

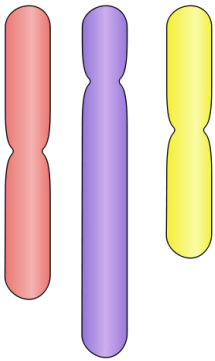
Základy buněčné genetiky

Cytogenetika

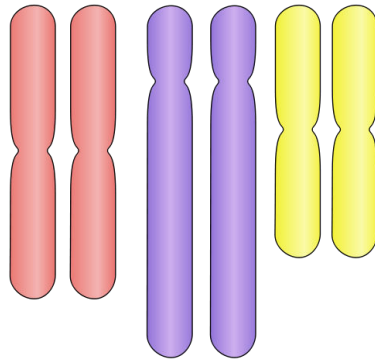
- Buněčný cyklus
- Buněčné dělení
- chromozomy
- chromozomální aberace

Množství genetické informace

Haploidní

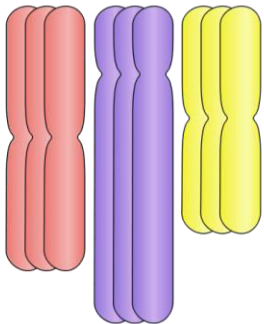


Diploidní

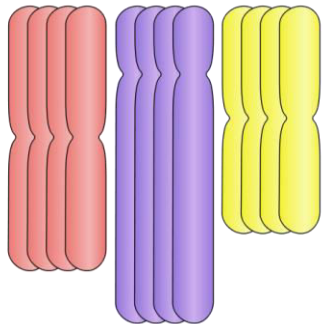


Polyploidní

Triploid (3N)



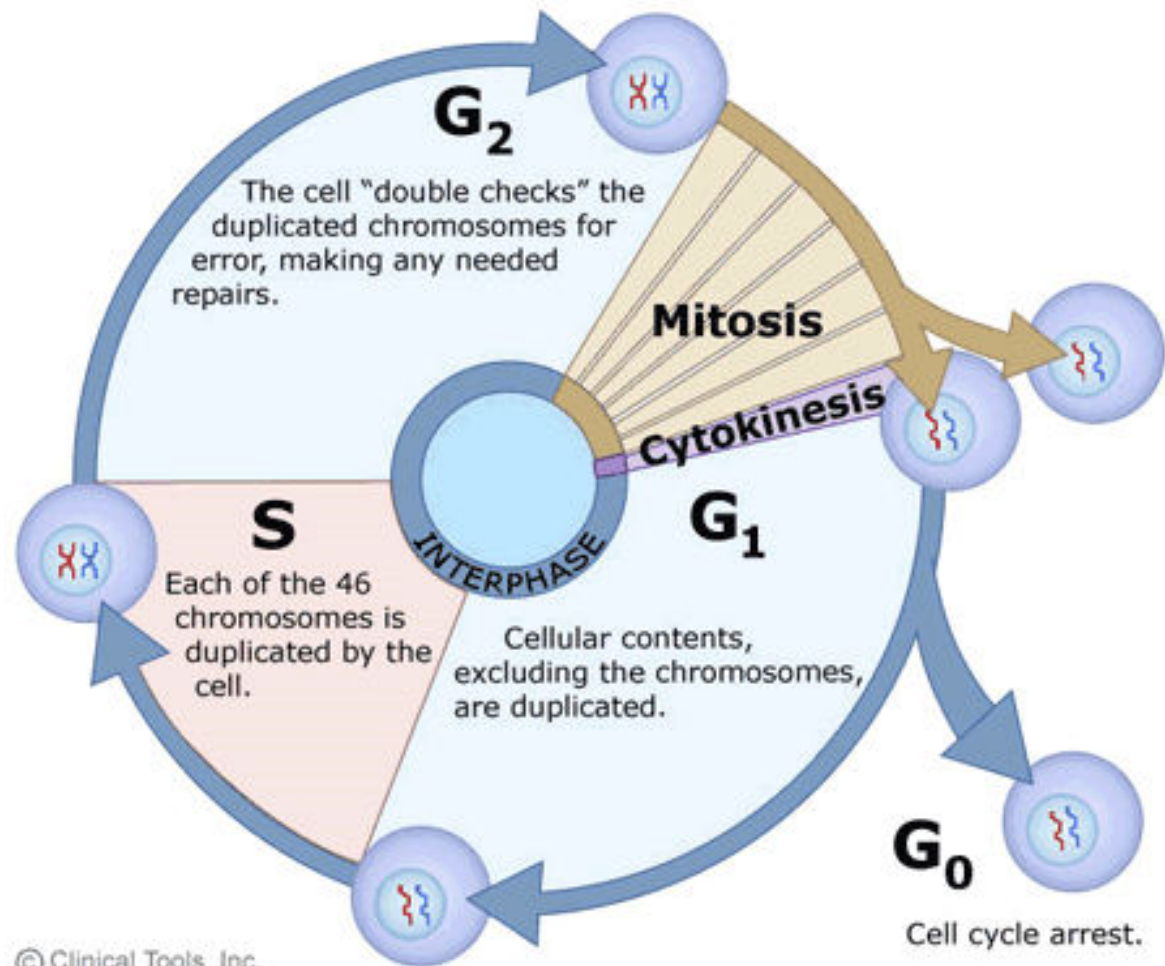
Tetraploid (4N)



- U některých organismů normální
- U člověka letální na úrovni organismu
- Některé typy buněk – jaterní, megakaryocyty

Buněčný cyklus

- Interfáze x mitóza
- Příprava na dělení x dělení



Interfáze

- Metabolická fáze buňky

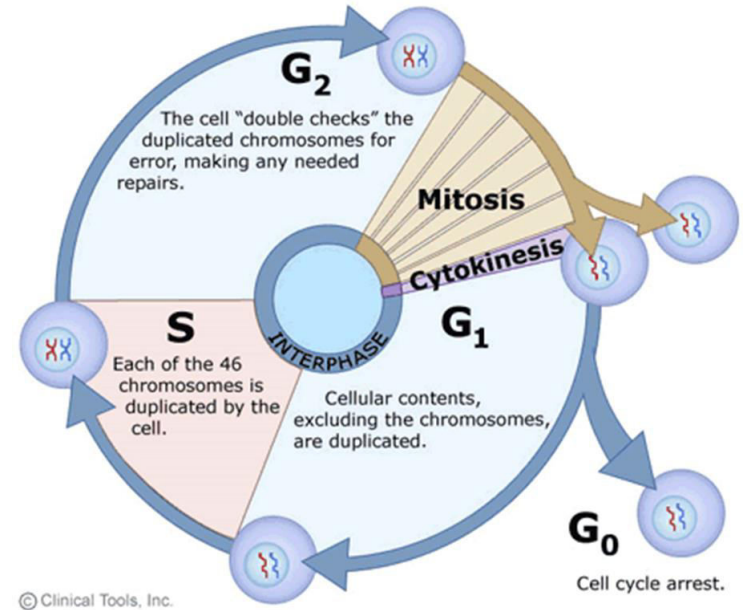
- syntéza RNA, proteozyntéza

- **G1 (G0)** – postmitotická fáze – replikace organel, 10-12h

- **G0** – buňka se přestává dělit

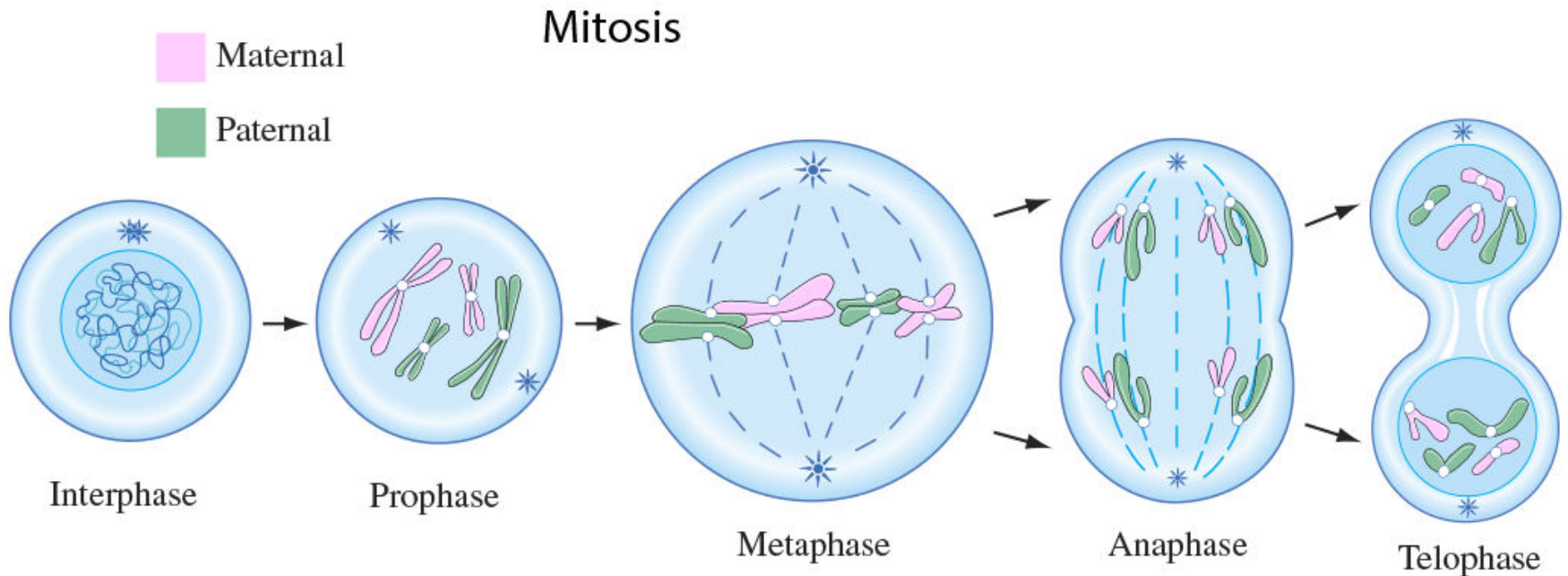
- **S** – syntetická fáze – replikace DNA, 2 chromatidy (♂, ♀) se zdvojí, 6-8 h

- **G2** – postsyntetická, premitotická fáze, oprava DNA, nejkratší, 2-4 h

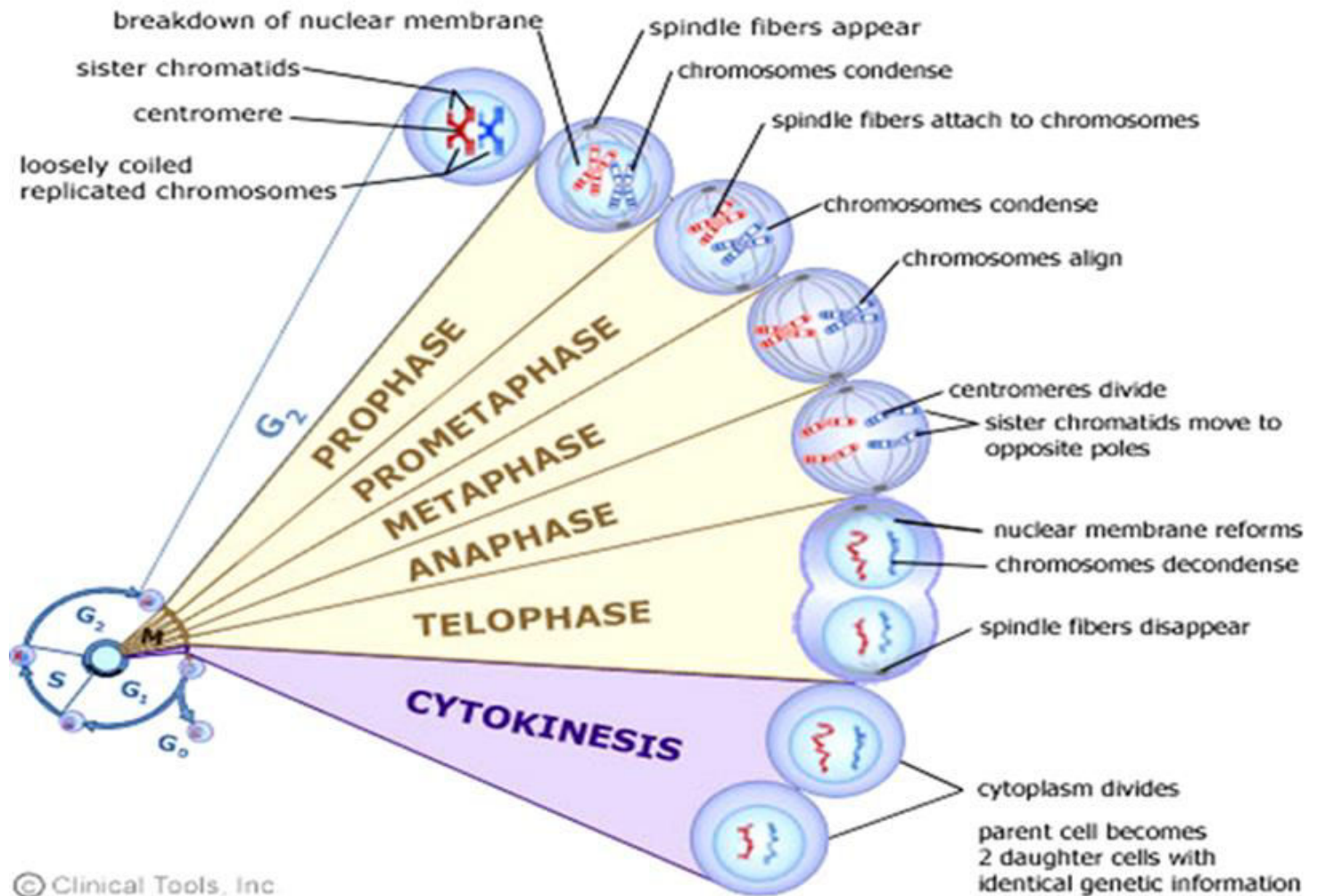


Mitóza

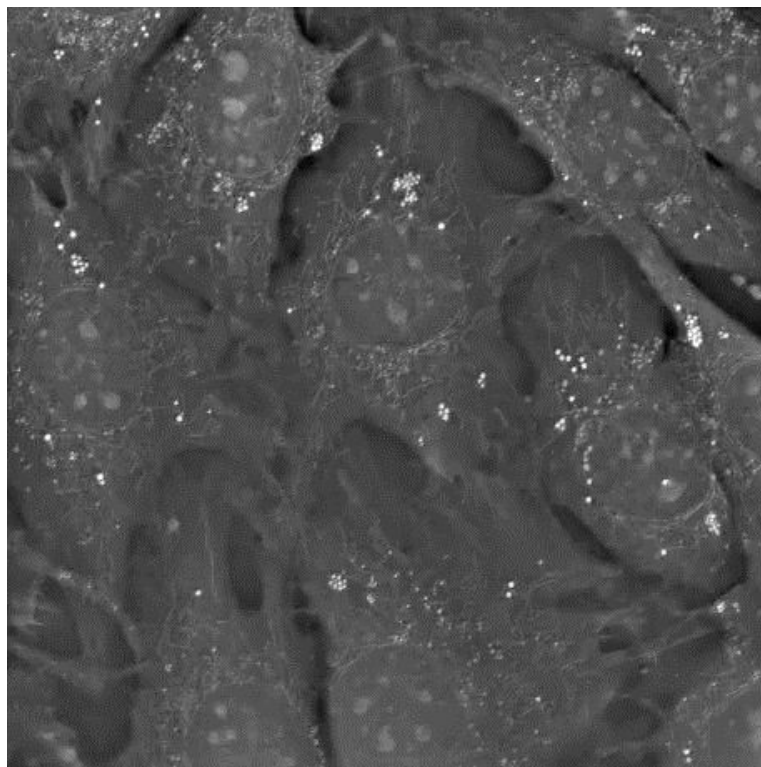
- kondenzace → rozdělení chromatid → rozdělení buňky → replikace
- dceřiná buňka má stejné množství TĚ SAMÉ genetické informace

