

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

# Základní pojmy

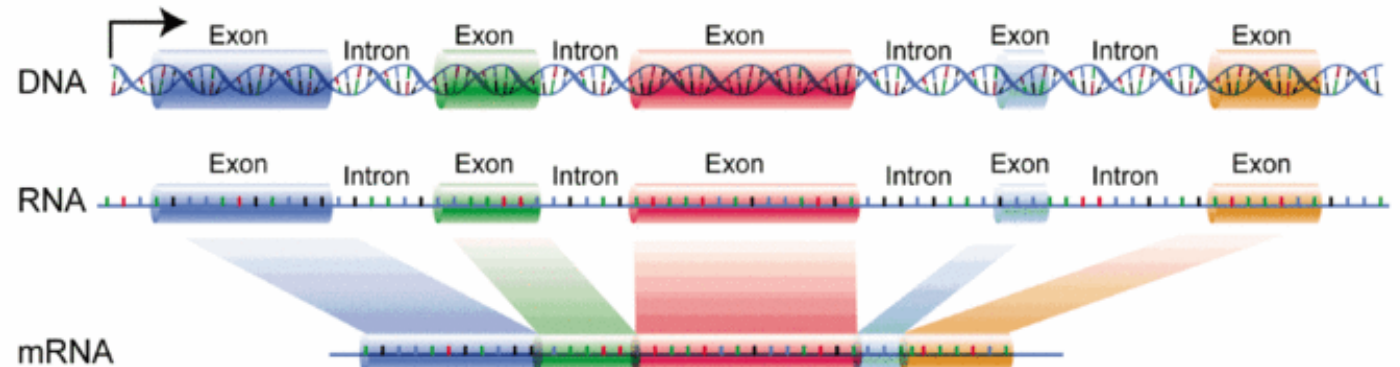
- **Genetika**

- 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

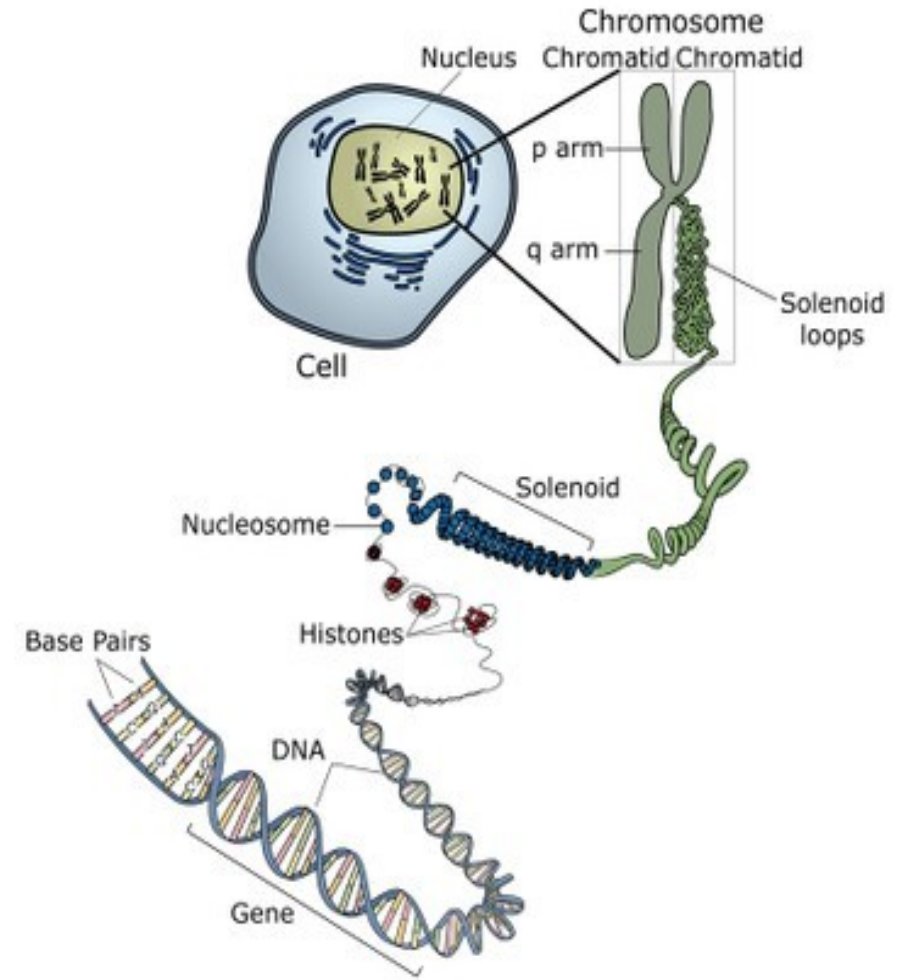


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

# Základní pojmy

- **Genomika**

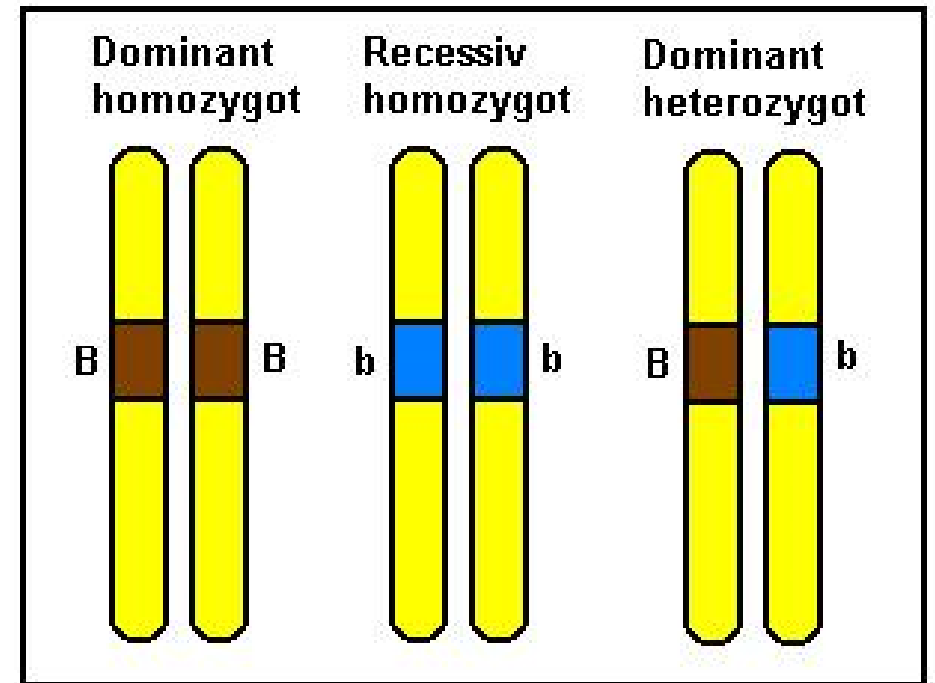
- obor genetiky, který se snaží stanovit úplnou genetickou informaci organismu a interpretovat ji v termínech životních pochodů

