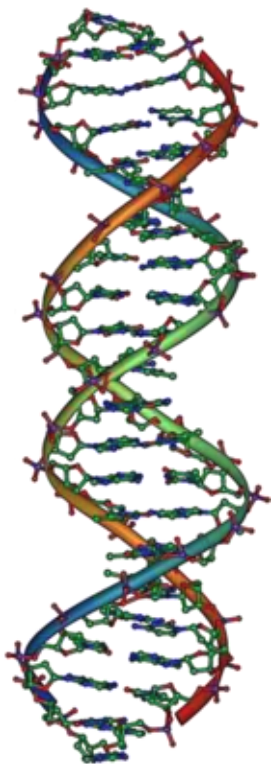
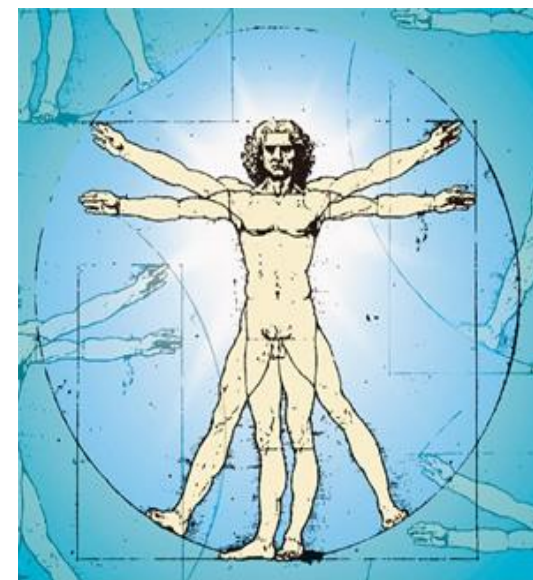


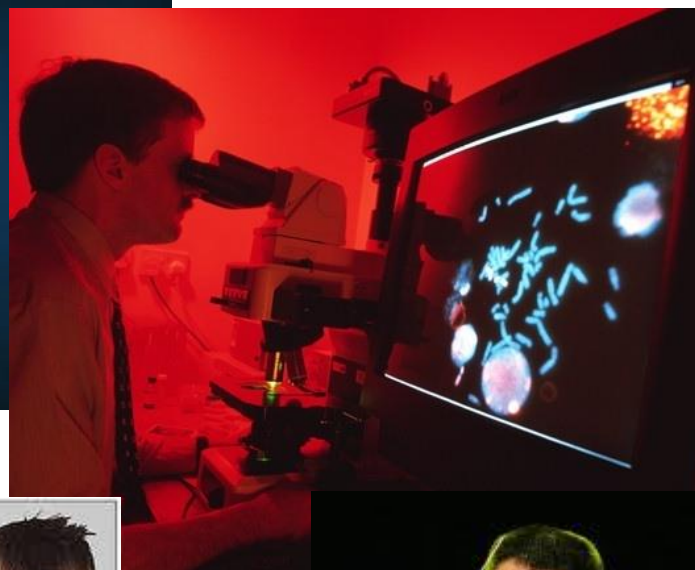
Genetika člověka / GCPSB



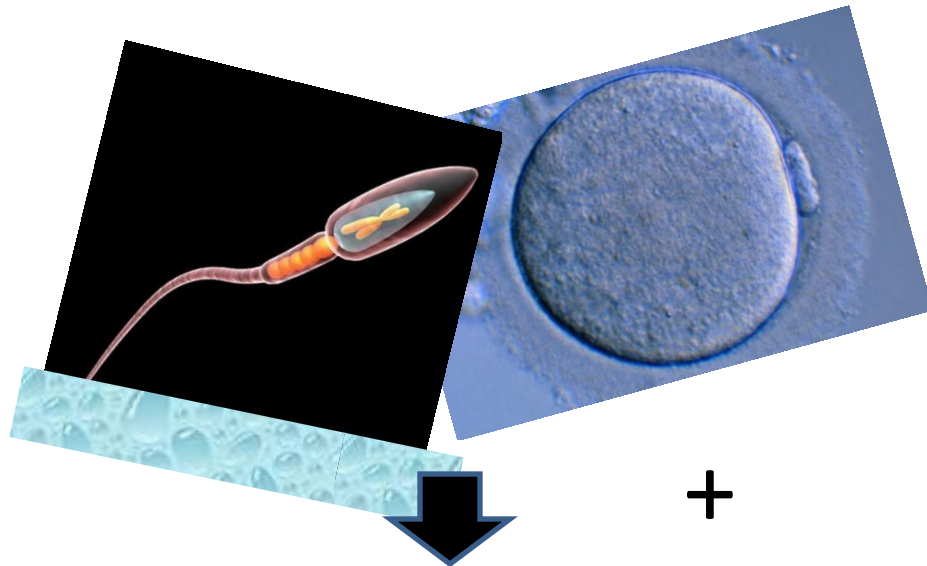
Radim Vrzal



Analýza chromosomů a s nimi spojených nemocí (část I.)



Genetický materiál: Chromosomy



Zygota

Série
buněčných
dělení



Úkoly genetického systému

Jak každá buňka dostane kompletní sadu nosičů genetické informace?

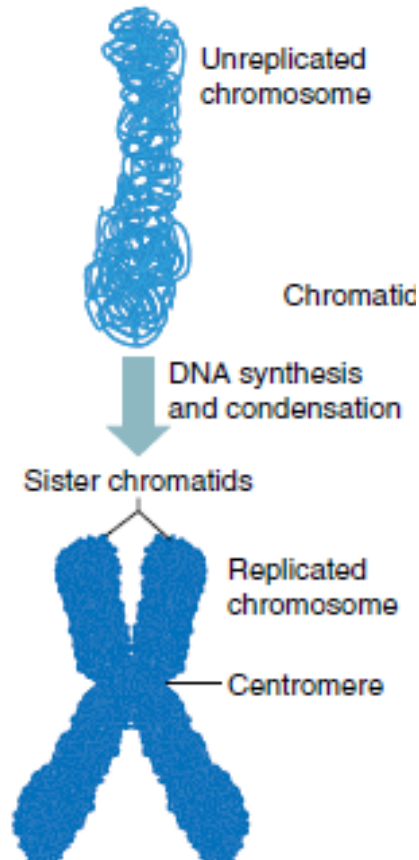
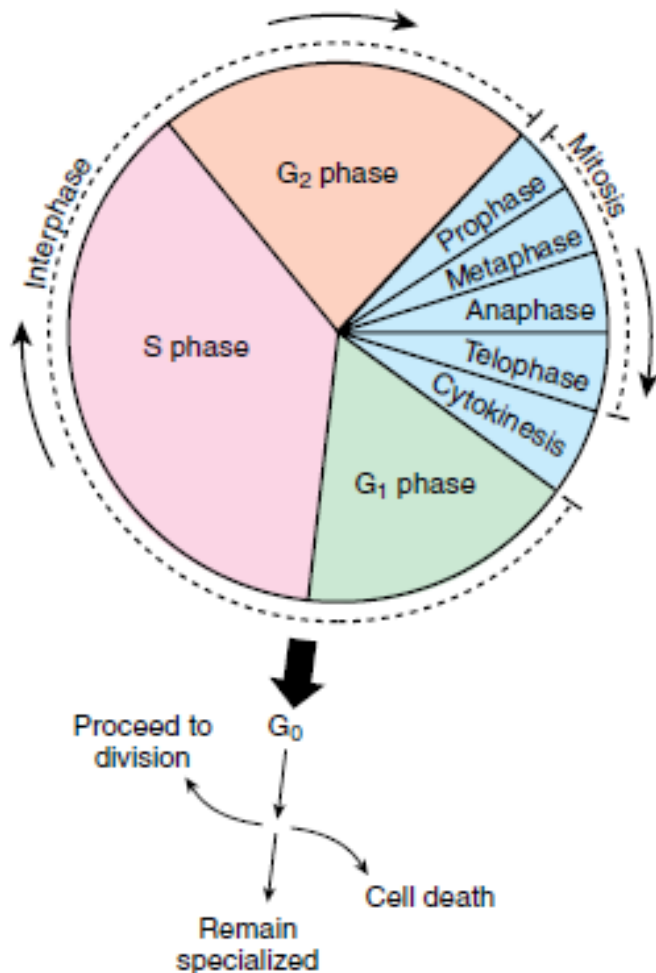
Jaký je způsob přenosu jednotek genetické informace?

Jak je genetická informace zakódována a jak je dekodována?

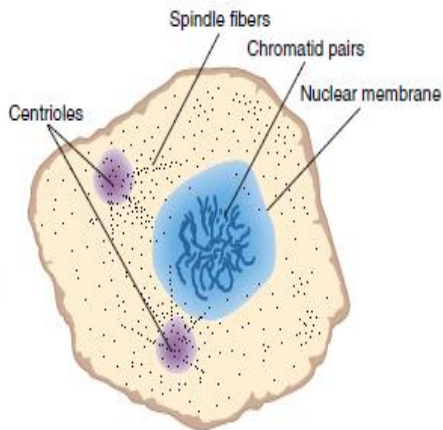
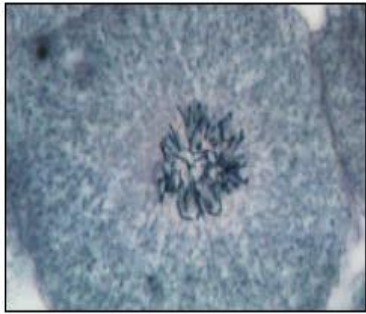
Buněčný cyklus

4 fáze buněčného cyklu

- gap 1 (G1)
- synthesis phase (S)
- gap 2 (G2)
- mitosis (M)

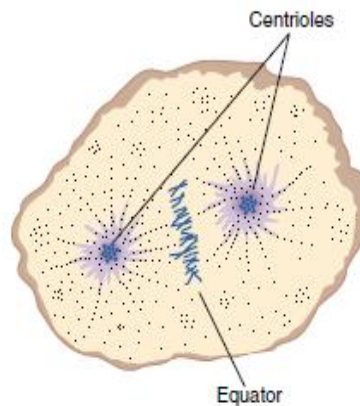
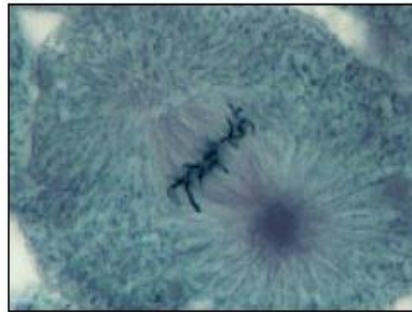


Mitosa ...aneb jak nepřibrat na váze



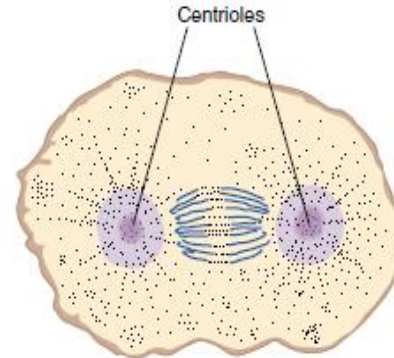
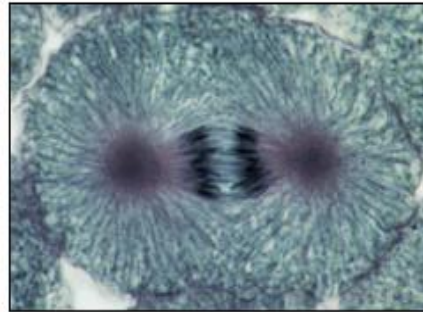
Profáze:

**Kondenzace
chromosomů
Pohyb centriol**

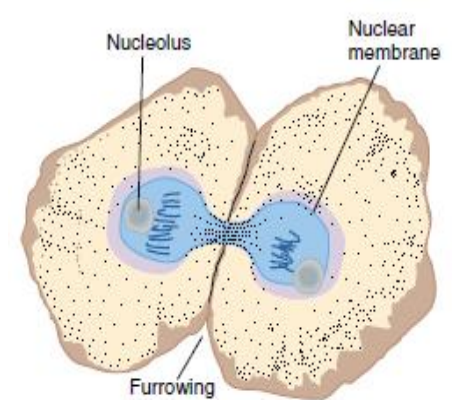
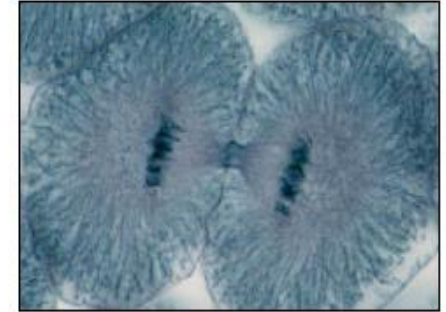


Metafáze:

**Vazba
mikrotubulul na
centrioly**



**Anafáze
(Disjunkce):
Separace
chromosomů**

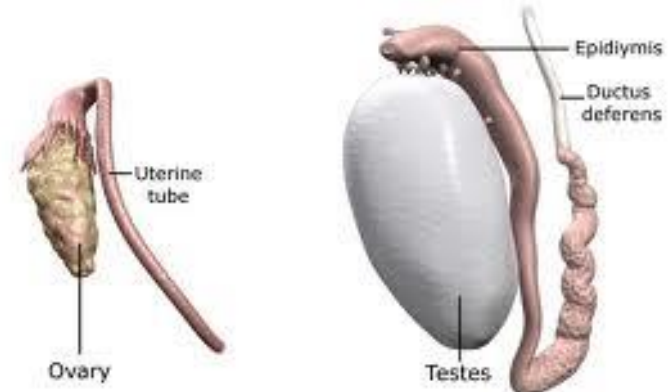
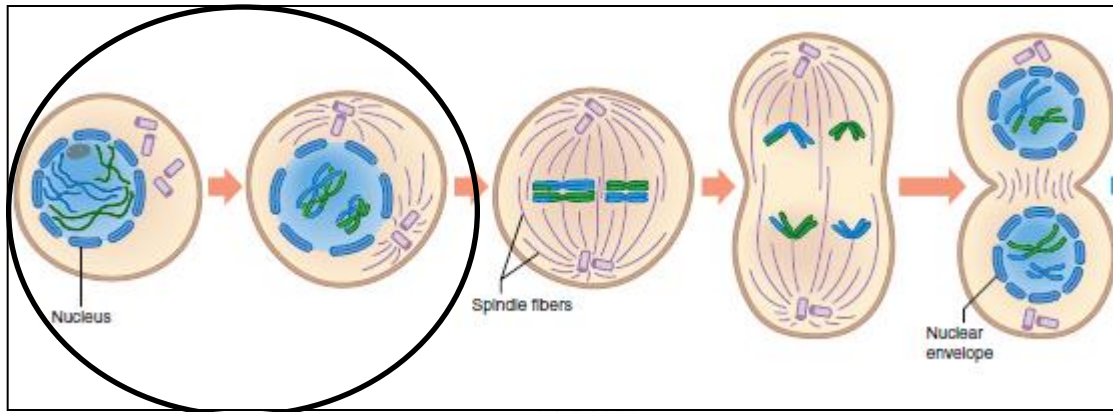


Telofáze:

