

Genetika v zubním lékařství – cvičení 1

Základní pojmy

Genetika

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

Genomika

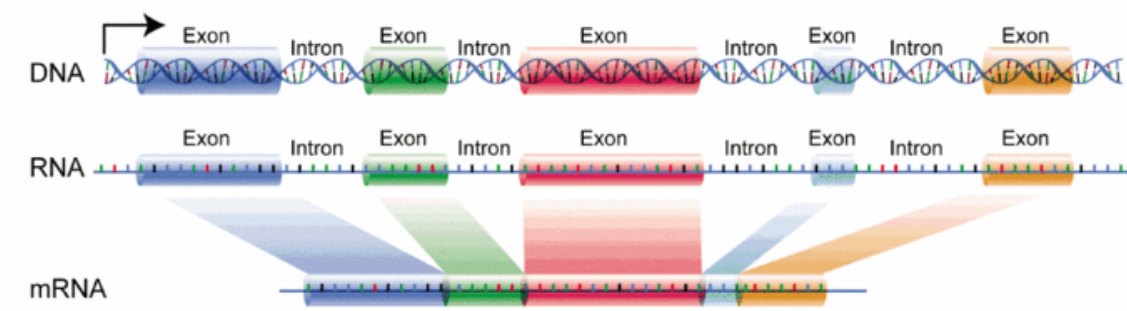
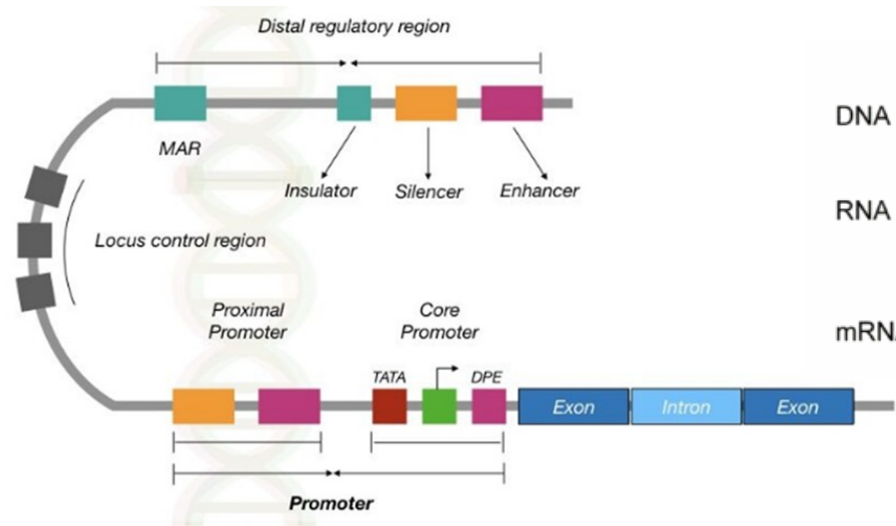
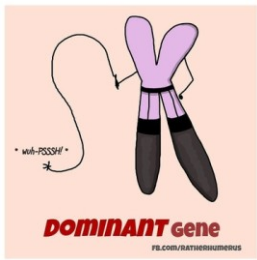
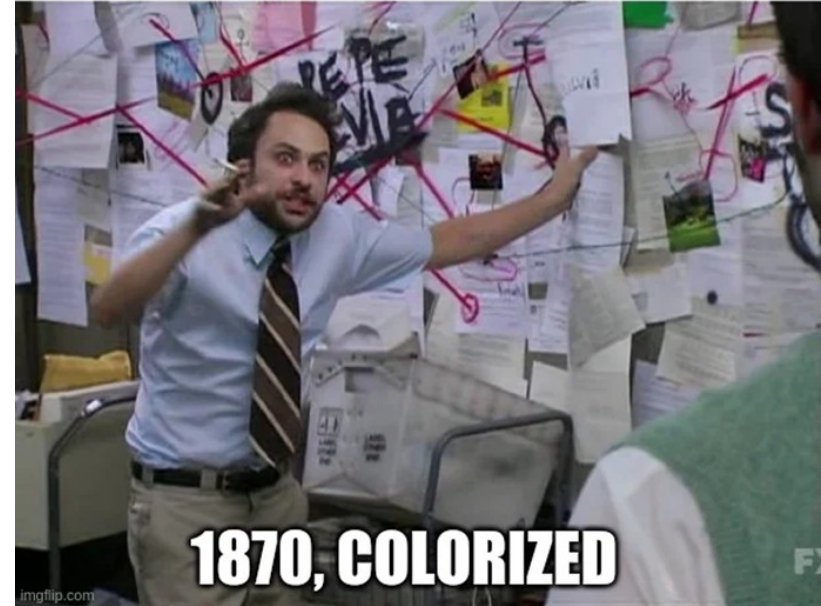
- obor genetiky, který se snaží stanovit úplnou genetickou informaci organismu a interpretovat ji v termínech životních pochodů

Gen

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

strukturní
funkční

GREGOR MENDEL EXPLAINING HIS PEA STUFF TO MORAVIAN FARMERS



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

Heterozygot

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

Homozygot

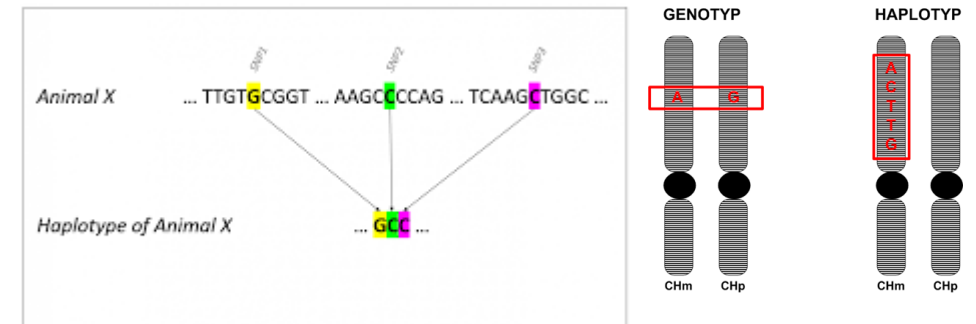
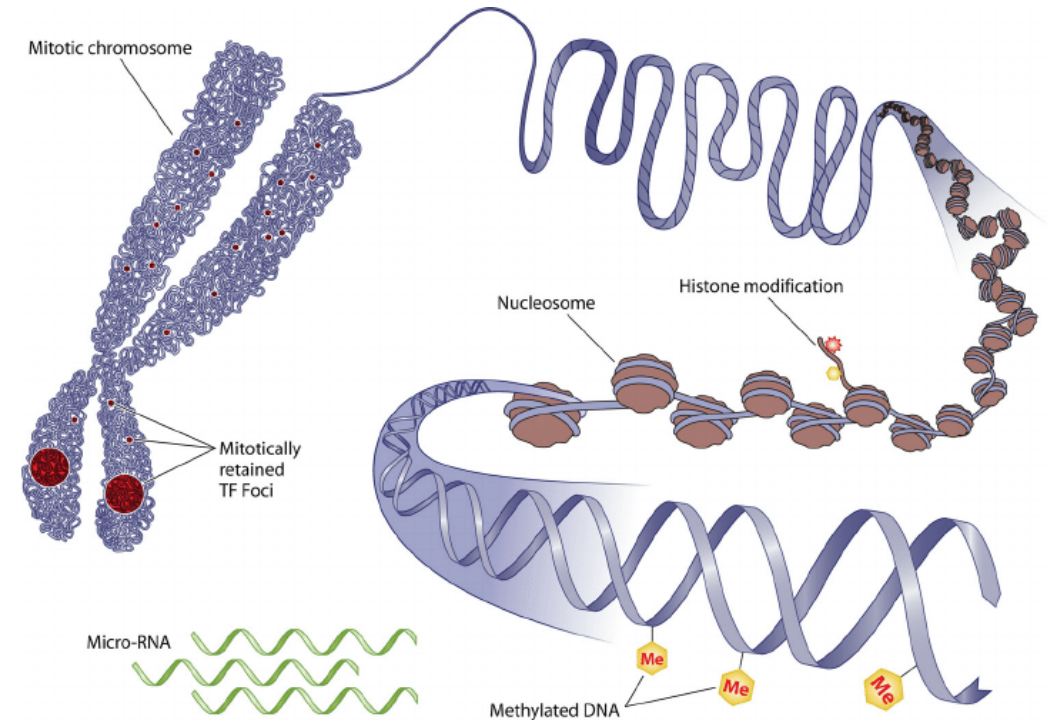
- dvě stejné varianty (alely) daného genu nebo jeho části

Genotyp

- kompletní či genetická informace konkrétního jedince nebo označení alel přítomných v daném genu
- kombinace alel v určitém lokusu na paternálním a maternálním chromozomu diploidního genomu

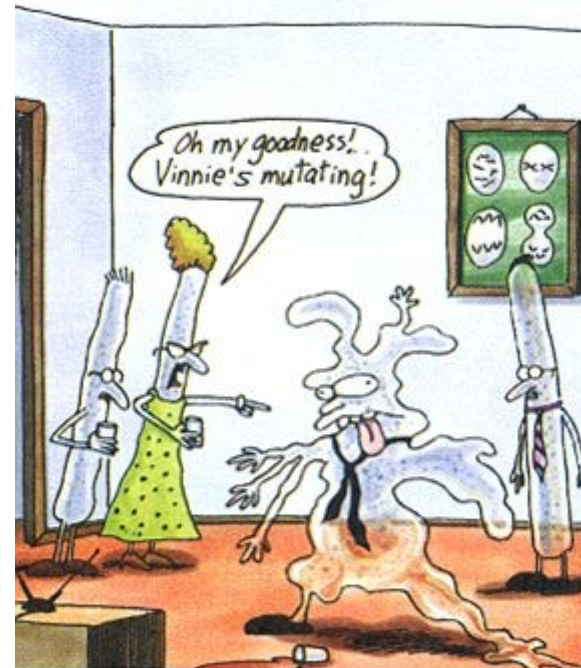
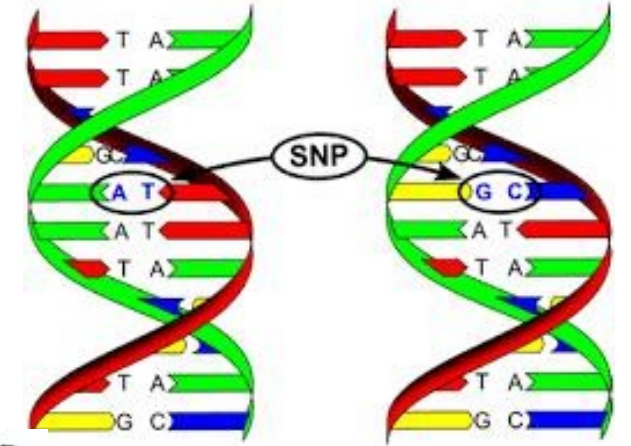
Haplotyp

- skupina genů (lokusů), které jsou ve vazbě a jsou tudíž preferenčně předávány rodiči potomkům pohromadě
- lineární kombinace genů/alel na jenom z homologních chromozomů (výjimečně dochází k rekombinaci)



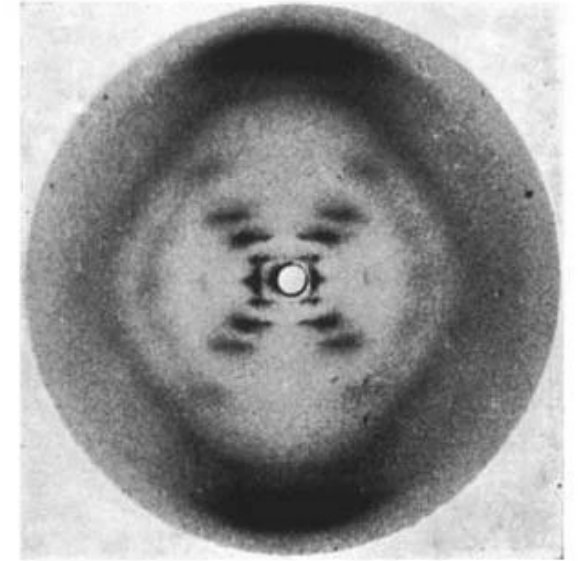
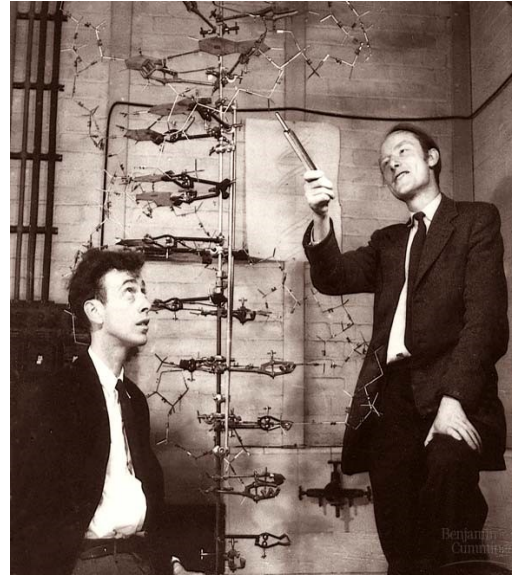
Základní pojmy

- **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 $< 1\%$



Embarrassing moments at gene parties

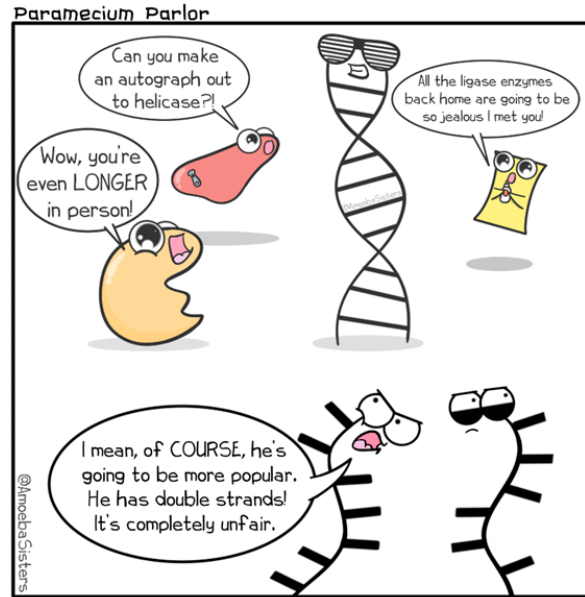
- DNA was discovered in 1869 by Swiss researcher Friedrich Miescher, who was originally trying to study the composition of lymphoid cells (white blood cells). Instead, he isolated a new molecule he called nuclein (DNA with associated proteins) from a cell nucleus



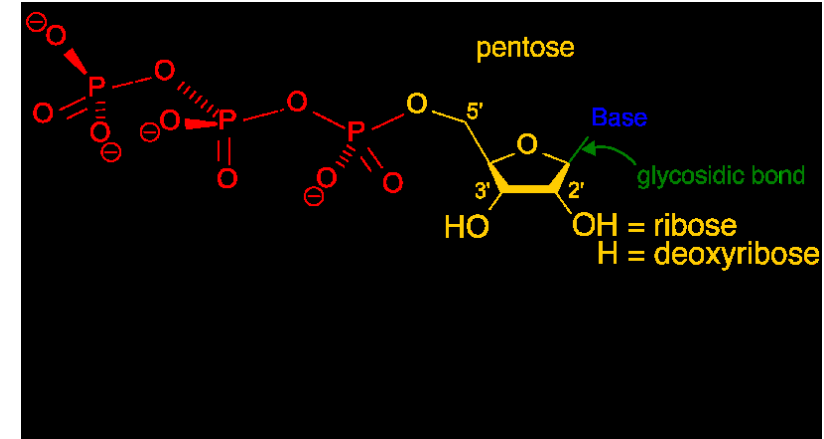
- 1950 - Rosalind Franklin and Maurice Wilkins – X-ray photograph of DNA
- 1953 - James Watson and Francis Crick - deduced how nucleotides are organized within DNA, create a model of DNA- double helix
- 1962 The Nobel Prize in Physiology or Medicine (Watson and Crick)

DNA vs. RNA

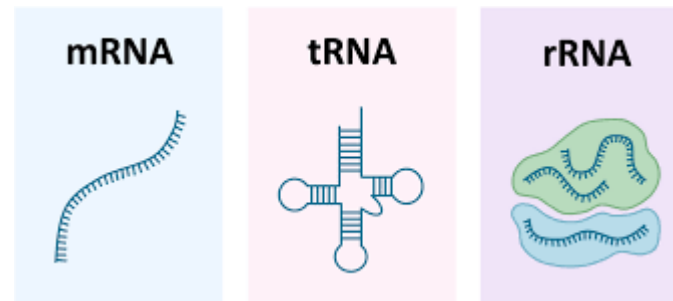
- molekula DNA = **kyselina deoxyribonukleová**
 - Dvoušroubovice – 2 řetězce v opačném směru
 - Polynukleotidový řetězec
 - Dusíkatá báze (T, A, C, G) spojená vodíkovými můstky
 - Zbytek kyseliny fosforečné
 - Cukerná složka – deoxyribóza



Johan decided now was not the time to mention double-stranded RNA.