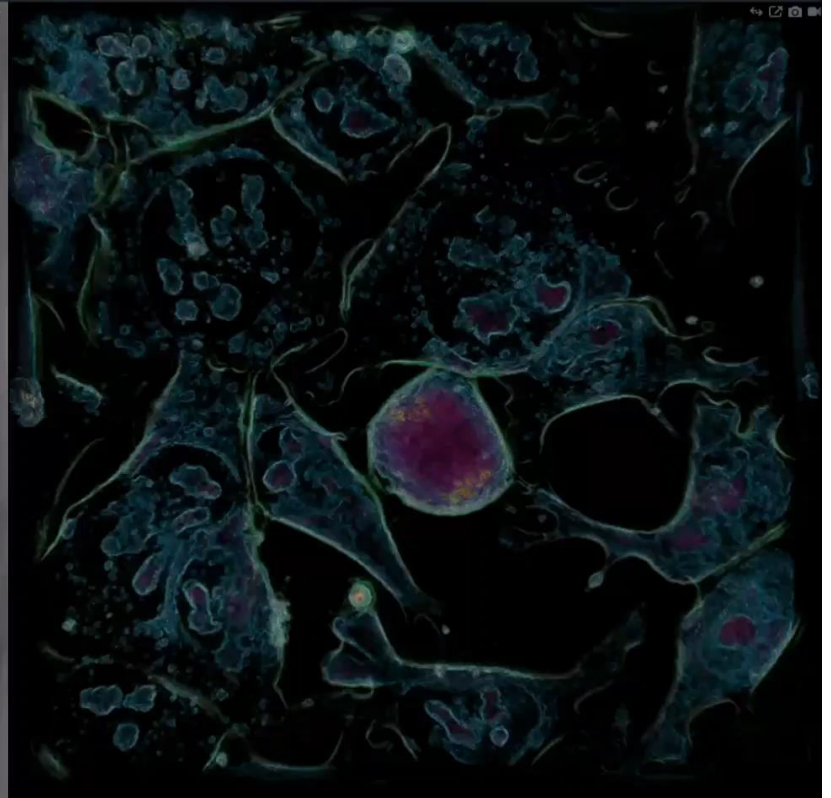
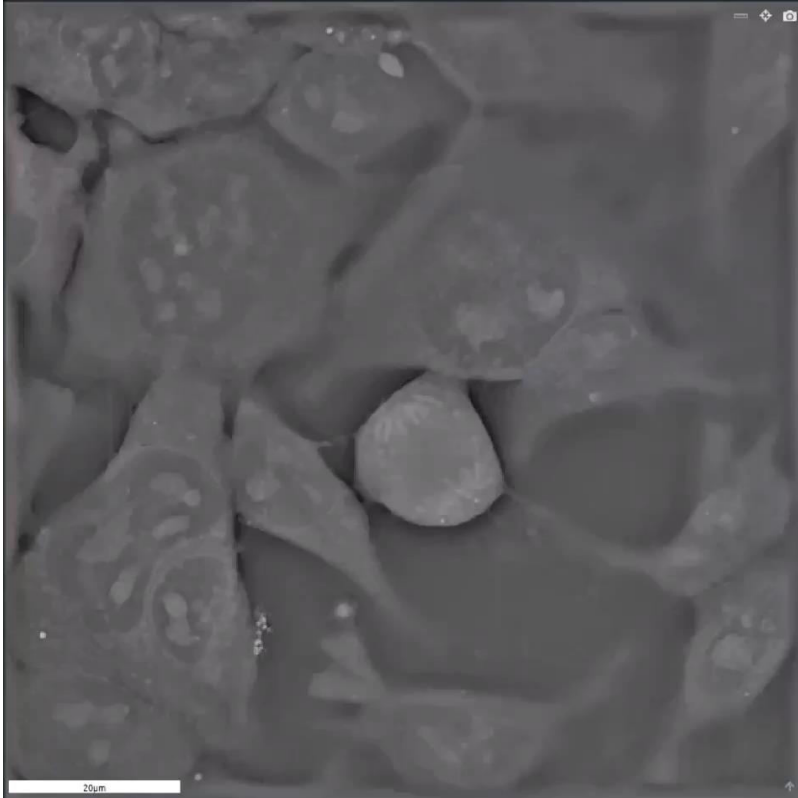


Mitóza



Mitóza



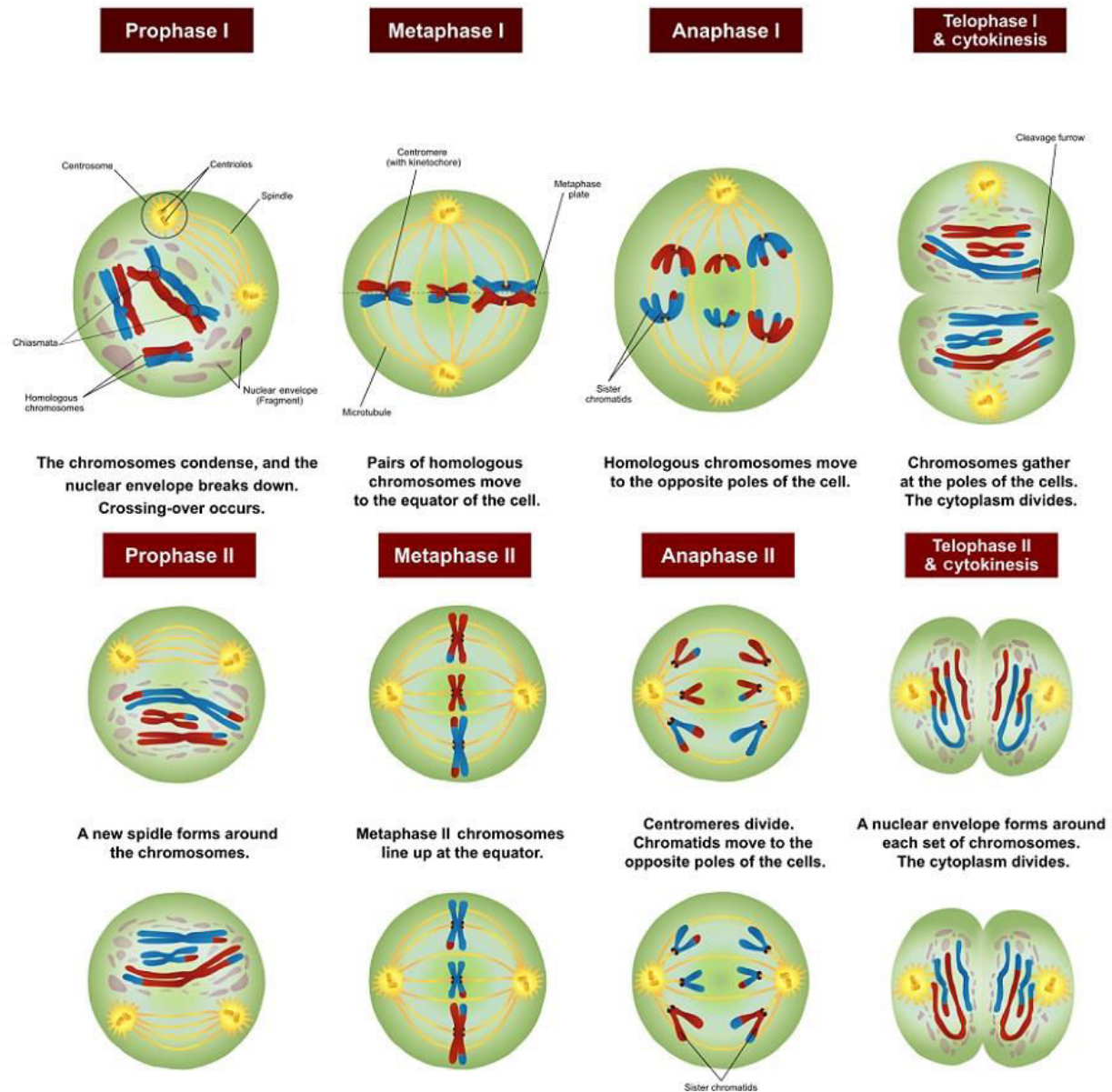


001 00:00:00.00 32x

Navigation icons: Home, Back, Forward, Stop, Play, Pause, Full Screen, Close.

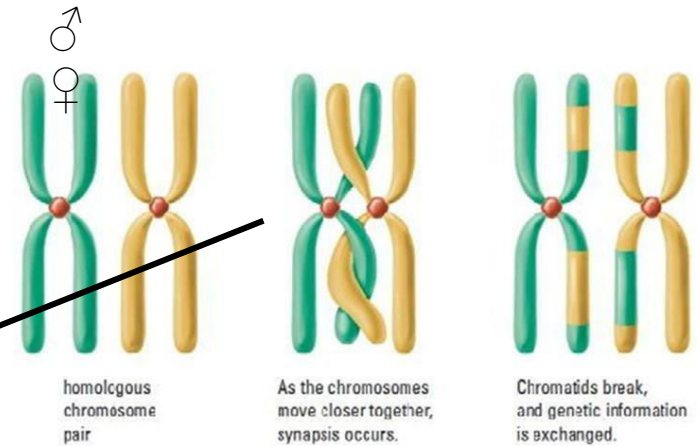
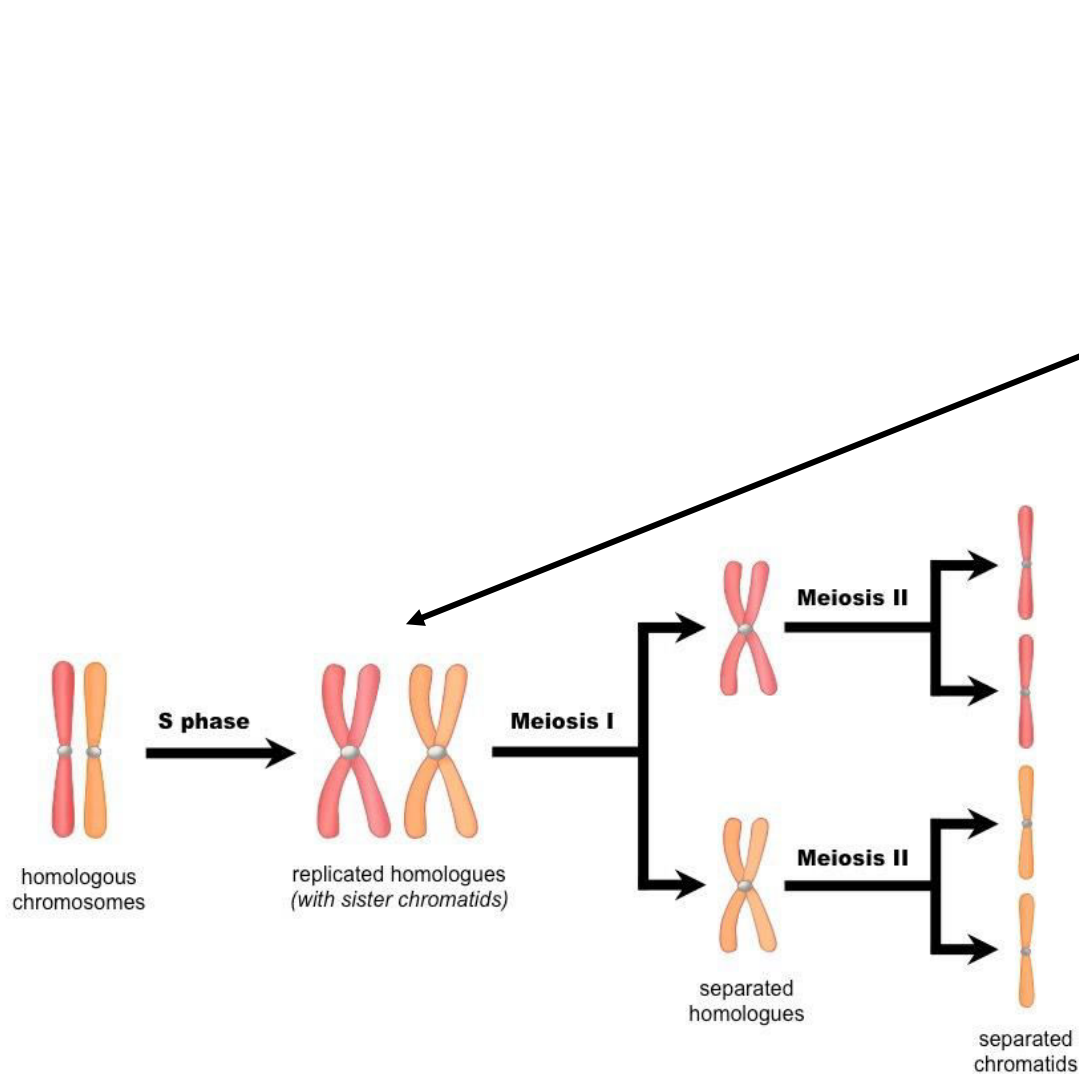
Meiόza – redukční dělení