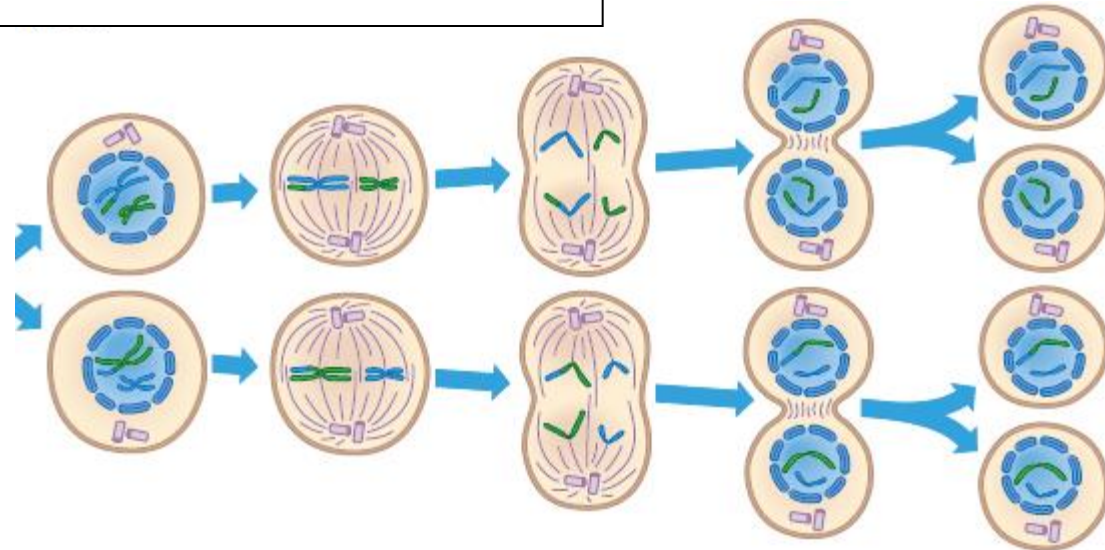
**Tvorba jaderné
membrány**

Meiosa...aneb jak efektivně zhubnout

- Jen v gonádách
- 2 dělení



Profáze I –
rozdělena do 5
stadií

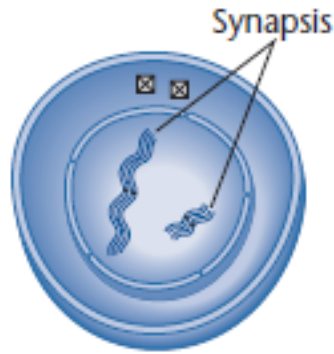


Meiosa...aneb jak efektivně zhubnout



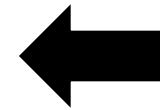
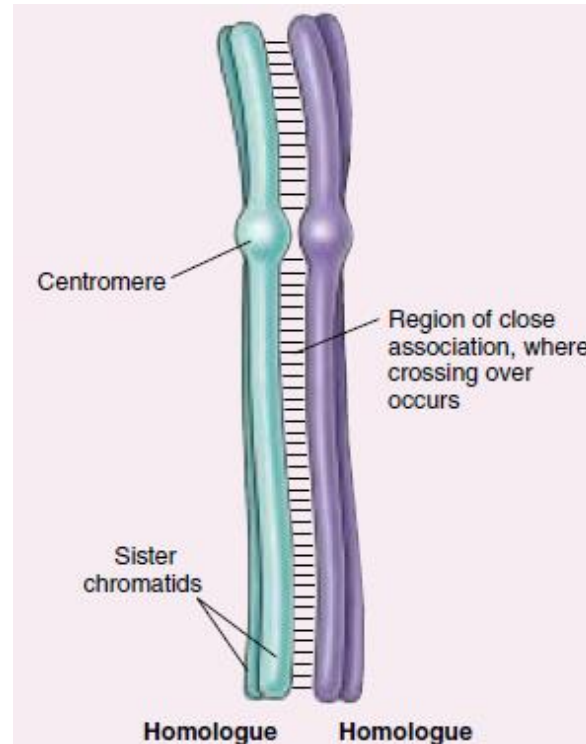
Leptotene

Zdvojené
chromosomy
začínají
kondenzovat.



Zygotene

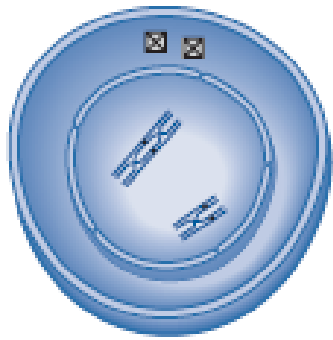
Podélné
spojení mezi
členy páru
chromosomů
(homologní) =
synapse



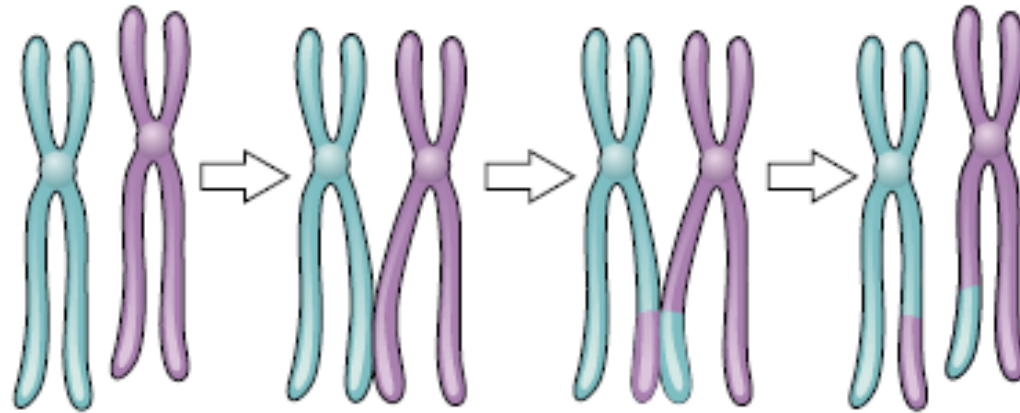
Bivalent

**Člověk = 23
bivalentů**

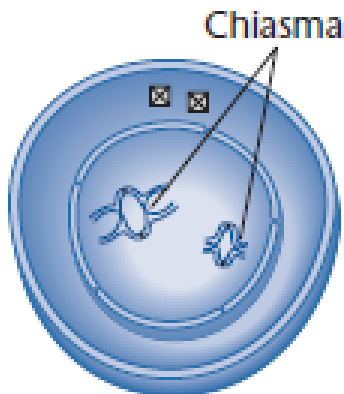
Meiosa...aneb jak efektivně zhubnout



Pachytene

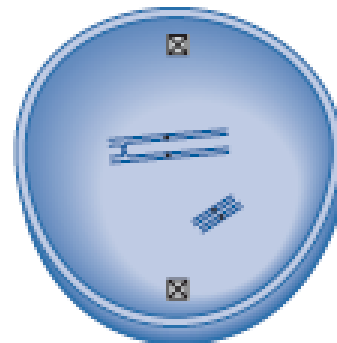


Reciproká výměna chromosomálního materiálu = **crossing over** mezi nesesterskými chromatidami



Diplotene

Ústup synase s výjimkou několika míst (chiasmata). Bivalenty kondenzují



Diakinesis

Chiasmata ustupují od centromer k telomerám. Centrioly jsou na opačných pólech, jaderná blána se rozpouští.

Meiosa...aneb jak efektivně zhubnout



Metaphase I

Uspořádání v rovníku buňky.



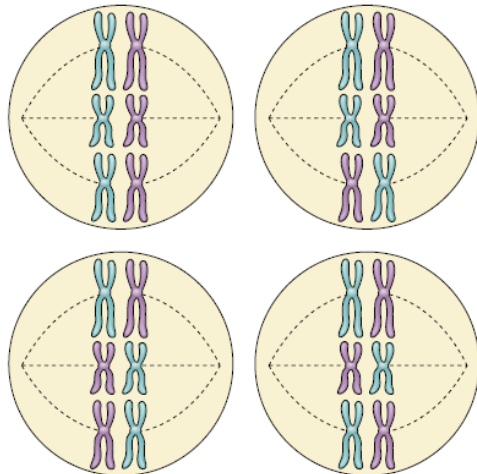
Anaphase I

Duplikované chromosomy (dyády) z každého bivalentu se rozcházejí.



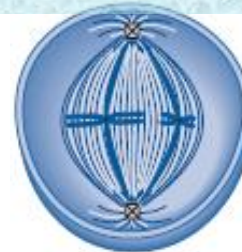
Telophase I

Vznik jaderné membrány a tvorba dceřiných buněk. Každá obsahuje 23 duplikovaných chromosomů.



2ⁿ kombinací uspořádání (n = počet chromosomových párů)

Meiosa II nemá S fázi. Na konci má každá buňka 23 jednoduchých chromosomů.



Metaphase II



Anaphase II



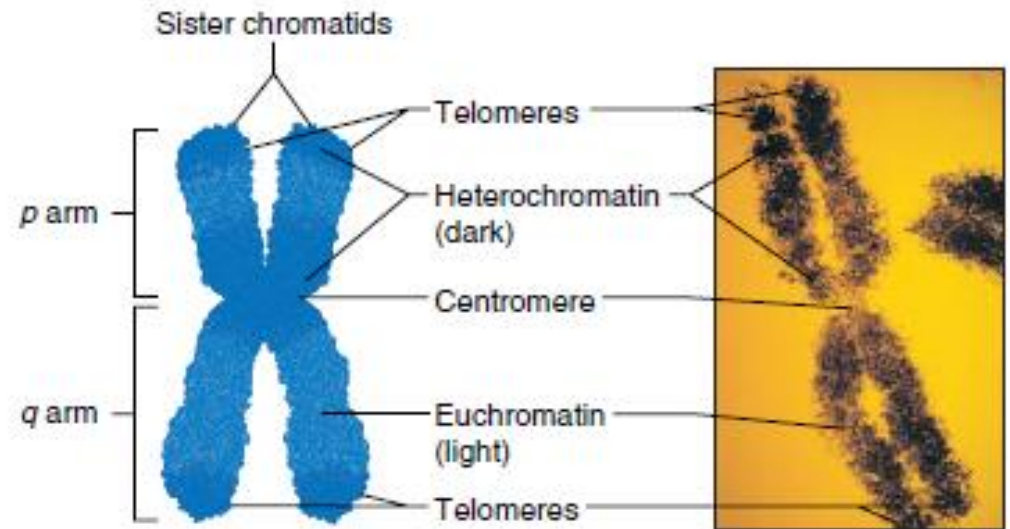
Telophase II

Charakterizace chromozomů

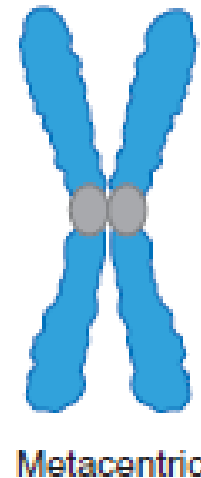
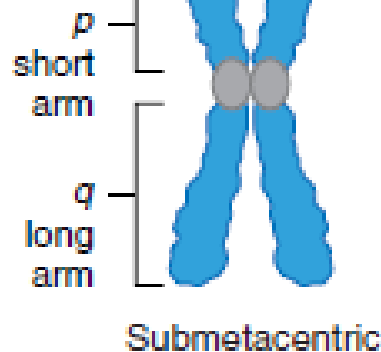
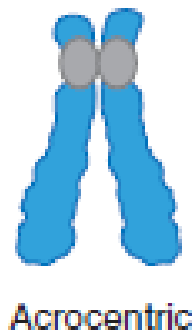
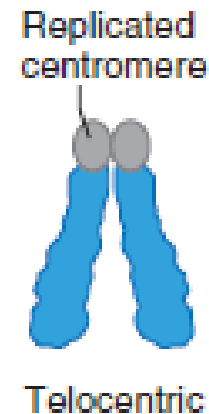
Cytogenetika – spojuje variace chromosomů k určitému znaku (spojení HUGO + cytogenetika)

Velikost a tvar → 22 párů drží pohromadě = autosomy
23. pár = pohlavní chromosomy,
u žen oba stejné = X,
muži = X + Y

***In vitro* studie – metafázní blok (kolchicin)**



Místo primárního zaškrvení (centromera) - společný znak chromosomů → dvě raménka chromosomů → krátké (p), malé (q)



Charakterizace chromozomů

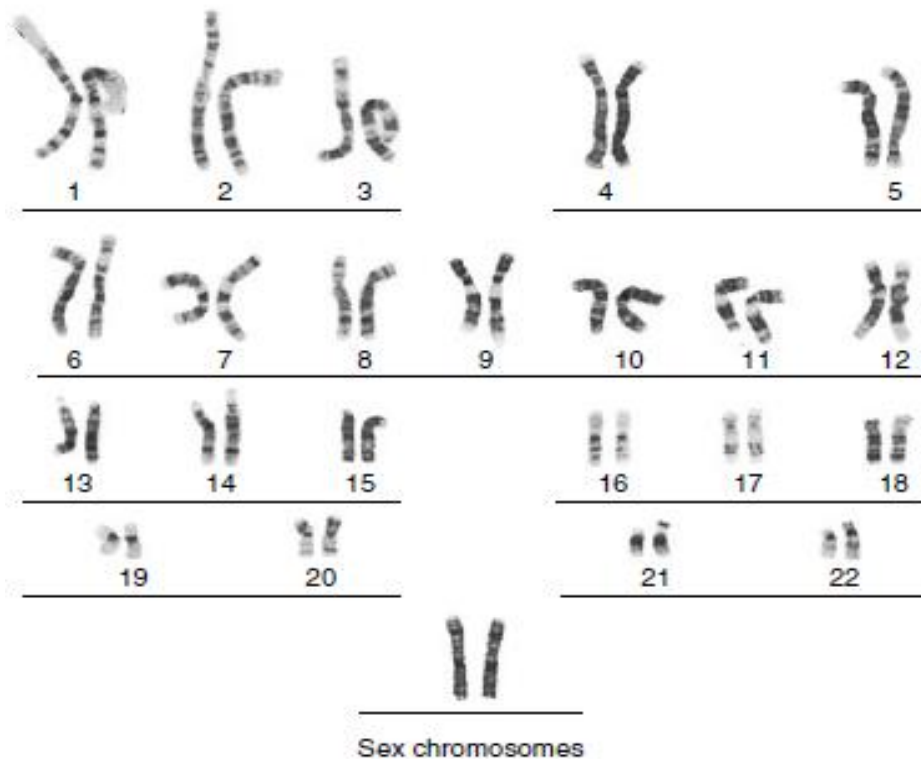
Počáteční klasifikace – dle poměru p/q, centromerového indexu $100 \cdot p/(p+q)$, délky každého chromosomu vůči celkové délce haploidní sestavy
→ nejdelší chromosom 1 – dle konvence

Karyotyp = soubor všech chromozomů v jádře buňky

Reálně označení chromozomů
neodráží skutečnou velikost
(22 > 21)

Některé chromosomy mají
další rozlišující znaky než
polohu centromery –
sekundární zaškrčení – 13, 14,
15, 21, 22

Relativní délky nejsou příliš
uspokojivé – 8, 9, 10, 11 –
podobná délka a pozice
centromery při homogenním
barvení



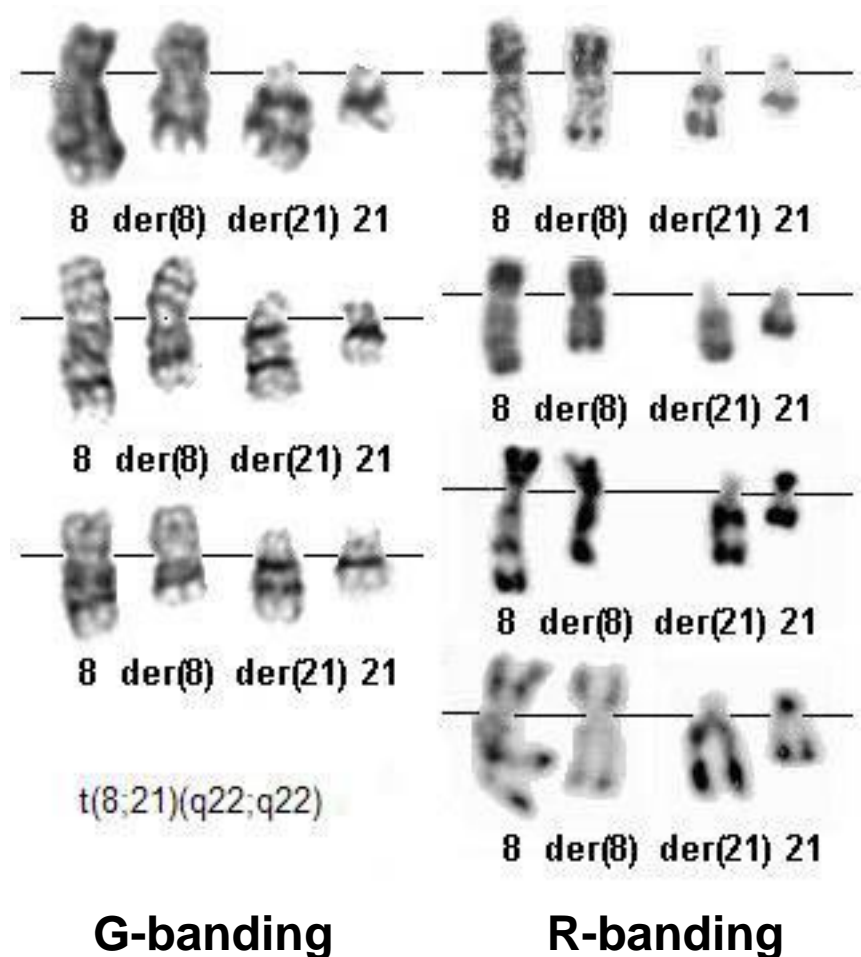
Charakterizace chromozomů

Rozdílná barvení – rozdílné proužkování

Proužek = band = ta část chromosomu snadno odlišitelná od sousedního segmentu jevící se tmavší či světlejší jednou z barvicích technik