- 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



DNA (Deoxyribonucleic Acid)

Deoxyribose (sugar)

Generally Double-stranded*

*few exceptions

RNA (Ribonucleic Acid)

Ribose (sugar)

Generally Single-stranded*

*few exceptions

- Adenine
- Thymine
- Cytosine
- Guanine

- Adenine
- Uracil
- Cytosine
- Guanine

@AmoebaSisters

NUKLEOSID × NUKLEOTID × BÁZE × DNA

Nukleotidy = základní stavební kameny NA

A) Nukleová báze

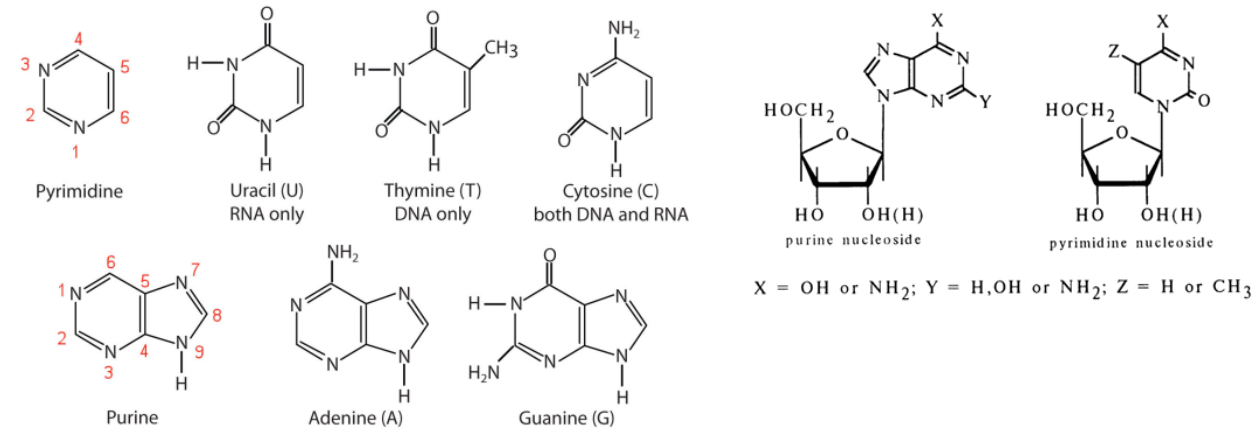
- Puriny – adenin (A); guanin (G)
- Pyrimidiny – cytosin (C); thymin (T - DNA); uracil (U – RNA)

B) Nukleosid

- Nukleová báze + pentóza (ribóza; deoxyribóza)
- N-glykosidická vazba

C) Nukleotid

- Fosforylovaný nukleosid



Další funkce

Skladování a přenos energie

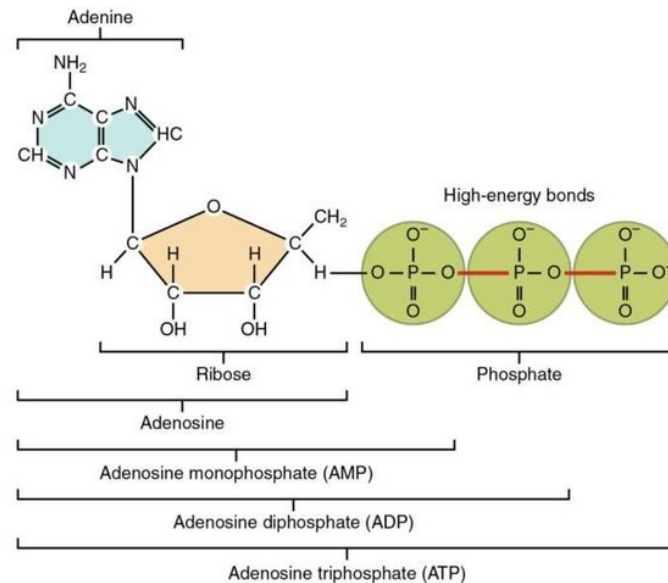
- Hydrolýza fosfoanhydridové vazby
- Většina ATP je intracelulární

Signalní molekuly

- Intracelulární signalizace
- Např. cAMP a cGMP (second messenger)

Koenzymy

- Např. Koenzym A



Adenosin

- stavba NK
- **energeticky** bohaté sloučeniny ATP, ADP, AMP
- kofaktory (koenzym A, NADPH, NADH) -
- radikál v kofaktoru transferázy S-adenosylmethioninu (SAM)
- cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) - **buněčná signalizace**
- vit. B12
- léčivo –antiarytmikum
- funkce neuromodulátoru a homeostatického regulátoru (reg. stability vnitř. prostředí).
- blokáce uvolňování všech aktivujících neurotransmiterů –rozšíření krevních cév a pokles krevního tlaku, adenosin snižuje srdeční frekvenci (léčba tachykardií)
- inhibice agregace krevních destiček
- zvýšené hladiny adenosinu -snižování zánětu- aktivace /inhibice -neutrofilní granulocyty a fagocytózu
- bdění a spánek –inhibice centra probuzení a bdění neurotransmiterem GABA - adenosin - produkt degradace ATP – větší spotřeba ATP buňkou –vyšší konc. – větší tlak na spánek - během spánku –rozklad adenosinu, tvorba ATP -tlak na spánek klesá.
- zvýšená koncentrace v mozku -metabolický stres (anoxie, ischemie, prodloužené období bdělosti) – ochrana mozku potlačením jeho aktivity a zvýšením průtoku krve.
- **kofein se váže na stejné receptory 1.hromadění adenosinu (bez pocitu unavy) 2. aktivace kortizolu a adrenalinu**



VLIV KOFEINU NA SPÁNEK



Prodlužuje dobu
potřebnou k usnutí



Zkracuje celkovou
dobu spánku



Zhoršuje samotnou
kvalitu spánku

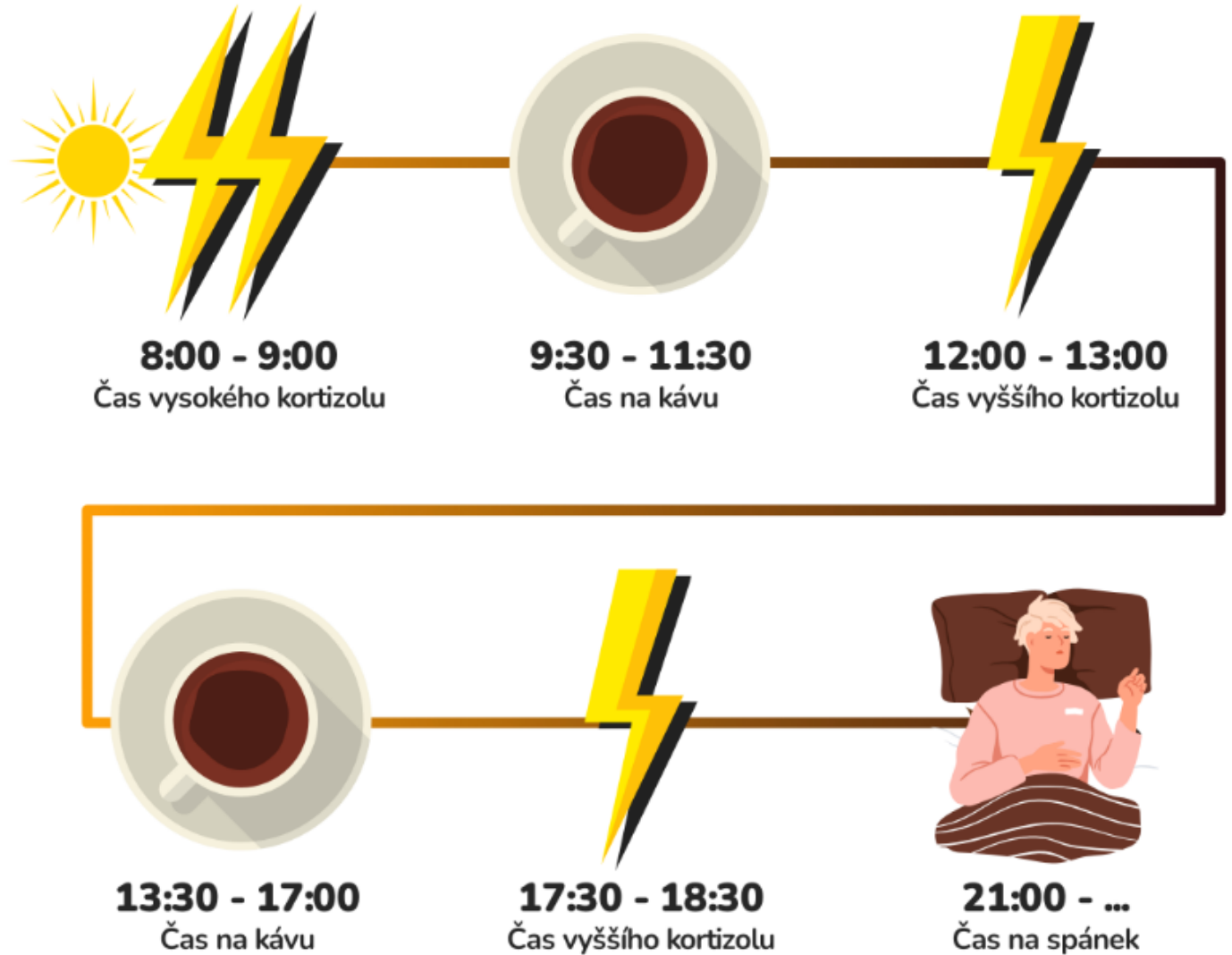


Zkracuje interval
hlubokého spánku



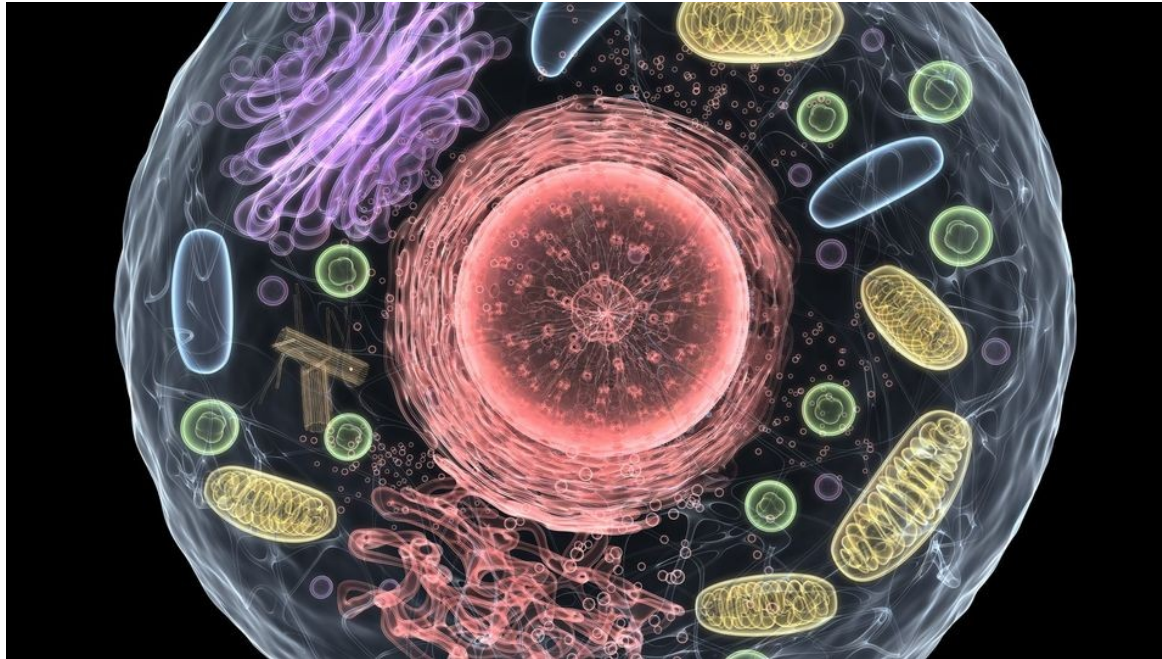
Způsobuje častější
probuzení v průběhu noci

KDY BĚHEM DNE PÍT KÁVU?



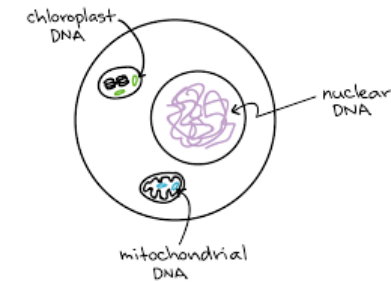
- zvýšená koncentrace v mozku -metabolický stres (anoxie , ischemie , prodloužené období bdělosti) – ochrana mozku potlačením jeho aktivity a zvýšením průtoku krve.
- kofein se váže na stejné receptory –hromadění adenosinu (bez pocitu unavy)

Nukleové kyseliny



INTRACELULÁRNÍ

- DNA - jádro, mitochondrie, „exclusome“
- mRNA a ncRNA (miRNA, siRNA)

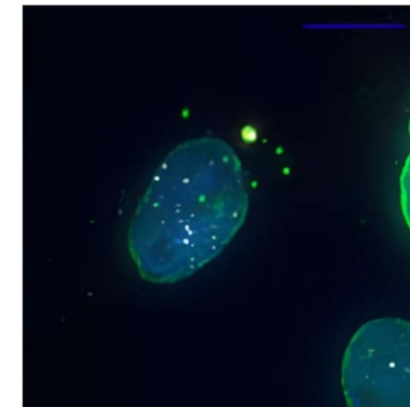
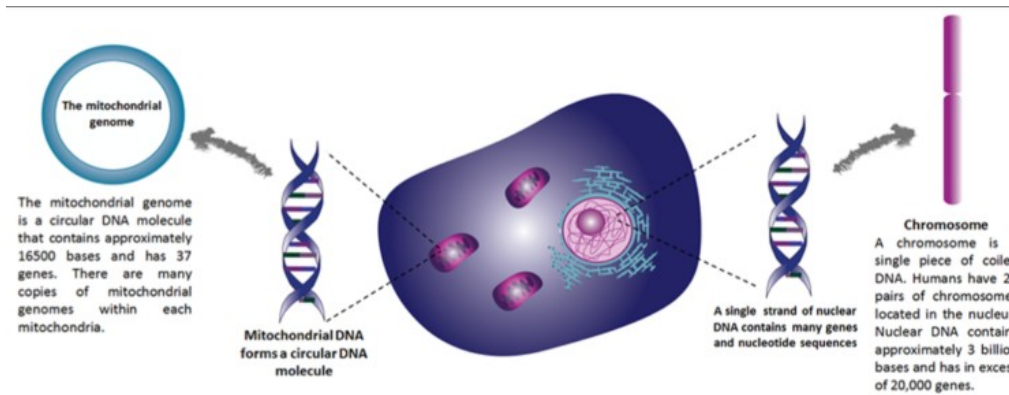


OCTOBER 2, 2023

Editors' notes

Cell biologists identify new organelle present in mammalian cells made of rings of DNA

by Peter Rügge, ETH Zurich

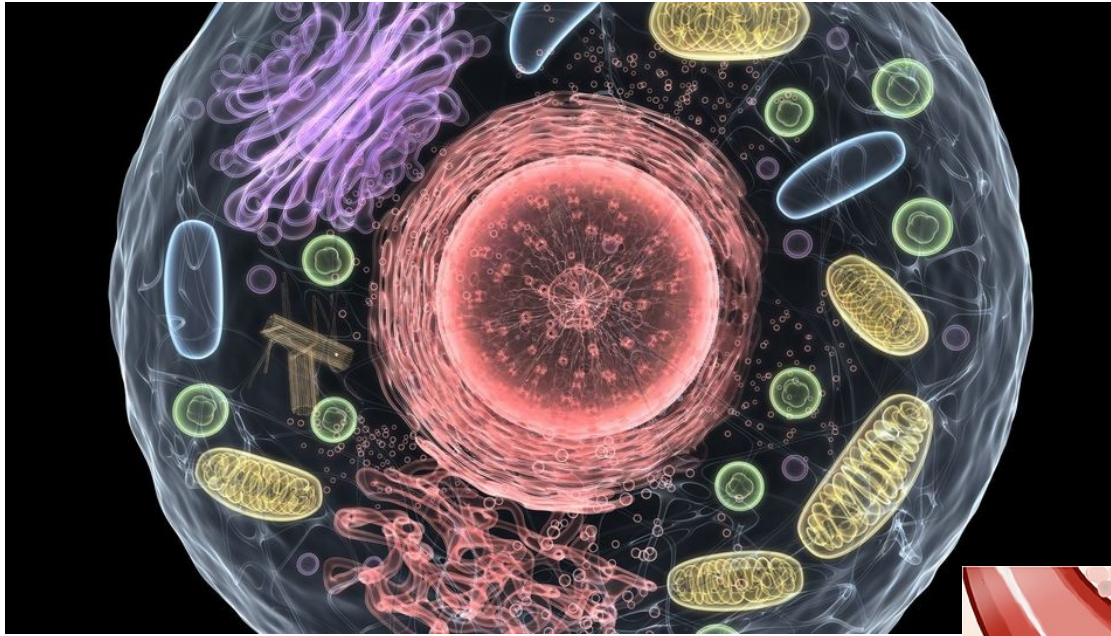


Almost like a moon in a planet, the exclusome (yellow-green dot) lies in the cytoplasm near the nucleus (blu...