- **Heterozygot**

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

- **Homozygot**

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



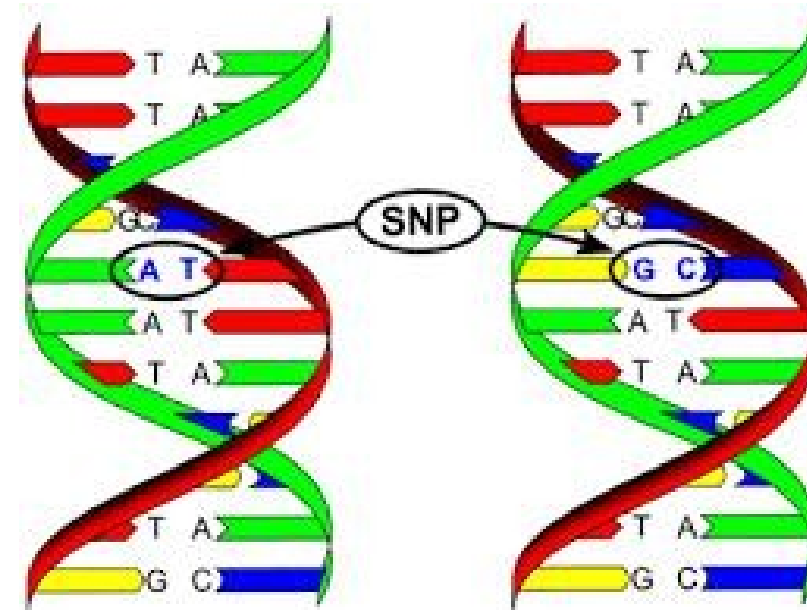
# Základní pojmy

- **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 frekvencí  $< 1\%$



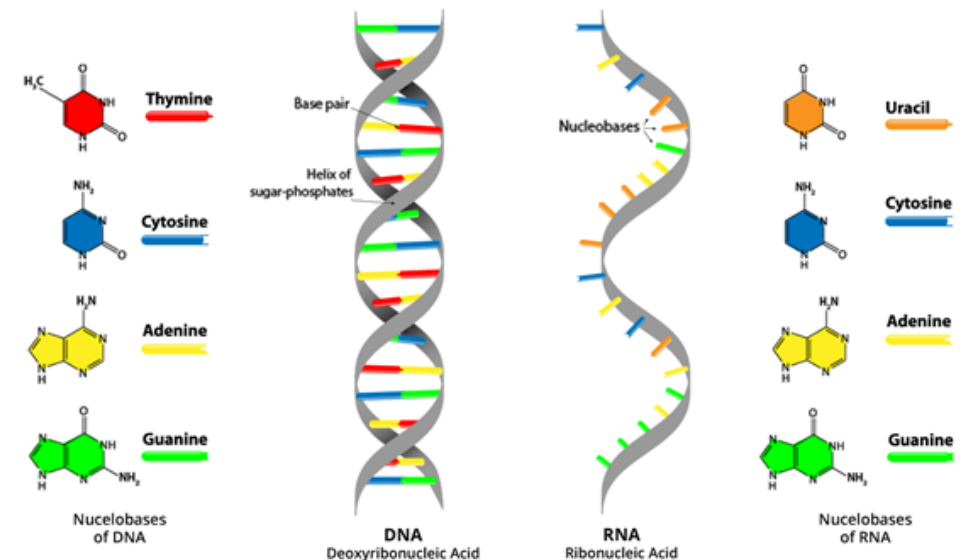
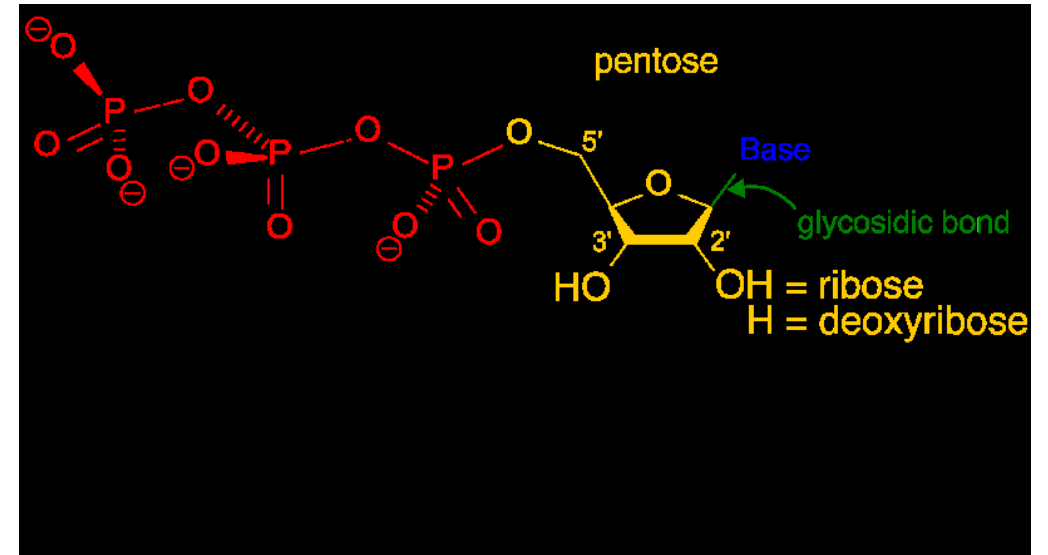
# DNA vs. RNA

- 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**

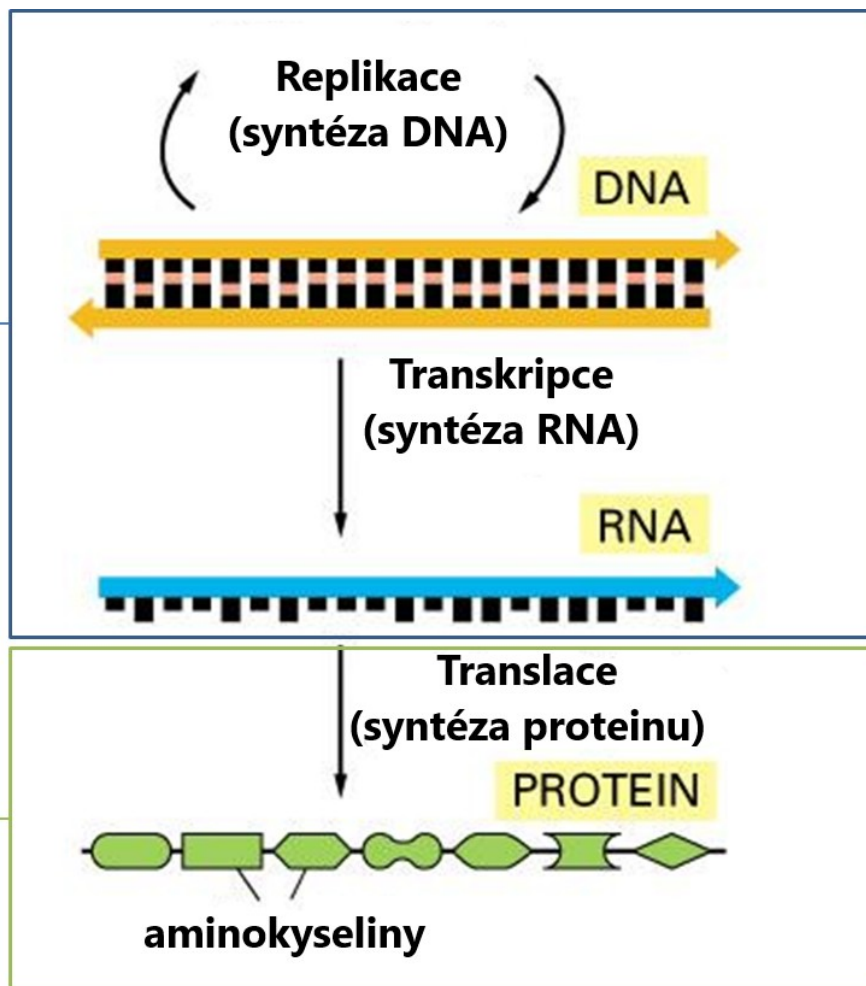
- jednovláknová
- Polynukleotidový řetězec
  - Dusíkatá báze ( U, A, C, G) spojená vodíkovými můstky
  - Zbytek kyseliny fosforečné
  - Cukerná složka – ribóza
- Typy – mRNA, tRNA, rRNA



# Ústřední dogma molekulární biologie



Jádro



Cytoplazma - ribozomy

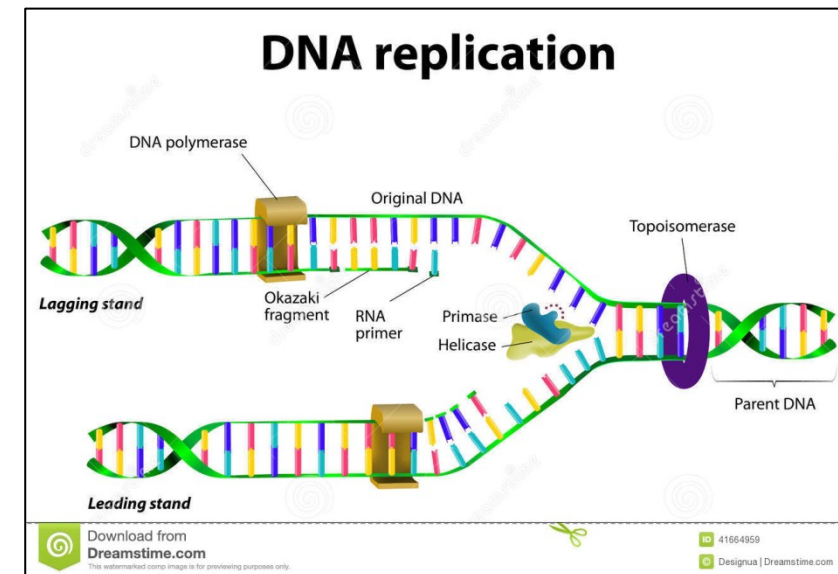
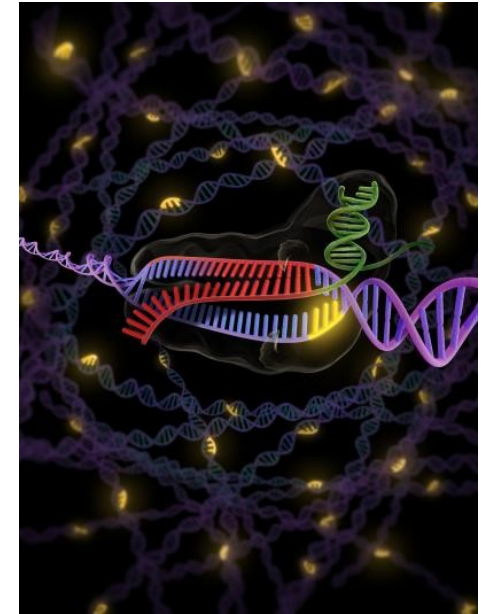
aminokyseliny

PROTEIN

# Replikace DNA

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

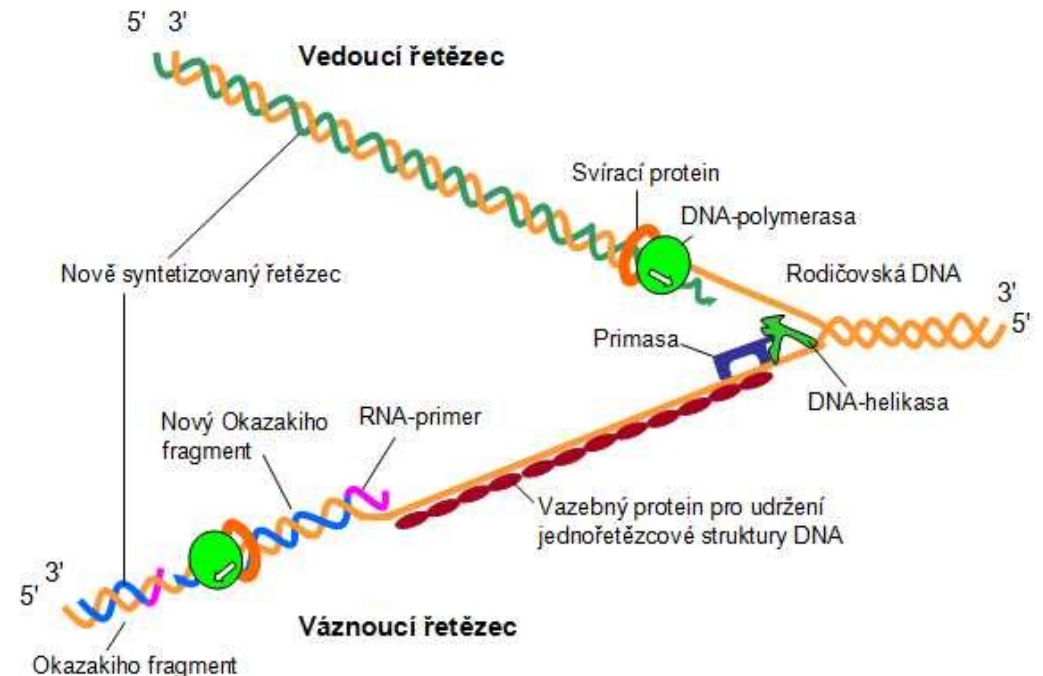
- S-fáze buněčného cyklu
- semikonzervativní proces – 1 nové + 1 staré vlákno
- Složky potřebné pro replikaci
  - templát – mateřské vlákno
  - primer – krátký oligonukleotid s volným 3'OH koncem
  - enzymy
  - nukleotidy





