

BIULETYN INFORMACYJNY Nr 2

Komisja Genetyki Człowieka
przy Komitecie Patofizjologii Komórki
Polska Akademia Nauk

Instytut Psychiatrii i Neurologii
Warszawa, 1990

BIULETYN
INFORMACYJNY Nr 2

Komisja Genetyki Człowieka
przy Komitecie Patofizjologii Komórki
Polska Akademia Nauk

Instytut Psychiatrii i Neurologii
Warszawa, 1990

UWAGI WSTĘPNE

Drugi zeszyt Biuletynu zawiera głównie materiały z konferencji na temat stanu analizy DNA w Polsce, które odbyło się 20 kwietnia, 1990 w Łodzi. Większość doniesień dotyczy badań przeprowadzonych w różnych ośrodkach na terenie kraju. Następny rozdział charakteryzuje krótko te właśnie ośrodki pod kątem ich aktualnych zainteresowań badawczych i planów na przyszłość. Wymieniono także sondy genetyczne, którymi poszczególne ośrodki dysponują.

Rozdział III zawiera pracę Dr. A. Latos-Bieleńskiej z Zakładu Genetyki PAM w Poznaniu, poświęconą problematyce hybrydyzacji in situ w cytogenetyce. Jest to nowoczesna metoda, która powinna znaleźć szersze niż dotychczas zastosowanie w kraju.

Rozdział IV zawiera listę wszystkich ośrodków na terenie kraju zajmujących się genetyką człowieka - z nazwiskami kierowników, adresami i numerami telefonów.

Ostatnie posiedzenie Komisji Genetyki odbyło się 14 grudnia 1990 w CZD. Na posiedzeniu tym dyskutowane było zagadnienie przyszłości genetyki człowieka w Polsce. Zastanawiano się nad celowością powołania towarzystwa zajmującego się genetyką człowieka (Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka).

Na zakończenie pragniemy przypomnieć, że w dniach 10 i 11 maja 1991 w Kazimierzu Dolnym odbędzie się VII Krajowa Konferencja Cytogenetyczna, organizatorami Sympozjum są Zakład Genetyki Medycznej AM w Lublinie, kierownik Prof. dr hab. med. Danuta Rożynkowa oraz Instytut Pediatrii AM w Lublinie, ul. Staszica 11, 20-081 Lublin, kierownik Doc. dr hab. med. Jerzy Kowalczyk, tel. 206-19.

Będziemy wdzięczni za uwagi członków Komisji na temat zawartości tego zeszytu Biuletynu, jak również za wnioski

dotyczące jego treści w przyszłości.

Wszystkim członkom Komisji Genetyki Człowieka Komitetu Patofizjologii Kowórki PAN oraz wszystkim innym osobom zajmującym się genetyką człowieka w Polsce tyczymy wszelkiej pomysłowości w roku 1991.

Warszawa, 27 grudnia, 1990 r.

Sekretarz Komisji

Dr Alicja Ilnicka

Przewodniczący Komisji

Doc.dr Jacek Zarebski

I. MATERIAŁY KONFERENCJI PT. ANALIZA DNA W UWARUNKOWANYCH GENETYCZNIE CHOROBLACH CZŁOWIEKA - OBECNA SYTUACJA W POLSCE. ŁÓDŹ, 20 KWIEŹNIA 1990 R.

1. Analiza DNA w zespole kruchego X - Grzegorz Nowicki 1
2. Analiza DNA w zespole kruchego X - J. Bał,
D. Maciejko, A. Szpecht-Potocka, E. Bocian, T. Mazurczak 2
3. Analiza DNA w dystrofii mięśniowej Duchenne'a
E. Popowska, J. Popowski, M. Krajewska-Walasek,
E. Pronicka 3
4. Analiza DNA w dystrofii mięśniowej Duchenne'a i
Beckera - P. Bieganski, J. Zimowski, I. Hausmanowa-
-Petrusewicz, E. Fidziańska, J. Zarebski, I. Wald 5
5. Analiza DNA w fenyloketonurii - J. Jaruzelska 9
6. Analiza DNA w krzywicy hipofosfatemicznej -
E. Popowska, J. Popowski, M. Krajewska-Walasek,
E. Wleczorek, E. Pronicka 10
7. Wykorzystanie sond molekularnych genu tyreoglobu-
linowego i tyreoperoksydazowego w badaniach
patogenezy wrodzonych defektów syntezy hormonów
tarczycy - K. Łacka, M. Gembicki, J. Kosowicz 12
8. Deregulacja genu 17-1A w liniach komórek nowotwo-
rowych z raka trzustki u człowieka - D. Polucha,
J. Wojcierowski 14
9. Analiza DNA w mukowiscydozie - J. Bał, D. Maciejko,
A. Szpecht-Potocka, T. Mazurczak 18
10. Wykorzystanie sond DNA swoistych dla chromosomu Y
w diagnostyce zaburzeń rozwoju cielesno-płciowego
- L. Jakubowski, B. Kubiński 19

11. Analiza DNA w zaburzeniach rozwoju cielesno- -piciowego - M. Kotwicki, J. Jaruzelska	21
12. Szybka metoda detekcji DNA chromosomu Y przy uzyciu reakcji łańcuchowej z polimerazą - M. Witt	22
13. Supernumerary marker chromosomes; Presentation of ten new cases. A practical approach - B. Kaluzewski, S. W. Burkholder, W. G. Coutinho, M. Dębiec-Rychter, M. Skorski, L. G. Jackson	23
II. OSRODKI, W KTORYCH PROWADZI SIĘ ANALIZĘ DNA W POLSCE - DANE NA TEMAT PROWADZONYCH BADAŃ I WYPOSAŻENIA	25
III. HYBRYDYZACJA IN SITU (ISH) W CYTOGENETYCE - DR MED. ANNA LATOS-DIELEŃSKA	31
IV. WYKAZ OSRODKÓW ZAJMUJĄCYCH SIĘ GENETYKĄ CZŁOWIEKA W POLSCE	42

I. MATERIAŁY KONFERENCJI PT. ANALIZA DNA W UWARUNKOWANYCH
GENETYCZNIE CHOROZACH CZŁOWIEKA - OBECNA SYTUACJA W POLSCE.
ŁÓDŹ, 20 KWIEŃCIA 1990 R.

1. ANALIZA DNA W ZESPOLE KRUCHEGO X

Grzegorz A. Nowicki

Zakład Genetyki Medycznej Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

Zespół kruchego chromosomu X jest jedną z najczęstszych
uwarunkowanych genetycznie chorób u człowieka.

Diagnostyka cytogenetyczna w tym zespole ze względu na nie-
jednorodną ekspresję kruchego chromosomu X jest niewystarczająca.
Dlatego też badania na poziomie DNA w tych przypadkach są bardzo
istotnym elementem diagnostycznym.

W analizie DNA w zespole kruchego X stosuje się sprzężenie
technik rekombinacji DNA z wykorzystaniem polimorfizmu długości
fragmentów restrykcyjnych (RFLP).

Przedmiot badań stanowiła rodzina C., w której dwóch
chłopców było dotkniętych zespołem kruchego chromosomu X; ich
siostra była natomiast podejrzana o nosicielstwo genu warunkują-
cego ten zespół.

Analizę DNA wykonano u całej rodziny - w trzech pokole-
niach. Materiał do uzyskania DNA stanowiła krew obwodowa.

Do analizy wykorzystano następujące sondy i fragmenty RFLP:
czynniki VIII i IX, DXS02, DXS01, DXS02, DXS15.

Wyniki informatywne uzyskano przy pomocy sond odpowiadających
czynnikom VIII i IX; prawdopodobieństwo sprzężenia określono na
8:1.

Występująca różna częstość rekombinacji sond w stosunku do

regionu kruchego miejsca pozwala wyodrębnić dwa typy rodzin:

1. Rodziny, w których mężczyźni nie wykazują efektu penetracji zmutowanego genu,
2. Rodziny, w których mężczyźni wykazują pełną penetrację zmutowanego genu.

Dlatego też w przypadkach zespołu kruchego X należy postąpić z większą liczbą sond zblizonych do locus kruchego X.

2. ANALIZA DNA W ZESPOLE KRUCHEGO X

J. Bai, D. Maciejko, A. Szpecht-Potocka, E. Bocian, T. Mazurczak
Pracownia Genetyki Molekularnej, Zakład Genetyki, Instytut
Matki i Dziecka, Warszawa

Analizę DNA w zespole kruchego X rozpoczęliśmy w Zakładzie Genetyki IMD w 1989 r. Badaniu poddano 31 preparatów DNA pochodzących z 6 rodzin. Zespołu łamliwego chromosomu X potwierdzono w tych rodzinach badaniem cytogenetycznym.

Stosowano następujące sondy molekularne: St14 wykrywająca polimorfizm po cięciu DNA enzymem restrykcyjnym TaqI, 4D8/MspI, U6:2/TaqI i cX95.7/TaqI.

Badaniem polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA potwierdzono nosicielstwo zmutowanego genu u matek chorych chłopców i wykryto chromosom przenoszący gen Fra X u 5 członków rodzin pięci żeńskiej. U jednej dziewczynki, dla której wyniki badania cytogenetycznego były niejednoznaczne wykluczono nosicielstwo genu Fra X.

W jednej rodzinie uzyskano informacyjne wyniki jedynie dla sondy St14, o której wiadomo, że oddalona jest od miejsca kruchego

około 12 cM. Oddalenie takie wiąże się z większą częstością rekombinacji, a co za tym idzie większym prawdopodobieństwem popełnienia błędów przy identyfikacji chromosomu X zawierającego zmutowany gen.

3. ANALIZA DNA W DYSTROFII MIĘŚNIOWEJ DUCHENNE' A

E. Popowska¹, J. Popowski¹, M. Krajewska-Walasek², E. Pronicka³

¹ Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej CZD, Warszawa

² Poradnia Genetyczna CZD, Warszawa

³ Zespół d/s Chorób Metabolicznych, CZD, Warszawa

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD), choroba dziedziczna o charakterze recesywnym, jest skutkiem uszkodzenia genu dystrofiny, zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu X w rejonie Xp21.3.

