

# **Genetika v zubním lékařství – cvičení 1**















**Ing. Hana Holcová Polanská, Ph.D.**  
**Mgr. Lucie Válková**

# 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	
tvář	dělohy	barva	tvář	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

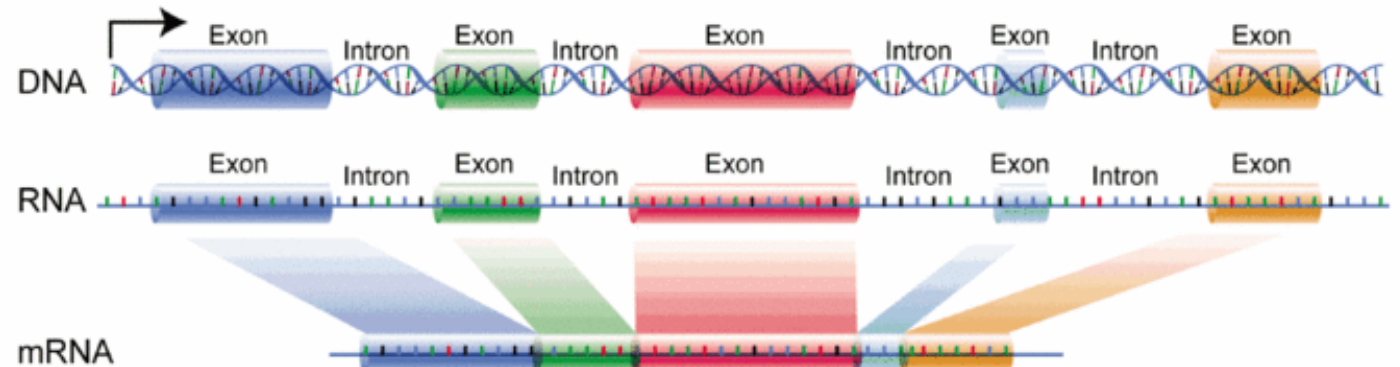
- **Genetika**

- 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

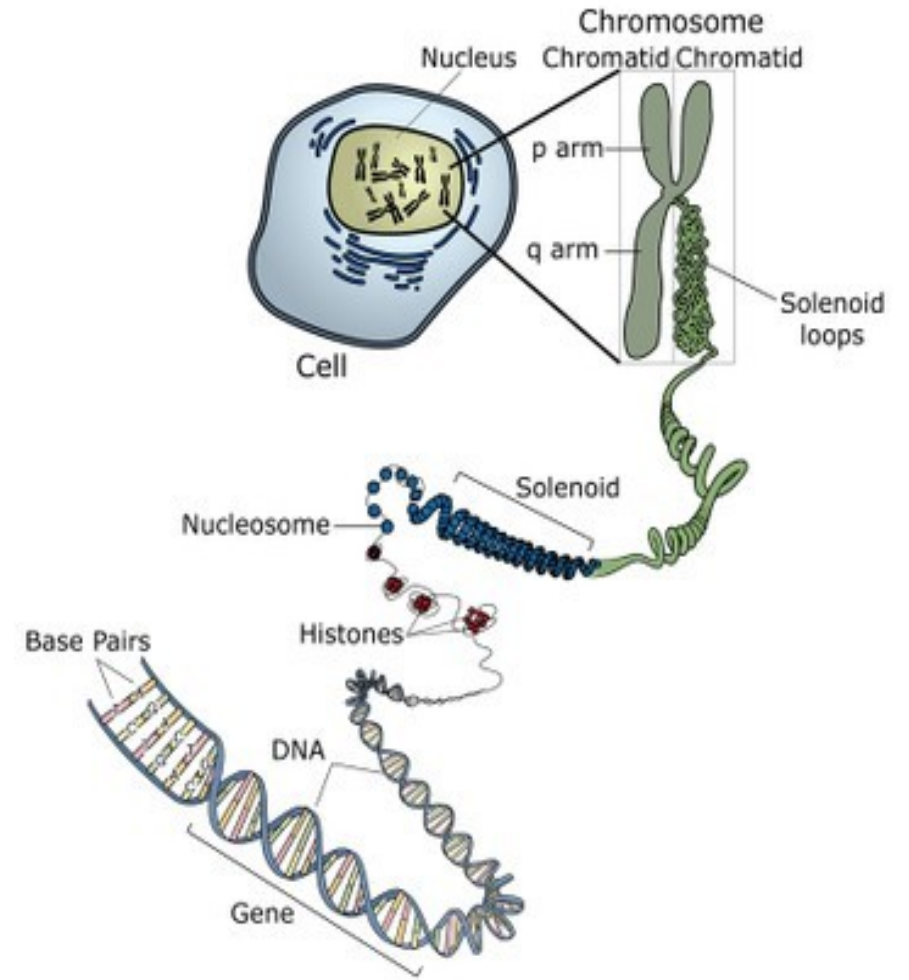


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

# Základní pojmy

- **Genomika**

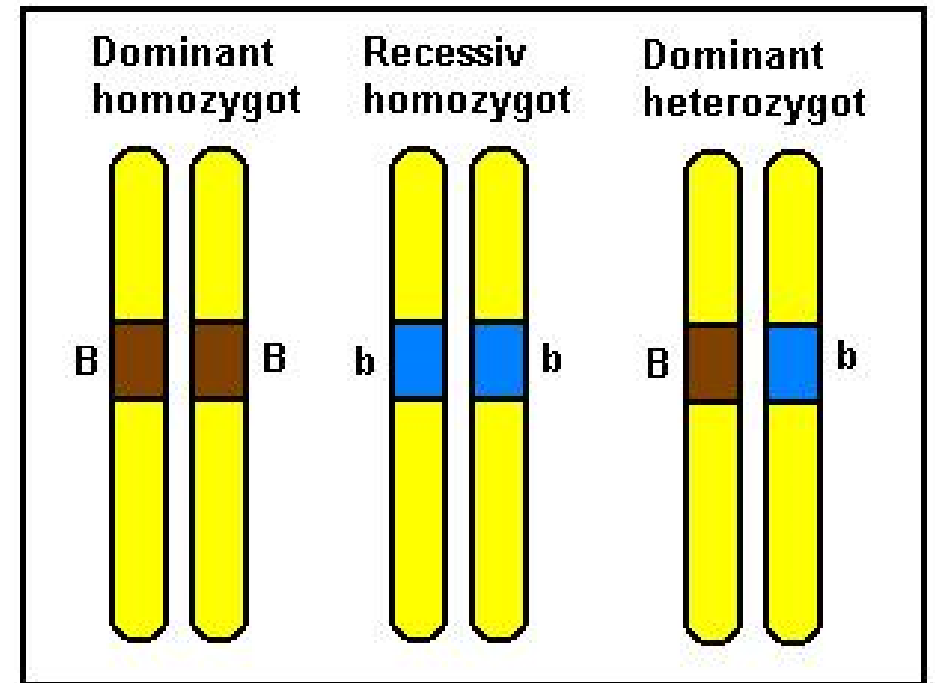
- obor genetiky, který se snaží stanovit úplnou genetickou informaci organismu a interpretovat ji v termínech životních pochodů