Researchers at ETH Zurich recently identified a previously unknown compartment in mammalian cells. They have named it the exclusome. It is made up of DNA rings known as plasmids. The researchers have [published details of their discovery in the journal *Molecular Biology of the Cell*](#).

Hostitelské NK/Infekční částice

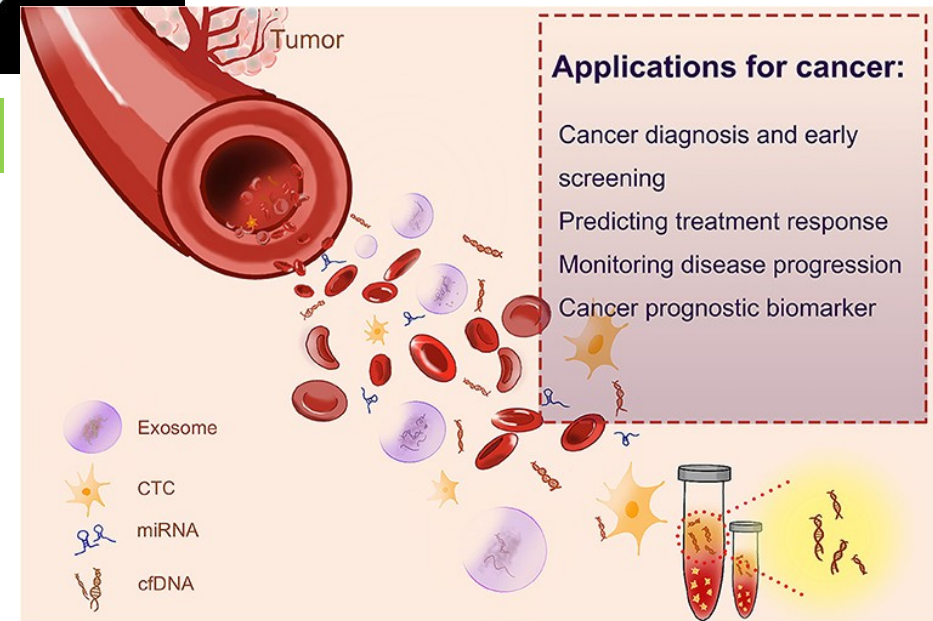
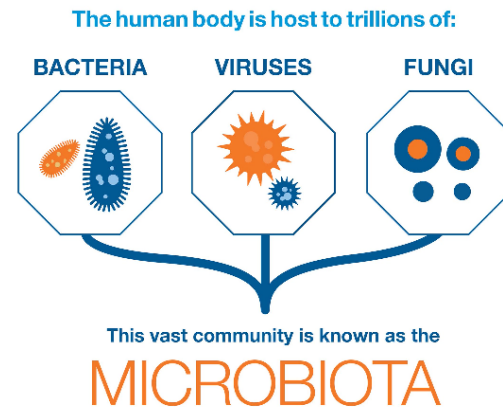
Nukleové kyseliny



EXTRACELULÁRNÍ

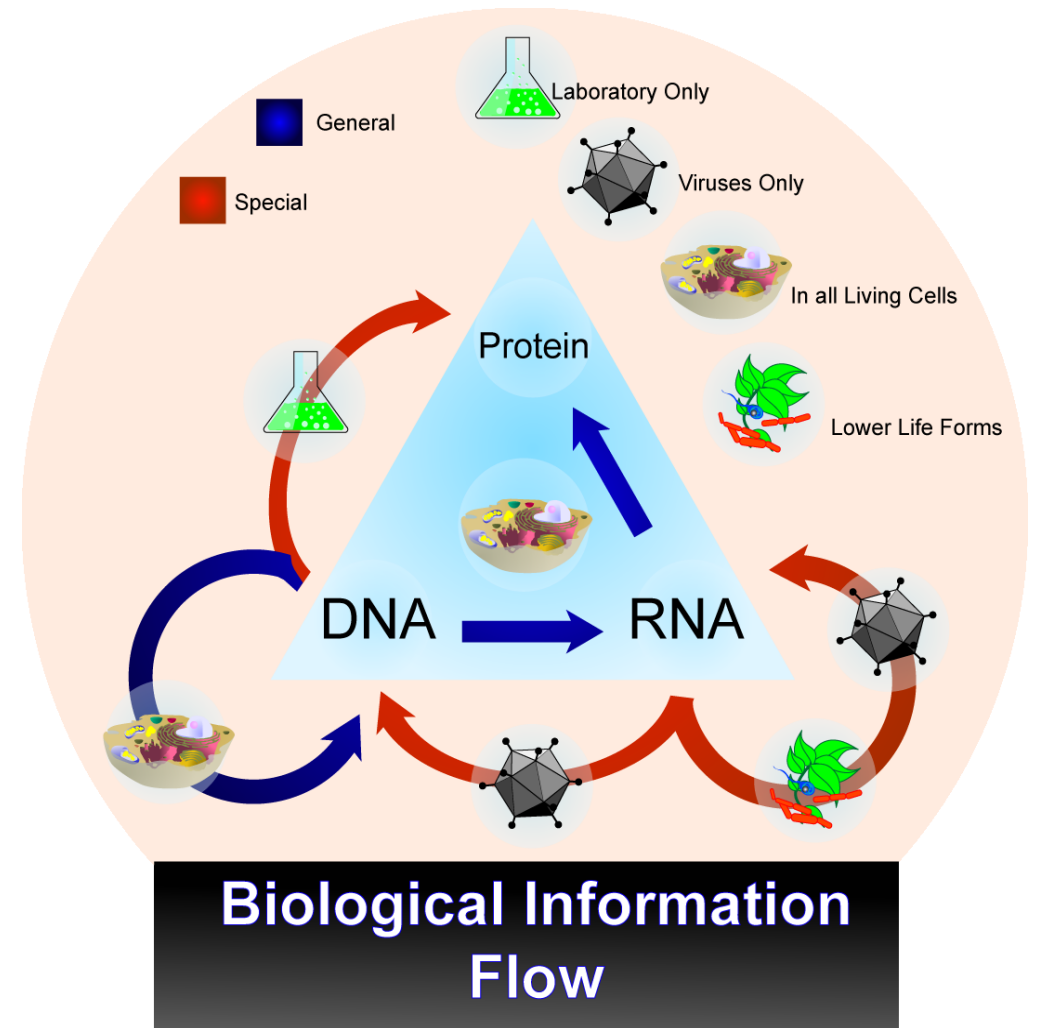
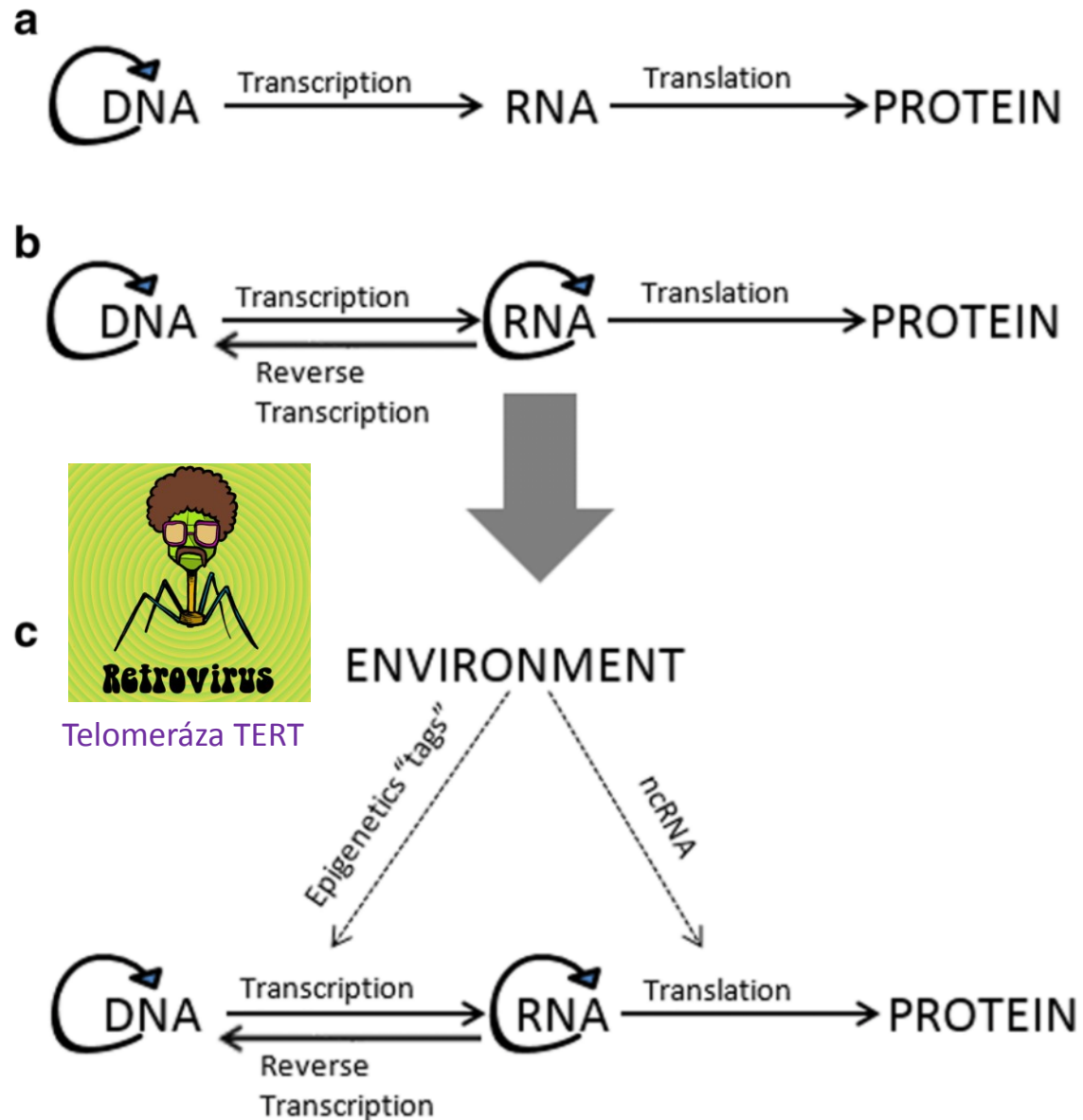
- cirkulující cell-free DNA
- ncRNA
- extracelulární vezikuly
 - exozomy, mikrovezikuly, apoptická tělíska
 - nesou gDNA, mtDNA, RNA, proteiny, lipidy

Hostitelské NK/Infekční částice/Mikrobiom



Liquid biopsy

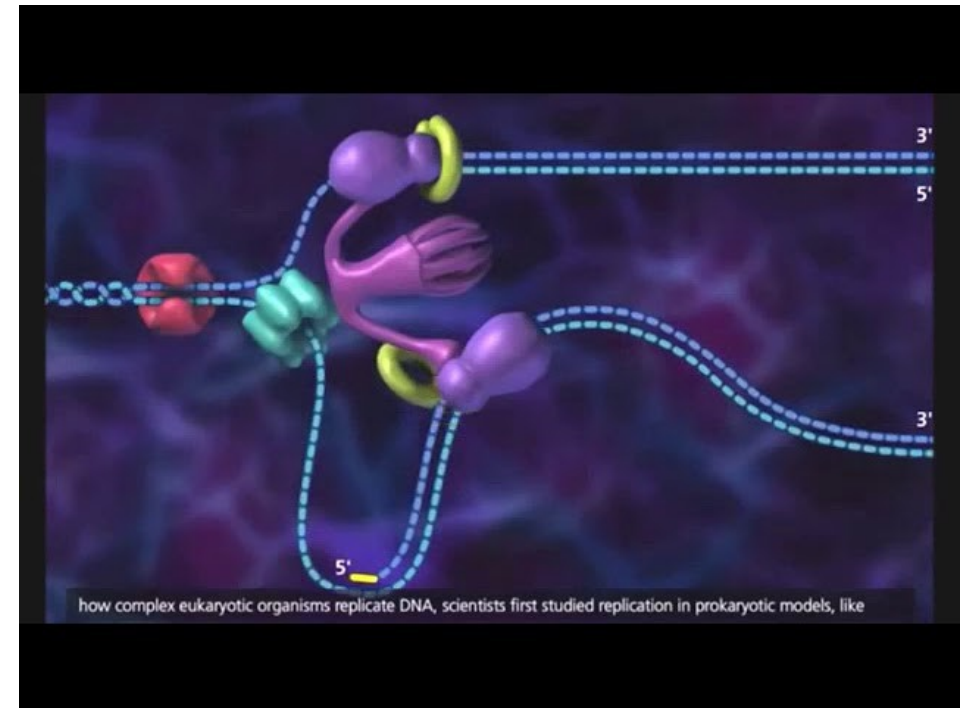
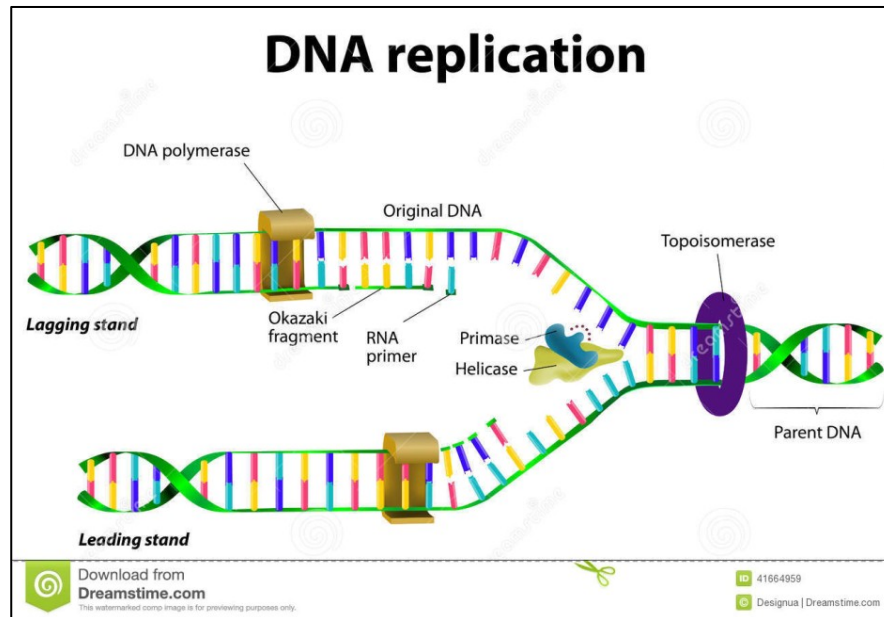
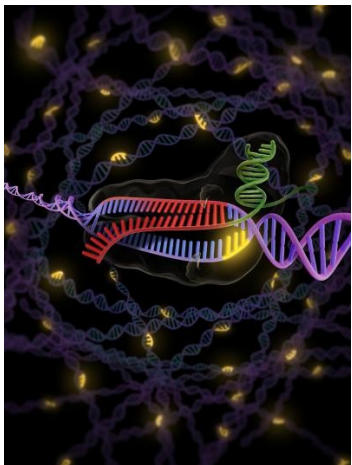
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ DOGMA



