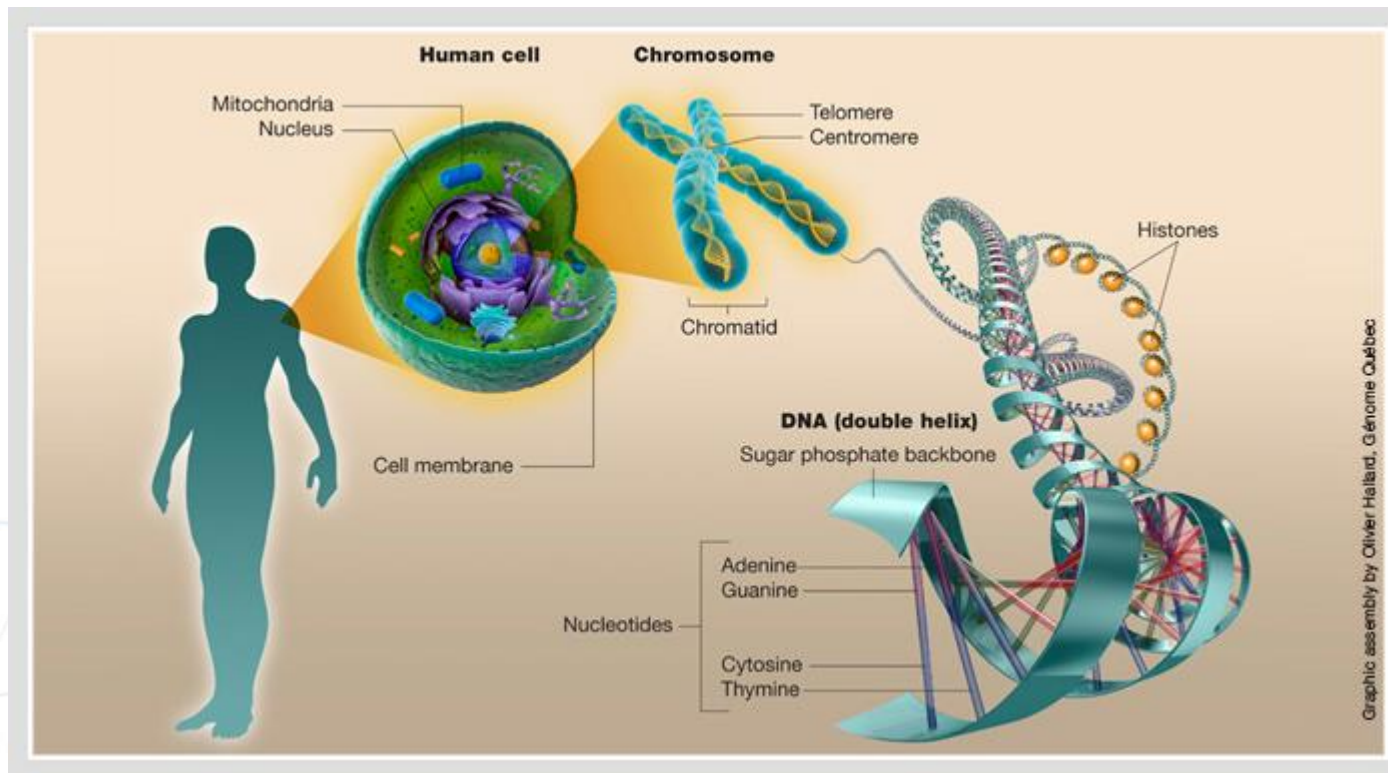


DNA analýza  
při diagnostice  
mendelovsky dědičných (monogenních)  
onemocnění

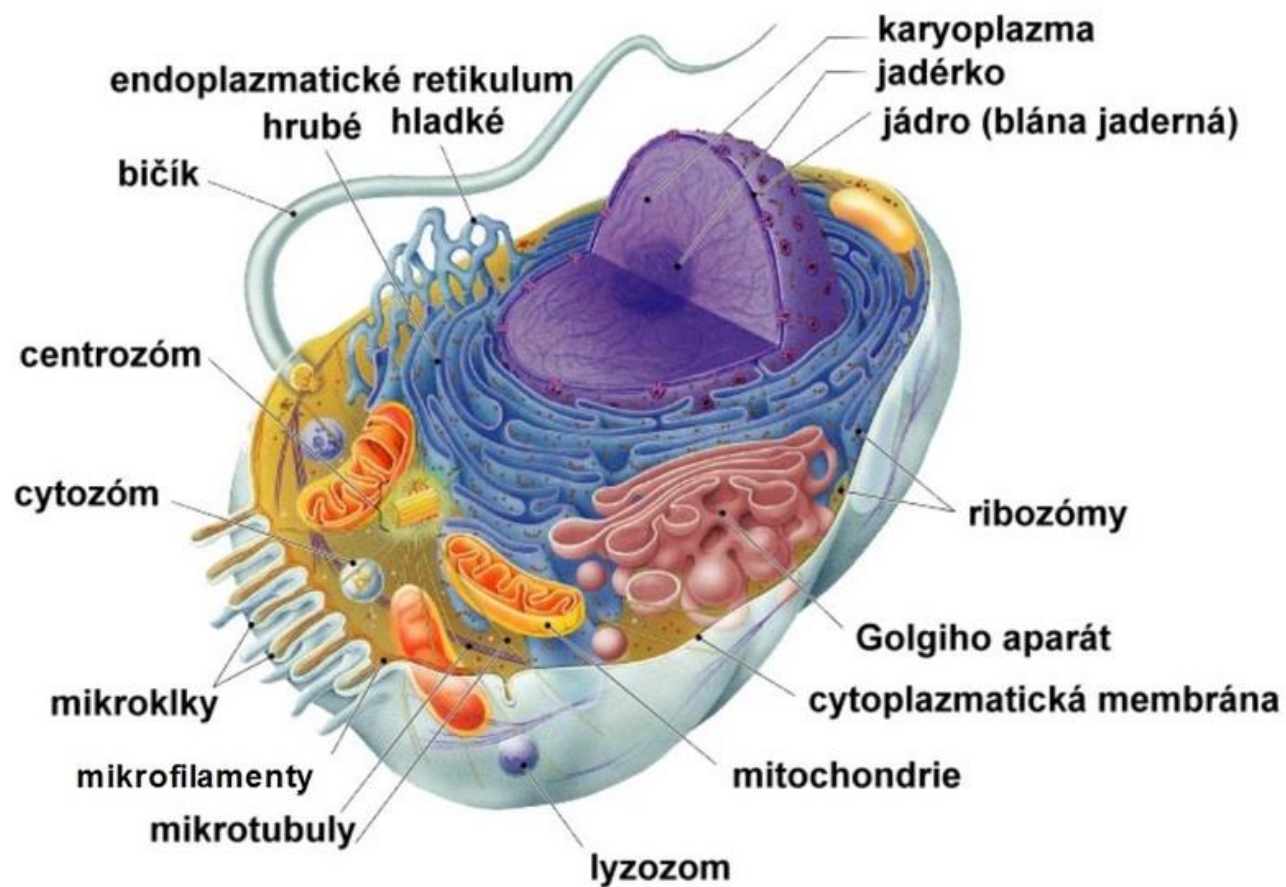
Iveta Valášková



# Člověk



# Buňka



Genetická informace uložena v jádře a mitochondriích

# Lidský genom

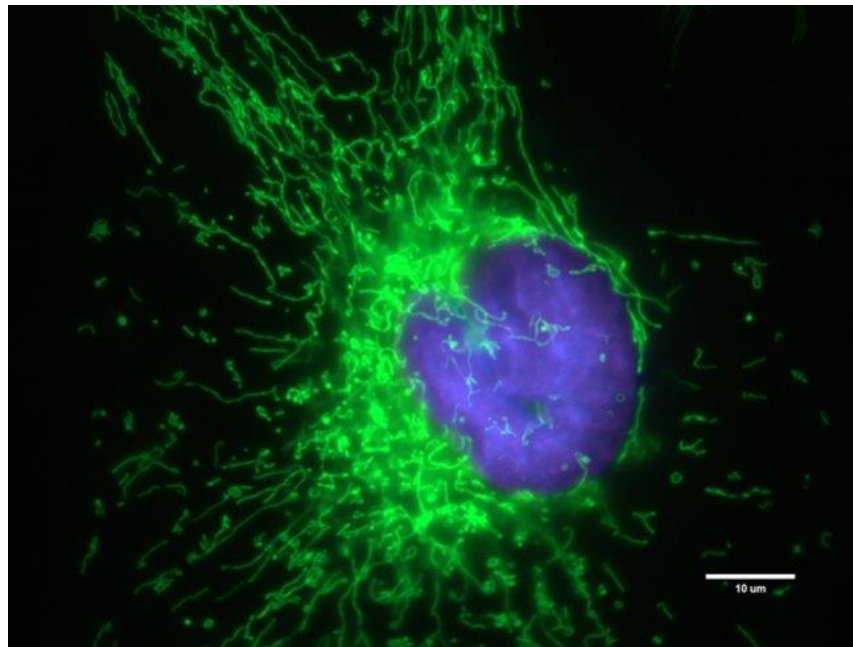
Soubor všech genů daného organismu

Veškerá genetická informace (obsažená v DNA) v lidských buňkách



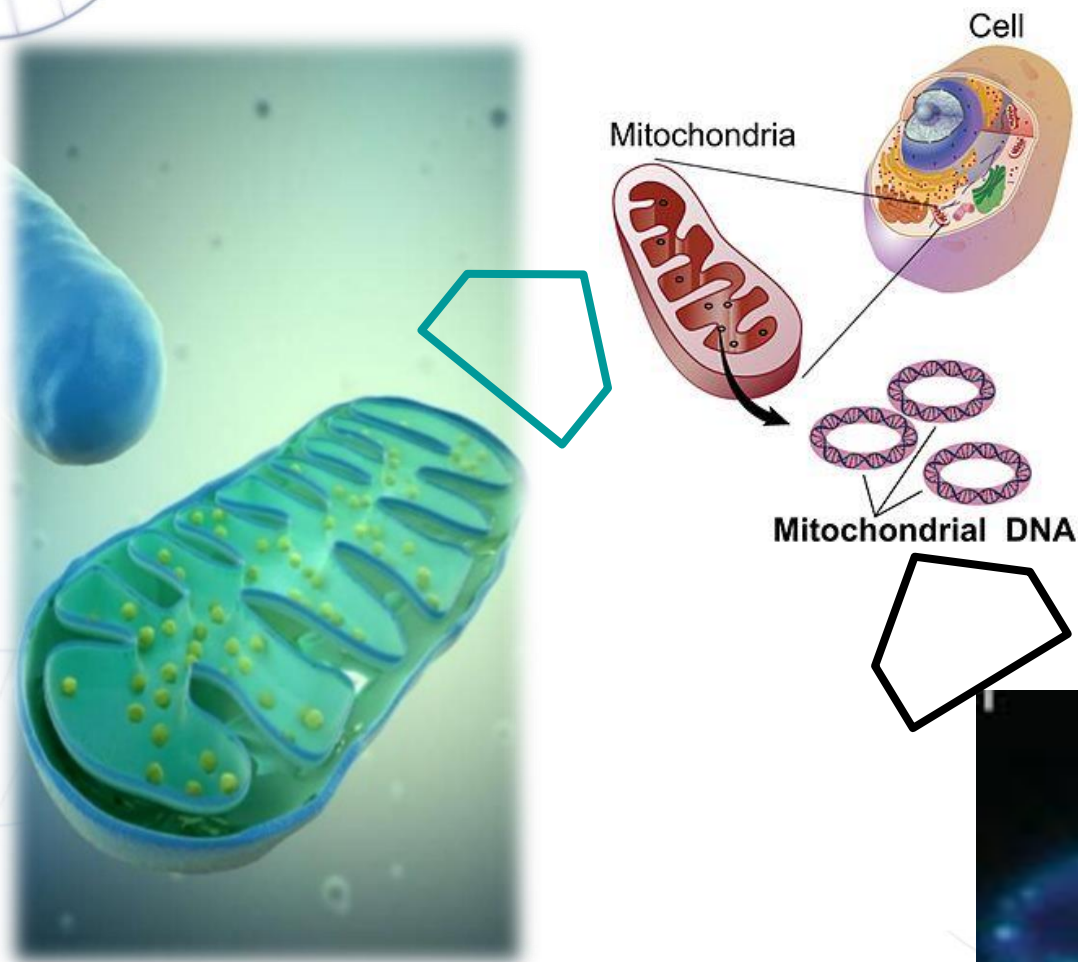
# Lidský genom

- jaderný
- mitochondrialní



Buněčné jádro obklopené mitochondriemi

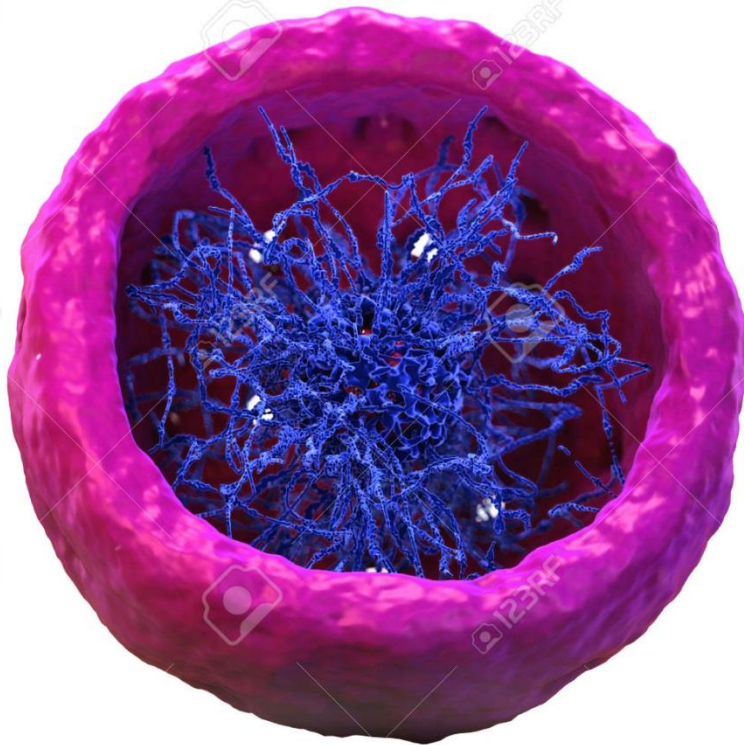
# Mitochondrie



V každé buňce se nachází mnoho mitochondrií,  
Každá obsahuje mitochondriální DNA



