



**Genetika
v zubním
lékařství
(25.2.2013)**

Petra Bořilová Linhartová
peta.linhartova@gmail.com

Trombofilie

Leidenská mutace – koagulační faktor V rs6025 G1691A, R506Q (arg→gln)

- v kavkazské populaci – v heterozygotní formě asi u 5% populace, směrem na sever výskyt roste (u Švédů až 7% populace), směrem na jih výskyt klesá (jižní Evropa jen 2-3%). U asiátů a černochů se vyskytuje jen vzácně.
- zvyšuje riziko žilní trombózy dle různých literárních zdrojů asi 3-7 krát

Mutace genu pro protrombin rs1799963 G20210A

- zvyšuje koncentrace protrombinu v plazmě a tím zvyšuje riziko trombózy asi 3 krát (uváděné rozmezí relativních rizik 2-8)
- v kavkazské populaci - v heterozygotní formě asi 2% populace. V některých oblastech je výskyt vyšší (4-5% u Italů, Řeků či v Izraeli), naopak u asiátů či černochů se vyskytuje vzácně
- v selektované populaci dospělých pacientů, kteří prodělali trombotickou příhodu, se vyskytuje v 5-6%. Riziko rekurence trombózy je u nich přes 20%.

Hyperhomocysteinemie - mutace enzymu metyltetrafolátreduktázy (MTHFR) rs1801133 C677T

- hladina homocysteinu stoupá s věkem
- u zdravých mladých dospělých do 40 let je prevalence mírné hyperhomocysteinemie (do 30 $\mu\text{mol/l}$) až 10%, u stejně starých pacientů s žilní trombózou pak 11-19%
- relativní riziko žilního tromboembolismu je zvýšeno 2-4 krát

Obsah přednášky

- Metody molekulární biologie
- Funkční genomika a proteomika
- Genová terapie a farmakogenomika

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.



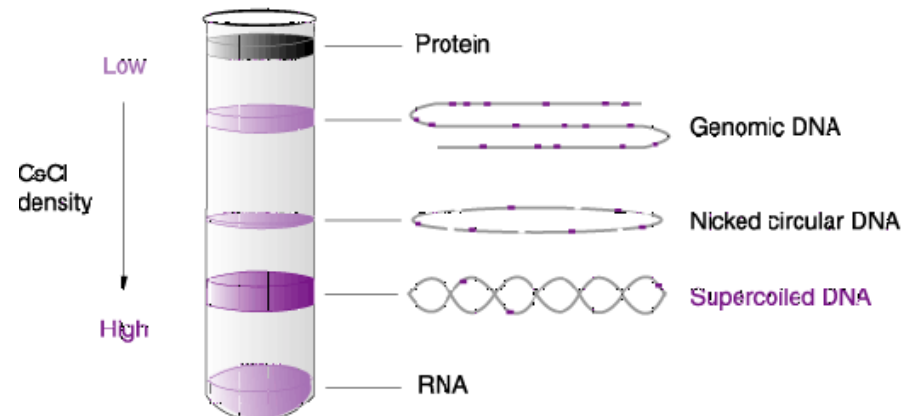
Odběry

- 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 NH_4Cl , b. membr. – proteináza K, lýza jad. membr. a precipitace proteinů – NaCl, ethanol – vysrážení NA
- v hustotním gradientu
 - gradient CsCl



