

The background of the slide is a microscopic image featuring several distinct cell types. In the upper left, there is a large, clear, irregularly shaped cell with a prominent purple nucleus and several smaller, light-colored organelles. Below and to the right of this cell are several smaller, spherical cells with a fuzzy, orange-brown surface. In the lower right, there is a larger, spherical cell with a dense, purple, fibrous surface. The overall background is dark with a bokeh effect of light blue and green circular spots.

**Genetika v ZL**  
**cvičení**  
jaro 2012

Mgr. Petra Linhartová  
peta.linhartova@gmail.com



# Doporučená literatura

- Vašků A., Izakovičová Hollá L., Gaillyová R.: **Genetika v zubním lékařství** (<http://www.med.muni.cz/patfyz/>)
- Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.: **Klinická genetika**. 2004.
- Šmarda J. a kol.: **Metody molekulární biologie**. Brno, 2005

## Požadavky na ukončení předmětu

- Aktivní účast na cvičení
- Protokol
- 60% úspěšnost v testu



# Obsah cvičení

## Teoretická část

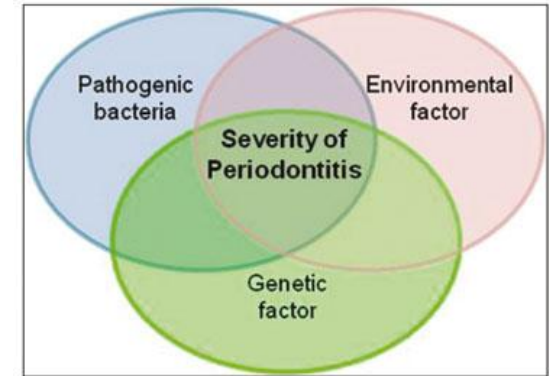
1. cvičení - význam DNA diagnostiky v patogenezi parodontitidy
2. cvičení - molekulárně genetické metody

## Praktická část

- Detekce polymorfismu v genu pro interleukin-1
1. cvičení - polymerázová řetězová reakce a restriční štěpení
  2. cvičení - elektroforéza na agarózovém gelu

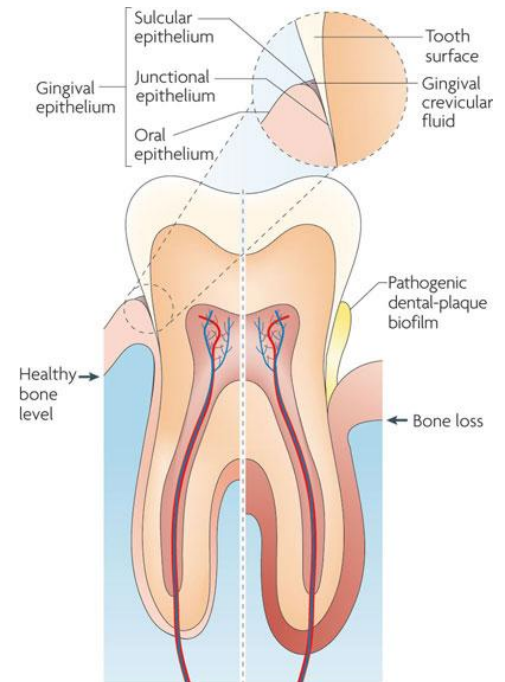
# Parodontitida

- destruktivní **zánětlivé** onemocnění postihující podpůrné tkáně zubů (ztráta závěsného aparátu, alveolární kosti, zubů)
- multifaktoriální choroba - faktory exogenní i endogenní



## Etiologie

- mikrobiální povlak - anaerobní *G*<sup>-</sup> bakterie (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia* aj.)
- poškození parodontu způsobeno:
  - **produkty bakterií** (např. toxiny, enzymy, LPS,...)
  - **látky vznikající během zánětu** (např. prozánětlivý  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\alpha, \beta, R$ )



# Parodontitida

## Kandidátní geny

- **Geny pro imunoregulační faktory** - interleukiny (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 a další)
- Metaloproteinasy (MMP1, MMP3, MMP9, MMP12 a další)
- Produkty kostní remodelace (VDR, RAGE, SFTPD a další)

