

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

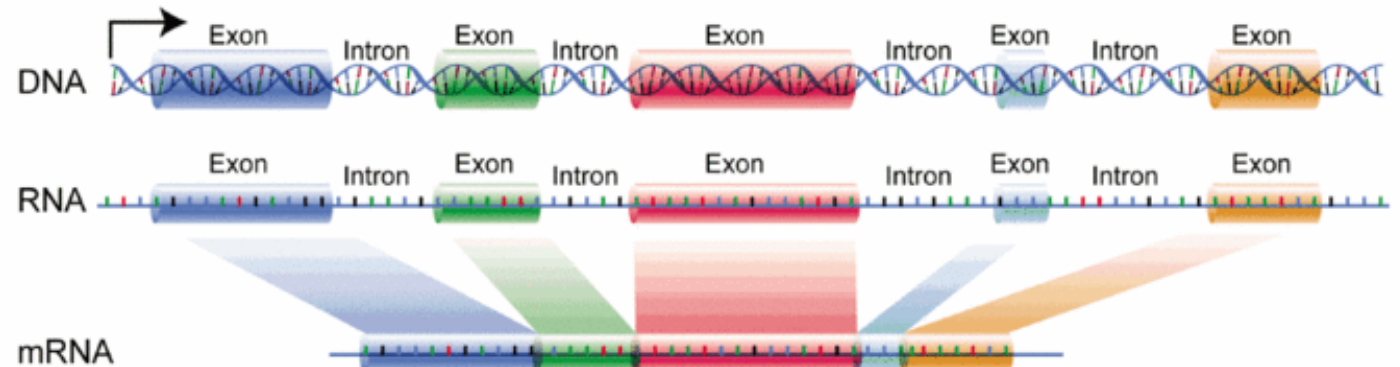
- **Genetika**

- 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

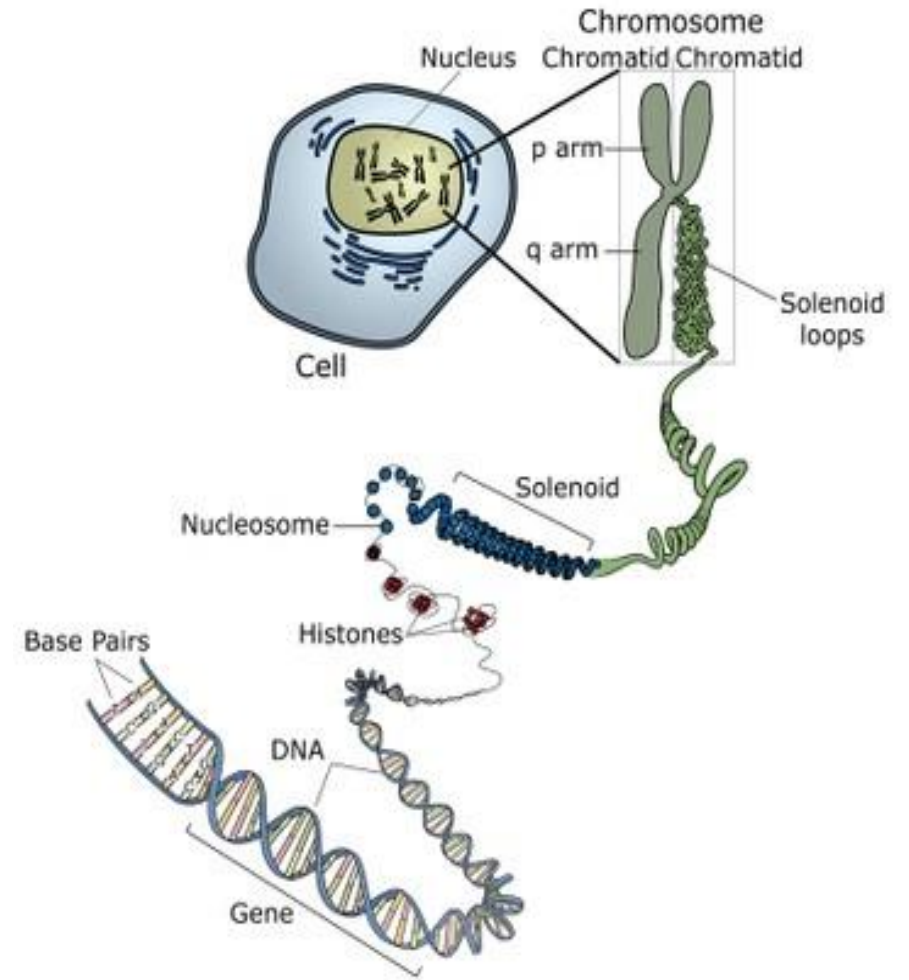


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

Základní pojmy

- **Genomika**

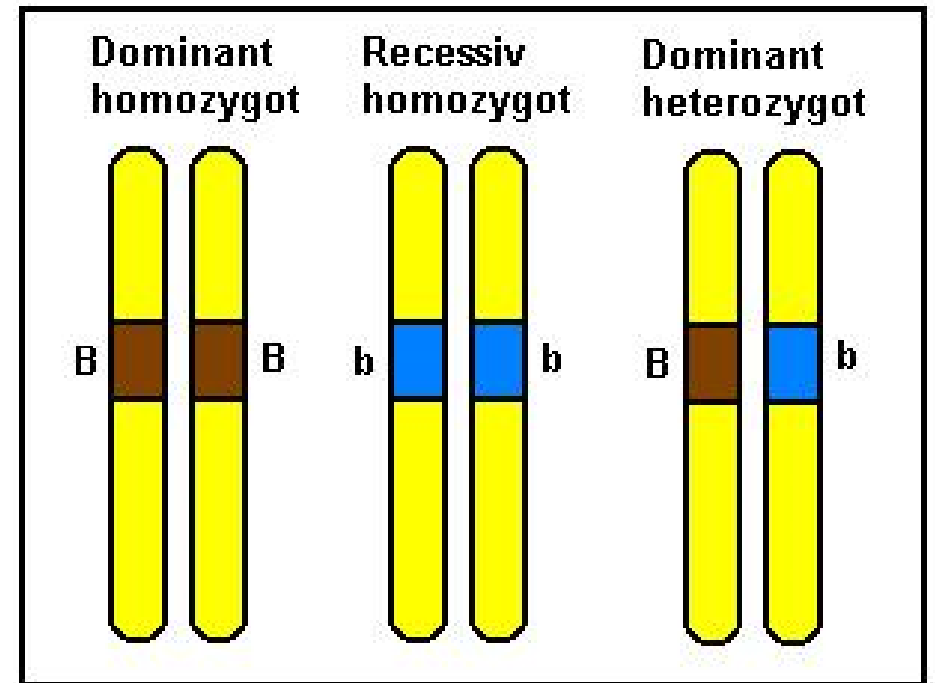
- obor genetiky, který se snaží stanovit úplnou genetickou informaci organismu a interpretovat ji v termínech životních pochodů

- **Heterozygot**

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

- **Homozygot**

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



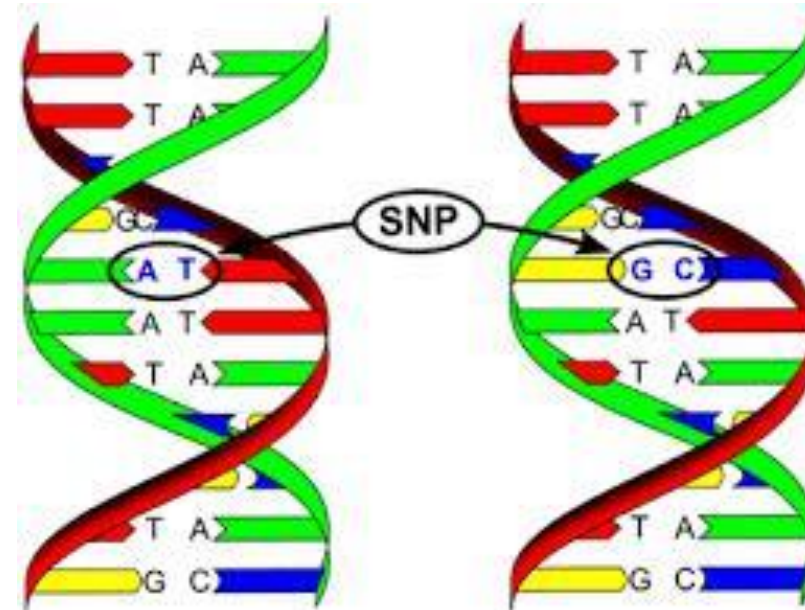
Základní pojmy

- **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 $< 1\%$



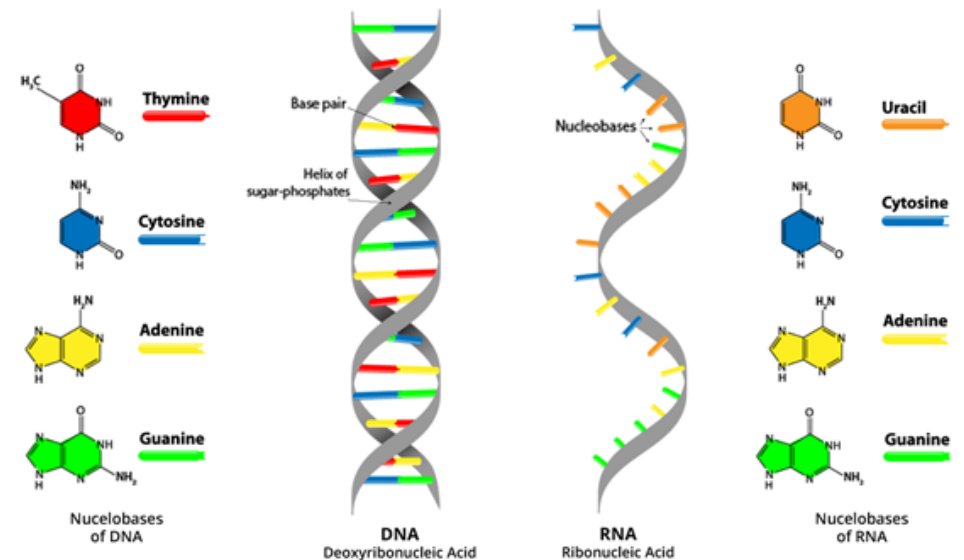
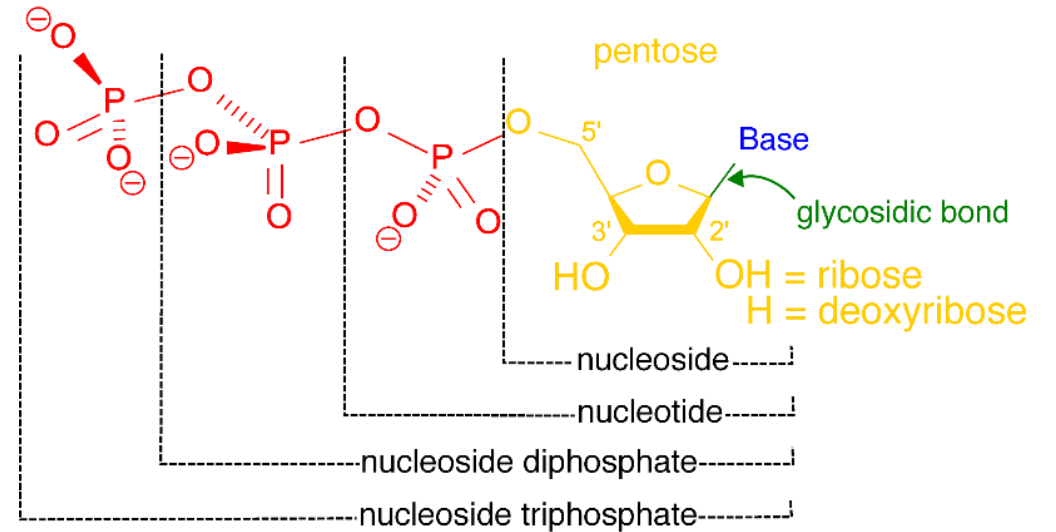
DNA vs. RNA