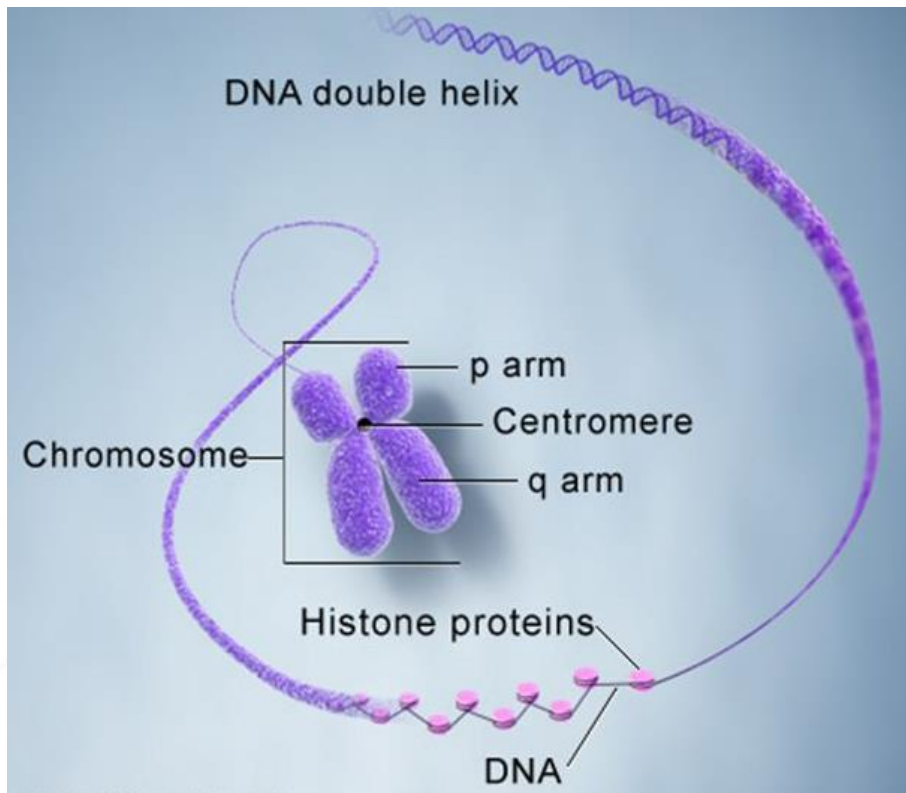
# Jádro



Každá DNA molekula je sbalena do chromosomu

Každý ze 46 chromosomů člověka je tvořen jednou molekulou dvoušroubovicové

# Chromosom



Chromozóm je složen z DNA a histonových bílkovin, které tvoří jakousi kostru, na níž se molekula DNA namotává.

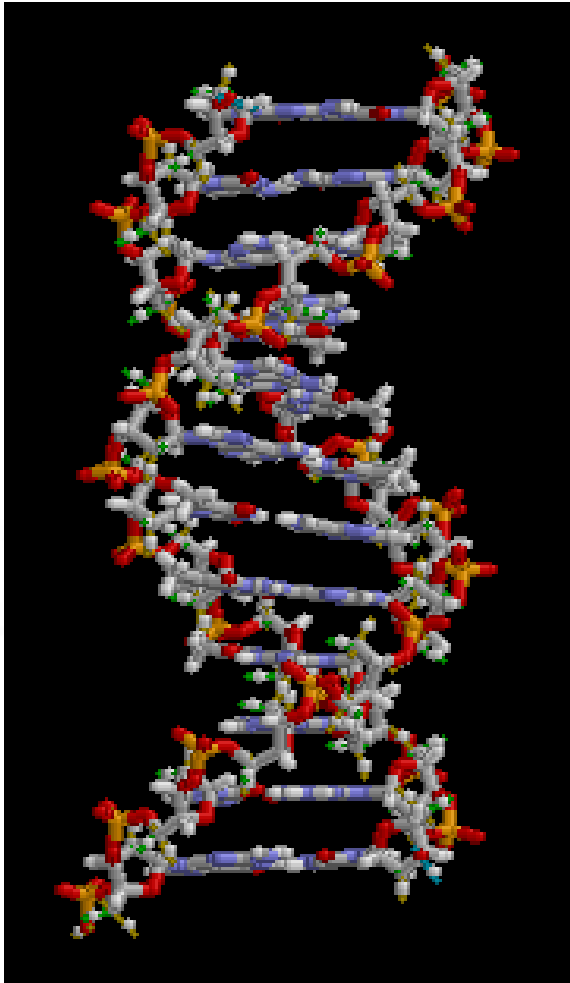
Člověk má v každé buňce dvě sady - 23 párů chromosomů, tj. celkem 46

Pohlavní buňky obsahují jednu sadu chromosomů





# Deoxyribonukleová kyselina DNA

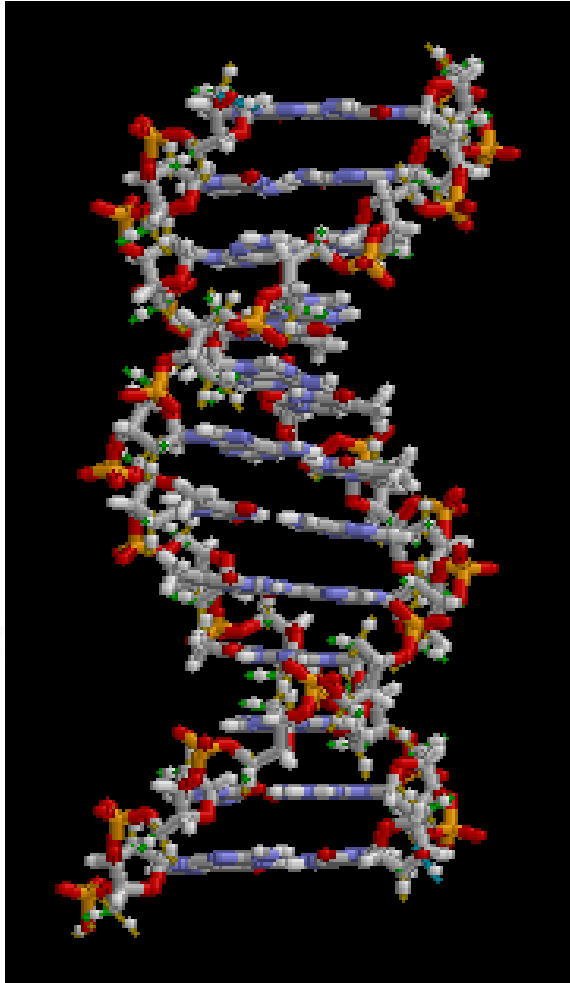


Uvnitř jádra většiny buněk a mitochondrií je svinutá 2 m dlouhá spirála.

- V její části je zakódováno, kdo jsme a jak vypadáme.
- Obsahuje vzorce opakující se v jedinečném, pro každého jedince individuálním počtu.



# Deoxyribonukleová kyselina DNA



je pro život nezbytnou látkou

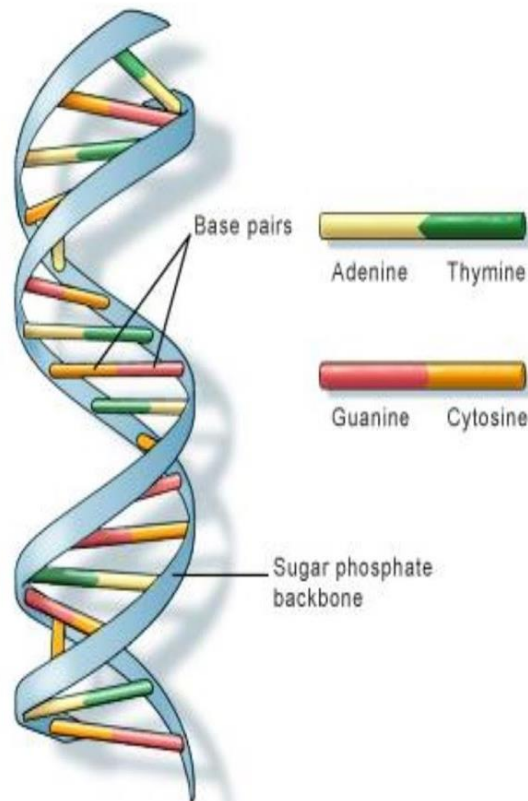
je nositelkou genetické informace všech organismů

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

je to molekulární paměť disponující úžasnou kapacitou



# Struktura DNA



DNA je jako stočený spirálovitý žebřík se třemi miliardy příčí  
Příčle tvoří látky nazývané báze.

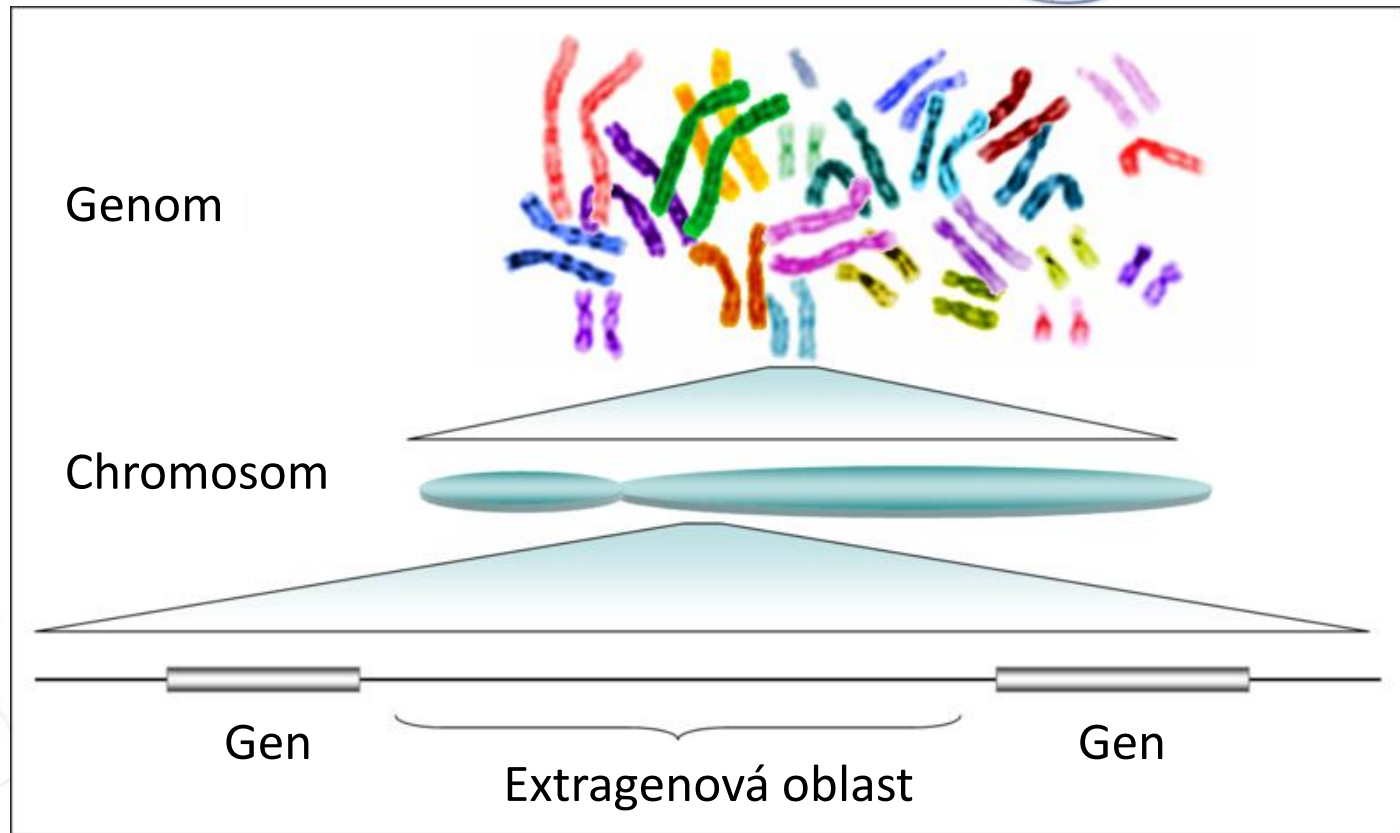
Jsou čtyři druhy bází

[adenin (A), guanin (G), cytosin (C), tymin (T)]

Přesný pořádek se liší u každého jedince kromě identických  
jednovaječných dvojčat.

Lidská DNA obsahuje 6, 4 miliardy bází

# Kódující a nekódující DNA



Oblasti kódující znaky jsou uvnitř genů - tvoří 1,5% lidské DNA

# Gen

Je základní jednotka genetické informace (základní jednotka dědičnosti). Je to určitý úsek DNA (sekvence nukleotidů) na chromosomu

gen se může vyskytovat v různých formách – **alelách**

soubor všech alel v buňce daného jedince označujeme jako **genotyp**

vnější projev genotypů, soubor všech znaků organismu označujeme jako **fenotyp**

soubor všech genů daného organismu nazýváme **genom**

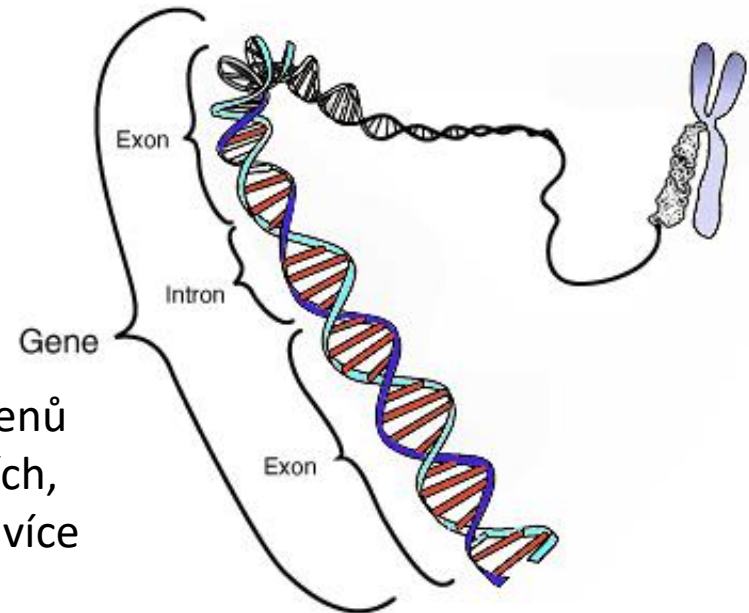
genom člověka je tvořen **jaderným genomem a mimojaderným genomem (mitochondriálním)**

## Monogenní dědičnost

jeden gen může podmiňovat vytvoření jednoho konkrétního znaku

## Polygenní dědičnost

realizace znaku po spolupůsobení většího počtu genů  
častěji je vznik znaku závislý na genových interakcích, tzn., že o konkrétní podobě znaku rozhodují alely více zúčastněných genů