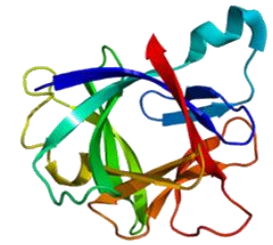


# Cytokiny

- široká škála signálních peptidů, některé mají i hormonální účinky
- slouží ke komunikaci nejen leu, ale i b. kostní dřeně endotelu a dalších...řídí proliferaci, diferenciaci a funkci buněk IS
- podílí na procesech zánětu a na neuronálním, krvetvorném a embryonálním vývoji organismu
- nejsou uloženy v žlázách (oproti hormonům), jsou rychle syntetizované a vylučované různými buňkami většinou po stimulaci
- jsou pleiotropní
- působení jiných cytokinů aditivním, synergickým nebo protichůdným způsobem



# Interleukin-1



- prozánětlivý mediátor - cytokin
- uvolňován monocyty, makrofágy, fibroblasty a dendritickými buňkami
- stimuluje resorpci kosti a reguluje proliferaci fibroblastů gingiválního i ligamentálního původu

## Biochemické parametry

- hladiny IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  (prozánětlivé cytokiny) a poměr IL-1 s antagonistou IL-receptory (protizánětlivý cytokin) -  $\uparrow$  u chorob parodontálních tkání

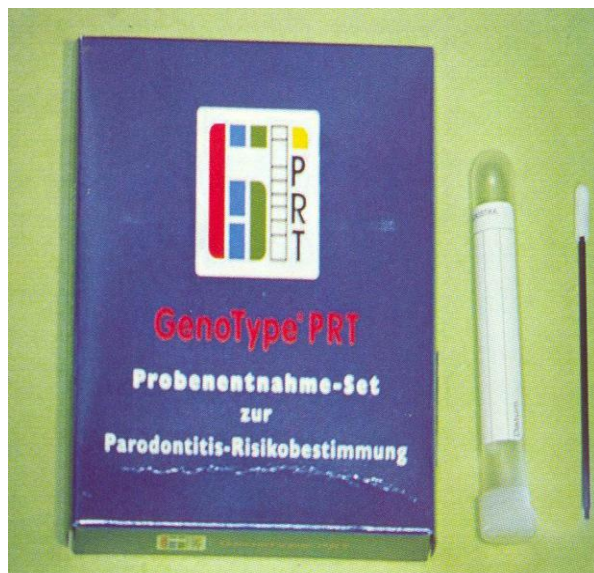
## Gen pro IL-1

- na chromozomu 2q13-q21
- recesivní alely IL-1A -889 a IL-1B +3953 -  $\uparrow$  genové transkripce a produkce proteinů ( $\uparrow$  prozánětlivá odpověď)
- recesivní alely IL-1RN VNTR -  $\downarrow$  genové transkripce...

# Komerčně dostupné testy

testují přítomnost:

