















# **Genetika v zubním lékařství - cvičení**

# Johann Gregor Mendel

\* 20. 7. 1822, Hynčice

† 6. 1. 1884, Brno

- zakladatel genetiky
- objevitel základních zákonů dědičnosti
  - zákon o uniformitě F1 generace
  - zákon o náhodné segregaci genů do gamet
  - zákon o nezávislé kombinovatelnosti alel

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

Pokusy s rostlinnými hybridy (1866)



# Základní pojmy

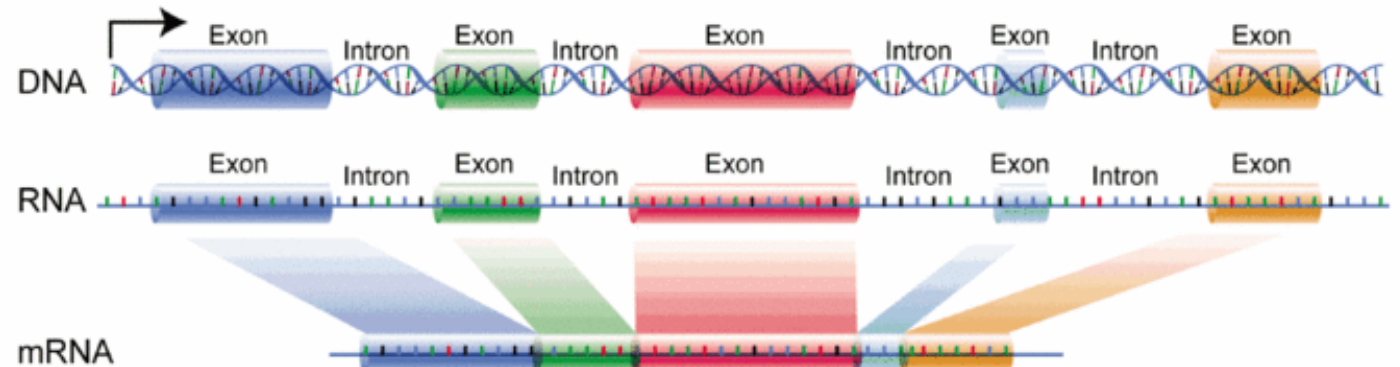
- **Genetika**

- obor zabývající dědičností a variabilitou kvantitativních a kvalitativních znaků všech živých organismů

- **Gen**

- základní jednotka dědičnosti (genetické informace)
- konkrétní úsek molekuly DNA, který nese informaci pro tvorbu bílkoviny nebo nukleové kyseliny
- skládá se z exonů a intronů

↳ strukturní  
funkční



# Základní pojmy

- **Chromozom**
  - funkční celek dědičného záznamu genetické informace v buňce
  - jádro buňky → 22 párů autozomů + 1 pár gonozomů
- **Lokus**
  - umístění genu na určitém místě na konkrétním chromozomu
- **Alela**
  - konkrétní forma genu

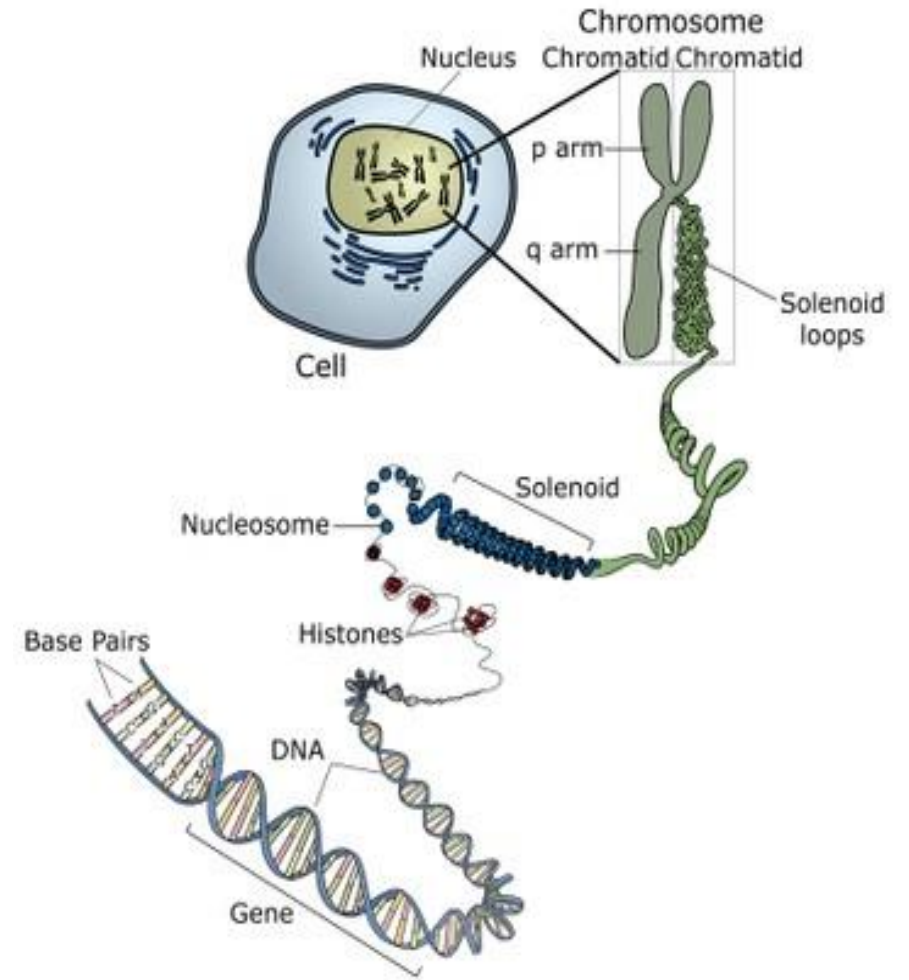


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

# Základní pojmy

- **Genomika**

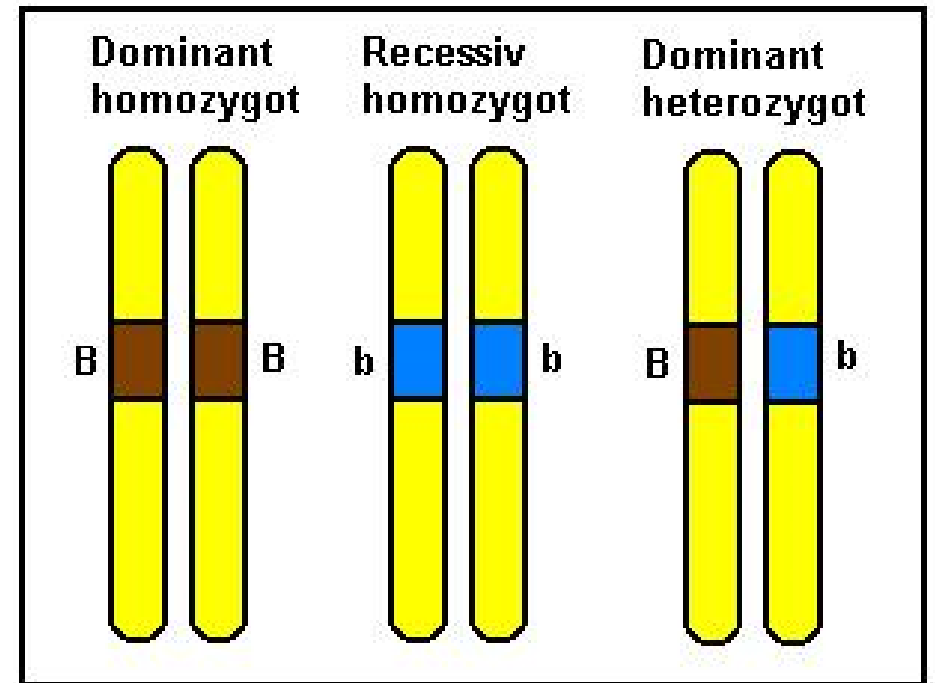
- obor genetiky, který se snaží stanovit úplnou genetickou informaci organismu a interpretovat ji v termínech životních pochodů

- **Heterozygot**

- dvě různé varianty (alely) daného genu nebo jeho části

- **Homozygot**

- dvě stejné varianty (alely) daného genu nebo jeho části



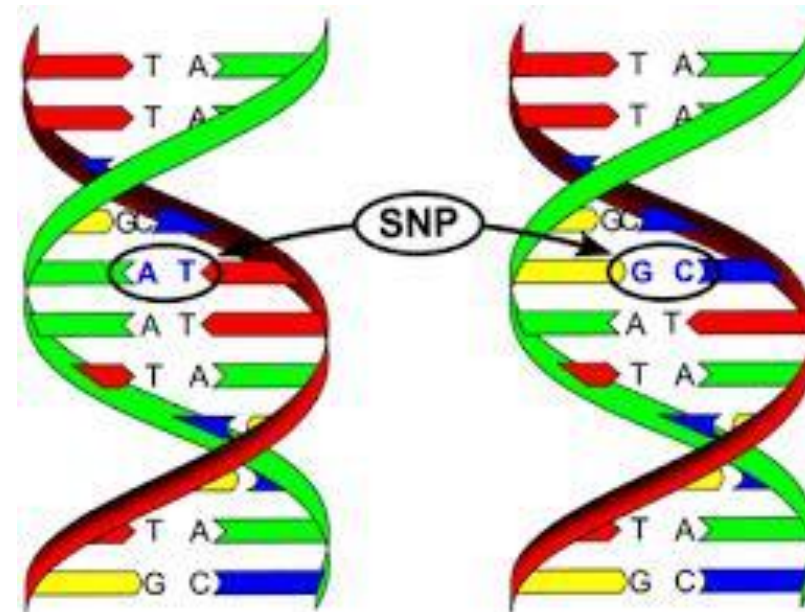
# Základní pojmy

- **Polymorfismus**

- existence několika (přinejmenším dvou) alel pro daný gen, z nichž nejméně častá má populační frekvenci alespoň  $\geq 1\%$

- **Mutace**

- procesy, při kterých dochází ke změnám v genotypu v důsledku působení různých faktorů prostředí
- méně častá alela má populační frekvenci  $< 1\%$



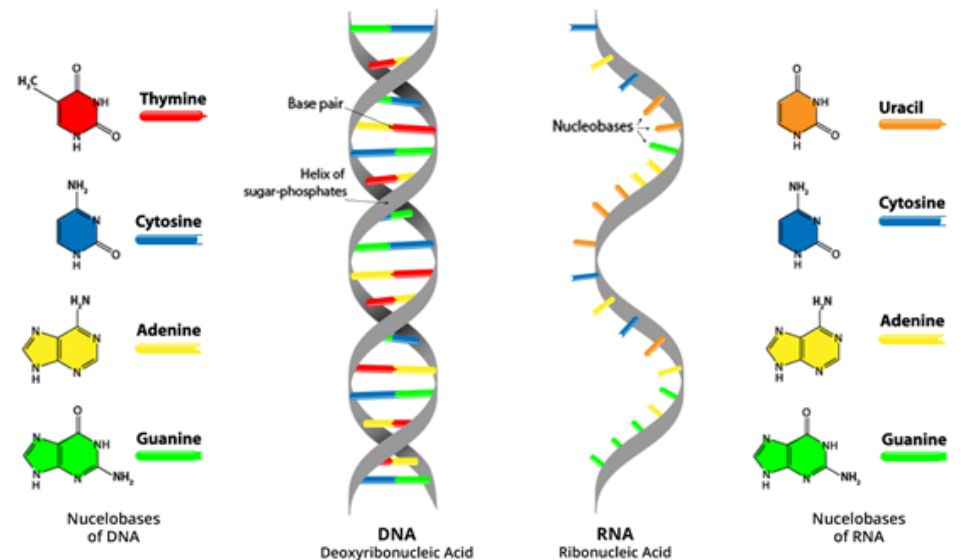
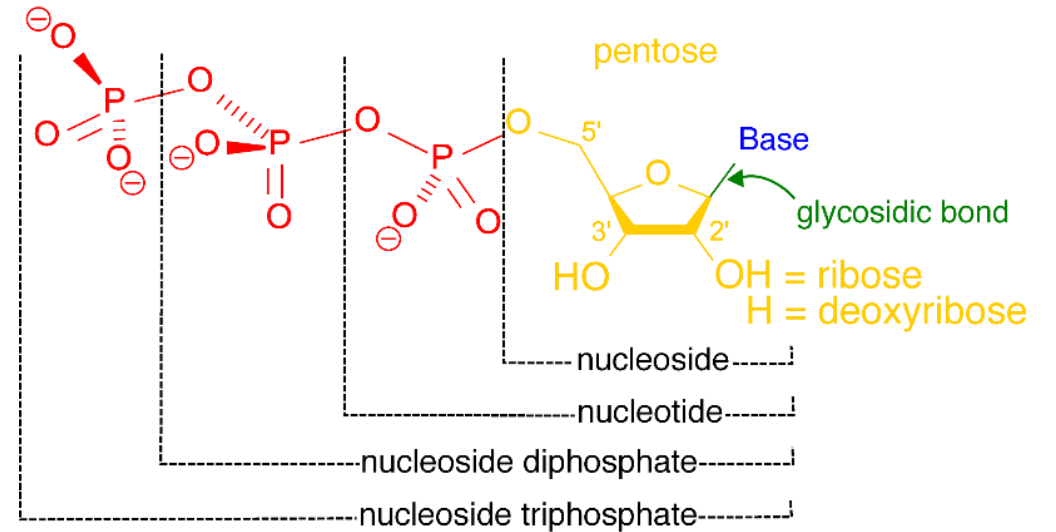
# DNA vs. RNA

- molekula DNA = **kyselina deoxyribonukleová**

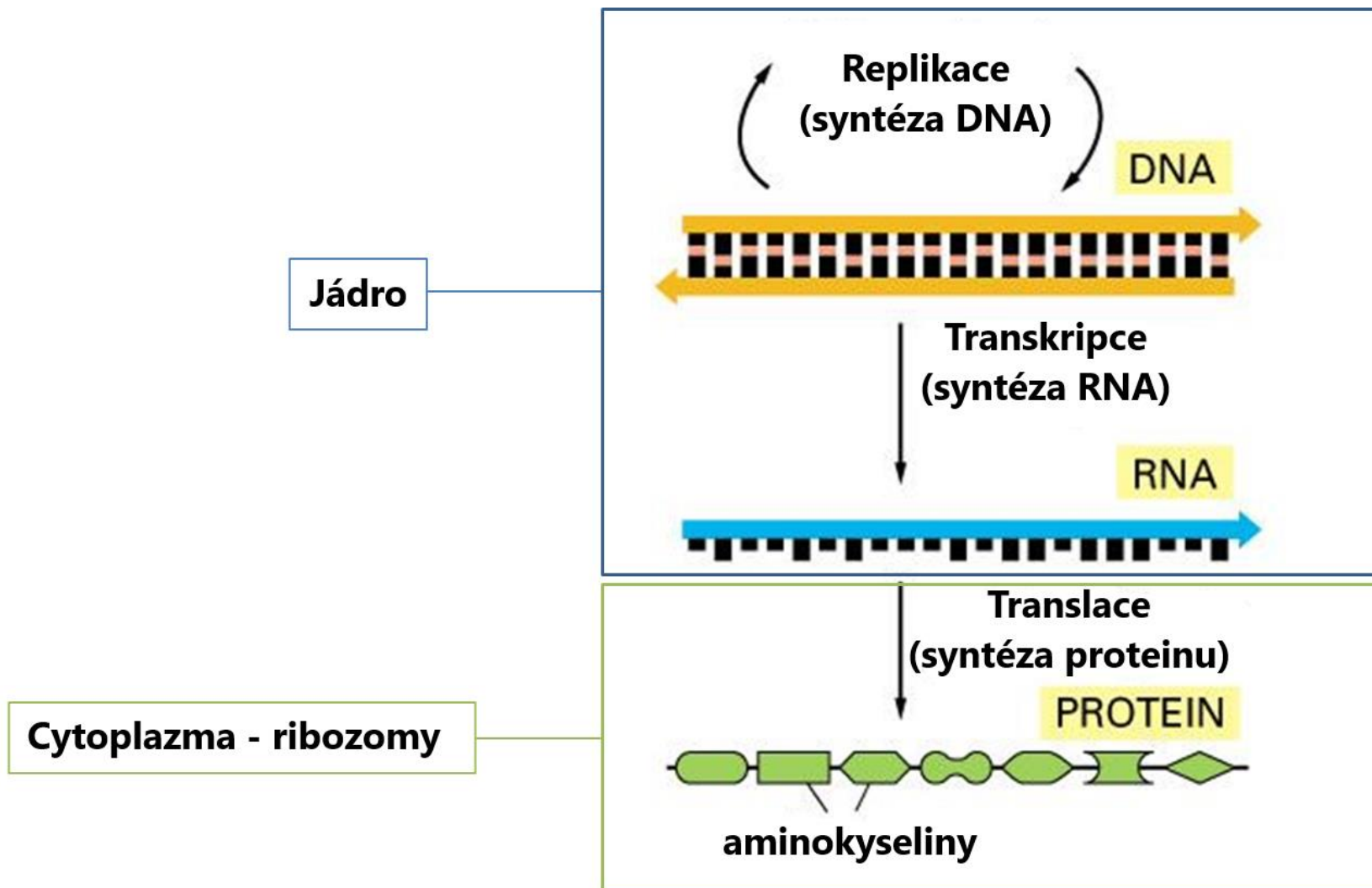
- dvoušroubovice – 2 řetězce v opačném směru
- polynukleotidový řetězec
  - dusíkatá báze ( T, A, C, G) spojená vodíkovými můstky
  - zbytek kyseliny fosforečné
  - cukerná složka – deoxyribóza