- **Heterozygot**

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

- **Homozygot**

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



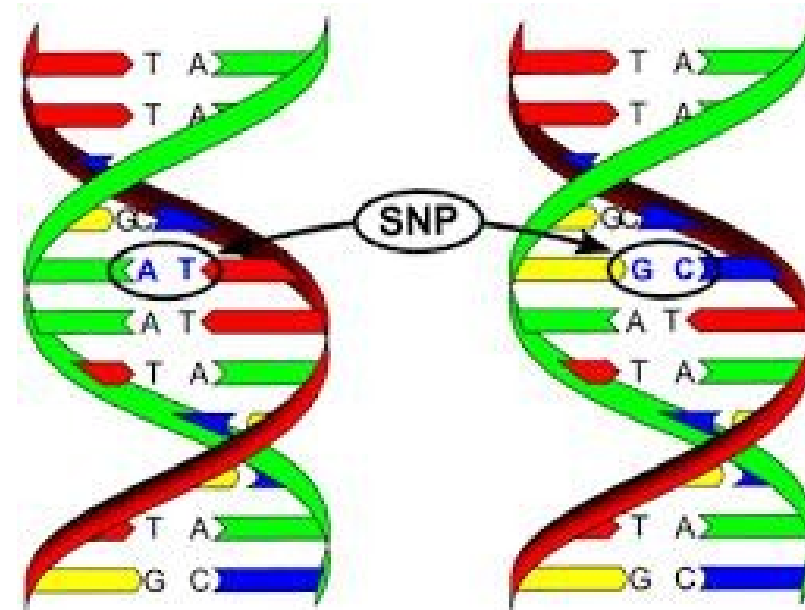
# Základní pojmy

- **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  $< 1\%$



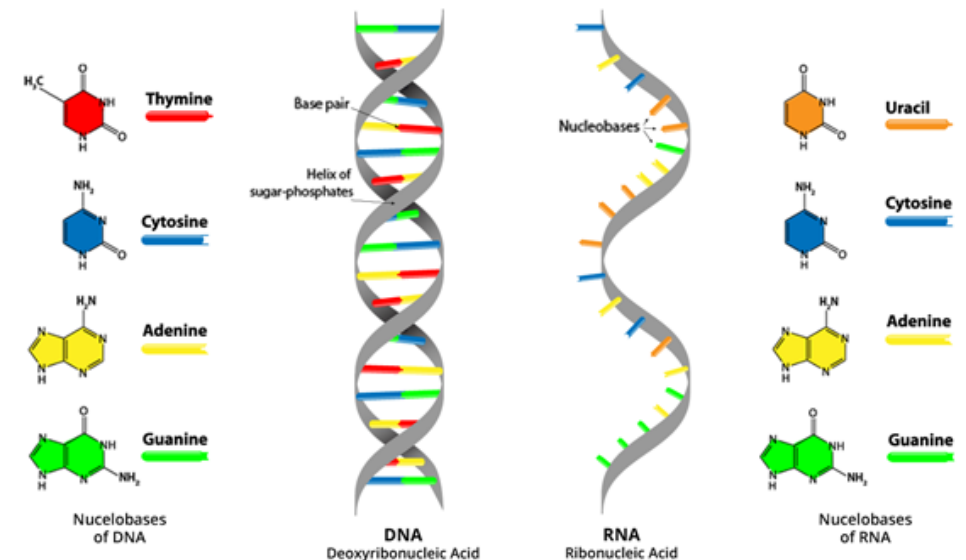
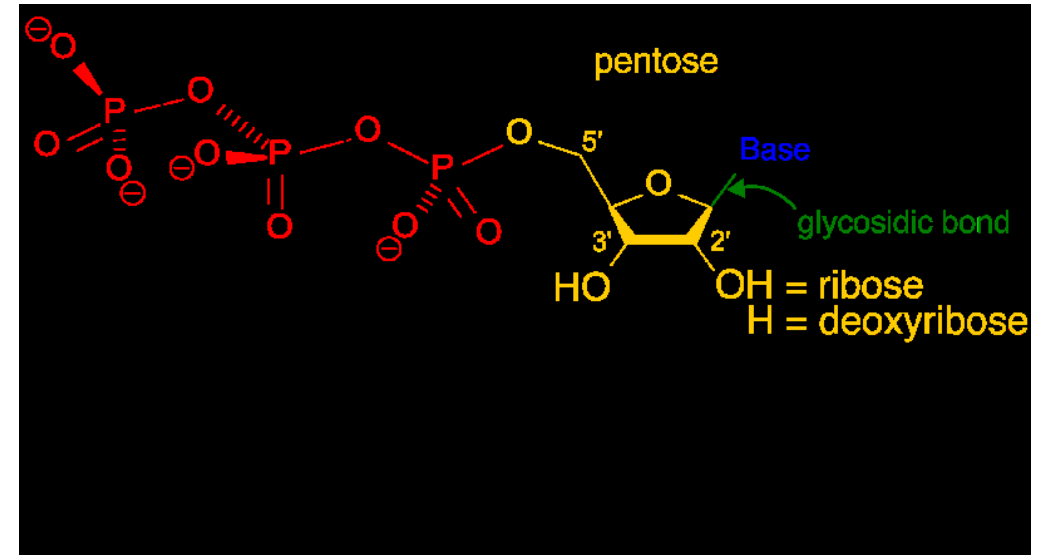
# DNA vs. RNA

- molekula DNA = **kyselina deoxyribonukleová**

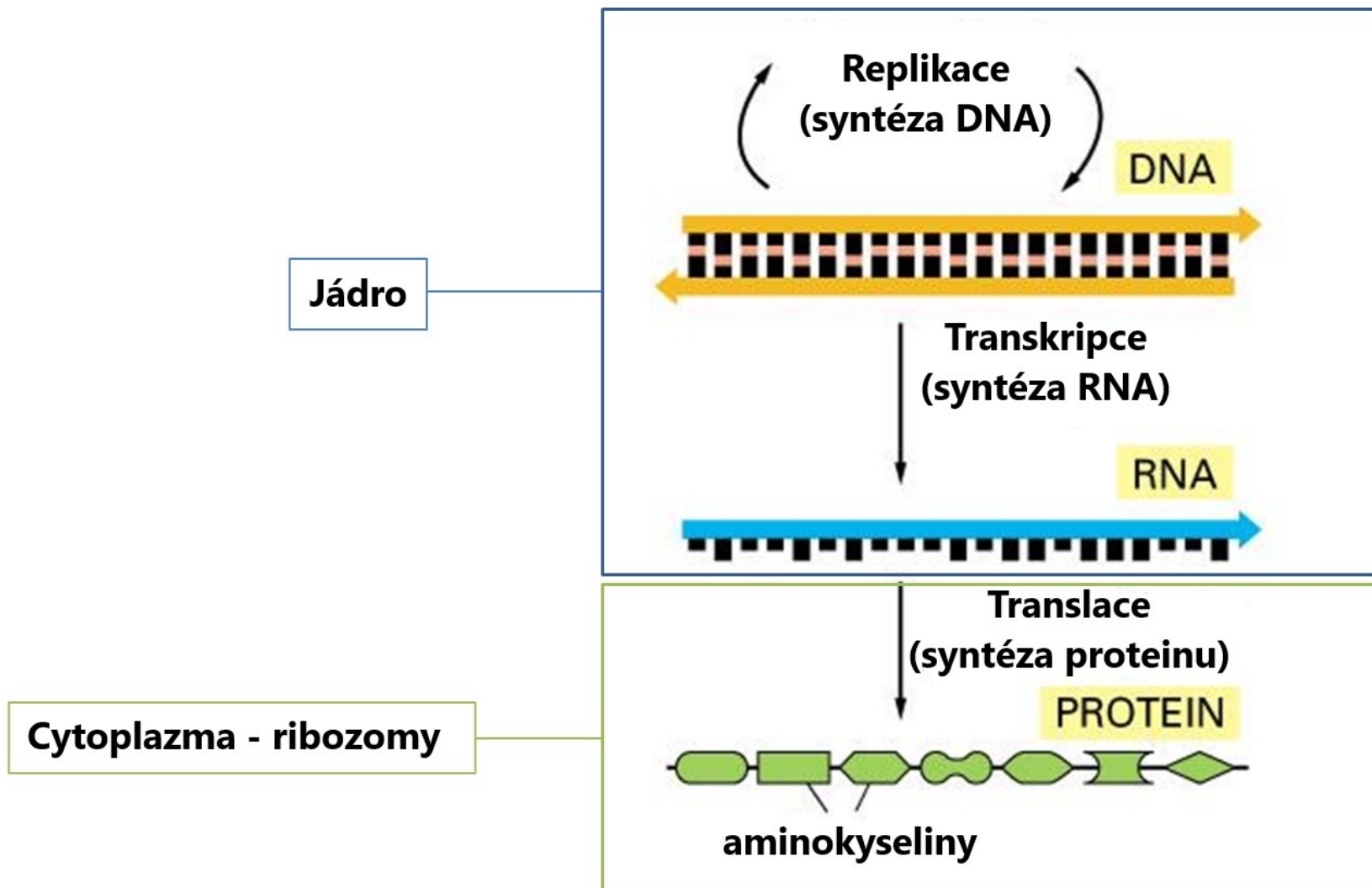
- Dvoušroubovice – 2 řetězce v opačném směru
- Polynukleotidový řetězec
  - Dusíkatá báze ( T, A, C, G) spojená vodíkovými můstky
  - Zbytek kyseliny fosforečné
  - Cukerná složka – deoxyribóza

- 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

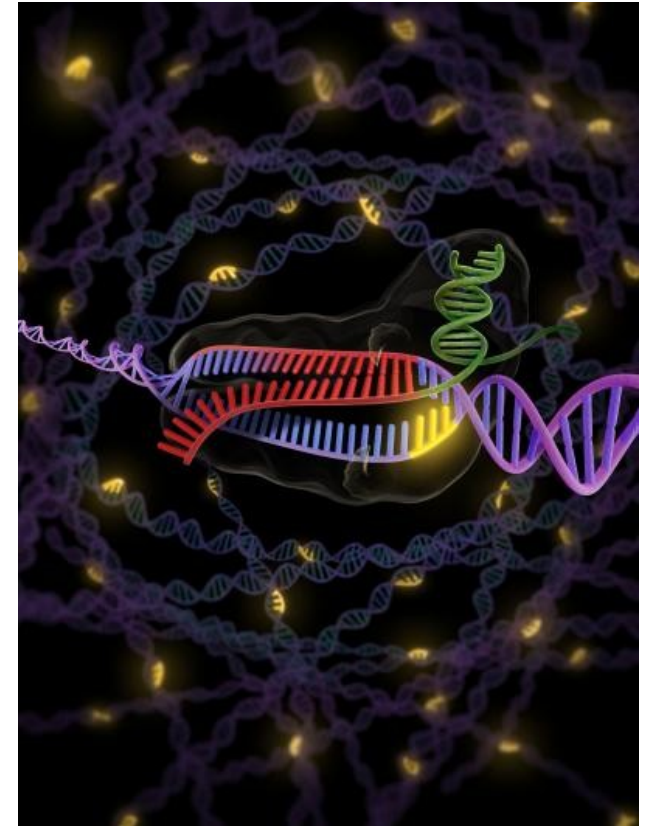




# Replikace DNA

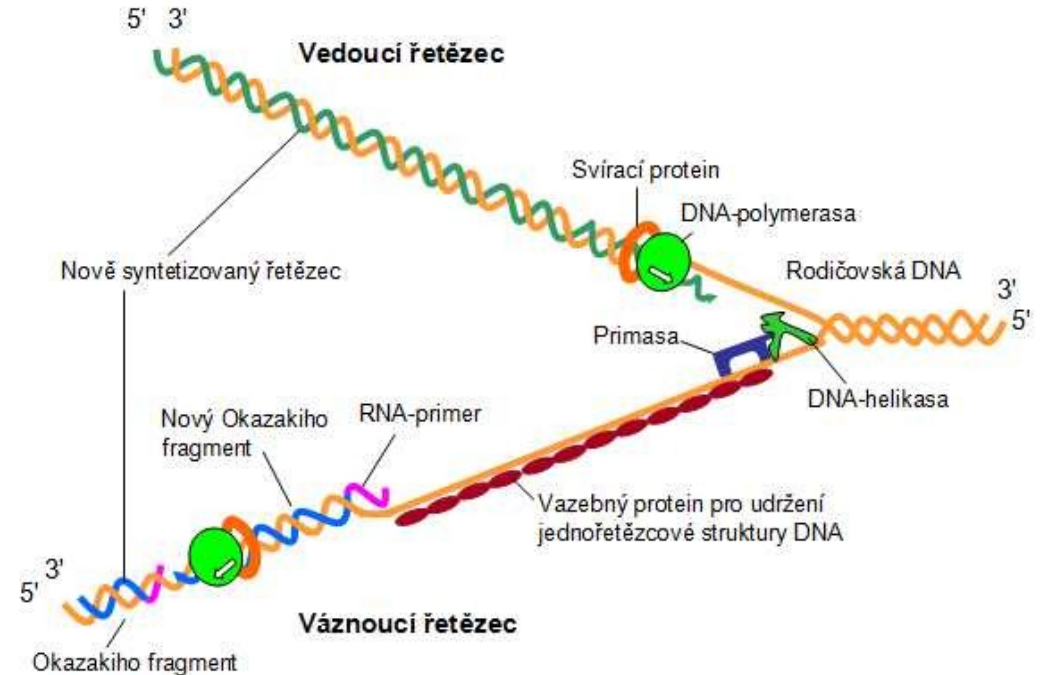
= **tvorba kopií** molekul DNA zajišťující přenos genetické informace z mateřské do dceřiné buňky