- konečná buňka je haploidní



Meióza

Rekombinace – crossing over



ATTGCGATTTGCTAGCCGTATGCCCTTGAGT
 TGATCGGTATGCGGGTTAAATGCCGTAGTAT

Jednoduchý crossing over

ATTGCGATTTGCTAGCCGAATGCCGTAGTAT
 TGATCGGTATGCGGGTTAATATGCCCTTGAGT

ATTGCGATTTGCGGGTTAAATGCCGTAGTA
 TGATCGGTATTGCTAGCCGTATGCCCTTGAGT

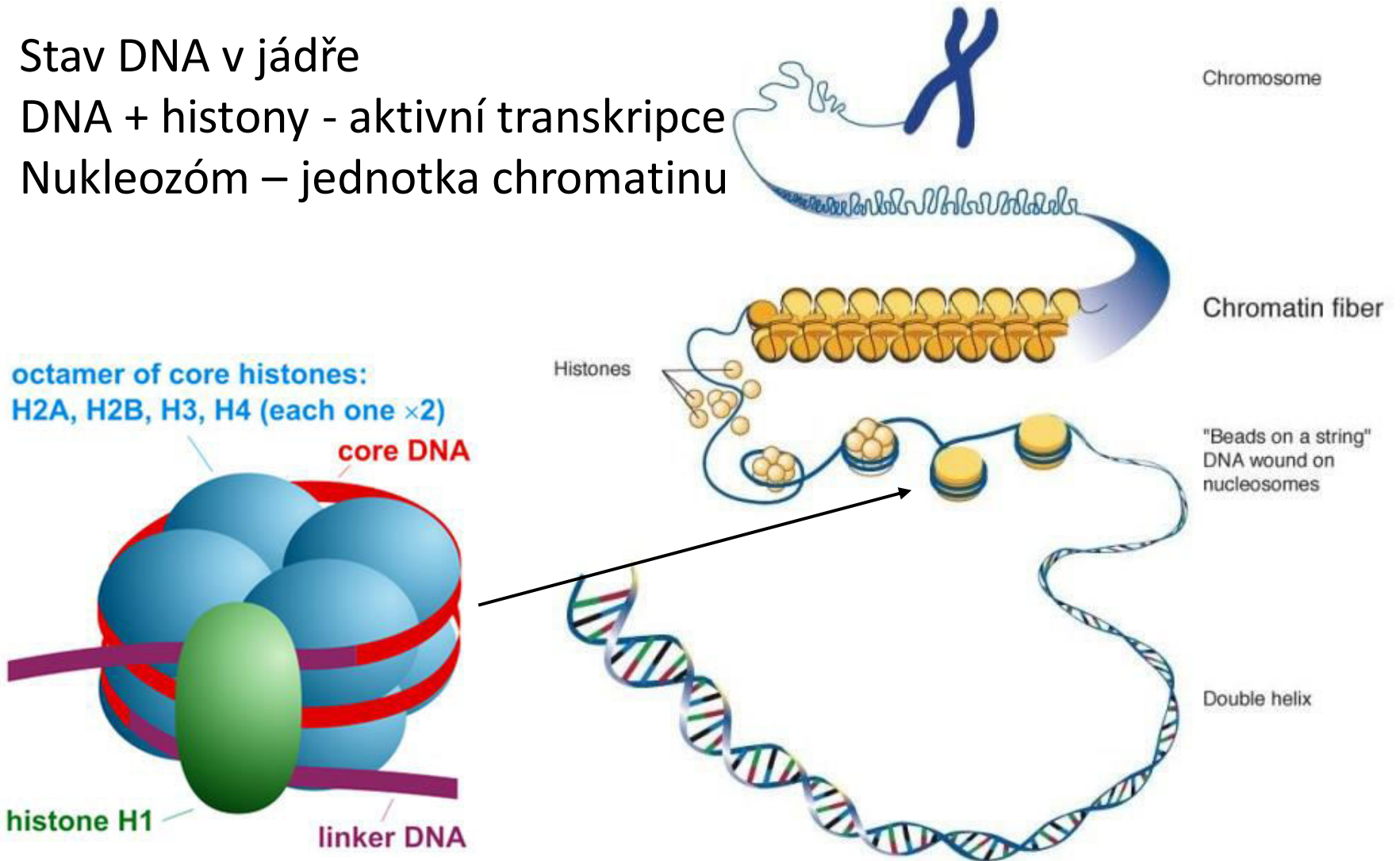
Násobný crossing over

ATTGCGATTTGCGGGTTAATATGCCCTTGAGT
 TGATCGGTATTGCTAGCCGAATGCCGTAGTAT

Se zmenšující se vzdáleností klesá
 pravděpodobnost crossing overů=VAZBA

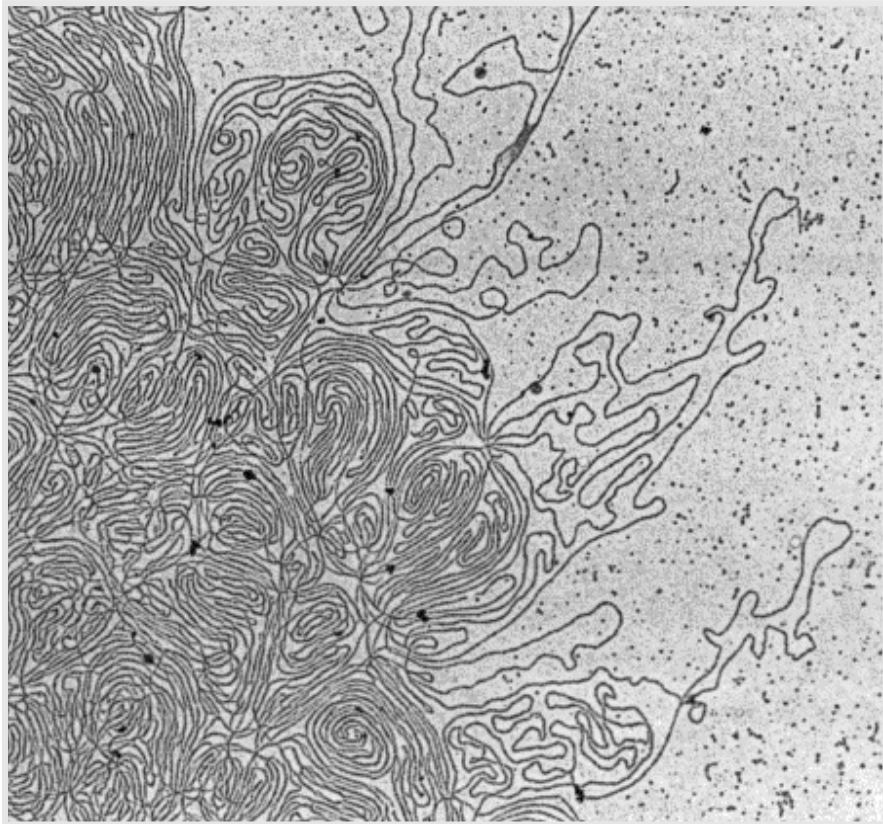
Chromatin

- Stav DNA v jádře
- DNA + histony - aktivní transkripce
- Nukleozóm – jednotka chromatinu



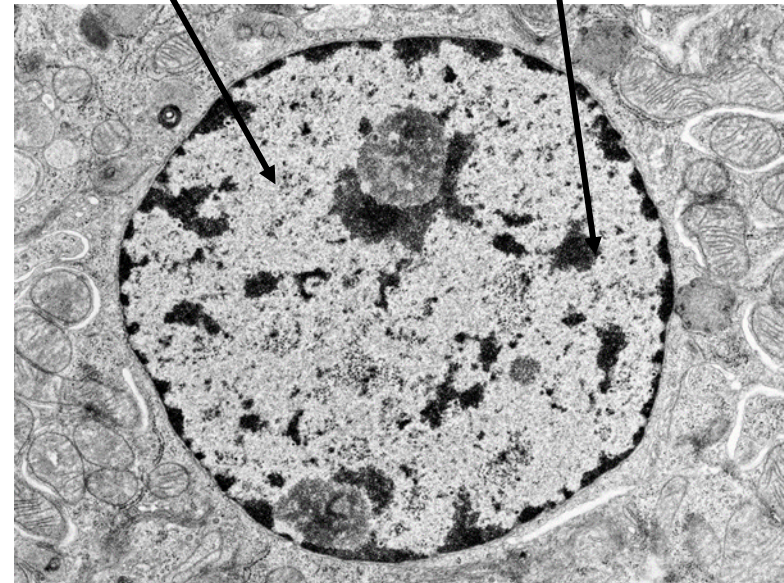
Chromatin

- Euchromatin – světlé části, aktivní
- Heterochromatin – tmavé, neaktivní

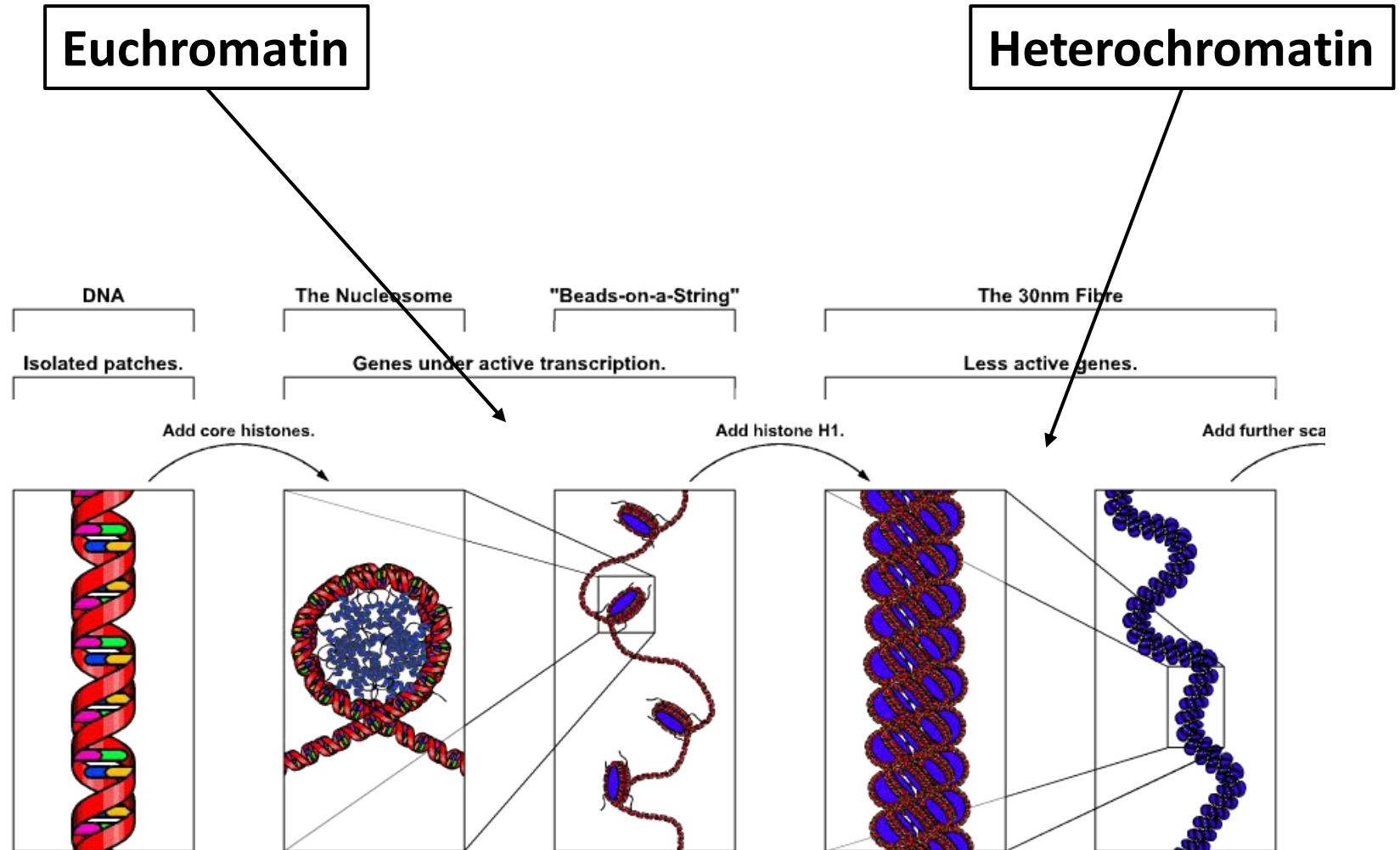


Euchromatin

Heterochromatin

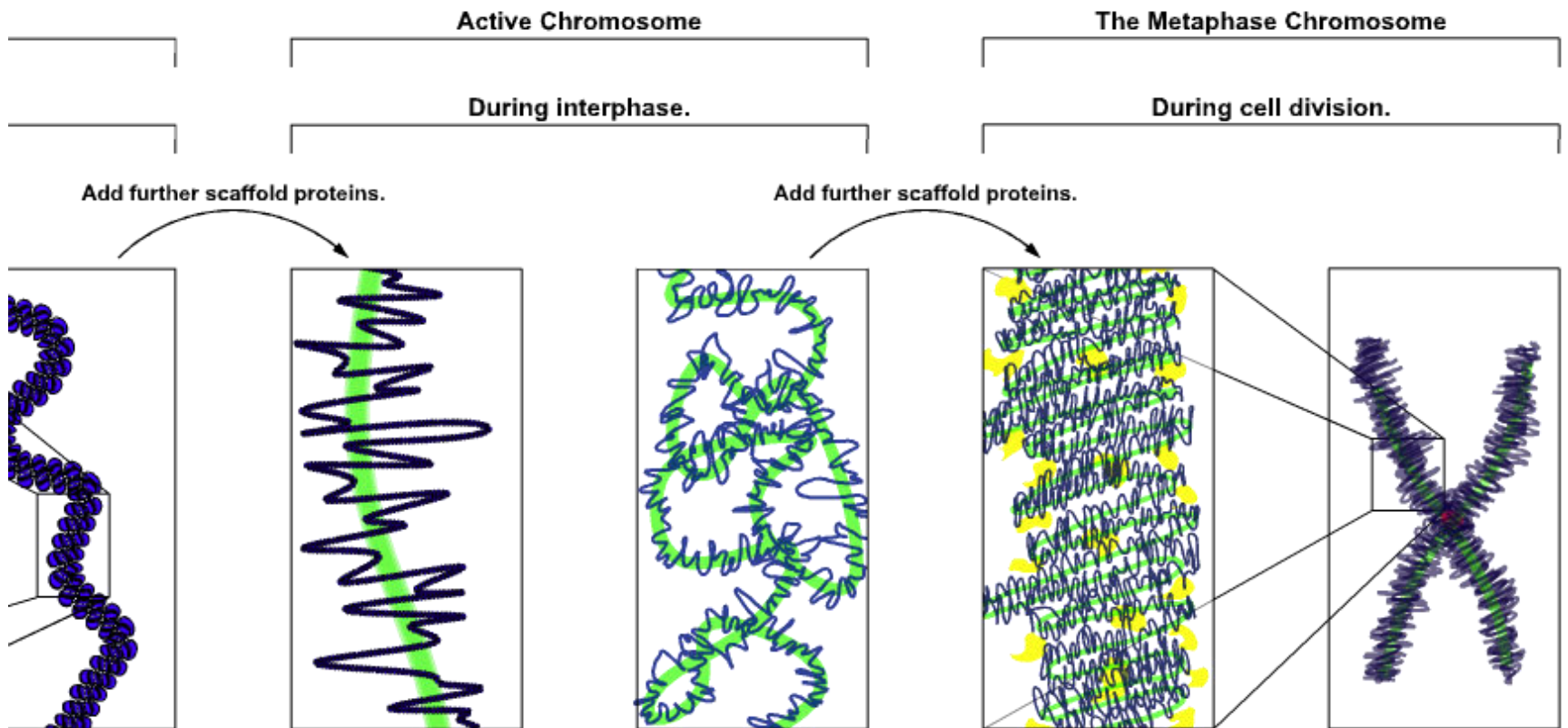


Struktura a kondenzace chromatinu



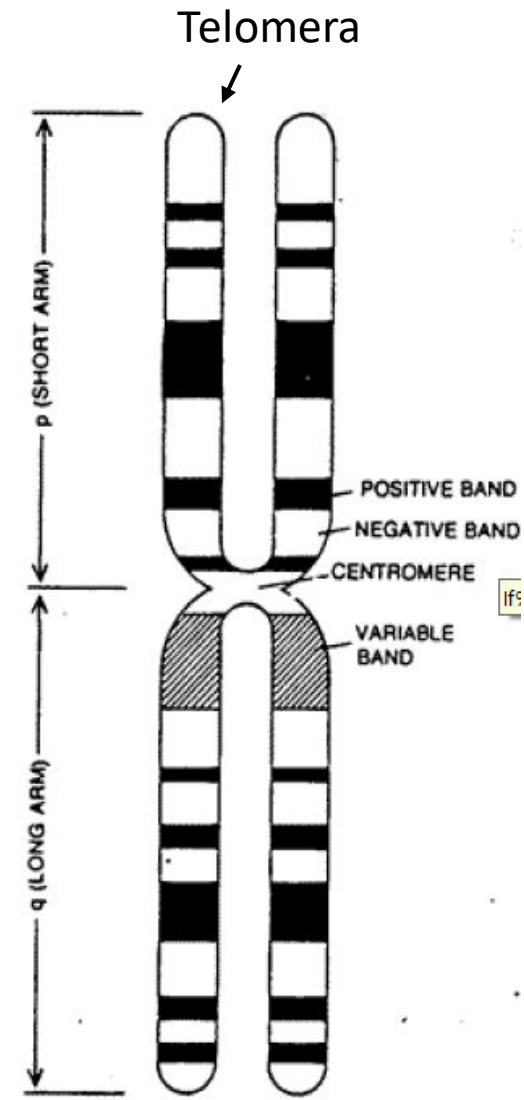
Kondenzace chromozomu

Příprava na dělení



Struktura chromozómu

- 2 homologní chromozómy v buňce -
♂, ♀ = chromozomový pár
- Každý chromozóm - 2 identické chromatidy
- centromera, raménko, telomera
- tmavé úseky – neaktivní, AT bohaté, málo genů
- světlé úseky – aktivní, kódující oblasti