- molekula DNA = **kyselina deoxyribonukleová**

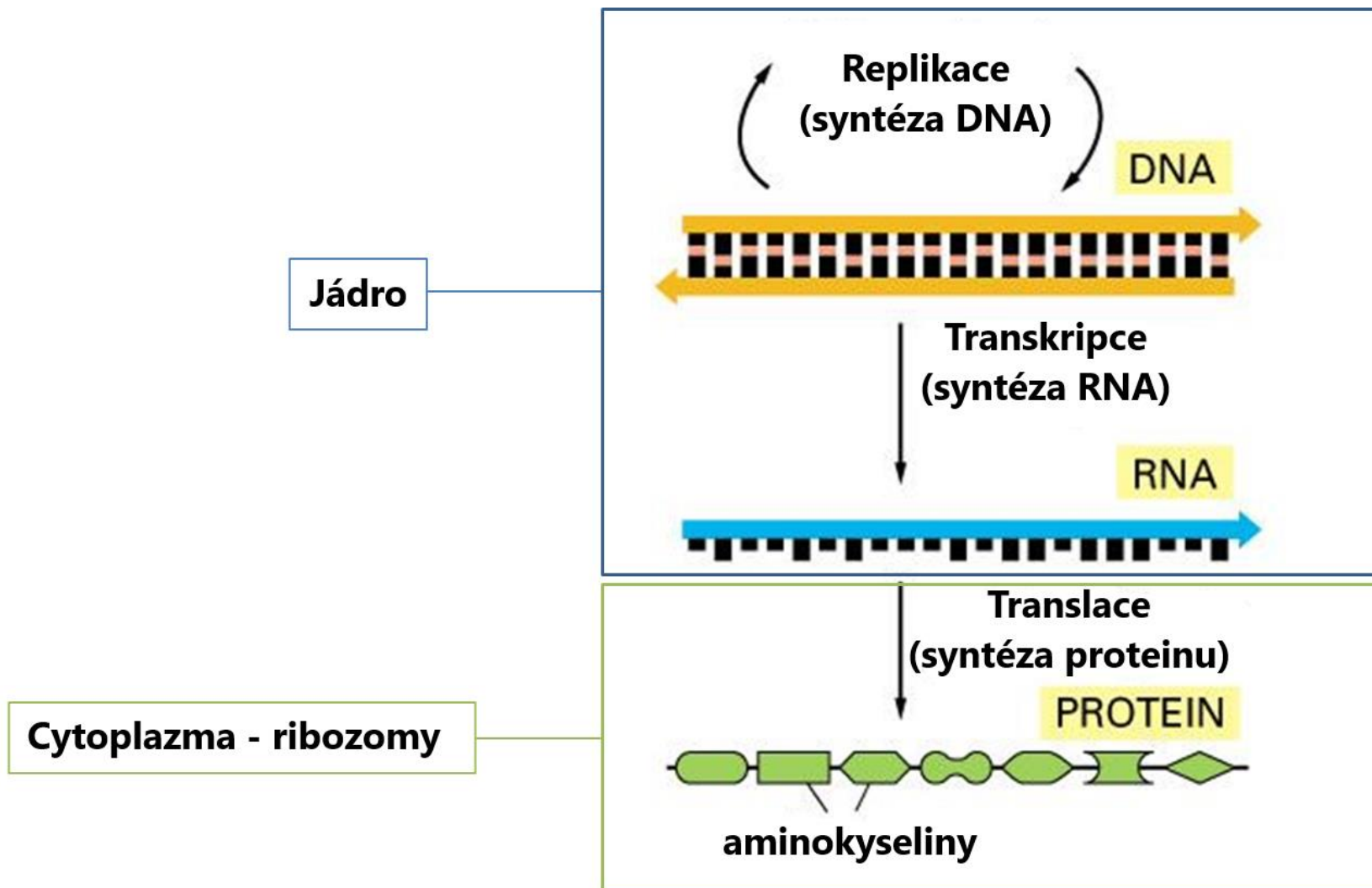
- Dvoušroubovice – 2 řetězce v opačném směru
- Polynukleotidový řetězec
 - Dusíkatá báze (T, A, C, G) spojená vodíkovými můstky
 - Zbytek kyseliny fosforečné
 - Cukerná složka – deoxyribóza

- 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



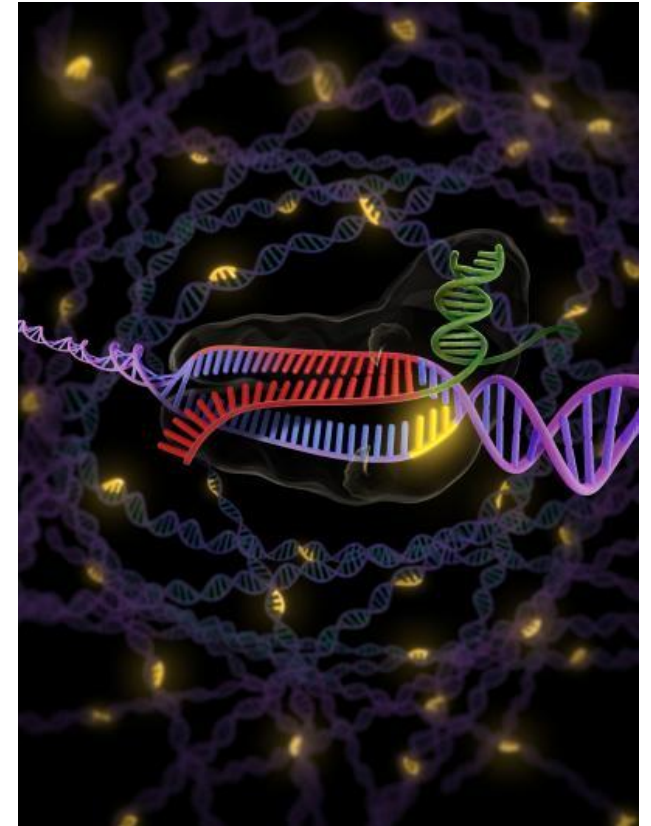
Ústřední dogma molekulární biologie



Replikace DNA

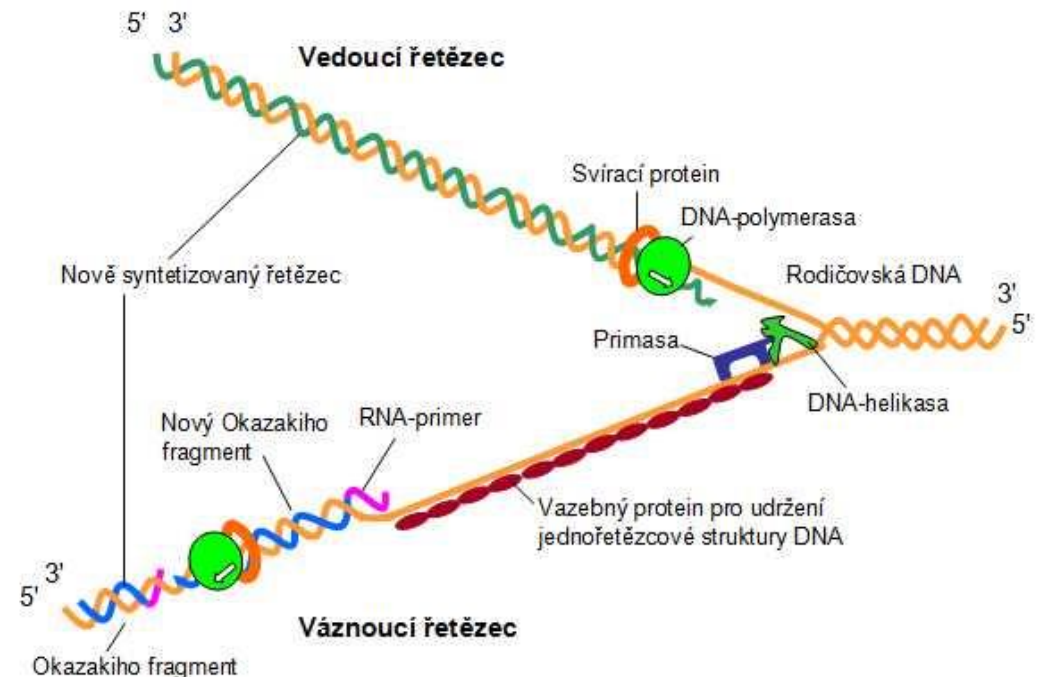
= **tvorba kopií** molekul DNA zajišťující přenos genetické informace z mateřské do dceřiné buňky