- mikrobiálních patogenů
- specif. s parodontitidou asociovaného IL-1 genotypu



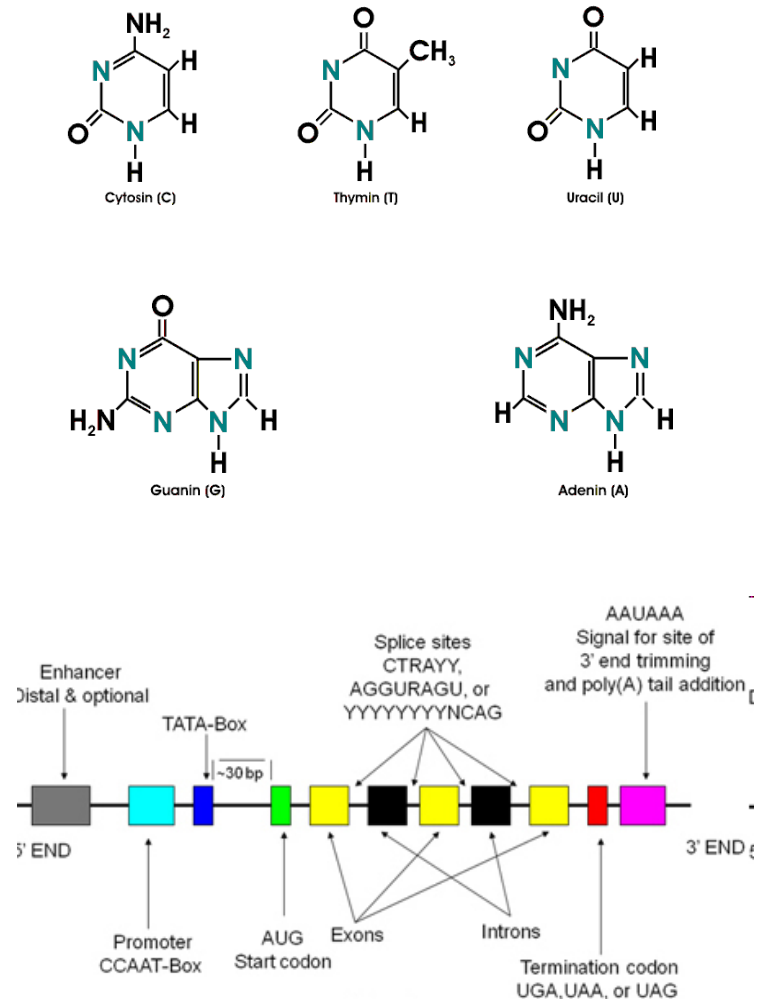
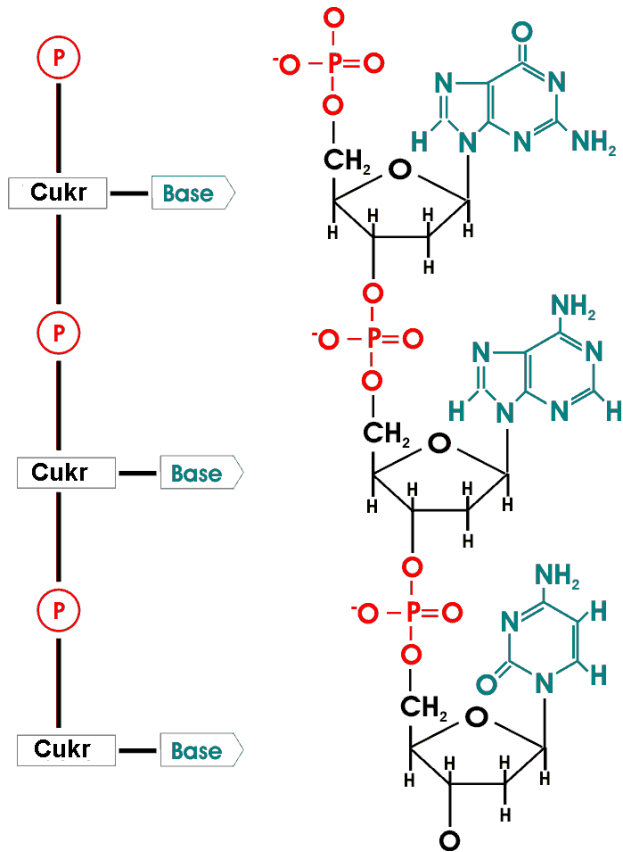
GenoType PST® test od  
HAIN Diagnostics™



GenoType™ PST test  
od Dentalyse™



# Základní pojmy





# Praktické cvičení

- Izolace DNA
- Polymerázová řetězová reakce (PCR)
- Restrikční analýza
- Elektroforéza (ELFO) na agarózovém gelu

# Izolace DNA

## Vstupní materiál

- **periferní krev** (leu)
- **buňky bukální sliznice** (sliny, stěry)
- amniové buňky
- choriové klky
- buňky vlasových kořínků
- spermie
- epitelální buňky pokožky
- uvolněné buňky v tělních sekretech
- aj.