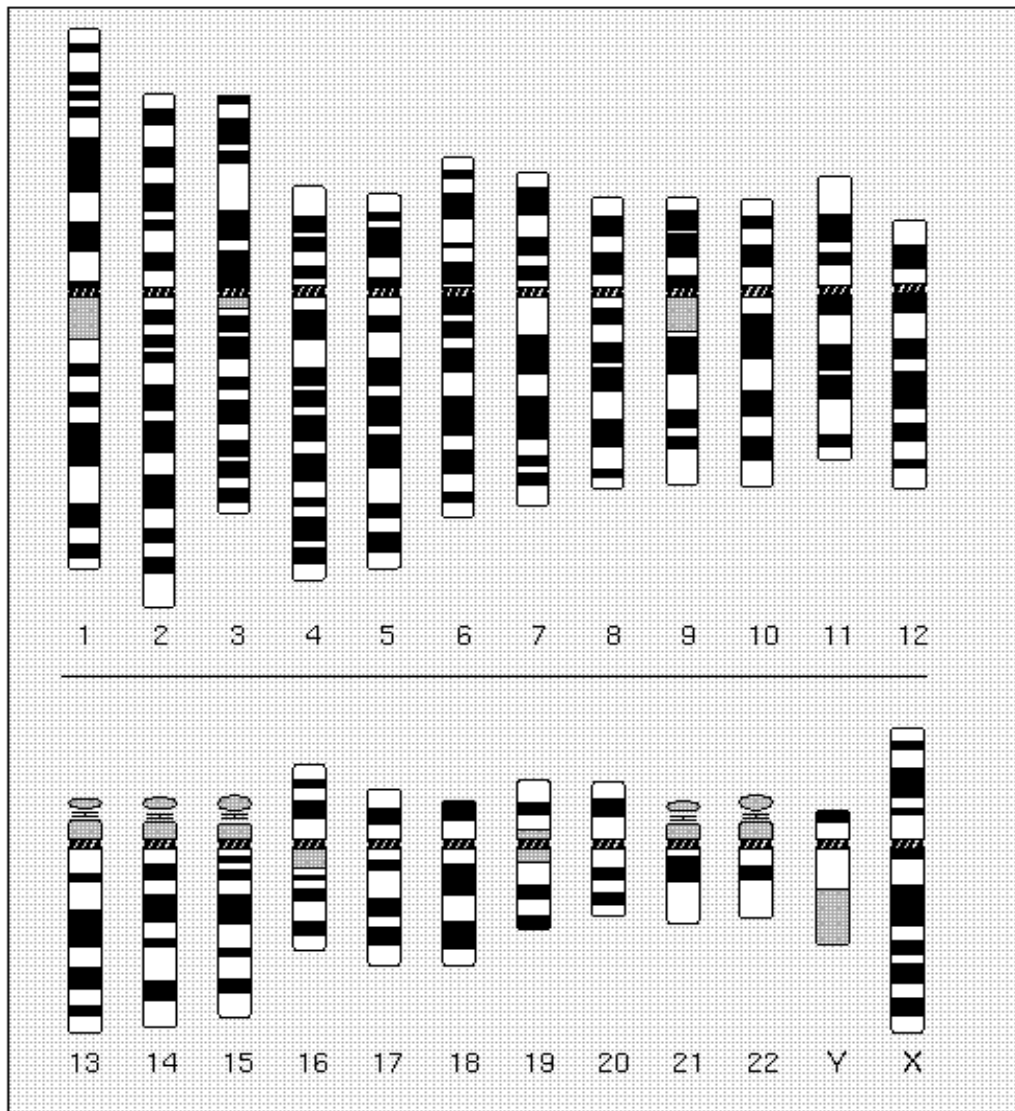


Chromatidy

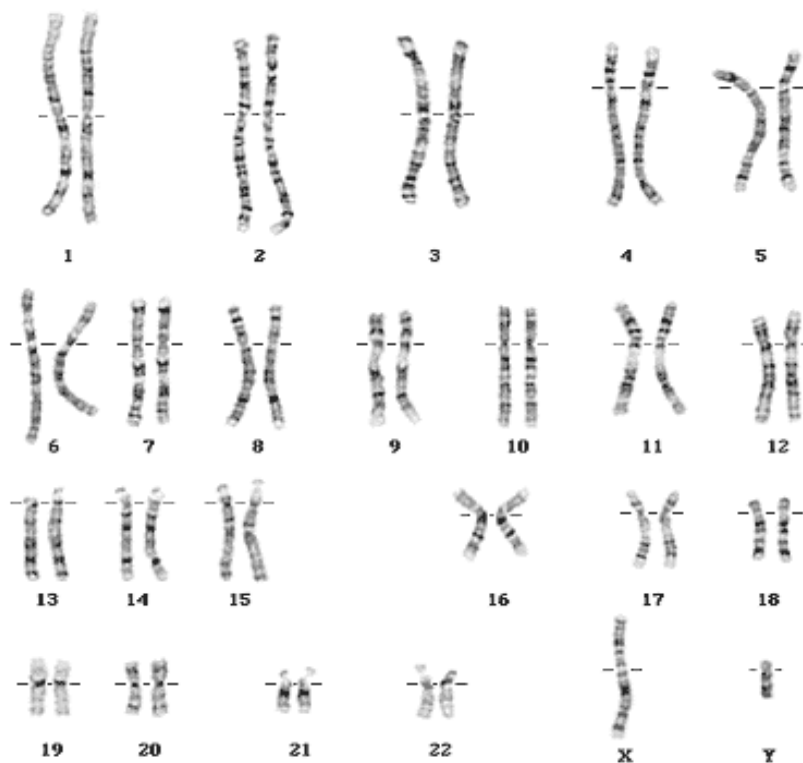
Karyotyp člověka

- soubor chromosomů jedince (buňky) s označením celkového počtu, typu pohlavních chromosomů a příp.aberací
- zápis karyotypu: Mezinárodní systém lidské cytogenetické nomenklatury (ISCN)
- označení pro soubor metafázních chromosomů
- *46 chromosomů: 22 párů autosomů (nepohlavních chromosomů)*
 - 2 páry gonosomů (pohlavních chromosomů)*
- chromosomový pár tvořen homologními chromosomy

Ideogram- grafické znázornění pruhování chromosomů při G - barvení

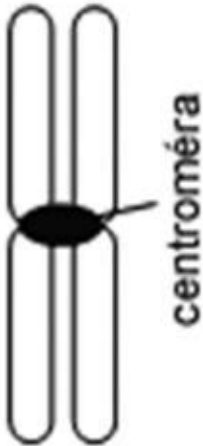


Karyogram člověka

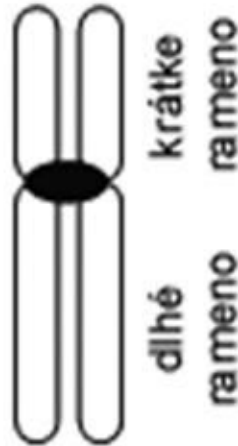


Typy chromozomů dle polohy centromery

metacentrický
chromozóm



submetacentrický
chromozóm



akrocentrický
chromozóm



telocentrický
chromozóm

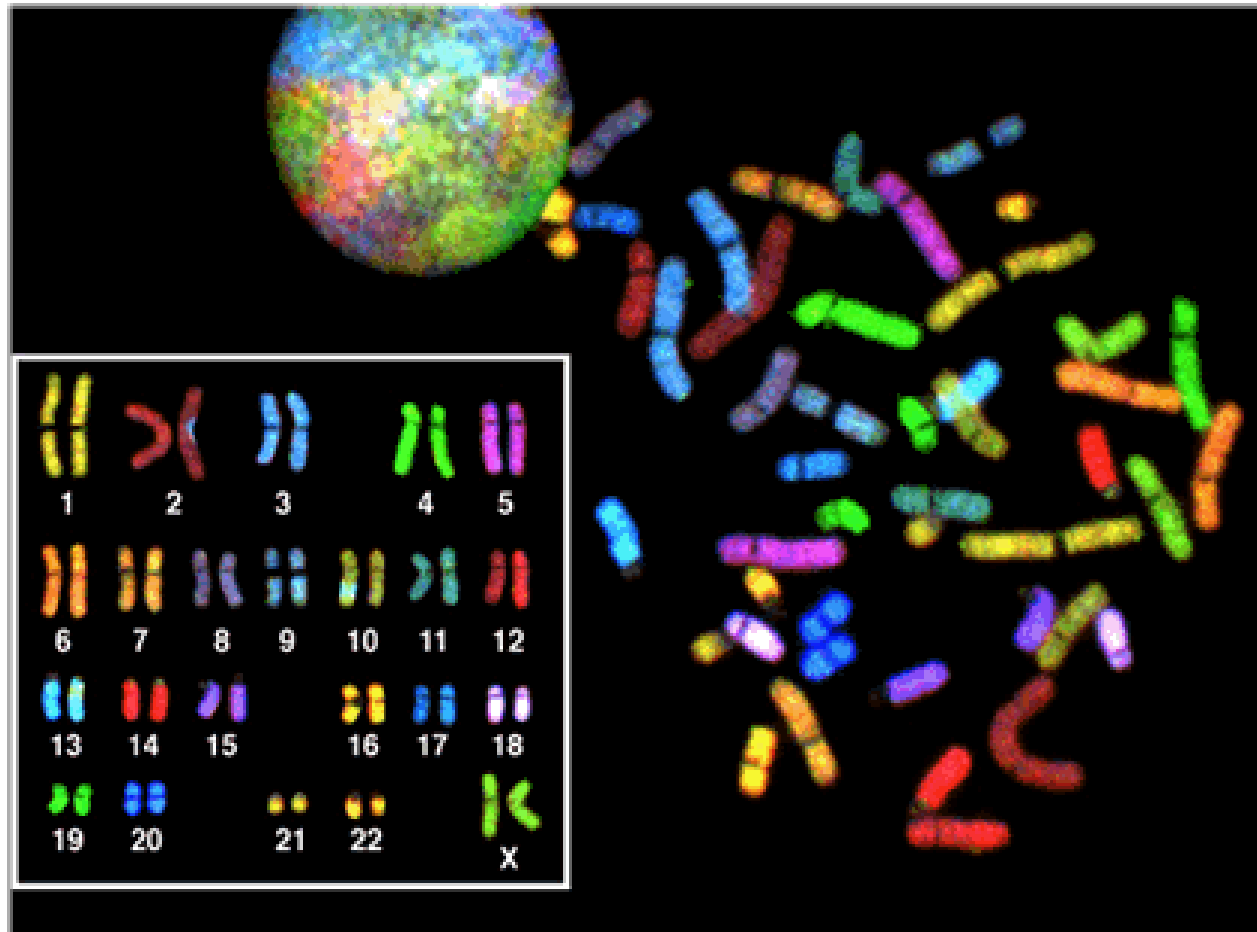


- A - Chromozomy 1, 2, 3 jsou velké metacentrické.
- B - Chromozomy 4, 5 jsou velké submetacentrické.
- C - Chromozomy 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 jsou střední submetacentrické, včetně chromozomu X.
- D - Chromozomy 13, 14, 15 jsou střední akrocentrické.
- E - Chromozomy 16, 17, 18 jsou malé submetacentrické.
- F - Chromozomy 19, 20 jsou malé metacentrické.
- G - Chromozomy 21, 22, jsou malé akrocentrické, řadí se sem i chromozom Y

Cytogenetické vyšetření

- Kolchicin – zachycení mitotické fáze
- většinou leukocyty z krve
- **M-FISH** – celochromozomové sondy

- Klinická genetika: postnatální, prenatální
- Onkologická genetika
- Preimplantační genetika
- Mapování genomu



Geneticky podmíněná onemocnění u člověka

1. **Monogenní choroby** (AD, AR, XD, XR) – poruchy strukturních genů, hormonů, enzymů (metabolické poruchy)
2. **Chromosomové aberace (CHA)**
3. Patologické stavy s **multifaktoriálním** typem dědičnosti (cukrovka, ateroskleróza)
4. Choroby s **nemendelistickým způsobem** dědičnosti - mitochondriální, expanze trinukleotidových repeticí...
5. Genetické poruchy **somatických buněk** (nádory)



Chromozomální aberace

- **Numerické**
 - **Euploidie** - polyploidie – zmnožení celé sady - letální
 - **Aneuploidie** – změna počtu jednotlivých chromozomů
 - trisomie – 21 (Down), 18 (Edwards), XXY (Klinefelter), XXX (superfemale), XYY (supermale)
 - monosomie – Turnerův syndrom – 45, X
 - **Marker chromozom** – „kousek navíc“
 - Autozomální x gonozomální
- **Strukturní**



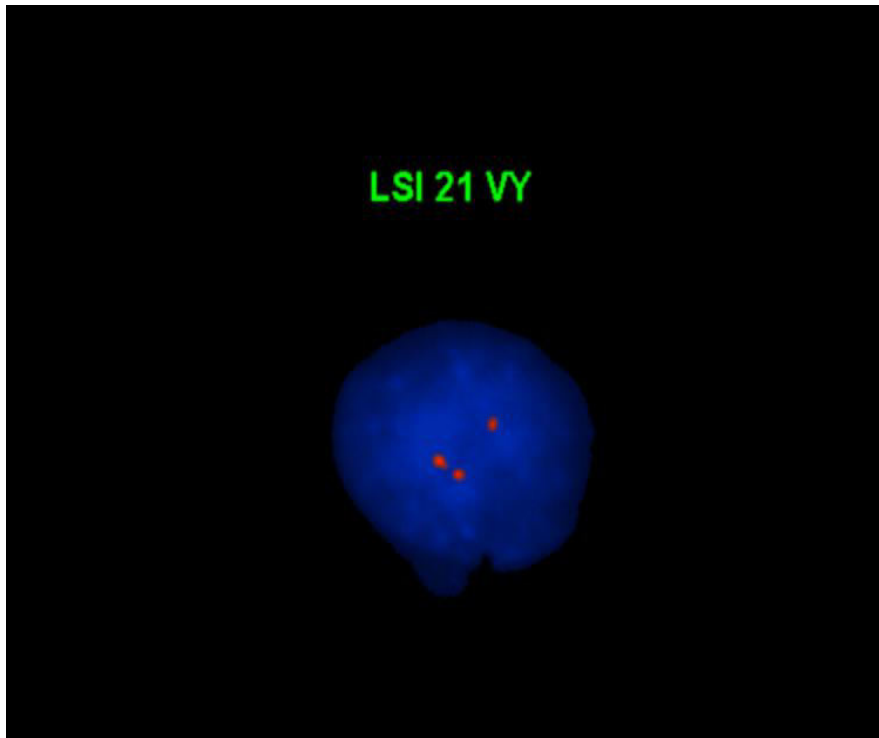
Příklad autozomální – Downův syndrom

- Výskyt asi 1 / 700
- Riziko se prudce zvyšuje s věkem matky
- Manifestace: zpomalený vývoj, hypotonie, různý stupeň MR, velký jazyk, široké ruce, krátké prsty, malý nos a ústa.
- největšími riziky jsou případné vrozené vady srdce a zvýšené nebezpečí vzniku leukémie.



