatně muskulární ataxie (Kornhuberova choroba) SBMA	Xq11-12	CAG	12-34	>40	SBMA	SBMA androgen rec.(AR)	?	XR	ORF	
Spinocerebellární ataxie typu I (New River syndrom)	12p12-13	CAG	7-25	54-70		atrofin I		AD	ORF	
Machajová-Josephova choroba MJD (SCA 3)	14q32.1	CAG	12-40	(68-78) více než 61	MJD 1 SCA3	SCA3/MJD1	1:50000	AD	ORF	
Správně a špatně cerebelární ataxie typu 1 (olivopontocerebelární ataxie)	6p22-23	CAG	6-39	39-83	SCA1	ataxin I	?	AD	ORF	
Správně a špatně cerebelární ataxie typu 2	12q24.1	CAG	15-31	34-220	SCA2	ataxin2	?	AD	ORF	
Správně a špatně cerebelární ataxie typu B	19p	CAG	6-17	21-30	CACNL1A4	podjednotka alfa1A napětím řízeného kalciového kanálu	?	AD	ORF	
SCA7	3p21.1-p12	CAG	4-19	37-300	SCA7	ataxin7	?	AD	ORF	

TAB. 2
Choroby způsobené expanzí CTG trinukleotidů uvnitř nekódující sekvence (3'-UTR, 5'-UTR, intron)

CHOROBY ZPŮSOBENÉ EXPANZEMÍ TRINUKLEOTIDŮ									
Choroba	Chromosom	typová struktura trypsa	fyziologický proces opakování	patolog. proces opakování	postih pohlaví ženy a muži	proteiny produkční	inžený rybní bi	inžený rybní bi	lokální zavaz expan- ze v geniu
Choroby způsobené expanzí v nekódujících oblastech genu									
Myofonická dystrofie	19q13.3	CTG	12-38	50 to >několik tisíc	DMPK	DMPK prof. kinase	1:8000 až 1:8500	AD	3'-UTR
Syndrom fragility X (FRAXA)	Xq27.3	CGG	5-54 (60-230 premutace)	230 až >2000	FMR-1 (FRAXA)	RNA vazebný protein	1:1250 muži 1:2000 ženy	XD	5'-UTR
Friedreichova ataxie (FRDA)	9q13-21.1	GAA	7-22	200-900	FRDA1 X25	frataxin	1 až 2:50000	AR	Intron 1, uvnitř Alu sekvence

TAB. 3
Korelace mezi počtem CTG trinukleotidů a klinickým typem myotonické dystrofie

	premutace	klinická forma myotonické dystrofie	
		mírná	klasická neonatální
počet CTG trinukleotidů	35 - cca. 49	50 - cca. 150	100 - 1000 až 1500
propuknutí choroby ve věku	-	21 - 40 let	11 - 20 let
průměrná délka života	normální	64 let	48 - 55 let
klinické projevy	žádné postižení vyjimečně katarata katarakta	katarakta mírná myotonie	svalová slabost myotonie katarakta předčasné plešatění srdeční arytmie postižení endokrinního systému další
			těžká hypotonie respirační problémy postižení srdce mentální retardace další typický výraz obličeje "maska"

O Mendelově expozici v Brně a v Hynčicích

Průvodní text: J. Relichová

V Brně

O Mendelově expozici v Brně v prostorách Starobrněnského kláštera se v posledních měsících mnoho napsalo ve veřejných sdělovacích prostředcích a mnohdy to byly zprávy i rozporu plné, viděné jen z jednoho úhlu pohledu.

Současný stav je takový, že vlastní, již zastaralá expozice v refektáři kláštera je zrušena a tato část je připravena pro rekonstrukci. Nicméně ostatní zbývající části v interiéru i exteriéru je možné navštívit a pracovníci Mendeliana zajišťují odborný výklad jako dosud.

Od 11. dubna do konce května je také možné navštívit výstavu „Mendel a genetická informace“ v mramorových sálech Moravského zemského muzea na Zelném trhu, kterou připravili pracovníci Mendeliana. Jsou u zde vystaveny historické dokumenty vztahující se k životu a badatelské činnosti J. G. Mendela, ty, které byly součástí dosavadní expozice v klášteře, i dokumenty zcela unikátní.

