

Molekulárně genetická diagnostika:



Iveta Valášková

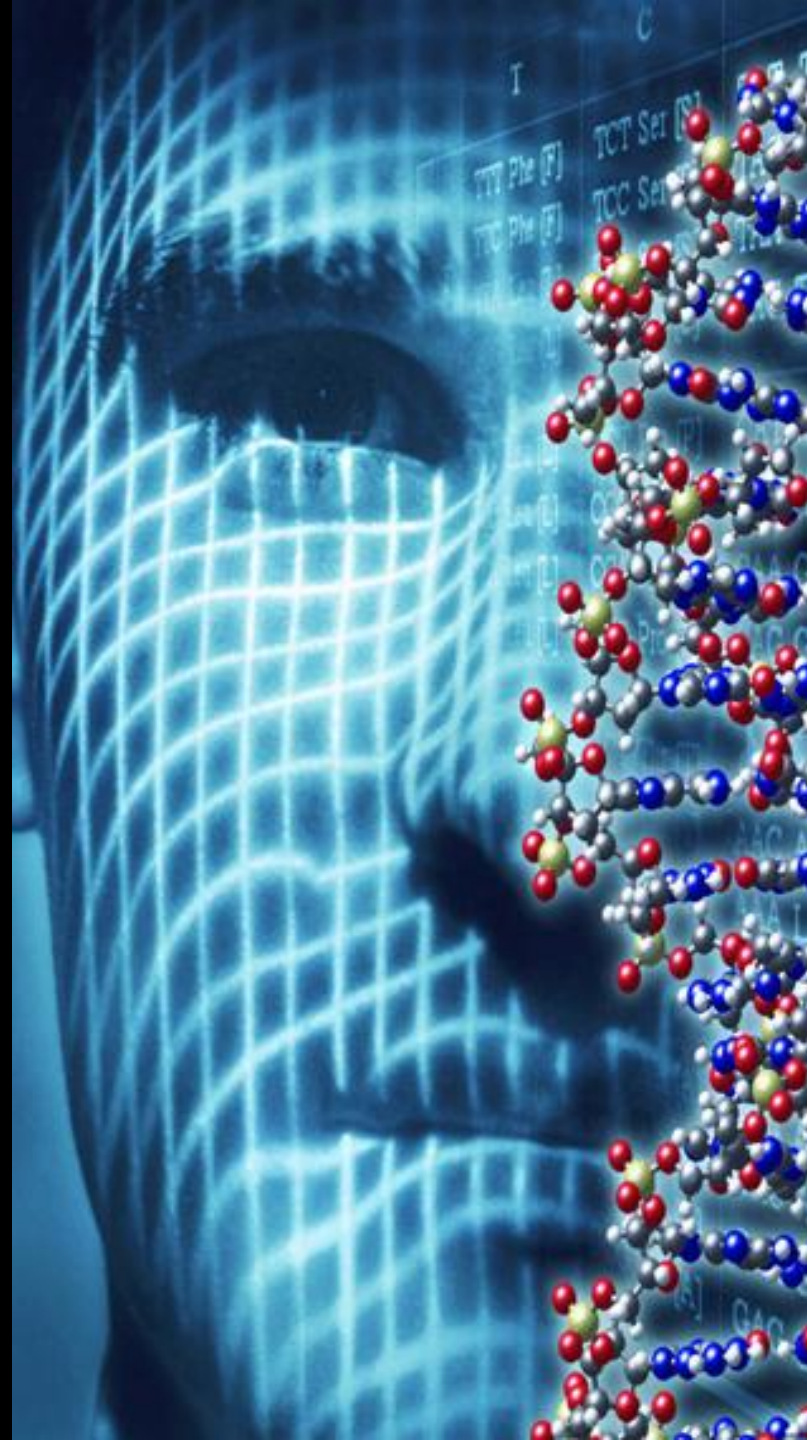
Oddělení lékařské genetiky FN Brno

Lékařská fakulta MU

Budoucnost medicíny: tahounem bude genetika

Prof. MUDr. Antonín Doležal, DrSc.

30. prosince 2008, MF Dnes



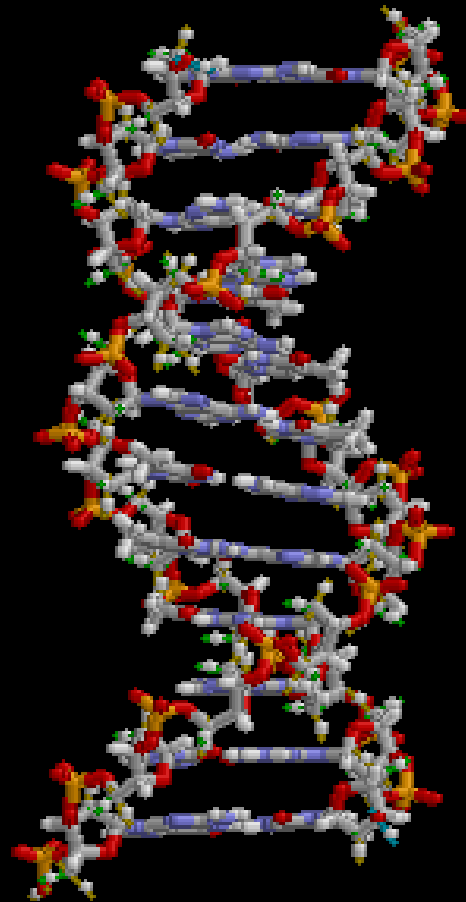
DNA

deoxyribonukleová kyselina

je nositelkou genetické informace všech organismů

je pro život nezbytnou látkou

je molekulární paměť
disponující úžasnou kapacitou



ve své struktuře kóduje a zadává
buňkám jejich program
a tím předurčuje vývoj
a vlastnosti celého organismu



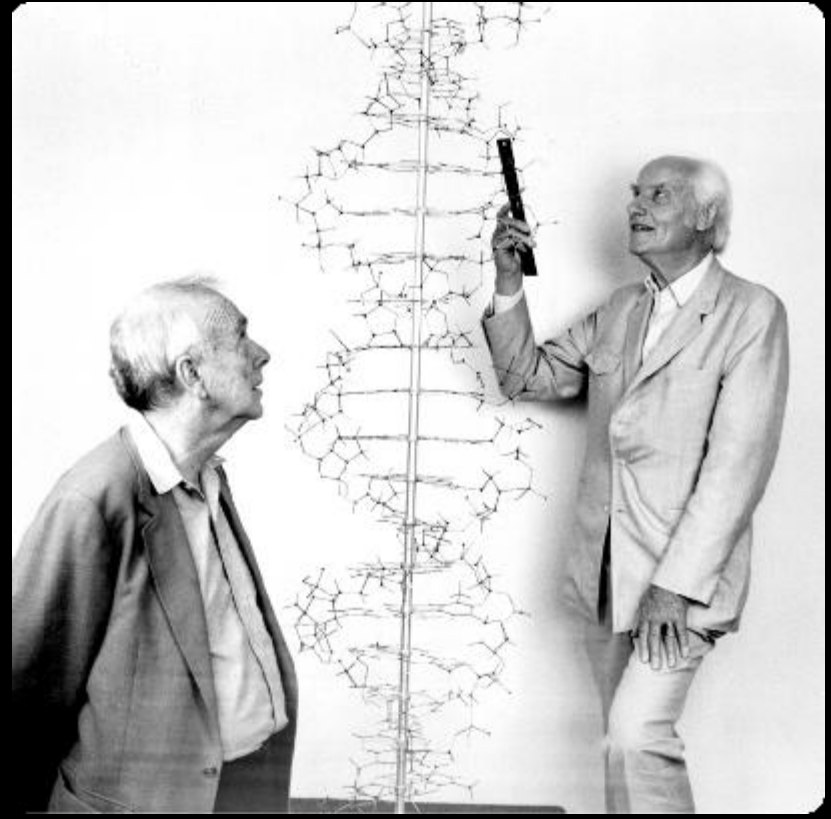
So what are you
thinking about
James?

Oh I just have an
idea...



James Watson Francis Crick

„We have discovered the secret of life!“





Rosalind Franklin



**Crick and Watson's
DNA molecular model, 1953.**

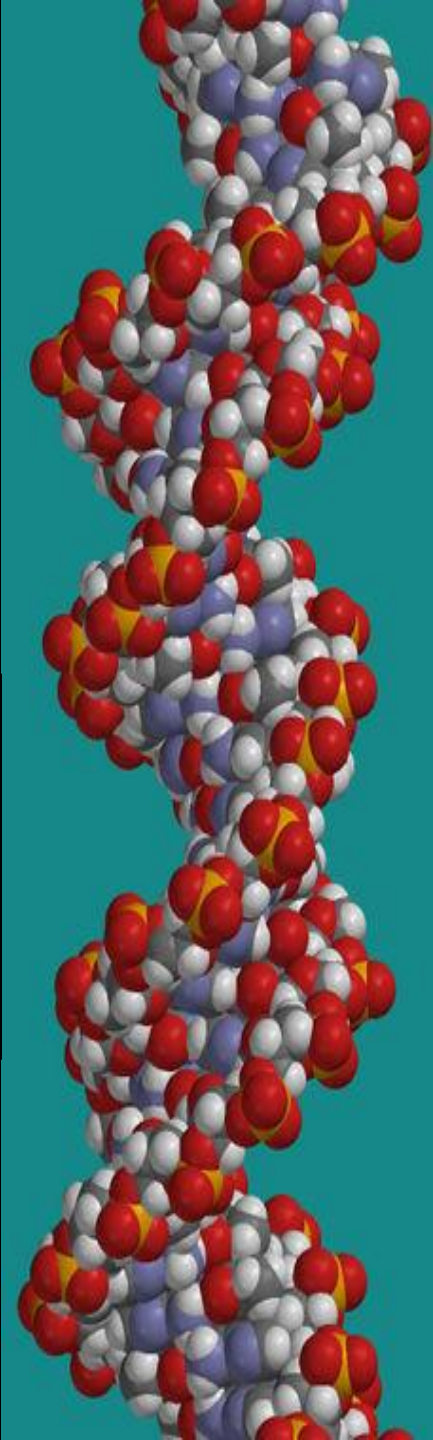
"Watson and Crick staring up at their model of the Double Helix is one of the most iconic pictures of the 20th Century. A replica of the model now gathers dust in a glass case in a dark corner of the top floor of the Science Museum. Here, a man glances at it as he walks past. Does he know the story?"

Dave Kinahan.

biologická makromolekula

Biologická makromolekula čili biomakromolekula nebo **biopolymer** je obecně látka vzniklá v organismu kondenzací z více stejných či různých nízkomolekulárních látek

Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v řádech tisíců až milionů.
Z chemického hlediska jde **nukleové kyseliny, proteiny a polysacharidy**

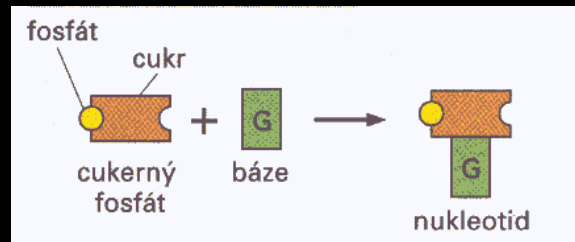
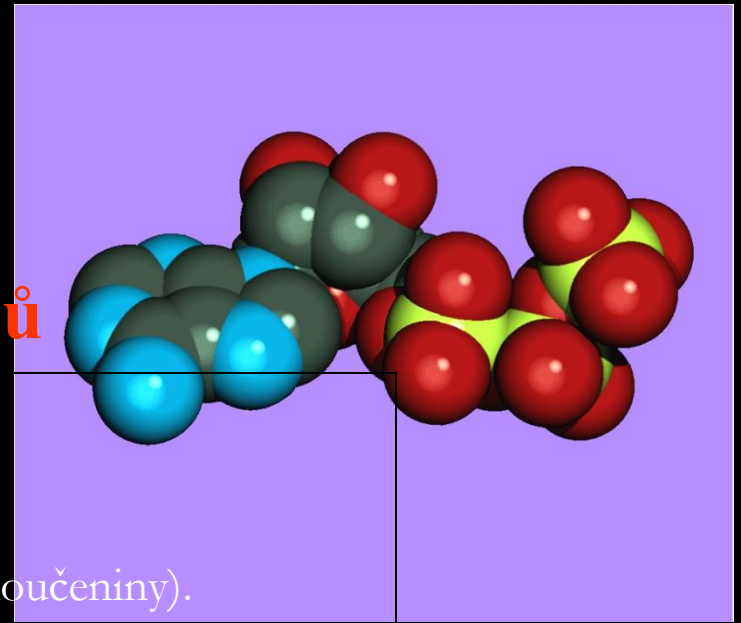


DNA

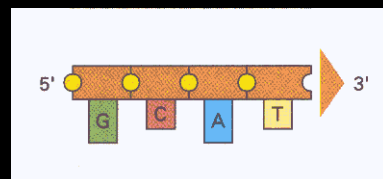
- je tvořena čtyřmi typy **nukleotidů**

skládají se ze tří složek:

- **fosfátu** (vazebný zbytek kyseliny fosforečné)
- **deoxyrybózy** (pětiuhlíkový cukr-pentóza)
- **nukleové báze** (konkrétní dusíkaté heterocyklické sloučeniny).



jsou kovalentně spojeny v polynukleotidovém řetězci cukerfosfátovou páteří, ze které vyčnívají jednotlivé báze



Nukleové báze

purinové báze - adenin(A)
guanin (G)

pyrimidinové báze - thymin - (T)
cytosin(C).

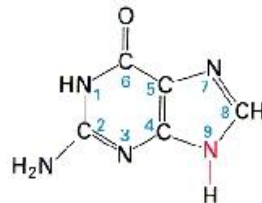
Purinové báze

adenin



Adenine (A)

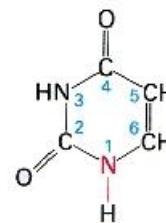
guanin



Guanine (G)

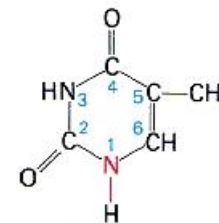
Pyrimidinové báze

uracil ... RNA



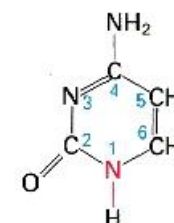
Uracil (U)

thymin ... DNA



Thymine (T)

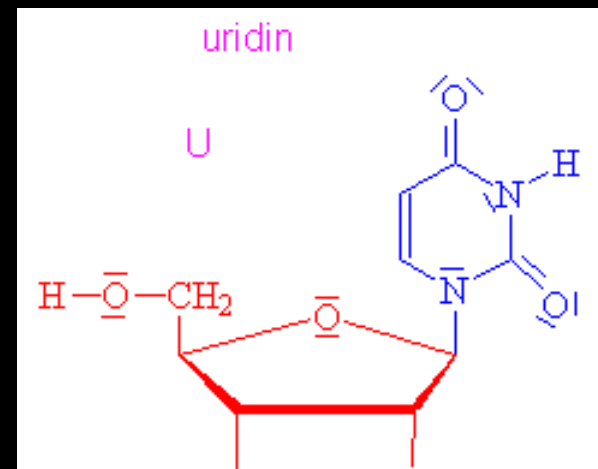
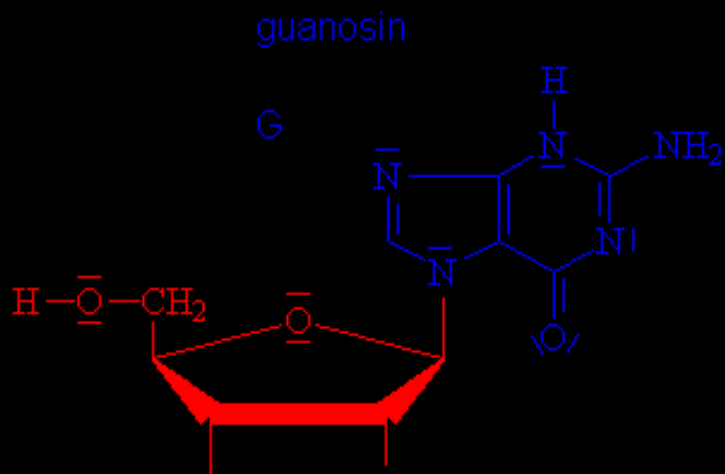
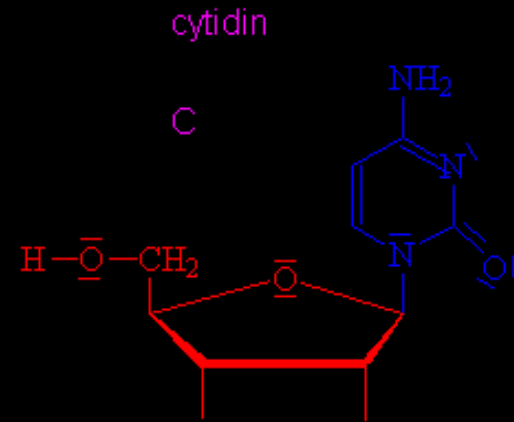
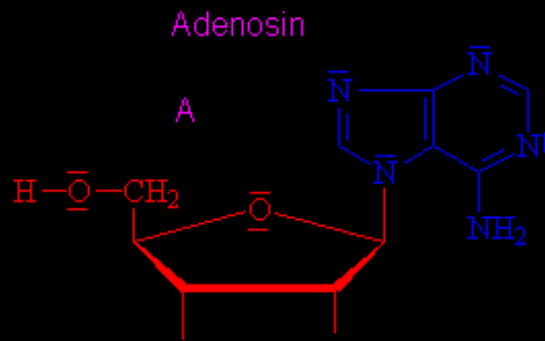
cytosin



Cytosine (C)

Nukleozidy

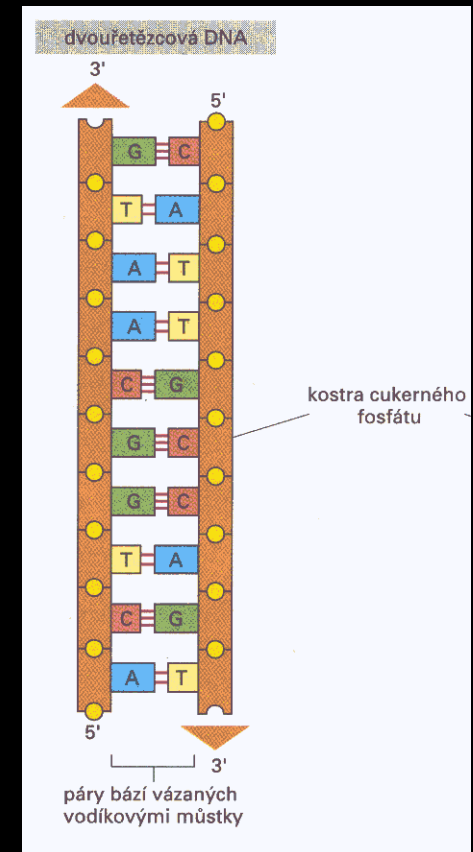
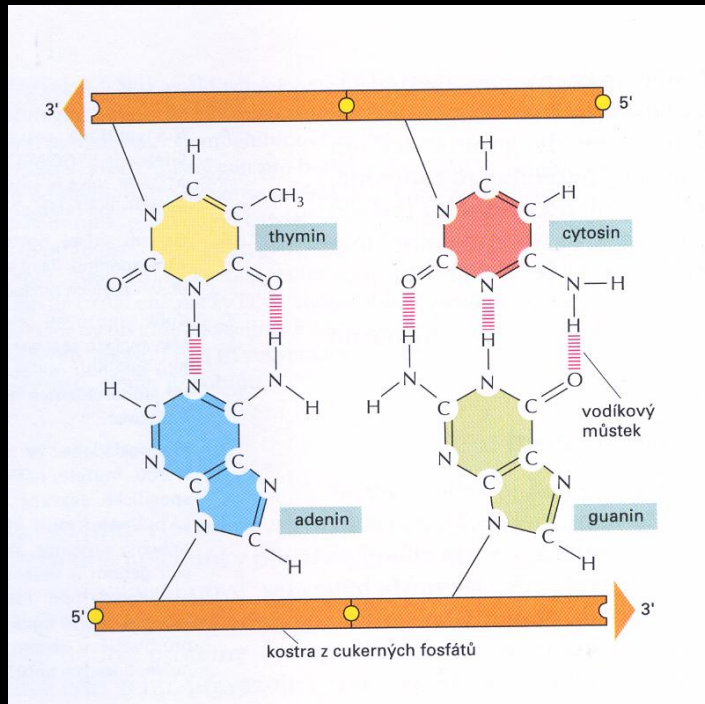
vznikají vazbou bází na 1 uhlík pentózy