- 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



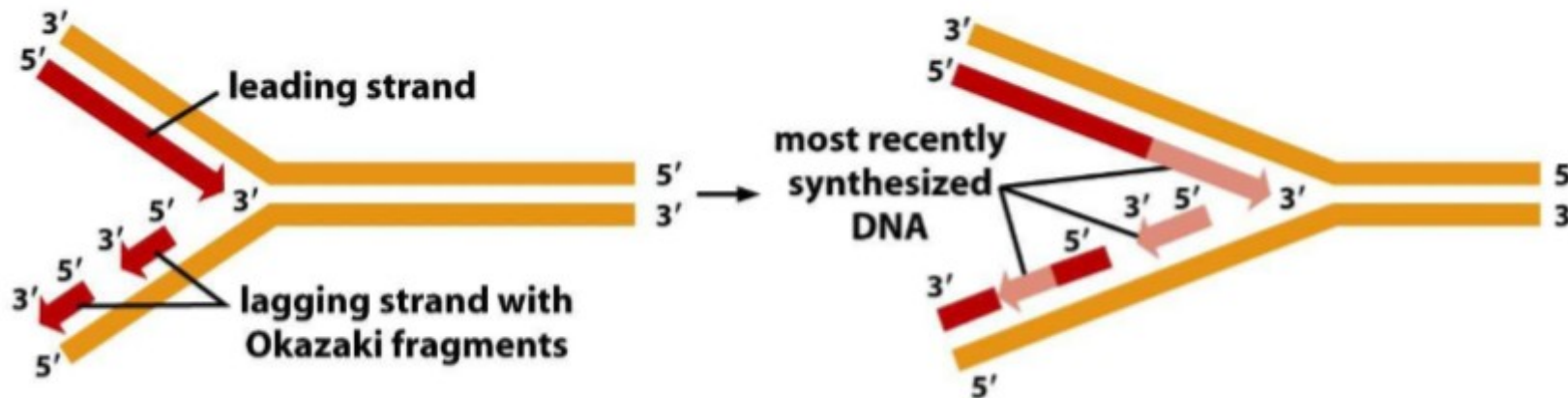
# Replikace DNA

- Vznik replikační vidlice
  - **helikáza** – umožňuje oddálit obě molekuly dvojšroubovice
  - **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
  - Opožděující 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

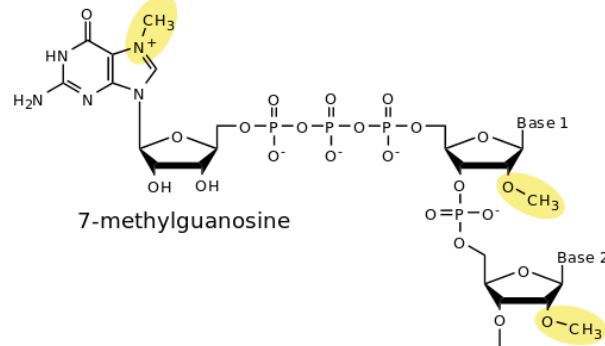
- **přepis** informace v podobě sekvence DNA do sekvence RNA
- jádro buňky
- **templát** - vlákno DNA
- Transkripty se z templátu uvolňují jako jednořetězce
- **DNA-dependentní RNA polymeráza**
  - 3 typy (strukturně podobné, přepisují různé typy genů)
    - RNA pol. I (geny kódující rRNA)
    - RNA 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



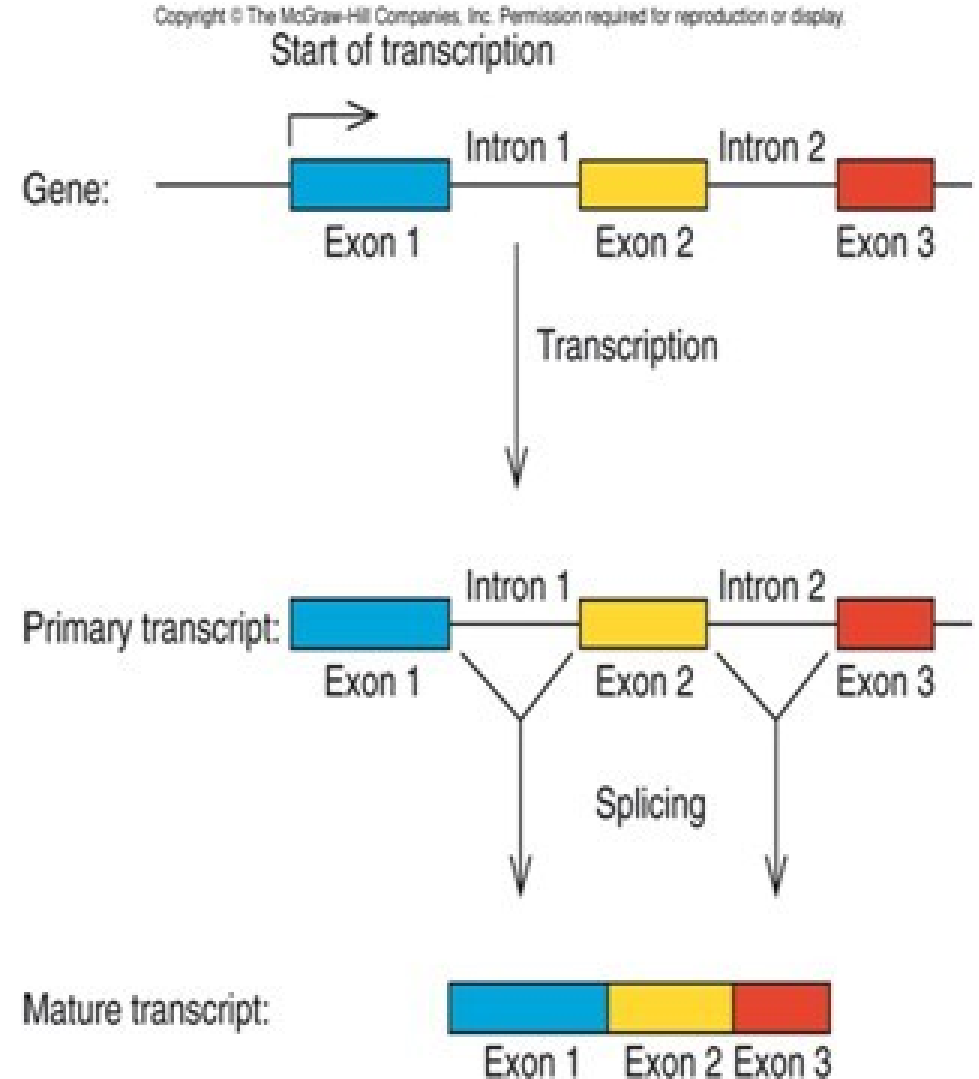
# Posttranskripční modifikace

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

Obrázek 3 - Struktura tzv. RNA čepičky

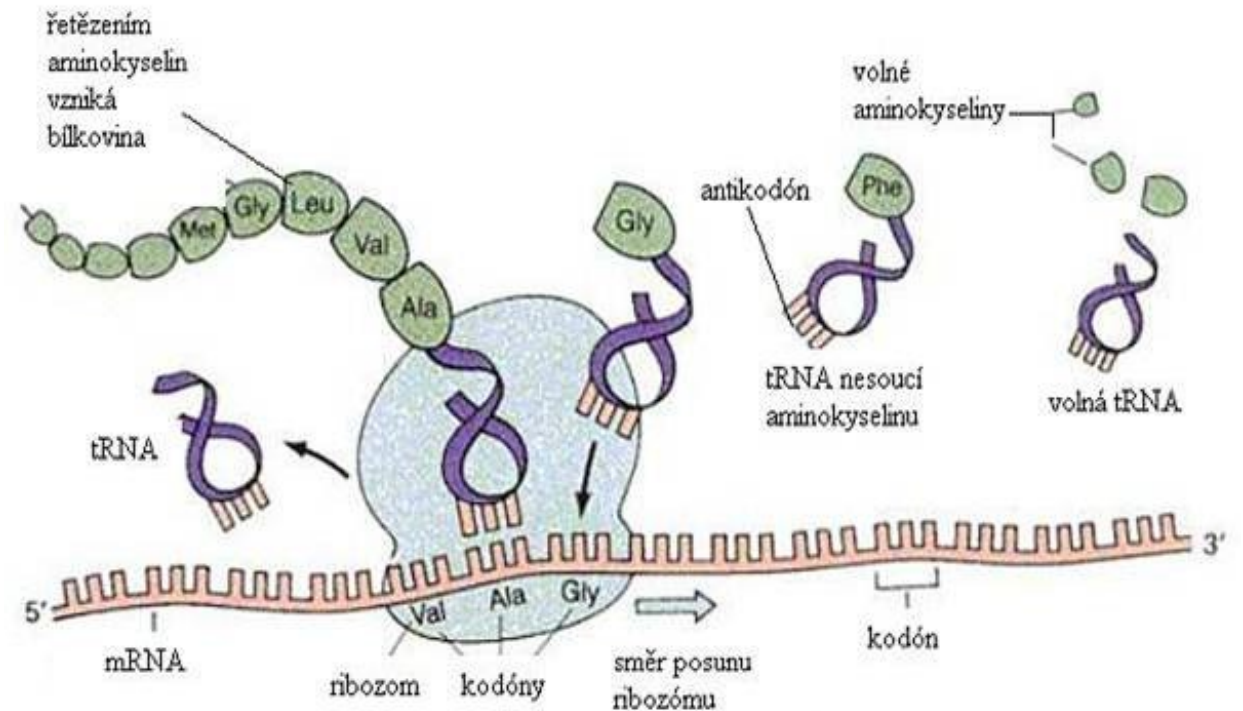


- Připojení **polyadenylačního řetězce** na 3' konec
- **Sestřih** (splicing) RNA – vystřížení intronů za vzniku zralé mRNA