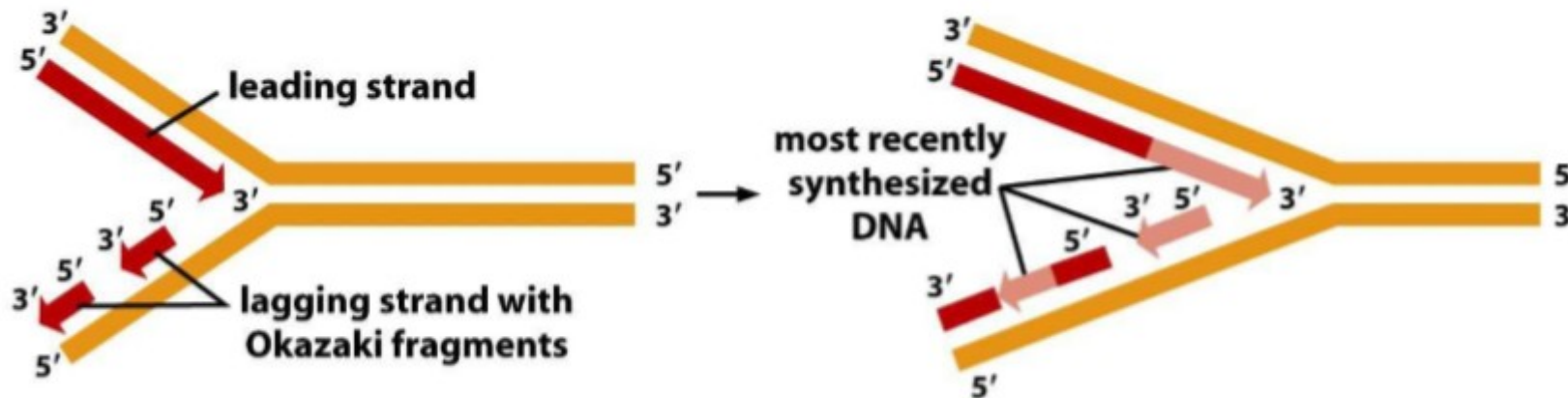
# Replikace DNA

- 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



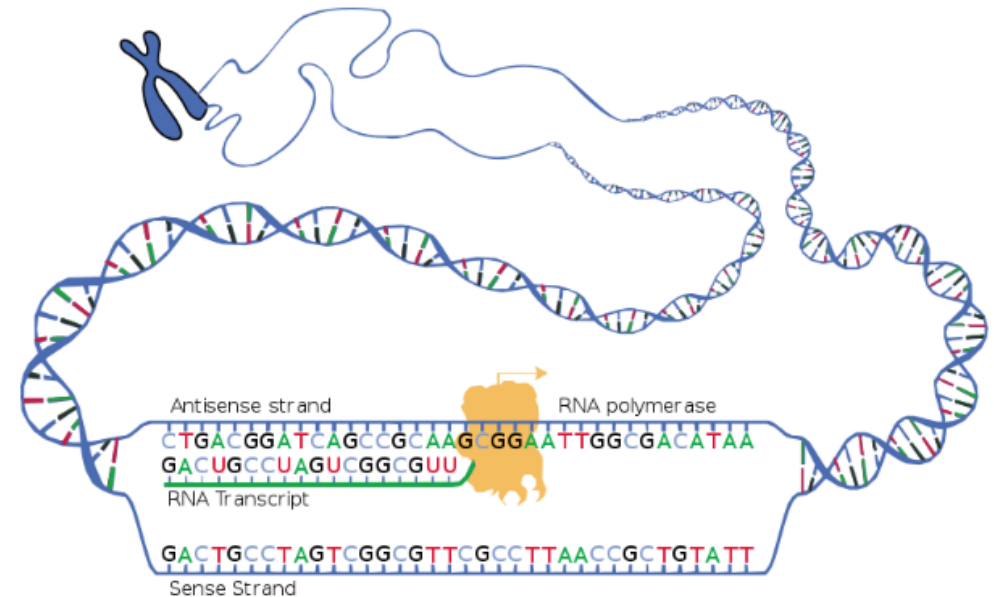
# Replikace DNA

- 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

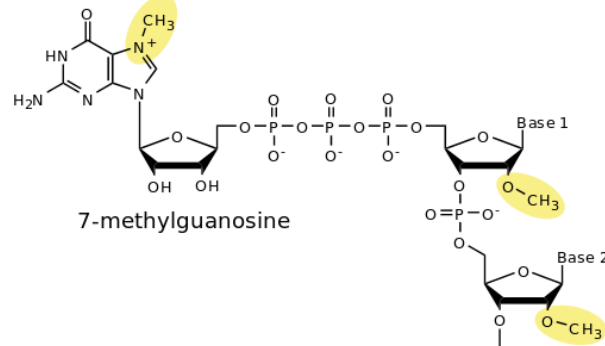
- **přepis** informace v podobě sekvence DNA do sekvence RNA
- jádro buňky
- **templát** - vlákno DNA
- Transkripty se z templátu uvolňují jako jednořetězce
- **DNA-dependentní RNA polymeráza**
  - 3 typy (strukturně podobné, přepisují různé typy genů)
    - RNA pol. I (geny kódující rRNA)
    - RNA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



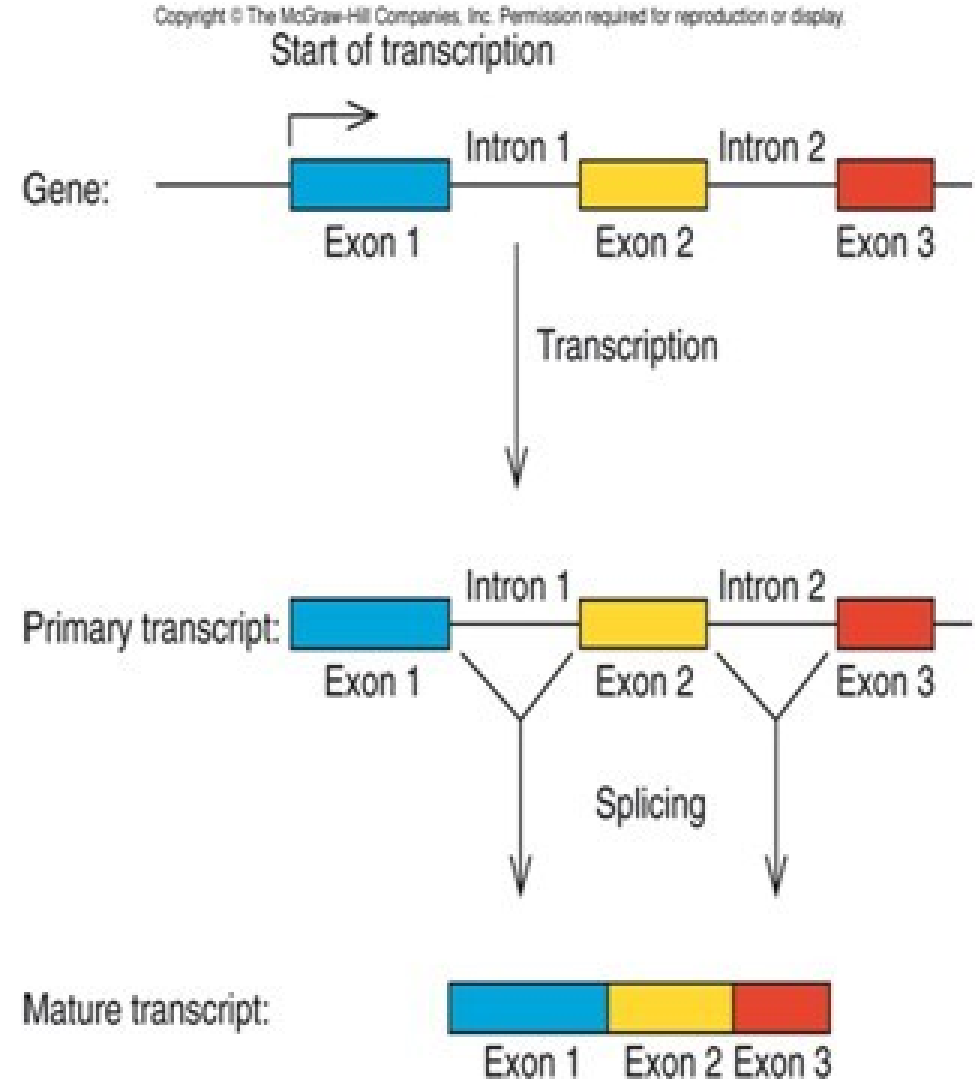
# Posttranskripční modifikace

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

Obrázek 3 - Struktura tzv. RNA čepičky

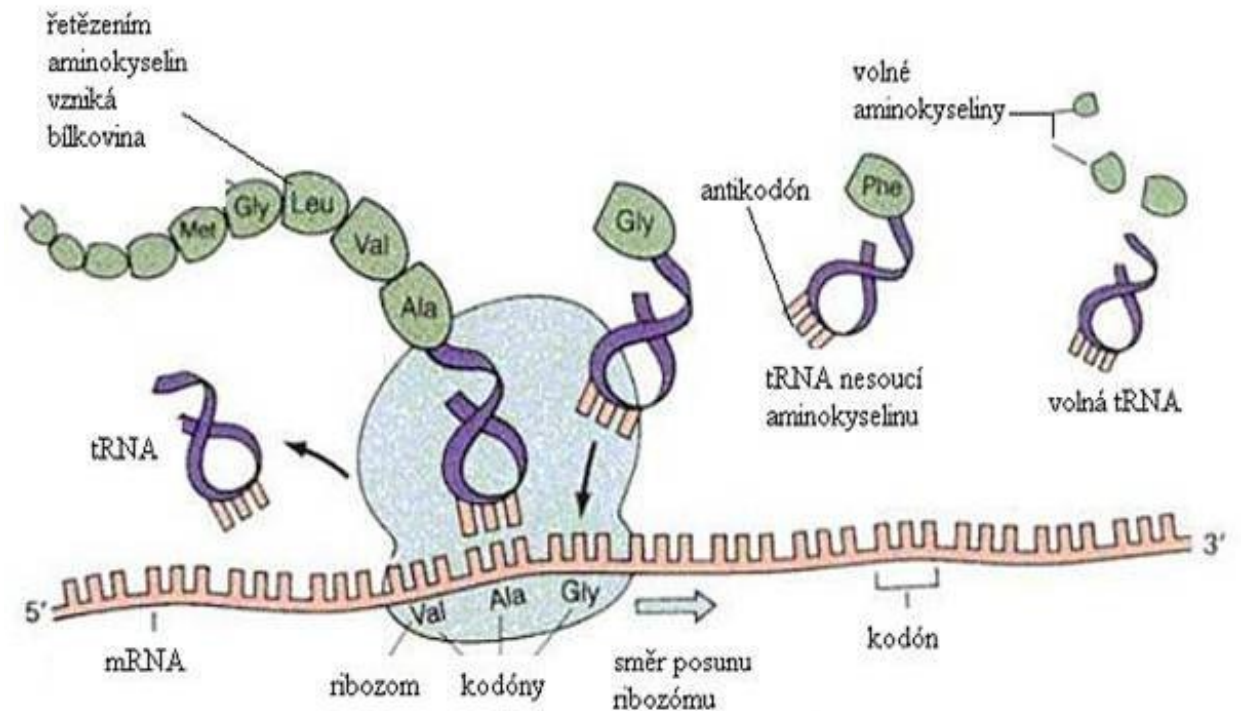


- Připojení **polyadenylačního řetězce** na 3' konec
- **Sestřih** (splicing) RNA – vystřížení intronů za vzniku zralé mRNA