DNA

Molekulu DNA tvoří dva polynukleotidové řetězce

jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky mezi páry bází



Šipky na řetězcích DNA označují jejich polaritu, obě vlákna jsou vůči sobě antiparalerní

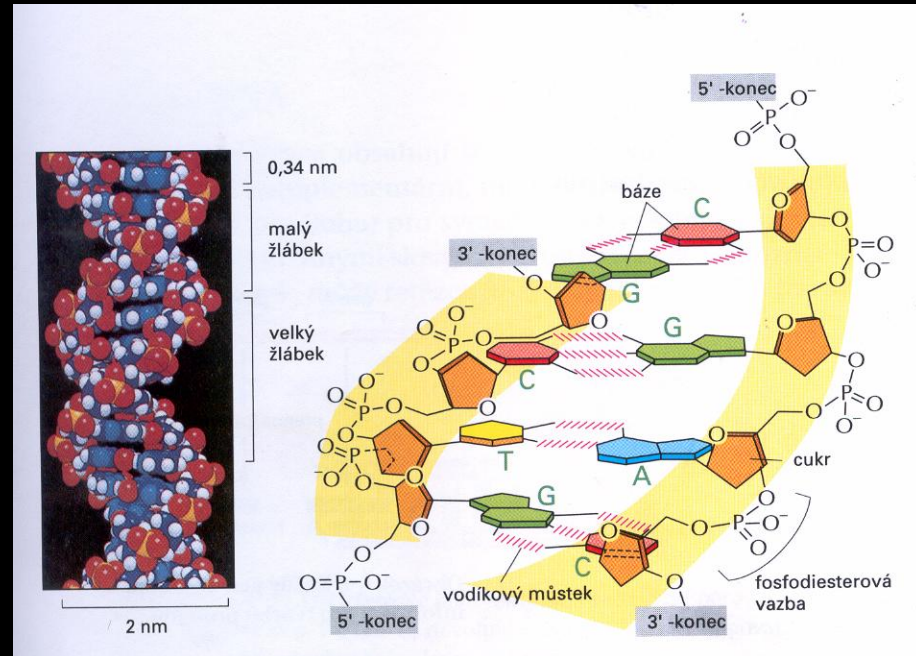
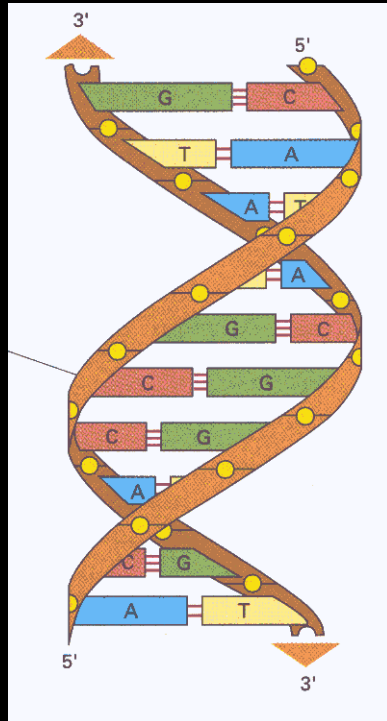
Komplementární páry bází

A-T dva vodíkové můstky

G-C tři vodíkové můstky

Báze se mohou párovat jen v případě, že jsou oba řetězce antiparalerní

Dvoušroubovice DNA

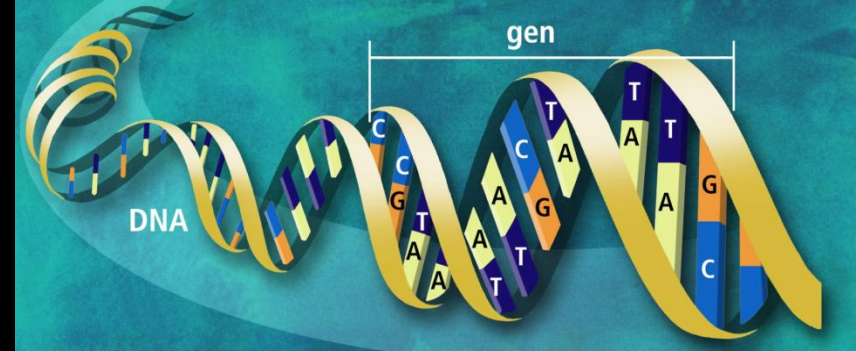


Nukleotidy jsou spojeny navzájem fosfodiesterovými vazbami

mezi 3 hydroxylovou skupinou (-OH) jednoho sacharidu
a 5 fosfátovou skupinou (-P) druhého sacharidu

Oba konce vlákna jsou chemicky odlišné každý polynukleotidový řetězec má jinou polaritu

Gen



- Každý gen podmiňuje vytvoření určitého konkrétního znaku

gen obsahuje informaci k tvorbě určitého proteinu

má určitou funkci
(katalyckou, regulační, stavební)

T.H.Morgan

vytváří konkrétní znak

Každý gen lze ztotožnit s určitým úsekem chromozomu

Morganovy zákony

- Geny jsou na chromozomech uspořádány lineárně za sebou,
Jejich umístění na daném chromozomu je neměnné
Každý gen má na chromozomu svoje místo - **lokus**
- Všechny geny, které se nacházejí na stejném chromozomu, jsou ve **vazbě**,
neboli vytvářejí **vazebnou skupinu**

□ Geny

□ Strukturární geny

obsahují informace o primární struktuře proteinů, popř. polypeptidů

➤ geny kódující proteiny se stavební funkcí

základní složky cytoskeletu a mezibuněčné hmoty
(tubulin, kolagen, elastin, aktin, myosin)

➤ geny kódující proteiny s biochemickou nebo fyziologickou funkcí

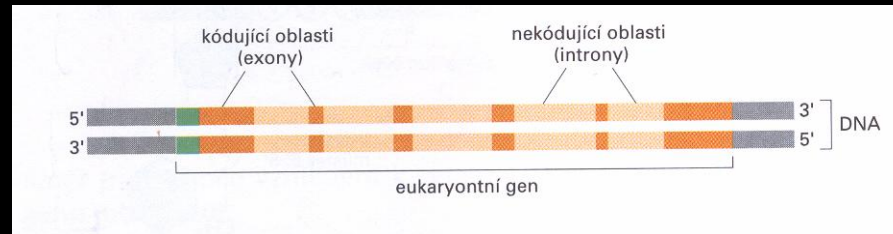
e1. zymy, buněčné receptory, regulační proteiny, protilátky, hormony

□ Geny pro funkční RNA

jejich transkripční produkty nepodléhají translaci

geny kódující tRNA a rRNA

Struktura genu

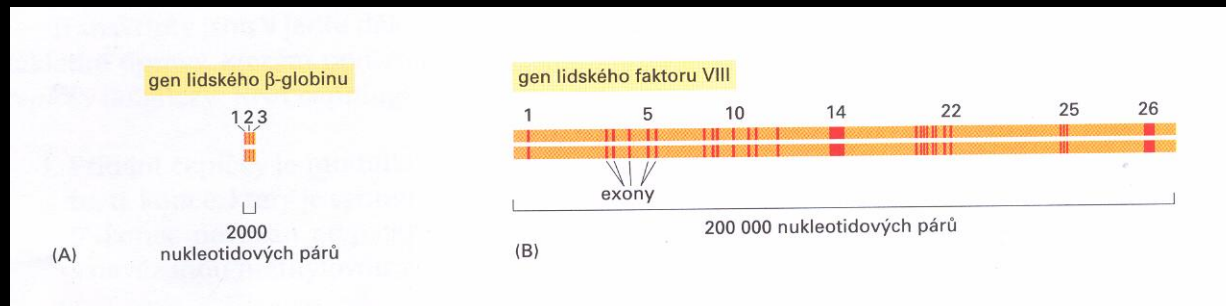


Exony

úseky kódujících sekvencí
jsou jen malým zlomkem délky celého genu

Introny

nekódující sekvence
nejsou překládány do proteinu
velikost 80-10 000 nukleotidů



Gen

Solitární gen:

- **v celém genomu v jediné kopii (asi polovina genů)**

Genová rodina:

- **skupina genů evolučně pocházející z jediného genu, v evoluci postupná diverzifikace sekvence a funkce**

Pseudogen:

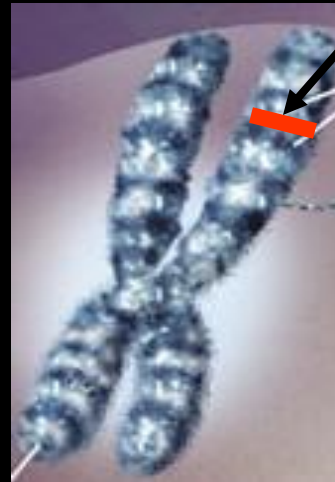
- **gen který zmutoval natolik že nemůže být přepisován (v celém genomu > 20 000)**

Zpracovaný (“processed”) pseudogen:

- **pseudogen vzniklý zpětným přepisem mRNA a integrací do genomu**

Alela

Každý gen se vyskytuje
v různých konkrétních formách
alelách



alela 1



alela 2

Alela
obsahuje „návod“ k vytvoření
určité konkrétní
podoby znaku

Alela

- **dominantní** - převažující
- **recesivní** - ustupující
- **kodominance** – alely se společně podílejí na konečné podobě znaku

Genotyp

Soubor alel daného jedince

Genotypy jedinců stejného druhu mohou být rozdílné

Fenotyp

Vnější projev genotypů
Soubor všech znaků organismu.

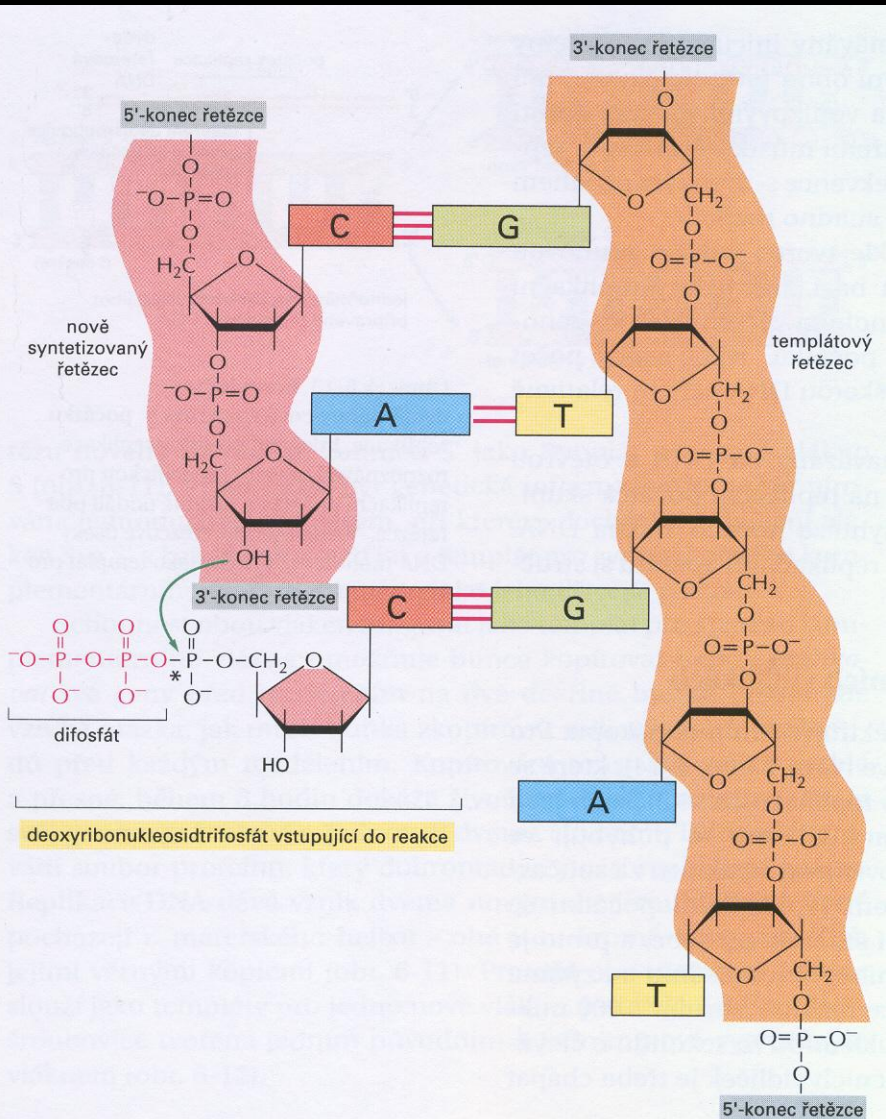
Homozygot

Jedinci se shodným párem alel příslušného genu

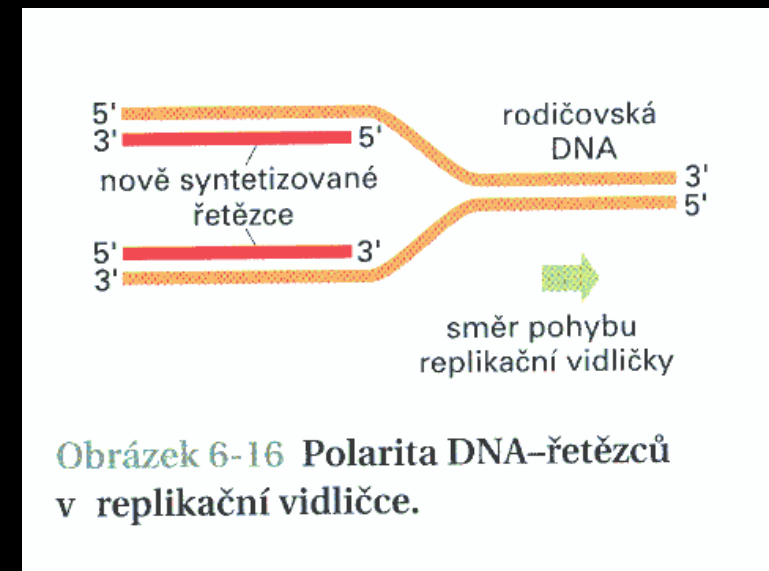
Heterozygot

Jedinci s odlišnými alami příslušného genu

Přenos genetické informace

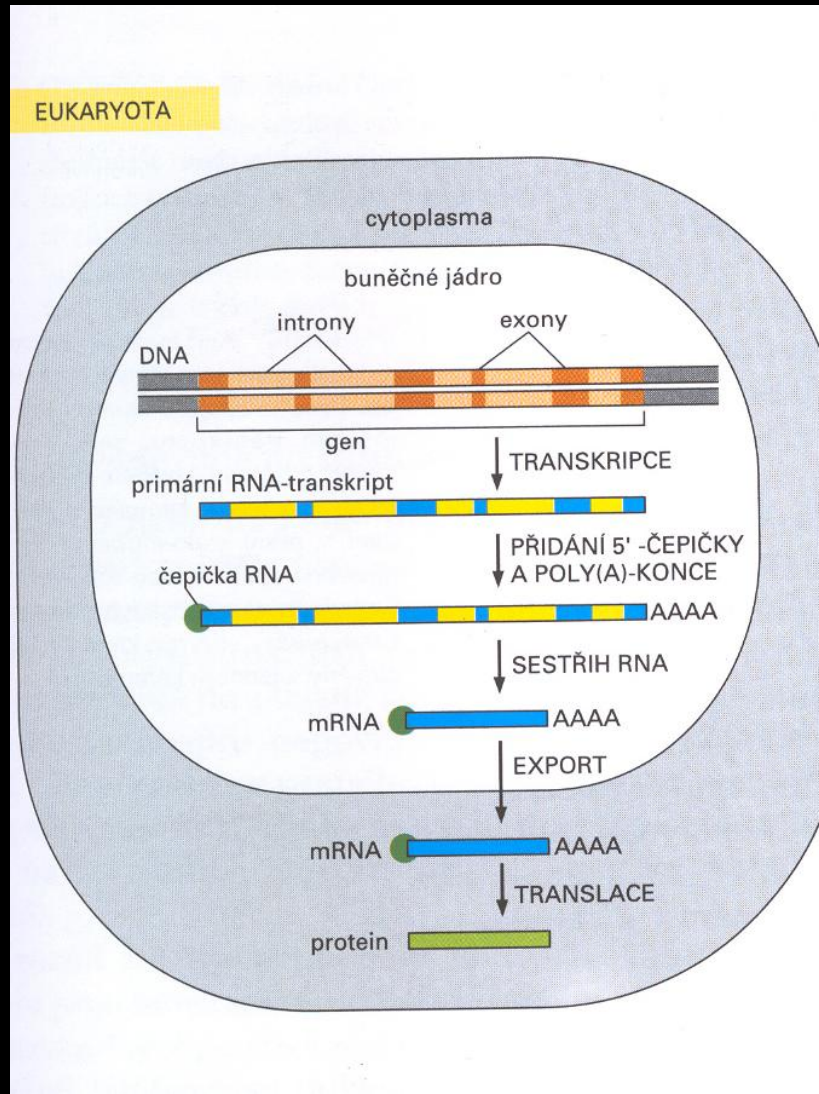


replikace DNA



Obrázek 6-16 Polarita DNA-řetězců v replikační vidličce.