G-banding – Giemsovo barvivo (směs methylenové modři + eosinu) po digesci trypsinem – **tmavé bandy** vázající barvu jsou většinou **AT**

R-banding – reversní k G – **AT**, heterochromatické, **světlé**; GC-tmavé, euchromatické, tmavé

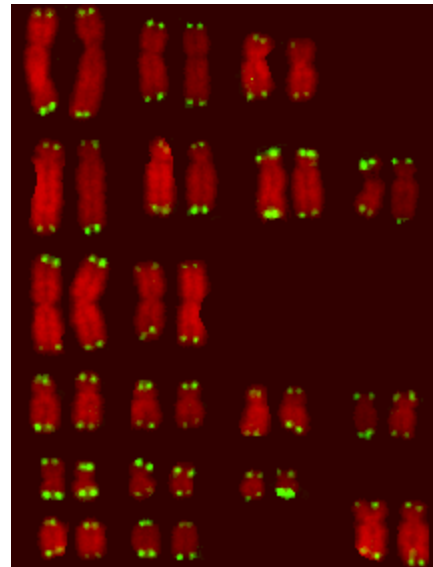
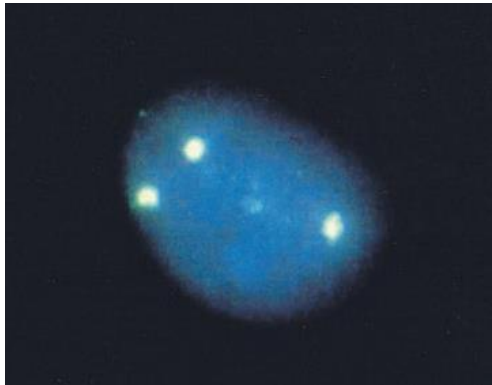
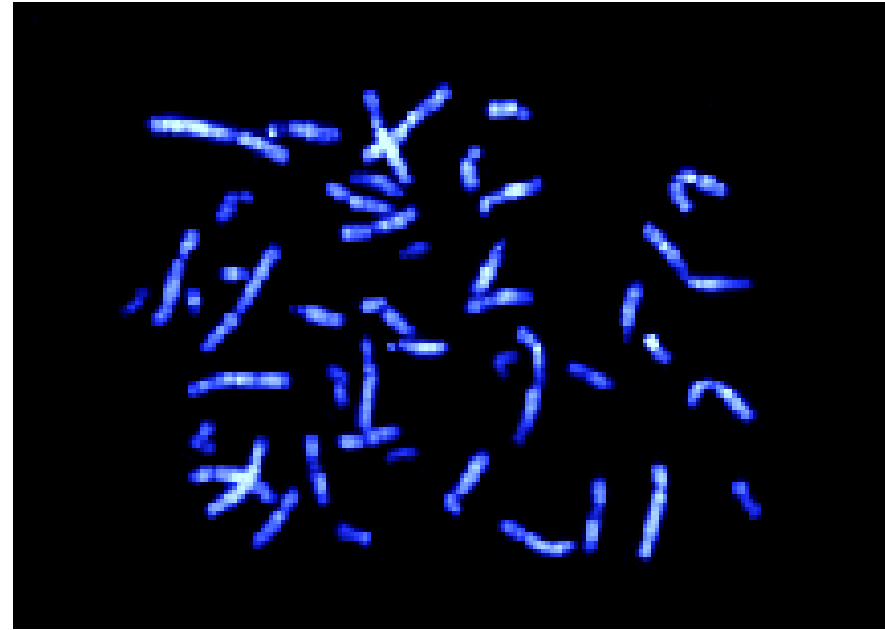


Charakterizace chromozomů

Q-banding – fluorescenční **chinakrin**,
vzorec barvení je podobný G-bandingu
(pro Y)

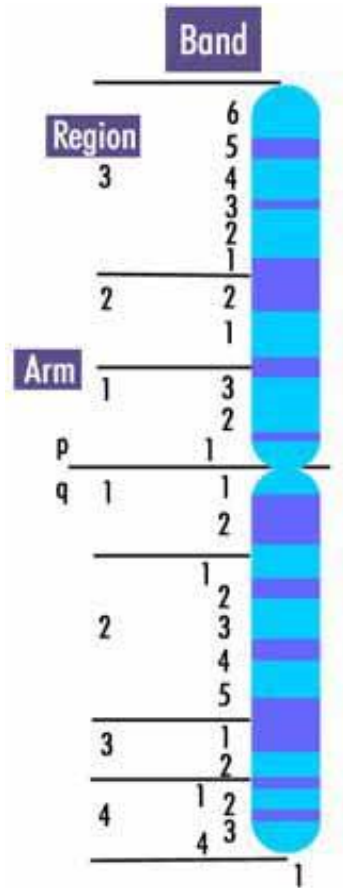
Barvení stříbrem (NOR) - AgNO_3 barví
asociované proteiny s oblastí
organizující jadérko

FISH – specifická DNA komplementární
oligonukleotid s fluorescenční značkou



Charakterizace chromozomů

Chromosomová raménka rozdělena do oblastí (regions) – souhlasné a odlišné morfologické znaky (orientační body) byly použity k pojmenování každé oblasti



Oblast (Region) = úsek chromosomového raménka ležící mezi středy dvou orientačních bodů - značeny arabskými číslicemi od centromery směrem ke koncům

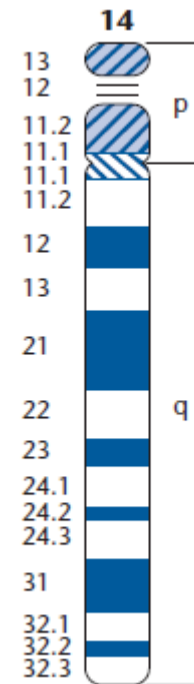
The International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)



Charakterizace chromozomů

Chromosom 14

Ideogram, idiogram =
grafické schéma zobrazující
chromozomové bandy



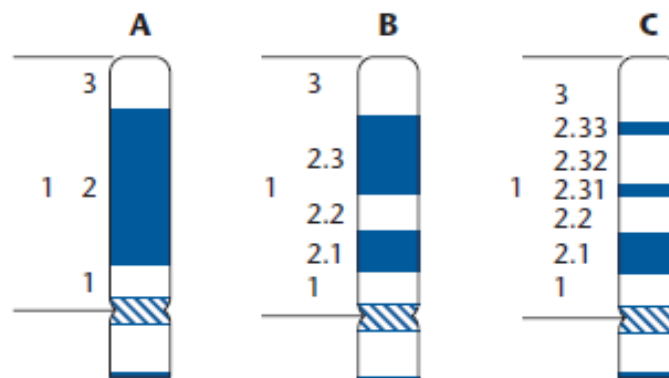
14q21

Dlouhé
raménko

Druhá
oblast

První
proužek

Použití vysoko-rozlišovacích technik -
staré se „rozpadaly“ na větší počet. →
Proužky rozděleny na podproužky.



Chromozomové abnormality

Mitosa / meiosa nejsou bezchybné – občasná ztráta či zisk chromozomu v důsledku defektního mitotického vřeténka.

Změna v počtu chromozomů = **aneuploidie**

Somatická buňka = ztráta schopnosti se dělit nebo v kombinaci s ostatními chromozomálními a buněčnými změnami → **rakovina**

Pohlavní buňka = ztráta schopnosti správně segregovat v meiose I či II (nondisjunkce) → gamety s chromosomem navíc či chybějícím

Výskyt extra chromosomu navíc (trisomie) ve většině případů vede k ztrátě embrya *in utero*.

Výjimky se týkají chromosomů 13, 18, 21 a X.

Trisomie chromosomu 21



Downův syndrom - 47, XX/Y, +21

- mentální retardace
- opožděný růst
- krátký nos
- široký, plochý obličej
- zkrácení kostí
- frekvence 1 : 800, roste s věkem matky
(1 : 952 – pod 30, 1 : 378 pod 35, 1 : 106 pod 40)

1866 – John Langdon Haydon Down – nepřesný výraz *mongoloidní* – neodůvodněná podobnost

1958 – odhaleno 47 chromosomů u osob s D.s.

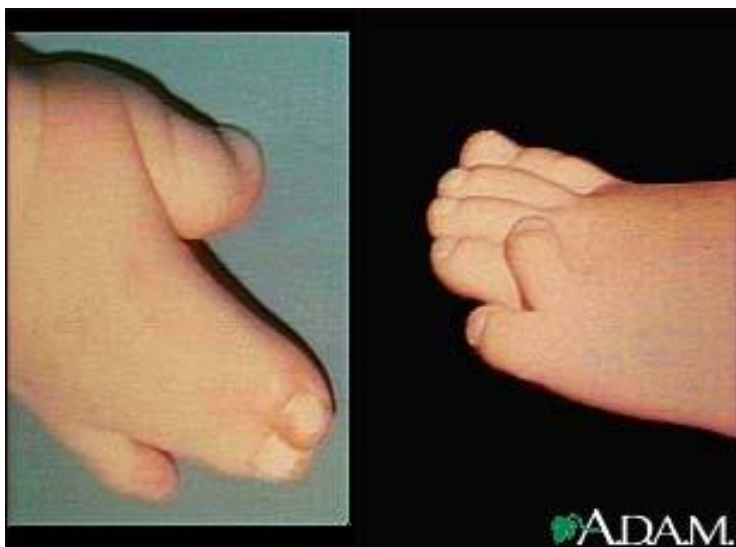
U osob starších 40 - černá vlákna a klubka amyloidu charakteristická pro Alzheimerovu chorobu.

Vyšší riziko – 25 % vs. 6 % obecné populace

Trisomie chromosomu 18

Edwardsův syndrom - 47, XX/Y, +18

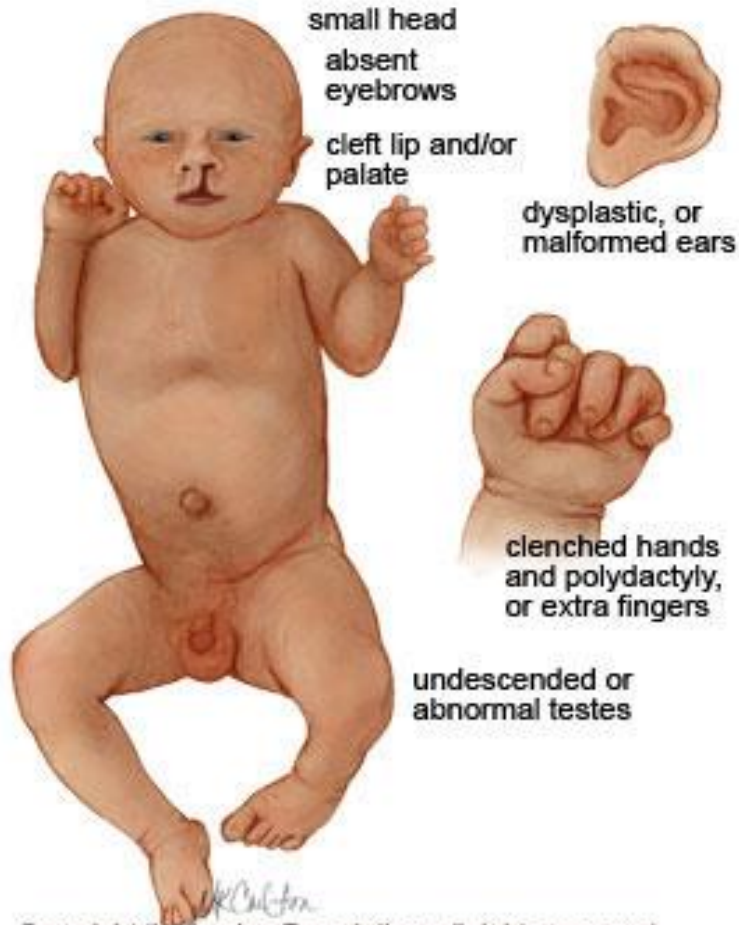
- mentální retardace
- malformace srdce
- zvláště sevřené pěsti
- frekvence 1 : 8 000
- většina případů v důsledku nodisjunkce v meiose II během vývoje oocyty



Trisomie chromosomu 13

Patauův syndrom - 47, XX/Y, +13

- těžké defekty v CNS, rozštěp patra
- fúze očí v jednu oku podobnou strukturu
- frekvence 1 : 25 000
- výskyt extra prstu či rozštěpu patra jsou dostatečné důkazy pro provedení chromosomové analýzy plodu
- ultrazvuk odhalí extra slezinu, abnormální strukturu jater



Copyright the Lucina Foundation, all rights reserved.

Chromozomové abnormality gonozomů

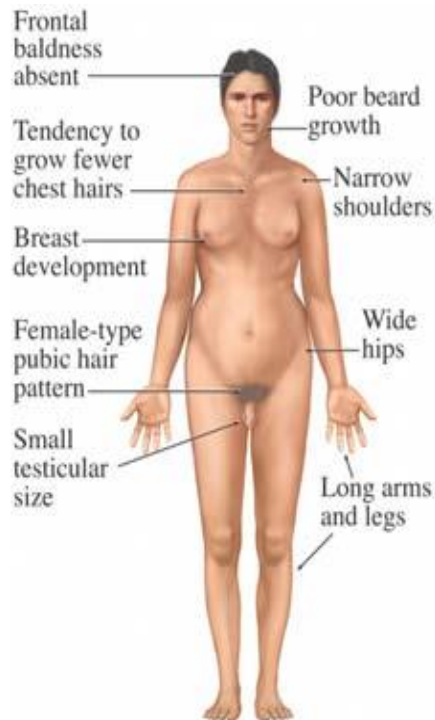
47, XXY

Klinefelterův syndrom

- 1 : 600 mužů

- neplodní muži, vysocí

- dlouhé paže a chodidla



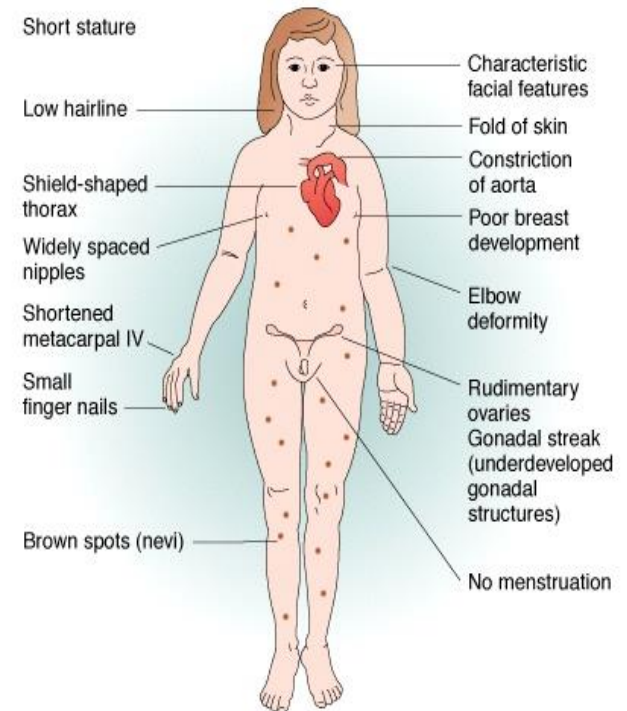
45, X

Turnerův syndrom

1 : 2 500 žen

- krátké, neplodné

- tlustý krk



Trisomie X, 47, XXX

- 1 : 1 000 žen

- většina trpí problémy s učením

- menstruační nepravidelnosti

Disomie Y – 47, XYY – Syndrom Jacobsové

- 1 : 1 000 mužů

- normální

- 1961 prvně identifikován u muže s nevázaným chováním

- 1967 – P. Jacobs – studie mezi vězni – asociace s agresivním chováním

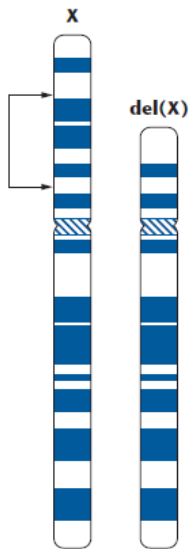
Změny ve struktuře chromosomů

- vznikají při zlomení chromosomu a znovuspojení s jiným zlomeným kouskem chromosomové DNA

