

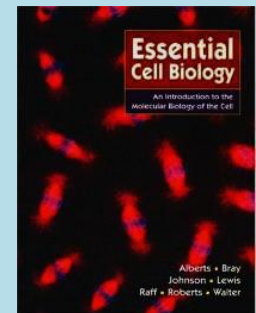
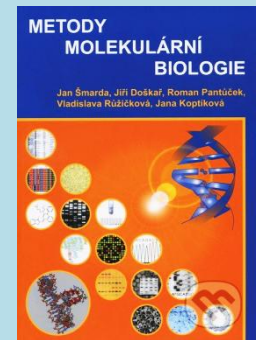


**Genetika
v zubním lékařství
(18.2.2013)**

**Petra Bořilová Linhartová
peta.linhartova@gmail.com**

Doporučená studijní literatura

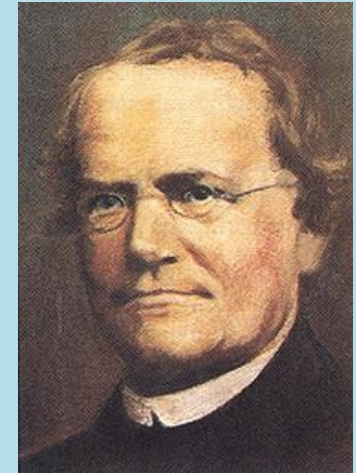
- Skripta: <http://www.med.muni.cz/patfyz/gzl.pdf>
- **Essential genetics: a genomics perspective.** Edited by Daniel L. Hartl - Elizabeth W. Jones. 2002.
- Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.: **Klinická genetika.** 2004.
- Šmarda J. a kol.: **Metody molekulární biologie.** Brno, 2005
- Alberts B. et kol.: **Essential cell biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell.**
- Rosypal S.: **Úvod do molekulární biologie**
- Rosypal S. a kol.: **Terminologie molekulární biologie.** Brno, 2001.
- Mazura I. a kol.: **Speciální metody molekulární biologie.** Praha, 2001.
- Odborné články: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>



Obsah přednášky

- **Struktura lidského genomu**
- Reakce lidského genomu na vlivy prostředí. Exonové, intronové a promotorové mutace.
- Monogenní a polygenní choroby a vztah multigenních nemocí a prostředí.
- Genetické studie a klinická genetika.

Genetika



- brněnský kněz a středoškolský profesor **Johann Gregor Mendel** se zabýval křížením různobarevných odrůd hrachu
- Genotypové zákony:
 - **Zákon o samostatnosti alel**
Genotyp je soubor samostatných genů určujících znaky. Každý znak je určen dvojicí samostatných alel.
 - **Zákon o segregaci alel**
Dvojice samostatných alel se při zrání rozcházejí a do každé gamety přechází jedna z obou alel.
 - **Zákon o nezávislé kombinaci alel**
- Fenotypové zákony
 - **Zákon o uniformitě hybridů**
Křížíme-li dominantního homozygota s homozygotem recesivním, jsou jejich potomci F1 generace v sledovaném znaku všichni stejní. Reciproká křížení u jakýchkoliv jedinců F1 generace dávají shodné výsledky.
 - **Zákon o štěpení v potomstvu hybridů**
Při křížení heterozygotů lze genotypy a fenotypy vzniklých jedinců vyjádřit poměrem malých celých čísel. Vzniká genotypový a fenotypový štěpný poměr.

1. Mendelův zákon

- Zákon o uniformitě F1 (1. filiální = první generace potomků) generace. Při vzájemném křížení 2 homozygotů vznikají potomci genotypově i fenotypově jednotní. Pokud jde o 2 různé homozygoty jsou potomci vždy heterozygotními hybridy.
- Při křížení dvou homozygotů (dominantního - AA a recesivního - aa) vzniká jednotná generace potomků - heterozygotů se stejným genotypem (Aa) i fenotypem.

	A	A
a	Aa	Aa
a	Aa	Aa

2. Mendelův zákon

- Zákon o náhodné segregaci genů do gamet. Při křížení 2 heterozygotů může být potomkovi předána každá ze dvou alel (dominantní i recesivní) se stejnou pravděpodobností. Dochází tedy ke genotypovému a tím pádem i fenotypovému štěpení = segregaci.
- Pravděpodobnost pro potomka je tedy 25% (homozygotně dominantní jedinec) : 50% (heterozygot) : 25% (homozygotně recesivní jedinec). Tudíž genotypový štěpný poměr 1:2:1. Fenotypový štěpný poměr je 3:1, pokud je mezi alelami vztah kodominance, odpovídá fenotypový štěpný poměr štěpnému poměru genotypovému (tj. 1:2:1).

	A	a
A	AA	Aa
a	Aa	aa

3. Mendelův zákon

- Zákon o nezávislé kombinovatelnosti alel. Při zkoumání 2 alel současně dochází k téže pravidelné segregaci. Máme-li 2 dihybridy AaBb může každý tvořit 4 různé gamety (AB, Ab, aB, ab). Při vzájemném křížení tedy z těchto 2 gamet vzniká 16 různých zygotických kombinací. Některé kombinace se ovšem opakují, takže nakonec vzniká pouze 9 různých genotypů (poměr 1:2:1:2:4:2:1:2:1. Fenotypový štěpný poměr je 9:3:3:1. Tento zákon platí pouze v případě, že sledované geny se nachází na různých chromozomech, nebo je jejich genová vazba natolik slabá, že nebrání jejich volné kombinovatelnosti.

Rozdělení genotypů

	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

1:2:1:2:4:2:1:2:1

Rozdělení fenotypů

	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

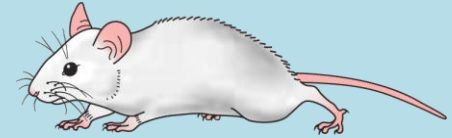
9:3:3:1

Genetika

- specializovaný biologický obor zabývající se variabilitou (proměnlivostí) a dědičností
 - **klinická genetika**
 - zabývá se diagnostikou, léčením a prevencí genetických nemocí (u celé rodiny!)
 - genetické poradenství
 - **lidská genetika**
 - studuje variabilitu a dědičnost u člověka
 - **cytogenetika**
 - studium chromozomů
 - **molekulární genetika**
 - studium struktury a funkce jednotlivých genů
 - **populační genetika**
 - studium proměnlivosti populací
 - **komparativní a evoluční genetika**
 - mezidruhové srovnání a studium evoluce druhů



Genomika

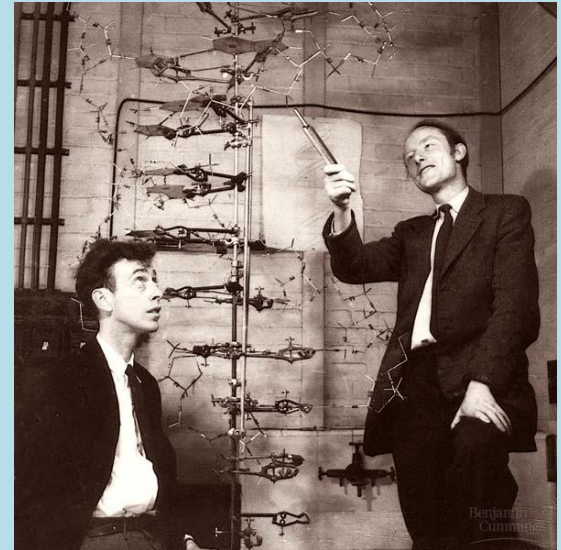
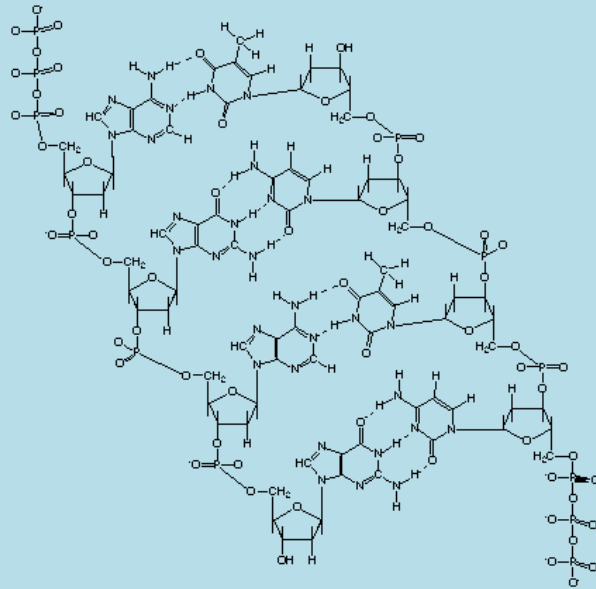


- studuje strukturu a funkci genomů pomocí genetického mapování, sekvenování a funkční analýzy genů
- snaží se o pochopení veškeré informace obsažené v DNA živých organismů
 - **strukturní genomika** = pochopení struktury genomu
 - konstrukce detailních genetických, fyzických a transkripčních map genomů příslušných organismů
 - reprezentovala zejména iniciální fázi analýzy genomů; konečným cílem byla kompletní znalost DNA sekvence (např. HUGO projekt)
 - **bioinformatika** = shromažďování, analýza a vizualizace biologických souborů dat
 - využívá metod výpočetní techniky, tvorba databází a softwarů
 - **funkční genomika** = studium funkce genů a ostatních částí genomu
 - využívá poznatků strukturní genomiky a snaží se o poznání funkce genů; velmi často k tomu využívá modelové organizmy (kvasinka, nematoda, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Mesocricetus auratus* aj.) jako časově a finančně výhodnou alternativu vyšších živočichů (zejm. pro možnost studovat mnoho generací v relativně krátkém čase)