Opat kláštera, pan Ing. Th.Dr. Evžen Martinec, OSA, vede intenzivní jednání o přípravě nové moderní expozice, pro kterou hodlá otevřít další nově zrenovované prostory Starobrněnského kláštera.

V Hynčicích

V Hynčicích se starají o zachování památky JGM a nyní především o záchranu rodného domu JGM. Za všechny lze jmenovat starostu obce Vražné, Ing. Vladimíra Nipperta, ředitele Okresního vlastivědného muzea v Novém Jičíně ing. Ivo Otáhal a Mgr. Janu Markovou, zástupkyni ředitele Církevní střední školy a Střední zdravotnické školy sv. Anežky České.

Pro vaši informaci uvádíme původní námět na využití rodného domu JGM, který zpracoval ing. Ivo Otáhal. Tento vstupní námět je na základě četných jednání s různými institucemi dopracováván a upřesňován.

Rodný dům Johanna Gregora Mendela ve Vražném – Hynčicích: problém záchrany a regenerace

Rodný dům Johanna Gregora Mendela (zapsán ve státním seznamu nemovitých kulturních památek - č. r. 8 - 1698) je jednopatrová hospodářská usedlost na půdorysu tvaru písmene „L“. Součástí usedlosti je obytný trakt s chlévy, k němuž je v pravém úhlu přistavena neomítaná stodola, hospodářská budova a zděný výměnek. Usedlost, jejíž hospodářská část je v havarijním stavu, je v současné době nabízena v realitní kanceláři ke koupi v hodnotě 1 600 000,- Kč. K usedlosti se přimyká poměrně rozsáhlá zahrada, která je nevyužívaná. Statek je prázdný a neobývaný. Ve dvou místnostech bývalé obytné části se nachází expozice věnovaná životu a dílu Johanna Gregora Mendela, v současné době silně zastaralá, obsahově, formálně i rozsahem nedostačující významu osobnosti, která se na statku narodila.

Okresní vlastivědné muzeum v Novém Jičíně jako zřizovatel a provozovatel expozice je v této souvislosti postaveno před náležitý úkol vybudování moderní a důstojné expozice Johanna Gregora Mendela a to u příležitosti 180. výročí narození v roce 2002. Problém omezenosti stávajících expozičních prostor, stavební stav objektu a nejasnost budoucích majetkových poměrů v případě usedlosti, které se ukazují jako navzájem provázané a neoddelitelné, nastolují úvahu o komplexním způsobu ochrany objektu a jeho regenerace, kam náleží jeho vykoupení, převedení do majetku Okresního vlastivědného muzea v Novém Jičíně a nalezení smysluplného využití takto získaných prostor.

Jako výhodné se v tomto případě jeví využití 1. a 2. podlaží obytné části statku pro účely moderně pojaté expozice o životě a díle Johanna Gregora Mendela se zaměřením na regionální kořeny zájmu o šlechtění a přírodovědu na bývalém Kravařsku.

Další možné využití:

- Část usedlosti včetně bývalé hospodářské části modelovat jako ukázkou statku na Kravařsku s využitím bohatých národopisných sbírek novojičínského muzea, nacházejících se převážně v depozitářích.
- Využití části statku rovněž pro depozitáře muzea. V této souvislosti statek zabydlet vybudováním malého bytu pro správce objektu, který by vykonával ochranu objektu, průvodcovské služby, údržbu.
- Část bývalého výminku nabídnout Přírodovědecké fakultě Ostravské univerzity pro vybudování terénní stanice s možností ubytování studentů přímo na statku.
- Areál zahrady přebudovat na volně pojatý sad ohrožených a vzácných dřevin a keřů, který by demonstroval sepjetí Mendelovy genetiky s dneškem.

Veškeré aktivity spojené s rodným domem a statkem mají na mysli skutečnou regeneraci objektu s ohledem na význam kulturní památky, význam Mendelův a přiblížení jeho učení co nejširšímu spektru zájemců.