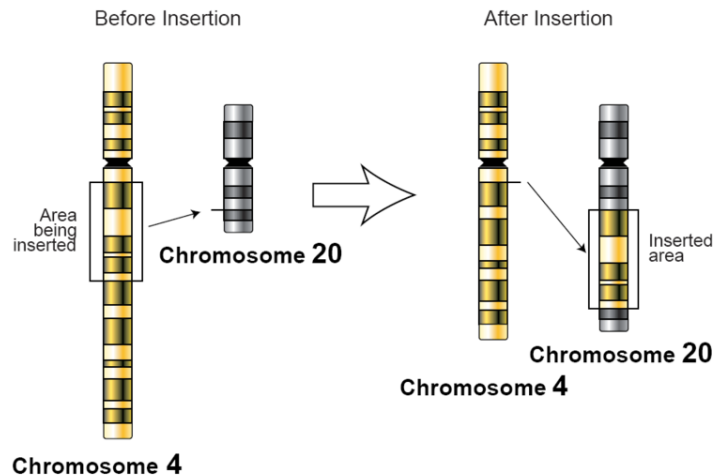
Většinou v S fázi – chybná oprava DNA nebo chyby během replikace

Rentgenové paprsky / chemikálie – indukce zlomů

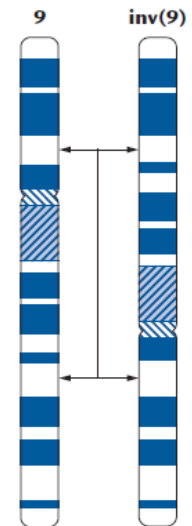
Delece



Inserce



Inverse



Nomenklature ISCN – zkratka pro popis abnormality – např. 46, XY, del(5)(p13)

Změny ve struktuře chromosomů

Cri-du-chat (kočičí pláč) – jakákoliv terminální delece chromosomu 5



- dítě vydává pláč jako když kočka mňouká
- malé hlavy (mikrocefálie)
- široký rozestup očí (okulární hypertelorismus)
- malé čelisti (mikrognathia)
- výrazná mentální retardace



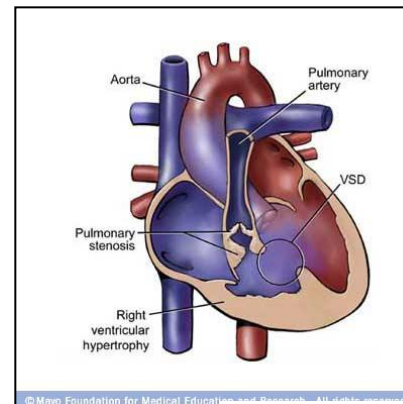
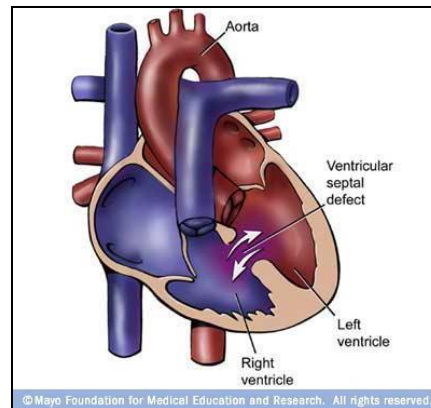
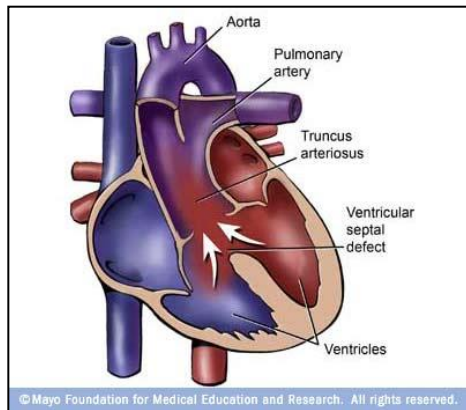
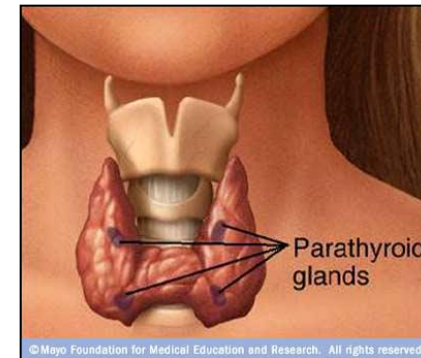
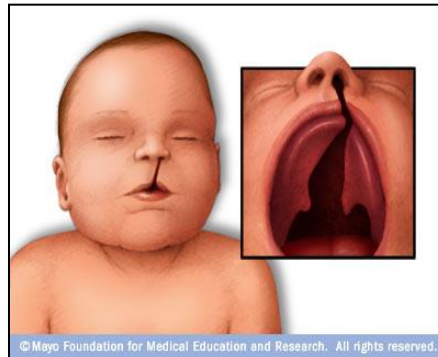
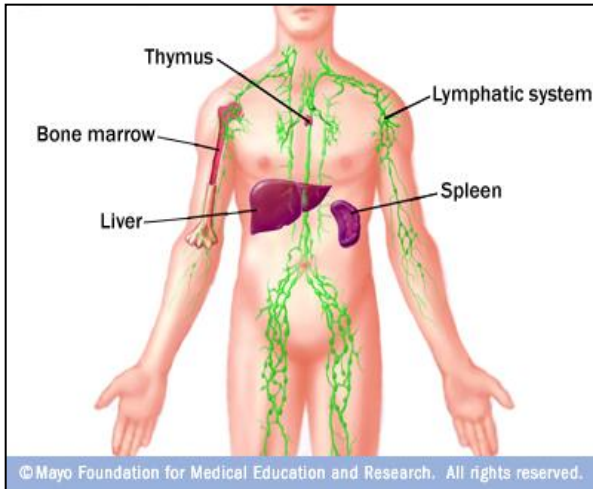
Inverze inv(9)(p11q12) – 1 : 100

- žádné speciální fyzické abnormality
- mění pořadí sekvence informace podél chromosomu
- v nekritické oblasti
- genetická informace je zachována

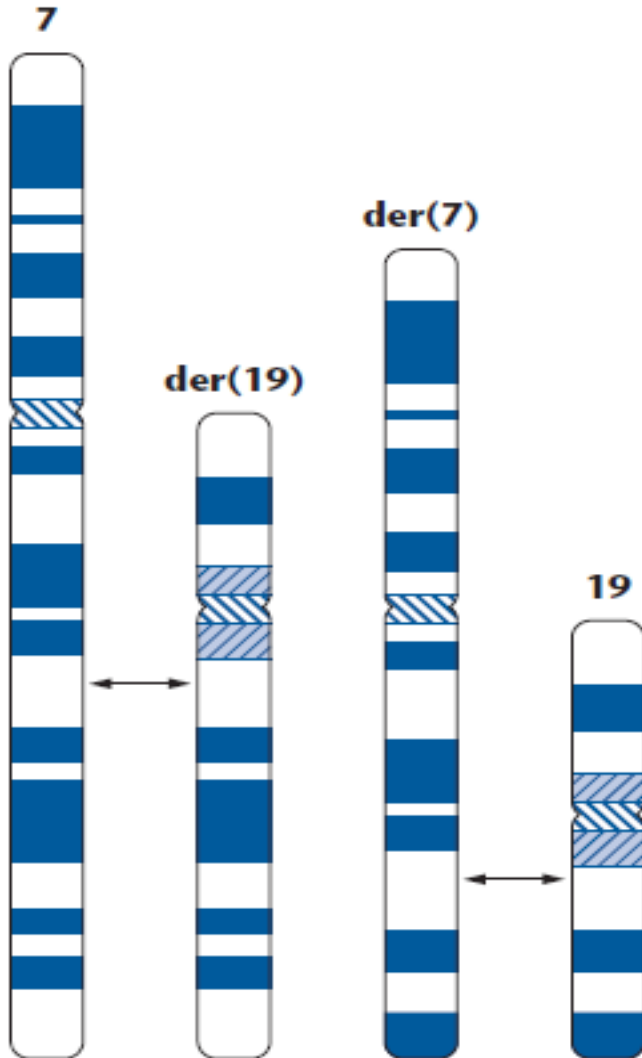
Změny ve struktuře chromosomů

DiGeorge Syndrom (22q11.2 deleční syndrom) – jakákoliv terminální delecce chromosomu 22

- rozštěp patra
- defekty srdce
- snížená funkce imunitního systému
- hypoparathyroidismus



Změny ve struktuře chromosomů



- mezi nehomologními chromosomy – výměna části chromosomů bez ztráty materiálu = **reciproká / balancovaná translokace**

- většina rodinně specifická, i když existují výjimky $t(11;22)(q23;q11.2)$
- zachování materiálu → žádný zvláštní vliv na fyzické / mentální schopnosti

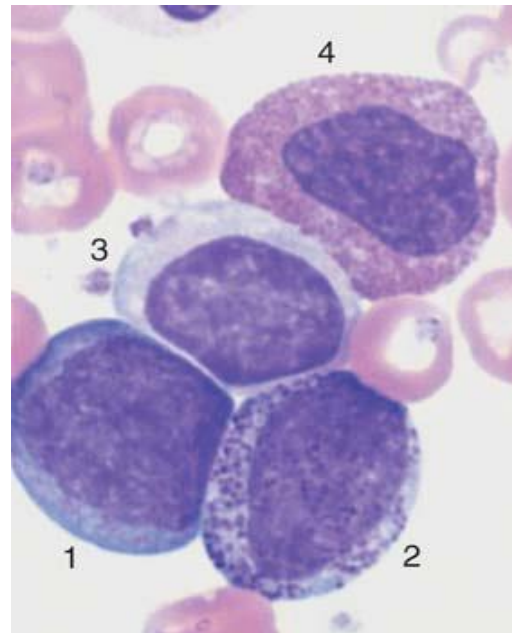
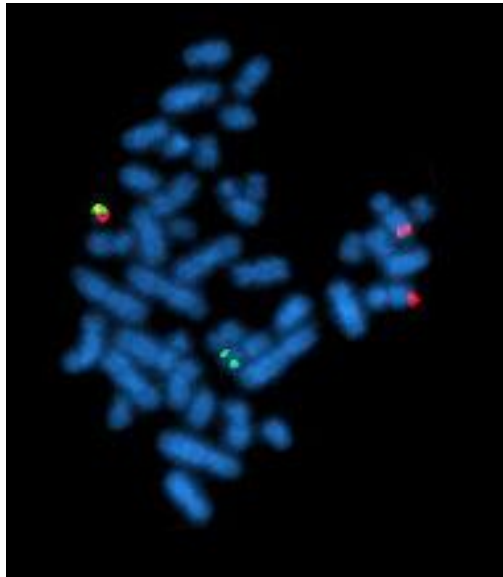
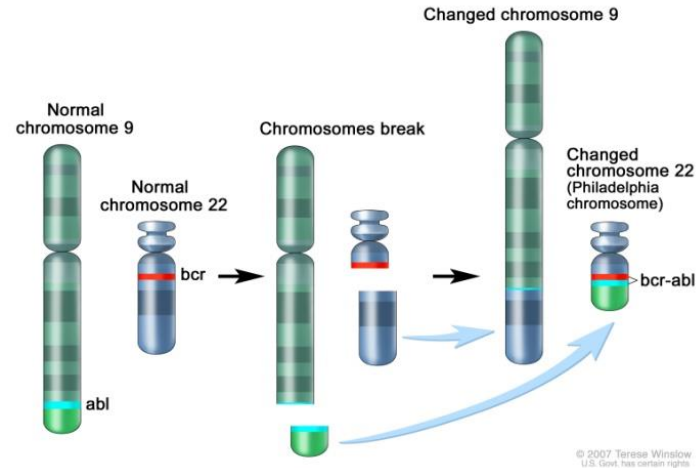
!!! Výjimky – u některých typů rakovin

$t(7;19)(q22;q13.1)$

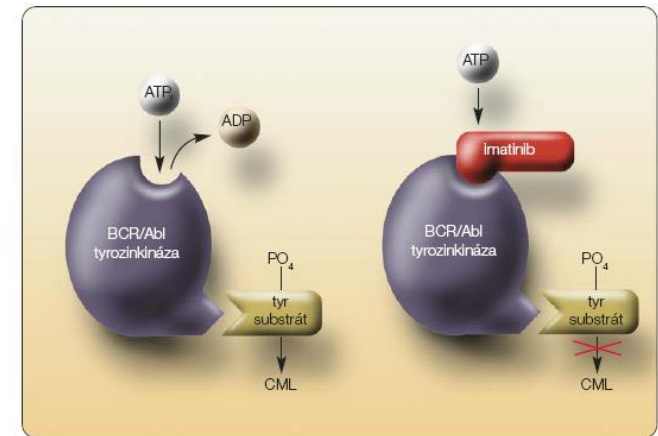
der – odvozený chromosom

Změny ve struktuře chromosomů

- **t(9;22)(q34;q11)** – nález u 95 % CML
(**Filadelfský chromosom**)
- splenomegalie, anemie, leukocytosa, levý posun v řadě granulocytů
- fúzní protein BCR-ABL se zvýšenou Tyr kinasovou aktivitou

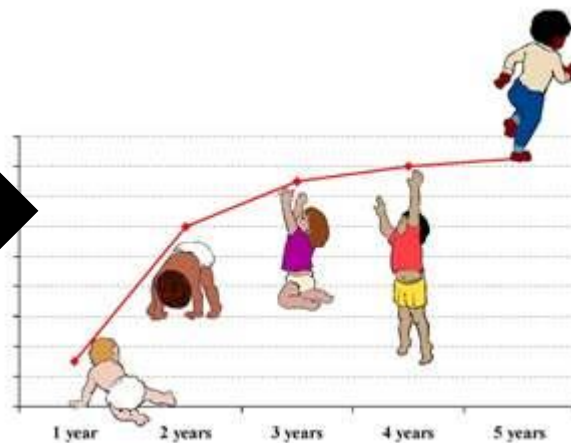
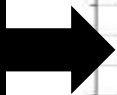
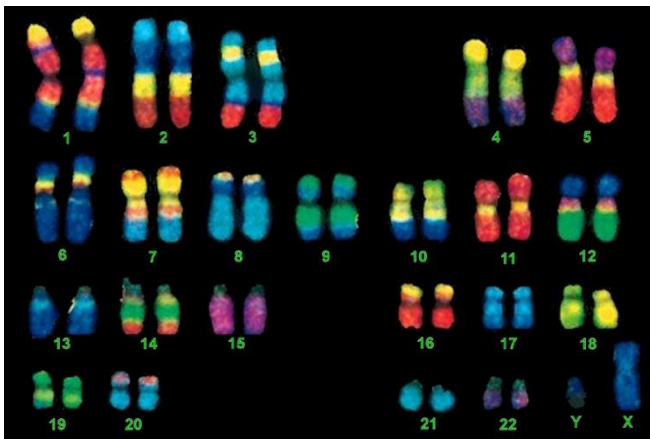


- 1 - myeloblast, 2-promyelocyt,
- 3 - myelocyt s defektní granulací,
- 4 - nezralý eosinofil

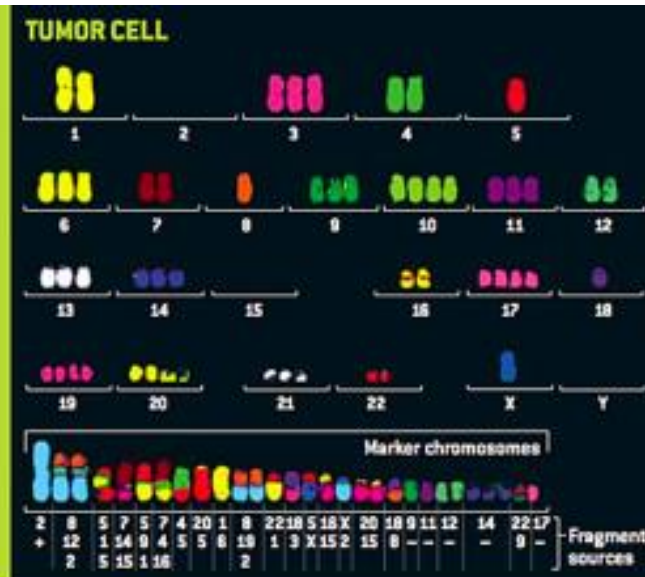
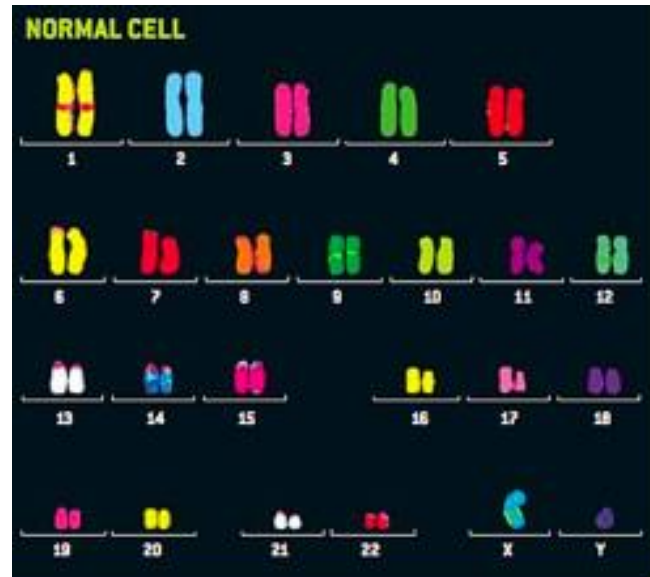