Tok genetické informace

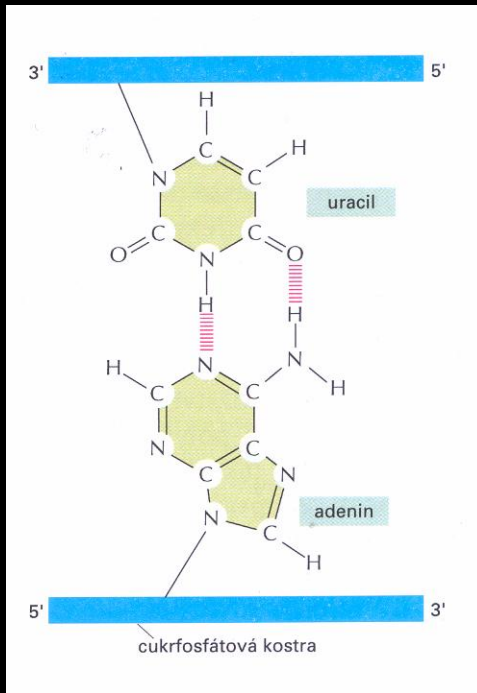
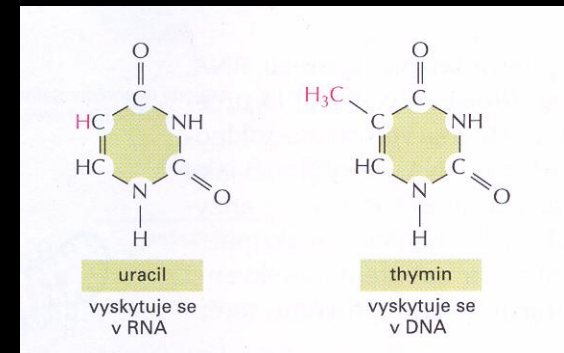
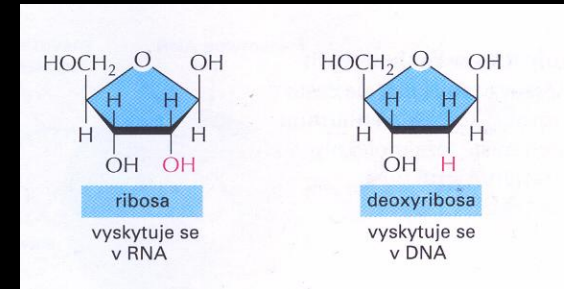


RNA

RNA se liší od DNA v těchto aspektech:

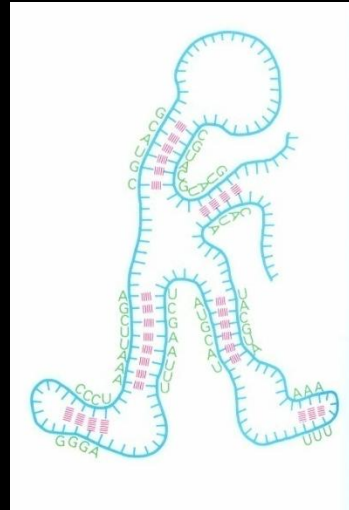
☐ nukleotidy v RNA se nazývají rybonukleotidy, protože cukernou složkou je ribóza

☐ v RNA se vyskytují báze adenin, cytosin, guanin, thymin nahrazen uracilem



RNA

jednořetězcová molekula
na základě párování bazí se může sbalit do různých tvarů



Typ RNA

mRNA

rRNA

tRNA

malé RNA

Funkce

kódování proteinů

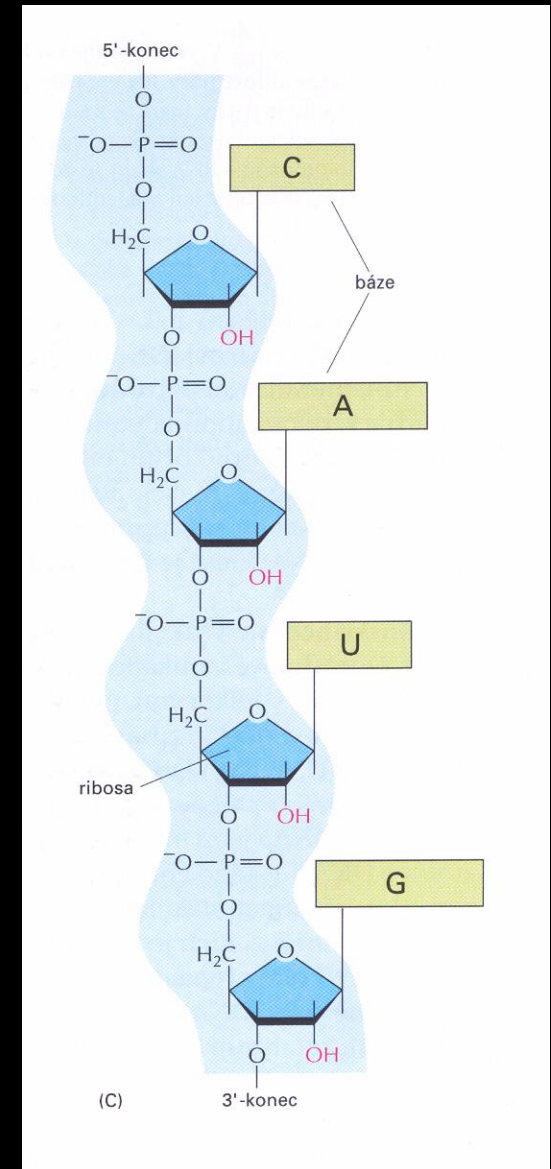
součást ribozomů, účast na proteosyntéze

adaptor mezi mRNA a aminokyselinou

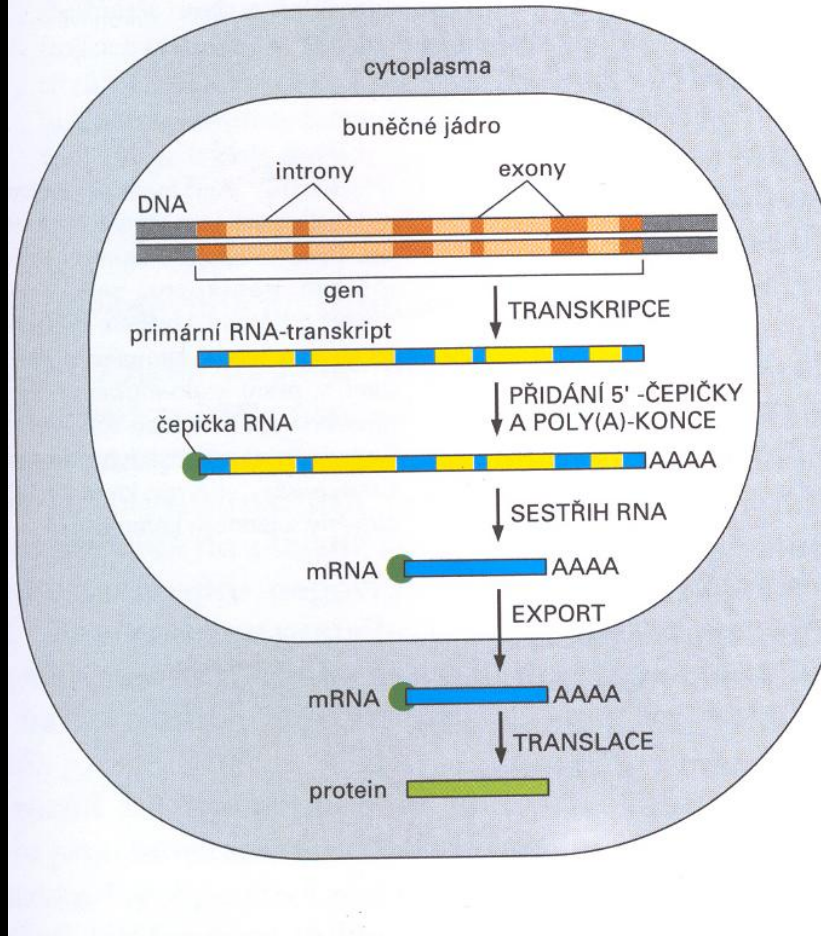
při proteosyntéze

účast na sestřihu pre-RNA,

účast na transportu proteinů do ER



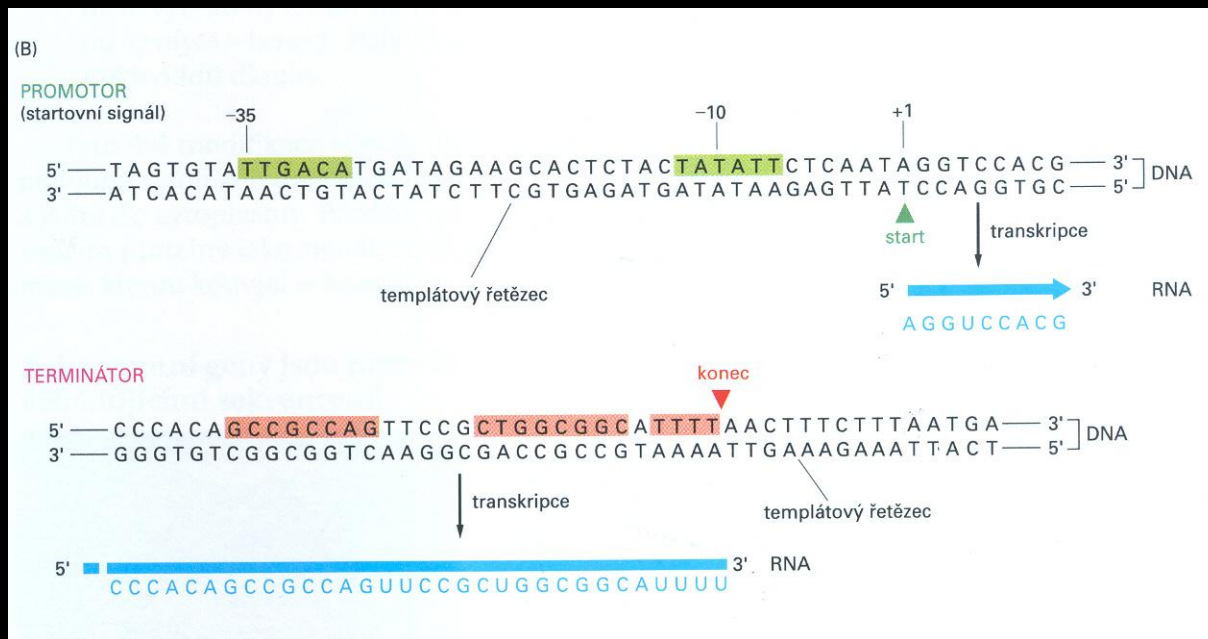
EUKARYOTA



Transkripce

Nukleotidové sekvence signalizují **RNA-polymeráze** začátek a konec transkripce

promotor
terminátor



Posttranskripční úpravy

RNA processing

Transkripcí vzniká primární transkript
upravován v jádře

1. Přidání čepičky

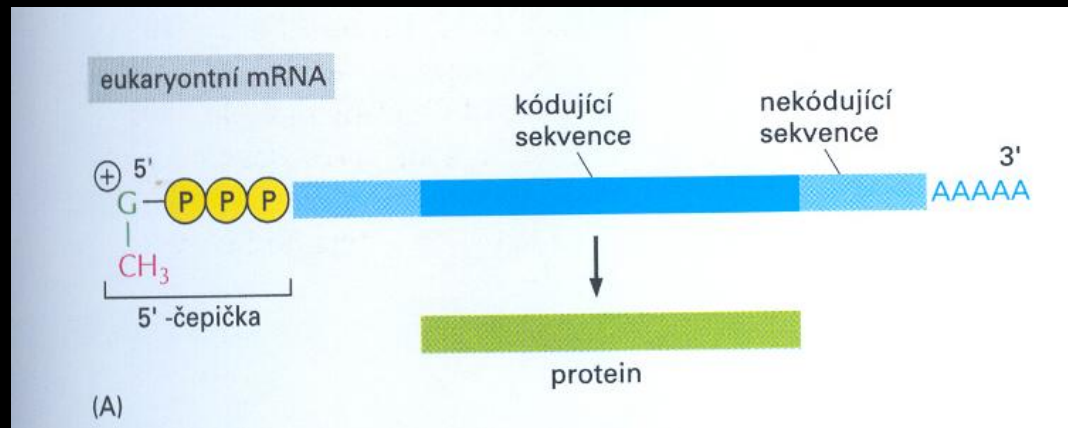
modifikace 5 konce primárního transkriptu

mnoho eukaryotních mRNA má modifikaci na 2 OH skupině skupině ribosy

2. Polyadenylace

odštěpení 3 konce primárního transkriptu,

je nahrazen přidáním několika adeninů (poly(A)konec)

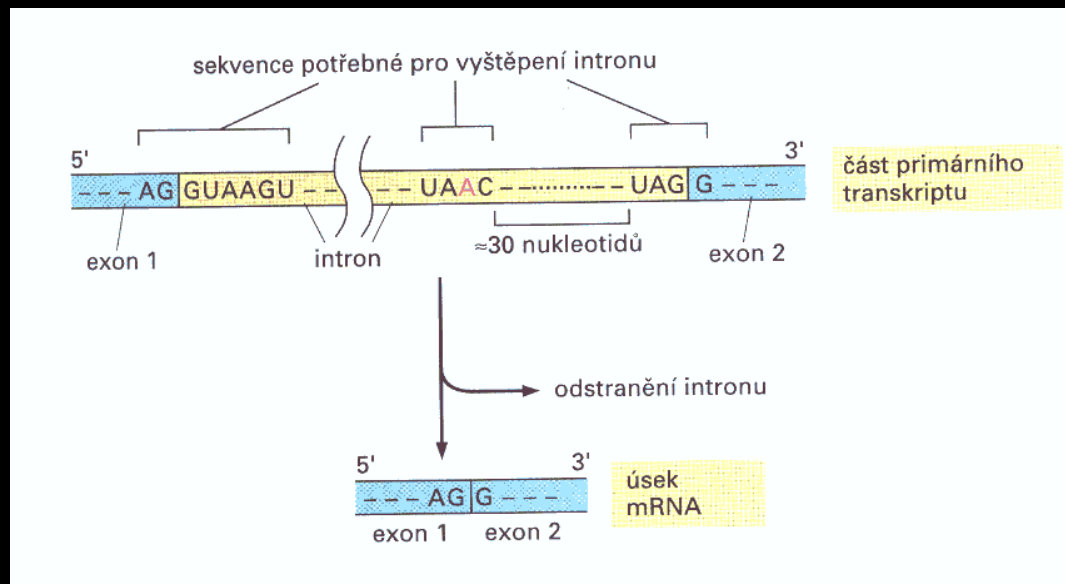


Sestřich RNA

RNA splicing

Z primárního transkriptu jsou vystřiženy všechny introny a exony jsou spojeny

Výsledkem je molekula mRNA, která obsahuje nepřerušenu kódující sekvenci



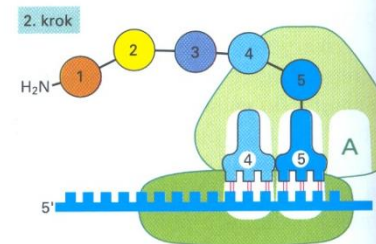
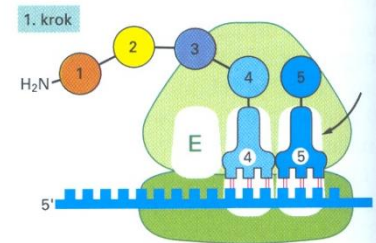
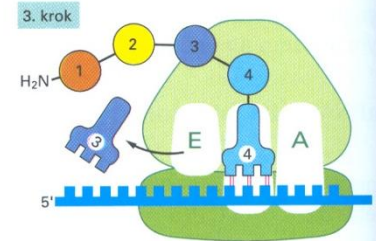
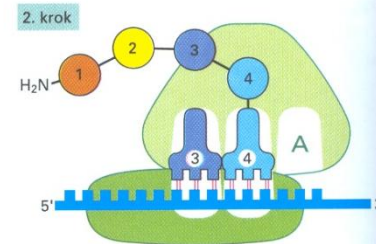
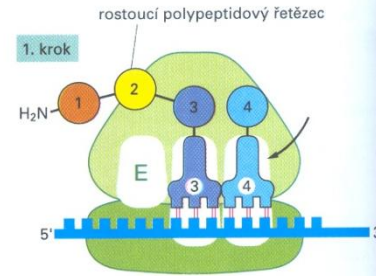
Tři nukleotidové sekvence jsou nutné k rozpoznávání a vyštěpení intronu

roznávanány snRNP částicemi, které rozštěpí exon-intronové hranice a spojí sousední exony

Translace mRNA

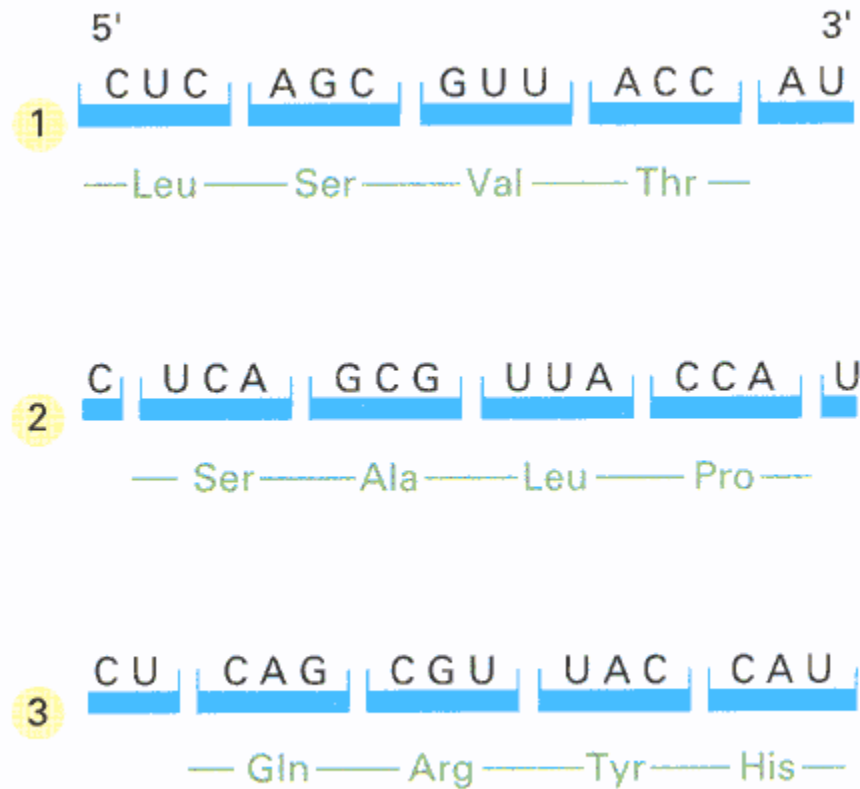
Tříkrokový cyklus:

1. krok
aminoacyl-tRNA navázána do rybosomu
2. krok
vzniká nová peptidická vazba
3. Krok
uvolnění tRNA bez navázané aminokyseliny



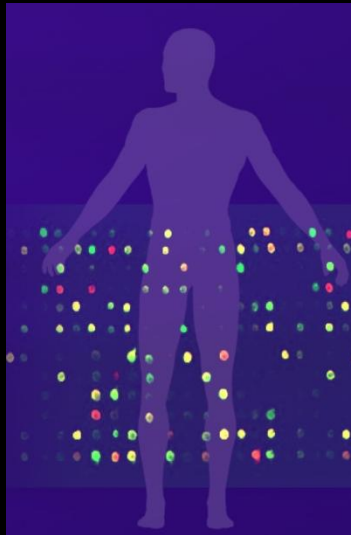
Čtecí rámce

Při translaci je nukleotidová sekvence mRNA čtena z 5 konce po trojicích nukleotidů



Genetický kód

- ❑ je reprezentován 64 kodóny
 - vyjadřuje 20 standardních aminokyselin
- ❑ je degenerovaný
 - táž aminokyselina je kódována několika kodóny
- ❑ kodóny UAA, UAG, AGA jsou nesmyslné
- ❑ je univerzální pro všechny organismy



Genetický kód

GCA	AGA										UUA					AGC						
GCC	AGG										UUG					AGU						
GCG	CGA						GGA			AUA	CUA			CCA	UCA	ACA						GUA
GCU	CGC						GGC			AUC	CUC			CCC	UCC	ACC						GUC
	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUU	CUU	AAA			CCG	UCG	ACG					UAC	UAA
	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	UUU	AUG	UUU			CCU	UCU	ACU	UGG	UAU			GUG	UAG
																					GUU	UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	stop		
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V			