- molekula RNA = **kyselina ribonukleová**

- jednovláknová
- polynukleotidový řetězec
  - dusíkatá báze ( U, A, C, G) spojená vodíkovými můstky
  - zbytek kyseliny fosforečné
  - cukerná složka – ribóza
- typy – mRNA, tRNA, rRNA



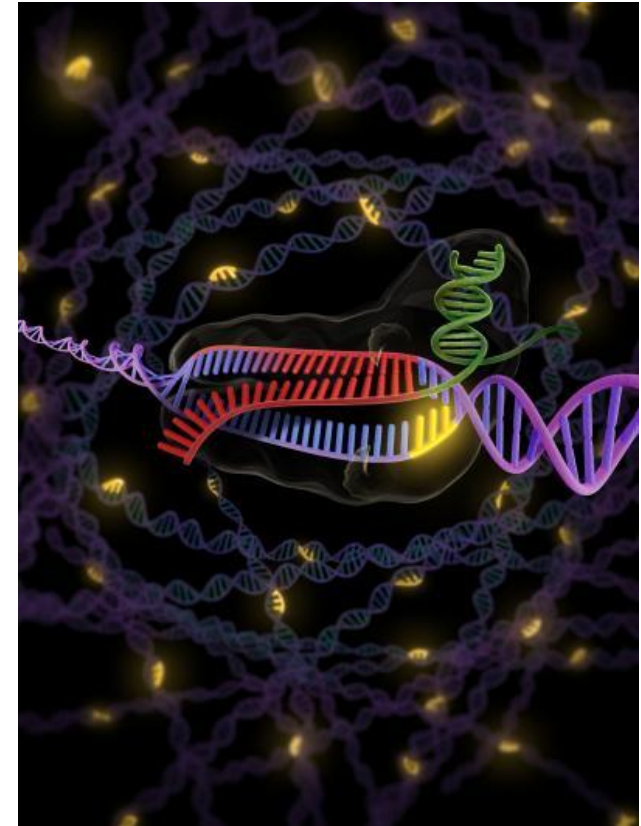
# Ústřední dogma molekulární biologie





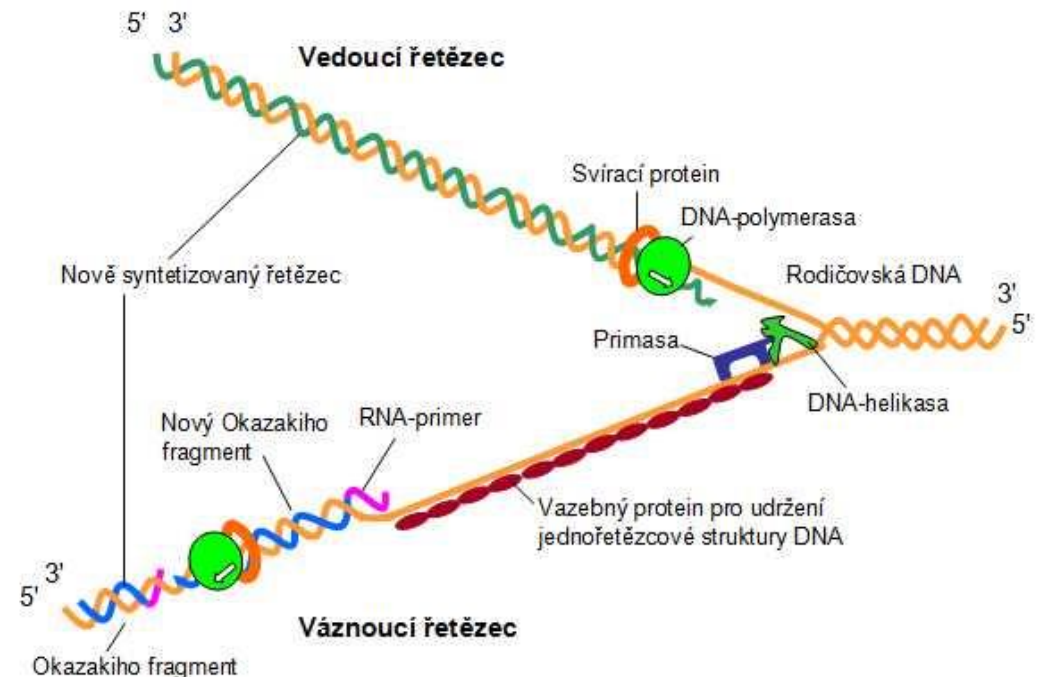
# Replikace DNA

- = **tvorba kopií** molekul DNA zajišťující přenos genetické informace z mateřské do dceřiné buňky
- S-fáze buněčného cyklu
- semikonzervativní proces – 1 nové + 1 staré vlákno
- složky potřebné pro replikaci
  - templát – mateřské vlákno
  - primer – krátký oligonukleotid s volným 3'OH koncem
  - enzymy
  - nukleotidy



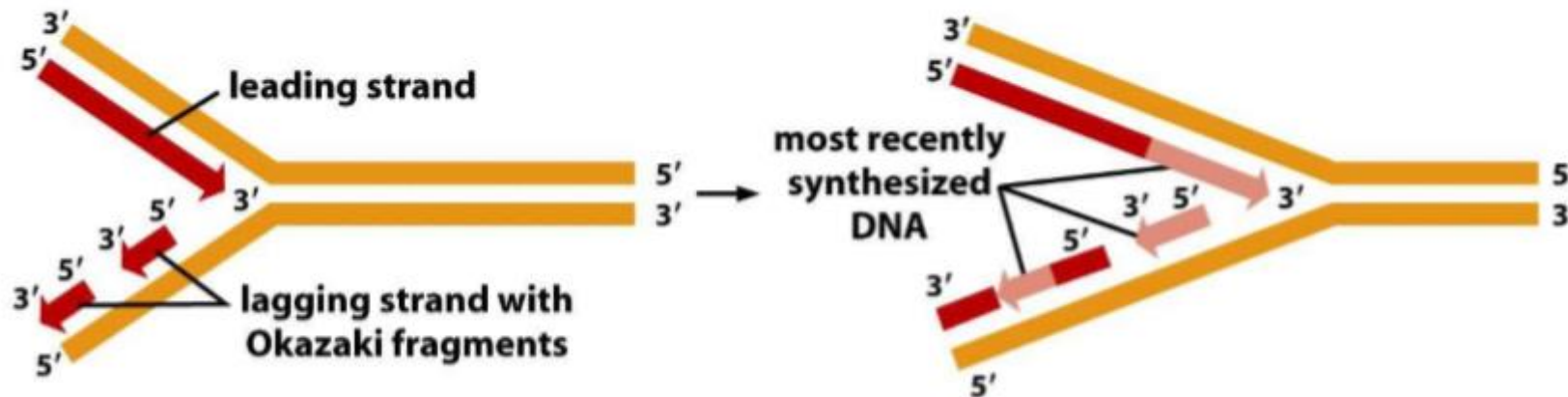
# Replikace DNA

- vznik replikační vidlice
  - **helikáza** – umožňuje oddálit obě molekuly dvoušroubovice
  - **SSB proteiny** – napomáhají udržet vlákna rozdělená
- **DNA primáza** – tvorba RNA primerů
- Replikace je zahájena ve specifických místech – **počátcích replikace** („origins“)
- **DNA polymeráza** – katalyzuje prodlužování řetězce
  - sekvence nového vlákna dle principu komplementarity bází - **adenin + thymin** (2 vodíkové můstky) a **cytosin + guanin** (3 vodíkové můstky)
  - syntéza od 5' konce ke 3' konci



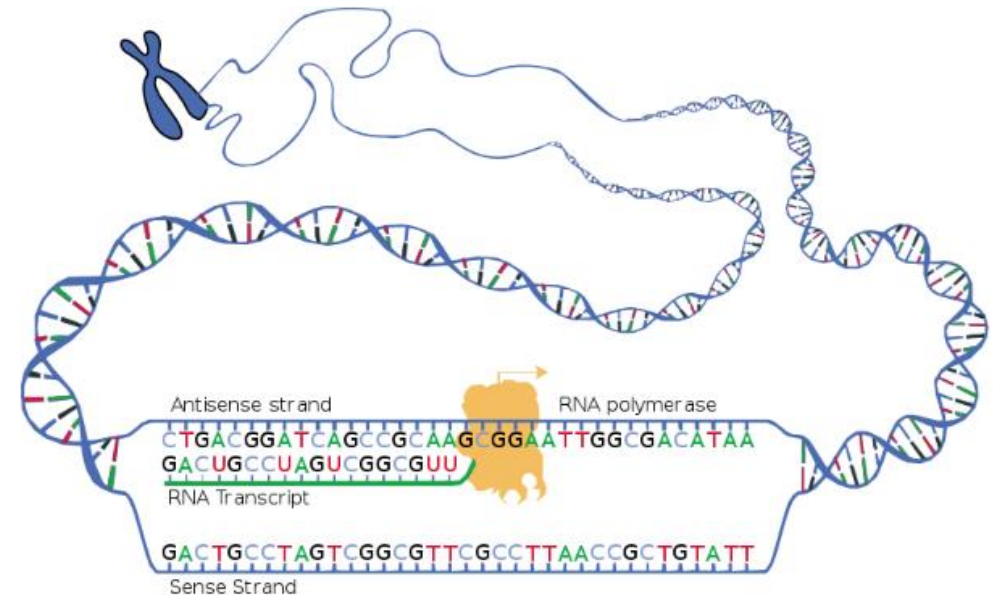
# Replikace DNA

- templátová vlákna **antiparalelní** – jeden řetězec opožděn
  - vedoucí řetězec – jeden RNA primer na začátku, replikace probíhá bez přerušení
  - opoždující se řetězec – ve směru 5'–3' se diskontinuitně tvoří krátké **Okazakiho fragmenty** (každý z nového RNA primeru), které se následně spojí **DNA ligáza**
- RNA primery jsou odstraněny 5'–3' exonukleázovou a nahrazeny 3'-5' polymerázovou aktivitou



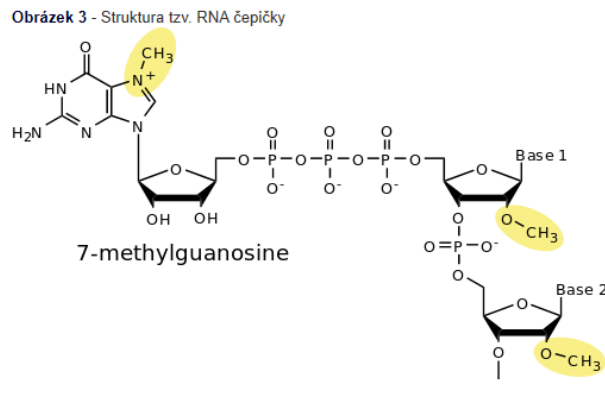
# Transkripce

- **přepis** informace v podobě sekvence DNA do sekvence RNA
- jádro buňky
- **templát** - vlákno DNA
- transkripty se z templátu uvolňují jako jednořetězce
- **DNA-dependentní RNA polymeráza**
  - 3 typy (strukturně podobné, přepisují různé typy genů)
    - RNA pol. I (geny kódující rRNA)
    - RNA pol. II (geny kódující hnRNA)
    - RNA pol. III (geny kódující tRNA)
  - vyžaduje přítomnost transkripčních faktorů (rozvolnění řetězců DNA, umístění RNA polymerázy na promotor a uvolnění z promotoru)
  - **promotor** = startovací místo na DNA – TATA box, CAT box
  - **terminátor** = koncové místo - AAAA

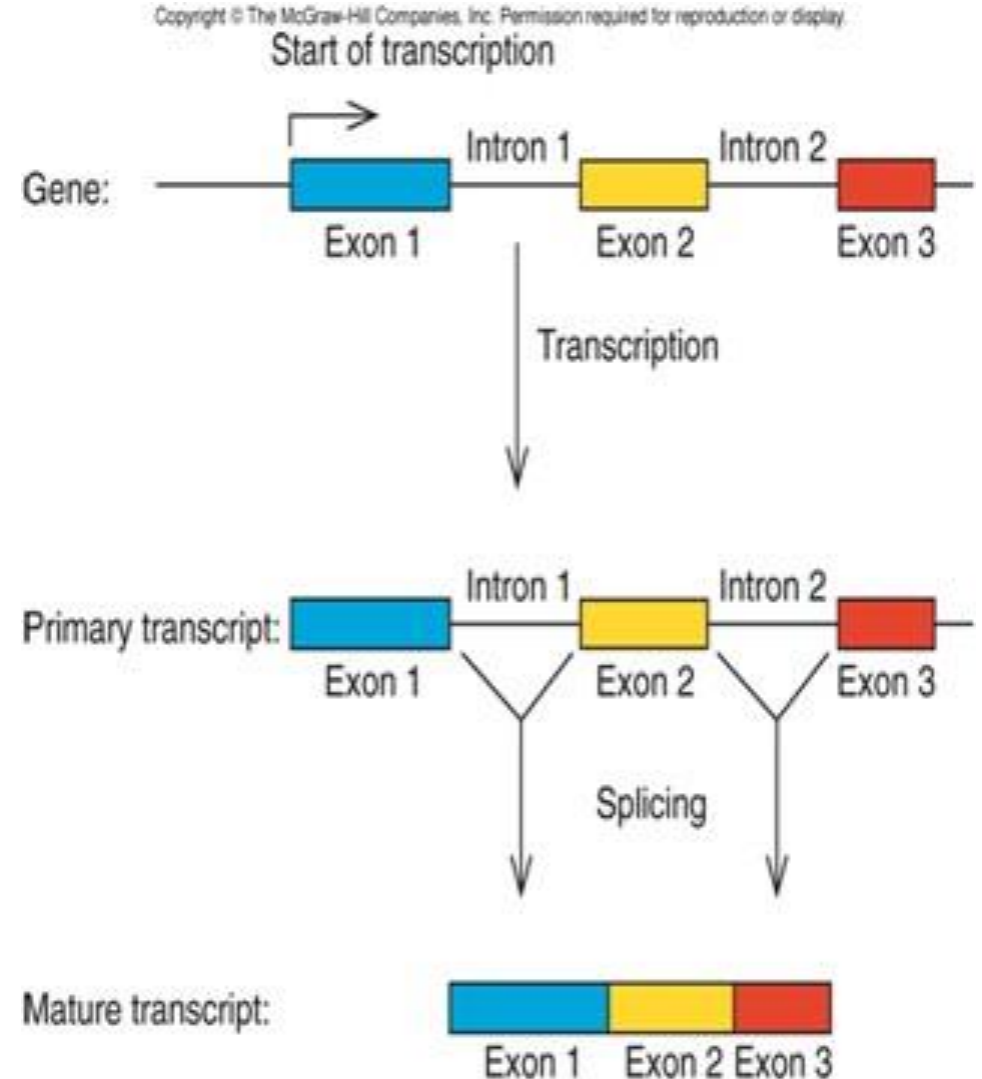


# Posttranskripční modifikace

- modifikace primárních transkriptů:
  - připojení **čepičky** na 5' konec (podílí se na řízení translace mRNA)

