

Základy genetiky

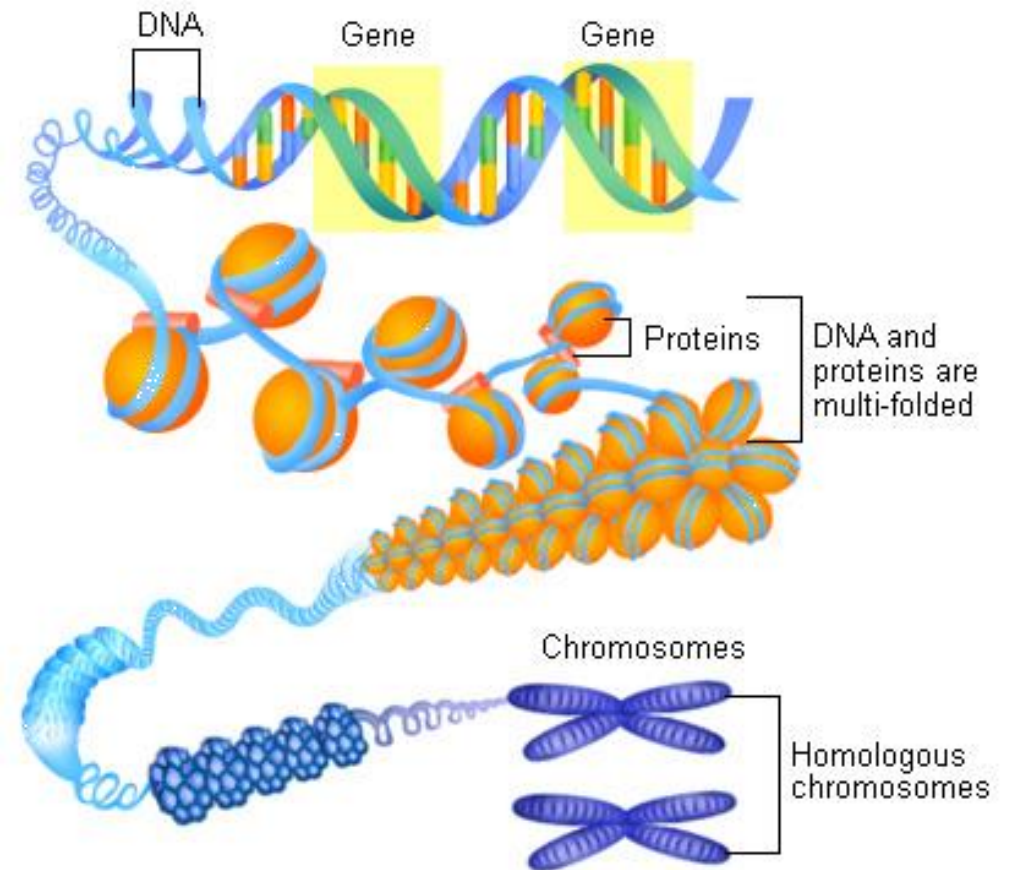
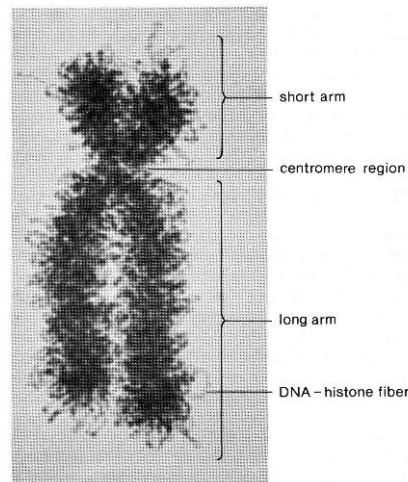
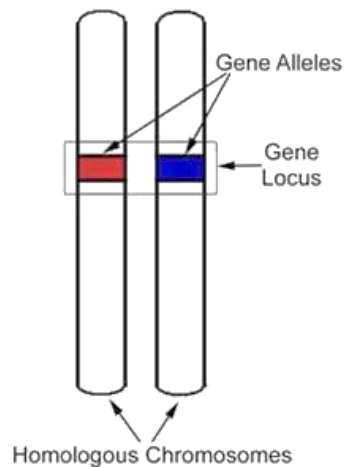
Genetická podmíněnost nemocí

- Podstata dědičnosti
- Genetická variabilita (mutace × polymorfismus)
- Monogenní × komplexní nemoci

Základní genetické pojmy

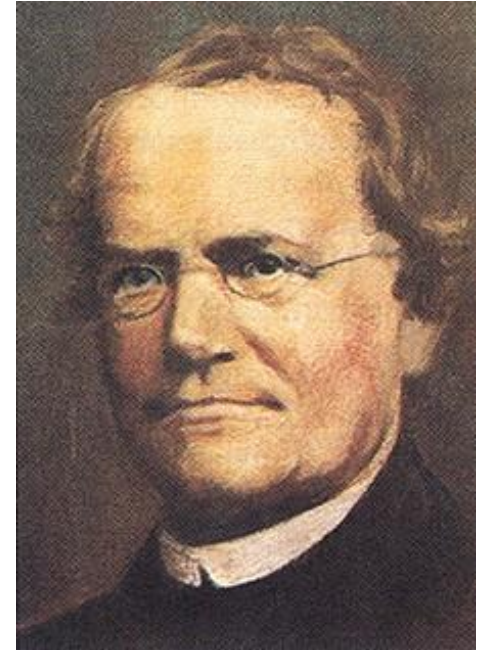
- **gen, alela, genom, chromozom**

- lokus
- alely
 - dominantní
 - recesivní
- homozygot
- heterozygot
- genotyp
- fenotyp



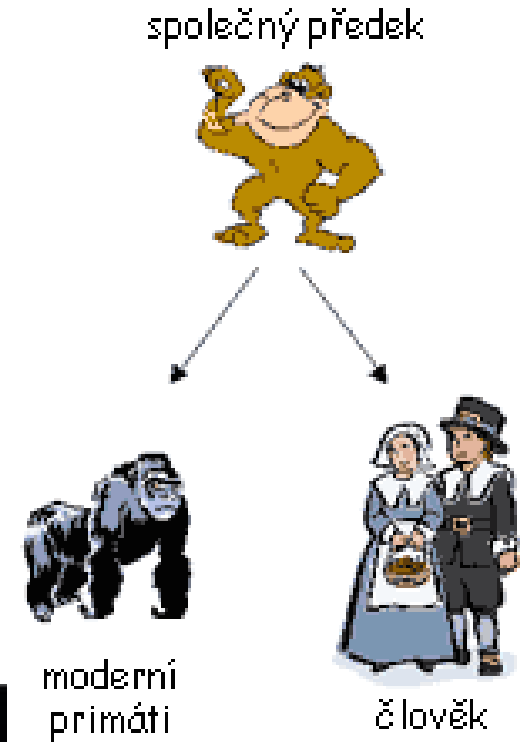
Historie

- brněnský kněz a středoškolský profesor **Johann Gregor Mendel**
 - zabýval se křížením různobarevných odrůd hrachu
- Genotypové zákony:
 - **Zákon o samostatnosti alel**
Genotyp je soubor samostatných genů určujících znaky. Každý znak je určen dvojicí samostatných alel.
 - **Zákon o segregaci alel**
Dvojice samostatných alel se při zrání rozcházejí a do každé gamety přechází jedna z obou alel.
 - **Zákon o nezávislé kombinaci alel**
- Fenotypové zákony
 - **Zákon o uniformitě hybridů**
Křížíme-li dominantního homozygota s homozygotem recesivním, jsou jejich potomci F1 generace v sledovaném znaku všichni stejní. Reciproká křížení dávají shodné výsledky.
 - **Zákon o štěpení v potomstvu hybridů**
Při křížení heterozygotů lze genotypy a fenotypy vzniklých jedinců vyjádřit poměrem malých celých čísel. Vzniká genotypový a fenotypový štěpný poměr.



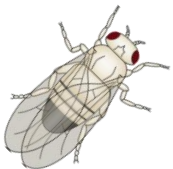
Genetika

- specializovaný biologický obor zabývající se variabilitou a dědičností
 - **klinická genetika**
 - zabývá se genetikou patologických stavů
 - zabývá se diagnostikou, léčením a prevencí genetických nemocí (u celé rodiny!)
 - genetické poradenství
 - **lidská genetika**
 - studuje variabilitu a dědičnost u člověka
 - **cytogenetika**
 - studium chromozomů
 - **molekulární genetika**
 - studium struktury a funkce jednotlivých genů
 - **populační genetika**
 - studium proměnlivosti populací
 - **komparativní a evoluční genetika**
 - mezidruhové srovnání a studium evoluce druhů



Genomika

- studuje strukturu a funkci genomů pomocí genetického mapování, sekvenování a funkční analýzy genů
- snaží se o pochopení veškeré informace obsažené v DNA živých organismů
 - **strukturní genomika** = pochopení struktury genomu
 - konstrukce detailních genetických, fyzických a transkripčních map genomů příslušných organismů
 - reprezentovala zejména iniciální fázi analýzy genomů; konečným cílem byla kompletní znalost DNA sekvence (např. HUGO projekt)
 - **bioinformatika** = shromažďování, analýza a vizualizace biologických souborů dat
 - využívá metod výpočetní techniky, tvorba databází a softwarů
 - **funkční genomika** = studium funkce genů a ostatních částí genomu
 - využívá poznatků strukturní genomiky a snaží se o poznání funkce genů; velmi často k tomu využívá modelové organizmy (kvasinka, nematoda, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Mesocricetus auratus* aj.) jako časově a finančně výhodnou alternativu vyšších živočichů (zejm. pro možnost studovat mnoho generací v relativně krátkém čase)

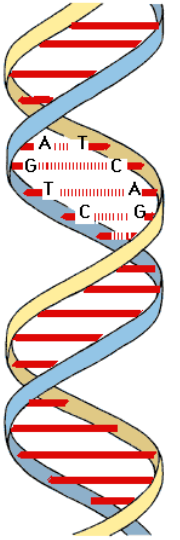


Chromozomální podstata dědičnosti

- **DNA, RNA, proteiny**

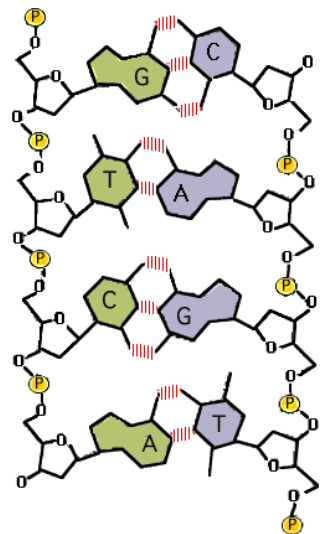
DNA: nese informaci potřebnou pro regulaci vývoje, růstu, metabolismu a reprodukce

- složena z nukleotidů (zbytek kys. fosforečné, deoxyribóza a dusíkatá báze [Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin])
 - DNA kostra – polynukleotidový řetězec
 - zbytky deoxyribózy a kys. fosforečné spojené fosfodiesterovou vazbou
 - DNA dvojšroubovice - 2 polynukleotidové řetězce v opačné orientaci
 - jedno vlákno v 5'→3' směru, druhé opačně
 - vodíkové vazby mezi páry bází (A=T, G≡C)



RNA: transport informace z jádra do cytoplazmy

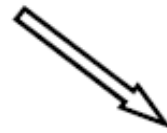
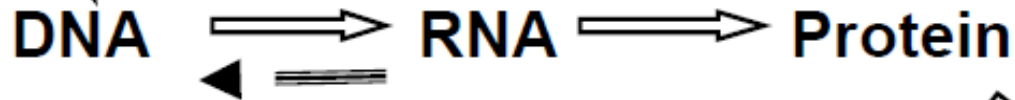
proteiny: základní stavební kameny



Molekulárně biologické dogma



Centrální dogma



Fenotyp

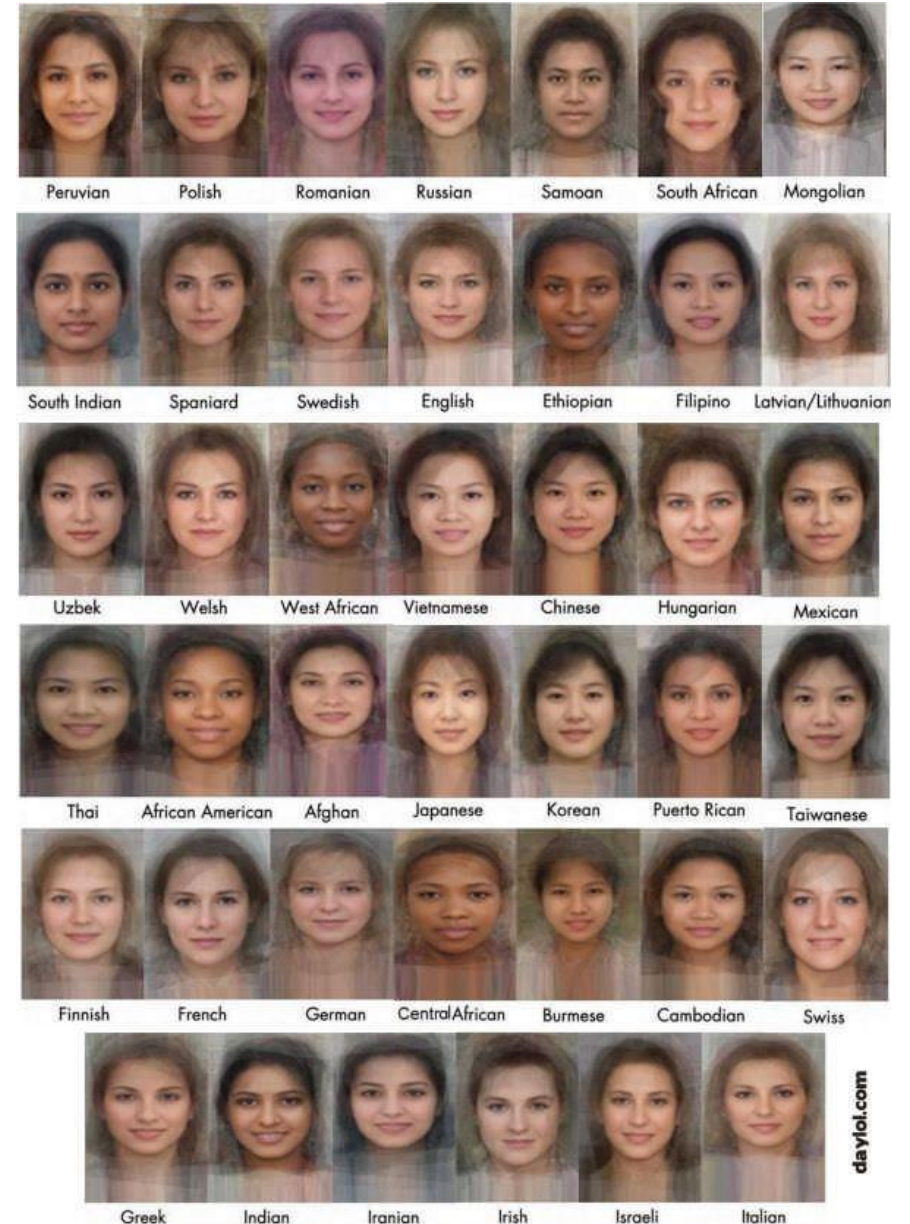
DNA do DNA \rightarrow REPLIKACE

DNA do RNA \rightarrow TRANSKRIPCE

RNA do Protein \rightarrow TRANSLACE

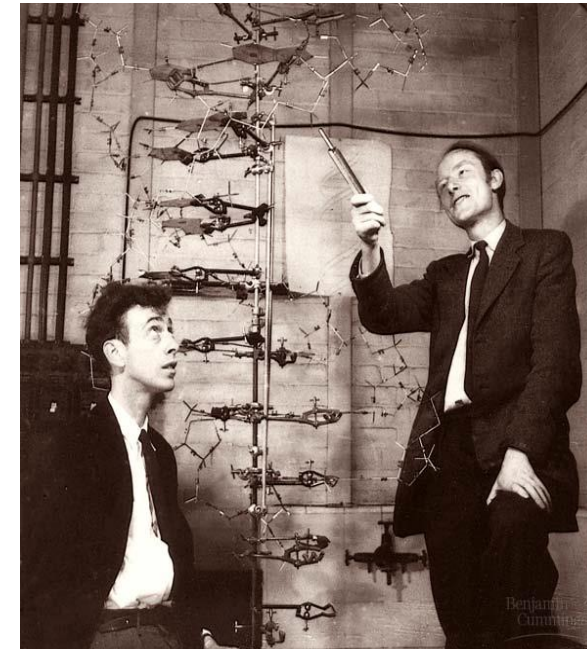
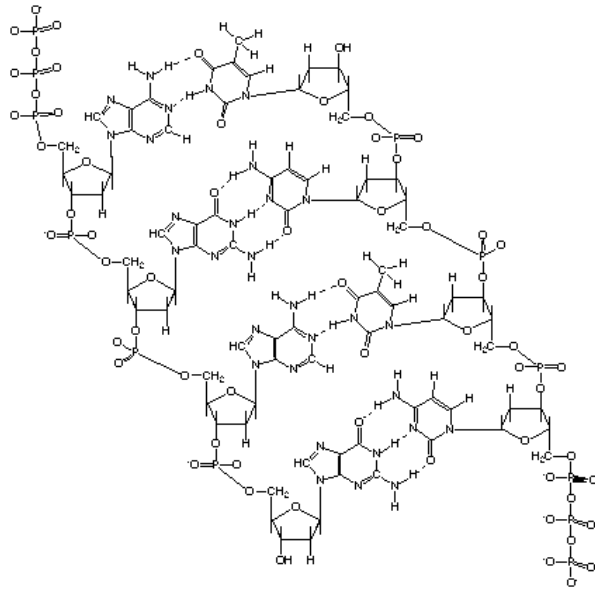
RNA do DNA \rightarrow REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Jeden gen jeden enzym (protein/polypeptid)



