

1.LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

Pojem genu a některé jeho etické konsekvence

Disertační práce

Mgr. Věra Franková, PhD

2009

Obsah

1. Úvod	6
2. Gen a jeho historie	9
2.1. Genetika před genem	10
2.2. Od gemmulí ke genu - zavedení genetických jednotek	15
2.3. Od klasické genetiky po molekulární biologii	17
2.4. Krize genu	28
2.4.1. Genetika bez genů?	28
2.4.2. Gen je mrtev! Ať žije gen!	30
2.5. Od genů po genomy	32
2.6. Současné molekulární definice genu a jejich problémy	37
2.6.1. Regulace genů	40
2.6.2. Sestřih RNA	41
2.6.3. Překrývající se geny	42
2.6.4. <i>Trans</i> -sestřih	44
2.6.5. RNA editace	44
2.7. Doba post-genomová a ještě více problémů	45
2.8. Shrnutí	51
3. Co je gen?	53
3.1. Jsou ještě jiné ‚geny‘?	57
3.1.1. Evoluční koncept genu	57
3.1.2. Koncept genu jako tvůrce rozdílů.	59
3.2. Gen je informace pro vytvoření znaku	61
3.3. Co dědíme?	63
3.3.1. Informace nebo hmota?	63
3.3.2. Epigenetika	65
3.3.3. Vnější prostředí	68
3.4. Realizace informace genu – vznik fenotypu	70
3.5. Koncept informace v genetice	71
3.6. Shrnutí	76
4. Genetik jako tlumočník	78

4.1.	Co je genetické testování?.....	80
4.2.	Proč je genetické testování „jiné“?.....	81
4.3.	Prediktivní genetické testy.....	83
4.4.	Některé problémy DNA diagnostiky.....	85
4.5.	Genetické poradenství.....	87
4.6.	Komerčně nabízené prediktivní genetické testy.....	90
4.7.	Shrnutí	94
5.	Závěr	96
6.	Seznam použité literatury	98

1. Úvod

Genetika je rozsáhlý obor zabývající se variabilitou a dědičností všech živých organismů. Základy genetiky jako oboru jsou spojovány s českým badatelem Johannem Gregorem Mendelem, který jako první v roce 1865 matematicky vyjádřil štěpné poměry znaků v druhé filialní generaci hybridů (Mendel 1865). Taktéž jako první dopěl k představě, že se nedědí znaky jako takové, ale jejich základy (Elemente), které jsou dnes označovány jako geny. Od publikace výsledků Mendelových objevů uplynulo více než 140 let. Během této doby bylo učiněno v tomto vědním oboru mnoho zásadních objevů, na jejichž základě byly objasněny molekulární základy dědičnosti. Metody moderní - molekulární genetiky začaly ve druhé polovině minulého století pronikat do většiny biologických oborů. A poznatky, které na základě těchto metod byly učiněny, zásadním způsobem ovlivnily naše představy o původu života na této planetě a jeho biologických zákonitostech.

Stejně jako se vyvíjela genetika, vyvíjel se i význam a obsah pojmu genu. Poprvé tento pojem použil v roce 1909 Wilhelm Johannsen, který jím označil teoretickou jednotku genetické analýzy (Johannsen 1909). Projevy genů byly v té době studovány, aniž by byla známa povaha geneticky aktivní hmoty a biologické mechanismy podílející se na dědičnosti. Johannsenův gen v podstatě neměl definici, byl pouze teoretickou jednotkou genetické analýzy. Definice genu se proto ve 20. století s novými objevy na poli genetiky měnila. V počátcích genetiky byl gen chápán jako abstraktní jednotka, jejíž existence byla prokázána přenosem

znaků mezi generacemi. S objevem funkce DNA a stanovením její struktury byla úloha genu do určité míry redukována, dědičnost získala v molekule DNA svoji hmotnou podstatu. Molekulární koncept genu používaný v současné biologii je založen na tom, že DNA sekvence a její genový produkt si navzájem lineárně odpovídají (Waters 2007). Tento koncept se však stal ve světle poznatků získaných výzkumem genomů různých organismů, včetně genomu člověka, již nevyhovujícím (např. Gerstein et al. 2007, Gingeras 2007, Griffiths a Stotz 2006). Definice genu neodpovídající stupni poznání a jeho značně vágní koncept v molekulární genetice podnítily některé filozofy zabývající se biologií k jeho kritice a snaze o nahrazení jinými pojmy (např. Burian 2004, Falk 1986, Portin 1993 a 2002). Přesto je v současné době pojem genu v biologické a medicínské terminologii hojně používán a geny zřejmě tento odborný diskurs neopustí.

Cílem této práce je proto vymezit pojem genu a to za použití výkladu mechanického, sémantického a hermeneutického (Payne 2002a, 101-124; Payne 2008, 50-77, 90-94). V části zabývající se historií genu se seznámíme především s mechanickým výkladem a zároveň se pokusíme prokázat, že současné definice genu jako spojitého segmentu molekuly DNA neodpovídají recentním poznatkům genetiky a genomiky. V rovině sémantické bude poukázáno na to, že přestože je gen v biologickém výkladu skoro vždy bezprostředně spojován s molekulou DNA, jeho podstata není materiální, ale má charakter informace. DNA v procesu přenosu informace z generace na generaci funguje pouze jako prostředník či nosič. *Gen je tudíž informace obsahující instrukci pro vytvoření fenotypového znaku, který je vymezen dle klinického či jiného teoretického zájmu.* Z dřívějších i recentních poznatků genetiky a genomiky je zřejmé, že komplexita organismů není založena

pouze v jejich genech, ale podílí se na ní zřejmě celá řada faktorů vnitřního a vnějšího prostředí a jejich vzájemné interakce. Gen musí být proto vykládán – interpretován v souvislostech se všemi dalšími faktory, které přinášejí další informace nutné k jeho realizaci. Podrobný rozklad problematiky spojené s realizací informace genů a prokázáním jejich funkce by přesáhl rámec tohoto sdělení. Uvedeno proto bude pouze několik příkladů ilustrujících komplexnost tohoto procesu, případně prokazujících vymezení genu jako informace obsahující instrukci pro vytvoření znaku.

Klinická genetika je obor zaměřený na variabilitu a dědičnost různých poruch významných pro praktickou medicínu. I z hlediska klinické genetiky je gen informací obsahující instrukci pro vytvoření fenotypového znaku. Zde gen rozhoduje o nemoci a zdraví. V rámci klinické genetiky lze poukázat na hermeneutický výklad pojmu genu, což budeme demonstrovat na tak zvaném prediktivním genetickém testování. To umožňuje analýzou DNA určit riziko vzniku určité choroby u zdravých dospělých jedinců. Genetické testování umožňuje tudíž informaci genu alespoň zčásti přečíst a následně v procesu genetického poradenství interpretovat do zprávy srozumitelné pro pacienta. Ta poté formuje postoj testované osoby k prevenci a klinické péči. Až takto přeložená informace genu do zprávy v pacientově jazyce je relevantní pro jeho zdraví. Genetik má proto v procesu genetického testování funkci překladatele.

2. Gen a jeho historie

Od pradávna lidé vnímali, že potomci se podobají na své rodiče a to nejenom u lidí ale i u zvířat a rostlin. Co však tuto dědičnost umožňuje a způsobuje? Odpověď na tuto otázku byla dlouhou dobu obestřena tajemstvím a vysvětlení nabízely pouze spekulace. Samozřejmě způsob početí a přispění ženy při vývoji a zrození nového jedince byly našim předkům známe, dále ale zůstávalo otázkou, co je to za tělesnou látku, která dává vznik novému životu a zároveň způsobuje, že jsou si generace navzájem podobné. Jedním z možných a celkem logických vysvětlení bylo, že touto látkou je krev, která koluje v celém těle, a její větší ztráty způsobují smrt. Podle těchto představ docházelo k transfúzi malého množství krve při sexuálním aktu. Aristoteles proto přirovnal mužský ejakulát k pění vznikající ze zvířené krve (Lennox 2006, Klein a Takahata 2002, 14-15). Tato hypotéza žije v našem podvědomí dodnes, což potvrzují výroky typu „krev mojí krve“ nebo „má to v krvi“.

Jak bude však znít odpověď na otázku, co způsobuje dědičnost, dnes? „Geny!“, tak odpoví asi většina průměrně vzdělaných lidí v 21. století. Pojem genu užil poprvé v roce 1909 Wilhelm Johannsen, pro označení teoretické jednotky genetické analýzy. V té době nebyla známa ani povaha geneticky aktivní hmoty ani mechanismy podílející se na dědičnosti. Definice genu se proto ve 20. století s každým novým objevem na poli genetiky měnila. ‚Genu‘ tedy není ani sto let, přesto však v našem vědomí a řeči již zdomácněl stejně jako po staletí přijímaná hypotéza o krvi. Za notného přispění médií se geny staly jakýmsi všemocnými vládci nad našimi životy. Jaký má pojem genu původ? Proč vůbec byl tento pojem,

ve své době ještě zcela abstraktní, zaveden? Jak se jeho chápání v souvislosti s objevy genetiky měnilo? Na jakém stupni poznání genu se nachází současná biologie? A do jaké míry ovlivňují metody v používané biologii definici genu? V následujícím historickém přehledu některých významných biologických a genetických objevů, které přispěly k zavedení a vývoji pojmu genu, se pokusíme na tyto otázky odpovědět.

2.1. Genetika před genem















Prvním krokem k poznání podstaty dědičnosti bylo pochopení fyziologické podstaty rozmnožování jak člověka, tak živočichů a rostlin. Významnou měrou k vyvrácení hypotézy ‚krve‘ přispěl holandský vědec amatér Antony van Leeuwenhoek, který v roce 1677 jako první popsal v ejakulátu člověka, psa i jiných zvířat přítomnost červů ‚*vermiculi*‘, později přejmenovaných na spermie nebo spermatozoa (Klein a Takahata 2002, 15). Přesto dalších 200 let trvalo než němečtí zoologové Oscar Hertwig a Hermann Fol pod mikroskopem pozorovali penetraci vajíčka mořské ježovky spermií a jeho následný vývoj (Klein a Takahata 2002, 17). Až tím bylo u živočichů s konečnou platností prokázáno, že se dědičné znaky přenášejí vajíčky a spermii.

U rostlin prokázal pohlavnost švédský botanik Carl Linné již v polovině 18. století (Nečásek et al. 1979, 20). První pokusy v oblasti křížení rostlin provedl roku 1760 německý profesor přírodní historie Joseph Kölreuter. Na jeho práci navázal Carl von Gärtner. Svými pokusy prokázali, že první generace uměle vytvořených hybridů je mezi sebou shodná (uniformní), ale jejich potomci (druhá generace) jsou

rozdílní; někteří se podobají hybridům, jiní se vracejí v tom či onom stupni k jednomu nebo druhému z rodičů (Nečásek et al. 1979, 20; Ho 1998, 91). Protože oba tito biologové byli stále silně ovlivněni myšlenkou, že svět byl stvořen bohem, došli na základě svých pokusů k závěru, že křížení nemá z hlediska vzniku nových druhů žádný význam a že biologické druhy jsou přirozené entity, které existují od prvopočátku (Ho 1998, 91). Nicméně byly to právě výsledky pokusů Kölreutera a Gärtnera, z nichž vídeňský profesor biologie Franz Unger došel ke zcela opačným závěrům. Unger byl stoupencem myšlenky evoluce, která byla ve vědeckých kruzích již koncem první poloviny 19. století diskutována (Nečásek et al. 1979, 48; Ho 1998, 91). Právě Unger byl učitelem Johanna Gregora Mendela a zřejmě jej inspiroval k dalším pokusům, na jejichž základě by bylo možno prokázat, zda jsou organismy neměnné nebo jestli křížením mohou vznikat nové biologické druhy. Jak uvidíme ještě později, počátky genetiky jako vědního oboru byly velmi úzce spjaty s evoluční teorií.

Mendel si vybral jako objekt svých pokusů hrách setý a k jednotlivým křížením vybral variety, které se navzájem lišily v párových znacích (různý tvar semen a lusků, různé zbarvení děloh, atd.), jež dovoľovaly bezpečné a jasné rozlišení (obr. 1). Mendel pozoroval, že u první generace hybridů se objevil znak přítomný pouze u jednoho z obou rodičů, který označil jako znak dominantní. Znak přítomný u druhého rodiče, který se u hybridů první generace nevyskytl, označil termínem recesivní (obr. 2). U potomků hybridů (druhá generace) se objevily vedle dominantních znaků i odpovídající znaky recesivní, a to v nezměněné podobě, v průměrném poměru 3:1. Termíny dominance a recesivity jsou v genetice

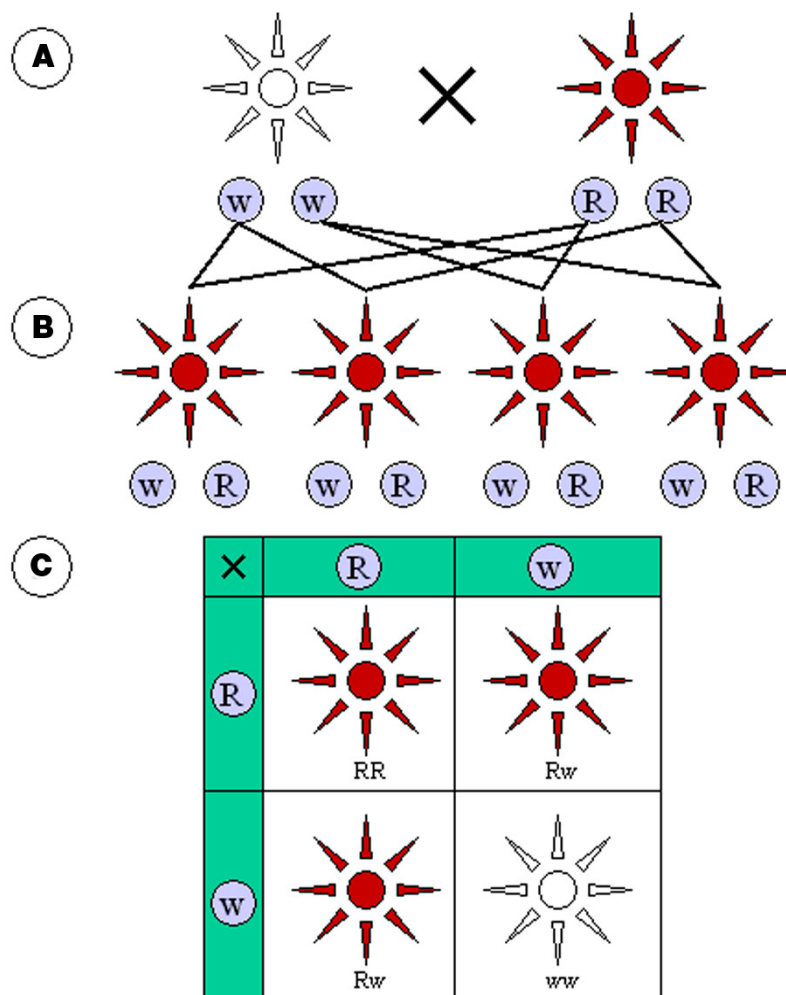
používány dodnes. Na základě svých pokusů Mendel vyvodil, že znaky u hrachu jsou řízeny dvěma odlišnými „elementy“, z nichž každý pochází od jednoho

semeno		květ	luska		stonek	
tvář	dělohy	barva	tvář	barva	umístění	velikost
						
šedý & kulatý	žluté	bílá	plný	žlutý	lusky a květy podél stonku	dlouhý
						
bílý & svrasklý	zelené	fialová	přiškrcený	zelený	koncové lusky, vrcholový květ	krátký
1	2	3	4	5	6	7

Obrázek č. 1. Párové znaky u hrachu setého (*Pisum sativum*), které sledoval J.G.Mendel ve svých pokusech. (Převzato z *Wikimedia Commons* [online]. Dostupné na http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Mendel_seven_characters_cs.svg. 3.5.2008.)

z rodičů. Stejně tak se každý z těchto „elementů“ nezávisle rozchází do různých pohlavních buněk (princip segregace). Dále odvodil, že k výskytu dominantního znaku stačí přítomnost jednoho „elementu“, který určuje tento znak. A naopak u recesivního znaku je nutná přítomnost dvou „elementů“ (obr. 2). Mendel si dále povšiml, že každý pár sledovaných znaků se chová při křížení nezávisle (princip kombinace), což následně experimentálně ověřil a matematicky vyjádřil (Mendel 1865). Závěry, které ze svých pokusů Mendel (1865) vyvodil, jsou dodnes považovány za základy genetiky (tzv. Mendelovská genetiky nebo mendelismus). Období Mendelových klasických pokusů s hrachem v letech 1854 – 1863 časově navazuje na jeho universitní studium ve Vídni, kde kromě biologie studoval i fyziku. Jeho učiteli fyziky byli Christian Doppler a Andreas von Ettinghausen, a ti oba

zdůrazňovali matematický přístup. Právě matematický přístup, v němž nejdůležitější roli hrála kombinatorika, zřejmě určil Mendelův objevitelský úspěch. Pro jeho současníky bylo však spojení biologie s matematikou nepochopitelné.



Obrázek č. 2. Mendelovský typ dědičnosti - dominantní a recesivní fenotypy. A) Generace rodičů; B) F₁ generace – první generace hybridů; C) F₂ generace – druhá generace hybridů (potomci F₁). U F₁ generace se objevuje pouze znak přítomný u jednoho z rodičů, zde je to červená barva květu. Tento znak je dominantní a „element“ (v dnešním genetickém názvosloví alely) zodpovědné za jeho vznik jsou označeny písmenem R. U F₂ generace se vedle dominantních znaků objevují i znaky recesivní, zde je bílá barva květu podmíněná přítomností obou alel genu označených w. Dominantní a recesivní fenotypy se v F₂ generaci vyskytují v průměrném poměru 3:1. (Převzato a upraveno z Wikimedia Commons [online]. Dostupné na http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Mendelian_inheritance_3_1.png. 3.5.2008.)

V druhé polovině 19. století byla víceméně všeobecně uznávána teorie pangenese - kontinuální variability znaků, jejímž autorem byl Charles Darwin (Darwin 1868). Darwin argumentoval, že variabilita při křížení v populaci má kolísavou podstatu vytvářející spektrum variací, na jehož základě jsou selekcí vybírány nejvíce vhodné formy. Ale jaký byl mechanismus těchto variací? Musel být dědičný, jinak by selekce vzhledem k pokroku v evoluci byla nesmyslná. Darwin vyzkoušel experimenty s holuby a nechal se informovat o výsledcích šlechtitelských pokusů s mnohými druhy domestikovaných rostlin a živočichů. Bohužel, Darwin studoval spíše vlastnosti, které měly komplexní dědičnost než čistě alternativní (kvalitativní) znaky. Sledované znaky měly proto sklon se smíchat a vytvořit kvantitativně stupňované série. Výsledky těchto pokusů Darwina utvrzovaly v jeho přesvědčení, že variabilita v přírodě se vyskytuje skoro v nepostřehnutelně kolísavých stupních. Jako pracovní teorii Darwin (1868) navrhnul mikroskopické nebo ultramikroskopické částice „gemmmule“ (z řeckého *gemma*, česky pupen), které existovaly ve všech buňkách. Ty odpovídaly na fyziologické podmínky tkáně, ve které se nacházely, a proto se mohly měnit na základě podmínek prostředí. Tkáň, jejíž součástí byly, jejich počet a čas, ve kterém byly uvolněny z původní buňky tkáně do oběhového systému, aby našly svoji cestu do gonád a vlivy vnějšího prostředí, kterému byly vystaveny, to vše mělo za výsledek jedinečnost každé individuální gamety, jenž se skládala z gemmulí. Ty taktéž způsobovaly rozdíly ve znacích – variabilitu, na základě které mohla pracovat přírodní selekce (Darwin 1868). Teorie pangenese byla považována většinou biologů za základ pro evoluci. Mendel svojí prací chtěl přispět k experimentálnímu řešení evolučních otázek - stále ještě existují spory, jestli chtěl Darwinovu teorii

vyvrátit nebo potvrdit (Sapp 1990). Nicméně výsledky jeho prací však v době zveřejnění upadly v zapomnění. Sám Darwin obdržel jeden výtisk Mendelovy publikace, odložil jej však do knihovny a nikdy se do něj ani nepodíval.

2.2. Od gemmulí ke genu - zavedení genetických jednotek

Mendelův objev, že zárodečné ‚elementy‘ přenášejí odlišné znaky rostlin hrachu, byl prvním pokusem o popsání organismu jako směsi jednotlivých dědičných determinant. Mendel dospěl k této abstrakci přes experimentální objev principu segregace (obr. 2). Mendelova práce byla doceněna až roku 1900, kdy téměř současně Hugo De Vries, Carl Correns a Erich von Tschermak znovuobjevili Mendelovy principy segregace a kombinace. Před znovuobjevením Mendelových zákonů byla Darwinova teorie pangenese podrobena kritice a navrženo bylo několik jiných teorií dědičnosti, ve kterých byly použity různé jednotky sloužící jako determinanty dědičnosti. Žádná z těchto teorií nevzešla přímo z výsledků praktických pokusů. Některé měly původ v Darwinových spekulacích, jiné pocházely z cytologických studií buňky, jádra a chromosomů (Conklin 1898). Ať byl jejich původ jakýkoliv, žádná nebyla experimentálně potvrzena. Přesto jejich diskutováním a probíráním ve vědeckých kruzích vznikla atmosféra, která byla znovuobjevení mendelismu nakloněna (Carlson 1966, 17). Mendelovy zákony byly proto koncem 19. století nejen přijatelné, ale nyní již pro většinu i pochopitelné. To, co se v roce 1865 zdálo být čímsi nesrozumitelným, bylo v roce 1900 se slávou přijato.

Jako první navrhl užívání pojmu gen, jako zkratku z Darwinem používaného pojmu pangen, Wilhelm Johannsen v roce 1909 (Johannsen 1909). V této době byly již všeobecně uznávány a ceněny výsledky Mendelovy práce. Zároveň byla provedena řada dalších pokusů a to jak na cytologické tak i na biochemické úrovni, ze kterých byla vyvozena existence určitých částic v jádře buňky, které nesou dědičné znaky a podílejí se na vývoji organismu. Problémem bylo, že v každé z publikovaných prací byly tyto částice označeny jiným termínem, většinou v závislosti na užití metodě sledování a hypotéze, která jejich existenci prokazovala (Conklin 1898)¹. Ještě před zavedením samotného pojmu genu, navrhl v roce 1905 genetik William Bateson jako jednoslovný název oboru studující dědičnost termín „genetika“ (z angl. genetics)².

Johannsen (1909) ve své práci „Elemente der Exakten Erblchkeitslehre“ publikuje výsledky genetických výzkumů na tak zvaných ‚čistých liniích‘ fazolu. Vlastnosti (v genetickém názvosloví znaky) organismu označuje termínem fenotyp, dědičné základy těchto znaků jako genotyp a faktory podmiňující vznik těchto znaků jako geny (Johannsen 1909). Tato terminologie je v genetice platná dodnes. Johannsen v této práci uvádí: „Proto se zdá nejjednodušším užít poslední slabiku ‚gen‘, který je sám předmětem našeho zájmu, z Darwinova dobře známého slova pangen a tímto nahradit méně vhodné a zavádějící slovo determinant. Následně budeme jednoduše mluvit o ‚genu‘ a ‚genech‘ místo ‚pangenu‘ a ‚pangenech‘. Slovo ‚gen‘ je zcela prosté jakýchkoliv hypotéz; pouze vyjadřuje zjevnou

¹ Již v roce 1903 bylo prokázáno, že každý z rodičů přispívá potomstvu polovinou chromosomové výbavy. Dokonce v roce 1905 byl ke chromosomu přiřazen první znak a to samotné pohlaví, jednalo se tedy o objev pohlavních chromosomů.

² Bateson navrhl tento termín v dopise adresovaném kolegovi prof. A.Sedgwickovi. Dostupné na <http://www.jic.ac.uk/corporate/about/bateson.htm>

skutečnost, že v každém případě je mnoho vlastností organismu určeno v gametách prostřednictvím speciálních podmínek, základů a determinant, které jsou přítomny jedinečným, odděleným a proto nezávislým způsobem – zkrátka přesně tak, proč je chceme nazývat geny.“ (citováno z Carlsona 1966, 20).

Johannsenův gen v podstatě neměl definici, byl pouze teoretickou jednotkou genetické analýzy. Jestliže některým genetikům té doby přinesl pojem, který neměl žádný základ v hmotné realitě, pro jiné osvobodil pojem genu od jakýchkoliv teorií a hypotéz. Což umožnilo tomuto pojmu, aby se s pokroky na poli klasické a posléze molekulární genetiky vyvíjel a s přibývajícím množstvím poznatků na sebe vždy vzal novou a odložil starou již nevyhovující definici.