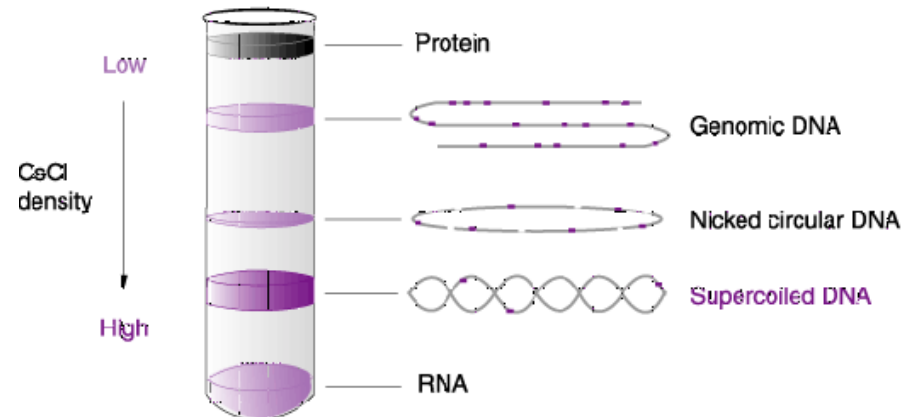
## Odběry

- bukální stěry - na kartáček, nechat vysušit 3 dny (kvasinky)
- sliny - 10 ml, hodinu před odběrem nejíst a nekouřit, skladovat 1 - 3 dny při teplotě 4°C
- periferní krev - odběr do chelatačního roztoku EDTA (zabránění srážení krve a degradaci DNA Dnázami), skladovat 1 - 5 dní při teplotě 4°C, nebo dlouhodobě v zamraženém stavu

# Izolace DNA

## Metody izolace DNA

- metody využívající rozdílnou rozpustnost biologického materiálu
  - fenol-chloroformová extrakce
  - ethanolová (isopropanolová) precipitace
- adsorpce na pevný podklad
  - vazba NK na křemičité sklo (silikát) v přítomnosti chaotropních solí (NaI, guanidin thiokyanát, guanidin hydrochlorid) - iontová síla, typ NA a pH
- vysolování - lýza ery  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , b. membr. - proteináza K, lýza jad. membr. a precipitace proteinů - NaCl, ethanol - vysrážení NA
- v hustotním gradientu
  - gradient CsCl



# Izolace DNA

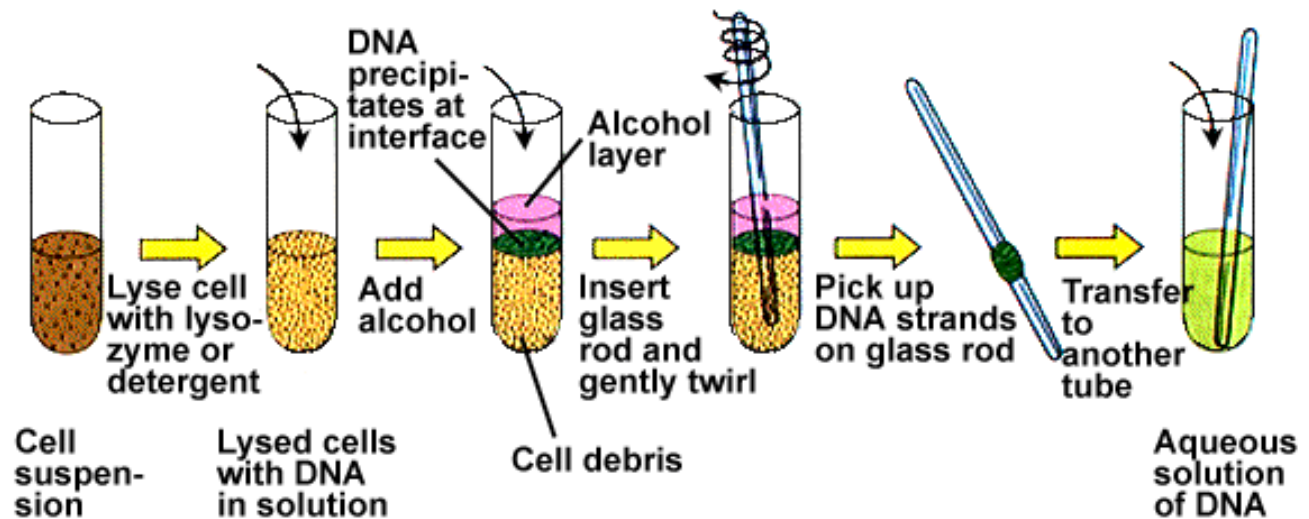
## Princip

- **lyze buněk** (rozrušení buněčných membrán) - tenzidy, lysozym, změna osmotického tlaku, změna pH, změna t
- **odstranění membránových lipidů a proteinů**
  - chemicky (detergenty)
    - chemicky (např. hydrolýzou bílkovin pomocí proteolytických enzymů ...proteináza K, jejich denaturací apod.)
    - vysolování (precipitace proteinů - NaCl)
  - fyzikálně (na základě různé afinity DNA a kontaminantů k různým látkám...**fenol-chloroformová extrakce**)
- **odstranění RNA** - přečišťovací enzymy (RNAázy)
- **precipitace DNA** - ethanol (isopropanol)
- **purifikace DNA** - 70% ethanol
- **rozpuštění DNA** - pufr (slabě alkalický)