Badania diagnostyczne podjęte w Centrum Zdrowia Dziecka zmierzają do:

- wykrycia ubytku (delecji) w genie DMD - I etap,
- identyfikacji haplotypu markerowego choroby i ustalenia nosicielstwa choroby w rodzinie - II etap.

W pierwszym etapie analizę DNA przeprowadzano jedynie u pacjentów z dystrofią mięśniową Duchenne'a, a do wykrycia delecji w genie DMD stosowano sondy: cDMD 1-2a, cDMD 2b-3, cDMD 4-5a, cDMD 5b-7 i cDMD 8, będące fragmentami cDNA, komplementarnego dla mRNA dystrofiny.

W drugim etapie analizę DNA przeprowadzano u chorych chłopców oraz u członków ich rodzin. Stosowano sondy polimorficzne wewnętrzgenowe: XJ 1.1N, XJ 2.3, pERT 87-1 i pERT 87-15

oraz sondy polimorficzne zewnątrzgenowe: p9C.01 i p754.

Ogólnie badaniami objęto 18 rodzin z dystrofią mięśniową Duchenne'a (10 rodzin z Kliniki Neurologicznej AM w Warszawie udostępnionych przez prof. I. Hausmanową-Petrusewicz, oraz 8 rodzin skierowanych z Poradni Genetycznej CZD). Z wywiadu oraz badań biochemicznych wynika, że w pięciu rodzinach (31%) choroba jest wynikiem świeżej mutacji w genie DMD, natomiast w jedenastu rodzinach (69%) została przekazana przez matki - nosicielki.

U siedmiu pacjentów zidentyfikowano delecje w obrębie genu dystrofiny obejmujące od jednego do sześciu eksonów. Stwierdzono, że występują one głównie w proksymalnej (2 rodziny) lub środkowej części genu DMD (3 rodziny).

Każda zidentyfikowana delecja w genie DMD stanowi precyzyjny i pewny marker genetyczny choroby, który można wykorzystać w diagnostyce prenatalnej u matki - nosicielki oraz w poradnictwie genetycznym dla wszystkich spokrewnionych kobiet podejrzanych o nosicielstwo choroby.

Wszystkie choroby, w których nie stwierdzono delecji w genie DMD oraz wszystkie inne rodziny, w których należało zidentyfikować nosicielstwo genu choroby poddano analizie sprzężeń locus choroby z polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) genomowego DNA, stosując cztery wewnętrzne i dwie zewnątrzgenowe sondy polimorficzne. Badanie to ma na celu ustalenie haplotypu markerowego choroby czyli zestawu alleli sprzężonych z chorobą w danej rodzinie.

Zastosowanie 4-6 polimorficznych sond w analizie DNA u 11 rodzin dziedziczących chorobę po matce, ujawniło istnienie trzech informatywnych rodzin dla trzech sond, trzech informatywnych rodzin dla dwu sond oraz trzech informatywnych rodzin dla jednej sondy. Dla dwu rodzin wszystkie przebadane sondy okazały się

nieinformatywne.

Oznawiane wyżej sondy polimorficzne użyte także w badaniach rodzin ze świeżymi mutacjami genu DMD w celu wyjaśnienia przyczyn powstania uszkodzeń genu. Dotychczasowe badania wykazały, że w przypadku dwu rodzin nowa mutacja była prawdopodobnie wynikiem rekombinacji międzychromosomalnej. W jednej z tych rodzin ujawniono ponadto delecję zlokalizowaną w rejonie objętym crossing over.

Prezentowane powyżej wyniki badań nie stanowią jeszcze zamkniętej całości. Planuje się zwiększenie zestawu polimorficznych sond tak, aby dla każdej rodziny można było ustalić haplotyp markerowy choroby przy pomocy co najmniej trzech informatywnych sond. Zwiększy to poprawność wnioskowania przy ustalaniu nosicielstwa choroby w rodzinie oraz identyfikacji uszkodzeń genu DMD w komórkach kosmówki w planowanych badaniach prenatalnych.

4. ANALIZA DNA W DYSTROFII MIĘŚNIOWEJ DUCHENNE'A I BECKERA

P. Bieganowski¹, J. Zimowski¹, I. Hausmanowa-Petrusewicz², E. Fidziańska¹, J. Zaremba¹, I. Wald¹

¹ Zakład Genetyki, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

² Zespół Diagnostyki i Terapii Chorób Nerwowo-Mięśniowych przy Centrum Medycyny Doświadczalnej PAN, Warszawa

Dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a (DMD) i Beckera (BMD) jest genetycznie uwarunkowaną chorobą sprzężoną z chromosomem X. Częstość występowania DMD wynosi 1:3000 żywo urodzonych dzieci płci męskiej; BMD występuje znacznie rzadziej.

Jest to ciężka postępująca choroba mięśni charakteryzująca się stopniowym osłabieniem siły mięśniowej i zanikiem mięśni.

W części przypadków występuje upośledzenie umysłowe, zazwyczaj lekkiego stopnia. Średni czas przeżycia osób dotkniętych DMD wynosi 18 lat. Przebieg BMD jest dużo dłuższy a czas przeżycia dużo dłuższy.

Gen DMD/BMD znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu X w miejscu Xp21; jego produktem jest białko dystrofina. Gen dystrofiny jest największym znanym genem u człowieka. W latach osiemdziesiątych udało się ustalić, że duża część mutacji (ok. 80%) polega na występowaniu delecji w obrębie genu dystrofiny. Badania molekularne w DMD/BMD polegają na:

- 1/ wykrywaniu sprzeczności pomiędzy genem choroby i polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych,
- 2/ wykrywaniu delecji w obrębie genu dystrofiny.

Materiał i metody

Krew pobierano od chorych z DMD/BMD i członków ich rodzin. DNA izolowano z limfocytów krwi obwodowej 56 pacjentów z 55 rodzin wg Maniatisa i wsp., 1982 (SDS, proteinaza K, fenol, chloroform). DNA trawiono odpowiednimi endonukleazami restrykcyjnymi przez noc stosując ilości enzymu i buforu zalecane przez producentów restryktaz. Fragmenty restrykcyjne rozdzielano elektroforetycznie na żelu agarozowym w buforze TBE (Tris, boran, EDTA) przez kilkanaście godzin w temperaturze pokojowej. Następnie fragmenty DNA przenoszono z agarozy na filtry Hybond N i C (Southern blot) i wykonywano prehybryzację i hybryzację ze znakowanymi ³²P sondami. Stosowano następujące sondy cDNA i genomowe: Cf23a, Cf 50a, 4-5a, pEXT 87-1, pERT 87-8, pERT 87-30, pERT 87-15, XJ 2.3, JBir, L 782. Hybryzację prowadzono w 85°

przez noc wg Maniatisa i wsp. (1982).

Wyniki

Przy pomocy sondy Cf23a (PstI) przebadano 25 chorych dotkniętych DMD/BMD, wykrywając 8 delecji. Przy pomocy sondy Cf50a (PstI) zastosowanej u 24 chorych wykryto 10 przypadków delecji. Sonda 4-5a (Hind III) nie ujawniła delecji u żadnego z 35 badanych chorych (Tabela I).

Ponadto badano matki chorych chłopców w celu ustalenia, które sondy wewnętrzgenowe, wykrywające fragmenty polimorficzne dają obraz heterozygotyczny, umożliwiając rozróżnienie obu chromosomów X. Wyniki tych badań przedstawia Tabela II. Używając 8 sond przebadano kilkadziesiąt kobiet. W pełni informatywne wyniki otrzymano u 29 kobiet. Wyniki te umożliwiają badania prenatalne w oparciu o RFLP. W 3 rodzinach wykryto układy heterozygotyczne trzema sondami, w 10 rodzinach dwiema sondami; w 7 rodzinach wykryto równocześnie delecję i układy heterozygotyczne. Łącznie w związku z wykryciem delecji u chorych i stwierdzeniem polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych u matek badanie prenatalne można zaproponować 35 rodzinom. Do tej pory diagnozę prenatalną wykonano u 3 kobiet.

Analiza RFLP w rodzinach pozwoliła ponadto na wykluczenie nosicielstwa u 2 siostr chłopców chorych na DMD/BMD. Dwie inne kobiety okazały się być nosicielkami.

Tabela I.

Sonda/restryktaza	Liczba badanych chorych	Liczba chorych z wykrytymi delecjami
Cf 23a/Pst I	28	8
Cf 50a/Pst I	34	10
4-5a/Hind III	35	0

Liczba chorych z wykrytą delecją - 13 (u 3 chorych delecje wykryto dwiema sondami: Cf 23a i Cf 50a).

Tabela II. Liczba heterozygot wśród kobiet badanych sondami wewnątrzgenowymi.

Sonda/restryktaza	Liczba badanych matek	Liczba matek z informatywnym RFLP
Cf 50a/Pst I	28	8
JB1r/Bam H I	36	13
pERT 87-1/Xmn I	37	8
pERT 87-8/Taq I	13	7
pERT 87-30/Bgl II	2	0
pERT 87-15/Bam H I	20	2
pERT 87-15/Xmn I	15	3
XJ 2.3/Taq I	15	5
L 782/Eco RI	15	3

(Heterozygoty RFLP łącznie - 29)

5. ANALIZA DNA W FENYLOKETONURII

J. Jaruzelska, Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

W 1983 roku sklonowano cDNA hydroksylazy fenyloalaninowej (pHPAH247) (Woo i wsp.) zawierający wszystkie sekwencje kodujące genu. Stosując to cDNA jako sondę hybrydacyjną w technice Southerna stwierdzono bogaty polimorfizm locus hydroksylazy fenyloalaniny (PAH). Analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) zastosowano w prenatalnym diagnozowaniu PKU oraz w określeniu nosicielstwa. W badanych rodzinach, w których wystąpiła fenylketonuria w ponad 90% przypadków analiza RFLP jest w pełni informatywna tzn. u każdego członka rodziny jest możliwe odróżnienie allelu prawidłowego i nieprawidłowego. Rejestr prowadzony w Instytucie Pediatrii w Poznaniu obejmuje ponad 100 rodzin z fenylketonurią. U 44 rodzin zawartych w rejestrze przeprowadzono analizę RFLP DNA określając w ten sposób, czy zdrowe dziecko jest nosicielem nieprawidłowego genu.