# 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, ....



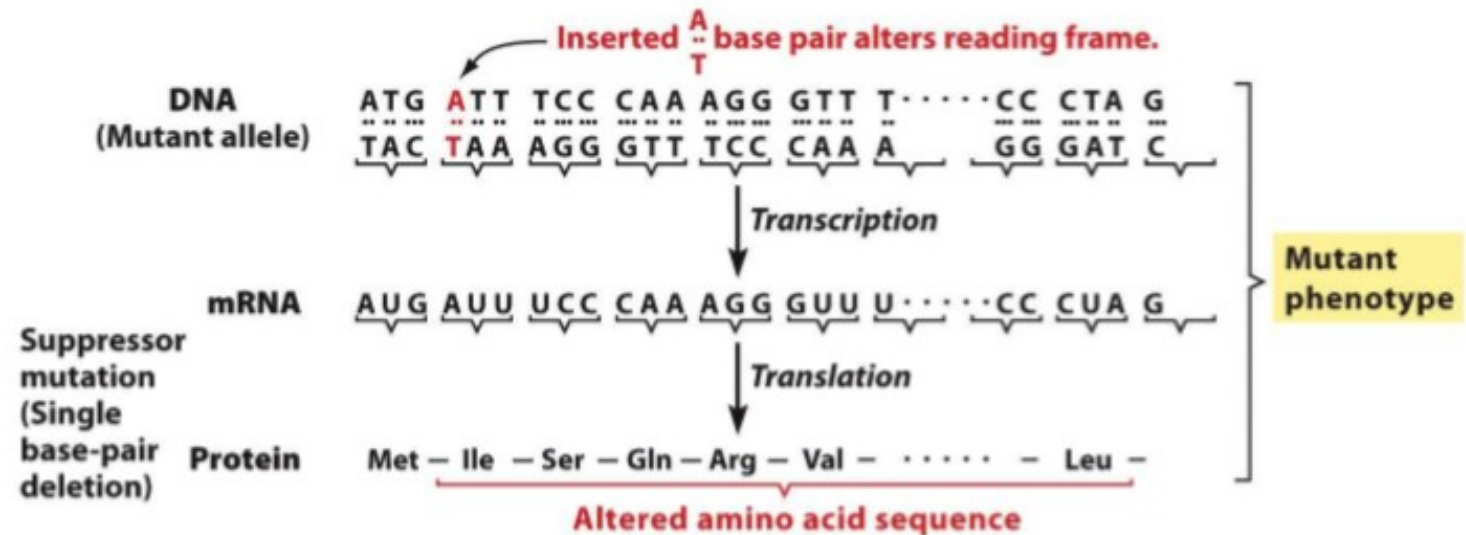
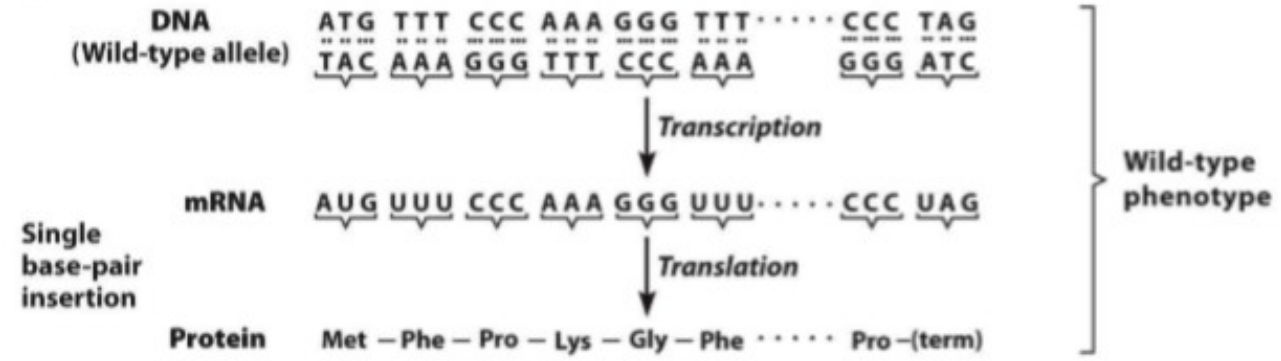
# Genetický kód

- **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 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

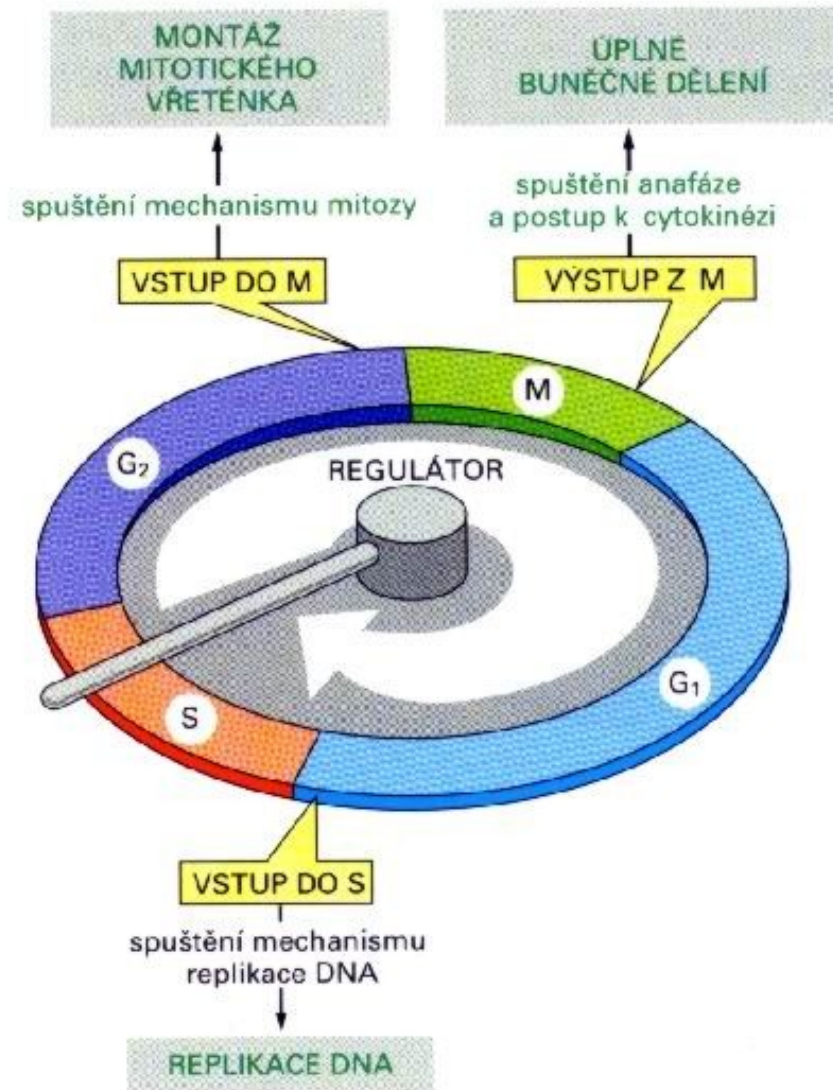
# Genetický kód – změna čtecího rámce

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**

- **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

## Interfáze – G1, G2, S (90%)

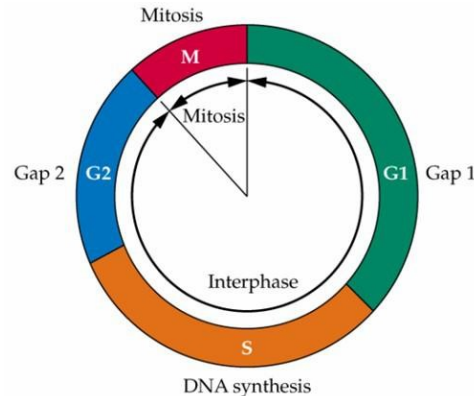
- **příprava** na buněčné dělení, vnější jaderná membrána je spojená s ER
- **nepříznivé podmínky**
  - setrvání v G1/vstup do G0; buňky nerostou, mohou tak setrvat i několik měsíců/let

### G2-fáze

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

### S-fáze

- replikace DNA
- syntéza proteinů asociovaných s DNA



## M fáze (mitotická)

- mitóza x meióza
- jaderné dělení, kondenzace chromozomů – až 10 000x
- karyokineze a cytokineze
- klesá syntéza RNA a proteinů