# Izolace DNA

## Fenol-chloroformová extrakce



## Čistota a koncentrace DNA

- spektrofotometricky (např. na přístroji NanoDrop)
- NA absorbují UV záření s maximem absorpance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm
- stupeň čistoty NA se stanovuje z poměru absorpance při 260 a 280 nm (ideální poměr  $260/280 = 1,8$ )

# PCR



- popsal v r. 1983 Kary B. Mullis, 1993 NP
- princip: enzymatická amplifikace DNA *in vitro* syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích (denaturace, annealing, extenze)
- výsledek: počet kopií dané sekvence DNA-  $2^n$  (n-počet cyklů)
- komponenty reakční směsi pro PCR:
  - voda
  - pufr
  - dNTP (dATP+dTTP+dCTP+dGTP)
  - $MgCl_2$
  - termostabilní DNA polymeráza (např. Taq z bakterie *Thermus aquaticus*)
  - oligonukleotidové sondy ("primery") - specifická Ta
  - templátová DNA



# PCR

- teplotní režim (v termocycleru):
  - 1) 95°C 2' iniciální denaturace
  - 2) 96°C 30" denaturace
  - 3) 40-72°C 20" annealing
  - 4) 72°C 30" elongace
    - kroky 2 - 4 celkem 30x
  - 5) 72°C 5' závěrečná elongace
  - 6) 4°C 10' zchlazení

<http://www.youtube.com/watch?v=2KoLnIwoZKU&feature=related>





# PCR

## Modifikace

- Reverzně transkripční PCR
- Alelově specifická PCR
- PCR RFLP
- PCR VNTR
- Real-time PCR
  
- Nested PCR
  - nejprve amplifikace genomické DNA
  - v další PCR reakci je templátem produkt reakce předcházející
  - zvyšování specifity
  
- Multiplex PCR
  - detekce několika genů současně v jedné reakci
  - př. detekce deletovaných exonů u Duchennovy muskulární dystrofie



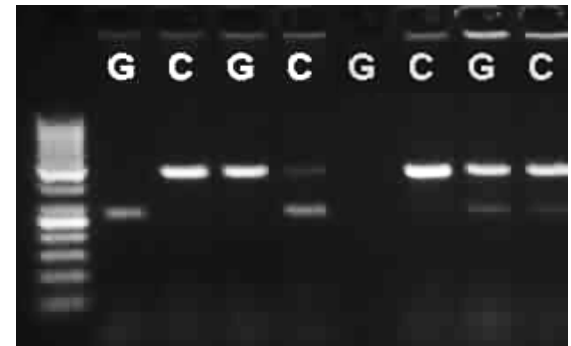
# PCR

## Reverzně transkripční PCR

- amplifikace RNA
- RNA-dependentní DNA-polymeráza
- eliminace intronů - poskytuje informace o alternativním sestřihu
- analýza genové exprese (detekce infekčních agens, genetických chorob)

## Alelově specifická PCR

- ve dvou nebo více paralelních reakcích
- detekce SNP



# PCR

PCR RFLP = analýza délky restrikčních fragmentů

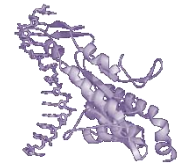
- analýza DNA pomocí specifického štěpení restrikčními endonukleázami (RE)

## RE

- enzymy bakterií vyvinuté během evoluce k štěpení cizí DNA
- název odvozen dle jejich původce - např. EcoRI (*E.coli*)
- rozpoznávací specif. oblast (palindrom)