Trisomie 21 – Downův syndrom

Detekce trisomie chromozomu 21. Zpracováno technikou interfázní FISH

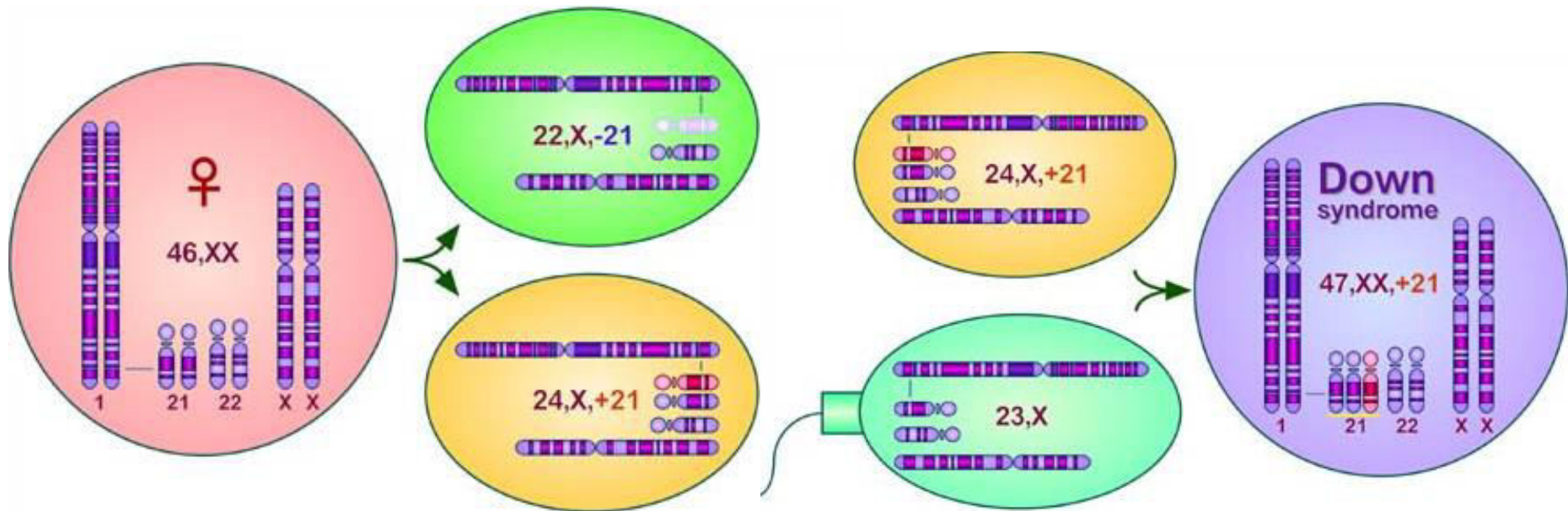


Vznik DS – volná trisomie

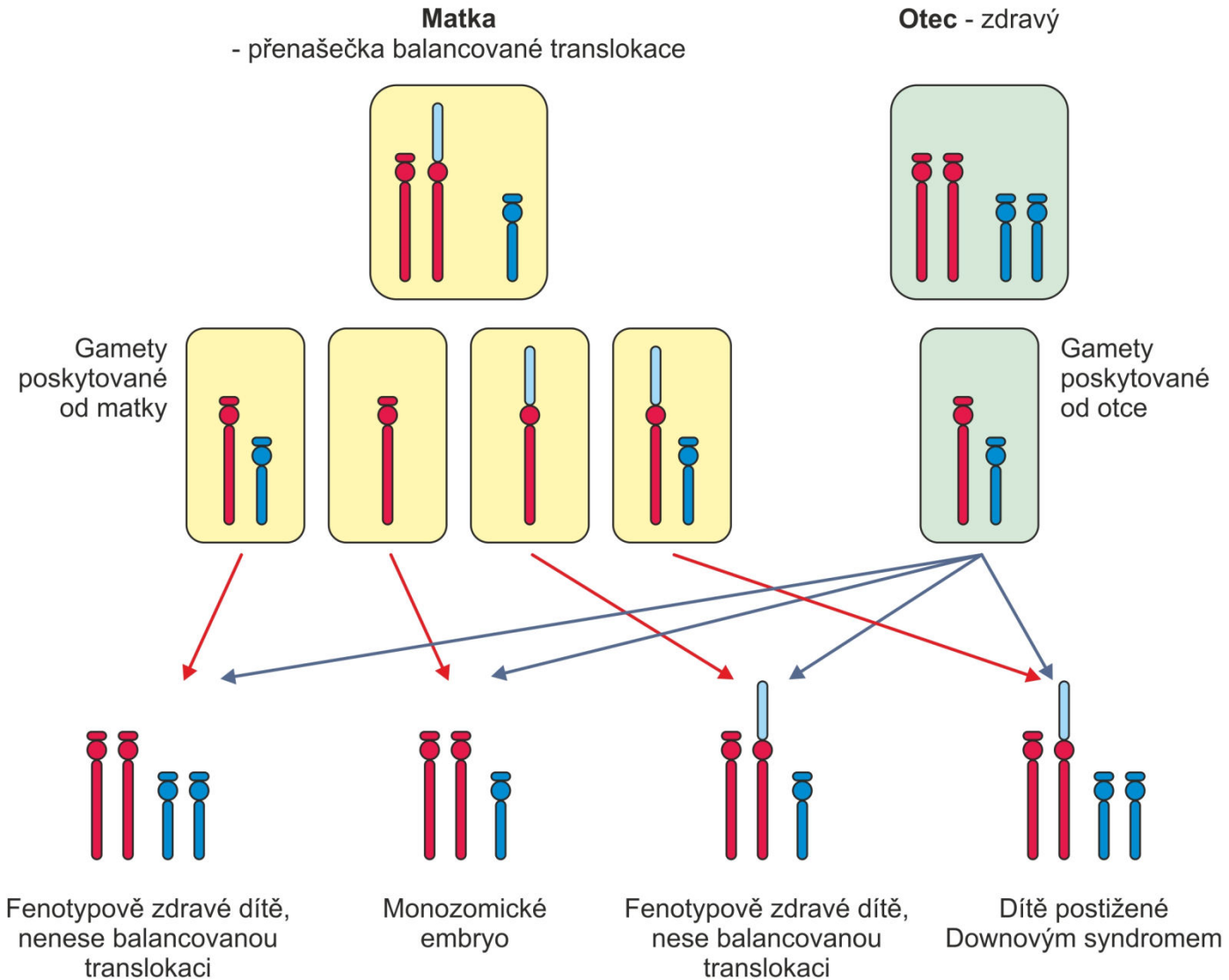
závisí na věku matky

Meioza

Fertilizace

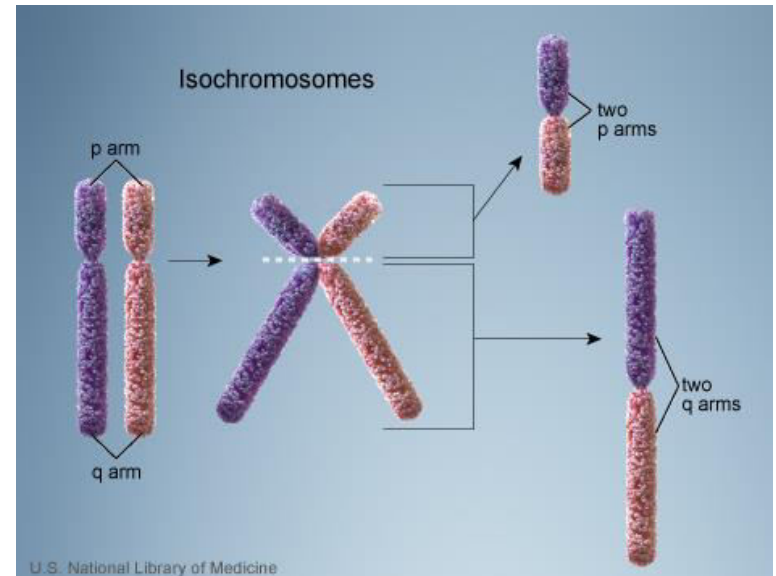


Translokační forma



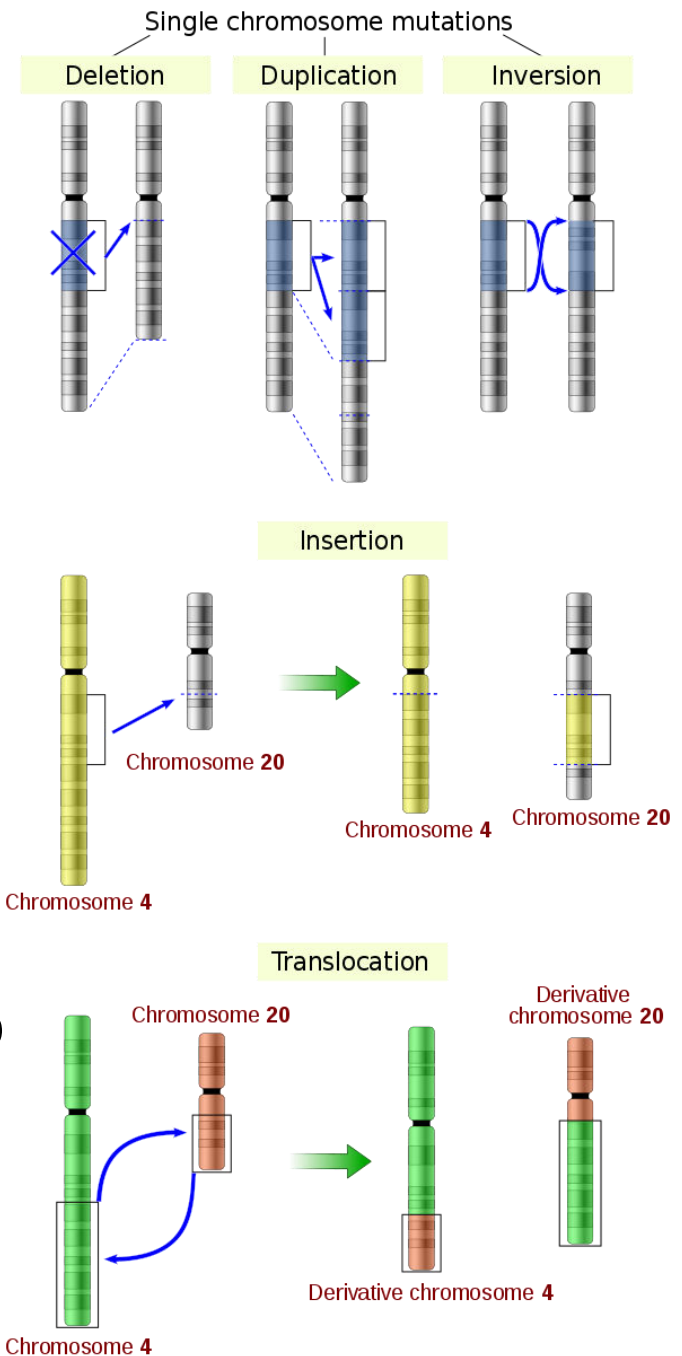
Chromozomální aberace gonozomů

- Turnerův syndrom - 45,X
- Klinefelterův syndrom – 47,XXY
- Supermale, superfemale – 47,XXX a 47,XYY
- Strukturální změny – i(Xq) – fenotypově Turnerův syndrom



Strukturní aberace

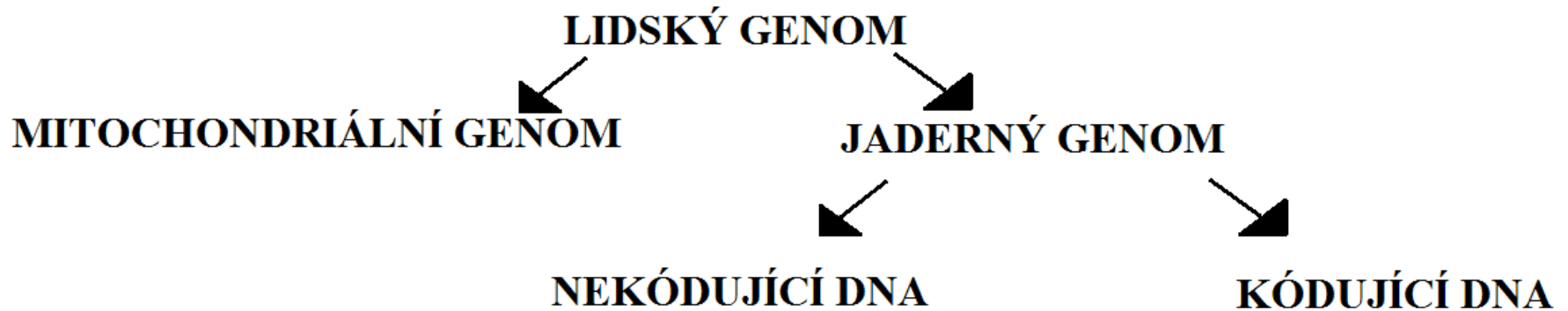
- **balancované x nebalancované**
- **chromozomální zlomy**
- delece – Cri-du-chat
- mikrodelece
- duplikace
- inverze
- translokace
- ring – ztráta telomer, spojení do kruhu



Prenatální diagnostika

- **Invazivní:**
 - Amniocentéza (AC) → II.trimestr
 - Odběr choriových klků (CVS) → I.trimestr
 - Kordocentéza
 - Fetoskopie
- **Neinvazivní:**
 - Ultrazvuk
 - Jiné typy zobrazování (MR, retgen)
 - Fetální buňky v mateřském oběhu

Funkční stavba lidské DNA

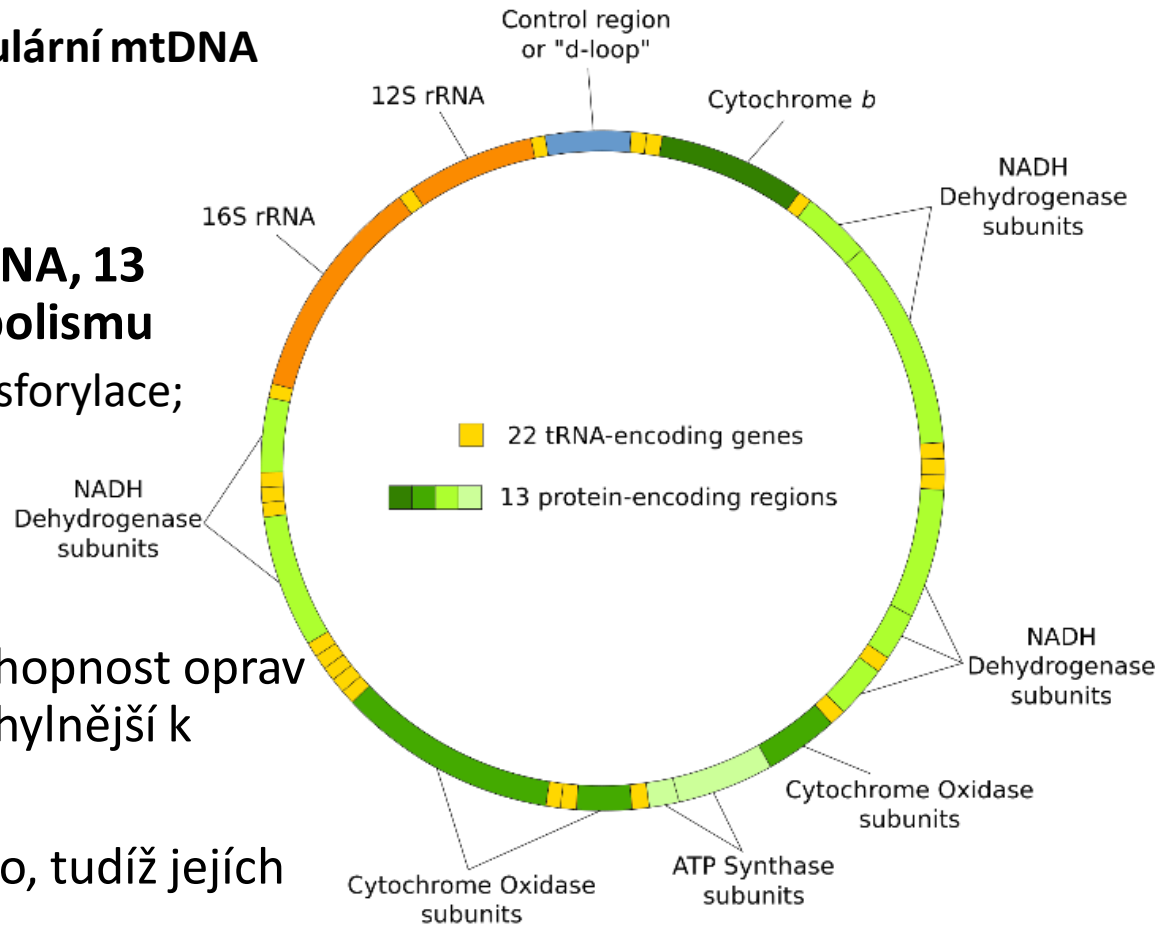


Tandemové repetitivní sekvence
Pohyblivé segmenty
RNA (t,r,sn)
Promotory
Terminátory
Enhancery
Junk DNA

1,5% DNA!