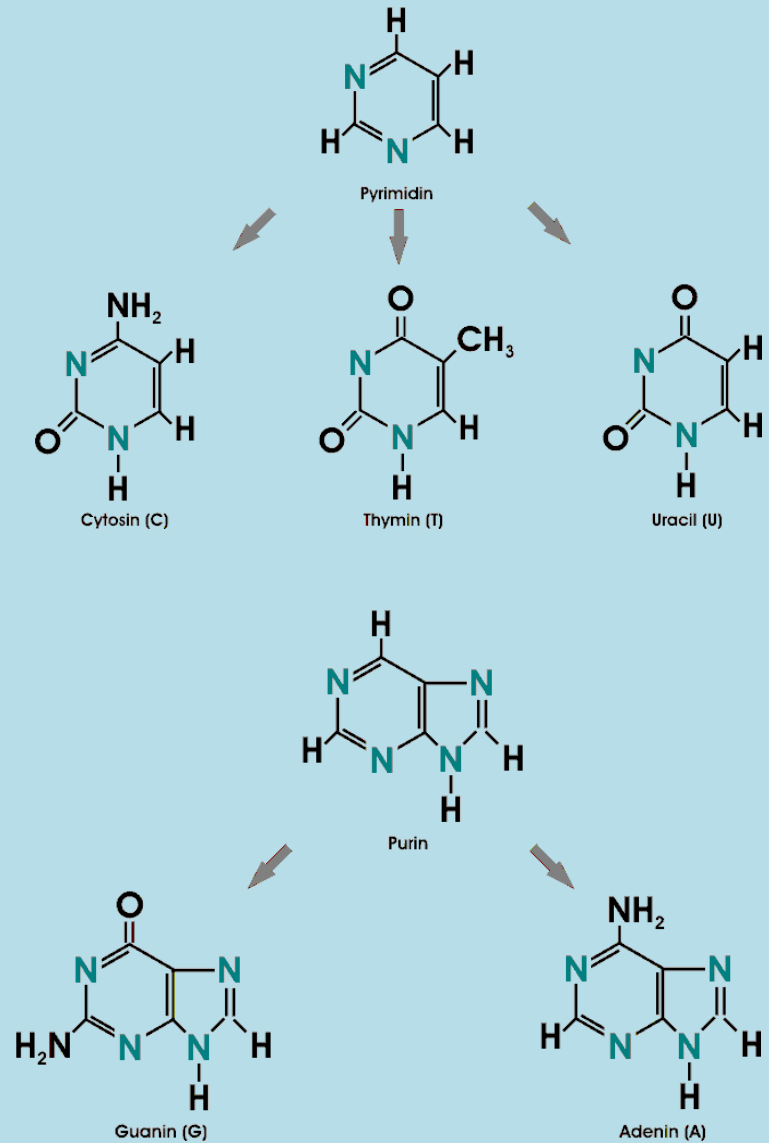
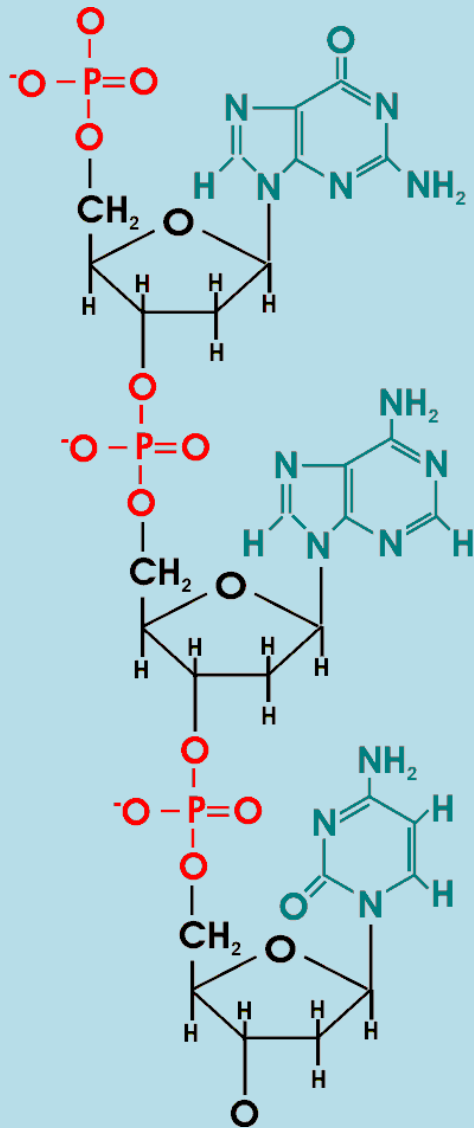
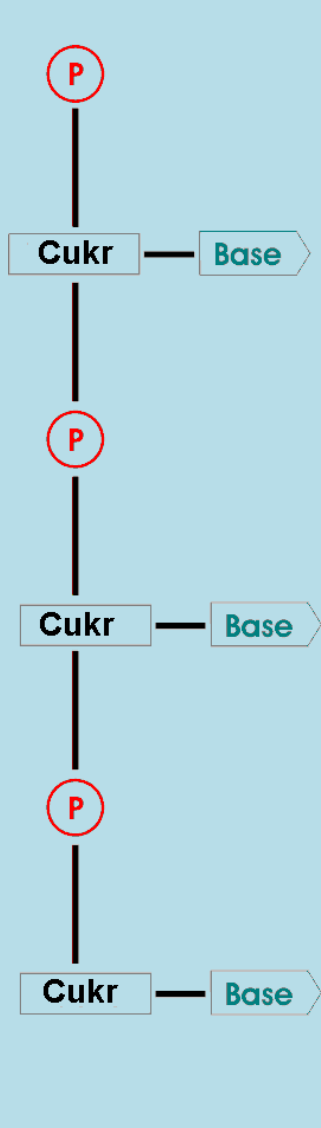
DNA

- molekula DNA jako taková byla objevena v roce 1869, kdy se švýcarskému lékaři Friedrich Miescherovi podařilo vyizolovat DNA z bílých krvinek



- 1962 obdrželi společně Francis Crick, James Watson a Maurice Wilkins Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Rosalyn Franklin se pro tragické úmrtí této ceny nedočkala.

DNA



Gen

= konkrétní úsek molekuly DNA nesoucí informaci pro tvorbu proteinu nebo NA (rRNA, tRNA...).

- geny strukturní
- geny pro RNA
- geny regulační

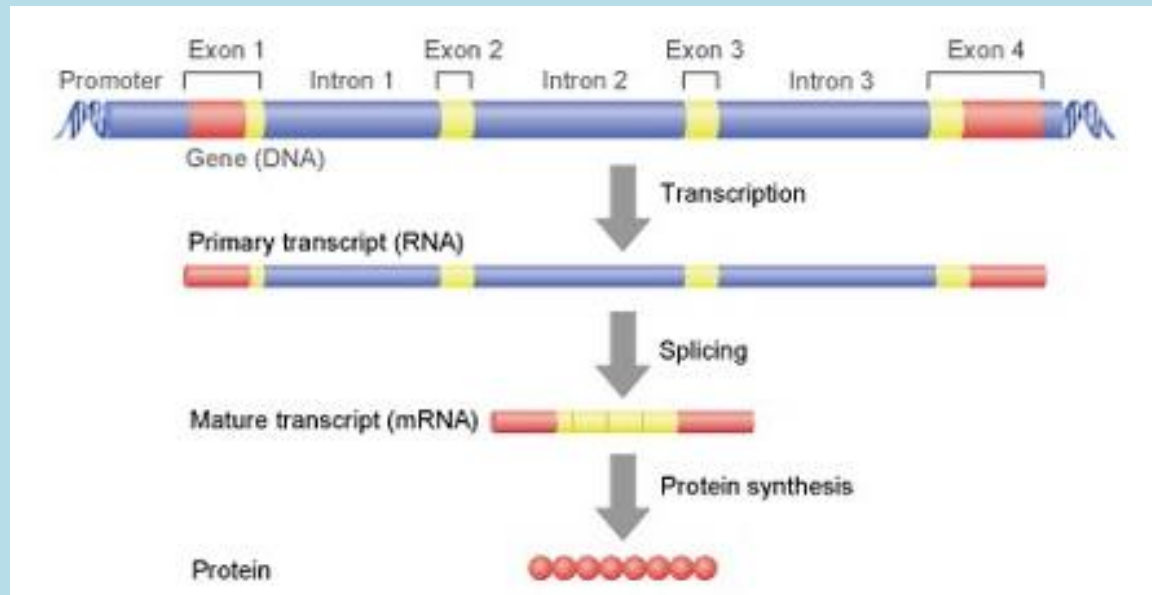
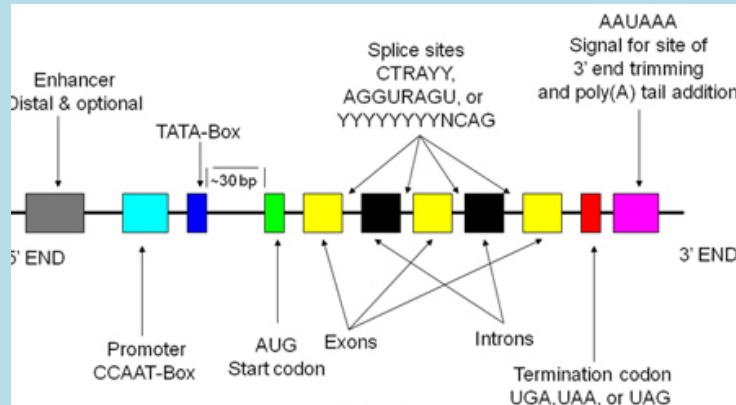
- **exony** = funkční úseky genu, které jsou přepisovány do mRNA a dále translantovány při proteosyntéze
- **introny** = úseky genu, jejichž funkce dosud nebyla zcela objasněna a které nejsou využívány pro translaci

Dle jejich obsahu geny dělíme na:

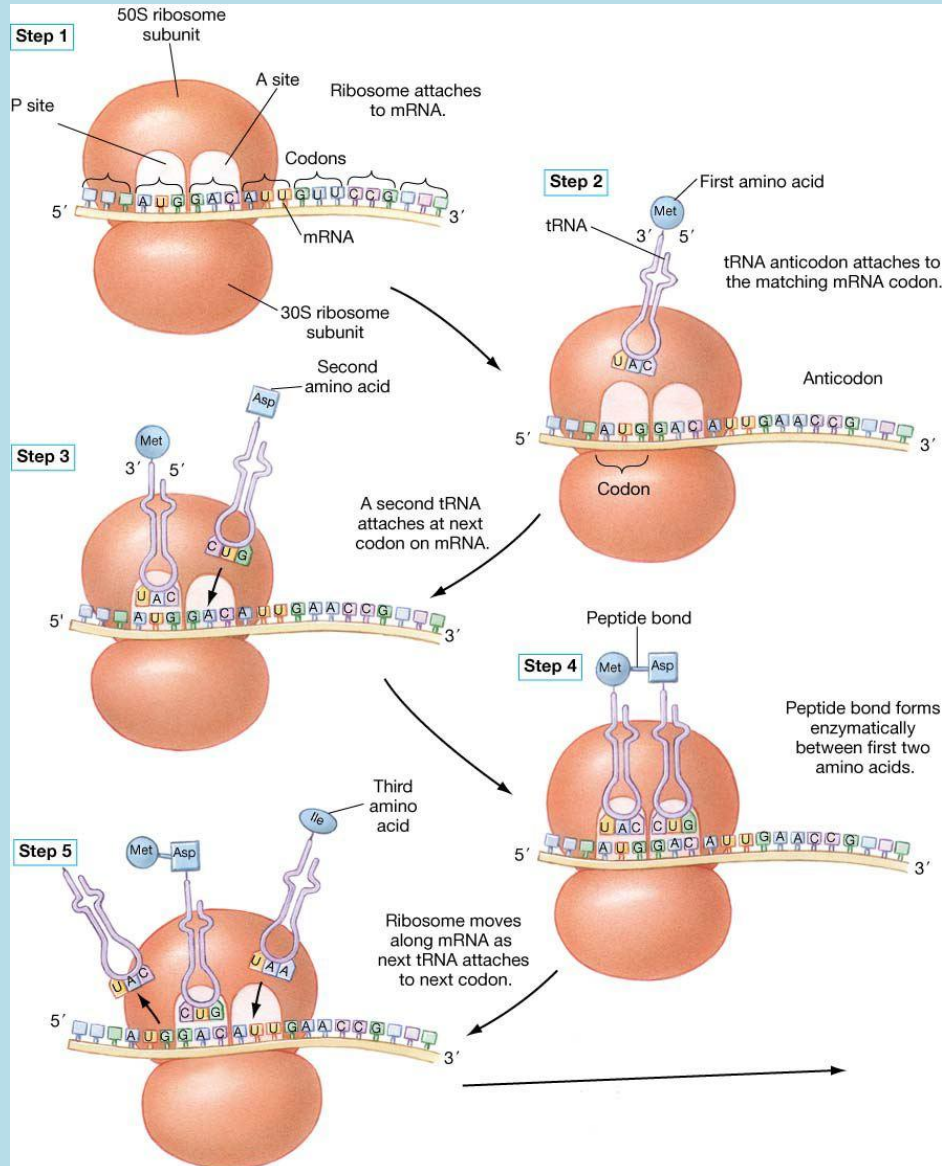
- **jednoduché - obsahují pouze exony**
- **složené - obsahují i introny**

- **genové rodiny** = sekvenčně podobné geny, které vznikly zřejmě duplikací během evoluce, např. geny pro (hemo)globiny, imunoglobuliny, ...