5 -CCT G↓AATTC AGG-3

3 -GGA CTTAA↑G TCC-5



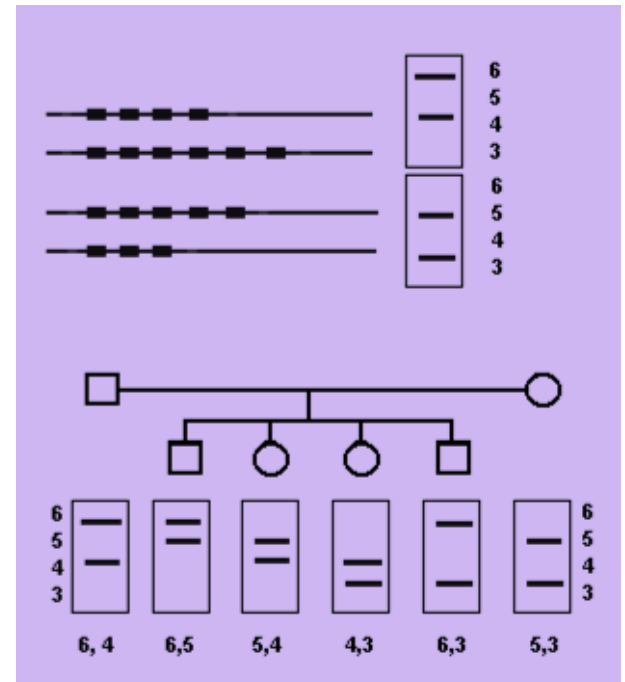
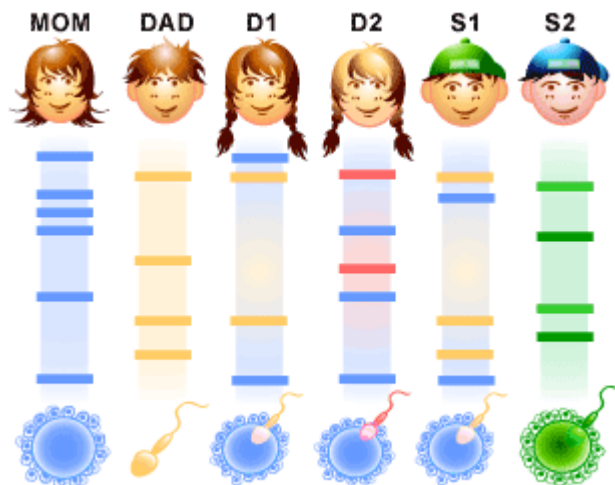
- štěpí vnitřní fosfodiesterové vazby
- schopny rozpoznat a štěpit JEN specifické sekvence (zamezení bakt. narušení vlastní DNA)
- mají specifickou teplotu, při které štěpení probíhá optimálně
- využití - při detekci určité mutace (SNP)



# PCR

## VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)

- minisatelitní sekvence, introny genů a mezigenové oblasti
- vysoký stupeň interindividuální variability
- polymorfní úsek DNA (lokus), který je vytvořen tandemovým uspořádáním mnohočetných kopií krátkých sekvencí DNA
- lokus má v populaci několik alel



# PCR

## Real-time

### DNA

- genotypizace (kvantifikace alel nebo SNP)
- určování druhů, SNP, kvantifikace (HRM = analýza tání s vysokým rozlišením)

### RNA

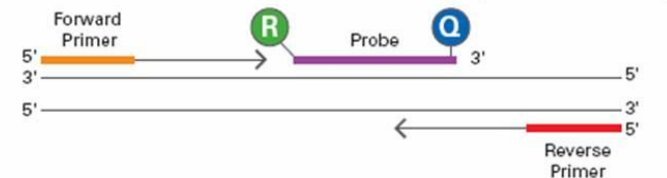
- kvantifikace transkriptu

### Interkalační fluorescenční barva (SybrGreen)

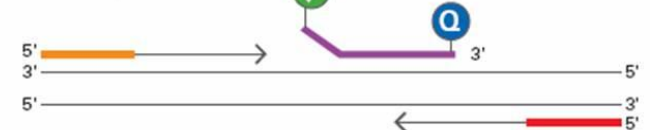
### Taqman sondy

- kromě primerů značený oligonukleotid - fluorescenční značka (R) a tzv. zhášecem (Q)
- fluorescenční látka v těsné blízkosti zhášecí - fluorescence potlačena
- DNA polymeráza při syntéze narazí na značený nukleotid - vytěsnění z templátového vlákna a štěpení (Taq polymeráza - 5'-exonukleasová aktivita)
- uvolnění fluorescenční sondy do roztoku
- měření fluorescence v průběhu amplifikace
- intenzita fluorescence je úměrná množství nasyntezovaného PCR produktu.