Takto pojatý záměr předpokládá mimo řádově nemalých finančních prostředků taktéž spolupráci s řadou institucí:

- Moravské zemské muzeum - Mendelianum
spolupráce na vybudování moderní expozice J. G. Mendela
- Ostravská univerzita
spolupráce na vybudování terénní stanice
- Chráněná krajinná oblast Poodří
- Státní ústav památkové péče a Památkový ústav Ostrava
- Obecní úřad Vražné
- další spolupracující instituce
- zahraniční nadace, spolky krajanů, grantové organizace

ing. Ivo Otáhal

Paní Mgr. Jana Marková nám na požádání poslala aktuální informaci týkající se současného stavu jednání o rodném domě JGM:

Rodný dům Johanna Gregora Mendela v Hynčicích ve Slezsku

Ráda bych se s vámi podělila o poslední zprávy, které se týkají záchrany rodného domu J. G. Mendela v Hynčicích.

Pravděpodobně víte, že tento dům je v současné době v soukromém vlastnictví čtyř sester, které se nemohou nadále starat o tuto kulturní památku v tom smyslu, že by se pustily do jeho náročné rekonstrukce, a proto se rozhodly domek p rodát. Před několika lety přednostně nabídly dům k odprodeji státu, ten však tuto možnost – slovy úředníka – odmítl. V současné době je tedy domek volný k prodeji komukoliv a k jakýmkoliv účelům. Sestry však naštěstí stále doufají, že se podaří získat finanční prostředky pro koupi a následnou rekonstrukci domu státním orgánům či Nadačnímu fondu rodného domu Johanna Gregora Mendela, aby kulturní památka zůstala zachována v původní podobě a k původním účelům.

Malá skupina lidí začala intenzívně hledat pomoc, aby koupě domu byla možná v co nejkratší době. Vynechám celou genezi učiněných kroků, dobrých a následně negativních zpráv, které vycházely z různých stran, včetně ministerstva kultury. Do celé kauzy se zapojila paní senátorka RNDr. Jitka Seitlová, která začala iniciovat mnohá jednání na různých úrovních. Při poslední schůzce, která se konala 18. dubna 2001 v Praze, se sešli zástupci různých orgánů a institucí zainteresovaní v celé věci a pokusili se najít možnosti řešení. Na jednání byli přítomni: paní senátorka RNDr. Jitka Seitlová, pan senátor prof. PhDr. Josef Jařab, CSc., Dr. h. c., ředitel Odboru ochrany movitého kulturního dědictví muzeí a galerií Ministerstva kultury Ing. Pavel Jirásek, ředitel Moravského zemského muzea v Brně PhDr. Petr Šulěř, zástupce odboru kultury Krajského úřadu Moravskoslezského kraje Mgr. Tomáš Moravec, ředitel Okresního vlastivědného muzea v Novém Jičíně Ing. Ivo Otáhal a starosta obce Vražné (Hynčice jsou součástí této obce) Ing. Vladimír Nippert.

Přítomní se shodli na tom, že je nutné co nejdříve dům odkoupit (v této etapě si určili možné směry), dále je třeba vědět, kde lze získat finanční prostředky na rozsáhlou rekonstrukci celého objektu, a v neposlední řadě zvažovali možnost využití celého komplexu budov, včetně nové expozice v samotném rodném domu Johanna Gregora Mendela. Přínosné je jistě i to, že do celé kauzy se aktivně zapojil také krajský úřad Moravskoslezského kraje a přislíbil podporu. Podnětné náměty pro budoucí expozici v rodném domě J. G. Mendela i využití přilehlých budov přednesl ředitel MZM v Brně. Pomoc při finančním zajištění následných programů pak přislíbil i zástupce Ministerstva kultury. V závěru jednání paní senátorka shrnula kroky, které budou v příštích dnech učiněny, a vyslovila naději, že se podaří přivést celý případ ke zdárnému konci.

Jisté však je, že ještě není vyhráno a že bude nutné, aby každý člověk, který si uvědomuje velikost osobnosti Johanna Gregora Mendela a jeho historický i současný význam, nevynechal jedinou příležitost možné pomoci při záchraně rodného domu otce genetiky a poskytl svůj nápad, své schopnosti i své možnosti k podpoře celého projektu. Bylo by dobré se obrátit na kteréhokoliv účastníka pražského jednání a svým hlasem i činem se připojit k této záslužné aktivitě. Uvádím také svůj kontakt a za jakékoliv podnětné náměty děkuji.