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



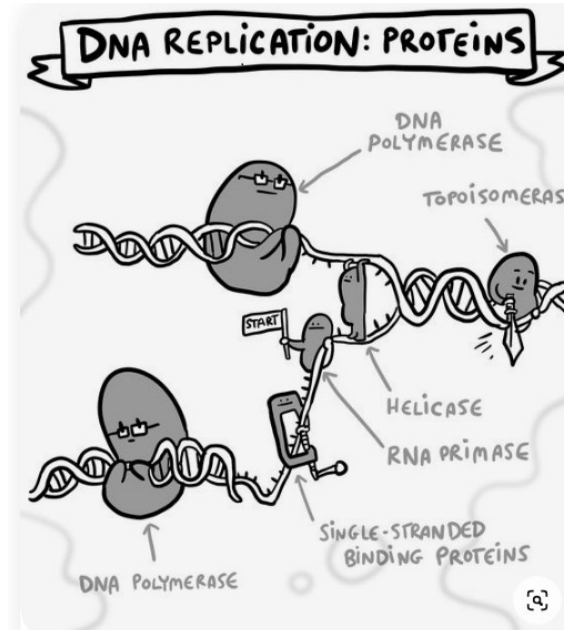
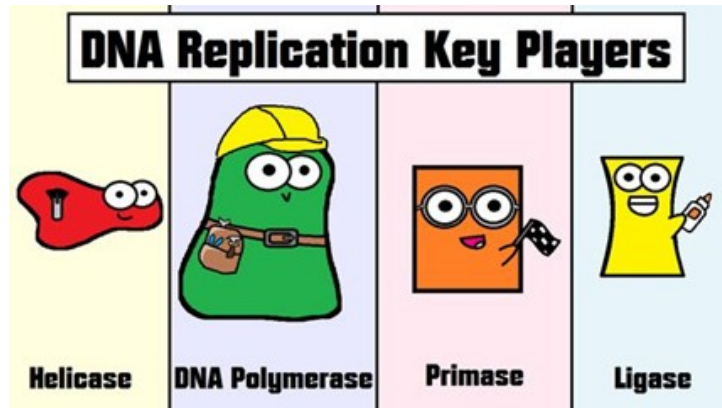
Replikace DNA

- Replikace je zahájena ve specifických místech – počátcích replikace („origins“)

Vznik replikační vidlice

- **helikáza** – umožňuje oddálit obě molekuly dvojšroubovice
- **SSB proteiny** – napomáhají udržet vlákna rozdělená

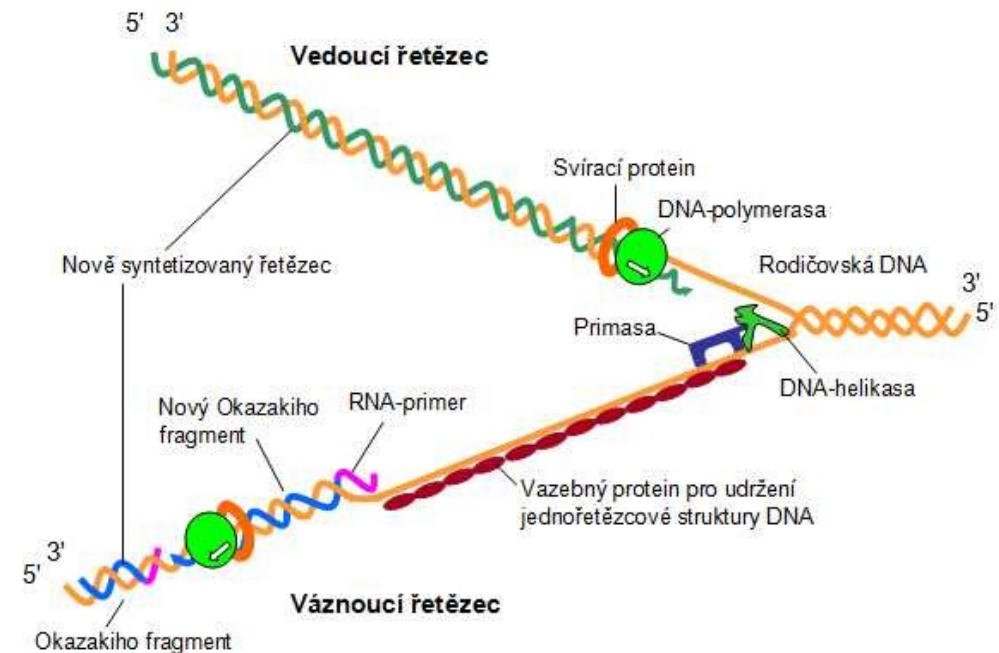
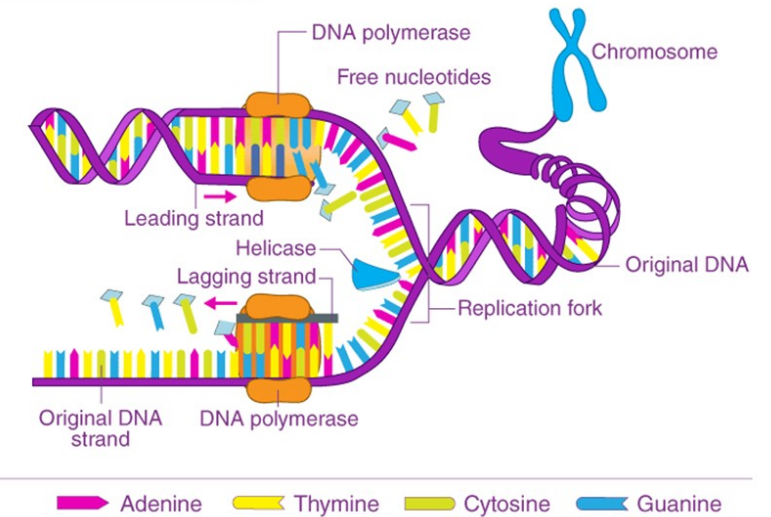
- **DNA primáza** – tvorba RNA primerů



- **DNA polymeráza** – katalyzuje prodlužování řetězce

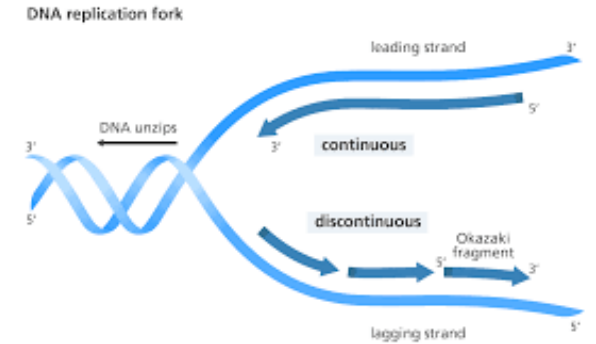
- sekvence nového vlákna -komplementarita bází - **adenin + thymin** (2 vodíkové můstky) a **cytosin + guanin** (3 vodíkové můstky)
- syntéza od 5' konce ke 3' konci

DNA REPLICATION

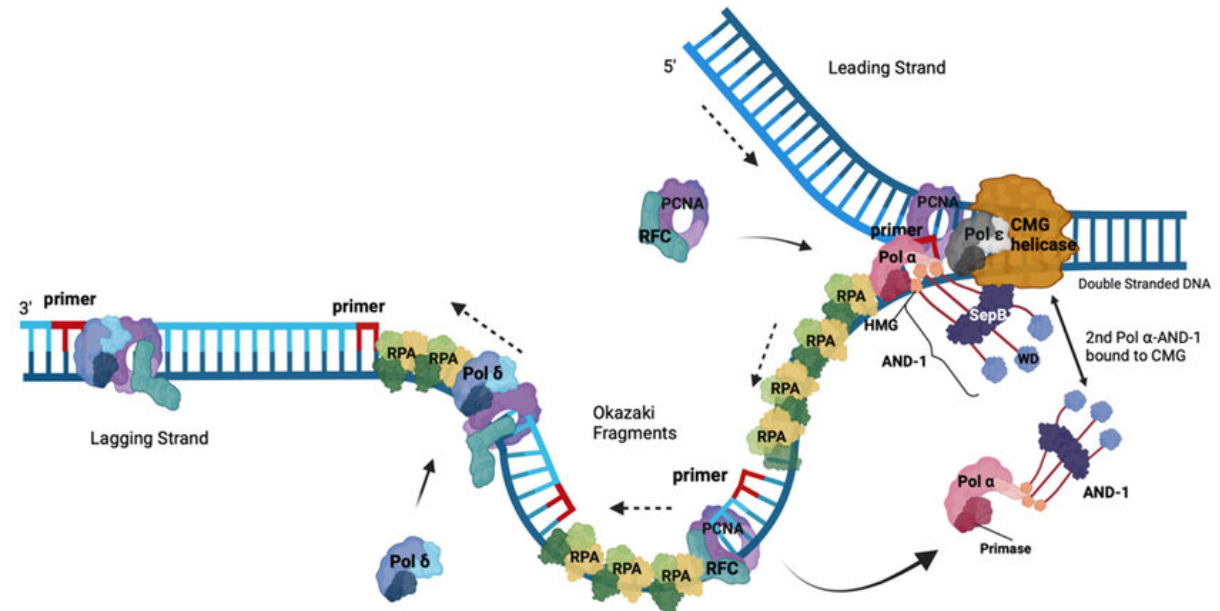
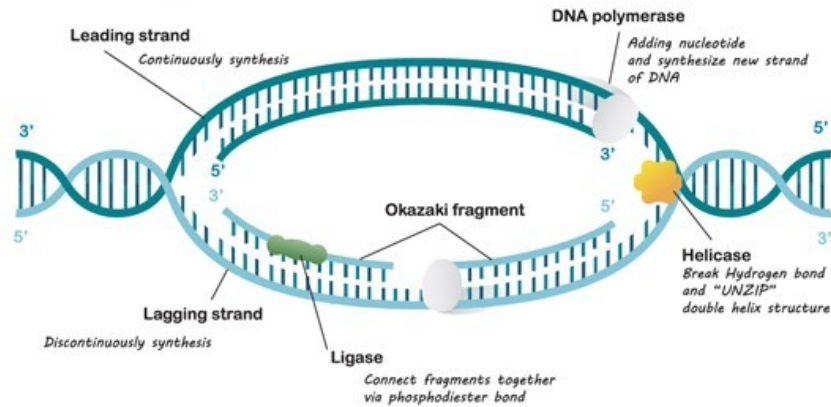


Replikace DNA

- 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



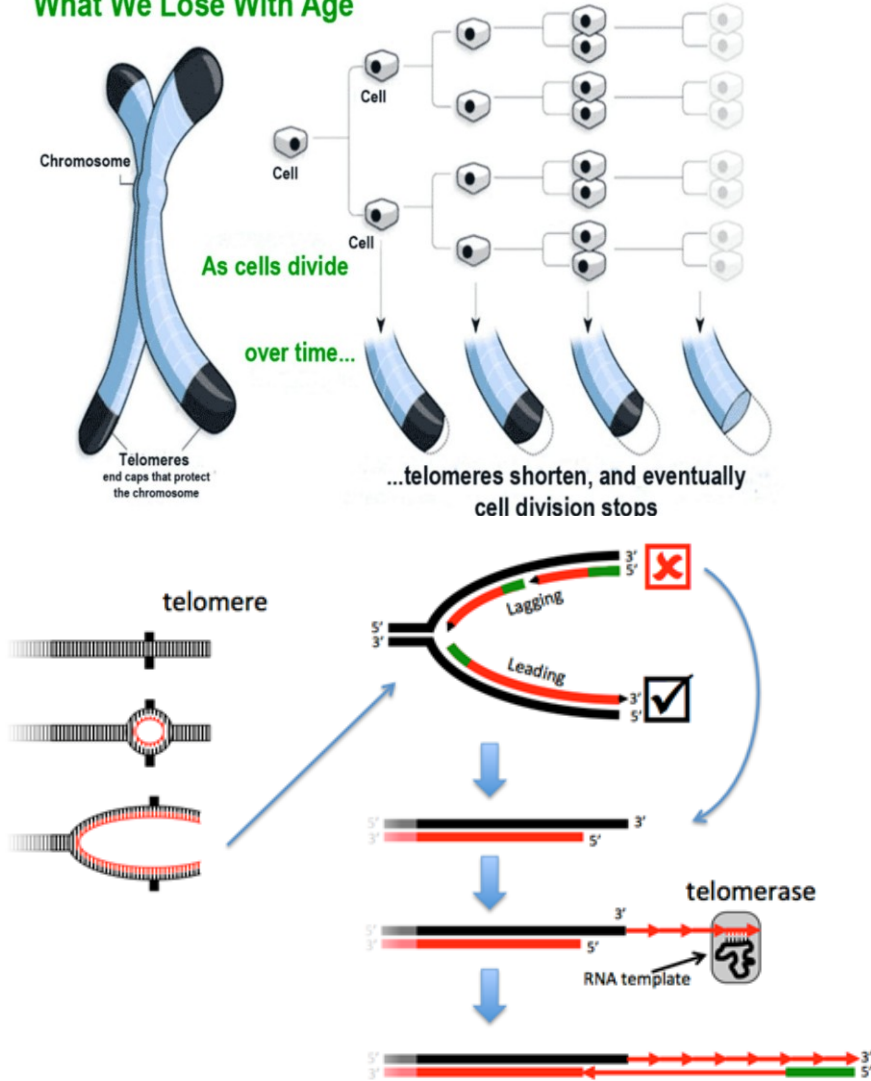
DNA Replication



Hayflickův limit pro každou buňku (replikativní senescence)

- během každého cyklu se 5' konec zkracuje (odstranění primery z okazakiho fragmentu) - ztráta 5-200 bp - průměrná doba - 40 -60 dělení

What We Lose With Age



Black Represents Parental DNA Strands
Red Represents Newly Synthesized DNA Strands
Green represents RNA primer

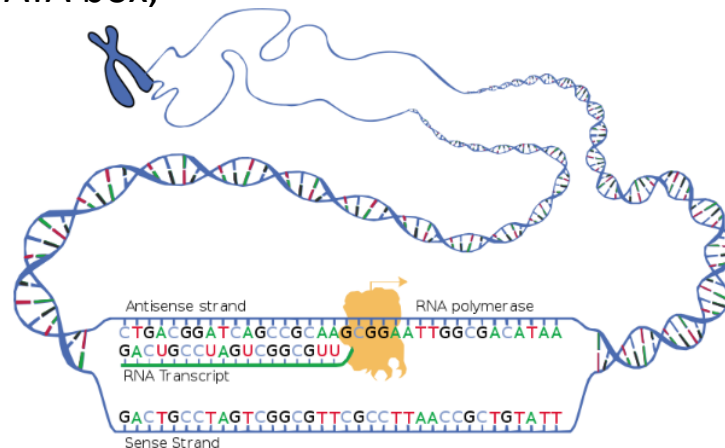
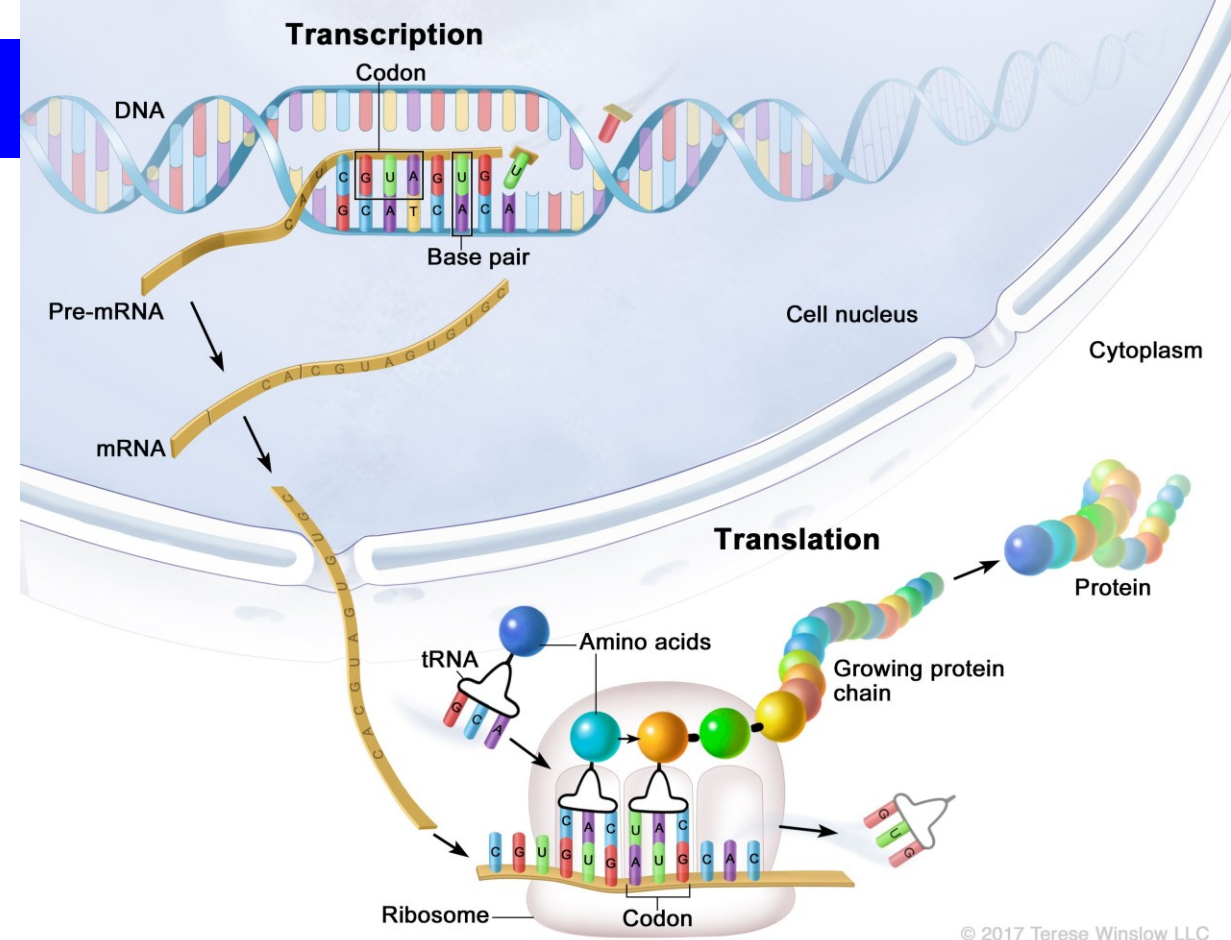
Replikační aparát musí čelit exogenním a endogenním vlivům, které mohou ovlivnit jeho postup zástavou replikačních vidlic. Hromadění zastavených replikačních vidlic a jejich případný kolaps vedoucí k formaci zlomů na DNA, které představují zásadní hrozbu pro integritu genomu, se nazývá replikační stres.