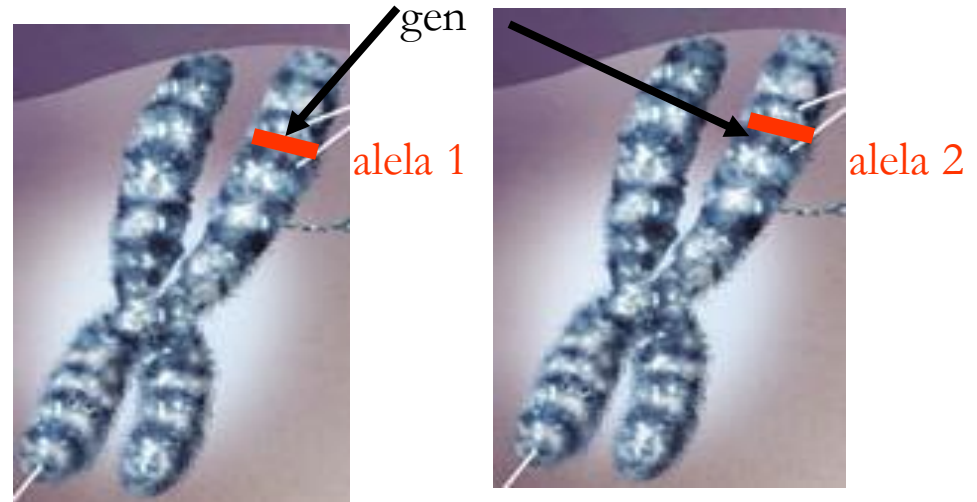
# Alela

Forma genu

Každý gen se vyskytuje  
v různých konkrétních formách  
alelách

**Gen**  
podmiňuje určitý znak

**Alela**  
obsahuje „návod“ k vytvoření  
určité konkrétní  
podoby znaku



## Alela

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

# Homozygot

Jedinci se shodným párem alel příslušného genu

# Heterozygot

Jedinci s odlišnými alami příslušného genu



# Gen

## ☐ Strukturární geny

obsahují informace o primární struktuře proteinů, popř. polypeptidů

➤ geny kódující proteiny se stavební funkcí

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

➤ geny kódující proteiny s biochemickou nebo fyziologickou funkcí

enzymy, buněčné receptory, regulační proteiny, protilátky, hormony

## ☐ Geny pro funkční RNA

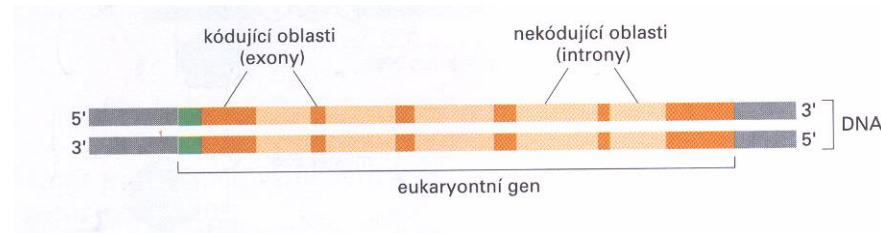
jejich transkripční produkty nepodléhají translaci

geny kódující tRNA a rRNA





# Gen - struktura

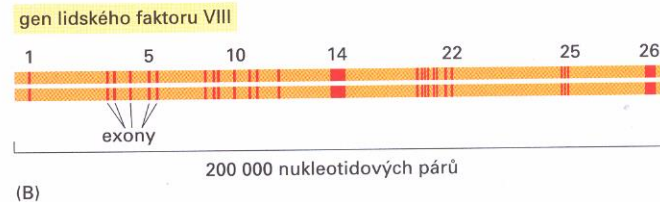
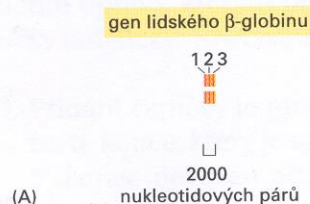


## Exony

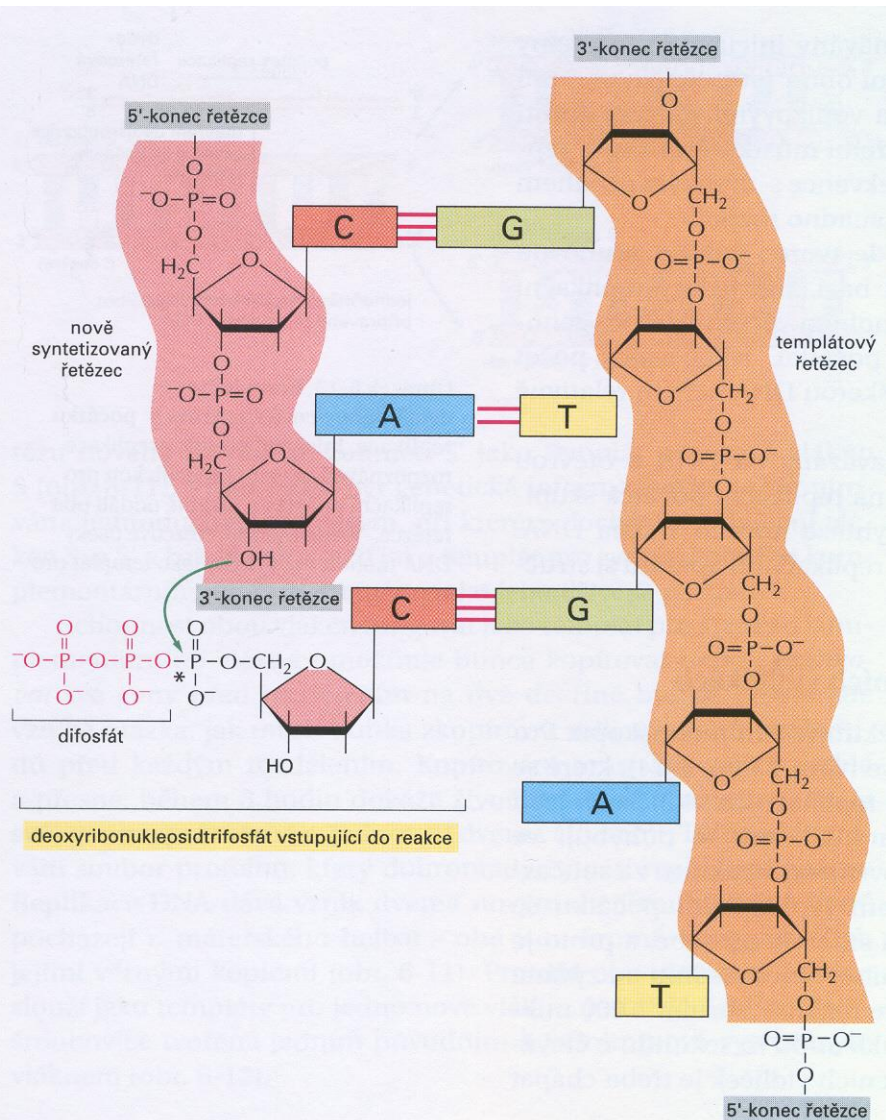
úseky kódujících sekvencí  
jsou jen malým zlomkem délky celého genu

## Introny

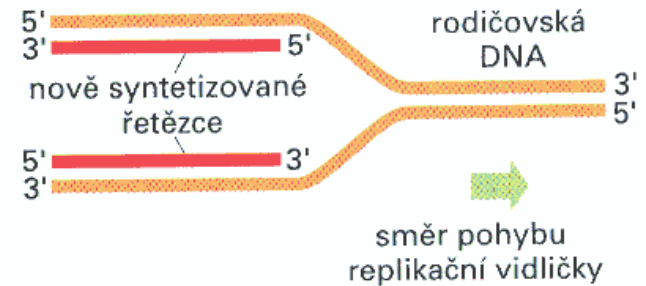
nekódující sekvence  
nejsou překládány do proteinu  
velikost 80-10 000 nukleotidů



# Přenos genetické informace

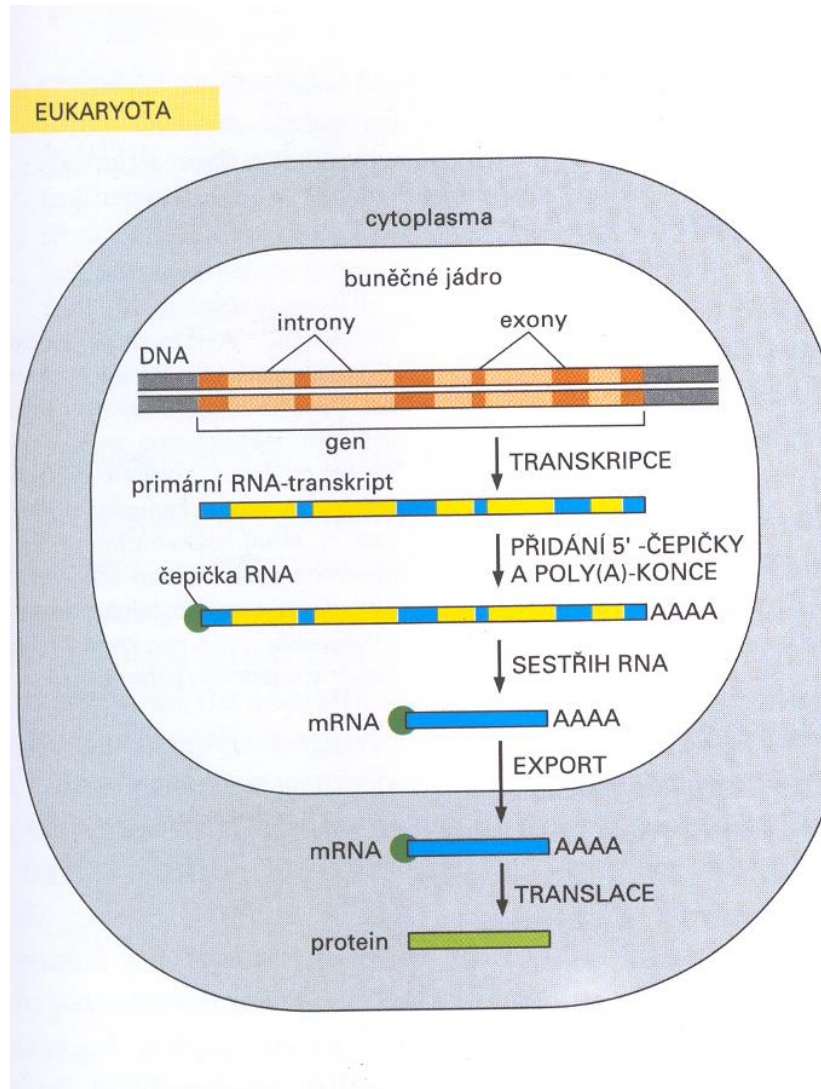


Genetická informace je přenášena  
z generace na generaci  
v nezměněné formě  
replikace DNA



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

# Tok genetické informace



# RNA

RNA se liší od DNA v těchto aspektech:

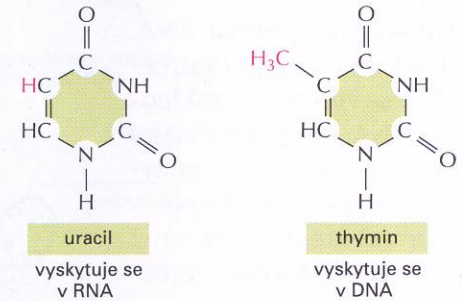
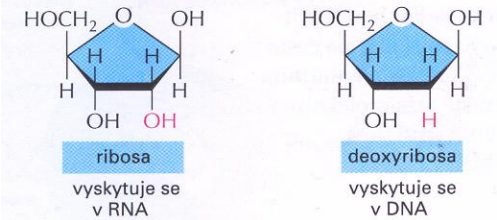
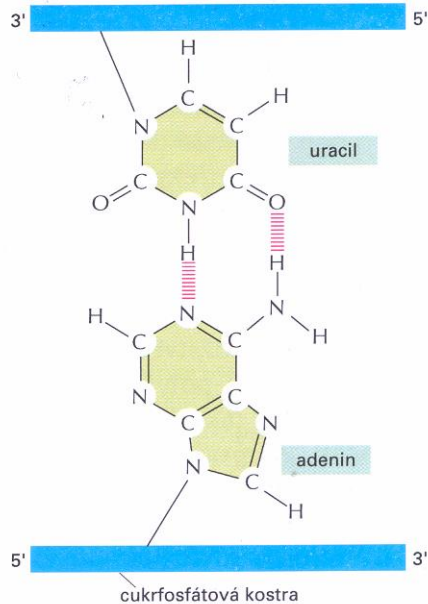
☐ nukleotidy v RNA se nazývají rybonukleotidy, protože cukernou složkou je ribóza