Jana Marková
U Nemocnice 5
742 35 Odry
0605-957790



E-mail: jana.zmarku@cbox.cz

V rámci zmíněných aktivit v regionu rodiště JGM byla vyhlášena celorepubliková soutěž Mendelovy Hynčice“, jejíž první ročník se uskutečnil letos počátkem dubna. Informaci o této akci podává v následujícím článku Mgr. Jana Marková. Organizátoři uvítají jakoukoli pomoc při zajišťování dalších ročníků této soutěže.

Mendelovy Hynčice 2001

Vážení čtenáři, dovoluji vám, abych vás informovala o finále celostátní akce Mendelovy Hynčice, kterou připravila Církevní střední škola a Střední zdravotnická škola sv. Anežky České Odry ve spolupráci s Gymnáziem Vítkov a obcí Vražné.

Nová biologická soutěž Mendelovy Hynčice 2001 zaujala 16 studentů středních škol z celé naší republiky. Studenti vypracovali kompilační práce na téma „Život a dílo Johana Gregora Mendela“ a 3. dubna 2001 přijeli do obce Vražné, aby před odbornou porotou obhájili svá díla. Finále nultého ročníku nové soutěže se konalo v prostorách Základní školy Vražné a pozvání přijali kromě přihlášených studentů také hosté – asistentka senátorky RNDr. Jitky Seitlové paní Mgr. Blažena Mačáková, ředitel Vlastivědného muzea v Novém Jičíně Ing. Ivo Otáhal, PhDr. Sylvie Dvořáčková z Vlastivědného muzea v Novém Jičíně, majitelky rodného domu Johanna Gregora Mendela a řada dalších.

Odborná porota ve složení předseda - prof. MUDr. Augustin Svoboda, CSc., předseda Biologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, a členové - PhDr. Jiří Sekerák, vedoucí Mendeliana při Moravském zemském muzeu v Brně, Mgr. Alena Kulíšková a Mgr. Josef Bryja - neměla jednoduché rozhodování. Téměř všichni studenti přiznali, že, než se přihlásili do této soutěže, neměli o osobnosti Johanna Gregora Mendela mnoho znalostí, snad jen tušili jeho nějaký vztah ke genetice. Všichni se však shodli, že právě díky zpracování své práce se mohli blíže seznámit s touto světově uznávanou osobností, která je považována za otce genetiky, ale která se rovněž velkým dílem přičinila o řadu oborů z meteorologie, ovocnářství, včelařství a dalších disciplín. Nebyl opomenut ani fakt, že Johann Gregor Mendel byl knězem a později opatem augustiniánského kláštera v Brně.

Vyhlášení vítězů proběhlo, stejně jako celá soutěž, v příjemné atmosféře a ocenění byli všichni zúčastnění pamětními listy a pamětními medailemi Johana Gregora Mendela. Vítězem nultého ročníku se stala studentka Gymnázia Šternberk Michaela Vymyslická, druhé místo obsadily studentky Gymnázia T. G. Masaryka ze Zastávky u Brna Jana Fúdorová a Helena Sedláčková, na třetím místě se pak umístila studentka Gymnázia Vítkov Lenka Štrublíková, která zaujala svou prací na téma „Dětství Johanna Gregora Mendela a záchrana jeho rodného domu v Hynčicích.“

Po vyhlášení vítězů se všichni přítomní odebrali na prohlídku rodného domu Johanna Gregora Mendela, kde první dojmy ze soutěže a starosti kolem Mendelova rodného domu zachytili redaktoři České televize z Ostravy.

Poté jsme se za slunečného počasí rozloučili s přáním, aby soutěž Mendelovy Hynčice proběhla stejně dobře i při jejím 1. ročníku v roce 2002, nad kterým převzala záštitu Česká komise pro UNESCO.

V závěru bych ráda poděkovala panu starostovi obce Vražné Ing. Vladimíru Nippertovi, Základní škole ve Vražném v čele s paní ředitelkou Mgr. Janou Šlapkovou, firmě paní Ivany Sochorové a oběma ředitelstvím pořádajících škol za podporu celé akce a rovněž za vstřícnost při organizaci soutěže.

Jana Marková

..... *R. Wood - V. Orel: Genetic Prehistory in Selective Breeding – A Prelude to Mendel*

Rádi upozorňujeme na knihu doc. Ing. Vítězslava Orla, čestného člena GSGM, o to raději, že doc. Orel se letos dožívá významného životního jubilea, a to v plné tvůrčí činnosti.