2.3. Od klasické genetiky po molekulární biologii

Jestliže budeme dále sledovat vývoj pojmu genu, bude zřejmé, že jeho definice se vždy odvíjela od zvolené metody sledování. V prvních třech dekadách genetického výzkumu, v období nazývaném ‚klasická genetika‘, měl gen dvojí identitu (Falk 1986). Gen byl stanoven fyzikální jednotkou dědičnosti, v té době však ještě zcela abstraktní. Geny – Mendelovy elementy – byly proměnnými, na jejichž základě byl definován Mendelovský způsob (vzorec) dědičnosti. Fakt, že některé vlastnosti organismu mohou být u potomků v různých generacích sledovány jako jeden nebo více Mendelových znaků definitivně stanovilo, že pro tyto znaky musí existovat geny. Geny tak napomáhaly při odhadu fenotypu potomků na základě fenotypu jejich rodičů. To byla ta koncepce genu, která zajímala genetiky při jejich vědecké práci. To také Thomas H. Morgan vyjádřil ve

svém proslovu při příležitosti převzetí Nobelovy ceny: „Mezi názory genetiků není žádný konsensus, co jsou geny – jestli jsou skutečné nebo zcela fiktivní – protože na úrovni, na které genetické experimenty spočívají, nedělá sebemenší rozdíl, jestli je gen hypotetickou jednotkou nebo jestli je gen hmotnou částicí.“ (1933, citováno z Griffiths a Stotz 2006).



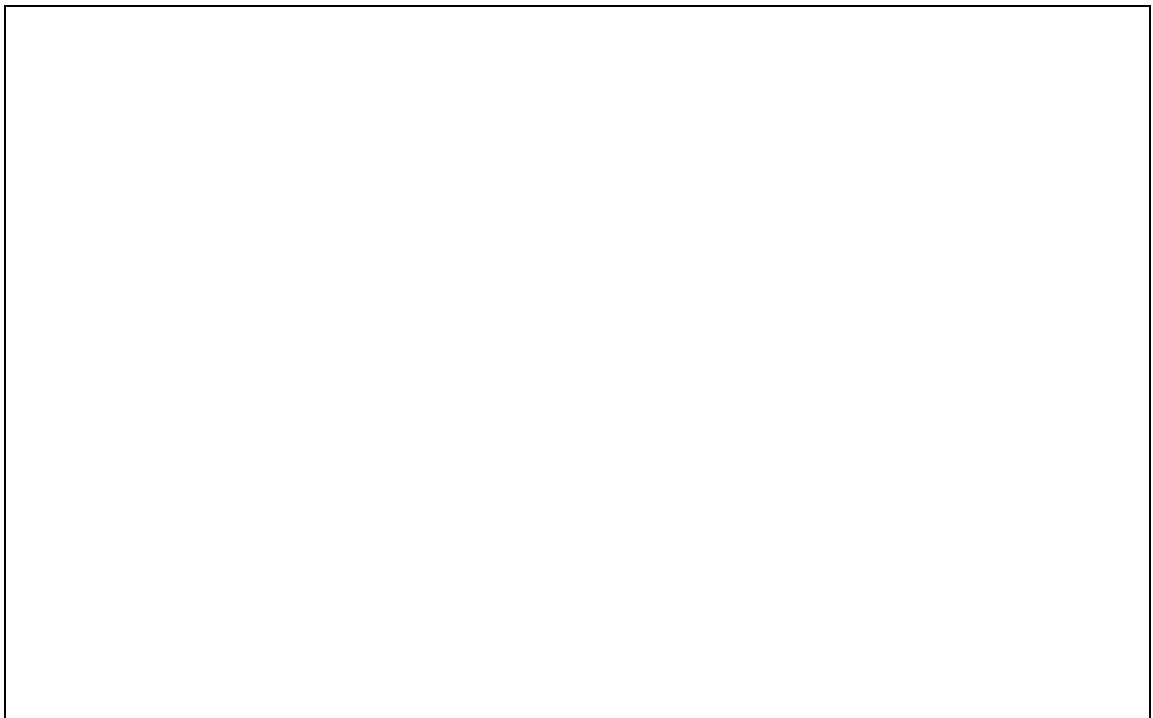
Obrázek č. 3. Základní schéma rekombinace. Rekombinace (crossing-over) je proces, ke kterému dochází při vzniku pohlavních buněk. Dva párové chromosomy (jeden od otce a jeden od matky) si vymění své části. Jestliže jeden párový chromosom obsahuje alely AB a druhý alely ab , pak crossing-overem, který se uskuteční v oblasti mezi příslušnými lokusy, dojde ke vzniku chromosomů s novou sestavou alel aB a Ab . Pohlavní buňky s rekombinovanou sestavou alel budou méně časté než nerekombinované; jejich četnost bude tím menší, čím blíže budou oba sledované lokusy na chromosomu a čím bude tedy menší pravděpodobnost, že se crossing-over uskuteční právě v oblasti mezi nimi. Na tomto principu je založena vazebná analýza, sloužící ke stanovení genetické vazby. Crossing-over tudíž umožňuje vznik nových sestav alel, které jsou spolu vázány a které by bez tohoto mechanismu byly předávány příslušným chromosomem potomstvu vždy společně. (Převzato a upraveno z Nečásek et al. 1979, 34.)

V klasické genetice byl tedy gen chápán jako abstraktní jednotka, jejíž existence byla prokázána přenosem určitých znaků mezi generacemi. Metodami používanými v této časně fázi genetiky bylo sledování mutací (změny dědičného

materiálu) a rekombinací³ (obr. 3). Ve dvacátých letech minulého století dospěl Morgan se spolupracovníky (1915) na základě pokusů u octomilek (*Drosophila melanogaster*) ke konstatování, že gen je hmotná částice chromosomu, která je schopná mutovat, ale není dále dělitelná crossing-overem (Morgan et al. 1915). Gen měl tedy na chromosomu místo – v genetickém názvosloví lokus (z angl. locus). Existenci genu prokazovala mutace, která inaktivovala nebo aktivovala sledovaný znak. Geny jako fyzikální jednotky byly sledovány pomocí vazebné analýzy (obr. 3). Podstatou této analýzy je předpoklad, že při lineárním uspořádání genů na chromosomu nedochází mezi geny, které se nacházejí v bezprostřední blízkosti, k rekombinaci a jsou tudíž děděny společně. Podle výsledků křížení u potomstva se počítaly vazebné koeficienty mezi genetickými lokusy a na jejich základě byla sestavována vazebná mapa chromosomu. Gen byl tudíž na základě vazebné analýzy taktéž charakterizován délkou rekombinujících oblastí chromosomu. Morgan (1915) navrhl model, dle kterého byly geny na chromosomu lineárně uspořádány ve vazbě a jejich schopnost crossing-overu odpovídala vzdálenosti mezi nimi. Chromosom byl proto často znázorňován jako dlouhá šňůra korálků, které zobrazovaly jednotlivé geny (obr. 4) (Morgan 1915). Tato představa přetrvávala v genetice po velmi dlouhou dobu. Fakt, že vzdálenosti mezi geny stanovené vazebnou analýzou odpovídají fyzikální mapě chromosomu, byl prokázán později v roce 1929 Barbarou McClintock pomocí cytogenetických studií u kukuřice (McClintock 1929).

³ Rekombinace nebo též crossing-over je proces probíhající při meiose, při kterém dochází k výměně části homologních chromosomů (obr. 3).

Někteří autoři (Falk 1986, Waters 2007, Griffiths a Stotz 2006) zabývající se historií genetiky zdůrazňují, že klasická genetiky nebyla pouze teorií dědičnosti. Stejně tak důležitá byla i experimentální praxe – genetická analýza – při které byly zákonitosti Mendelovy teorie dědičnosti používány jako rámec k objasnění dalších otázek struktury a funkce živých systémů. Genetická analýza různých fenotypů, identifikace genetických lokusů, sady alel (alela je v klasickém genetickém názvosloví jedna z možných variant genu) vyskytující se v každém lokusu, vazebných vztahů a interakcí mezi jednotlivými lokusy a vztahu dominance a



Obrázek č. 4. Morganův model chromosomu a rekombinace. Ilustrace z původní Morganovy publikace z roku 1915 představuje zjednodušené znázornění genů jako „korálek na niti“. A) Znázornění dvou parentálních chromosomů; B) překřížení chromosomů, při němž dochází k výměně částí parentálních chromosomů; C) výsledek – vznik rekombinovaných chromosomů. (Morgan 1915 publikováno v *Proceedings of National Academy of Science* 1: 420-429; Převzato z Carlsona 1966, 47.)

recesivity přinášely výsledky, které odpovídaly na obecnější otázky, jako jsou vývoj a fyziologie organismu. Tato experimentální praxe však zároveň vnutila koncepci genu značná omezení. Neměnnost a diskrétnost Mendelových elementů byla v časně fázi mendelismu ohrožena pokusy s krysami prováděnými Wiliamem Castlem (1905). Při těchto pokusech některé alely vykazovaly „kontaminaci“ jinými alelami, což nebylo ve shodě s principem segregace. Tato neshoda byla brzy srovnána následující definicí: „Mendelovské znaky jsou determinovány jednotlivými geny (1 znak = 1 gen), a znaky nevykazující mendelovský způsob dědičnosti jsou kontrolovány více geny (1 znak = více genů)“ (Griffiths a Stotz 2006). Což znamená, že dědičné znaky organismu musely být hodnoceny způsobem, který umožňoval jejich genetickou analýzu. Jestliže sledovaná vlastnost neodpovídala jednomu genu, musela být rozložena na více jednotlivých vlastností (později popsaných jako „primární znaky“), které jednotlivým genům již odpovídaly (Griffiths a Stotz 2006).

Stejným způsobem působily v počátcích genetiky problémy tzv. kvantitativní znaky, jako jsou například výška a váha. Ty vykazují mezi jednotlivci kontinuální proměnlivost, tudíž neodpovídají Mendelovským znakům, které v potomstvu segregují v nespojitých poměrech (princip kombinace) (obr. 1, 2). Nicméně, již v roce 1918 Ronald A. Fisher prokázal, že statistickou analýzou korelace fenotypů lze tyto kvantitativní znaky vyložit v duchu mendelismu (Fisher 1918). Kvantitativní znaky byly vysvětleny jako efekt působení mnoha hypotetických genů malého účinku, z nichž každý přispívá stejným dílem k variabilitě znaku. Na tomto základě byla založena kvantitativní genetiky, jako jedna z genetických disciplín. Výzkum v klasické genetice se tudíž podobá známé charakteristice „normální vědy“

Thomase Kuhna, kdy veškerá vědecká činnost potvrzuje existenci paradigma (Kuhn 1962).

Michel Morange napsal: „Molekulární biologie se zrodila tehdy, když se genetici, již nespokojení s kvazi-abstraktním náhledem na úlohu genů, zaměřili na problém podstaty genů a mechanismu jejich působení“ (Morange 1998, 2). Jedním z prvních, kdo nebyl spokojen s abstraktním pojetím genu jako neznámé fyzikální jednotky lokalizované na chromosomu a zaměřil se na materiální podstatu genu, byl Morganův student Herman J. Muller. Pro Mullera byly tyto částice - atomové jednotky - základem pro ‚tajemství‘ života a podstatou, na jejímž základě fungoval Darwinův proces evoluce. Aby geny mohly naplňovat tyto funkce, musely být k tomu schopny autokatalýzy (sebe-replikace), což jim umožňovalo být jednotkami dědičnosti, a heterokatalýzy, aby se mohly projevit ve fenotypu. Zároveň musely být schopny mutovat, aby byla zajištěna dědičná variabilita. Muller zřídil výzkumný program, který se zabýval studiem materiální podstaty genu (Carlson 1966, 87-88). V roce 1927 Muller objevil mutační efekt rentgenových paprsků, což využil k prvním odhadům fyzikálních rozměrů jednotlivých genů. Tímto Muller prokázal, že dědičnost má hmotnou molekulární podstatu (Muller 1927).

Mullerův důraz na hmotnou podstatu genu a jeho zaujetí pro objevení způsobu, kterým by se daly geny analyzovat jinak než jenom sledováním jejich projevu ve fenotypu, umožnil značný posun v genetickém poznání. A to proto, že před jeho objevem by zpochybňování ústřední hypotézy mendelismu a teorie genu vedlo k intelektuální paralýze. Způsoby dědičnosti, které se vymykaly základním pravidlům mendelismu musely být další genetickou analýzou těmito pravidlům přizpůsobeny, nebo byly označeny za anomálii, případně pro ně byly zavedeny

„opravné faktory“ jako penetrance (pravděpodobnost, že gen bude mít fenotypovou expresi; je-li frekvence fenotypové exprese nižší než 100% gen vykazuje neúplnou penetranci) a expresivita (stupeň exprese fenotypu, je-li fenotypový projev genu různorodý, je označován jako variabilní expresivita). Tyto termíny se konec konců používají v genetice dodnes. Naopak další výzkum genů jako fyzikálních entit otevřel možnosti získání jasných a nezávislých důkazů proti fundamentální hypotéze mendelismu (Griffiths a Stotz 2006). Vlastnosti genu, které byly dříve považovány za definitivní, mohly být dále testovány a jejich platnost mohla být na základě prokazatelných výsledků výzkumu případně zamítnuta (viz níže Krize genu).

Hmotná podstata genu byla dále postupně odkrývána novým vědeckým oborem - biochemií – která vznikla v době mezi dvěma světovými válkami. Jedním z cílů tohoto oboru bylo i porozumění syntéze organických molekul, které interagují pouze s malou skupinou dalších molekul, čímž umožňují velmi přesné chemické pochody v živých organismech. Od poloviny třicátých let bylo jasně zřetelné, že specifická organických molekul spočívá v jejich konformaci (stavbě) a schopnosti vytvářet tak zvané slabé vazebné síly (slabé interakce). Prostorová konformace molekul určuje, která specifická místa molekuly se k sobě přiblíží. Interakce mezi těmito místy, jejich vzájemná vazba, je o mnoho slabší než u vazeb kovalentních ve standardní anorganické chemii. Z tohoto důvodu vyžaduje narušení slabé vazby a změna konformace jednotlivých molekul podstatně méně energie. Jak se ukázalo, struktura a funkce všech živých systémů je založena na těchto principech (Morange 1998, 15). Koncept specifity začal být rychle používán k objasnění vztahu genů a jejich produktů, stejně jako vztah mezi enzymy a jejich substráty.

Jestliže aktivita buňky byla vysvětlována na základě specifity, bylo nasnadě předpokládat, že projev genů ve fenotypu je zprostředkován produkcí biomolekul s odpovídající specífcitou. Tak v roce 1941 vznikla hypotéza ‚jeden gen – jeden enzym‘, která napomohla stvořit experimentální spojení mezi biochemií a genetikou (Tatum a Beadle 1941). Počátkem čtyřicátých let se Edward L.Tatum a George W.Beadle rozhodli zaútočit na problém funkce genů genetickou analýzou známých biochemických procesů. Vytvořili a izolovali mutantní kmeny plísně *Neurospora*. Studium jejich metabolismu objevili Beadle a Tatum (1941), že mutace v genech mohou působit defekty v různých stupních metabolických drah. Tento objev je původem tvrzení ‚jeden gen - jeden enzym‘, které následně vyústilo v genetice dlouho přetrvávající pravidlo ‚jeden gen - jeden polypeptid‘. Tímto byl následně gen definován jako jednotka determinující jedinou specifickou funkci čili jako nejmenší jednotka podmiňující fenotypové diference.

Jenom o tři roky později prokázal Oswald T. Avery se spolupracovníky (1944) na základě pokusů s enzymem DNázou, že geneticky aktivní hmotou je DNA (Avery et al. 1944) (obr. 5.). V době tohoto objevu byl považován za dědičný materiál tzv. ‚nukleoproteid‘. Předpokládalo se, že hlavní složkou genů jsou proteiny a na DNA bylo nahlíženo jako na nespecifickou a jednotvárnou molekulu, která je zřejmě zodpovědná za určitou strukturu chromosomu. O její stavbě a funkci bylo v této době zatím velmi málo známo, při izolaci a analýze vykazovala velmi jednoduché složení, a tudíž nebyla považována za základ ‚genetické specifity‘. Z dnešního pohledu se zdá důkaz předložený Averym (Avery et al. 1944) jednoznačný, přesto trvalo dalších osm let, než byl hypotetický ‚proteinový model genu‘ vyvrácen.

V průběhu čtyřicátých let minulého století dochází v biologickém výzkumu k velmi podstatným změnám. Strůjci těchto změn byli vědci, jejichž původní disciplínou byla fyzika. Jejich příchodem se genetika ještě více sblíží s biochemií, což následně vydláždilo cestu molekulární koncepci genu, která převládala v letech 1950 až 1970. Jedním z těchto bývalých fyziků byl i Max Delbrück (Carlson 1966, 160-161, 197). Ten byl přesvědčen, že k porozumění tajemství života je nutno fyzikálního přístupu, navíc je nutno taktéž zvolit pokusný organismus, který je tak jednoduchý, že může být nahlížen jako holý gen. Volba padla na bakteriální virus (bakteriofág). Bakteriofágy se zdály být pro tento přístup ideální, protože neměly více než jednu jedinou klíčovou vlastnost a to sebe-replikaci. Takto byly přístupny výzkumu bez toho, „že by musela být otevřena biochemická černá skříňka“ (Morange 1998, 45). Skupina kolem Maxe Delbrücka, Salvadora Lurii a Alfreda Hersey pomohla vytvořit genetiku bakterií a prokaryot, která sehrála v dalším genetickém výzkumu podstatnou roli (Carlson 1966, 196-199).

Začátkem padesátých let 20.století byla jako genetický materiál uznána DNA – molekula dědičnosti (obr. 5.). V roce 1953 James Watson a Francis Crick objasnili její strukturu (Watson a Crick 1953). Objev struktury DNA umožnil následně objasnění předávání genetického materiálu (proces kopírování - v genetické terminologii replikace DNA). V šedesátých letech minulého století nabraly objevy na poli molekulární genetiky značný spád. Rozluštěn byl genetický kód (Nirenberg et al. 1965 a Söll et al. 1965), na jehož základě se sekvence nukleotidů DNA převádí do sekvence polypeptidu procesy nazývanými transkripce a translace (obr. 6). V průběhu transkripce má jeden z DNA řetězců funkci matrice,

Obrázek č. 5. Buňka, chromosom a DNA. Buňky jsou základními pracovními jednotkami každého organismu. Veškerý dědičný materiál obsahuje kyselina deoxyribonukleová (DNA). DNA všech organismů je složena ze stejných chemických i fyzikálních složek. DNA sekvence je paralelní uspořádání bází (A-adenin, T-tymin, C-cytosin, G-guanin) podél řetězce DNA (např. sekvence ATTCCGGA). Genom je soubor veškeré DNA organismu. Všechny lidské buňky kromě červených krvinek obsahují kompletní genom. DNA je v lidském genomu uspořádána do 46 chromosomů – molekul, jejichž délka se pohybuje mezi 50 – 250 milióny párů bází. Některé úseky DNA - označované v molekulárním konceptu jako geny - kódují polypeptidy, které jsou součástí proteinů. (Převzato a upraveno z Basic Genomics Image Gallery [online]. Dostupné na http://genomics.energy.gov/gallery/basic_genomics/detail.np/detail-18.html. 19.5.2008.)

na jejímž základě je přepisována nově vznikající mRNA (z angl. messenger-RNA). Molekula mRNA následně slouží jako matrice pro syntézu polypeptidu. V průběhu translace triplety – trojice nukleotidů mRNA sekvence (tyto trojice se označují jako kodóny) specifikují, které aminokyseliny budou zařazeny do vznikajícího polypeptidového řetězce. Iniciační a terminační kodóny určují, kde bude translace zahájena a ukončena. Proces transkripce a translace se souhrnně nazývá genová

exprese. Způsob genové exprese ve směru DNA→RNA→protein byl již dříve shrnut Crickem (1958), který jej zároveň označil za ‚ústřední dogma‘ molekulární genetiky (Crick 1958). Na základě molekulárního náhledu na problematiku dědičnosti, který se v průběhu šedesátých let vyvinul, byl gen obecně definován jako kód pro aminokyseliny finálního funkčního produktu (proteinu). V této době se tedy zásadně změnila definice genu. Tato změna bývá označována za změnu ‚klasického‘ genu na gen ‚neo-klasický‘ (Portin 1993) nebo na ‚klasický molekulární gen‘ (Neumann-Held 1998), což v podstatě označuje totéž.

Obrázek č. 6. Genetický kód. Živé organismy se skládají z velké části z proteinů. Proteiny jsou velké komplexní molekuly složené z dlouhých řetězců podjednotek, které se nazývají aminokyseliny. V proteinech se obvykle nachází 20 různých druhů aminokyselin. Specifická sekvence složená ze tří DNA bází (= 1 kodón) při syntéze proteinů určuje, která specifická aminokyselina bude do řetězce polypeptidu zařazena. Například sekvence ATG kóduje aminokyselinu metionin. Genetický kód je tudíž sada kodónů specifikujících, které aminokyseliny budou tvořit určitý protein. (Převzato a upraveno z Basic Genomics Image Gallery [online]. Dostupné na http://genomics.energy.gov/gallery/basic_genomics/detail.np/detail-10.html. 3.5.2008.)

2.4. Krize genu

2.4.1. Genetika bez genů?

Vraťme se nyní ještě zpátky do doby klasické genetiky a počátků genetiky molekulární. Přestože byla teorie genu v tomto období se všeobecně přijata, našly se i její odpůrci. Jedním z nich byl i jeden z vůdčích a uznávaných genetiků Richard Goldschmidt. Na základě Goldschmidtova sporu s jeho současníky, lze dále nahlédnout do podstaty konceptu genu v klasické genetice.

Gen bylo možno v klasické genetice identifikovat dvěma způsoby: 1) přes fenotypové rozdíly, které způsoboval a 2) přes vazebnou analýzu jako specifický segment chromosomu. Tento přístup umožnil objev pozičního efektu, jehož podstatou je změna pozice genu na chromosomu, která je zároveň doprovázena i změnou projevu genu ve fenotypu. Poprvé byl tento jev popsán nezávisle Alfredem H. Sturtevant (1925) a H. Mullerem (1930) jako nová mutace u octomilky (*Drosophila*). Tyto mutace byly výsledkem translokace (přemístění) části chromosomu, která měnila umístění genu, ale nikoliv jeho fyzickou strukturu. Například umístěním genu do oblasti chromosomu, ve které neprobíhá transkripční aktivita, dojde k jeho „umlčení“, což znamená, že jeho efekt ve fenotypu se neprojevuje. Tento objev zpochybnil podstatu mutace, tak jak byla v klasické genetice chápána. Dnes mutací označujeme jakoukoliv změnu dědičného materiálu a to jak na úrovni změny nukleotidové sekvence chromosomu, tak i větší změny jako jsou translokace (přemístění segmentu chromosomu) nebo inverze (otočení segmentu chromosomu). Nicméně v klasické genetice byla mutace definována jako změna ve skutečné vlastnosti konkrétního genu způsobující

dědičnou změnu ve fenotypu. Přestože výsledkem pozičního efektu byla také změna fenotypu, byl považován za něco jiného než mutace, protože ke skutečné změně konkrétního genu nedocházelo, měnila se pouze jeho poloha.

Goldschmidt protestoval právě proti tomuto rozdělení (např. Goldschmidt 1932 a Goldschmidt 1937, Goldsmichdt 1940, Goldschmidt 1946, Goldschmidt 1954). Protože neexistoval žádný důkaz, že chromosom se skládá z rozdílných strukturních oblastí odpovídajících jednotlivým genům, Goldschmidt navrhnul možnost, že mutace a poziční efekt jsou jednoduše větší a menší změny ve struktuře chromosomu. Protože bylo známo, že chromosomové změny na těchto úrovních mají za důsledek změny ve fenotypu, Goldschmidt argumentoval, že chromosomy pravděpodobně obsahují hierarchii funkčních jednotek. V roce 1937 Goldschmidt uvádí: „... přišel čas poznání, že mutace genů existují stejně tak málo jako existují geny samy. ...Myšlenka pozičního efektu, která měla zachránit koncept genu, také zmizí, až bude rozpoznáno, že poziční efekt je ve skutečnosti identický s tím, co nazýváme genem. Za jednotku kontrolující normální vývoj bude označen chromosom.“ (citováno z Carlsona 1966,125).

Goldschmidt tudíž popřel existenci genů, čímž měl na mysli, že neexistují žádné strukturní jednotky, které by odpovídaly jednotkám funkce – genům v klasické genetice. A chtěl nahradit jednotlivé oddělené geny kontinuálním chromosomem s hierarchickou strukturou. Přestože „Goldschmidtova snaha v letech 1940 až 1958 byla jedním z prvních pokusů vyvinout teorii, která by zahrnovala modely genetické struktury, genetického působení, vývojových procesů a evoluční dynamiky“ (Dietrich 2000, 1143), jeho názor byl pro většinu jeho současníků absolutně nepřijatelný. Goldschmidt trval na svém přesvědčení, že oba

aspekty dvojí podstaty genu v klasické genetice musí odpovídat jedné jednotce. To znamená, že hmotný gen musí odpovídat pomocným jednotkám vazebné analýzy. Jakýkoliv důkaz proti tomu v podstatě potvrzuje, že žádné geny ve smyslu klasické genetiky neexistují. Goldschmidtovy současníci možná s nadějí hleděli do budoucnosti, slibující objev jednotky genetické funkce na molekulární úrovni. Jisté ale je, že se od radikální Goldschmidtovy pozice distancovali, a hlavní proud v genetice a jejím výzkumu postupoval již zavedeným směrem.