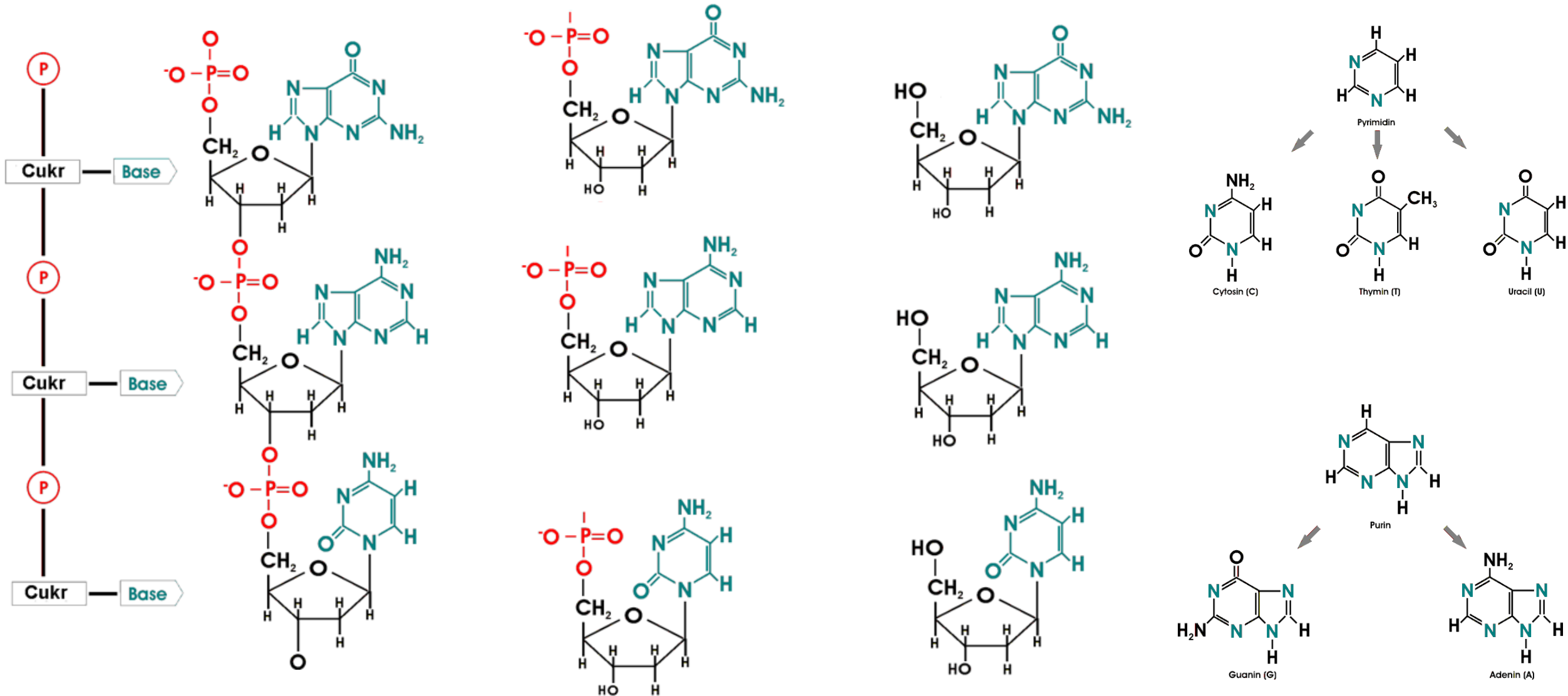
DNA

- molekula DNA jako taková byla objevena v roce 1869, kdy se švýcarskému lékaři Friedrichu Miescherovi podařilo izolovat DNA z bílých krvinek



- 1962 obdrželi společně Francis Crick, James Watson a Maurice Wilkins Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Rosalinda Franklin se pro tragické úmrtí této ceny nedočkala

DNA × nukleotid × nukleosid × báze



Gen

základní jednotka dědičnosti

konkrétní úsek molekuly DNA nesoucí informaci pro tvorbu proteinu nebo NA (rRNA, tRNA...)

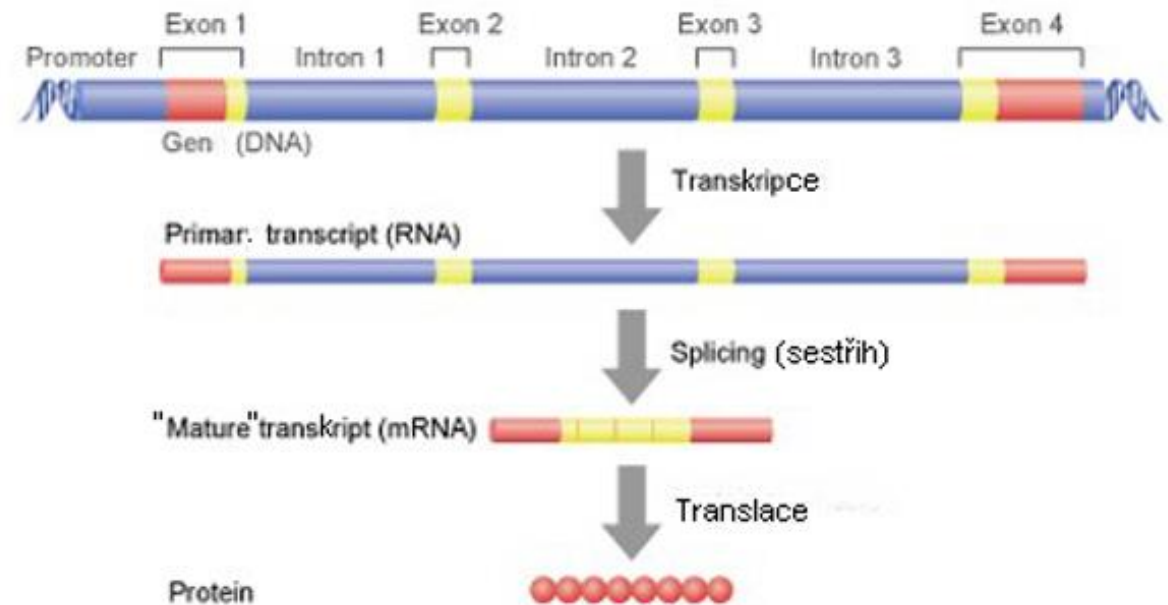
- geny strukturní
- geny pro RNA
- geny regulační (promotory)

- **exony** = funkční úseky genu, které jsou přepisovány do mRNA a dále translatovány při proteosyntéze
- **introny** = úseky genu, jejichž funkce dosud nebyla zcela objasněna a které nejsou využívány pro translaci

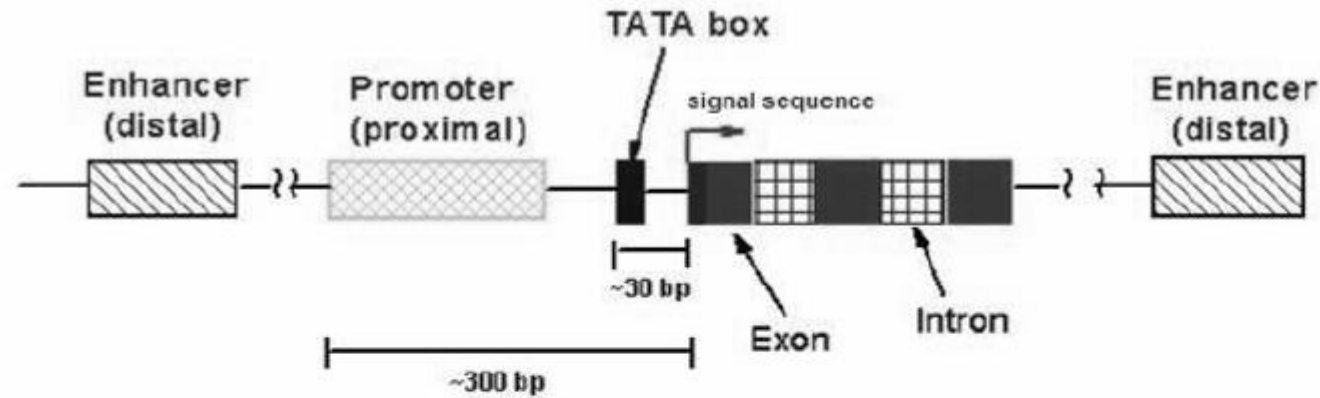
Dle jejich obsahu geny dělíme na:

- **jednoduché** - obsahují pouze exony
- **složené** - obsahují i introny

- **genové rodiny** = sekvenčně podobné geny, které vznikly zřejmě duplikací během evoluce, např. geny pro (hemo)globiny, imunoglobuliny...



Struktura genu



- Introny a Exony
- Promotor
- Enhancer a Silencer
- Počátek transkripce
- Transkripční faktory
- Signální sekvence

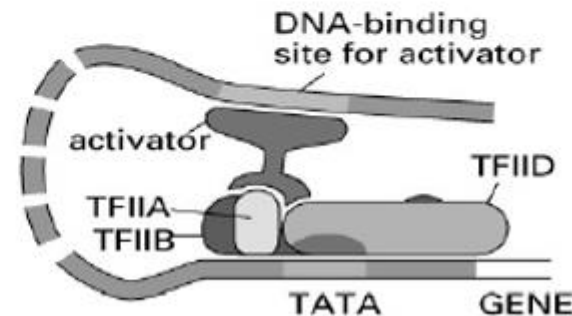


Figure 7-44. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Introny a Exony: Kódující sekvence (ORF) mnoha eukaryotických genů je přerušena sekvencí známou jako **introny**. Introny jsou úseky DNA jejichž transkripty nejsou přítomny ve zralé mRNA. **Exony** jsou části sekvence přítomné ve zralé mRNA a kódují produkt eukaryotického genu.

Struktura genu

Místo počátku transkripce: místo kde začíná syntéza mRNA (pozice 0, -30bp od TATA boxy)

Promotor: oblast genu (5'-konec) upstream od místa počátku transkripce sloužící jako templát pro navázání transkripční jednotky a iniciaci transkripce. **Inducibilní promotor** – je závislý na přítomnosti induktorů (nízkomolekulární látka). **Konstitutivní promotor** – nezávislý (provozní „house keeping“ geny)

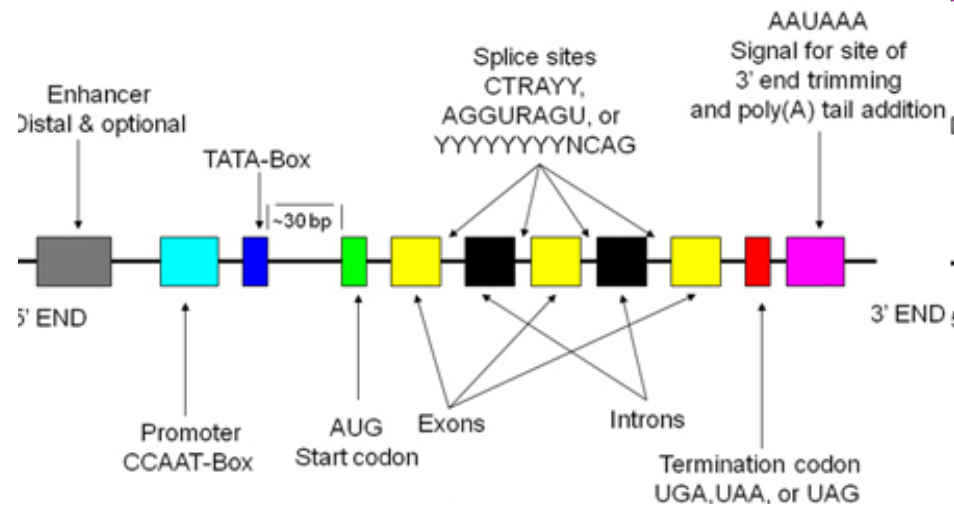
Enhancer: část sekvence genu, která interaguje s transkripčními faktory a tím zvyšuje účinnost transkripce. Je umístěna upstream nebo downstream od kódující sekvence a může být stovky bází daleko od kódující sekvence kterou kontroluje.

Silencer: opak enhanceru

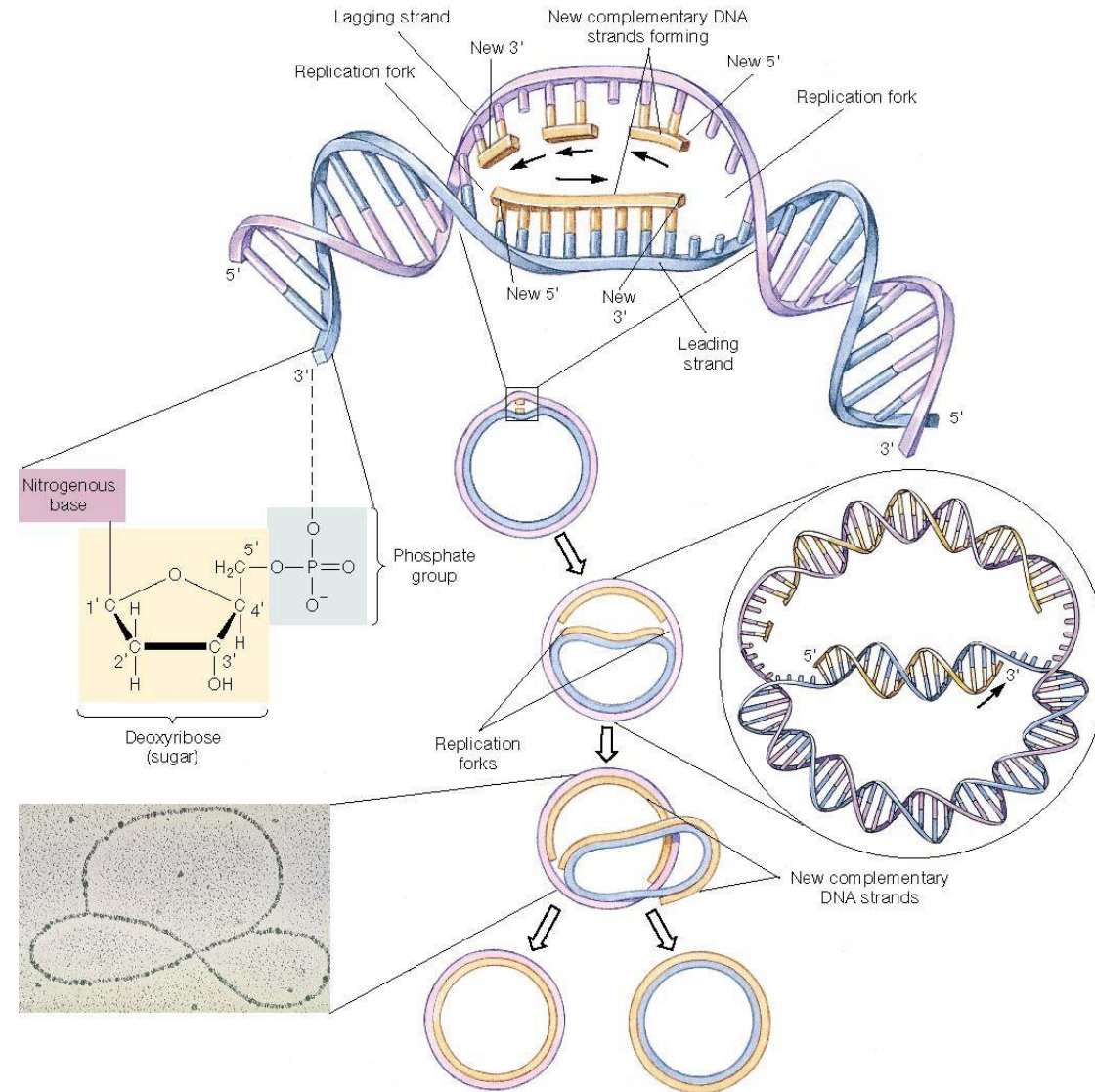
Transkripční faktory: proteiny interagující se specifickou sekvencí DNA, většinou ovlivňující terciální strukturu DNA a tak regulují transkripční jednotku. Jsou buď aktivátory či represory (viz výše)

Koaktivátory: proteiny interagující s transkripčními faktory (ale ne s DNA) regulující transkripci

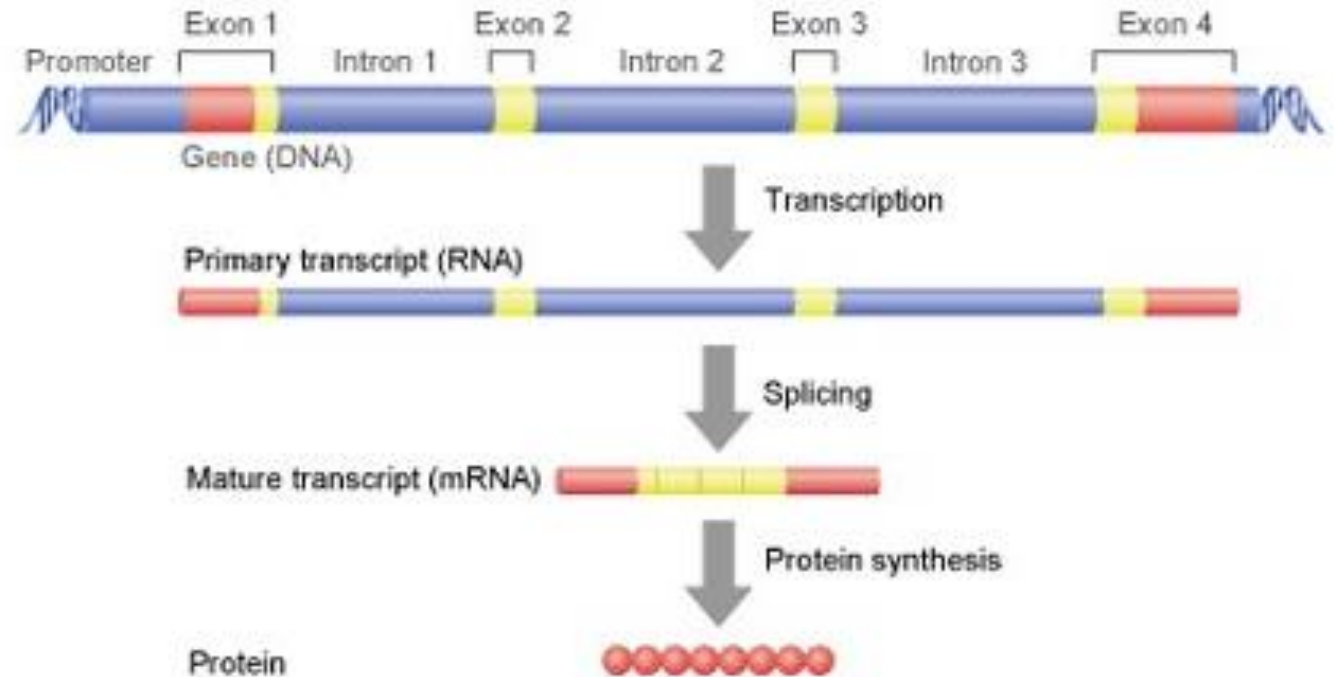
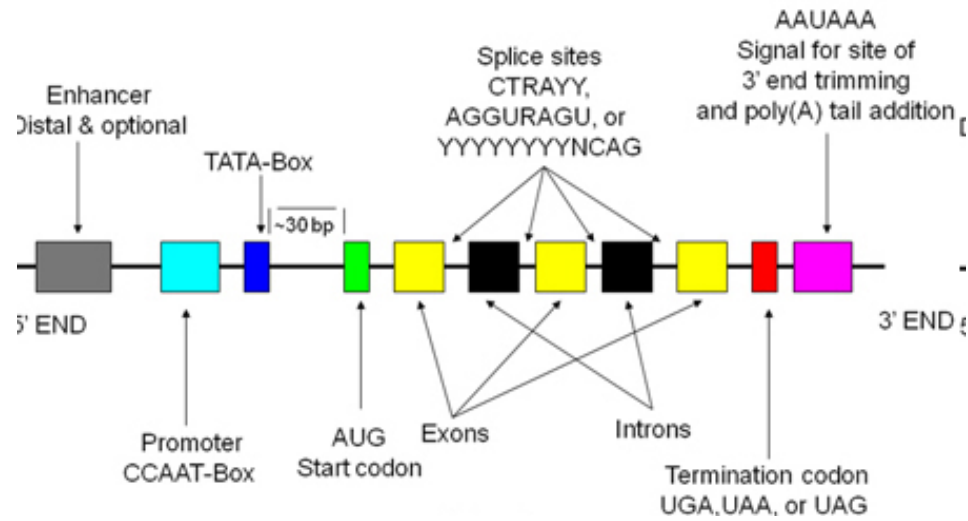
Signální sekvence: kóduje signální peptid, který předurčuje zacílení proteinu na buněčné úrovni a následně se odštěpuje