☐ v RNA se vyskytují báze adenin

cytosin

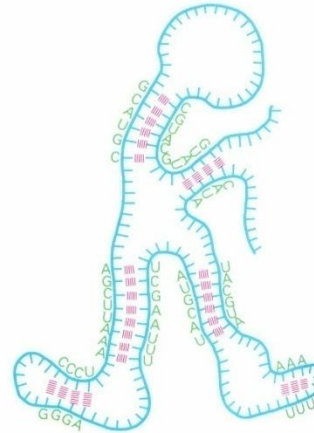
guanin

thymin nahrazen uracilem



# RNA

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



## Typ RNA

mRNA

rRNA

tRNA

malé RNA

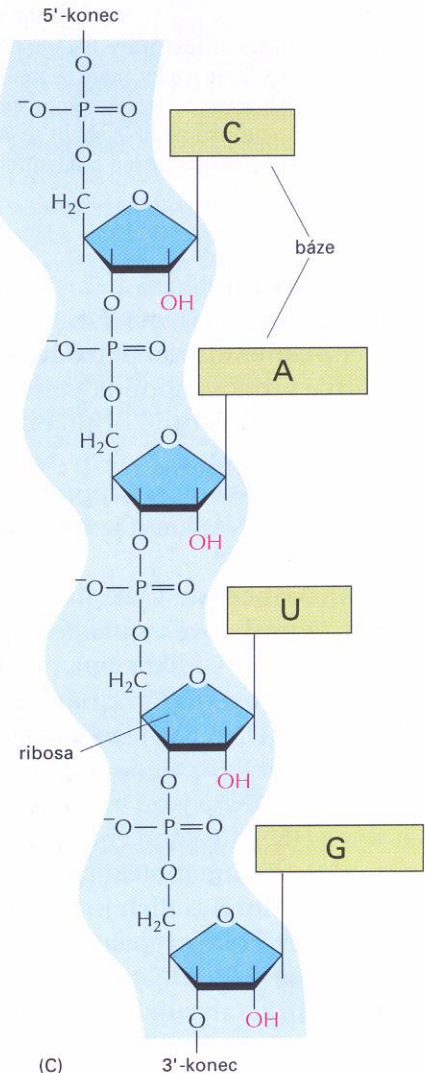
## Funkce

kódování proteinů

součást ribozomů, účast na proteosyntéze

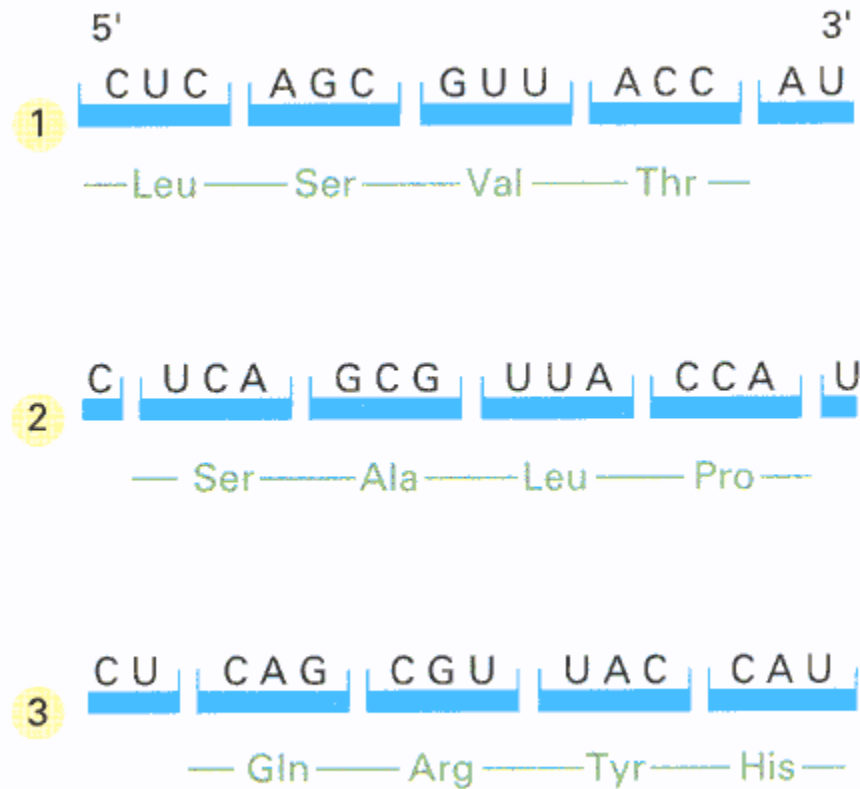
adaptor mezi mRNA a aminokyselinou  
při proteosyntéze

účast na sestřihu pre-RNA,  
účast na transportu proteinů do ER



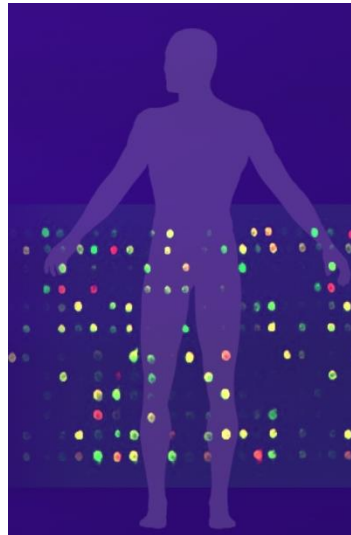
# Čtecí rámce

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



# Genetický kód

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







# Typy mutací

## 1) Genomové

- dojde ke změně celého genomu  
(haploidizace, polyploidizace)

## 2) Chromozomové

- mutační změna postihla strukturu chromozomu  
(chromozomové aberace)

## 3) Genové

- mutační změna v genu

### a) Somatické

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

### b) Gametické

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

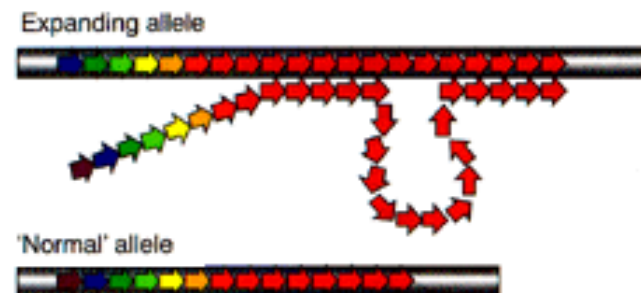
# Genové mutace

## Typy mutací

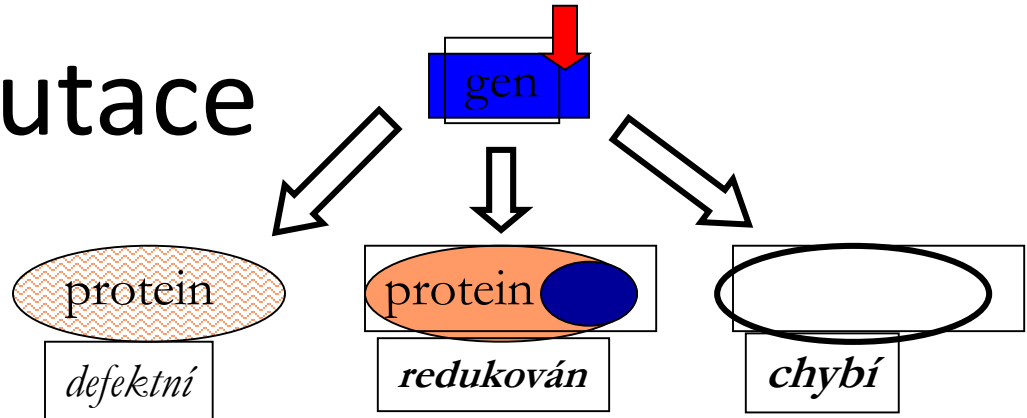
- **delece**
  - od 1 bp po megabáze
- **inzerce**
  - včetně duplikací
- **jednobázové substituce**
  - missense            transverze
  - nonsense            tranzice
  - splice site
  - silent
- **posunové (frameshift)**
  - v důsledku delecí, inzercí, poruch splicingu
- **„dynamické“ (expanzia rep. sekv.)**
  - tandemové repetice, které často expandují během meiózy

## Podle sekvence:

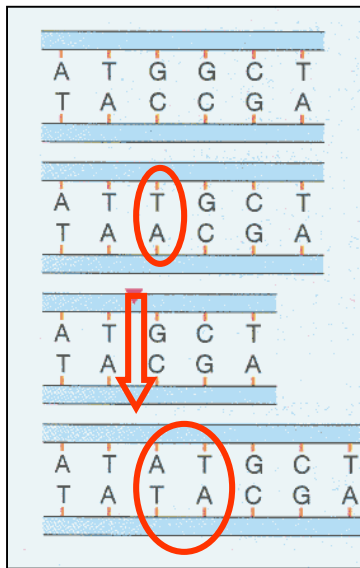
- v kódující sekvenci
- v nekódující sekvenci



# Mutate



## Typy mutací



wildtype

substitute

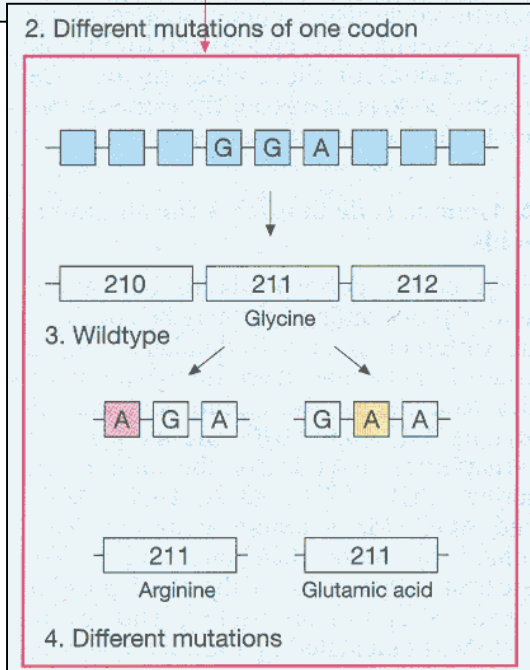
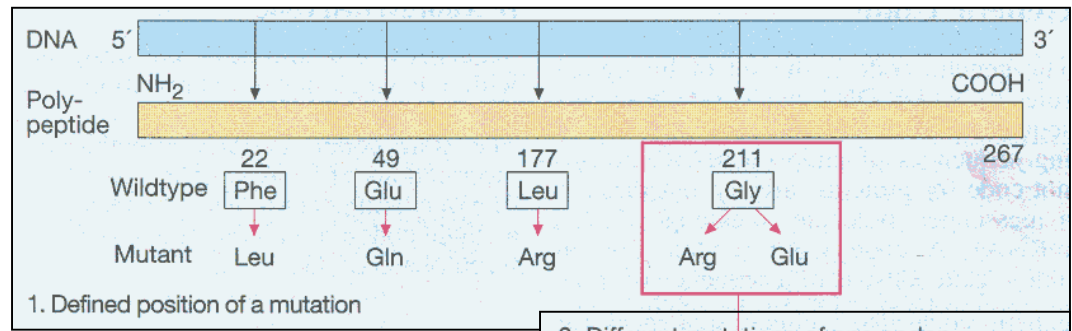
delece

inzerce

nonsense → G542X  
missense → N1303K

→ dF508

→ 390insT



# Člověk



**Buňky v lidském těle: 75 – 100 biliónů**

**Lidský genom: jádro, mitochondrie**

**Chromosomy v jádře: 46**

**Geny v lidském genomu: 20 000**

# Genetická informace jako kniha



Our **genome** -> The book

Our **chromosomes** -> The chapters of the book

Our **genes** -> The sentences in the book

Our **DNA** -> The letters forming the words and sentences

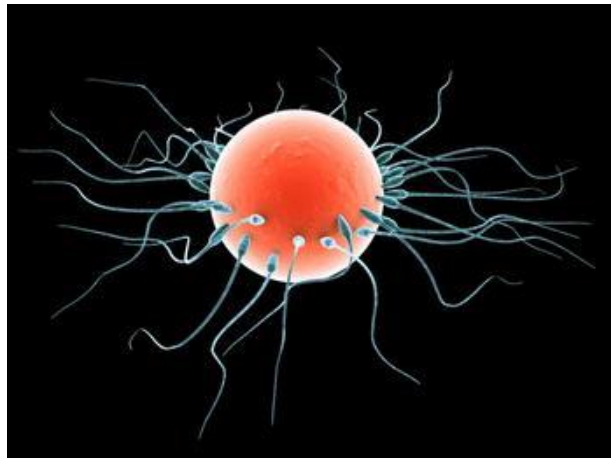
A **mutation** -> A typographical error

A **variation** -> A spelling variation

# Buňka

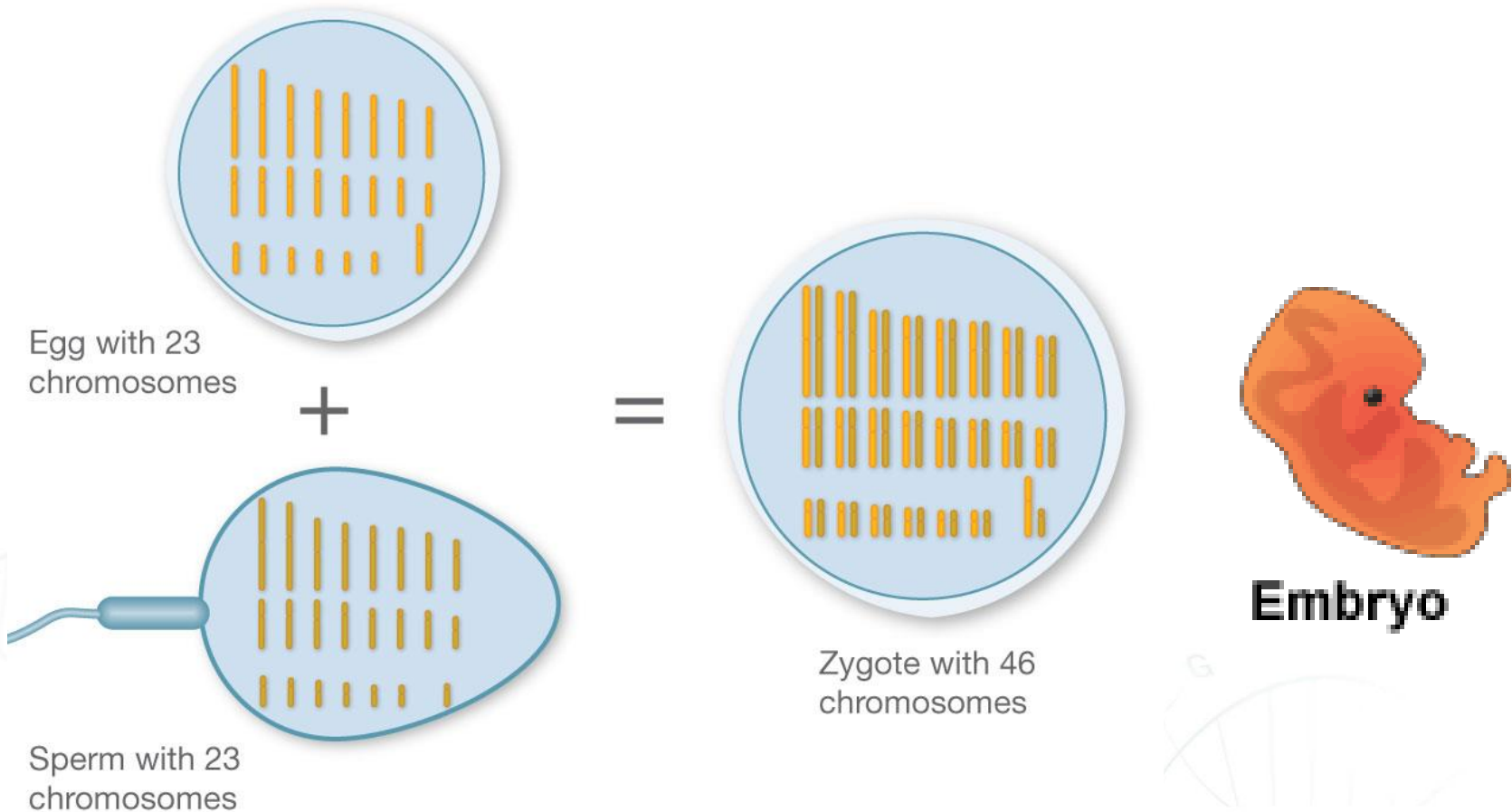
Jerome Lejeune, nositel Nobelovy ceny za genetiku

Za nejdokonalejší buňku považoval oplodněné vajíčko, z něhož se vše vyvíjí. Říkal, že „každý z nás má přesný výchozí bod, což je doba, kdy jsou všechny potřebné a vhodné genetické informace shromážděny v jedné buňce, oplodněném vajíčku, a to je okamžik oplodnění. O tom neexistuje nejmenších pochyb a víme, že tato informace je zapsána na stužce DNA