### 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

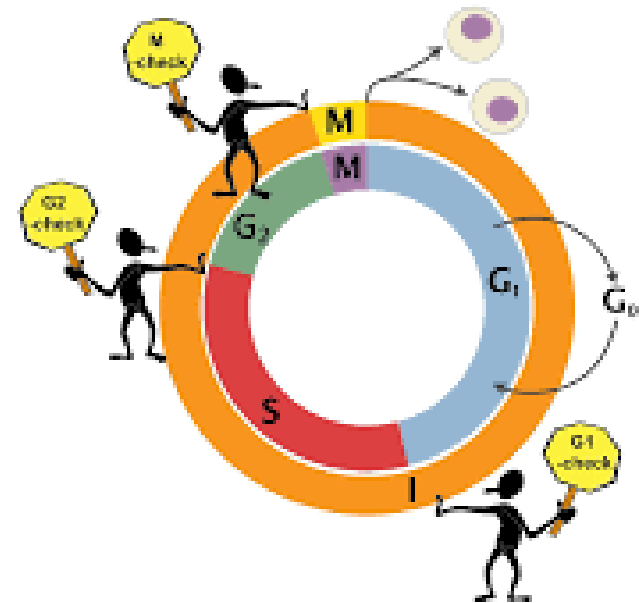
### G1-fáze

- 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

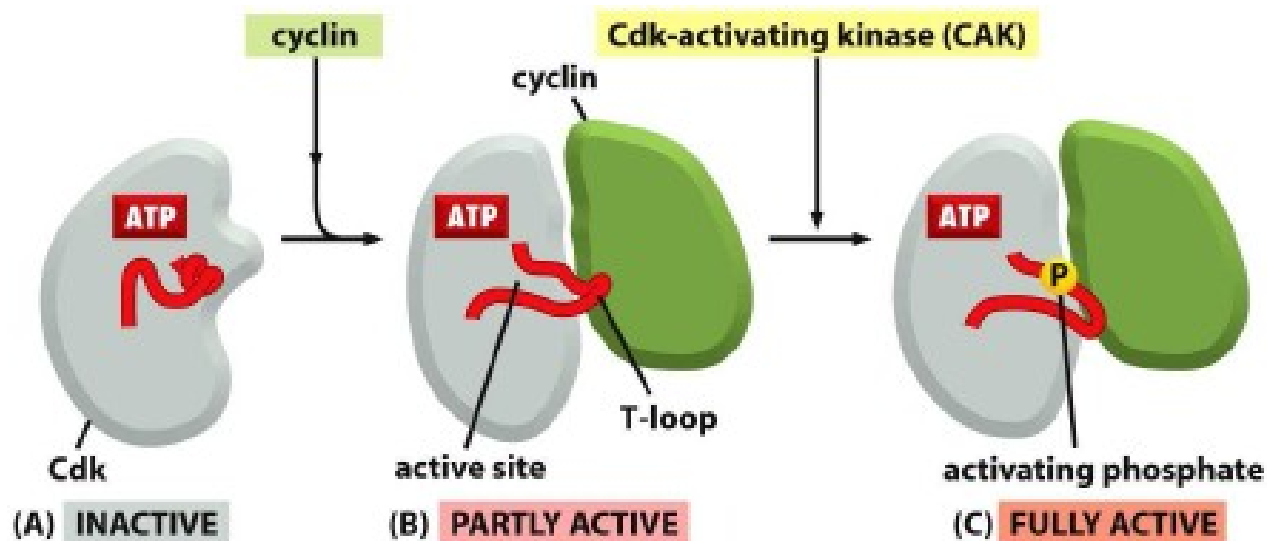
- kladeny **vysoké nároky na přesnost**
  - bezchybná replikace
  - správné řazení fází
    - mitóza před dokončením replikace -> ztráta genetické informace min. u jedné buňky
    - dvojnásobná replikace před mitózou -> zvýšený počet kopií genů na příslušné části chromozomu -> nerovnováha v genové expresi,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

→ **kontrolní body**



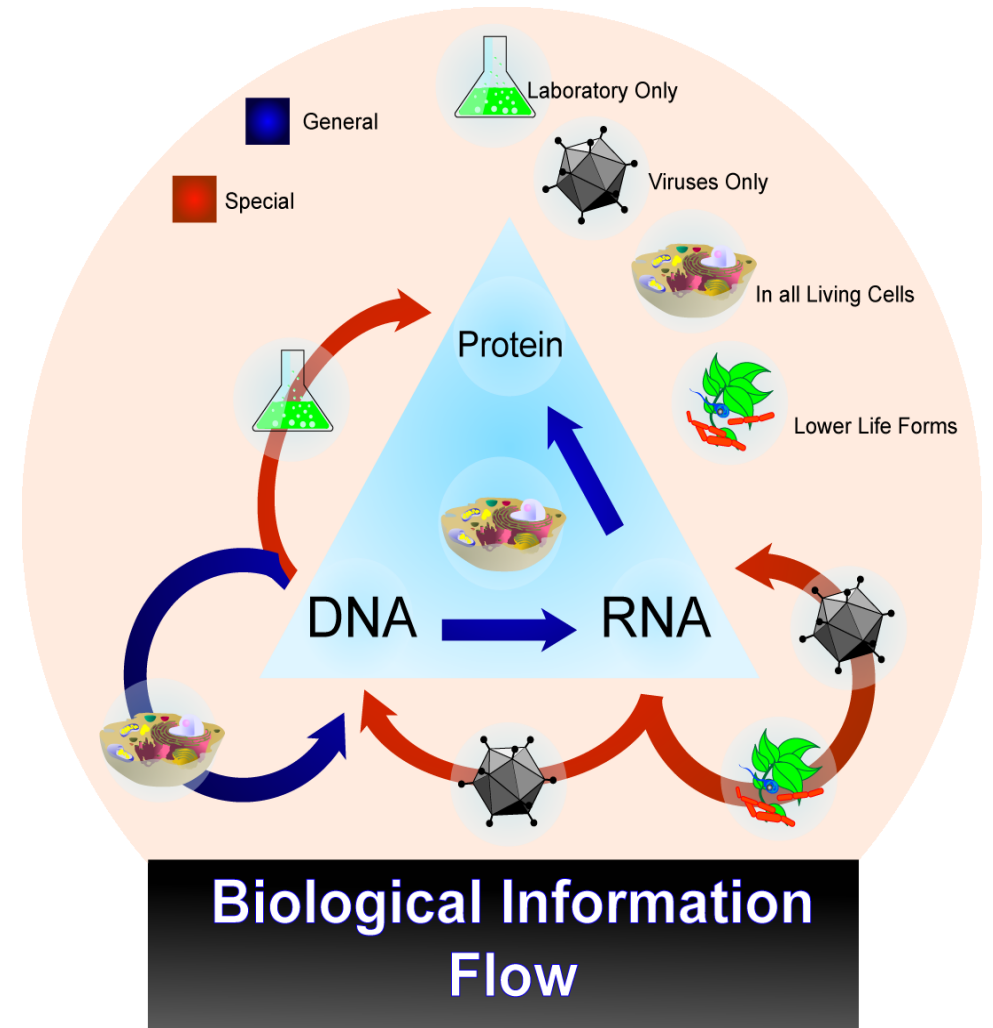
# Buněčný cyklus

- 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



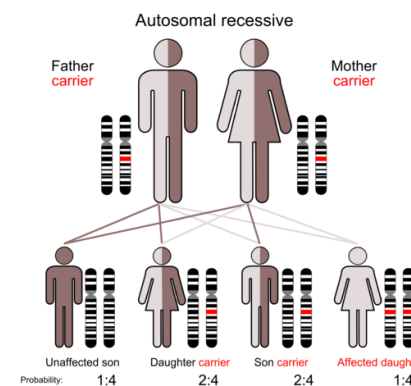
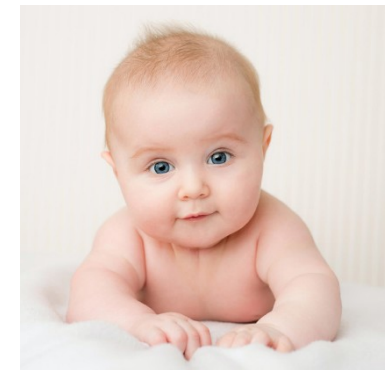
# Metody molekulární biologie

- DNA
- RNA
- PROTEIN



# DNA diagnostika

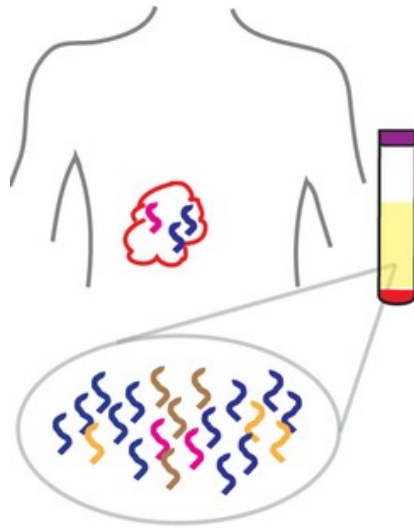
- **Detekce přítomnosti nukleové kyseliny specifické sekvence**
  - Identifikace živočišného druhu
  - Paternita
  - Identifikace jedince - forenzní účely
  - **Profil DNA – SNPs**
- **Analýza struktury (sekvence) nukleové kyseliny**
- **Stanovení genotypu**
  - Detekce klinicky významných mutací a polymorfismů
  - 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**



# Biologický materiál

- Biologický materiál je vše, co bylo či je součástí nebo produktem živého organismu
  - sušená bylinná čajová směs
  - ohryzek od jablka
  - dubové prkno
  - kočičí trus/srst
  - zkumavka s virem SARS-CoV-2
  - tělní tekutiny – moč, krev, plazma, sérum, sliny, ejakulát, hlen
  - tkáně, buňky





Práce s biologickým materiálem  
 PLNÁ KREV - PLAZMA, SÉRUM ,SLINY, BUŇKY, TKÁNĚ, TĚLNÍ TEKUTINY

Izolace DNA, RNA, PROTEINY

Detekce a Kvantifikace

## DNA

### Detekce polymorfismu a mutace

1. PCR (amplifikace konkrétního fragmentu)- RFLP (naštěpení spec. restrikčními enzymy) – detekce na ELFO
2. Real-Time PCR
3. Sekvence