Izolace DNA

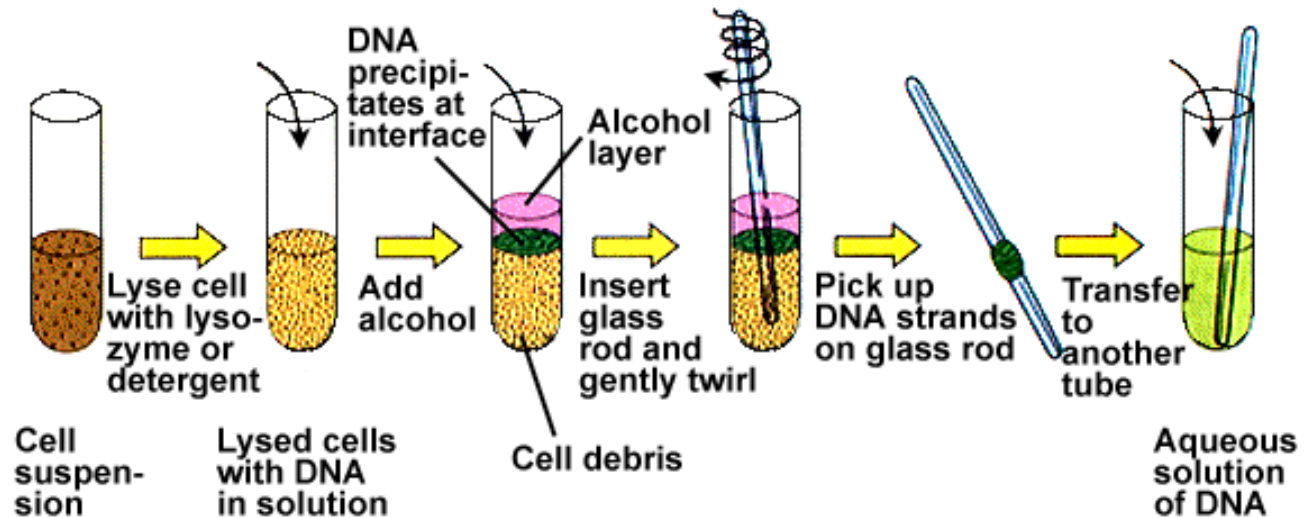
Princip

- **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 absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm
- stupeň čistoty NA se stanovuje z poměru absorbance 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+dGT)
 - $MgCl_2$
 - 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=2KoLnlwoZKU&feature=related>

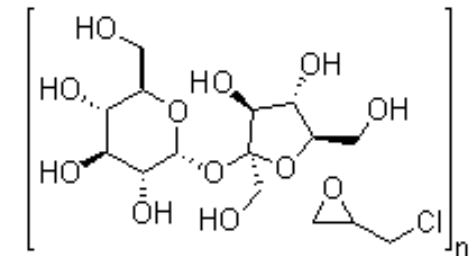
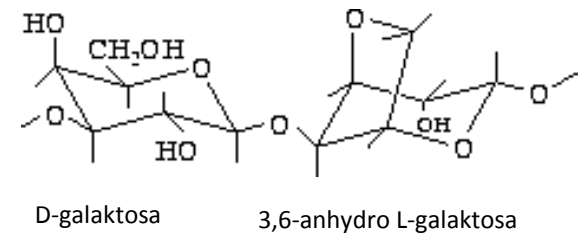


Elektroforéza

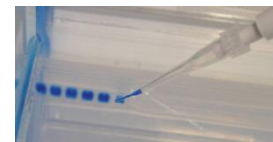
- separace NA v elektrickém poli v gelu (molekulární síto) na základě rozdílného náboje (amino či fosfátových skupin) a velikosti