2.4.2. Gen je mrtev! Ať žije gen!

Goldschmidtův kritický názor na geny lze považovat za skepticismus, který nebyl jeho současníky pochopen a přijat (Griffiths a Stotz 2006). Opačného osudu se dočkala práce Seymoura Benzera z let 1954 – 1961 (např. Benzer 1955, Benzer 1957, Benzer 1961), přestože jejím důsledkem mělo být zavedení nového názvosloví v genetice a náhrada pojmu genu pojmy zcela novými.

Benzerovi se podařilo pomocí výzkumu s bakteriofágy dosáhnout vysokého rozlišení tzv. *cis-trans* testu a s jeho pomocí detailně lokalizovat jednotlivé mutace. A to dokonce tak detailně, že byl schopen prokázat, že různé mutace se mohou vyskytovat v jednom a tomtéž genu. Stejně tak prokázal, že rekombinace může probíhat nejenom mezi jednotlivými geny, ale mezi různými částmi jednoho a téhož genu (tzv. intragenová rekombinace). Na základě těchto poznatků bylo jasné, že gen nemůže být dále definován jako jednotka mutace, rekombinace a funkce. Benzer svou prací přinesl důkazy, že gen definovaný jednotlivými metodami klasické genetiky není totožný. To znamená, že gen jako jednotka rekombinace je

jiný než gen jako jednotka funkce nebo mutace. Benzer navrhnul zavést místo tradičního pojmu genu tři nové genetické jednotky (Benzer 1957, 70-93). Jednotku mutace označil jako ‚muton‘ a definoval ji jako nejmenší část genetického materiálu, jejíž změna vyvolává vznik mutantní formy organismu. Jednotku rekombinace nazval ‚rekon‘ a označoval jí nejmenší část genetického materiálu, která může být vyměněna při rekombinaci. Jednotku funkce definoval podle *cis-trans* genetického testu jako ‚cistron‘. Cistronem Benzer označoval funkční genetickou jednotku zároveň vymezenou úsekem chromosomu nebo molekuly DNA. Jan Klein ve své knize Molekulární základy dědičnosti (1964) uvádí: „Ukázalo se, že na nejnižší strukturální úrovni pojem genu jako jednotky mutace, rekombinace a funkce pozbývá smyslu a musel být nahrazen třemi samostatnými jednotkami. Názvy muton, rekon a cistron navrhl Benzer v roce 1958. Dnes už se ukazuje, že se pravděpodobně vžijí. Ale to neznamená, že soudobá genetika upustí od pojmu a názvu gen úplně. Genetická analýza totiž nesestupuje vždy až na molekulární úroveň a pro vyšší analýzy pojem genu postačuje. Proto také my v této knize budeme i nadále hovořit všude tam, kde nemůže dojít k omylu o genu, jsouce si vědomi historičnosti tohoto termínu a relativity jeho platnosti.“ (Klein 1964, 257). Byly to však Benzerovy pojmy, které se v genetice neujaly. Nejdéle se zřejmě užívalo pojmu cistron, ale i ten časem upadl v zapomnění. Naopak pojem genu se hřeje na výsluní genetické terminologie dodnes a svoji pozici zřejmě již nikdy neopustí.

Benzerova práce byla jeho současníky přijata a cistron byl víceméně okamžitě ztotožněn s genem. A to zřejmě proto, že v této době byl již znám Watsonův a Crickův model struktury DNA, který napomohl interpretaci

Benzerových výsledků. Jednotkou mutace a rekombinace je jediný nukleotid, zatímco cistron odpovídá podle ústředního dogma molekulární genetiky (DNA→RNA→protein) sekvenci nukleotidů zahrnutých v syntéze produktu jednotlivého genu. Tento závěr navíc podporoval i pravidlo ‚jeden gen – jeden enzym‘. Benzer tudíž bývá považován za zakladatele nového neo-klasického (Portin 1993) nebo ‚molekulárního konceptu genu‘ (Neumann-Held 1998). Tento nový koncept byl výsledkem technického vývoje, který umožnil mnohem detailnější mapování chromosomů (tzv. jemné strukturní mapování) a nového náhledu na hmotnou podstatu genu. Tato nová koncepce genu vycházela z koncepce klasické genetiky s poznáním, že gen není základní jednotkou mutace nebo rekombinace.

2.5. Od genů po genomy

V polovině šedesátých let minulého století si mnoho vědců myslelo, že hlavní problémy molekulární genetiky byly objasněny, a nastal čas pro jiné vědce „doladit detaily“. Ale tvrzení že, ‚co platí pro E.coli platí i pro slona‘, se ukázalo být předčasným (Griffits a Stotz 2006, 507). I v současné době je jasné, že na poli molekulární genetiky stále ještě zbývá mnoho práce k objasnění procesů a mechanismů dědičnosti, variability a exprese genů. V souladu s molekulárním konceptem byl gen definován jako souvislá sekvence nukleotidů, která odpovídá sekvenci aminokyselin v jednom polypeptidovém řetězci (protein se skládá z jednoho nebo více polypeptidových řetězců). Záhy bylo objeveno, že geny kódují nejenom polypeptidy ale i funkční RNA, které nejsou překládány do proteinů. Tento fakt byl molekulárnímu konceptu genu jednoduše přizpůsoben. Gen v molekulární

genetice je v podstatě „DNA obrazem jeho produktu“ (Griffiths a Stotz 2006, 507). Jak vyzdvihnul Ken Waters, molekulární koncept genu je založen na tom, že DNA sekvence a její genový produkt si navzájem lineárně odpovídají (Waters 2007, 15) (obr. 7B). Konceptu molekulárního genu nicméně nelze upřít, že je ukázkou úspěšné vědecké strategie vedoucí k identifikaci funkční role genu, objasnění jejího mechanismu a zlepšení porozumění této funkci na nižší úrovni analýzy než byla analýza původní (tj. analýza fenotypu).

V sedmdesátých letech byly vyvinuty technologie klonování⁴ a sekvenování (přečtení nukleotidové sekvence DNA). Tyto technologie umožnily další podrobnou analýzu genů a následně i genomu⁵ jednotlivých organismů. První DNA sekvence genu byla stanovena u bakteriofágu MS2 (Fiers et al. 1971) a následně byl u tohoto bakteriofágu jako u prvního organismu osekvenován celý genom (Fiers et al. 1976). Souběžný vývoj počítačových technologií a jejich aplikace v molekulární genetice (bioinformatika) vedla k vytvoření algoritmů, které umožňují identifikaci genů v sekvenci DNA na základě již dříve popsaných sekvencí charakteristických pro gen. V mnoha případech se DNA sekvence používá k odvození struktury a funkce genu a jeho produktu. Identifikace většiny genů v osekvenovaných genomech je založena buď na jejich podobnosti s jinými již dříve identifikovanými geny (i u různých druhů organismů) nebo na statisticky signifikantním vzoru sekvence kódující protein. V mnoha případech je gen v DNA sekvenci genomu

⁴ Klonování je způsob izolace genu z genomu; přenos genů do bakteriálního vektoru umožňující jeho pomnožení a analýzu.

⁵ Soubor veškeré DNA organismu.

rozpoznán a určen na základě přítomnosti ORF - otevřeného čtecího rámce (z angl. open reading frame)⁶(Gerstein et al. 2007, 670).

Richard Burian nazývá toto pojetí genu jako gen ‚nominální‘ (z angl. nominal gene) a popisuje jej: „Použití databází obsahující nukleotidové sekvence je dobře zavedeno. Kodifikovaný jako součást tohoto procesu je určitý způsob použití konceptu genu, na jehož základě je možno identifikovat různé geny a stanovit počet genů v daném genomu... Já nazývám geny rozeznávané tímto způsobem, jako nominální geny“ (Burian 2004, 64). ‚Nominální‘ gen již není genetický lokus odpovídající za fenotypový znak, ale je definován svojí předpokládanou sekvencí. Přesto však vymezení takovéto sekvence není zcela jednoznačné. K jejímu určení se používá určitého stereotypu nebo prototypu: sekvence je označena jako gen, jestliže je dostatečně podobná jiným genům. ‚Nominální‘ molekulární gen definovaný jako určitá sekvence DNA představoval a stále představuje praktický nástroj umožňující komunikaci mezi vědci mnoha různých biologických oborů (Griffiths a Stotz, 2006, 519).

V posledních dvou desetiletích 20. století se pozornost genetiků upřela především k molekule DNA a ke kompletnímu sekvenování genomů mnoha různých organismů⁷. Jako vrchol budoucího vědeckého pokroku byl v průběhu osmdesátých let prezentován Projekt lidského genomu (zajišťovaný v rámci HUGO – Human Genome Organisation)⁸. Cílem projektu, který formálně započal v roce 1990, bylo zmapování a stanovení sekvence všech lidských genů. Projekt lidského

⁶ Otevřený čtecí rámec (ORF) je sekvence DNA vymezená iniciačním kodónem – počátkem čtení a terminačním kodónem – koncem čtení, která kóduje souvislý a dostatečně dlouhý polypeptidový řetězec, viz transkripce

⁷ Dokončené i rozpracované projekty sekvenování genomů různých organismů lze nalézt na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>.

⁸ HUGO je mezinárodní „veřejné“ konsorcium složené převážně z akademických laboratoří.

genomu byl plánován na 15 let, ale technologický pokrok a zejména konkurenční tlak vyvolaný soukromou americkou firmou Celera Genomics vedly k jeho podstatnému urychlení. První hrubé přečtení lidského genomu bylo společně slavnostně ohlášeno v červnu 2000 a o rok později byla hrubá verze lidského genomu zveřejněna (Lander et al. 2001, Venter et al. 2001). K započetí tohoto projektu vedla vědce dobrá víra, že pokud bude známa sekvence lidského genomu a tím i jeho geny bude učiněn velký pokrok v poznání struktury genomu a mechanismů různých fyziologických a patologických procesů. V současné době je jasné, že získání sekvence lidského genomu bylo pouze prvním krůčkem k úplnému pochopení těchto procesů.

Na základě analýzy lidského genomu bylo nutno poopravit řadu dosavadních znalostí. Bylo prokázáno, že sekvence DNA kódující proteiny tvoří méně než 1,5% celkové DNA. Navíc je v genomu značně fragmentována a rozptýlena v nadbytku DNA, jejíž smysl není znám (Sedláček 2002, 494). Funkce proteinového produktu je v současné době známá přibližně jen u poloviny segmentů DNA definovaných jako geny. Analýza genomu člověka dále ukázala, že genom člověka obsahuje pouze asi 22 000 takovýchto segmentů DNA – genů (Gingeras 2007, 683), což je asi $\frac{1}{4}$ z původního dlouho uváděného počtu (80 000 – 100 000) a taktéž přibližně stejně jako má genom hlístice *C. elegans* (asi 20 000) (Gingeras 2007, 683). Z tohoto srovnání ‚počtu genů‘ člověka a jednoduchého bezobratlého organismu vyplývá jednoznačný závěr, že komplexita lidského organismu musí být podmíněna jinak, než pouze větším počtem ‚genů‘. A tudíž začalo být nahlíženo jinak i na různé mechanismy, které se uplatňují při expresi genů (např. alternativní sestřih, modifikace transkriptů a post-translační úpravy

proteinů; viz níže). Stejně jako se stále větší pozornosti začalo dostávat genům kódujícím RNA (počet lidských genů byl stanoven podle sekvencí kódujících proteiny) (Sedláček 2002, Gingeras 2007).

Od poloviny šedesátých let až do nedávné minulosti vědci předpokládali, že k pochopení struktury a funkce genů a následně celého genomu nezbývá tak dlouhé cesty a že k cíli bude bezpečně vést stanovení sekvence genomu člověka a dalších komplexních organismů. Celé toto období nejlépe charakterizuje citát, který si vypůjčíme od Zdeňka Neubauera (1984): „A tak každá doba podléhá dojmu, že teď už na to konečně přišla, teď už můžeme budovu vědy definitivně dostavět; a ono to nějakou dobu skutečně funguje, ten pokrok, opírající se o konečně pevné základy, je obrovský, oslnivý a úspěšný. Přesto se však s mírou rostoucího množství poznatků, s mírou velikých průlomů a úspěšných syntéz a aplikací kýžený horizont definitivity spíše vzdaluje, než aby se přibližoval, problémy a překážky, které se zdály zprvu snadno odstranitelné, se kumulují, a podařilo-li se skutečně některé sprovodit ze světa, a nikoli jen odložit ad acta a ignorovat nebo přímo odmítnout jako „nevědecké“, pak většinou jen za cenu, že se všechno ukáže nakonec daleko složitější, než se na první pohled zdálo. Problémy, které byly dosud přehlíženy jako anomálie, se postupně se vzrůstajícím neklidem a nespokojeností dostávají do samotného středu zájmu, stanou se *těmi* vlastními problémy příslušné disciplíny, ... (Neubauer 1984,41). Na „tyto problémy“ začaly poukazovat výsledky výzkumů navazujících na Projekt sekvenování lidského genomu. A jak si ukážeme později, právě tyto prozatím částečně objasněné komplexní výsledky výzkumů, začaly být považovány za klíčová fakta vedoucí

k pochopení ‚funkce genomu a vzniku fenotypu‘ v době post-genomové (Gingeras 2007).

2.6. Současné molekulární definice genu a jejich problémy

Prozatím se ještě chvíli budeme věnovat současné definici genu. Na začátek uvedme několik definic genu užívaných buď vědeckými organizacemi, nebo uváděných v učebnicích. Tyto definice jsou relativně recentní, stále používané, přesto v době svého vzniku zcela neodpovídaly již známým vědeckým poznatkům. Některé z těchto poznatků a tím i rozpor, který v definici genu vyvolávají, si ukážeme následovně.

V roce 2002 HUGO komise pro nomenklaturu genů (z angl. HUGO Gene Nomenclature Committee) definovala gen jako „DNA segment, který má podíl na fenotypu/funkci. Jestliže nelze funkci genu prokázat, může být charakterizován sekvencí, transkripcí nebo homologí“ (Wain et al. 2002, 464). „Sequence Ontology Consortium“ je organizace sdružující bioinformatiky a jejím cílem zpracovat srovnání jednotlivých databází sekvenovaných genomů pomocí počítačových programů. To v podstatě znamená určit v genomech konkrétní hranice, které takové vzájemné porovnání budou umožňovat. I proto bylo nutno pro práci organizace stanovit definici genu. Karen Eilbecková jako její koordinátorka uvedla, že stanovení této definice zabralo 25 vědcům skoro 2 celé dny a celé toto jednání se neobešlo bez sporů a roztržek. V důsledku toho byla stanovena značně volná definice, se kterou se mohli všichni ztotožnit (citováno z Pearson 2006, 401). Její znění je: „Gen je lokalizovatelná oblast genomové sekvence, odpovídající jednotce

dědičnosti, která je asociovaná s regulačními oblastmi, transkripčními oblastmi a/nebo jinými funkčními oblastmi sekvencí“ (Pearson 2006, 401). Jako poslední příklad uveďme definici z učebnice Klinické genetiky: „Obvykle definujeme gen tak, že se jedná o sekvenci chromosomové DNA, která je nezbytná k vytvoření funkčního produktu, ať již to je polypeptid nebo funkční molekula RNA. Geny nemají pouze kódující sekvenci, ale i další sekvence, které jsou nezbytné pro jejich expresi. Tyto regulační sekvence jsou nezbytné pro vytvoření normální a funkční molekuly mRNA a to v přiměřeném množství, na správném místě, v adekvátním období jedince a v odpovídající části buněčného cyklu....Nicméně s rozvojem poznání dalších, více vzdálených regulačních elementů se bude naše chápání ‚začátku‘ a ‚konce‘ genů neustále aktualizovat“ (Nussbaum et al. 2001, 32-33).

Zdá se, že uvedené definici sjednocují obě identity klasického genu (definice funkce genu jako jeho projevu ve fenotypu a strukturní definice hmotného genu jako segmentu chromosomu) v jedné základní přirozené jednotce. Nicméně při detailnějším pohledu, lze zjistit, že funkční definice genu je značně redukována ve prospěch poznatků o hmotné molekulární podstatě genu. V Mullerově originální vizi byly geny schopny sebe replikace (autokatalýzy), zároveň ovlivňovaly fenotyp (heterokatalýza) a byly schopny mutace. Klasický molekulární gen ale není jednotkou replikace. Tou je celá molekula DNA, jíž je gen jenom součástí. Zároveň není gen ani jednotkou mutace. Molekulární gen lze označit za jednotku jedině ve smyslu funkce, jeho podílu na fenotypu (Mullerova heterokatalýza) (Carlson 1966, 87-88). Funkční úloha genu byla tudíž upravena tak, aby byla v souladu s výsledky výzkumu molekulární genetiky. Navíc molekulární koncept genu je omezen na ty sekvence DNA, které naplňují tuto funkční úlohu. Druhá část definice HUGO

komise pro nomenklaturu („Jestliže nelze funkci genu prokázat, může být charakterizován sekvencí, transkripcí nebo homologií“ (Wain et al. 2002, 464), je zcela jasně formulovaná ve smyslu ‚nominálního‘ genu (Griffiths a Stotz, 2006, 519).

Všechny tři definice pojmají gen jako segment DNA a vytváří určitou iluzi genu, jako souvislé sekvence - kompaktního genetického lokusu, který je nějakým způsobem ohraničen a tudíž tvoří jakýsi samostatný celek. Na tento rozpor poukazuje Dillon (2003): „Nejjednodušším vysvětlením pro samostatnost genu by byla existence určitých bariér nebo izolátorů (z angl. insulators), které by každý gen bezprostředně oddělovaly od dalších sekvencí. Ale přes veškerý intenzivní výzkum, nebyly takovéto bariéry spolehlivě prokázány. Tam, kde byly nalezeny, bylo později prokázáno, že jsou extrémně rozdílné ve struktuře a často se shodují se sekvencí jiné funkce.“ (Dillon 2003, 457).

Tak jak začaly být geny a případně celé genomy postupně sekvenovány, začalo být jasné, že jednoduchá organizace genů platí pouze pro některé geny prokaryont (např. *Escherichia coli*)⁹ a jejich fágů. U eukaryont¹⁰ byly prokázány značné odlišnosti v organizaci a struktuře genů. Struktury v genomu eukaryont, které jsou označovány za geny, nemusí být vůbec fyzicky odděleny. Geny se mohou navzájem svými sekvencemi překrývat nebo dokonce jeden gen může být obsažen v sekvenci genu jiného a to buď ve stejném, nebo opačném směru sekvence (tzn. na komplementárním řetězci) DNA molekuly. Vztah mezi strukturou

⁹ *Escherichia coli* je střevní bakterie patřící mezi prokaryonta, což jsou jednoduché jednobuněčné organismy, u nichž DNA není oddělena v buněčném jádře hraničeném membránou.

¹⁰ Mezi eukaryonta patří organismy jako jsou houby, rostliny a živočichové, jejichž buňky obsahují jádro a organely oddělené od cytoplasmy v membránou ohraničeném jádře.

genů a jejich funkcí není tak jednoznačný, jak se na začátku zdálo. Některé finální genové produkty vznikají z více než jednoho strukturního genu a některé strukturní geny vytvářejí více než jeden produkt. Konečně, pořadí různých oblastí v genovém produktu nezáleží jenom na pořadí nukleotidů v sekvenci strukturního genu, důležitou roli zde také hrají post-transkripční a post-translační úpravy, kterými produkty transkripce (RNA) a translace (proteiny) procházejí. Vztah mezi DNA a genovým produktem je ovlivněn řadou mechanismů a není tudíž tak přímý, jak bylo při objevu základních mechanismů transkripce, RNA úprav a translace předpokládáno a jak i relativně recentní definice genu naznačují. Finální produkt tudíž může být různými úpravami ovlivněn do stejné míry jako originální DNA sekvencí genu. Uvedme nyní několik příkladů, které nám pomohou tyto mechanismy přiblížit.

2.6.1. Regulace genů

Druhá a třetí definice (Pearson 2006, 401; Nussbaum et al. 2001, 32-33) zahrnují kromě kódujících sekvencí i tak zvané regulační oblasti, které mají přímou souvislost s expresí genů. Mechanismus genové regulace poprvé popsali Jacob a Monod (1961). Z jejich studie ‚*lac* operonu‘ u *Escherichia coli* vzešel model mechanismu genové regulace. Ten se skládal z oblasti DNA kódující jeden nebo více proteinů, oblasti „promotoru“ (regulační sekvence, na kterou se váže enzym zodpovědný za transkripci) a „operátoru“ (regulační sekvence, na kterou se váže protein inhibující transkripci) (Jacob a Monod 1961). Později byly nalezeny i další sekvence a to zejména u eukaryont, které mohou prakticky ovlivňovat jakýkoliv

stupeň exprese genů a to jak transkripci, tak i degradaci finálního transkriptu (mRNA) a post-translační modifikace proteinů. Tyto sekvence se mohou nacházet přímo v kódující sekvenci nebo v oblasti s ní bezprostředně sousedící. Kromě toho ovšem mohou být regulační oblasti od kódující sekvence značně vzdáleny tak jako v případě ‚enhancerů‘ (z angl. enhancers, zesilovače transkripce) a dalších příbuzných ‚elementů‘ ovlivňujících transkripci (Nussbaum et al. 2001, 33, 38). Regulační elementy a zejména ty značně vzdálené, přestože jsou pro expresi genů funkčně nezbytné, narušují definici genu jako kompaktního genetického lokusu. Navíc tyto regulační oblasti mohou v procesu crossing-overu segregovat nezávisle od sekvence kódující. Vzhledem k tomu, že regulační oblasti ovlivňují transkripci kódujících sekvencí, je zcela jasný i jejich vliv na fenotyp organismu (Nussbaum et al. 2001, 38). Tudíž regulační oblasti lze považovat za nezávislé Mendelovy elementy a jsou taktéž „DNA segmenty, které se podílejí na fenotypu/funkci“, tak jak uvádí první definice genu (Wain et al. 2002, 464). Přesto ale většina biologů nebude regulační oblasti za geny považovat.

2.6.2. Sestřih RNA

U naprosté většiny genů eukaryont je kódující sekvence genů přerušena jedním nebo více nekódujícími segmenty. Tyto vložené nekódující sekvence se nazývají introny. Výsledkem transkripce DNA sekvence u eukaryont je tak zvaná pre-mRNA (z angl. pre-messenger RNA, primární produkt transkripce), která ještě sekvence intronů obsahuje. Z té je vytvořen finální RNA transkript (mRNA) vystřížením intronu a spojením – „sestřihem“ zbylých sekvencí, které se nazývají

exony (Nussbaum et al. 2001,31, 34, 38). Sestřih RNA byl objeven v roce 1977 (Berget et al. 1977, Chow et al. 1977, Gelinás a Roberts 1977). Většina genů lidských má alespoň jeden intron, u mnoha genů je kumulativní délka intronů daleko větší než celková délka všech exonů (Nussbaum et al. 2001). Biologové mluví o *cis*-alternativním sestřihu¹¹, když z jedné mRNA vzniká více než jeden transkript a to procesem vystřížení a opětovného spojení alternativních exonů, což má za důsledek i tvorbu různých proteinových produktů (Berget et al. 1977, Gelinás a Roberts 1977). Tudíž DNA sekvence a její produkt si navzájem lineárně neodpovídají. U bezprostředně sousedících genů někdy proběhne transkripce společně, což znamená, že jsou transkribovány společně a vytvoří jednu pre-mRNA, která je následně sestřihem upravena (Finta a Zaphiropoulos 2000, Communi et al. 2001, Magrangeas et al. 1998). Společná transkripce a následný sestřih může taktéž proběhnout mezi genem a bezprostředně sousedícím pseudogenem (nefunkční kopie některého genu), který by sám o sobě nebyl schopen produkt vytvořit (Finta a Zaphiropoulos 2000, Finta a Zaphiropoulos 2002).