# Oplození

předání genetické informace z generace na generaci



Od svých rodičů dostáváme do výbavy od každého 23 chromosomů z toho jeden pohlavní (X nebo Y od otce, od matky vždy X)

# Mendelovská dědičnost

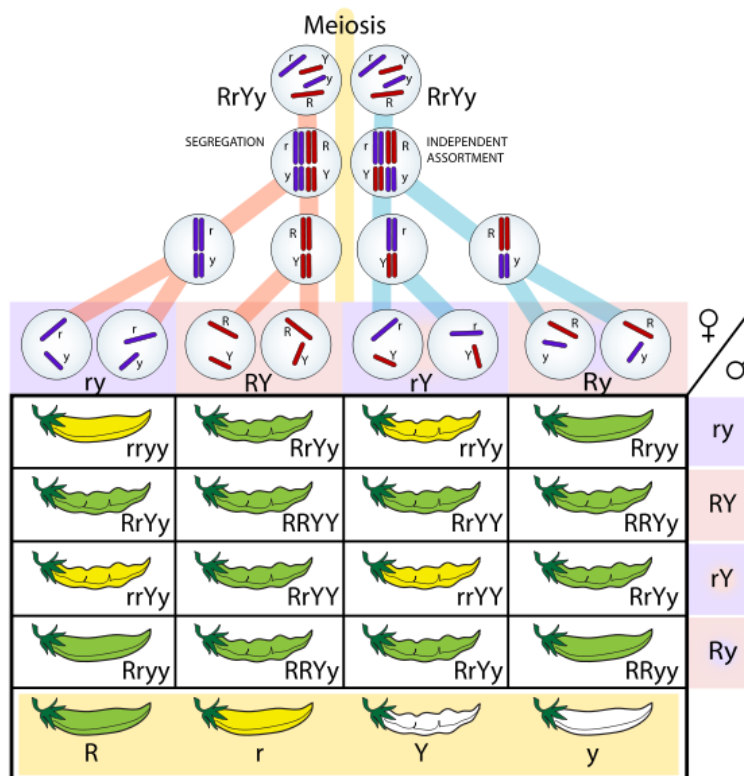
		pollen ♂	
		B	b
pistil ♀	B	 BB	 Bb
	b	 Bb	 bb





# Mendelovská dědičnost

- Zákon dominance
- Zákon segregace
- Zákon o volné kombinovatelnosti vloh



# Mendelovská dědičnost

Dělí se do čtyř skupin.

**autozomálně dominantní** (familiární hypercholesterolemie, achondroplazie, Marfanův syndrom aj.)

**autozomálně recesivní** (hemochromatoza, cystická fibróza, fenylketonurie),

**gonozomálně** (tedy postižením pohlavních chromozomů) **dominantní** (např. vitamín D resistantní rachitida)

**gonozomálně recesivní** (barvoslepost, Duchennova muskulární dystrofie, hemofilie) onemocnění.



# Oplození

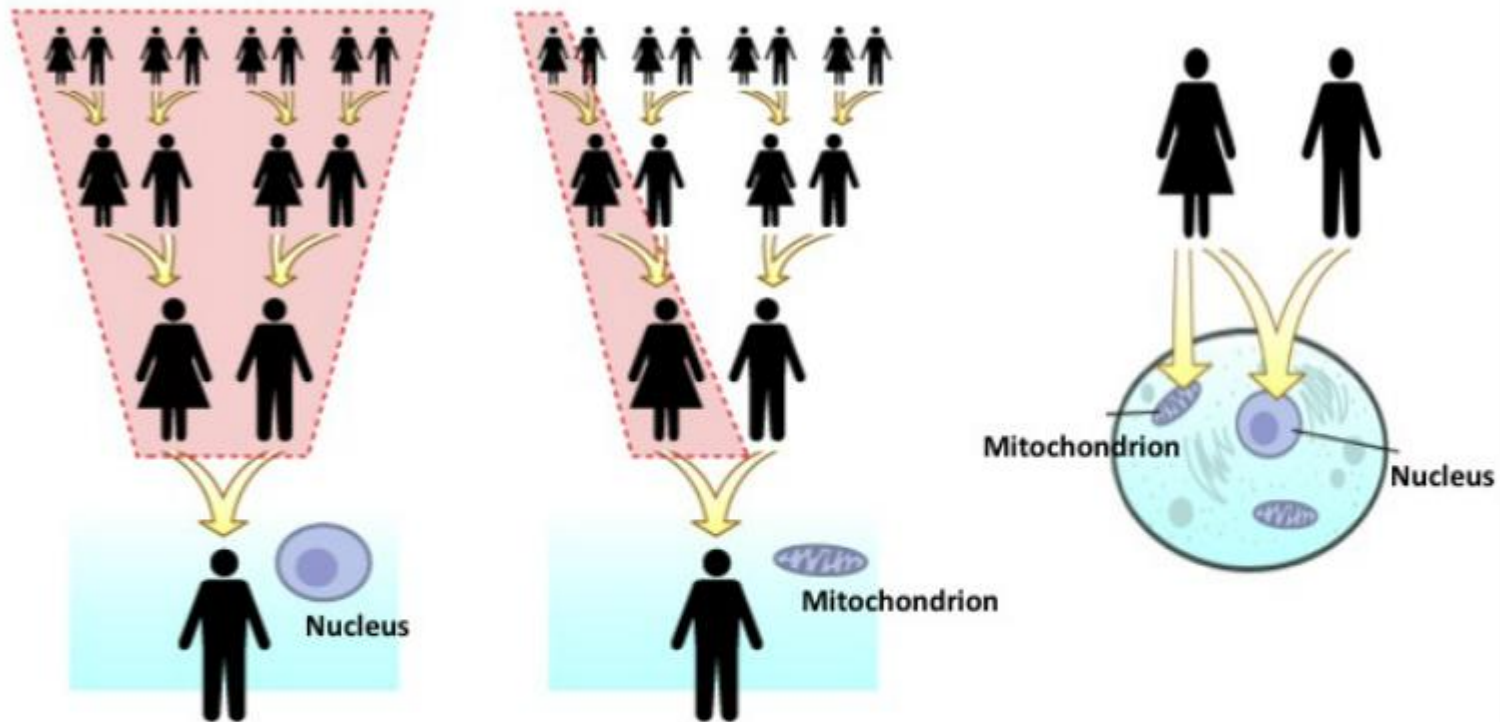
Jak se předává genetická informace uložená v mitochondriálním genomu



U většiny mnohobuněčných organismů je mtDNA zděděna od matky (maternálně dědičná).

- Vajíčko obsahuje průměrně 200 000 mtDNA molekul, zatímco zdravé lidské spermie obsahují v průměru 5 molekul mtDNA, protože dochází k degradaci mtDNA spermií v mužském pohlavním traktu.
- Mužská mtDNA je společně s bičíkem spermie ztracena při vstupu do vajíčka.

# Jaderná a mitochondriální dědičnost



Nuclear DNA is inherited from all ancestors (left panel); Mitochondrial DNA is inherited from a single lineage, maternal (center panel); mitochondria are passed from mother to child only, whereas the genes in the nuclei of your cells come from both parents (right panel). From the University of California Museum of Paleontology's Understanding Evolution (<http://evolution.berkeley.edu>).

# Dědičná onemocnění

onemocnění, která jsou přenášena (děděna) v rámci rodiny z rodičů na potomky.

Genomové (polyploidie, aneuploidie)

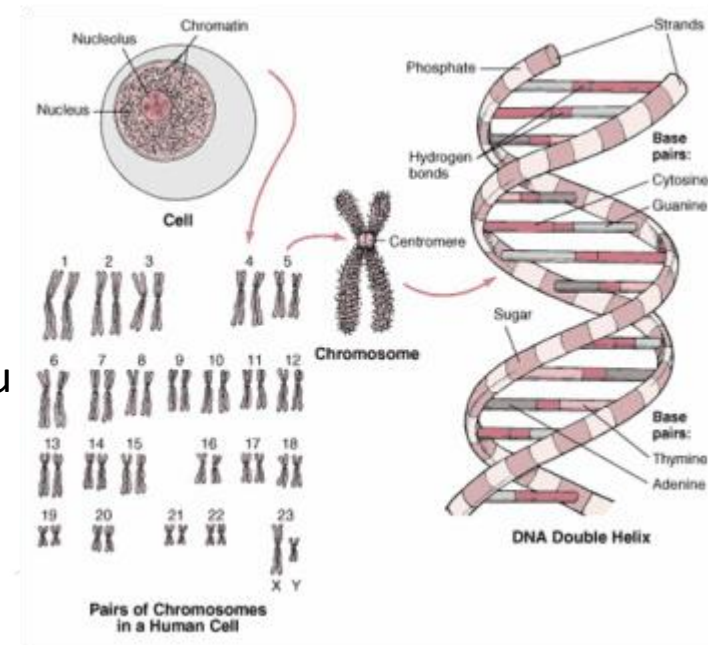
- dojde ke změně celého genomu (početní aberace)

Chromozomové

- mutační změna postihla strukturu chromosomu (strukturní aberace)

Genové

- mutační změna v genu (změny sekvence DNA)



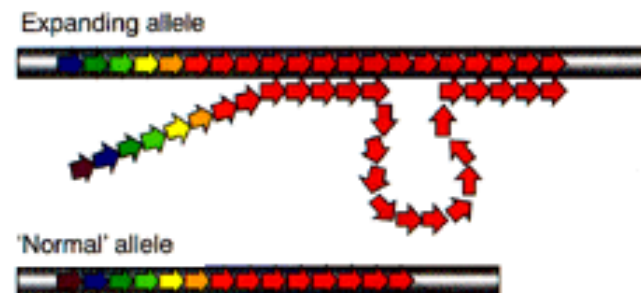
# Genové mutace

## Typy mutací

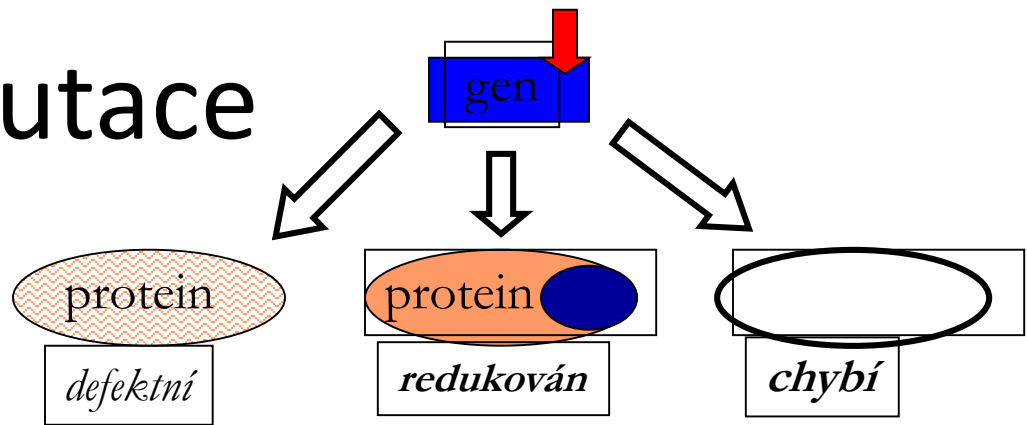
- **delece**
  - od 1 bp po megabáze
- **inzerce**
  - včetně duplikací
- **jednobázové substituce**
  - missense            transverze
  - nonsense            tranzice
- **sestřihové**
- **silent**
- **posunové (frameshift)**
  - v důsledku delecí, inzercí, poruch splicingu
- **„dynamické“ (expanzia rep. sekv.)**
  - tandemové repetice, které často expandují během meiózy

Podle sekvence:

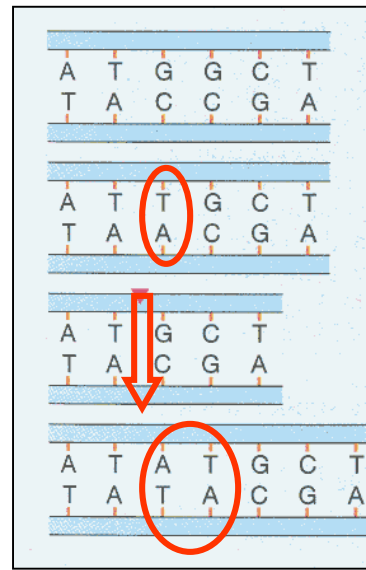
- v kódující sekvenci
- v nekódující sekvenci



# Mutate



## Typy mutací



wildtype

substitute

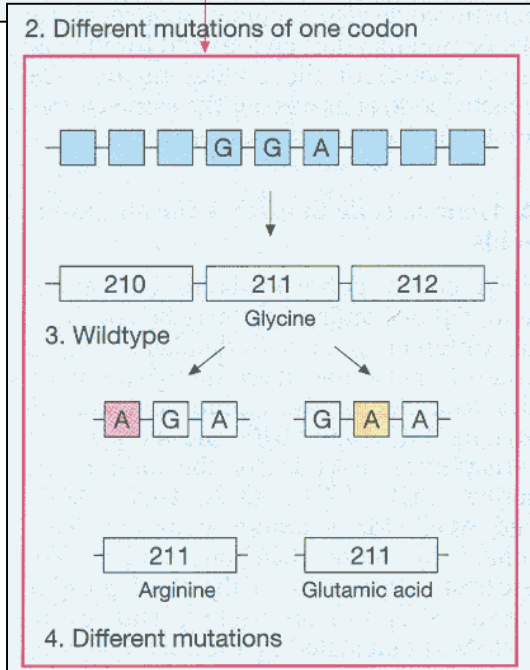
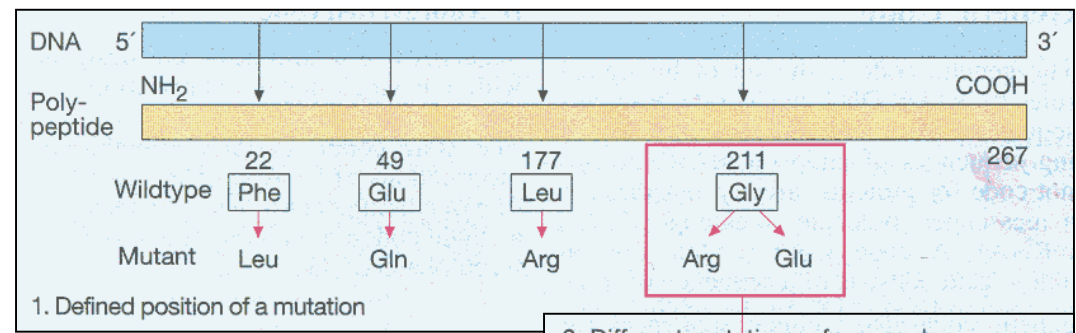
delece

inzerce

nonsense → G542X  
missense → N1303K

→ dF508

→ 390insT



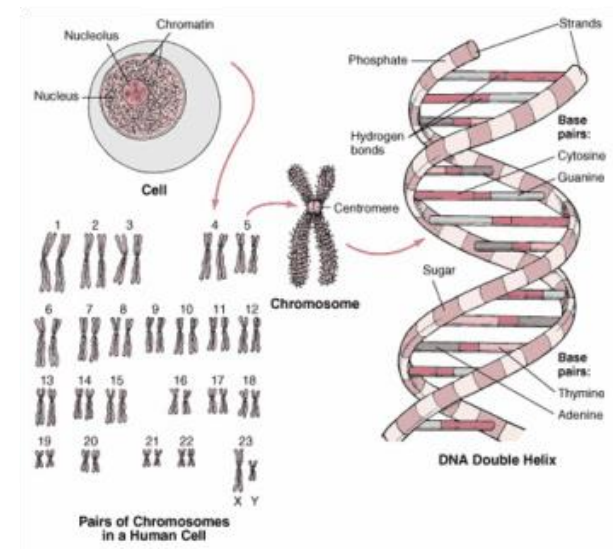
# Dědičná x geneticky podmíněná onemocnění