- gel z agarózy (horizontálně)
- lineární polymer z řasy *Agar agar*

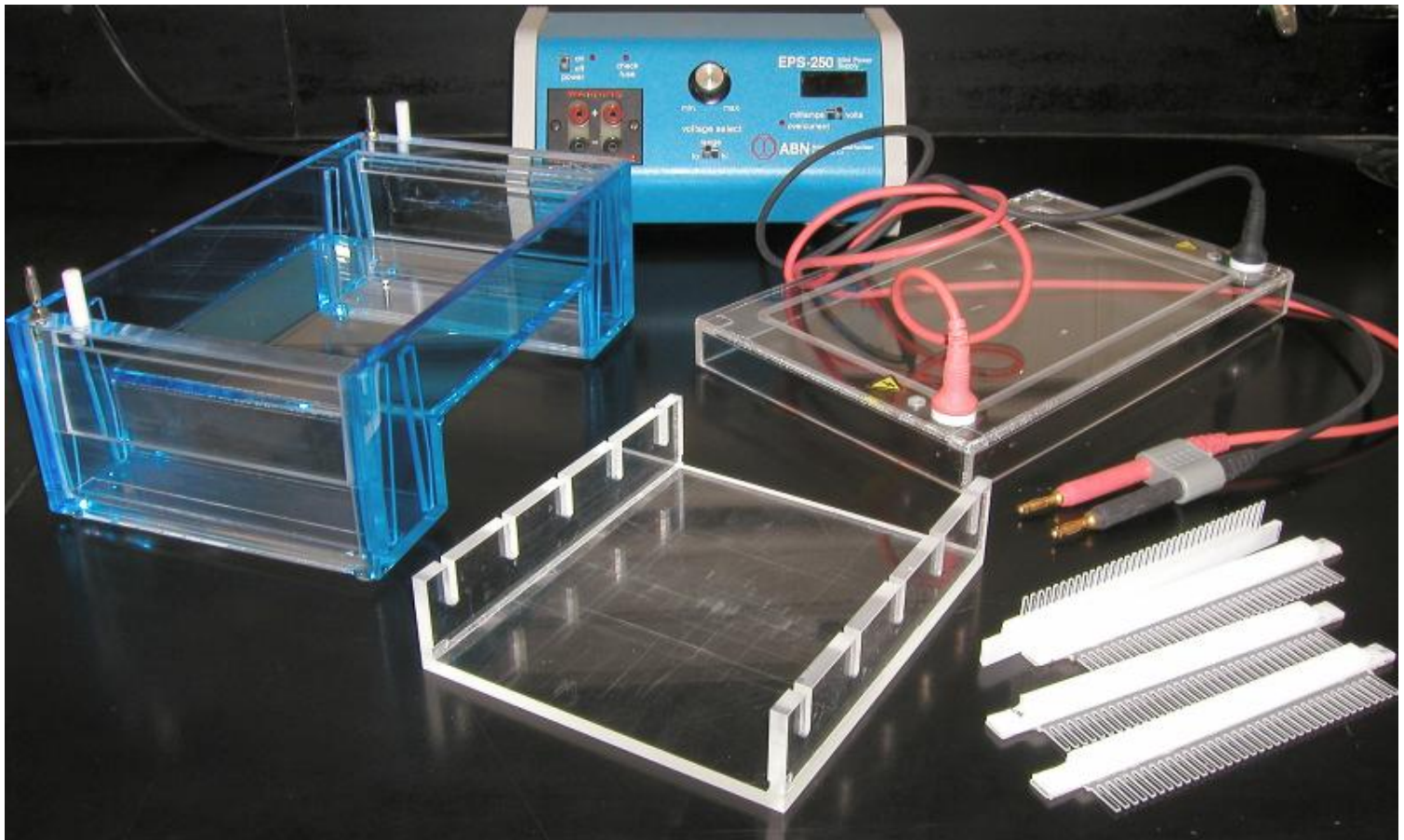
- elektroforetická pohyblivost vzorků je srovnána se standardy o známé velikosti
- Loading buffer – nanášecí pufr:
 - Ficoll - hustý, drží vzorek na dně
 - bromfenolová modř - vizualizace



Ficoll



Elektroforéza



Elektroforéza

- DNA nutno vizualizovat
- fluorescenční barviva x interkalační barvivo (EtBr - UV světlo 590nm, kancerogen, mutagen, teratogen!)

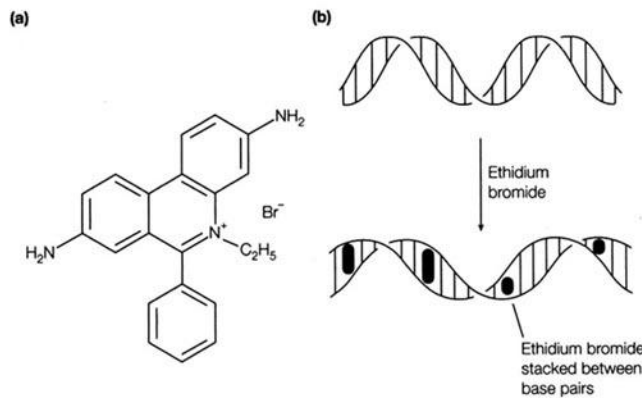
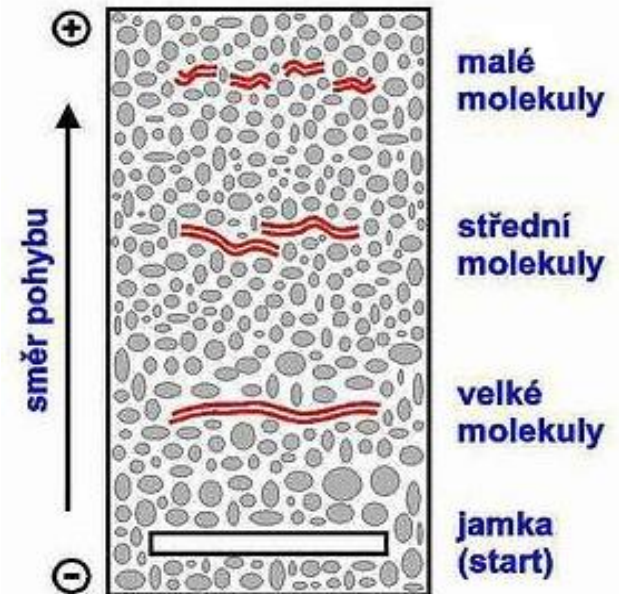