2.6.3. Překrývající se geny

Alternativní genové produkty mohou taktéž vznikat z překrývajících se genů. V tomto případě, geny ve smyslu otevřeného čtecího rámce (ORF), které jsou transkribovány do RNA, nejsou za sebou – tak jako korálky na niti - ale mohou se

¹¹ V současném názvosloví jsou jako *cis*-elementy označovány ty úseky DNA, které jsou transkribovány společně jako součást jedné pre-mRNA. Naproti tomu *trans*-elementy jsou transkribovány zvlášť a jsou spojeny v určité fázi post-transkripčních úprav – tzv. *trans*-sestřih; viz dále.

překrývat a to buď svými částmi anebo jeden gen může být zcela součástí genu druhého (Mottus et al. 1997, Blumenthal 1998). Zvláštním případem je přítomnost genu v sekvenci intronu genu jiného (Henikoff et al. 1986). V některých případech alternativním sestřihem vznikají proteinové produkty, které jsou si strukturně podobné. V jiných případech však se výsledné produkty navzájem velmi liší. Proto také bývají spíše popisovány jako produkty překrývajících se genů než jako produkty alternativního sestřihu jednoho genu (Quelle et al. 1995). Míra odlišnosti mezi těmito produkty závisí na rozsahu překrývání mezi exony genů a na tom, zda sdílené sekvence jsou čteny ve stejném ORF. To, jaké kodóny DNA a následně mRNA obsahuje, závisí na tom, zda čtení DNA sekvence začne na jednom přesném nukleotidu. „Posun čtecího rámce“ znamená, že čtení DNA začalo na jiném nukleotidu. Je to jako bychom známou větu ze slabikáře: „My máme maso“, začali číst na druhém písmeně a vytvořili z ní: „Ymá mem aso“. Nicméně rozdíl mezi jazykem DNA a jakoukoliv lidskou řečí, je v tom, že DNA sekvence bude ve většině případů tvořit smysluplný ‚tří písmenný kód‘ (kodóny, které specifikují jednotlivé aminokyseliny v průběhu translace; obr. 6). To znamená, že velmi odlišné produkty mohou být překládány ze stejné sekvence a to pouze posunem čtecího rámce o jeden nukleotid (Griffiths a Stotz 2006). Stejně jako alternativní transkripty z DNA sekvence, mohou vznikat i několikanásobné simultánní transkripty. Tak tomu je v případě některých funkčních nekódujících RNA (jako jsou mikroRNA), které vznikají paralelním sestřihem z intronových oblastí ještě nematurovaného transkriptu a které se mohou podílet na regulaci kódující části transkriptu toho samého genu (Rodriguez et al. 2004, Mattic a Makunin 2006).

Až do nedávna bylo navíc předpokládáno, že k transkripci dochází pouze u jednoho řetězce DNA. Ve skutečnosti může být DNA transkribována oběma směry (tzn. z obou komplementárních řetězců) za vzniku různých produktů (Coelho et al. 2002). RNA vznikající touto transkripcí mohou být k sobě komplementární a to jak v kódující sekvenci, tak i v nepřekládaných oblastech genu. V tomto případě se může jednat i o transkript s regulační funkcí, který navázáním na svůj komplementární produkt zamezuje jeho translaci (Delihias 1995, Petrukhin et al. 1998, Jong et al. 1999).

2.6.4. *Trans*-sestřih

V procesu *trans*-sestřihu je výsledný mRNA transkript složen ze dvou nebo více nezávisle transkribovaných pre-mRNA. Ve výsledné mRNA mohou být dohromady sestřiženy totožné sekvence, stejně jako alternativní exony pocházející z jednoho ‚normálního‘ genu (Blumenthal 1998, Mottus et al. 1997, Takahara et al. 2000). Kromě toho ovšem může dojít ke spojení pre-mRNA pocházejících z různých částí genomu a tyto transkripty se mohou spojit v různých kombinacích (Borst 1986).

2.6.5. RNA editace

Dalším mechanismem, který do značné míry modifikuje z původní sekvence DNA přepisovanou mRNA a tím i výsledný produkt genu je RNA editace (Eisen 1988). Na rozdíl od většiny prost-translačních úprav mRNA, při kterých zůstává primární struktura kódující sekvence a genového produktu stejná, při RNA

editaci dochází po transkripci ke změně této shody a to změnou primární sekvence mRNA. RNA editace může potenciálně mít značný efekt na finální produkt. To závisí na tom, zda se RNA editací změní smysl kodónu, ve kterém ke změně dochází, čímž by docházelo i ke změně sekvence aminokyselin ve výsledném proteinovém produktu. Přestože bude zřejmě existovat mnoho různých variant RNA editace, všechny budou náležet do k jednomu ze známých mechanismů: místně specifické inserci (vložení) nebo delecí (vystřížení) několika nukleotidů nebo nukleotidové substituci (Mattick a Makunin 2006).

2.7. Doba post-genomová a ještě více problémů

Jak z výše uvedených příkladů vyplývá, byla od osmdesátých let minulého století, až po dokončení první hrubé sekvence lidského genomu objevena řada mechanismů, které ovlivňují a do značné míry narušují původní představu přímého vztahu – lineární korespondence – mezi DNA kódující sekvencí a jejím produktem. Další problém představuje zahrnutí regulačních elementů do definice genu. Tyto elementy jistě patří do této definice funkčně (i když lze diskutovat, zda z funkčního hlediska nejsou ‚geny samy o sobě‘), nicméně jsou lokalizovány v různých oblastech genomu, čímž opět narušují představu kompaktní ‚DNA oblastí‘ (segmentu, sekvenci) zodpovědné za fenotyp/funkci. Tato fakta se v definicích genů, které současná biologie používá, neodrazila a jejich základní znění zůstává i v současné době prakticky nezměněno.

Ještě před zveřejněním prvního hrubé sekvence lidského genomu se zájem vědců částečně přesunul od DNA k jiným oblastem buněčné biologie, jejichž

úlohou je objasnit funkci genomu. Vznikají nové obory jako genomika a proteomika a s nimi spojené podobory charakterizované koncovkou -omika (v angličtině -omics). Tato koncovka obecně poukazuje na to, že zmíněná disciplína studuje kompletní systém biomolekul jako např. genom obsahující veškeré ‚geny‘ organismu. Kromě genomiky, která se zabývá strukturou a pochopením funkce genomu, vznikla i proteomika zabývající se proteomem jako souborem všech proteinů organismu, transkriptomika zabývající se transkriptomem jako souborem všech kódujících transkriptů a rnomem jako souborem všech nekódujících, ale funkčních RNA transkriptů. Výzkumy navazující na data získaná z projektů sekvenování lidského genomu přinesly další komplexní poznatky, díky kterým se i sami biologové snaží o revizi definice genu (Gerstein et al. 2007, Gingeras 2007) (obr. 7, 8).

Jedním z projektů navazujících na sekvenování lidského genomu je i projekt ENCODE (z angl. Encyclopedia of DNA Elements). Cílem tohoto projektu je mapování různých sekvenčních elementů DNA včetně genů, exonů, elementů ovlivňujících transkripci (např. promotory, enhancery, atd.), RNA transkriptů a mnoha jiných dalších specifických sekvencí. Započatý pilotní projekt se zaměřil na 44 vybraných oblastí, které pokrývají 1% genomu (Weinstock 2007). Tento projekt přinesl další poznatky, na jejichž základě se Mark Gerstein se spolupracovníky (2007) pokusil navrhnout novou definici genu. Uvedme zkráceně alespoň některé z těchto poznatků.

Ve shodě s některými dříve publikovanými výsledky (Kapranov et al. 2002, Bertone et al. 2004, Cheng et al. 2005) bylo nalezeno značné množství nových dříve nepopsaných transkriptů, jejichž potenciál kódovat proteiny je však značně

omezený. Přestože byly dočasně nazvány jako nekódující transkripty, neexistuje žádný důkaz, že tyto transkripty nekódují krátké polypeptidy. Proto byly taktéž přejmenovány na transkripty neznámé funkce (TUFs, z angl. transcripts of unknown function) (Cheng et al. 2005). TUFs tvoří přibližně polovinu lidského transkriptomu (The ENCODE Project Consortium 2007). A pocházejí z transkripčních oblastí, které jsou přibližně rovnoměrně rozloženy vevnitř stejně jako vně ‚hranic genů‘ (Gingeras 2007, 684). Předpokládá se, že část TUFs tvoří dvě dříve popsané skupiny a to pseudogeny a transkribované RNA, které nekódují proteiny (ncRNAs, non-coding RNAs). Obě tyto genomové skupiny jsou často lokalizovány v intronech genů kódujících proteiny (Gerstein et al. 2007, Gingeras 2007). ncRNAs mají mnoho různých funkcí jako je genová regulace, RNA sestřih, syntéza proteinů (Mattick a Makunin 2006), jsou však těžko identifikovatelné a proto se předpokládá, že prozatím byla popsána pouze část funkčních ncRNAs lidského genomu (Gerstein et al. 2007,674). Druhou skupinou jsou pseudogeny. Tyto ‚záhadné‘ genomové elementy často se ‚pohybující mezi životem a smrtí‘ mohou ovlivnit strukturu a funkci lidského genomu (Gerstein et al. 2007,675). Ačkoliv bylo předpokládáno, že pseudogeny jsou transkripčně inaktivní, bylo nedávno objeveno, že přibližně 20% z nich vykazuje transkripční aktivitu. Bylo taktéž prokázáno, že některé aktivní geny nově vznikly z inaktivních pseudogenů. Tyto poznatky by měly vést k přehodnocení charakteristik rozlišujících navzájem mezi pseudogeny a geny (Gerstein et al. 2007).

Popsány byly i nové dříve neznámé počátky transkripce (The ENCODE Project Consortium 2007). Což následně vedlo testováním 12 různých typů tkáně ke zjištění, že u více než poloviny genových lokusů existují alespoň v jedné tkáni



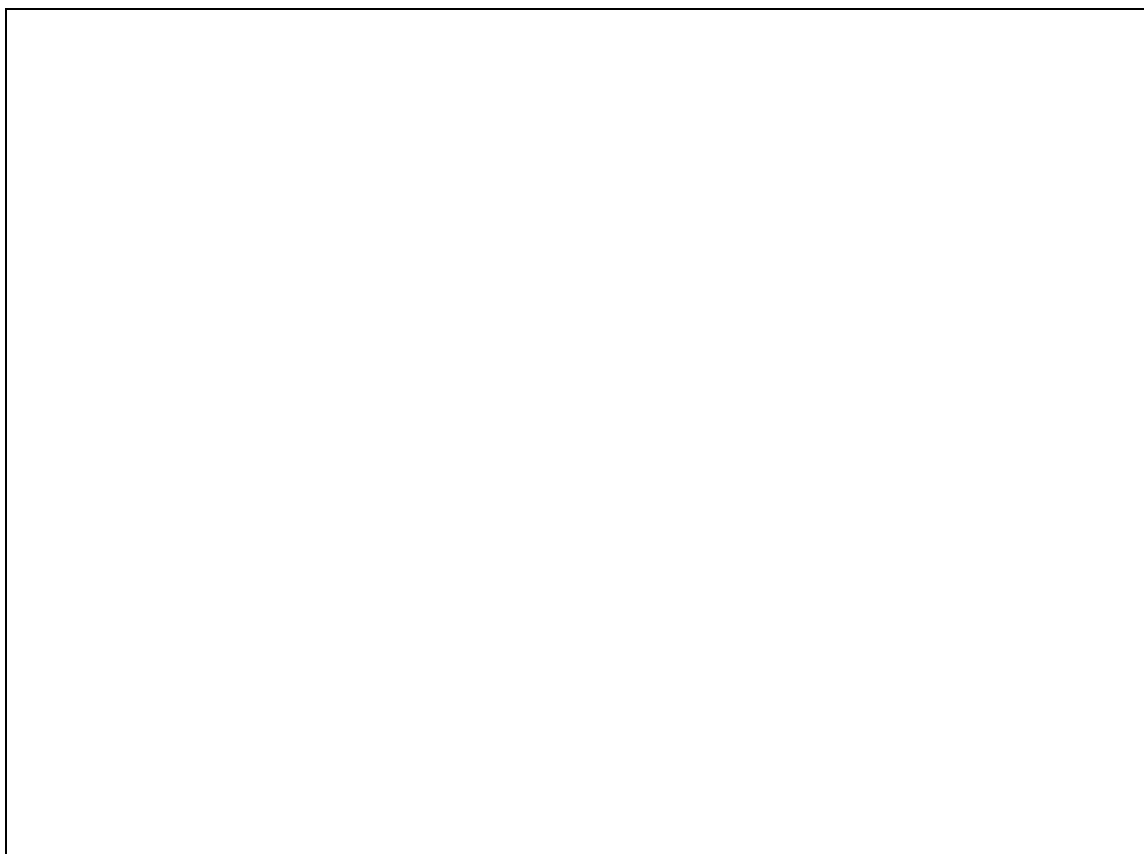
Obrázek č. 7. Postupný vývoj konceptu genu a modely působení mutací na vznik fenotypu. A) koncept genu v klasické genetice na počátku 20. století; B) molekulární koncept genu vycházející ze znalosti struktury DNA a základních procesů exprese genů; C) objevy intronů a alternativního sestřihu RNA narušily molekulární koncept genu jako ohraničený a spojitý segment DNA; D) v post-genomové době je známo, že jedna sekvence DNA může kódovat mnoho alternativních produktů, včetně nekódujících RNA (ncRNA). Oblasti exonů jsou znázorněny jako modré obdélníky, pod nimi jsou šipkami vyznačeny transkripty s alternativním sestřihem. Hypotetická mutace je znázorněna červeným trojúhelníkem; tak jak koncept genu v době post-genomové zahrnuje více transkriptů, může také jedna mutace nyní ovlivnit více různých transkriptů a tudíž potenciálně vytvořit více různě odlišných fenotypů. (Převzato a upraveno z Gingeras 2007.)

alternativní počátky transkripce. Ty mohou být i značně distálně vzdáleny (v průměru ~ 1000 000 bazí, což mohou být i dva až tři genové lokusy) a mohou využívat i promotorů jiných genů. Tyto transkripty představují tkáňově specifické alternativní izofomy pokrývající několik genových lokusů (Gerstein et al. 2007, 673). Prokázáno také bylo, že elementy podílející se na genové regulaci pokrývají celý genom a jsou v něm značně rozptýleny (The ENCODE Project Consortium 2007). Nejsou však rozloženy náhodně, ale mají tendenci vytvářet oblasti ‚chudé‘ a

,bohaté' na regulační elementy (Gerstein et al. 2007, 673). Navíc bylo objeveno, že některé z těchto elementů jsou transkribovány a tudíž tvoří součást genomového transkriptu (Gerstein et al. 2007, 673). Dále bylo potvrzeno, že mnoho regulačních elementů je součástí genů, a to jak intronů, tak i exonů (obr. 7D) (The ENCODE Project Consortium 2007).

Výsledky výzkumu Projektu ENCODE odhalily komplexní transkripční síť pokrývající genom (Gerstein et al. 2007, 674). Z toho Gerstein se spolupracovníky (2007) odvozuje, že genom nelze již dále rozdělovat na genové a intergenové oblasti, protože mnoho dříve ohraničených genových lokusů splývá ve větší genomové celky. Poukazuje zároveň na to, že současně používané definice genu, tyto komplexní poznatky nezahrnují a tudíž nejvhodnějším východiskem by bylo zavést definici novou. Znění definice nové zde uvedeme v angličtině a jejím přibližném překladu: „The gene is a union of genomic sequences encoding a coherent set of potentially overlapping functional products.“ (Gen je sjednocení genomových sekvencí kódujících koherentní sadu potenciálně se překrývajících funkčních produktů) (Gerstein et al. 2007). Její pochopení není zcela možné bez vysvětlujícího nákresu (obr. 8). Tato definice by měla zahrnovat DNA segmenty rozptýlené v genomu, nepojímá tudíž gen jako spojitou DNA sekvenci, nezahrnuje navíc regulační elementy a snaží se zohlednit všechna fakta známá o překrývajících se genech a alternativním sestřihu. Ambicí autorů je i určitá spojitost s dřívějšími definicemi užívanými v biologii a zároveň její využitelnost v různých oborech a podoborech genomiky, genetiky a biologie vůbec. Autoři především zdůrazňují, že definice genu zahrnuje funkční produkty genů a to jak proteiny, tak i

RNA. Ačkoliv zároveň připouštějí, že prokázání a úplná znalost funkce všech molekul kódovaných genomem je prozatím v nedohlednu (Gerstein et al. 2007).



Obrázek 8. Schéma k definici genu navrhované projektem ENCODE. Z genomové oblasti jsou vytvářeny tři různé primární transkripty. Následuje alternativní sestřih, jehož výsledkem je pět proteinových produktů vzniklých ze dvou primárních transkriptů. Produktem třetího z primárních transkriptů je nekódující RNA (ncRNA). Proteinové produkty jsou kódovány třemi skupinami DNA segmentů (první je A, B, C; druhou je D a třetí E). V případě první skupiny obsahující tři segmenty (A, B a C) je každý DNA segment sdílen nejméně dvěma z produktů. Dva z primárních transkriptů sdílejí 5' nepřekládanou oblast, ale jejich překládané oblasti D a E se nepřekrývají. ncRNA produkt sdílí genomové sekvence (X a Y) s protein kódujícími segmenty A a E. Protože ncRNA produkt je tvořen RNA, není ko-produktem protein kódujících genů. V souhrnu tato genomová oblast obsahuje čtyři geny, každý z nich je ohraničen přerušovanou oranžovou čarou: Gen 1 se skládá z DNA segmentů A, B a C; gen 2 se skládá z D; gen 3 z E; gen 4 z X a Y. Pro přehlednost byly v schématu exonové a proteinové sekvence A-E vertikálně seřazeny, takže přerušované čáry sestřižených transkriptů a funkčních produktů znázorňují spojitost mezi proteinovými sekvencemi (ovály) a RNA sekvencemi (obdélníky). Tmavě vyznačené části obdélníků znázorňují nepřekládané oblasti a světle vyznačené části obdélníků překládané sekvence. (Převzato a upraveno z Gerstein et al. 2007.)

Jak je vidět nové poznatky v biologii získané nejmodernějšími a nejvýkonnějšími technologiemi přinesly další novou definici genu. Definici, která se má stát novým nástrojem vhodným k počítání genů a stanovení jejich funkce (obr. 8). Právě prokázání funkce ‚jednotlivých genů‘, což v podstatě znamená prokázání jejich podílu na fenotypu, představuje pro genetiky skutečný oříšek. Na toto poukazuje i Thomas Gingeras (2007, 687) a zároveň navrhuje použití transkriptů jako základních operačních jednotek, pomocí kterých by mohl být ke konkrétním genomovým sekvencím přiřazen její podíl na fenotypu/funkci (Gingeras 2007, 688).

2.8. Shrnutí

Gen byl původně zaveden jako hypotetická jednotka genetické analýzy, jejíž úloha ve vztahu genotyp - fenotyp byla funkčně vymezená Mendelovými zákony dědičnosti. Další snahou bylo prokázání hmotné podstaty genu, které vyvrcholilo popsáním struktury DNA. Objevením procesů exprese genů a ustanovením ‚ústředního dogma‘ molekulární genetiky, byl gen definován jako spojitá DNA sekvence kódující protein nebo funkční RNA (obr. 7A, B). Z definice genu byly vyřazeny mutace a rekombinace, které se staly vlastnostmi DNA spíše než vlastnostmi genu. Funkcí genu bylo určení struktury genového produktu tak, že sekvence DNA a její genový produkt si navzájem lineárně odpovídají. Další objevy na poli molekulární genetiky tento koncept značně narušily. V roce 1986 Raphael Falk uvádí: „Není (gen, pozn. autora) samostatný – jsou zde překrývající se geny, není spojitý – jsou zde introny v genech, nemá ani stálé místo – existují transpozony, nemá ani jasně definovanou funkci – jsou zde pseudogeny, nemá ani

neměnnou sekvenci – jsou zde dohodnuté (z angl. consensus) sekvence, nemá ani přesné hranice – jsou zde proměnlivé sekvence v obou směrech genu.“ Tudíž od roku 1986 je koncept genu na cestě z „dobře definované hmotné jednotky zpátky k abstrakci, hypotetickému konstrukt, jestli ne k nestálé proměnné, vymyšlené vědci pro jejich potřeby“ (Falk 1986, 169, 160).

Současně používané definice genu jsou ve světle poznatků, které přinesla doba post-genomová, i pro odborné kruhy již nevyhovující. Na základě poznatků Projektu ENCODE, který se detailně zabýval sekvencemi pokrývající 1% (!) lidského genomu, může dojít k přehodnocení definice genu eventuálně posunu k transkriptům jako základním jednotkám funkce genomu. Další vývoj konceptu genu v biologii bude jistě ovlivněn výsledky výzkumů genomiky a jí příbuzných oborů za pomoci stále výkonnějších technologií. Jak bude naznačeno v další části, není ovšem od věci se ohlédnout zpátky a zkoumat, zda právě původní klasické koncepty genu nevyhovovaly lépe i našemu současnému chápání jeho funkce. Vždyť i Goldschmitova kritika genu jako určité částice chromosomu se zdá ve světle dnešních poznatků opodstatněná: „Specifický gen formoval myšlení v biologických vědách po celé minulé století. Ale pokusy o přeložení takto komplexního konceptu do samostatné fyzikální struktury s jasně definovanými hranicemi byly vždycky s vysokou pravděpodobností problematické a nyní se zdají být odsouzeny k neúspěchu. Místo toho se gen stal flexibilní entitou s hranicemi, které jsou definovány kombinací prostorové organizace a polohy, schopností specificky odpovídat na určité sady buněčných signálů, a vztahem mezi jeho expresí a finálním efektem ve fenotypu.“ (Dillon 2003, 457).

3. Co je gen?

Současně používaný molekulární koncept a z něj odvozené definice genu jako segmentu DNA, který tvoří kompaktní a ohraničený genetický lokus, neodpovídají stavu poznání. Zároveň i vztah mezi strukturou genu a funkcí genu není jednoznačný – genový produkt není pouze lineárním obrazem kódující sekvence. Tyto argumenty proti molekulárnímu konceptu genu lze vyvodit z těchto poznatků:

- Existence regulačních oblastí značně vzdálených od kódující sekvence.
- Vzájemné překrývání se ‚genů‘.
- Existence alternativních počátků transkripce v různých tkáních organismu.
- Post-transkripční modifikace – alternativní sestřih, trans-sestřih, RNA editace

Mezi další argumenty, které nebyly v předcházejícím textu podrobně rozebrány, patří například degenerace genetického kódu nebo post-translační úpravy genových produktů. Z poznatků projektu ENCODE dále vyplývá, že genom nelze již dále rozdělovat na genové a intergenové oblasti, protože mnoho dříve ohraničených genových lokusů splývá ve větší genomové celky (Gerstein et al. 2007).

Nevyhovující definice genu, a jeho značně vágní koncept v molekulární genetice konce minulého století podnítila některé filosofy zabývající se biologií

k jeho kritice (např. Burian 2004, Falk 1986 a Portin 1993 a 2002). Tito ‚genový skeptici‘ (Watters 2007, 12) přišli s tvrzením, že gen je přežitý termín postrádající v biologii užitečnost. Namísto ‚genu‘ navrhují biologům užívat molekulární jednotky jako nukleotid, kodon, kódující oblast, protomorová oblast, exon a další. Pragmatickou odpověď tomuto ‚genovému skepticizmu‘ nabízí Ken Watters (2007) společně Evelyn F. Kellerovou (2005). Oba podotýkají, že právě vágnost termínu genu umožňuje biologům porozumění a flexibilní komunikaci o výsledcích výzkumů v různých disciplínách. Jako druhý důvod uvádějí, že termín ‚genu‘ se vztahuje k entitám, kterými lze experimentálně manipulovat a tím vytvářet nesporné a reprodukovatelné výsledky. Oba považují geny za vhodné nástroje k manipulaci biologických procesů a především z tohoto důvodu předpokládají, že geny hrají a dál budou hrát důležitou roli v biologickém diskursu (Watters 2007, Keller 2005).

Přestože lze s ‚genovými skeptiky‘ v mnohém souhlasit, je nutno dát za pravdu Kellerové a Watersovi v tom, že geny zřejmě biologický diskurs neopustí. Ačkoliv by se z historie genu zdálo, že jeho definice mu dává pouze jednu funkci a to kódovat genový produkt, je tomu jinak. Geny a to i ve svém abstraktním pojetí stále hrají důležitou roli ve dvou základních teoriích biologie a genetiky. Těmi jsou dědičnost a vývoj jedince. Geny jsou stále ještě klíčovým faktorem používaným při objasnění dědičnosti – přenášení jednotlivých znaků mezi generacemi a ve vývoji těchto znaků – vzniku fenotypu u jedince. Svoje místo mají i v jiných disciplínách jako je evoluční biologie nebo populační genetiky. Z těchto důvodů nebudou jistě v dohledné době nahrazeny jinými pojmy, i když bližší vymezení pojmu genu je zcela jistě nutné.