- 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



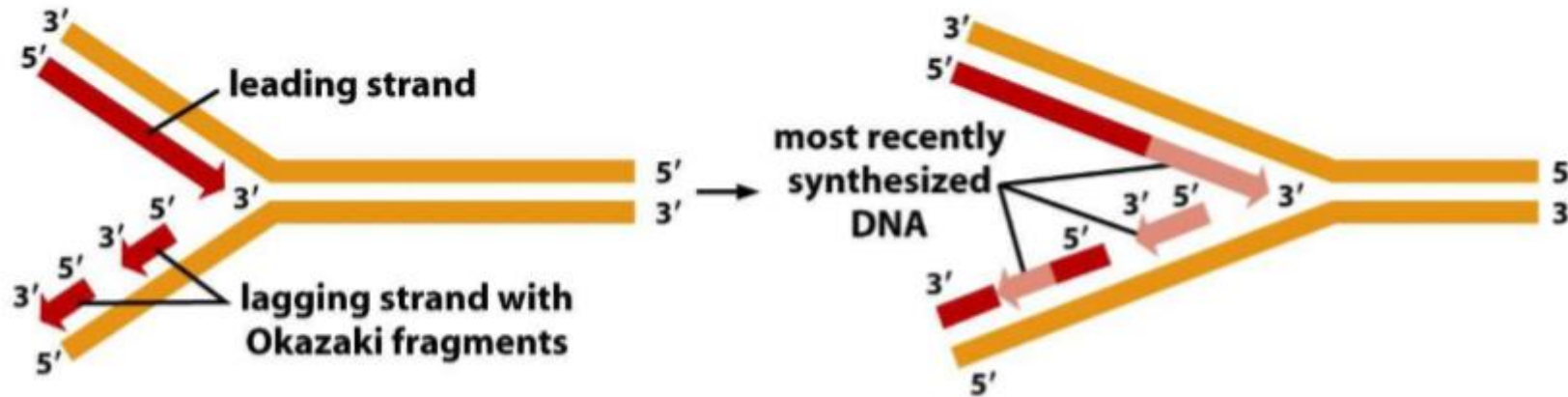
Replikace DNA

- 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



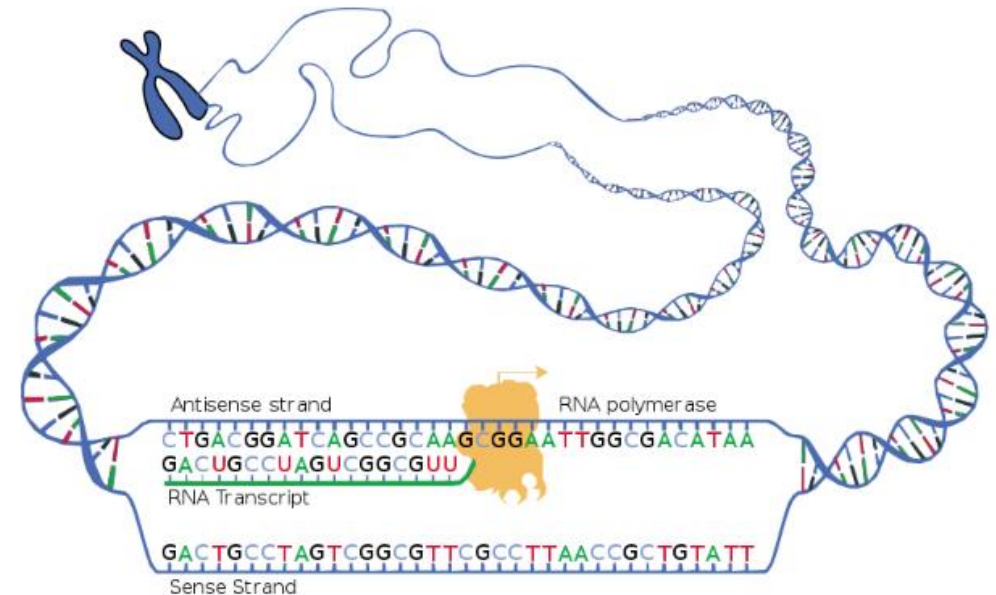
Replikace DNA

- 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



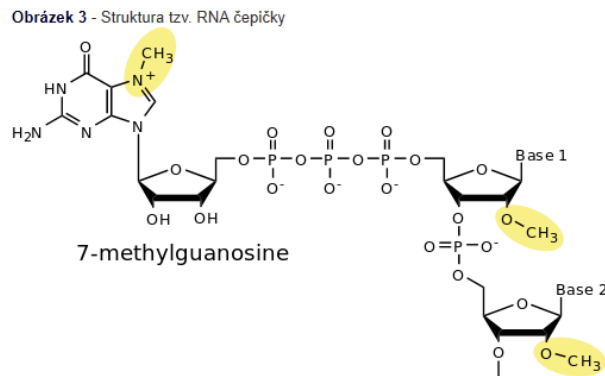
Transkripce

- **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

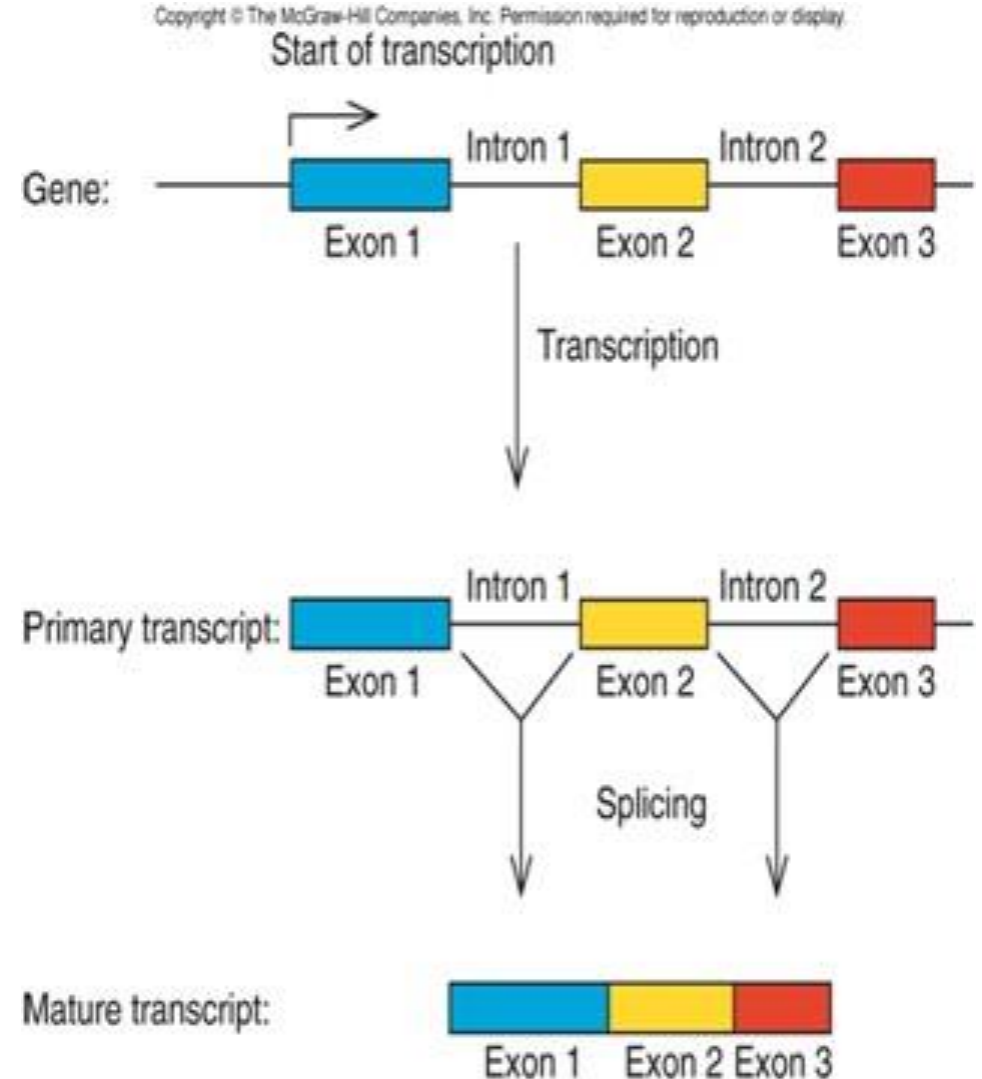


Posttranskripční modifikace

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



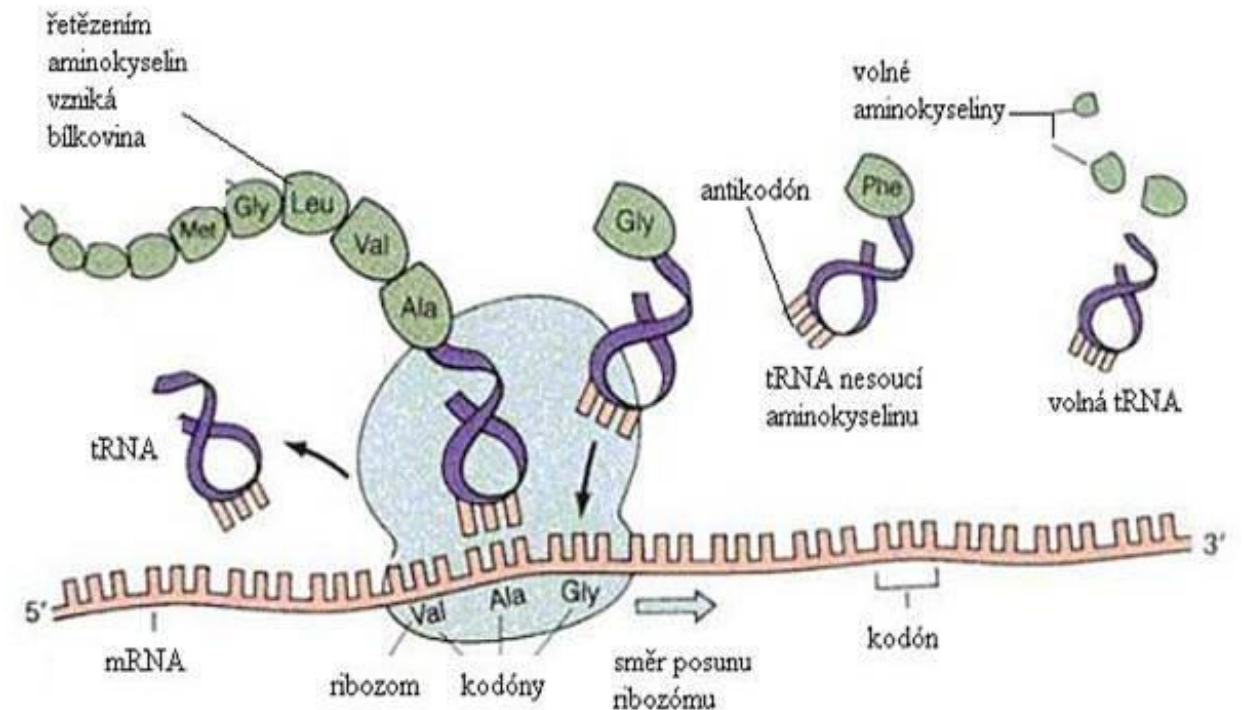
- Připojení **polyadenylačního řetězce** na 3' konec
- **Sestřih** (splicing) RNA – vystřížení intronů za vzniku zralé mRNA