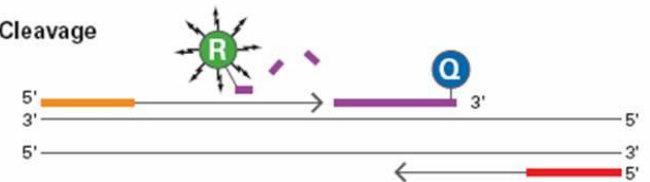
### Polymerization



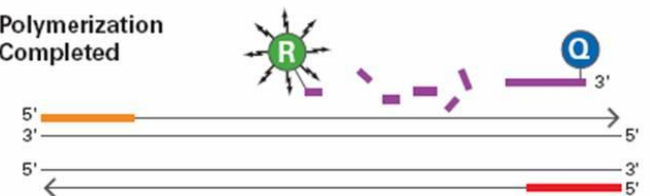
### Strand Displacement



### Cleavage



### Polymerization Completed





# PCR

## Základní výzkum

- izolace genů nebo jejich částí
- sekvencování DNA
- mutageneza in vitro
- modifikace konců DNA
- analýza (selekce) klonů z genových knihoven
- příprava značených sond

## Aplikovaný genetický výzkum

- prenatální diagnostika (dědičných chorob)
- detekce mutací v genech
- studium polymorfizmu genů (např. RAPD)
- populační genetika
- farmakogenomika

# PCR

## Využití v klinických disciplínách

- detekce patogenních MO
- (baktérií, virů, prvoků, hub)
- identifikace onkogenů
- typizace nádorů
- stanovení pohlaví

## Využití v praxi

- archeologie
- soudnictví
- kriminalistika - VNTR
- určování paternity





# Detekce polymorfismu v genu pro interleukin-1

Detekce SNP rs1143634 IL-1 $\beta$  +3953C/T

## PCR - postup

- 1) popsat mikroskopické zkušební nádoby
- 2) rozmrazit a promíchat chemikálie, Taq polymerázu udržovat v chladu
- 3) připravit MasterMix (viz. rozpis), protřepat, centrifugovat zkušební nádoby, rozpipetovat MM do mikroskopických zkušebních nádobek
- 4) rozpipetovat DNA do mikroskopických zkušebních nádobek
- 5) zakápnout minerálním olejem
- 6) vložit mikroskopické zkušební nádoby do termocyklu
- 7) nastavit program v termocyklu a zapnout běh



# Detekce polymorfismu v genu pro interleukin-1

## PCR - reakční směs

Master Mix (MM)		
roztok	Množství v $\mu\text{l}$ na 1 vzorek	Množství v $\mu\text{l}$ na vzorků
PCR voda	12,5	
Pufr DYNEX	2,5	
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	4,0	
Primer forward IL-1 $\beta$	1,25	
Primer reverse IL-1 $\beta$	1,25	
dNTP	0,5	
Taq polymerasa (1 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	1,0	
23,0 $\mu\text{l}$ MM + 2,0 $\mu\text{l}$ <b>templátové DNA</b> (50 ng $\mu\text{l}^{-1}$ ) + 1 kapka minerálního oleje na 1 vzorek		

## Primery

IL-1BF CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA A - forward (Ta = 58,79°C)

IL-1BR GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG - reverse (Ta = 58,80°C)



# Detekce polymorfismu v genu pro interleukin-1

## PCR - průběh

- v termocykleru Sensoquest labcycler (Schoeller)

1. 95°C	5 minut	
2. 95°C	1 minuta	
3. 60°C	1 minuta	
4. 72°C	1 minuta	krok 2.- 4. - cyklus 35x
5. 72°C	7 minut	
6. 10°C	10 minut	



# Detekce polymorfismu v genu pro interleukin-1

## RA - postup

- 1) popsat mikrozkušavky
- 2) rozmrazit a promíchat chemikálie
- 3) připravit MasterMix (viz. rozpis), protřepat, centrifugovat zkumavky, rozpipetovat MM do mikrozkušavek
- 4) rozpipetovat amplikon do mikrozkušavek
- 5) zakápnout minerálním olejem
- 6) vložit mikrozkušavky do termostatu na 65°C a inkubovat min. 4 hodiny