Mitochondriální genom

- **mitochondrie - semiautonómí buněčná organela**
 - vlastní genom ve formě **cirkulární mtDNA**
 - ve 2–10 kopiích
 - zděděny vždy po matce
- **Geny – 37 genů, 2rRNA, 22 tRNA, 13 enzymů energetického metabolismu**
 - citrátový cyklus; oxidativní fosforylace;
 - β -oxidace mastných kyselin;
 - část cyklu močoviny
 - částečně apoptóza
- mitochondriální DNA nemá schopnost oprav na rozdíl od DNA jaderné (náchylnější k poškození)
- mitochondrií je v buňce mnoho, tudíž jejich DNA se musí dělit stejně často
- mitochondriální DNA nemá histony



Variabilita lidského genomu

- Různorodost vlastností je dána různorodostí genetické informace a její regulace (genetika x epigenetika)
- Zdrojem variability v DNA jsou mutace, které pozměňují DNA a tvoří tak nové varianty.
- Variabilita je pak dále promíchávána procesem pohlavního rozmnožování (rekombinace DNA + spojení dvou genomů) a/nebo horizontálním přenosem genů.
- **Polymorfismus** - frekvence v populaci **přesahuje 1 %** (více variant jednoho genu)
- **Mutace** (vzácné varianty) - frekvence v populaci **nepřesahuje 1 %**
- **SNP – Single nucleotide polymorphism** – detekce „deep sequencing“, markery genetických onemocnění, evoluce, populační genetika

Typy mutací

V kódující oblasti genu

- **SYNONYMNÍ** - nevedou k záměně AK (*degenerace genet. kódu*)
- **MISSENSE** - chybný smysl - záměna AK za jinou (*Srpkovitá anemie*)
- **NONSENSE** - vznik terminačního kodonu (*Neurofibromatóza*)
- **ELONGAČNÍ** - zánik terminačního kodonu
- **POSUNOVÉ** (*frameshift*)....inzerce, delece

V promotoru

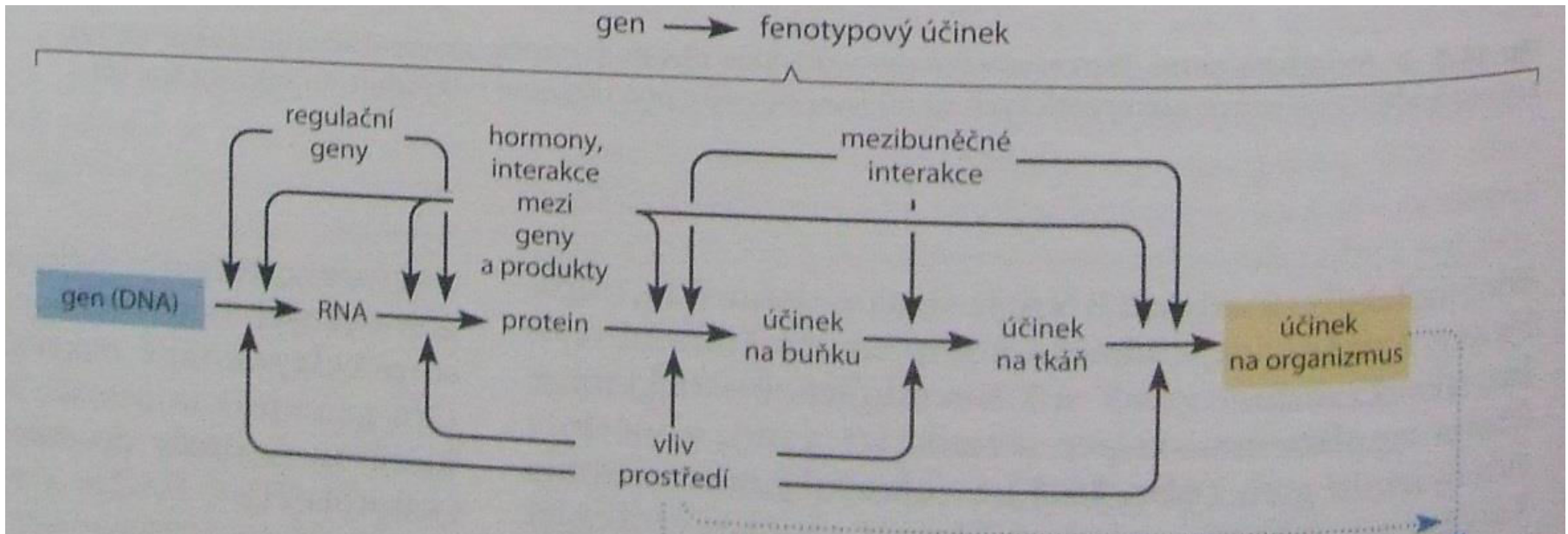
- Narušení vazby transkripčních faktorů vyvolá
- změny v genové expresi

Na rozhraní exonů a intronů

- Interferuje se sestřihem (Splicing)

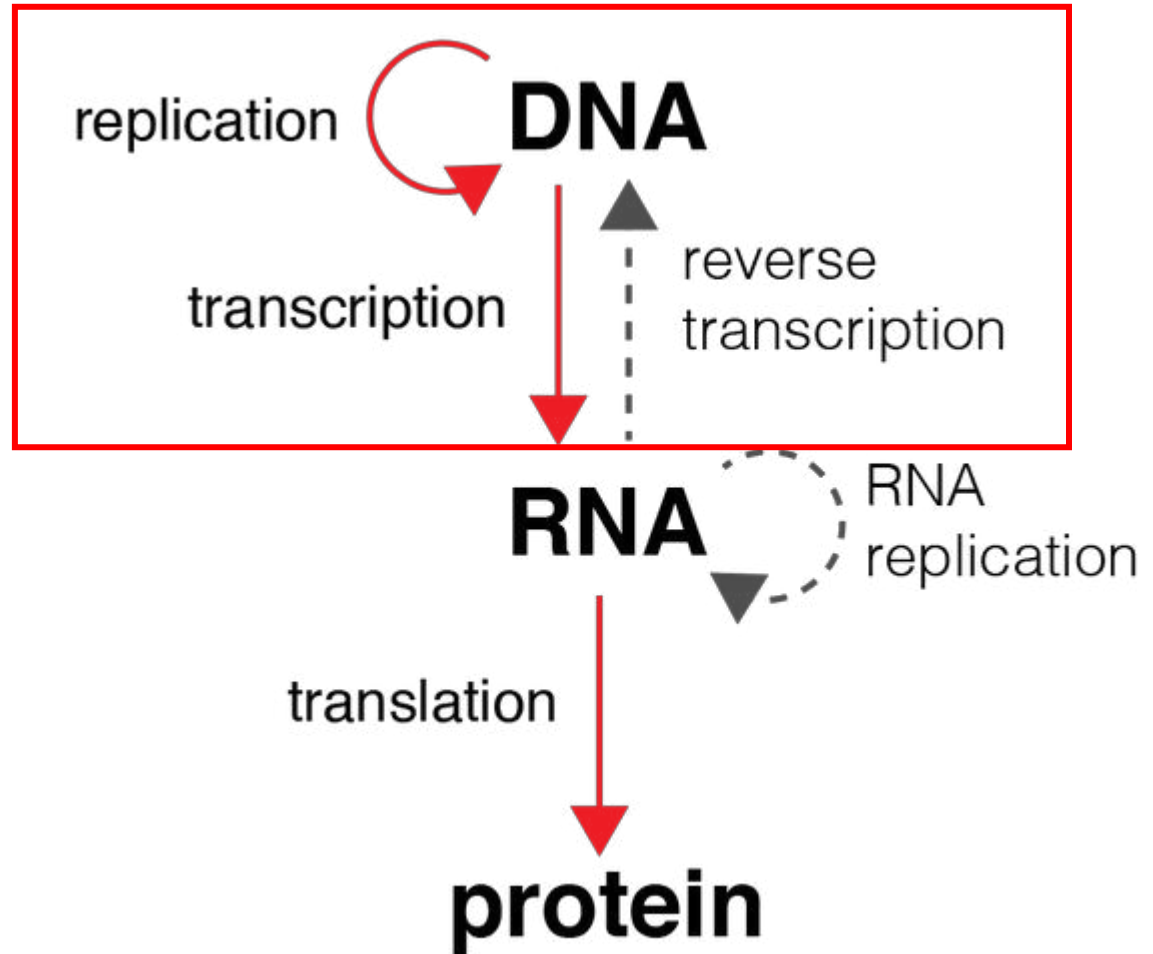
Co je to gen

- Kvalitativní znak x kódující sekvence
- **Monogenní** - na tvorbě znaku se podílí málo genů (často jen jeden), většinou
- **Polygenní** - na tvorbě znaku se podílí více genů, nezanedbatelný je i vliv
- vnějšího prostředí, většinou ovlivňuje kvantitativní znaky.
- **Strukturní** - Kódují strukturní bílkoviny.
- **Regulační** - Podle nich vytvořené bílkoviny regulují děje v buňce (enzymy, receptory, atd.)
- **RNA geny** - dle nich se syntetizuje tRNA a rRNA.
- Genová vazba



Replikace a transkripce DNA

Centrální dogma molekulární biologie



Replikace DNA

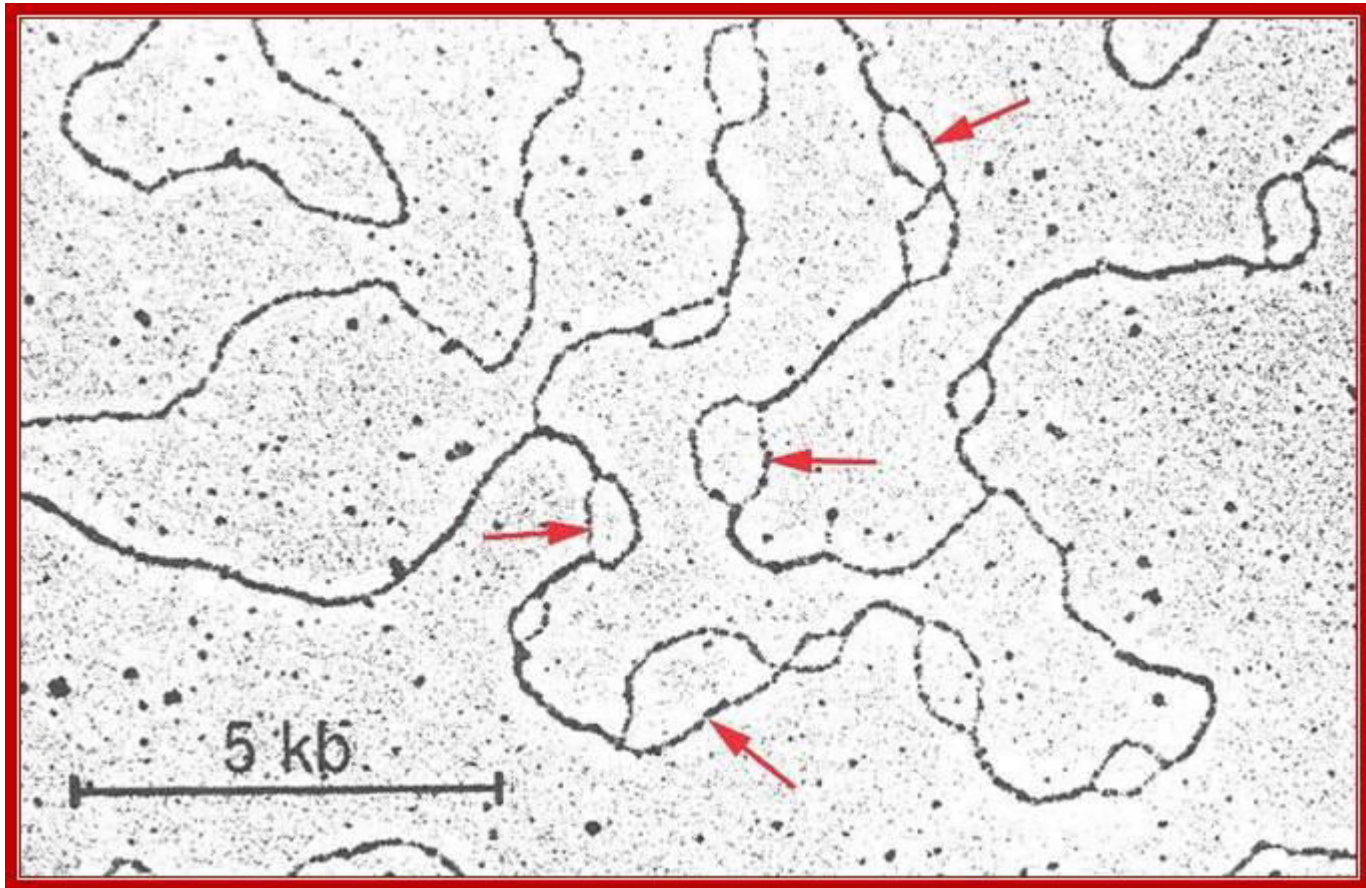
- V interfázi (S fáze)
- Zajišťuje dědičnost
- DNA dependentní DNA polymeráza

Eukaryotické DNA-polymerázy

Typ polymerázy	Funkce
Polymeráza α	Replikace na opožďujícím se řetězci
Polymeráza β	Reparační funkce
Polymeráza γ	Replikace mitochondriální DNA
Polymeráza δ	Replikace na vedoucím řetězci

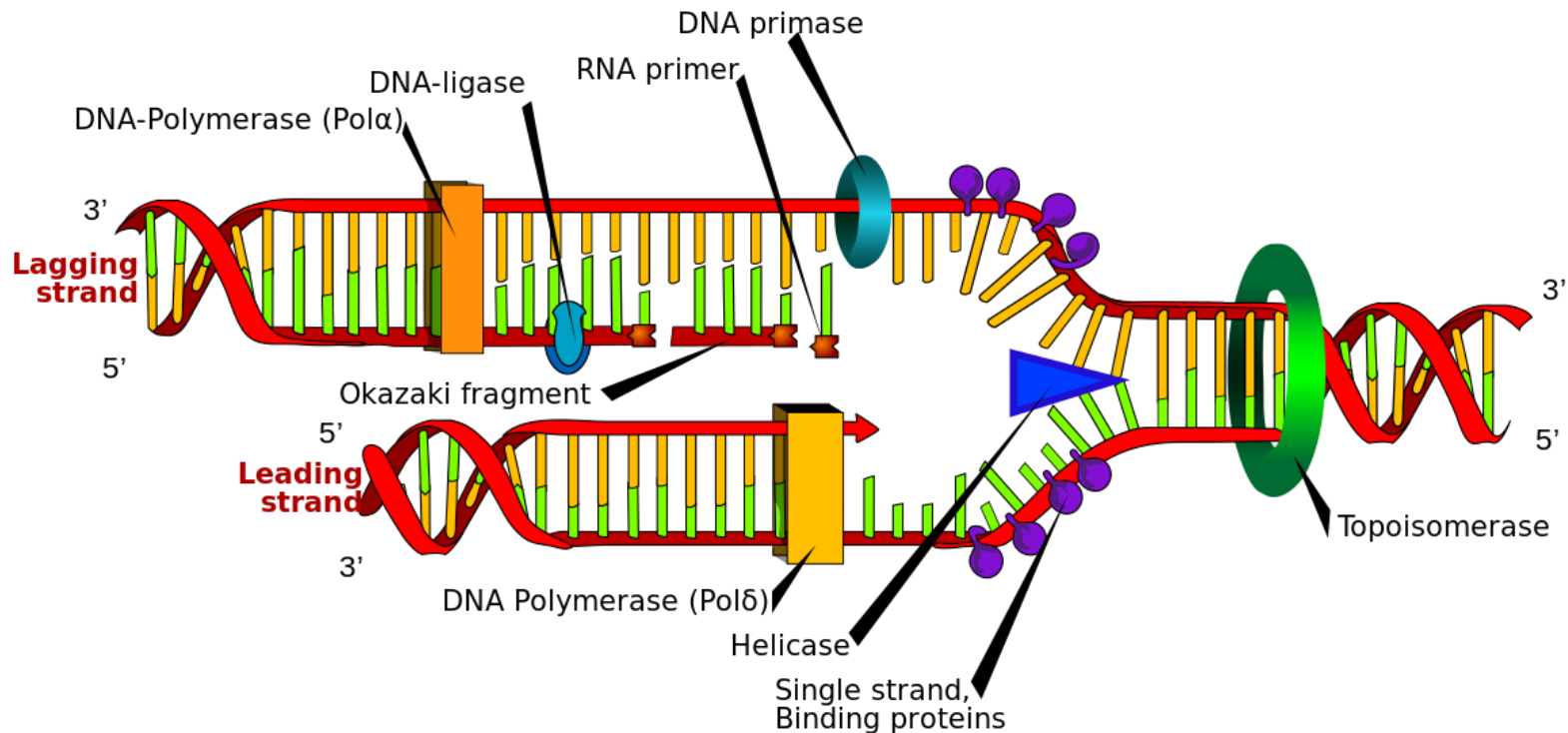
Replikace

10 000 replikačních počátků u člověka → rychlost



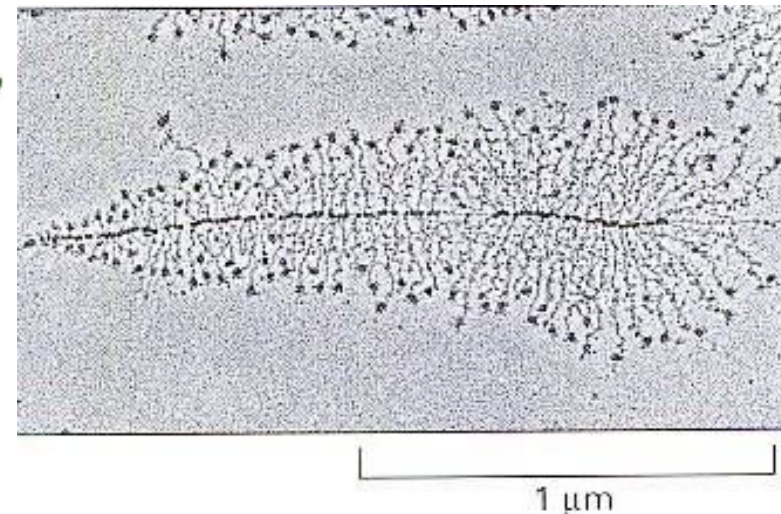
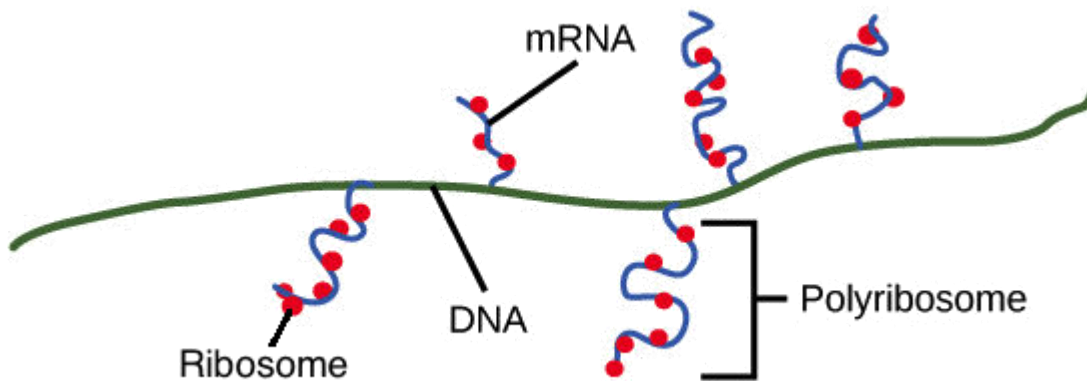
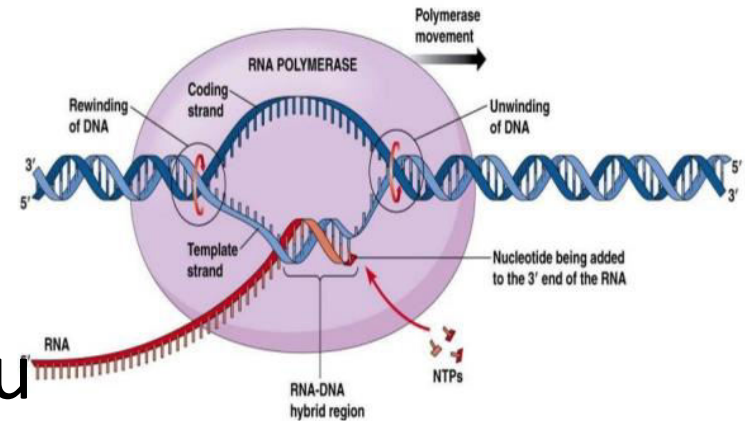
Replikace DNA