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,



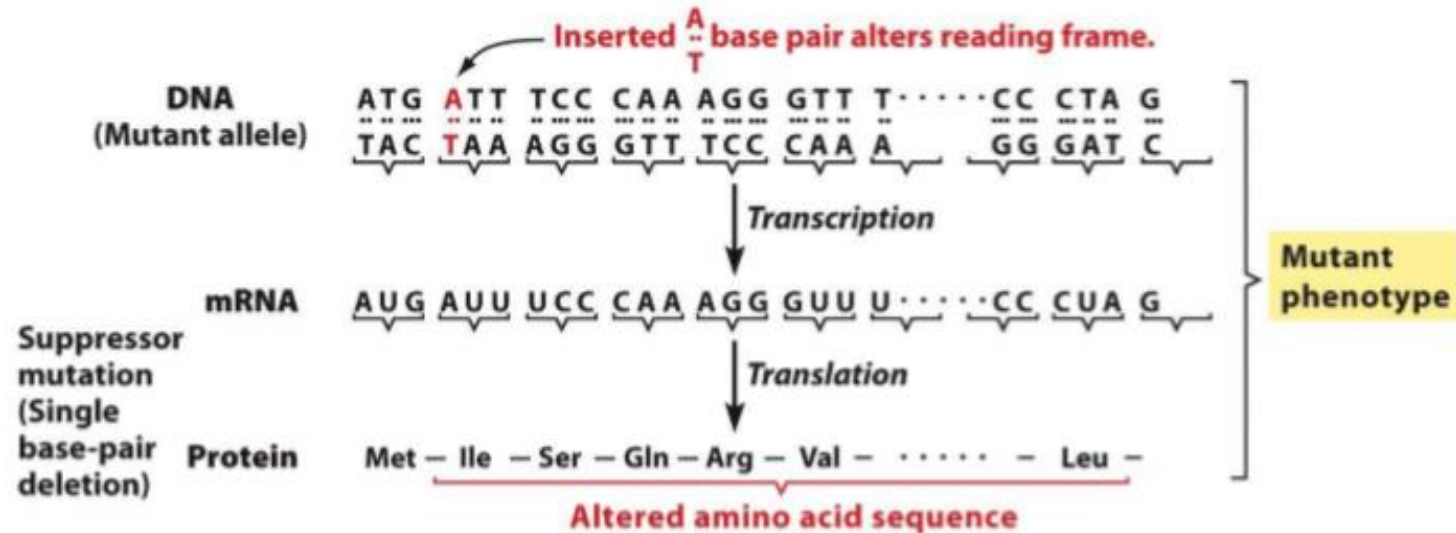
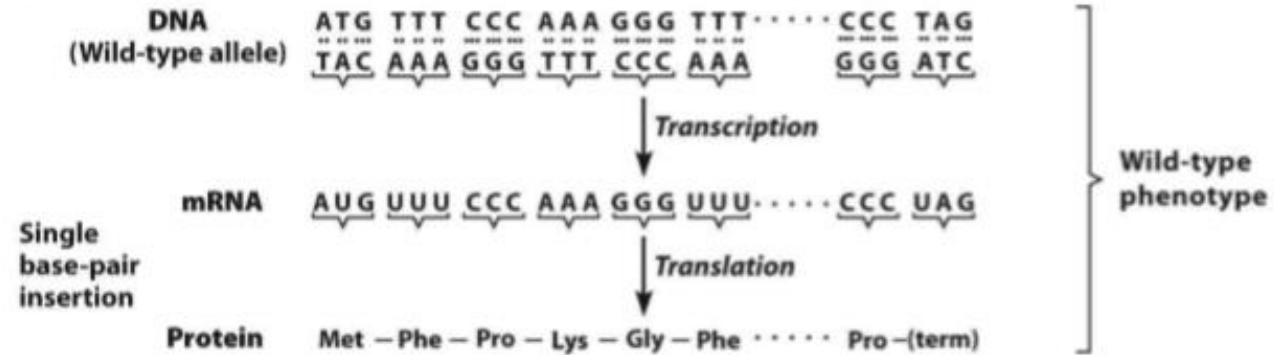
Genetický kód

- **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**

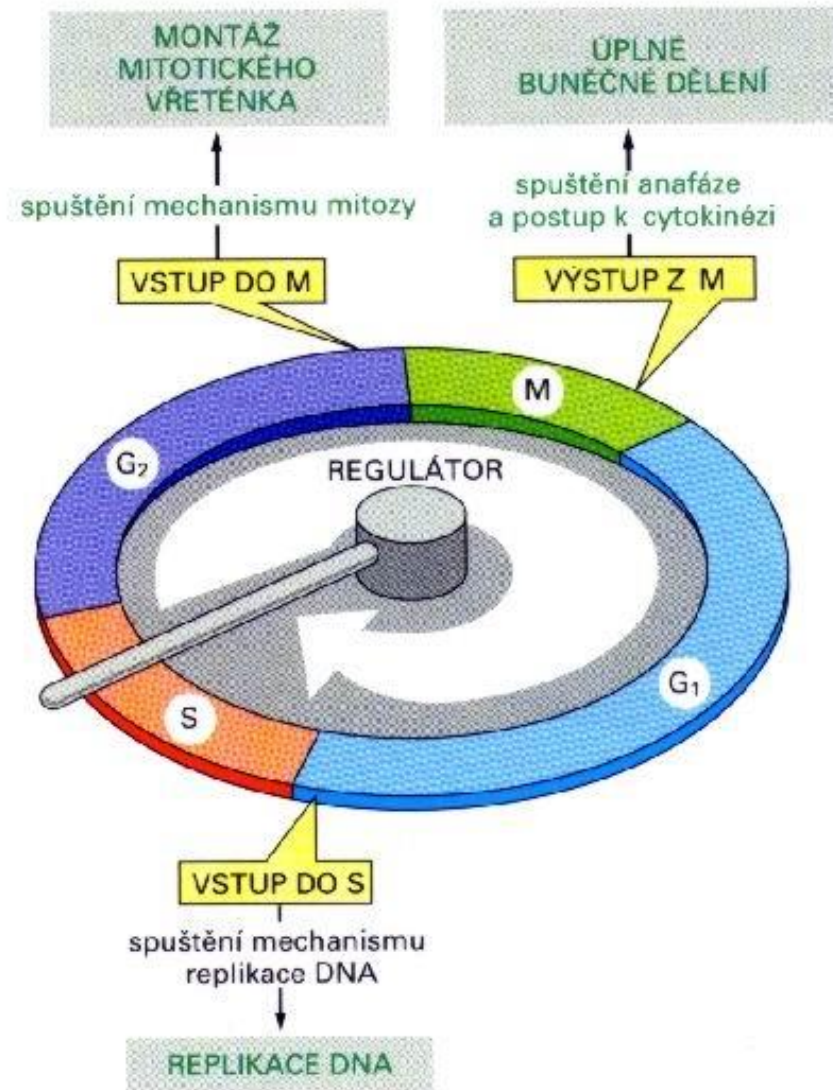
		druhý nukleotid				
		U	C	A	G	
první nukleotid	U	UUU fenylalanín UUC fenylalanín UUA leucín UUG leucín	UCU serín UCC serín UCA serín UCG serín	UAU tyrozín UAC tyrozín UAA konec UAG konec	UGU cystein UGC cystein UGA konec UGG tryptofán	U
	C	CUU leucín CUC leucín CUA leucín CUG leucín	CCU prolin CCC prolin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

Genetický kód – změna čtecího rámce

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



Buněčný cyklus



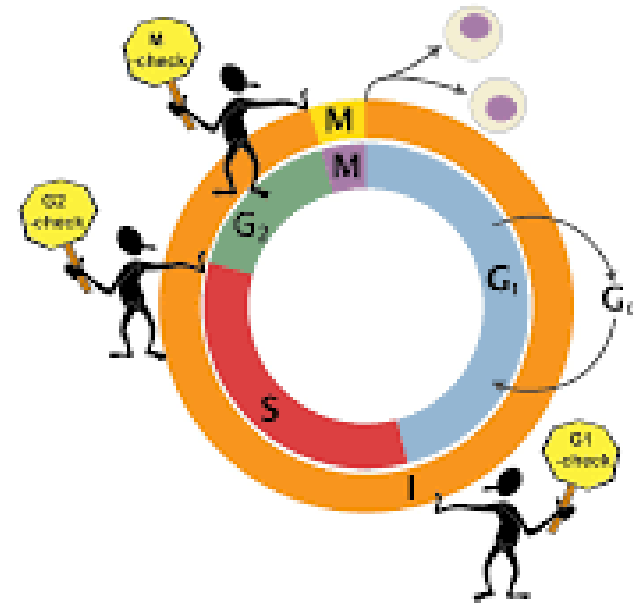
= uspořádaný sled procesů, při kterých buňka zdvojí svůj obsah a následně se rozdělí na dvě buňky dceřiné (každá z nich ponese stejné chromozomy)

Cíl: reprodukce genetického materiálu pro příští generaci buněk

Buněčný cyklus

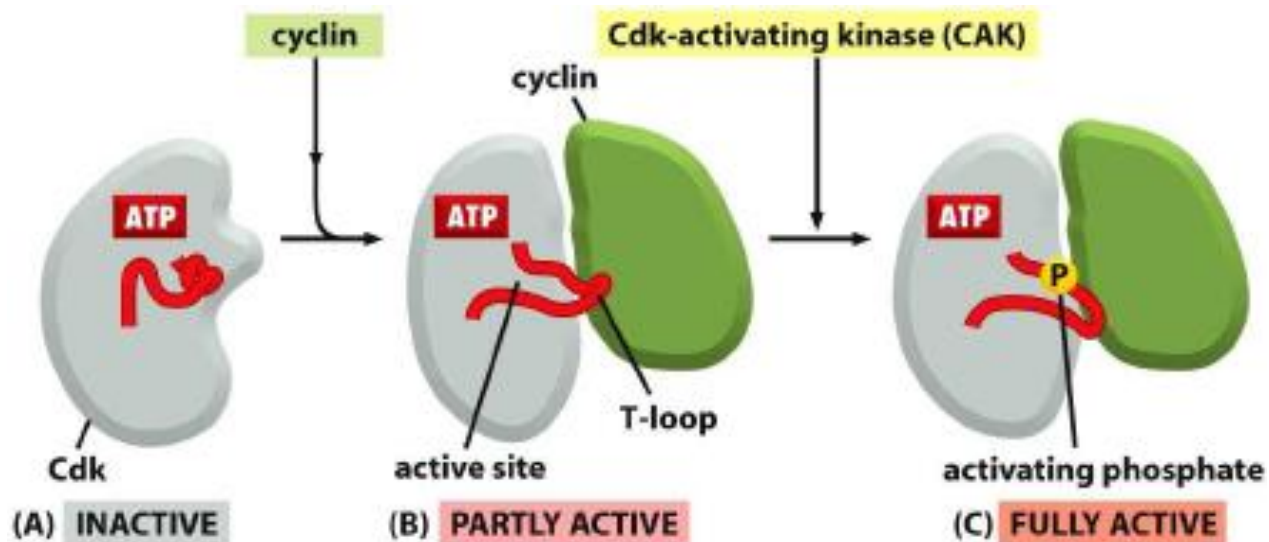
- kladeny **vysoké nároky na přesnost**
 - bezchybná replikace
 - správné řazení fází
 - mitóza před dokončením replikace -> ztráta genetické informace min. u jedné buňky
 - dvojnásobná replikace před mitózou -> zvýšený počet kopií genů na příslušné části chromozomu -> nerovnováha v genové expresi, nízká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