Obr. 4 Mechanismus působení imatinibu

Shrnutí části I.:

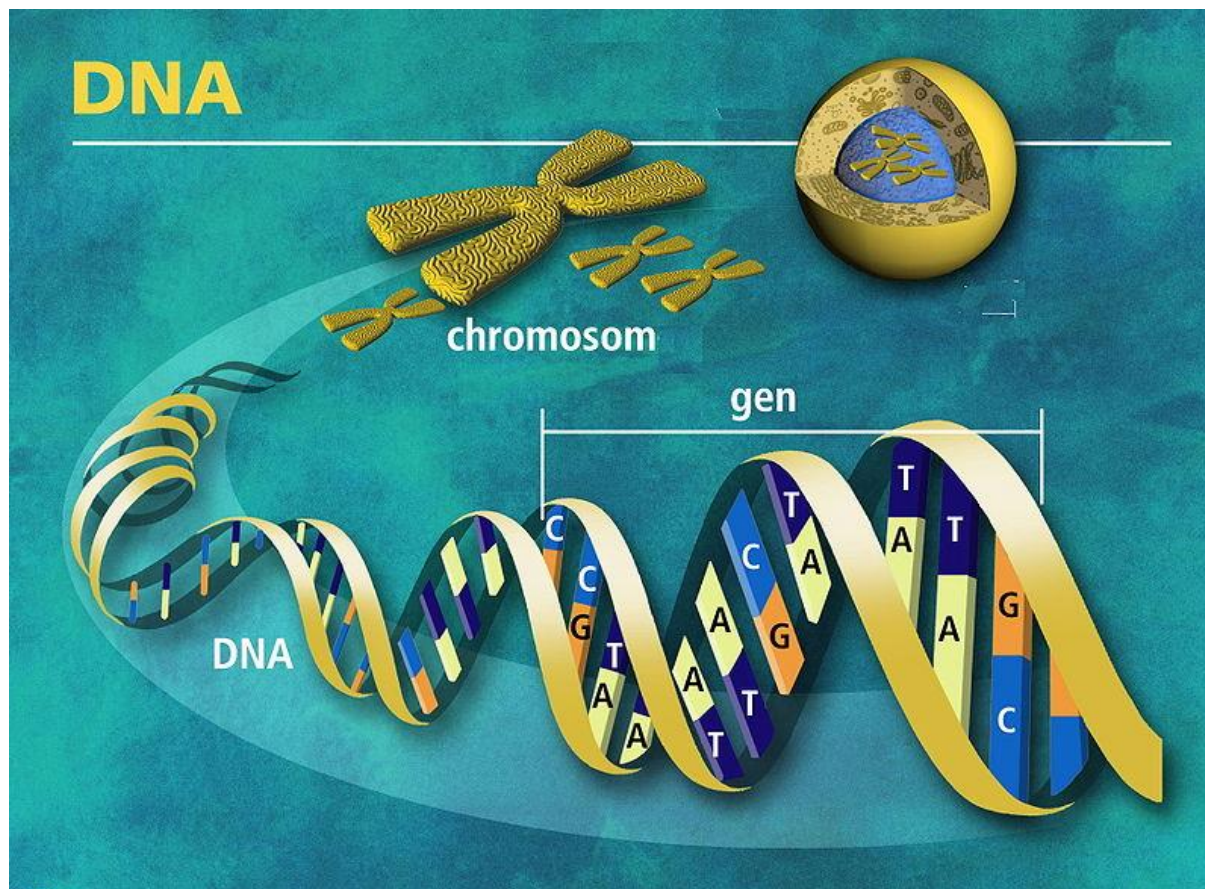


Správný počet chromosomů a množství genetické informace jsou esenciální pro normální vývoj.



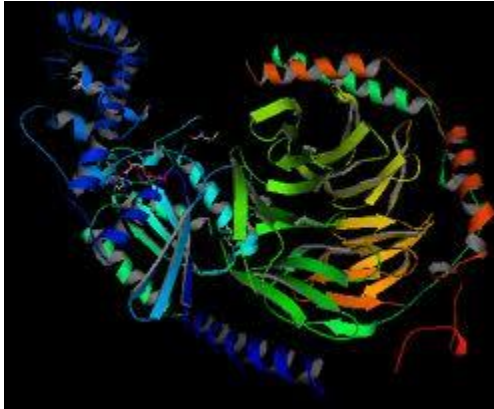
Přeuspořádání chromosomů je typickým znakem rakoviny.

Část II. - Molekulární biologie genu

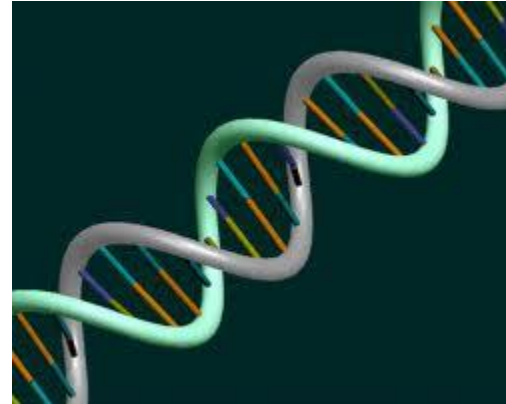


Molekulární biologie genu

Otázka : Co je gen? Protein nebo DNA?



?



E.B. Wilson (1899) – nukleová kyselina (DNA) by mohla být genetickým materiálem

Pozornost na protein – důvod?

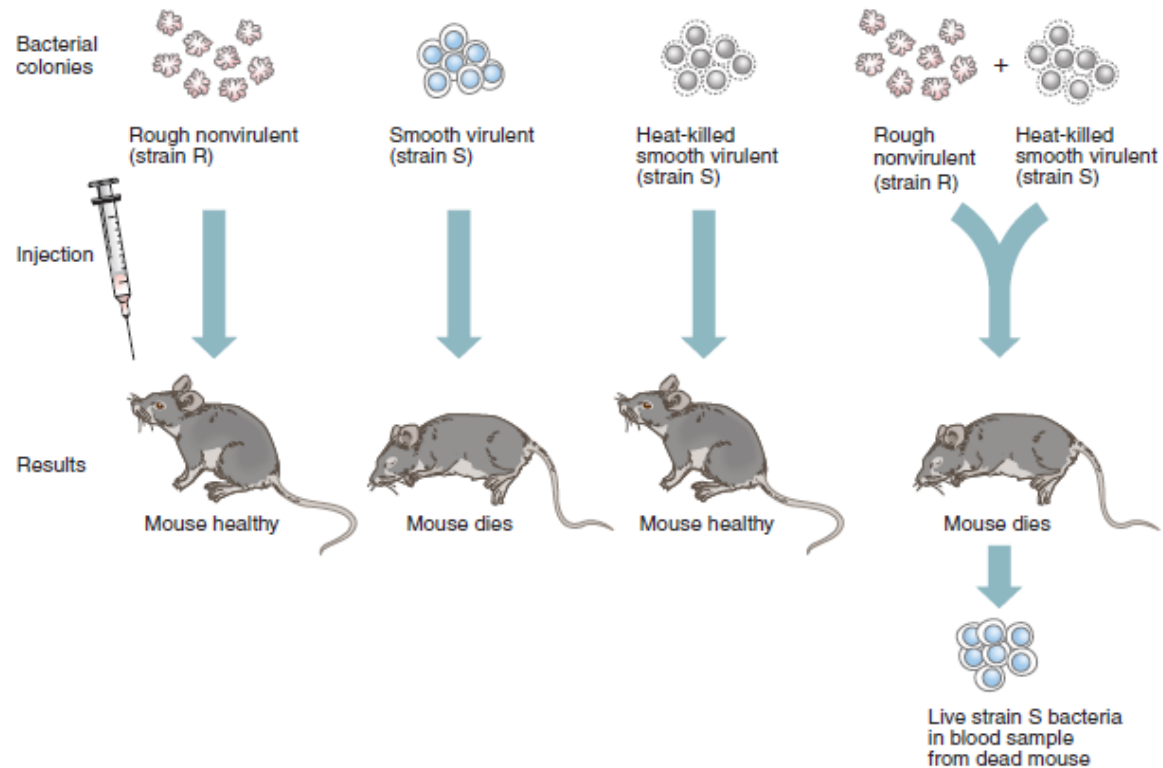
- DNA - „jen“ 4 báze
- protein - rozmanitější, dle Garrodovy práce – kauzální vztah mezi geny a enzymy

Vlastnosti genetického materiálu

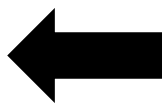
1920 – H.J. Muller – Nobelova cena (1945)

- 1) kóduje informaci pro produkci sloučenin určujících fenotyp
- 2) musí být schopen replikace
- 3) musí podstupovat změny, které mohou být zachovány

1928 - F. Griffith - myši s pneumonií – *Diplococcus pneumoniae* – dva typy R (rough) a S (smooth)



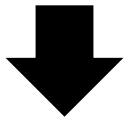
Jaká je
příčina?



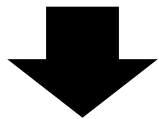
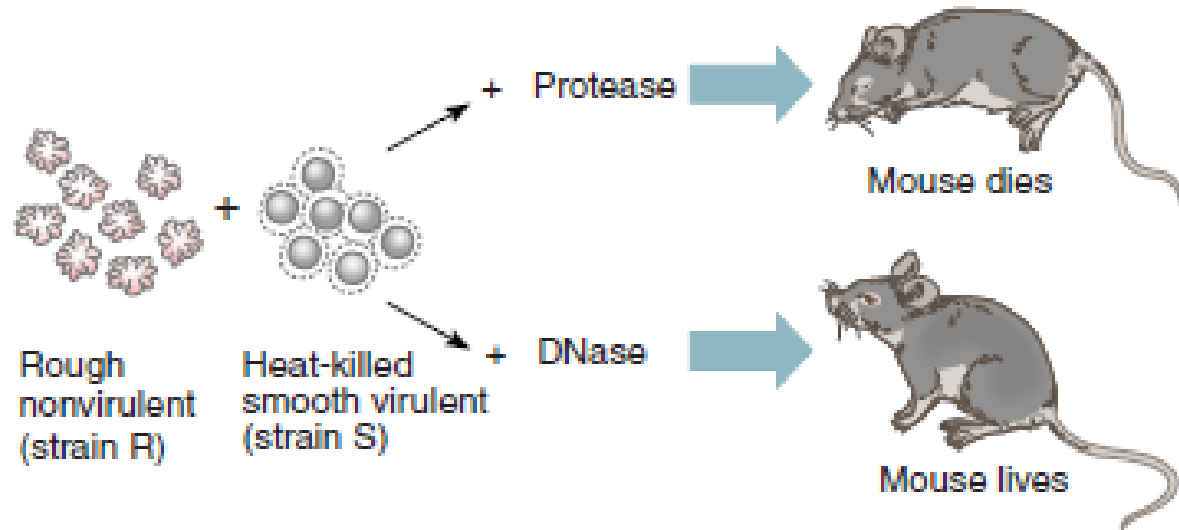
Vlastnosti genetického materiálu

1944 – O. Avery, C. MacLeod, M. McCarthy –

- typ R + mrtvý S (proteasou/DNAsou) → transformace
proběhla/neproběhla → **DNA přešla z S na R** → výroba polysacharidové
vrstvy nezbytné k virulenci



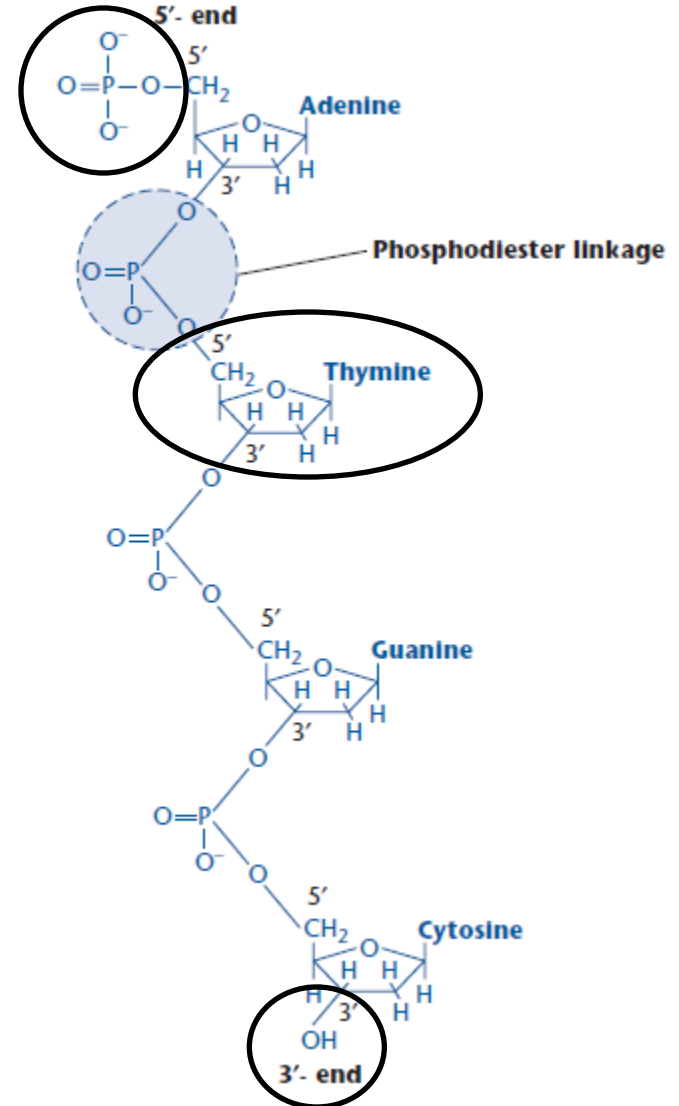
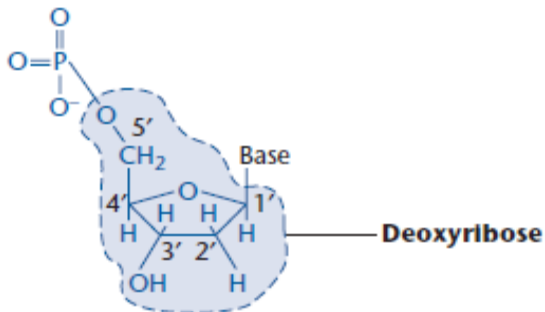
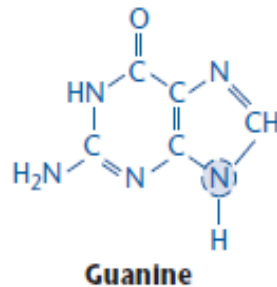
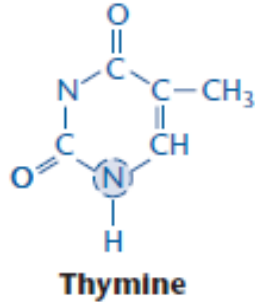
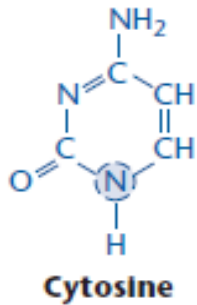
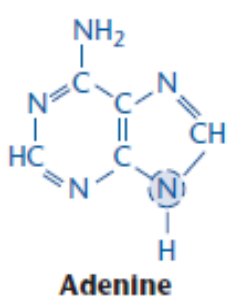
**DNA řídí syntézu
specifických
buněčných
produktů** které
přispívají k
fenotypu



- 1) Jaká je struktura DNA ?
- 2) Jak může struktura přispívat k základním vlastnostem genetického materiálu ?