Genetický kód

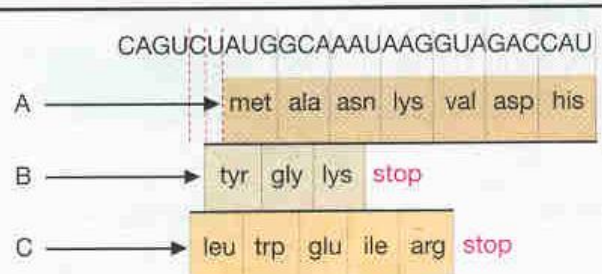
Nucleotide base					
First	Second				Third
	Uracil (U)	Cytosine (C)	Adenine (A)	Guanine (G)	
Uracil (U)	F Phenylalanine (Phe)	S Serine (Ser)	Y Tyrosine (Tyr)	C Cysteine (Cys)	U
	F Phenylalanine (Phe)	S Serine (Ser)	Y Tyrosine (Tyr)	C Cysteine (Cys)	C
	L Leucine (Leu)	S Serine (Ser)	Stop Codon	Stop Codon	A
	L Leucine (Leu)	S Serine (Ser)	Stop Codon	W Tryptophan (Trp)	G
Cytosine (C)	L Leucine (Leu)	P Proline (Pro)	H Histidine (His)	R Arginine (Arg)	U
	L Leucine (Leu)	P Proline (Pro)	H Histidine (His)	R Arginine (Arg)	C
	L Leucine (Leu)	P Proline (Pro)	Q Glutamine (Gln)	R Arginine (Arg)	A
	L Leucine (Leu)	P Proline (Pro)	Q Glutamine (Gln)	R Arginine (Arg)	G
Adenine (A)	I Isoleucine (Ile)	T Threonine (Thr)	N Asparagine (Asn)	S Serine (Ser)	U
	I Isoleucine (Ile)	T Threonine (Thr)	N Asparagine (Asn)	S Serine (Ser)	C
	I Isoleucine (Ile)	T Threonine (Thr)	K Lysine (Lys)	R Arginine (Arg)	A
	Start (Methionine)	T Threonine (Thr)	K Lysine (Lys)	R Arginine (Arg)	G
Guanine (G)	V Valine (Val)	A Alanine (Ala)	D Aspartic acid (Asp)	G Glycine (Gly)	U
	V Valine (Val)	A Alanine (Ala)	D Aspartic acid (Asp)	G Glycine (Gly)	C
	V Valine (Val)	A Alanine (Ala)	E Glutamic acid (Glu)	G Glycine (Gly)	A
	V Valine (Val)	A Alanine (Ala)	E Glutamic acid (Glu)	G Glycine (Gly)	G

Genetický kód

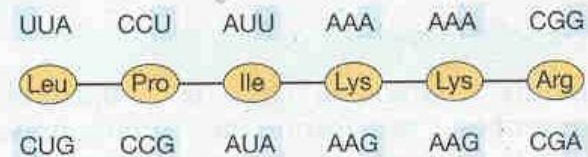
A. Genetic code for all amino acids in mRNA

Start	AUG	F (Phe)	UUU UUC	L (Leu)	CUU CUC CUG CUA UUG UUA	R (Arg)	CGU CGC CGG CAA AGG AGA	V (Val)	GUU GUC GUG GUA
Stop	UAA UAG UGA	G (Gly)	GGU GGC GGG GGA	M (Met)	AUG	S (Ser)	UCU UCC UCG UCA AGU AGC	W (Trp)	UGG
A (Ala)	GCU GCC GCG GCA	H (His)	CAU CAC	N (Asn)	AAU AAC	T (Thr)	ACU ACC ACG ACA	Y (Tyr)	UAU UAC
C (Cys)	UGU UGC	I (Ile)	AUU AUC AUA	P (Pro)	CCU CCC CCG CCA			B (Asx)	Asn oder Asp
D (Asp)	GAU GAC	K (Lys)	AAG AAA	Q (Gln)	CAG CAA	Z (Glx)	Gln oder Glu		

B. Abbreviated code



C. Open reading frame

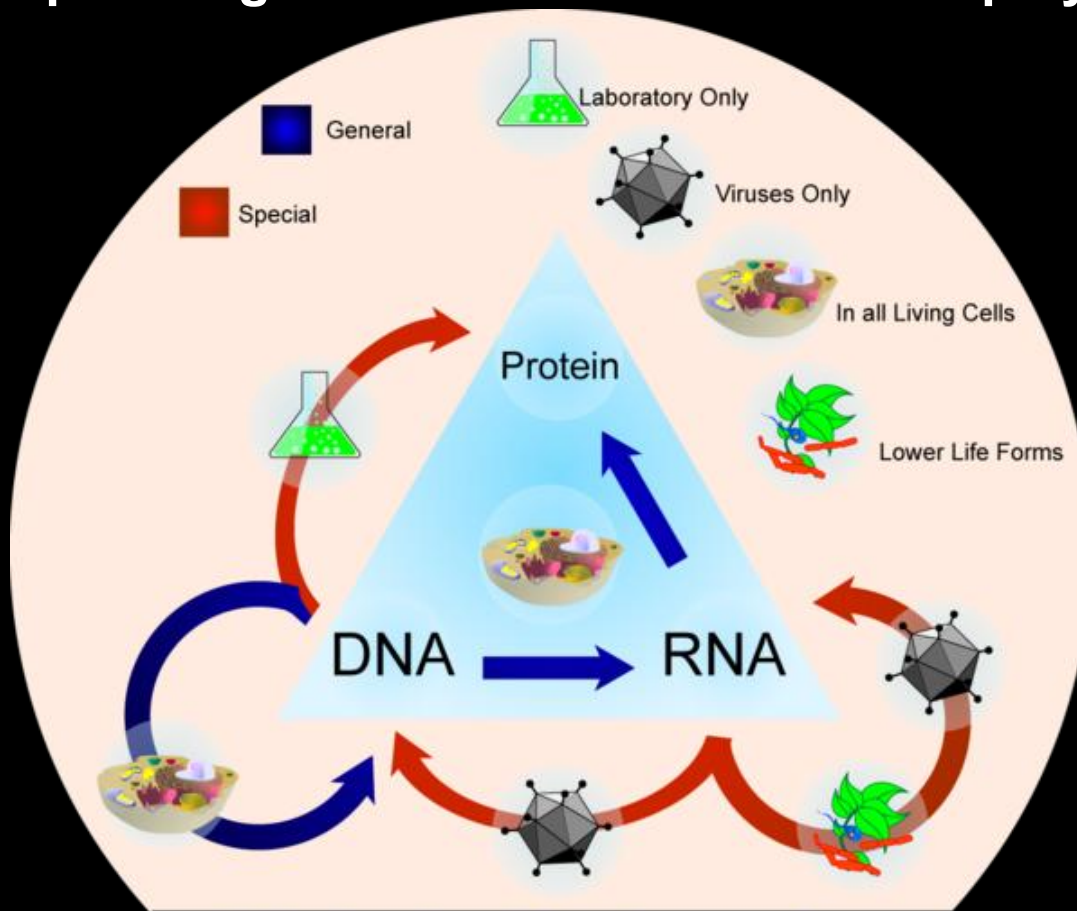


D. Coding by similar nucleotide sequences

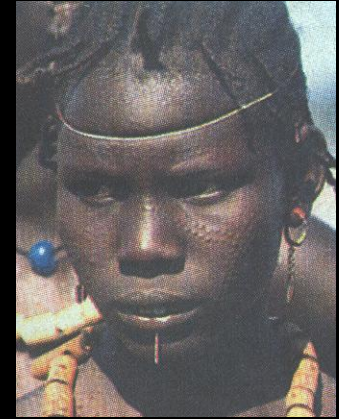
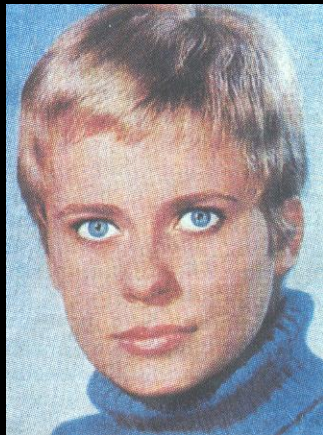
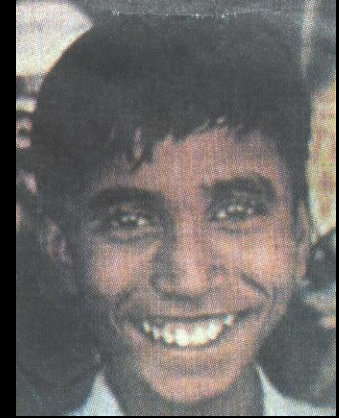
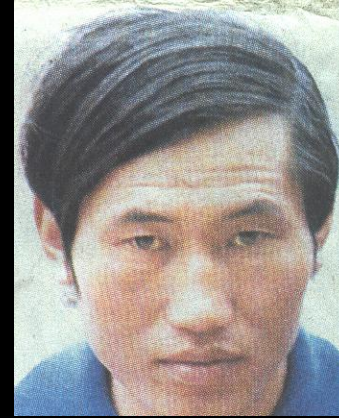
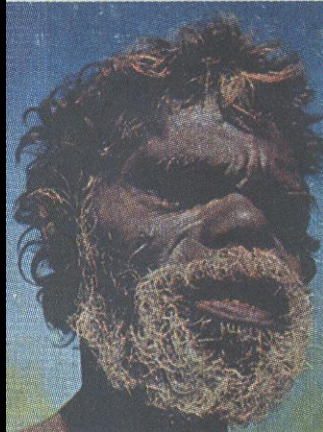
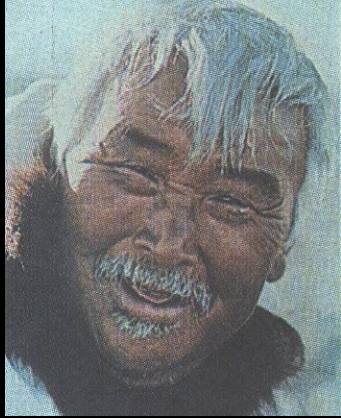


Francis Crick

Ústřední dogma molekulární biologie
přenos genetické informace mezi biopolymery



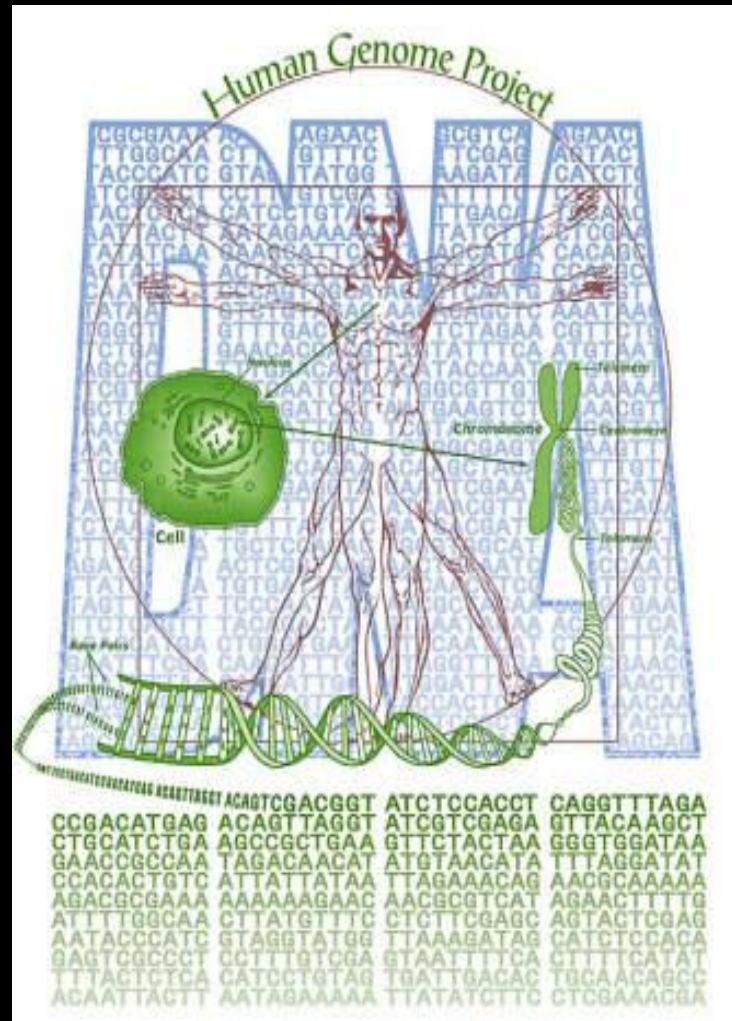
Genom u jedinců stejného druhu je stejný



Genotypy jedinců stejného druhu mohou být rozdílné

Human Genome Project

Projekt lidský genom



Human Genome Project

Projekt lidský genom

- ❑ 1986: Santa Fe
- ❑ James Watson:
- ❑ „vstoupit na cestu od dvojišroubovice
- ❑ k 3 miliardám schodů lidského genomu“
- ❑ 1988: Kongres USA schválil 15 letý projekt a dotaci 3 mld USD



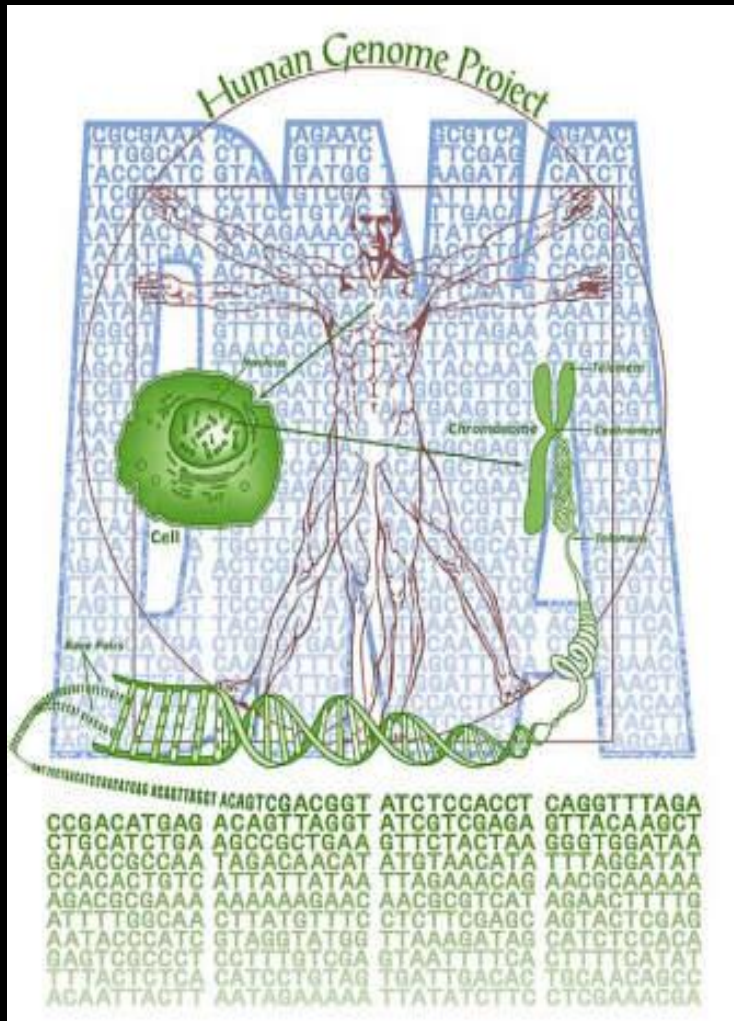
- ❑ 1990: začátek projektu
- ❑ 2005: předpokladané ukončení

- Walter Gilbert: „až budeme mít v ruce úplnou sekvenci lidského genomu, budeme vědět, co dělá člověka člověkem.“ ...



Human Genome Project

Projekt lidský genom



Cíle

- Určit úplnou sekvenci genomu (3,2 Gb)
- Identifikovat a mapovat geny, určit jejich strukturu a funkci v zdraví i v patologii
- Identifikovat důležité mimogenové sekvence
- Všechny data uložit v veřejně přístupných databázích
- Sekvenovat genomy modelových organismů (drozofila, myš, *C. elegans*, *A. thaliana* a i.)
- Zkoumat etické, právní a sociální aspekty

The Genome International Sequencing Consortium:
Initial sequencing and analysis of the human genome.
Nature 409,860-621,2001

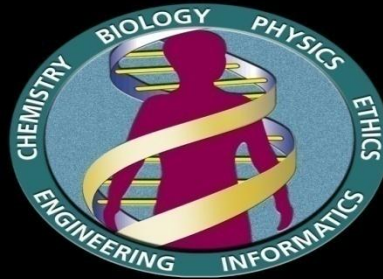




Venter, J.C. et al.:
The sequence of the human
genome. *Science* 291:1304-1351, 2001

Human Genome Project

Projekt lidský genom



**V roce 2003 vědci popsali
DNA sekvenci 3 miliard párů bází
tvořících lidský genom**

Human Genome Project

Projekt lidský genom

Co bylo zjištěno



Lidský genom je u všech lidí stejný



**Pouze 1-2% lidského genomu obsahuje geny,
které obsahují instrukce pro tvorbu proteinů**



**Lidé mají 22 tisíc genů,
funkce více než čtvrtiny z nich je neznámá**



**Polovina lidských proteinů je velmi podobných
s jinými organismy, což naznačuje jednotu života**

Human Genome Project

Projekt lidský genom

- 3-5% z ročního rozpočtu jde na ELSI (=Ethical, Legal, Social Issues), etické, právní, sociální otázky
- Vznikl tak největší etický projekt v historii planety
- Právo na genetické soukromí – před pojišťovny a zaměstnavateli
- Opačný problém: zruinování pojišťoven díky tomu, že klient zná svůj genom a volí optimální pojišťovací strategii

Human Genome Project

Projekt lidský genom



Frank Collins
Konsorcium HUGO



Craig Venter
Celera Genomics

Frank Collins



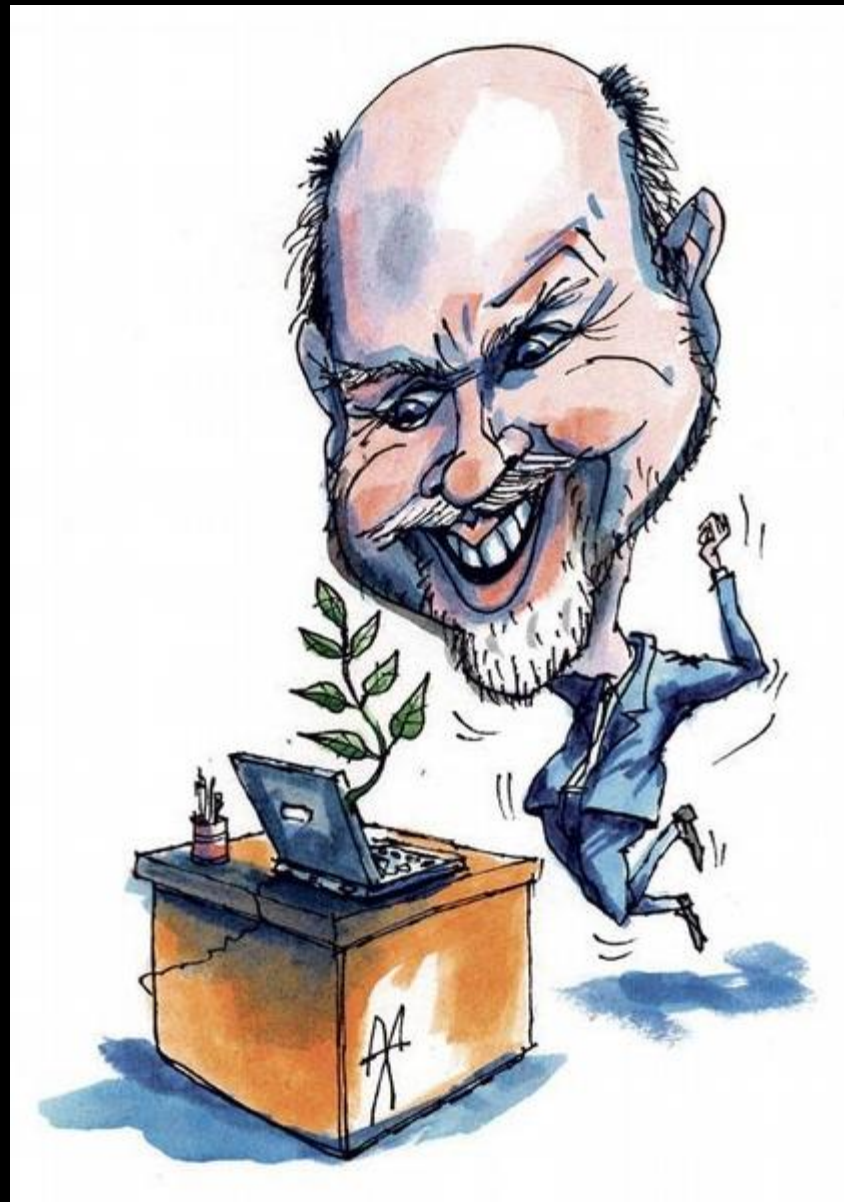
„Molekulární genetici jsou povinni využít poznatky o lidských genech v boji s chorobami.“