Důležitou roli gen taktéž hraje ve všeobecném laickém chápání dědičnosti. Tento pojem se vžil, stejně jako po staletí přijímaná hypotéza „o krvi“. Místo tradičního „má to v krvi“, dnes říkáme „má to v genech“ nebo „nemám na to geny“. Co tím vlastně chceme říct? Jak si představujeme, že asi geny působí? Vnímáme sami sebe jako nějaký konglomerát genových produktů? Ne, to zcela jistě ne. Tak nějak intuitivně chápeme, že se geny našich rodičů smíchaly a vytvořily některé naše fyzické i charakterové vlastnosti, ve kterých se více či méně rodičům podobáme. Všichni u svých potomků hledáme ty vlastnosti, kterých si sami na sobě vážíme, a děšíme se toho, že mohly zdědit i některé méně dobré. Všichni známe tu otázku: „Po kom to dítě asi má?“ A nemusí to být přímo rodiče, u kterých je nutno zděděnou vlastnost hledat. Vždy se najde hudebně nadaná tetička nebo třeba nezodpovědný strýček ze třetího kolene. Na co tedy poukazujeme, když mluvíme o tom, že jsme něco – některé geny zdělili po matce a nějaké jiné zase po otci? V podstatě na to stejné, na co se zaměřila genetika ve svých počátcích před sto lety, před tím než byla známá hmotná podstata genu, jejíž objev ovlivnil veškeré její další směřování. Geny v našem chápání stejně jako v klasické genetice přenášejí z generace na generaci určité znaky a umožňují, aby se tyto znaky vyvinuly.

V klasické genetice byly geny zpočátku abstraktními proměnnými, které umožňovaly přenos znaků z generace na generaci. Objevením DNA a stanovením její struktury byla úloha genu do určité míry redukována, dědičnost získala v molekule DNA svoji hmotnou podstatu. Dále se v textu pokusíme odvodit, že *gen nemá hmotnou podstatu, ale charakter informace*. A DNA v procesu přenosu informace z generace na generaci funguje pouze jako prostředník či nosič

informace ve směru horizontálním – mezi generacemi a ve směru vertikálním - mezi buňkami organismu. Druhou funkcí genů je vznik a vývoj znaku organismu, tedy určitý podíl jednoho genu na finálním fenotypu organismu. *Gen je tudíž informace obsahující instrukci pro vytvoření fenotypového znaku. Tato informace je zapsaná různým způsobem v různých oblastech genomu.* Vzhledem k tomu, že v další části se budeme věnovat pojmu genu v klinické praxi, *je fenotypový znak vymezen podle klinického či jiného teoretického zájmu.* V tomto smyslu tedy záleží zcela na nás, co potřebujeme či chceme sledovat. Jinými slovy vybereme sami určitý znak a sledujeme, zda vůbec a případně do jaké míry je genetický podmíněn (např. různá onemocnění a dědičné choroby). Abychom mohli dokázat toto tvrzení, bude nutno se seznámit do jisté míry s konceptem informace a to jak matematickým modelem komunikace (Shannon 1948), tak i konceptem informace se sémantickým obsahem, který vymezuje informaci i jako instrukci (Floridi 2005, 16).

Na základě dřívějších i recentních výsledků genetiky a genomiky je jasné, že komplexita organismů není založena pouze v genech, ale podílí se na ní zřejmě celá řada faktorů vnitřního a vnějšího prostředí, jejich vzájemné interakce a další mechanismy genové exprese (Sedláček 2002, Ho 1998). Tato fakta je nutno v pojmu genu taktéž zohlednit. V jejich světle totiž nemůže být gen jenom informací zapsanou v DNA, která je následně beze zbytku mechanicky realizována. Na základě poznatků v době post-genomové se více blížíme k tomu, že gen je to „co organismus dokáže dělat se svým genomem“ (Griffiths a Stotz 2006). Gen proto musí být vykládán – interpretován v souvislostech se všemi dalšími faktory – proměnnými jako je vnější prostředí, přinášejícími další informace nutné k jeho

realizaci. Nejblíže se tomuto pojetí genu blíží Jan Klein (1964), který gen definuje jako „množství informace potřebné pro jeden znak“ (Klein 1964, 166), aniž by blíže specifikoval, ze kterých zdrojů tato informace pochází.

3.1. Jsou ještě jiné ‚geny‘?

Termín ‚genu‘ se neužívá pouze v molekulární biologii a genetice, ale má své místo i v jiných disciplínách biologie. Jednou z nich je i evoluční biologie, která v mnohém navazuje na populační genetiku. Jak si ukážeme na následujících dvou příkladech evolučních teorií, koncept genu vycházející z klasické genetiky může být zcela přizpůsoben sledování a výzkumu daného oboru. Přestože oba tyto koncepty vycházejí z poznatků molekulární genetiky a jsou bezprostředně spjaté s molekulou DNA, jejich definice ‚genu‘ se zcela odlišuje od molekulárního konceptu genu. Tyto příklady nám navíc dále pomohou při našem vymezení pojmu genu.

3.1.1. Evoluční koncept genu

Základem teorie klasické genetiky, která v podstatě platí dodnes, bylo, že genotyp jedince společně s působením vnějšího prostředí determinuje jeho fenotyp. Identifikace genu byla tudíž možná přes fenotypové rozdíly, které způsoboval. Tyto fenotypové rozdíly byly způsobeny různými alelami přítomnými v lokusu genu. Gen bylo taktéž možno sledovat přes vazebnou analýzu jako specifický segment chromosomu (obr. 3).

Tento koncept genu je stále součástí biologie a některých jejích teorií takovým způsobem, že jeho nahrazení molekulárním konceptem genu by bylo umělé, nepřírozené a zároveň omezující. Příkladem je ‚evoluční koncept genu‘, což je generalizovaný koncept genu obhajovaný zejména George C. Williamsem (1966) (citováno z Griffiths a Stotz 2006, 509). Populační genetika, na níž je založena evoluční teorie neodarwinismu, předpokládá, že fenotypové rozdíly, na kterých působí selekce, jsou výsledkem toho, že každý jedinec má jinou alelu v různých genových lokusech, a že změny ve složení populace v čase zcela odrážejí změny v poměru různých alel v každém lokusu. V populační genetice stejně tak jako v evoluční teorii je gen něco, co způsobuje fenotypovou odlišnost a co vykazuje mendelistický způsob dědičnosti. Proto Williams píše: „Užívám slova gen ve významu „to, co segreguje a rekombinuje s pozorovatelnou frekvencí.“ (Williams 1966, citováno z Griffiths a Stotz 2006, 509, stejný citát lze nalézt v nepřesném překladu v Dawkinsovi 1989, 244). Od Williamse si tuto definici vypůjčil Richard Dawkins a dále ji rozpracoval na „gen jako jakoukoli část chromosomového materiálu, která může přečkat dobu dostatečně dlouhou k tomu, aby mohla sloužit jako jednotka přírodního výběru“ (Dawkins 1989, 35). Rozhodující vlastností ‚evolučního genu‘ není to, že kóduje protein, ale že je jednotkou rekombinace – segmentem chromosomu, u něhož v meiose dochází pravidelně k rekombinaci s jinými segmenty chromosomu (obr. 3). Zároveň, aby tento segment mohl být jednotkou přírodního výběru, musí být tak dlouhý (lépe řečeno krátký), že v intaktním stavu nerozdělený meiosami přetrvává mnoho generací (Dawkins 1989, 35-42). Jedinou dále nedělitelnou jednotkou rekombinace je jednotlivý nukleotid, proto je ‚evoluční gen‘ jako jednotka otázkou stupně

rozlišení. Což ovšem není na překážku použití konceptu evolučního genu v populační biologii (Griffiths a Stotz 2006, 509).

Mnoho chromosomových segmentů, které se chovají jako nezávislé Mendelovy elementy (regulační oblasti genů zmiňované v kapitole Regulace genů, viz výše), jsou dle teorie neodarwinismu ‚evolučními geny‘, přestože neodpovídají molekulární definici genu. Tyto regulační oblasti často i velmi vzdálené od kódujících sekvencí, jejichž expresi ovlivňují, mohou být předmětem působení přírodního výběru. Různé elementy přítomné v DNA jsou tudíž potenciální ‚evoluční geny‘. Dawkins nazývá ‚molekulární geny‘ dle Benzera cistrony. Jeho gen jako jednotka přírodního výběru „se ve stupnici umístí někde mezi cistronem a chromosomem“ (Dawkins 1989, 41). ‚Evoluční geny‘ mají svojí vlastní ‚sobeckou‘ (Dawkins 1989) evoluční dynamiku. Do tohoto konceptu je nutno zahrnout všechny dědičné rozdíly v DNA, které mají vliv na fitness (biologickou zdatnost). Omezení jednotek evoluční genetiky na kódující sekvence a regulačními oblastmi by zároveň omezilo možnosti neodarwinistické teorie objasnit evoluční změny (Dawkins 1989).

3.1.2. Koncept genu jako tvůrce rozdílů

Konceptu genu v klasické genetice vychází z předpokladu, že různé alely genu lze sledovat přes fenotypové rozdíly, které způsobují. Gen je tudíž zodpovědný za vznik znaku, na jehož základě lze od sebe navzájem odlišit dva jedince. Toto vysvětlení pojmu genu, lze nalézt u Jaroslava Flegra v jeho teorii ‚Zamrzlé evoluce‘ (2006). Podle něj je gen „vloha zodpovědná za vznik jednoho konkrétního nejmenšího samostatně vymežitelného rozdílu mezi dvěma jedinci

v populaci“ (Flegr 2006, 295). Podobné pojetí funkce genu má i Waters (2007, 23), který vychází z konceptu ‚tvůrce aktuálních rozdílů‘ v rámci populace tvořené jedinci, kteří se navzájem v určité vlastnosti liší. V takovéto populaci může být mnoho ‚potenciálních tvůrců rozdílů‘ (z angl. potential difference makers), protože na vytvoření rozdílných vlastností se může podílet mnoho různých faktorů. Za ‚aktuální tvůrce rozdílů‘ jsou považovány ty faktory, které jsou aktuálně různé a jejichž aktuální odlišnost přináší rozdíly v dané vlastnosti. Na základě tohoto principu jsou geny s ohledem na fenotypové rozdíly v populaci ‚aktuální tvůrci rozdílů‘. A to tak, že aktuální rozdíly v genech způsobují aktuální rozdíly ve fenotypu (Waters 2007, 23).

Waters dále aplikuje tuto teorii na poznatky molekulární genetiky tak, že geny označuje za ‚aktuální tvůrce rozdílů‘ v lineární sekvenci RNA molekul a proteinů. Tyto rozdíly jsou dle něj způsobeny specifickými rozdíly v DNA sekvenci. Geny lze tedy označit kromě ‚aktuálních tvůrců rozdílů‘ i za ‚specifické tvůrce rozdílů‘ (Waters 2007, 23-24). Rozdíly mezi jednotlivci v dané populaci způsobuje dle Flegra také DNA: „V některých případech může být zodpovědný za daný rozdíl jeden úsek DNA (přesněji řečeno jeden či více rozdílů nacházejících se v určitém úseku DNA), jindy je rozdíl mezi jedinci podmíněn charakterem DNA na několika místech genomu. I rozdíl v jediném nukleotidu v DNA může zapříčinit změnu ve vlastnostech organismů, a může tedy být materiální podstatou genu.“ (Flegr 2006, 295).

Watersovo i Flegrovo vymezení genu jako ‚tvůrce rozdílů‘ stále ještě přisuzuje výhradní roli DNA a změny na úrovni DNA jsou jimi považovány za zásadní. Přesto se jejich pojetí diametrálně odlišuje. Waters je zastáncem

molekulárního konceptu genu a jeho lineární korespondence mezi genem - jako DNA kódující sekvencí a jeho produktem - biomolekulou (Waters 2007, 15). Naproti tomu Flegr má k molekulárnímu konceptu genu podstatně skeptičtější přístup: „Představy molekulárních biologů, že můžeme spočítat geny u určitého organismu tím, že osekvenujeme jeho genom, je tak naprosto naivní – počty genů pochopitelně podstatně překračují počty samotných nukleotidů v jeho genomu.“ (Flegr 2006, 295).

3.2. Gen je informace pro vytvoření znaku

Z konceptu klasické genetiky budeme při vymezení pojmu genu vycházet i my. Stejně jako v klasické genetice považujeme za gen něco, co přenáší znaky z rodičů na děti. Stejně jako v klasické genetice, gen umožňuje sledovat znaky v generacích a na základě fenotypu rodičů odhadovat fenotyp jejich potomků. Gen tudíž dědičně podmiňuje vytvoření určitého znaku. Z obou předchozích příkladů – evolučního konceptu genu a genu jako tvůrce rozdílu – je patrné, že lze pojem genu i jeho hmotnou podstatu (tzn. délku sekvence DNA) zcela vymezit dle teoretického zájmu dané disciplíny. V našem případě budeme sledovat gen v klinické praxi. Zde gen rozhoduje o nemoci a zdraví. Jednotlivé znaky tudíž mohou být vymezeny na základě různých onemocnění a to jak onemocnění podmíněných monogenně (za vznik onemocnění je zodpovědná změněná informace jednoho genu), tak i komplexních onemocnění (onemocnění vznikající spolupůsobením více faktorů).

V této chvíli bude nutno upřesnit termíny ‚znak‘ a ‚vlastnost‘, protože se v různých konceptech tyto termíny zaměňují, jsou používány jako synonyma nebo naopak jako termíny různé. V genetickém názvosloví jsou vlastnosti označovány jako znaky. Znakem označujeme sledovanou vlastnost, která je geneticky podmíněna, i když na jejím spoluvytváření se může podílet vnější prostředí. Rozdílný náhled na tyto termíny má Flegr. Ten považuje za znak takovou vlastnost, která se v populaci vyskytuje nejméně ve dvou formách. „Gen je vymezován na základě rozdílu mezi jedinci, proto se při sledování v populaci daného druhu musí vyskytovat daná vlastnost (například barva očí) nejméně ve dvou formách. Vlastnost vyskytující se v populaci nejméně ve dvou formách označujeme jako znak. O existenci mnohých genů se vůbec nedozvíme, neboť příslušným rozdílem ve vlastnostech organismů mohou projevit pouze za určité situace (v kombinaci s určitým vlivem prostředí nebo s určitými alelami přítomnými u daného jedince, případně ve studované populaci (nebo u studovaného druhu vůbec) může v daný okamžik chybět variabilita v daném genu.“ (Flegr 2006, 295).

Dle našeho vymezení, však mezi znaky jistě patří i ty vlastnosti, ve kterých se navzájem jedinci v určité populaci nebo i určitého druhu od sebe neodlišují. Existuje mnoho vlastností = znaků, které jsme zdělili po svých předcích, jsou dědičně podmíněny, a přesto se v nich navzájem neodlišujeme. Například lidé jako druh *Homo sapiens* má jistě mnoho dědičně podmíněných znaků, ve kterých se všichni navzájem shodujeme (např. 4 končetiny). Co můžeme sledovat jako rozdíl, je například délka končetin, která taktéž může být do určité míry geneticky podmíněna a to různými způsoby.

Jako příklady různě geneticky podmíněných syndromů charakterizovaných malým vzrůstem lze uvést achondroplázii nebo Turnerův syndrom. Achondroplázie, nejčastější příčina lidského trpaslictví, je autosomálně dominantní onemocnění způsobené specifickými mutacemi v genu nazývaném *FGFR3* (dle našeho vymezení se jedná o gen pro achondroplázii) a kódujícím transmembránový tyrozin kinázový receptor, který váže růstový faktor fibroblastů. Více než 80-90% pacientů má mutaci *de novo*, která vzniká výhradně v otcovské zárodečné linii (Nussbaum et al. 2001, II).

Druhým příkladem, pro nějž je kromě jiných znaků charakteristický nízký vzrůst, je Turnerův syndrom. Jeho příčinou je kompletní nebo parciální chybění (monosomie) druhého X-chromosomu u jedinců ženského fenotypu. Monosomie X-chromosomu může vzniknout buď chyběním X-chromosomu v gametě, nebo ztrátou X-chromosomu v zygotě. U 70-80% pacientek chybí paternální X-chromosom. U tohoto onemocnění je tedy příčinou malého vzrůstu chybění informace X-chromosomu. Mechanismus vedoucí k vzniku fenotypu Turnerova syndromu není doposud známý (Nussbaum et al. 2001, LVI).

Oba příklady dokumentují onemocnění vykazující typické fenotypové znaky, které jsou geneticky různě podmíněny. U obou je jedním ze znaků i nízký vzrůst postavy tedy krátká délka končetin. Ten ovšem může být způsoben v některých případech i zcela jinými důvody, jako je například převažující malý vzrůst postavy u většiny členů rodiny nebo podvýživa.

Znak je tedy určitá vlastnost organismu, jejíž vznik ve vývoji jedince je podmíněn geneticky při spolupůsobení dalších faktorů. Funkcí genu je znaky mezi jednotlivými generacemi přenášet, tak aby byly dědičné a tudíž geneticky podmíněné. Další funkcí je vznik tohoto znaku, jeho vývoj ve fenotypu. Pro vznik určitého znaku je nutná informace genu, která byla zděděna po rodičích. V případě různých onemocnění může být tato informace změněna – mutována, což má za následek změnu fenotypu a vývoj daného onemocnění (např. výše zmíněná achondroplázie a Turnerův syndrom). Informace, která se dědí mezi generacemi, nemá hmotnou povahu a nemusí být, jak si dále ukážeme, zapsána přímo v nukleotidové sekvenci DNA.

3.3. Co dědíme?

3.3.1. Informace nebo hmota?

Přestože gen je v biologickém výkladu skoro vždy bezprostředně spojen s molekulou DNA, lze celkem snadno odvodit, že jeho podstata není materiální, ale

má charakter informace. Molekula DNA je pouze prostředníkem, umožňujícím jak její horizontální přenos mezi buňkami organismu tak i vertikální přenos z generace na generaci. Toto tvrzení lze celkem jednoduše doložit. Při pohlavním rozmnožování vzniká nový organismus vždy splynutím dvou zárodečných buněk. Pro zjednodušení budeme dále užívat termíny používané pro pohlavní rozmnožování člověka, ačkoliv vyvozené závěry lze aplikovat na geny jakéhokoliv diploidního organismu vzniklého pohlavním rozmnožováním. Každý nový jedinec tedy vzniká oplodněním vajíčka spermií. Každý člověk má celkem 46 chromosomů, tzn. 46 molekul DNA. Chromosomy jsou vždy v somatických buňkách přítomné ve dvou kopiích, nebo-li ve dvou sadách. Ovšem pohlavní buňky obsahují pouze jednu sadu chromosomů. Vajíčko tedy obsahuje 23 molekul DNA maternálního původu a spermie 23 molekul DNA paternálního původu. Po oplození vajíčka tyto dvě sady vytvoří kompletní genetickou výbavu člověka. Následně po oplození dochází k dělení buňky. Jednou z vlastností DNA, o které jsme mluvili již dříve, je schopnost její replikace – kopírování. Při každém buněčném dělení se veškerá DNA zkopíruje a přesně rozdělí do dvou nově vznikajících buněk. Jestliže lidské tělo je tvořeno biliony buněk, kde potom najdeme naši původní DNA z vajíčka a spermie? Kde je v podstatě ta jediná pravá hmota, kterou jsme zdědili po svých rodičích? Nikde! To je jediná možná odpověď. Protože i kdyby se nám podařilo najít buňku obsahující alespoň část původní maternální nebo paternální sady, již by to nebyly ty stejné molekuly. Důvodem je to, že DNA není jakousi rigidní strukturou, která podléhá pouze kopírování. Naopak v DNA probíhají dynamické změny a to i v důsledku transkripce genů, neustále v ní dochází k různým změnám a jejich opravám. Je to tedy informace obsažená v DNA nikoliv DNA sama, která

jako tok souvisle proudí z buňky a do buňky a sestupuje dále mezi jednotlivé generace. Je to informace, která nás spojuje nejenom s našimi rodiči, ale v podstatě se všemi našimi předky. Mluvili jsme nyní o informaci obsažené v celém genomu člověka, je ale jasné, že tyto závěry platí pro každý jednotlivý gen.

Mezi jednotlivými generacemi se tedy nedědí hmota ale informace. Záměrně zde neužíváme označení genetická informace, na které lze narazit v odborných textech a učebnicích. Za genetickou informaci v jejím originálním významu považujeme to, co vyslovil Crick při své formulaci ‚ústředního dogma‘ molekulární genetiky. A sice to, že genetickou informací je informace o pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Genetickou informaci obsahuje kódující sekvence, která specifikuje lineární sekvenci aminokyselin v polypeptidovém řetězci (Crick 1958). Naproti tomu ovšem existují i další elementy v genomu, ale i faktory vnitřního a vnějšího prostředí buňky, které expresi genu a finálně celého genomu ovlivňují do té míry, že nejsou pouhým pozadím podporujícím expresi kódující sekvence. Naopak zároveň s kódující sekvencí ko-specifikují vznik genového produktu a hrají stejně důležitou roli jako kódující sekvence sama (Griffiths a Stotz 2006, Stotz et al. 2006). Jsou tedy součástí informace genu, jejíž funkcí je vznik určitého znaku.

3.3.2. Epigenetika

Jedním z dědičných procesů ovlivňujících expresi genů a tudíž ko-specifikující vznik znaků je epigenetická regulace. Epigenetika je obvykle definována jako mitoticky (mitosa - buněčné dělení) a/nebo meioticky děděné

změny genové exprese, ke kterým dochází bez změny primární genetické informace (tedy bez změny sekvencí nukleotidů v DNA) (Vyskot 2006, 9). Epigenetika je charakterizována jako nejistá (nestabilní) dědičnost, která se obvykle neřídí mendelovskými pravidly. Což znamená, že epigeneticky řízené lokusy se vyznačují neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou (Vyskot 2006, 9). Epigenetické procesy patří v současné době k nejaktuálnější problematice vývojové genetiky eukaryotických organismů. Jedním z nejznámějších epigenetických mechanismů je genomový imprinting, kdy specifická modifikace genů v parentální generaci vede k funkčním rozdílům mezi genomy paternálními a maternálními v diploidních buňkách potomstva. Genomový imprinting je významným faktorem v embryonálním vývinu savců, jeho jednoznačnými důkazy jsou geny, které jsou aktivní v závislosti na tom, od kterého rodiče pocházejí, tj. jejich exprese závisí výhradně na pohlaví rodiče. To způsobuje, že některé geny jsou exprimovány výhradně z genomu maternálního původu a jiné geny výhradně z genomu paternálního a pouze takovýto vzorec exprese těchto genů vede k vývinu normálního jedince (Vyskot 2006, 12). Změna exprese imprintovaných genů má fatální důsledky na zdravotní stav plodu, dítěte nebo dospělého. Obvykle byly u takto postižených jedinců popsány těžké mentálně fyzické syndromy často provázené nádorovým bujením.

Patrně nejlépe prostudovanými příklady role genomového imprintingu u lidských chorob jsou Prader-Williho syndrom a Angelmanův syndrom. Prader-Williho syndrom je relativně častý dismorfický syndrom, charakterizovaný obezitou, nepřiměřenými a nevybíravými stravovacími návyky, malými rukama a nohama, malou postavou, hypogonadismem a mentální retardací. Asi 70% případů má cytogenetickou delecí zahrnující část chromosomu 15 zděděnou od otce. Genom těchto pacientů obsahuje tuto část 15 chromosomu, která pochází pouze od matky. Naopak asi 70% pacientů se zřídka se vyskytujícím Angelmanovým syndromem, má delecí přibližně stejné části chromosomové oblasti, ale na chromosomu 15 od zděděnou od matky. Jejich genom obsahuje tudíž pouze část chromosomu 15 paternálního původu. Angelmanův syndrom se vyznačuje jiným fenotypovým projevem – charakteristickým neobvyklým výrazem obličeje, těžkou

mentální retardací, malou postavou, spasticitou a křečemi (Nussbaum et al. 2001, 80-81). Mezi další příklady poruch parentálního imprintingu genů pro růstové faktory patří Beckwith-Wiedemannův syndrom a Russell-Silverův syndrom (Vyskot 2006, 16).

Epigenetika někdy bývá charakterizována jako „měkká dědičnost“, což znamená, že je do jisté míry vyvolávána prostředím nebo chováním jedince či buňky. Epigenetické stavy genů mohou být ovlivňovány prostředím, proto se někdy používá termínu environmentální dědičnost. Některé tyto změny vyvolané vnějším prostředím se do dalších generací nepřenášejí, jsou meioticky nepřenášené a nezasahují zárodečnou dráhu. O těch se zmíníme níže (viz Vnější prostředí). Naproti tomu existuje určitá skupina epigenetických změn, která je s jistou četností meioticky přenášena do potomstva. „Tyto epigenetické jevy jistě evokují již mnohokrát odmítanou teorii o dědičnosti získaných znaků („ghost of Lamarck““ (Vyskot, 2006, 19). Mezi takto získané a dále přenášené znaky například patří některé dědičné poruchy samčí fertility po aplikaci disruptorů (exogenní látky působící jako hormony) endokrinních funkcí na gravidní krysy (Anway et al. 2005). U člověka byl popsán model intergeneračního programování porodní váhy a rizika ke kardiovaskulárním chorobám (Drake a Walker 2004). Na základě tohoto modelu mohou nepříznivé faktory vnějšího prostředí, které ovlivňují fyzické i duševní zdraví matky, negativně ovlivnit i zdraví dítěte (zejména porodní váhu a tendenci ke kardiovaskulárním chorobám). Expozice vůči nepříznivým vlivům u matky vede k vzniku signálu, který vede k fyziologickým změnám u dítěte a jejich ,expresnímu

nastavení'. Stav je stabilizován a předáván do dalších generací zřejmě prostřednictvím metylačního záznamu¹² (Drake a Walker 2004).