## a) Somatické

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

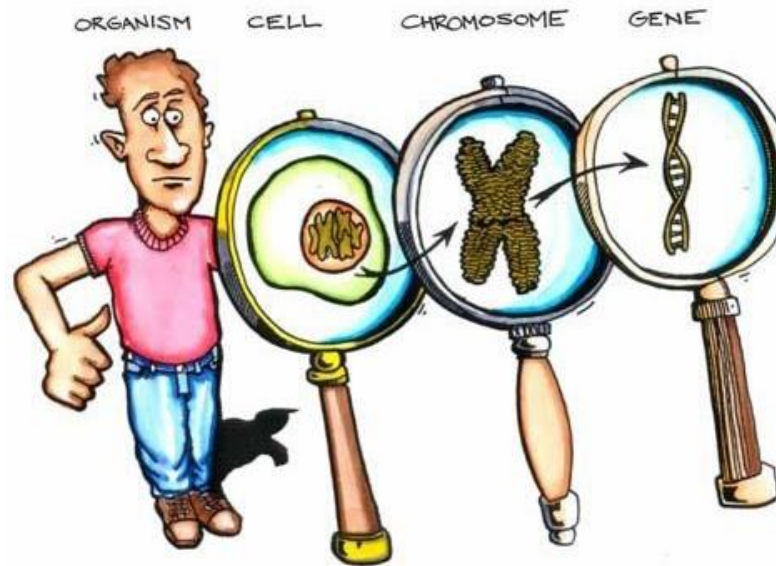
## b) Gametické

- vznikají v gametách
- všechny buňky jedince, který vznikl z příslušné zygoty, obsahují mutantní změnu
- onemocnění, která jsou přenášena (děděna) v rámci rodiny z rodičů na potomky





# Diagnostika genetických onemocnění



početní  
aberrace chromosomů

strukturní

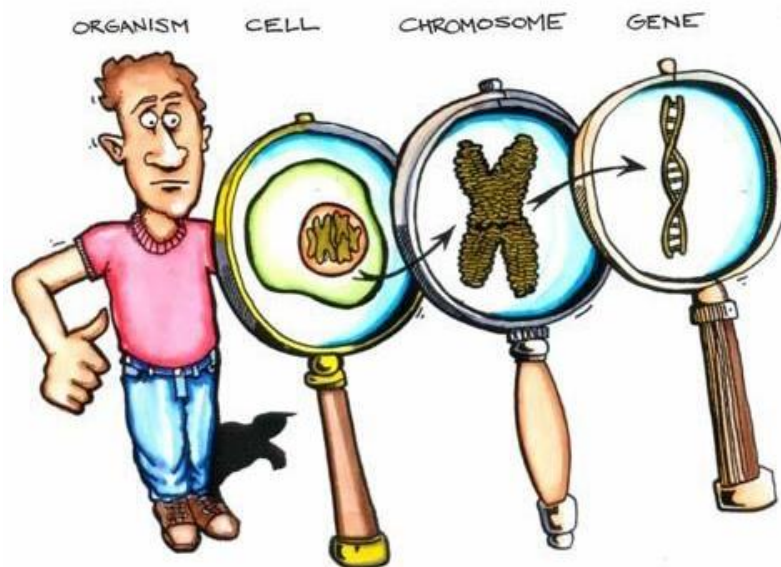
sekvenční změny DNA

Cytogenetika

Molekulární diagnostika

Molekulární cytogenetika

# Diagnostika genetických onemocnění



početní  
aberrace chromosomů

strukturní

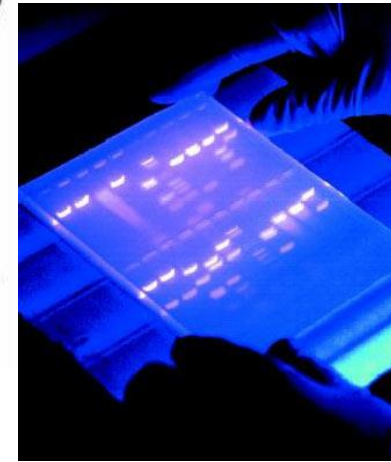
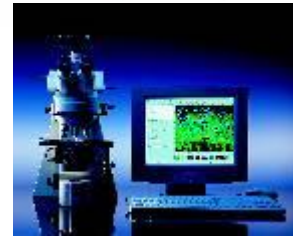
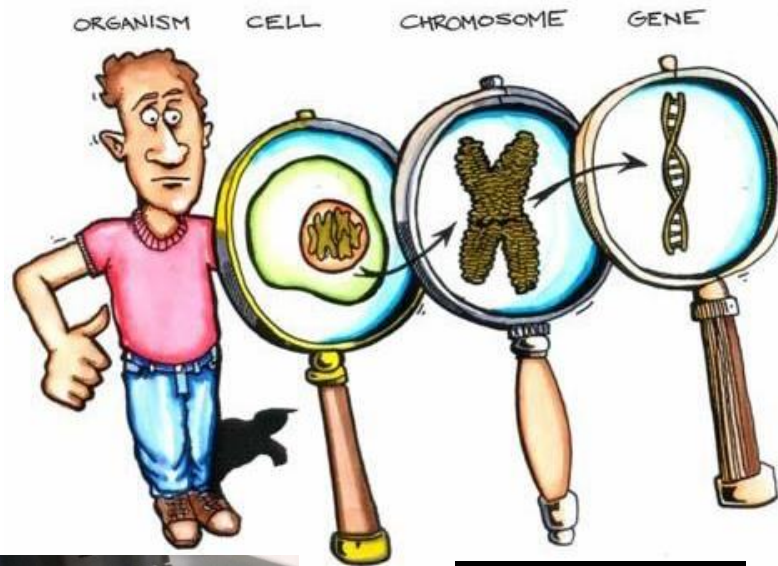
sekvenční změny DNA

Cytogenetika

Molekulární diagnostika

Molekulární cytogenetika

# Diagnostika genetických onemocnění



Cytogenetika  
Molekulární cytogenetika

Molekulární diagnostika

# 1983

## Kary Banks Mullis

PCR (polymerázová řetězová reakce)

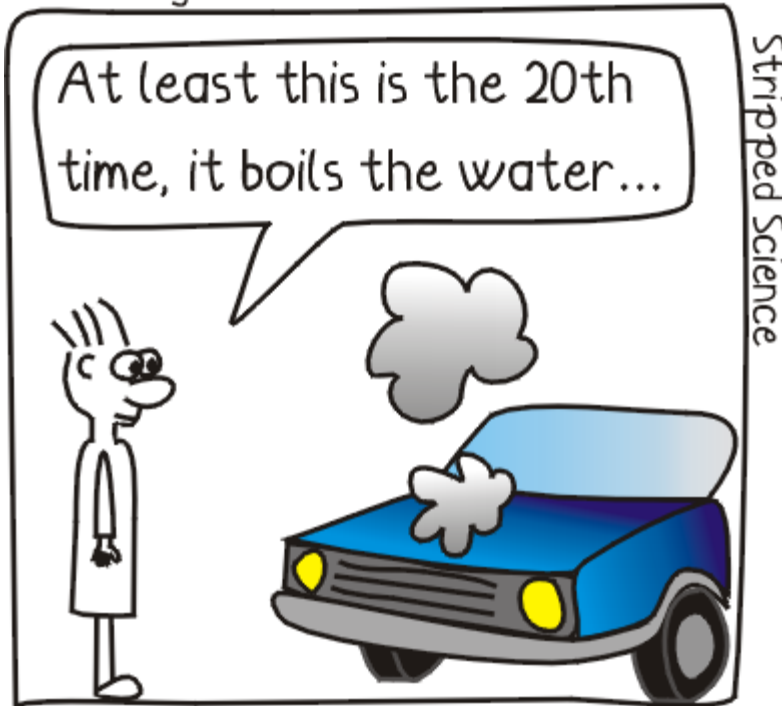


Tato metoda byla ve své době doslova převratná a nejen že měla obrovský dopad na vědeckou komunitu, ale ovlivnila i mnoho aspektů našeho každodenního života.

# Kary Banks Mullis

Událost popisuje tak, že během cesty po dálnici 128 ze San Franciska do Mendocina v jeho Hondě Civic ho náhle polymerázová řetězová reakce napadla tak jasně, jako by jí měl v hlavě nakreslenou na tabuli.

Inventing the PCR



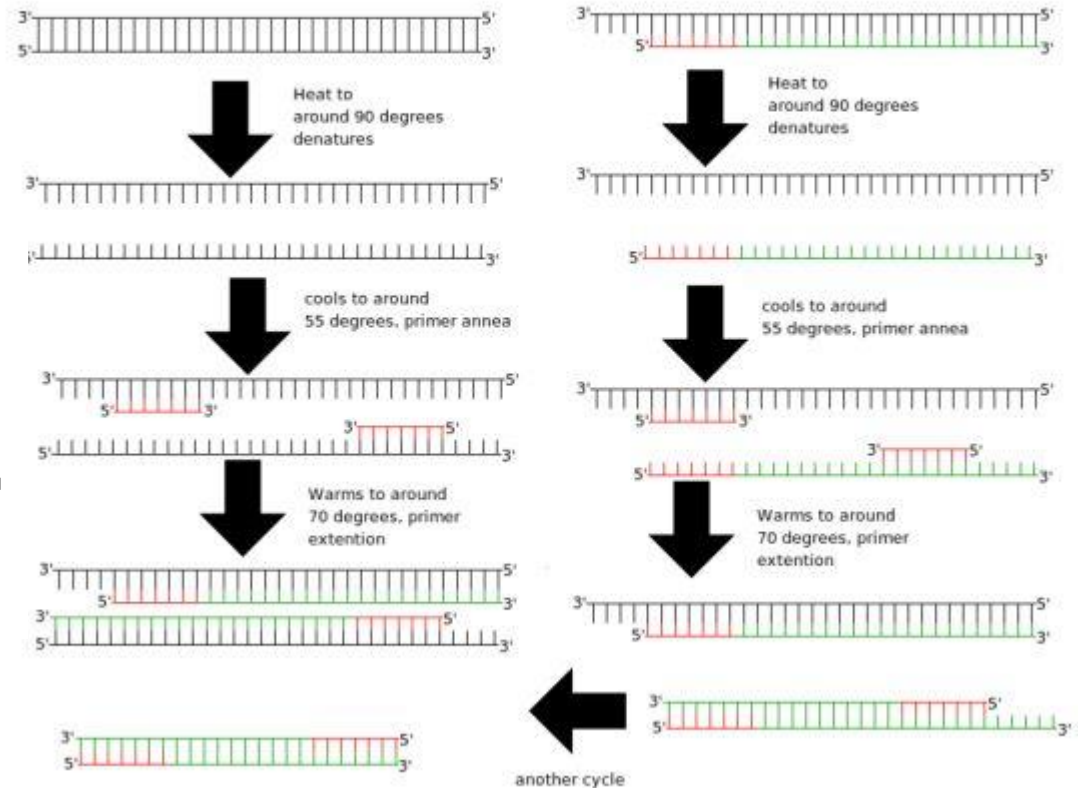


Mullis za vynález PCR obdržel Nobelovu cenu v roce 1993, deset let po své cestě ze San Francisca do Mendocina.

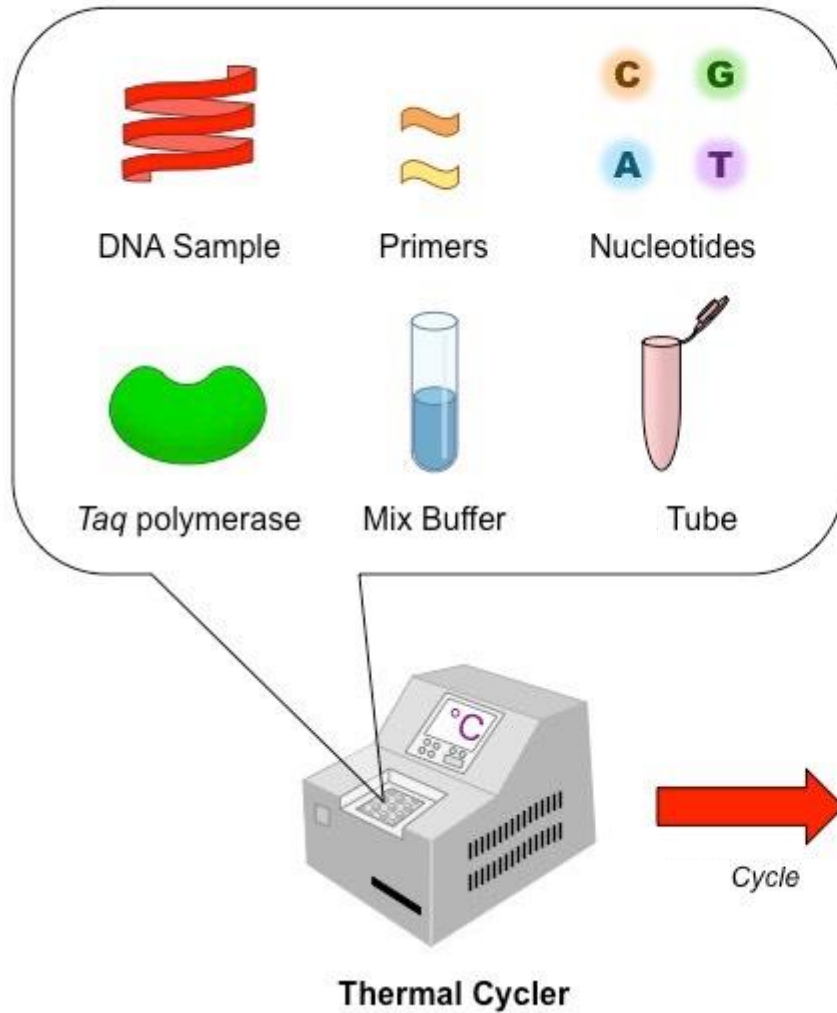
# Polymerase Chain Reaction: PCR

Typická PCR amplifikace využívá oligonukleotidové primery, které hybridizují k protilehlým řetězcům. Primery pak bývají orientovány tak, aby směr jejich prodlužování mířil dovnitř, kde se mezi oběma primery nachází požadovaná sekvence.