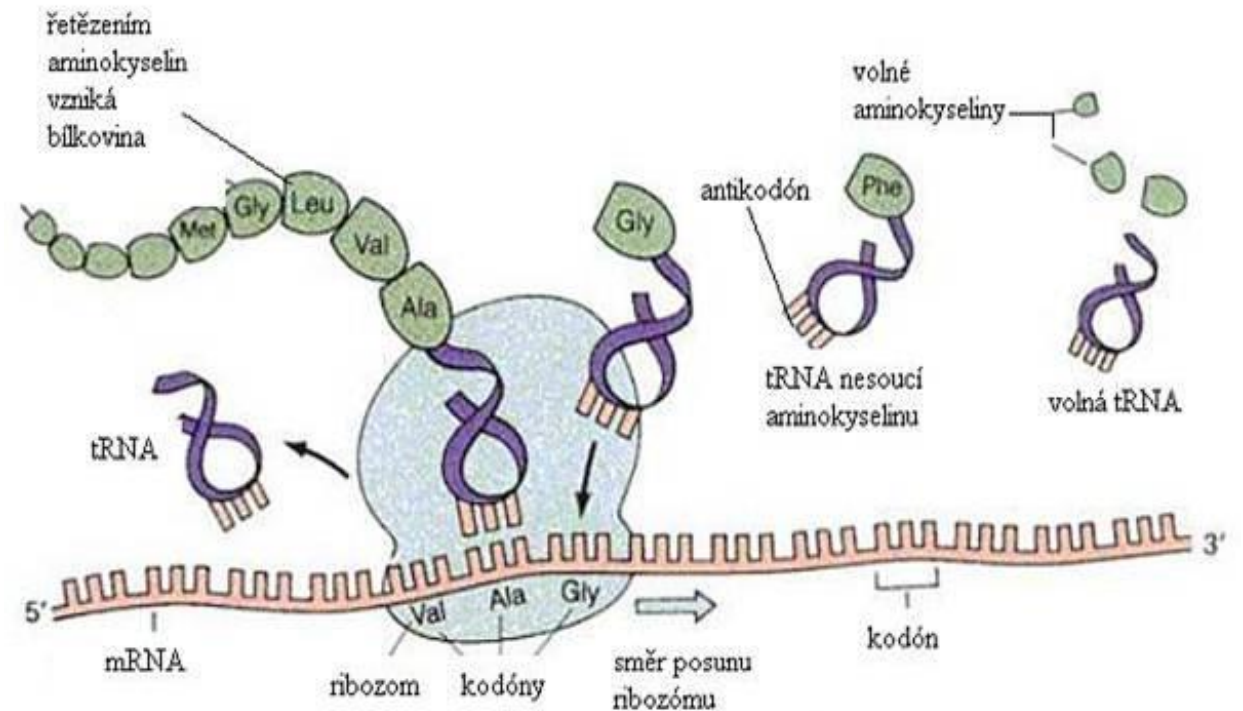


- připojení **polyadenylačního řetězce** na 3' konec
- **sestřih** (splicing) RNA – vystřížení intronů za vzniku zralé mRNA



# Translace

- **překlad** genetické informace z mRNA do sekvence AMK v polypeptidu (pomocí genetického kódu)
- probíhá na ribozomy v cytoplazmě buňky
- fáze – iniciace, elongace, terminace
- **enzym - aminoacyl-tRNA syntetáza**
- iniciační komplex se tvoří na 5'konci mRNA (čepička), zkoumá mRNA od 5'konce a hledá **iniciační kodon AUG**
- terminace translace: **UAA, UAG, UGA**
- **postranlační úpravy** – fosforylace, glykosylace, metylace, ....



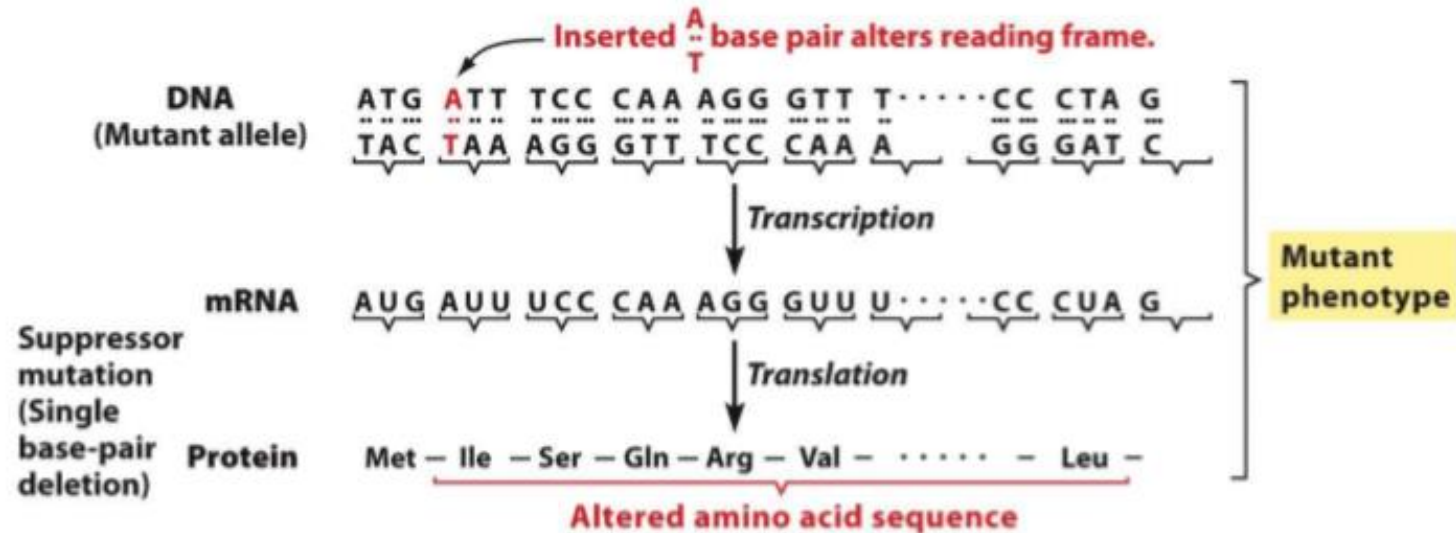
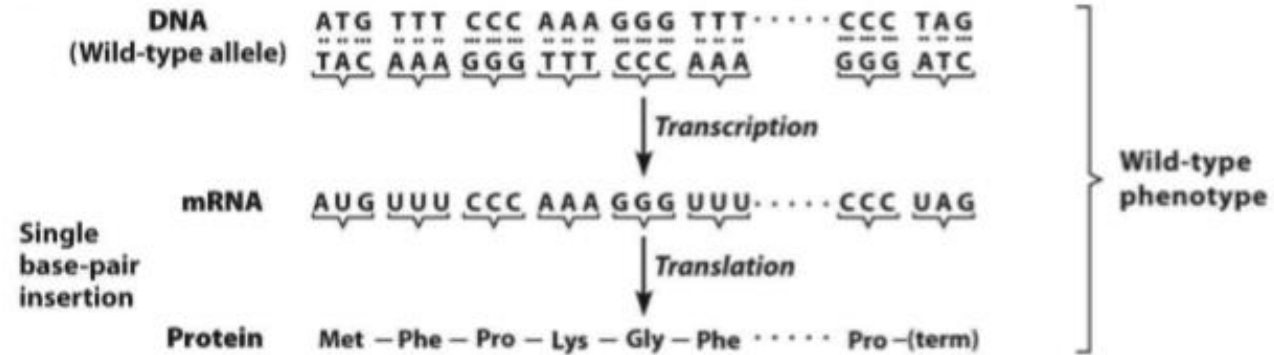
# Genetický kód

- **system**, podle kterého se přiřazují specifické AMK do polypeptidového řetězce podle sekvence mRNA
- **triplet** = kodon – definuje AMK nebo terminaci translace
- každá AMK určena jedním nebo několika kodony v mRNA
- **64 možných tripletů**: 61 určuje AMK, 3 určují terminaci translace
- kodony jsou rozeznávány komplementárními sekvencemi v tRNA (antikodony), které nesou na 3' konci specifické AMK
- inzerce/delece jednoho/dvou párů bází mění čtecí rámec
- **(téměř) univerzální, degenerovaný**

		druhý nukleotid				
		U	C	A	G	
první nukleotid	U	UUU fenylalanín UUC UUA leucín UUG	UCU serin UCC UCA UCG	UAU tyrozín UAC UAA koniec UAG koniec	UGU cystein UGC UGA koniec UGG tryptofán	U
	C	CUU leucín CUC CUA CUG	CCU prolín CCC CCA CCG	CAU histidín CAC CAA glutamin CAG	CGU arginin CGC CGA CGG	C
	A	AUU isoleucín AUC AUA AUG začiatok	ACU treonín ACC ACA ACG	AAU asparagin AAC AAA lyzín AAG	AGU serin AGC AGA arginin AGG	A
	G	GUU valín GUC GUA GUG	GCU alanín GCC GCA GCG	GAU kys. asparagová GAC GAA kys. GAG glutamová	GGU glycín GGC GGA GGG	G

# Genetický kód – změna čtecího rámce

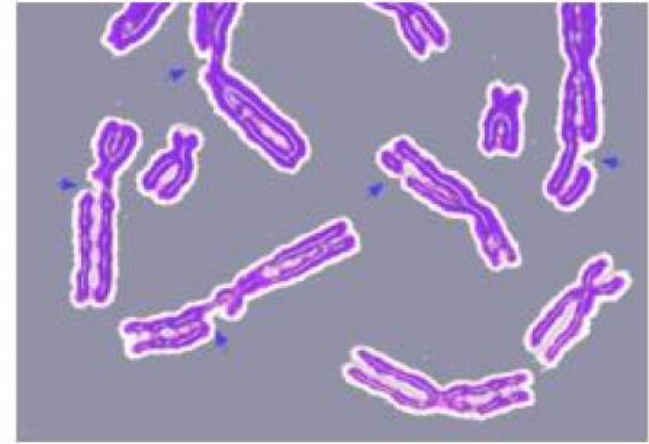
A single base-pair deletion restores the reading frame changed by a single base-pair addition.





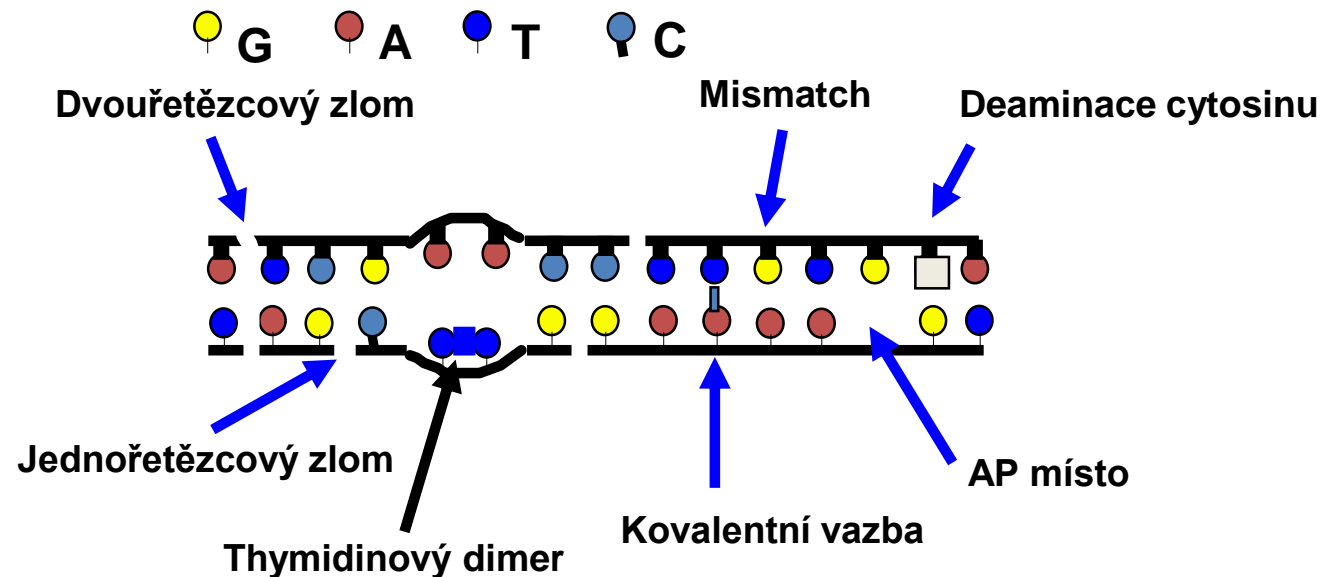
# Poškození DNA

- závažný stav
- následky v syntéze poškozených proteinů
- reparační mechanismy DNA
- rozmnožovací schopnost buněk



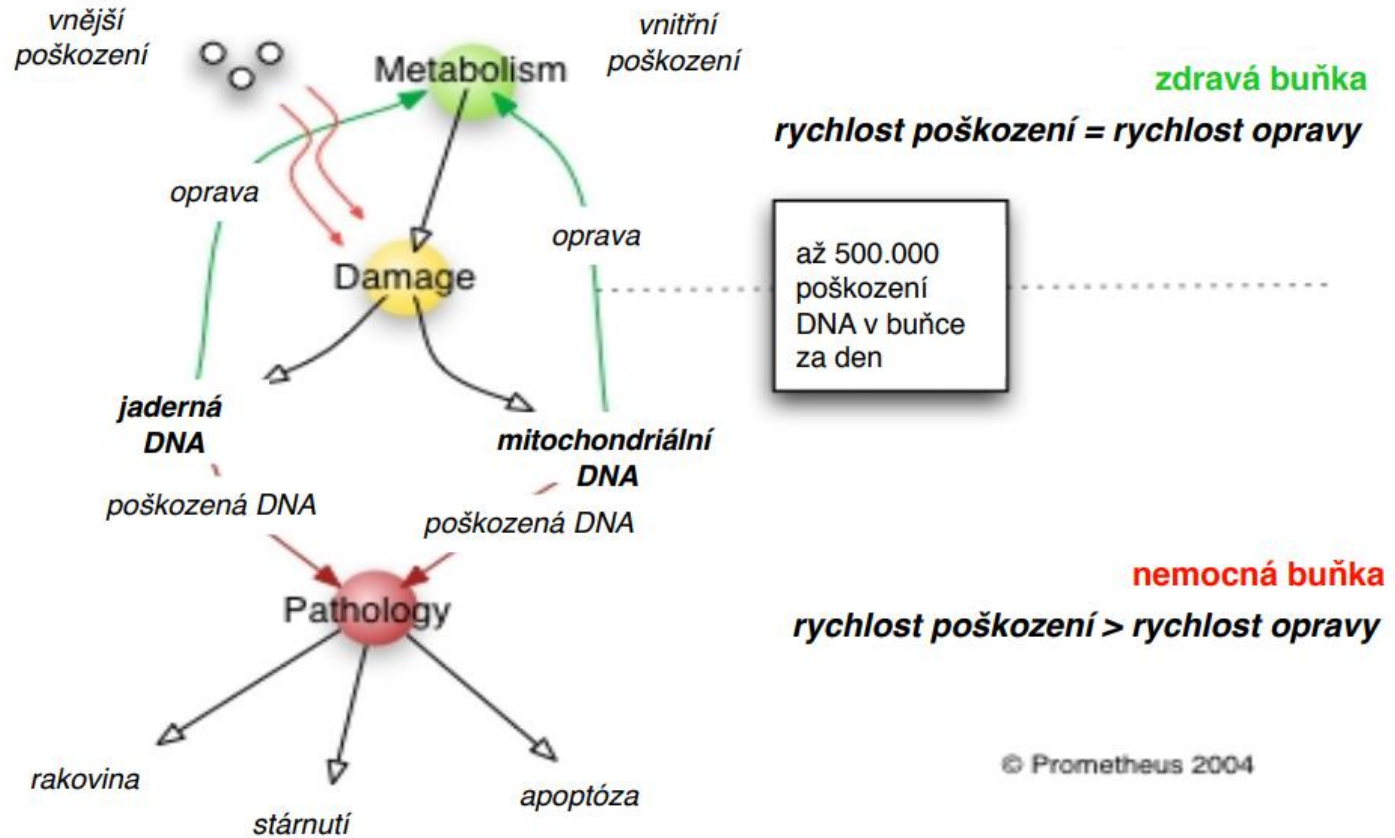
- **Typy poškození:**

- dvouřetězcové zlomy
- jednořetězcové zlomy
- kovalentní vazby
- thymidinové dimery
- deaminace cytosinu
- alkylace báze
- ztráta báze



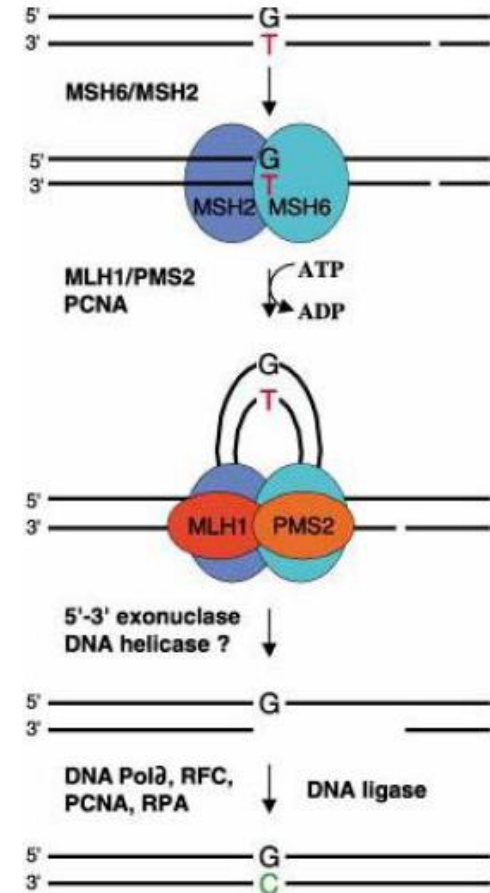
# Reparační mechanismy DNA

- Rozeznání a přímá reparace poškozeného místa
- Excisní reparace
- Mismatch reparace
- SSB reparace