3.3.3. Vnější prostředí

Dalším faktorem, který do značné míry přispívá k působení genů a jejich projevu a tudíž přináší další informaci, na jejímž základě se znaky vyvíjí, je vnější prostředí. Ačkoliv by se mohlo zdát, že vnější prostředí nelze považovat za dědičné, není tomu zcela tak. Už Wilhelm Weinberg v roce 1908, ve svém známém článku o rovnováze genotypových frekvencí¹³, zdůrazňuje, že některá onemocnění s environmentální etiologií mohou působit dojmem onemocnění familiárních, protože členové rodiny bývají vystavení působení stejného prostředí, holdovat stejným návykům a životosprávě (citováno z Buchanan et al. 2006).

Je notoricky známo, že embryonální i fetální vývoj dítěte uvnitř těla matky je citlivý na vnější vlivy. I nejlepší genetická výbava jedince může být narušena působením vnějších vlivů, což bylo demonstrováno na malformacích způsobených například alkoholem, thalidomidem nebo infekcí zarděnek. V těchto případech je sice příčina spouštějící vývojovou odchylku zcela exogenního původu, jejím důsledkem je ovšem změna genové exprese, která má za výsledek patofyziologické změny (Vyskot 2006, 15, Nussbaum et al. 2001, 323).

¹² Metylační záznamem je myšlena metylace DNA, což je endogenní buněčný proces, při němž dochází k adici metylové skupiny CH₃ na bázi cytosin. V důsledku toho dochází k modifikaci exprese genu – ke snížení jeho exprese, může dojít i k jeho úplné inaktivaci.

¹³ W. Weinberg je považován společně s G.H. Hardym za zakladatele populační genetiky. Oba nezávisle na sobě v roce 1908 objasnili, jaké důsledky vyplývají z mendelovských principů pro poměry genové a genotypové frekvence ve velké populaci. Jimi odvozený vztah pro tyto frekvence se nazývá Hardy-Weinbergova rovnováha.

Jako příklad lze uvést fetální alkoholový syndrom, který vzniká v důsledku prenatální expozice etanolu během kritické periody vývoje mozku. Mezi klinické příznaky tohoto syndromu patří mikrocefalie, hypoplázie očního nervu, opožděný psychomotorický vývoj, faciální sigmatismus a hyperaktivita (Nussbaum et al. 2001, 325).

Mateřská péče v časném postnatálním období je považována z psychologického hlediska za významný faktor zdravého vývoje jedince. Poslední výzkumy ovšem prokázaly, že mateřská péče jako faktor vnějšího prostředí může ovlivnit i mechanismy epigenetické. Jde sice o epigenetické změny, které se do dalších generací nepřenášejí, přesto podmiňují zdraví jedince až do dospělosti. Tento epigenetický mechanismus byl prozatím pozorován u krys. Prokázáno bylo, že mazlení krysí matky s novorozеныmi mláďaty u nich spouští kaskádu signálů, které jsou podmínkou psychické stability. Tento epigenetický stav je v somatické linii předáván opět změnou metylace DNA a podmiňuje reakci na stres a další faktory psychického zdraví zvířete až do dospělosti (Meaney 2001, Weaver et al. 2004).

V genetice člověka jsou ke sledování vlivů vnějšího prostředí často využívány monozygotní (jednovaječná) dvojčata, protože jejich genotyp je v době početí zcela identický. Právě u nich byl prokázán přímý vztah mezi epigenetickými změnami v genomu a věkem. Počet odlišností vlivem vnějšího prostředí mezi jednovaječnými dvojčaty s věkem narůstá. Tyto epigenetické změny mohou mít přímý vliv i na vznik různých onemocnění jako jsou nádorová onemocnění (Fraga a Esteller 2007) nebo alergie vznikající jako reakce na vlivy vnějšího prostředí (Isidoro-García et al. 2007).

U výše uvedených příkladů byly přímo prokázány mechanismy, kterými vnější prostředí s největší pravděpodobností ovlivňuje vznik určitého fenotypu

jedince. Složitě ovšem bývá prokázat, do jaké míry se podílí na vzniku určitého znaku vnější prostředí a do jaké míry je tento znak geneticky podmíněn. Na tuto problematiku naráží současný výzkum genetiky člověka zejména u tak zvaných komplexních onemocnění (např. diabetes, kardiovaskulární a nádorová onemocnění), která jsou působením vnějších vlivů do značné míry ovlivňována. Vnější prostředí tudíž přináší další informace, které je potřeba při vzniku geneticky podmíněných znaků zohlednit. Působení vnějších vlivů, tak jak jsme si ukázali na případě epigenetických mechanismů, může do značné míry ovlivňovat záznam v DNA, tím i ukládat svoji informaci v DNA a dále ji přenášet jak v horizontální (somatické) linii buněk tak i vertikálně mezi jednotlivými generacemi.

3.4. Realizace informace genu – vznik fenotypu

Druhou funkcí, ve které hrají geny klíčovou roli, je realizace jejich informace při vývoji jedince. Informace potřebná pro vytvoření znaku nemusí být zapsána pouze na jednom segmentu DNA, ale může být přítomna v různých oblastech genomu. Tuto informaci tvoří pouze sekvence kódující určité produkty, ale také další elementy přítomné v DNA jako regulační a intronové sekvence, které představují vazebné cíle pro transkripční faktory a faktory podílející se na sestřihu RNA. Dále tuto informaci vytvářejí i specifické podněty vnějšího prostředí, které faktory genové exprese vyvolávají nebo jiným způsobem ovlivňují (Stotz et al. 2006). Podněty z vnějšího prostředí působí jako proměnné přinášející další informace nutné k realizaci nebo „vyvolání“ vlastní informace genu. V mnohobuněčném organismu tudíž musí existovat značná komplexita umožňující

reagovat v každém okamžiku na podněty vnějšího prostředí a zároveň regulovat jednotlivé funkce. Podrobný rozklad problematiky spojené s realizací informace genů a prokázáním jejich funkce by přesáhl rámec tohoto sdělení. Proto uvedeme jenom několik příkladů ilustrujících komplexnost tohoto procesu, případně prokazujících vymezení genu jako informace obsahující instrukci pro vytvoření znaku.

Bez toho, že bychom blíže specifikovali jejich jednotlivé funkce, uvedeme jako první příklad komplexnosti dějů probíhajících v buňce počet proteinů nutných pro transkripci eukaryotických genů. Tento proces zahrnuje: přibližně 12 proteinů chromatin přestavujícího komplexu, dalších 15 proteinů komplexu holoenzymu RNA polymerázy II, jeden protein vázající se na TATA box (TBP), přibližně 8 TBP asociovaných faktorů, několik až mnoho specifických transkripčních faktorů (jejich přesné složení a počet se liší mezi jednotlivými lokusy a zároveň se mění i v závislosti na prostoru a čase ve shodě s podmínkami vnějšího prostředí) a různý počet transkripčních kofaktorů. Většina z uvedených faktorů reaguje specificky na podněty vnějšího prostředí (Lemon et al. 2001).

Přesná funkce genů a jejich produktů při vzniku fenotypů, přes pokrok v technologiích a metodách molekulární biologie, prozatím ještě není ze značné části známá. Prokázání funkce genů – funkční genomika – je jedním z cílů post-genomové biologie. Jak uvádí Gerstein se spolupracovníky (2007, 679), je prokázání funkce všech molekul kódovaných genomem prozatím v nedohlednu. Jako alternativa k důkazům funkce genů založených na experimentech je bioinformatika pracující se statistickými vlastnostmi DNA sekvencí. Nicméně je nutno zároveň i připustit možnost, že funkce všech molekul genomu nebude známá nikdy (Gerstein et al. 2007).

3.5. Koncept informace v genetice

Jestliže jsme došli k závěru, že gen je informace, bude v tuto chvíli nutné pojem informace specifikovat. Koncept informace je však poněkud vágní a možná

ještě méně konkrétní než koncept genu: „Informace je tak notoricky polymorfní fenomén a polysémantický koncept, stejně jako definovaný pojem, že může být spojován s několika různými výklady a to v závislosti na úrovni přizpůsobené abstrakce a na skupině potřeb a požadavků směřujících teorii.“ (Floridi 2005, 1). Jedním ze základních a často užívaných konceptů je matematická teorie komunikace, jejímž autorem je Claude Shannon (1948). Jeho cílem bylo kvantifikovat některé vlastnosti informace a toho následně využít při hledání efektivních způsobů kódování a přenosu dat. Matematická teorie komunikace sleduje komunikační limity z hlediska elektrotechniky a zabývá se řešením dvou základních problémů: krajního stupně komprese dat (mezní velikost zprávy kódující informaci) a krajní stupeň přenosu dat (rychlost přenosu dat kanálem). V matematické teorii komunikace je informace pouze volbou jednoho symbolu ze sady možných symbolů. Kvantifikace informace probíhá se zřetelem na to kolik otázek, na které odpověď zní ano/ne, je nutných ke stanovení toho, co zdroj komunikuje. Jednotkou takto definované informace je bit. V tomto konceptu má informace pouze technický význam (Floridi 2005, 15). Což znamená, že odpověď ano/ne na jakoukoliv otázku má v podstatě stejnou hodnotu (např. srovnajme dvě otázky: „Zavřel si okno?“ a „Chceš mít se mnou dítě?“).

Z hlediska matematické teorie komunikace je zdrojem informace cokoliv, co se může vyskytovat v určitém počtu alternativních stavů, které mohou za určitých podmínek nastat. Každá další proměnná nese informaci o zdroji, jestliže je její stav možno korelovat se stavem zdroje. Tudíž signál přináší více či méně informace o zdroji, jestliže na jeho základě můžeme lépe či hůře stanovit stav zdroje. Přestože původní práce Shannona (1948) byla zaměřená na aplikaci v elektrotechnickém

inženýrství, určitý způsob uvažování v ní nastíněný, zejména ten týkající se korelace, se uplatnil v mnoha jiných oblastech a genetika je jednou z nich. „...biologové často používají informace v tomto smyslu při popisu působení genů a dalších procesů, kdy přijímají kvantitativní rámec pro popis vzájemných vztahů a příčinných souvislostí.“ (Godfrey-Smith a Sterelny 2007, 5). V tomto rámci lze informaci genu vyložit v několika málo případech působení genů, kdy určitá změna – mutace genu přímo působí jako příčina vzniku určitého fenotypu. V klinické praxi se jedná se o monogenně podmíněné poruchy s vysokou penetrancí.

Jedním z příkladů může být již dříve zmíněná achondroplázie. Zde je v 99% případů příčinou jedna ze dvou různých mutací označovaných G1138A (~98% případů) a G1138C (1-2%) v genu kódujícím FGFR3 protein. Tyto mutace vedou u tohoto genu k zisku funkce – na ligandu nezávislou aktivaci FGFR3, která nepatříčně inhibuje proliferaci chondrocytů v růstové ploténce a diferenciaci progenitorových buněk kosti (Nussbaum et al. 2001, II).

Jako druhý příklad může sloužit fenylketonurie, která bývá označována jako prototyp vrozených vad metabolismu. Fenylketonurie je autosomálně recesivní porucha katabolismu aminokyseliny fenylalaninu zapříčínující mentální retardaci. Je způsobena mutacemi genu, který kóduje enzym přeměňující fenylalanin na tyrozin. Mutace genu způsobují neschopnost tohoto enzymu degradovat fenylalanin, který se pak akumuluje v tělesných tekutinách a poškozuje vyvíjející se centrální nervový systém v raném dětství a zasahuje do funkce dospělého mozku. Neurologickému poškození se lze vyhnout do značné míry úpravou stravy, která zabrání akumulaci fenylalaninu. I zde se tedy zdá jasná korelace mutace genu = typický fenotyp. Nicméně byla u fenylketonurie prokázána nestálost fenotypu postižených jedinců, která je zapříčiněná doposud neidentifikovanými biologickými proměnnými (Nussbaum et al. 2001, 205).

U většiny znaků však jednoduchý kauzální model působení genů nelze uplatnit. Pro znaky, jejichž vývoj je značně komplexní a podílí se na něm více faktorů a to jak genetických tak i faktorů vnějšího prostředí, je možné použít koncept ‚informace se sémantickým obsahem‘ (Bar-Hillel 1964, citováno z Floridi 2005, 16). Informace se sémantickým obsahem se rozděluje na dvě rozdílné kategorie. První je faktická informace. U tohoto typu lze rozlišit, je-li informace pravdivá nebo nepravdivá. Tuto kategorii sémantického konceptu informace tudíž nemůžeme jako model v genetice využít. Druhou kategorií, která je na funkci genů již aplikovatelná, je informace obsahující instrukci. Informace obsahující instrukci

nevyovídá o situaci, faktech, stavu věci ani nepředstavuje model, popis nebo zástupce dané věci. Touto kategorií informace „je spíše míněno (napomoci) přivodit určitý stav věci“ (Floridi 2005, 16). Stejně tak i informace genů obsahují instrukce, které ve spojení s informacemi z intracelulární a extracelulárního prostředí buňky, vyvíjející se organismus navádí k vytvoření fenotypových znaků. Za hlavní součást genetického řízení vývoje organismu byly po dlouhou dobu považovány proteiny podílející se na signálních a regulačních mechanismech buňky. To zahrnuje proteiny modifikující chromatin¹⁴, transkripční faktory vázající se na regulační sekvence DNA, pro něž informaci zprostředkovávají receptory na buněčném povrchu a transdukční signální dráhy. Dohromady představují spleť modulární systém (Levin a Davidson 2005). Nyní představují novou a doposud z většiny neprobádanou skupinu molekul podílejících se na regulaci genů ncRNA (viz výše Historie genu), které jsou považovány za další součást modulárního systému regulace (Mattick 2007).

Systémy regulující expresi genů čelí značným nárokům. Musí koordinovat velké množství úkolů, které buňky plní při svém stále se měnícím stavu – podle stadia buněčného cyklu. Zároveň tyto systémy musí interpretovat značné množství chemických a fyzikálních signálů. I nejjednodušší jednobuněčný organismus musí upravovat expresi stovek kódujících sekvencí podle nesčetných aktuálních buněčných stavů a podnětů vnějšího prostředí. Systémy regulující expresi genů musí mít proto schopnost precizně odpovídat na specifické signály, rychle dosáhnout zamýšleného genetického efektu a mít dostatečně dynamický charakter

¹⁴ Chromatin je jaderná hmota eukaryont složená z DNA, histonů a proteinů nehistonové povahy. Někdy bývá chromatin nazýván jako „proteínové lešení DNA“.

na přesné vyladění úrovně exprese stovek různých genů (Mattick 2007). Geny vlastně kódují svoje vlastní čidla pro detekci podnětů z vnějšího prostředí (transkripční faktory a ncRNA) aby mohly přenášet informaci vnějšího prostředí do genomu (Stotz et al. 2006).

Jedním z důležitých regulačních mechanismů, který umožňuje kontinuálně měnit úroveň transkripce, zahrnuje vazbu transkripce na intracelulární signální faktory (např. transkripce kontrolovaná proteinkinasami aktivovanými mitogenem¹⁵ (MAPK))(Hazzalin a Mahadevan 2002). Mnoho regulačních mechanismů buňky reaguje na extracelulární signální proteiny, které se váží k buněčnému povrchu a tímto aktivují signální přenašeče a aktivátory transkripce - STAT proteiny (z angl. signal transducer and activator of transcription proteins) jinak latentní v cytoplazmě (Levy a Darnell Jr. 2002). Dynamiku regulačních dějů a jejich vzájemné propojení ovlivňuje na buněčné úrovni fyziologický a nutriční stav buňky. Na extracelulární úrovni je jejich dynamika a propojení ovlivňováno exogenními signály z extracelulární matrix a jiných buněk například prostřednictvím hormonů. Na úrovni vnějšího prostředí působí další faktory (např. teplota vnějšího prostředí, cirkadiální rytmus nebo exogenní distrupory požitě gravidní samicí – viz. výše Epigenetika).

Důležitou roli hraje při vývoji organismu epigenetika (viz výše). Až na několik výjimek vytváří různé buňky obsahující stejný genetický materiál tak rozdílné orgány jako jsou mozek nebo ledviny. Právě epigenetická informace umožňuje těmto buňkám vyjádřit informaci jejich genů při tvorbě různých orgánů odlišně (Fraga a Esteller 2007). Je to tedy epigenetická informace, která obsahuje instrukci k vyjádření informace genu. Epigenetickými procesy genotyp organismu interaguje s vnějším prostředím, aby vytvořil jeho fenotypové znaky. Právě epigenetické procesy a mechanismy poskytují rámec pro vysvětlení rozdílů mezi jedinci a jedinečností buněk, tkání nebo orgánů, přestože obsahují stejný genetický materiál (Tang a Ho 2007). Epigenetický mechanismus dědičnosti přenáší tedy interpretaci informace zapsané v DNA (Stotz et al. 2006). Místo toho, že by byla DNA děděna

¹⁵Přenos signálu se uskutečňuje přes kaskádu postupné enzymové aktivace spočívající v tom, že jedna signalizující složka fosforyluje a aktivuje druhou složku, která pak uskuteční tentýž děj na třetí atd., dokud se nedosáhne nejzazší cílové molekuly jako konečného příjemce signálu. Fosforylační děje jsou katalyzovány proteinkinasami. Jako mitogeny se označují růstové faktory stimulující buňku k dělení.

jako zdroj informací pro vývoj organismu, je namístě spíše říci, že epigeneticky organismus dědí určité instrukce pro nakládání s tímto zdrojem.

Informace obsahující instrukci pro vytvoření znaku může být zapsána v různých oblastech genomu a to i různým způsobem – v sekvenci nukleotidů nebo epigeneticky. Informace z vnějšího prostředí přenášená do genomu stimuluje další instrukce v genomu obsažené. Lze říci, že místo lineárního toku informace z DNA sekvence k jejímu produktu, je informace jako instrukce tvořena a distribuována v rámci celého vývojového systému organismu. Z tohoto pohledu jsou geny to „co organismus dokáže dělat se svým genomem“: jsou to způsoby jakými buňka používá dostupných zdrojů matric (z angl. template) k syntéze biomolekul, které jsou potřebné na určitém místě a v určitém čase (Griffiths a Stotz 2006, Stotz et al. 2006).

3.6. Shrnutí

Gen jako znak, který se dědí mezi jednotlivými generacemi, nemá hmotný základ ale charakter informace. Za znaky se považují geneticky podmíněné vlastnosti organismu. Funkcí genu je znak mezi jednotlivými generacemi přenášet a umožňovat jeho vývoj. *Gen je tudíž informace obsahující instrukci pro vytvoření fenotypového znaku. Tato informace je zapsaná různým způsobem v různých oblastech genomu. Výsledný fenotypový znak je determinován nejen informací obsaženou v DNA ale i její epigenetickou interpretací a zároveň informací pocházející z vnějšího prostředí. Tomuto pojetí genu je velmi blízká i Kleinova definice genu jako „množství informace potřebné pro jeden znak“ (Klein 1964,166).*

Ze dvou rozdílných konceptů genu – evolučního konceptu a genu jako tvůrce rozdílů – vyplývá, že gen lze definovat na základě potřeb daného oboru. Gen tudíž nemusí být spjat s jednou ohraničenou kódující sekvencí DNA, tak jako v současné době již překonaném molekulárním konceptu genu. Vymezení genu jako informace obsahující instrukci pro vytvoření znaku více odpovídá původnímu konceptu klasické genetiky. Fenotypový znak, který v takto vymezeném pojmu genu sledujeme, může být definován na základě našeho klinického či teoretického zájmu. A k tomuto fenotypovému znaku, lze následně v genomu vyhledat sekvence, které jej determinují. Vymezení genu tímto způsobem zcela odpovídá laickému chápání pojmu genu. Jak si ukážeme v následující části, toto vymezení je důležité právě v klinické genetice, kde geny rozhodují o zdraví či nemoci pacienta a jeho rodiny.

4. Genetik jako tlumočník

Genetika je jedním z nejrychleji se rozvíjejících oborů medicíny. S narůstající znalostí molekulárně-genetické podstaty řady onemocnění přibývají i nové možnosti molekulární diagnostiky. V uplynulých 20 letech vzrostl počet genetických chorob, které je možno testovat na úrovni DNA z 10 na více jak 6 000. Metody genetického testování se změnily z nepřímé metody vazebné analýzy na přímé stanovení sekvence DNA umožňující detekovat mutaci na úrovni změny jediného nukleotidu. Pokrok umožnily objevy a následný vývoj metod molekulární genetiky v průběhu sedmdesátých a osmdesátých let minulého století, jako použití restričních enzymů a klonování lidských genů. Tento vývoj nakonec kulminoval v Projektu lidského genomu. Jedním z hlavních příslibů projektu byl i vývoj efektivních strategií prevence a léčby různých onemocnění. Je však zřejmé, že prvním praktickým výsledkem těchto poznatků je a v nejbližší době asi stále bude zavádění dalších genetických testů do klinické praxe a rozšíření možností populačního screeningu. V současné době je stále většina dostupných genetických testů používána v souvislosti se vzácnými a ojediněle se vyskytujícími onemocněními. Nicméně možnosti genetického testování by se měly v budoucnu rozšířit na stanovení genetického rizika u běžných onemocnění tzv. komplexních chorob, jako jsou nádorová nebo kardiovaskulární onemocnění, a vyústit v tak zvanou personalizaci medicíny.

Klinická genetika je obor zaměřený na variabilitu a dědičnost různých poruch významných pro praktickou medicínu. Jak lze pojem genu vymezit v rámci tohoto oboru? Opět je vhodné gen vymezit jako informaci obsahující instrukci pro vytvoření fenotypového znaku. Fenotypový znak zde představuje chorobu nebo nemoc, u níž se bude sledovat, zda a případně do jaké míry je podmíněna geneticky. K takto vymezenému fenotypovému znaku – určitému onemocnění, lze následně v genomu vyhledat sekvence, které se na jeho vzniku podílejí. Vymezení genu tímto způsobem odpovídá laickému chápání pojmu genu. Gen pro pacienta není tak jako v molekulární genetice informace zapsaná v nukleotidech DNA. Gen naopak rozhoduje o pacientově zdraví či nemoci, stejně jako může u mnoha genetických onemocnění rozhodovat o zdraví či nemoci dalších členů pacientovy rodiny. Pro pacienta není důležitý popis změny na úrovni DNA, který ke vzniku onemocnění vede, ani název změněných kódujících sekvencí (neboli genů podle molekulárního konceptu), jejichž jména jsou velmi často laikovi absolutně nesrozumitelná. Pro pacienta je relevantní až genetikem interpretovaná – přetlumočená zpráva o genetické povaze jeho onemocnění. Děje se tak v procesu genetického testování. V tomto procesu je informace genu klinickým genetikem rozpoznána na základě fenotypu pacienta, genealogie, případně výsledků různých specializovaných vyšetření. Následně může být informace genu v laboratoři přímo testována, jestliže jsou známy mutace DNA zodpovědné za výskyt dané choroby.

Nezbytnou součástí genetického testování je genetické poradenství, jehož cílem je poskytnutí přesných a srozumitelných informací o diagnóze a prognóze onemocnění, jeho léčebných možnostech, o rizicích postižení pro členy rodiny a o preventivních opatřeních, jak je možno rizikům čelit (Goetz a Seemanová 2002).

Tradičně je genetické poradenství nedirektivní, na základě předaných informací se pacient sám a svobodně rozhodne pro další postup, který formálně potvrdí podepsáním poučené dohody (= informed consent) (Beauchamp a Childress 2001, 77-104; Payne 2002b, 61-69). Zároveň by mělo být i podpůrné, pacientům a jejich rodinám by mělo nabízet pomoc na profesionální úrovni (Goetz a Seemanová 2002). S tím souvisí i prosazování zájmů a rozhodnutí pacienta, stejně jako i nezbytný empatický přístup k pacientovi a jeho rodinným příslušníkům. Právě při genetickém poradenství klinický genetik přetlumočí genovou informaci do zprávy pro pacienta.

V další části se pokusíme problematiku genetického testování a jeho výstižné interpretace přiblížit, konkrétně na příkladu prediktivních genetických testů. Poukázáno bude z tohoto hlediska i na problémy komerčně nabízeného prediktivního testování. Specifické etické konsekvence má prenatální a preimplantační diagnostika, genetické testování dětí a populační screening. Jejich podrobný rozbor by přesáhl rámec tohoto sdělení, proto se jim nebudeme dále věnovat.

4.1. Co je genetické testování?

Máme-li hovořit o genetickém testování, je nutno nejprve stanovit, co lze vlastně za genetické testování považovat. Ke stanovení genetické diagnózy nemusí být vždy použito DNA testů nebo analýzy chromosomů (sestavení karyotypu). Často stačí fyzikální vyšetření, rodinná anamnéza, analýza rodokmenu, hematologické nebo rentgenové či ultrazvukové vyšetření. Stejně tak

přestože dojde k analýze DNA určité osoby, jako například při stanovení paternity nebo z forensních důvodů, nejedná se o genetické testování. V roce 1999 bylo americkou komisí pro genetické testování („Task Force on Genetic Testing“) genetické testování definováno jako „analýza lidské DNA, RNA, chromosomů, proteinů a některých metabolitů provedená z klinických důvodů a za účelem prokázání dědičných onemocnění spojených s určitým genotypem, mutací, fenotypem nebo karyotypem“ (Burke 2002).