# 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**
- **Postranslační úpravy** – fosforylace, glykosylace, metylace, ....



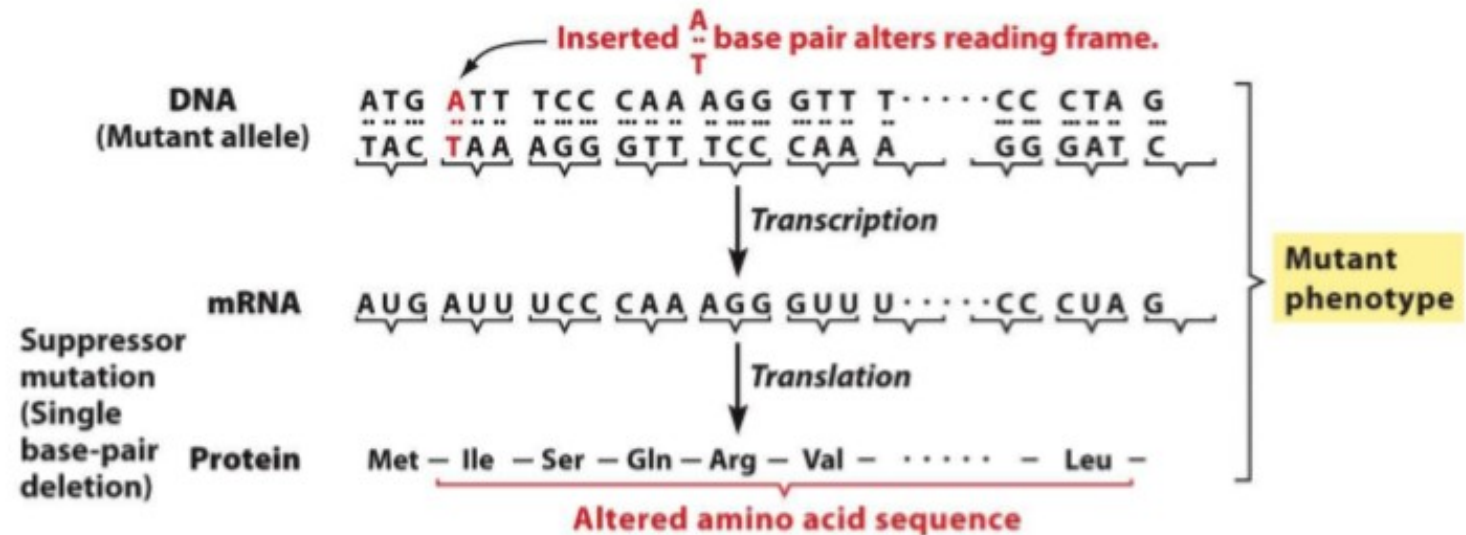
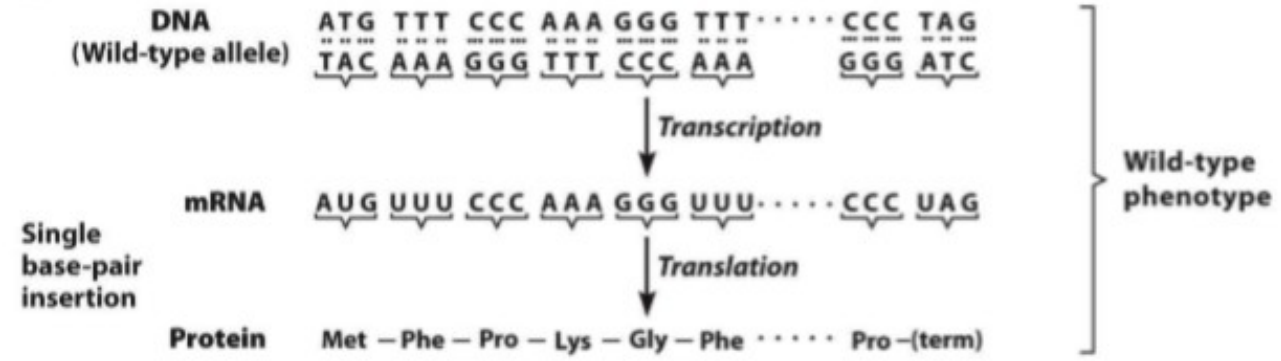
# Genetický kód

- **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 serín UCC UCA UCG	UAU tyrozín UAC UAA koniec UAG koniec	UGU cysteín UGC UGA koniec UGG tryptofán	U
	C	CUU leucín CUC CUA CUG	CCU prolín CCC CCA CCG	CAU histidín CAC CAA glutamín CAG	CGU arginín CGC CGA CGG	C
	A	AUU isoleucín AUC AUA AUG začiatok	ACU treonín ACC ACA ACG	AAU asparagín AAC AAA lyzín AAG	AGU serín AGC AGA arginín 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