Struktura genu a jeho transkripce

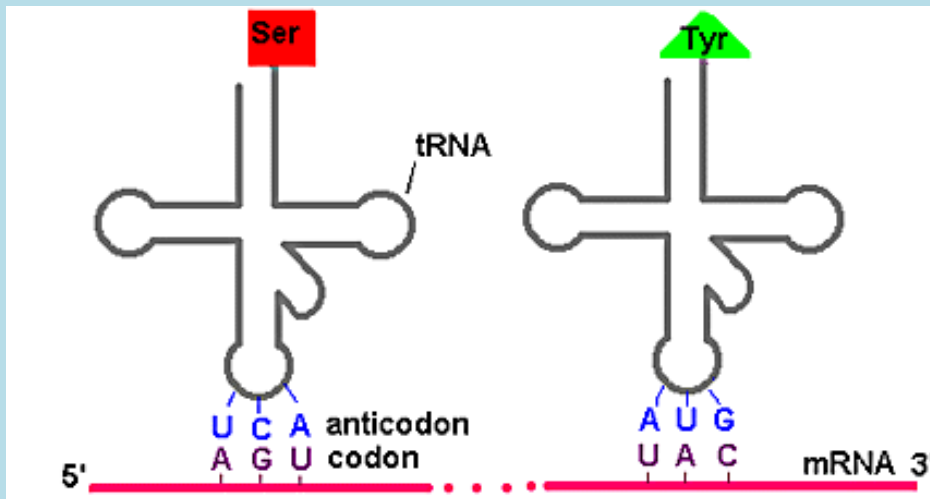


Genová translace



Genetický kód

- určuje pořadí aminokyselin v proteinu
 - univerzální
 - podobný princip u většiny živých organismů
 - tripletový
 - trojkombinace 4 nukleotidů (A, C, G, T)
 - degenerovaný
 - $4^3 = 64$, ale aminokyselin jen 21

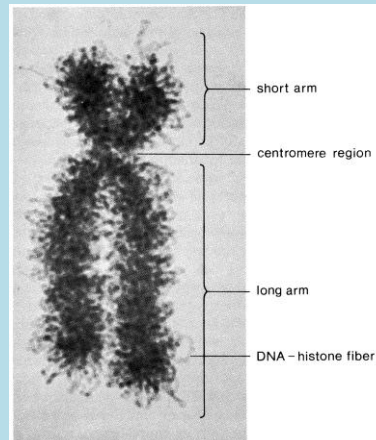
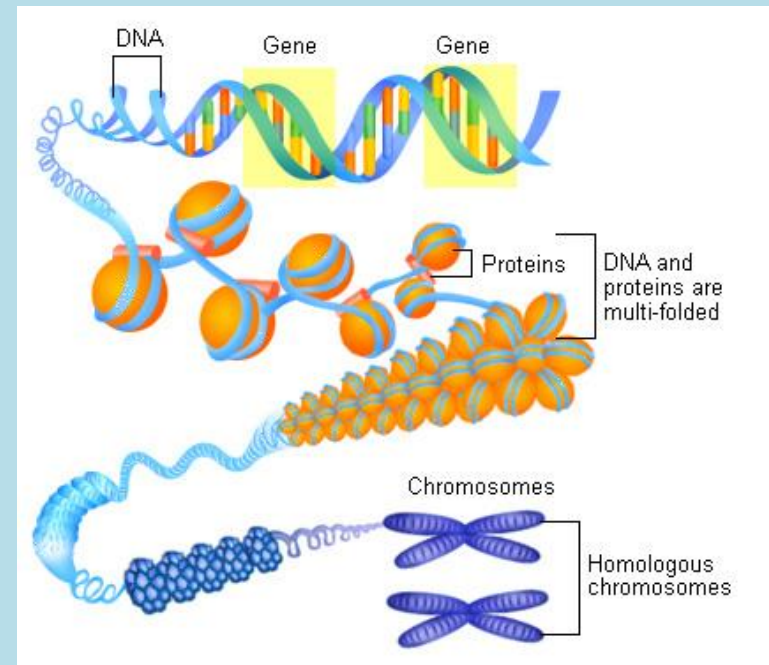
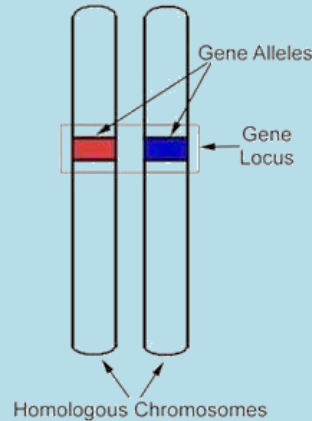


1. pozice 2. pozice 3. pozice

U		C		A		G		
UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

Základní genetické pojmy

- chromozom
- lokus
- alely
 - dominantní
 - recesivní
- homozygot
- heterozygot
- genotyp
- fenotyp

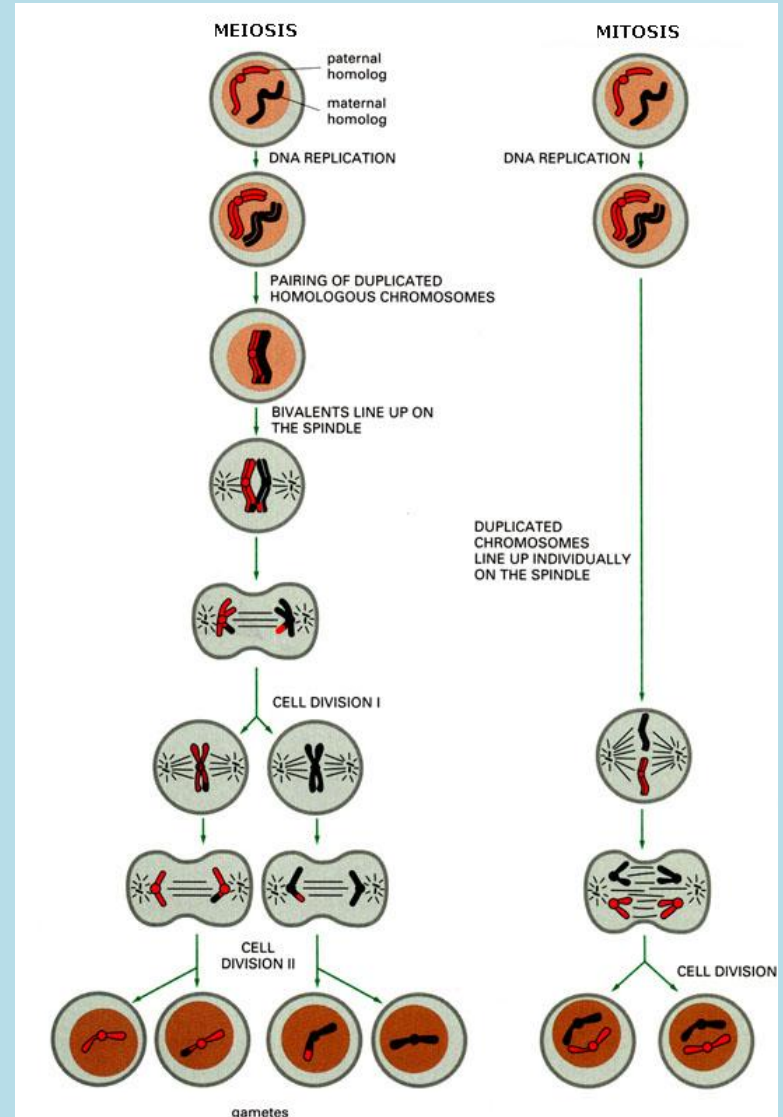


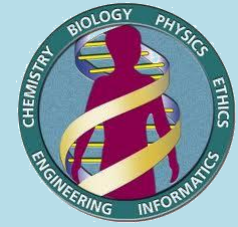
Mitóza a meióza

Mitóza = 2 dceřinné buňky s diploidním počtem chromozomů, 1 cyklus DNA replikace následuje rozdělení chromozomů a jádra (profáze → prometafáze → metafáze → anafáze → telofáze) a násl. celé buňky (cytokineze)

Meióza = 1 cyklus replikace následován 2 cykly segregace chromozomů a buněčného dělení

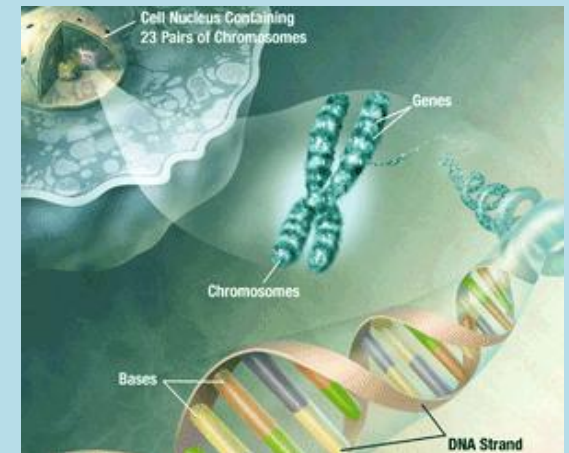
1. meiotické (redukční) dělení – rozdělení homologních chromozomů
významné – odehrává se zde meiotický crossing-over (rekombinace) – žádná z gamet není identická!
poruchy rozestupu – např. trisomie
2. meiotické dělení – rozestup sesterských chromatid
2 dceřinné buňky s haploidním počtem chromozomů
vznik pohlavních buněk (spermie, vajíčko)
dodatečné promíchání genetického materiálu crossing-overem





Lidský genom

- **Human Genome Project** (HUGO) vs. **Celera Genomics Inc.** – v r. 2001 zveřejnění prvních výsledků, genom Jamesa D. Watsona (2008)
- **gen** = konkrétní úsek molekuly DNA nesoucí informaci pro tvorbu proteinu nebo NA (rRNA, tRNA...). ~ 21 tisíc genů (2011)
- **pseudogen** = sekvence DNA, která je podobná genu, ale nedochází k jejímu přepisování v RNA (transkripci). ~ 20 tisíc pseudogenů
- **genom** = soubor všech genů v jedné buňce, **genom jaderný a mitochondriální** (mtDNA)
- v jádru diploidní lidské buňky 22 párů chromozomů (autozomy) a pár pohlavních chromozomů X/Y (gonozomy) = karyotyp = soubor všech chromozomů v jádře b., zjišťuje se na základě cytogenetického barvení, kt. využívá různé barvitelnosti sekvencí bohatých na AT páry a GC páry nukleotidů
- hustota genů na jednotlivých chromozomech dost heterogenní
 - pouze ~ 10 % kódující sekvence
 - ~ 75 % se skládá z jedinečné (neopakující se) sekvence
 - zbytek repetitivní sekvence