Genetické testování se provádí z rozdílných klinických důvodů. Jeho účelem může být 1) stanovení diagnózy u již chorobou postiženého pacienta, 2) určení osob - přenašečů chromosomových mutací nebo genových mutací pro autosomálně recesivní nebo X – vázaná onemocnění, 3) stanovení genetické predispozice nebo prokázání presymptomatické diagnózy u onemocnění s pozdním nástupem (tzv. prediktivní testování), 4) prenatální a preimplantační diagnostika, 5) novorozenecký nebo jiný populační screening.

4.2. Proč je genetické testování „jiné“?

Současně s pokrokem v genetickém výzkumu začaly být na různých úrovních diskutovány i etické otázky, které se zaváděním genetických testů do praxe bezprostředně souvisí. Logicky vyvstala otázka, zda se opravdu genetické testování zásadně liší od jiných testů používaných v medicíně. V této souvislosti je nutno poukázat na několik aspektů genetického testování. Za prvé je genetický materiál dědičný. Tudíž výsledek testu jedné osoby může mít přímé zdravotní důsledky pro všechny, kteří jsou s touto osobou geneticky příbuzní. Lze tedy

předpokládat, že v návaznosti na potvrzení genetické diagnózy u postiženého jedince budou u dalších členů rodiny provedeny genetické testy (Franková 2007). To může zcela narušit dynamiku rodiny a rozdělit její členy na ty, kteří chtějí test podstoupit a ty, kteří nechtějí, ale cítí se povinni. Stejně tak i výsledek testu může rozdělit rodinu na „zdravé a nemocné“ (Esplen et al. 2001, Blain a Brooks 2007). Samostatným tématem je i komunikace v rodině, informování blízkých i vzdálených příbuzných o výsledku testu a jeho důsledcích (Esplen et al. 2001, Peterson et al. 2003, Claes et al. 2003, Fulda a Lykens 2006).

Za druhé, některá rizika genetického testování, jako jsou rizika psychologická, sociální a finanční, nemusí být bezprostředně zřejmá. Mezi hlavní psychosociální rizika patří: pocit viny, stres, úzkost, narušená sebeúcta, sociální stigmatizace, diskriminace ze strany pojišťoven a zaměstnavatele (Baum et al. 1997, Bleiker et al. 2003, Franková et al. 2003, Lerman a Shields 2004). Za třetí je genetická výbava jedince do značné míry neměnná. Znamená to, že vyšetření provedené prenatalně nebo v ranném věku dítěte, má na rozdíl od mnoha jiných medicínských testů (např. hematologických nebo biochemických) stejnou platnost i v jeho dospělosti či stáří.

Za čtvrté je v mnoha případech predikce stanovená na základě genetické informace zatím často omezená. Naše geny a jejich produkty vcházejí navzájem mezi sebou a k tomu zároveň i s vnějším prostředím do komplexních interakcí. Mechanismy a zákonitosti těchto interakcí jsou prozatím většinou málo známy. Proto lze stanovit výši genetického rizika vzniku určité choroby, ale stěží lze předpovědět, zda se dané onemocnění vyvine (neúplná penetrance), kdy se vyvine a jak závažná bude jeho manifestace (variabilní expresivita). Konečně, mnoho

genetických chorob nelze účinně léčit anebo jim předcházet, což omezuje využití znalosti genetické informace k doporučení efektivní zdravotní péče (Franková 2007).

V žádném z těchto aspektů není z medicínského hlediska genetické testování jedinečné. Je to však jejich vzájemná spojitost a spletnost, která je důvodem odlišného přístupu a zvýšené opatrnosti při zavádění genetických testů do praxe. Součástí postupu každého genetického testování by proto mělo být odborné genetické poradenství a poučené rozhodování (Beauchamp a Childress 2001, 77-104; Payne 2002b, 61-69) a důvěrnost zamezující úniku dat vysoce osobního charakteru. A to zejména v případech, kdy je přínos genetického vyšetření značně diskutabilní (Franková 2007). To se týká především prediktivních genetických testů, které jsou v současné době považovány za nejvíce kontroverzní.

4.3. Prediktivní genetické testy

O prediktivním testování hovoříme u asymptomatických jedinců, kteří se nacházejí v riziku vzniku určitého onemocnění. Prediktivní test podává informaci o budoucím onemocnění. Nemoc sice není ještě přítomna, ale genotyp podmiňuje „náchyllost“ nebo „predispozici“ k určitému onemocnění. Mluví se zde o „pravděpodobnosti“ nebo „riziku“ vzniku tohoto onemocnění. Prediktivní genetické testy pro choroby s pozdním nástupem lze dále rozdělit na testy presymptomatické a testy zjišťující predispozici (náchyllost) k určitému onemocnění. Jestliže je při presymptomatickém testování u doposud zdravé osoby zjištěna mutace genu podmiňující onemocnění, lze téměř se stoprocentní jistotou říci, že pokud se dožije

věku nástupu, bude touto nemocí postižena. Jde o tak zvané presymptomatické stanovení diagnózy. Jestliže je mutace podmiňující vznik onemocnění u testované osoby vyloučena, je pravděpodobnost vzniku tohoto onemocnění prakticky nulová.

Klasickým příkladem onemocnění, u kterého se presymptomatické testování provádí, je Huntingtonova choroba (HD, z angl. Huntington disease). HD je autosomálně dominantně dědičná progresivní neurodegenerativní porucha, která je důsledkem mutací v genu označovaném *HD*. Produkt genu huntingtin je exprimován ve všech tkáních, ale jeho funkce je doposud neznámá. Mutace odpovědné za vznik HD jsou výsledkem expanze CAG opakování kódujícího polyglutamin (normální HD gen má 10-26 opakování, mutovaný pak více než 36 opakování) (Nussbaum et al. 2001, XXX). HD je charakterizována choreou, psychickými poruchami a demencí, s nástupem ve středním věku. Progrese onemocnění vede k úplné závislosti pacienta na péči okolí. Efektivní terapie dosud není známa a smrt přichází přibližně po 10 až 15 letech devastujícího průběhu, který je enormní zátěží pro pacienta i jeho blízké (Židovská 2002).

Testy používané ke stanovení genetické predispozice k určitému onemocnění informují o tom, zda je u testovaných osob větší či menší (nikoliv však nulové!) riziko vzniku daného onemocnění (např. dědičně podmíněná nádorová onemocnění). Jestliže je u testované osoby prokázána mutace podílející se na vzniku onemocnění, je „diagnózou“ v tomto případě zvýšené riziko udávané na základě statistických studií, které však nemusí nutně vést k vzniku onemocnění. Stejně tak i nepřítomnost dané mutace neznamena, že riziko vzniku onemocnění u testované osoby je nulové. V závislosti na typu onemocnění a genetického testu se riziko udává na základě rodinné anamnézy nebo rizika populačního.

Jako příklad testování genetické predispozice (náchylnosti) k nádorovému onemocnění uveďme hereditární nonpolyposní karcinom tlustého střeva (HNPCC, z angl. hereditary nonpolyposis colon cancer). HNPCC je geneticky heterogenní autosomálně dominantní syndrom nádorové predispozice a je zodpovědný za vznik přibližně 3-8% všech kolorektálních karcinomů. Pacienti s HNPCC, u nichž je prokázána zárodečná mutace způsobující toto onemocnění, mají 80-90% celoživotní riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Kromě kolorektálního karcinomu se u HNPCC vyskytují i karcinomy žaludku, tenkého střeva, pankreatu, ledvin, endometria a ovarií. Vzhledem k neúplné penetranci a variabilní expresivitě nelze závažnost HNPCC a začátek onemocnění předpovědět (Nussbaum et al. 2001, XXVI).

Přibližně u 70% rodin s HNPCC byly prokázány zárodečné mutace, vyskytující se v některé ze sekvencí kódující proteiny, které se podílejí na opravě DNA (tzv. DNA reparační geny). Tyto sekvence (geny) se nazývají: *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *MLH3*, *PMS1* a *PMS2*. Na příkladu *MSH2*, který byl jako jeden z prvních ‚genů‘ podmiňující vznik HNPCC identifikován, lze ilustrovat, že takovéto označení genu není pro pacienta relevantní informací. *MSH2* je nesrozumitelný akronym pro *mutS* homolog, pojem odvozený z podobnosti kvasinkového a bakteriálního reparačního genu nazvaného

mutS (Nussbaum et al. 2001, 134). Pacient zřejmě nebude své onemocnění a jeho další výskyt v rodině dávat do spojitosti s mutací v *MSH2* kódující sekvenci, ale za jeho vznik pro něj bude zodpovědný vždy gen pro rakovinu eventuálně gen pro rakovinu tlustého střeva. Stejně tak mu před vlastním započítím testování klinický genetik oznámí, že u něj budou testovány geny, které se na vzniku rakoviny tlustého střeva podílejí. Výčet kódujících sekvencí (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *MLH3*, *PMS1* a *PMS2*) by pacientovi zřejmě nic neupřesnil.

U chorob s pozdním nástupem může uplynout řada let i desetiletí než dojde k projevu příznaků a část nosičů mutace neonemocní vůbec. Výsledek testu nepřináší informaci o věku, nástupu ani závažnosti onemocnění, takže i přes informativní výsledek vyšetření určitá míra nejistoty stále zůstává. Prediktivní testování vytváří skupinu jedinců, kteří se nacházejí ve dvojznačné situaci mezi „zdravím a nemocí“ se všemi důsledky pro jejich budoucnost a životní plány. Právě možnosti prediktivního genetického testování by se měly v budoucnu rozšířit na testy stanovujících riziko pro celou škálu běžných onemocnění, taktéž na testy pro geneticky podmíněnou citlivost k vlivům vnějšího prostředí zvyšujícím riziko vzniku určitých onemocnění a geneticky podmíněnou reakci na léky (= farmakogenetika). Některé komerční společnosti nabízejí právě tento typ prediktivních genetických testů již nyní.

4.4. Některé problémy DNA diagnostiky

Většina výše zmiňovaných etických otázek a obav ohledně genetického testování se týká testů založených na DNA analýze. A to především z důvodu jejich relativně nedávného a zároveň velmi rychlého rozšíření a komplexnosti jejich interpretace, dále pak citlivých informací osobního charakteru, které může výsledek přinést (např. prokázání non-paternity, riziko vzniku choroby pro potomky nebo u doposud zdravé osoby) a v neposlední řadě je diskutována i jejich finanční

nákladnost (Brdička et al. 2006). V ideálním případě by měly DNA testy být méně invazivní, více přesné a méně finančně náročné než jiné způsoby testování. DNA diagnostika je od tohoto ideálu stále ještě velmi vzdálena. Uvedme alespoň některé z důvodů, které by měly stejně jako u jiných laboratorních metod vést k obezřetnému hodnocení DNA testů (Burke 2002, McPherson 2006):

- **Senzitivita:** Přestože genetické testování analyzuje genom přímo, není jeho citlivost nutně vysoká. Mnoho DNA testů má sníženou senzitivitu, protože sleduje pouze omezenou skupinu kauzálních mutací. Tato limitace je způsobena stupněm vědeckého poznání – některé kauzální mutace pro dané onemocnění nejsou prozatím známy. Dalším důvodem může být i umístění promotorů nebo jiných elementů kontrolujících genovou expresi mimo analyzovanou část DNA sekvence.
- **Specifická:** I při přítomnosti DNA změny nelze v některých případech stanovit diagnózu. Některé mutace v kódujících sekvencích jsou neškodné varianty anebo tak zvané varianty neznámého významu. V některých případech mohou různé mutace v jedné kódující sekvenci způsobovat různá onemocnění.
- **Interpretace:** Interpretace mnoha genetických testů může být komplikována, protože 1) efekt určité mutace může být modifikován dalšími DNA sekvencemi a vnějším prostředím, 2) různé změny v jedné určité kódující sekvenci mohou mít různé projevy, 3) takzvané šedé zóny nebo intermediární alely mohou způsobovat onemocnění pouze u části jejich nosičů, 4) jiná genetická výbava, vnější prostředí a individuální faktory jako je věk a pohlaví mohou ovlivňovat penetranci, takže dva jedinci s přesně stejnou mutací v kódující sekvenci

mohou mít zcela jiné klinické projevy, 5) osoba s mutací „způsobující“ onemocnění nemusí být postižena.

4.5. Genetické poradenství

Důležitou součástí každého genetického testování by mělo být genetické poradenství. Co je přesně genetické poradenství? A kdo má genetické poradenství vyšetřovaným osobám poskytovat? Odpovědi na tyto otázky lze najít v materiálech vypracovaných v rámci projektu EuroGentestu¹⁶ zaměřeného na celoplošnou harmonizaci a zvýšení úrovně genetických služeb v Evropě. V roce 2007 byla vydána prozatím druhá pracovní verze „Doporučení pro genetické poradenství spojené s genetickým testováním“ volně dostupná na webových stránkách EuroGentestu¹⁷. V dokumentu je na základě modifikace Frazera (1974) genetické poradenství definováno takto: Genetické poradenství je komunikační proces, který se zabývá výskytem nebo rizikem výskytu (možné) genetické choroby v rodině. V tomto procesu je snahou náležitě školené osoby (event. osob) pomoci vyšetřované osobě nebo rodině při:

- 1) porozumění medicínským faktům onemocnění;
- 2) zhodnocení dědičné složky onemocnění a rizika jeho dalšího výskytu u určitých členů rodiny;
- 3) porozumění léčebným a preventivním možnostem, kterými lze onemocnění čelit;
- 4) využití získané genetické informace takovým osobně smysluplným způsobem, který minimalizuje psychologický stres a zvyšuje pocit osobní kontroly;

¹⁶ www.eurogentest.org

¹⁷ <http://www.eurogentest.org/guidelines.xhtml>

5) výběru následného postupu, který vyhovuje vyšetřované osobě či rodině vzhledem k rizikům a osobním či rodinným cílům, a dále napomoci jednat v souladu s tímto rozhodnutím;

6) přizpůsobení se nejlepší možným způsobem onemocnění u postiženého člena rodiny a/nebo riziku výskytu onemocnění.

Dále je v dokumentu uvedeno, že „patříčně školenou osobou“, která poskytuje genetické poradenství je obvykle geneticky školený profesionál (klinický genetik, genetický poradce nebo sestra s genetickým školením). V České republice je tímto profesionálem klinický genetik. Součástí genetického poradenství by měly být nejméně dvě konzultace, jedna před testem a druhá spojená s předáním výsledků a jejich interpretací. Počet genetických konzultací může být v závislosti na problematice spojené s testováním i vyšší, jako je tomu například u precizně vypracovaného protokolárního postupu na presymptomatické testování Huntingtonovy choroby (World Federation of Neurology 1994).

Genetik má v procesu poučeného rozhodování a souhlasu roli zprostředkovatele a pacientova tlumočnicka převádějícího odborná fakta spojená s genetickým testováním do jeho jazyka. Ačkoliv je genetické testování tradičně nedirektivní (Goetz a Seemanová 2002), již tento překlad určitým způsobem formuje postoj jedince k testování a jeho výsledkům (Hare 1981, 65-86). Při prediktivním genetickém testování by měl být pacient, kromě výše uvedených medicínských a genetických faktů, taktéž seznámen s podstatou testu a s tím, jestli a jak jeho výsledek ovlivní způsob léčení a prevence. Měl by být i poučen o pravděpodobnosti s jakou lze u vyšetření čekat výsledky informativní nebo neurčité, které nelze interpretovat, případně i o možnosti výsledků nečekaných

(např. prokázání non-paternity). Důležitým faktem při rozhodování, zda test podstoupit, je i pravděpodobnost s jakou může být výsledek nepříznivý a z toho vyplývající důsledky pro pacienta (medicínské i osobní – např. reprodukční plány) a jeho rodinu. Navrženy by měly být i alternativní postupy genetického testu. S pacientem by měly být i diskutovány eventuální negativní dopady testu na psychiku, postavení v rodině, zaměstnání, pojištění, atd. Pacient by měl být seznámen i se svým právem test odmítnout nebo se kdykoliv v průběhu testování rozhodnout, že jeho výsledek nechce vědět. Většina těchto zpráv je pro laika těžko pochopitelná, přesto jejich porozumění hraje při rozhodování pacienta důležitou roli (Franková 2007). Na základě všech těchto zpráv a jejich náležitém pochopení se pacient rozhodne, zda chce testování podstoupit, či případně preferuje jiné alternativy postupu.

Nelehkou úlohu má klinický genetik i při sdělení a interpretaci výsledku prediktivního genetického testu, která je komplikována nejenom problémy DNA diagnostiky (viz výše), ale i převedením výsledku testu na individuální výši rizika vzniku onemocnění. Ve vědecké souvislosti je riziko vypočítáváno na základě různých faktorů, zatímco se předpokládá, že stanovení rizika osobou je do značné míry ovlivněno osobní zkušeností, morálními hodnotami a sociálními normami (Hare 1952, 11-126). Studie opakovaně prokázaly, že pacienti ve většině případů nevnímají riziko vzniku choroby správně, mají tendenci jej hodnotit binárně („je nebo není“) (Blain a Brooks 2007), případně jej významně nadhodnocovat či podhodnocovat (Cull et al. 1999, Hoppwood 2000, Nordin et al. 2002). Tento fakt do značné míry následně komplikuje jejich postoj k prevenci a klinické péči.

Genetik má funkci překladatele mezi objektivním relativně jednoznačným vědeckým poznáním založeným na statistickém riziku (měřitelná nejistota) a osobní neobjektivní zkušeností pacienta s rizikem (neměřitelná nejistota) (Sachs et al. 2001). Genetik se zároveň musí vypořádat s riziky zahrnutými v problematické interpretaci genetických a/nebo populačních údajů do diagnózy a klinické péče. Což je v podstatě převedení statistických dat na fyzickou osobu. Již dřívější empirický výzkum ukázal jak těžké a subjektivní je porozumění a interpretace biomedicínky založených pravděpodobností a to jak pro pacienta tak i lékaře (Rose 1985, Julian-Reynier 2003). Genetikův správný „překlad“ výsledků testování do pacientova jazyka formuje postoj jeho, případně postoj členů jeho rodiny, k prevenci a klinické péči (Hare 1981, 65-86).

4.6. Komerčně nabízené prediktivní genetické testy

Současně s rozšiřujícím se poznáním lidského genomu započal i vývoj nových moderních technologií umožňujících stále rychleji a levněji analyzovat velké množství genetické informace. To co se zdálo dříve nemožné, bude zřejmě v budoucnu běžnou realitou a vyšetření genomu jednotlivé osoby by mělo být v průběhu dvou desetiletí komerčně dostupné v ceně 1000 USD či euro. Otázkou ale je, jak vhodně bude možno takovéto množství individuální genetické informace použít. Nové poznatky genomiky a moderní technologie začaly být komerčně využívány již dříve, kdy některé zahraniční společnosti nabízely svým zákazníkům genetické testování ke zjištění genetické predispozice či náchylnosti k jednotlivým

chorobám buď přímo přes internet (z angl. direct-to-consumer) nebo prostřednictvím soukromých genetických center.

Nově se však v roce 2007 objevily komerční společnosti¹⁸, které nabízejí celogenomovou analýzu jednonukleotidových polymorfismů (SNPs, z angl. single nucleotide polymorphisms). Tyto polymorfismy byly již dříve identifikovány v různých asociačních studiích, které sledují rozdíly v genetické variabilitě a porovnávají prevalenci různých genových variant mezi skupinou pacientů s daným onemocněním a kontrolní zdravou skupinou. Na základě této celogenomové analýzy obdrží zákazník výsledek shrnující stupeň rizika vzniku různých specifických onemocnění. Většinou se jedná o multifaktoriální onemocnění dospělého věku (např. hypertenze, obezita, diabetes, kardiovaskulární a nádorová onemocnění, atd.). Dle současných poznatků se vliv genetických faktorů na rozvoj multifaktoriálních chorob dospělého věku pohybuje v řádu jednotek procent (Goetz et al. 2008). Navíc nebylo prozatím vědecky prokázáno, že by celogenomová analýza byla použitelná ke stanovení genetického rizika pro běžná onemocnění nebo, že by byla vhodná jako podklad pro doporučení týkající se úpravy životního stylu za účelem prevence (Janssens et al. 2008). Proto odborné kruhy označily tyto komerční aktivity a popularizaci výsledků genomiky za značně předčasné a prozatím zcela nevhodné pro klinické využití (Nature genetics editorial 2007, Hunter et al. 2008, Janssens et al. 2008, Goetz et al. 2008). Zároveň bylo poukázáno na nutnost dalšího výzkumu v této oblasti a to jak laboratorního tak i epidemiologického.

¹⁸ Např. zahraniční www.23andme.com a www.decodeme.com, v České republice www.ghc.com nebo www.genscan.com

Komerčně nabízené prediktivní genetické testování zcela jistě najde svoje zákazníky. V návaznosti na zdravotnickou osvětu a medializovaný kult „zdraví a krásy“ lze v běžné populaci sledovat stále narůstající zájem o vlastní zdraví. V současné době je i široké laické veřejnosti známo mnoho faktorů, které zvyšují riziko vzniku různých onemocnění. Životní styl, způsob stravování, infekce, stav ovzduší, kouření, chemické substance přidávané do potravin a jiné chemikálie jsou rizikovými faktory, kterým je v médiích věnována větší či menší pozornost. Jednou z mediálních novinek je i komerčně nabízené prediktivní genetické testování. Zároveň je stále více předpokládána aktivní účast jedince na zachování vlastního zdraví. Zaměření na zodpovědnost jednotlivce ale i zodpovědnost vůči zdraví jeho blízkých – partnera, dětí, rodičů – poskytuje to právě sociální klima pro prediktivní genetické testování, které přináší možnost „jako racionální a autonomní jedinec“ onemocněním čelit. Může se zdát, že genetická výbava jedince je mimo jeho vlastní kontrolu, ale znalost genetického rizika vzniku onemocnění, tak jak je nyní komerčním firmami prezentována, je další z řady povinností osoby dbající o vlastní zdraví (Franková 2008).

Určitou úlohu při podstoupení prediktivních genetických testů hraje i lidská iracionalita. Možnost nahlédnout do budoucnosti a řídit „svůj osud“ je stále pro mnoho jedinců přitažlivá. Jestliže někteří lidé neváhají utrácet nemalé finanční prostředky u kartářek a na sestavování svého horoskopu, lze si jen těžko představit, že by „možnost nahlédnutí vlastního zdraví a schopností“ genetickým testováním zůstala nepovšimnuta. Za víru v možnosti genetiky „odhalovat osud“ mohou do značné míry i vědci sami. V 80-90tých letech minulého století byly vědci v médiích často používány metafory genomu jako knihy života či genů jako tvůrců

našeho osudu. Tyto metafory se dostaly do povědomí veřejnosti a způsobily, že vliv genetických faktorů v životě jedince začal být značně přeceňován. Tento způsob prezentace genů má své kořeny stále ještě v molekulárním konceptu genu. Nyní v post-genomové době se ve světle nových objevů náhled vědců na geny mění. Otázkou ovšem zůstává, jak objasnit úlohu genů „ve zdraví a nemoci“ široké veřejnosti. V této souvislosti je nutno zmínit osvětu, která by v rámci medií měla fungovat a nové poznatky z oblasti genetiky a genomiky objektivním způsobem přibližovat. Veřejnosti je nutno nezkráceným způsobem přiblížit úlohu genů a faktorů vnějšího prostředí ve vývoji jedince („co geny můžou a nemůžou“), stejně tak jako objektivní možnosti prediktivního genetického testování. Takto široká osvěta mezi laickou ale i zdravotnickou veřejností může vést k racionálnímu postoji ke komerčně nabízeným prediktivním testům.

Další důležitou náležitostí, která by se měla pro komerční společnosti poskytující prediktivní genetické testování stát podmínkou zaručující kvalitu poskytovaných služeb, je akreditace těchto pracovišť. V současné době mohou laboratoře poskytující prediktivní genetické testování existovat na základě pouhého zápisu v obchodním rejstříku, neboť nejde o vázanou činnost. Neexistuje tudíž nejmenší záruka kvality jejich práce (Goetz et al. 2008). Standardní genetické laboratoře se podrobují externím kontrolám kvality, které by měla zaručit, že jejich činnost odpovídá daným pravidlům¹⁹ (Goetz et al. 2008). I u komerčně nabízených prediktivních testů by měla být samozřejmostí správná, přesná a výstižná interpretace získaných výsledků prováděná odborně vzdělaným zdravotnickým

¹⁹ Seznam akreditovaných genetických laboratoří v České republice lze nalézt na <http://www.uhkt.cz/nri/db>.

pracovníkem, který si bude vědom veškerých dalších konsekvencí vyplývajících z prováděného testování (Franková 2008).