W rodzinach tych określono również tzw. haplotypy RFLP locus PAH. W nieprawidłowych allelach najczęściej (83%) występuje haplotyp 2 (nosicielstwo wg Woo). U chorych dzieci, będących homozygotami lub heterozygotami w odniesieniu do haplotypu 2, przeprowadzono amplifikację *in vitro* 12. eksonu genu PAH na podstawie kropli krwi chorego pobranej na bibułę Whatmana. Amplifikowany DNA hybrydowano następnie z syntetyzowanymi chemicznie krótkimi sondami DNA - komplementarnymi do prawidłowego miejsca w genie oraz do miejsca zawierającego mutację punktową w ściśle określonym kodonie (hybrydacja ASO - allele specific oligonucleotide). We wszystkich badanych przypadkach haplotyp 2 był sprzężony z mutacją w kodonie 408, podobnie jak w większości innych europejskich populacji. W podobny sposób przeprowadzono

analiza nieprawiłowych alleli PAF o haplocybie 2 stwierdzając podobieństwo występujące w sekwencji DNA granicznej 18bp alteleu, podobnie jak w innych europejskich populacjach. Określenie nieobecności przy zastosowaniu hybrydizacji RFLP nie wyłącza badania rodzinnego oraz pozwala na stwierdzenie nieobecności nieprawidłowego genu PAF w rodzinach, w których nie wystąpiła inwazyjność.

6. ANALIZA DNA W KRZYWICY HIPOFOSFATEMICZNEJ

E. Popowska¹, J. Popowski¹, K. Krajewska-Walasek², E. Włoczarek¹,
E. Pronicka³

¹ Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej CZD, Warszawa

² Poradnia Genetyczna CZD, Warszawa

³ Zespół d/s Chorób Metabolicznych CZD, Warszawa

Rodzinna krzywica hipofosfatemiczna (HPDR) przekazywana jest w sposób dominujący sprzężony z chromosomem X. Objawy choroby związane są z wybiórczym obniżeniem resorpcji zwrotnej fosforanów w kanalikach nerkowych, co wynika z defektu genu HPDR kodującego, prawdopodobnie, specyficzne dla fosforanów białko nośnikowe. Sekwencja i struktura genu jest nieznana, lecz wiadomo, że jest on zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu X w rejonie p22.3-p21.3 i że jest sprzężony ze znanymi sąsiadami genowymi p99.6 (DKS41) i pD₂ (DKS42).

W Centrum Zdrowia Dziecka podjęto badania przydatności obu sond genowych do ustalenia haplotypu markerowego krzywicy hipofosfatemicznej w rodzinie, a następnie zastosowania do wczesnego rozpoznania choroby u następnego dziecka we wczesnym niemowlęc-

twie przed ujawnieniem się zmian biochemicznych i radiologicznych.

Badaniami objęto 36 rodzin posiadających jedno lub dwoje dzieci z objawami krzywicy hipofosfatemicznej. W 18 rodzinach (44% badanych rodzin) choroba dzieci została odziedziczona od matek, u których obserwowano ciężkie objawy krzywicy hipofosfatemicznej (11 matek) lub jedynie izolowaną hipofosfatazję (5 matek). W 12 rodzinach przebadanych przy użyciu jednej lub obu sond polimerazycznych stwierdzono 4 rodziny informatywne dla sondy p99.6i, 4 rodziny informatywne dla sondy pD₂ oraz 1 rodzinę informatywną dla obu sond (łącznie 9 rodzin informatywnych, co stanowi 75%). Trzy rodziny nieinformatywne dla żadnej z wyżej wymienionych sond poddano dalszym badaniom diagnostycznym, stosując cztery inne sondy zlokalizowane na krótkim ramieniu chromosomu X: p754, XJ2.3, pERT87-1 i pERT 87-15.

W 7 rodzinach (20% badanych rodzin) chore córki odziedziczyły uszkodzony gen HPDR od swych ojców. Badania genetyczne ograniczono w tych przypadkach do analizy chromosomalnego DNA ojca i córki. Analiza DNA ojca pozwoliła na poznanie haplotypu markerowego choroby, natomiast analiza DNA córki pozwoliła na wykazanie, która z badanych sond będzie przydatna w poradnictwie genetycznym dla przyszłych rodzin chorych dziewcząt.

W 13 spośród badanych 36 rodzin (36%) wywiad genetyczny oraz badania biochemiczne i radiologiczne nie wskazywały na istnienie choroby u rodziców lub dziadków chorych dzieci. Należy przypuszczać, że we wszystkich tych przypadkach choroba jest wynikiem świeżej mutacji w genie HPDR.

7. WYKORZYSTANIE SOND MOLEKULARNYCH GENU TYREOGLOBULINOWEGO I TYREOPEROKSYDAZOWEGO W BADANIACH PATOGENEZY WRODZONYCH DEFECTÓW SYNTEZY HORMONÓW TARCZYCY

K. Łacka, M. Gembicki, J. Kosowicz

Klinika Endokrynologii, Instytut Chorób Wewnętrznych AM,
Poznań

Genetycznie uwarunkowane zaburzenia gruczołów wydzielania wewnętrznego dziedziczone są najczęściej jako choroby jednogennego, autosomalne i recesywne. Przykładem jest tutaj wrodzona niedoczynność tarczycy ze współistniejącym wolem. Szacunkowa częstość występowania wrodzonej niedoczynności tarczycy wynosi jeden na 3000 urodzeń. Choroba prowadzi do znacznego stopnia upośledzenia umysłowego i fizycznego, a ile zaraz po urodzeniu nie rozpocznie się leczenia substytucyjnego hormonami tarczycy. Stąd bardzo istotne z punktu widzenia klinicznego i społecznego jest szybkie i możliwie wczesne rozpoznanie tego schorzenia. Jedną z przyczyn wrodzonej niedoczynności tarczycy są zaburzenia biosyntezy hormonów tarczycy będące wynikiem częściowego lub całkowitego uszkodzenia utylizacji jodków w obrębie gruczołu. Wbudowywanie jodków do reszty tyrozylowych tyreoglobuliny zależne jest od czterech czynników: tyreoperoksydazy (TPO), H_2O_2 , tyreoglobuliny (Tg) i jodków. Poznanie sekwencji genu Tg (Brocas et al., 1982) oraz genu TPO (Libert et al., 1987) jak też ich sklonowanie umożliwiło badania zmian w obrębie ich struktury. Głównym celem naszych badań jest analiza DNA oraz RNA we wrodzonej niedoczynności tarczycy przy pomocy sond genu tyreoglobulinowego (Tg) oraz genu tyreoperoksydazowego (TPO). Plan badań obejmuje:

a/ analiza DNA

- ocenę ilości kopii DNA w wybranych grupach chorych z zastosowaniem techniki hybrydyzacji "Dot blot"
- ocenę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) DNA w regionie genu Tg i TPO
- ocenę linkage disequilibrium

b/ analizę RNA - ocenę ilości kopii, poziomu RNA oraz jego rozmieszczenie w komórkach patologicznych.

Użyto sondy radioaktywne 5 fragmentów restrykcyjnych Pst I plazmidu pBR 322 zawierających sklonowany, normalny ludzki gen Tg oraz fragment restrykcyjny Eco RI plazmidu pBS zawierający sklonowany, ludzki gen TPO.

Dna i RNA izolowano odpowiednio z krwi i tkanki tarczycowej pacjentów z wrodzonymi defektami syntezy hormonów tarczycy. Obecnie przedstawiamy wyniki części badań przeprowadzonych w naszej Klinice, a obejmujące ocenę RFLP w regionie genu Tg.

W piśmiennictwie światowym opisano dotychczas 6 takich polimorfizmów. W naszym materiale klinicznym obejmującym 63 pacjentów z wrodzoną niedoczynnością tarczycy oraz rodzinnym wolem obojętnym obserwowano RFLP dla następujących enzymów: Taq I, Pvu II, Msp I, Hind III. Częstość ich występowania wynosiła odpowiednio: 4%, 8%, 26%, 12%.

Ponadto w trakcie badań przesiewowych przeprowadzonych u chorych z różnymi chorobami tarczycy znaleziono nowy - dotychczas nieopisany fragment restrykcyjny Msp I genu Tg o wielkości 3.5 i 2.5 kb, którego częstotliwość badana w grupie 32 niespokrewnionych osób zdrowych populacji polskiej wynosiła 0.628 i 0.472.

Celem obecnego etapu badań jest skrining genetyczny większej liczby pacjentów z defektami syntezy hormonów tarczycy i

ich rodzin dla potwierdzenia ewentualnego związku między występowaniem i stopniem nasilenia klinicznych objawów tego schorzenia a obecnością w DNA nietypowego fragmentu restrykcyjnego genu Tg.

6. DEREGLACJA GENU 17-1A W LINIACH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH Z RAKA

TRZUSTKI U CZŁOWIEKA

Dorota Poluha, Jacek Wojcierowski

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Patologii Klinicznej AM,
Lwów

Wykryty przez grupę badawczą prof. Kopróskiego neoantygen komórek raków trzustki, żołądka i jelita grubego rozpoznawany przez monoklonalne przeciwciała GA 733 i 17-1A pełni w chwili obecnej ważną rolę markera w diagnostyce i "tarczy" w próbach terapii immunologicznej tych nowotworów. Znana w obecnej chwili sekwencja cDNA i DNA genu neoantygeny pozwala na przypuszczenia co do jego roli jako receptora nieznanego czynnika wzrostu i różnicowania (Linnenbach, Wojcierowski i wsp.). Gdyby przypuszczenia te były prawdziwe, stosowanie terapeutyczne przynajmniej pewnych przeciwciał monoklonalnych byłoby obarczone pewnym ryzykiem. W chwili obecnej nie jest znana przyczyna gwałtownej ekspresji genu 17-1A w nowotworach. Badanie heterogenności fragmentów restrykcyjnych genu w komórkach prawidłowych i nowotworowych nie wykazało istnienia rearanżacji i zmian sekwencji (z pewnym zastrzeżeniem - nie przeprowadzono dotychczas badań metodą PCR). Dotychczas nie ustalono też sekwencji promotora genu 17-1A, chociaż można przypuszczać, że punktowe mutacje

wążyłyby być odpowiedzialne za jej nadmierną ekspresję. Klonowanie małych odcinków promotora i UKS genu 17-1A może być niezbędne dla dalszych badań obecności i specyfiki białek jądrowych regulujących transkrypcję motywu "footprinting". Zmiany ilościowe i jakościowe tych białek w jądrach komórek nowotworowych mogą być ważne zarówno z punktu widzenia praktycznego i teoretycznego.