Struktura DNA

40. léta 20. st. = DNA složena z nukleotidů = sacharid (2-deoxyribosa) + fosfát + báze (A, G, C, T)



Struktura DNA

1953 – Watson + Crick – struktura DNA z rentgenografické analýzy

- Dvouřetzcová šroubovice - držena vodíkovými vazbami
- Komplementární báze – A+T (2), C+G (3)
- Počet párů bazí (bp) = popis délky řetězce (chr. 1 cca = 263 Mb)

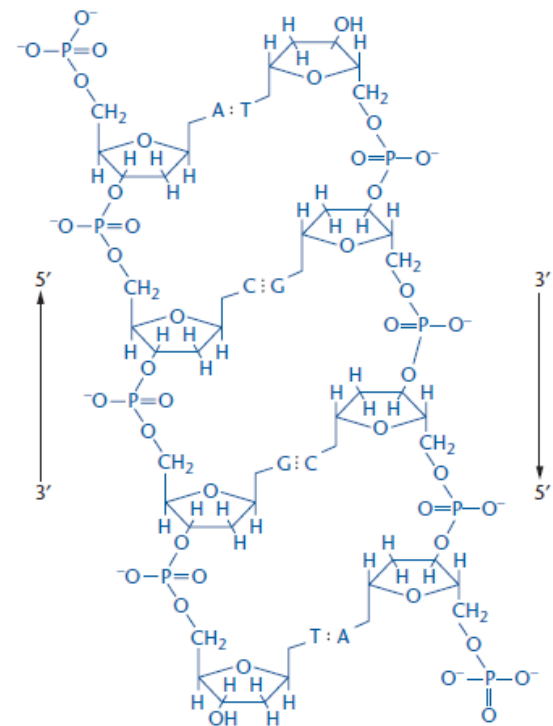


Sekvence 1 řetězce určuje druhý řetzec = **komplementarita**

Řetězce jsou **antiparalelní**.

Struktura odpovídala požadovaným kritériím:

- 1) Genetická informace kódována sekvencí nukleotidů
- 2) Každý řetzec je templátem pro produkci nového řetězce
- 3) Změna v bázi změní informaci a ta je předávána v replikaci dále



Replikace DNA

- = **syntéza DNA** - každý řetězec templát - **semikonzervativní**
- sekvence nukleotidů určována na základě komplementarity bazí
- Fosfo skupina je enzymaticky připojena k 3'-OH skupině předcházejícího nukleotidu
- Nukleotidy = trifosfo nukleosidy odštěpí se poslední dva fosfáty
- Cca 3 000 nukleotidů / min (savci)
- Mnoho počátků replikace (lidský genom)
- Telomerasy
- Využití = PCR

Enzymes in DNA replication



Helicase unwinds parental double helix



Binding proteins stabilize separate strands



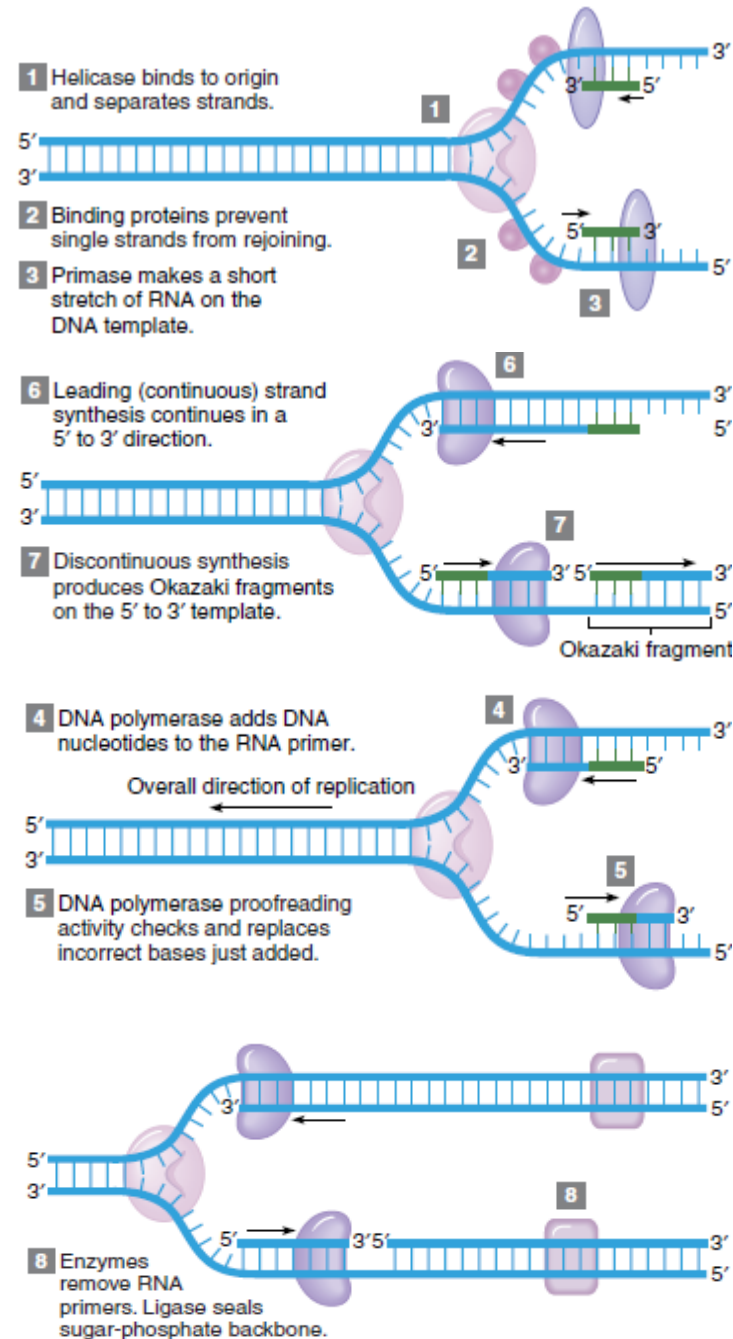
Primase adds short primer to template strand



DNA polymerase binds nucleotides to form new strands



Ligase joins Okazaki fragments and seals other nicks in sugar-phosphate backbone

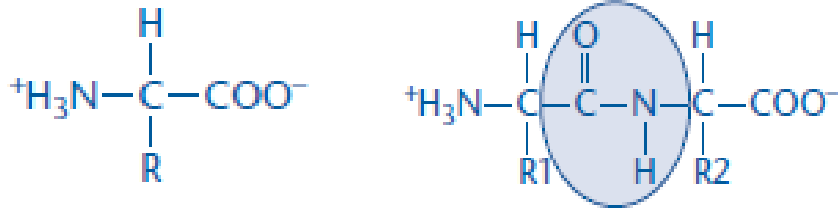


Od DNA k proteinu

Mnoho genů kóduje informaci pro produkci proteinů

- katalýza chem. reakcí, kontrola permeability, struktura buněk

Všechny proteiny se skládají z aminokyselin.



20 kódovaných AK.

1 AK má volnou NH_2 a poslední COOH skupinu → N- a C-konec

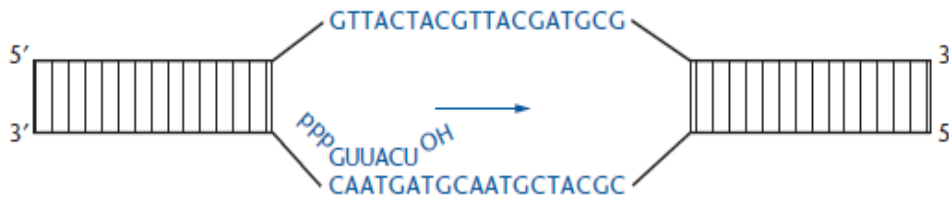
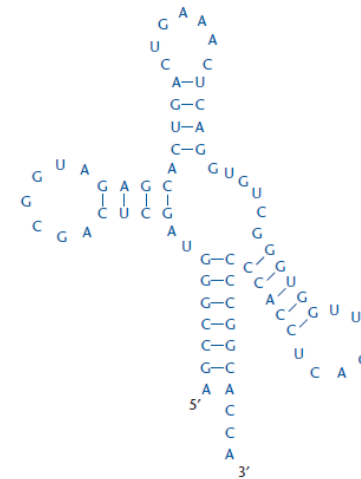
Amino acid	Three-letter designation	Single-letter designation
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	Q
Aspartic acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamic acid	Glu	E
Glutamine	Gln	N
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Iso	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Proteiny se skládají do
patričného tvaru na
základě umístění AK
residuí.

Dekódování
informace
zajišťuje RNA.

Od DNA k proteinu

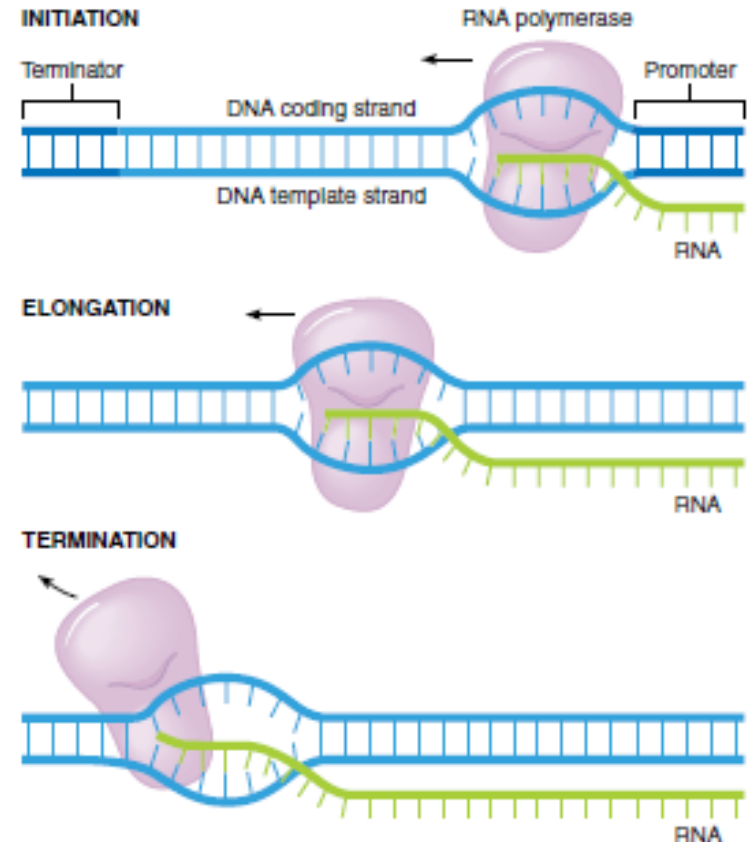
- RNA = lineární polynukleotid
- Odlišnost od DNA - sacharid (ribosa) + jedna z bazí (U)
- 3 druhy – mRNA, rRNA, tRNA – transkripce různými RNA polymerasami



Pouze úseky DNA jsou transkribovány – signální oblasti uvnitř DNA určující začátek a konec transkripce.

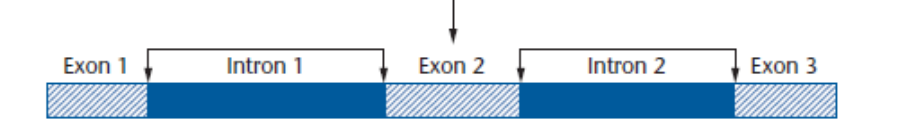
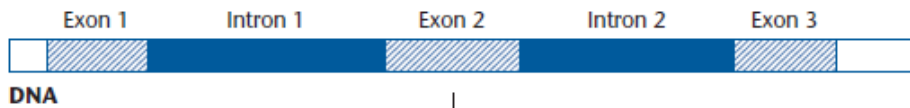
Segment předcházející genu = 5'-flanking (upstream) region

Segment následující po genu = 3'-flanking (downstream) region

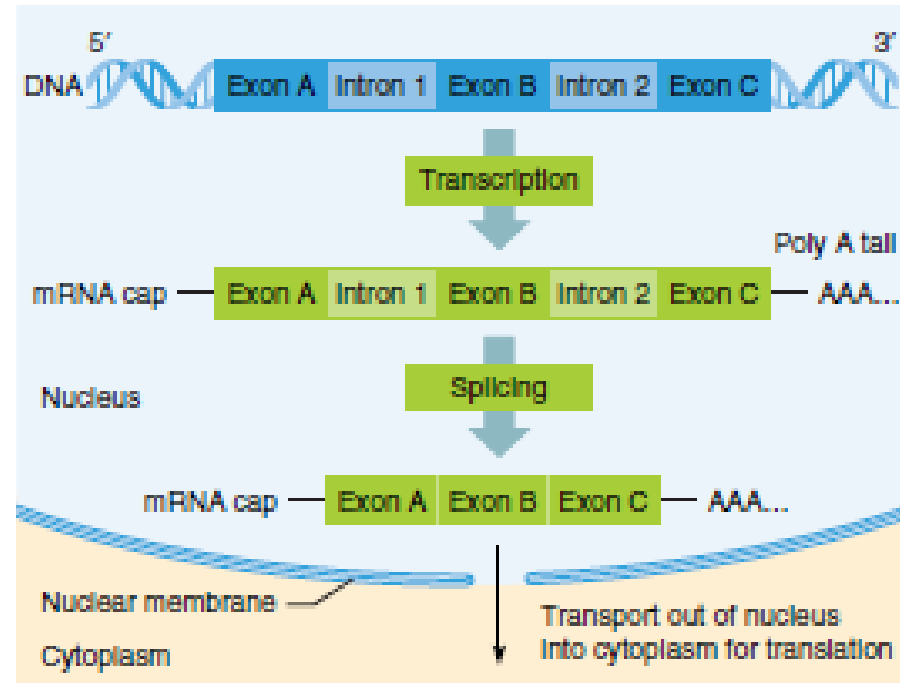
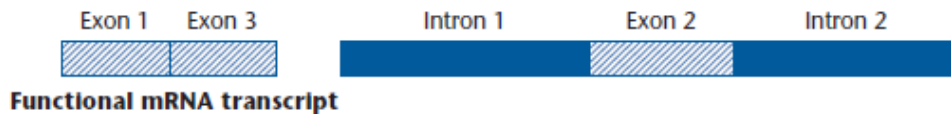
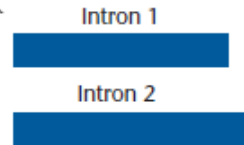
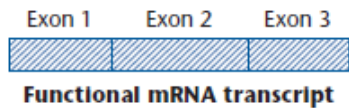


Od DNA k proteinu

U eukaryot – kódující sekvence (**exony**), nekódující sekvence (**introny**)



Splicing (sestřih)