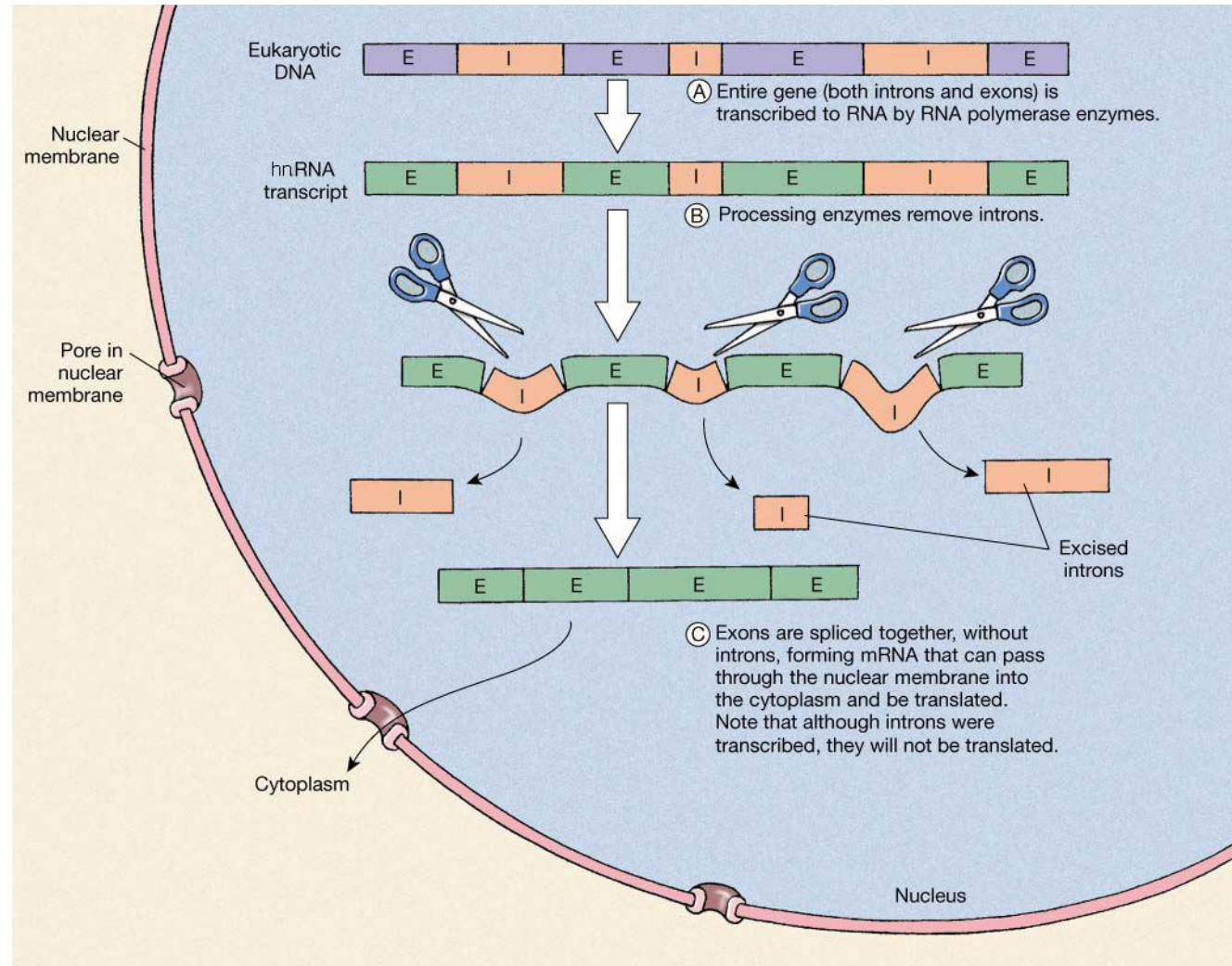
DNA replikace



Transkripce



Transkripce - RNA "splicing"



Posttranskripční úpravy mRNA

Čepička (capping)

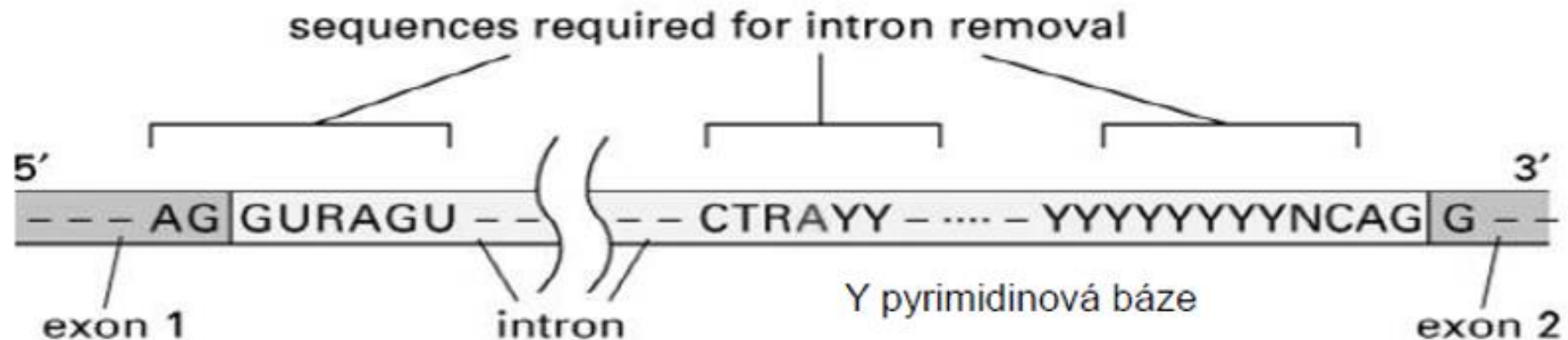
- modifikovaný guanozin (m^7G) je přidáván na 5'-konec většiny mRNA a podílí se na vazbě k ribozomu

Polyadenilace

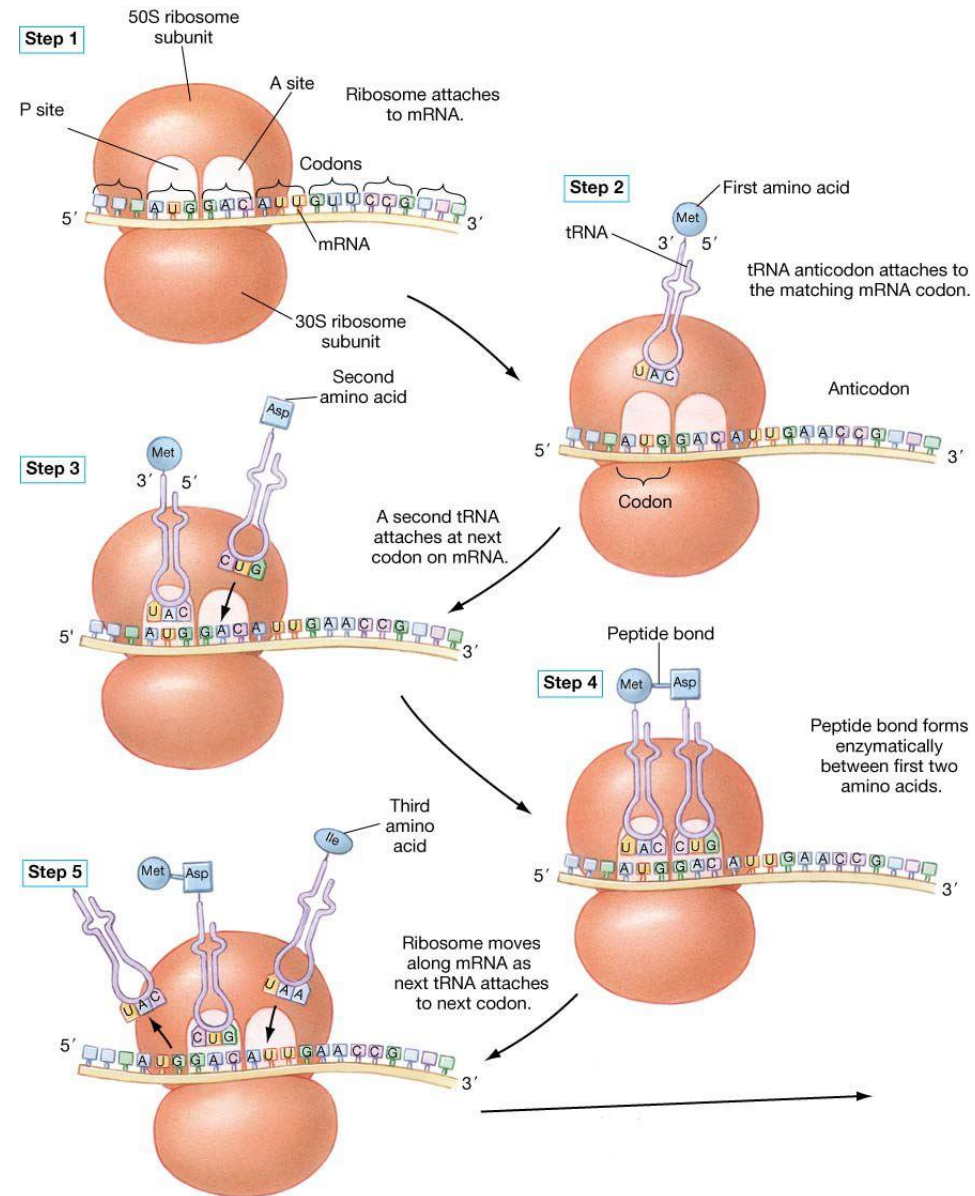
- 100-200 bp dlouhá sekvence polyadenozinu je přidávána na 3'-konec většiny eukaryotické pre-mRNA
- PolyA konec není kódován v DNA

Sestřih intronů a exonů

- Introny jsou vyštěpeny a exony spojeny dohromady ve struktuře zvané spliceozom



Translance



RNA → protein

Translace (syntéza proteinů)

- Proces přeměny informace z RNA do AMK řetězce (polypeptidu)
- Probíhá v cytoplazmě
- Zralá mRNA do cytoplazmy k ribozomům

Ribozóm

- skládá se ze strukturní rRNA a 80 různých proteinů (ty tvoří velkou a malou podjednotku)

1) Iniclace

- zachycení mRNA a nalezení START kodonu AUG (=methionin)

2) Elongace

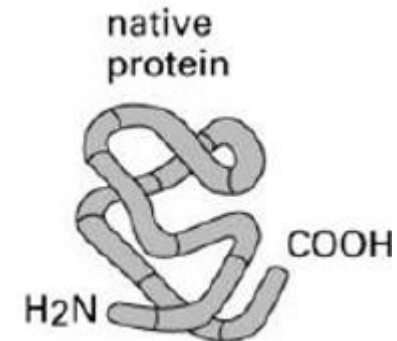
- Přidávání různých AMK v aktivované formě vázané na tRNA → vytváření peptidové vazby mezi amino- a karboxylovou skupinou

3) Terminace

- STOP kodon (**UAA**, **UAG** či **UGA**)

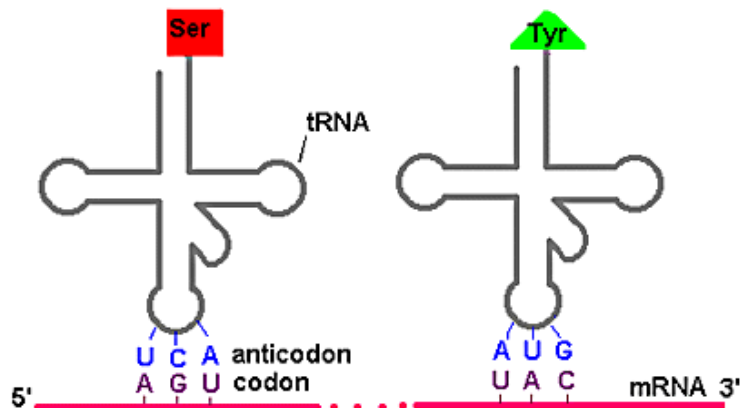
Posttranslační úpravy

- fosforylace, glykosylace, organelové cílení a odštěpení signálního peptidu, složení do aktivního stavu (=terciální a kvartérní struktura)



Genetický kód

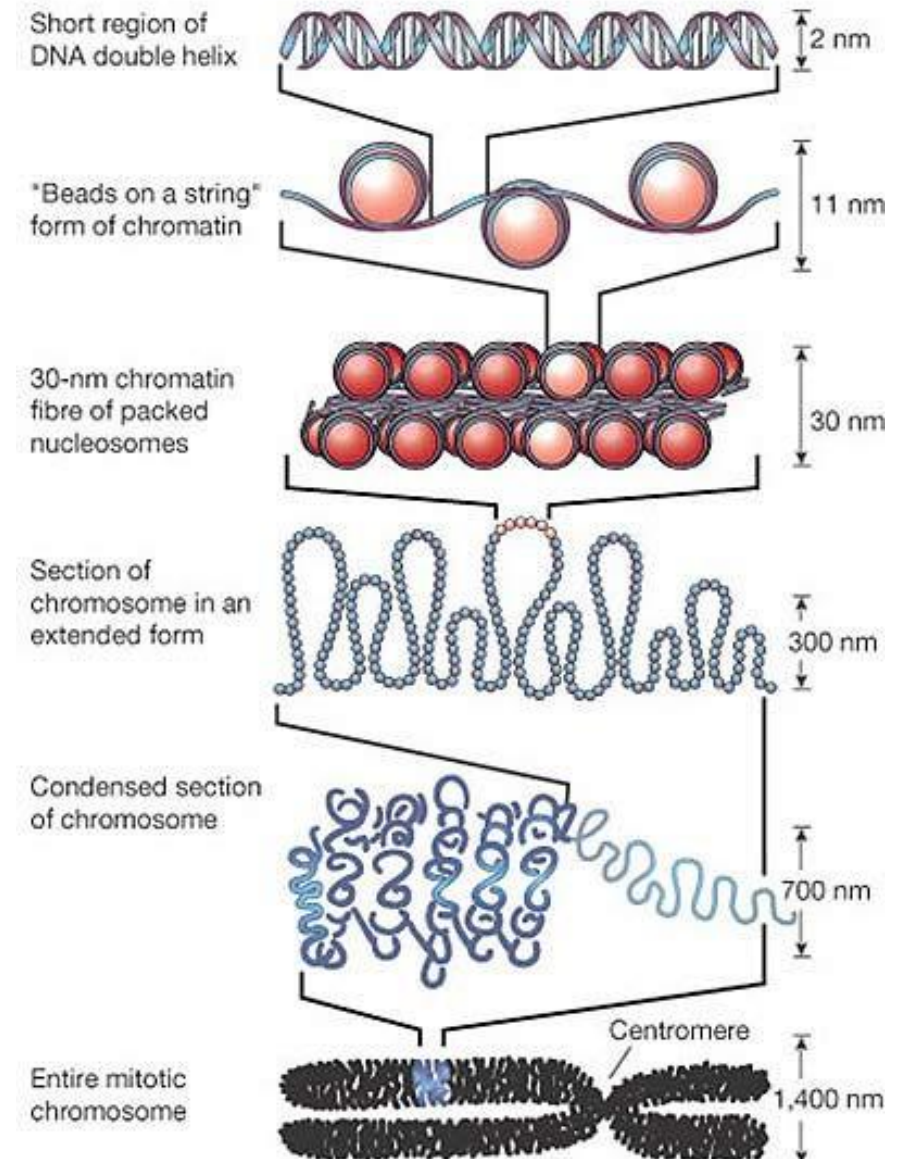
- určuje pořadí AMK v proteinu
 - univerzální
 - podobný princip u většiny živých organismů
 - tripletový
 - trojkombinace z celkem 4 nukleotidů (A, C, G, T)
 - degenerovaný
 - $4^3 = 64$, ale aminokyselin jen 21

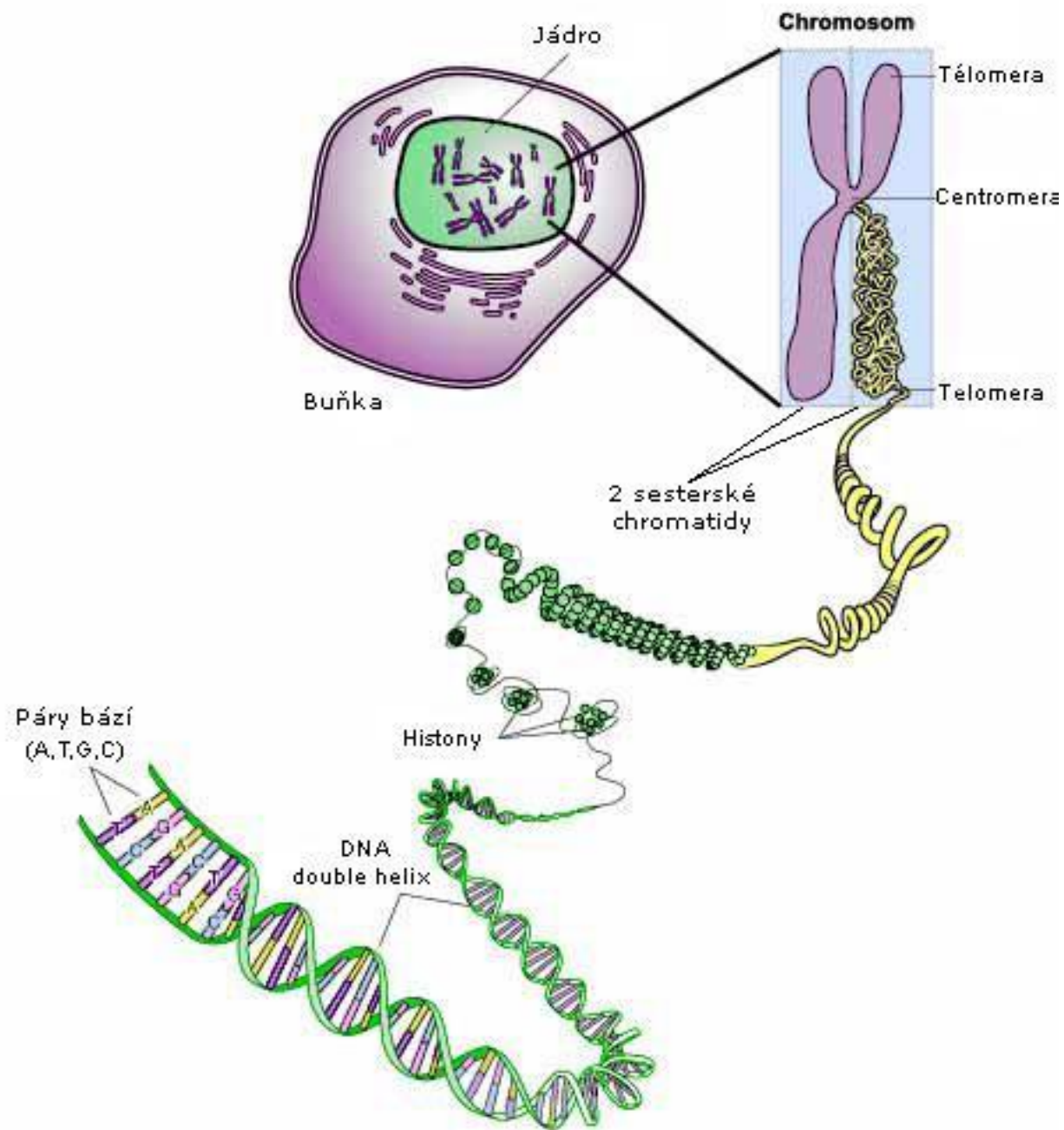


		1. pozice				2. pozice				3. pozice	
		U		C		A		G			
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U		
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C		
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A		
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G		
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U		
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C		
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A		
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G		
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U		
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C		
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A		
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G		
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U		
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C		
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A		
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G		