Lidský genom

Repetitivní sekvence = DNA s vysokým množstvím kopií

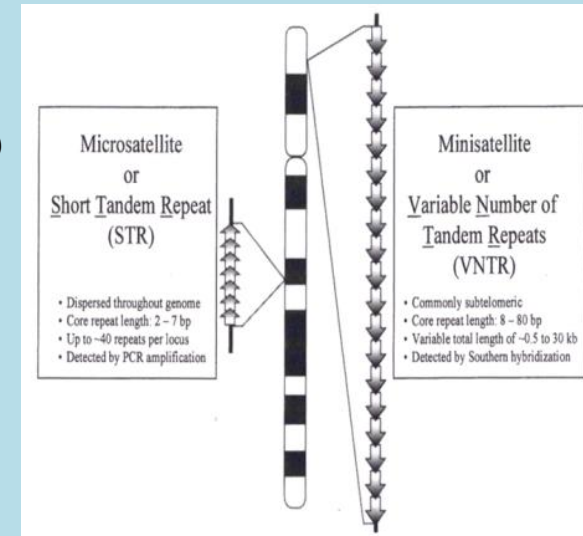
- se podílí na formování vyšších nukleoproteinových struktur, jako jsou telomery nebo centromery
- při chromozomových přestavbách, mají vliv na regulaci genové exprese při procesu zvaném RNA interference, zajišťují ochranu konců lineárních chromozomů, řídí správný průběh mitotického i meiotického dělení buňky
- zřejmě udržují strukturu chromozomů, možná jsou “evoluční” rezervou

- **rozptýlené**

- DNA transpozony (př. „Sleeping Beauty“ – vektor pro genové terapie)
- retrotranspozony
- endogenní retrovity = LTR
- autonomní – LINE – L1-repetice
- neautonomní – SINE – Alu-repetice

- **tandemové** = za sebou jdoucí identické repetice, VNTR

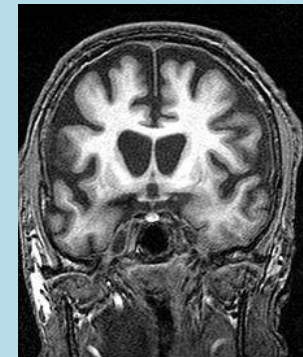
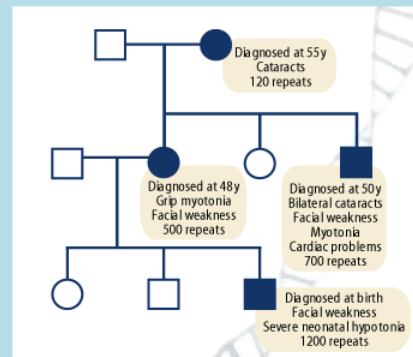
- mikrosatelity – opakování 1- 5 bp
- minisatelity - v rozsahu kilobází, které se více vyskytují v subtelomerických oblastech chromozomů
- genetické markery



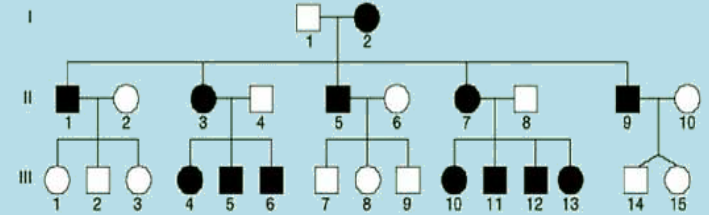
Lidský genom

- **Huntingtonova chorea**, fatální neurologické onemocnění s nástupem v dospělosti, projevující se jako demence s extrapyramidovou poruchou motoriky. V genu pro huntingtin je repetitivní sekvence (CAG)_n, která kóduje úsek bílkoviny tvořený zbytky glutaminu (polyglutaminový úsek, polyglutamine tract). Za normálních okolností mají lidé méně než 20 trinukleotidů CAG a tedy i glutaminů v huntingtinu, kde tyto tvoří důležitou doménu pro interakce s jinými proteiny. Pokud se však mutací toto množství zvětší nad 30 glutaminů, protein nepracuje správně s výsledným progresivním odumíráním neuronů v nucleus caudatus.
- **myotonické dytrofie** (svalová dystrofie se svalovou slabostí provázenou paradoxně zvýšeným svalovým tonem) se nachází patologická expanze trinukleotidu CTG v 3' nepřekládané oblasti genu DMPK (dystrophia myotonica protein kinase). Mutantní mRNA má sama o sobě patogenní potenciál.

- expanze trinukleotidových repetice
- autosomálně dominantní choroby

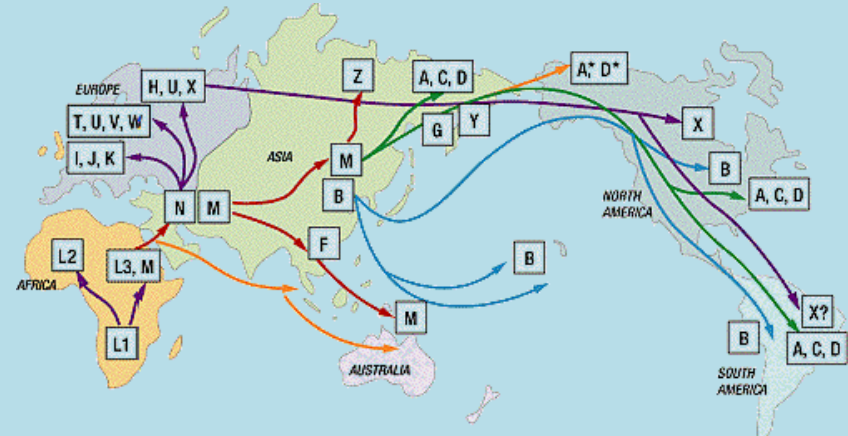
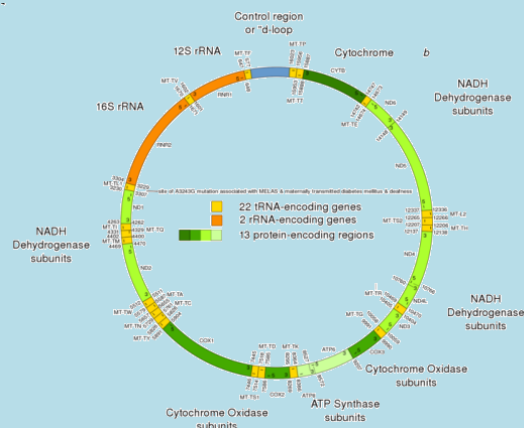


Lidský genom



mtDNA

- původ: alfaproteobakterie pohlcena eukaryotickou buňkou
- mnoho genů během evoluce bylo z mtDNA horizontálně přeneseno do buněčného jádra (geny v jádře kódující různé mitochondriální proteiny silně připomínají bakteriální proteiny)
- ~ 16,5 tisíce bp
- kóduje 37 genů
 - 24 genů pro různou nekódující RNA
 - 13 genů kóduje vlastní mitochondriální polypeptidy zapojené v mitochondriálních procesech (využívány během oxidativní fosforylace)
- maternální dědičnost
- genetické analýzy: na základě mtDNA určena migrace lidstva - „mitochondriální Eva“, která žila ~ před 140 000 lety v místech dnešní Etiopie, Keni nebo Tanzanie



Obsah přednášky

- Struktura lidského genomu
- Reakce lidského genomu na vlivy prostředí. Exonové, intronové a promotorové mutace.
- Monogenní a polygenní choroby a vztah multigenních nemocí a prostředí.
- Genetické studie a klinická genetika.

Evoluční biologie

- **výběr** neboli **selekcí** (přírodní, pohlavní, rodičovský, umělý)
- **migraci** neboli **genový tok**
- **evoluční tahy** (mutační, reparační, molekulární – těmi se rozšiřuje tzv. **sobecká DNA**, tj. zpravidla vysoce repetitivní nekódující DNA v genomu eukaryotických organismů)
- **příbuzenské křížení (inbreeding)**
- **genetický drift (posun)** = náhodné posuny ve frekvenci jednotlivých alel v populaci, které nejsou způsobené přirozeným výběrem, důvodem vzniku je nesoulad mezi teoretickou kombinovatelností a praktickou může evoluci urychlovat i zpomalovat (hod kostkou)



Genetická uniformita

Science.1983 Jul 29;221(4609):459-62.

The cheetah is depauperate in genetic variation.

[O'Brien SJ](#), [Wildt DE](#), [Goldman D](#), [Merril CR](#), [Bush M](#).



- A sample of **55 South African cheetahs** (*Acinonyx jubatus jubatus*) from two geographically isolated populations in South Africa **were found to be genetically monomorphic at each of 47 allozyme (allelic isozyme) loci**. Two-dimensional gel electrophoresis of 155 abundant soluble proteins from cheetah fibroblasts also revealed a low frequency of polymorphism (average heterozygosity, 0.013). Both estimates are dramatically lower than levels of variation reported in other cats and mammals in general. The extreme monomorphism may be a consequence of a demographic contraction of the cheetah (a population bottleneck) in association with a reduced rate of increase in the recent natural history of this endangered species.

Populační genetika



Godfrey Hardy

Hardy-Weinbergův zákon

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

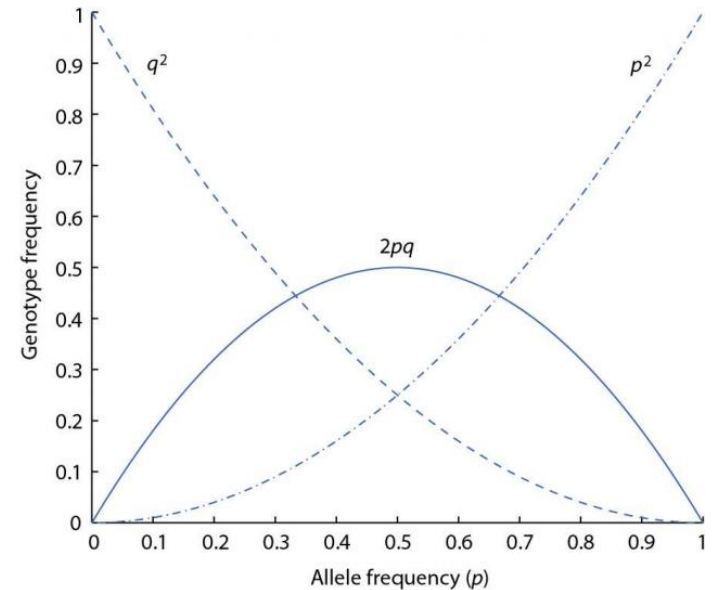


Wilhelm Weinberg

Umožňuje odhadnout frekvence alel v populaci, když známe frekvence genotypů a naopak.

p	frekvence alely A
q	frekvence alely a
p^2	frekvence genotypu AA
q^2	frekvence genotypu aa
$2pq$	frekvence genotypu Aa

Grafické znázornění Hardy-Weinbergova zákona



H-W zákon ukazuje, že se v případě ideální populace z generace na generaci nemění frekvence alel v populaci.