Metody

Izolacja ekstraktu jądrowego.

Komórki linii komórkowej CAPAN 2 zebrane z sześciu płytek płukano buforem PBS, wirowano 10 min, w 4°C przy 2000 obr/min, osad komórek zawieszano w 5 ml buforu A na 10 min. w temp. 4°C i wirowano 10 min. w 4°C. Osad komórek homogenizowano w 2 ml buforu A przez 15 min., a następnie wirowano 10 min. w temp. 4°C przy 2000 obr/min. Uzyskany osad jąder zawieszono w 300 µl lodowatego zimnego buforu C i homogenizowano 5 min. w łaźni lodowej. Lizat wirowano 30 min, w 4°C przy 25000 obr/min., supernatant dializowano 5 godzin do 30 ml buforu D w temp. 4°C. Ekstrakt jądrowy przechowywano w temp. -20°C.

Bufory: A - 10 mM HEPES pH 7,9, 15 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT. D - 20 mM HEPES pH 7,9, 20% glicerol, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 0,1 mM KCl. C - 20 mM HEPES pH 7,9, 25% glicerol, 0,42 NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT.

Reakcja transkrypcji in vitro.

Reakcję transkrypcji in vitro przeprowadzono wg metody Handa używając zestawu odczynników firmy BRL. Matrycą do syntezy RNA była dwuniciowa forma DNA klonu T3 (promotor ludzkiego 17-1A

wbudowany w faga M13mp18, przecięta enzymem restrykcyjnym EcoR I. Mieszanina reakcyjna zawierała 15 µl ekstraktu jądrowego komórek HeLa, 15 µl ekstraktu jądrowego kom. CAPAN 2, 5 µg DNA klonu T3 ciętego restryktazą EcoR I, 0,14 mM EDTA, 1 mM fosforanu kreatyniny, 1 mM ATP, 1 mM GTP, 1 mM CTP, 5 µl ³²P α UTP. Mieszaninę inkubowano w temp. 30°C. Próbki zbierano po 3, 15, 45 minutach trwania reakcji, o objętości 15 µl każda i dopełniano do obj. 70 µl buforem USE (8M mocznik, 0,5% SDS, 10 mM EDTA pH 8,0), frakcje poddawano ekstrakcji równą obj. fenolu z chloroformem oraz chloroformem. Fazę wodną strącano 3 vol. 99% etanolu (2 godz. w -20°C). Osad rozpuszczano w 3 µl buforu USE, dodawano 3 µl buforu ddSTOP (90% formamid, 0,1% Xylene cyanol, 0,1% błękit bromoianolowy) i po 3 minutowej denaturacji w 60°C poddano elektroforezie w żelu sekwencyjnym (7M mocznik, 7% akrylamid).

Wyniki

Analiza komputerowa sekwencji badanego odcinka DNA pozwoliła ustalić obecność elementów charakterystycznych dla promotorów i funkcjonalnych URS, jak np. region TATA, CAAT i inne. Pozwoliło to na założenie, że badany odcinek DNA flankujący gen 17-1A od strony 5' pełni rzeczywiście rolę regulatora i promotora transkrypcji.

Celem udowodnienia tej tezy konieczne było jednak przeprowadzenie in vitro reakcji transkrypcji na matrycy regulowanej badanym fragmentem DNA zwłaszcza w obecności ekstraktów jądrowych komórek wykazujących wysoki poziom ekspresji genu 17-1A.

Jako matrycy użyto formy RF klonu T3 (M13) zliniowanej enzymem restrykcyjnym EcoR I tuż poza URS, promotorem i leaderem genu

17-1A o łącznej długości ok. 2200 par zasad oraz sekwencję faga M13mp18 o długości 7250 par zasad. Stosowano ekstrakty jądrowe komórek wykazujących silną ekspresję mRNA genu 17-1A (linia komórkowa CAPAN-2 raka trzustki) w obecności uzupełniającego ekstraktu jądrowego komórek HeLa (preparat komercyjny firmy BRL).

Jako system kontrolny stosowano dwuniciowy DNA faga M13mp18 przecięty enzymem EcoR I w obecności ekstraktu jądrowego komórek HeLa (bez ekstraktu z komórek CAPAN 2). Stwierdzono, że w opisanym systemie reakcji in vitro uzyskuje się szereg transkryptów o różnej masie cząsteczkowej, przy minimalnej syntezie w systemie kontrolnym. Występowała też wyraźna zależność ilości produktów od czasu trwania reakcji transkrypcji (obserwowanej w czasie od 15 do 45 minut).

Porównano również efektywność w reakcji in vitro ekstraktu jądrowego komórek CAPAN 2 (w których ekspresja genu 17-1A jest kilkaset razy wyższa niż w komórkach prawidłowych) z efektywnością niespecyficznego ekstraktu z jąder komórkowych limfocytów ludzi chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną (ekstrakt był preparowany w naszej pracowni identycznie jak ekstrakt jądrowy komórek CAPAN 2). Transkrypcja DNA klonu T3 pod wpływem białek jądrowych komórek raka trzustki była kilkakrotnie silniejsza niż pod wpływem ekstraktu jądrowego z komórek białaczkowych.

Literatura

- A. Linnenbach, W. Wojciorowski, S. Wu, J. Pyrc, B. Dietzchold, D. Speicher, H. Koprowski, 1989, PNAS USA vol. 86, str. 27.
H. Handa, R. Kaufmann, J. Manley, M. Seftor, P. Sharp, 1981, J. BC. vol 256, str. 478.

9. ANALIZA DNA W MUKOWISCYDOZIE

J. Bai, D. Maciejko, A. Szpocht-Polocka, T. Mazurczak

Pracownia Genetyki Molekularnej, Zakład Genetyki, Instytut

Matki i Dziecka, Warszawa

Mukowiscydoza (CF)* jest chorobą uwarunkowaną genetycznie, dziedziczącą się jako cecha monogenowa autosomalna recesywna. Występuje z częstością 1 na 2300 żywo urodzonych dzieci. Gen CF znajduje się na chromosomie 7.

Analizę DNA w rodzinach ryzyka rozpoczęliśmy w Zakładzie Genetyki Instytutu Matki i Dziecka jesienią 1987 roku. Do chwili obecnej przebadano 80 rodzin ryzyka, w których byli żyjący proband dotknięty CF i które wyraziły chęć poddania się badaniu. CF rozpoznawano na podstawie obrazu klinicznego i podwyższonego stężenia chlorków w pocie w kilkakrotnie powtórzonym teście. Używane w pracy sondy molekularne przedstawiono w Tabeli 1. Stosowano standardowe metody otrzymywania i analizy DNA. W 54 (68%) rodzinach otrzymano wyniki całkowicie informatywne pozwalające na określenie, z którym chromosomem matki i ojca przekazywany jest zmutowany gen. Rodzinom tym można zaoferować wczesną diagnostykę prenatalną. W 6 (10%) rodzinach otrzymano wyniki częściowo informatywne, pozwalające na identyfikację chromosomu zawierającego gen choroby tylko u jednego z rodziców, pomimo badania od 7 do 10 różnych miejsc polimorficznych.

W 35 z badanych rodzin analizę DNA przeprowadzono u potomstwa nie wykazującego objawów choroby.

Nosicielstwo genu CF stwierdzono u 32 (71,1%) na 45 badanych dzieci. Wśród nosicieli genu CF było 21 chłopców i 11 dziewczy-

* CF - cystic fibrosis = mukowiscydoza

tek.

Tabela 1. Używane sondy molekularne i badane polimorfizmy DNA w diagnostyce mukowiscydozy.

Locus	Sonda	Enzyma restrykcyjny	RFLP kb	Źródło otrzymania sondy
D7S16	7C22	EcoRI	7.2/5.1	B. Williamson
MET	met5	MspI	16.0/8.0	B. F. Vande Woude
MET	met5	TaqI	3.2/1.8	B. F. Vande Woude
MET	aeth	TaqI	7.0/4.2	B. F. Vande Woude
MET	metD	TaqI	5.0/4.0	B. F. Vande Woude
MET	metD	BanI	7.6/6.8	B. F. Vande Woude
D7S122	W3D1.4	Hind III	20.0/10.0	L.-C. Tsui
D7S122	E6	TaqI	4.4/3.6	L.-C. Tsui
D7S23	XV2C	TaqI	2.1/1.4	B. Williamson
D7S23	KM19	PstI	7.8/6.6	B. Williamson
D7S398	D9	MspI	13/8.5+4.5	X. Estivill
D7S8	J3.11	MspI	4.2/1.8	B. Williamson

10. WYKORZYSTANIE SOND DNA SWOISTYCH DLA CHROMOSOMU Y W

DIAGNOSTYCE ZABURZEŃ ROZWOJU CIELESNO-PĘCIOWEGO.