REPLIKAČNÍ STRES (prof. Jiří Bártek)

- Nádorová transformace - mnohokroková záležitost: První změna – zpravidla aktivace onkogenu způsobená (toxických látek v prostředí, kouřením, ozářením či metabolickou změnou) – vyvolá chaos v procesu replikace genomové DNA, **replikační stres**, který buňka detekuje a reaguje na tento stav „nebezpečí nádorové přeměny“ apoptózou.
- Selhání kontrolních mechanismů apoptózy - nekontrolovatelné dělení poškozené buňky – další replikační stres - chromozomální zlomy a mutace DNA. Replikační stres pak působí opačně, místo sebevraždy vyvolává další a další mutace.
- Replikační stres se dá měřit (u přednádorových buněk)

Transkripce

- **přepis** informace ze 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



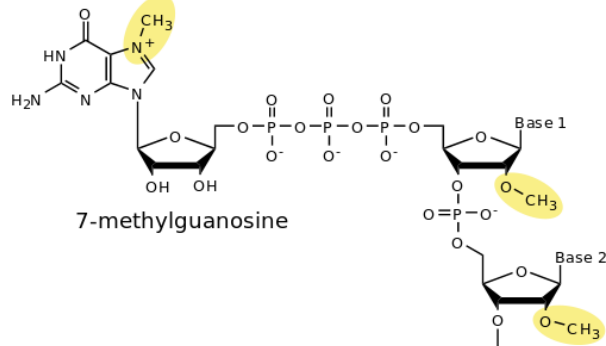
Posttranskripční modifikace

Modifikace primárních transkriptů:

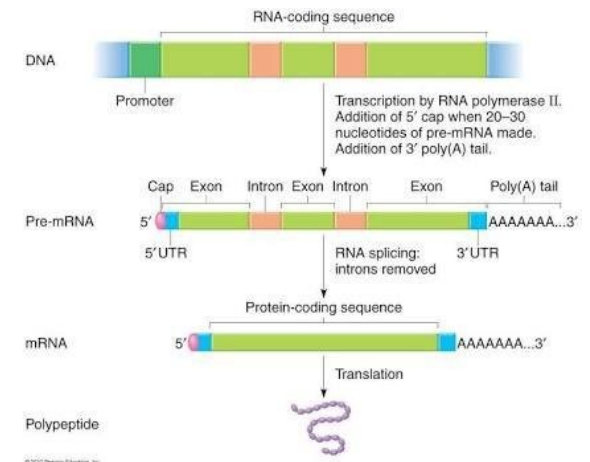
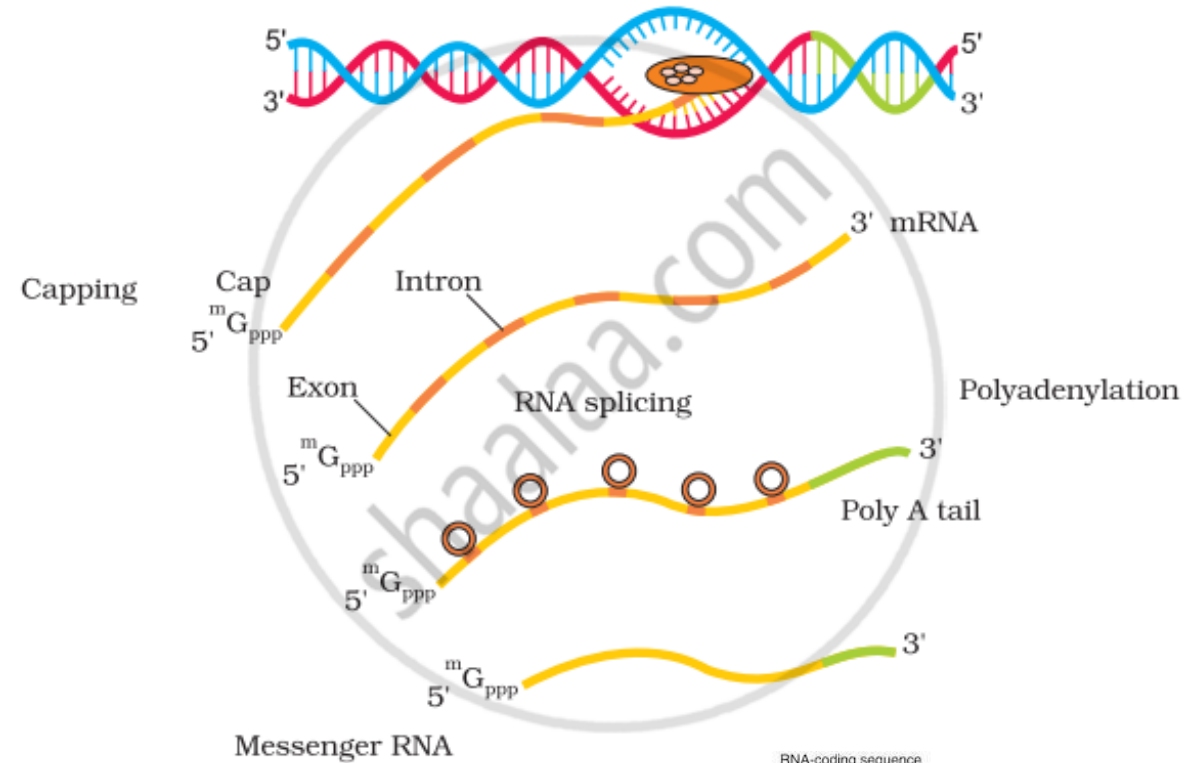
- Připojení **čepičky** na 5' konec (podílí se na řízení translace mRNA)



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)

- Fáze – iniciace, elongace, terminace
- Enzym - Aminoacyl-tRNA syntetáza (20 druhů)

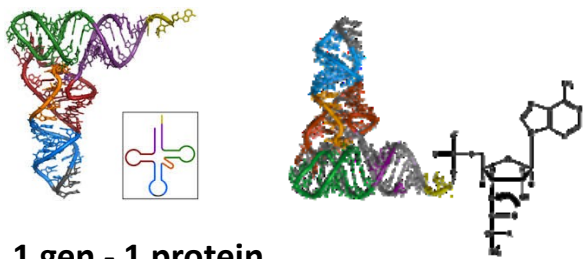
ligáza - navázání AMK na tRNA; katalyzuje:

1. navázání AMK k ATP - aktivace a vznik aminoacyl-adenylát (přechodný produkt -tRNA, na 3' – adenosin)
2. připojen přes karboxylovou skupinu aminokyseliny k 2' nebo 3' hydroxylové skupině koncového adenosinu tRNA molekuly, čímž vzniká tzv. aminoacyl-tRNA - putuje na A-místo ribozomu - místo translace
3. proofreading – hydrolýza AMK a tRNA

Iniciační komplex se tvoří na 5' konci mRNA (čepička), zkoumá mRNA od 5' konce a

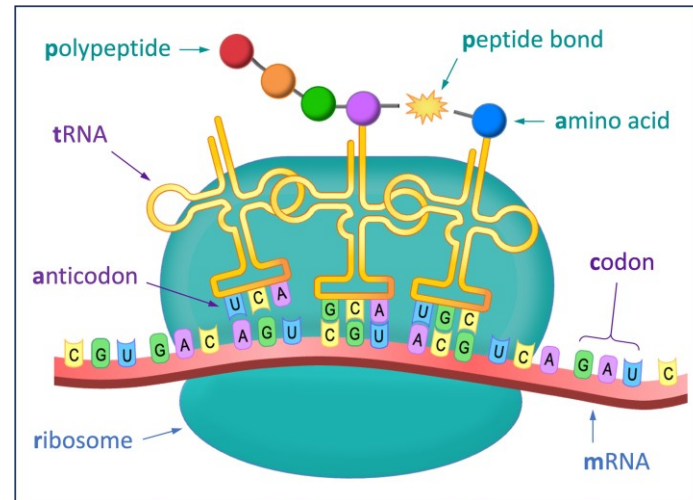
hledá **iniciační kodon AUG**

- Terminace translace: **UAA, UAG, UGA**

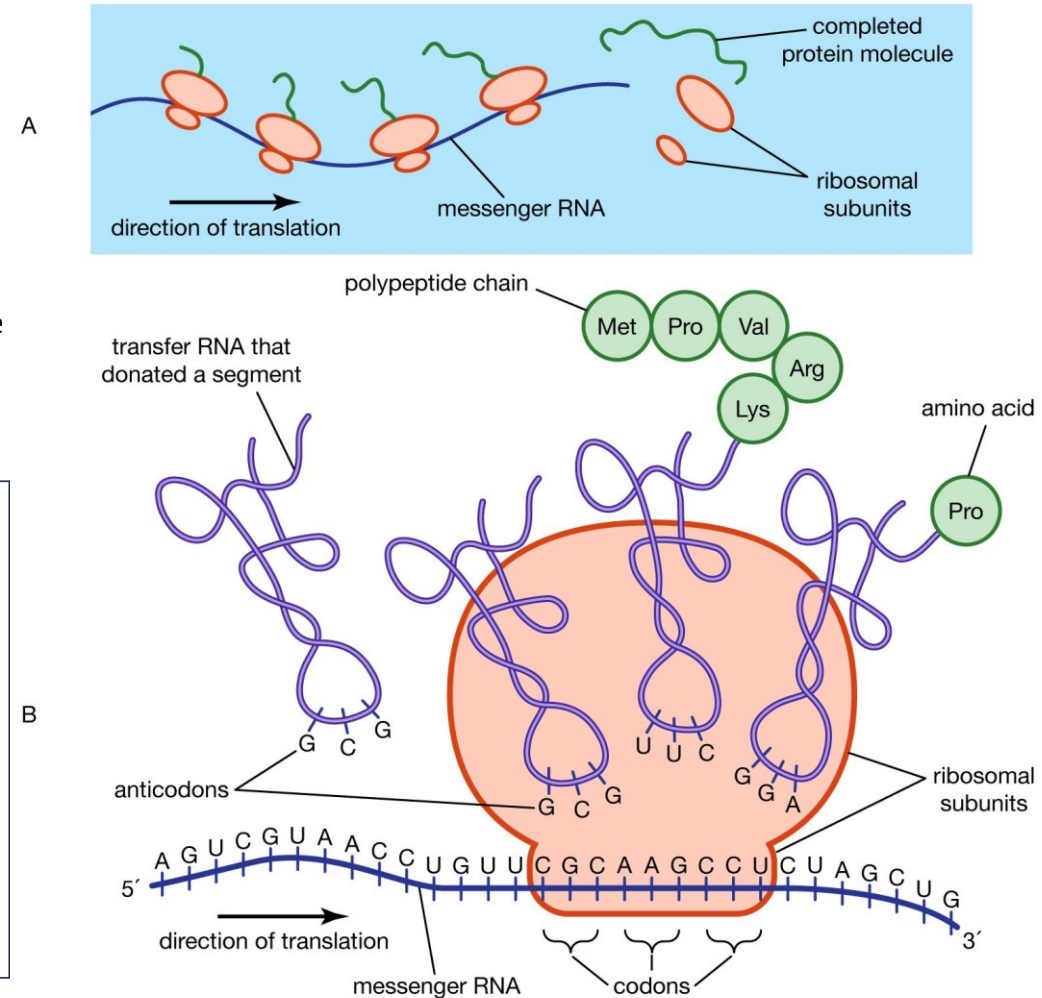


- **1 gen - 1 protein**
geny kódující více proteinů:

Alternativní sestřih
Různé čtecí rámce
Různá místa iniciace a terminace
Přeskok v čtecím rámci
Epigenetika

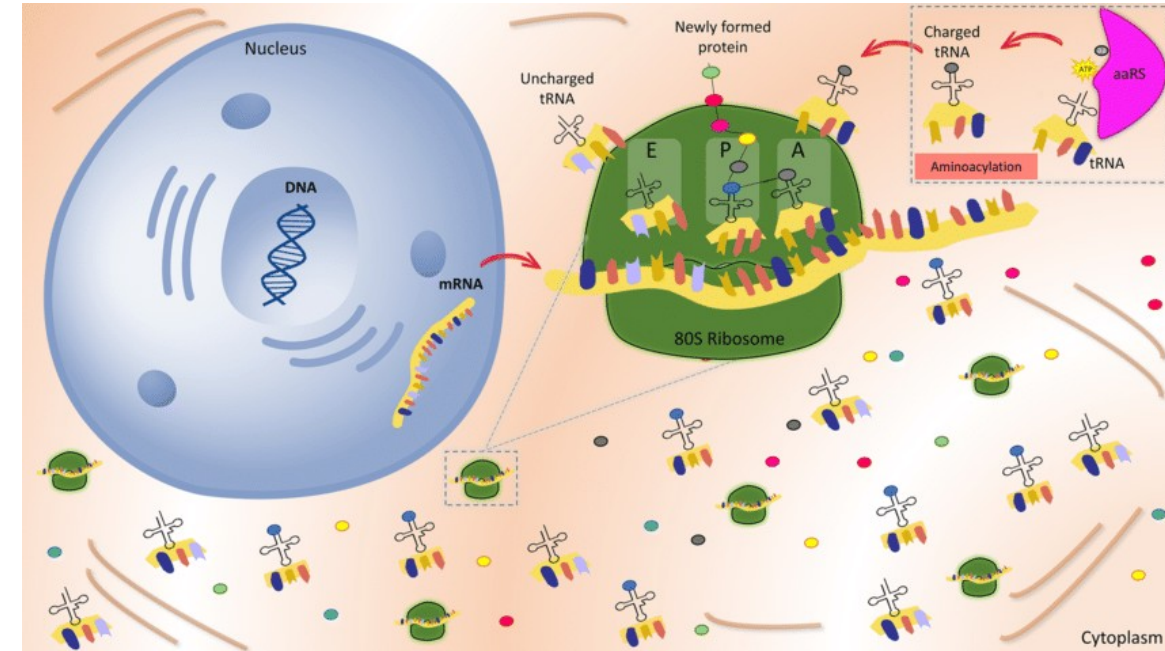


- 1 protein - potřebný pro více biolog. procesů
- 1 biologický proces - více proteinů