Populační genetika

H-W zákon platí za následujících předpokladů:

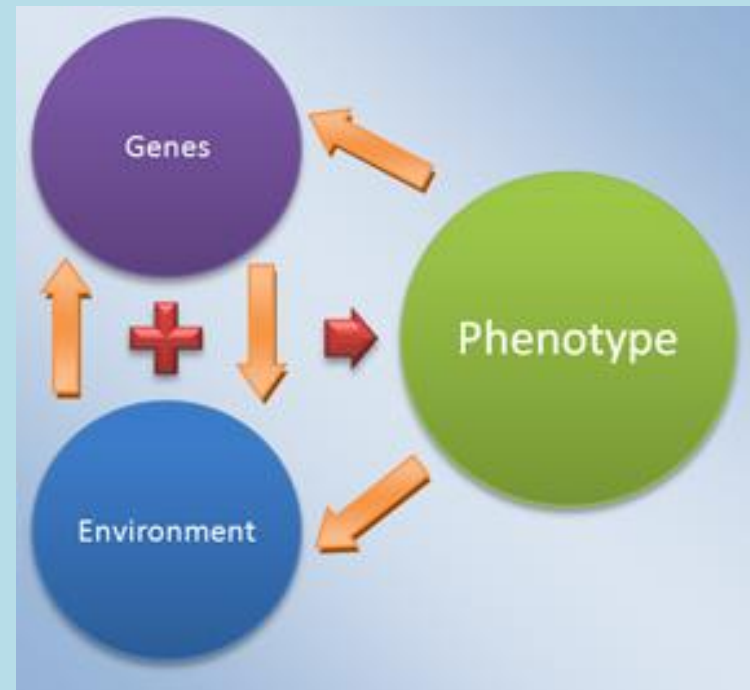
- efektivně nekonečně velká populace
- náhodné křížení mezi jedinci (panmiktická populace)
- všichni jedinci stejnou fitness
- populace je homogenní, tzn. frekvence alel stejné v různých místech populace
- nulový model = ukazuje jak budou vypadat frekvence alel a genotypů v případě nekonečně velké panmiktické populace, na kterou nepůsobí žádné evoluční síly jako jsou drift, migrace nebo selekce

Populační genetika

- H-W rovnováha nevypovídá mnoho o daleké historii populace, protože může nastat již po jedné generaci náhodného křížení.
- Panmiktická populace je mendelistická populace, ve které se dva genotypy párují s takovou frekvencí (pravděpodobností), v jaké frekvenci se oba genotypy nachází v populaci.
- Příklad: genotypové frekvence AA 25%, Aa 50% a aa 25% →
Pravděpodobnost, že AA se spáruje s Aa je $0,25 \cdot 0,5 = 0,125$ (12,5%)

Vliv prostředí na lidský genom

- Genetická výbava jedince je sice osudově zadána v okamžiku zplodění, ale není pro další život konečná, protože v průběhu života se může měnit jak pod vlivem četných faktorů **epigenetických** (vlivy prostředí), tak pod vlivem **dalších faktorů genetických** (např. mutacemi somatických buněk v průběhu maligní transformace).
- **Biologické mutageny:**
onkogenní viry: adenoviry, herpes viry, virus Epstein-Barr, Rousův sarkomální virus a Rauscherův virus leukémie
- **Fyzikální mutageny:**
záření (rentgenové, gama, UV – tvorba thymidinových dimerů)
- **Chemické mutageny:**
organické, alkylační činidla (ATB), anorganické látky, alkaloidy, kationty těžkých kovů, peroxidy, dusitany, aromatické chlorované deriváty, volné radikály (O·)



Genetická proměnlivost

- je zdrojem individuální variability (vytváří se nové kombinace alel):
 - segregace alel při vzniku gamet
 - rekombinace při crossing-overu
 - vznik náhodných kombinací alel při oplození

Mutace

- procesy, při kterých se mění počet alel (mění se kvalita a kvantita genů)
- **mutageneze** = proces vzniku mutací
- mutace = náhodné změny genotypu, změna genetické informace, poměrně vzácné

Typy mutací (indukované nebo spontánní, ty mají četnost $\sim 10^{-7}$, oprava polymerázou a proteinem p53):

- **Genové mutace**
- **Chromozomové mutace = aberace**
- **Genomové mutace**

Vzácné mutace a polymorfismus

- **vzácné mutace** - jsou výrazně patologické a tudíž jsou z populace odstraňovány selekcí, nebo vznikly nedávno a nestačily se v populaci rozšířit), vyskytuje se v populaci méně než v 1 %
- **polymorfismus** - častá mutace, tyto mutace jsou základem interindividuální variability jedinců, v jediném genu je často mnoho polymorfizmů, jejich kombinace tvoří haplotypy, vyskytuje se v populaci více než v 1 %
 - **SNP** = jednonukleotidový polymorfismus - bialelické
 - **minisatelitní a mikrosatelitní polymorfismy** - multialelické

Germinativní a somatická mutace

- **germinativní mutace** - přenášeny na potomstvo (často příčinou zániku plodu), u potomka přítomny ve všech buňkách, mají vliv na vývoj druhu, „úspěšnost“ germinativní mutace 1:100000
- **somatické mutace** - vznikají v somatických buňkách v průběhu života (maligní transformace x žádný fyziologický vliv)

Polymorfismus

- alkoholdehydrogenáza (ADH) a aldehyddehydrogenáza (ALDH) - mají mnoho polymorfních forem napříč lidskými rasami.
- isoformy vykazují rozdíly v aktivitě a rychlosti zpracování a odbourávání substrátu
- nositelé určitých kombinací funkčních variant více náchylní k propadnutí alkoholizmu než jedinci s jinými kombinacemi
- alelová kombinace, která může svého nositele uchránit před závislostí, se zdá být ADH1B*2 a ALDH2*2 (Chen a kol., 2008).

- ADH1B*1 převládá u kavkazské populace a populace severoamerických indiánů
- ADH1B*2 u obyvatelů východní asie
- ADH1B*3 se pak hojně vyskytuje u černošské populace
- ADH1C*1 převládá u východoasijské populace, zatímco u kavkazské a u amerických indiánů je přibližně stejně distribuována jako alela ADH1C*2

- Významnou alelickou variantou je ALDH2*2 se záměnou kyseliny glutamové na pozici 487 za lysin (SNP G>A). Zatímco ve východoasijské populaci je jeho četnost mezi 16-24%, u ostatních se objevuje jenom zřídka.
- Varianta ALDH2*2 odbourává acetaldehyd pomalu a tím tyto účinky prodlužuje.

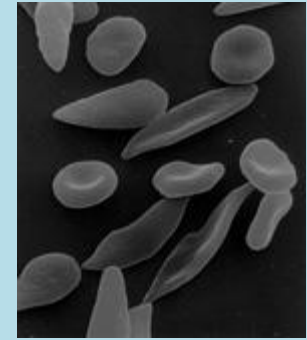
Genové mutace

- mění jednotlivé geny (alely), většinou jsou indukované
- podstata je molekulární, mění se struktura DNA, ale nenarušuje se celistvost stavby chromozomu
- v somatických nebo v pohlavních buňkách
- mutace v regulačních genech pro množení a diferenciaci → nádorového onemocnění

- **bodové mutace - substitute** = záměna páru nukleotidu za jiný (→ změna AA sekvence, změna v regulaci, ovlivnění transkripce a translace... nebo tvorba STOP kodonu), transverze/tranzice, spíše v exonech
- **posunové mutace - delece/inzerce** = ztráta/zařazení nukleotidů (→ možný posun čtecího rámce), spíše v intronech



Genové mutace



Srpkovitá anemie

- missense mutace (transverze T>A) genu pro hemoglobin na 6. pozici v β -řetězci (hydrofóbní valin místo hydrofilní glutamové kyseliny, tvorba shluků Hb a tím změna tvaru ery) → HbS
- autosomálně recesivní

	ancestral	mutant
DNA	-CTC-	-CAC-
mRNA	-GAG-	-GUG-
AA	-glu-	-val-

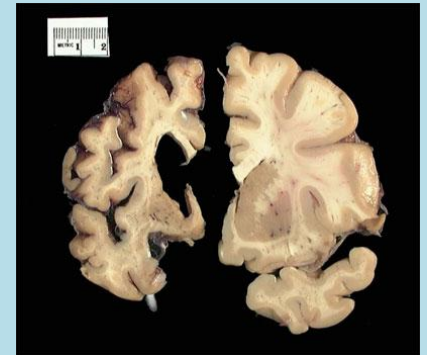
- Srpkovité červené krvinky mnohem hůř přenášejí kyslík. Lidé se srpkovitou anémií mají proto ve srovnání s obyčejnými lidmi červených krvinek víc. To jim dává proti malárii velkou výhodu, díky níž mají lepší šanci přežít.

Genové mutace

β^0 thalasemie

- nonsense mutace pro Hb – chybná syntéza jednoho z řetězců globinu
- autozomálně recesivní

	ancestral	mutant
DNA	-AGT-	-A C T-
mRNA	-UCA-	-UGA-
AA	-ser-	-STOP



Huntingtonova choroba

- trinukleotidová expanze

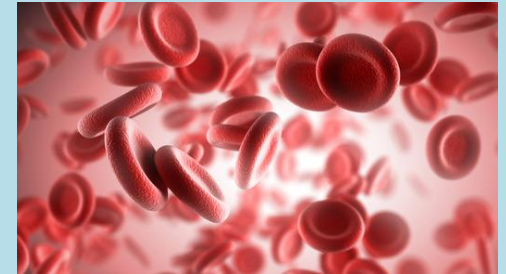
	ancestral	mutant
DNA	...TAC-GTC-...	...TAC-(GTC-GTC-GTC) ₂₀ -GTC-...
mRNA	...-AUG-CAG-...	...-AUG-(CAG-CAG-CAG) ₂₀ -CAG-...
AA	...-met-gln-...	...-met-(gln-gln-gln) ₂₀ -gln-...