L. Jakubowski, B. Kałużewski

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Endokrynologii, Akademia Medyczna, Łódź

Stosując sondy DNA swoiste dla chromosomu Y człowieka

pDP61 (DXYS8); 90Z2; pDP34 (DXYS3); pDP37 (DYZ3); 491; H1A (DXS31); lambda-CYI; pY432-H1nfA (DYZ2) badano chorych z zaburzeniami rozwoju cielesno-płciowego w powiązaniu z aberracjami tego chromosomu. Porównując pacjentów o różnych cechach somatycznych lecz z podobnymi rozpoznaniami cytogenetycznymi wykazano, że różnice kliniczne można wiązać z mikrodelecjami chromosomu Y nieuciłowymi przy użyciu technik cytogenetycznych. Mikrodelecje te mogą też wpływać na destabilizację struktury chromosomu Y przede wszystkim w przypadkach Ynf (chromosom Y niefluoryzujący). Stwierdzono także różnice ilościowe w zawartości DNA poszczególnych fragmentów chromosomu Y porównując rozdziały elektroforetyczne podobnych ilości DNA w próbach pochodzących od wybranych pacjentów z jednakowymi rozpoznaniami cytogenetycznymi lecz różnymi cechami klinicznymi. Badania u hermafrodyty prawdziwego z kariotypem 45, X/46, XX/46, X, mar/47, XX, mar poza uzyskaniem dowodu, że chromosom markerowy jest pochodną chromosomu Y, pozwalają także na wykazanie znacznych odrębności w strukturze DNA w porównaniu z innymi typami zaburzeń rozwoju cielesno-płciowego. Odrębności takie w porównaniu z osobami zdrowymi stwierdzono także u ojca pacjenta.

Wykazano również, że badania DNA stanowią jedyną możliwość identyfikacji markerów pochodzących z chromosomu Y przy zbyt małej dla tego celu rozdzielczości metod cytogenetycznych. Ma to znaczenie praktyczne szczególnie w przypadkach dysgenезji gonad z wysokim ryzykiem transformacji nowotworowej dysgenetycznej gonady. Badania takie są prowadzone także celem rozpoznania lub wykluczenia translokacji małych fragmentów chromosomu Y na inne chromosomy.

11. ANALIZA DNA W ZABURZENIACH ROZWOJU CIELESNO-PŁCIOWEGO

M. Kotecki, J. Jaruzelska

Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Aberracje chromosomowe płci są częstą przyczyną nieprawidłowości rozwoju cielesno-płciowego. Do stosunkowo częstych należą kariotypy mozaikowe, zawierające linie komórkowe 45, X i linie z aberracją chromosomu Y. U pacjentów tych wykazano różne zaburzenia rozwojowe w zakresie zewnętrznych i wewnętrznych cech płciowych, przy czym stwierdza się u nich obecność jajników, gonad dysgenetycznych, obojnaczych lub jąder. Ponieważ obecność DNA chromosomu Y u osobników mozaikowych powoduje podwyższenie ryzyka wystąpienia nowotworu typu gonadoblastoma lub dysgerminoma, zachodzi konieczność stosowania dokładnych metod identyfikacji DNA chromosomu Y. Klasyczne metody cytogenetyczne, oparte na analizie prążków chromosomowych są często nie wystarczające, stąd ostatnio stosuje się metody hybrydyzacji kwasów nukleinowych z chromosomowo swoistymi sondami molekularnymi.

Badania hybrydyzacyjne DNA dają także możliwość określenia zakresu delecji i ewentualnej współistniejącej inwersji oraz duplikacji submikroskopowego fragmentu chromosomu. Zastosowanie sond molekularnych do hybrydyzacji in situ z chromosomami metafazowymi pozwala na wykrycie translokacji bardzo małych fragmentów, bądź innych rearanżacji chromosomowych.

Dotychczas przeprowadzono analizę DNA chromosomu Y, określając zakres delecji, u 9 pacjentów z zaburzeniami determinacji płci. Dalsze przypadki są w trakcie badania. Prowadzenie i rozwijanie tego typu badań diagnostycznych wydaje się mieć wysoką wartość kliniczną, ponieważ mogą być one pomocne w podejmowaniu decyzji co do kierunku terapii korekcyjnej płci. Badania te mogą

też dostarczyć oryginalnych danych na temat mapowania poszczególnych loci oraz ich znaczenia w patogenezie zaburzeń genetycznej determinacji płci.

12. SZYBKA METODA DETEKcji DNA CHROMOSOMU Y PRZY UŻYCIU REAKCJI ŁAŃCUCHOWEJ Z POLIMERAZĄ

Michał Witt

Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Opracowano szybką i prostą metodę diagnozy płci opartą na detekcji sekwencji powtarzalnych alfa (alphoid repeats), charakterystycznych dla centromeru chromosomu Y. W teście tym źródłem DNA może być krew świeża lub wysuszone plamy krwi. Ponieważ detekcji dokonuje się przy użyciu reakcji łańcuchowej z polimerazą (PCR)*, DNA nie musi być ani oczyszczany, ani trawiony enzymami restrykcyjnymi. Gdy jako matryca dla reakcji użyty został DNA osobników płci żeńskiej, tylko fragment o długości 130 par zasad, swoisty dla chromosomu X, ulegał amplifikacji (kontrola). W analogicznym doświadczeniu z DNA osobników płci męskiej, amplifikacji ulegały dwa fragmenty, diagnostyczny - zawierający 170 par zasad (chromosom Y) i kontrolny - zawierający 130 par zasad (chromosom X). DNA chromosomu Y można wykryć tą metodą w wysuszonych plamach odpowiadających 5 µl krwi, przechowywanych uprzednio nawet w ciągu wielu lat w temperaturze pokojowej. Jej czułość można zwiększyć hybrydując radioaktywną sondę z produktami PCR. Metoda znajduje zastosowanie w diagnos-

* Polymerase chain reaction

tyce klinicznej i medycynie sądowej.

13. SUPERNUMERARY MARKER CHROMOSOMES; PRESENTATION OF TEN NEW CASES. A PRACTICAL APPROACH

B. Kałużewski¹, S.W. Burkholder², W.G. Coutinho², M. Dębicz-Rychter², M. Skorski², L. Corridori², C.E. Anderson², L.G. Jackson²

¹ Department of Medical Genetics, Institute of Endocrinology Medical Academy of Łódź, Poland

² Division of Medical Genetics, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA

In a period of twenty seven months, among 6857 patients submitted for the chromosomal evaluation 14 cases with supernumerary marker chromosomes (SMCH) were recorded. Ten representative cases are presented in detail. The G/G, Q/Q, NOR, DA/DAPI, CA₃/DA, RHG, RBG and MIX-BHG (MIX synchronization-BrdU-Hoechst-Giemsa) techniques were used to evaluate the origin and activity or inactivity of the SMCH in question.

In five cases DA/DAPI positive, derived from chromosome 15, RHG positive, bisatellited, SMCH were discovered. The measurements of the SMCH and RHG positive bands were taken. Statistical differences in size were established between SMCH in question. The above was related to the size of central RHG positive bands. The size of the bands in case 1 and 2 was significantly larger than in cases 3, 4 and 5. The differences in the size of R bands were verified with DNA specific probes: phage 15 (D15S4), pMS1-14 (D15S1) and pDP151 (D15S2). The most spectacular result

was obtained with pDP151 probe. The quantitative comparison of the autoradiograms in cases 1 and 4 confirm the observed R band sizes to be a consequence of the presence or absence of 15q13-15q19 region. In our opinion the observed clinical differences between the cases 1 and 4 are related to the presence of the mentioned region.

In nine cases DA/DAPI negative SMCH were discovered. Using sequentially NOR-CBG techniques, bisatellited and heterochromatic constitution of the markers was confirmed in two non-mosaic and four mosaic cases.

In three mosaic, non-satellited, DA/DAPI negative cases positive CBG bands in SMCH were revealed. Using DNA replicating banding techniques genetic inactivity in one and activity in two cases of SMCH in question was documented. The possible practical implications for prenatal prognosis of the risk of abnormality are discussed.

II. OŚRODKI, W KTÓRYCH PROWADZI SIĘ ANALIZY DNA W POLSCE - DANE NA TEMAT PROWADZONYCH BADAŃ I WYPOSAŻENIA

1. Laboratorium DNA, Zakład Genetyki Medycznej,
Kierownik: Dr med. Grzegorz Nowicki
Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289,
93-338 Łódź, tel. 42-29-87, 45-11-83

Laboratorium jest w trakcie organizacji. W chwili obecnej prowadzone są prace na etapie izolacji DNA i stosowania endonukleaz.

2. Pracownia Genetyki Medycznej, Zakład Genetyki
Kierownik: Doc.dr hab.med. Tadeusz Nazurczak
Instytut Matki i Dziecka, ul. Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa
tel. 32-34-51 w. 388, 32-96-57

W Pracowni prowadzone są badania DNA w mukowiscydozie i zespole kruchego X.

Sondy dostępne w laboratorium:

- pDP1007, pDP61, pDP105, pDP34, pDP67, pY431-HinfI,
- do badania zespołu Fra (IO):
- St14, 4D8, 4D8-B, 4D8-IV, U6:2, cX55.7, RN1A, P1factor
- IXO, 5S-E,
- do badania mukowiscydozy:
- E7, pHi31, W3D1.4, EG1.4

3. Pracownia Analizy DNA, Zespół d/s Chorób Metabolicznych,
Kierownik: Prof.dr hab.med. Ewa Proniczka
Centrum Zdrowia Dziecka, Al.Dzieci Polskich 20,
04-738 Warszawa-Miedzylesie, tel. 15-12-70, 15-11-92,

04-736 Warszawa-Międzyłonie, tel. 15-12-70, 15-11-92,
15-74-00, 15-74-94.

W Pracowni wykonuje się badania służące postnatalnemu porad-
nictwu genetycznemu w zakresie rodzinnej krzywicy hipofosfa-
temicznej i dystrofii mięśniowej Duchenne'a.

W Zakładzie Genetyki CZD w trakcie opracowywania jest izolacja
DNA z trofoblastu.

W przyszłości głównym tematem badań będą nadal choroby
zlokalizowane na chromosomie X. Przewiduje się wprowadzenie
diagnostyki DNA m.in. w incontinentia pigmenti, deficycie
OTC; ewentualnie w hemofilii, hipomagnezemia rodzinnej i
niedoczynności przytarczyc.

Sondy dostępne w laboratorium:

sondy z krótkiego ramienia chromosomu X:

RCS, p99-6, pDE, L754, pXG-20, pA13RT, pAX-7, pB-24, JBir,
PERT87-30, PERT87-15, PERT87-8, PERT87-1, p dic56, pOTC,
pS8-1, pXJ1.1N, pXJ 1.2, pXJ 2.3, pXJ 5.1, pXJ 10.1,
cDMD 1-2a, cDMD 2b-3, cDMD 4-5a, cDMD 5b-7, cDMD 8,
cDMD 9-14.