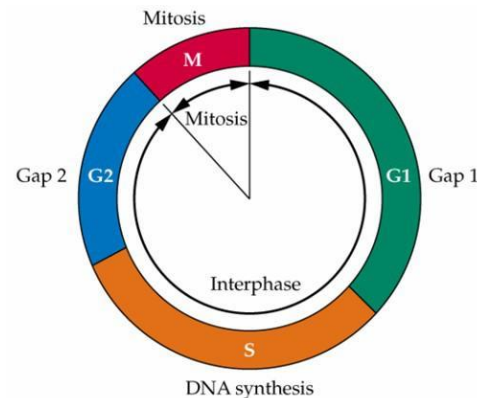
- **příprava** na buněčné dělení, vnější jaderná membrána je spojená s ER
- **nepříznivé podmínky**
 - setrvání v G1/vstup do G0; buňky nerostou, mohou tak setrvat i několik měsíců/let

• 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

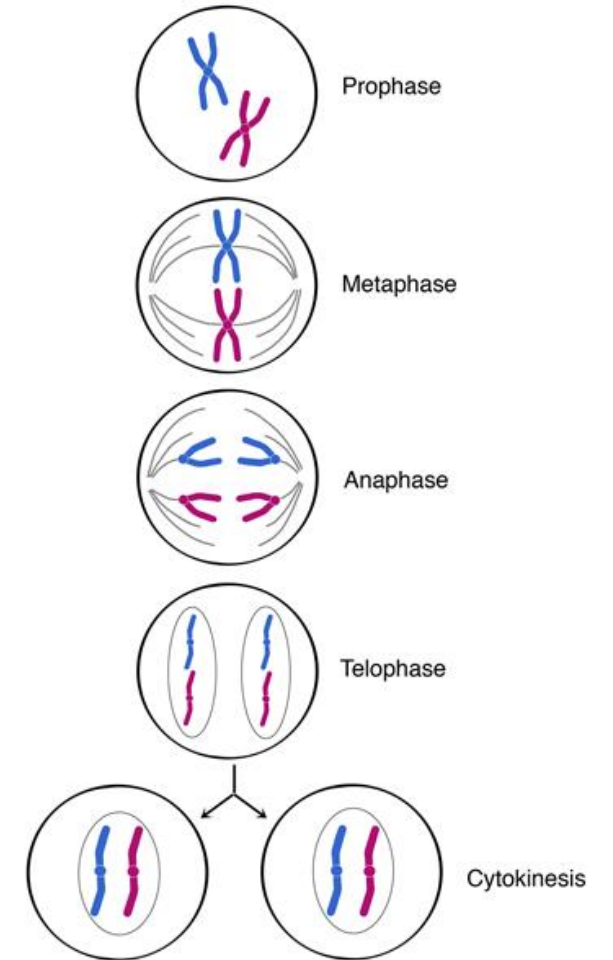
- nejdelší a nejvariabilnější
- buňka se **zvětšuje a zdvojuje organely**
- na konci této fáze se nachází kontrolní bod: **bod restrikce**
 - buňka má dostatek živin a růstových faktorů, vykazuje vysokou metabolickou aktivitu -> přejde bod restrikce a pokračuje do další fáze
 - nedostatek živin, obdržení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

Buněčný cyklus - Mitóza

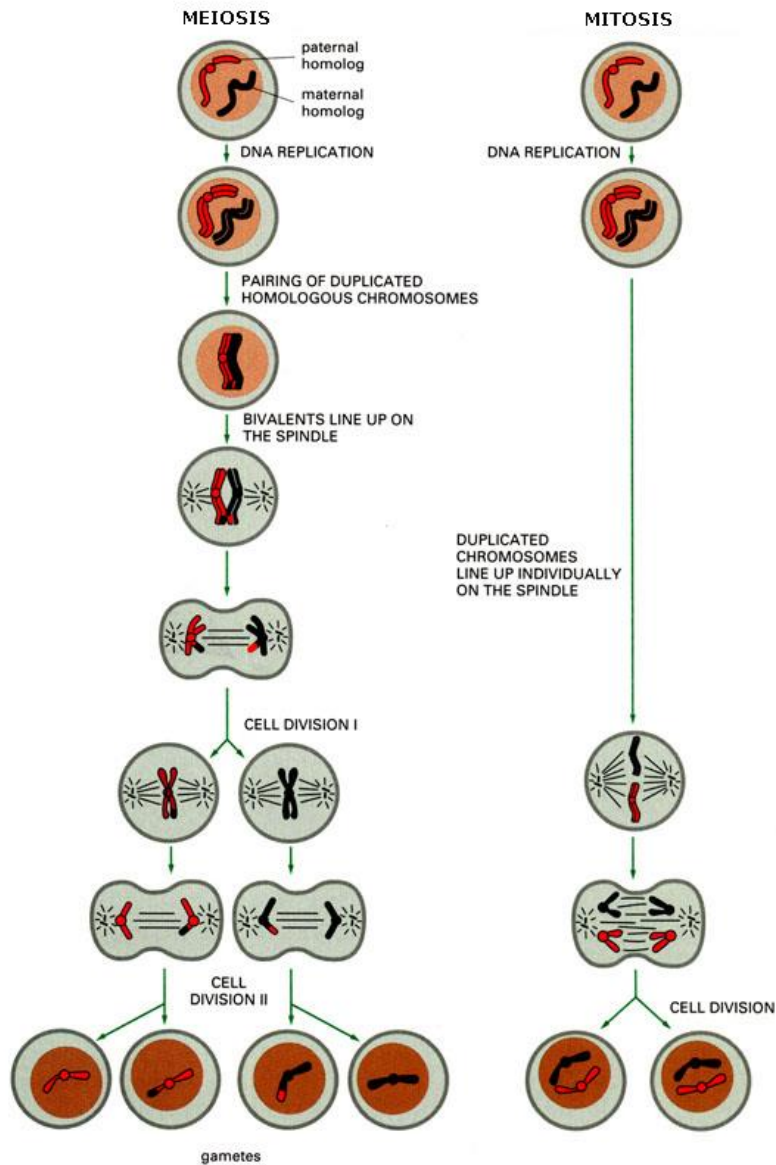
- jaderné dělení (mitóza) + následné dělení cytoplazmy = cytokineze

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.

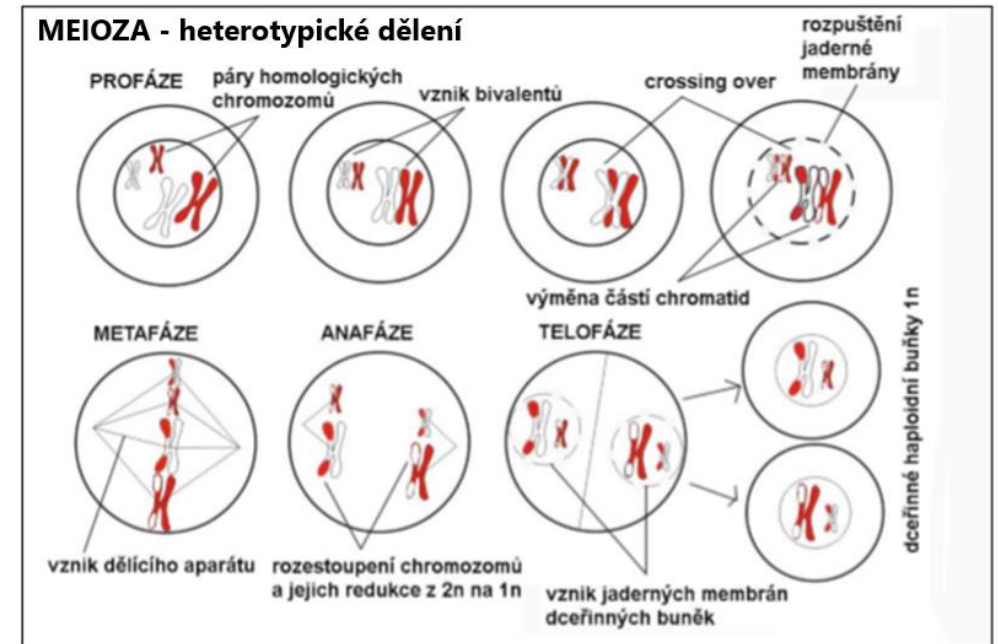
2.meiotické dělení – rozestup sesterských chromatid -> 2 dceřiné buňky s haploidním počtem chromozomů, vznik pohlavních buněk (spermie, vajíčko), dodatečné promíchání genetického materiálu crossing-overem