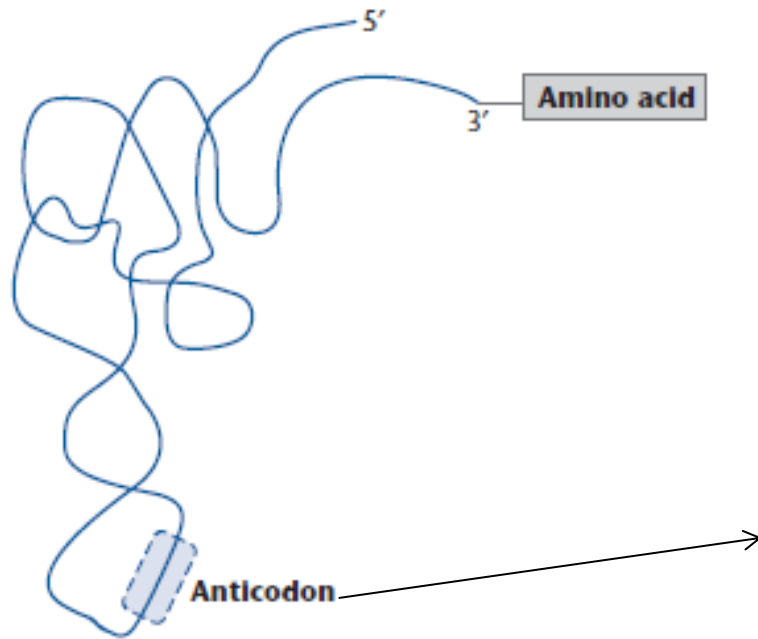


Alternativní sestřih – odlišný produkt, ale ze stejného genu = isoforma

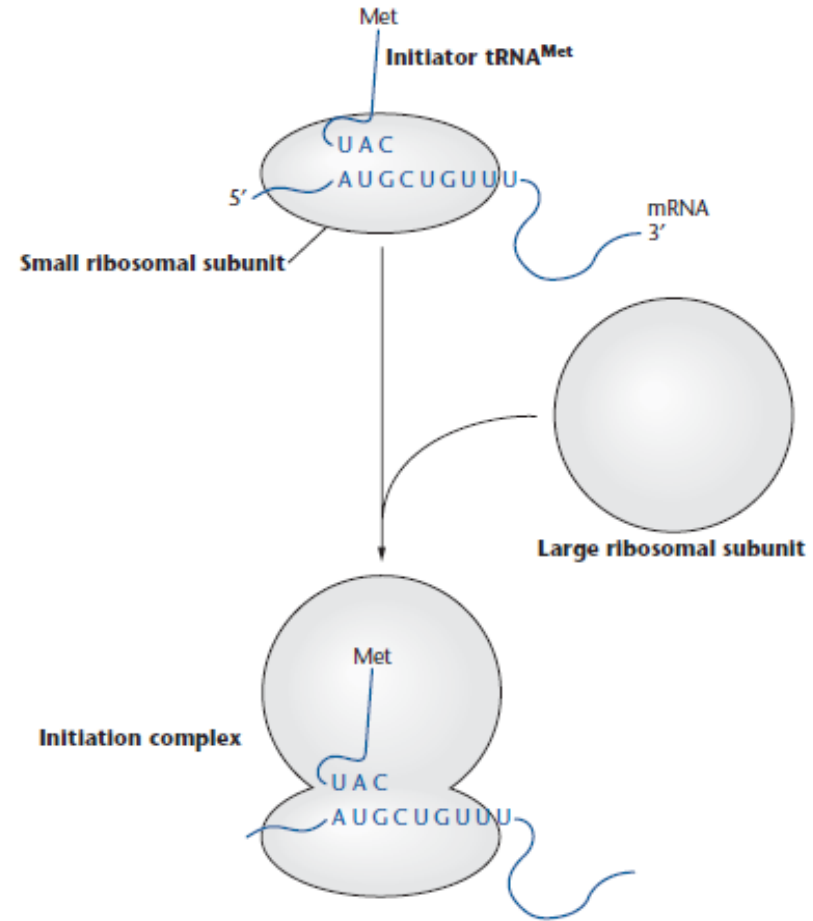
Od DNA k proteinu

V metabolicky aktivních buňkách – 3-5 % mRNA, 90 % rRNA, 4 % tRNA
rRNA tvoří velkou a malou podjednotku ribosomu spolu s proteiny –
syntéza proteinů = translace

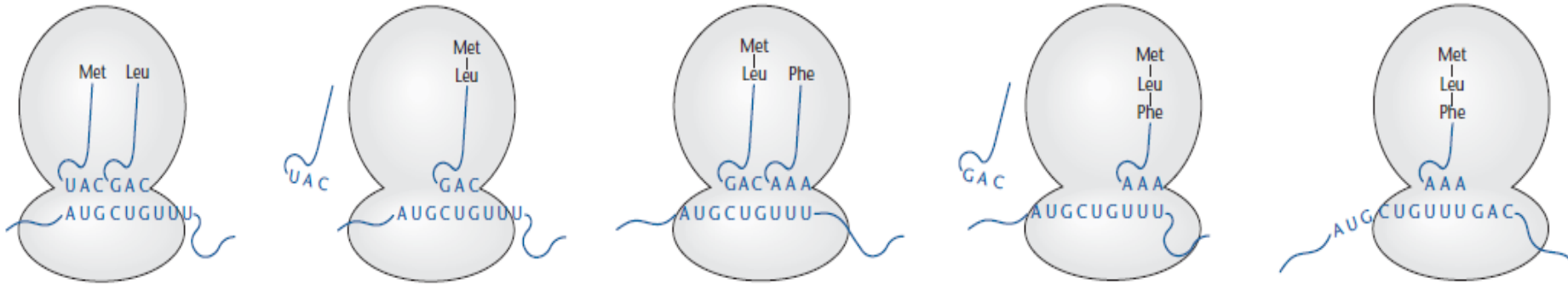
tRNA – tvar L – AK je enzymaticky spojena
s 3'-koncem tRNA



Páruje se
s
kodonem
v mRNA

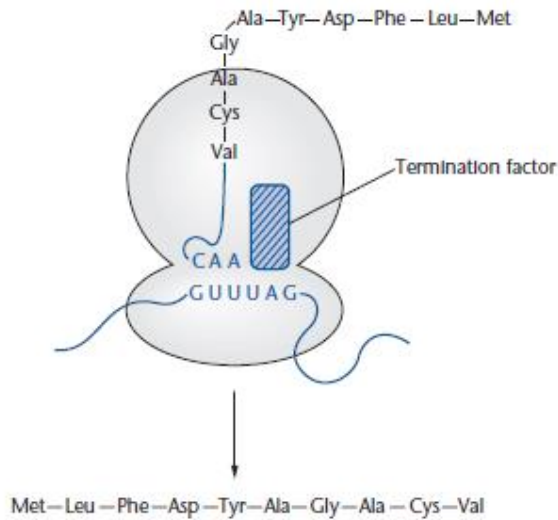


Od DNA k proteinu...translace



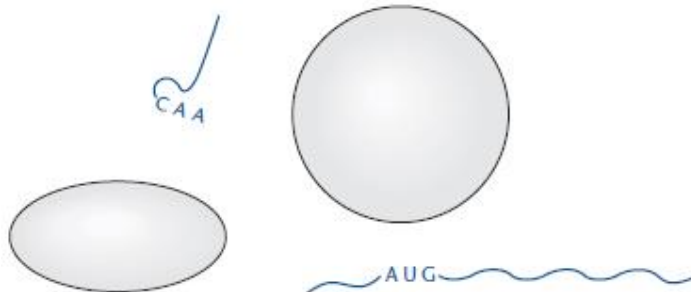
Terminační /stop kodon – UAG, UAA, UGA

Po translaci – modifikace – fosforylace, glykosylace, selektivní proteolýza



Kompletní genetický kód = 64 kodonů

- 3 stop
- 1 iniciační
- 1 Trp
- pro ostatní AK – 2 - 6 kodonů



Regulace transkripce

- Prováděna **transkripčními faktory** – většinou vazba na DNA, na sekvence cca 10 bp
- Místa vazby faktorů – „DNA moduly, boxy, iniciátorové elementy, **responsivní elementy**“

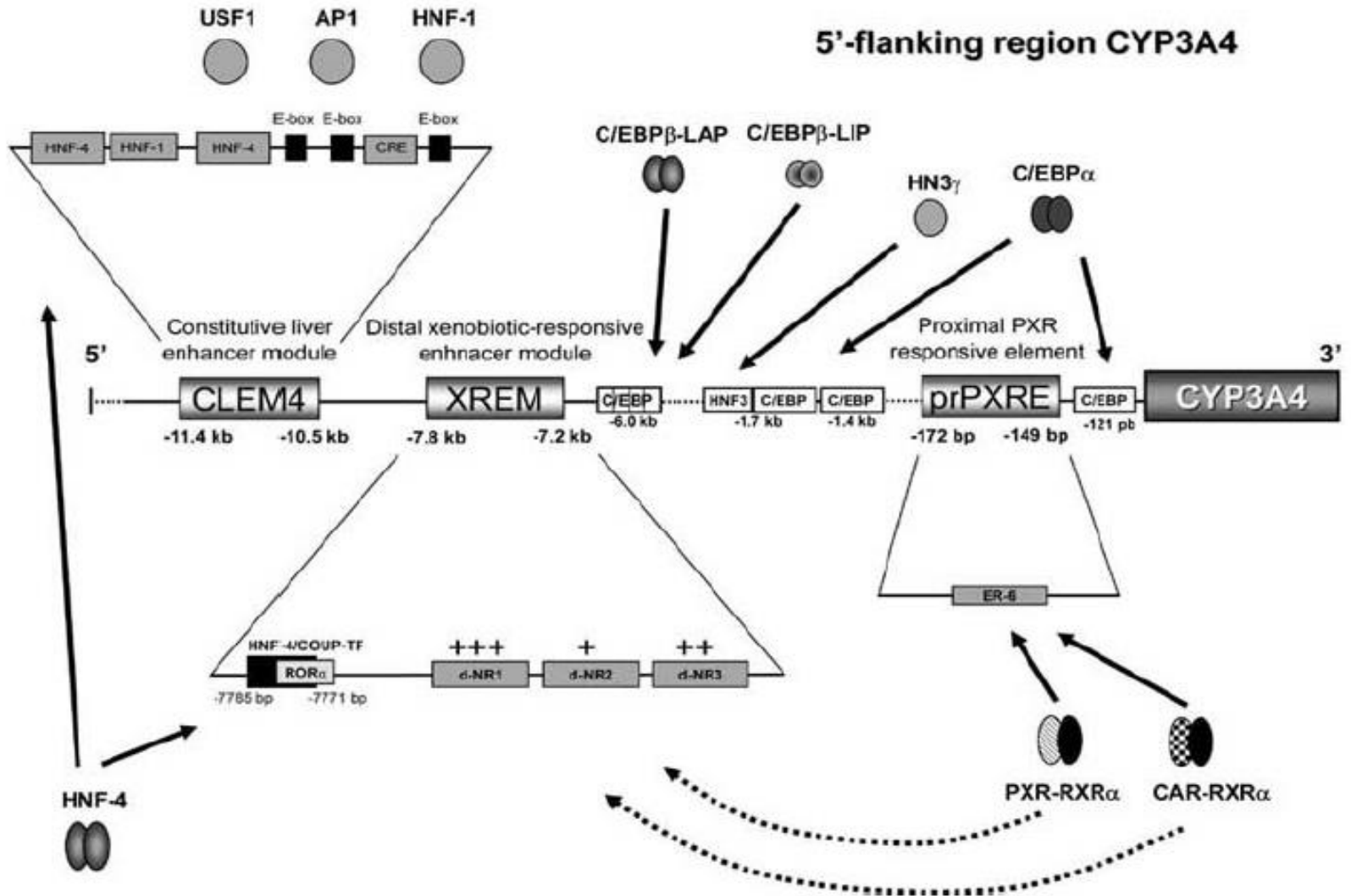


Representativní strukturální gen – promotorová sekvence obsahuje TATA box, „CAT“ box, GC box

- 1) Vazba IID (TATA-binding protein; TBP) na TATA sekvenci
- 2) Vazba dalších TF přilehlých k TATA boxu
- 3) Vazba RNA polymerasy II

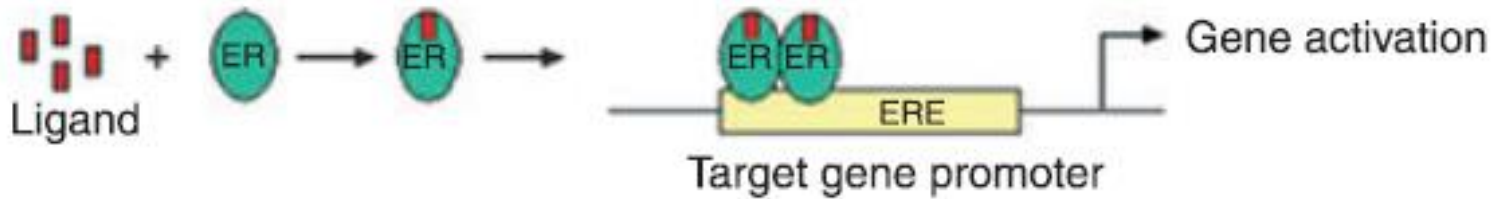
Enhancerové sekvence – stovky až tisíce bp od +1

Regulace transkripce

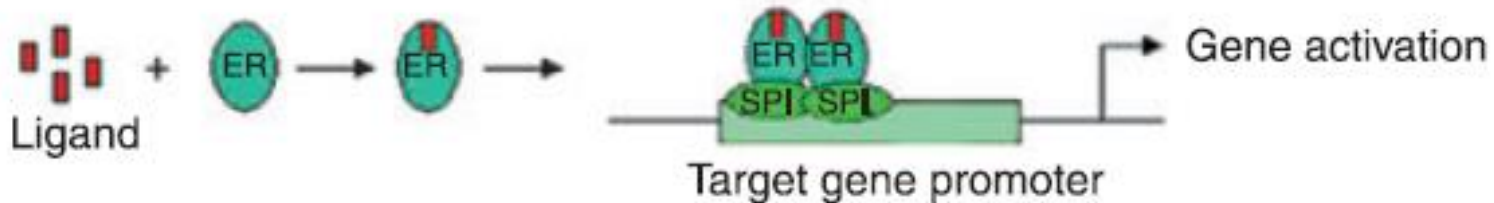


Regulace transkripce

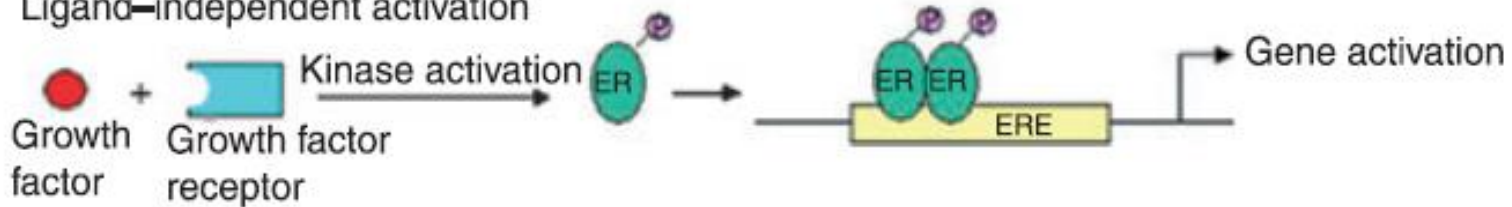
Direct activation



Indirect activation



Ligand-independent activation

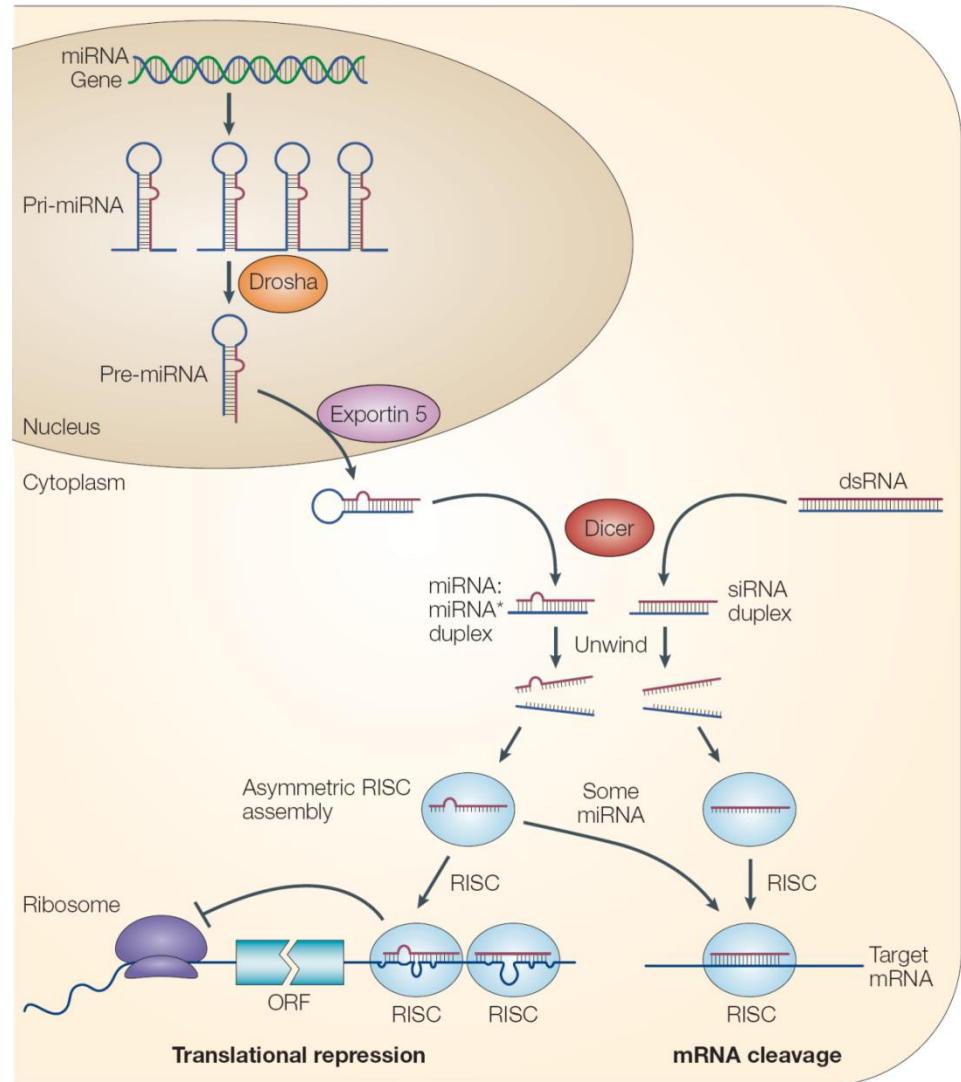


Některé geny jsou spouštěny specifickým extracellulárním signálem, např. hormonem.