4. Pracownia DNA, Zakład Genetyki

Kierownik: Prof.dr hab.med. Ignacy Wald

Instytut Psychiatrii i Neurologii, Al.Sobieskiego 1/9,
02-057 Warszawa, tel. 42-76-50, 642-66-11 w. 310

W planach: 1/ dalsze badania dystrofii mięśniowej
Duchenne'a i Beckera; próba korelacji pomiędzy stwierdzonymi
mutacjami a obrazem klinicznym. Wykrywanie nosicielstwa w
rodzinach,

badania cytogenetyczne i analiza DNA w wybranych rodzinach.

Sondy dostępne w laboratorium:

do badania choroby Duchenne'a i Beckera:

cDNA: Cf 27, Cf 23a, Cf 36a, Ca1a,

wewnątrzgenowe:

XJ 1.1, XJ 2.3, pERT 87-1, pERT 87-8, pERT 87-15, JBir,
p20,

sprzężone:

L1.28, 754, 754.1f, pERT 84-10, J-68, C-7, B 24, 99-6,
D-2, RCS, 782,

do badania zespołu Fra (X):

cX 55.7, cX' 33.2, RMI, U6.2, F9 VIII, F9OX 13, St 14 FVIII.

5. Zakład Genetyki Człowieka PAN

Kierownik: Prof.dr hab.med. Jerzy Nowicki

ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, tel. 233-235, 233-011

W pracowni prowadzone są badania: 1/ analiza DNA w
fenyloketonurii, 2/ analiza DNA w zaburzeniach rozwoju
cielesno-płciowego, 3/ stosowanie szybkiej metody diagnozo-
wania płci opartej na detekcji sekwencji chromosomu Y.

Sondy dostępne w laboratorium:

362a, 602, pDP1007, FR 80-II, 47z, pDP61, GMGY7a, GMGY7c,
GMGY7d, 52d b, 52d c, 50f2a, 50f2b, GMGY7b, GMGY7d',
pDP105a, Fr 35-II, pDP94, 50f2d, pDP97, pDP105b, 52da, Fr
25-II, 50f2e, Fr 15-II, 50f2c, 40f, pY431, Y97, 4D8, ST14,
FIX, cX55.7, DR31, DQa, XV-2c, KM19.

22 -

6. Pracownia Genetyki Endokrynologicznej, Klinika Endokrynologii

Kierownik: Prof. dr hab. med. Maciej Gembricki

Instytut Choroób Wewnętrznych AM, ul. Przybyszewskiego 49,
60-355 Poznań, tel. 67-55-14, 67-68-41.

Pracownia Genetyki wyposażona jest w podstawowy sprzęt potrzebny do wykonywania badań analizy DNA. Etapy badań (procesy amplifikacji, transformacji, izolacji mRNA) wymagające bardziej skomplikowanego sprzętu wykonywane są w innych pracowniach genetycznych w Poznaniu (w zakresie badań genu Tg i TPO korzysta się z bazy, jaką dysponuje Zakład Biochemii Biopolimerów przy Uniwersytecie Poznańskim - kierownik prof. dr J. Augustyniak).

Plany pracowni obejmują badania udziału czynników genetycznych w patogenezie chorób tarczycy: wrodzonej niedoczynności tarczycy, wola rodzinnego, wytrzeszczu złośliwego oraz nowotworów tarczycy. Ocena zmian w zakresie genu tyreoglobuliny, tyreoperoksydazy i kalcytoniny dotyczy zarówno analizy DNA jak i RNA.

Sondy dostępne w laboratorium:

- sonda tyreoglobulinowa
- sonda tyreoperoksydazowa.

7. Zakład Genetyki Medycznej

Kierownik: Prof. dr hab. med. Danuta Rozyńska

Instytut Patologii Klinicznej AM, ul. Jaczewskiego 8,
20-090 Lublin, tel. 72-57-93, 201-71 w. 493

Sondy dostępne w laboratorium:

- pBES (ludzki gen rRNA), TCR alfa, TCR gamma, TCR beta,

CD3, Bcl2, TAC, NSF (NSC0), NGF-receptor, NGFbeta2 (118),
PY3.4, v-myc.

8. Zakład Genetyki Medycznej

Kierownik: Doc. dr hab. med. Bogdan Kaluzewski

Instytut Endokrynologii AM, ul. Sterlinga 1/3, 91-425 Łódź
tel. 33-66-30, 36-64-27

W laboratorium prowadzone są badania zaburzeń rozwoju cięlesno-płciowego przy użyciu sond DNA chromosomu Y. Ponadto stosuje się sondy DNA chromosomu 15 w diagnostyce markerów chromosomowych.

Sondy dostępne w laboratorium:

sondy do badania chromosomu Y:

pDP230, pDP61, pDP105, pDP34, pDP97, p431-Minf a,

sondy do badania chromosomu 15:

phage 15, pKSI-14, pDP151.

9. Pracownia DNA, Zakład Patofizjologii AM

Kierownik: Prof. dr hab. med. Józef Jagielski

ul. Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław, tel. 22-49-59

Obecnie pracownia doskonali metody pozyskiwania DNA z różnych źródeł przy użyciu różnorodnych metod ekstrakcji.

W planach praktyczne wdrożenie techniki "DNA fingerprint" i wykorzystanie jej w praktyce jako głównego źródła finansowania działalności pracowni.

Oferta współpracy: pracownia zamierza wykorzystywać sondy DNA dostępne na rynku. Chętnie nawiąże kontakty w celu zakupu dostępnych w kraju sond typu "multi-loci". Zakupi dobrej

jakości sondę komplementarną do DNA z ludzkiego chromosomu Y.
Pozwierz na uzgodnionych warunkach finansowych wykonanie
hybrydyzacji blotów z sondami Jeffreys'a 33.06 i 33.15.

HYBRYDYZACJA IN SITU (ISH) W CYTOGENETYCE

Anna Latos-Bieleńska

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań,

Pracownia Genetyki Medycznej ZPP, Instytut Pediatrii AM, Poznań.

ISH jest metoda, polegająca na lokalizowaniu specyficznych sekwencji DNA lub RNA bezpośrednio w materiale biologicznym (preparat cytogenetyczny, komórki, skrawki tkanki) znajdującym się na szkiełku podstawowym lub, rzadziej, w zawiesinie. W cytogenetyce hybrydyzacja sondy molekularnej następuje do DNA chromosomów mitotycznych lub mejozycznych, uzyskanych standardową metodą, niekiedy także bezpośrednio do DNA jąder interfazowych.

ISH jest procesem wieloetapowym, na który składają się: przygotowanie sondy molekularnej, przygotowanie preparatu cytogenetycznych, hybrydyzacja, usunięcie niespecyficznie związanej sondy, detekcja sondy.

1. Przygotowanie sondy molekularnej

Sonda molekularnym stosowanymi w ISH jest cDNA, fragmenty genomowego DNA, a także syntetyczne oligonukleotydy. W tzw. CISS hybrydyzacji (= chromosomal in situ supression) stosuje się złożone sondy hybrydyzacyjne, stanowiące heterogenną mieszaninę sekwencji komplementarnych dla danego fragmentu chromosomu lub nawet dla całego chromosomu.

Sonda molekularna musi zostać odpowiednio przygotowana, aby mogła być następnie wykryta w miejscu hybrydyzacji. Osiąga się to poprzez wprowadzenie na drodze "nick translation" (Rigby i wsp. 1977) lub "random priming technique" (Feinberg i Vogelstein

1983), nukleotydy radioaktywnych lub modyfikowanych chemicznie. Opisano także zastosowanie PCR (polymerase chain reaction) do znakowania sondy (Lion i Baas, 1986). Sondy niezotopowe mogą być też bezpośrednio znakowane na drodze reakcji chemicznej.

a) sondy radioaktywne

Główną zaletą sond radioaktywnych jest wysoka czułość, umożliwiającą stosowanie do hybrydyzacji samego insertu. Radioizotopem najczęściej stosowanym w ISH jest ³H, którego zaletą jest małe tło, wada natomiast długi okres ekspozycji podczas autoradiografii (1-4 tygodnie). Z tych względów do znakowania sond molekularnych stosuje się niekiedy ¹²⁵I, wówczas autoradiografia trwa krócej, jednak powstaje silniejsze tło, a także większe sygnały na czym traci rozdzielczość metody. Innym radioizotopem stosowanym do znakowania sond molekularnych do ISH jest

³⁵S

Rozdzielczość ISH z zastosowaniem sond radioaktywnych jest jednak ograniczona długością emitowanego promieniowania oraz wielkością ziaren emulsji fotograficznej. W celu zwiększenia rozdzielczości metody, niektórzy autorzy zastosowali do obserwacji sygnałów mikroskop elektronowy (Li i wsp., 1986).

b) sondy modyfikowane chemicznie

W ostatnich latach obserwuje się szerokie stosowanie sond molekularnych modyfikowanych chemicznie. Ich popularność stale wzrasta i wypierają one stopniowo sondy radioaktywne. W przeciwieństwie do sond radioaktywnych, ulegających radiolizie, sondy modyfikowane chemicznie są trwałe. Zaletą sond modyfikowanych

chemicznie jest także, oprócz wyeliminowania izotopów radioaktywnych, wysoka rozdzielczość metody a przez to możliwość precyzyjnego określenia miejsca hybrydyzacji sondy. Oblicza się, że lokalizacja sekwencji przy zastosowaniu sond niezotopowych jest 20-krotnie dokładniejsza w porównaniu z ISH z użyciem sond izotopowych (Lawrence i wsp., 1988). Następną zaletą sond modyfikowanych chemicznie jest możliwość bardzo szybkiej detekcji sondy (2-3 godziny) po przeprowadzonej hybrydyzacji. Ma to szczególne znaczenie w sytuacjach, gdy wynik musi być wydany szybko (diagnostyka prenatalna). Ponadto, można na tym samym preparacie cytogenetycznym prowadzić hybrydyzację in situ równocześnie z kilkoma sondami, z których każda jest znakowana w inny sposób (Mederlof i wsp., 1986). ISH z użyciem sond modyfikowanych chemicznie, była stosowana początkowo do wykrywania sekwencji powtarzalnych i uważano, że nie jest wystarczająco czuła dla detekcji sekwencji "single copy". Ostatnio, dzięki wprowadzeniu wielostapowych reakcji immunocytochemicznych, sondy modyfikowane chemicznie stosuje się z powodzeniem do wykrywania sekwencji występujących w jednej kopii w genomie.