GRATULUJEME a přejeme hlavně hodně zdraví.

Výbor GSGM

OXFORD
UNIVERSITY PRESS



GENETIC PREHISTORY IN SELECTIVE BREEDING A Prelude to Mendel

Roger Wood, *University of Manchester*, and
Vitezslav Orel, *Emeritus Head of Mendelianum, Brno, Czech Republic*

- The first detailed account of the spread of the Merino sheep into northern European countries and Australia
- The most comprehensive treatment to date of Robert Bakewell's sheep breeding achievements
- Detailed coverage of the Brno Sheep Breeder's Society – central to development of ideas about heredity

Before Mendel, who came closest to the truth about heredity? This book examines the activities of sheep breeders able to transform the appearance and qualities of their stock by combining different traits of body or wool into new patterns. Exploiting what were then untried procedures - individual trait selection, very close inbreeding and progeny testing - they demonstrated inheritance from both sexes and showed how it could be stabilised. Major advances in breeding are associated with the English farmer Robert Bakewell (1725-1795). By the following century, when the same procedures had been established at breeding centres in central Europe, theory as well as practice became the subject of wider attention. In the Brno Sheep Breeders' Society, discussions of patterns of heredity instigated also the application of artificial fertilization in plant breeding, what was hybridization, and finally gave way to the physiological question, 'What is inherited and how?' The question was posed by Cyrill Napp, abbot of the monastery to which Mendel was admitted six years later.

Contents: The elusive law; The fleeces of Spain; Sheep breeding sets new standards; The Bakewell system; Bakewell becomes a celebrity; Merinos in Sweden, France and Great Britain; Merinos in German speaking countries and Australia; Ferdinand Geisslern, the Moravian Bakewell; Towards a theory of heredity; The sheep breeders' legacy to Mendel.

336 pages, 7 halftones, 18 line figures, June 2001
0-19-850584-1, Hardback £49.50

Visit our website at
www.oup.co.uk

GENETICKÁ SPOLEČNOST GREGORA MENDELA

(STANOVY SPOLEČNOSTI)

I. Poslání a cíle společnosti

§ 1

(1) GENETICKÁ SPOLEČNOST GREGORA MENDELA (dále jen GSGM) je dobrovolné sdružení pracovníků zabývajících se genetikou, a to jak profesí onálně, tak soukromě z vlastního zájmu. Cílem GSGM je sdružovat genetické pracovníky a zájemce o genetiku, zprostředkovávat odbornou komunikaci mezi nimi navzájem i se zahraničními genetiky, zajišťovat jejich informovanost o nejnovějších směrech a poznatcích v oboru genetiky, vytvářet podmínky pro prezentaci jejich vědeckovýzkumné práce v oboru genetiky a podílet se na koncepční, poradenské, prognostické a jiné činnosti v tomto oboru.

(2) GSGM vznikla jako sdružení registrací ve smyslu zák.č. 83/1990 Sb.

(3) GSGM se vyčlenila z Československé biologické společnosti. Navazuje na program a činnost její Sekce pro obecnou genetiku (přejmenovanou v roce 1990 na GSGM), a je proto v tomto smyslu pokračování této sekce jako samostatná společnost.

§ 2

(1) GSGM je právnickou osobou a vykonává činnost v souladu se svým posláním.

(2) GSGM působí na územích České Republiky a Slovenské Republiky. Sídlem GSGM je Brno (Česká Republika).

§ 3

(1) Své poslání a cíle uvedené v § 1 odst. (1) GSGM naplňuje zejména tím, že

- a/ organizuje a pořádá vědecké konference, semináře, pracovní setkání, přednášky, diskuze, školící kurzy, tématické zájezdy a jiné obdobné společenské akce, zaměřené na genetickou problematiku;
- b/ zpracovává a předkládá příslušným odborným pracovištím, státním orgánům a ostatním subjektům návrhy, podněty a doporučení k opatřením, týkajícím se oboru genetiky;
- c/ vyjadřuje se k vědecké a publikační činnosti a dalším vědeckým a odborným aktivitám v oboru genetiky;
- d/ podle možností vypisuje soutěže a oceňuje významné výsledky pedagogické, vědeckovýzkumné a odborné činnosti v oboru genetiky;
- e/ vydává písemný informační bulletin a popř. i další písemné materiály, zaměřené na problematiku genetiky a poskytující informace o tuzemských i zahraničních akcích souvisejících s problematikou genetiky;
- f/ poskytuje svým členům odbornou pomoc.