Meióza

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

Heterotypické dělení

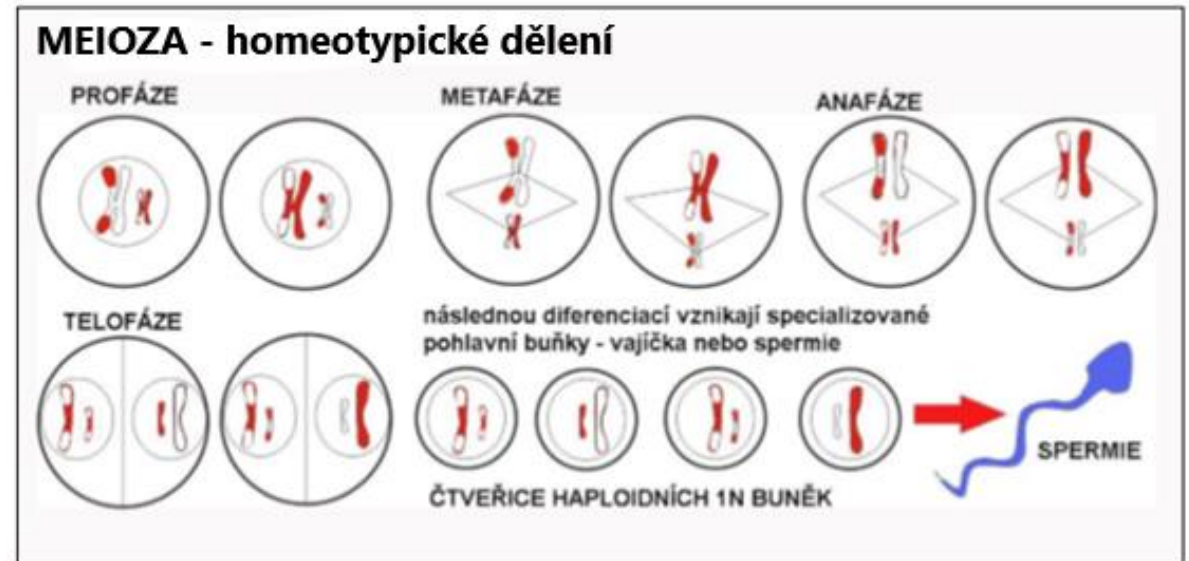
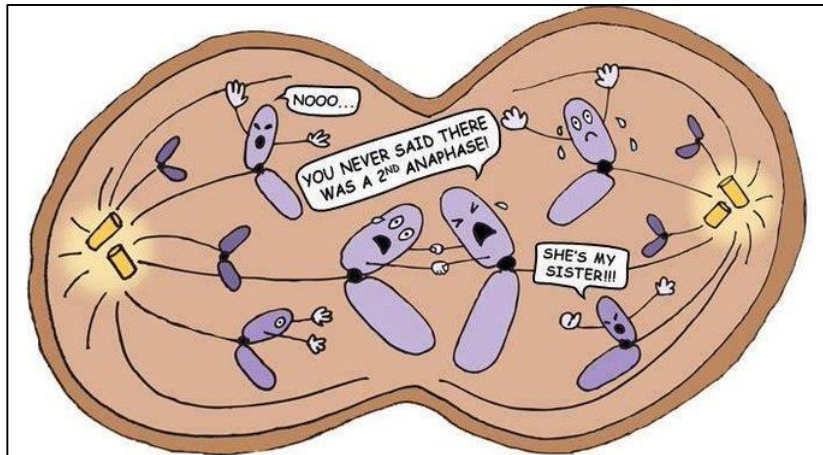
- **Profáze** – 5 částí
 - **Leptotene** – spiralizace chromozomů
 - **Zygotene** – vznik bivalentů
 - **Pachytene** – **crossing over** = křížení nesesterských chromatid
 - **Diplotene** – postupné rozestoupení homologních chromozomů
 - **Diakineze** – rozpuštění jaderného obalu, vznik dělicího vřeténka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

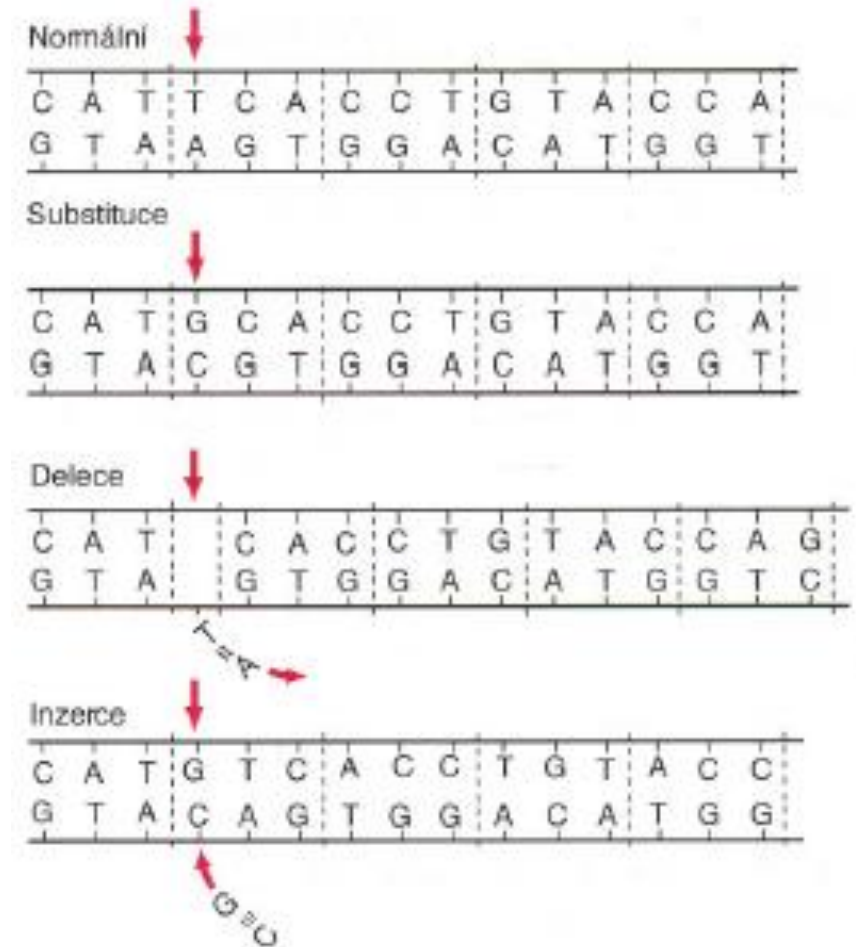
- Pozitivní – zdroj dědičné variability, význam pro evoluci
- Negativní – hromadění vadných genů, vznik geneticky podmíněných onemocnění, tvorba nádorů
- Neutrální

- **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)



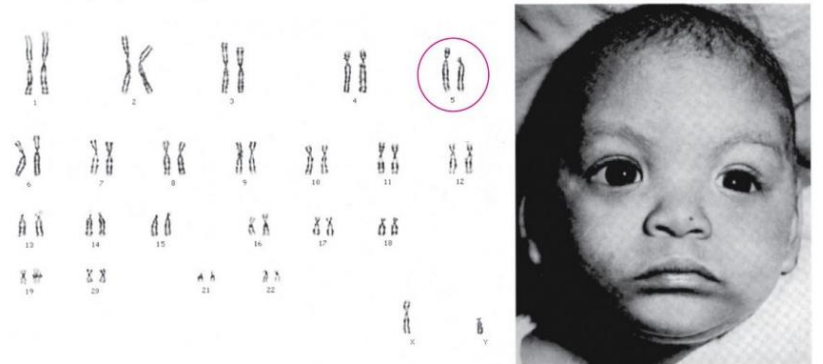
Chromozomové mutace

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**

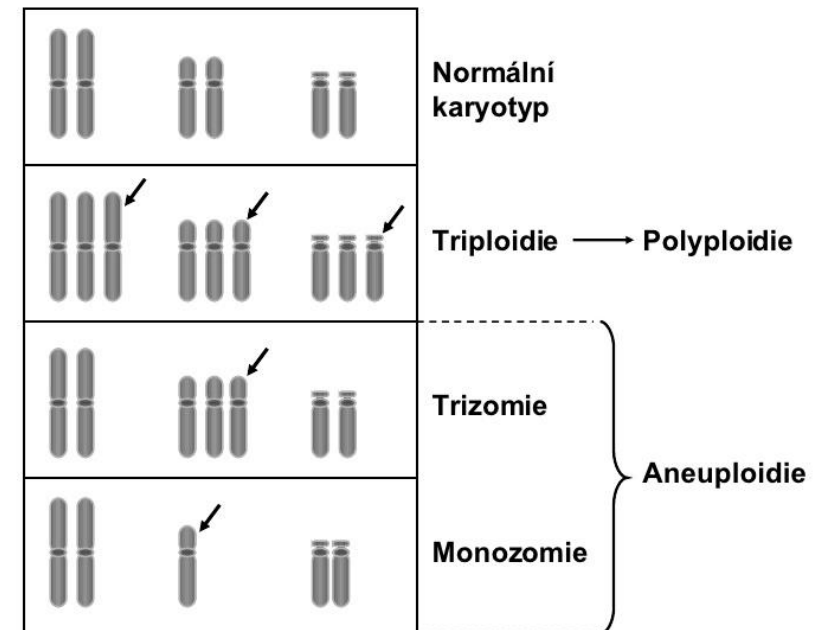
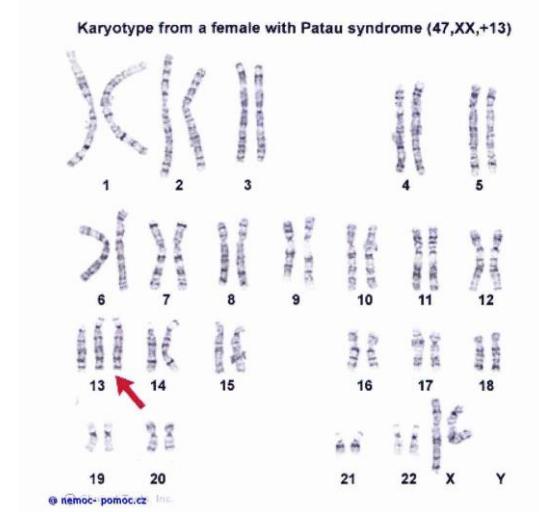
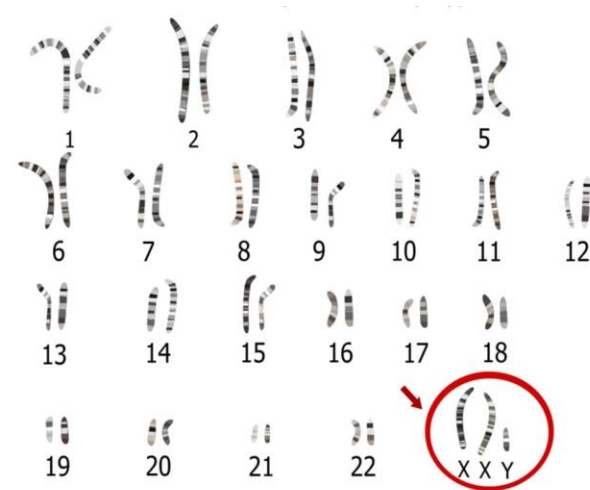
- Turnerův syndrom 45, X
- Klinefelterův syndrom 47, XXY
- XXX syndrom
- XYY syndrom