Chromatin × chromatida × chromozom

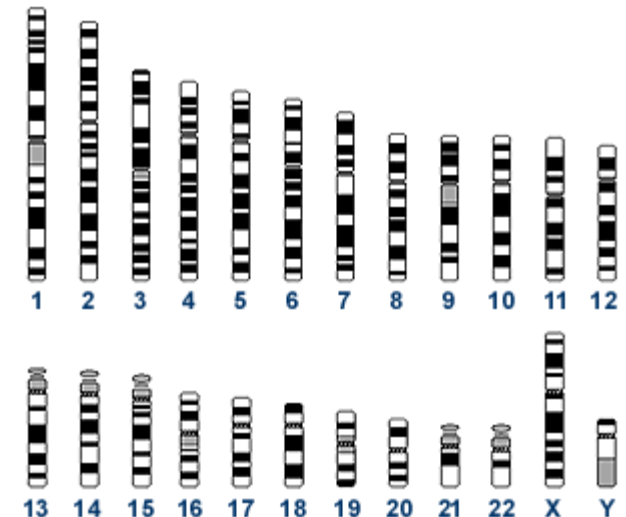
- DNA je organizována v **chromozomech**
 - chromatin + chromozomální proteiny (histony)
- chromozom = lineární sekvence genů přerušovaných nekódujícími úseky
- v nedělicí se buňce je chromatin rozprostřen volně v jádře
- u dělicí se organizuje do viditelných chromozomů
- struktura chromozomu
 - centromera
 - telomery (raménka)
 - dlouhé - q
 - krátké - p
- dvě kopie daného chromozomu po replikaci (před dělením) = sesterské chromatidy



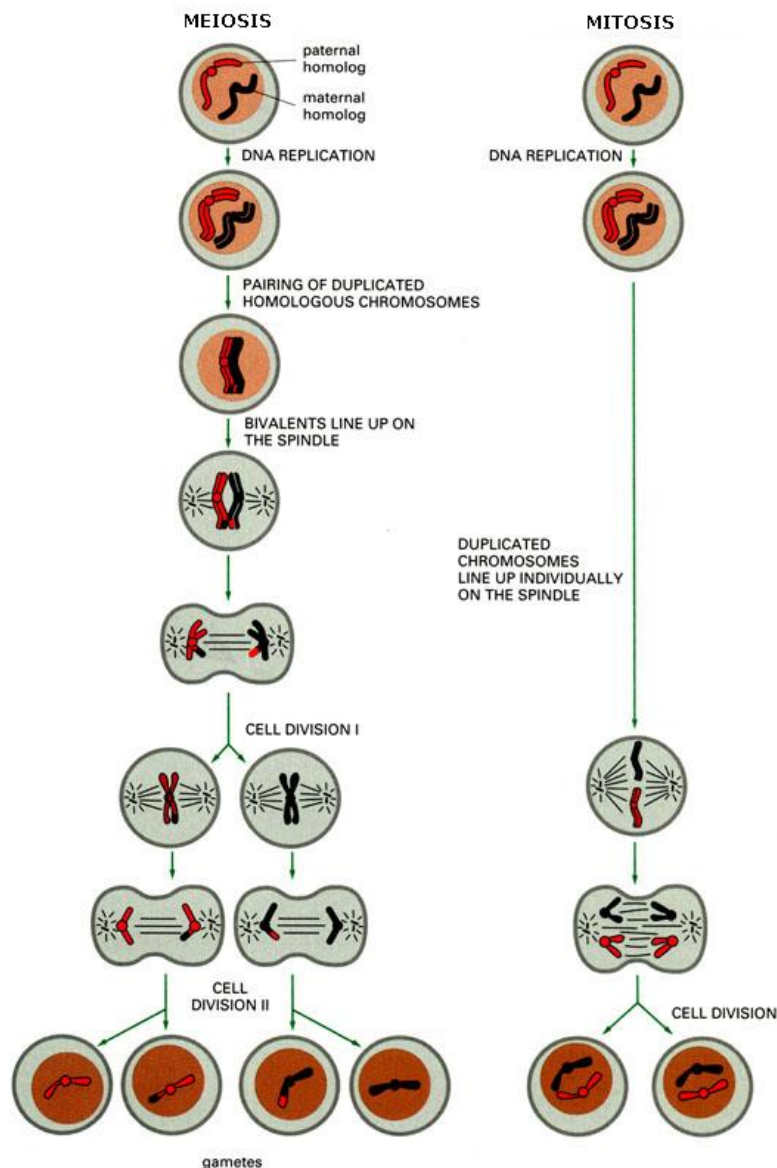


Karyotyp člověka

- každý biologický druh má svou charakteristickou chrom. výbavu (počet a morfologii) = **karyotyp**
 - u člověka mají somatické **diploidní** buňky 46 chromozomů
 - 22 párů homologních autozomů
 - 1 pár gonozomů (44XX nebo 44XY)
 - gamety (vajíčko, spermie) 23 chromozomů (ne párů!) – **haploidní**
 - standardní klasifikace číslováním podle velikosti
- zpracování vzorku buněk pro karyotyp
 - nejlépe hodnotitelné jsou kondenzované chromozomy v metafázi nebo prometáfázi mitózy
 - lymfocyty perif. krve nutno uvést do mitózy mitogenem a zastavit v metafázi např. colchicinem
 - barvením chromozomů (např. Giems) se dosáhne charakteristického pruhování a tím rozlišení jednotlivých chromozomů
- hodnocení karyotypu
 - manuální – obarvený chromozomový “rozptyl” (nejč. mitotické lymfocyty nebo buňky plodové vody) se po obarvení vyfotí, vystříhnou a seřadí do párů
 - automatizované (mikroskop + software)



Dělení buněk



Mitóza = 2 dceřiné buňky s diploidním počtem chromozomů, 1 cyklus DNA replikace následuje rozdělení chromozomů a jádra (profáze → prometafáze → metafáze → anafáze → telofáze) a násl. celé buňky (cytokineze)

Meióza = 1 cyklus replikace následován 2 cykly segregace chromozomů a buněčného dělení

1.meiotické (redukční) dělení – rozdělení homologních chromozomů významné – odehrává se zde meiotický crossing-over (rekombinace) – žádná z gamet není identická!
poruchy rozestupu – např. trisomie

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

Mitóza - detail

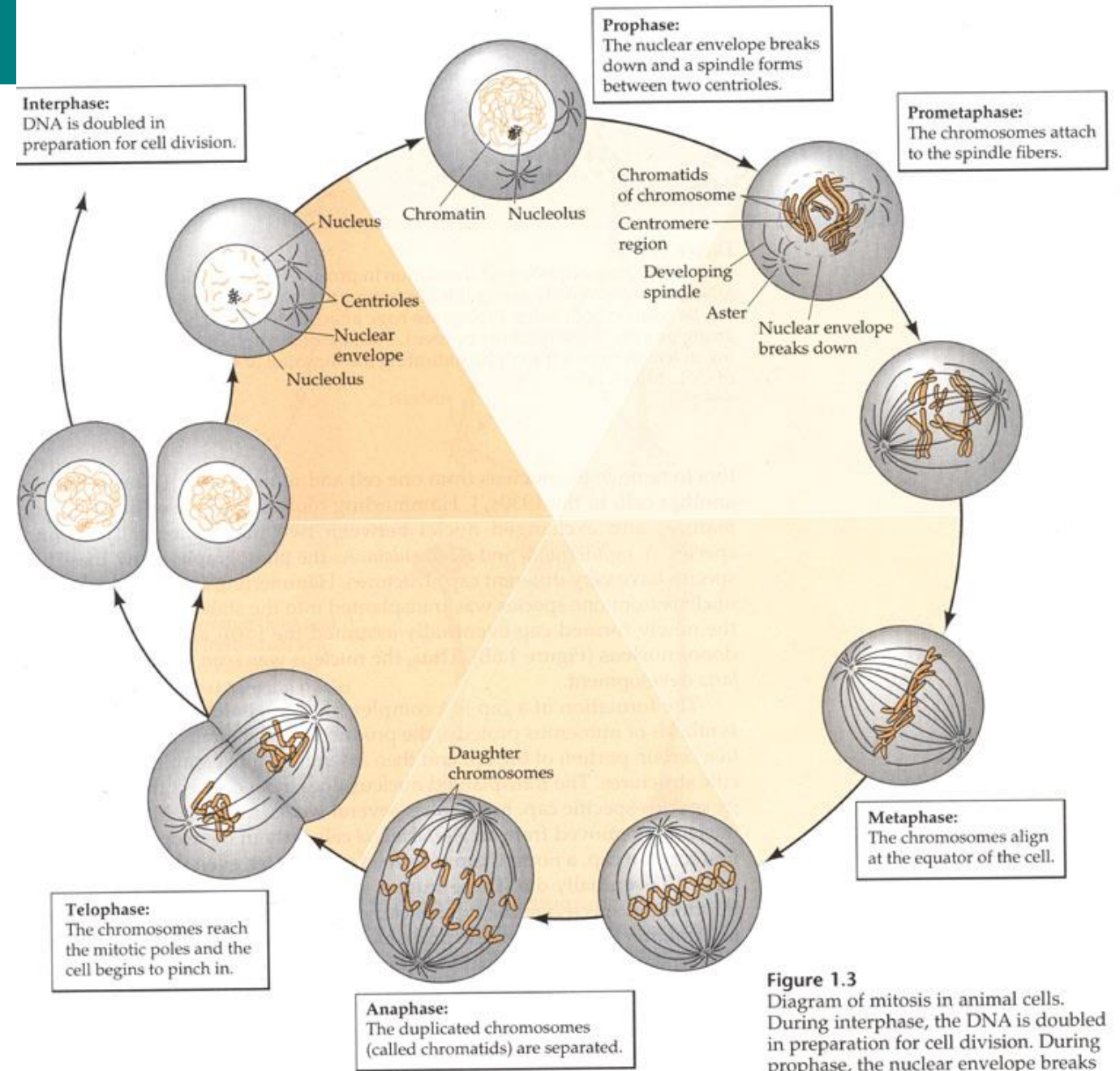


Figure 1.3
Diagram of mitosis in animal cells. During interphase, the DNA is doubled in preparation for cell division. During prophase, the nuclear envelope breaks down and a spindle forms between the

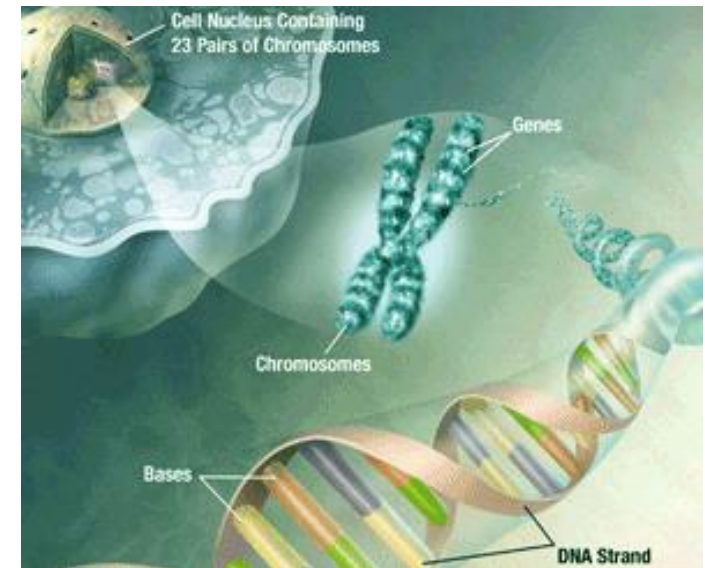
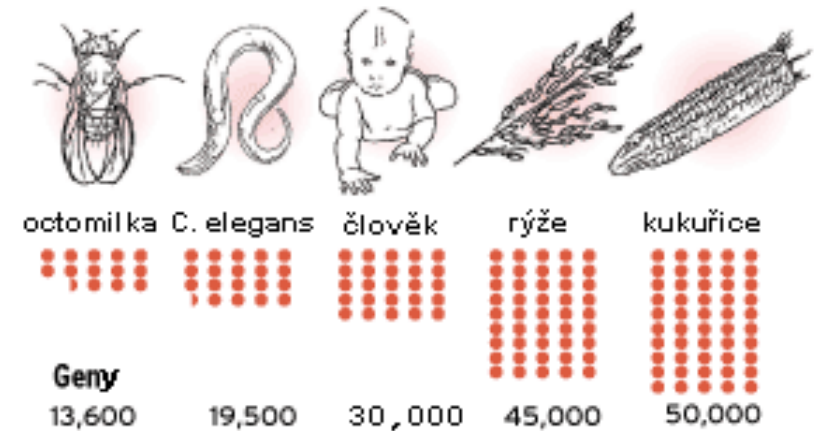
Lidský genom



- **Human Genome Project** (HUGO) – James D. Watson v r. 2001 zveřejnění prvních výsledků (The first complete human genome was only decoded in 2007)

haploidní genom obsahuje cca 3.3×10^9 bp

- **gen** = konkrétní úsek molekuly DNA nesoucí informaci pro tvorbu proteinu nebo NA (rRNA, tRNA...)
 - ~ 21 tisíc genů (2011), 19 tisíc (2014) ...
- **pseudogen** = sekvence DNA, která je podobná genu, ale nedochází k jejímu přepisování v RNA (transkripci)
 - ~ 11 tisíc pseudogenů
- **genom** = soubor všech genů v jedné buňce,
genom jaderný a mitochondriální (mtDNA)
 - několik desítek genů kódujících proteiny zapojené v mitochondriálních procesech (přenos pouze od matky)
- v jádru diploidní lidské buňky 22 párů chromozomů (autozomy) a jeden pár pohlavních chromozomů X/Y (gonozomy) = karyotyp
- hustota genů na jednotlivých chromozomech heterogenní
 - pouze ~ 10 % kódující sekvence
 - ~ 75 % se skládá z jedinečné (neopakující se) sekvence
 - zbytek repetitivní sekvence

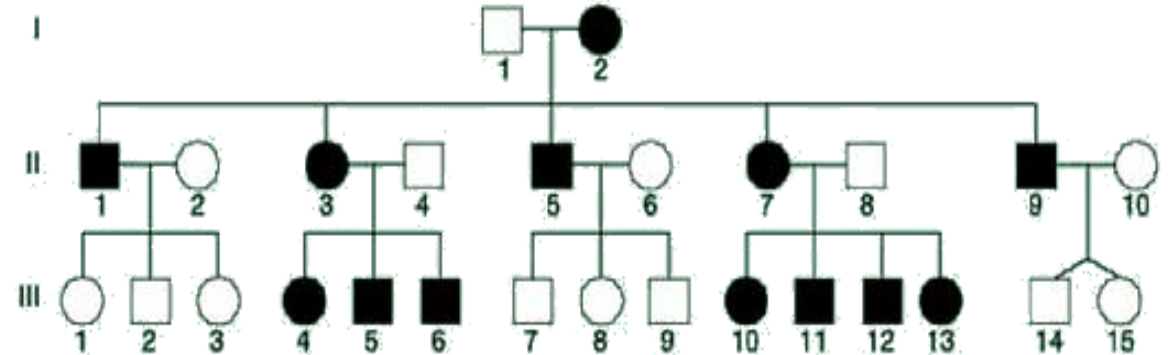
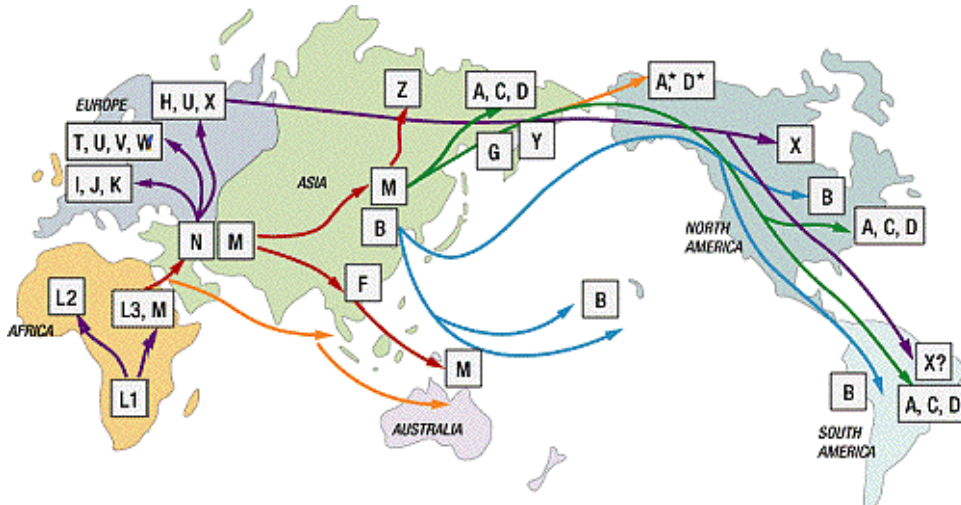
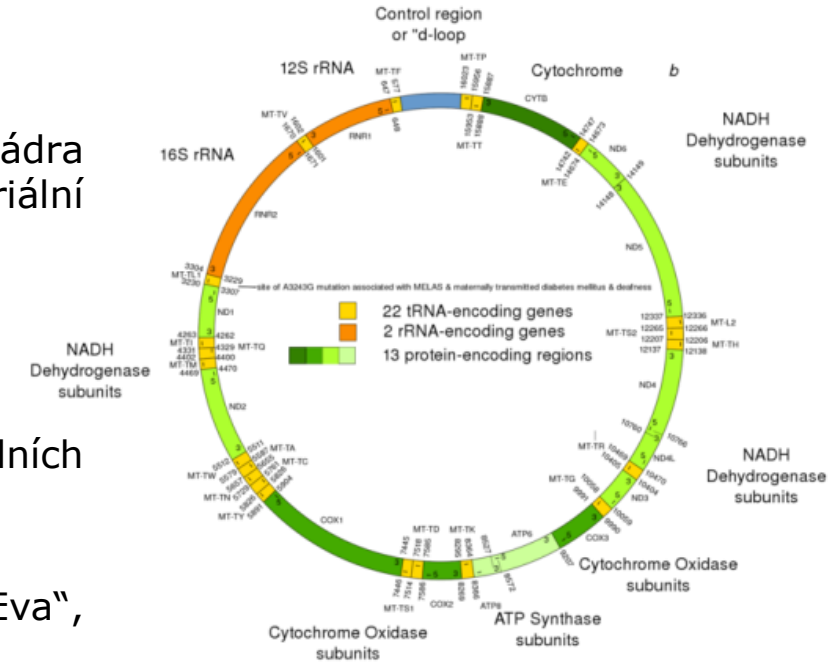


nejasná funkce, zřejmě udržují strukturu chromozomů, možná jsou "evoluční rezervou"