(2) GSGM spolupracuje s Československou biologickou společností i s dalšími českými a slovenskými vědeckými společnostmi. V zahraničí spolupracuje především s genetickými společnostmi sdruženými ve FEES (Federation of European Genetic Societies).

Členství

§ 4

(1) Členství v GSGM je řádné nebo čestné.

(2) Členem GSGM může být fyzická osoba starší 18 let, jestliže písemně požádá o členství v GSGM a písemně prohlásí, že bude v GSGM působit ve smyslu jejích stanov. O přijetí za člena rozhoduje výbor GSGM.

(3) Fyzické osoby mladší 18 let mohou být čekateli na členství. Čekatelé mají právo využívat všech výhod GSGM, nemohou však volit a být voleni do samosprávných orgánů GSGM. Dověšením věku 18 let se čekatelé na členství automaticky stávají členy GSGM se všemi právy a povinnostmi řádných členů GSGM.

(4) Čestným členem GSGM se může stát významný domácí (tzn. český nebo slovenský) nebo zahraniční vědecký odborník, působící v oboru genetiky, nebo i vědecký pracovník z jiného oboru, který se význačným způsobem zasloužil o rozvoj genetiky. Čestný člen je zproštěn povinnosti platit členské příspěvky. Čestní členové jsou voleni plénem GSGM po projednání a předložení příslušného návrhu na čestné členství výborem GSGM.

Práva členů

§ 5

(1) Každý řádný i čestný člen má právo:

- a/ zúčastňovat se všech akcí pořádaných GSGM a být informován o termínech jejich konání a o jejich programu;
- b/ být informován o činnosti GSGM, tzn. dostávat zdarma a pravidelně informační bulletin GSGM a popř. i další písemné materiály připravované výborem GSGM pro informování členstva;
- c/ volit a být volen do samosprávných orgánů GSGM;
- d/ stát se členem odborných komisí, pracovních skupin a jiných odborných orgánů, pokud jsou v GSGM účelově ustaveny či jmenovány;
- e/ vyjadřovat se k činnosti GSGM a k práci jejího výboru, a předkládat, prosazovat a obhajovat svoje vlastní návrhy, podněty, iniciativy a kritické připomínky;
- f/ podávat návrhy na udělení čestného členství, popř. ocenění, čestného uznání či jiného vyznamenání GSGM, pokud je takové ocenění, uznání nebo vyznamenání udělováno;
- g/ jednat a hlasovat o všech návrzích podávaných výborem GSGM plénu nebo valnému shromáždění k rozhodnutí.

Povinnosti členů

§ 6

(1) Řádný člen GSGM je povinen zejména:

- a/ dodržovat stanovy GSGM a aktivně se podílet na její činnosti;
- b/ plnit povinnosti vyplývající z jeho příj. funkcí v samosprávných či jiných orgánech GSGM;
- c/ platit pravidelně ve stanovených termínech a ve stanovené výši členské příspěvky;
- d/ za všech okolností dodržovat všeobecně uznávané normy a zásady etiky vědecké práce.

(2) Čestný člen GSGM má stejné povinnosti jako řádný člen, kromě povinnosti platit členské příspěvky.

(3) Členské příspěvky ve výši stanovené a schválené podle § 8 odst. (2) písm. e/ platí všichni řádní členové GSGM, kromě čekatelů na členství (§ 4 odst. (3)) a studentů. Čekatelé na členství a studenti platí pravidelně ve stanovených termínech členský příspěvek v poloviční výši.

Zánik členství

§ 7

(1) Řádné nebo čestné členství v GSGM zaniká:

- a/ písemným prohlášením člena, že z GSGM vystupuje;
- b/ úmrtím člena;
- c/ vyloučením člena.

(2) Řádný nebo čestný člen může být z GSGM vyloučen pouze ze závažných důvodů, a to zejména tehdy, jestliže se prokazatelně provinil proti platným zákonům České Republiky (u českých členů) nebo Slovenské Republiky (u slovenských členů), nebo jestliže jeho jednání je v rozporu se stanovami GSGM.