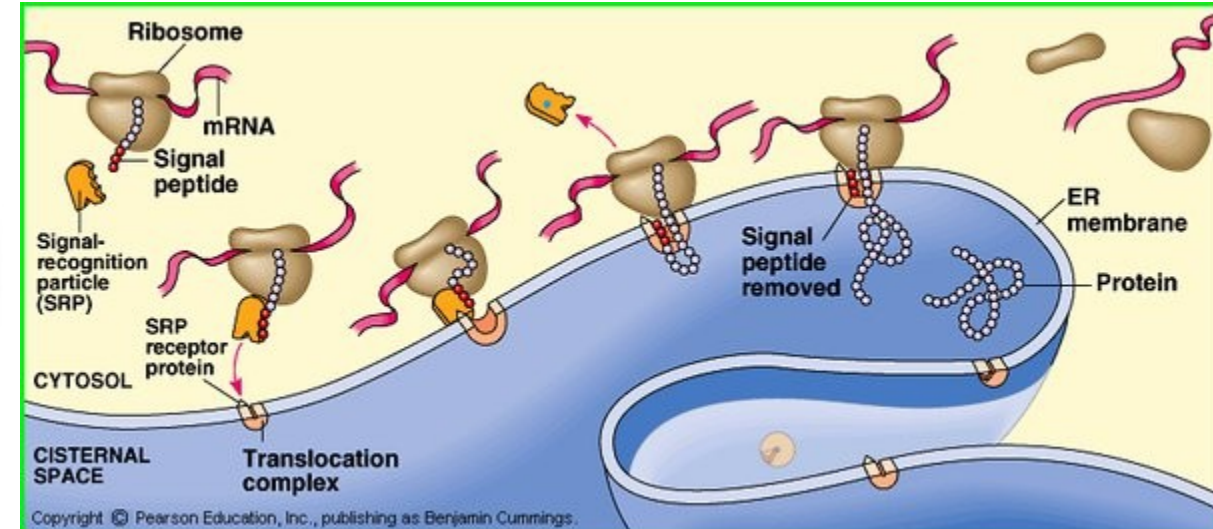
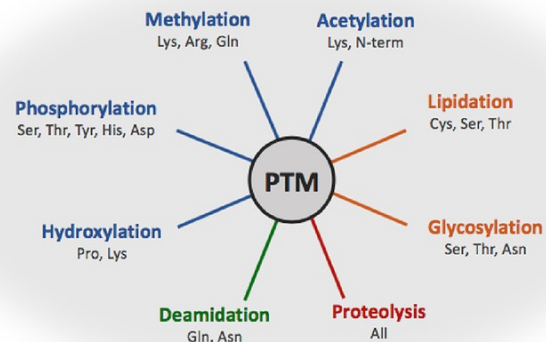


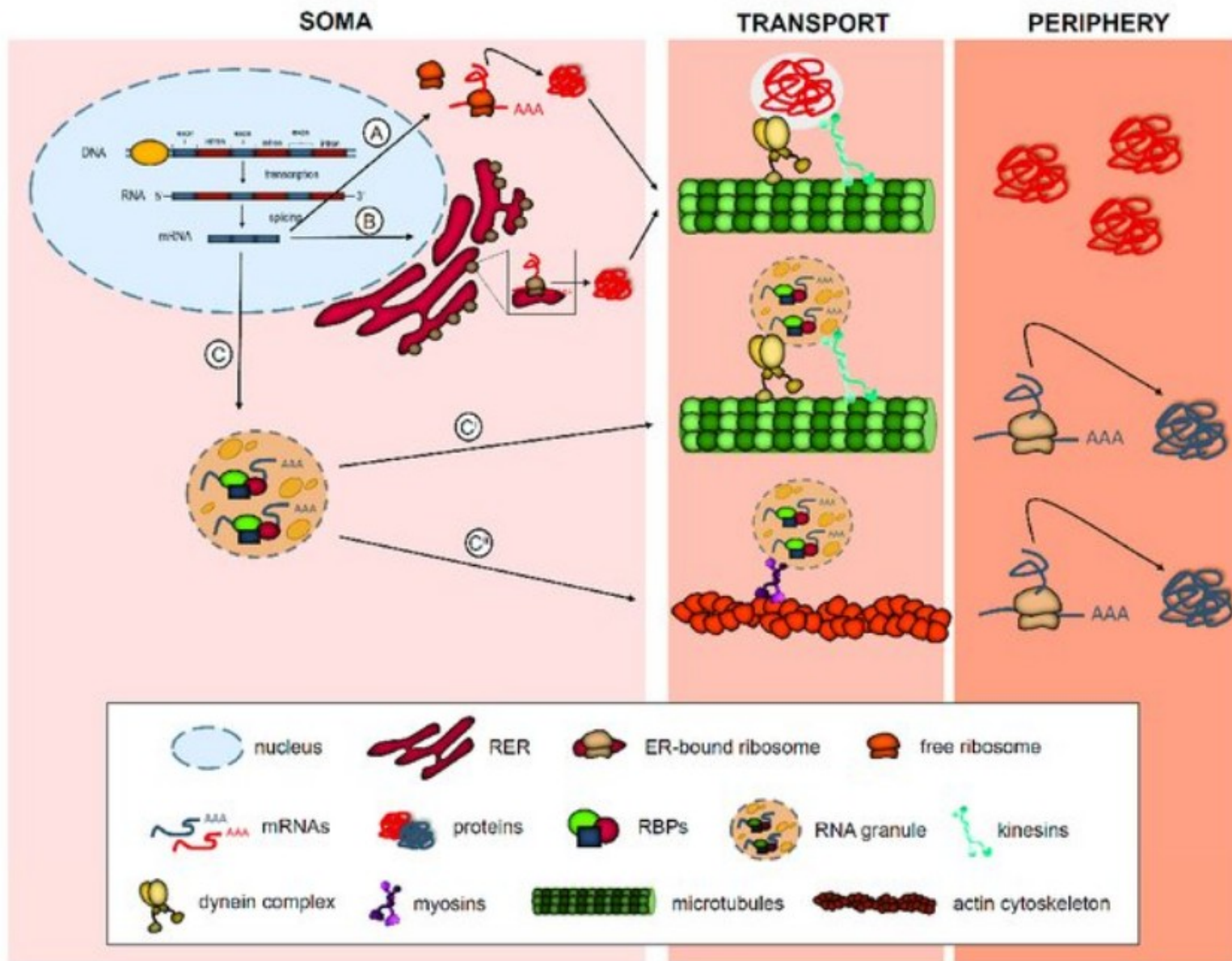
Translace

- **1. translace na ribozomech v cytosolu**
- **2. translace na ribozomech vázající se na RER**
mRNA pro polypeptid (protein/ prekurzor hormonu) sekretovaný z buňky ven/ součást membrány
- *The attachment is always **temporary** (depends on the cell's need to secrete)*
- *An individual ribosome might be membrane-bound when it is making one protein, but free in the cytosol when it makes another protein*
- *Proteins bound for a variety of locations (ER, Golgi, lysosomes, plasma membrane, secretion...) are translated by ribosomes in the cytoplasm but need to get into the ER.*
- *The signal required for their transport into the ER is **a short signal sequence at the beginning of the protein**. When this begins to emerge from the ribosome's exit tunnel -- before translation of the rest of the protein -- it binds to a signal recognition peptide (SRP) that guides the ribosome to bind the ER. Then the protein can be channeled directly into the ER as translation continues. When translation finishes, the ribosome dissociates from the ER again.*



Posttranslační úpravy
organelové cílení
složení do aktivního stavu
terciální a kvartérní struktura





- cells consume a **large amount of their available energy** for the process of **translation and for protein folding**, it is not surprising that most stresses cause an inhibition in global protein synthesis
- **stress** (cancerogenesis-hypoxia, acidosis and nutrient starvation) - cause the **accumulation of unfolded proteins in the ER** - a major organelle that is involved in protein synthesis, preservation of cellular homeostasis, and adaptation to unfavourable environment; **folding capacity of the ER is limited.**
- the accumulation of unfolded proteins in the ER causes **stress triggering** an unfolded protein response in order to promote cell survival or to induce apoptosis in case of chronic stress.
- **synthesis of "housekeeping" proteins is paused** in stressed cells, whereas the translation of a pool of proteins necessary for the adaptive stress response is maintained, via **alternative mechanisms of translational initiation**
- **ER stress triggers activation of the unfolded protein response (UPR)** - alters **both transcriptional and translational programs** to coordinate adaptive and/or apoptotic responses
- **UPR aims to restore cellular homeostasis** and to promote cell survival by inhibiting protein synthesis, improving protein folding ability, increasing the degradation of unfolded proteins. However, when damages are irreversible after intense and prolonged activation, **UPR induces cell death.**

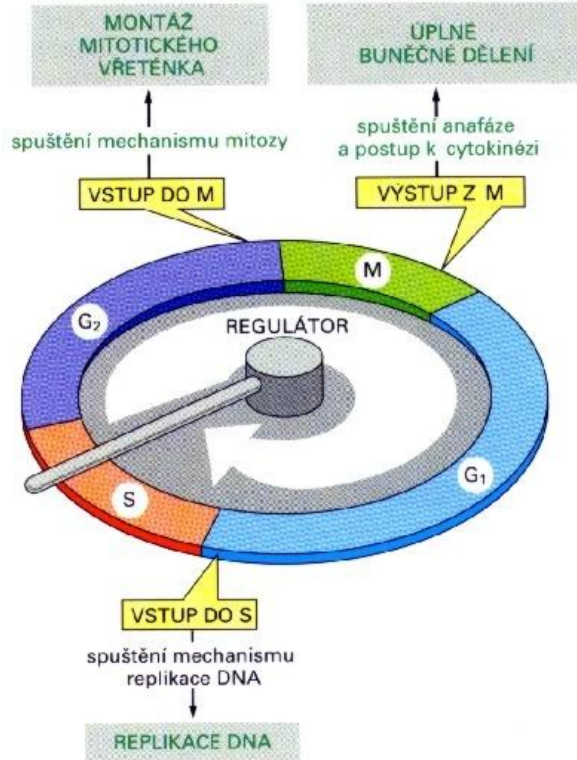
Figure 1. Simplified model of protein and mRNA trafficking in eukaryotic cells. Typically, proteins are thought to be synthesized in the soma by free ribosomes (A) or endoplasmic reticulum (ER)-bound ribosomes (B) and then transported to different destinations in the cells where they elicit their function. Some mRNAs associate to RNA-binding proteins (RBPs) and are transported in RNA granules (C) by microtubules using motor proteins kinesin and dynein (C i) or by actin using myosin (C ii). Once they reach the target compartment the mRNAs are translated into protein.

Buněčný cyklus

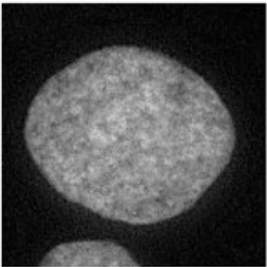
= uspořádaný sled procesů, při kterých buňka zdvojí svůj obsah a následně se rozdělí na dvě buňky dceřiné (každá z nich ponese stejné chromozomy)

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**



regular cell



dividing cell

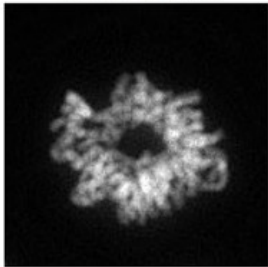


Image of chromosomes in uncondensed form (left) and condensed form in dividing cell (right).



Harry has the little talk about the birds and the bees.

Prokaryotic Cells



Buněčný cyklus

Interfáze – G1, G2, S (90%)

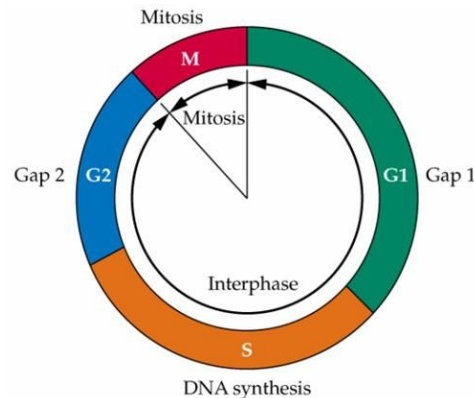
- **příprava** na buněčné dělení, vnější jaderná membrána je spojená s ER
- **nepříznivé podmínky**
 - setrvání v G1/vstup do G0; buňky nerostou, mohou tak setrvat i několik měsíců/let

G2-fáze

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

S-fáze

- replikace DNA
- syntéza proteinů asociovaných s DNA



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)

M fáze (mitotická)

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

genes become “silent” during cell division, not being transcribed into proteins or regulatory molecules?

how genes get properly re-activated after cell division?

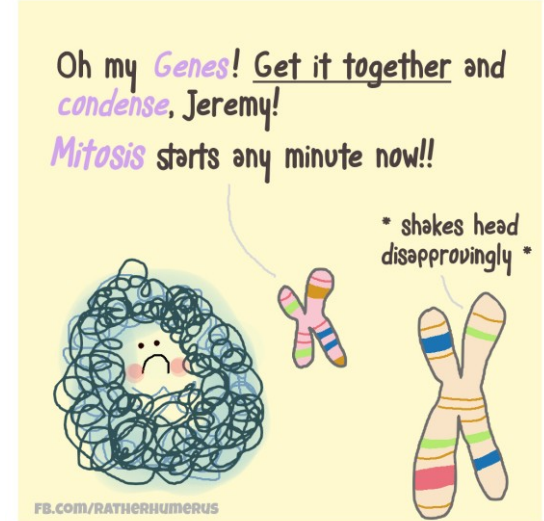
Although chromosomes are extremely compact during cell division gene expression was still on – albeit at a low level – during replication

“What ultimately drives cell differentiation are sequences of enhancer molecules located away from the gene they act on.

far-away modifiers “nap” during division, since it only lasts about 30 minutes – relatively quickly in biological terms – and come back online after a cell division cycle is complete.

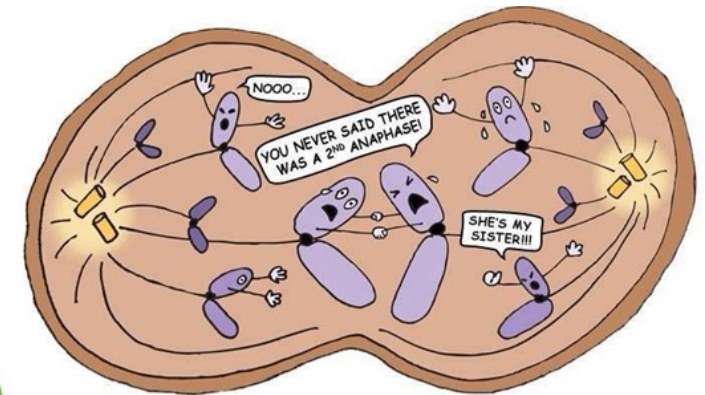
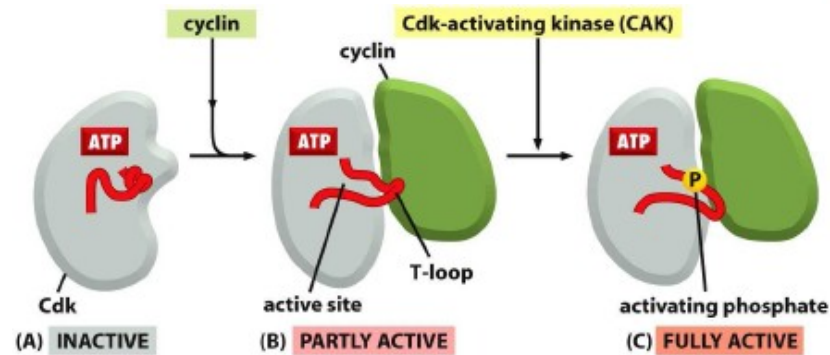
Buněčný cyklus