Mimojaderná DNA

mitochondriální DNA

- původ: α -proteobakterie pohlcená eukaryotickou buňkou
- mnoho genů během evoluce bylo z mtDNA horizontálně přeneseno do buněčného jádra (geny v jádře kódující různé mitochondriální proteiny silně připomínají bakteriální proteiny)
- ~ 16,5 tisíce bp
- kóduje 37 genů
 - 24 genů pro různou nekódující RNA
 - 13 genů kóduje vlastní mitochondriální polypeptidy zapojené v mitochondriálních procesech (využívány během oxidativní fosforylace)
- maternální dědičnost
- genetické analýzy: na základě mtDNA určena migrace lidstva - „mitochondriální Eva“, která žila ~ před 140 000 lety v místech dnešní Etiopie, Keni nebo Tanzanie



Repetitivní sekvence

Repetitivní sekvence = DNA s vysokým množstvím kopií

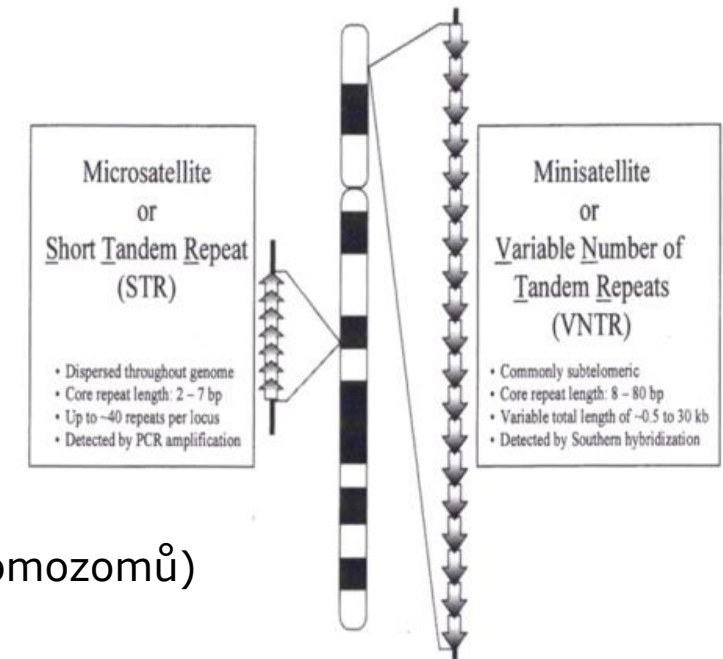
- se podílí na formování vyšších nukleoproteinových struktur, jako jsou telomery nebo centromery
- při chromozomových přestavbách, mají vliv na regulaci genové exprese při procesu zvaném RNA interference, zajišťují ochranu konců lineárních chromozomů, řídí správný průběh mitotického i meiotického dělení buňky
- zřejmě udržují strukturu chromozomů, možná jsou "evoluční" rezervou

rozptýlené

- DNA transpozony (př. „Sleeping Beauty“ – genová terapie)
- retrotranspozony
- endogenní retroviry = LTR
- autonomní – LINE – L1-repetice
- neautonomní – SINE – Alu-repetice

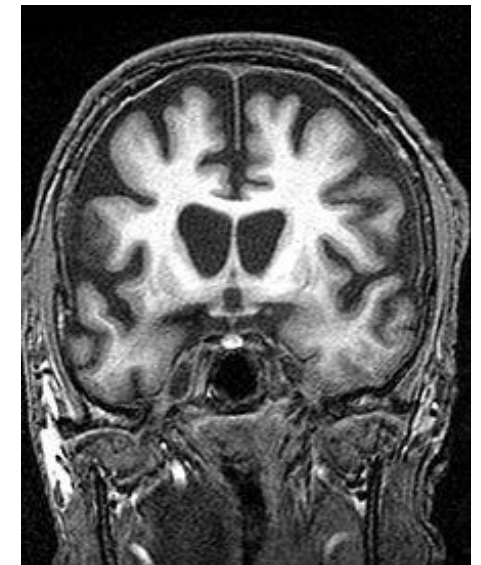
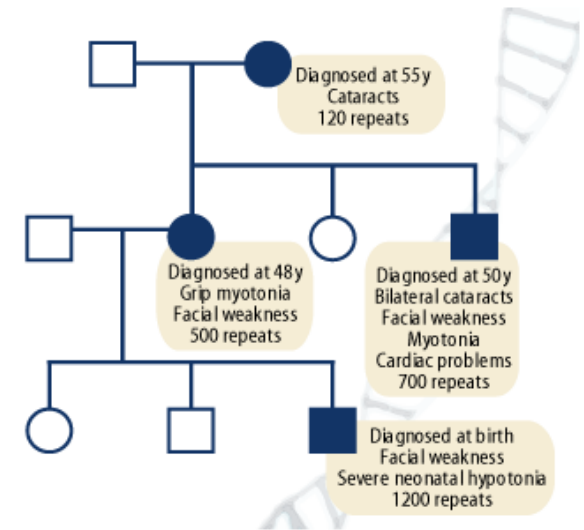
tandemové = za sebou jdoucí identické repetice, VNTR

- mikrosatelity – opakování 1- 5 bp
- minisatelity - v rozsahu kilobází (vyskytují se v subtelomerických oblastech chromozomů)
- genetické markery



Repetitivní sekvence - význam

- expanze trinukleotidových repetitivních sekvencí – větší množství repetitivních sekvencí, patologické následky
- **Huntingtonova chorea**, fatální neurologické onemocnění s nástupem v dospělosti, projevující se jako demence s extrapyramidovou poruchou motoriky. V genu pro huntingtin je repetitivní sekvence (CAG)_n, která kóduje úsek bílkoviny tvořený zbytky glutaminu (polyglutaminový úsek, polyglutamine tract). Za normálních okolností mají lidé méně než 20 trinukleotidů CAG a tedy i glutaminů v huntingtinu, kde tyto tvoří důležitou doménu pro interakce s jinými proteiny. Pokud se však mutací toto množství zvětší nad 30 glutaminů, protein nepracuje správně s výsledným progresivním odumíráním neuronů v nucleus caudatus.
- **myotonické dystrofie** (svalová dystrofie se svalovou slabostí provázenou paradoxně zvýšeným svalovým tonem) se nachází patologická expanze trinukleotidu CTG v 3' nepřekládané oblasti genu DMPK (dystrophia myotonica protein kinase). Mutantní mRNA má sama o sobě patogenní potenciál.



Telomery a jejich funkce

telomery - ochrana pro konce chromozomů spolu s proteiny
- během každého cyklu se 5' konec zkracuje (odstranění primeru z okazakiho fragmentu)

Hayflickův limit pro každou buňku
telomery - mitotické hodiny

repetice TTAGGG

telomeráza - v zárodečných buňkách
- v nádorových buňkách

telomerázová terapie:

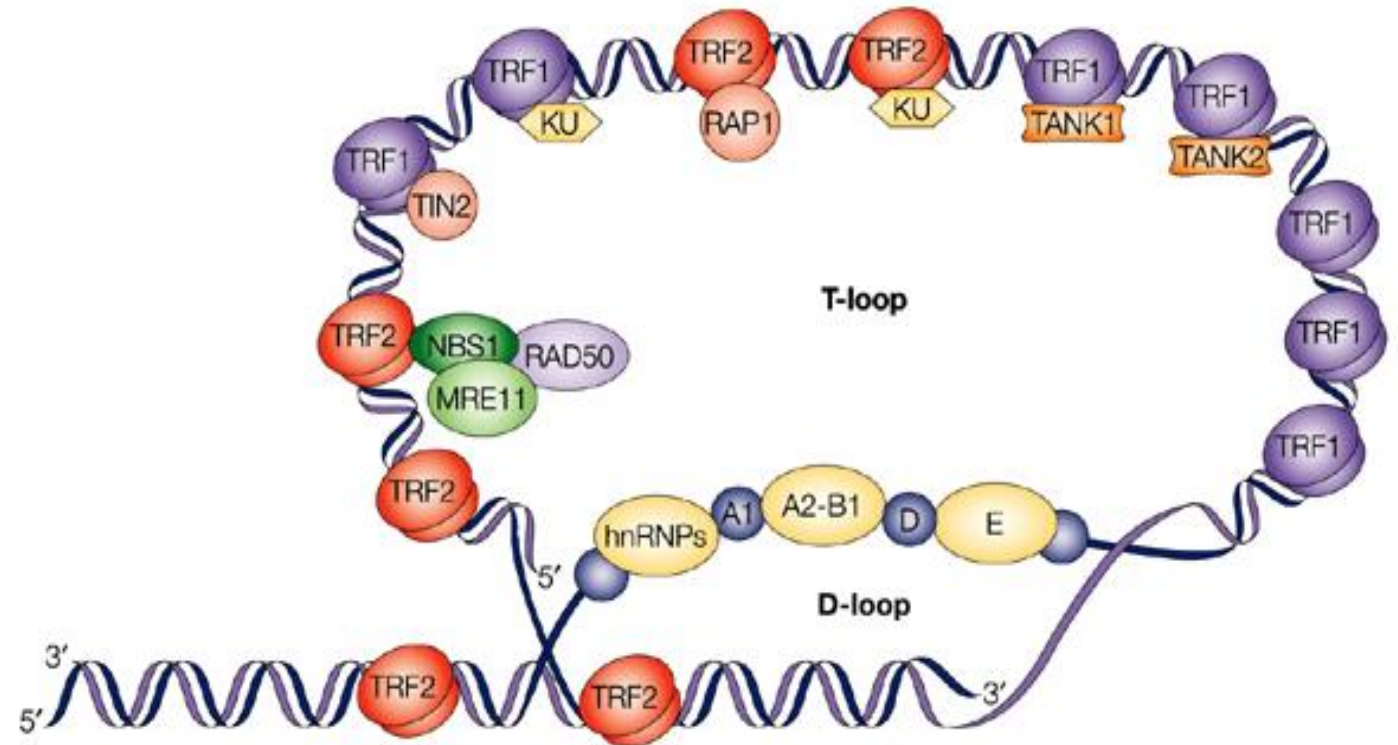
nízkomolekulární inhibitory

antisense oligonukleotidy

RNA interference

genová terapie

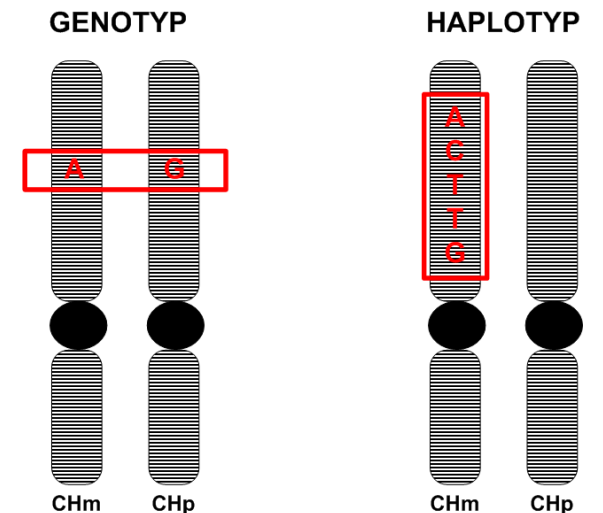
imunoterapie



Gen × alela × genotyp × fenotyp



- **gen** – základní jednotka dědičnosti
 - **genové rodiny**
 - sekvenčně podobné geny, které vznikly zřejmě duplikací během evoluce
 - např. geny pro hemoglobiny, imunoglobuliny, některé enzymy, ...
 - **pseudogeny**
 - podobné konkrétním genům ale nefunkční
- každý gen je umístěn na konkrétním místě konkrétního chromozomu = **lokus** (např. 12q21.5)
 - lokalizace genů je u všech lidí stejná, sekvence ale ne!
- **alela** – konkrétní varianta genu
 - v populaci se pro naprostou většinu genů vyskytuje vícero variant (= alel), které mohou být různě časté = **genetický polymorfismus**
- **genotyp** – kombinace alel v určitém lokusu na paternálním a maternálním chromozomu diploidního genomu
- **haplotyp** – lineární kombinace alel na jenom z homologních párů chromozomů
- **fenotyp** – vnější projev (vyjádření) genotypu
 - znak – jednoduše měřitelná, většinou spojitá proměnná
 - fenotyp – sobor znaků
 - intermediární fenotyp – podobný znaku, ne vždy musí být spojitý

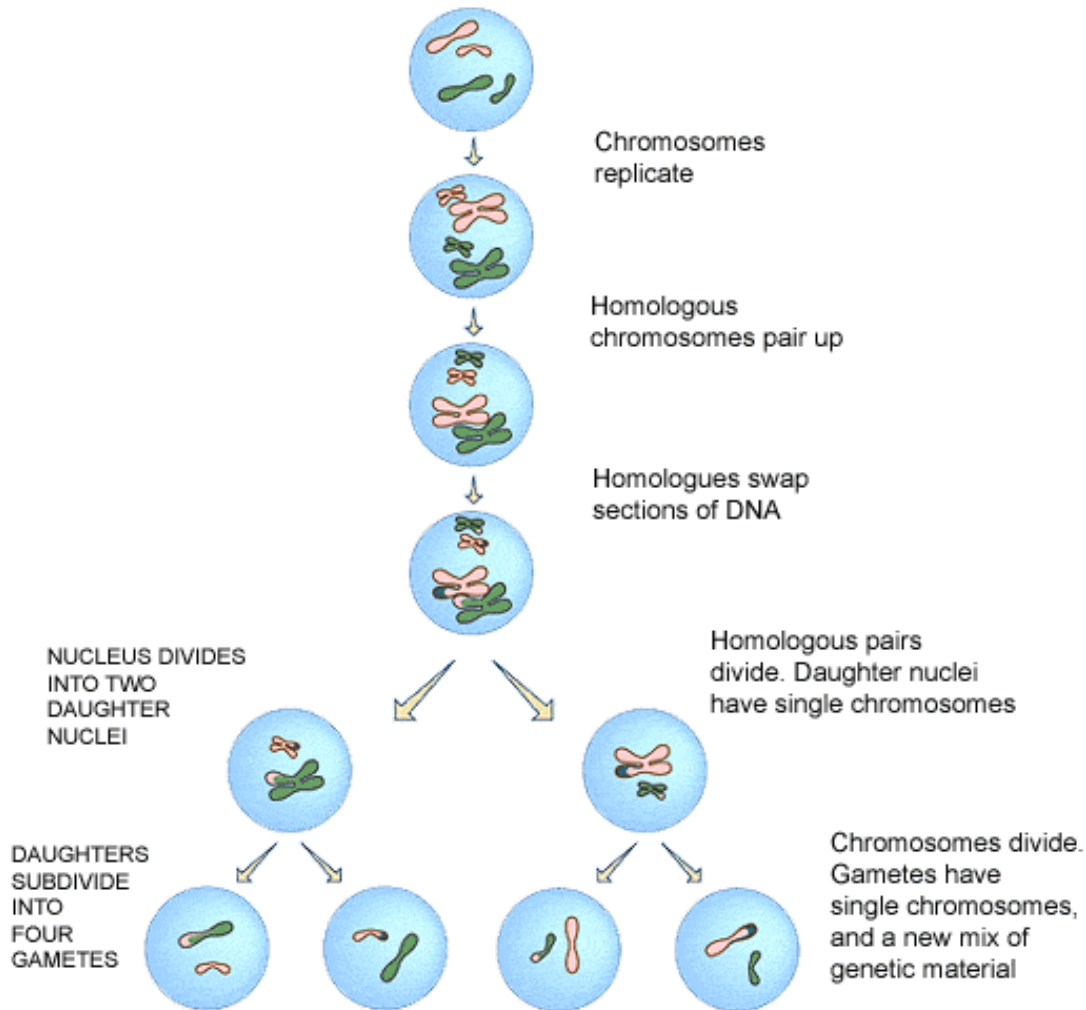


Jak velký genom sdílí člověk s banánem?