### Klonování v plasmidech

### Zásah do genové exprese

## Epigenenom

metylace DNA  
 histonové modifikace

## RNA - mRNA

### Analýza genové exprese

Nothern Blott  
 Real-Time PCR

### Analýza transkriptomu

## MicroRNA

## PROTEIN

### Analýza proteinů

Imunohistochemické metody

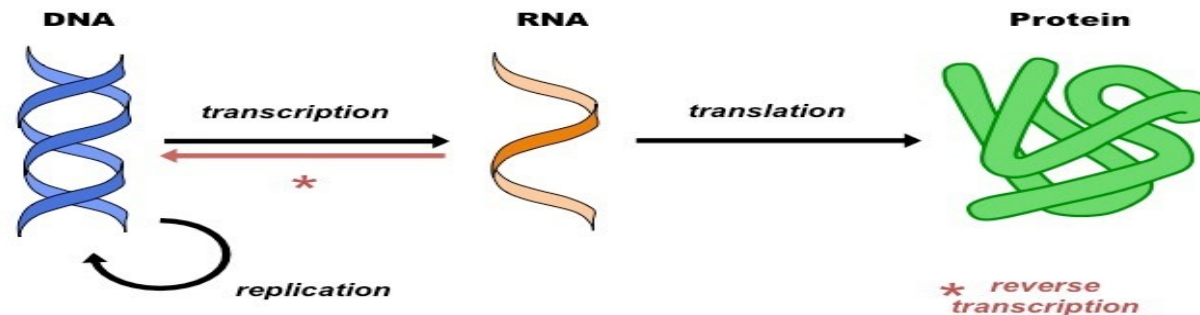
1. Western Blott
2. ELISA

### Analýza proteomu

MS

## Analýza buněk

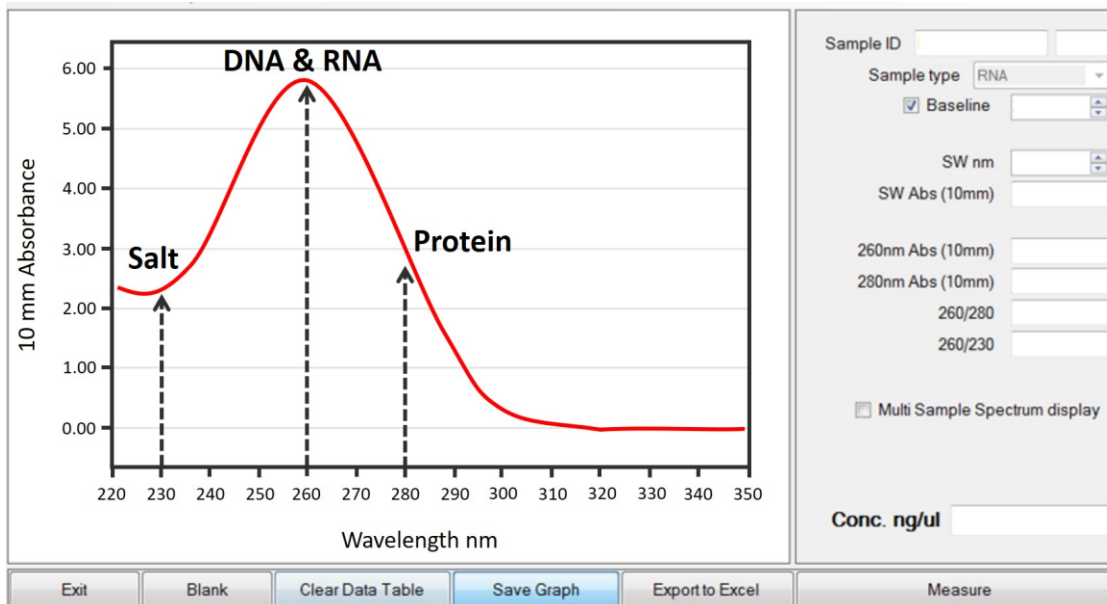
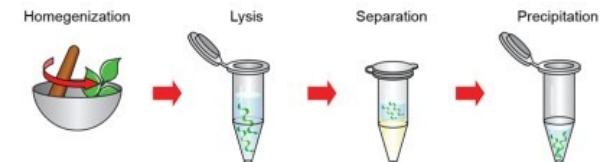
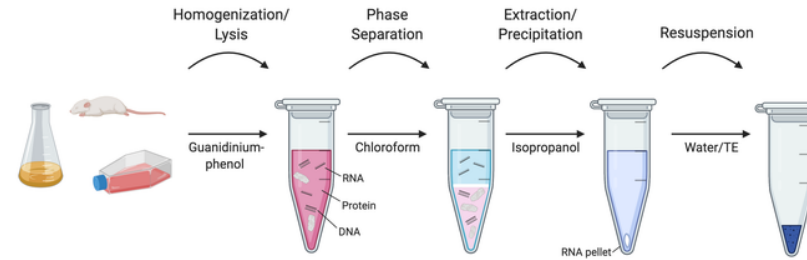
Průtoková flow-cytometrie





# Izolace nukleových kyselin

- V nativním stavu z přirozeného materiálu – v **dostatečném množství a požadované čistotě**.
- NK je potřeba zbavit všech všech látek, které se po lyzi buněk stávají součástí hrubého lyzátu a jejichž přítomnost by bránila účinnému specifickému působení enzymů používaných k dalším analýzám
- Izolace genomové DNA
- Izolace RNA – důraz na ochranu před degradací
- **Stanovení koncentrace a čistoty DNA/RNA – Spektrofotometrie**
- **Kontrola kvality a integrity - ELFO**





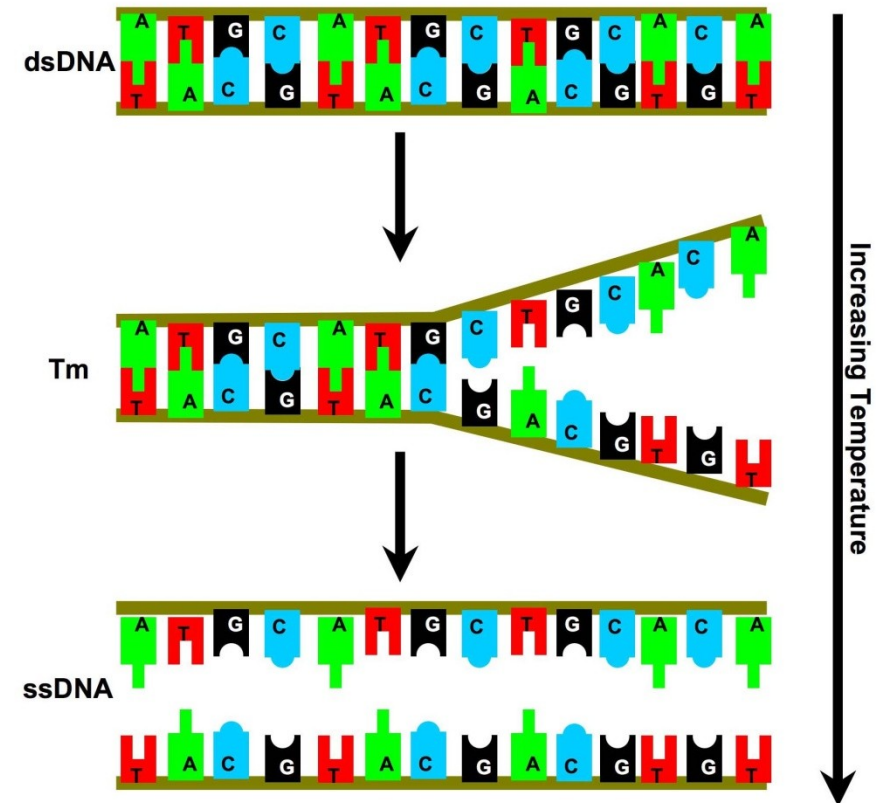
# PCR – Polymerase chain reaction

- Amplifikace vybraného úseku **DNA**
- Mnohonásobná in vitro replikace ve zkumavce - řetězová reakce vychází z DNA replikace
- Kary Mullis, 1983
- **DNA řetězce duplexu může být denaturována a znovu spojena**
- DNA replikace **in vivo** vyžaduje několik enzymů
  - separace řetězců
  - syntéza krátkých RNA primerů
  - syntéza dvou nových DNA helixů
- DNA replikace **in vitro** vyžaduje pouze jeden enzym  
(1957 Arthur Kornberg dokázal existenci DNA Polymerázy)

**AŽ S OBJEVEM A POUŽITÍM TERMOSTABILNÍ POLYMERÁZY**

**(TERMOFILNÍ BAKTERIE) ZÍSKALA PCR NA VÝZNAMU**

**FUNKCE OSTATNÍCH PROTEINŮ JE in vitro NAHRAZENA ZMĚNOU TEPLOT !**



**Cíl** – získání požadované a specifické sekvence genomové DNA

**Princip** – mnohonásobná replikace

- cca 30 cyklů
- závislost na teplotě reakční směsi
- množství namnožené DNA roste exponenciální řadou ( $2^n$ )

### komponenty PCR:

- **templátová DNA**

- **dNTP**

- **pufr** (pH=8)

- **Mg<sup>2+</sup> ionty** (aktivita a přesnost polymerázy)

- **Primer** - krátké specifické úseky DNA, oligonukleotid 20–25 pb, ohraničení oblasti amplifikace DNA

- **DNA polymeráza**

termostabilní (odolává teplotám až 98 °C)