Craig Venter

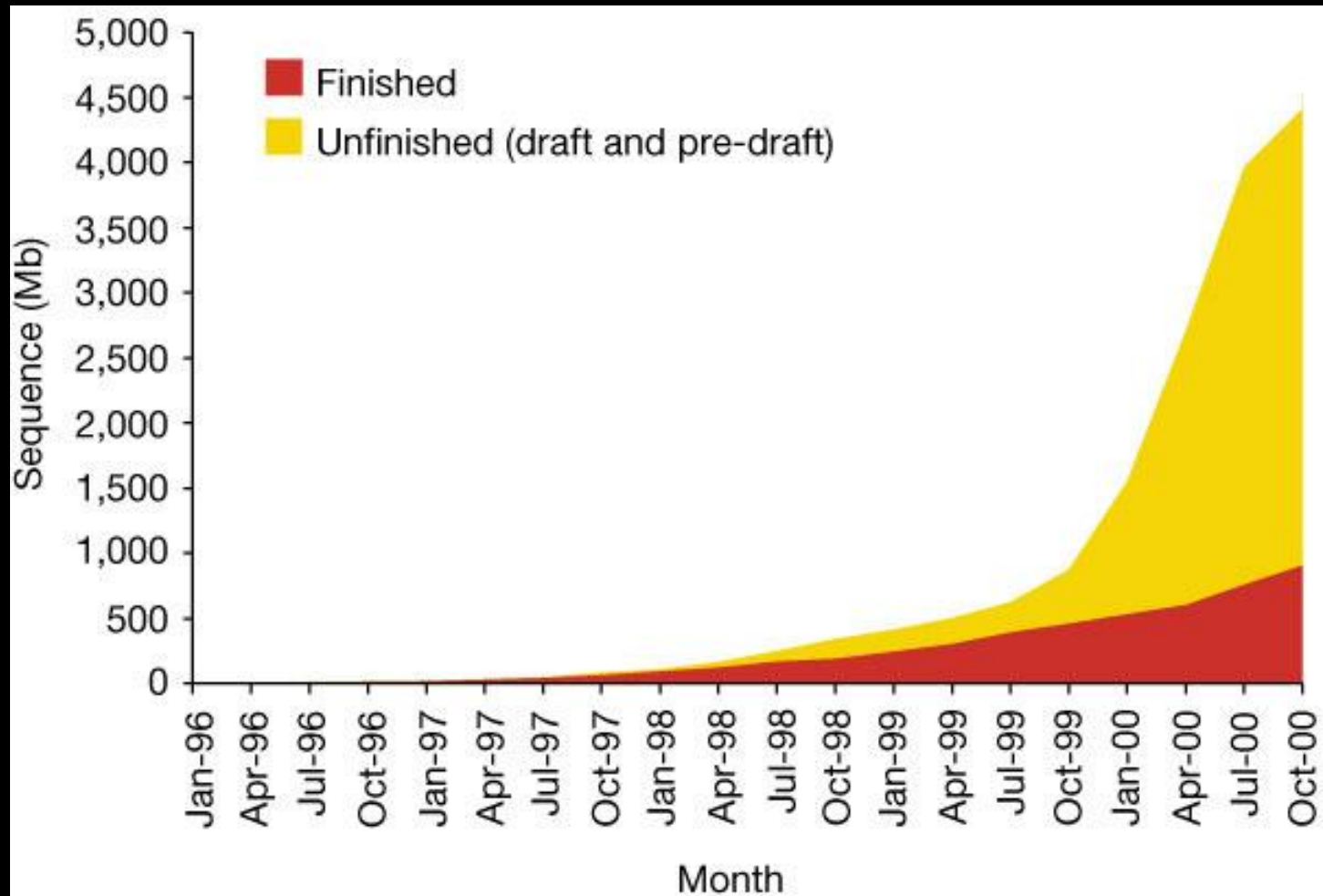


Člověk, který dal ke zkoumání svoji DNA

„Myslím, že největší překvapení je, že se jeden od druhého lišíme více, než jsme čekali.“

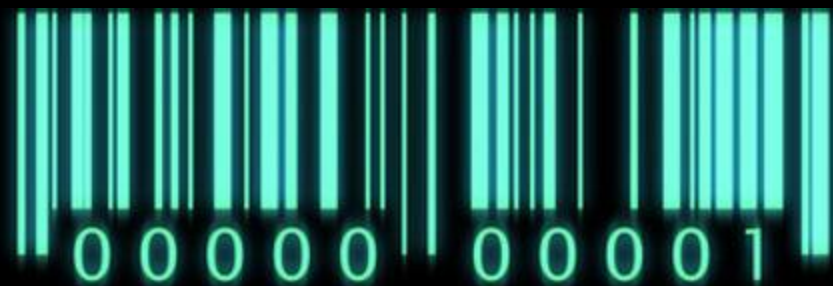


Nárůst údajů o sekvenci DNA



Faster and faster we go, so hang on!





Projekt lidského genomu

- 3-5% z ročního rozpočtu jde na ELSI (=Ethical, Legal, Social Issues), etické, právní, sociální otázky
- Vznikl tak největší etický projekt v historii planety
- Právo na genetické soukromí – před pojišťovny a zaměstnavateli
- Opačný problém: zruinování pojišťoven díky tomu, že klient zná svůj genom a volí optimální pojišťovací strategii

Etické otázky HGP

- je identifikováno čím dál tím víc lidských genů
- pokud budou objeveny geny, které indikují náchylnost ke kriminalitě, inteligenci nebo homosexualitě, jak by na to měla společnost reagovat?
- genetika versus kriminalita: když u zločinců manipulujeme prostředí vězením, nemohli bychom též manipulovat jejich genomem?

Etické otázky plynoucí z HGP

- Kdo bude mít přístup k osobním informacím o složení genomu jedince a jak budou tyto informace využívány?
- Kdo je majitelem informace o genomu jedince?
- Jak ovlivní informace o složení genomu jedince seberechápání daného člověka a jak tato informace ovlivní přijetí tohoto jedince společností?
- Jak informace o genomech jedinců ovlivní přijetí minoritních skupin společností?
- Jak připravíme lékaře na nástup „nové genetiky“ a jak připravíme na nástup nové genetiky veřejnost?
- Jak připravíme veřejnost, aby byla schopna uvážlivě a kvalifikovaně provést informovanou volbu?

Etické otázky plynoucí z HGP

- Jak společnost vyváží nutná vědecká omezení a sociální risk s dlouhodobým prospěchem?
- Mělo by se provádět genetické testování, pokud neexistuje terapie?
- Měli by mít rodiče právo nechat testovat děti na nemoc, která propukne až v dospělosti?
- Jsou genetické testy spolehlivé a interpretovatelné lékařskou komunitou?
- Způsobují geny, že se lidé chovají určitým způsobem?
- Mohou lidé vždy kontrolovat své chování?
- Kde se nachází linie mezi léčbou a vylepšením?
- Kdo vlastní geny a další sekvence lidské DNA?
- Bude patentování sekvencí DNA omezující pro jejich nedostupnost a zbrzdí se tím vývoj užitečných produktů?

Etické otázky plynoucí z HGP

- 1. Vzrůstající informovanost a genetické konstituci jedince a celých populací vede k otázce, kdo by měl kontrolovat získávání těchto informací a kde by tyto informace měly být přístupné. Do této otázky spadají otázky týkající se presymptomatického testování, screening přenašečů, genetický screening prováděný zaměstnavatelem za účelem zjištění vhodnosti uchazeče k dané práci atd.
- 2. V nedaleké budoucnosti budu zcela jistě možné manipulovat genom embryí za účelem změny genotypu i fenotypu
- 3. Vzrůstající informovanost obhledně genetického základu behaviorálních projevů zřejmě změní naše sebepochopení a ovlivní sociální instituce.[\[1\]](#)

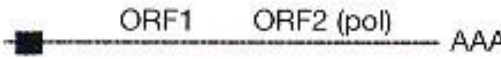
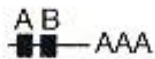
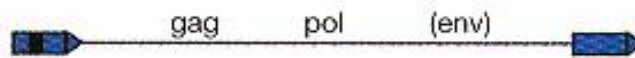
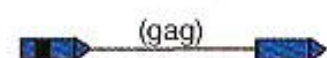
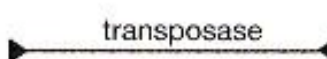

[\[1\]](#) Murray, T.H., (1991) Ethical issues in human genome research
FASEB Journal 5,55-60

Lidský genom

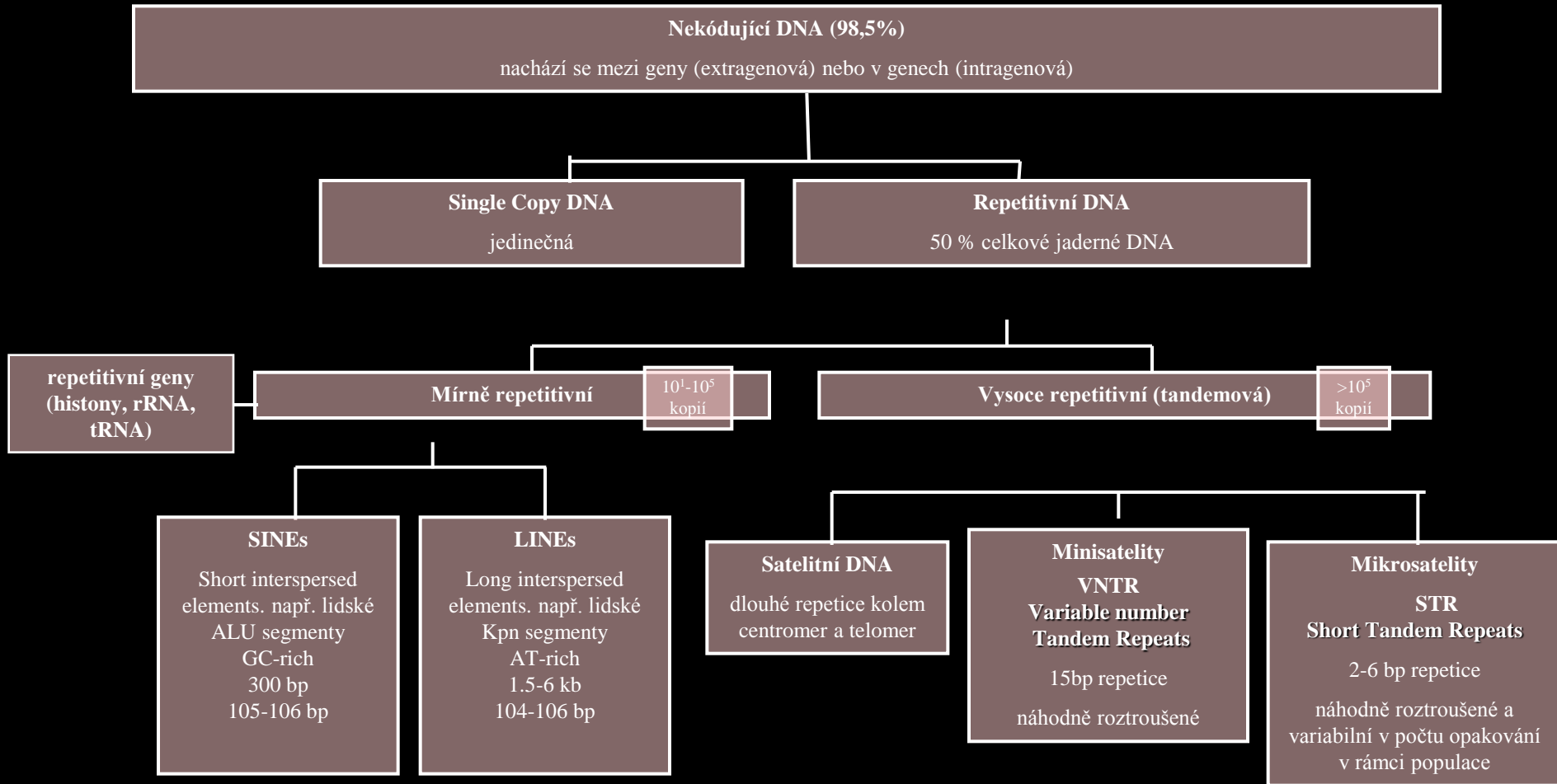
- má přibližnou velikost 3,2 Gb (haploidní stav)
- z nichž je 2,95 Gb tvořeno euchromatinem.
- 28% sekvencí je transkribováno do RNA a z těchto 28% je pouhých 5% přepisováno do proteinů; což je 1,1%-1,4% absolutní velikosti celého genomu člověka.
- Přes 50% genomu je tvořeno repetitivními sekvencemi:
- 45% genomu je tvořeno jedním ze čtyř typů parazitických DNA elementů,
- 3% genomu tvoří repetice jen několika bází
- 5% genomu je tvořeno recentními duplikacemi velkých segmentů DNA. .
- Lidský genom tak z určitého úhlu pohledu připomíná moře repetitivních sekvencí s malou příměsí genů.

PARAZITICKÁ DNA

Classes of interspersed repeat in the human genome

			Length	Copy number	Fraction of genome
LINEs	Autonomous		6–8 kb	850,000	21%
	Non-autonomous		100–300 bp		
Retrovirus-like elements	Autonomous		6–11 kb	450,000	8%
	Non-autonomous		1.5–3 kb		
DNA transposon fossils	Autonomous		2–3 kb	300,000	3%
	Non-autonomous		80–3,000 bp		

Nekódující DNA

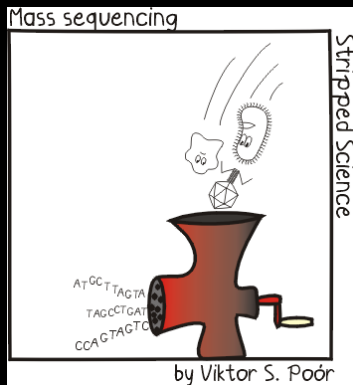


Lidský genom

- 22 287 genů kódujících proteiny

méně genů než se očekávalo: předpovídalo se 150,000 (před sekvenací), 30-40,000 (2001)

- Průměrně 9 genů na 1Mb
- Celkem 232 000 exonů (průměrně 10,4 exonu / gen)
- Identifikovaných asi 20 000 pseudogenů



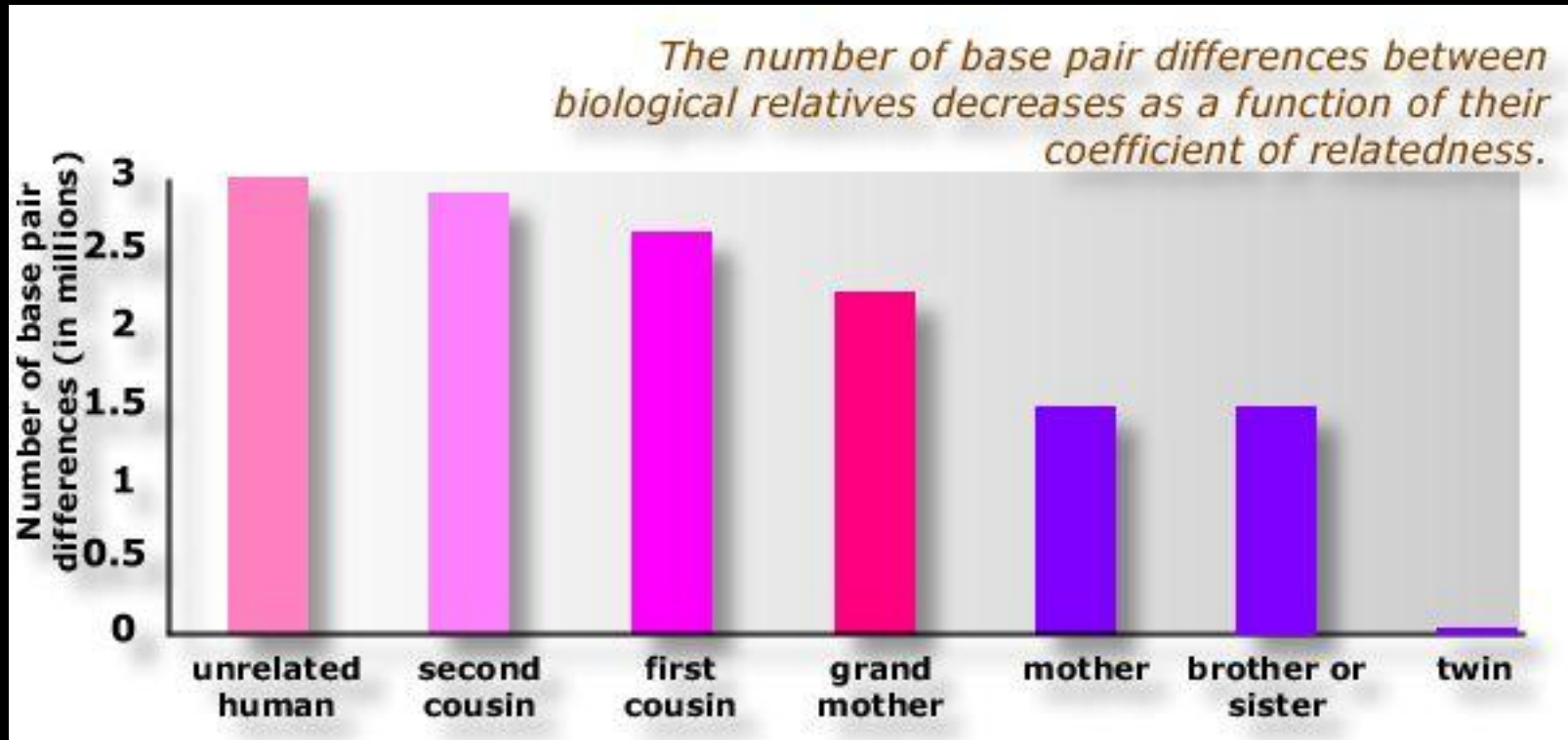
organismus	Velikost (Mbp)	počet genů
člověk (<i>Homo sapiens</i>)	3.200	22 000
lidská mitochondriální DNA	0.016	37
laboratorní myš (<i>M. musculus</i>)	2.600	25.000
rýže (<i>Oryza sativa</i>)	430	60.000
huseníček (<i>A. thaliana</i>)	125	25.498
kukuřice (<i>Zea mays</i>)	2.500	40-60.000
pšenice (<i>Triticum aestivum</i>)	15.000	40-60.000
hlíst (<i>C. elegans</i>)	97	19.000
octomilka (<i>D. melanogaster</i>)	137	13.472
kvasinka (<i>S. cerevisiae</i>)	12.1	5.770
bakterie (<i>E. coli</i>)	4.6	4.377
virus (HIV)	0.009	9