# Detekce polymorfismu v genu pro interleukin-1

RA - reakční směs

Master Mix (MM)		
roztok	Množství v $\mu\text{l}$ na 1 vzorek	Množství v $\mu\text{l}$ na vzorků
RA voda	1,0	
Pufř pro TaqI	1,7	
Enzym TaqI	0,3	
3,0 $\mu\text{l}$ MM + 15,0 $\mu\text{l}$ <b>amplikonu</b> + 1 kapka minerálního oleje na 1 vzorek		

- enzym TaqI

5 -T↓CGA- 3

3 -AGC↑T- 5

Velikost produktů

- CC 99 bp + 77 bp
- CT 176 bp + 99 bp + 77 bp
- TT 176 bp

# SNP rs1143634 IL-1 $\beta$ +3953C/T

## Sekvence


TAGTGGAAAC TATTCTTAAA GAAGATCTTG ATGGCTACTG ACATTTGCAA  
CTCCCTCACT CTTTCTCAGG GGCCTTTCAC TTACATTGTC ACCAGAGGTT  
CGTAACCTCC CTGTGGGCTA GTGTTATGAC CATCACCATT TTACCTAAGT  
AGCTCTGTTG CTCGGCCACA GTGAGCAGTA ATAGACCTGA AGCTGGAACC  
CATGTCTAAT AGTGTCAGGT CCAGTGTTCT TAGCCACCCC ACTCCCAGCT  
TCATCCCTAC TGGTGTGTC ATCAGACTTT GACCGTATAT GCTCAGGTGT  
CCTCCAAGAA ATCAAA TTTT GCCGCCTCGC CTCACGAGGC CTGCCCTTCT  
GATTTTATAC CTAAACAACA TGTGCTCCAC ATTTCAGAAC CTATCTTCTT

## Y (C/T)

GACACATGGG ATAACGAGGC TTATGTGCAC GATGCACCTG TACGATCACT  
GAACTGCACG CTCGGGACT CACAGCAAAA AAGCTTGGTG ATGTCTGGTC  
CATATGAACT GAAAGCTCTC CACCTCCAGG GACAGGATAT GGAGCAACAA  
GGTAAATGGA AACATCCTGG TTTCCCTGCC TGGCCTCCTG GCAGCTTGCT  
AATTCTCCAT GTTTTAAACA AAGTAGAAAG TTAATTTAAG GCAAATGATC  
AACACAAGTG AAAAAAATA TAAAAAGGA ATATACAAAC TTTGGTCCTA  
GAAATGGCAC ATTTGATTGC ACTGGCCAGT GCATTTGTTA ACAGGAGTGT  
GACCCTGAGA AATTAGACGG CTCAAGCACT CCCAGGACCA TGTCCACCCA

IL-1BF CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA A

IL-1BR GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG



# Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study.

J Am Dent Assoc. 2006 Mar;137(3):322-9.

Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV.

## **BACKGROUND:**

The authors conducted a study to determine if salivary biomarkers specific for three aspects of periodontitis inflammation, collagen degradation and bone turnover correlate with clinical features of periodontal disease.

## **METHODS:**

The relationship between periodontal disease and the levels of interleukin-1 beta (IL-1beta), matrix metalloproteinase (MMP)-8, and osteoprotegerin (OPG) in whole saliva of 57 adults (28 "case" subjects with moderate-to-severe periodontal disease and 29 healthy control subjects) was examined in a case-control trial.

## **RESULTS:**

Mean levels of IL-1beta and MMP-8 in saliva were significantly higher in case subjects than in controls. Both analytes correlated with periodontal indexes, whereas, after adjustment for confounders, OPG did not. Elevated salivary levels of MMP-8 or IL-1beta (more than two standard deviations above the mean of the controls) significantly increased the risk of periodontal disease (odds ratios in the 11.3-15.4 range). Combined elevated salivary levels of MMP-8 and IL-1beta increased the risk of experiencing periodontal disease 45-fold, and elevations in all three biomarkers correlated with individual clinical parameters indicative of periodontal disease.

## **CONCLUSION:**

Salivary levels of MMP-8 and IL-1beta appear to serve as biomarkers of periodontitis.

## **CLINICAL IMPLICATIONS:**

Qualitative changes in the composition of salivary biomarkers could have significance in the diagnosis and treatment of periodontal disease.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>