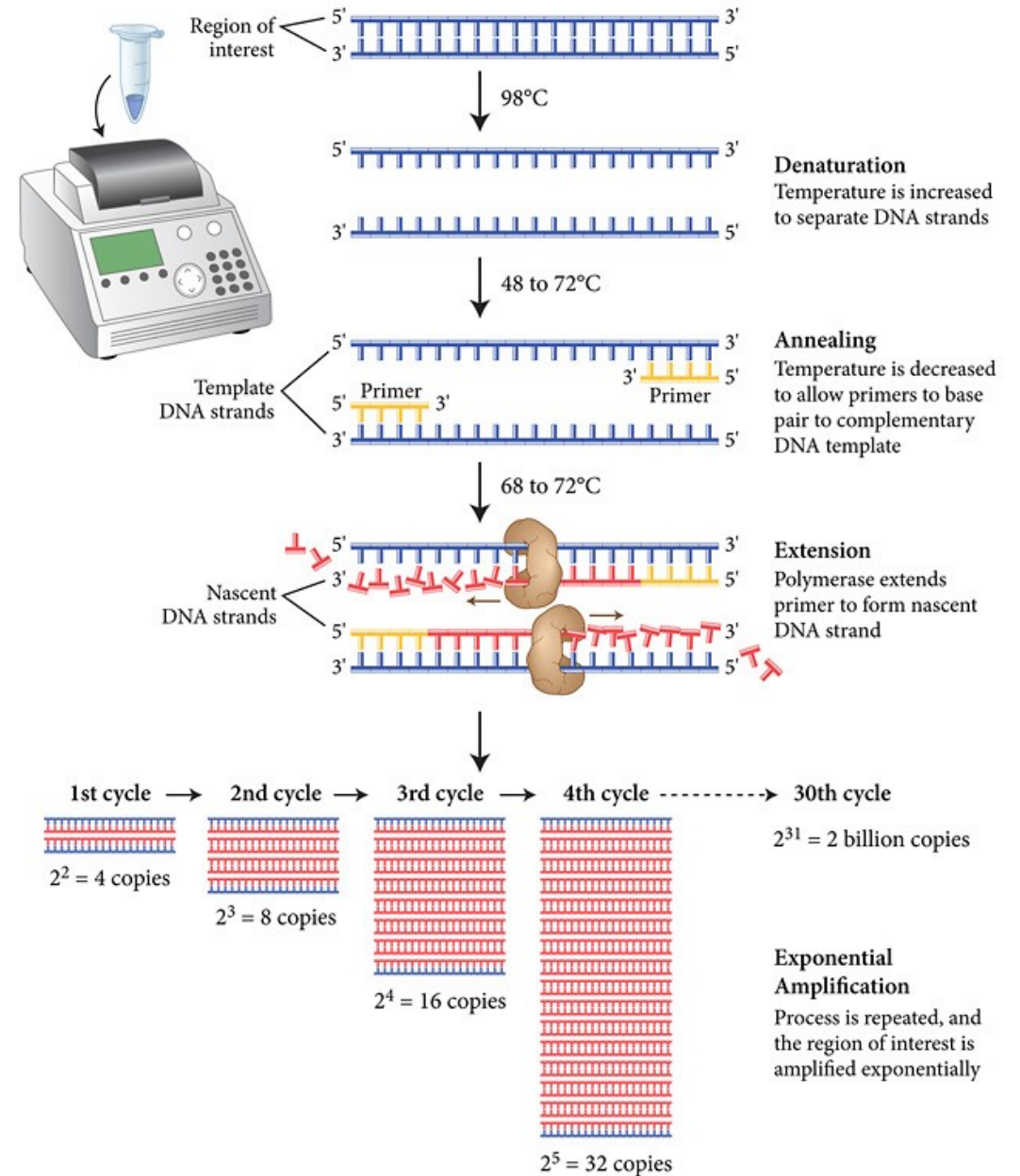
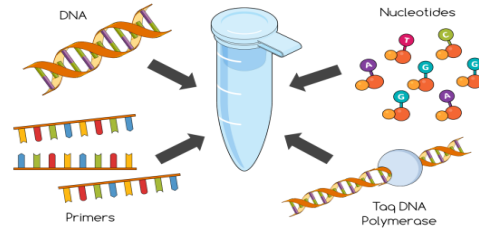
Taq (*Thermus aquaticus*), Tth (*Thermus thermophilus*)

- **teplota**

### opakování cyklů:

- denaturace (separace dsDNA)
- navázání primerů
- elongace primerů
- syntéza nového vlákna DNA

**pomocí změn teploty!**



# Praktická část cvičení

# CO?

## Stanovení SNP +3953C/T (rs1143634) v genu pro interleukin IL-1beta u pacientů s chronickou periodontitidou

[Display Settings:](#)  Abstract

[Send to:](#)

[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).

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.

PMID: 10929872 [PubMed - indexed for MEDLINE]

# PROČ? cytokiny X onemocnění parodontu

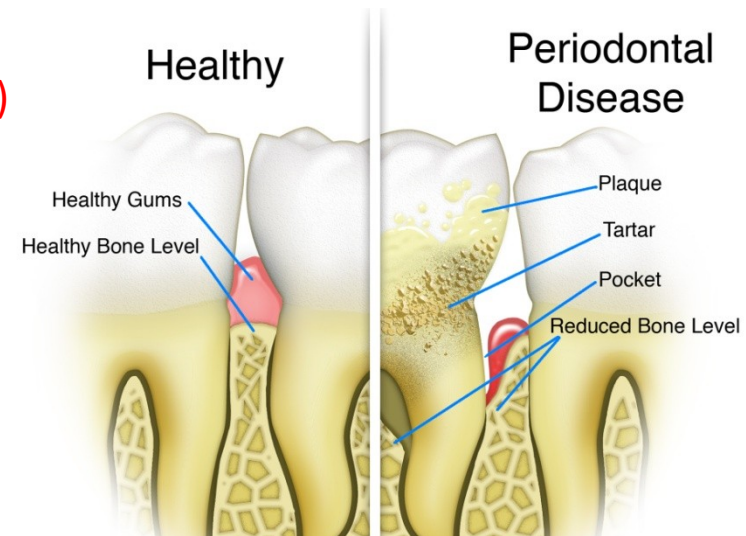
## Zánětlivé onemocnění parodontu

- 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)



[Quintessence Int. 2010 Jun;41\(6\):517-25.](#)

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

[Grigoriadou ME<sup>1</sup>](#), [Koutayas 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.

# JAK? METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

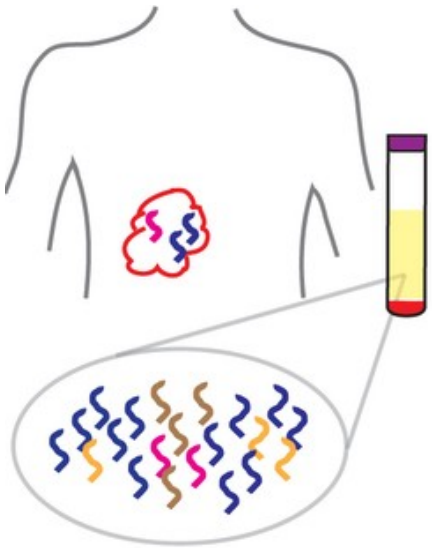
Práce z biologickým materiálem (PLNÁ KREV, PLAZMA, SÉRUM)



Izolace **DNA**



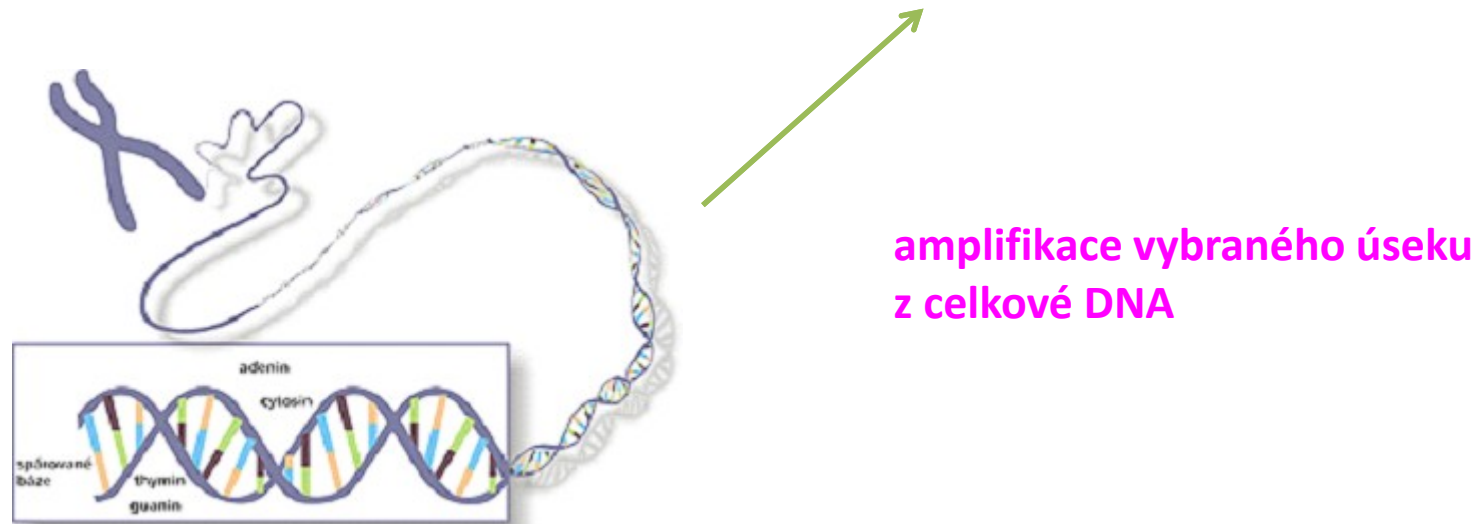
1. Amplifikace DNA úseku - PCR
2. Detekce polymorfního místa - Restrikční analýza
3. Vizualizace - Elektroforéza