Genové mutace

Hemofilie A

= nedostatek srážecího faktoru VIII

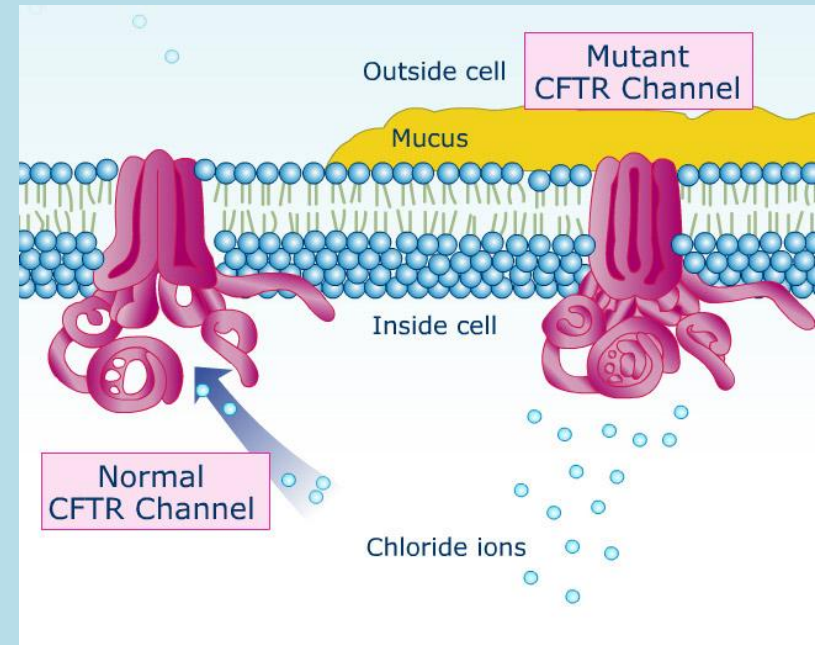
- inzerce 3000 bp – snížení tvorby proteinu
- gonozomálně recesivní – vazba na X chromozom
- žena je přenašečka



Genová mutace

Cystická fibróza

- deleční mutací genu produkujícího protein CFTR (chloridový ABC transportér na buň. membráně) → nefunkční protein
- delece 3 bp v pozici 1652 až 1655 v exonu 10 (delece phe v kodonu 508)
- autozomálně recesivní

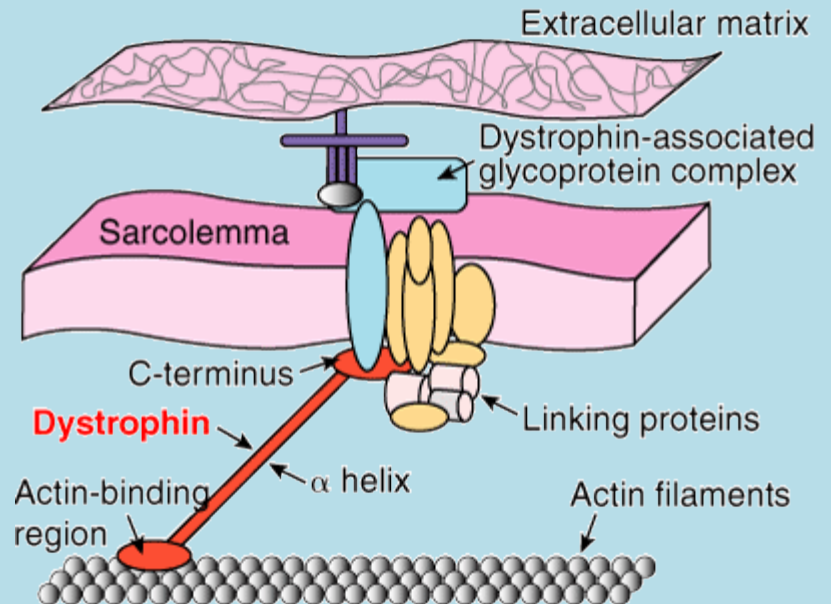


	ancestral	mutant
DNA	-TAG- AAA -CCA-	-TA A-CCA-
mRNA	-AUC- UUU -GGU-	-AUU-GGU-
AA	-ile- phe -gly-	-ile-gly-

Genová mutace

Duchennova svalová dystrofie

- „frameshift“ mutace = posun čtecího rámce v genu pro protein dystrofin
- gonozomálně recesivní – vazba na X chromozom



	ancestral	mutant
DNA	-CAC-TGT	-CAC-TTG-T..-
mRNA	-GUG-ACA-	-GUG-AAC-U..-
AA	-val-thr-	-val-gly-

Chromozomové mutace - aberace

- nemění strukturu samotných genů, ale mění strukturu chromozomů.
- dají pozorovat ve světelném mikroskopu
- mohou být překážkou normálního průběhu meiózy a jimi postižené gamety mohou být sterilní nebo mohou po splynutí vznikat neživota schopné zygoty.

Strukturní chromozomové aberace

- následkem chromozomových zlomů, na které navazuje určitá přestavba. Primární je tedy porucha struktury, přičemž původní množství genetického materiálu může - ale nemusí - být zachováno. Dělíme je na **balancované** (kdy je zachováno původní množství genetického materiálu) a **nebalancované** (kdy část genetického materiálu chybí či přebývá).
- **deficience** = ztráta koncové části chromozomu, oddělený kousek se rozpadne v cytoplazmě, dochází ke ztrátě genů, ztráta důležitých genů vede ke smrti
- **delece** = ztráta vnitřní části chromozomu.
- **duplikace** = zdvojení některých částí chromozomů
- **inverze** = převrácení části chromozomu o 180°
- **translokace** = přesun části chromozomu na jiný chromozom, může vést k vytvoření nového znaku
- **fragmentace** = rozpad na malé části

Genomové mutace

Numerické chromozomové aberace

- způsobeny abnormálním počtem chromozomů v karyotypu
- struktura chromozomů je neporušená, patologicky se uplatňuje nestandardní množství genů
- vznikají díky chybě při rozchodu chromozomů do dceřiných buněk během buněčného dělení (nondisjunkce) nebo abnormalitami fertilizace či časně embryogeneze
- **aneuploidie** - numerická odchylka se týká pouze určitého chromozomu nebo chromozomů, ne však celé sady. Konkrétní chromozom může být buď znásoben - **trisomie** (3x - tři kopie chromozomu), **tetrasomie** (4x - čtyři kopie chromozomu), nebo naopak ztracen - **monosomie** (1x - jedna kopie chromozomu), **nulisomie** (0x - žádná kopie chromozomu)
- **polyploidie** - znásobena je celá chromozomová sada - porucha rozdělení celých sad nebo oplození spermii (dispermie)], u člověka přichází v úvahu zejména triploidie (3n = 69 chromozomů) a tetraploidie (4n = 92 chromozomů), většinou ale:
 - těhotenství je potraceno
 - **zásněť hroznová** (*mola hydatidosa*) je edematózní hroznovitý útvar vznikající v děloze patologickým bujením embryonálního trofoblastu

Genomové mutace

Aneuploidie (změna počtu chromozomů v sadě)

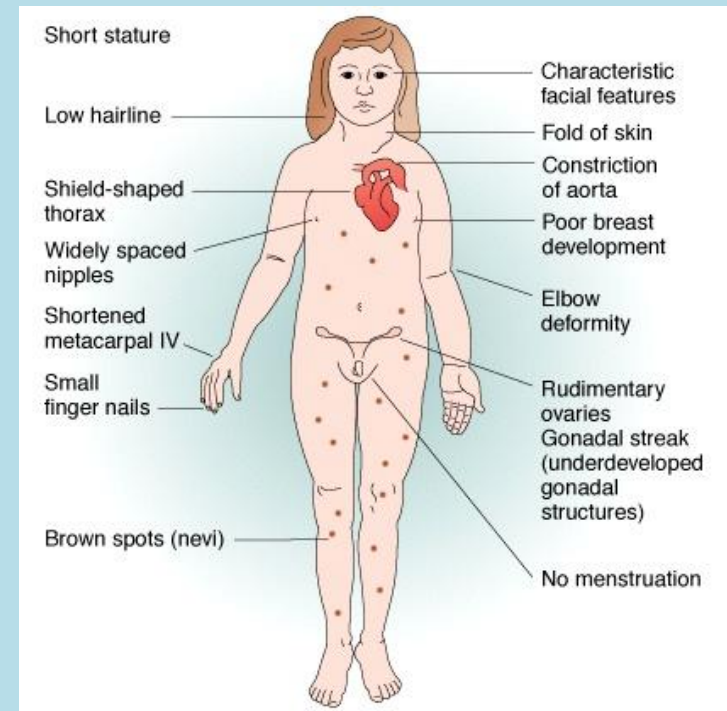
○ monosomie

- gonozomální
 - Turnerův sy. (45, X0)



○ trisomie

- autozomální
 - **Downův sy.** (47, XX/XY + 21)
 - Edwardsův sy. (47, XX/XY +18)
 - Patauův sy. (47, XX/XY +13)
- gonozomální
 - Klinefelterův sy. (47, XXY)
 - XXX sy.
 - XYY sy.



Obsah přednášky

- Struktura lidského genomu
- Reakce lidského genomu na vlivy prostředí. Exonové, intronové a promotorové mutace.
- Monogenní a polygenní choroby a vztah multigenních nemocí a prostředí.
- Genetické studie a klinická genetika.

Monogenní nemoci

- Rozvoj molekulárně biologických metod umožnil detailní analýzu genetického podkladu mnoha mendelisticky děděných, tzv. **monogenních nemocí**.
- U těchto chorob se dědičný podklad uplatňuje jako **velký faktor**, tj. je přítomen prakticky u všech nemocných a jedná se prokazatelně o faktor příčinný (např. defekty v dystrofinovém genu u muskulárních dystrofií), k němuž se přidávají jen jako přídatné další faktory genetické i faktory zevního prostředí. Příčinou těchto nemocí bývají především tzv. **vzácné alely**.
- je determinována alelami v jednom lokusu
- variantní alela, která vznikla mutací někdy v nedávné nebo vzdálené minulosti a je většinou relativně málo častá, nahrazuje původní „divokou“ alelu na jednom nebo obou chromozomech
- mají charakteristický způsob přenosu v rodinách

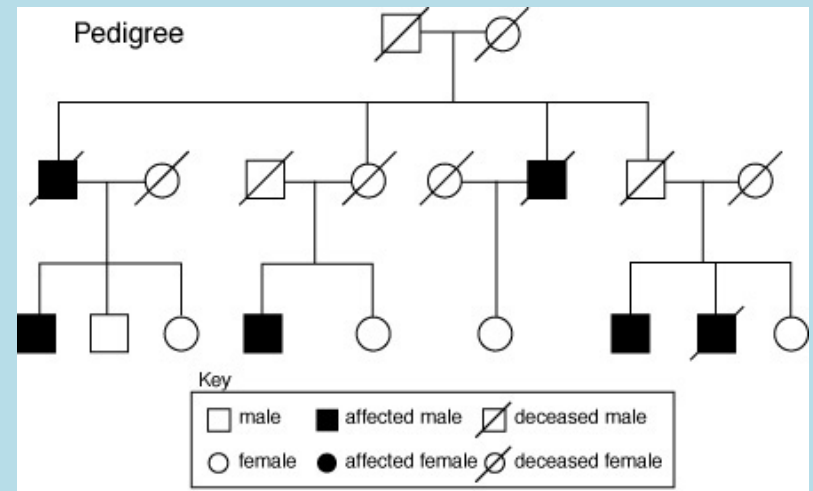
Monogenní nemoci

- choroby dětského věku
- méně než 10% z nich se manifestuje po pubertě a pouhé 1% se objeví po skončení reprodukčního věku
- často výrazně patologické
- V populační studii na 1 milionu živě narozených dětí byla incidence vážných monogenních chorob odhadnuta na 0,36 %, u 6-8 % hospitalizovaných dětí se uvažuje o monogenních chorobách.
- doposud známé shrnuje OMIM (On-line Mendelian Inheritance in Man)
 - ~6000 klinicky významných fenotypů
- čtyři základní typy dědičnosti:

	dominantní	recesivní
autosomální	autosomálně dominantní (AD)	autosomálně recesivní (AR)
X-vázaný	X-dominantní (XD)	X-recesivní (XR)