- 50-60 %
- Most DNA is involved in production of proteins, enzymes for creating or breaking down sugars, for building cellular structures and processes, etc. etc.
- Structure of the hemoglobin pigment (a protein) has a lot of common code with the structure of the chlorophyll pigment. the same basic molecule structure was basically readapted for two very different functions
- lot of DNA has no function called "junk DNA."
- It's this junk DNA that's really a tell-tale sign of common ancestry. Why else would there be common sequences of base-pairs in the DNA, that are present in both species, but serves no function in either species?
- 90% identita savců, 99,9% identita mezi lidmi



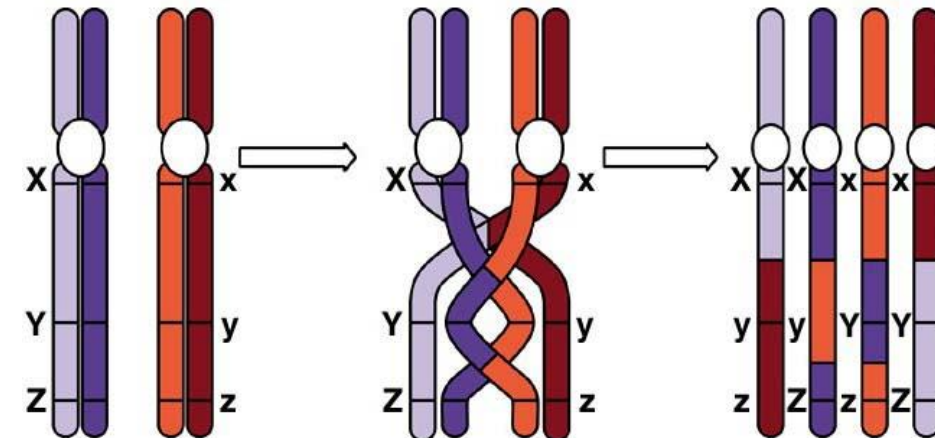
Genetická variabilita (~0.1 %)



- DNA sekvence kódujících i nekódujících úseků genomu je variabilní
- v populaci pro daný gen vyskytuje vícero variant (= alel) s různou populační frekvencí = **genetická variabilita**, která je výsledkem několika procesů
 - 1) sexuální reprodukce
 - 2) nezávislé meiotické segregace
 - 23 párů ch. → 2^{23} kombinací = 8,388,608 různých gamet
 - 3) rekombinace (meiotický crossing-over)
 - >> kombinací než 8 miliónů
 - 4) mutageneze *de novo*
 - chyba při DNA replikaci
 - proof-reading DNA polymerázy ani mismatch DNA repair není 100%
 - působení externích mutagenů
 - 5) genetický drift
 - 6) přirozená selekce

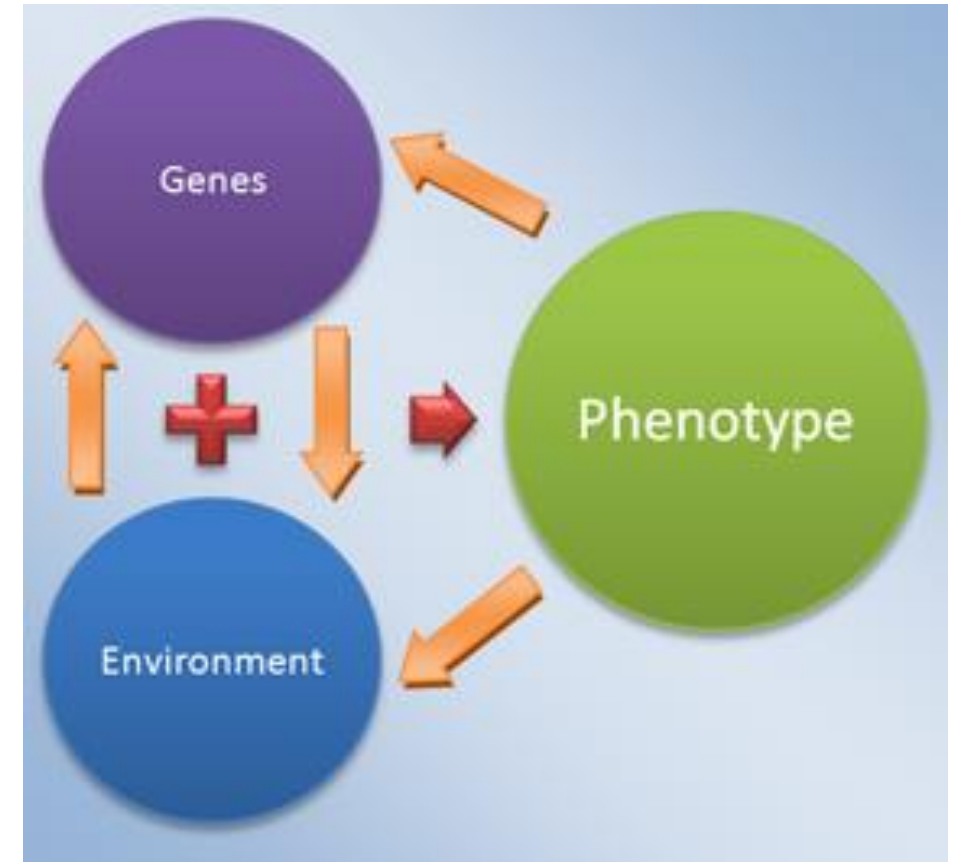
Crossing-over a rekombinace

- při meióze získává každá gameta **náhodně** 1 z páru homologního chromozomu - paternálního (CHp) nebo maternálního (CHm)
 - při celkovém množství 23 páru je teoreticky možných 2^{23} kombinací (= 8 388 608 různých gamet)
- ve skutečnosti ale gameta obsahuje směs homologního CHm a CHp chromozomu v důsledku procesů během prvního meiotického dělení = **crossing-overu** a **rekombinace**
 - takže např. alely, které původně pocházely od různých prarodičů, mohou být na jednom chromozomu
 - vzniká tedy mnohem vyšší počet kombinací než 8 miliónů
- **pravděpodobnost rekombinace** ale není pro každý úsek DNA stejná, ale záleží na vzdálenosti
 - čím blíže jsou geny u sebe tím menší je pravděpodobnost rekombinace
 - vzdálenost se může udávat i v centimorganech (1cM = 1% pravděpodobnost rekombinace)
- existence **haplotypů**
 - lineární kombinace alel (SNPs) na vícero sousedních lokusech jednoho z homologních chromozomů přenášená pohromadě (\emptyset rekombinace)
 - statistická asociace mezi DNA variantami
 - na dané chromatidě se tedy vyskytují skupiny těsně vázaných variant = **haplotypové bloky**



Vliv prostředí na lidský genom

- Genetická výbava jedince je sice osudově zadána v okamžiku zplodění, ale není pro další život konečná, protože v průběhu života se může měnit jak pod vlivem četných faktorů **epigenetických** (vlivy prostředí), tak pod vlivem **dalších faktorů genetických** (např. mutacemi somatických buněk v průběhu maligní transformace).
- **Biologické mutageny:**
onkogenní viry: adenoviry, herpes viry, virus Epstein-Barrové, Rousův sarkomální virus a Rauscherův virus leukémie
- **Fyzikální mutageny:**
záření (rentgenové, gama, UV – tvorba thymidinových dimerů)
- **Chemické mutageny:**
organické, alkylační činidla (ATB), anorganické látky, alkaloidy, kationty těžkých kovů, peroxidy, dusitany, aromatické chlorované deriváty, volné radikály (O·)



Genetická proměnlivost

- je zdrojem individuální variability (vytváří se nové kombinace alel):
 - segregace alel při vzniku gamet
 - rekombinace při crossing-overu
 - vznik náhodných kombinací alel při oplození

Mutace

- procesy, při kterých se mění počet alel (mění se kvalita a kvantita genů)
- **mutageneze** = proces vzniku mutací
- mutace = náhodné změny genotypu, změna genetické informace, poměrně vzácné

Typy mutací (indukované nebo spontánní, ty mají četnost $\sim 10^{-7}$, oprava polymerázou a proteinem p53)

- **Genové mutace**
- **Chromozomové mutace = aberace**
- **Genomové mutace**

Vzácné mutace a polymorfismus

- **vzácné mutace** - jsou výrazně patologické a tudíž jsou z populace odstraňovány selekcí, nebo vznikly nedávno a nestačily se v populaci rozšířit), vyskytuje se v populaci méně než v 1 %
- **polymorfismus** - častá mutace, tyto mutace jsou základem interindividuální variability jedinců, v jediném genu je často mnoho polymorfizmů, jejich kombinace tvoří haplotypy, vyskytuje se v populaci více než v 1 %
 - **SNP** = jednonukleotidový polymorfismus - bialelické
 - **minisatelitní a mikrosatelitní polymorfismy** - multialelické

Germinativní a somatická mutace

- **germinativní mutace** - přenášeny na potomstvo (často příčinou zániku plodu), u potomka přítomny ve všech buňkách, mají vliv na vývoj druhu, „úspěšnost“ germinativní mutace 1:100000
- **somatické mutace** - vznikají v somatických buňkách v průběhu života (maligní transformace x žádný fyziologický vliv)

Genové mutace

- mění jednotlivé geny (alely), většinou jsou indukované
- podstata je molekulární, mění se struktura DNA, ale nenarušuje se celistvost stavby chromozomu
- v somatických nebo v pohlavních buňkách
- mutace v regulačních genech pro množení a diferenciaci
→ nádorové onemocnění

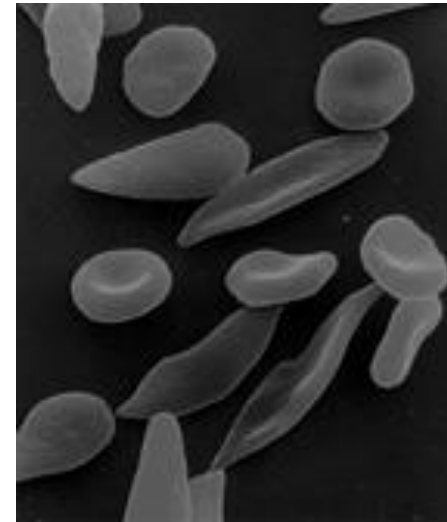
- **bodové mutace - substituce** = záměna páru nukleotidu za jiný (→ změna AA sekvence, změna v regulaci, ovlivnění transkripce a translace... nebo tvorba STOP kodonu), transverze/tranzice, spíše v exonech
- **delece/inzerce** = ztráta/zařazení nukleotidů (→ možný posun čtecího rámce), spíše v intronech

Genové mutace

Srpkovitá anemie

- missense mutace genu pro hemoglobin na 6. pozici v β -řetězci (hydrofóbní valin místo hydrofilní glutamové kyseliny, tvorba shluků Hb a tím změna tvaru ery) → HbS
- autosomálně recesivní

	ancestral	mutant
DNA	-CTC-	-CAC-
mRNA	-GAG-	-GUG-
AA	-glu-	-val-



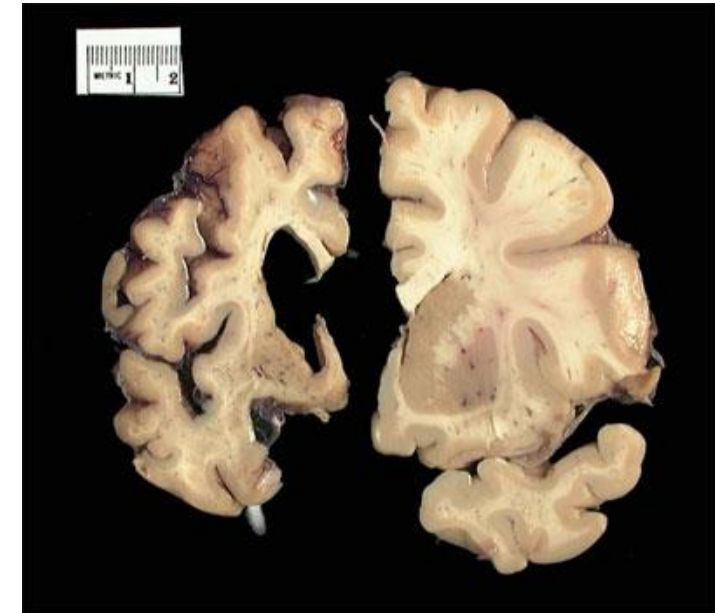
- Srpkovité červené krvinky mnohem hůř přenášejí kyslík. Lidé se srpkovitou anémií mají proto ve srovnání s obyčejnými lidmi červených krvinek víc. (Paradoxně výhoda při nákaze malárií, lepší šance na přežití)

Genové mutace

β^0 thalasemie

- nonsense mutace pro Hb – chybná syntéza jednoho z řetězců globinu
- autozomálně recesivní

	ancestral	mutant
DNA	-AGT-	-ACT-
mRNA	-UCA-	-UGA-
AA	-ser-	-STOP



Huntingtonova choroba

- trinukleotidová expanze

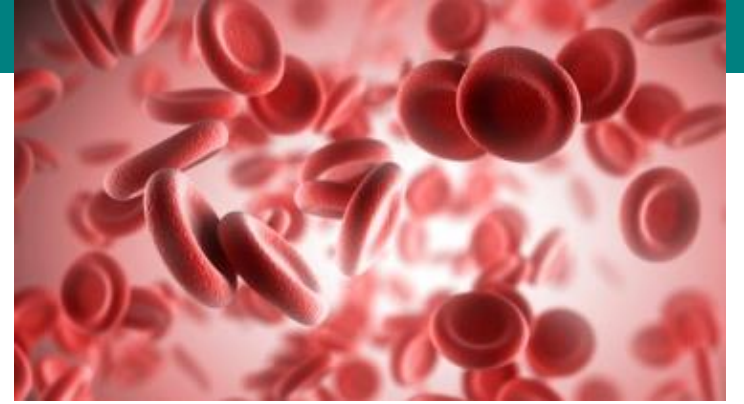
	ancestral	mutant
DNA	...TAC-GTC-...	...TAC-(GTC-GTC-GTC) ₂₀ -GTC-...
mRNA	...-AUG-CAG-...	...-AUG-(CAG-CAG-CAG) ₂₀ -CAG-...
AA	...-met-gln-...	...-met-(gln-gln-gln) ₂₀ -gln-...

Genové mutace

Hemofilie

= nedostatek srážecího faktoru

- snížení tvorby proteinu
- gonozomálně recesivní – vazba na X chromozom
- žena je přenašečka

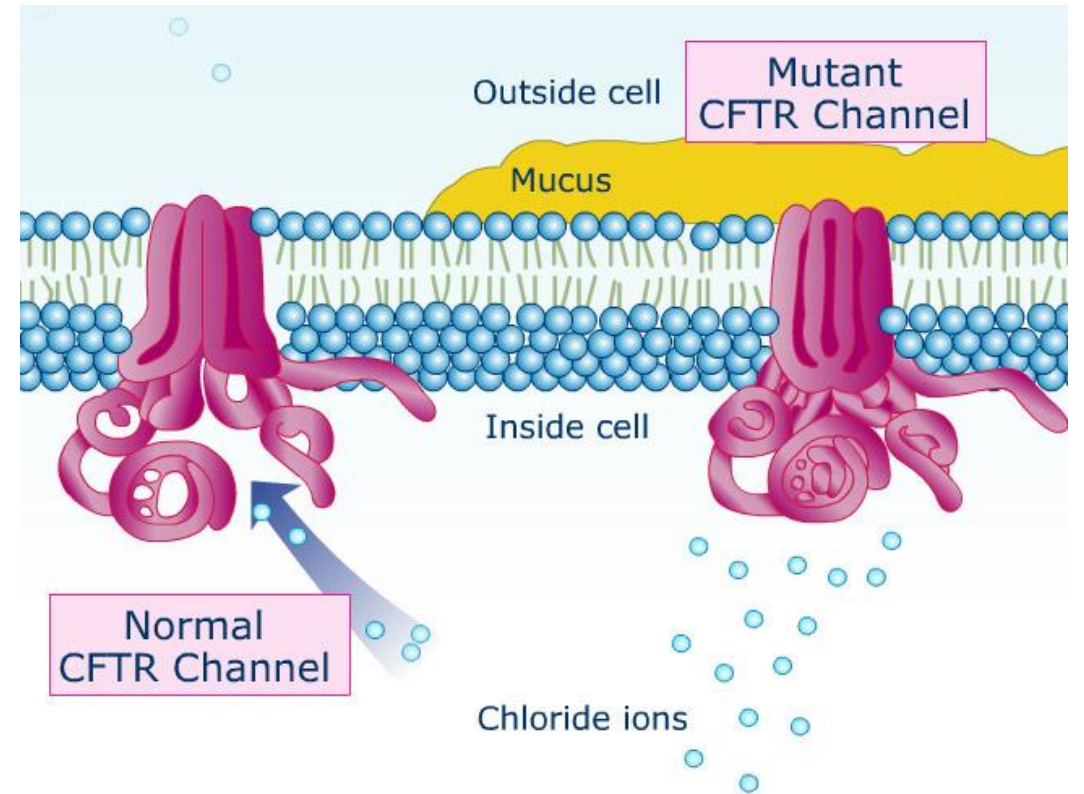


Genová mutace

Cystická fibróza

- deleční mutací genu produkujícího protein CFTR (chloridový ABC transportér na buň. membráně) → nefunkční protein
- delece 3 bp v pozici 1652 až 1655 v exonu 10 (delece phe v kodonu 508)
- autozomálně recesivní

	ancestral	mutant
DNA	-TAG-AAA-CCA-	-TA A-CCA-
mRNA	-AUC-UUU-GGU-	-AUU-GGU-
AA	-ile-phe-gly-	-ile-gly-

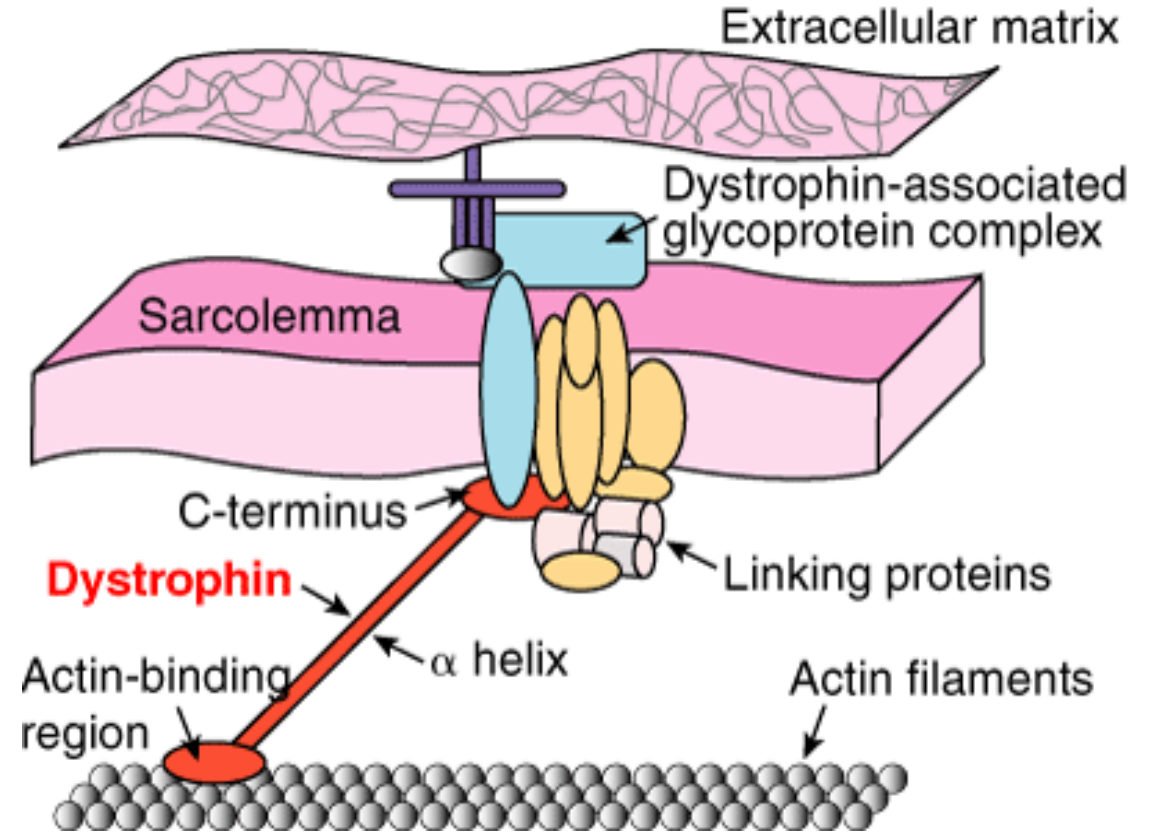


Genová mutace

Duchennova svalová dystrofie

- „frameshift“ mutace = posun čtecího rámce v genu pro protein dystrofin
- gonozomálně recesivní – vazba na X chromozom

	ancestral	mutant
DNA	-CAC-TGT	-CAC-TTG-T..-
mRNA	-GUG-ACA-	-GUG-AAC-U..-
AA	-val-thr-	-ile-gly-



Chromozomové mutace - aberace

- nemění strukturu samotných genů, ale mění strukturu chromozomů.
- dají se pozorovat ve světelném mikroskopu
- mohou být překážkou normálního průběhu meiózy a jimi postižené gamety mohou být sterilní nebo mohou po splynutí vznikat života neschopné zygoty.