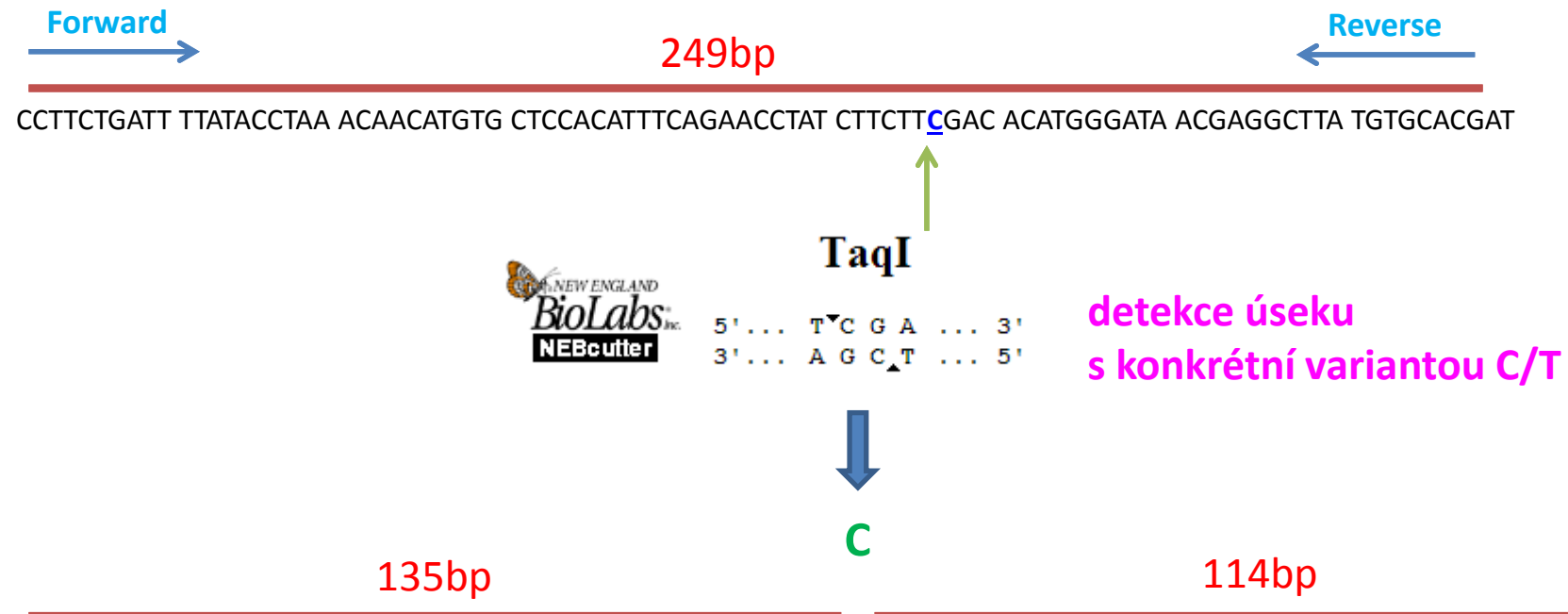
# JAK?

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



# JAK?

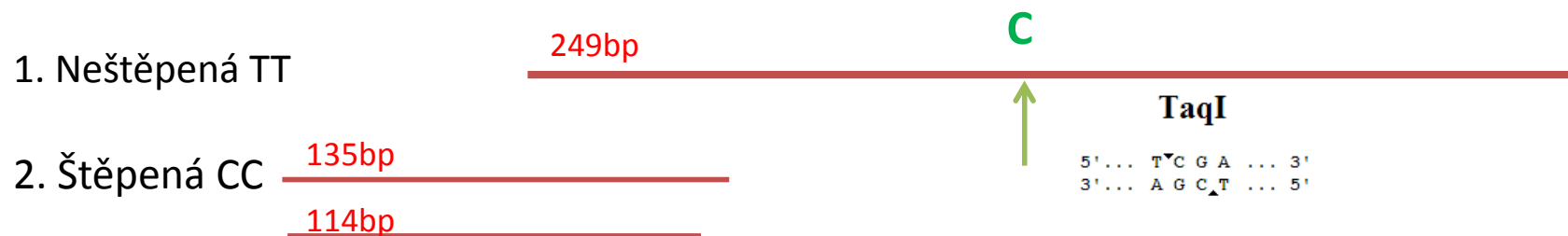
## 1. RFLP IL-1B +3953C/T (rs1143634) pomocí restriční endonukleázy TaqI





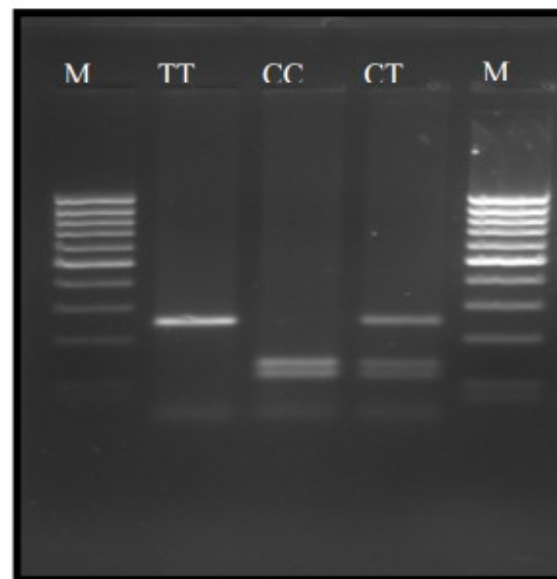
# JAK?

## 1. ELFO restrikčních fragmentů po štěpení TaqI (Agarózový gel)



3. Heterozygot CT – 3 pruhy

249 bp →



vizualizace DNA fragmentů  
po restrikční analýze

# PCR

## 1. Praktické provedení PCR

Objem v mikrozkušavce: 25 $\mu$ L

Složení (1 vzorek):

- templátová DNA (2 $\mu$ L)
- 2 primery (1.25  $\mu$ L)
- MgCl<sub>2</sub> 25mM (4  $\mu$ L)
- dNTP mix (0.5  $\mu$ L)
- Taq polymeráza 1U (1  $\mu$ L)
- pufr (2.5  $\mu$ L)
- PCR H<sub>2</sub>O (12.5  $\mu$ L)

MASTER MIX

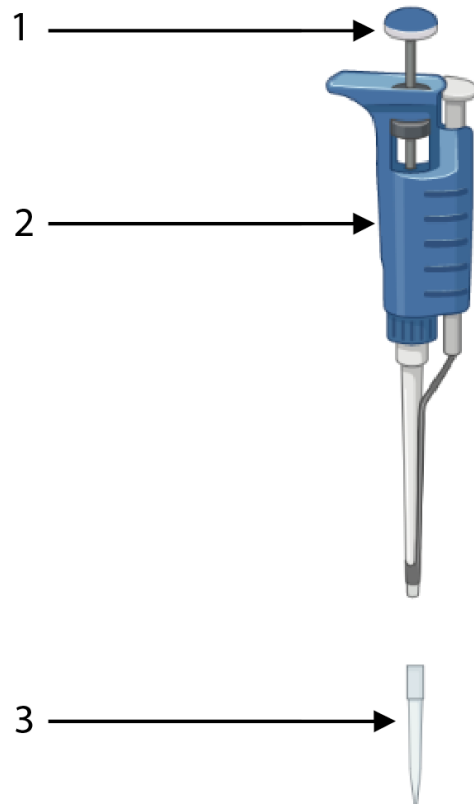


1 kapka minerálního oleje



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

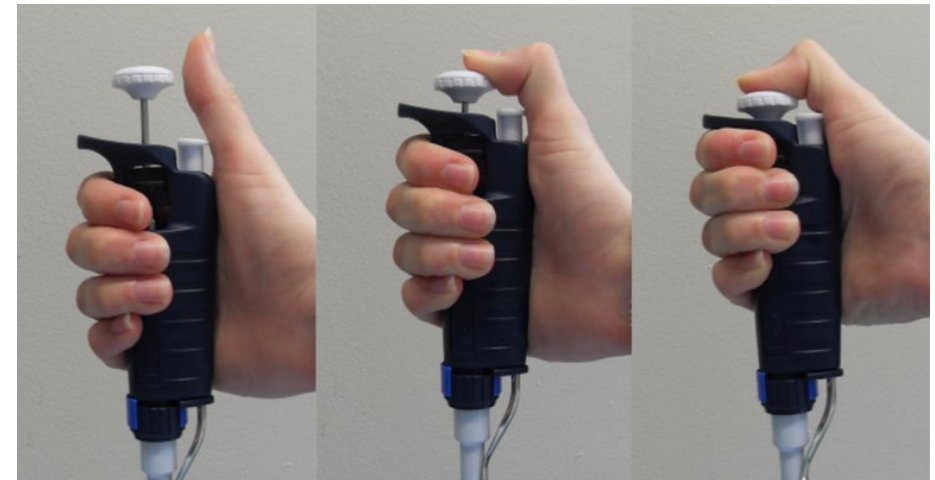
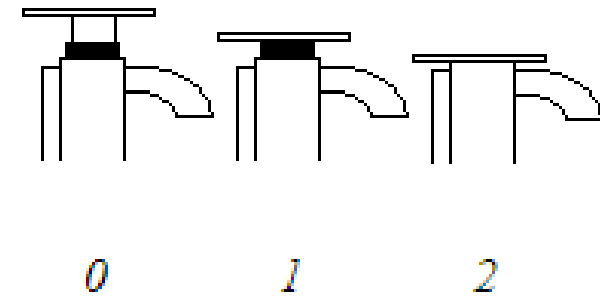
- Pipetu držím vždy **vertikálně** (špičkou dolů).
- Pipetu držím v dlani zavěšenou za ukazováček a ovládám ji palcem.
- **Vyberu optimální rozsah objemu!!! Nikdy nepřekračuju rozsah pipety nahoru ani dolů!!!**
- Před pipetováním musíme na pipetu nasadit příslušnou **špičku** (dle objemového rozsahu 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

## Postup:

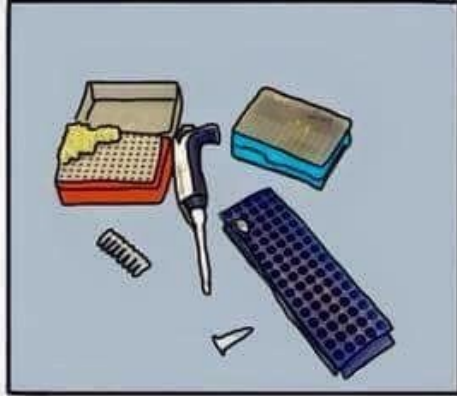
- Na pipetě nastavím požadovaný objem. Vodorovná čára na displeji značí desetinnou čárku.
- Nasadím špičku na pipetu (důkladně utěsním) – **ne rukama!**
- Pipetu uchopím tak, abych si o ukazováček podepřel/a držák a palcem tak mohl/a pracovat s dvoupolohovým ovladačem.
- **Nasátí:** ovladač stlačím do polohy „1“ (špička je ve vzduchu), ponořím do roztoku a **pomalou** pustím.
- **Vypuštění:** pipetu ponořím do roztoku, kam chci pipetovanou látku přidat. Vypustím roztok stlačením ovladače do polohy „1“, dokončím stlačením do polohy „2“ a vyjmutím špičky z roztoku (stále v poloze „2“).
- Ovladač pustím, špičku vyhodím.

Obr. 3.2.2: Polohy ovladače:



# PCR Protocol

Get the reagents



Prepare the mix



Set up conditions



Analyze the gel



Negative result



Cry