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.



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

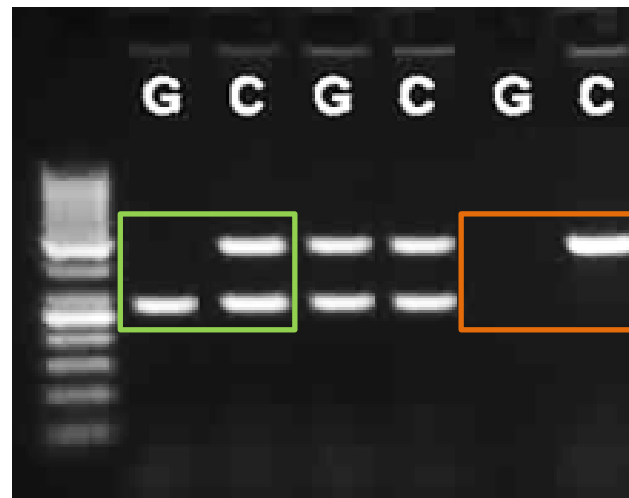
- Multiplex PCR
 - detekce několika genů současně v jedné reakci
 - př. detekce deletovaných exonů u Duchenyovy muskulární dystrofie

PCR

Alelově specifická PCR

- ve dvou nebo více paralelních reakcích
- detekce SNP

vzorek č. 1 2 3



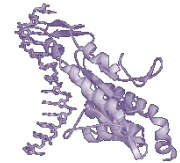
PCR

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)



- 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)