Strukturní chromozomové aberace

- následkem chromozomových zlomů, na které navazuje určitá přestavba. Primární je tedy porucha struktury, přičemž původní množství genetického materiálu může - ale nemusí - být zachováno. Dělíme je na **balancované** (kdy je zachováno původní množství genetického materiálu) a **nebalancované** (kdy část genetického materiálu chybí či přebývá).
- **deficience** = ztráta koncové části chromozomu, oddělený kousek se rozpadne v cytoplazmě, dochází ke ztrátě genů, ztráta důležitých genů vede ke smrti
- **delece** = ztráta vnitřní části chromozomu.
- **duplikace** = zdvojení některých částí chromozomů
- **inverze** = převrácení části chromozomu o 180°
- **translokace** = přesun části chromozomu na jiný chromozom, může vést k vytvoření nového znaku
- **fragmentace** = rozpad na malé části

Genomové mutace

Numerické chromozomové aberace

- způsobeny abnormálním počtem chromozomů v karyotypu
- struktura chromozomů je neporušená, patologicky se uplatňuje nestandardní množství genů
- vznikají díky chybě při rozchodu chromozomů do dceřiných buněk během buněčného dělení (nondisjunkce) nebo abnormalitami fertilizace či časně embryogeneze

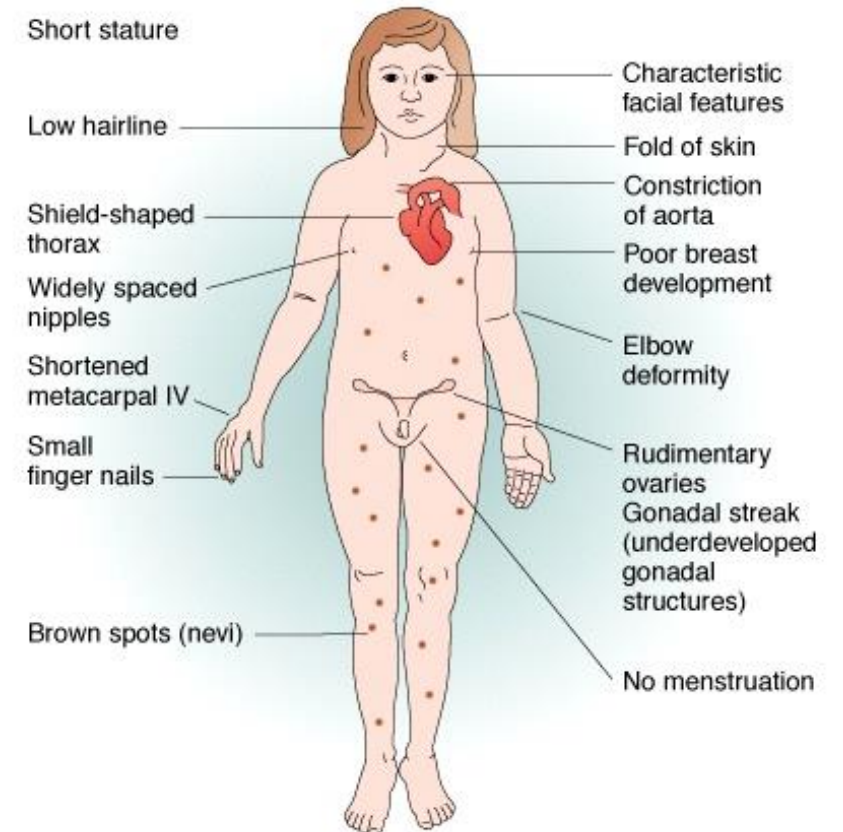
- **aneuploidie** - numerická odchylka se týká pouze určitého chromozomu nebo chromozomů, ne však celé sady. Konkrétní chromozom může být buď znásoben - **trisomie** (tři kopie chromozomu), **tetrasomie** (čtyři kopie chromozomu), nebo naopak ztracen - **monosomie** (jedna kopie chromozomu), **nulisomie** (žádná kopie chromozomu)

- **polyploidie** - znásobena je celá chromozomová sada - porucha rozdělení celých sad nebo oplození 2 spermii (dispermie), u člověka přichází v úvahu zejména triploidie ($3n = 69$ chromozomů) a tetraploidie ($4n = 92$ chromozomů), většinou ale:
 - těhotenství je potraceno
 - mola hydatidosa (plod neschopný života, invaze tkání do těla matky)
 - porod novorozence s triploidí – velmi časná letalita

Genomové mutace

Aneuploidie (změna počtu chromozomů v sadě)

- monosomie
 - gonozomální
 - Turnerův sy. (45, X0)
- trisomie
 - autozomální
 - **Downův sy.** (47, XX/XY + 21)
 - Edwardsův sy. (47, XX/XY + 18)
 - Patauův sy. (47, XX/XY + 13)
 - gonozomální
 - Klinefelterův sy. (47, XXY)
 - XXX sy.
 - XYY sy.



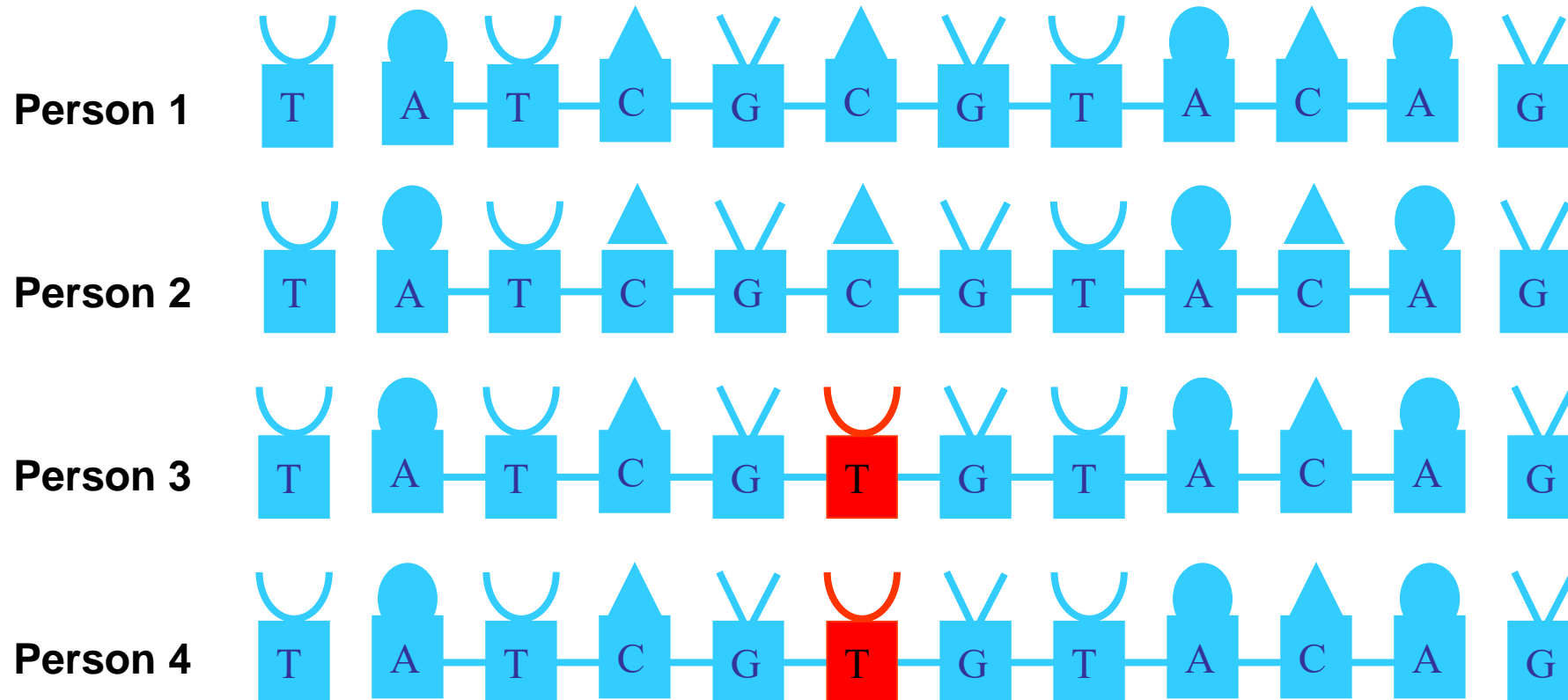
Genomové mutace

polymorfismus = existence několika (přinejmenším dvou) alel pro daný gen, z nichž nejméně častá má populační frekvenci alespoň 1%

mutace = méně častá alela má populační frekvenci <1%

pozor, existuje ale značná nejednotnost v terminologii – někdy se mutací myslí záměna v kódující oblasti genu a polymorfizmem záměna v nekódující, jindy např. mutací záměna vedoucí k rozvoji patologického fenotypu, polymorfizmem (záměna bez patologického důsledku)

Most Variants Change a Single DNA Base: Single Nucleotide Polymorphism (“SNP”)



Klasifikace geneticky podmíněných nemocí

- prakticky každá nemoc (tj. její vznik a progres) je u daného jedince modifikována genetickou výbavou, avšak s různým podílem na finálním fenotypu
 - snad s výjimkou úrazů, závažných intoxikací a vysoce virulentních infekcí, kde individuální genetická konstituce nehraje prakticky žádnou roli
- **monogenní nemoci**
 - jedna kritická "chyba" (tj. alela) konkrétního genu je sama o sobě nebo v homozygotní kombinaci téměř výhradně zodpovědná za rozvoj nemoci (fenotypu) nebo přenašečství a tedy zvýšenému riziku pro potomky
- **chromozomální poruchy**
 - nejedná se o konkrétní chybu ale o nadbytek/nedostatek genů obsažených v celých chromozomech nebo jejich segmentech ("gene dosage" efekt)
- **komplexní (poly-, multigenní) nemoci**
 - genetická dispozice podmíněná kombinací alel několika genů je výrazně manifestována prostředím a komorbiditami

Monogenní nemoci

- Rozvoj molekulárně biologických metod umožnil detailní analýzu genetického podkladu mnoha mendelisticky děděných, tzv. **monogenních nemocí**.
- U těchto chorob se dědičný podklad uplatňuje jako **velký faktor**, tj. je přítomen prakticky u všech nemocných a jedná se prokazatelně o faktor příčinný (např. defekty v dystrofinovém genu u muskulárních dystrofií), k němuž se přidávají jen jako přídavné další faktory genetické i faktory zevního prostředí. Příčinou těchto nemocí bývají především tzv. vzácné alely.
- je determinována alelami v jednom lokusu
- variantní alela, která vznikla mutací někdy v nedávné nebo vzdálené minulosti a je většinou relativně málo častá, nahrazuje původní „divokou“ alelu na jednom nebo obou chromozomech
- mají charakteristický způsob přenosu v rodinách

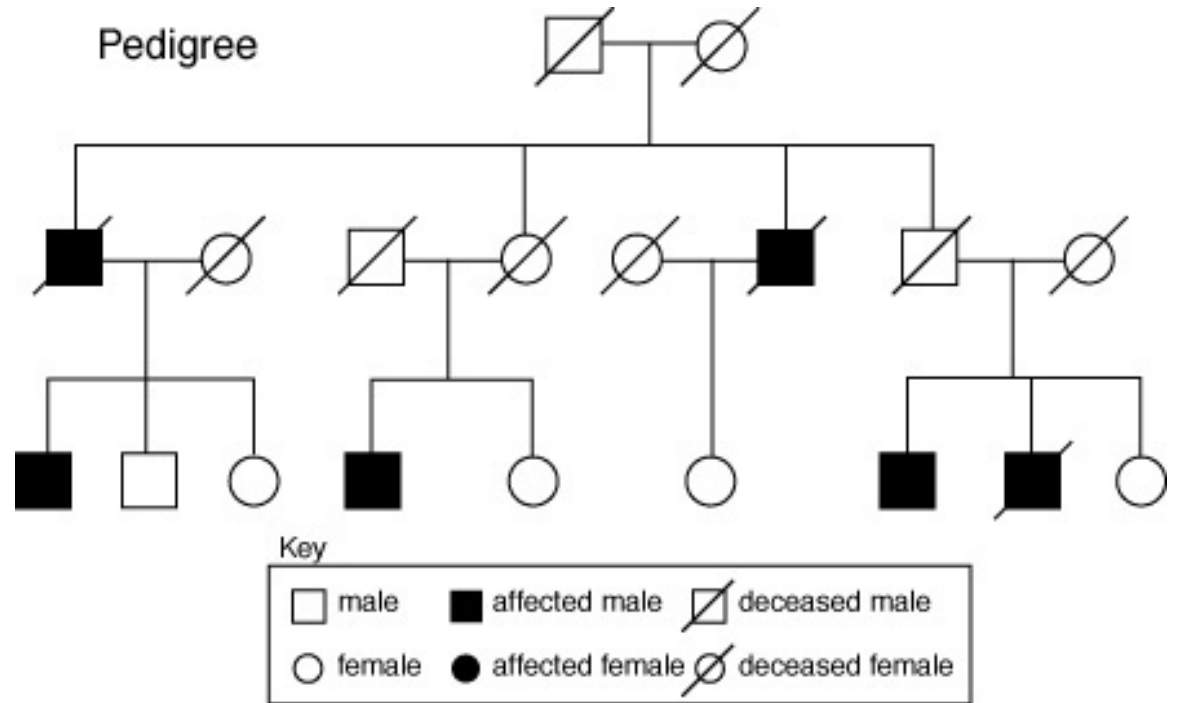
Monogenní nemoci

- choroby dětského věku
- méně než 10% z nich se manifestuje po pubertě a pouhé 1% se objeví po skončení reprodukčního věku
- často výrazně patologické
- V populační studii na 1 milionu živě narozených dětí byla incidence vážných monogenních chorob odhadnuta na 0,36%, u 6-8% hospitalizovaných dětí se uvažuje o monogenních chorobách.
- doposud známé shrnuje OMIM (On-line Mendelian Inheritance in Man)
~6000 klinicky významných fenotypů
- čtyři základní typy dědičnosti:

	dominantní	recesivní
autosomální	autosomálně dominantní (AD)	autosomálně recesivní (AR)
X-vázaný	X-dominantní (XD)	X-recesivní (XR)

Monogenní nemoci

- typy přenosu
 - autozomální
 - geny na obou autozomech aktivní
 - gonozomální (X-chromozom vázané)
 - muži hemizygotní
 - u žen 1 X-chromozom inaktivován!
 - jiné
 - imprinting, mozaicismus, ...
- podle projevu genotypu ve fenotypu
 - recesivní
 - nemoc jen u mutovaného homozygota
 - dominantní
 - nemoc stejná u heterozygota a mutovaného homozygota
 - neúplně dominantní
 - odstupňovaná tíže nemoci u heterozygota a mutovaného homozygota
 - kodominantní
 - jak normální tak patologická alela jsou vyjádřeny ve fenotypu



Monogenní nemoci - AR

- u heterozygotů s 1 mutovanou alelou stačí produkt k udržení normální funkce
- manifestní onemocnění u heterozygota je důsledkem:
 - haploinsuficience - pro normální funkci je potřeba >50% aktivního genového produktu
 - dominantně negativního efektu - syntéza abnormálního proteinu, který "soutěží" s normálním a ovlivňuje fenotyp (např. osteogenesis imperfecta)
 - zesílení funkce ("gain-of-function") - mutací je posílena přirozená vlastnost proteinu
 - ztráty heterozygoty (loss-of-heterozygosity, LOH) v somatické buňce - např. familiární predispozice k nádorům v důsledku mutací v supresorových genech (např. retinoblastom)
- velmi často enzymové defekty
- postižen je mutovaný homozygot (popř. sourozenci), heterozygotní rodiče jsou přenašeči (asymptomatictí) - riziko $0,50 \times 0,50 = 0,25$
- frekvence přenašečů nemoci v populaci $\gg \gg$ frekvence nemocných
- nejčastější AR nemocí u bělochů je cystická fibróza (f nemocných 1/2000, f přenašečů 1/22)
- konsanguinita (příbuzní rodiče) a geneticky izolované populace (např. Aškenazi židé – Tay-Sachsova choroba)

Monogenní nemoci - AD

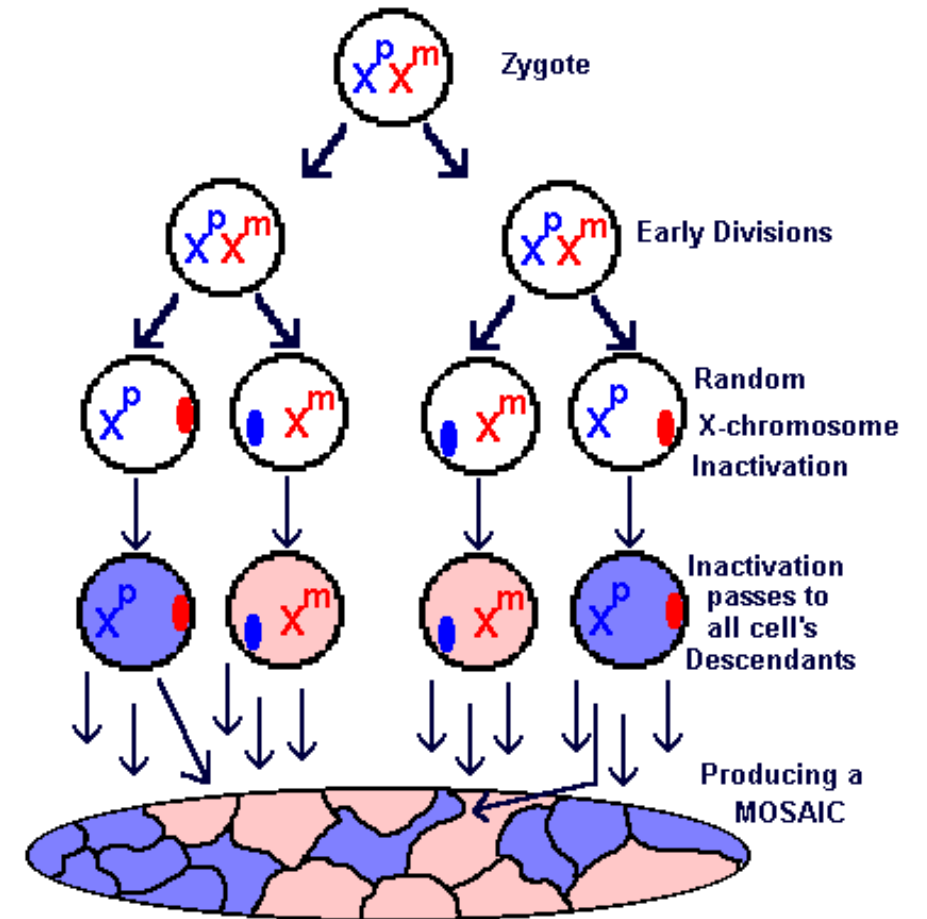
- nemoci jsou důsledkem jak mutací přenášených mezi generacemi tak vzniklých nově
- nemoc se projevuje v každé generaci - postižený jedinec má postiženého rodiče (a prarodiče), a to matku nebo otce
- riziko pro potomka 0,50 (pokud by byli oba rodiče postižení pak 0,75, ale to je vzácné)