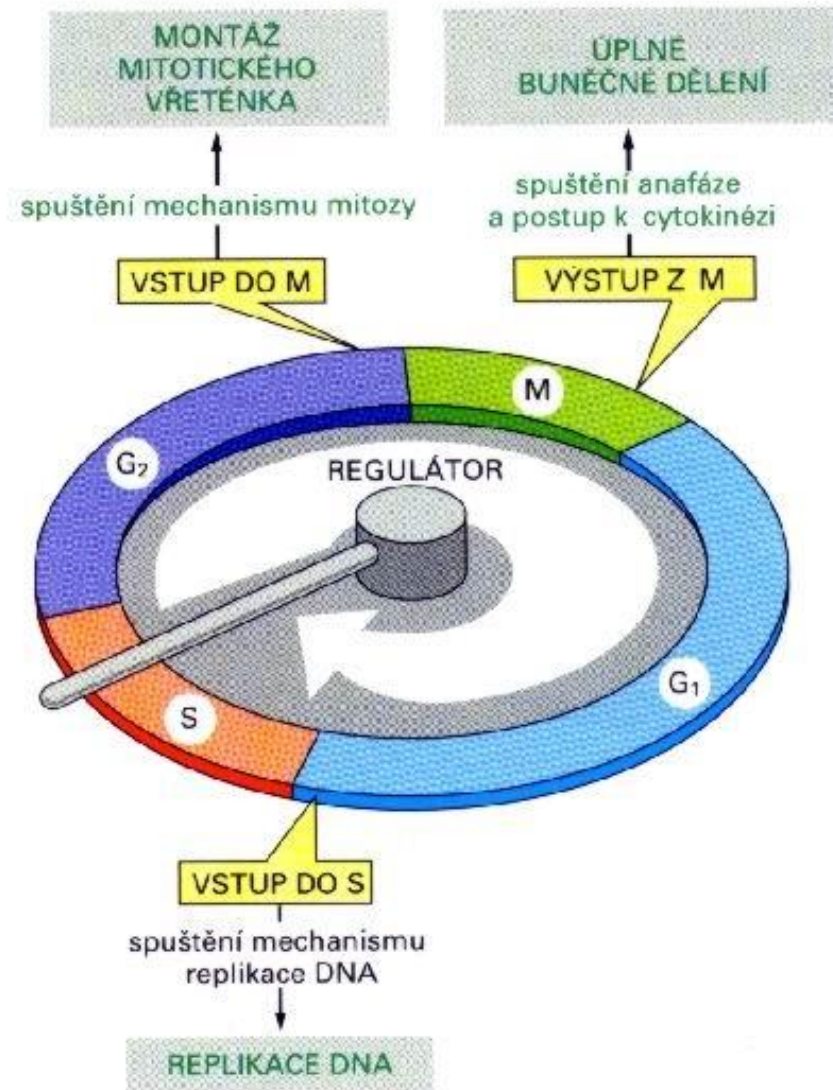


# System oprav chybného párování bází u savců

- Poškozený řetězec DNA obsahuje nesprávně párovanou bázi (T).
- Rozpoznáno proteinovým heterodimerem **MSH6-MSH2**.
- Proteiny **MLH1/PMS2** a **PCNA** (proliferační jaderný antigen) utváří na DNA strukturu smyčky (angl. loop structure).
- **Enzymy**
  - DNA exonukleáza a DNA helikáza degradují chybně párovanou část řetězce
  - DNA ligáza – spojení řetězců
- Mezera doplněna/opravena replikačním aparátem.



# Buněčný cyklus



= uspořádaný sled procesů, při kterých buňka zdvojí svůj obsah a následně se rozdělí na dvě buňky dceřiné (každá z nich ponese stejné chromozomy)

**Cíl: reprodukce genetického materiálu pro příští generaci buněk**

# Buněčný cyklus

- **Jednobuněčné organismy**

- sladěno s růstem – mateřská b. musí dorůst do určité velikosti, aby se rozdělila

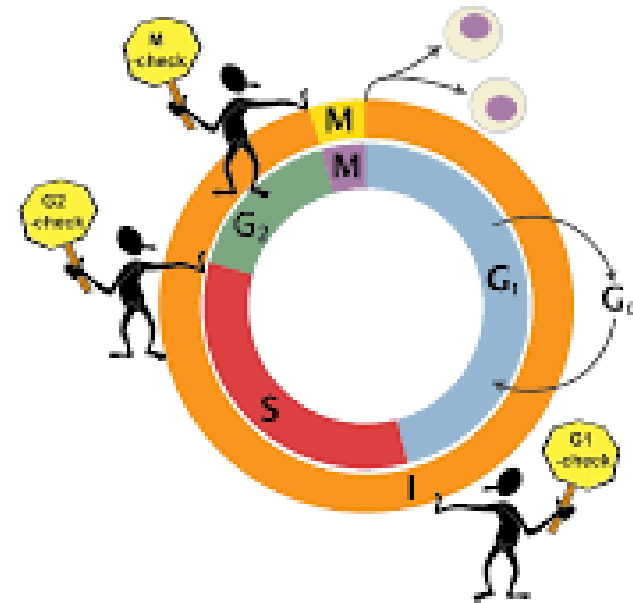
- **Mnohobuněčné organismy**

- sladění replikace DNA s vývojovým programem buňky
- sladění replikace a dělení každé buňky s vývojem příslušné tkáně nebo orgánu
- **dospělost** - buňky se dělí, když je potřeba (nahrazení odumírajících buněk, obnova poraněné tkáně)
- ztráta kontroly nad buněčným cyklem -> **rakovina**

# Buněčný cyklus

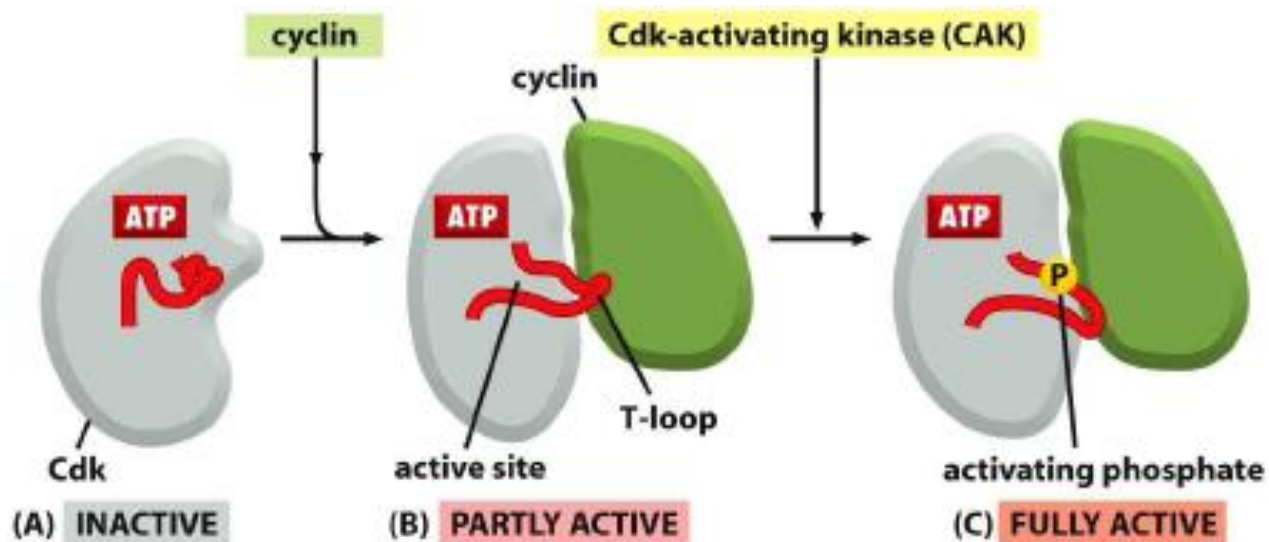
- kladeny **vysoké nároky na přesnost**
  - bezchybná replikace
  - správné řazení fází
    - mitóza před dokončením replikace -> ztráta genetické informace min. u jedné buňky
    - dvojnásobná replikace před mitózou -> zvýšený počet kopií genů na příslušné části chromozomu -> nerovnováha v genové expresi, nízká viabilita
  - přesná segregace chromozomů
  - koordinace s vývojovými programy

→ **kontrolní body**



# Buněčný cyklus

- řídicí elementy – **cyklin-dependentní kinázy (CDK)**
  - **řídí aktivitu** mnoha proteinů zapojených do replikace DNA a mitózy tím, že je ve specifických místech **fosforyluje** (aktivace/inaktivace)
- Cyklin + CDK -> komplex se připojí na protein -> fosforylace proteinu -> po fosforylaci se komplex rozpadne a dojde ke změně aktivity proteinu



# Buněčný cyklus - Interfáze

## Interfáze – G1, G2, S

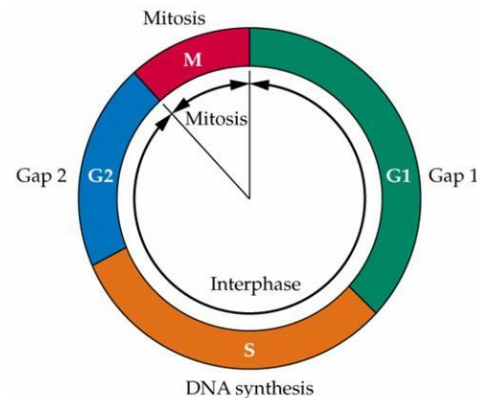
- **příprava** na buněčné dělení, vnější jaderná membrána je spojená s ER
- **nepříznivé podmínky**
  - setrvání v G1/vstup do G0; buňky nerostou, mohou tak setrvat i několik měsíců/let

### G2-fáze

- dvojnásobné množství DNA (než v G1)
- syntéza proteinů potřebných na vstup do mitózy

### S-fáze

- replikace DNA
- syntéza proteinů asociovaných s DNA



### G0-fáze

- většina buněk mnohobuněčných organismů (jsou diferencované a specializované k výkonu určité funkce, nedělí se)
- po přijetí prorůstového faktoru mohou vstoupit zpět do buněčného cyklu

### G1-fáze

- nejdelší a nejvariabilnější
- buňka se **zvětšuje a zdvojuje organely**
- na konci této fáze se nachází kontrolní bod: **bod restrikce**
  - buňka má dostatek živin a růstových faktorů, vykazuje vysokou metabolickou aktivitu -> přejde bod restrikce a pokračuje do další fáze
  - nedostatek živin, obdržení antiproliferačního signálu -> zpomalení postupu fází/opuštění cyklu (přechod do G0)

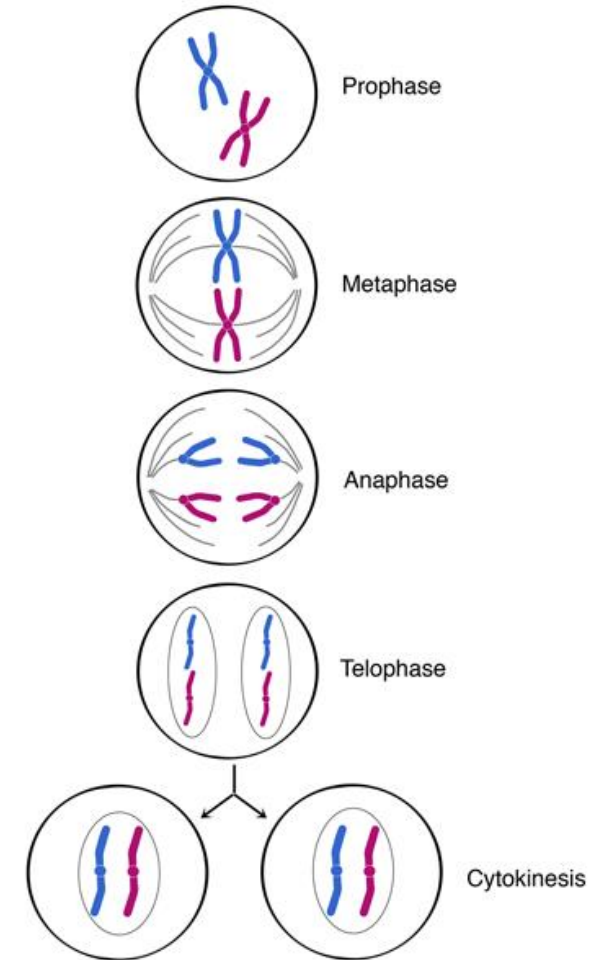


# Buněčný cyklus - Mitóza

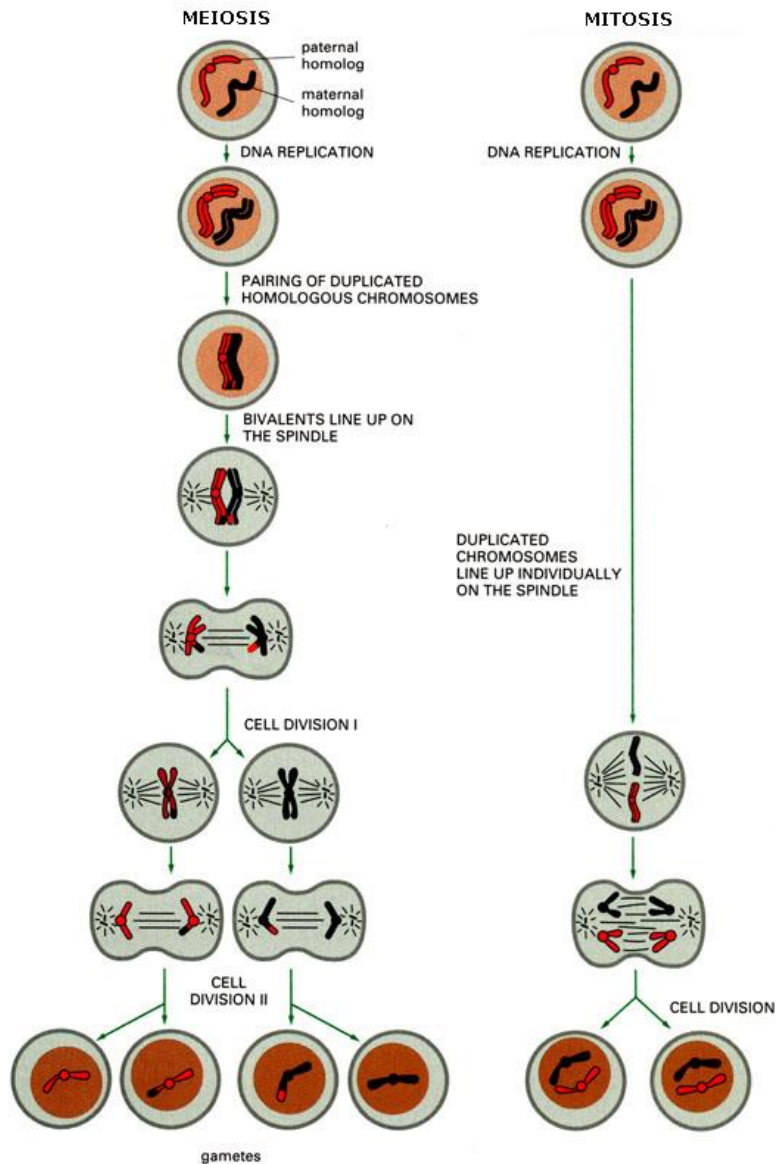
- jaderné dělení (mitóza) + následné dělení cytoplazmy = cytokineze

## Mitóza

- dělení somatických buněk
- vznik - **dvě diploidní** buňky s identickou genetickou výbavou
- **profáze** – spiralizace vláken DNA, tvorba mitotického vřeténka
- prometafáze – rozpad jaderné membrány
- **metafáze** – sestavení kinetochoru na každé centromere, připojení chromatid k vřeténku ( ekvatoriální rovině)
- **anafáze** – separace chromatid k opačným pólům
- **telofáze** – dokončení separace chromatid, rozložení vřeténka, obnovení jaderné membrány



# Mitóza vs. meióza



**Mitóza** = 2 dceřiné 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, vznik haploidních gamet

1.meiotické (redukční) dělení – rozdělení homologních chromozomů; odehrává se zde meiotický crossing-over (rekombinace genů) – žádná z gamet není identická!

Poruchy rozestupu – např. trisomie.