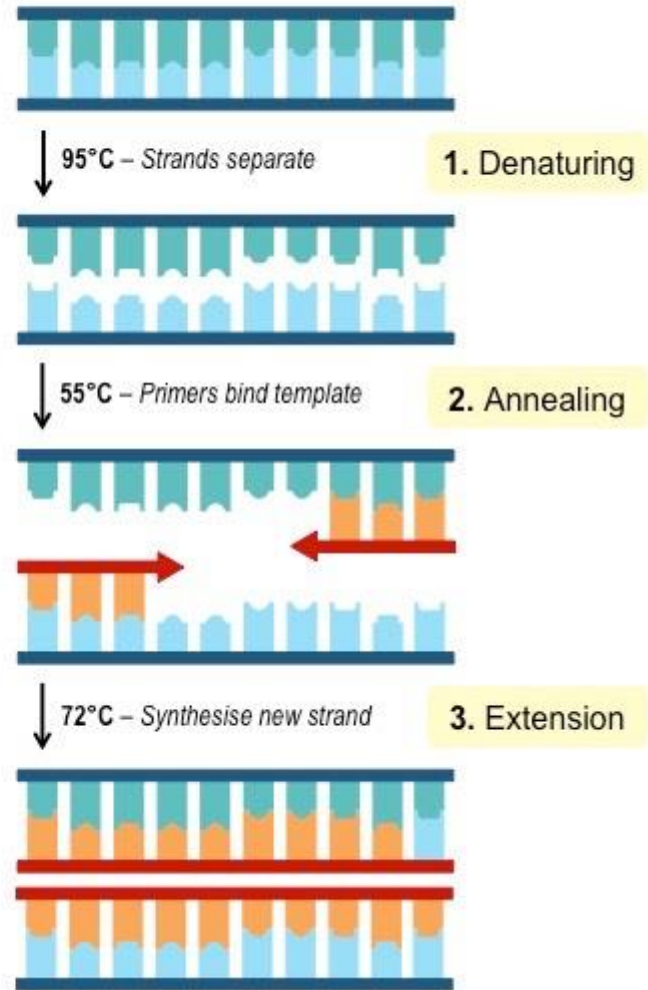
Jelikož je pak produkt jednoho primeru zároveň templátem pro primer opačný, následuje po opakování cyklů denaturace, nasedání primerů a jejich prodlužování exponenciální namnožení kopií oblasti ohraničené těmito primery.



## PCR Components

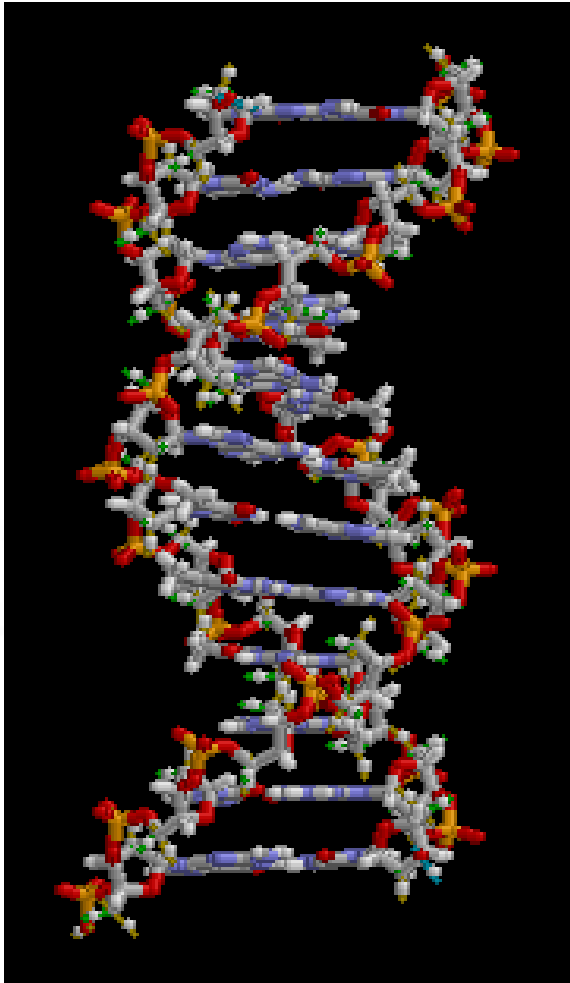


## PCR Process (ONE Cycle)





# Deoxyribonukleová kyselina DNA



Uvnitř jádra většiny buněk a mitochondrií je svinutá 2 m dlouhá spirála.

- V její části je zakódováno, kdo jsme a jak vypadáme.
- Obsahuje vzorce opakující se v jedinečném, pro každého jedince individuálním počtu.



Jsem biodetekтив,  
jmenuji se DNA a usvědčím  
každého!





# DNA fingerprinting

10. září roku 1984 v 9 hodin a 5 minut, kdy si britský genetik **Alec Jeffreys** pracující v laboratoři na univerzitě v anglickém Leicesteru povšiml zdánlivě nepatrných rozdílů v dědičné informaci různých členů rodiny jednoho laboranta.

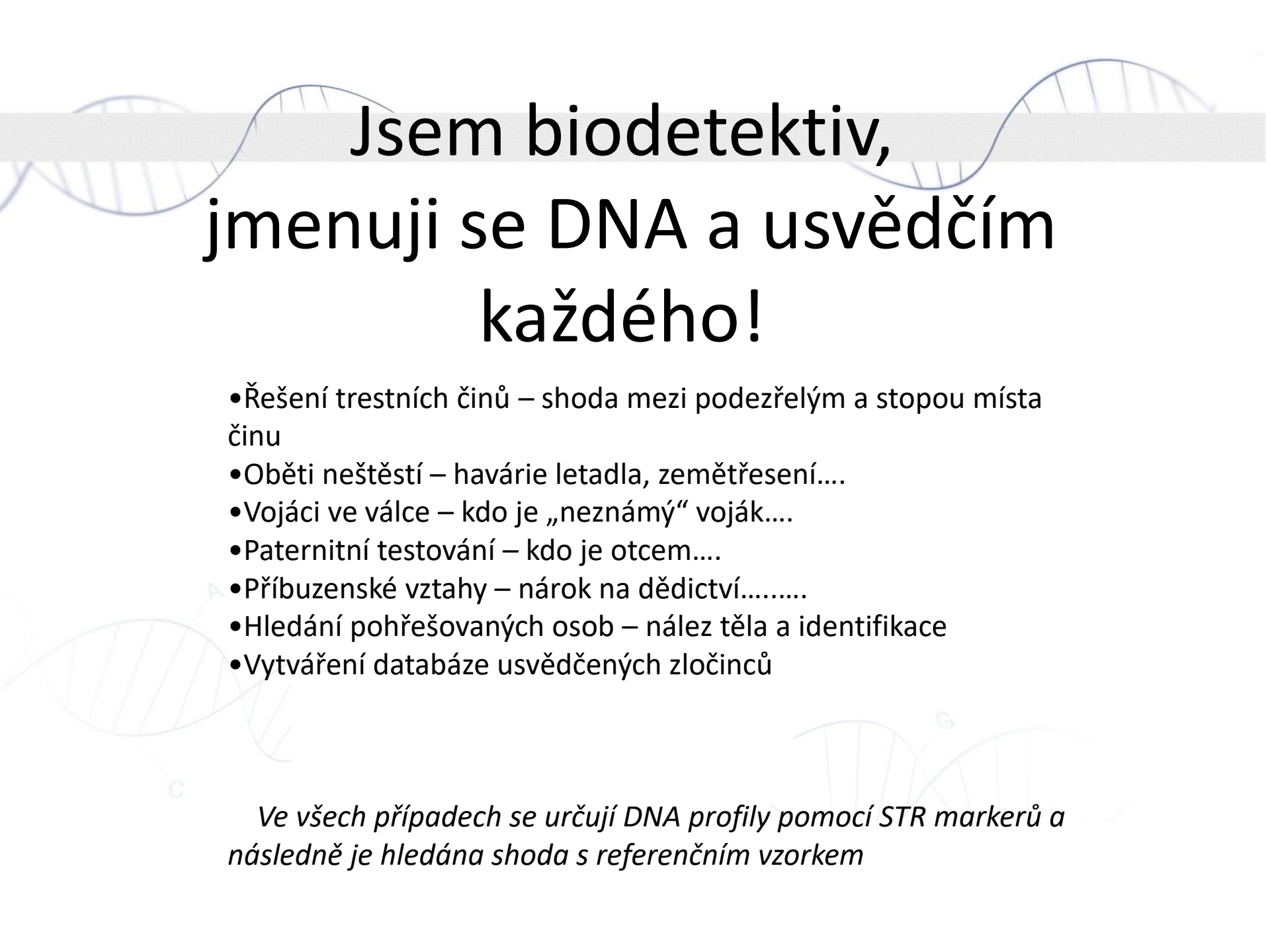
Tak se zrodila technika „otisku DNA“ neboli „DNA fingerprintu“.

Do roku 1987, kdy byl celý postup komercializován, zůstal Jeffreys jediným člověkem na světě, který uměl „otisk DNA“ stanovit.

Metoda našla široké uplatnění v kriminalistice a dnes s její pomocí usvědčuje násilníky a zloděje i plejáda detektivů v televizních seriálech.

Už první případ, který Jeffreys rozlouskl s pomocí „DNA fingerprintu“, se však týkal důkazu rodičovství. Britští imigrační úředníci odmítli uvěřit tvrzení mladíka, že se vrací z návštěvy u příbuzných v Ghaně k rodičům, kteří dostali ve Velké Británii azyl. Cizinecká policie byla přesvědčená, že se s pasem mladíka snaží do země vloudit jeho vzdálený příbuzný.

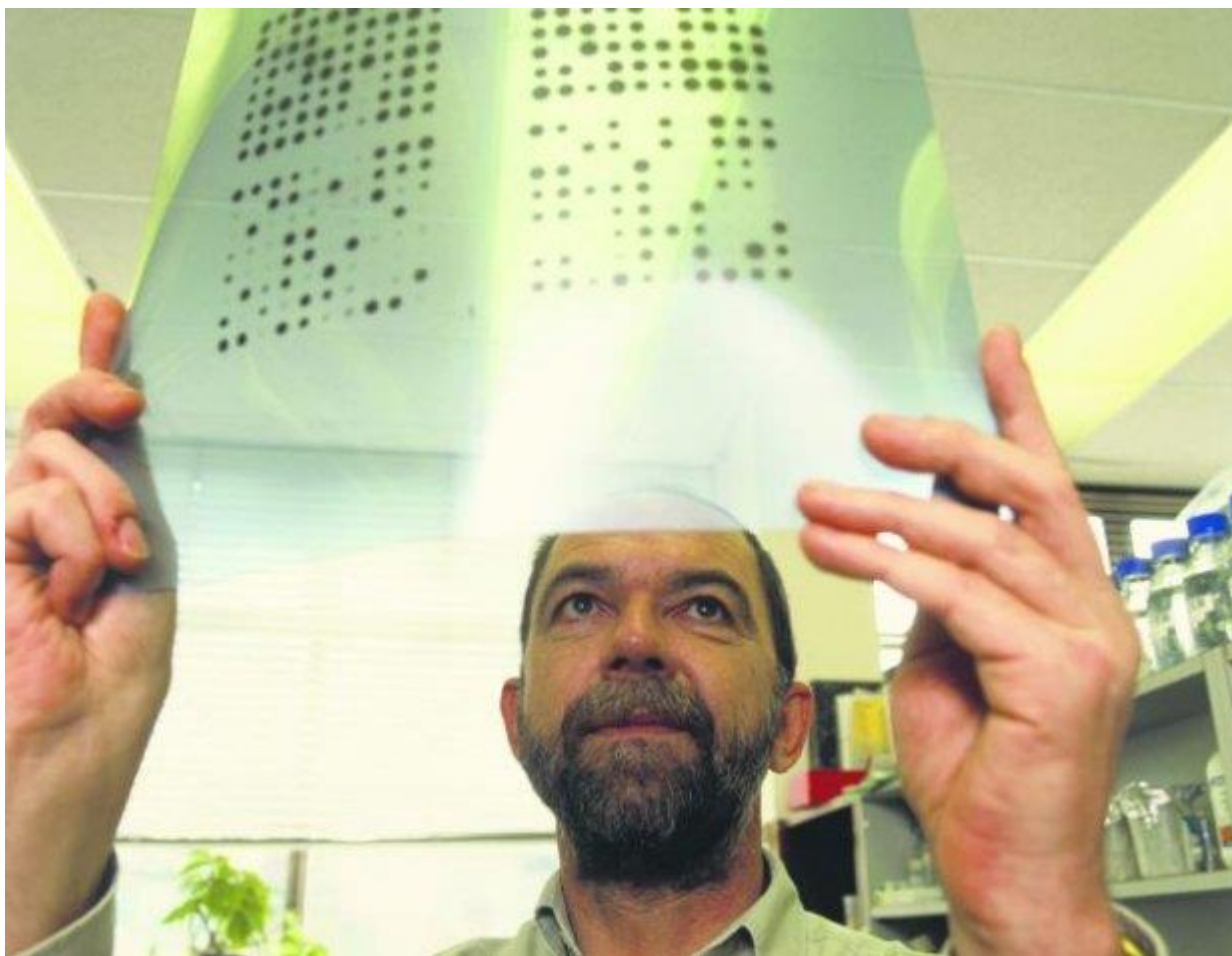
Jeffreys vyhověl žádosti mladíkovy matky a dokázal, že chlapec je její syn.