Monogenní nemoci

- typy přenosu
 - autozomální
 - geny na obou autozomech aktivní
 - gonozomální (X-chromozom vázané)
 - muži hemizygotní
 - u žen 1 X-chromozom inaktivován!!
 - jiné
 - imprinting, mozaicismus, ...
- podle projevu genotypu ve fenotypu
 - recesivní
 - nemoc jen u mutovaného homozygota
 - dominantní
 - nemoc stejná u heterozygota a mutovaného homozygota
 - neúplně dominantní
 - odstupňovaná tíže nemoci u heterozygota a mutovaného homozygota
 - kodominantní
 - jak normální tak patologická alela jsou vyjádřeny ve fenotypu



Monogenní nemoci - AR

- u heterozygotů s 1 mutovanou alelou stačí produkt k udržení normální funkce
- manifestní onemocnění u heterozygota je důsledkem:
 - haploinsuficience - pro normální funkci je potřeba >50% aktivního genového produktu
 - dominantě negativního efektu - syntéza abnormálního proteinu, který “soutěží” s normálním a ovlivňuje fenotyp (např. osteogenesis imperfecta)
 - zesílení funkce (“gain-of-function”) - mutací je posílena přirozená vlastnost proteinu
 - ztráty heterozygozity (loss-of-heterozigosity, LOH) v somatické buňce - např. familiární predispozice k nádorům v důsledku mutací v supresorových genech (např. retinoblastom)
- velmi často enzymové defekty
- postižen je mutovaný homozygot (popř. sourozenci), heterozygotní rodiče jsou přenašeči (asymptomatictí) - riziko $0.50 \times 0.50 = 0.25$
- frekvence přenašečů nemoci v populaci $\gg \gg$ frekvence nemocných
- nejčastější AR nemocí u bělochů je cystická fibróza (f nemocných 1/2000, f přenašečů 1/22)
- konsanguinita (příbuzní rodiče) a geneticky izolované populace (např. Aškenazi židé – Tay-Sachsova choroba)

Monogenní nemoci - AD

- nemoci jsou důsledkem jak mutací přenášených mezi generacemi tak vzniklých nově
- nemoc se projevuje v každé generaci - postižený jedinec má postiženého rodiče (a prarodiče), a to matku nebo otce
- riziko pro potomka 0.50 (pokud by byli oba rodiče postižení pak 0.75, ale to je vzácné)

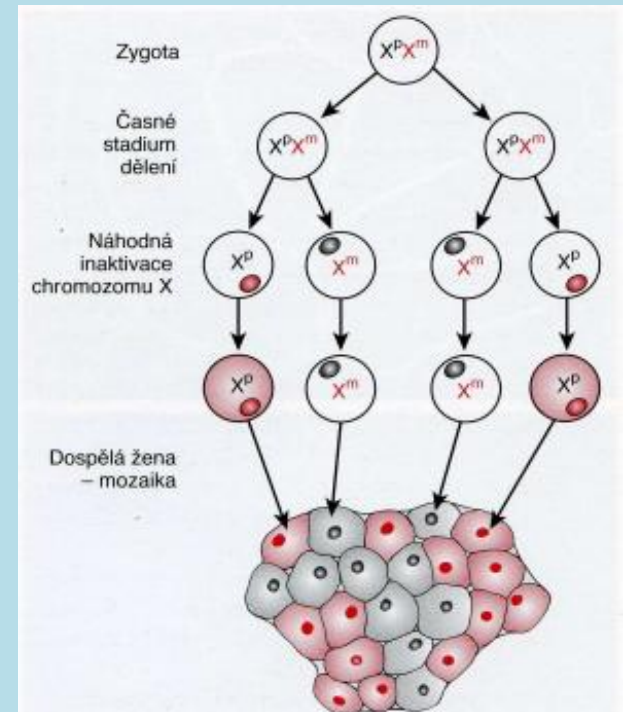
- familiární hypercholesterolemie (1/500),
- myotonická svalová dystrofie (1/1000)
- Huntingtonova chorea (1/3000)

Monogenní nemoci - X-vázané

- ženy 3 genotypy, muži pouze 2
 - X-vázané nemoci se manifestují u všech mužů, kteří zdělili mutaci, a pouze u homozygotních žen
 - hemofilie A
 - Duchenneova muskulární dystrofie
 - Wiskott-Aldrichův syndrom (imunodeficiency)
-
- existují rozdíly v genové expresi mezi alelami, které se nacházejí na chromosomech, zděděných od otce a od matky – jsou důsledkem genomového imprintingu (metylace chromatinu, různý metylační vzor na chromosomu mateřského a otcovského původu, dochází k ovlivnění exprese genů, nedochází ke změně sekvence DNA)

Monogenní nemoci - X-vázané

- inaktivace X-chromozomu u žen
 - kompenzace dávky a exprese X-vázaných genů
 - hypotéza Lyonové (“lyonizace”)
 - v somatických b. je 1 X inaktivovaný a v interfázi se zobrazuje jako “Barrovo” tělíčko (viz sporné identifikace pohlaví)
 - proces je náhodný, může se týkat jak otcovského tak mateřského X
 - “manifestující přenašečka” - u heterozygotních žen je důsledkem buněčný mozaicismus (př. X-vázaná anhidrotická ektodermální dysplazie - chybí potní žlázy). Pokud žena je heterozygotní pro některou X- vázanou recesivně dědičnou chorobu, může se tato choroba u ní klinicky projevit. Porucha tam, kde zůstal aktivní defektní X chromozom



Obrázek 5.16 Hypotéza Lyonové o náhodné inaktivaci X chromozomu v ženských somatických buňkách. X^P = paternálně zděděný chromozom X, X^m = maternálně zděděný chromozom X. Šedé nebo červené ovály představují tělíska Barrové, vytvořená z inaktivovaného paternálního, respektive maternálního chromozomu. Dospělé tkáně (dole) jsou mozaikou populací klonů, exprimujících alely buď z X^P , nebo z X^m . (Upraveno podle Rosenberga LE Inborn errors of metabolism, z Bondy PK, Rosenberg LE (ed.) Metabolic control and disease, 8. vyd., WB Saunders 1980, Philadelphia, s. 73-102.)

Komplexní nemoci

- multifaktoriální, multigenní
- roli hrají kombinace určitých genů a určitých faktorů zevního prostředí
- Na odhalení nejobecnějších principů genetiky multifaktoriálních nemocí se na rozdíl od genetiky nemocí mendelistických v současné době stále ještě čeká.
- v klinické praxi často kolísá názor na výsledky genetických studií, které se snaží odhalit genetický podklad komplexních nemocí, od neodůvodněného očekávání nad nalezenými geny velkého účinku až po velkou skepsi vzhledem k existenci genetického podkladu v populaci četných nemocí (nad 1%), jako je v kardiologii např. esenciální hypertenze.
- pokud choroba má prokazatelně familiární výskyt, musíme očekávat podíl genetického podkladu na její manifestaci, a to i v tom případě, že není dosud dobře definován nebo dosavadní znalost nepovažujeme za přesvědčivou.
- Své genetické pozadí mají i tak relativně vzdálené proximální fenotypy, jako je např. kvalita života u nemocných s chronickým kardiovaskulárním onemocněním.

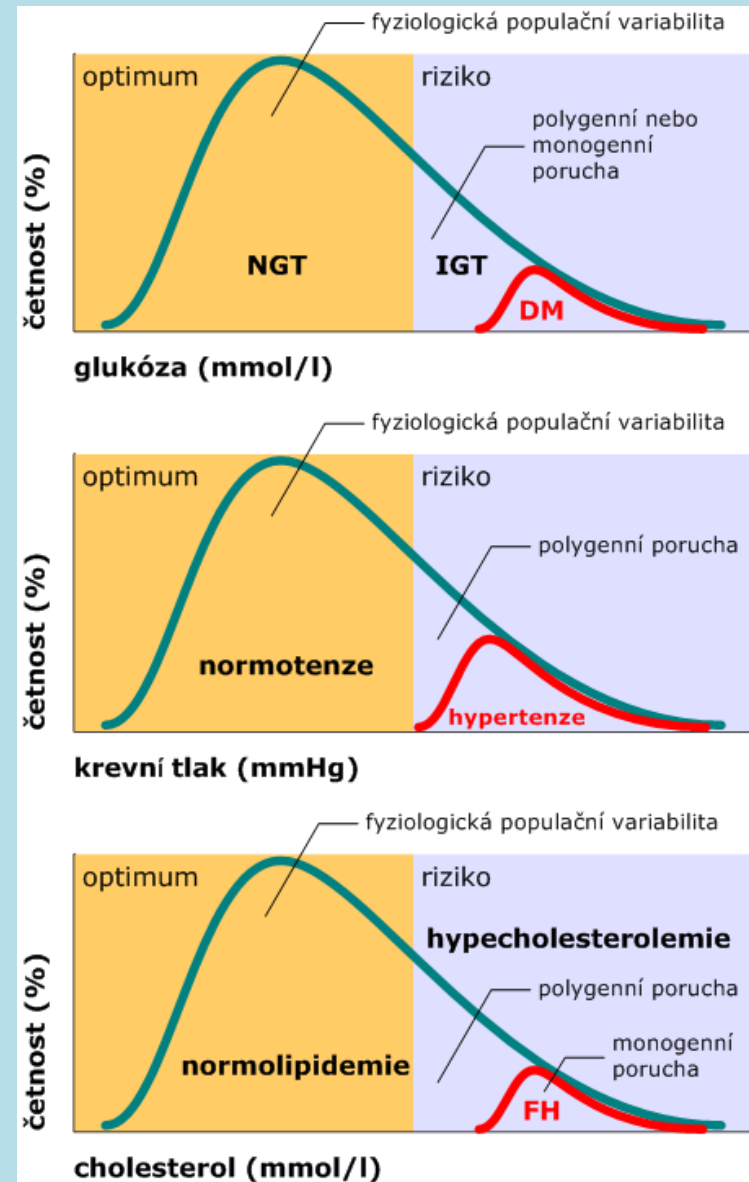
Každá choroba má nějaké genetické pozadí, jehož podíl na manifestaci dané choroby je různý.