- 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



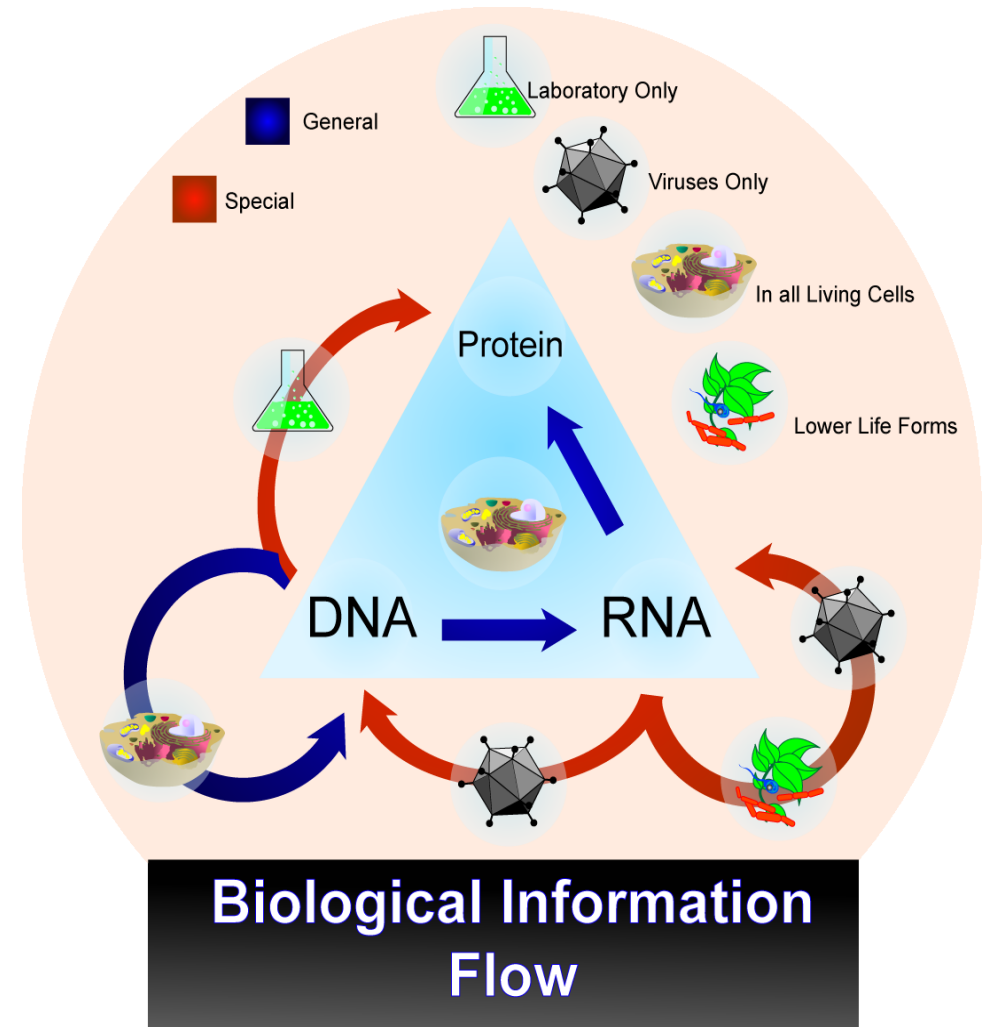
- řídicí elementy – **cyklin dependentní kinázy**

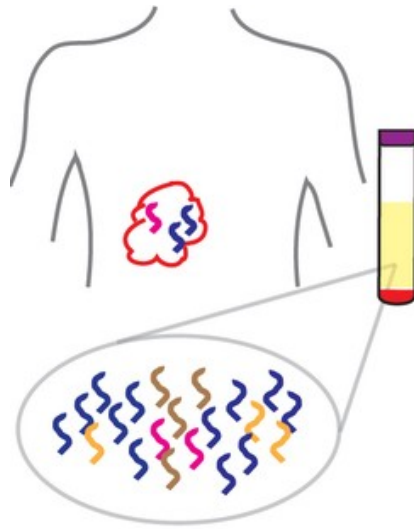
- **řídí aktivitu** mnoha proteinů zapojených do replikace DNA a mitózy tím, že je ve specifických místech **fosforylují** (aktivace/inaktivace)
- Cyklin + CDK -> komplex se připojí na protein -> fosforylace proteinu -> po fosforylaci se komplex rozpadne a dojde ke změně aktivity proteinu



Metody molekulární biologie

- DNA
- RNA
- PROTEIN





Práce s biologickým materiálem
 PLNÁ KREV - PLAZMA, SÉRUM ,SLINY, BUŇKY, TKÁŇĚ, 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
4. Micro-arraya

Sekvence

Klonování v plasmidech, Zásah do genové exprese, CRISPR

Epigenom

metylace DNA
 histonové modifikace

RNA - mRNA

Analýza genové exprese

Nothern Blott
 Real-Time PCR

Analýza transkriptomu

MicroRNA

Analýza exprese
 Interference

PROTEIN

Analýza proteinů

Imunohistochemické metody

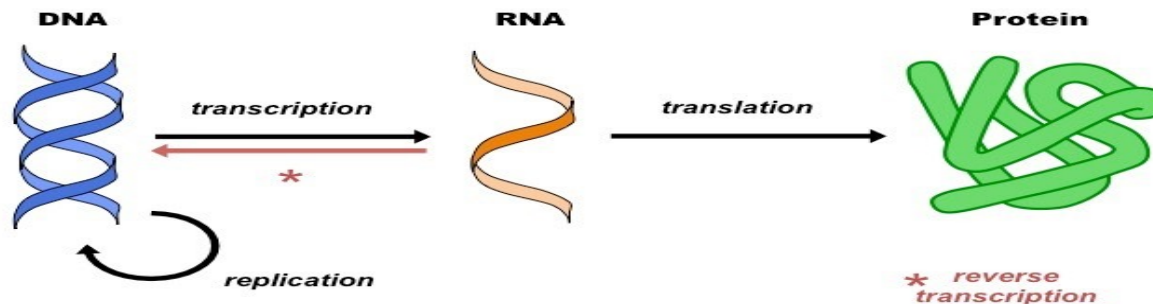
1. Western Blott
2. ELISA

Analýza proteomu

MS

Analýza buněk

Průtoková flow-cytometrie



Single dose of zilebesiran safely and effectively lowered blood pressure for six months

American Heart Association Scientific Sessions 2023, Late-Breaking Science Abstract in LBS.04

New drug zilebesiran effectively lowers blood pressure for six months, study finds

100/100

Download PDF Copy

Reviewed

American Heart Association

Nov 13 2023

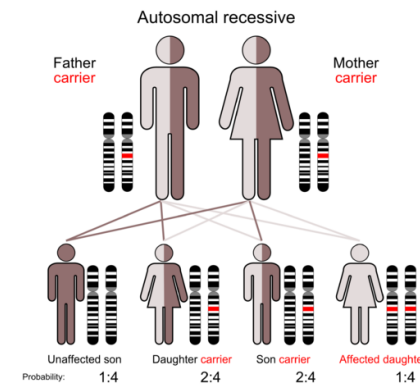
A single injection of the experimental medication zilebesiran was safe and effective in reducing systolic blood pressure in people with mild-to-moderate high blood pressure for up to six months, as detailed in the Phase 2 of the KARDIA study, reported as late-breaking science today at the American Heart Association's Scientific Sessions 2023. The meeting, Nov. 11-13, in Philadelphia, is a premier global exchange of the latest scientific advancements, research and evidence-based clinical practice updates in cardiovascular science.

Zilebesiran is an investigational [RNA interference](#) agent targeting angiotensinogen (AGT), a hormone produced predominantly in the liver that contributes to blood pressure regulation.

“Uncontrolled high blood pressure is a leading cause of death and disease, so there is a need for new treatments that provide sustained blood pressure control over longer periods of time. This will improve outcomes for people with hypertension. Uncontrolled hypertension also increases the risk of heart disease.”

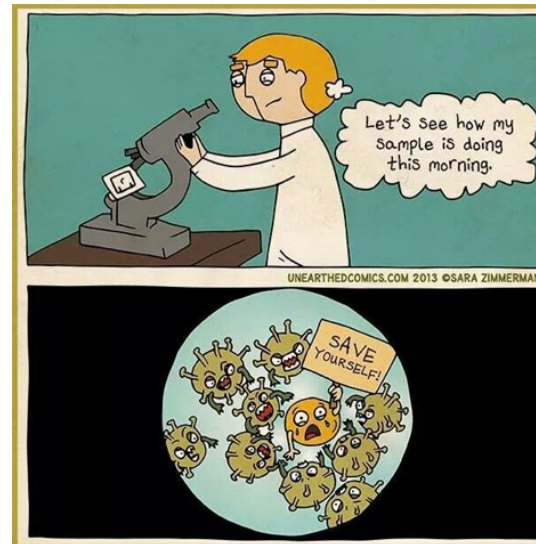
DNA diagnostika

- **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**



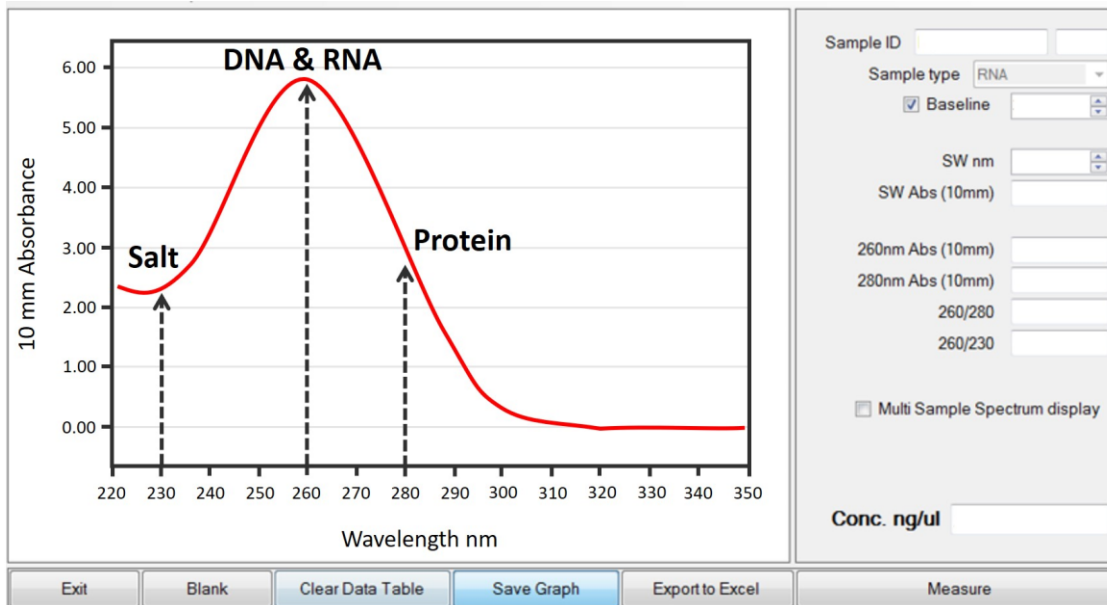
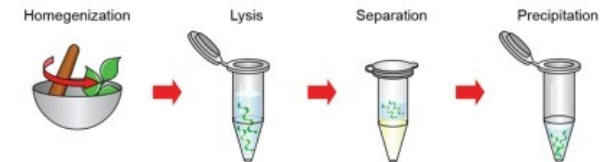
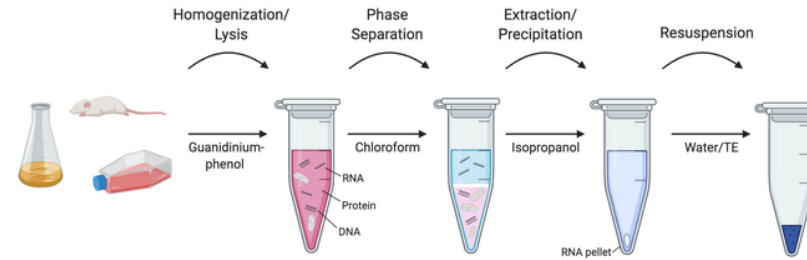
Biologický materiál

- 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



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**



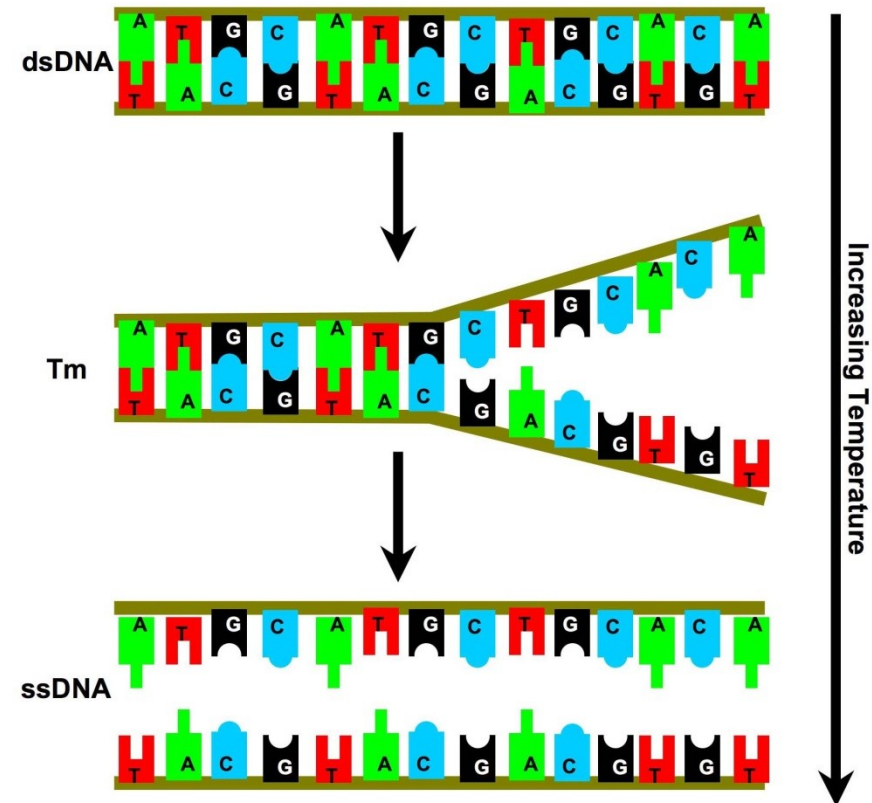
PCR – Polymerase chain reaction

- 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)

- **Mg²⁺ 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)

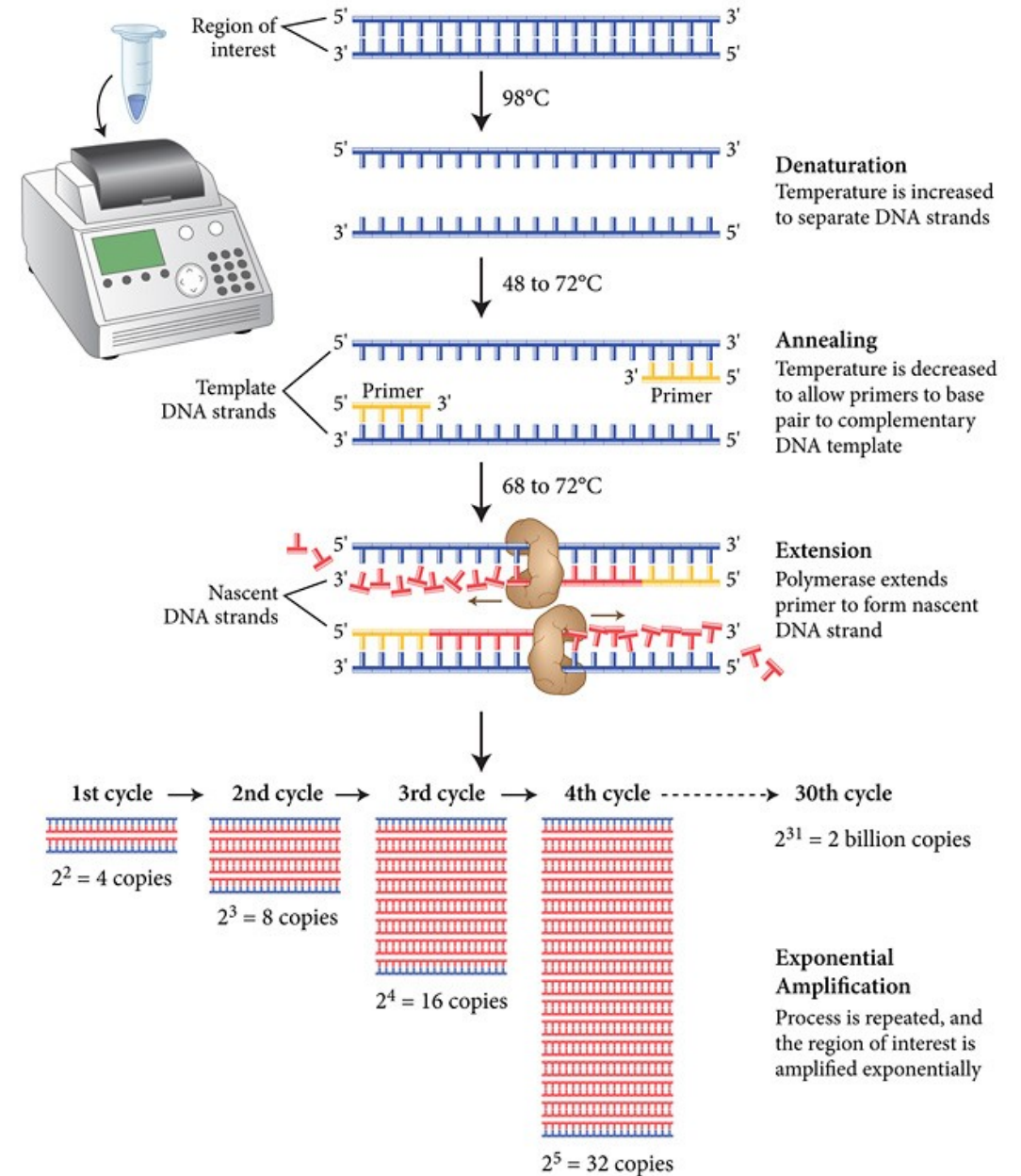
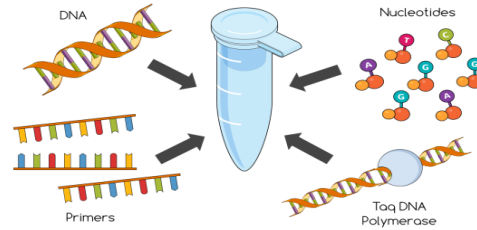
Taq (*Thermus aquaticus*), Tth (*Thermus thermophilus*)

- **teplota**

opakování cyklů:

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

pomocí změn teploty!