Lidský genom

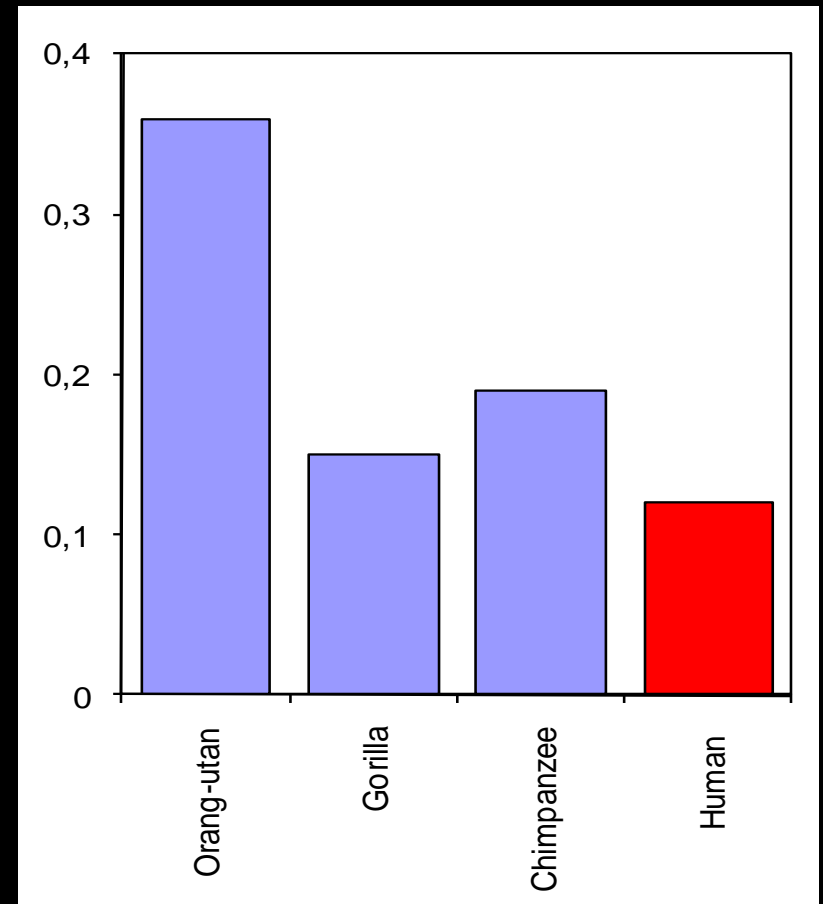
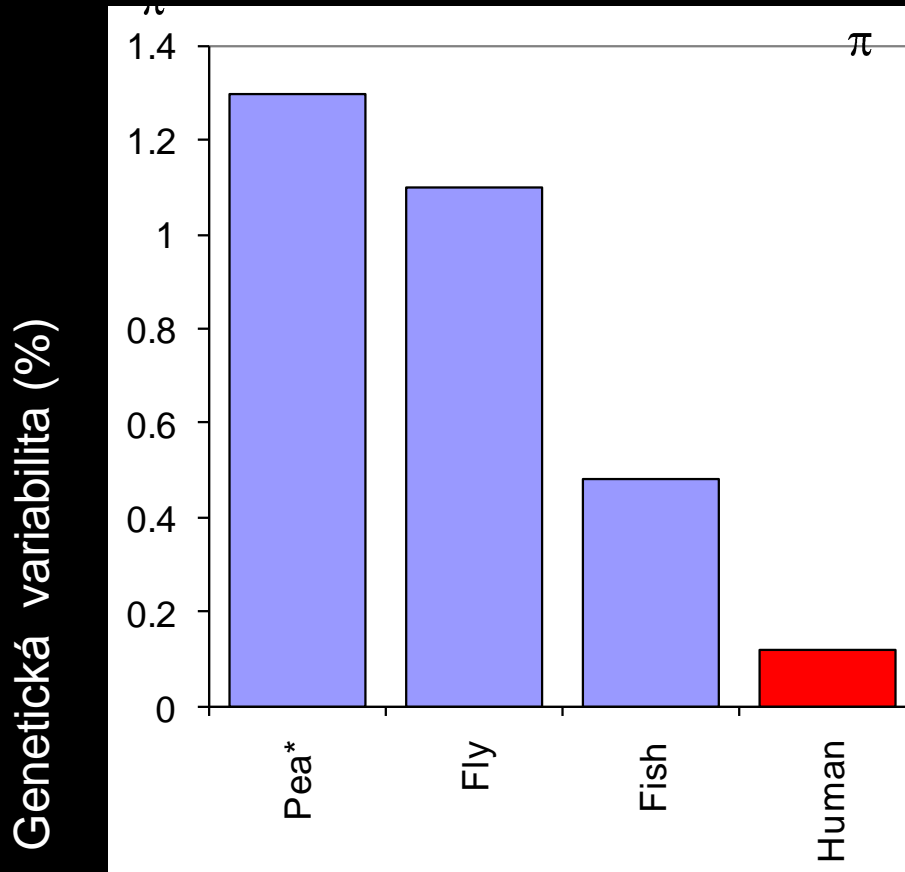
odlišnosti uvnitř druhu *Homo sapiens* v rámci celého genomu 0.1 – 0,5%
(většina je v nekódujících sekvencích)

- 1,5 milionu pb - rozdíl mezi matkou a dítětem
- 2,25 milionů pb - rozdíl mezi babičkou a vnučkou
- 3 miliony pb - rozdíl mezi dvěma náhodnými lidmi na Zemi

Všichni lidé si jsou nápadně podobní



Humans show little genetic variation compared with other species



Lidský genom

lidé sdílí překvapivé množství genetického materiálu
s ostatními organismy

- 99% homologie s ostatními primáty (v genech), 96% (celkem)

Lidský genom

Jaderný genom
3 000 Mb
cca 22 000 genů

Mitochondriální genom
16,6 kb
37 genů

Intragenová
DNA

Extragenová
DNA

2 rRNA
geny

22 tRNA
genů

13 strukturálních
genů

Kódující
DNA

Nekódující
DNA

Unikátní
sekvence

Repetitivní
sekvence

Pseudogeny

Genové
fragmenty

Introny
Nepřekládané
oblasti

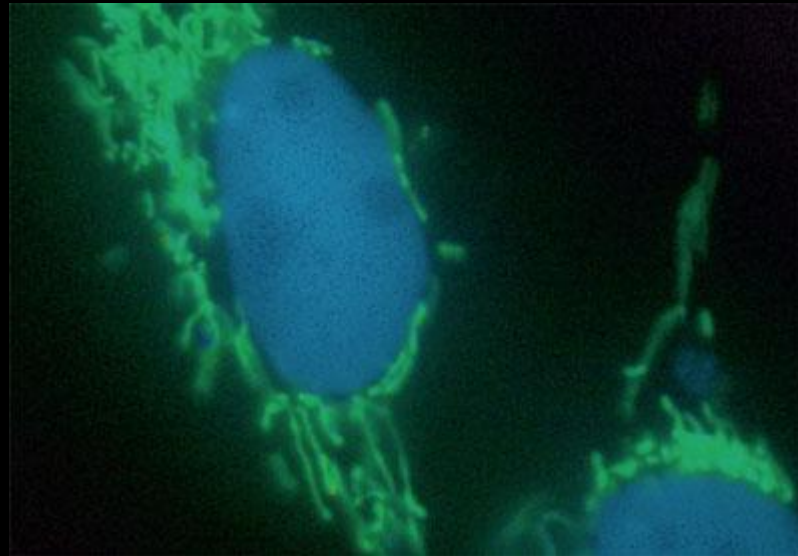
Tandemové
sekvence

Roztroušené
sekvence

1% DNA kóduje nějaké znaky

Lidský genom

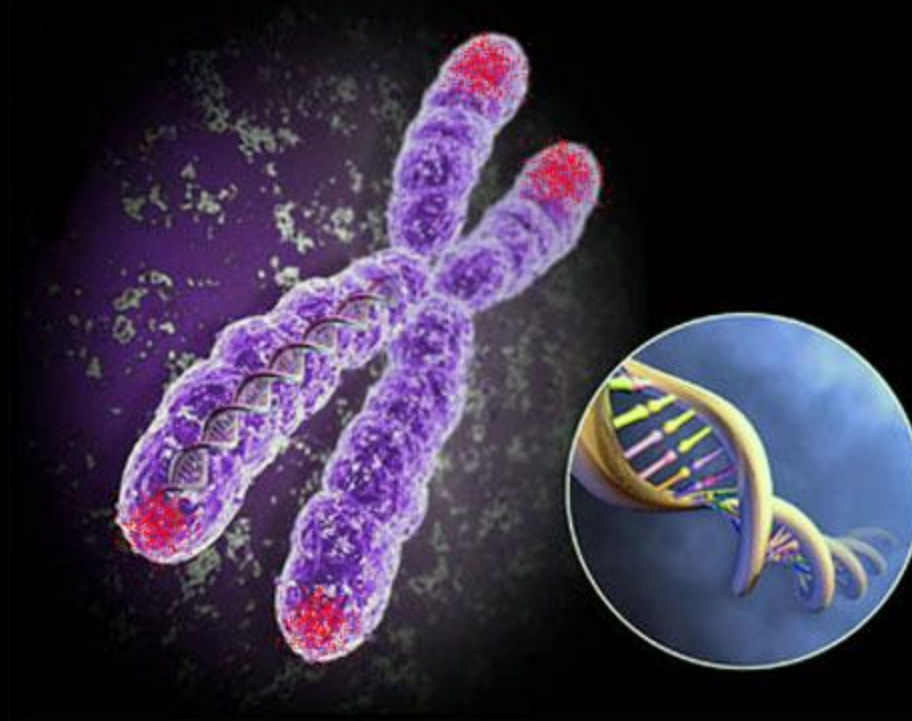
- jaderný
- mitochondrialní



Buněčné jádro obklopené mitochondriemi

Jaderný genom

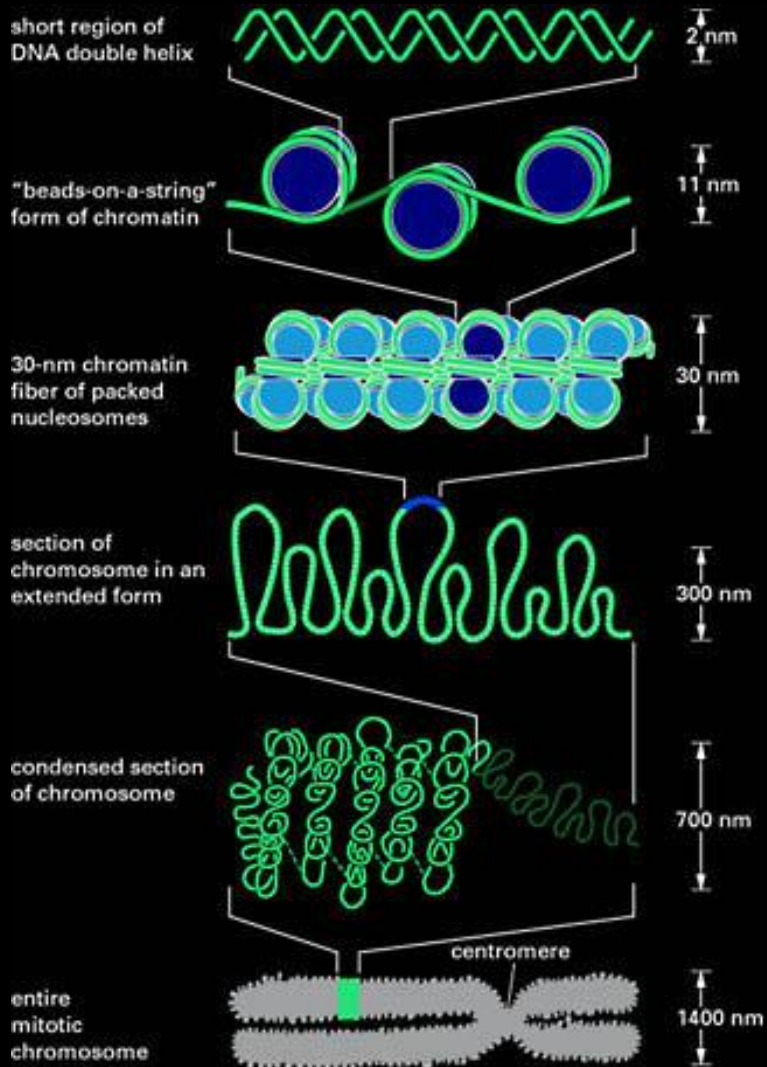
Každá DNA molekula je sbalena do **chromosomu**



Každý ze **46 chromosomů** člověka je tvoře jednou molekulou dvoušroubovicové

Chromosomes are tightly coiled microscopic structure

an elaborate system of coiling, which also seem to be involved in the control of gene expression is present in mammalian cells



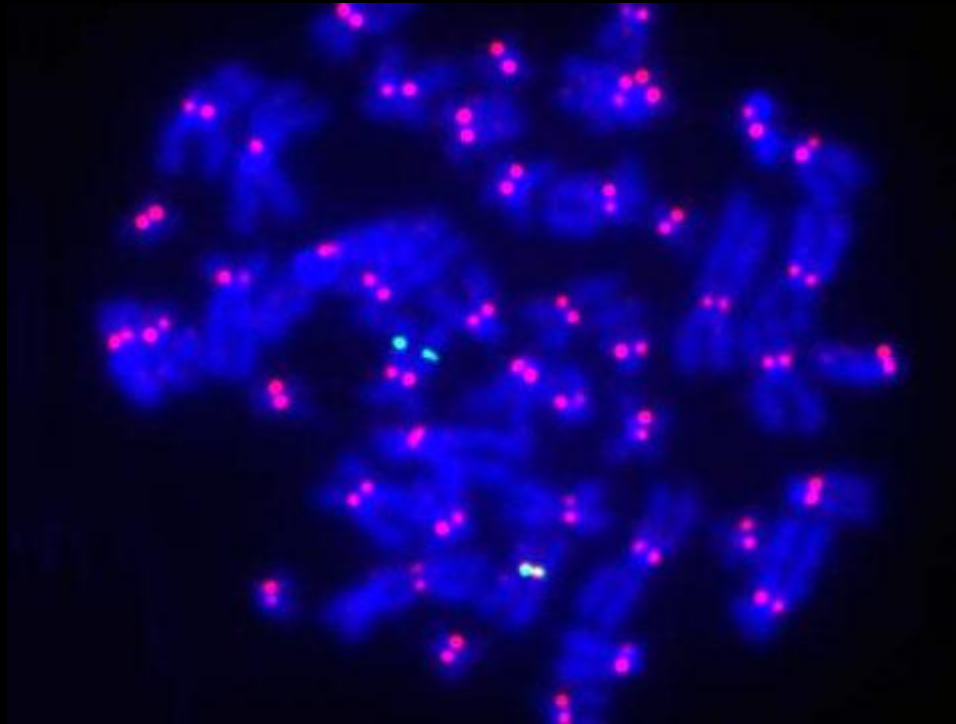
basic proteins called **histones** provide a core around which **DNA** is wound in a double loop composing approximately 146bp of DNA - **NUCLEOSOME**

if stretched out, the DNA from a single cell would extend **approximately 2 meters** in length

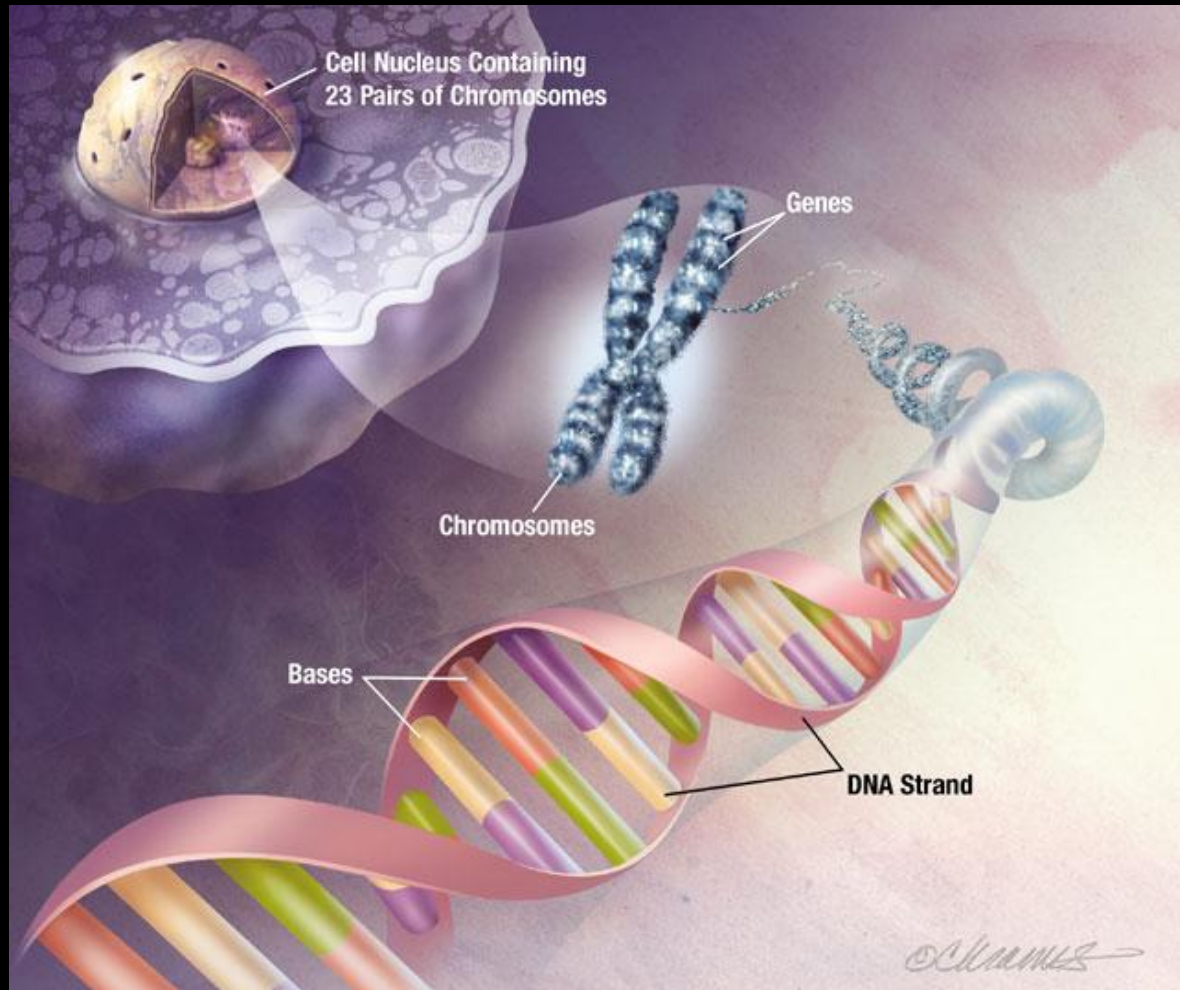
mitotic chromosome is 50 000 times shorter than its extended length

Nuclear genome

Uvnitř buněčného jádra je genetická informace soustředěna do molekul
DNA,
"zabalených" do chromozómů.