Minisatelity

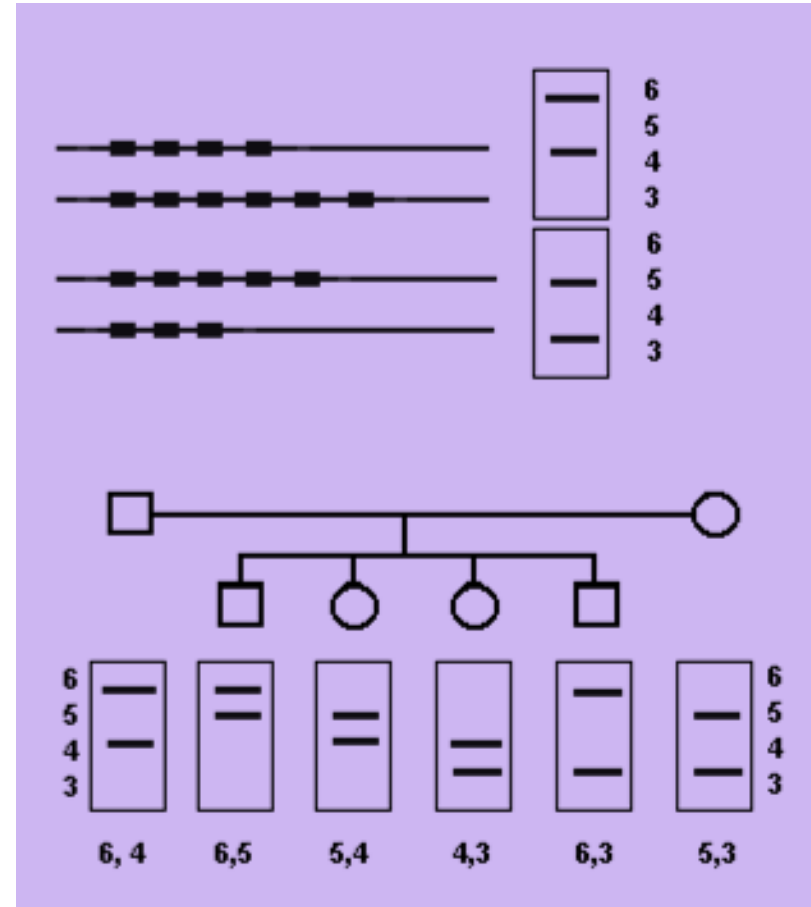
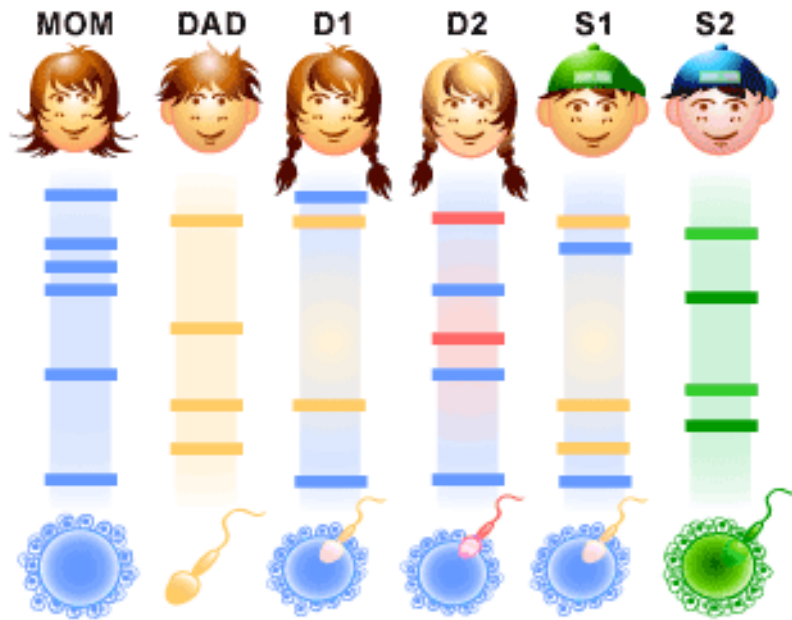
- polymorfní úsek DNA (lokus), který je vytvořen tandemovým uspořádáním mnohočetných kopií krátkých sekvencí DNA
- lokus má v populaci několik alel
- v rozsahu kilobází, které se více vyskytují v subtelomerických oblastech chromozomů, introny genů a mezigenové oblasti
- vysoký stupeň interindividuální variability

Mikrosatelity

- jsou zpravidla tvořeny opakováním 1-5 bp, s množstvím opakování zřídka překračujícím stovky
- nejčastější jsou dinukleotidové repetice, ze kterých převažuje typ (CA)_n
- jsou v genomu velice časté, vysoce polymorfní a jsou často používány jako genetické markery

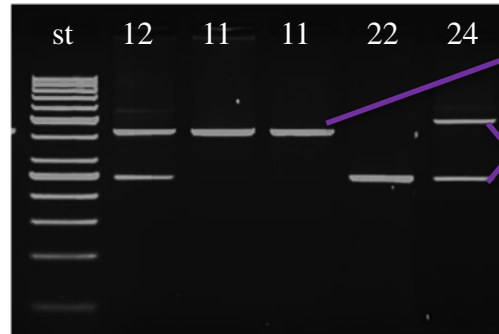
PCR

VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)



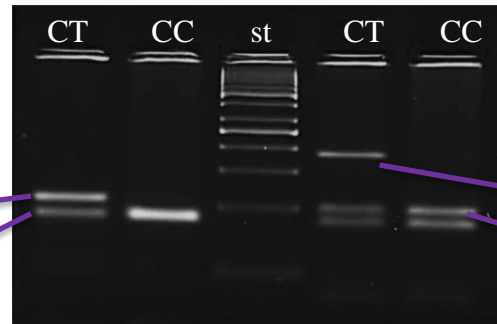
Výsledek genotypizace

PCR
IL-1RN
intron 2
86bp repetitive



1. 4 repetitive – 412bp
2. 2 repetitive – 240bp
3. 3 repetitive – 326bp
4. 5 repetitive – 498bp
5. 6 repetitive – 584bp