- **DNA polymeráza** (α , β , γ , δ) – připojuje nukleotidy na 3' konec řetězce – neumí začít od nuly – **primáza** (primery)
- u člověka cca 100 nukl/sec
- Leading a lagging strand, Okazakiho fragmenty
- https://www.ted.com/talks/drew_berry_animations_of_unspeakable_biology#t-181149



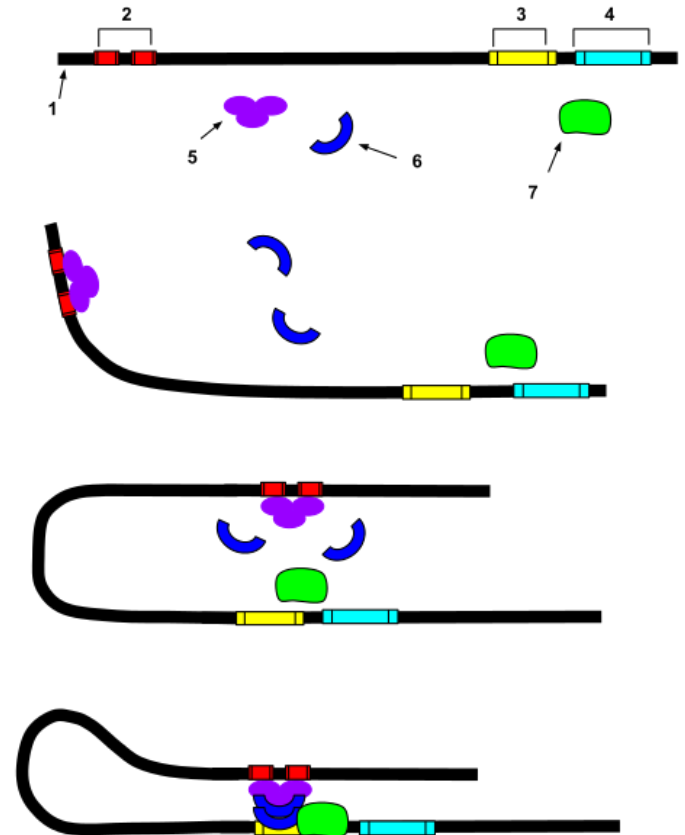
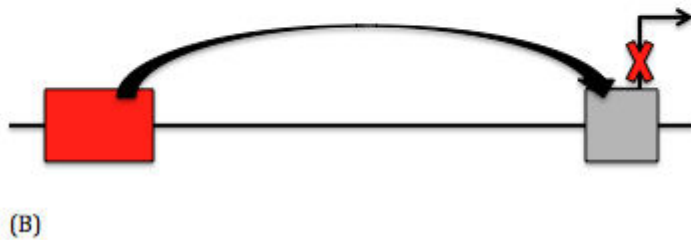
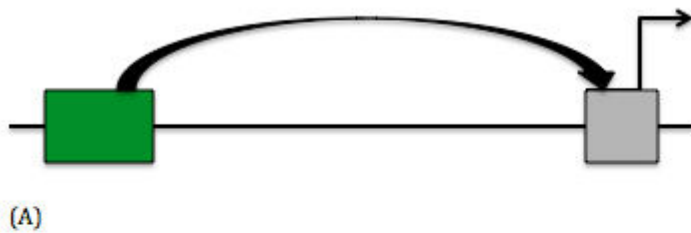
Transkripce

- Mnoho kopií mRNA najednou
- Vždy 5'-3' směr
- DNA dependentní RNA polymeráza



Regulace exprese

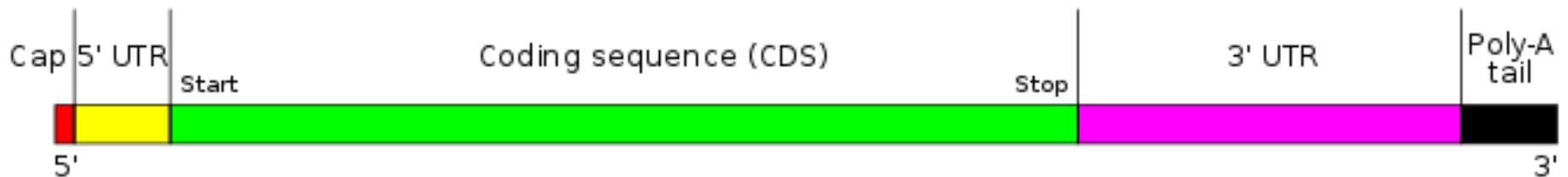
- Transkripce – **enhancery, silencery** – vazebná místa na DNA pro regulační proteiny (**transkripční faktory**)



Regulace exprese

- Posttranskripční úpravy mRNA
 - Methyl cap – stabilizace před exonukleázami
 - Polyadenylace – „potrava“ pro exonuklázy
 - exon-intron splicing, alternativní splicing, RNA editing

The structure of a typical human protein coding mRNA including the untranslated regions (UTRs)



Epigenetika - definice

- Vědní podobor genetiky, jenž studuje změny v genové expresi (a tedy obvykle i ve fenotypu), které **nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA**. Také epigenetické jevy mohou být děděny z buňky na buňku a z generace na generaci, tedy jak při mitóze, tak při meióze.
- Genom včetně epigenetických změn se označuje jako **epigenom**.

Epigenetika

- regulace exprese genů (ovlivňují přepis genetické informace do funkčních jednotek)
- Reverzibilní proces

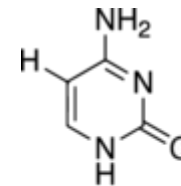
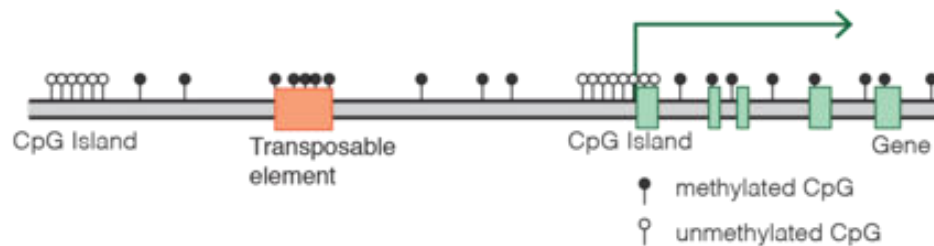
Dvě úrovně:

- **Pre-transkripční úroveň** (kovalentní modifikace)
 - Modifikace DNA
 - Modifikace histonů
- **Post-transkripční úroveň**
 - RNA interference (RNAi - miRNA, siRNA)
 - Editace RNA – výměna nukleotidů na úrovni mRNA

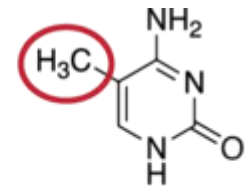
Modifikace DNA

- Methylace DNA –obvykle inhibice transkripce
- Methylace CpG míst – C-p-G dvojice
- DNMTs (DNA-metyl transferasy)

Typical mammalian DNA methylation landscape



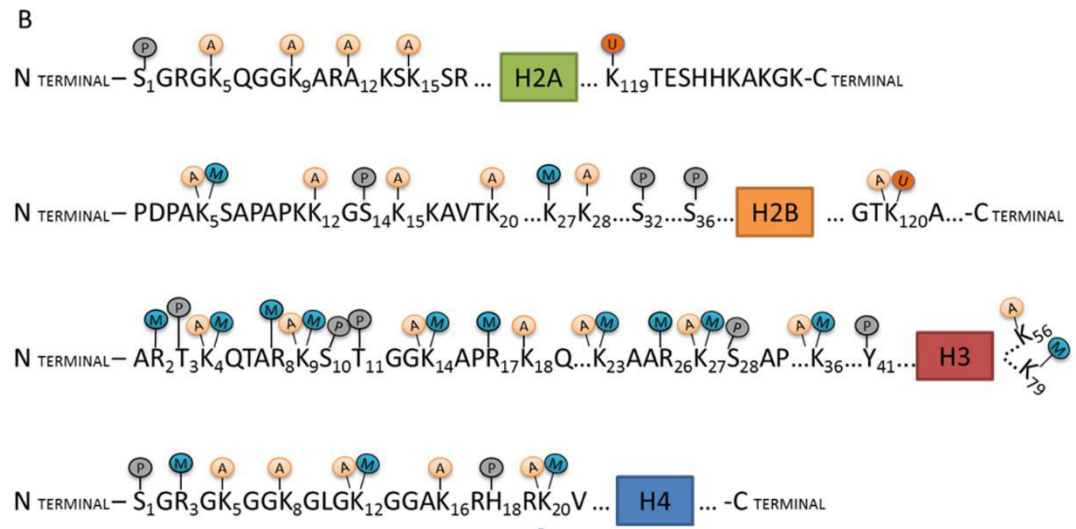
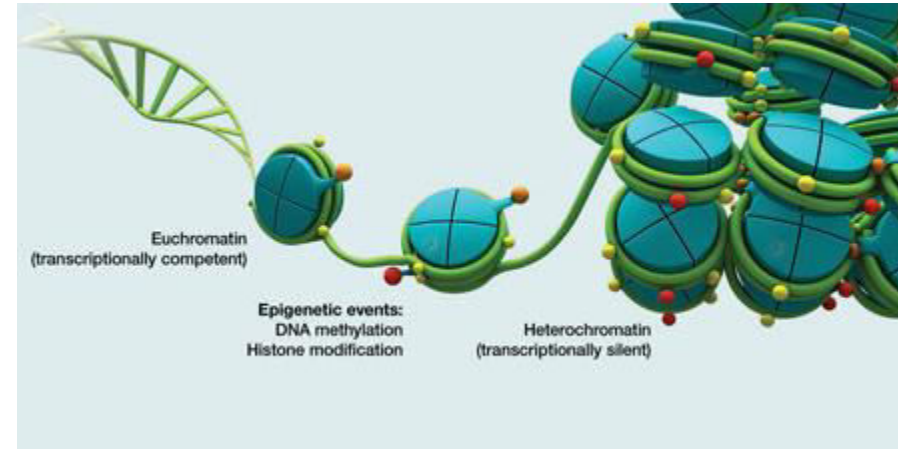
Cytosine



methylated Cytosine

Modifikace histonů

- Heterochromatin vs. Euchromatin
- –**Metylace** lysinu (–CH₃)
- –**Acetylace** lysinu (–COCH₃)
- –**Fosforylace** serinu a threoninu
- –**Ubiquitinilace** a **sumoylace** lysinu, ...

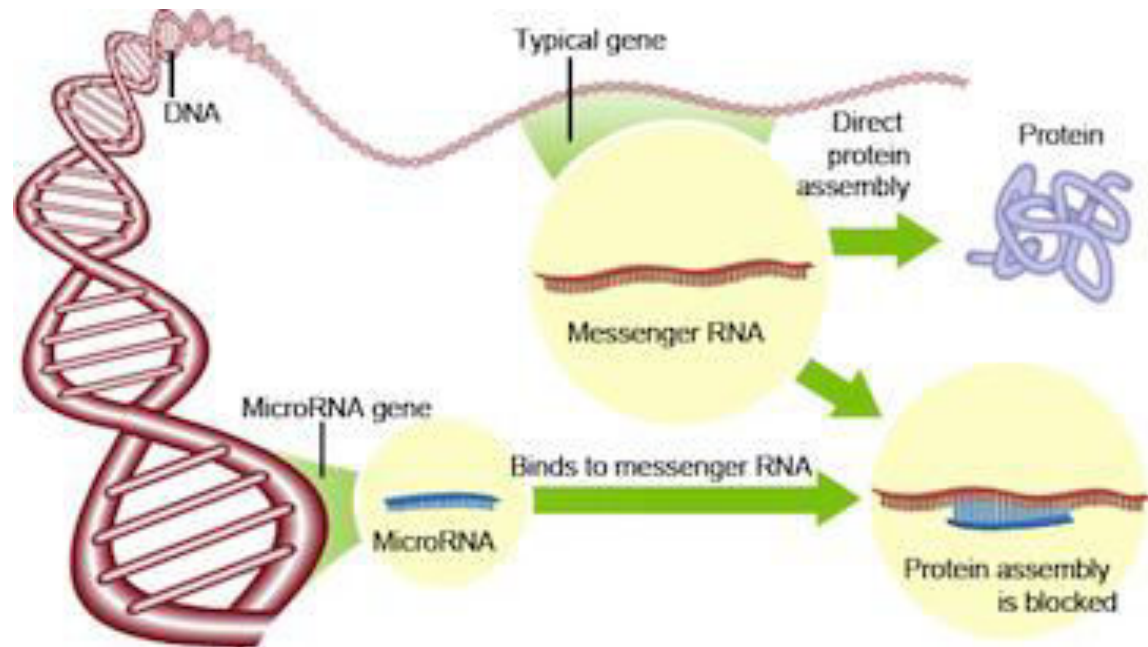


RNA interference

- 1998 – objev RNA interference (RNAi)
- 2006 – Nobelova cena za RNAi
- Krátké (cca 22 nt) endogenní jednovláknové molekuly RNA + RISC - RNA-induced silencing **complex**
- Zapojeny do řízení různých biologických procesů, jako např. proliferace, diferenciace, apoptóza
- Jejich deregulace bývá spojená s rozvojem mnoha onemocnění, např. kardiovaskulárních, imunodeficiency, nádorová onemocnění, diabetes.
- https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGB1_ELE