4.7. Shrnutí

V rámci klinické genetiky lze gen také vymezit jako informaci obsahující instrukci pro vytvoření fenotypového znaku. Fenotypový znak zde představuje chorobu nebo nemoc, u níž bude sledováno, zda a případně do jaké míry je geneticky podmíněna. Takto vymezený gen odpovídá i laickému chápání a lze jej použít při objasňování problematiky genetického testování bez použití různých zavádějících metafor.

V důsledku značného pokroku je předpokládáno rychlé zavádění nových genetických testů do klinické praxe a stále se rozšiřující nabídka genetických testů poskytovaných komerčními společnostmi. Nedílnou součástí procesu genetického testování je detailní genetické poradenství umožňující pacientovi provést poučené rozhodnutí (informed consent). Genetické poradenství poskytuje geneticky školený profesionál. Kromě procesu poučeného rozhodování je jeho důležitou úlohou i přeložení a interpretace genetických dat získaných testováním do zprávy srozumitelné pro pacienta. Což v podstatě znamená zpracování genetických dat do diagnózy a klinické péče neboli převedení statistických dat na fyzickou osobu. To v mnohém determinuje pacientovu budoucnost a ovlivňuje i postoj dalších členů rodiny k testování. Nebezpečí dezinterpretace hrozí zejména u komerčně dostupných testů. Průběžné vzdělávání zdravotníků a osvěta mezi laickou veřejností, nezkresleně přibližující nové poznatky genetiky a genomiky, je nutným

předpokladem pro racionální chápání funkce genu ve vývoji jedince a tím i porozumění možnostem současného genetického testování.

5. Závěr

V práci byla shrnuta historie pojmu genu, ze které vyplývá, že používaný molekulární koncept a z něj odvozené definice genu jako segmentu DNA, který tvoří kompaktní a ohraničený genetický lokus neodpovídají současnému stupni biologického poznání. Z předložených argumentů lze zároveň odvodit, že genový produkt není pouze lineárním obrazem DNA sekvence a tudíž vztah mezi strukturou genu a jeho funkcí není tak jednoznačný, jak jej molekulární koncept prezentuje. Tento mechanický výklad genu, neodpovídá ani recentním poznatkům post-genomové biologie.

Práce měla prokázat, že mnohem vhodnější pro vymezení genu je jeho sémantický výklad vycházející z konceptu klasické genetiky, ve které byl gen považován za něco, co přenáší znaky z rodičů na jejich potomky. Stanovili jsme dvě funkce, které jsou pro gen charakteristické. A to přenášení znaků z generace na generaci a realizaci informace genu při vývoji jedince – vznik fenotypu. *Gen jako znak, který se dědí mezi jednotlivými generacemi, nemá hmotný základ ale charakter informace.* Za znaky se považují geneticky podmíněné vlastnosti organismu. Funkcí genu je znak mezi jednotlivými generacemi přenášet a umožňovat jeho vývoj. *Gen je tudíž informace obsahující instrukci pro vytvoření fenotypového znaku.* Tato informace je zapsaná různým způsobem v různých oblastech genomu. Výsledný fenotypový znak je determinován nejen informací obsaženou v DNA ale i její epigenetickou interpretací a zároveň informací pocházející z vnějšího prostředí. Lze říci, že místo lineárního toku informace

z DNA sekvence k jejímu produktu, je informace jako instrukce tvořena a distribuována v rámci celého vývojového systému organismu.

Fenotypový znak, který v takto vymezeném pojmu genu sledujeme, je v medicíně definován na základě našeho klinického zájmu. Neboli jako nemoci či afekce, u kterých chceme stanovit, zda a případně do jaké míry jsou geneticky podmíněny. K takto vymezenému fenotypovému znaku je posléze nutné experimentální cestou hledat v genomu sekvence, které se na jeho vzniku podílejí. Informace některých genů může být „přečtena“ v procesu genetického testování. Takto získaná informace genu musí být následně při genetickém poradenství interpretovaná klinickým genetikem do zprávy pro pacienta. Na příkladu prediktivního genetického testování bylo poukázáno, jak důležitou roli hraje při poučeném rozhodování pacienta správný a výstižný překlad všech faktů spojených s testováním. Zároveň je i důležitá přesná interpretace výsledků testování dále ovlivňující pacientovy plány do budoucnosti a jeho postoj k prevenci a klinické péči.

Stejně jako genetik překládá informace genu do zprávy pro pacienta, měli by vědci prostřednictvím médií objektivním způsobem přibližovat široké laické veřejnosti nové poznatky z oblasti genetiky a genomiky. Veřejnosti je nutno nezkráceným způsobem přiblížit úlohu genů a faktorů vnějšího prostředí ve vývoji jedince („co geny můžou a nemůžou“), stejně tak jako objektivní možnosti genetického testování. Široká osvěta mezi zdravotnickou a laickou veřejností může vést k racionálnímu postoji k možnostem současné genetiky a změnit vžitý deterministický náhled na geny „jako na tvůrce našich osudů“.

6. Seznam použité literatury

Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M. et al. (2005): Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308:1466-1472.

Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M. (1944): Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine* 79:137-158.

Bar-Hillel, Y. (1964): *Language and Information: Selected Essays on Their Theory and Application*. Reading, Mass, Addison –Wesley. London. (citováno z Floridi, L. (2005): Semantic conceptions of information. *Stanford Encyclopedia of Philosophy*. [online] Dostupné na: <http://plato.stanford.edu/entries/information-semantic/>. 3.3.2008.)

Baum, A., Friedman, A., Zakowski S.G. (1997): Stress and genetic testing for disease risk. *Health Psychology* 16(1):8-19.

Beadle, G.W., Tatum, E.L. (1941): Genetic kontrol of biochemic reactions in *Neuspora*. *Proceedings of National Academy of Science* 74: 499-506.

Beauchamp, T.L., Childress, J.F. (2001): Principles of biomedical ethics. Fifth edition. Oxford University Press. Oxford.

Benzer, S. (1955): Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Science* 41:344-354. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)

Benzer, S. (1957): *The chemical basis of heredity*. In: McElroy, W.D., Glass, B (eds.) The Johns Hopkins Press, Baltimore. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)

Benzer, S. (1961): On the topography of the genetic fine structure. *Proceedings of National Academy of Science* 47:403-416. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)

Berget, S.M., Moore, C., Sharp, P.A. (1977): Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of National Academy of Science* 74:3171-3175.

Bertone, P., Stolc, V. Royce, T.E., et al. (2004): Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science* 306:2242-2246.

- Bleiker, E.M., Hahn D.E., Aaronson, N.K. (2003): Psychosocial issues in cancer genetics. *Acta Oncologica* 42(4):276-286.
- Blumenthal, T. (1998): Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryotes. *BioEssays* 20(6):480-487.
- Borst, P. (1986): Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annual Review in Biochemistry* 55:701-732.
- Brdička, R., Beránek, M., Čimburová, M., et al. (2006): Frekvenční pohled na vyšetření odchylek genomu. *Časopis Lékařů Českých* 145:98-103.
- Buchanan, A.V., Weiss, K.M., Fullerton, S. (2006): Dissectin komplex disease: the quest for the Philosopher's Stone? *International Journal of Epidemiology* 35:562-571.
- Burian, R. M. (2004): Molecular Epigenesis, Molecular Pleiotropy, and Molecular Gene Definitions. *History and Philosophy of the Life Sciences* 26:59-80.
- Burke, W. (2002): Genetic Testing. *New England Journal of Medicine* 347:1846-1875.
- Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.
- Castle William (1905): Recent discoveries in heredity and their bearing on animal breeding. *Popular Science Monthly* 66:193-208. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*, W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)
- Claes, E., Evers-Kiebooms, G., Boogaerts, A., et al. (2003): Communication with close and distant relatives in the context of genetic testing for hereditary breast and ovaria cancer in cancer patients. *American Journal of Medical Genetics* 116A:11-19.
- Coelho, P.S., Bryan, A.C., Kumar, A. et al. (2002): A novel mitochondrial protein, Tar1p, is encoded on the antisense strand of the nuclear 25S rDNA. *Genes and Development* 16:2755-2760.
- Communi, D., Suarez-Huerta, N. Dussosoy, D. et al. (2001): Cotranscription and intergenic splicing of human P2Y (11) SSF1 genes. *Journal of Biological Chemistry* 276 (19):16561-16566.
- Conklin, E.G. (1898): *The factors of organic evolution from standpoint of Embryology*. In: Jordan, D.S. (ed.). D. Appleton and Co., New York. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)

Crick, F.H.C. (1958): On protein synthesis. *Symposium of Society of Experimental Biology XII*:138-163.

Cull, A., Anderson, E., Campbell, S., et al. (1999): The impact of genetic counselling about breast cancer risk on women's risk perceptions and levels of distress. *British Journal of Cancer* 79 (3/4):501-508.

Darwin, C. (1868): Provisional hypothesis of pangenesis. *Animals and Plants Under Domestication*, Vol. II:428-483. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)

Dawkins, R. (1989): *Sobecký gen*. Z anglického originálu *The Selfish Gene*, Second Edition. Oxford University Press., Oxford, Mladá Fronta, Praha 2003.

Delihias, N. (1995): Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNAs. *Molecular Microbiology* 15:411-414.

Dietrich, M.R. (2000): The problem of the gene. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences – Series III – Sciences de la vie* 323:1139-1146.

Dillon, N. (2003): Positions, please: Gene autonomy. *Nature* 425 (2):457.

Drake, A.J. a Walker, B.R. (2004): The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *Journal of Endocrinology* 180:1-14.

Eisen, H. (1988): RNA editing: Who's on first? *Cell* 53:331-332.

The ENCODE Project Consortium (2007): Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447:799-816.

Esplen, M.J., Liede, A., Hoodfar, E. et al. (2001): Motivation and psychosocial impact of genetic testing for HNPCC. *American Journal of Medical Genetics* 103:9-15.

EuroGentest (2007): Recommendations for genetic counselling related to genetic testing (Draft 2).[online]. Dostupné na: <http://www.eurogentest.org/guidelines.xhtml>. 18.2.2008.

Falk, R. (1986): What is a gene? *Studies in the History and Philosophy of science* 17:133-173.

Fiers, W., Contreras, R., De Wachter, R. et al. (1971): Recent progress in the sequence determination of bacteriophage MS2 RNA. *Biochimie* 53:495-506.

Fiers, W., Contreras, R., Duerinc, F., et al. (1976): Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: Primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* 260:500-507.

Finta, C., Zaphiropoulos, P.G. (2000): The human cytochrome P450 3A locus. Gene evolution by capture of downstream exons. *Gene* 260 (1-2):13-23.

Finta, C., Zaphiropoulos, P.G. (2002): Intergenic mRNA molecules resulting from trans-splicing. *Journal of Biological Chemistry* 277 (8):5882-5890.

Fisher, R.A. (1918): The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Philosophical Transaction of the Royal Society of Edinburgh* 52:399-433.

Flegr, J. (2006): *Zamrzlá evoluce, aneb, Je to jinak, pane Darwin*. Academia. Praha.

Floridi, L. (2005): Semantic conceptions of information. *Stanford Encyclopedia of Philosophy*. [online] Dostupné na: <http://plato.stanford.edu/entries/information-semantic/>. 3.3.2008.

Fraga M.F. a Esteller M. (2007): Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends in Genetics* 23(8):413-418.

Franková, V., Židovská, J., Krutílková, V. et al. (2003): Psychosociální faktory spojené s genetickým testováním některých dědičně podmíněných nádorových onemocnění. *Časopis Lékařů Českých* 142:599-602.

Franková, V. (2007): Interpret – jedna z rolí klinického genetika. *Časopis Lékařů českých* 146:840-843.

Franková, V. (2008): Komerčně nabízené prediktivní genetické testy – kdo poskytne zákazníkům genetické poradenství? *Zdravotnictví v České republice* II(XI):60-62.

Frazer, F.C. (1974): Genetic counselling. *American Journal of Human Genetics* 26:636-661.

Fulda, K.G., Lykens, K. (2006): Ethical issues in predictive genetic testing: a public health perspective. *Journal of Medical Ethics* 32:143-147.

Gelinas, R.E., Roberts, R.J. (1977): One predominant 5'-undecanucleotide in adenovirus 2 late messenger RNAs. *Cell* 11:533-544.

Gerstein, M.B., Bruce, C., Rozowsky, J.S. et al. (2007): What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Research* 17:669-681.

Gingeras, T.R. (2007): Origin of phenotypes: Genes and transcripts. *Genome Research* 17:682-690.

Godfrey-Smith, P., Sterelny, K. (2007): Biological information. *Stanford Encyclopedia of Philosophy*. [online] Dostupné na: <http://plato.stanford.edu/entries/information-biological>. 3.3.2008.

Goetz, P., Seemanová, E. (2002): Etické problémy klinické genetiky. *Postgraduální medicína* 5:569-571.

Goetz, P., Foretová, L., Macek, M. (2008): Hrozí zneužití a diskreditace lékařské genetiky. *Česko-slovenská Pediatrie* 63(4):179-181.

Goldschmidt, R. (1932): Genetics nad Development. *Biology Bulletin* 63:337-356. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)

Goldschmidt, R. (1937): Spontaneous chromatin rearrangements in Drosophila. *Nature* 140: 767. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)

Goldschmidt, R. (1940): Chromosomes and genes. *AAAS publication* 14:56-66. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)

Goldschmidt, R. (1946): Position effect and the theory of the corpuscular gene. *Experientia* 2:1-40. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)

Goldschmidt, R. (1954): Different philosophies of genetics. *Science* 119:703-710. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)

Griffiths, P.E., Stotz, K. (2006): Genes in the postgenomic era. *Theoretical Medicine and Bioethics* 27(6):499-521.

Hare, R.M. (1952): *The Language of Morals*. Clarendon, Oxford.

Hare, R.M. (1981): *Moral Thinking*. Clarendon. Oxford.

Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C. (2002): MAPK-regulated transcription: A continuously variable gene switch? *Nature* 3:30-41.

Henikoff, S., Keene, M.A., Fechtel, K., et al. (1986): Gene within a gene: Nested Drosophila genes encode unrelated proteins on opposite DNA strands. *Cell* 44:33-42.

- Ho, M.-W. (1998): *Genetické inženýrství – naděje nebo hrozba?* Z anglického originálu Genetic Engineering - Dream or Nightmare? GATEWAY BOOKS, UK. Nakladatelství Alternativa, Praha 2000.
- Hopwood, P. (2000): Breast cancer risk perception: what do we know and understand. *Breast Cancer Research* 2:387-391.
- Hunter, D.J., Khoury, M.J., Drazen, J.M. (2008): Letting the genome out of the bottle – Will we get our wish? *New England Journal of Medicine* 358(2):105-107.
- Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J. et al. (2005): Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308:1149-1154.
- Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R. et al. (1977): An amazing semence arrangement at the 5'ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 116:499-509.
- Isidoro-García, M., Dávila-González, I., Pascual de Pedro, M. (2007): Interactions between genes and enviroment. Epigenetics in Alleny. *Allergologia et Immunopathologia* 35(06):254-258.
- Jacob, F. a Monod, J. (1961): Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3:318-356.
- Janssens, A.C.J.W., Gwinn, M., Bradley, L.A. (2008): A critical appraisal of the scientific basis of commercial genomic profiles used to assess health risk and personalize health interventions. *American Journal of Human Genetics* 82:593-599.
- Johannssen, W. (1909): *Elemente der Exakten Erblichkeitslehre*. G.Fisher, Jena. (citováno z Carlson A.E. (1966): *The Gene: A Critical History*. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.)
- Jong, M.T., Gray, T.A., Ji, Y. et al. (1999): A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in hte Prader-Willi syndrome critical region. *Human Molecular Genetics* 8:783-793.
- Julian-Reynier, C., Welkenhuysen, M., Hagoel, L. et al. (2003): Risk communication strategies: state of the art and effectiveness in the context of cancer genetic services. *European Journal of Human Genetics* 11:725-736.
- Kapranov, P., Cawley, S.E., Drenkow, et al. (2002): Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. *Science* 296:916-919.
- Keller E.F. (2005): The century blond the gene. *Journal of biosciences* 30(1):3-10.
- Klein, J. (1964): *Molekulární základy dědičnosti*. Orbis, Praha.

- Klein a Takahata (2002): *Where do we come from? The molecular evidence for human descent*. Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg, New-York.
- Kuhn, T. (1962): *The Structure of Scientific Revolutions*. 1ed. Chigago: University of Chigago Press.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the genome. *Nature* 409:860-921.
- Lemon, B., Inouye, C., King, D.S., et al. (2001): Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription. *Nature* 414:924-928.
- Lennox, J. (2006): Aristotle's biology. *Stanford Encyclopedia of Philosophy*. [online] Dostupné na: <http://plato.stanford.edu/entries/aristotle-biology>. 3.3.2008.
- Lerman, C., Shields, A.E. (2004): Genetic testing for cancer susceptibility: the promise nad the pitfalls. *Nature Reviews* 4:235-241.
- Levine, M. a Davidson E.H. (2005): Gene regulatory networks for development. *Proceedings of National Academy of Science* 102:4936-4942.
- Levy, D.E. a Darnell, J.E. Jr. (2002): STATS: Transcriptional control and biological impal. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 3:651-662.
- Magrangeas, F., Pitiot, G., Dubois, S. et al. (1998): Cotranscription and intergenic splicing of human galactose-1-phosphate uridylyltransferase and interleukin-11 receptor alpha-chain genes generace a fusion mRNA in normal cells – Implication for the rproduction of multidomain proteins during evolution. *Journal of Biological Chemistry* 273 (26):16005-16010.
- Mattick, J.S.(2007): A new paradigm for developmental biology. *Journal of Experimental Biology* 210:1526-1547.
- Mattick, J.S. a Makunin, I.V. (2006): Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics* 15:R121-R132.
- McClintock, B. (1929): A cytological and genetical study of triploid maize. *Genetics* 14:180-222.
- McPherson, E. (2006): Genetic diagnosis and testing in clinical practise. *Clinical Medicine&Research* 4(2):123-129.
- Meaney, M.J. (2001): Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across genetations. *Annual Review Neuroscience* 24:1161-1192.

Mendel, J.G. (1865): Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereins in Brün 4 Abhandlungen: 3-47. Citováno z R.C.Olby (1997) [online]. Dostupné na <http://www.mendelweb.org/MWGerText.html>. 3.3.2008.

Morange, M. (1998): A History of Molecular Biology. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1998.

Morgan (1915): The constitution of the hereditary material. *Proceedings of National Academy of Science* 1:420-429.

Morgan, T.H., Sturtevan, A.H., Muller, H.J. et al. (1915): *The mechanism of Mendelian heredity*. Holt Rinehart & Winston, New York.

Mottus, R.C., Whitehead, I.P., Ogrady, M. et al. (1997): Unique gene organization: alternative splicing in *Drosophila* produces two structurally unrelated proteins. *Gene* 198 (1-2):229-236.

Muller, H.J. (1927): Artificial transmutation of the gene. *Science* 46:84-87.

Muller, H.J. (1930): Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *Journal of Genetics* 22:20-334.

Nature genetics editorial (2007): Risky business. *Nature genetics* 39(12):1415.

Nečásek, J., Cetl, I. a kol. (1979): *Obecná genetika*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 2.vydání.

Neubauer, Z. (1984): *Kybernetické problémy přírodovědy. Sborník přednášek*. ZP ČSTV při FGÚ ČSAV, Praha.

Neumann-Held, E.M. (1998): The gene is dead – long live the gene: Conceptualising the gene the constructionist way. In Koslowski P. (ed.): *Sociobiology and Bioeconomisc. The theory of Evolution in Biological and Economic Theory*, Berlin: Springer-Verlag.

Niremberg, M., Leder, P., Bernfiedl, M., et al. (1965): RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code. *Proceedings of National Academy of Science* 53:1161-1168.

Nordin, K., Lidén, A., Hansson, M. (2002): Coping style, psychological distress, risk perception, and satisfaction in subjects attending genetic counselling for hereditary cancer. *Journal of Medical Genetics* 39:689-694.

Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard. H.F. (2001): *Klinická genetika. Thompson&Thompson*. Z anglického originálu *Thompson & Thompson: Genetics*

in Medicine, 6/e. WB. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania. TRITON. Praha 2004.

Payne, J. (2002a): Zdraví a celek lidské bytosti. In: Payne J (ed) Zdraví - hodnota a cíl moderní medicíny. Triton, Praha.

Payne, J. (2002b): Informed Consent Reconsideration of its role and structure in Medicine. In: Salek, S., Edgar, A. (eds): *Pharmaceutical Ethics*. John Wiley, Chichester.

Payne, J. (2008): Smrt jediná jistota. Triton, Praha.

Pearson (2006): What is a gene? *Nature* 441:399-401.

Peterson, S.K., Watts, B.G., Krehly, L.M., et al. (2003): How families communicate about HNPCC genetic testing: Findings from a qualitative study. *American Journal of Medical Genetics* 119C:78-86.

Petrukhin, K., Koisti, M.H., Bakall, B. et al. (1998): Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nature Genetics* 19:241-247.

Portin, P. (1993): The concept of the gene: Short history and present status. *The Quarterly Review of Biology* 68(2):173-223.

Portin, P. (2002): Historical development of the concept of the gene. *Journal of Medical Philosophy* 27(3):257-286.

Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A. et al. (1995): Alternative reading frames of the INK4 a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83:993-1000.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L. et al. (2004): Identification of mammalian microRNA host genes and transcription unit. *Genome Research* 14:1902-1910.

Rose, G. (1985): Sick individuals and sick population. *International Journal of Epidemiology* 14:32-38.

Sachs, L., Taube, A., Tishelman, C (2001): Risk in numbers – difficulties in the transformation of genetic knowledge from research to people. *Acta Oncologica* 40 (4):445-453.

Sapp, J. (1990): Nine lives of Gregor Mendel. *Experimental Inquiries* (ed.H.E. Le Grand): 137-166, Kluwer Academic Publisher. [online] Dostupné na: <http://www.mendelweb.org/MWsapp.html>. 3.3.2005.

Sedláček, Z. (2002): Sekvence lidského genomu a medicína. *Postgraduální medicína* 5:493-498.

Shannon, C. (1948): A mathematical theory of communication. *Bell Systems Technical Journal* 27:279-423, 623-656.

Söll, D., Ohtsuka, E., Hibes, D.S. et al. (1965): Studies on polynucleotides, XLIX. Stimulation of the binding of aminoacyl-sRNA's to ribosomes by ribonucleotides and a survey of codon assignments for 20 amino acids. *Proceedings of National Academy of Science* 54:1378-1385.

Stotz, K., Bostanci, A., Griffiths, P.E. (2006): Tracking the shift to 'postgenomics'. *Community genetics* 9(3):190-196.

Sturtevant, A.H. (1925): The effects of unequal crossing over at the bar locus in *Drosophila*. *Genetics* 10:117-147.

Takahara, T., Kanazu, S.I., Yanagisawa, S. et al. (2000): Heterogenous Sp1 mRNAs in human HePG2 cells include a product of homotypic *trans*-splicing. *Journal of Biology and Chemistry* 275:38067-38072.

Tang, W., Ho, S. (2007): Epigenetic reprogramming and imprinting in the origins of disease. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 8(2):173-182.

Venter, J.C., Adams, M.D., Meyers, E.W., et al. (2001): The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.

Vyskot B. (2006): Přenos epigenetické informace v liniích buněk somatické a zárodečné dráhy. In: Jonák, J. jun. a Jonák, J. (eds.): *Molekulární biologie a genetika XII*. Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha 2006.

Wain, H.M., Brudford, E.A., Lovering, R.C. et al. (2002): Guidelines for Human Gene Nomenclature. *Genomics* 79(4):464-470.

Waters, K. (2007): Molecular genetics. *Stanford Encyclopedia of Philosophy*. [online] Dostupné na: <http://plato.stanford.edu/entries/molecular-genetics/>. 3.3.2008.

Watson, J.D., Crick, F.H.C. (1953): A structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171:946-967.

Weaver, I.C.G., Cervoni, N., Champagne, F.A. et al. (2004): Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience* 7:847-853.

Weinberg, W. (1908): Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahreshefte des Vereins für Vaterländische Naturkunde in Württemberg*. Stuttgart 64: 368-382 (citováno z Buchanan, A.V. et al. (2006): Dissectin komplex disease: the quest for the Philosopher's Stone? *International Journal of Epidemiology* 35: 562-571.)

Williams, G.C. (1966): *Adaptation & Natural Selection*. Princeton: Princeton University Press. (citováno z Griffiths, P.E., Stotz, K. (2006): Genes in the postgenomic era. *Theoretical Medicine and Bioethics* 27(6):499-521.)

Winstock, G.M.(2007): ENCODE: More genomic empowerment. *Genome Research* 17:667-668.

World Federation of Neurology (1994): Research Committee, Research Group on Huntington's disease: Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington's disease. *Neurology* 44:1533-1536.

Židovská, J. (2002): Prediktivní genetické testování. *Postgraduální medicína* 5:560-562.