PCR
IL-1 α -889C/T
T 99bp
C 16bp + 83bp



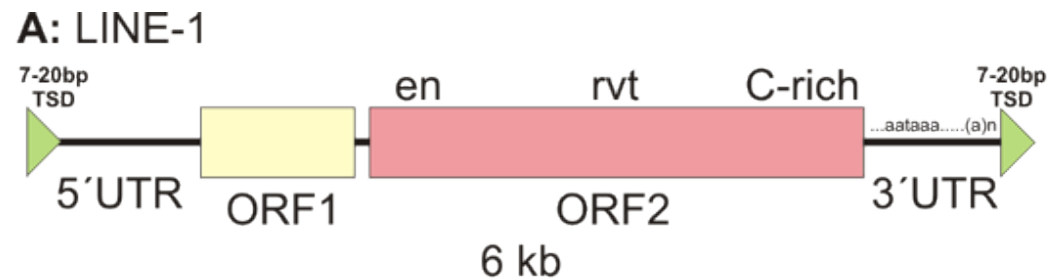
IL-1 β +3953C/T

exon 5

T 182bp +12bp

C 97bp + 85bp +12bp

Transpozony



Non-LTR retrotranspozony

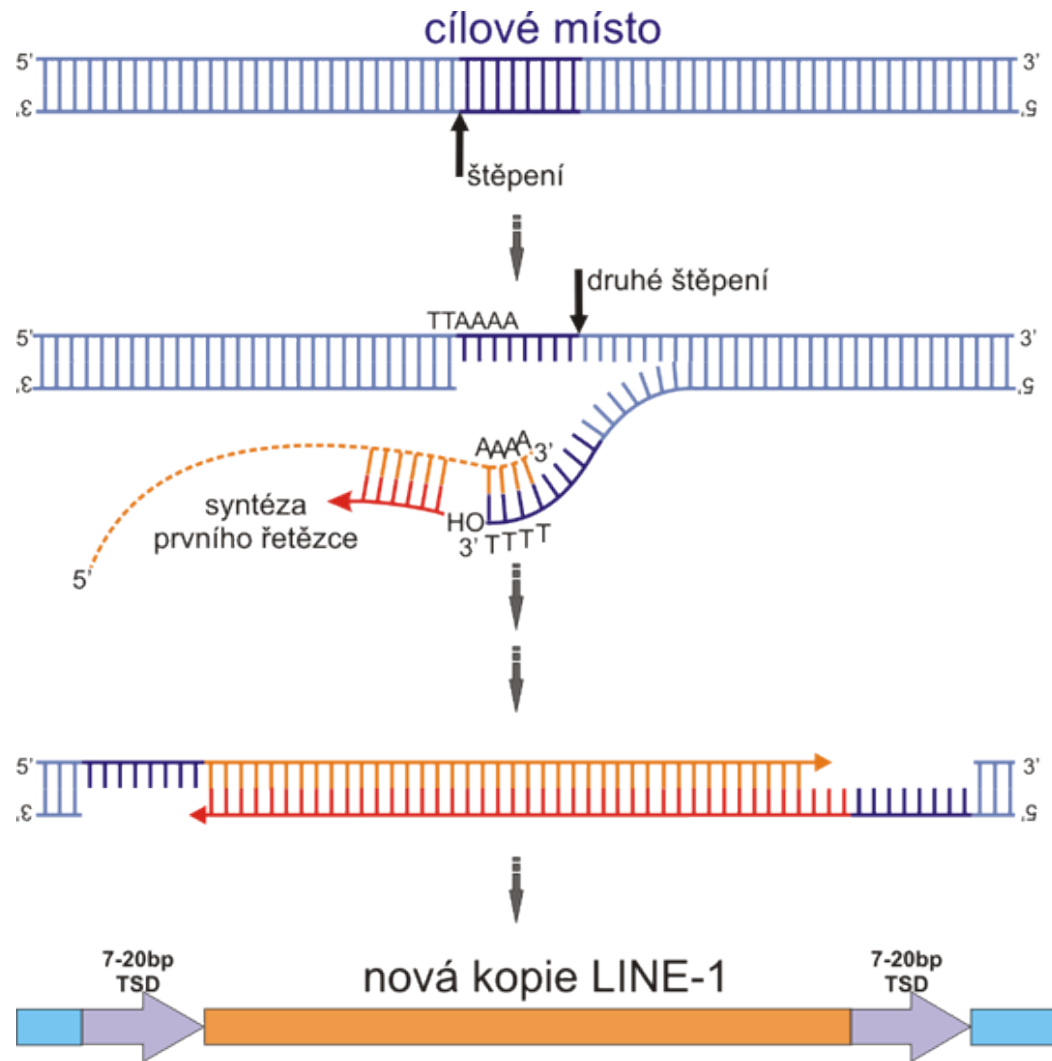
- LINE (long interspersed repeats, dlouhé rozptýlené repetice) jsou zastoupeny LINE-1 (L1)
- element dlouhý 6 kb obsahuje dva otevřené čtecí rámce
- ORF2 obsahuje doménu s endonukleázovou aktivitou (en), reverzní transkriptázovou aktivitou (rvt) a také doménu bohatou cysteinem (C-rich)
- 5' nepřekládaná oblast (5'UTR) obsahuje interní promotor pro RNA polymerázu II (u obvyklého genu je promotor před 5'UTR)
- 3' nepřekládaná oblast obsahuje kanonický polyadenylační signál (AATAAA) a polyA konec (ten se také v genech normálně nevyskytuje, přidává se až k mRNA prostřednictvím polyA polymerázy)
- L1 je obklopen duplikací cílového místa která vzniká během reverzní transkripce