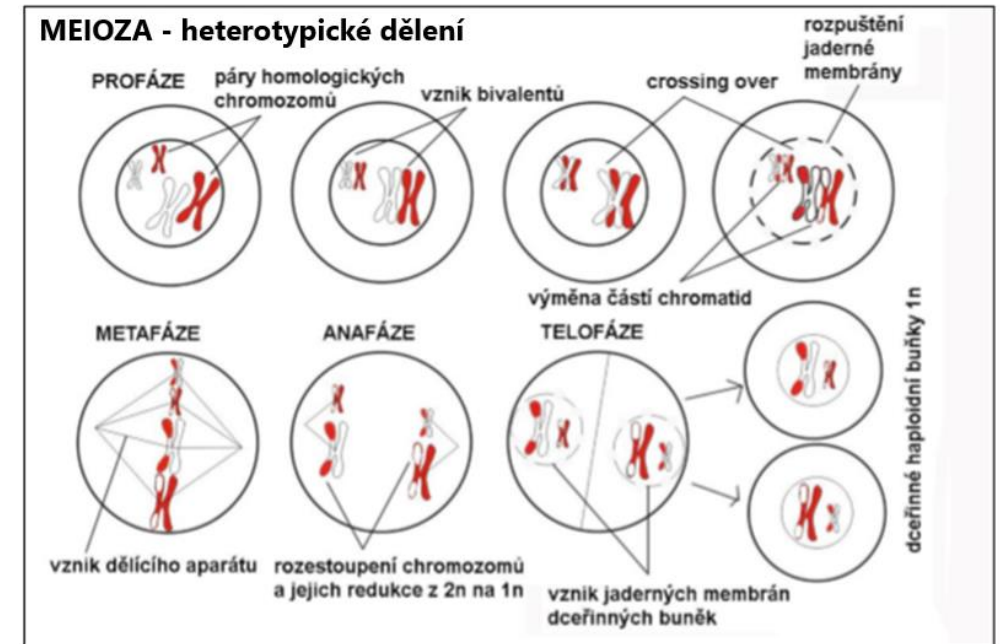
2.meiotické dělení – rozestup sesterských chromatid -> 2 dceřiné buňky s haploidním počtem chromozomů, vznik pohlavních buněk (spermie, vajíčko), dodatečné promíchání genetického materiálu crossing-overem

# Meióza

- vznik 4 haploidních gamet (pohlavní buňky)
- genetická variabilita

## Heterotypické dělení

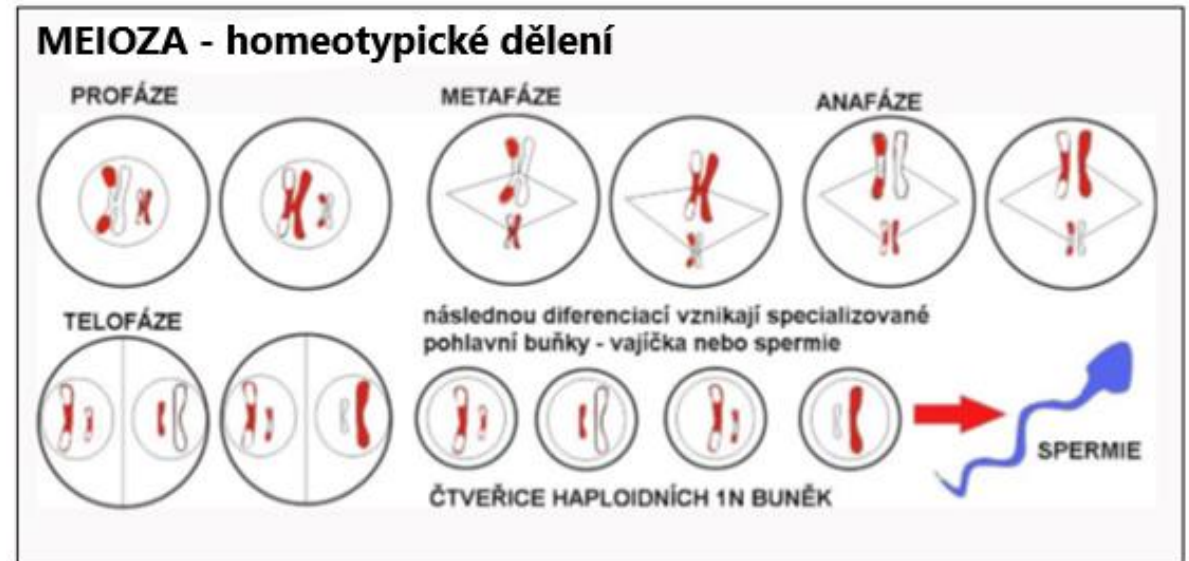
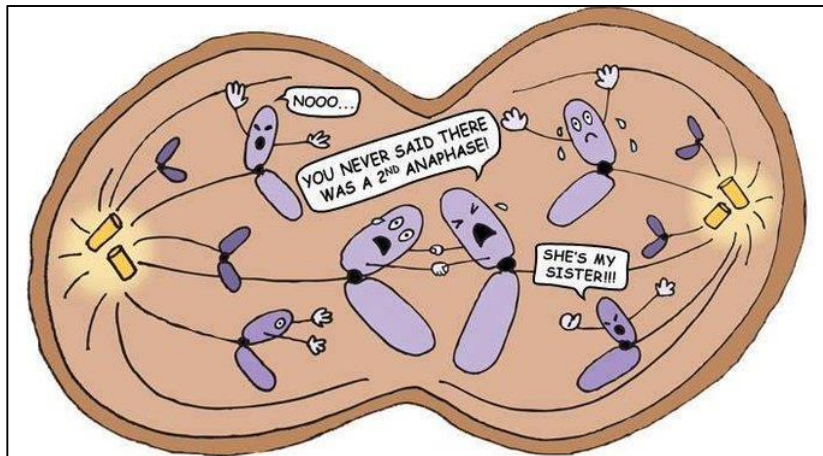
- **Profáze** – 5 částí
  - **Leptotene** – spiralizace chromozomů
  - **Zygotene** – vznik bivalentů
  - **Pachytene** – **crossing over** = křížení nesesterských chromatid
  - **Diplotene** – postupné rozestoupení homologních chromozomů
  - **Diakineze** – rozpuštění jaderného obalu, vznik dělicího vřeténka
- **Metafáze** – vzniká ekvatoriální rovina
- **Anafáze** – rozdělení  $2n$  chromozomů, oddálení vřeténka
- **Telofáze** – vytvoření jaderného obalu, zánik vřeténka



# Meióza

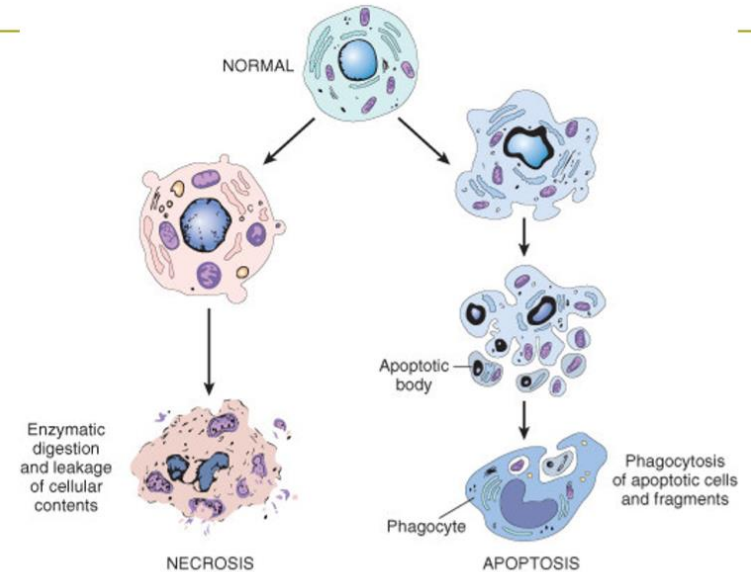
## Homeotypické dělení

- **Profáze** – spiralizace chromozomů, vznik dělicího vřeténka, rozpuštění jaderné membrány
- **Metafáze** – vzniká ekvatoriální rovina, připojení na dělicí vřeténko
- **Anafáze** – oddalování chromatid rozdělených chromozomů
- **Telofáze** – vytvoření jaderné membrány, zánik dělicího vřeténka, despirilizace chromozomů



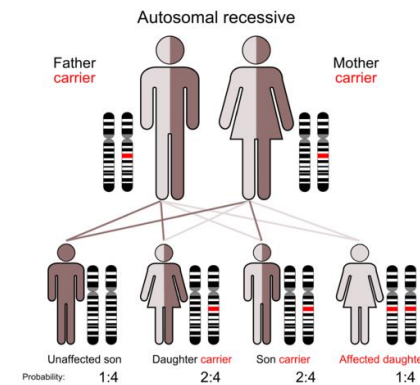
# Buněčná smrt

- Programovaná (signální systém) x neprogramovaná (neregulovaná)
- **Apoptóza**
  - **Kontrola** nadměrné proliferace buněk, **eliminace** přestárých/poškozených buněk
  - Zmenšení b., kondenzace jádra, fragmentace DNA a následně celé b. (**apoptická tělíska**)
  - Umírající buňka je fagocytována okolními buňkami
  - Klíčové složky: **kaspázy**
  - Vnitřní (mitochondriální) dráha – pomocí proteinů **Bcl-2 rodiny**
  - Vnější (receptorová) dráha – povrchové receptory smrti – **Fas a TRAIL**
- **Nekróza**
  - **vlivy** – mechanické, chemické, tepelné, virová infekce buňky, bakteriální toxiny, vyčerpání energetických zásob
  - narušení integrity cytoplazmatické membrány – změna vnitřního prostředí
  - rozpad buňky – vylití obsahu do okolí
  - řetězová reakce – poškození okolních tkání, **zánět**
- **Autofagie**
  - rozklad buněčných složek v lysozomech



# DNA diagnostika

- **Detekce přítomnosti nukleové kyseliny specifické sekvence**
  - Identifikace živočišného druhu
  - Paternita
  - Identifikace jedince - forenzní účely
  - Profil DNA – SNPs
- **Analýza struktury (sekvence) nukleové kyseliny**
- **Stanovení genotypu**
  - Detekce klinicky významných mutací a polymorfismů
  - Dědičné choroby
  - Detekce v onkogenech a supresorových genech v nádorech
- **Prenatální, preimplantační diagnostika**
- **Kvantifikace nukleové kyseliny se specifickou sekvencí**
  - Hodnocení intenzity a změny exprese genů – tumory
- **Kvantifikace proteinů a typů jejich posttranslační modifikace**



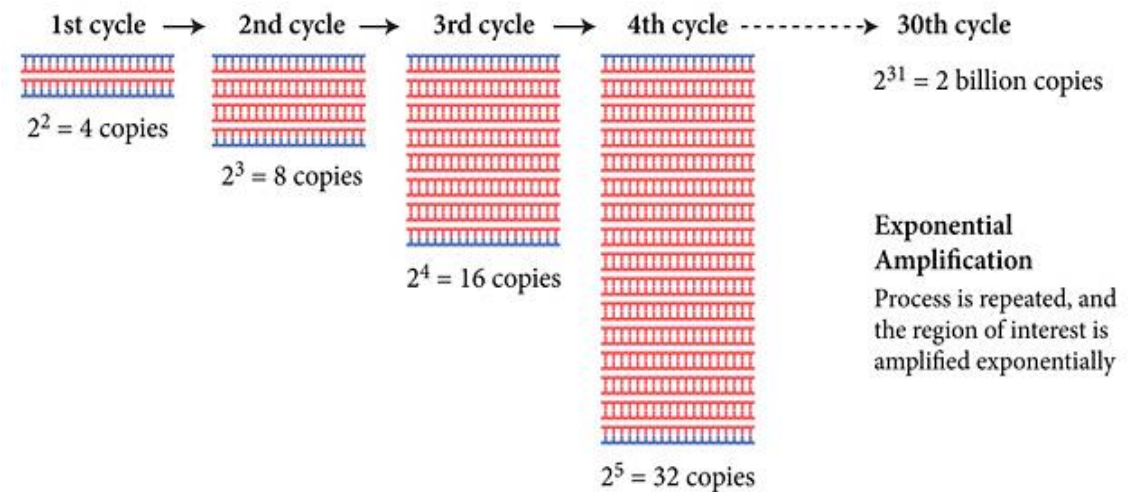
# Metody molekulární biologie

- Vstupní biologický materiál
  - Plná krev – sérum nebo plazma
  - Sliny
  - Buňky
  - Tkáně
  - Tělní tekutiny
- Izolace DNA, RNA, proteinů ze vstupního materiálu
- Molekulární a biochemické metodiky pro stanovení dané problematiky
  - Detekce polymorfismu
    - PCR → RFLP → detekce na ELFO
    - Real-time PCR
    - Sekvence



# PCR – Polymerase Chain Reaction

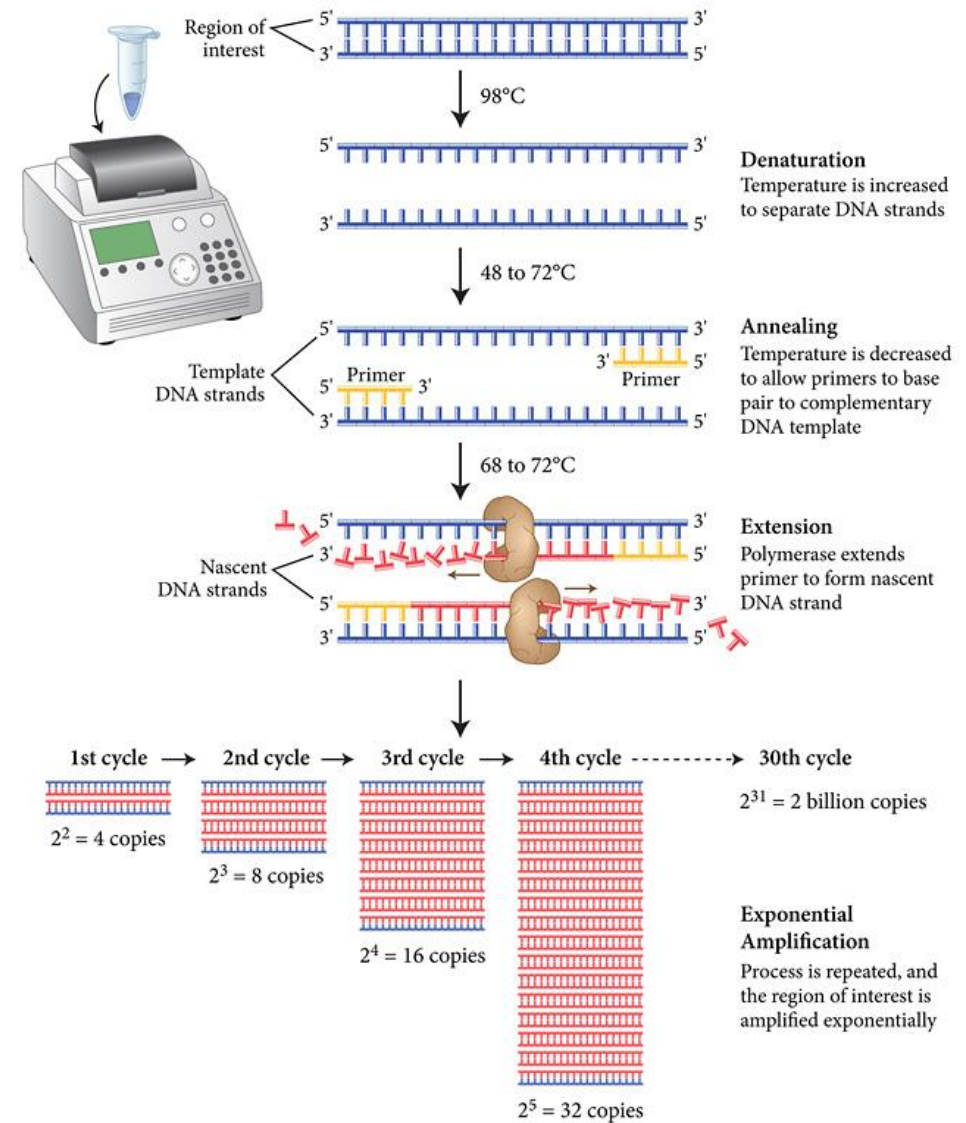
- **cíl** – získání požadované a specifické sekvence genomové DNA bez jejího předchozího klonování
- **princip** – mnohonásobná replikace
  - cca 30 cyklů
  - závislost na teplotě reakční směsi
  - množství namnožené DNA roste exponenciální řadou ( $2^n$ )
- termocycler





# PCR

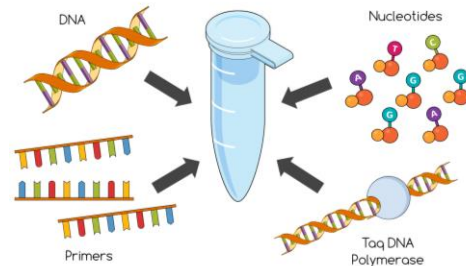
- **mnohonásobná in vitro replikace ve zkumavce**
- řetězová reakce vychází z DNA replikace
- opakování cyklů:
  - denaturace (separace dsDNA) – 96 °C
  - annealing – navázání primerů - 50 – 65 °C
  - elongace – syntéza nového vlákna DNA – 72 °C