(3) Řádný člen může být z GSGM vyloučen také pro neplacení členských příspěvků, a to po dobu nejméně dvou let, přičemž byl v průběhu této doby alespoň jednou prokazatelně k zaplacení dlužných členských příspěvků písemně vyzván.

(4) O vyloučení člena jedná a rozhoduje výbor GSGM na základě odůvodněného písemného návrhu kteréhokoli člena GSGM, a to na svém nejbližším zasedání. Proti rozhodnutí výboru GSGM se člen může odvolat k nejbližšímu valnému shromáždění GSGM, které je povinno odvolání projednat a sdělit prostřednictvím výboru GSGM členovi svoje konečné rozhodnutí. Proti rozhodnutí valného shromáždění již není odvolání.

(5) Zánikem členství nevzniká nárok na vrácení již zaplacených členských příspěvků.

(6) Vyloučený řádný člen může znovu požádat o členství v GSGM nejdříve po třech letech od svého vyloučení.

(7) Čestné členství, které zaniklo dobrovolným vystoupením člena nebo jeho vyloučením (§ 7 odst. (1) písm. a/ nebo c/) již nelze obnovit.

Samosprávné orgány GSGM

§ 8

(1) Samosprávnými orgány GSGM jsou:

- a/ plénum GSGM;
- b/ valné shromáždění GSGM;
- c/ výbor GSGM;
- d/ revizoři účtů GSGM.

(2) Plénum GSGM tvoří všichni členové GSGM. Plénum je nejvyšším samosprávným orgánem GSGM, který projednává, vyjadřuje se a rozhoduje o všech základních otázkách činnosti a existence GSGM. Do výlučné pravomoci pléna GSGM patří:

- a/ volba členů výboru GSGM;
- b/ volba revizorů účtů GSGM;
- c/ volba čestných členů GSGM;
- d/ schvalování stanov GSGM a jejich příp. změn, úprav a doplňků;
- e/ schvalování výše členských příspěvků GSGM;
- f/ schvalování příp. návrhu na zrušení GSGM.

(3) Ke všem bodům uvedeným v § 8 odst. (2) písm. a/ až f/ se plénum GSGM vyjadřuje tajným hlasováním, a to písemnou anonymní formou, kterou určí výbor GSGM. Příslušný návrh, o němž plénum hlasovalo, se pokládá za schválený, jestliže pro něj hlasovalo více než 50 % hlasujících členů GSGM, přičemž se hlasování musí zúčastnit alespoň 50 % všech členů GSGM.

(4) Valné shromáždění GSGM je svoláváno výborem GSGM podle potřeby, nejméně však jednou za tři roky. Výbor GSGM je kromě toho povinen svolat valné shromáždění, požádá-li o to nejméně 10 % členů GSGM. Na každé valné shromáždění musí být pozváni všichni členové GSGM. Valné shromáždění pak představují ti členové GSGM, kteří se ho osobně zúčastnili, přičemž ve svém souhrnu na tomto valném shromáždění musí tvořit nejméně 10 % veškerého členstva GSGM. Za této podmínky je valné shromáždění GSGM usnášeníschopné a může právoplatně hlasovat.

(5) Písemné pozvánky na valné shromáždění musí obsahovat navržený program jednání a všechny příslušné návrhy, které výbor GSGM předkládá valnému shromáždění k projednání a schválení. Pozvánky musí obdržet všichni členové GSGM nejméně dva měsíce před vlastním zasedáním valného shromáždění.

(6) Do výlučné pravomoci valného shromáždění GSGM patří projednávání a schvalování:

a/ zprávy o činnosti výboru GSGM za uplynulé funkční období;

b/ zprávy revizorů účtů GSGM o hospodaření společnosti v uplynulém tříletém období od posledního zasedání valného shromáždění GSGM;

c/ zásad a základních směrů činnosti GSGM pro následující funkční období;

d/ rozpočtu GSGM pro následující funkční období;

e/ návrhů na členy výboru GSGM na následující funkční období (o nichž pak následně hlasuje plénum GSGM, viz § 8 odst. (2) písm. a/);

f/ návrhů na příp.změny, úpravy a doplňky stanov GSGM (o nichž pak následně hlasuje plénum GSGM, viz § 8 odst.(2) písm. d/).