Regulace translace

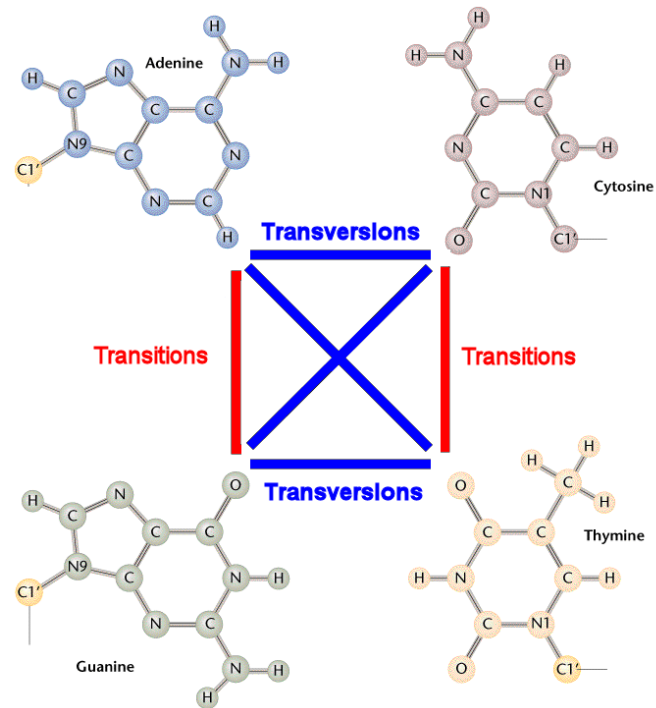
Malé nekódující RNA (snRNA)

- miRNA – 19-23 bp **ssRNA**
 - blokáce translace
 - z jednoho dlouhého transkriptu tvořící vlásenkovou strukturu
- siRNA – 21-25 bp **dsRNA**
 - usnadňují degradaci mRNA
 - ze dvou odlišných řetězců vzájemně se párujících



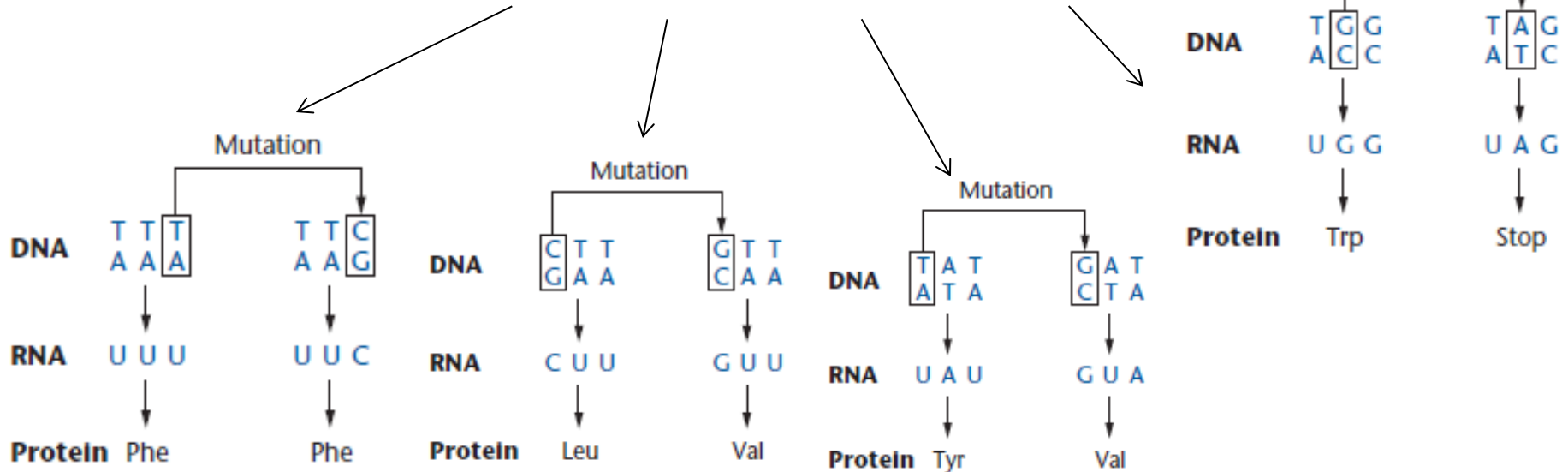
Změna sekvencí - mutace

- Replikace není bezchybný proces
- Chyby jsou vytvářeny i vnějším zásahem – UV záření, radioaktivní sloučeniny, rozličné sloučeniny
- **Změna v genetickém materiálu = mutace**
- Rozsah – od změny báze (**bodová mutace**) až po části chromozomů (**chromozomové aberace**)
- Mutace v genu strukturálního proteinu – záměna kodonu a následně i AK v proteinu = změna funkce = změna fenotypu
- Mutace v buňkách ze kterých nevznikají gamety = **somatické mutace** – nepřenáší se na potomstvo
- **Mutace v zárodečných buňkách** – přenos na potomstvo
- Triplet v DNA = transkribovaný triplet → templát pro kodon
- Komplementární DNA = kódující triplet
- Kódující+Transkribovaný triplet = DNA kodon

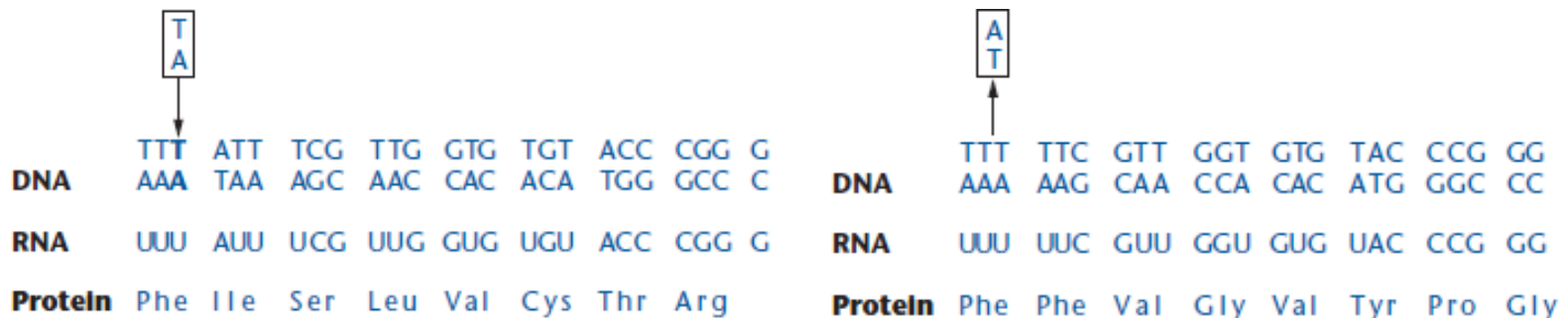


Změna sekvencí - mutace

Mutace v kodonu DNA – silent, neutral, missense, nonsense

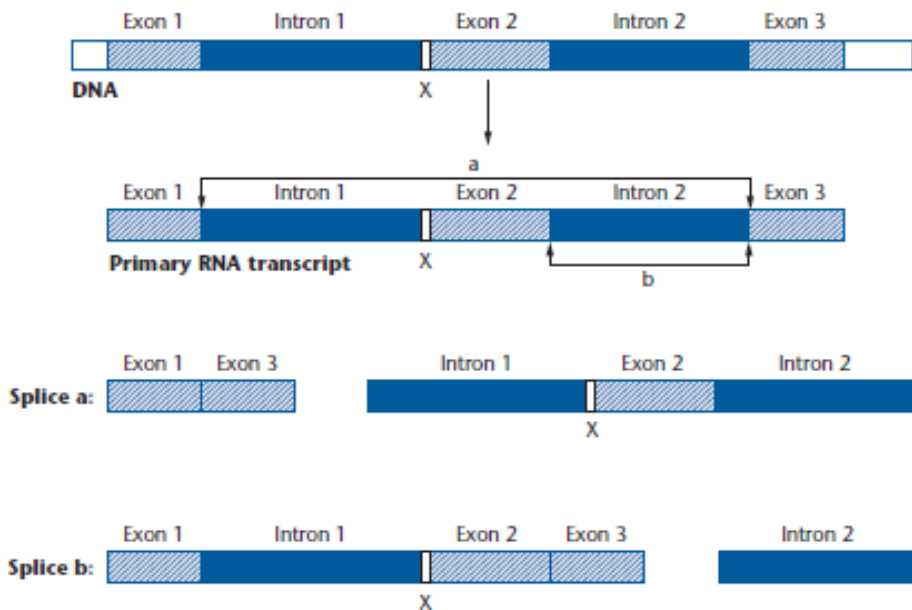


Delece či inserce páru basí → posun čtecího rámce – devastující účinek

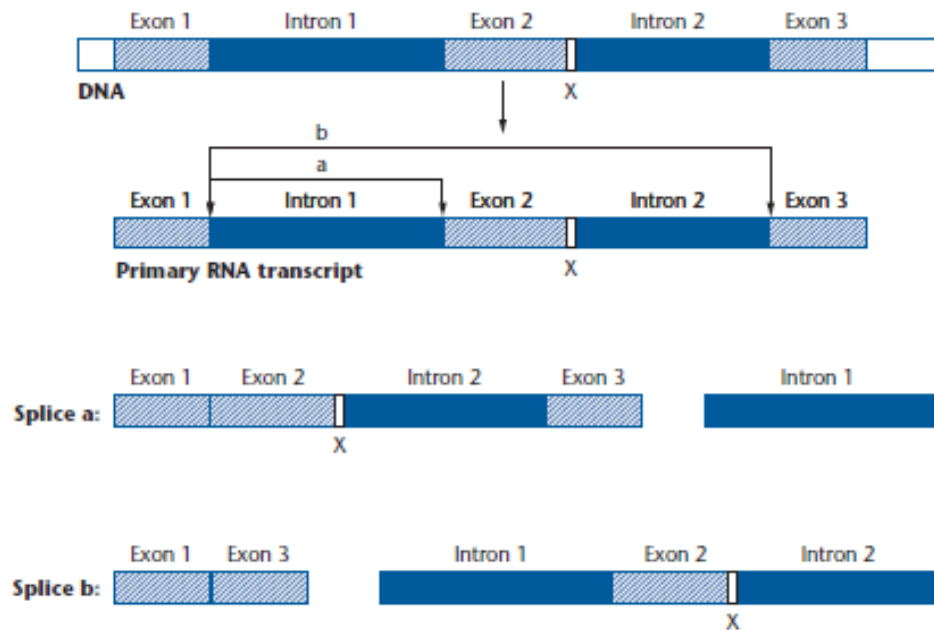


Vliv mutace na splicing

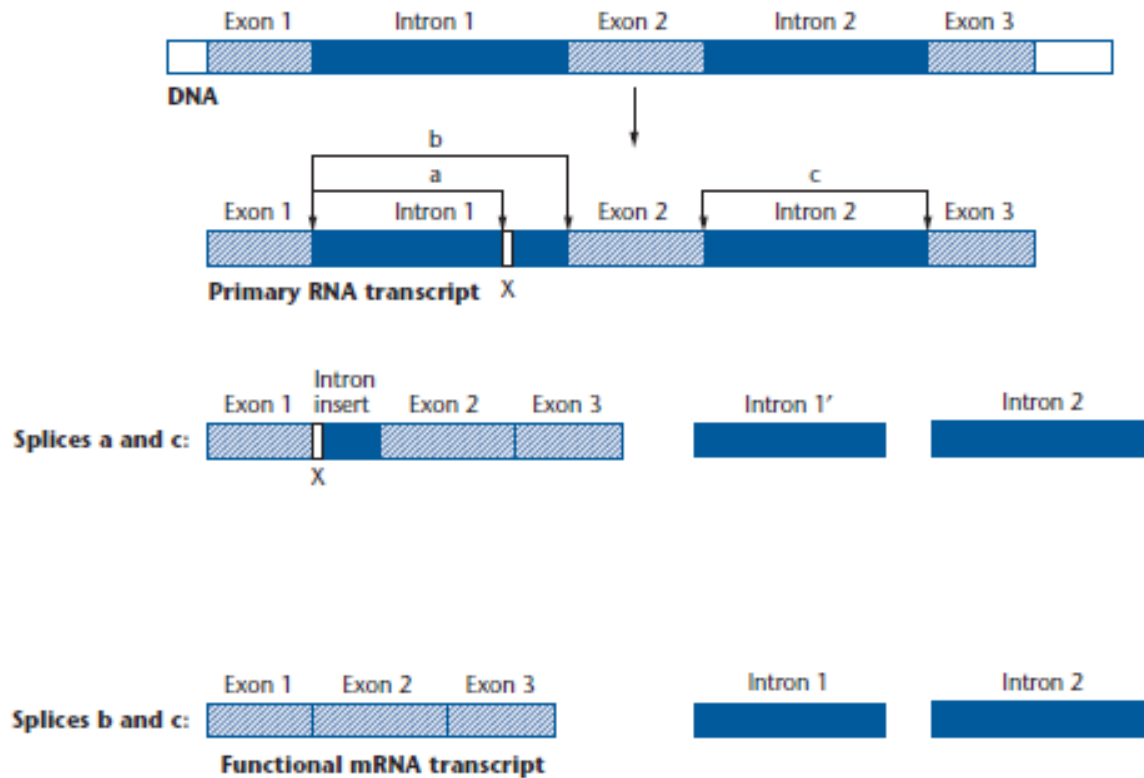
3' konec intronu mutován
= exon skipping



5' konec intronu mutován
= exon skipping



Vliv mutace na splicing



Mutace v intronu vytvoří nové splicing místo.

Nomenklatura mutací –

- záměna A → T na pozici 279
- základ mutace pro allelu na úrovni DNA součást jména – FGFR3*1138A
- záměna AK v proteinech – Asp89Gly (D89G); Arg81X(ter)
- posun rámce – 351delAT, 106insT; 109del27
- splicingové mutace- G->T + 5IVS20

Dominantní mutace

Dominance a recesivita = otázka fenotypu

Běžné je se odkazovat na dominantní/recesivní gen

Většina mutací = recesivní účinek

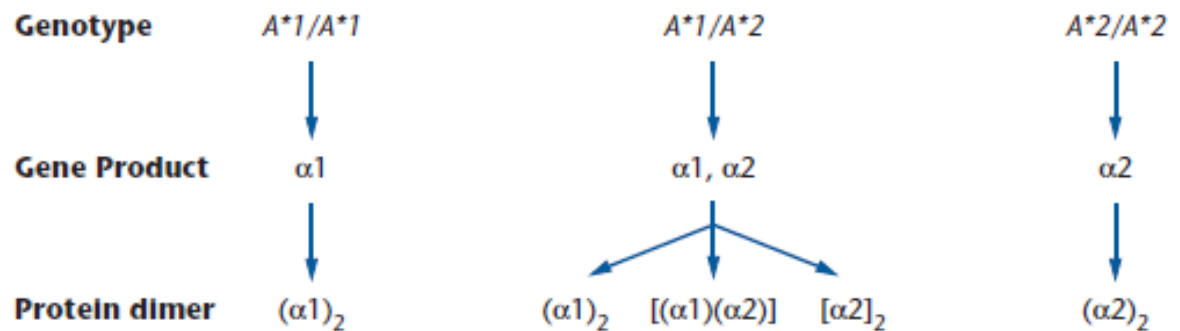
Mnoho nemocí důsledek jedné dominantní alely – jak je to možné?

- nedostatečná/nadbytečné produkce proteinu
- tvorba toxického produktu
- tvorba produktu s nezvyklou funkcí
- mutace v místě degradace - snadná precipitace - tvorba agregátů
- chromosomová translokace - tvorba „hybridního“ produktu

Mutace typu:

„Loss of function“

„Gain of function“



Slovo závěrem k části II.

...mutace skoro nikdy nevedou k výhodě !!!