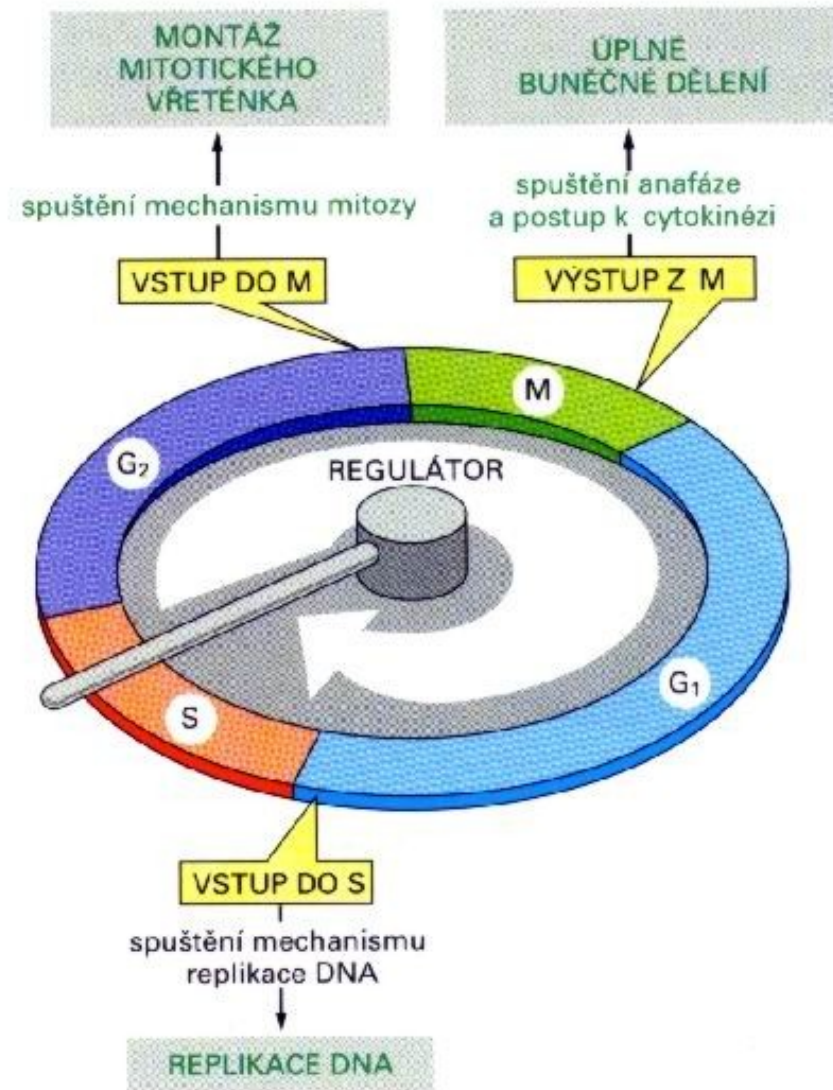
# Genetický kód – změna čtecího rámce

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





# 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

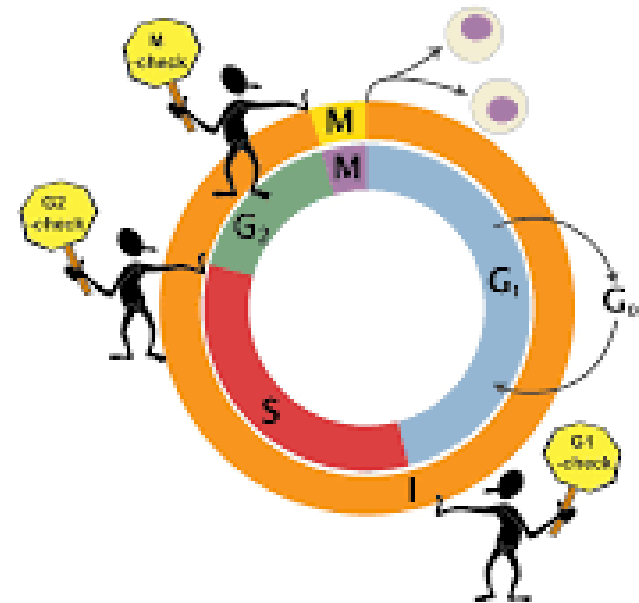
- **Mnohobuněčné organismy**

- 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

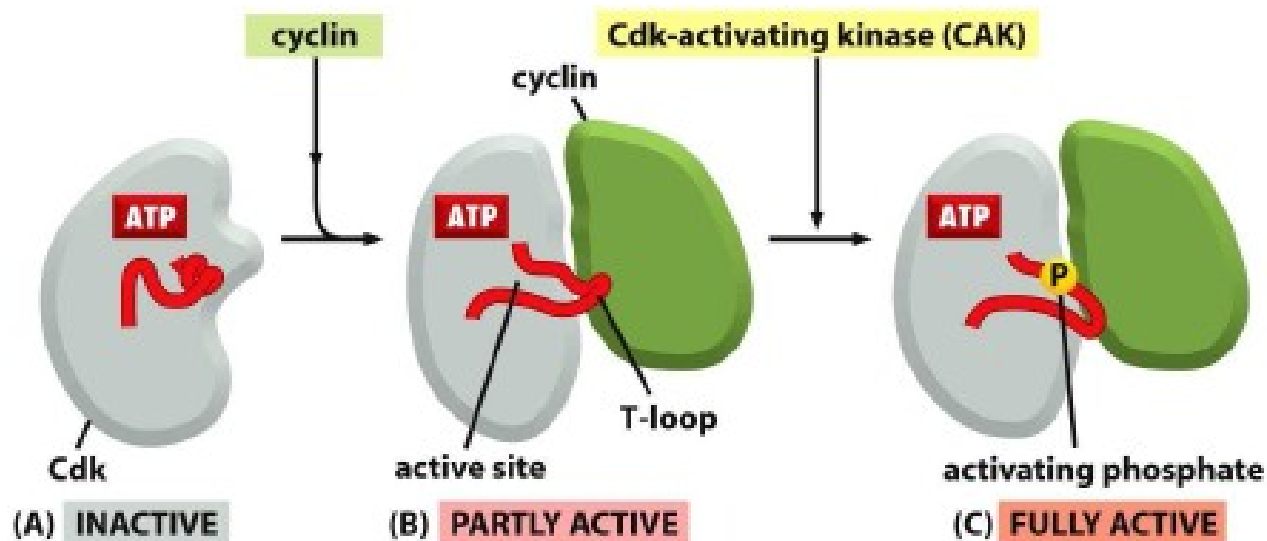
- kladeny **vysoké nároky na přesnost**
  - bezchybná replikace
  - správné řazení fází
    - mitóza před dokončením replikace -> ztráta genetické informace min. u jedné buňky
    - dvojnásobná replikace před mitózou -> zvýšený počet kopií genů na příslušné části chromozomu -> nerovnováha v genové expresi,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

→ **kontrolní body**



# Buněčný cyklus

- řídicí elementy – **cyklin dependentní kinasy**
  - **řídí aktivitu** mnoha proteinů zapojených do replikace DNA a mitózy tím, že je ve specifických místech **fosforylují** (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

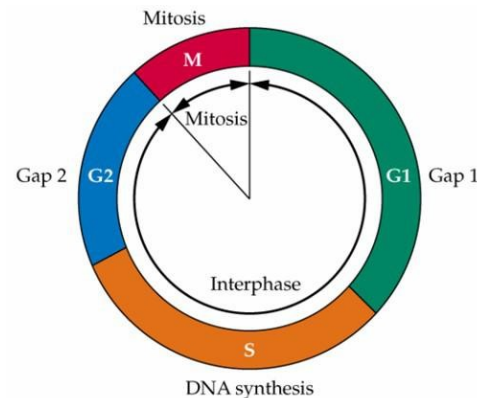
- **příprava** na buněčné dělení, vnější jaderná membrána je spojená s ER
- **nepříznivé podmínky**
  - setrvání v G1/vstup do G0; buňky nerostou, mohou tak setrvat i několik měsíců/let

### 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

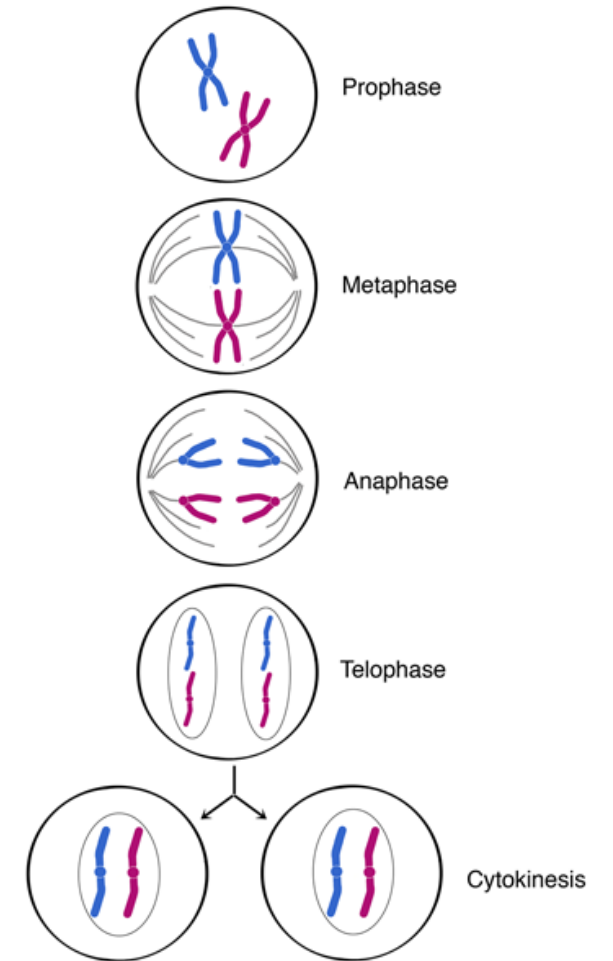
- nejdelší a nejvariabilnější
- buňka se **zvětšuje a zdvojuje organely**
- na konci této fáze se nachází kontrolní bod: **bod restrikce**
  - buňka má dostatek živin a růstových faktorů, vykazuje vysokou metabolickou aktivitu -> přejde bod restrikce a pokračuje do další fáze
  - nedostatek živin, obdržení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

# Buněčný cyklus - Mitóza

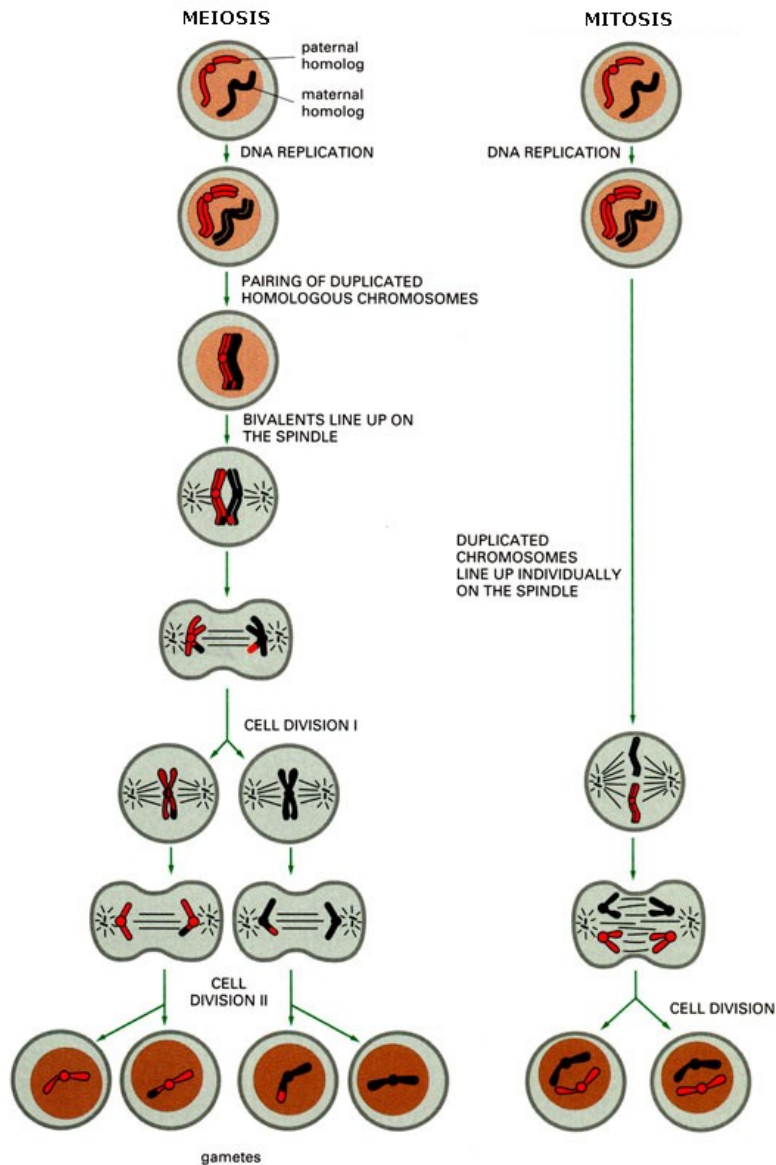
- jaderné dělení (mitóza) + následné dělení cytoplazmy = cytokineze