# PCR

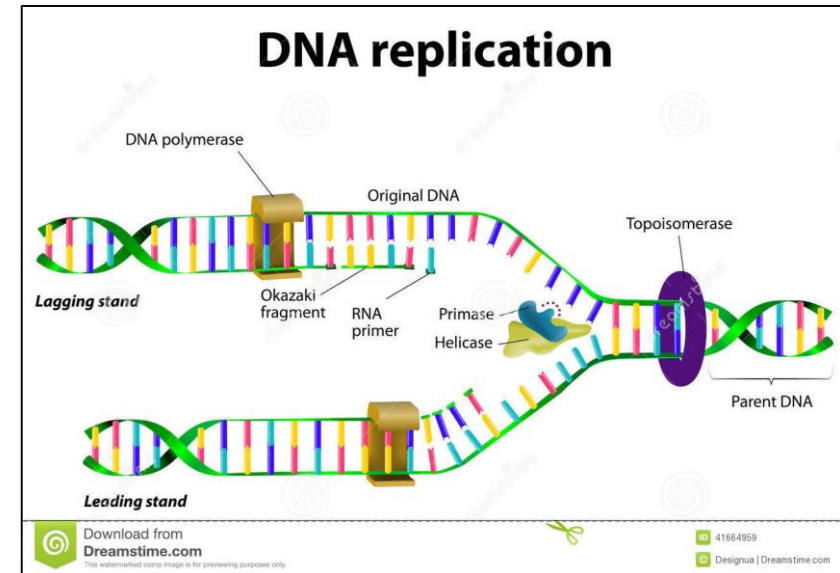
- DNA replikace – *in vitro* (PCR)

- **templátová DNA**
- **dNTP**
- **puf** (pH=8)
- **Mg<sup>2+</sup> soli**
  - aktivace polymerázy
- **primer**
  - krátké specifické úseky DNA
  - ohraničení oblasti amplifikace DNA
  - oligonukleotid 20 – 25 pb
- **Taq polymeráza**
  - bakterie *Thermus aquaticus*
  - Termostabilní



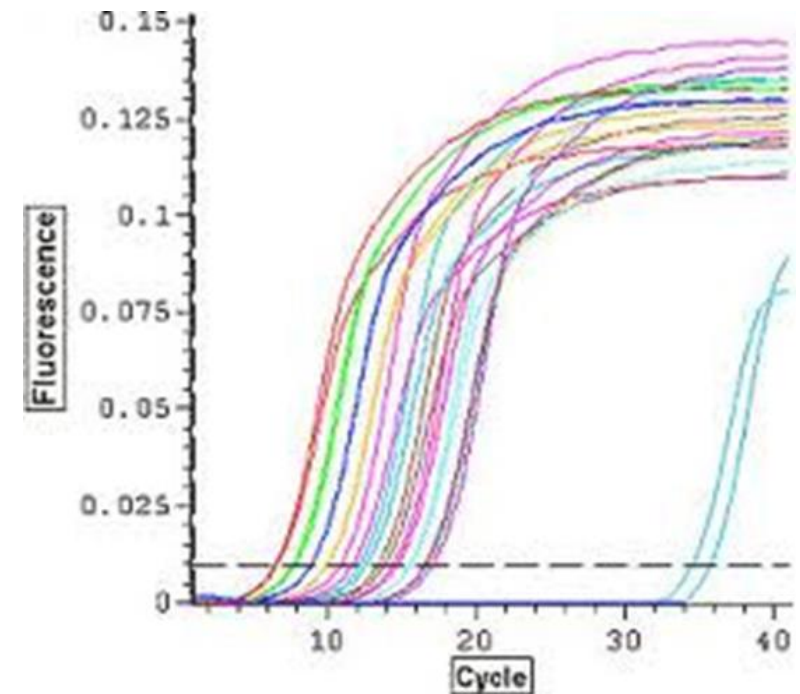
- DNA replikace - *in vivo*

- Enzymy – helikáza, primáza, DNA-polymeráza, ligáza ...



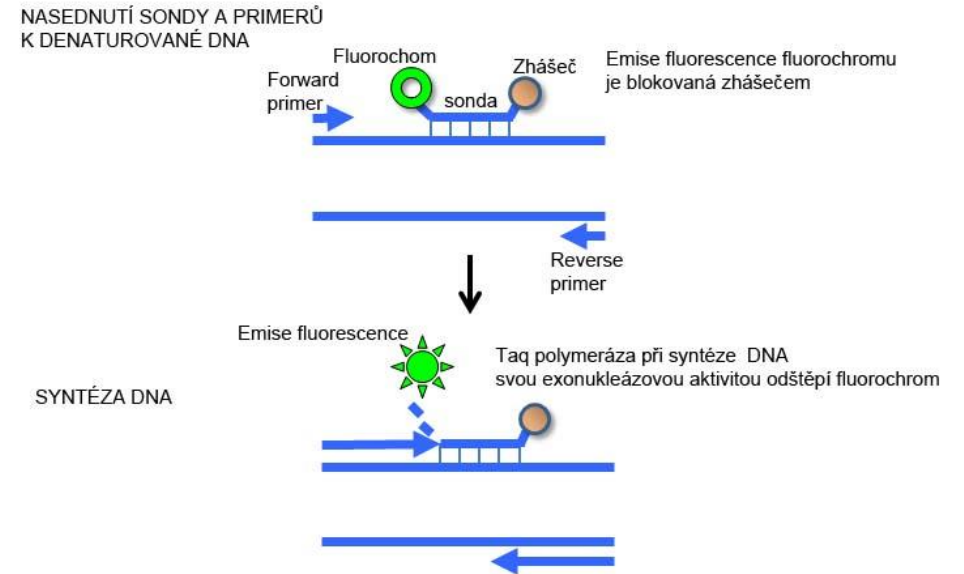
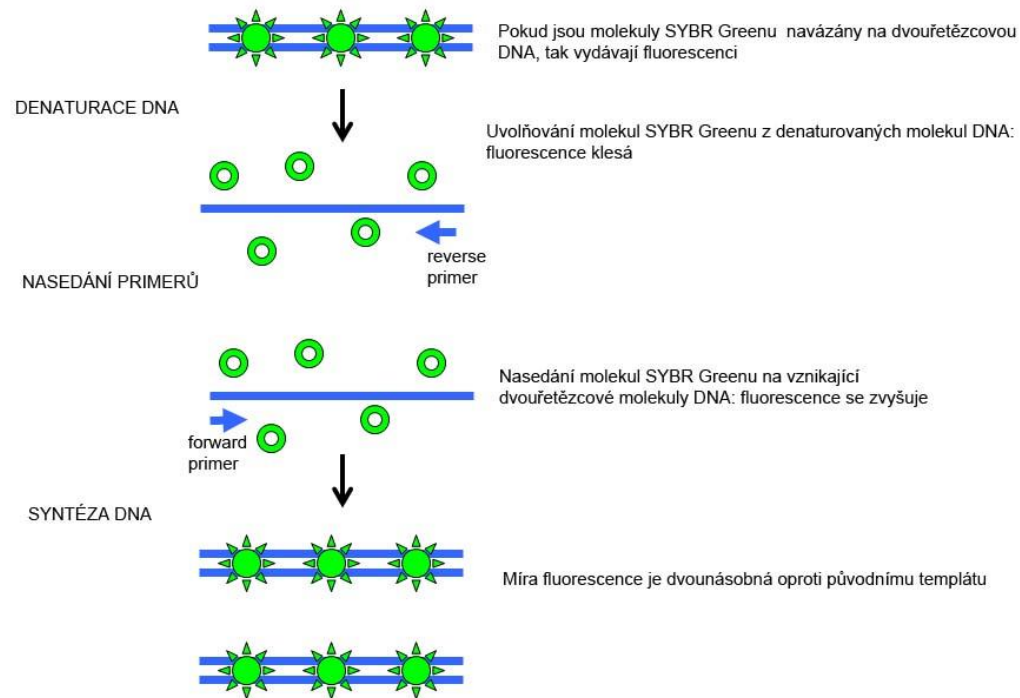
# qPCR – Kvantitativní Real-time PCR

- kvantifikace DNA
- založeno na klasické PCR
- využívá se speciální cycler, který v průběhu PCR kontinuálně zaznamenává množství DNA, a to v průběhu každého cyklu
- detekce množství DNA je umožněna přítomností **fluorescenčního substrátu**
- Real-time PCR se obvykle provádí v 96 jamkových destičkách, úroveň fluorescence je zaznamenávána v jednotlivých jamkách
- vysoce citlivá a vysoce specifická metoda



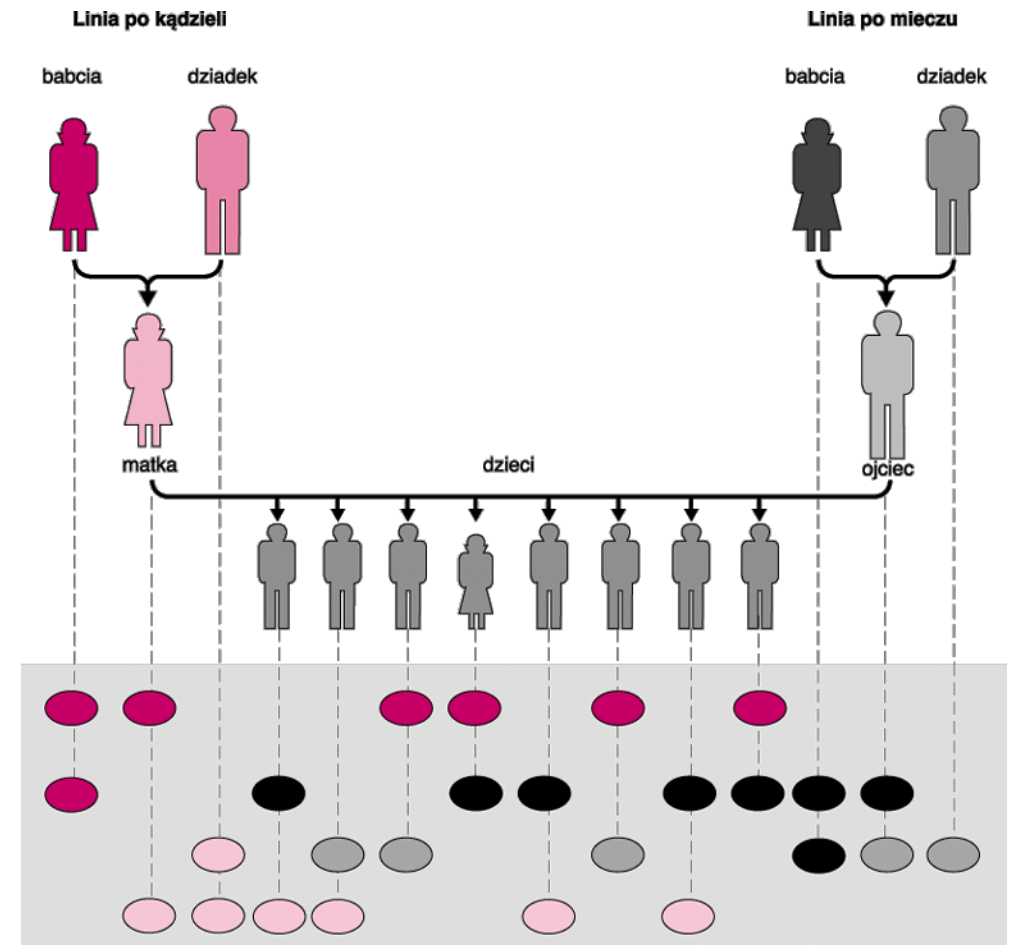
# qPCR

- intenzita fluorescence je **přímo úměrná množství produktu, který v reakci vzniká**
- Detekce produktu:
  - **nespecifické sondy - Sybr GREEN**
  - **sekvenčně specifická DNA proba - oligonuklotid značený fluorescenčně (Taq man)**



# RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

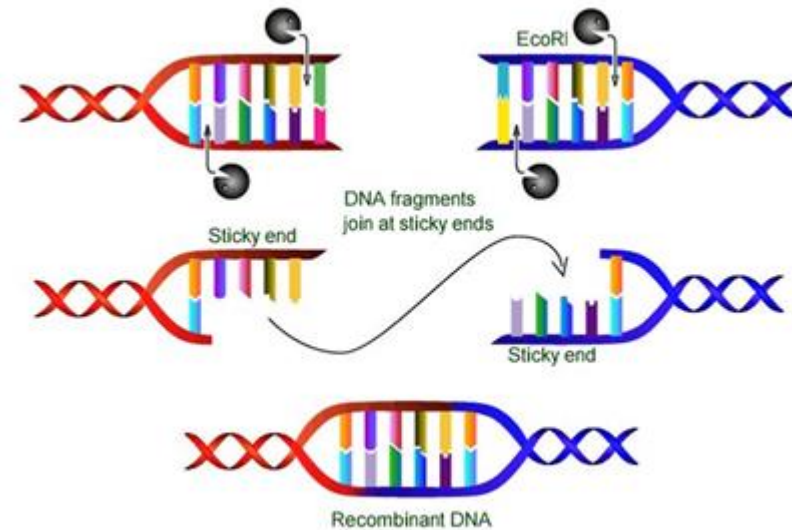
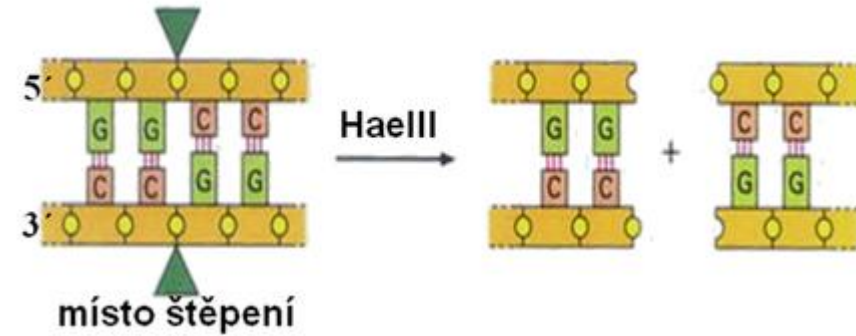
- enzymatické štěpení DNA ve specifickém restriční místě
- **restriční endonukleáza**
- produktem jsou fragmenty o různé délce
- vzniklé fragmenty jsou separovány pomocí gelové elektroforézy
- **Využití:** na základě velikosti a počtu fragmentů lze sledovat rozdíly ve studovaných sekvencích, tzv. **polymorfizmy** (polymorfizmy vznikají přestavbou v řetězci, např. inzercí, delecí, substitucí bází)



# RFLP

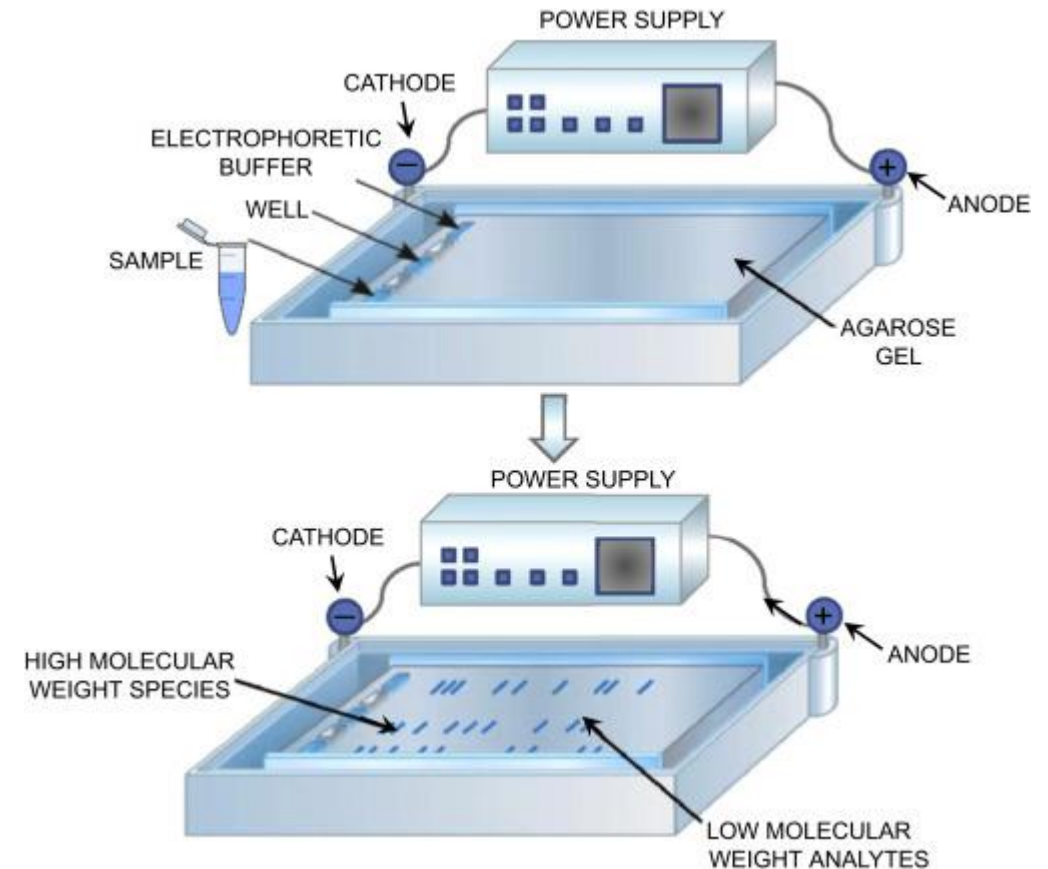
- **restrikční endonukleáza**

- sekvenčně specifické (původ z bakterií)
- EcoRI (*Escherichia coli*), HindIII (*Haemophilus influenzae*)
- tupé/lepivé konce
- funkce
  - **rozpoznání specifické sekvence dsDNA a následná restrikce** (hydrolýza fosfodiesterových vazeb)
  - ochrana před cizorodou DNA
- rozpoznávací místo
  - 4 – 8 bp dlouhé
  - charakter **palindromu** = stejné pořadí bází v obou směrech