- familiární hypercholesterolemie (1/500),
- myotonická svalová dystrofie (1/1000)
- Huntingtonova chorea (1/3000)

Monogenní nemoci - X-vázané

- ženy 3 genotypy, muži pouze 2
- X-vázané nemoci se manifestují u všech mužů, kteří zdělili mutaci, a pouze u homozygotních žen
- hemofilie A
- Duchenneova muskulární dystrofie
- Wiskott-Aldrichův syndrom (imunodeficiencie)

- inaktivace X-chromozomu u žen
 - kompenzace dávky a exprese X-vázaných genů
 - hypotéza Lyonové ("lyonizace")
 - v somatických bb. je 1 X inaktivovaný a v interfázi se zobrazuje jako "Barrovo" tělísko (viz sporné identifikace pohlaví)
 - proces je náhodný, může se týkat jak otcovského tak mateřského X
 - důsledkem je variabilní exprese X-vázaných genů u heterozygotek ("manifestující přenašečka")
 - funkční mozaicismus



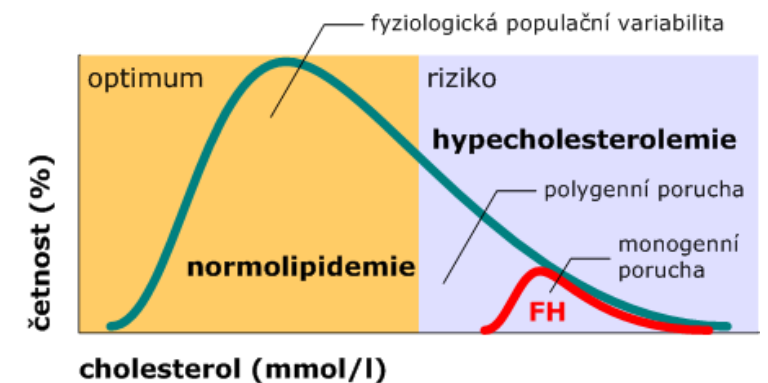
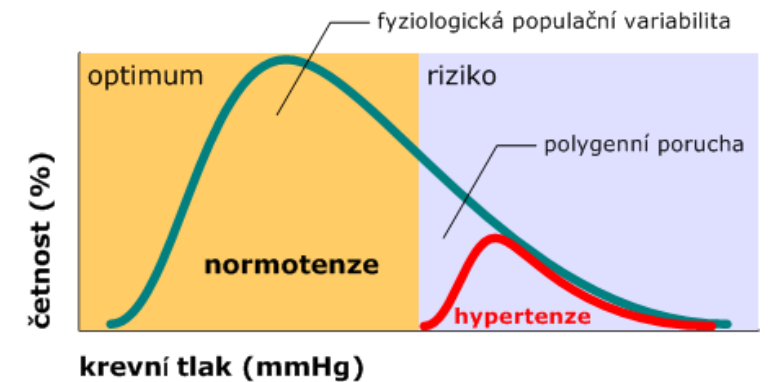
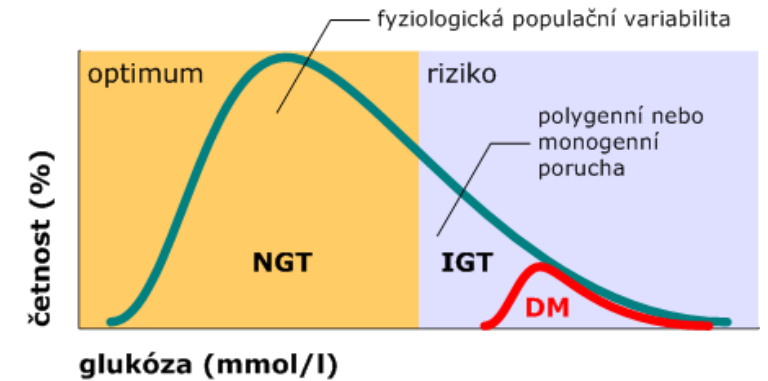
Komplexní nemoci

- multifaktoriální, multigenní
- roli hrají kombinace určitých genů a určitých faktorů zevního prostředí
- Na odhalení nejobecnějších principů genetiky multifaktoriálních nemocí se na rozdíl od genetiky nemocí mendelistických v současné době stále ještě čeká.
- v klinické praxi často kolísá názor na výsledky genetických studií, které se snaží odhalit genetický podklad komplexních nemocí, od neodůvodněného očekávání nad nalezenými geny velkého účinku až po velkou skepsi vzhledem k existenci genetického podkladu v populaci četných nemocí (nad 1%), jako je v kardiologii např. esenciální hypertenze.
- pokud choroba má prokazatelně familiární výskyt, musíme očekávat podíl genetického podkladu na její manifestaci, a to i v tom případě, že není dosud dobře definován nebo dosavadní znalost nepovažujeme za přesvědčivou.
- Své genetické pozadí mají i tak relativně vzdálené proximální fenotypy, jako je např. kvalita života u nemocných s chronickým kardiovaskulárním onemocněním.

Každá choroba má nějaké genetické pozadí, jehož podíl na manifestaci dané choroby je různý.

Komplexní nemoci

- choroby, na jejichž vzniku a progresi se podílí „komplex“ genetických, epigenetických a vnějších faktorů
 - fenotyp nevykazuje klasickou mendelistickou dominantní či recesivní dědičnost jako důsledek změn v jediném lokusu (tzv. jednolokusových)
- **predisponující "geny"** zvyšují pravděpodobnost onemocnění, ale nedeterminuje jednoznačně jeho přítomnost
 - je nutné spolupůsobení negenetických faktorů (**prostředí**)
 - dieta, fyzická aktivita, kouření,
 - a **interakcí genů** mezi sebou
- nejčastější komplexní nemoci
 - diabetes (1. i 2. typu)
 - dyslipidemie
 - esenciální hypertenze
 - alergie



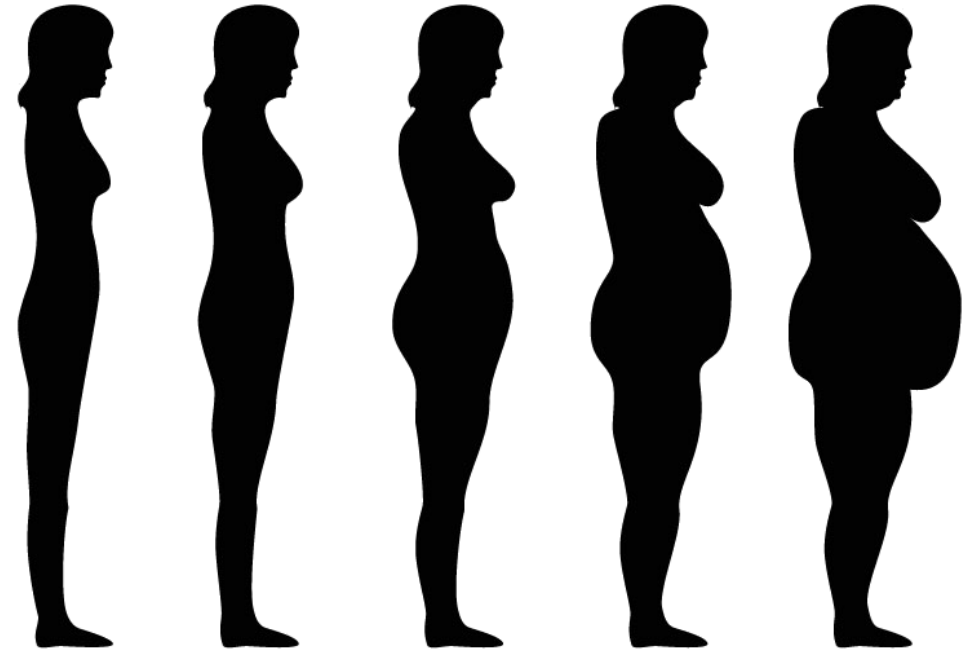
Komplexní nemoci

- komplexní onemocnění jsou charakterizována:
 - neúplnou penetrancí patologického fenotypu
 - u určité části osob, přestože zdědí nevýhodný genotyp (zde ve smyslu souboru vícero genů) se patologický fenotyp nerozvine
 - existencí fenokopí
 - patologický fenotyp může být přítomen u lidí, kteří nejsou nosiči zmíněného genotypu
 - genetickou heterogenitou (lokusovou a alelickou)
 - klinický obraz není specifický, ale může se rozvinout v důsledku záměn v genech ležících na různých lokusech (= lokusová heterogenita), v jednotlivých genech může být přítom vícero mutací či polymorfizmů (= alelická heterogenita)
 - polygenní dědičností
 - predispozice k rozvoji patologického fenotypu se zvyšuje pouze při simultánním výskytu určitého souboru alel
 - vysokou populační frekvencí alel zodpovědných za rozvoj patologického fenotypu
 - každá jednotlivá predisponující alela pravděpodobně není sama o sobě výrazně patogenní
 - spolupůsobením dalších mechanismů přenosu
 - mitochondriální dědičnost, imprinting

Komplexní nemoci

Obezita – Hypotéza typu „thrifty genotype!“

- V současné populaci jsou selektovány alely, které favorizují přírůstek váhy a skladování tuků, aby byl zajištěn dostatek živin pro častá období nedostatku potravy.
- Při konstantně vysoké nabídce potravy a poklesu fyzické aktivity tato predispozice vede v rozvinutých zemích k pandemii obezity.



	JEDNOLOKUSOVÉ NEMOCI	KOMPLEXNÍ NEMOCI
Závažnost		

Genetické studie

- Základní debata nad genetickým podkladem nemocí logicky začíná od strategie výběru tzv. **kandidátních genů**. Tato otázka je podstatně jednodušší u mendelisticky děděných nemocí, kde se změněná funkce jednoho genu snadněji identifikuje.
- **Celogenomové asociační studie** (GWAS=Genome-Wide Association Study) vyhledávají polymorfismus jednotlivých nukleotidů nebo běžné genové variace, které se typicky chovají jako ukazatelé genových oblastí s malým efektem u stoupajícího rizika nemocí.
- Dalším významným momentem je výběr statistické metodologie, která zhodnotí sílu asociace genů s chorobami. Možnosti jsou v zásadě dvě: **linkage (vazebná) analýza a asociační studie**. K detekci specifických genetických oblastí a genů, které se účastní v transmisi nemoci, je v principu možné použít obě metody.

Genetické studie

- s intermediálním fenotypem
- s klinickou manifestací nemoci
- s klinickou závažností nemoci
- s odpovídavostí nemoci na léčbu

Linkage (vazebná) analýza

- testuje kosegregaci genového markeru a fenotypu nemoci v rodině. Čili marker a nemoc se v dané rodině mají vždy vyskytovat spolu.

Asociační studie

- vyšetřují souvýskyt markeru a nemoci na populační úrovni, tj. u nepříbuzných jedinců, obvykle srovnáním frekvencí markerů u nepříbuzných nemocných a kontrolních subjektů (studie case-control).
- Statistickou sílu asociace je možno dále zvýšit obohacením o další kritéria, jako jsou klinické subtypy nemoci (studie case-case), závažnost nemoci, časný začátek nemoci, rizikové faktory pro nemoc včetně pohlaví a vhodné biologické znaky (např. plasmatické hladiny cytokinů při asociaci genetických polymorfismů v cytokinových genech; studie genotyp-fenotyp).

Klinická genetika

- **zabývá se diagnostikou, léčením a prevencí genetických nemocí**
- **genetické poradenství**
- **vrozené vady** - poruchy utváření orgánů, které vznikly v období nitroděložního života, i poruchy funkční (např. duševní opoždění) a poruchy na úrovni biochemické a molekulární (např. vrozené vady metabolismu).

Skupina	Příčina	Zastoupení
Primárně (geneticky)	chromozomální aberace	10 %
	monogenní dědičnost	20 %
Sekundárně (prostředí)	léky, infekce, záření	5 %
	porodní poranění	12 %
	infekce po narození	7 %
Neznámé (multifaktoriální)	geny + prostředí	46 %

Klinická genetiká

Prenatální diagnostika

- zahrnuje vyšetřovací postupy směřující k vyhledávání statisticky významné odchylky ve struktuře nebo funkci, která přesahuje hranice fenotypové variability
- umožňuje v závažných případech ukončení gravidity, u dalších je možno v předstihu plánovat optimální perinatální péči.

Rizikové faktory:

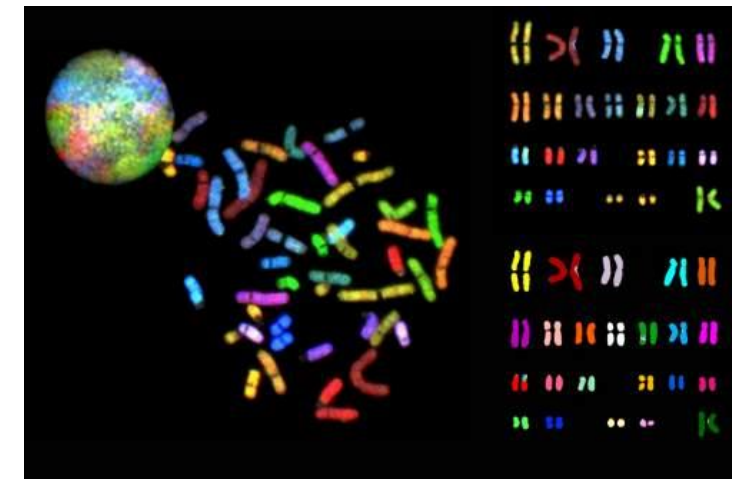
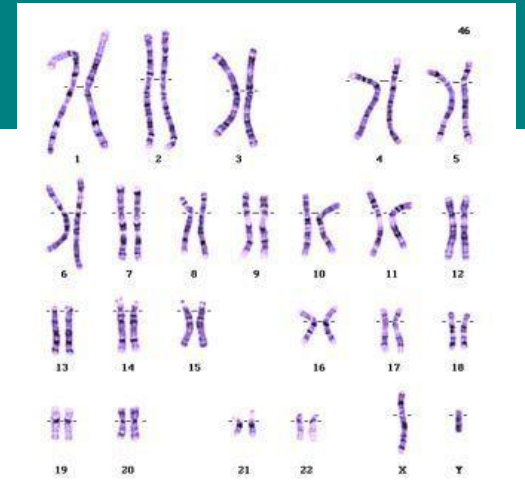
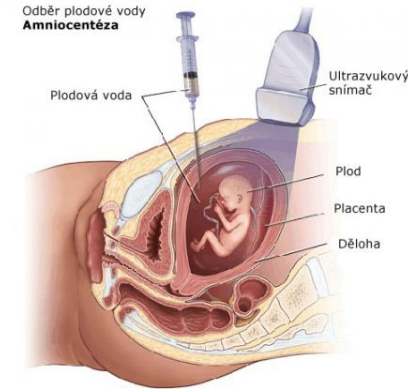
- věk matky v době porodu je vyšší jak 35 let
- pozitivní biochemický screening z krve matky
- ultrazvukový nález, který zvyšuje riziko přítomnosti chromozomální aberace (nahromadění tekutiny v podkoží, nepřítomnost nosní kůstky, srdeční vada plodu aj.)
- přítomnost chromozomální aberace v rodině



Klinická genetiká

Vyšetření karyotypu plodu

- invazivní metody - amniocentéza, biopsie choriových klků, kordocentéza
- genetické vyšetření, přesněji **vyšetření cytogenetické** (neboť se vyšetřují chromozomy), ovšem nejedná se o test DNA
- **FISH** – fluoresceční hybridizace in situ
- vazba denaturované sDNA se specifickou sondou
- **AmnioPCR** je moderní metoda sloužící ke genetickému vyšetření plodu.
- porovnání DNA markerů matky i plodu → stanovení počtu jednotlivých chromozomů u plodu.
- výsledek je následně potvrzen klasickým cytogenetickým vyšetřením
- K dispozici je v současné době vyšetření 21. chromozomu - amnioPCR, nebo sada vyšetřující chromozomy 13,18, 21, X a Y- tzv. multiamnioPCR.



Klinická genetiká



Stanovení pohlaví plodu

- volné fetální DNA kolující v krvi matky
- neinvazivní s přesností ~98 %
- od 10. týdne těhotenství
- DNA plodu z venózní krve matky
- z klinického hlediska je určení pohlaví plodu důležité v případě rizika nějaké genetické choroby vázané na určité pohlaví (např. hemofilie).

Preimplantační diagnostika

- metodu časně prenatalní diagnostiky, která je vázána na techniky umělého oplodnění. Za účelem minimalizace chyby genetického vyšetření je třeba k oplozování vajíček použít metody intracytoplazmatické injekce spermie
- buňky pro genetické vyšetření jsou odebírány z embrya nejčastěji ve stadiu 8 buněk nebo blastocysty

Postnatální diagnostika

- např. trombofilie, cystická fibróza, ...



Klinická genetiká

Trombofilie

- vrožený sklon ke zvýšenému srážení krve
- může být v některých případech pro své nositele výhodná (omezení ztrát krve při poranění)
- příčinou různých komplikací v těhotenství, při dlouhodobém znehybnění nebo při užívání některých léků může způsobit hlubokou trombózu či plicní embolii
- genetické vyšetření u: gravidních, před začátkem užívání hormonální antikoncepce, před chirurgickým zákrokem



Leidenská mutace – mutace genu pro inhibitor koagulace faktor V - riziko trombembolie ~30 %, genová mutace rs6025 G1691A, R506Q (arg→gln), AD

Hyperhomocysteinemie - mutace enzymu konvertujícího kyselinu listovou – metyltetrahydrofolátreduktáza (MTHFR) - projeví při nedostatku vitaminů B6, B12 a kyseliny listové, genová mutace rs1801133 C677T, AR

Defekt antitrombinu (FII) - mutace koagulačního faktoru II zvyšujícího hladinu protrombinu – riziko trombembolie ~70 – 90 %, genová mutace rs1799963 G20210A

Klinická genetiká

Cystická fibróza

- více než 30 mutací, které způsobují toto onemocnění

důvody k vyšetření jsou:

- podezření na klinické onemocnění
- příbuzenský vztah rodičů
- opakované potraty
- léčená neplodnost



Obecný princip molekulárního klonování

klonovací vector + DNA obsahující požadovaný gen (izolace)



Dolly - přenos jádra somatické buňky do oocyty buňky (mtDNA!)

selekce pomocí selekčních markerů

reprodukce a syntéza cílového proteinu

izolace

restrikce

ligace

transformace