## 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.

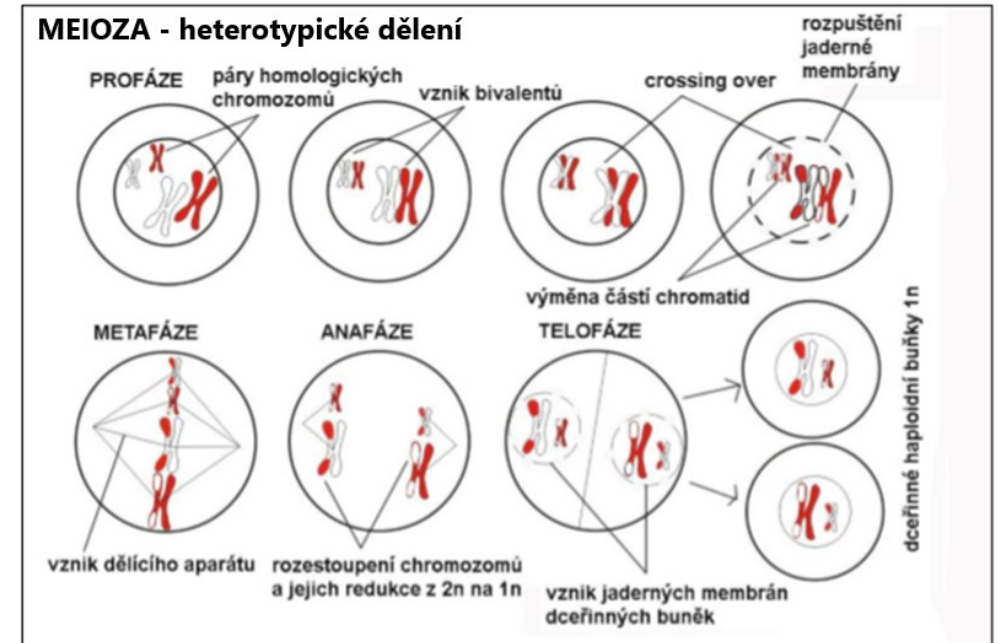
2.meiotické dělení – rozestup sesterských chromatid -> 2 dceřiné buňky s haploidním počtem chromozomů, vznik pohlavních buněk (spermie, vajíčko), dodatečné promíchání genetického materiálu crossing-overem

# 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

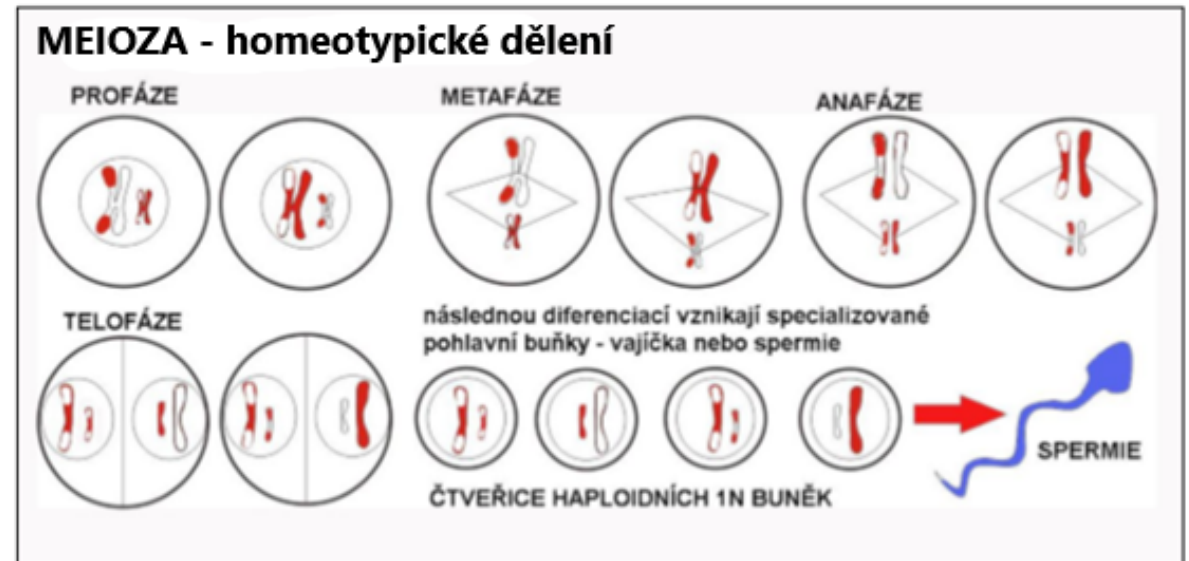
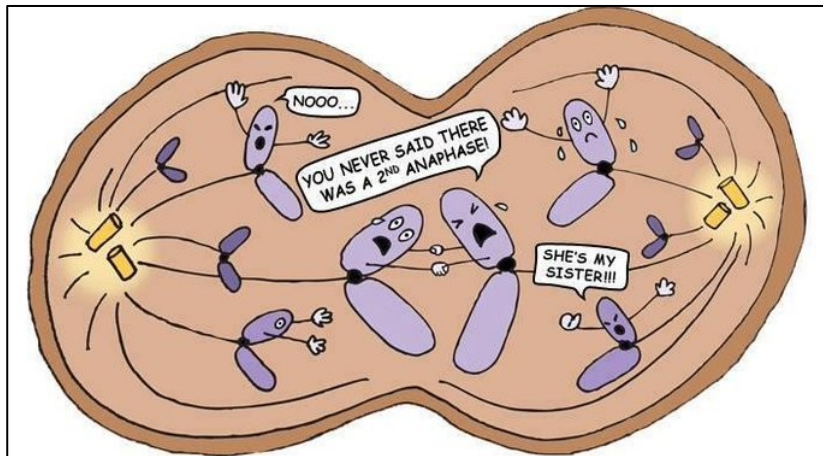




# Meióza

## 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



# Mutace

**Mutace** jsou dědičné změny na úrovni genetického materiálu, které se projevují ve změně primární struktury nukleové kyseliny, tj. změně v sekvenci nukleotidů. Souvisí se změnou genotypu, ale nemusí se projevit i fenotypově.

- **Význam** mutací:

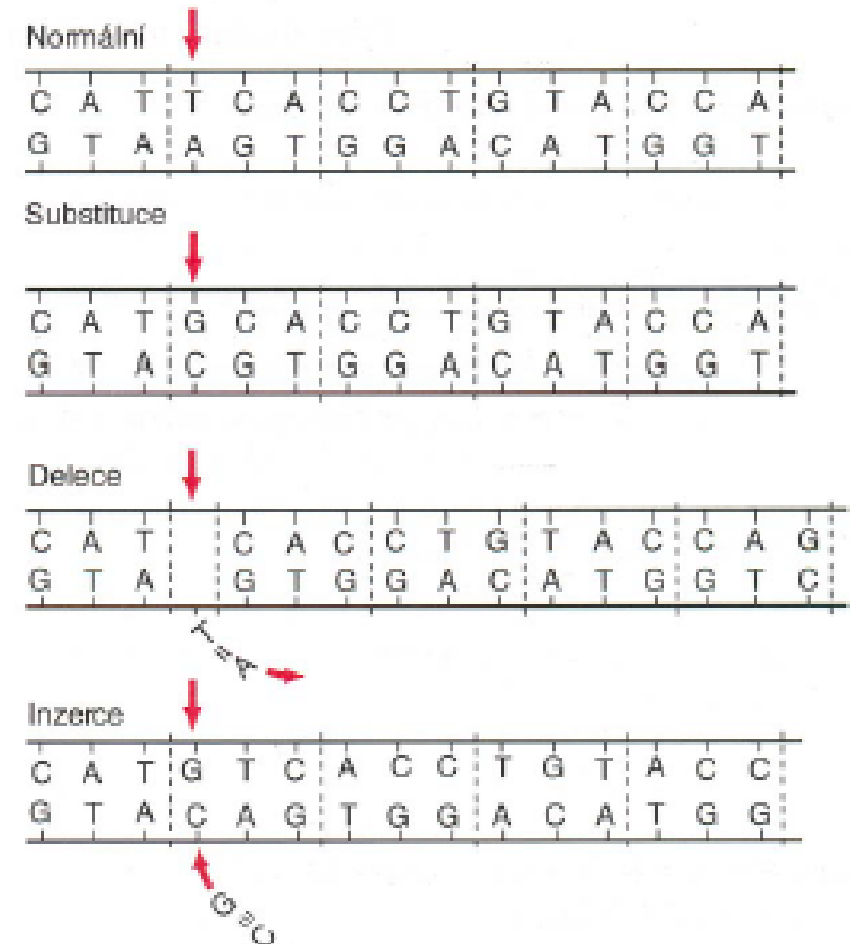
- Pozitivní – zdroj dědičné variability, význam pro evoluci
- Negativní – hromadění vadných genů, vznik geneticky podmíněných onemocnění, tvorba nádorů
- Neutrální

- **Klasifikace** mutací:

- spontánní (chyby při replikaci) x indukované (mutageny)
- gametické x somatické
- dominantní x recesivní (1:100)
- přímé x zpětné (mutovaný genotyp se zpětně mění na původní genotyp)
- vitální x letální
- jaderné x mimojaderné (mt, cp)
- genové x chromozomové (strukturní CHA) x genomové (numerické CHA, aneuploidie, polyploidie)

# Genové mutace

- Genové (bodové) mutace
  - substituce bazí (tranzice, transverze) – standardní alela -> mutantní alela -> změněný protein
  - delece/inzerce bazí (změna čtecího rámce)
- **Důsledky** bodových mutací:
  - mutace mění smysl kodonu (jiná AMK)
  - nesmyslné mutace (stop kodon)
  - silent mutace (jiný kodon, stejná AMK)
- **Srpkovitá anémie** – AR dědičnost; substituce CTC -> CAC v beta řetězci (záměna kys. glutamové za valin); rezistence vůči malárii (infekci plazmodiem) – heterozygotní výhoda (selekční výhoda oproti oběma homozygotům)



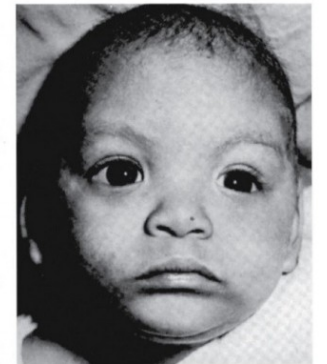
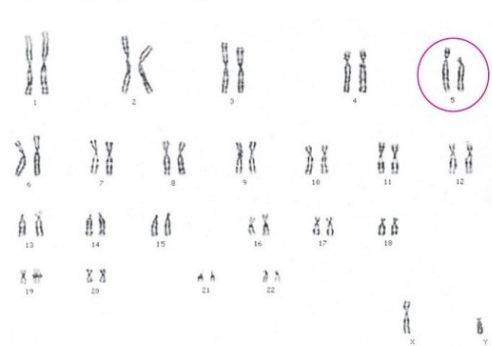
# Chromozomové mutace

Strukturní chromozomové aberace jsou důsledkem jednoho nebo několika zlomů v DNA.