Substancjami stosowanymi do przygotowania sond modyfikowanych chemicznie są biotyna (Langer i wsp., 1981; Pinkel i wsp., 1985; Cherif i wsp., 1989), digoksygenina (Helles i wsp., 1988; Zischler i wsp., 1989), acetylaminofluoreny (Tchen i wsp., 1984; Lardegent i wsp., 1985), BrdU (Frommer i wsp., 1988) i in. Do tej pory najczęściej stosowana była biotyna, jednak obecnie coraz większą popularność zdobywa digoksygenina.

Sondy zawieszają się w mieszaninie hybrydyzacyjnej, zawierającej nośnikowy DNA (lub tRNA), SSCP, siarczan dekstranu, formamid, ew. płyn Denharta. Stężenie sondy w mieszaninie hybrydyzacyjnej i skład mieszaniny hybrydyzacyjnej można modyfikować

W metodzie szkiełka. Zwykle stosuje się 1-20 mg DNA w 2-5 ml mieszaniny hybrydacyjnej na preparat. Formamid i sole zawarte w mieszaninie hybrydacyjnej obniżają temperaturę topnienia DNA. Nosnikowy DNA i płyn Denhardt zapobiegają nieswoistej hybrydacji. Słarczan dekstranu zwiększa efektywność hybrydacji (Wetmur, 1975; Harper i Saunders, 1981) poprzez ułatwienie tworzenia konglomeratów ("sieci" - "network") sondy w miejscu hybrydacji, co wzmacnia sygnał. Bezpośrednio przed nałożeniem na preparat, sondę denaturuje się poprzez ogrzanie w temp. 80-100°C i następnie gwałtownie oziębia.

W CISS hybrydacji, w której stosuje się zlożone sondy, zawierające heterogenną mieszaninę sekwencji "single copy" oraz sekwencji średnio i wysoko powtarzalnych, konieczna jest nieco odmienna strategia, mająca na celu zapobieżenie nieswoistemu wiązaniu się sondy do wielu chromosomów, co jest spowodowane występowaniem sekwencji wysoko powtarzalnych w wielu miejscach w genomie. Do sondy dodaje się całkowity ludzki DNA i, po denaturacji sondy, pozwala na hybrydację sekwencji wysoko powtarzalnych jeszcze w probówce. Dopiero po tym wstępnym etapie nakłada się sondę hybrydacyjną na preparat cytogenetyczny (Lichter i wsp., 1988).

2. Przygotowanie preparatów cytogenetycznych

Preparaty cytogenetyczne do ISH są sporządzane zasadniczo w zwykły sposób, należy jednak podkreślić, że muszą one być bardzo dobrej jakości. Z tych względów do uzyskania preparatów cytogenetycznych dla ISH najczęściej stosuje się hodowlę limfocytów. Korzystnie jest hodowlę limfocytów zsynchronizować dla uzyskania wysokiego indeksu mitotycznego.

Sposób przygotowania szkiełek podstawowych ma wpływ na stopień niespecyficznego wiązania sondy. Niektórzy autorzy powlekają szkiełka podstawowe substancjami mającymi wyeliminować nieswoiste wiązanie sondy (Brahic i Haase, 1978; Gerhard i wsp., 1981), zasadniczo jednak wystarcza wytrawienie szkiełek podstawowych w chromiance.

Przed ISH (metoda ISH wg Harper i Saunders, 1981) preparaty cytogenetyczne trawi się RNazą, która usuwa RNA mogący konkurować z sondą o miejsce na chromosomie i hybrydować z sondą powodując tło. Po trawieniu RNazą preparaty cytogenetyczne płucz się w 2xSSC i przeprowadza przez wzrastający szereg alkoholi. Niektórzy autorzy trawia preparaty cytogenetyczne także proteinazą K (Pinkel i wsp., 1986).

Przed nałożeniem sondy hybrydacyjnej należy zdenaturować chromosomowy DNA. Do denaturacji stosuje się 70% formamid (temp. 70°C [Szabo i wsp. 1977] lub 0,07 N NaOH (temp. pokojowa) [Henderson i wsp., 1972]. Dla sekwencji powtarzalnych zaleca się 0,2 N HCl, który wprowadzie denaturuje chromosomowy DNA w mniejszym stopniu, jednak pozwala zachować bardzo dobrą strukturę chromosomów. Po denaturacji, płukaniu w 2xSSC i przeprowadzeniu przez szereg alkoholi, preparaty są gotowe do hybrydacji.

Niektórzy autorzy denaturują równocześnie sondę i chromosomowy DNA poprzez ogrzanie szkiełka podstawowego już po nałożeniu sondy na preparat cytogenetyczny.

3. Hybrydacja

Hybrydację przeprowadza się pod szkiełkiem nakrywkowym w komorze wilgotnej lub po uszczelnieniu brzegów szkiełka nakrywkowego np. Fixogumą. Warunki hybrydacji są tak dobrane, aby

umożliwić precyzyjne formowanie dupleksu. Temperatura ISH wynosi 37-45°C, zwykle ok. 42°C, czas - 2-24 godziny, w zależności od rodzaju i siłzenia sondy.

4. Usunięcie niespecyficznie związanej sondy

Nadmiar nieshybrydowanej sondy i niespecyficznie związana sonda usuwa się po hybrydyzacji poprzez wieloetapowe płukanie preparatów w roztworze formamidu oraz w SSC, modyfikując stężenie soli, liczbę kapieli płuczających i temperaturę w zależności od rodzaju sondy.

5. Detekcja sondy związanej z preparatem cytogenetycznym

Sondy radioaktywne wykrywa się autoradiograficznie stosując płynne emulsje fotograficzne. Po autoradiografii chromosomy barwi się barwnikiem Giemsy lub stosuje rozmaite techniki prążkowe, odpowiednio zmodyfikowane: GTG, G z barwnikiem Wrighta, Q lub FPG. Można także chromosomy trawić trypsyną jeszcze przed hybrydyzacją in situ i wybarwić barwnikiem Giemsy po hybrydyzacji.

Sondy modyfikowane chemicznie wykrywa się na drodze reakcji immunocytochemicznej lub reakcji powinowactwa, stosując przeciwciała lub białka wykazujące duże powinowactwo do modyfikowanych chemicznie nukleotydów. Bardzo rzadko mikroskopowo wykrywalne znakowanie jest kowalencyjnie związane z sondą molekularną, np. opisano RNA znakowane fluorochromem (Bauman i wsp., 1980). Sondy dla sekwencji powtarzalnych można wykryć w jednoetapowej reakcji, np. w przypadku sondy biotynowanej mogłaby to być awidyna sprzężona z fluorochromem (Lawrence i wsp., 1988).

Do wykrycia sond dla sekwencji single copy konieczne jest zastosowanie wieloetapowej reakcji immunocytochemicznej. Dobranie warunków reakcji immunocytochemicznej zmierza do maksymalnego wzmocnienia sygnału, jednak bez zwiększenia tła. Przyjmuje się, że każdy kolejny etap reakcji immunocytochemicznej wzmacnia 6-krotnie sygnał (Pinkel i wsp., 1988). Ostatnie przeciwciało jest sprzężone z substancją, która powoduje reakcję możliwą do zaobserwowania w zwykłym mikroskopie świetlnym, fluorescencyjnym lub w mikroskopie ze światłem spolaryzowanym. Substancjami tymi są zazwyczaj enzymy (peroksydaza, alkaliczna fosfataza) lub fluorochromy (izotiocyanian fluoresceiny i in.). Dla sondy biotynowej można zastosować np. następującą reakcję immunocytochemiczną: przeciwciało królicze przeciwko biotynie - przeciwciało świni przeciwko króliczej Ig sprzężone z biotyną - kompleks streptawidyna-peroksydaza - reakcja z DAB.

W przypadku, gdy ostatnie przeciwciało jest sprzężone z fluorochromem, jakość obserwowanego obrazu wybitnie podnosi zastosowanie mikroskopu z cyfrowym przetwarzaniem obrazu (digital imaging microscopy) (Viegas-Pequignot i wsp., 1989). Mikroskopia ta pozwala na wzmocnienie sygnału w miejscu związania sondy hybrydyzacyjnej oraz podnosi rozdzielczość metody, umożliwiając precyzyjną lokalizację krótkich sekwencji single copy.

Zastosowanie hybrydyzacji in situ

Hybrydyzacja in situ znalazła szerokie zastosowanie zarówno w cytogenetyce klinicznej, jak i eksperymentalnej (Li i wsp., 1986; Lichter i wsp., 1988; Lichter i Ward, 1990). ISH stosuje się w pre- i postnatalnej diagnostyce aberracji chromosomowych do identyfikacji materiału genetycznego niemożliwego do identy-

fikacji tradycyjnymi technikami cytogenetycznymi, określenia punktów pęknięć chromosomów i wykrywania submikroskopowych aberracji chromosomowych. Wymienione zastosowania ISH dotyczą również cytogenetyki onkologicznej, w której ISH może być wykorzystywana także do wykrywania amplifikacji onkogenów (Li i wsp., 1986). ISH można również stosować do wykrywania delecji genowych.

Kosztące zainteresowanie budzi obecnie CISS hybrydyzacja z mieszaniną sond dla wybranego chromosomu lub jego fragmentu. Metoda ta umożliwia identyfikację chromosomów markerowych, a także wykrycie złożonych aberracji struktury chromosomów, co ma szczególnie znaczenie w cytogenetyce onkologicznej.

Inną modyfikacją ISH jest prowadzenie hybrydyzacji z kilkoma sondami równocześnie. Opisano zastosowanie ISH z trzema sondami hybrydyzacyjnymi do wykrycia liczbowych aberracji chromosomowych w komórkach guzów łitych człowieka (Nederlof i wsp., 1988).