# Gelová elektroforéza

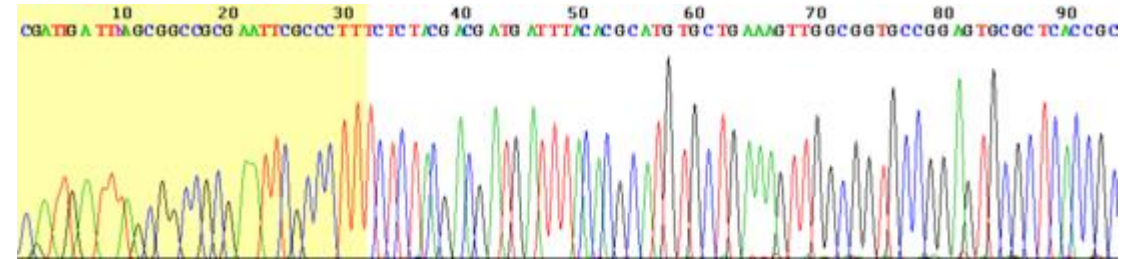
- separační metoda
- **princip** – pohyb nabitých molekul ve stejnosměrném elektrickém poli (separace molekul o rozdílné molekulové hmotnosti)
- rychlost pohybu je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku
- DNA má uniformní negativní náboj → v elektrickém poli se pohybuje **od katody k anodě**
- části **aparatury**
  - elektroforetická vana
  - separační gel
  - pufr
  - zdroj stejnosměrného elektrického proudu
- **agarózová** (produkt mořských řas – agar)/polyakrylamidová
- EtBr – vmezeří se mezi báze, zviditelní DNA pod UV



<https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/agarose-gel-electrophoresis>

# Sekvenace DNA

- stanovení **primární struktury DNA** (pořadí nt)

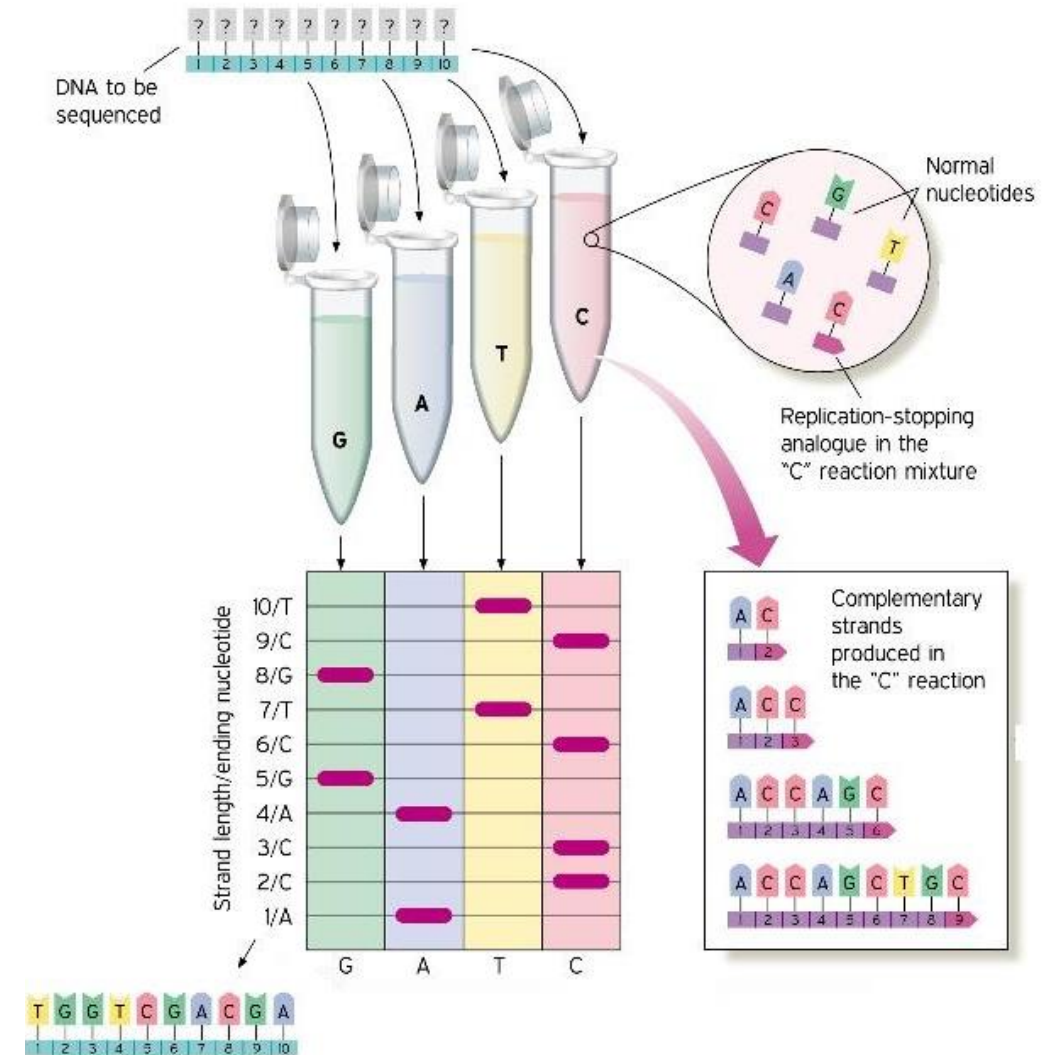


- **chemické sekvenování = Maxam-Gilbertovo sekvenování** – degradace řetězců nukleových kyselin pomocí chemických činidel (dimethylsulfát, NaOH, hydrazin,..)
- **enzymatická metoda** – specifická inhibice enzymové syntézy DNA – **Sangerovo sekvenování**
- **pyrosekvenování** – směs enzymů (DNA pol., ATP sulfuryláza, luciferáza, apyráza) a substrátů (adenosinfosulfát, luciferin) – postupně se přidávají dNTP různých typů. Začleněním určitého typu dNTP vzniká světelné záření.
- **NGS** – zefektivnění, zjednodušení, urychlení, zpřesnění
  - 454 sekvenování, SMRT, nanopóry, ...
- **Využití:** základní výzkum biologických procesů, diagnostika nemocí, forenzní medicína
- Human Genome Project (1990 – 2003)



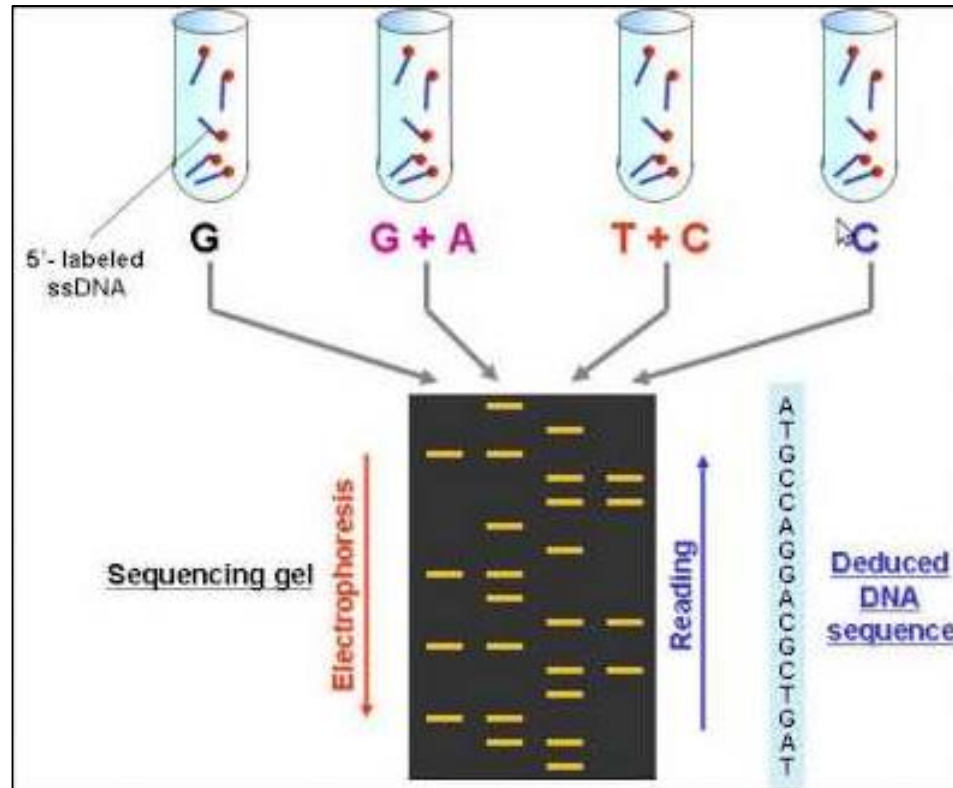
# Sangerovo sekvenování

- Využívá dideoxynukleotidů
- **Sekvenování krátké sekvence ssDNA**
- Založeno na **principu replikace**
- **Reakční směs**
  - DNA templát
  - Primer – radioaktivně značený
  - ddNTP – chybí volná 3'OH skupina
  - dNTP
  - Taq DNA polymeráza - syntéza DNA od 5' ke 3' konci
  - Pufr
- ddNTP se začlení do replikující se DNA a zastavuje elongaci (chybí mu OH skupina pro napojení dalšího dNTP)
- **Produkt** – soubor ssDNA s fluorescenčně definovaným koncem lišících se o jednu bázi
- **Vyhodnocení** – gelová elektroforéza



# Maxam-Gilbertovo sekvenování

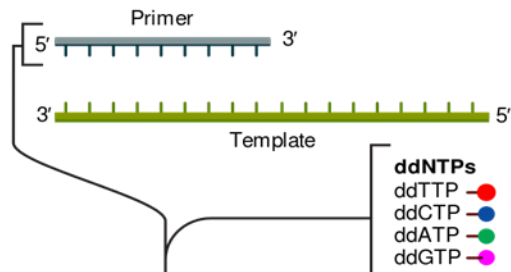
- Sekvence DNA je na 5' konci radioaktivně značena fosforem  $^{32}\text{P}$
- 5 chemikálií – každá štípe DNA ve specifickém místě
  - např. dimethylsulfát + piperidin  $\rightarrow$  G; hydrazin + piperidin  $\rightarrow$  C/T
- Vznikají různě dlouhé sekvence DNA, které jsou následně vyhodnoceny pomocí gelové elektroforézy.



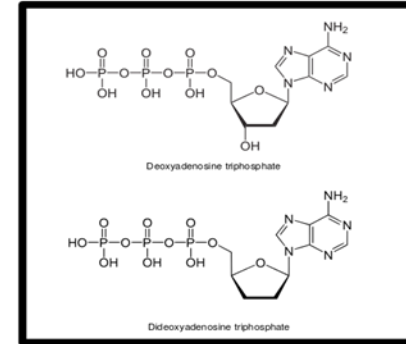
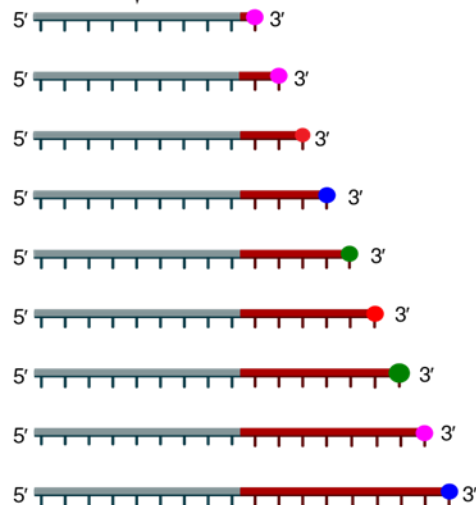
# Kapilární sekvenace

## ① Reaction mixture

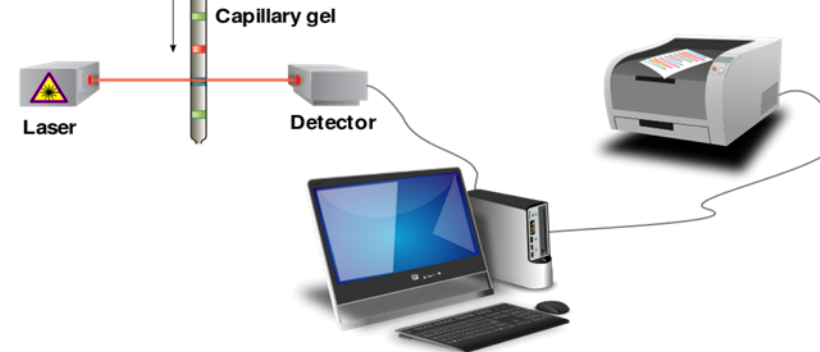
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



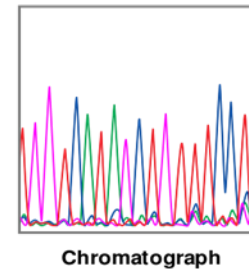
## ② Primer elongation and chain termination



## ③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



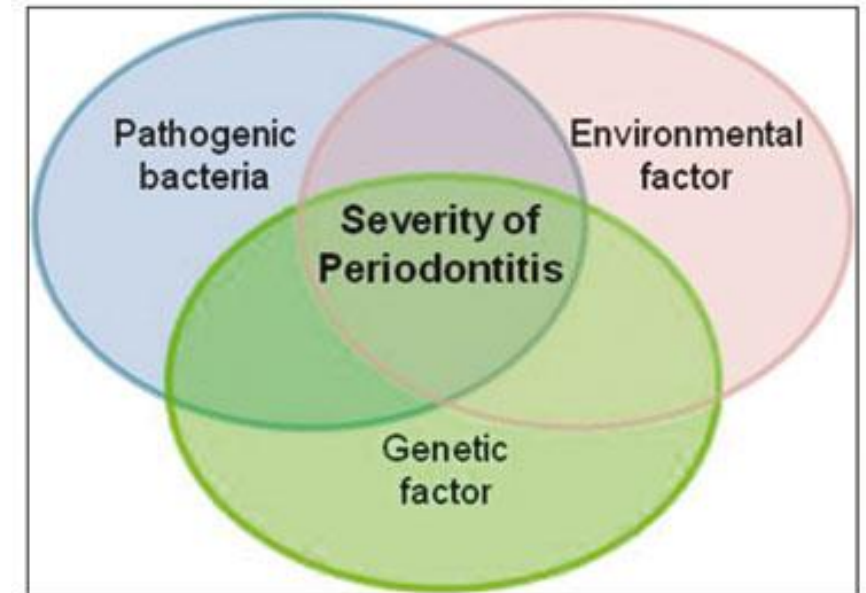
## ④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



# Praktická část cvičení

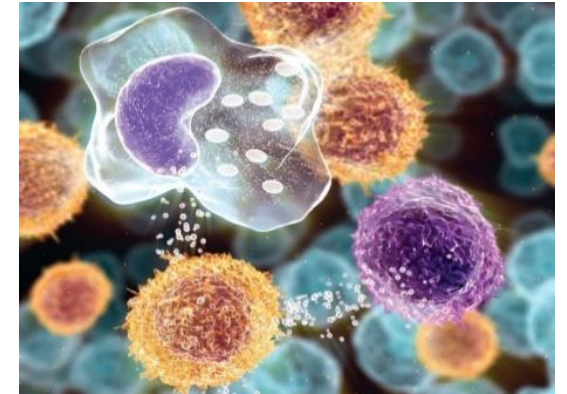
# Parodontitida – genetická variabilita

- destruktivní **zánětlivé onemocnění** postihující podpůrné tkáně zubů (ztráta závěsného aparátu, alveolární kosti, zubů)
- multifaktoriální choroba – faktory exogenní i endogenní
- **Etiologie**
  - mikrobiální povlak - anaerobní G<sup>-</sup> bakterie (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia* aj.)
  - poškození parodontu způsobeno:
    1. **produkty bakterií** (např. toxiny, enzymy, LPS,...)
    2. **látky vznikající během zánětu** (např. prozánětlivý TNF $\alpha$ , IL-1  $\alpha$ ,  $\beta$ , R)
- **Kandidátní geny**
  - **Geny pro imunoregulační faktory**
    - Interleukiny (**IL-1**, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 a další)
  - Metaloproteinázy (MMP1, MMP3, MMP9, MMP12 a další)
  - Produkty kostní remodelace (VDR, RAGE, SFTPD a další)



# Cytokiny

- **signální** proteiny podílející se na imunitní odpovědi
- produkovány buňkami IS (makrofágy, T-lymfocyty)
- schopné navodit rychlé dělení a diferenciaci určitých typů buněk, které se účastní boje proti patogenům
- podílí na procesech **zánětu** a na neuronálním, krvetvorném a embryonálním vývoji organismu
- jsou **pleiotropní** (působí na několik různých buněk)
  - působí buď na buňku, která ho produkuje (**autokrinní působení**)
  - na buňky ve své těsné blízkosti (**parakrinní působení**)
  - transportu cévním řečištěm působí na vzdálené tkáně (**endokrinní působení**)



## IL-1

- **prozánětlivý** mediátor - cytokin
- uvolňován monocyty, makrofágy, fibroblasty a dendritickými buňkami
- stimuluje resorpci kosti a reguluje proliferaci fibroblastů gingiválního i ligamentálního původu
- **↑ u chorob parodontálních tkání**

Gen pro IL-1

- na chromozomu 2q13-q21
- recesivní alely IL-1A -889 a IL-1B +**3953** - ↑ genové transkripce a produkce proteinů (**↑ prozánětlivá odpověď**)
- recesivní alely IL-1RN VNTR - ↓ genové transkripce...