- **Klasifikace:**

- **balancované** (zachováno původní množství genetického materiálu)
  - translokace – např. Philadelfský chromozom t(9;22) u CML
  - inverze
  - inzerce
- **nebalancované** (část genetického materiálu chybí či přebývá)
  - duplikace
  - delece
    - Cri du chat (delece na krátkém raménku chr. 5)
    - Prader-Willyho syndrom (delece paternálního chr. 15)
    - Angelmanův syndrom (delece maternálního chr. 15)
  - izochromozom
  - ring chromozom

46,XX,del(5)(p14.1)



# Genomové mutace

- **Aneuploidie pohlavních chromozomů**

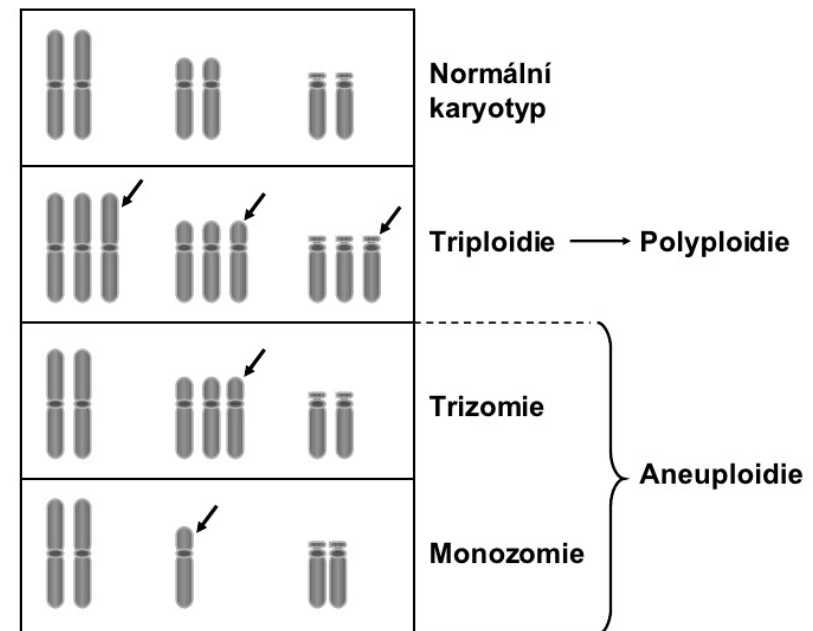
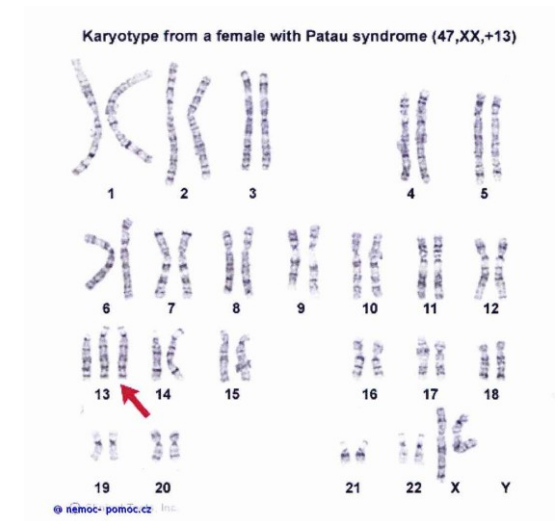
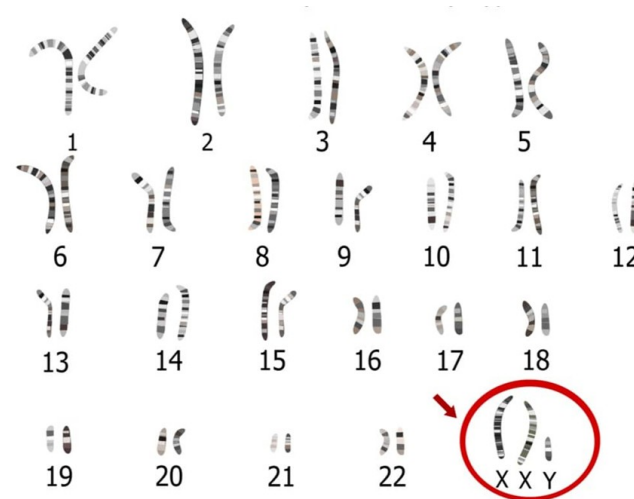
- Turnerův syndrom 45, X
- Klinefelterův syndrom 47, XXY
- XXX syndrom
- XYY syndrom

- **Aneuploidie somatických chromozomů**

- Downův syndrom (21)
- Edwardsův syndrom (18)
- Patauův syndrom (13)

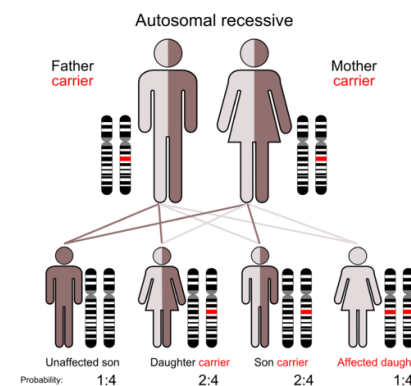
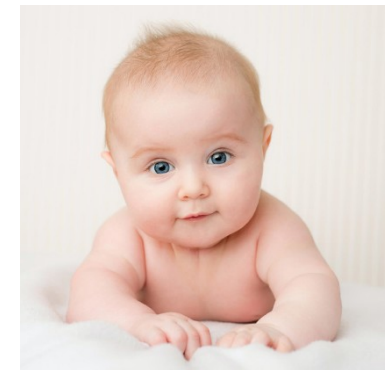
- **Polyploidie**

- mezi obratlovci vzácná, častější u rostlin



# 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

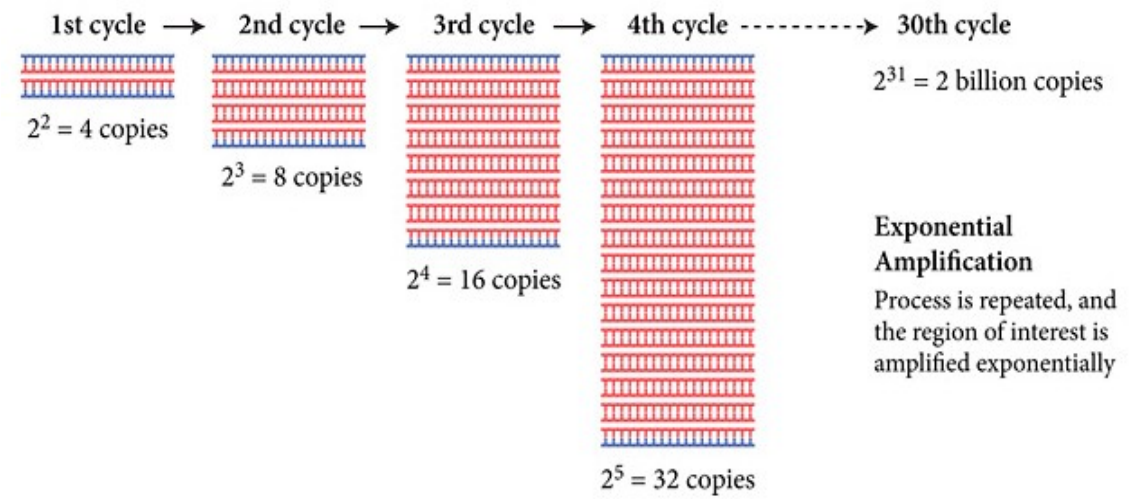
- Vstupní biologický materiál
  - Plná krev – sérum nebo plazma
  - Sliny
  - Buňky
  - Tkáně
  - Tělní tekutiny
- Izolace DNA, RNA, proteinů ze vstupního materiálu
- Molekulární a biochemické metodiky pro stanovení dané problematiky
  - Detekce polymorfismu
    - PCR – RFLP – detekce na ELFO
    - Real 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 ( $2^n$ )