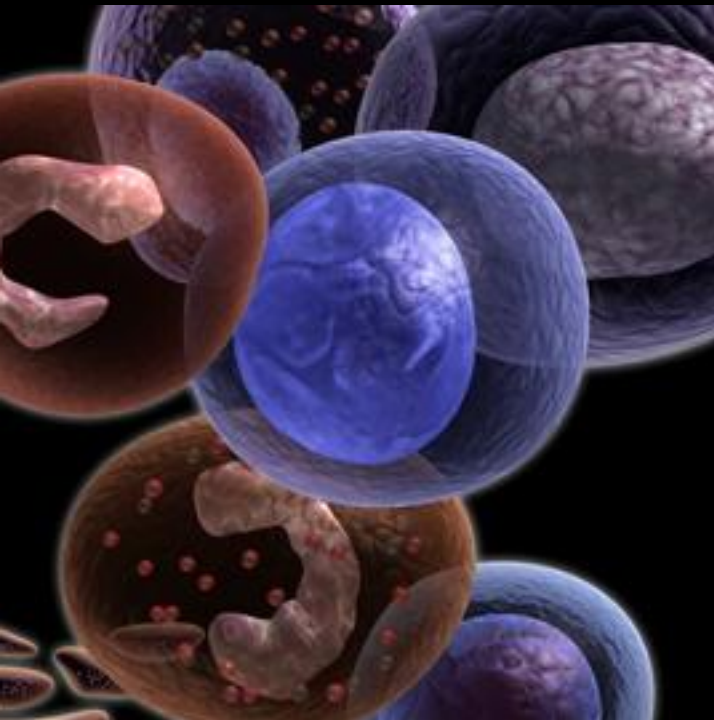
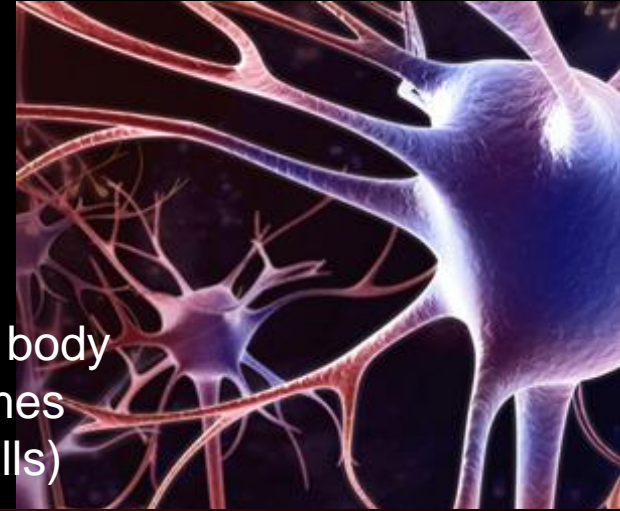
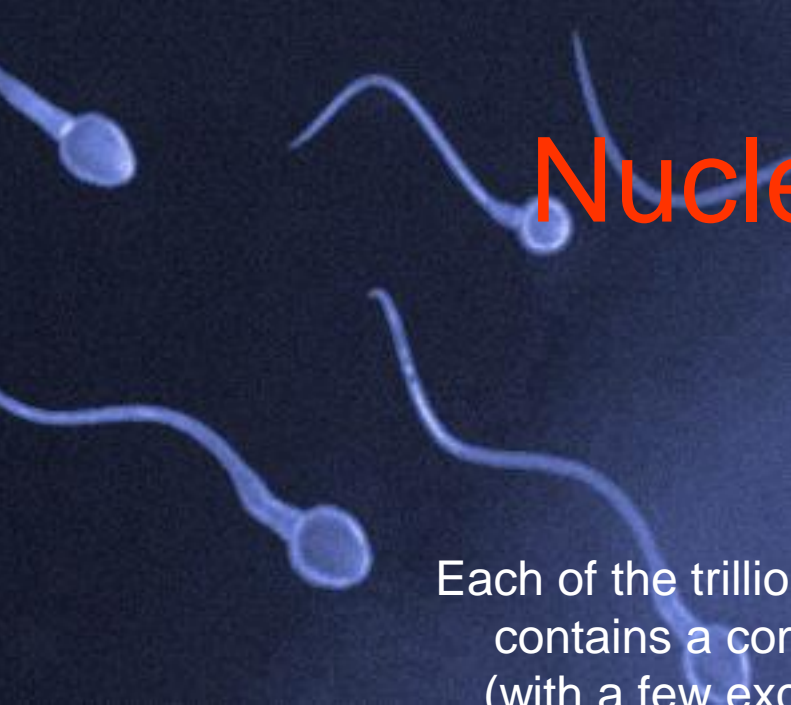
Jaderný genom



The four bases are repeated millions of times to form each chromosome
Lidský chromosom je délky od 50 milionů do 263 milionů bazí







Nuclear genome

Each of the trillions of cells in the human body contains a complete set of chromosomes (with a few exceptions e.g. red blood cells)

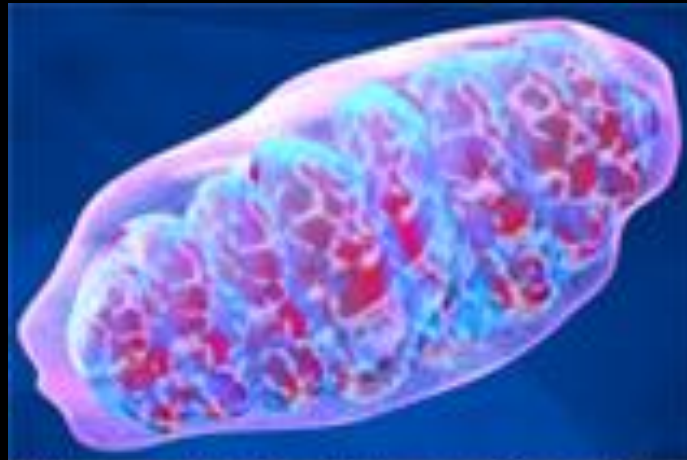


Nuclear genome

Mendelian inheritance

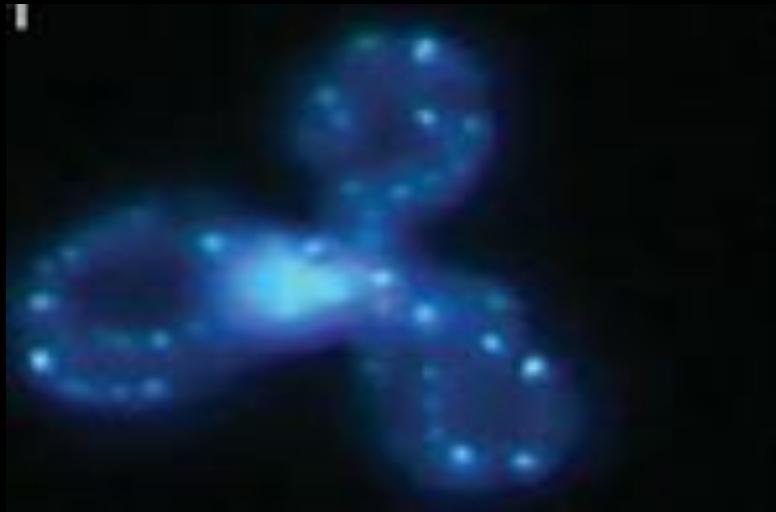
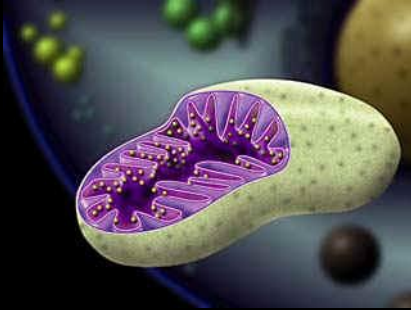
		 pollen ♂	
		B	b
 pistil ♀	B	 BB	 Bb
	b	 Bb	 bb

Mitochondrial genome



Many mitochondria are found in each cell, all containing mtDNA

Mitochondrial genome



Mitochondriální dvoušroubovicová DNA tvoří jednu kruhovou molekulu

Mitochondria have their own DNA, a relic from the distant past when they were free-living organisms.

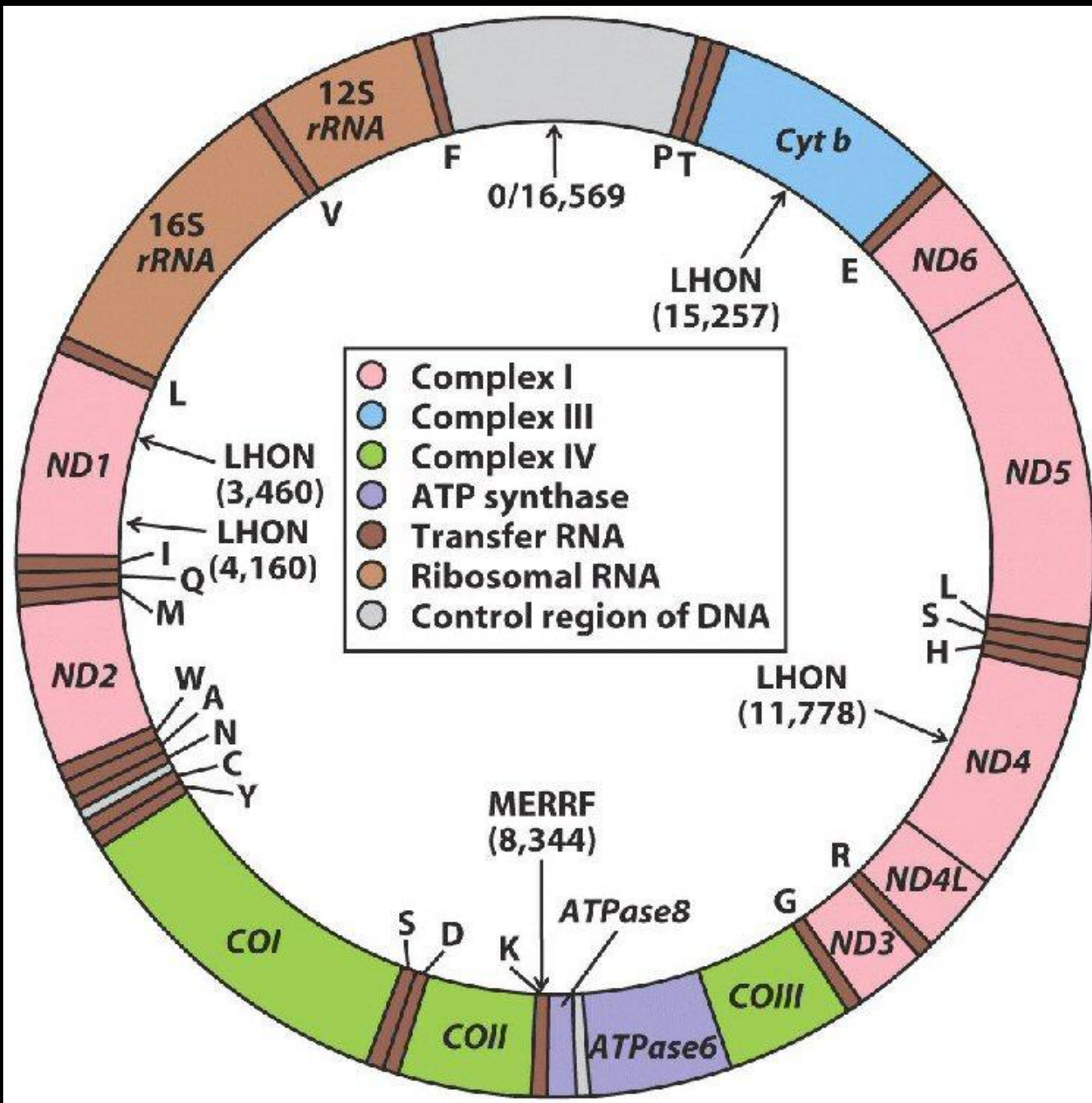
- Evidence of this is the slightly different genetic codes found in nonplant mitochondria. For example:

Organism	Code	Amino Acid (standard)
All nonplant species	UGA	Tryptophan (stop)
Mollusks	AGA	Serine (Arginine)
Yeast	CUU	Threonine (Leucine)

Mitochondrial genome

Exclusively maternal inheritance





mtDNA vs. choroby

- [cyclic vomiting syndrome](#) –přestavby rozáhlých segmentů mtDNA
- [Leber hereditary optic neuropathy](#) - mutace v genech *MT-ND1*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, and *MT-ND6*
- [mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes](#) - mutace v genech *MT-ND1*, *MT-ND5*, *MT-TH*, *MT-TL1*, and *MT-TV*
- [myoclonic epilepsy with ragged-red fibers](#) - mutace v genech *MT-TK*, *MT-TL1*, *MT-TH*, and *MT-TS1*
- [neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa](#) - mutace v genu *MT-ATP6*
- [nonsyndromic deafness](#) - mutace v genech *MT-RNR1* a

MT-TS1

- cancer, including breast, colon, stomach, liver, and kidney tumors, cancer of blood-forming tissue (leukemia) and cancer of immune system cells (lymphoma) – somatické mutace
- age-related disorders: heart disease, Alzheimer disease, and Parkinson disease - somatické mutace

The human nuclear and mitochondrial genomes

differ in many aspects of their organisation and expression

	Nuclear genome	Mitochondrial genome
Size	3000 Mb	16.6 kb
No. of different DNA molecules	23 (in XX) or 24 (in XY) cells, all linear	One circular DNA molecule
Total no. of DNA molecules per cell	23 in haploid cells; 46 in diploid cells	Several $\times 10^3$
Associated protein	Several classes of histone and nonhistone protein	Largely free of protein
No. of genes	22 000	37
Gene density	~1/40 kb	1/0.45 kb
Repetitive DNA	Large fraction, see <i>Figure 7.1</i> .	Very little
Transcription	The great bulk of genes are transcribed individually	Continuous transcription of multiple genes
Introns	Found in most genes	Absent
% of coding DNA	1 – 2 %	~93%
Codon usage	See <i>Figure 1.22</i>	See <i>Figure 1.22</i>
Recombination	At least once for each pair of homologs at meiosis	None
Inheritance	Mendelian for sequences on X and autosomes; paternal for sequences on Y	Exclusively maternal

Mutace

- jakákoliv dědičná změna v genetické materiálu
- změny v DNA, jejichž frekvence je nižší než 1%

Epimutace – nejsou to změny ve fenotypu, které jsou důsledkem změny sekvence DNA (poruchy metylace aj.)

Mutace - pozitivní (zdroj variability, selekce)
- negativní

Každý člověk 5 – 10 patologických mutací

Typy mutací

1) Genomové

- dojde ke změně celého genomu
(haploidizace, polyploidizace)

2) Chromozomové

- mutační změna postihla strukturu chromozomu
(chromozomové aberace)

3) Genové

- mutační změna v genu

a) Somatické

- vznikají v somatických buňkách
- mutantní změnu obsahují pouze části tkání,
které vznikly dělením původní mutantní buňky

b) Gametické

- vznikají v gametách
- všechny buňky jedince,
který vznikla z příslušné zygoty, obsahují mutantní změnu

Genové mutace

Typy mutací

delece

od 1 bp po megabáze

inzerce

včetně duplikací

jednobázové substituce

missense

transverze

nonsense

tranzice

splice site

silent

posunové (frameshift)

v důsledku delecí, inzercí,

poruch splicingu

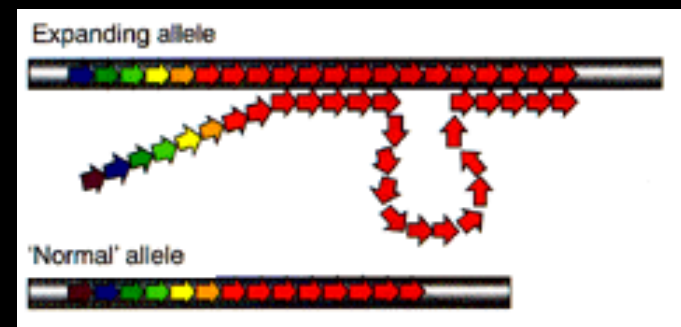
„dynamické“ (expansion rep. sekv.)

tandemové repetice, které často expandují během meiózy

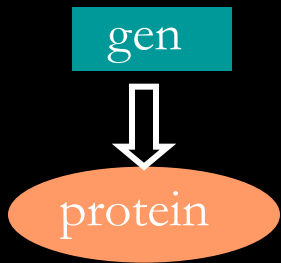
Podle sekvence:

- v kódující sekvenci

- v nekódující sekvenci



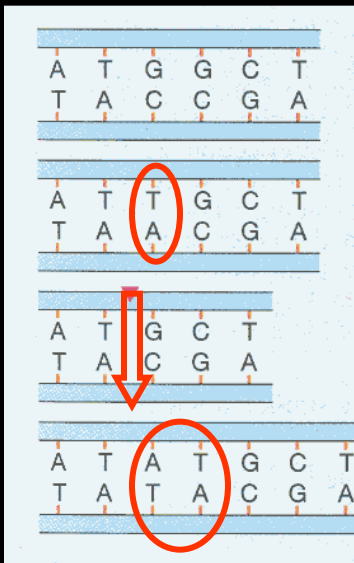
Mutace



chybí

onemocnění

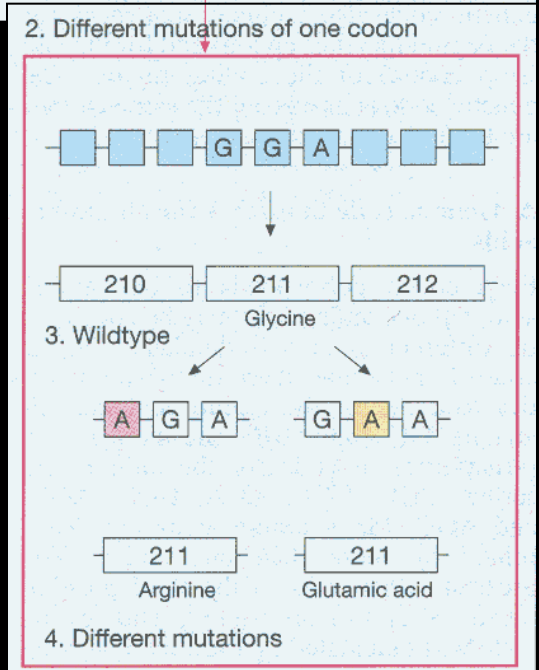
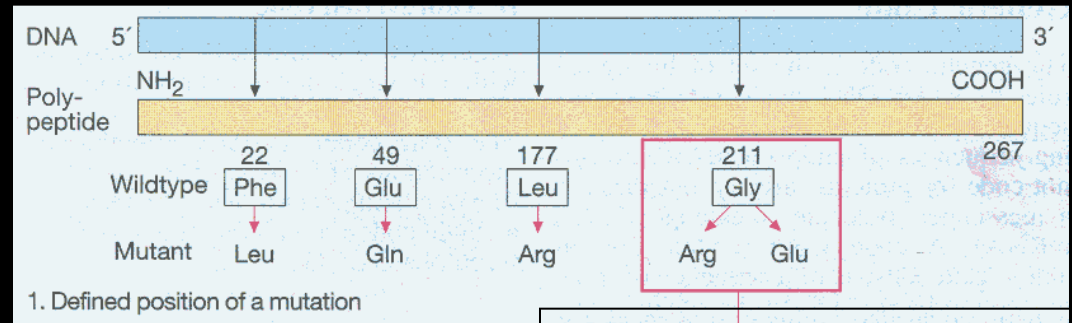
Typy mutací



nonsense C542X
missense N1303K

dF508

390insT



Polymerázová řetězová reakce PCR

Genetici potřebují pro své analýzy
značné množství studovaného úseku DNA

PCR zmnoží zvolený úsek DNA
Rychle a spolehlivě



Polymerázová řetězová reakce PCR

Kery Mullis

V roce 1983 PCR metodu
vynalezl

a postaral se o jednu z
největších revolucí
v molekulární genetice



Když v r. 1993 Kary Mullis z rukou švédského krále přijímal Nobelovu cenu za objevení realizaci PCR, sám skromně charakterizoval svůj obdivuhodný nápad a deset let práce na jeho uskutečnění jako souběh náhod, vědecké naivity a série šťastných omylů.