# Cytokiny x onemocnění parodontu

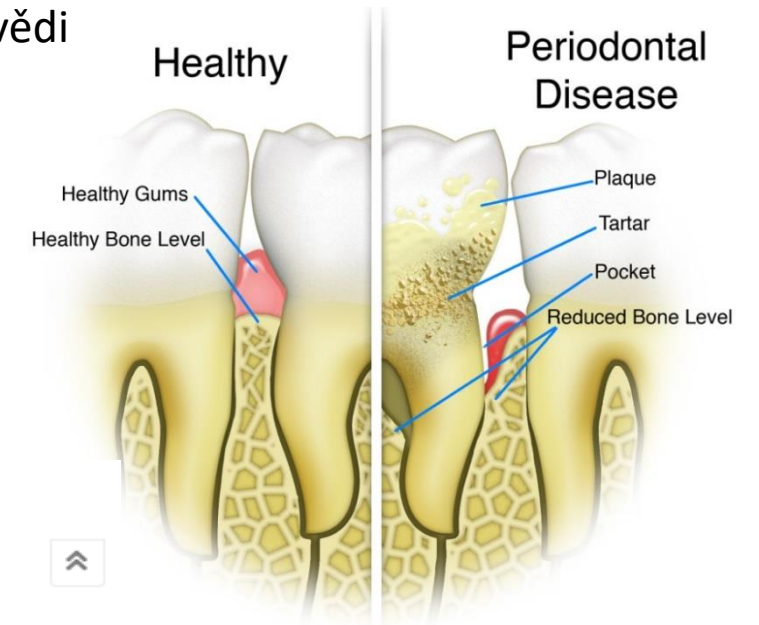
## Zánětlivé onemocnění parodontu

- komplexní onemocnění (endogenní a exogenní faktory)

1. Příčina zánětu-mikrobiální plak (anaerobní bakterie) – začátek imunitní odpovědi
2. Individuální predispozice

## RIZIKOVÉ A PROTEKTIVNÍ ALELY

IL-1beta – prozánětlivý cytokin – rizikové alely (Kornman, 1997)



### Interleukin-1 as a genetic marker for periodontitis: review of the literature.

[Griqoriadou ME](#)<sup>1</sup>, [Koutavas SO](#), [Madianos PN](#), [Strub JR](#).

#### Author information

<sup>1</sup>Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Albert-Ludwig University, Freiburg, Germany. [mariannagrigoriadou@yahoo.com](mailto:mariannagrigoriadou@yahoo.com)

#### Abstract

Periodontitis is considered to be a multifactorial disease. Studies have indicated that part of the clinical variability in periodontitis may be explained by genetic factors. Genes can affect the immunoinflammatory host response to bacterial challenge in the periodontal tissues by means of an overproduction of proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1). IL-1 plays an important role in the pathogenesis of periodontitis, through its involvement in the regulation of the host's inflammatory response and bone resorption. Therefore, the genes that encode for IL-1 production have recently received most attention as potential predictors of periodontal disease progression. Hence, the relationship between IL-1 genotype and periodontal disease has been investigated by a number of studies. This review article aimed to determine whether IL-1 could be regarded as a genetic marker for periodontitis by reviewing data concerning susceptibility, clinical parameters, and treatment strategies in relation to the IL-1 genotype. The review concluded that there is currently limited evidence to implicate a specific IL-1 genotype as a risk factor for chronic periodontitis in white populations. However, there is limited evidence that genetic variation in the IL-1B polymorphism could be a risk factor for aggressive periodontitis.

# Cíl experimentu

- Stanovení **interleukinu IL-1beta +3953C/T (rs1143634)** u pacientů s chronickou parodontitidou

[J Periodontol Res. 2000 Jun;35\(3\):172-7.](#)

## **Effect of the interleukin-1 genotype on monocyte IL-1beta expression in subjects with adult periodontitis.**

[Mark LL<sup>1</sup>](#), [Haffajee AD](#), [Socransky SS](#), [Kent RL Jr](#), [Guerrero D](#), [Kornman K](#), [Newman M](#), [Stashenko P](#).

### Author information



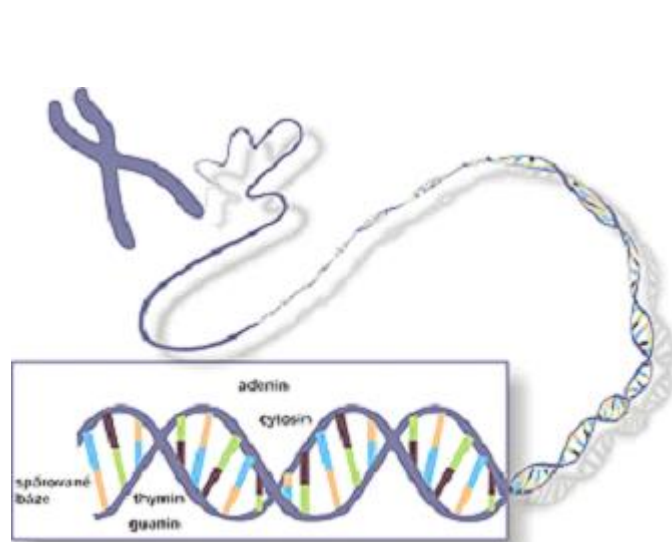
#### Abstract

An association has been reported between polymorphisms in the genes encoding IL-1alpha (-889) and IL-1beta (+3953) (periodontitis susceptibility trait, PST), and an increased severity of periodontitis (18). The IL-1beta polymorphism was reported to correlate with increased IL-1beta expression by monocytes in response to bacterial stimulants. In the present study, we determined if PST positive subjects with periodontitis exhibit elevated production of IL-1beta, compared to PST negative periodontitis patients. Peripheral blood monocytes were obtained from 10 PST+ and 10 PST- age- and disease-balanced subjects with adult forms of periodontitis. Monocytes were cultured with a panel of bacterial stimulants, including Escherichia coli and Porphyromonas gingivalis LPS, and whole formalinized periodontal pathogens P. gingivalis, Bacteroides forsythus and Prevotella intermedia, and health-associated organisms Veillonella parvula and Streptococcus sanguis. Our results demonstrate that monocytes from PST+ and PST- patients showed no significant differences in IL-1beta production in response to any stimulant tested. In addition, the periodontal pathogens P. gingivalis, B. forsythus and P. intermedia failed to stimulate higher IL-1beta responses compared to health-associated species V. parvula and S. sanguis. A marked interindividual variation in production of IL-1beta was seen, with high, low and intermediate responders present in both PST+ and PST- groups. We conclude that genetic loci other than the PST polymorphisms are also important regulators of monocyte IL-1 responses.



# Metody stanovení

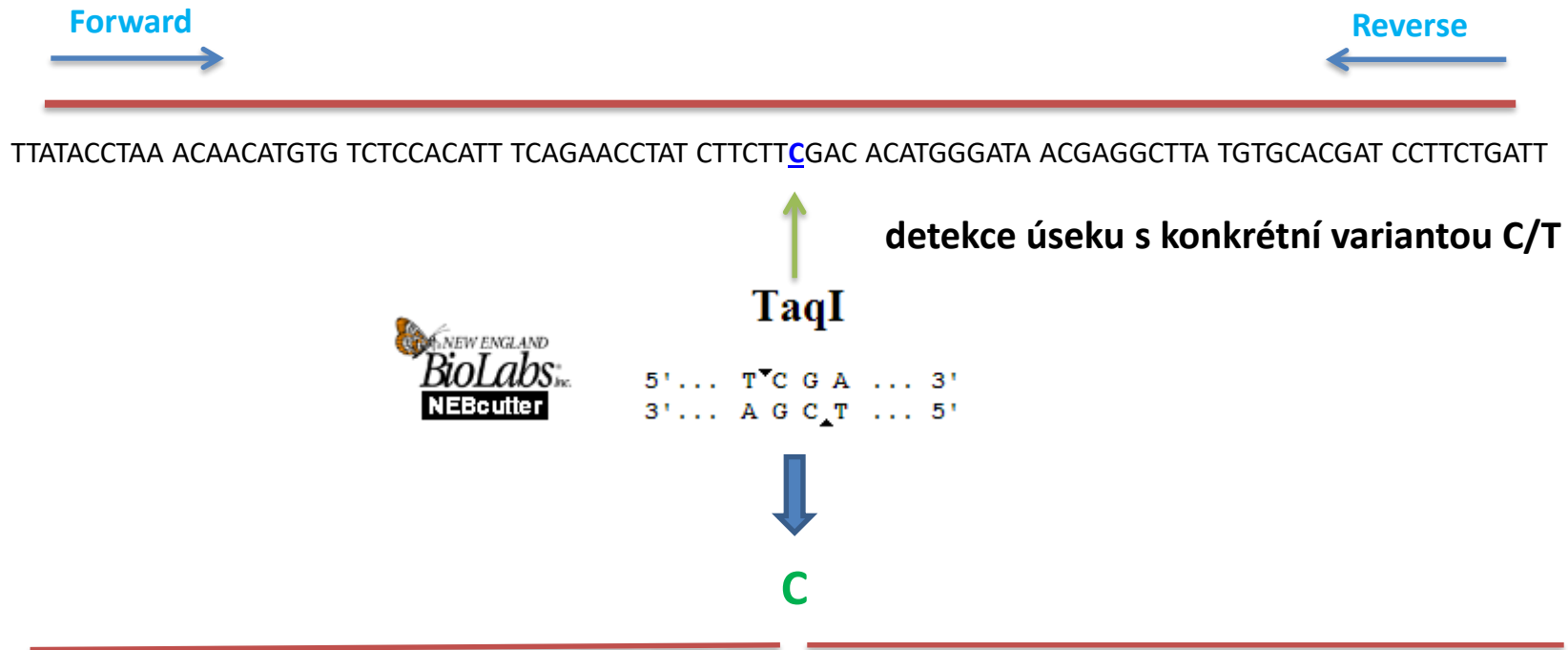
## 1. PCR IL-1B +3953C/T (rs1143634) u subjektů s chronickou parodontitidou



amplifikace vybraného úseku  
z celkové DNA

# Metody stanovení

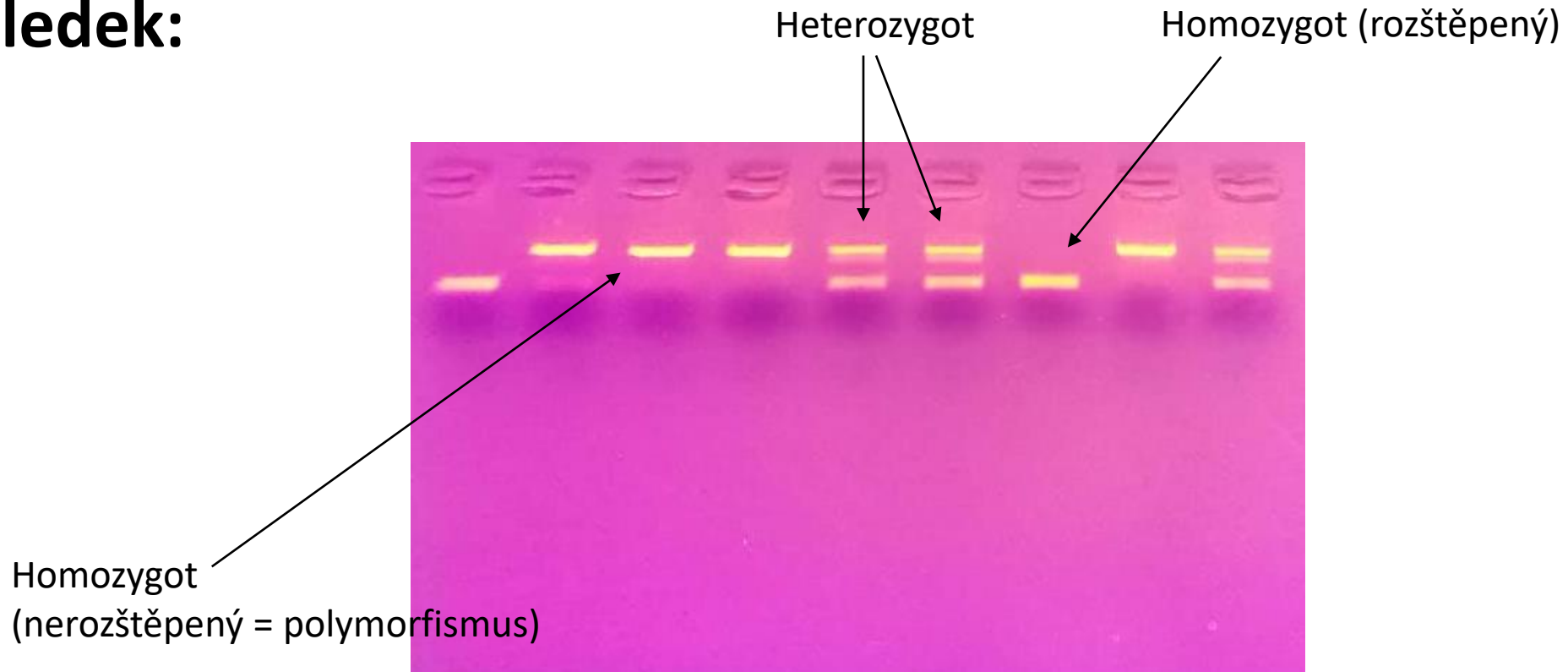
## 2. RFLP IL-1B +3953C/T (rs1143634) pomocí restriční endonukleázy TaqI

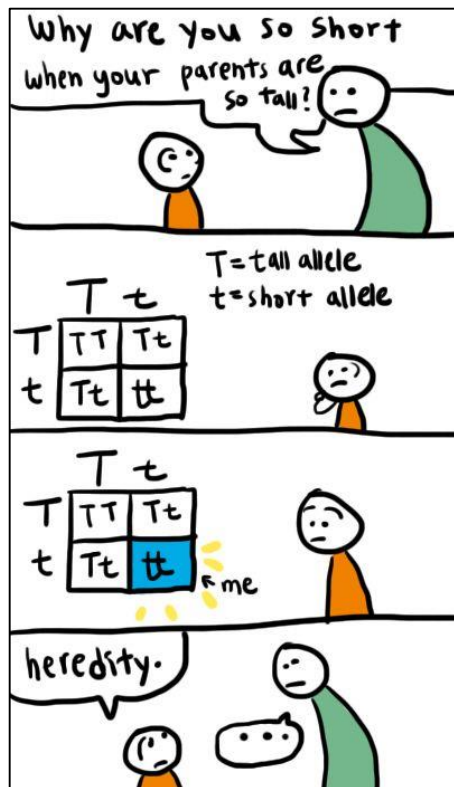


# Metody stanovení

## 3. ELFO restrikčních fragmentů po štěpení TaqI

**Výsledek:**





Děkuji za pozornost