- **Aneuploidie somatických chromozomů**

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

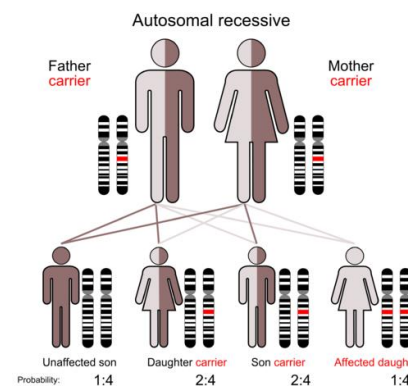
- **Polyploidie**

- 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**

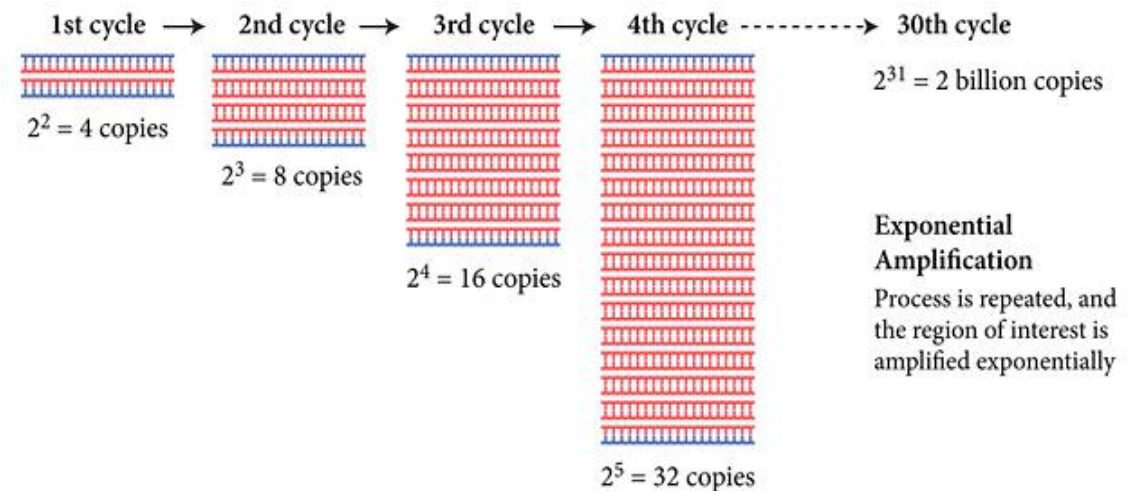


Praktická část cvičení

PCR – Polymerase Chain Reaction

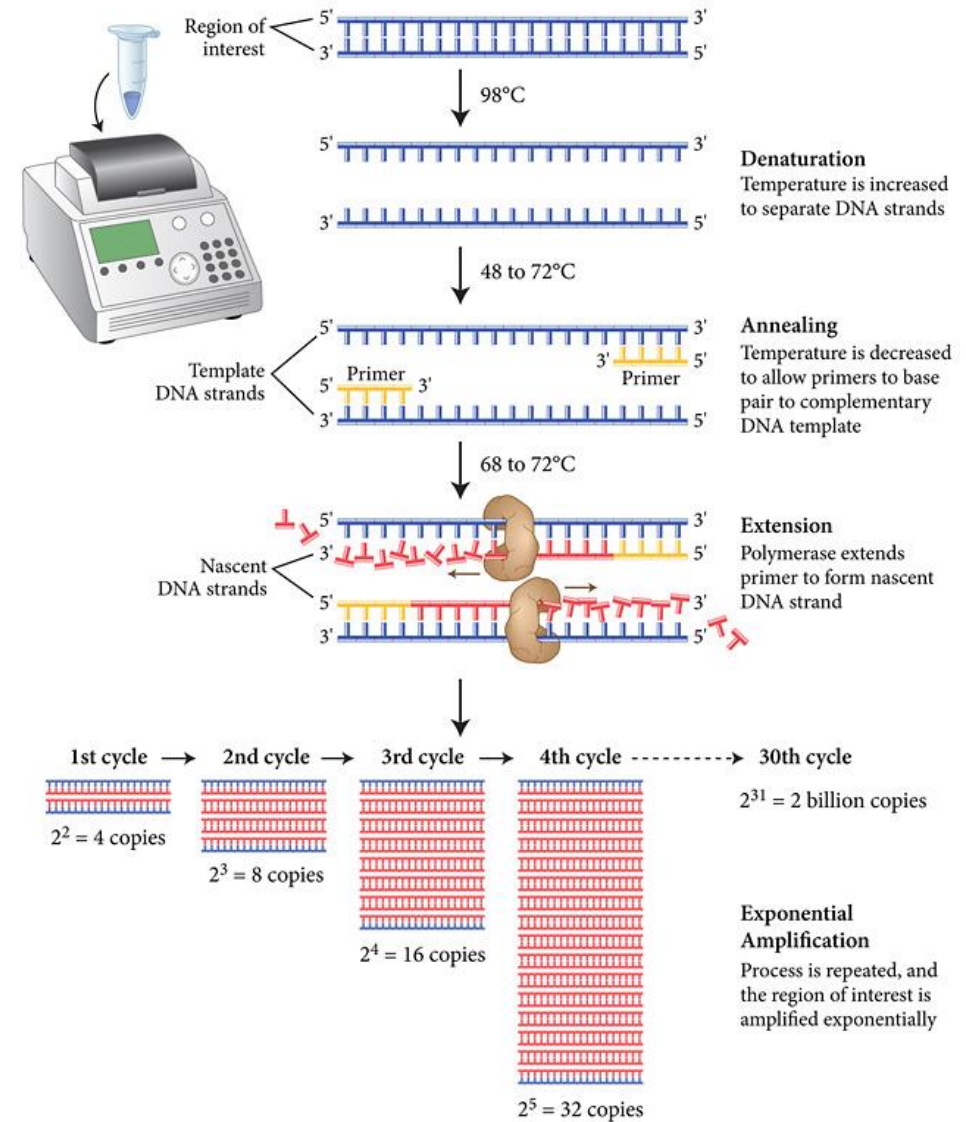
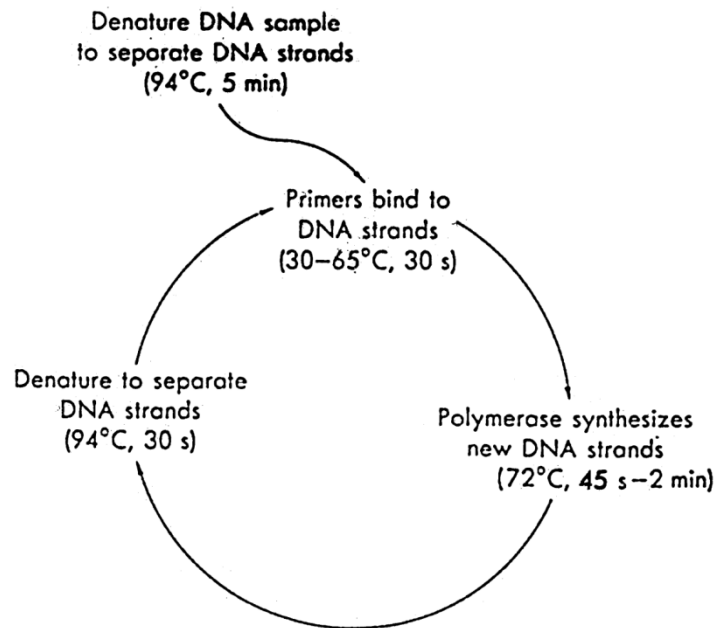
- **Cíl** – získání požadované a specifické sekvence genomové DNA bez jejího předchozího klonování
- **Princip** – mnohonásobná replikace
 - cca 30 cyklů
 - závislost na teplotě reakční směsi
 - množství namnožené DNA roste exponenciální řadou (2^n)

- Termocycler



PCR

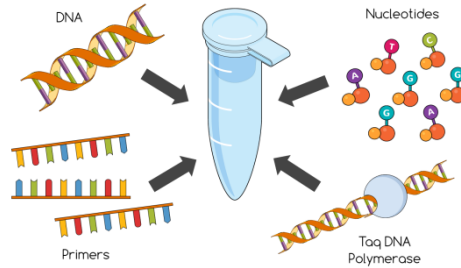
- **Mnohonásobná *in vitro* replikace ve zkumavce**
- Řetězová reakce vycházející z DNA replikace
- Opakování cyklů:
 - denaturace (separace dsDNA) – 96 °C
 - annealing – navázání primerů – 50–65 °C
 - elongace – syntéza nového vlákna DNA – 72 °C



PCR

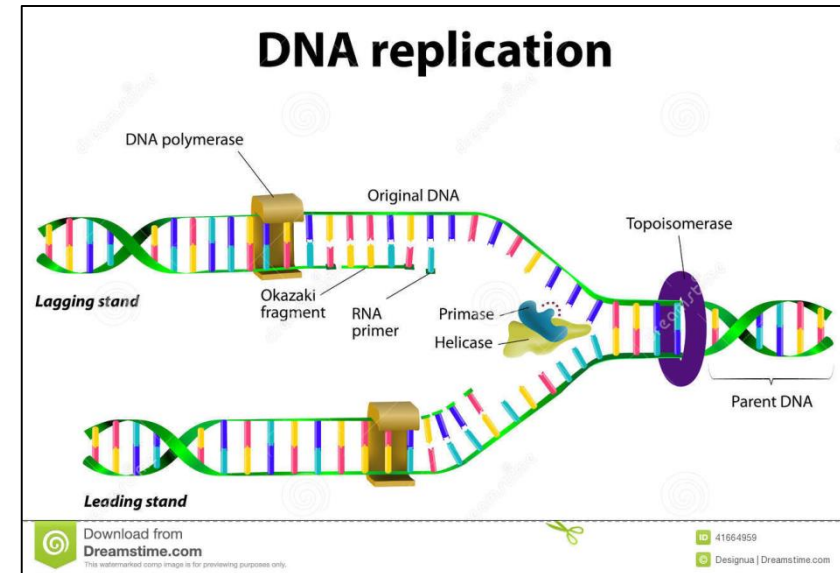
- **DNA replikace – *in vitro* (PCR)**

- **templátová DNA**
- **dNTP**
- **pufr (pH=8)**
- **Mg²⁺ ionty**
 - Ovlivňují aktivitu a přesnost polymerázy
- **primer**
 - krátké specifické úseky DNA
 - oligonukleotid 20–25 pb
 - ohraničení oblasti amplifikace DNA
- **DNA polymeráza**
 - termostabilní (odolává teplotám až 98 °C)
 - Taq (*Thermus aquaticus*), Tth (*Thermus thermophilus*)
- **teplota**