ISH stanowi niezastąpioną metodę mapowania chromosomów człowieka. Metodą tą zmapowano 357 genów człowieka (stan z 1.03.1989) (McKusick, 1989). Ostatnio coraz częściej stosowane są w tym celu sondy nieizotopowe, co wybitnie podnosi rozdzielczość metody.

Hybrydyzacja in situ znalazła także zastosowanie w badaniach w dziedzinie ewolucjonizmu porównawczego. Badania dotyczące podobieństw morfologii chromosomów człowieka, naczelnych i innych ssaków są obecnie uzupełniane przez ISH (Wienberg i wsp., 1990).

W ostatnich latach rozwijał się nowy kierunek cytogenetyki - cytogenetyka interfazowa (Cremer i wsp., 1988). Stwierdzono, że DNA poszczególnego chromosomu zajmuje w jądrze interfazowym

ograniczone terytorium (Cremer i wsp., 1982; Mantelidis, 1985). Umożliwia to wykrywanie aberracji liczby i struktury chromosomów na drodze hybrydyzacji sondy bezpośrednio do jąder interfazowych. Metodę tę wykorzystano już do szybkiego wykrywania aberracji liczby chromosomów dla potrzeb diagnostyki prenatalnej (Cremer i wsp., 1988), a także zastosowano do cytogenetycznej diagnostyki onkologicznej (Cremer i wsp., 1988). ISH stosowano także do badania organizacji przestrzennej chromosomowego DNA w jądrach interfazowych i wzajemnej relacji przestrzennej sprzężonych genów (Lichter i wsp., 1983).

Pismaennictwo

- Bauman J.C., Wiegant J., van Duijn P.: *Histochemistry* 73, 181-193, 1981.
- Brahic N., Haase A.J.: *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 75, 8125-29, 1978.
- Cherif D., Bernard O., Berger R.: *Hum.Genet.* 81, 358-362, 1989.
- Cremer T., Cremer C., Schneider T., Baumann H., Hens L., Kirsch-Volders M.: *Hum.Genet.* 82, 201-209, 1982.
- Cremer T., Landegent J., Brueckner A., Scholl H.P., Schardin M., Hager H.D., Devilee P., Pearson P., Van der Ploeg M.: *Hum.Genet.* 74, 348-352, 1986.
- Cremer T., Tesin D., Hopman A.H.N., Manuelidis L.: *Exp.Cell Res.* 176, 190-220, 1986.
- Feinberg A.P., Vogelstein B.: *Anal.Biochem.* 132, 8-13, 1983.
- Frowner M., Paul C., Vincent F.C.: *Chromosoma* 97, 11-18, 1988.
- Gerhard D.S., Kawasaki E.S., Bancroft F.C., Szabo P.: *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 78, 3755-59, 1981.
- Harper M.E., Saunders G.F.: *Chromosoma* 83, 431-439, 1981.
- Heiles H.B.J., Genersch E., Kessler C., Neumann R., Eggers H.J.: *Biotechnique* 10, 978-981, 1988.
- Henderson A.S., Warburton D., Atwood K.C.: *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 89, 3304-98, 1972.
- Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C.: *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 78, 8633-8637, 1981.
- Landegent J.E., Jansen in der Wal N., Ploem J.S., van der Ploeg M.: *J.Histochem.Cytochem.* 33, 1241-1246, 1985.
- Lawrence J.B., Villave C.A., Singer R.H.: *Cell* 52, 51-61,

- 1988.
- Li Ch., Wu M., Margitich I.S., Davidson N.: *Chromosoma* 93, 305-312, 1986.
- Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., Ward D.C.: *Hum.Genet.* 80, 224-234, 1988.
- Lichter P., Ward D.C.: *Nature* 345, 93-94, 1990.
- Lion T., Haas O.A.: *Materialy 2. Tagung der Gesellschaft für Humangenetik, Bonn 28-31.03.1990.*
- Manuelidis L.: *Hum.Gene.* 71, 229-293, 1985.
- McKusick V.: *Mendelian Inheritance in Man.* VIII wyd. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London 1988.
- Nederlof P.M., Robinson D., Abuknesha J., Wiegant J., Hopman A.H.N., Tanke H.J., Raap A.K.: *Cytometry* 10, 20-27, 1989.
- Pinkel D., Strauss T., Gray J.W.: *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83, 2934-2938, 1986.
- Rigby P.W.J., Dickmann M., Hodes C., Berg P.: *J.Mol.Biol.* 113, 237-251, 1977.
- Szabo P., Elder R., Steffensen D.M., Uhlenbeck O.C.: *J.Mol. Biol.* 115, 539-63, 1977.
- Tchen P., Fuchs R.P.P., Sage E., Leng M.: *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 81, 3466-3470, 1984.
- Viegas-Pequignot E., Dutrillaux B., Magdelenat H., Coppey-Moisan M.: *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 86, 582-586, 1989.
- Wetmur J.G.: *Biopolymers* 14, 2517-2524, 1975.
- Wienberg J., Jauch A., Stanyon R., Cremer Th.: *Materialy 2. Tagung der Gesellschaft für Humangenetik, Bonn 28-31.03.1990.*
- Zischler i wsp.: *Hum.Genet.* 82, 227, 1989.

IV. WYKAZ OSOBNIKÓW ZAJMUJĄCYCH SIĘ GENETYKĄ CZŁOWIEKA W POLSCE

1. Zakład Genetyki Centrum Zdrowia Dziecka
kierownik: Prof. dr hab. med. Lucjan Wiśniewski
Al. Dzieci Polskich 20, 04-726 Warszawa-Międzylesie
tel. 15-74-52
2. Zakład Genetyki, Instytut Matki i Dziecka
kierownik: Doc. dr hab. med. Tadeusz Mazurczak
ul. Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa, tel. 32-66-57, 32-34-51
w. 381
3. Zakład Genetyki, Instytut Psychiatrii i Neurologii
kierownik: Prof. dr hab. med. Ignacy Wald
Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa, tel. 42-76-50
4. Zakład Genetyki Klinicznej CMKP Szpital Dziecięcy w
Dziekanowie Leśnym
kierownik: Doc. dr hab. med. Antoni Rogóyski
05-092 Łomianki, tel. 34-12-15
5. Samodzielna Pracownia Genetyki, Instytut Położnictwa i
Ginekologii AM
kierownik: Prof. dr hab. med. Krzysztof Boczkowski
Pl. Starynkiewicza 1/3, 02-015 Warszawa, tel. 29-12-14
6. Zakład Patomorfologii Wieków Rozwojowego AM
kierownik: Prof. dr hab. med. Aleksander Wasilutyński
ul. Marszałkowska 24, 00-576 Warszawa, tel. 21-32-41 w. 319
7. Zakład Genetyki Medycznej, Centrum Zdrowia Matki Polki
kierownik: Dr med. Grzegorz Nowicki
ul. Rzgowska 281/289, 03-339 Łódź, tel. 42-26-87, 45-11-83

8. Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Endokrynologii AM
kierownik: Doc. dr hab. med. Bogdan Kaluzewski
ul. Sterlinga 1/3, 91-425 Łódź, tel. 33-96-30, 36-54-27
9. Zakład Biologii, Instytut Nauk Podstawowych WAM
kierownik: Prof. dr hab. med. Henryk Hubner
Pl. 9 Maja 1, 90-647 Łódź, tel. 33-05-94
10. Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Położnictwa i Chorób
Kobietych AM
kierownik: Doc. dr hab. med. Alina Midro
ul. Warszawska 15, 15-062 Białystok, tel. 43-50-32
11. Katedra i Zakład Biologii i Genetyki AM
kierownik: Doc. dr hab. med. Janusz Limon
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, tel. 47-82-22 w. 1094,
32-32-76
12. Poradnia Genetyczna i Pracownia Cytogenetyczna,
Specjalistyczny Zespół Opieki Zdrowotnej nad Matką
i Dzieckiem
kierownik: Dr med. Janina Luberda-Zapaśnik
ul. Żołnierska 18, 10-561 Olsztyn, tel. 33-41-41 w. 468,
33-41-50
13. Pracownia Cytogenetyczna, Wojewódzki Szpital Dziecięcy
kierownik: Mgr Anna Marcińska
ul. Chodkiewicza 44, 85-667 Bydgoszcz
14. Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Patologii Klinicznej
kierownik: Prof. dr hab. med. Danuta Rozyńska
ul. Jaczewskiego 8, 20-080 Lublin, tel. 72-57-83

16. Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Pediatrii AM
kierownik: Doc.dr hab.med. Jacek Pietrzyk
ul. Wielicka 285, 30-683 Kraków, tel. 55-02-58, 55-20-11
w. 230
16. Poradnia Genetyczna przy Państwowym Szpitalu Klinicznym Nr 1
kierownik: Dr med. Halgorzata Majchrowska
ul. Chalubińskiego 4, 50-365 Wrocław, tel. 21-64-20
17. Pracownia Cytogenetyczna, Katedra i Zakład Patofizjologii
kierownik: Prof.dr hab.med. Józef Jagielski
ul. Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław, tel. 22-40-59
18. Zakład Genetyki Człowieka PAN
kierownik: Prof.dr hab.med. Jerzy Nowak
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, tel. 23-32-35, 23-30-11
19. Pracownia Genetyki Medycznej ZPP, Instytut Pediatrii AM
kierownik: Dr med. Anna Latos-Bieleńska
ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań,
20. Pracownia Genetyczna, Klinika Endokrynologii, Instytut
Chorób Wewnętrznych AM
kierownik: Prof.dr hab.med. Maciej Gembicki
ul. Przybyszewskiego 48, 60-355 Poznań, tel. 67-55-14,
67-69-41
21. Poradnia Genetyczna, Wojewódzki Szpital Zespolony
kierownik: Dr med. Ewelina Walter-Szymańska
ul. M. Buczka 40/42, 70-502 Szczecin, tel. 22-28-41 w. 252

22. Katedra i Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej AM
kierownik: Doc.dr hab.med. Danuta Dziekanowska
ul. K. Marksa 19, 41-608 Zabrze
23. Klinika Chorób Dzieci Młodszych, Instytut Pediatrii AM
kierownik: Doc.dr hab.med. Jerzy Kowalczyk
ul. Staszica 11, 20-081 Lublin, tel. 23-433, 20-619