Molekulárně - genetická diagnostika

- **Diagnostika infekcí**

diagnostiky detekujících virová, bakteriální, mykotické a parazitální patogeny v různých tělních tekutinách

- **Diagnostika geneticky podmíněných chorob**

postnatální, prenatální, preimplantační diagnostika, populační screening

- **Diagnostika nádorových onemocnění**

analýza tumorsupresorových genů a onkogenů, diagnostická vyšetření zaměřená na detekci kauzálních markerů a prognostických faktorů ve vztahu k onkologickým onemocněním, monitorování terapie rakoviny, zjišťování minimální reziduální choroby.

- **Farmakogenetika**

stanovení tolerance k farmakům

- **DNA typizace osob (soudní lékařství, transplantologie)**

Molekulárně - genetická diagnostika

- **Diagnostika infekcí**

diagnostiky detekujících virová, bakteriální, mykotické a parazitální patogeny v různých tělních tekutinách

Cílem je detekovat infikované buňky

na pozadí mnohonásobně početnějších neinfikovaných buněk

Provádí se za použití PCR na DNA nebo cDNA cizírodých organismů

Konvenční diagnostické metody

-vypěstování organismu v kultuře

-detekce přítomnosti organismů za použití protilátek

Časově náročné

Někdy málo citlivé

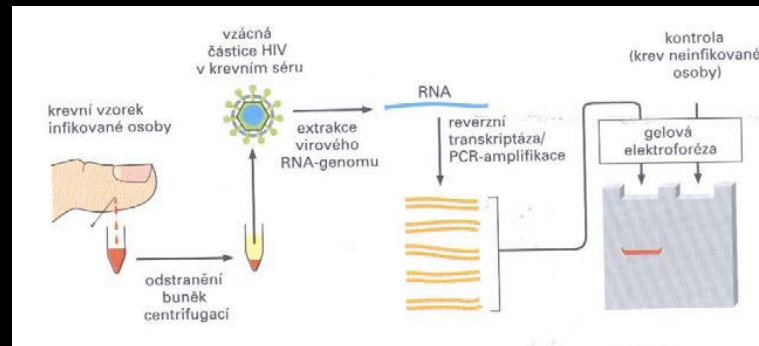
Molekulárně - genetická diagnostika

- Diagnostika infekcí

HIV

Přítomnost virová RNA naznačuje aktivní infekci

Lze prokázat provedením PCR za použití cDNA jako templátu vytvořených pomocí RT z RNA infikovaných buněk

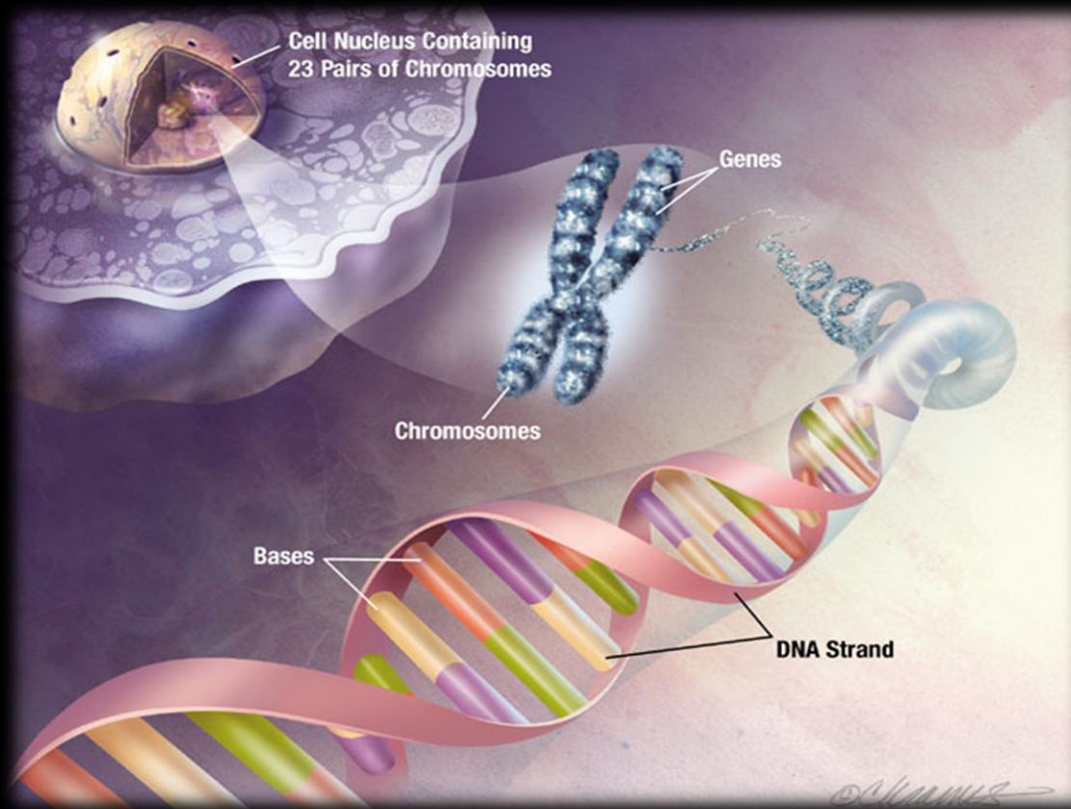


Tuberkulóza

Pomocí PCR prokazován některý z vysoce konzervativních genů mykobakterií pomocí primerů připraveným k těmto sekvencím

Amplifikovaný fragment je hybridizován se sondami vysoce specifickými pro daný kmen
Lze detekovat je 10 bacilů na 10000000 eukaryotických buněk

Molekulární diagnostika geneticky podmíněných chorob



Genetické choroby



1) Genomové

– dojde ke změně celého genomu
(polyploidie, aneuploidie)

2) Chromozomové

– mutační změna postihla strukturu chromozomu
(chromozomové aberace)

3) Genové

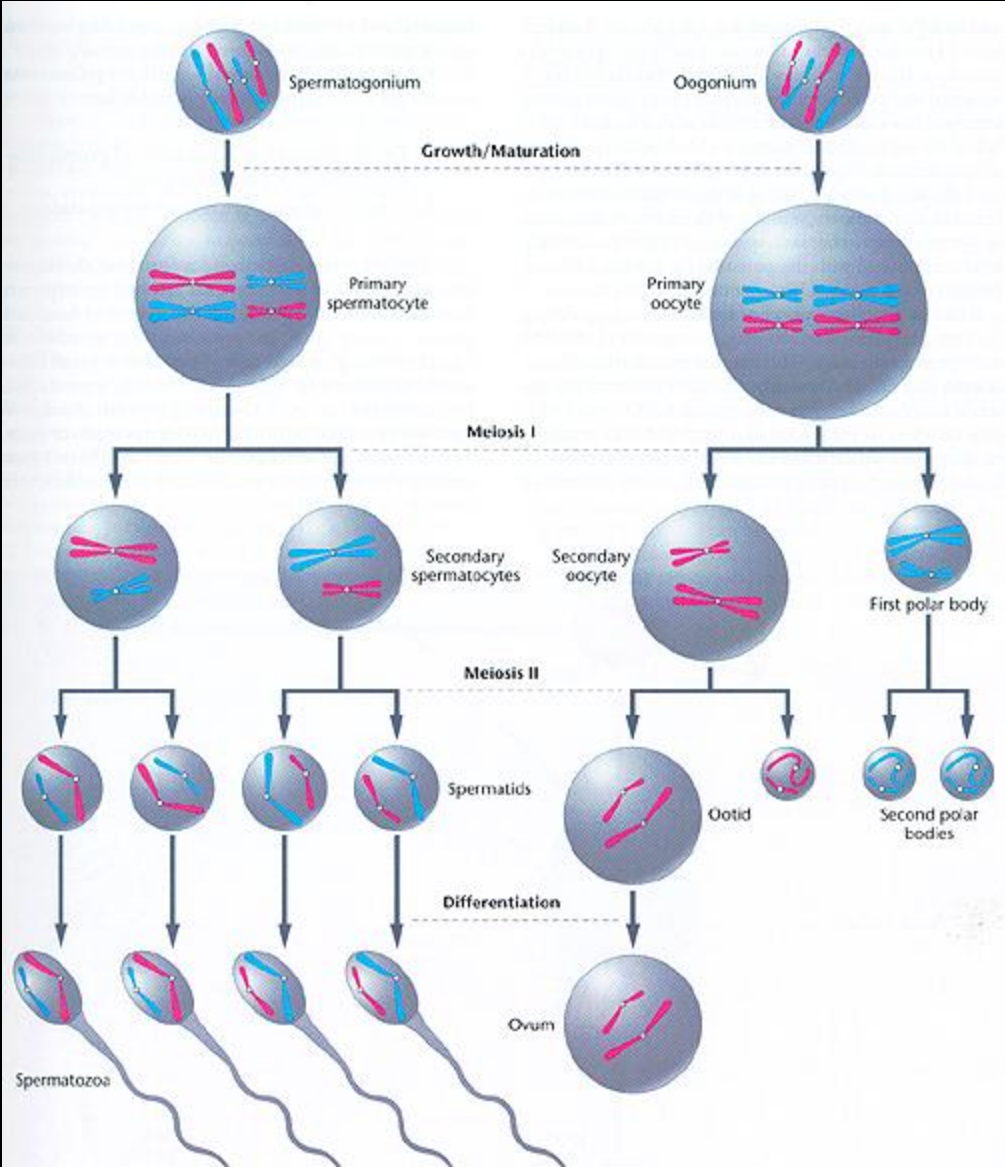
– mutační změna v genu

a) Somatické

- vznikají v somatických buňkách
- mutantní změnu obsahují pouze části tkání,
které vznikly dělením původní mutantní buňky

b) Gametické

- vznikají v gametách
- všechny buňky jedince,
který vznikl z příslušné zygoty, obsahují mutantní změnu



Genové choroby

- **A) POLYGENNÍ**
nemendelovská dědičnost
 - pravděpodobnost choroby závislá na **variantách** více genů + obvykle **výrazně ovlivněna vlivem prostředí**
 - riziko stanovováno empiricky/statisticky na základě populačních studií
 - diabetes, vrozené srdeční vady, schizofrenie, astma .
- **B) MONOGENNÍ**
mendelistická dědičnost
 - vlastnosti (choroby) se dědí v závislosti na jediném genu (lokusu DNA), obvykle změněném **mutací**
 - pravděpodobnost výskytu znaku/choroby u potomků – **Mendelovy zákony**

Princip molekulárně genetické diagnostiky

Rozpoznání a identifikace mutací v genech,
které jsou v asociaci s danou chorobou.

Jakmile je identifikována genetická příčina
onemocnění na úrovni DNA,
může se vyvinout specifický test
k analýze relevantních genetických charakteristik
pacienta

Molekulárně genetická diagnostika

cíle

DNA testy individuálních pacientů

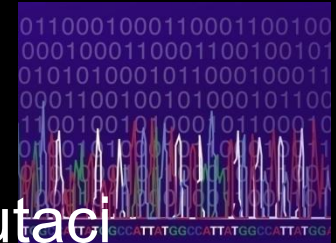
- ❑ Stanoví a upřesní diagnózu
- ❑ Umožňují prediktivní diagnózu
(identifikaci onemocnění před jeho manifestací)
- ❑ Umožňují identifikaci přenašečů genetických onemocnění
- ❑ Umožňují prenatální a preimplantační diagnostiku
(odhalují závažná onemocnění před narozením dítěte)
- ❑ Umožňují výběr nejvhodnější léčby farmaky
- ❑ Umožňují preventivní kroky s minimalizovanými vedlejšími účinky



Molekulárně genetická diagnostika strategie

Přímá DNA/RNA diagnostika:

- zjistí, zda analyzovaná DNA nese či nenes mutaci
- detekce mutací v genech asociovaných s chorobou



Nepřímá DNA diagnostika

- užitím vazebních markerů v rodinných studiích odhalí alelu genu v asociaci s nemocí v rodině
- využití polymorfních míst lidského genomu



Přímá DNA diagnostika

- **Detekce kauzálních mutací v odpovědném genu vždy potvrdí klinickou diagnózu**

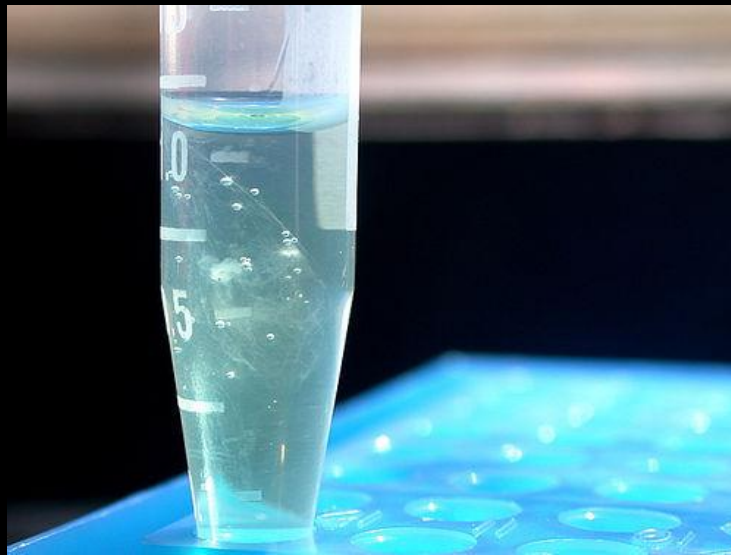
musíme znát:

- 1 gen , který má být analyzován**
- 2 standartní (wild type) sekvenci tohoto genu**



Přímá DNA diagnostika

- **Metody detekce známých mutací (scoring)**
v genu asociovaném s danou chorobou
- **Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)**
genu asociovaném s danou chorobou



Přímá DNA diagnostika

- **Metody detekce známých mutací (scoring)**
detekce určité kauzální mutace pro danou chorobu specifickou metodou

Detekce známé sekvenční změny je možná u:

- 1) chorob s předpokládanou alelickou homogenitou, tzn. že patologická alela příslušného genu je reprezentovaná
 - * jedinou mutací (srpkovitá anemie)
 - * omezeným počtem mutací (α 1-antitrypsinový deficit)
 - * rozsáhlou řadou mutací rozmístěných přes celý gen, kdy jedna nebo více mutací se vyskytují s prevalující četností (CFTR, DMD)
 - * expanzí trinukleotidových opakujících se sekvencí (HD, MD)
- 2) v rodinách s již charakterizovanou mutací v příslušném genu
- 3) ve výzkumu (k potvrzení kandidátního genu a k odlišení nepatogenního polymorfismu)

Přímá DNA diagnostika

- **Metody detekce známých mutací (scoring)**

Příklady chorob s vymezeným počtem mutací

Srpkovitá anemie	mutace E6V v HBB genu
Cystická fibróza	mutace F508del v CFTR genu
Huntingtonova chorea, Myotonická dystrofie, Fragilní X	nestabilní expanze trinukletidových repetací
Hemofilie A	velká inverze v genu pro faktor 8
Duchennova muskulární dystrofie	60-70% mutací tvoří velké delece
Tay-Sachsova choroba	inzerce 4pb v exonu 11 genu HEXA
Lebrova optická atrofie	mitochondriální mutace nukleotidu v pozici 3460, 11778, 14484

Přímá DNA diagnostika

- **Metody detekce známých mutací (scoring)**

Restrikční analýza PCR produktu	mutací vzniká nebo zaniká specifické místo v DNA, rozlišované restrikčním enzymem
Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy	detekce bodových mutací
PCR s alelově specifickými primery (ARMS test)	detekce bodových mutací
PCR s primery ohraničujícími předpokládané delece v DNA	úspěšná amplifikace odhalí přítomnost specifické přestavby v DNA
Analýza teploty tání PCR produktu pomocí real-time PCR	změna teploty tání v porovnání s pozitivní a standartní kontrolou odhalí specifickou sekvenční změnu
Detekce expanze trinukleotidových repeticí v DNA	malé expanze se detekují pomocí PCR, velké expanze pomocí Southern blot, Triplet Primed PCR

Přímá DNA diagnostika

- **Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)**
postupné nebo multiplexní screenování úseků genu
asociovaného s danou chorobou pomocí vyhledávacích
metod

odhalí jakékoliv odchylky v analyzované sekvenci DNA pacienta
ve srovnání se standartní sekvencí

neodliší patogenní a nepatogenní změny v sekvenci DNA

jsou náročnější časově i finančně

Přímá DNA diagnostika

Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)

Jednořetězcový konformační polymorfismus (SSCP)	jednoduchá metoda	doporučuje se pro krátké sekvence DNA neodhaluje pozici změny
Denaturační gradientová elektroforéza (DGGE)	vysoká citlivost	nutné primery s GC-clampy neodhaluje pozici změny
Heteroduplexní analýza (HD)	jednoduchá metoda	doporučuje se pro krátké sekvence DNA omezená citlivost neodhaluje pozici změny
Detekce zkráceného proteinu (PTT)	vysoká citlivost pro terminační mutace	pouze pro terminační mutace odhaluje pozici změny
Analýza teploty tání na real-time PCR, HRM	vysoká citlivost	doporučuje se pro sekvence cca 250 bp neodhalí pozici změny
Sekvenování	detekce veškerých změn v DNA	nadbytek informací plně charakterizuje mutace

Scoring RYR1 kauzálních mutací

Restrikční analýza

ARMS

Hybridizace

Analýza teploty tání (Real-time PCR)



Scanning RYR1 genu

Vyhledávací metody

(SSCP, DGGE, DHPLC)

Přímé sekvenování



Identifikace dosud nepopsané mutace ???

neznámá mutace – kauzální mutace???

Aby mohla být sekvenční varianta detekována k prediktivnímu genetickému testování
potřeba nezávislého důkazu, že je patogenní

- genetická charakterizace - aspekty evoluční konzervace
 - kosegregace mutace s chorobou v nejméně 2 rodinách
 - absence u 100 zdravých kontrol (<1%)
- funkční charakterizace
 - rekombinantní *in vitro* exprese na definovaném genetickém pozadí
 - zkouška funkce proteinu s charakterizovanou mutací v *ex vivo* tkáních

Vyšetřované genové choroby

<http://www.uhkt.cz/nrl/db>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>

<http://www.eurogentest.org/web/>

<http://www.genetests.org/>

<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>

Molekulárně genetická diagnostika