PCR

Reverzně transkripční PCR

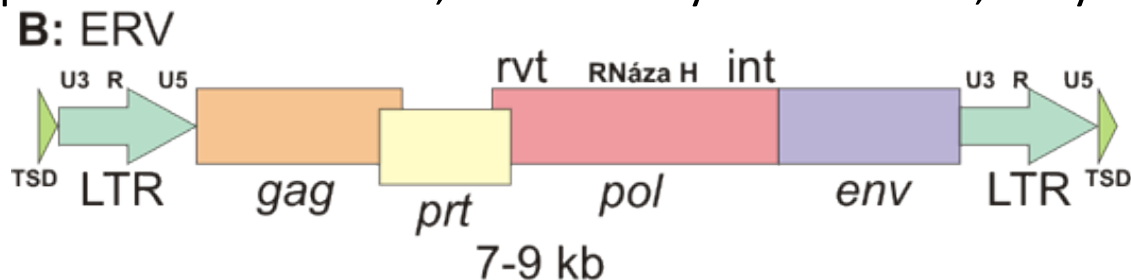
- amplifikace RNA
- RNA-dependentní DNA-polymeráza
- eliminace intronů – poskytuje informace o alternativním sestřihu
- analýza genové exprese (detekce infekčních agens, genetických chorob)

PCR



LTR-retrotranspozon (long terminal repeats, dlouhé terminální repetice)

- endogenní retrovirus
- typická struktura retroviru, resp. proviru, tj. formy integrované do DNA
- endogenní retroviry mohou být na úrovni sekvence odlišeny od infekčních na základě bodových mutací nebo delecí v genech nezbytných pro sestavení infekčních částic
- většinou je to gen env (envelope = obal), gag (group specific antigen = skupinově specifický antigen) je protein nukleokapsidy, pol (polymeráza) má aktivitu reverzní transkriptázy (rvt) pro syntézu prvního a druhého řetězce DNA, aktivitu RNázy H pro štěpení RNA v hybridu RNA/DNA po syntéze prvního řetězce a aktivitu integrázy (int) (štěpí cílovou DNA a liguje retrovirus do tohoto místa), prt (proteáza) je nezbytná pro sestavování virové částice tím, že štěpí proteinové prekurzory (např. gag a pol jsou často syntetizovány jako jeden velký polyprotein)
- LTR jsou identické sekvence na obou koncích retroviru
- LTR je složen z U3 (3' nepřekládaná oblast), R (oblast rekombinace) a U5 (5' nepřekládaná oblast). Názvy jsou odvozeny od struktury retrovirové mRNA, která je tvořena sekvencí pouze od 5' R do 3' R
- reverzní transkripce retrovirů se odehrává v cytoplazmě a teoreticky tedy nepotřebuje duplikaci cílového místa, tato se obvykle také tvoří, i když kratší než u L1