# Jsem biodetektiv, jmenuji se DNA a usvědčím každého!

- Řešení trestních činů – shoda mezi podezřelým a stopou místa činu
- Oběti neštěstí – havárie letadla, zemětřesení....
- Vojáci ve válce – kdo je „neznámý“ voják....
- Paternitní testování – kdo je otcem....
- Příbuzenské vztahy – nárok na dědictví.....
- Hledání pohřešovaných osob – nález těla a identifikace
- Vytváření databáze usvědčených zločinců

*Ve všech případech se určují DNA profily pomocí STR markerů a následně je hledána shoda s referenčním vzorkem*



**Prof. Sir Alec Jeffreys**

# Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)

délka základní repetice 2 – 6 bp

počet opakování repetice 2 – 100 bp

Rozptýlené rovnoměrně v lidské genomu

Vyskytují se běžně v populaci

Nejsou přepisovány do proteinu

leží v intronech

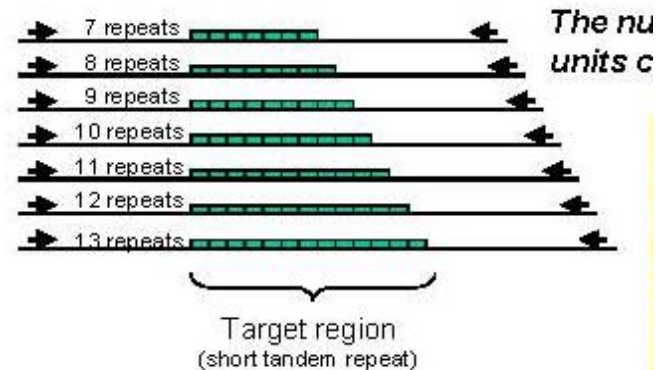
Nejsou příčinou choroby

Tvoří vzorce bez vztahu s fenotypem

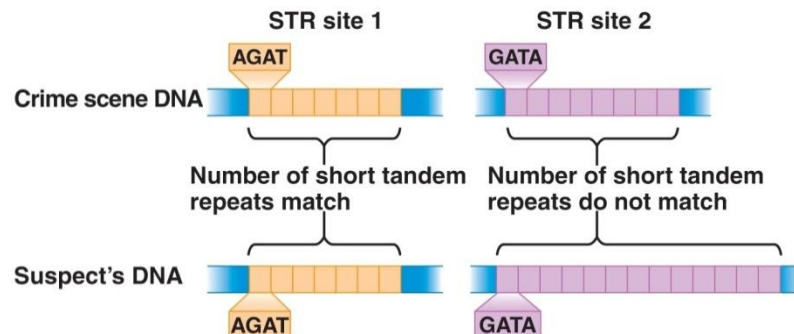
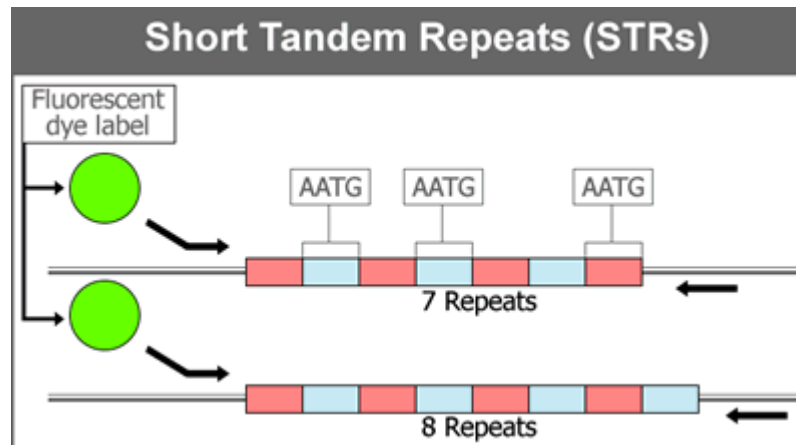
Mezi jednotlivci se velmi liší

Odlišují jednoho člověka od druhého

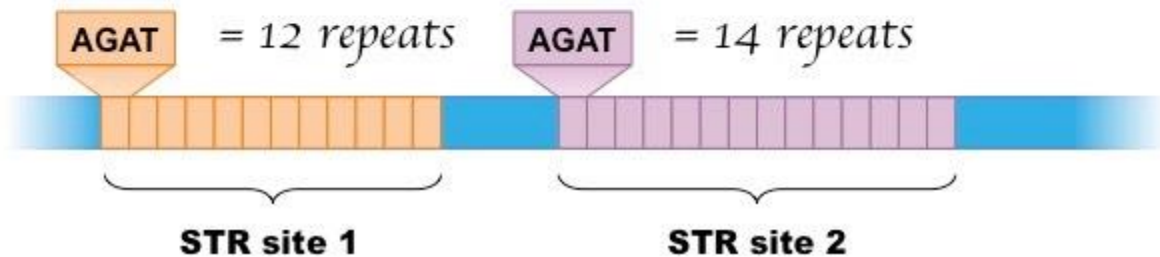
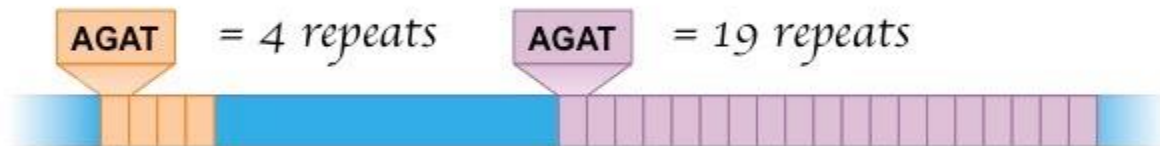
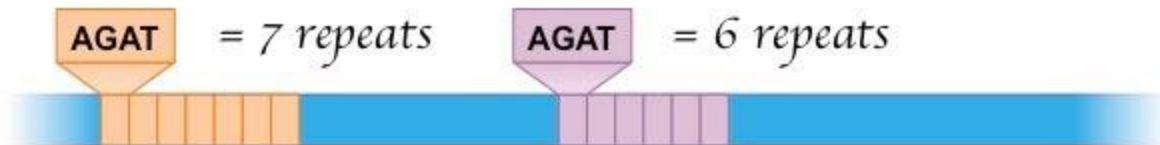
```
TCCCAAGCTCTTCCCTCTTCCCTAGATCAATACAGACAGAAGACA  
GGTGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
TAGATAGATATCATTGAAAGACAAAACAGAGATGGATGATAGAT  
ACATGCTTACAGATGCACAC
```



# Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)

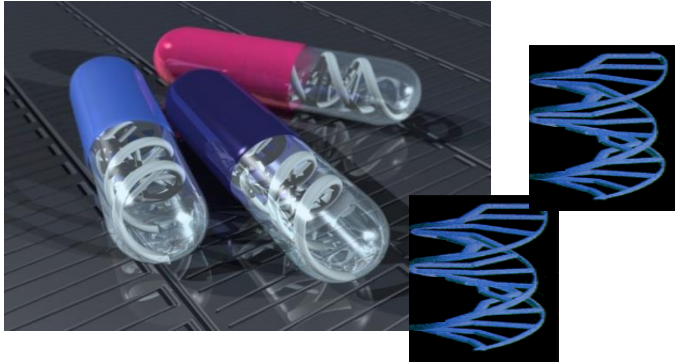


# Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)

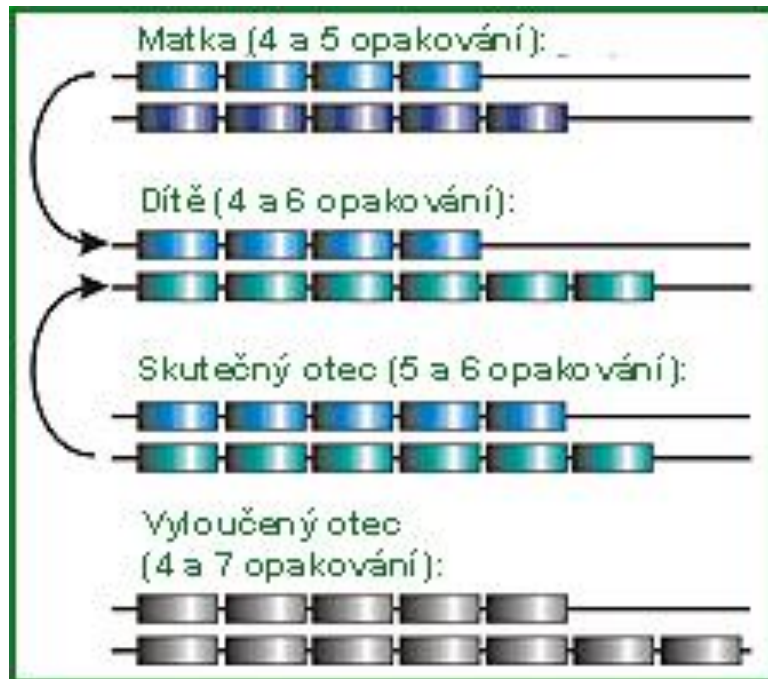




# Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)



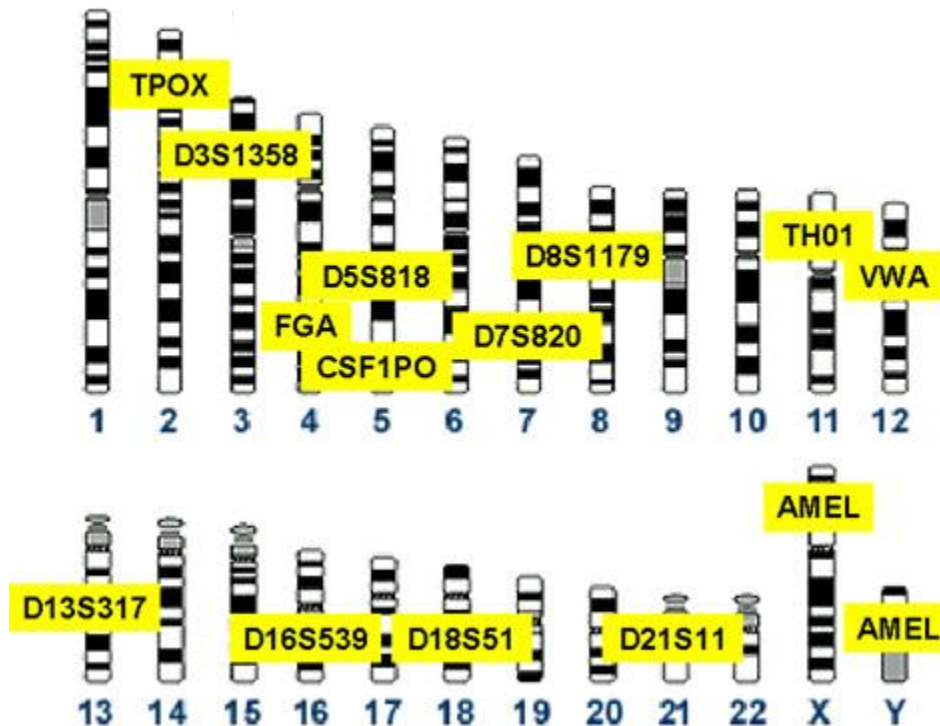
# STR - určení otcovství

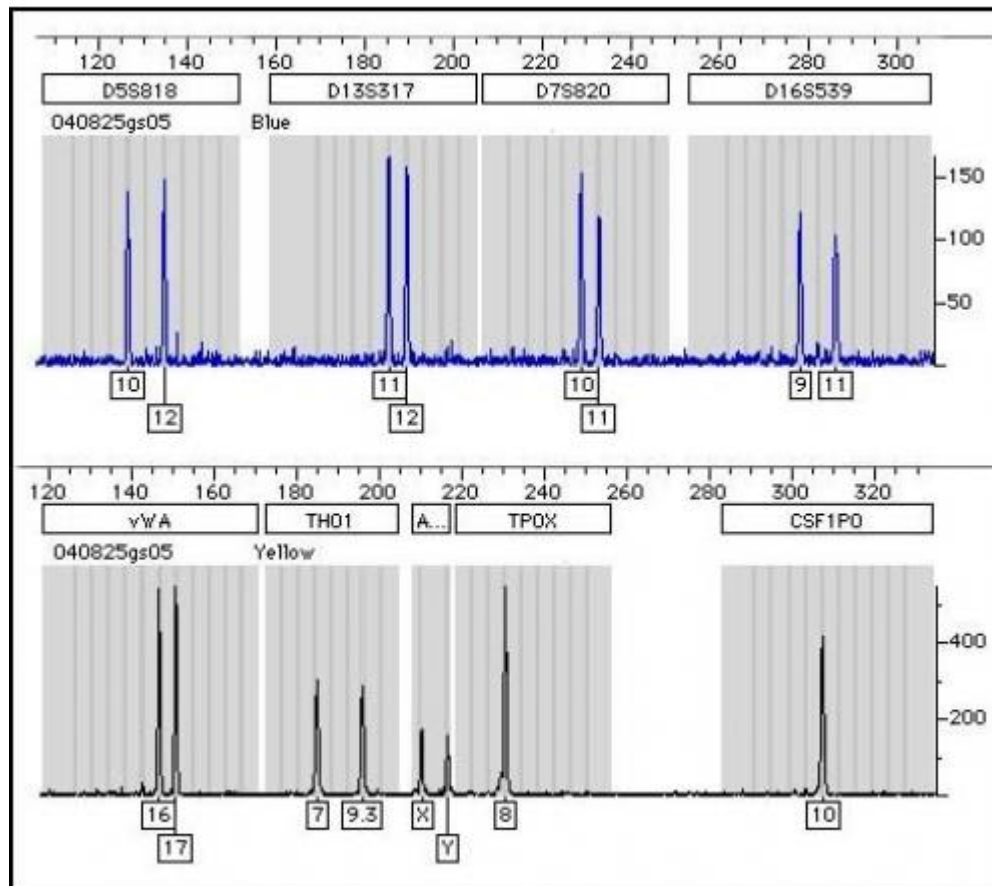


# CODIS loci

CODIS loci jsou DNA oblasti / znaky, které používá FBI a další světové agentury jako dohodnutý standard pro ukládání genetických profilů osob.

Ve vyhodnocení paternitních testů se v současné době používá 16 oblastí DNA.





Dnešní genetika ovšem během posledních let nabízí možnosti, o jakých se dřív ani nesnilo.

Nejistý otec si bez problémů ověří,  
jestli vychovává svoje dítě  
a nejistá matka zjistí, který z tatínek je ten pravý, biologický.

DNA je natolik variabilní, že každý člověk je de facto unikát  
a otcovství se tak dá potvrdit  
nebo vyvrátit s téměř stoprocentní pravděpodobností.



Nakolik je celá tahle revoluce ve finále přínosná pro děti, je ovšem téma k další diskuzi.



Vyspělé technologie umožňují molekulárním genetikům získat stále více informací o genetické výbavě analyzovaného člověka.

Otázka je:

Víme, jak s nimi naložit?

Víme, jak je použít ve prospěch člověka?



Sekvence naší DNA,  
vhodně zašifrovaná,  
se zanedlouho stane  
standardní součástí naší  
elektronické zdravotní  
dokumentace.

Collins, F., (2010) *The Language of Life*. Profile  
Books LTD. London, GB.



prof. RNDr. Jiřina Relichová, CSc.



Lidská genetika ale ještě čeká na svoje hlavní slovo.  
Věřím, že 21. století bude stoletím genetiky člověka.