- **DNA replikace – *in vivo***

- **enzymy – helikáza, primáza, DNA polymeráza, ligáza ...**



PCR

1. Praktické provedení PCR

Objem v mikrozkušavce: 25 μ L

Složení (1 vzorek):

- templátová DNA (2 μ L)
- 2 primery (1.25 μ L)
- MgCl₂ 25mM (4 μ L)
- dNTP mix (0.5 μ L)
- Taq polymeráza 1U (1 μ L)
- pufr (2.5 μ L)
- PCR H₂O (12.5 μ L)

MASTER MIX



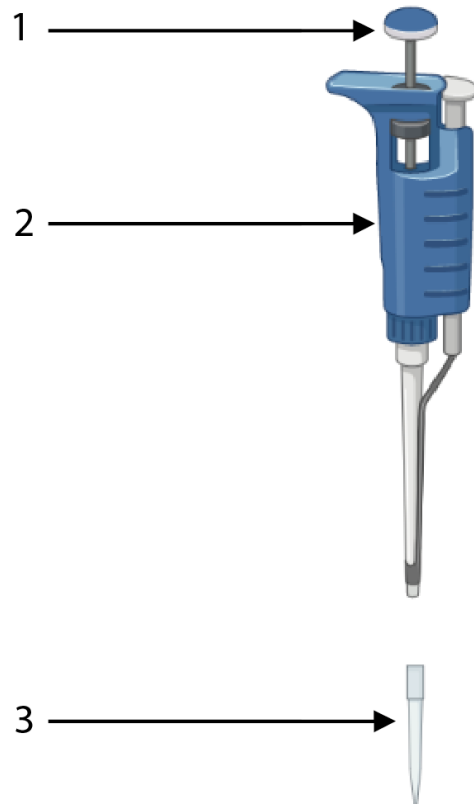
1 kapka minerálního oleje



1. 95°C.....5minut
2. 95°C.....1 minuta
3. 60°C.....1minuta
4. 72°C.....1minuta
5. 72°C.....7minut
6. 10°C.....10minut

} 35x

Práce s mikropipetou



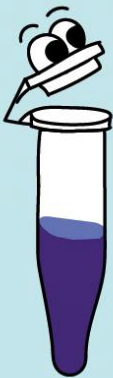
Mikropipeta
1 - dvoupolohový ovladač
2 - držák
3 - jednorázová špička

- Pipetu držím vždy **vertikálně** (špičkou dolů).
- Pipetu držím v dlani zavěšenou za ukazováček a ovládám ji palcem.
- **Vyberu optimální rozsah objemu!!! Nikdy nepřekračuju rozsah pipety nahoru ani dolů!!!**
- Před pipetováním musíme na pipetu nasadit příslušnou **špičku** (dle objemového rozsahu pipety).
- Vždy používám novou **sterilní špičku**.
- Pokud opakovaně pipetuju tentýž roztok, ponechám na pipetě po celou dobu práce tutéž špičku.
- K odhazování špiček slouží tlačítko na boční straně pipety.

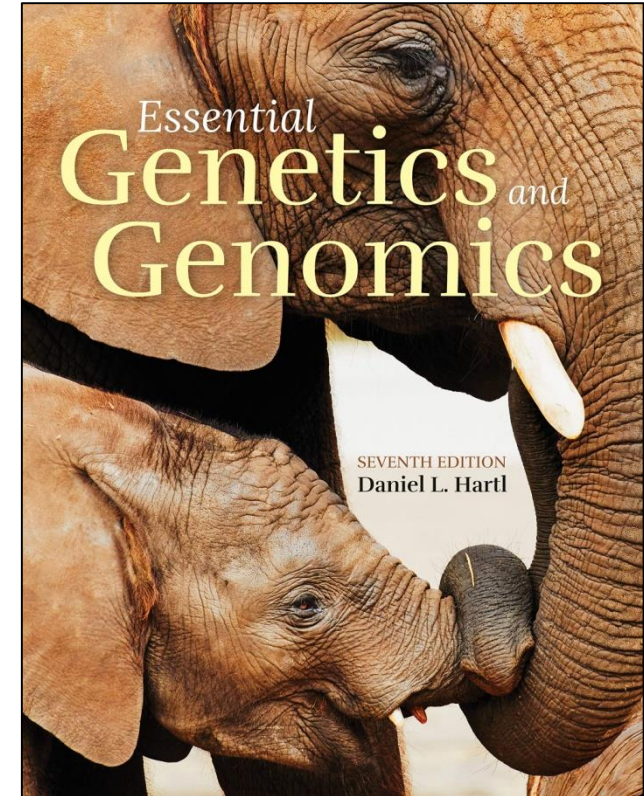
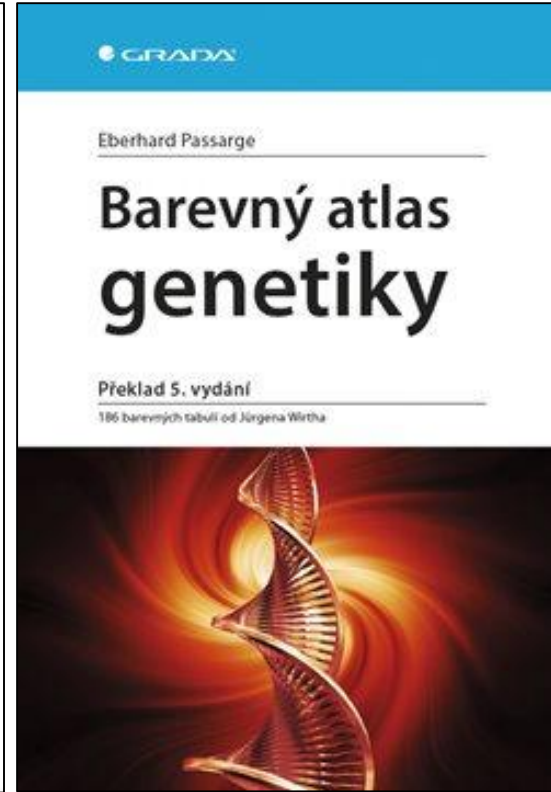
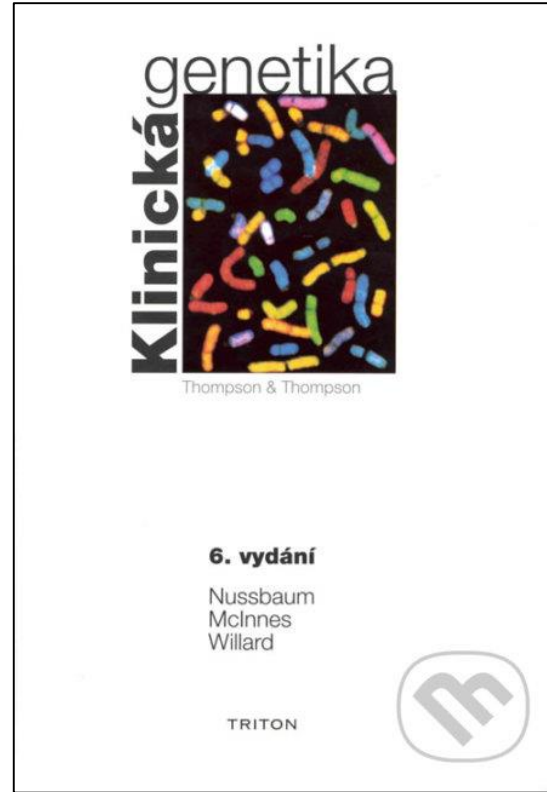
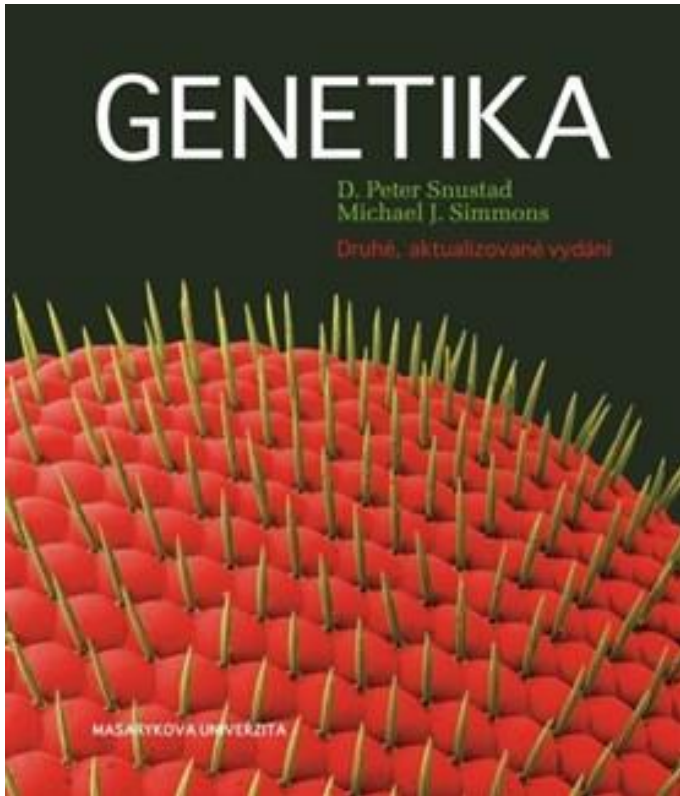
Práce s mikropipetou

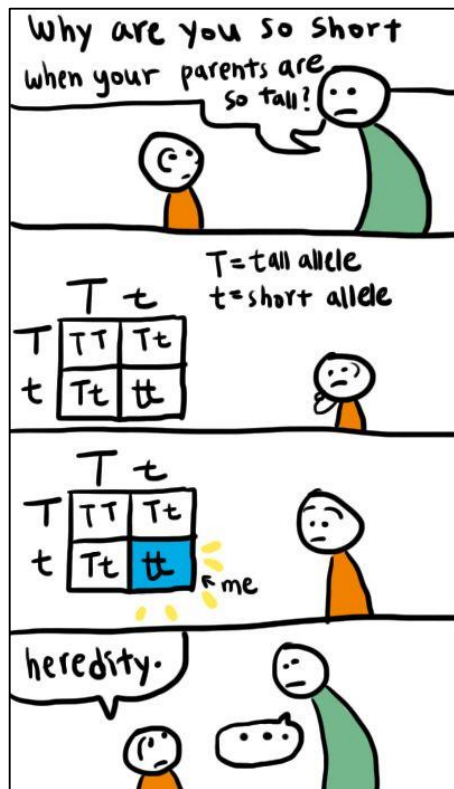


HOW TO USE A



Doporučená literatura pro samostudium





Děkuji za pozornost