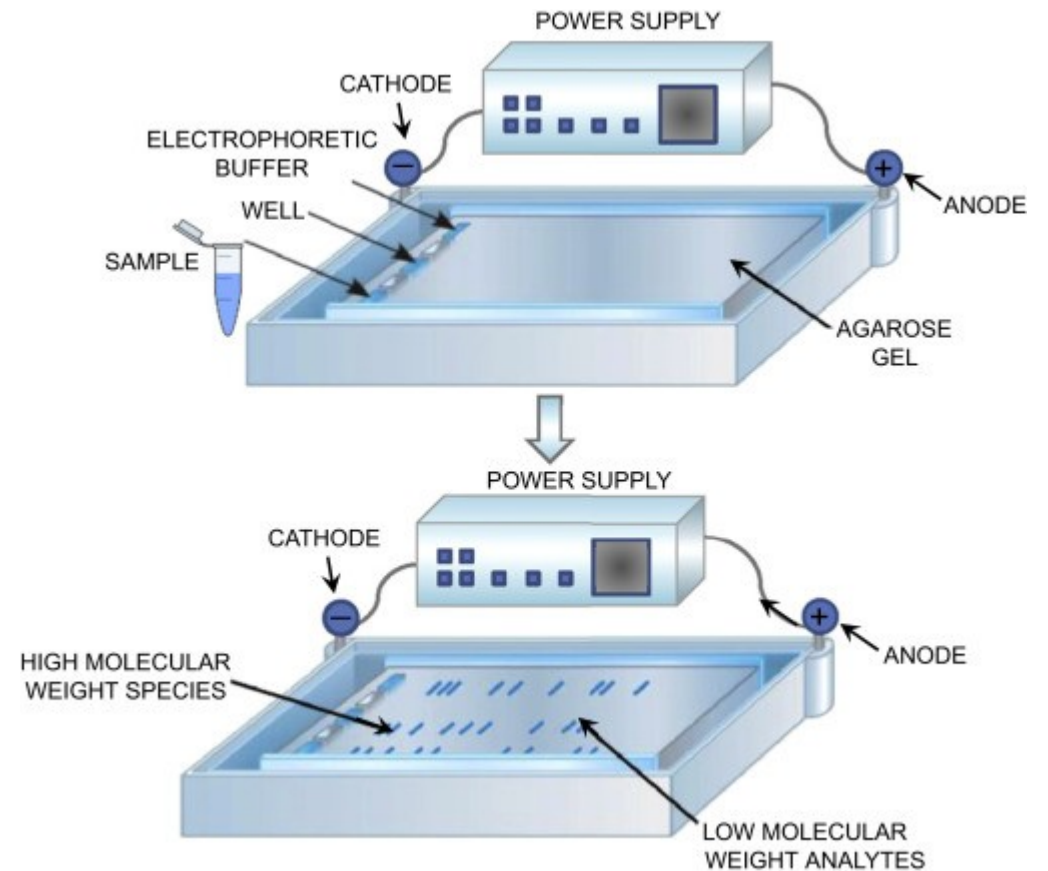
- Termocycler





# 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



# PCR + ELFO video



# Sekvenace DNA

- stanovení **primární struktury DNA** (pořadí nukleotidů)
- **chemická metoda** - degradace řetězců nukleových kyselin pomocí chemických činidel (dimethylsulfát, NaOH, hydrazin,..)
- **enzymatická metoda** – specifická inhibice enzymové syntézy DNA
- **Produkt** – řetězce ssDNA, jejichž vzájemná velikost se liší o jednu bázi
- **Vstupní materiál** – fragment DNA s jedním definovaným koncem



# Sekvenace DNA - video

# Western blot - video

Western blot je metoda používaná k detekci přítomnosti specifického proteinu ve vzorku. Touto metodou je možné porovnat množství proteinu v různých vzorcích. Western blot patří mezi imunochemické metody, které mají využití v klinické diagnostice i ve vývoji léků.

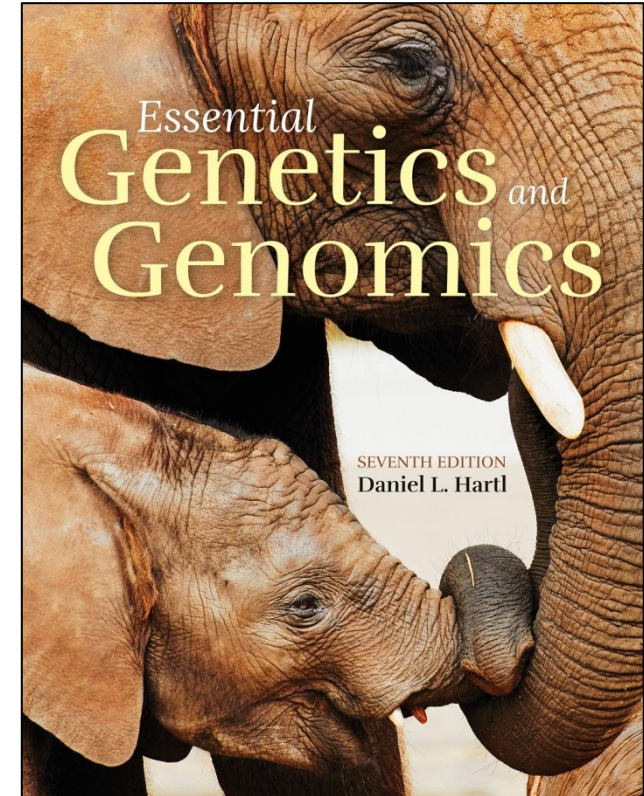
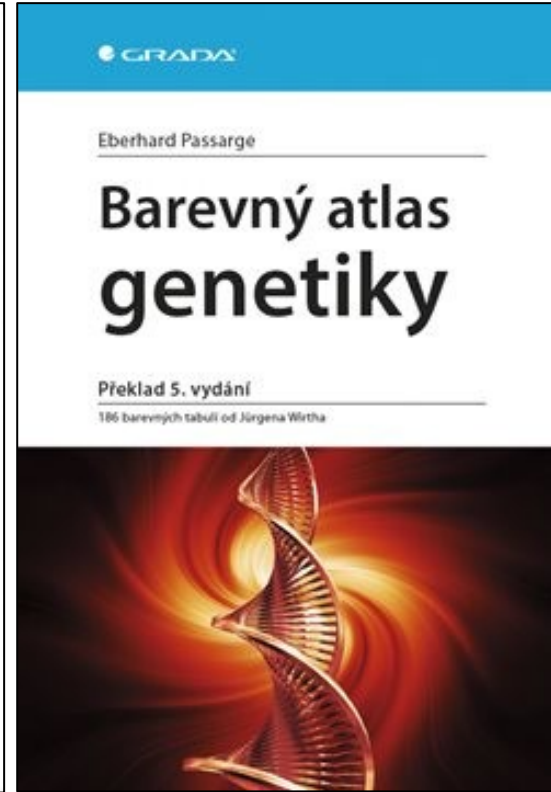
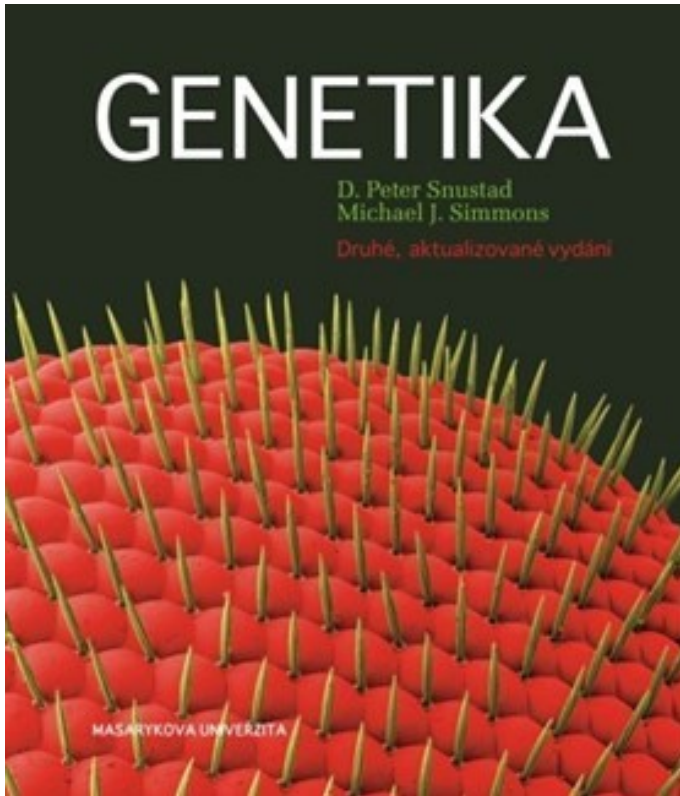
# Laboratoř TK - video

*In vitro* experimenty se využívají v biologii, medicíně a dalších příbuzných oborech a jsou založeny na pěstování buněčných/tkáňových kultur mimo organismus, ze kterého pochází.

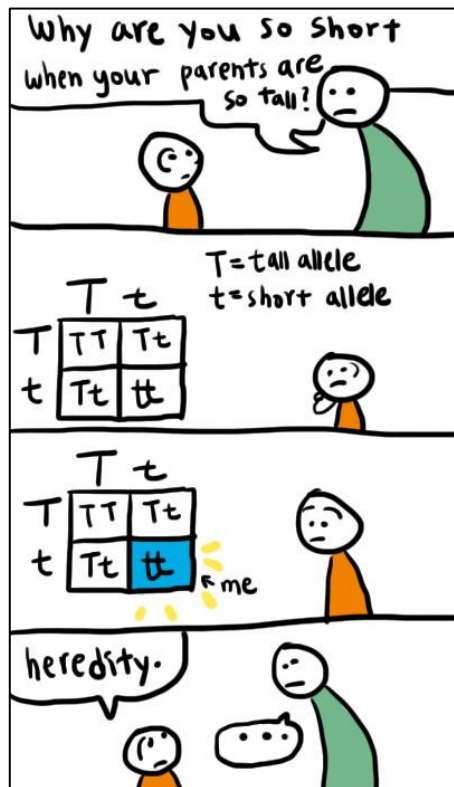


# Laboratoř TK - video

# Doporučená literatura pro samostudium







Děkuj za pozornost