Praktická část cvičení

PCR Protocol

Get the reagents



Prepare the mix



Set up conditions



Analyze the gel



Negative result



Cry



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](#)¹, [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

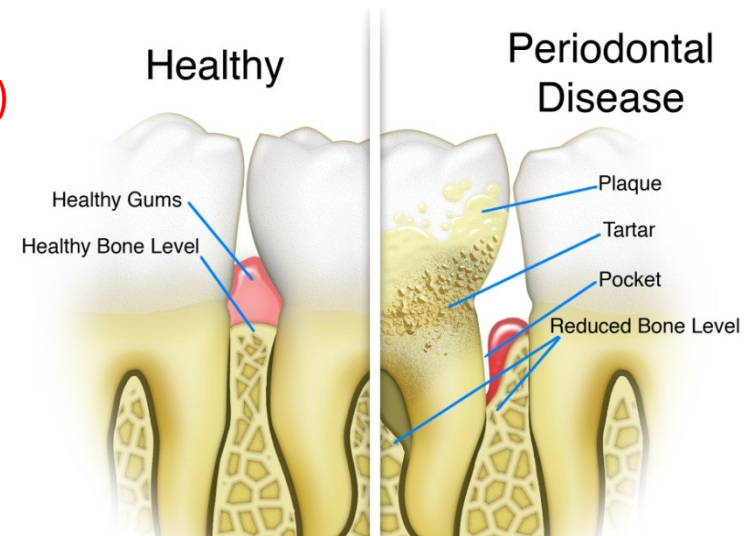
Zánětlivé onemocnění parodontu

- 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 ME¹](#), [Koutayas SO](#), [Madianos PN](#), [Strub JR](#).

Author information

¹Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Albert-Ludwig University, Freiburg, Germany. 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

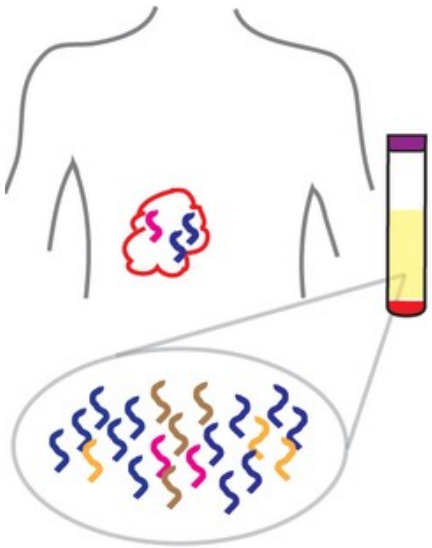
Práce z biologickým materiálem (PLNÁ KREV, PLAZMA, SÉRUM)



Izolace **DNA**

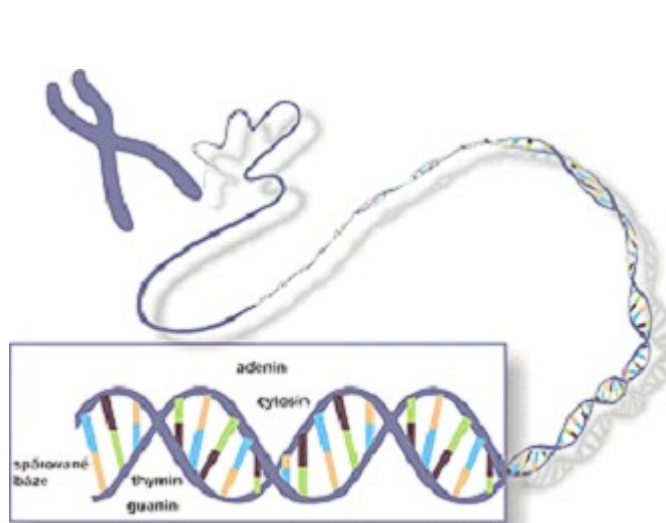


1. Amplifikace DNA úseku - PCR
2. Detekce polymorfního místa - Restrikční analýza
3. Vizualizace - Elektroforéza



JAK?

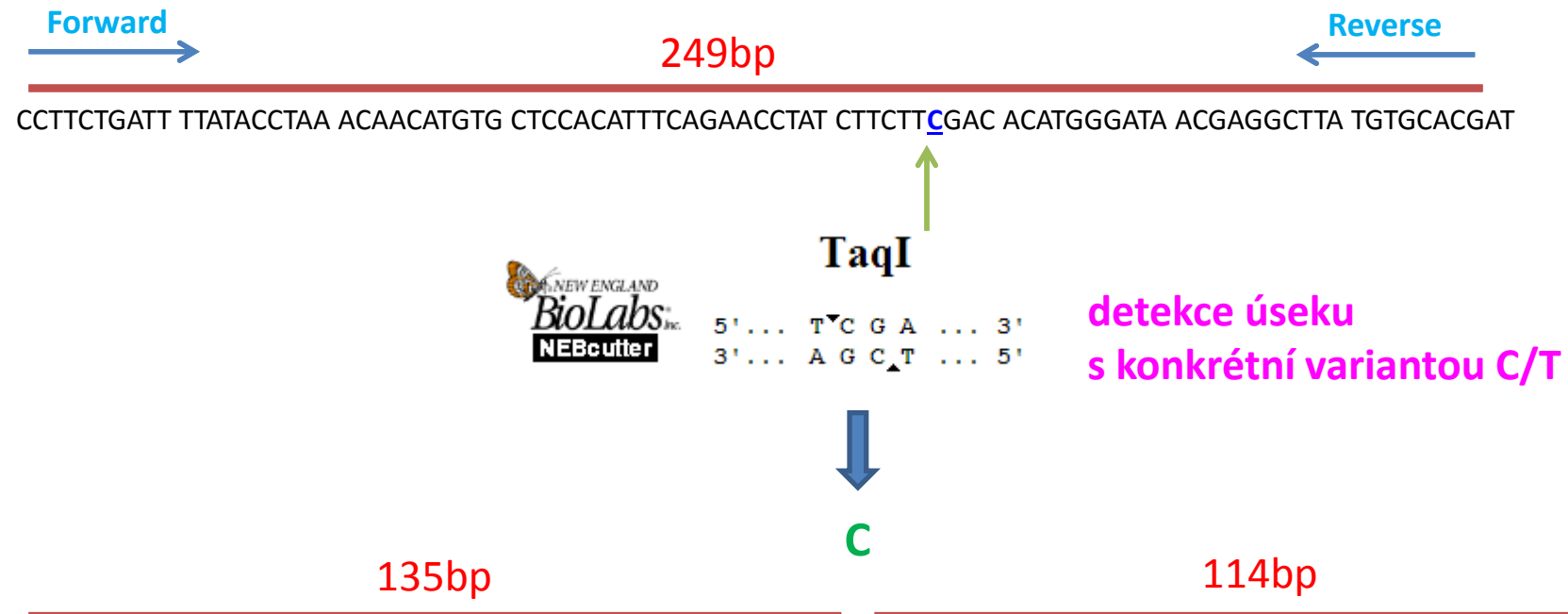
1. PCR IL-1B +3953C/T (rs1143634) u subjektů s chronickou peridontitidou



amplifikace vybraného úseku z celkové DNA

JAK?

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



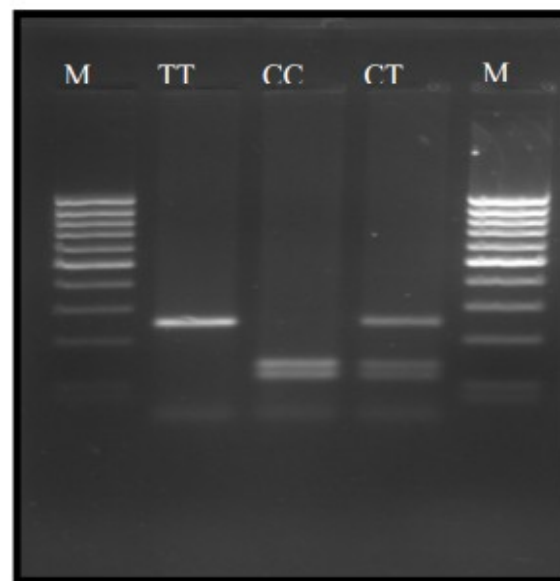
JAK?

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

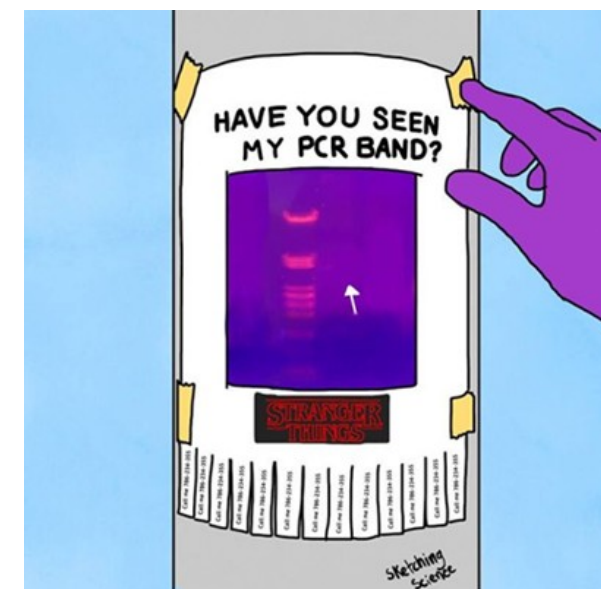


3. Heterozygot CT – 3 pruhy

249 bp →



vizualizace DNA fragmentů
po restrikční analýze



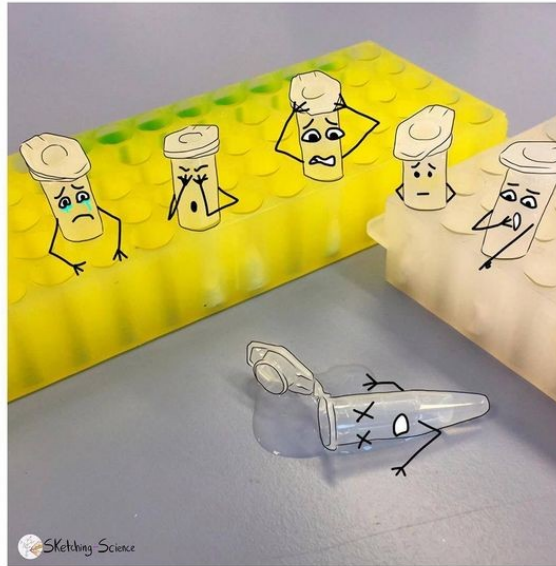
PCR

1. Praktické provedení PCR

Objem v mikrozukmavce: 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)

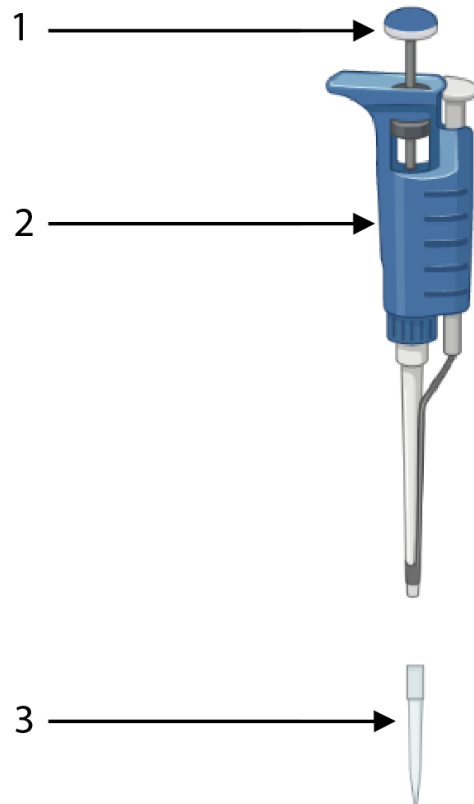


1 kapka minerálního oleje



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

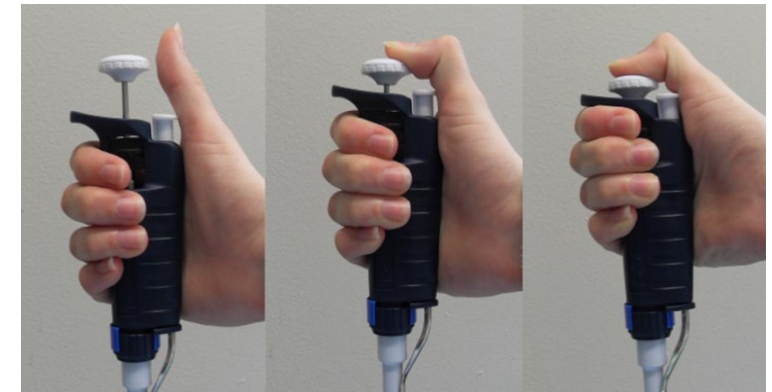
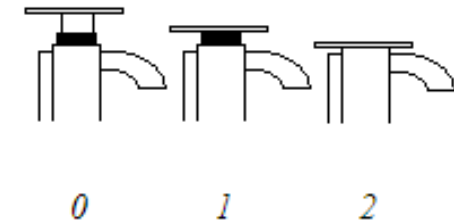
- Pipetu držím vždy **vertikálně** (špičkou dolů).
- Pipetu držím v dlani zavěšenou za ukazováček a ovládám ji palcem.
- **Vyberu optimální rozsah objemu!!! Nikdy nepřekračuju rozsah pipety nahoru ani dolů!!!**
- Před pipetováním musíme na pipetu nasadit příslušnou **špičku** (dle objemového rozsahu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



Stop by the lab!

We have



hand saunas



vibe check



piper bois



Extreme™
merry-go-round



piper boi hats



evil jello

Trivial Name	Structure	Suggested Chemical Name
Oldmacdenynenynol		6-(6-(3-(1-ethyl-1-methylpropyl)-hex-4-ynyl)-4,4-dipropyl-2-prop-2-ynylcyclohex-2-enyl)-4-methyl-cyclohept-2-en-1-ol
Cowenynenynol		(Z)-6-(2,3-diethylcyclopent-2-enyl)-7,7,10,10-tetraethylcyclodec-8-en-2,4-diyn-1-ol
Turkenynenynol		2-(3,3-diethyl-2,4-divinyl-6,6-diisobutylcycloheptyl)cyclopropanol
Goosenynenynol		(2E, 4Z)-13-cyclopropylcyclo-tridec-2,4-dien-8,10-diyn-1-ol
Serpentynenynol		(Z,Z)-11-(2-isopropylcyclopentyl) undeca-6,10-dien-4,8-diyn-1-ol
Giraffenynenynol		(4Z,7E)-12-cyclopropyl-3,6,6-triethyldodeca-4,7-dien-9,11-diyn-3-ol
Duckenynenynol		(Z)-4,4-diisobutyl-3-(4,4-dimethylcyclobut-2-enyl)-2-prop-2-ynyl-2-but-1-en-3-ynylcyclopentanol