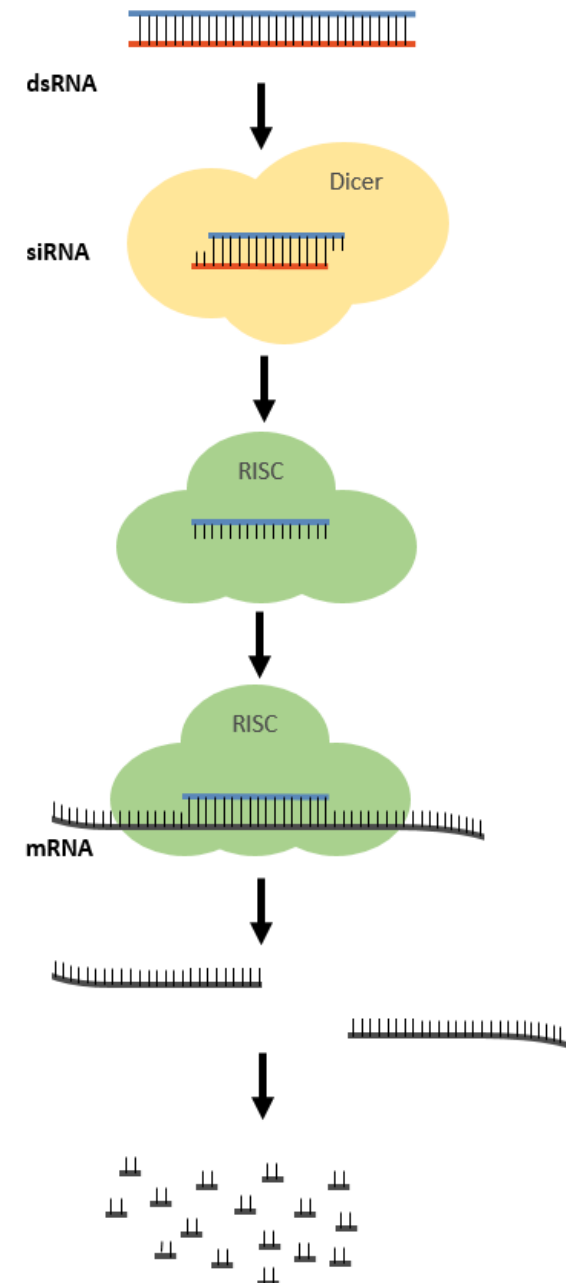
RNA interference - miRNA

- Inhibice translace, mRNA degradace
- částečně komplementární
- Jedna miRNA může cílit více mRNA, a tak se podílet na regulaci hladiny několika proteinů a naopak, jedna mRNA může být inhibována více miRNA molekulami

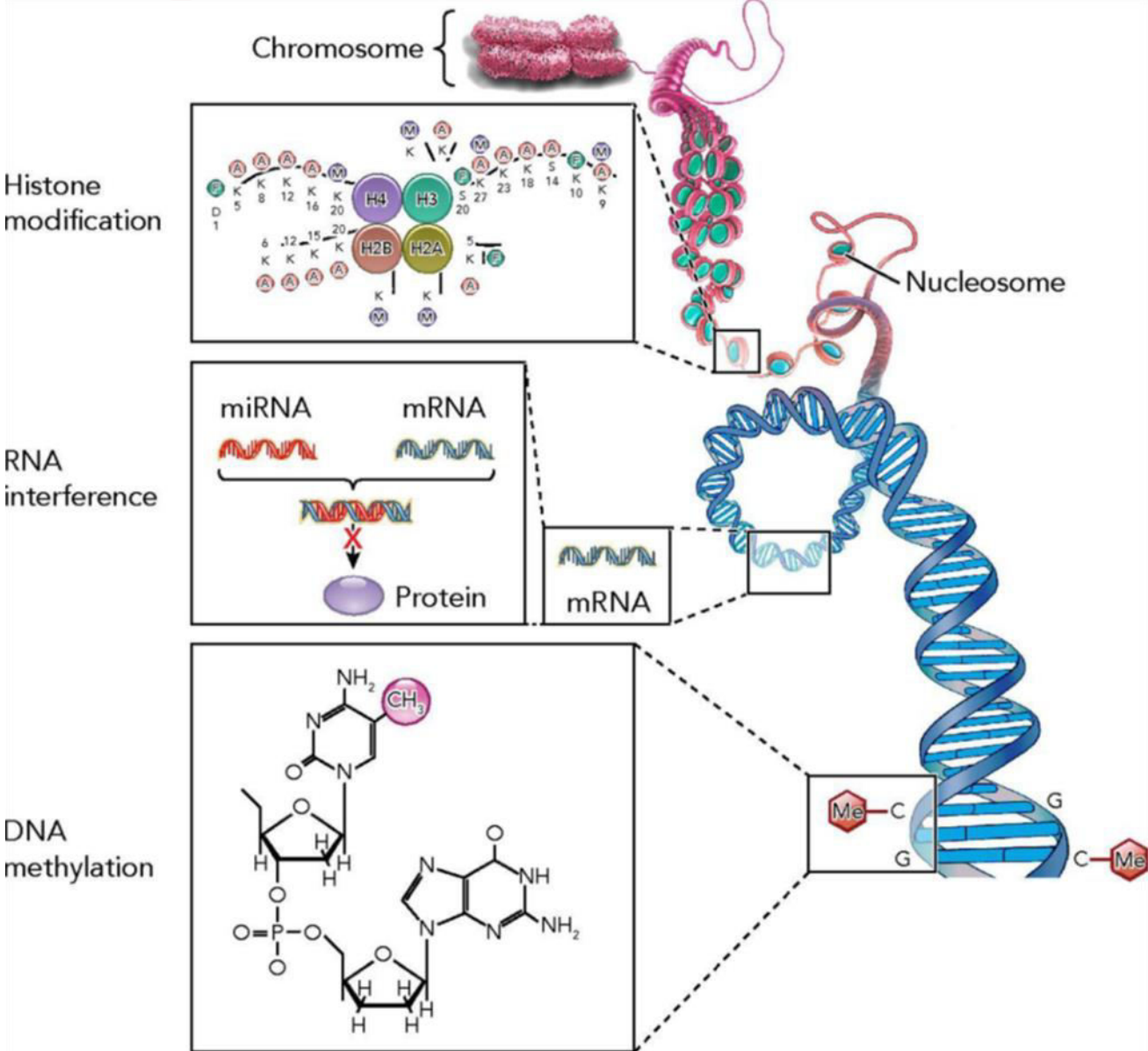


RNA interference - siRNA

- specifická pro 1 gen
- přesně komplementární
- RNA jde na rozštěpení



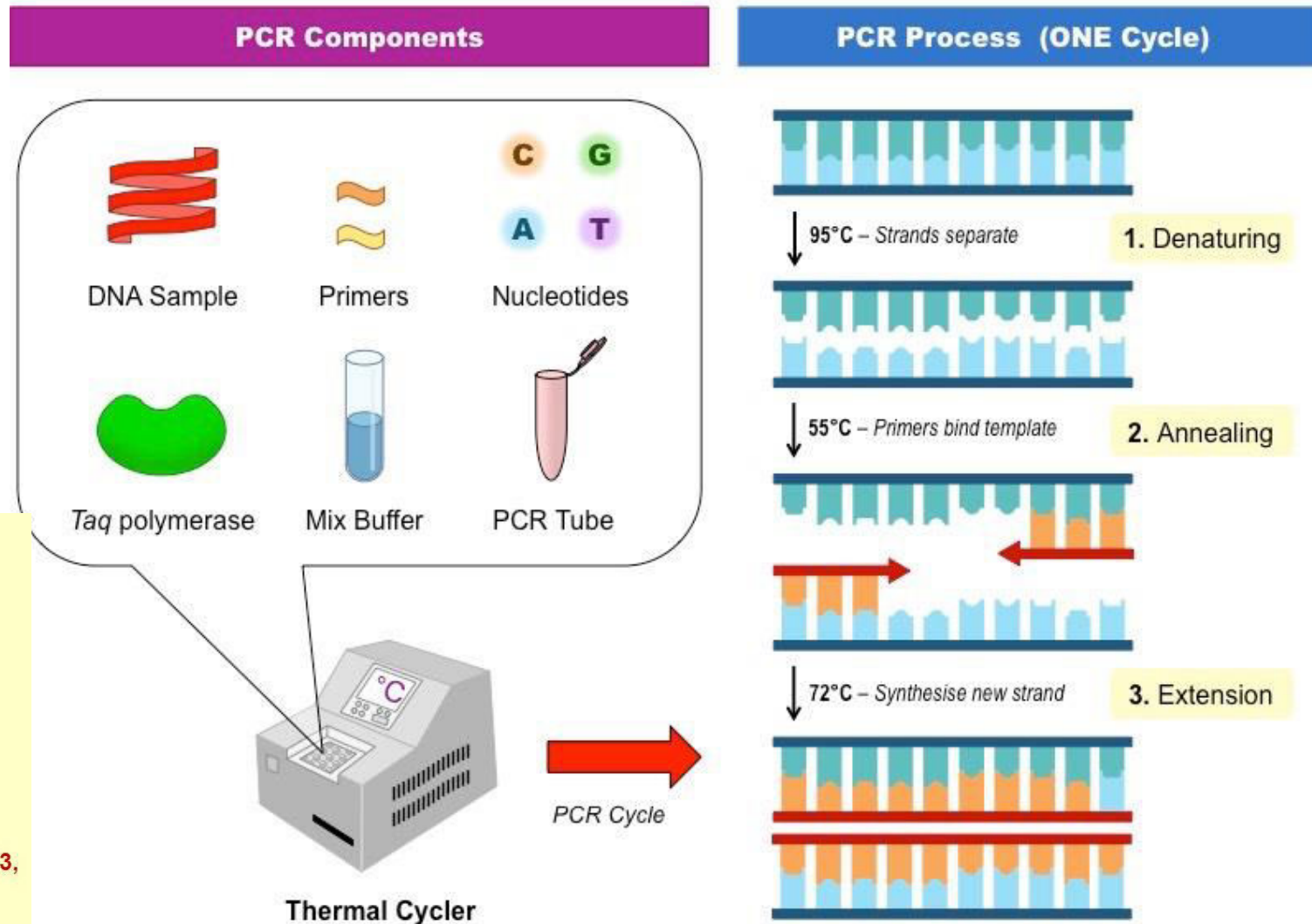
Epigenetická regulace



Metody založené na manipulaci s DNA

- základ molekulárního klonování
- PCR, restrikce, ligace, sekvenace

PCR – polymerase chain reaction



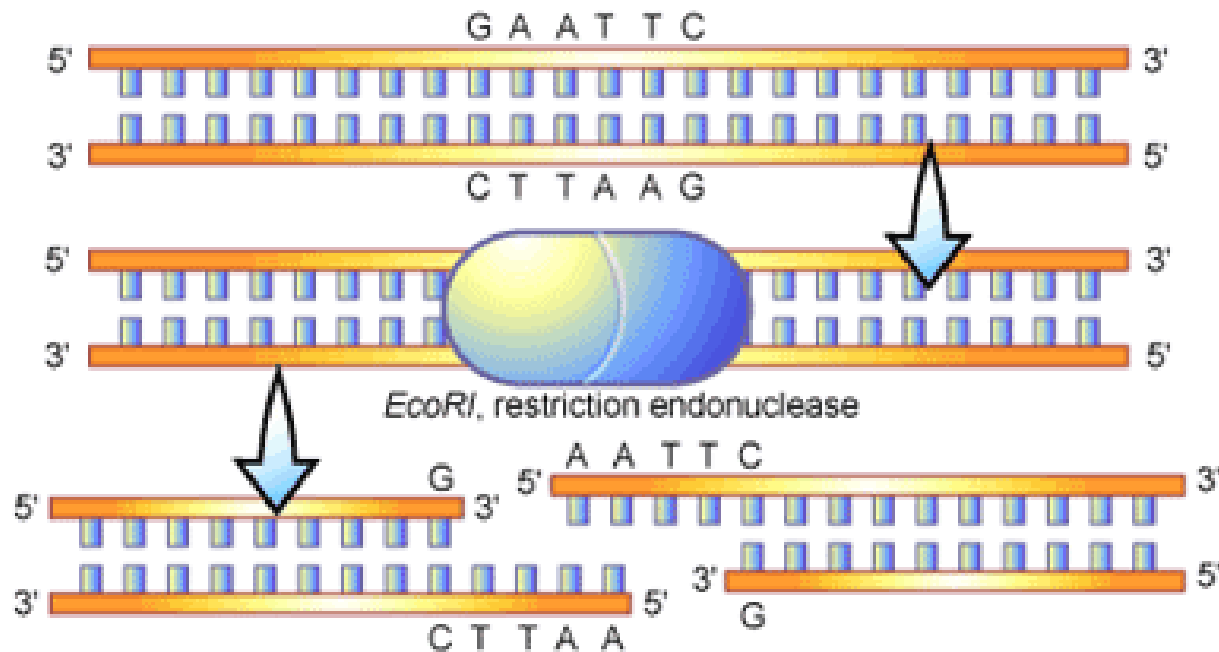
Nobel Prize in Chemistry 1993,
at age 48

Kary Mullis
(invented PCR in 1983)

Thermal Cycler

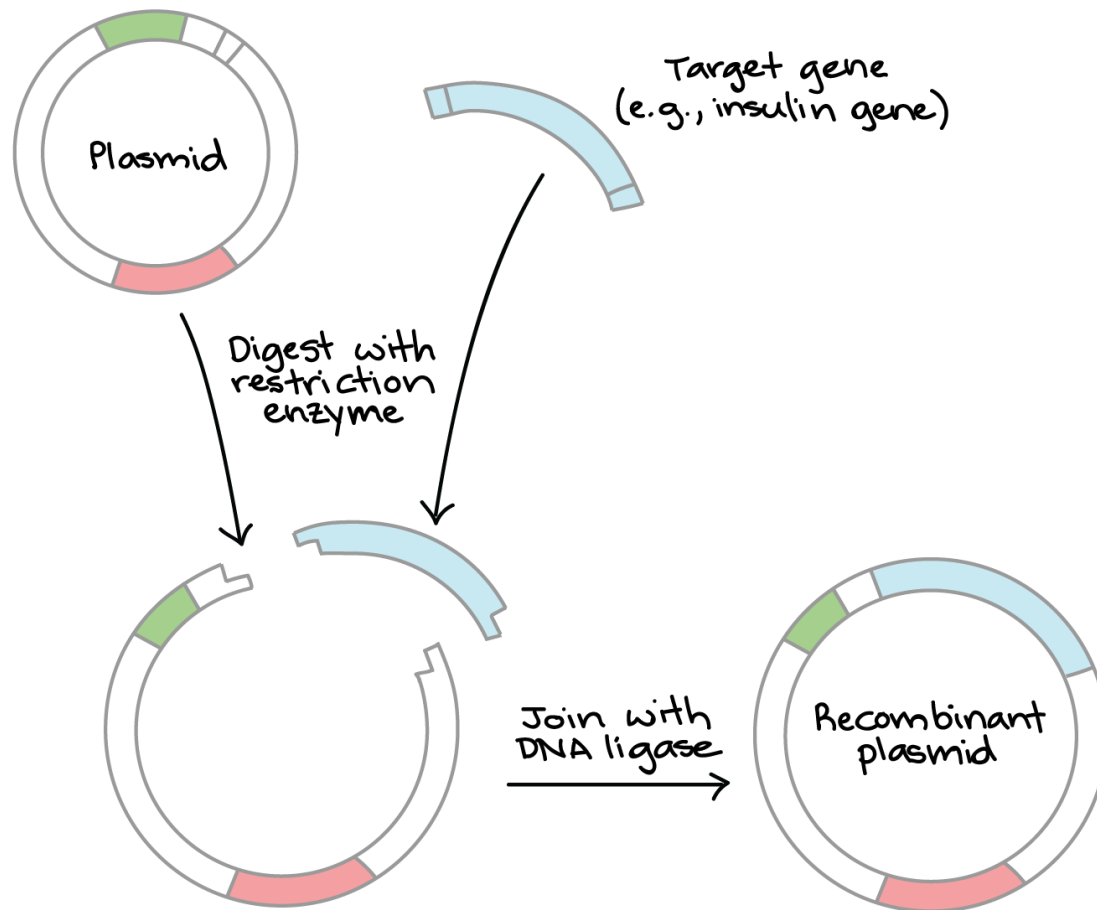
DNA restrikce

- restriční endonukleázy (restriktázy)
- izolované z bakterií, stovky v katalogu (EcoRI, ApaI, XbaI,...)
- specifické, palindromatické sekvence



Ligace

- restrikce + ligace = in vitro rekombinace
- rekombinantní proteiny



Sekvenace

- Frederick Sanger – Nobelova cena 1980
- NGS – next generation sequencing (mnoho krátkých sekvencí – nutné výkonné počítače)