Komplexní nemoci

- komplexní onemocnění jsou charakterizována:
 - neúplnou penetrancí patologického fenotypu
 - u určité části osob, přestože zdědí nevýhodný genotyp (zde ve smyslu souboru vícero genů) se patologický fenotyp nerozvine
 - existencí fenokopí
 - patologický fenotyp může být přítomen u lidí, kteří nejsou nosiči zmíněného genotypu
 - genetickou heterogenitou (lokusovou a alelickou)
 - klinický obraz není specifický, ale může se rozvinout v důsledku záměn v genech ležících na různých lokusech (= lokusová heterogenita), v jednotlivých genech může být přítom vícero mutací či polymorfizmů (= alelická heterogenita)
 - polygenní dědičností
 - predispozice k rozvoji patologického fenotypu se zvyšuje pouze při simultánním výskytu určitého souboru alel
 - vysokou populační frekvencí alel zodpovědných za rozvoj patologického fenotypu
 - každá jednotlivá predisponující alela pravděpodobně není sama o sobě výrazně patogenní
 - spolupůsobením dalších mechanismů přenosu
 - mitochondriální dědičnost, imprinting

Komplexní choroby

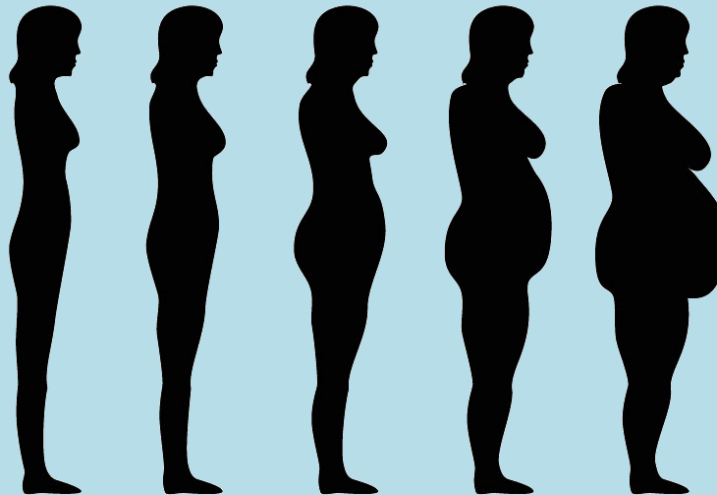
- choroby, na jejichž vzniku a progresi se podílí „komplex“ genetických, epigenetických a vnějších faktorů
 - fenotyp nevykazuje klasickou mendelistickou dominantní či recesivní dědičnost jako důsledek změn v jediném lokusu (tzv. jednolokusových)
- **predisponující „geny“** zvyšují pravděpodobnost onemocnění, ale nedeterminuje jednoznačně jeho přítomnost
 - je nutné spolupůsobení negenetických faktorů (**prostředí**)
 - dieta, fyzická aktivita, kouření,
 - a **interakcí genů** mezi sebou
- nejčastější komplexní nemoci
 - diabetes (1. i 2. typu)
 - dyslipidemie
 - esenciální hypertenze
 - alergie



Komplexní nemoci

Obezita – Hypotéza typu „thrifty genotype“

- V současné populaci jsou selektovány alely, které favorizují přírůstek váhy a skladování tuků, aby byl zajištěn dostatek živin pro častá období nedostatku potravy.
- Při konstantně vysoké nabídce potravy a poklesu fyzické aktivity tato predispozice vede k pandemii obezity v rozvinutých zemích.



	JEDNOLOKUSOVÉ NEMOCI	KOMPLEXNÍ NEMOCI
Závažnost
.....
.....
.....
.....
.....

Obsah přednášky

- Struktura lidského genomu
- Reakce lidského genomu na vlivy prostředí. Exonové, intronové a promotorové mutace.
- Monogenní a polygenní choroby a vztah multigenních nemocí a prostředí.
- Genetické studie a klinická genetika.

Genetické studie

- Základní debata nad genetickým podkladem nemocí logicky začíná od strategie výběru tzv. **kandidátních genů**. Tato otázka je podstatně jednodušší u mendelisticky děděných nemocí, kde se změněná funkce jednoho genu snadněji identifikuje.
- **Celogenomové asociační studie** (GWAS = Genome-Wide Association Study) vyhledávají polymorfismus jednotlivých nukleotidů nebo běžné genové variace, které se typicky chovají jako ukazatelé genových oblastí s malým efektem u stoupajícího rizika nemocí.
- Dalším významným momentem je výběr statistické metodologie, která zhodnotí sílu asociace genů s chorobami. Možnosti jsou v zásadě dvě: **linkage (vazebná) analýza a asociační studie**. K detekci specifických genetických oblastí a genů, které se účastní v transmisi nemoci, je v principu možné použít obě metody.

Genetické studie

Kandidátní geny

- s intermediálním fenotypem
- s klinickou manifestací nemoci
- s klinickou závažností nemoci
- s odpovídavostí nemoci na léčbu

Linkage (vazebná) analýza

- testuje kosegregaci genového markeru a fenotypu nemoci v rodině. Čili marker a nemoc se v dané rodině mají vždy vyskytovat spolu.

Genetické studie

Asociační studie

- vyšetřují související markeru a nemoci na populační úrovni, tj. u nepříbuzných jedinců, obvykle srovnáním frekvencí markerů u nepříbuzných nemocných a kontrolních subjektů (studie case-control).
- Statistickou sílu asociace je možno dále zvýšit obohacením o další kritéria, jako jsou klinické subtypy nemoci (studie case-case), závažnost nemoci, časný začátek nemoci, rizikové faktory pro nemoc včetně pohlaví a vhodné biologické znaky (např. plasmatické hladiny cytokinů při asociaci genetických polymorfismů v cytokinových genech; studie genotyp-fenotyp).

Klinická genetika

- **zabývá se diagnostikou, léčením a prevencí genetických nemocí**
- **genetické poradenství**
- **vrozené vývojové vady** - poruchy utváření orgánů, které vznikly v období nitroděložního života, i poruchy funkční (např. duševní opoždění) a poruchy na úrovni biochemické a molekulární (např. vrozené vady metabolismu).

Skupina	Příčina	Zastoupení
Primárně (geneticky)	chromozomální aberace	10 %
	monogenní dědičnost	20 %
Sekundárně (prostředí)	léky, infekce, záření	5 %
	porodní poranění	12 %
	infekce po narození	7 %
Neznámé (multifaktoriální)	geny + prostředí	46 %

Klinická genetik

Prenatální diagnostika

- zahrnuje vyšetřovací postupy směřující k vyhledávání statisticky významné odchylky ve struktuře nebo funkci, která přesahuje hranice fenotypové variability
- umožňuje v závažných případech ukončení gravidity, u dalších je možno v předstihu plánovat optimální perinatální péči.



Rizikové faktory:

- věk matky v době porodu je vyšší jak 35 let
- Součet věku rodičů nad 70 let
- pozitivní biochemický screening z krve matky
- ultrazvukový nález, který zvyšuje riziko přítomnosti chromozomální aberace (nahromadění tekutiny v podkoží, nepřítomnost nosní kůstky, srdeční vada plodu aj.)
- přítomnost chromozomální aberace v rodině



Klinická genetika

Vyšetření karyotypu plodu

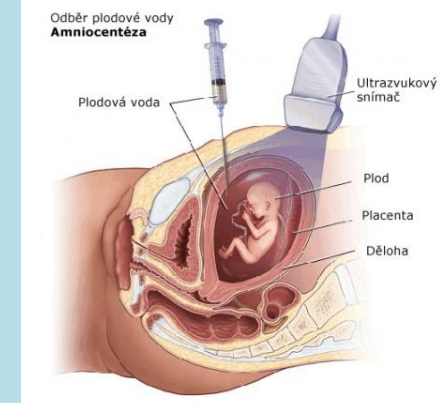
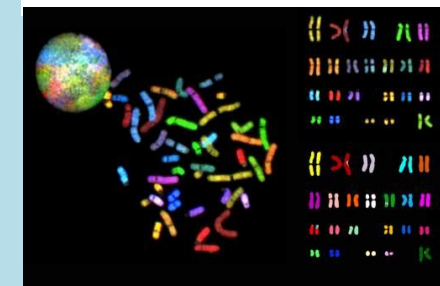
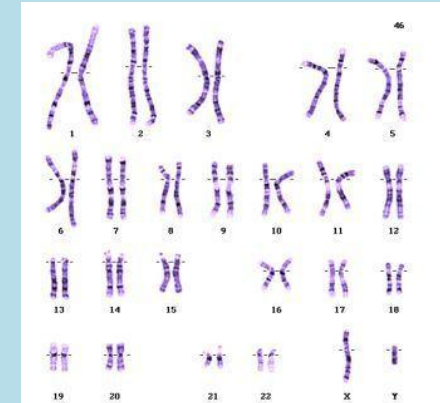
- invazivní metody - amniocentéza, biopsie choriových klků, kordocentéza
- genetické vyšetření, přesněji **vyšetření cytogenetické** (neboť se vyšetřují chromozomy), ovšem nejedná se o test DNA

FISH – fluoresceční hybridizace in situ

- vazba denaturované sDNA se specifickou sondou

AmnioPCR je moderní metoda sloužící ke genetickému vyšetření plodu.

- porovnání DNA markerů matky i plodu → stanovení počtu jednotlivých chromozomů u plodu.
- výsledek je následně potvrzen klasickým cytogenetickým vyšetřením
- K dispozici je v současné době vyšetření 21. chromozomu - amnioPCR, nebo sada vyšetřující chromozomy 13,18, 21, X a Y- tzv. multiamnioPCR.



Klinická genetika

Stanovení pohlaví plodu

- volné fetální DNA kolující v krvi matky
- neinvazivní s přesností ~98 %
- od 10. týdne těhotenství
- DNA plodu z venózní krve matky
- z klinického hlediska je určení pohlaví plodu důležité v případě rizika nějaké genetické choroby vázané na určité pohlaví (např. hemofilie).



Preimplantační diagnostika

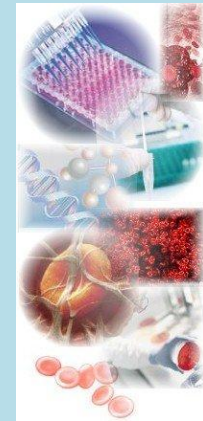
- metodu časně prenatalní diagnostiky, která je vázána na techniky umělého oplodnění. Za účelem minimalizace chyby genetického vyšetření je třeba k oplozování vajíček použít metody intracytoplazmatické injekce spermie
- buňky pro genetické vyšetření jsou odebírány z embrya nejčastěji ve stadiu 8 buněk nebo blastocysty

Postnatální diagnostika

- např. trombofilie , cystická fibróza...



Klinická genetiká



Trombofilie

- vrožený sklon ke zvýšenému srážení krve
- může být v některých případech pro své nositele výhodná (omezení ztrát krve při poranění)
- i příčinou různých komplikací v těhotenství, při dlouhodobém znehybnění nebo při užívání některých léků může způsobit hlubokou trombózu či plicní embolii
- genetické vyšetření u: gravidních, před začátkem užívání hormonální antikoncepce, před chirurgickým zákrokem

- **Leidenská mutace** – mutace genu pro inhibitor koagulace faktor V - riziko trombembolie ~30 %, genová mutace rs6025 G1691A, R506Q (arg→gln), AD

- **Defekt antitrombinu (FII)** - mutace koagulačního faktoru II zvyšujícího hladinu protrombinu – riziko trombembolie ~70 – 90 %, genová mutace rs1799963 G20210A

- **Hyperhomocysteinemie** - mutace enzymu konvertujícího kyselinu listovou – metyltetrahydrofolátreduktáza (MTHFR) - projeví při nedostatku vitaminů B6, B12 a kyseliny listové, genová mutace rs1801133 C677T, AR

Klinická genetika

Cystická fibróza

- více než 30 mutací, které způsobují toto onemocnění

důvody k vyšetření jsou:

- podezření na klinické onemocnění
- příbuzenský vztah rodičů
- opakované potraty
- léčená neplodnost