(7) K bodu, týkajícímu se návrhů členů výboru GSGM, uvedenému v § 8 odst. (6) písm. e/ se na valném shromáždění hlasuje tajně. Příslušný návrh se pak pokládá za schválený, pokud pro něj hlasovalo více než 50 % přítomných členů GSGM.

(8) Výbor GSGM je organizačním orgánem, který organizuje a řídí činnost společnosti. Výbor GSGM se skládá z předsedy, tří místopředsedů, tajemníka, dvou hospodářů, výkonného redaktora informačního bulletinu a dalších pěti členů. Do těchto funkcí jsou členové výboru voleni tajným hlasováním výborem GSGM.

(9) Funkční období výboru GSGM je tříleté.

(10) Výbor GSGM se schází nejméně dvakrát ročně. Jeho hlavní činností je:

a/ organizace a řízení činnosti GSGM podle zásad a hlavních směrů činnosti společnosti s schválených valným shromážděním GSGM;

b/ organizace a příprava seminářů, celostátních vědeckých konferencí a dalších celospolečenských akcí GSGM;

c/ příprava programu a svolávání valného shromáždění GSGM;

d/ projednávání a příprava návrhů pro valné shromáždění GSGM podle § 8 odst. (5);

e/ příprava a předkládání návrhů, schválených valným shromážděním, plénu GSGM;

f/ projednávání, schvalování a tématická příprava náplně jednotlivých čísel informačního bulletinu GSGM a organizační zajištění jeho vydávání;

g/ vedení účtů GSGM a hospodaření s finančními prostředky GSGM podle rozpočtu schváleného valným shromážděním.

(11) Revizoři účtů GSGM dohlíží na hospodaření s finančními prostředky GSGM. Pro dané funkční období jsou plénem GSGM voleni vždy dva revizoři (jedním z České republiky a druhým za Slovenskou republiku). Za svou činnost se zodpovídají valnému shromáždění GSGM, kterému

předkládají svou zprávu o hospodaření GSGM v daném funkčním období. Ve svojí revizní činnosti se řídí právními předpisy, obecně platnými v České Republice a ve Slovenské Republice. Jejich funkční období je tříleté.

Právní postavení, majetek a hospodaření

§ 9

- (1) Statutárním zástupcem GSGM je předseda výboru GSGM, který může pro jednotlivé dílčí úkoly, vyplývající z této funkce, písemně pověřit některého z dalších členů výboru GSGM;

§ 10

- (1) K materiálnímu zabezpečení činnosti GSGM slouží:
 - a/ členské příspěvky;
 - b/ dotace;
 - c/ dary a dědictví;
 - d/ zisky z vlastní činnosti GSGM, zejména z pořádaných vědeckých akcí.
- (2) Za hospodaření GSGM, za dodržování finančních předpisů a kontrolu účetních dokladů, za čerpání prostředků v souladu s obecně platnými zákonnými předpisy a rozhodnutími výboru GSGM odpovídá hospodář výboru GSGM.
- (3) V případě zániku GSGM rozhoduje o majetkovém vypořádání příslušná likvidační komise GSGM, která bude k tomu účelu jmenována plénem GSGM.

Přechodná a závěrečná ustanovení

§ 11

- (1) Tyto stanovy nabývají účinnosti dnem registrace GSGM.
- (2) Kterýkoli člen GSGM má právo předkládat návrhy a podněty na změny, úpravy a doplňky ve stanovách GSGM. Svůj návrh podává písemně výboru GSGM, který je povinen jej projednat na svém nejbližším zasedání a následně jej se svým vyjádřením předložit k projednání a ke schválení nejbližšímu valnému shromáždění GSGM, které připraví konečný návrh těchto změn pro jeho předložení a schválení plénem GSGM. Změny stanov schválené plénem GSGM jsou pak výborem GSGM oznámeny ve smyslu § 11 odst. (1) zák.č. 83/1990 Sb. Ministerstvu vnitra České republiky a nabývají účinnosti dnem, kdy toto ministerstvo písemně oznámí, že je bere na vědomí.
- (3) Toto znění stanov připravil a schválil výbor GSGM dne 1.listopadu 2000, projednalo a schválilo valné shromáždění GSGM dne, a schválilo plénum GSGM dne.....