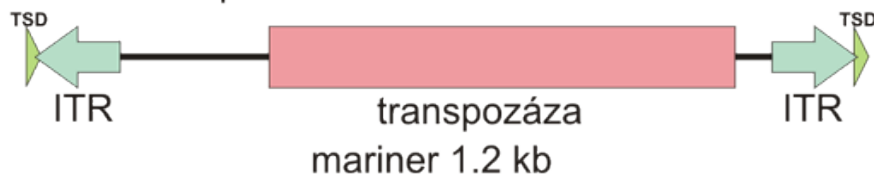


Transpozony

DNA-transpozon

- je reprezentován 1,2 kb dlouhou rodinou "mariner" (námořník)
- synthetický DNA transpozon Sleeping Beauty (Šípková Růženka) také patří do této rodiny
- centrálně uložený gen pro transponázu je obklopen invertovanými repetitivy
- při integraci se vytváří duplikace cílového místa, která je zanechána v genomu jako stopa po integraci, když transpozon přeskočí na jiné místo

C: DNA transpozon

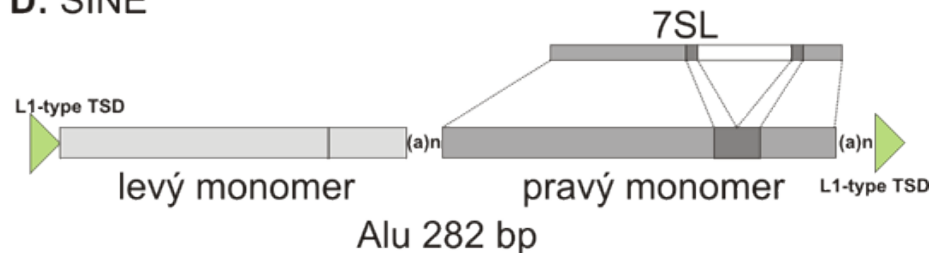


Transpozony

neautonomní nonLTR retrotranspozony patří k **SINE** (short interspersed repeat, krátká rozptýlená repetice)

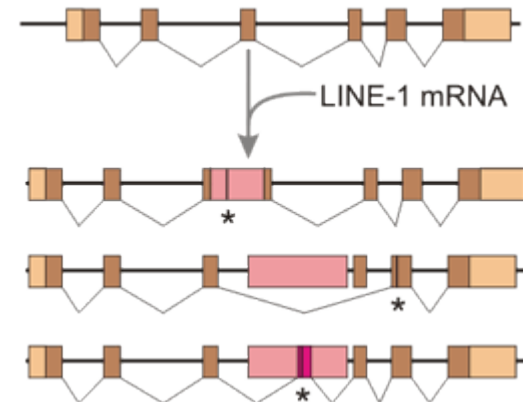
- rodina aktivní u lidí je reprezentována 282 bp dlouhým Alu elementem
- Alu je dimerem složeným z dvou téměř shodných monomerů
- monomer je odvozen od 7SL RNA, což je RNA podjednotka SRP (signal recognising particle = částice rozpoznávající signál)
- SRP je komplex rozpoznávající signální peptid proteinů, které mají být transportovány do lumen a nebo membrány ER
- oblast polyA není částí 7SL genu, ale je důležitá pro "úspěch" Alu jako retrotranspozonu

D: SINE



Transpozony

- nemají žádnou důležitou funkci v buňce
- odpadní DNA (junk DNA); nebo o sobecké DNA, transpozony se propagují na úkor buněčných energetických zdrojů
- mobilita retrotranspozonů být ale důležitá pro plasticitu genomu
- příležitostná inserce do genu může vyřadit gen z funkce a způsobit dědičné onemocnění (Alu a L1 elementy)



- LTR a LINE elementy mohou také měnit genovou expresi, pokud se inserují do blízkosti nějakého genu, neboť LTR a LINE 5'UTR mají silnou promotorovou aktivitu v obou směrech

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

PCR

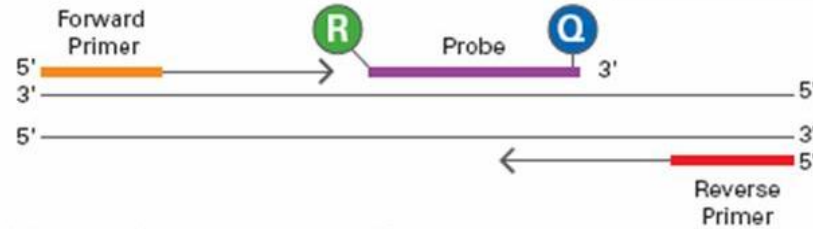
Real-time - postup

- kromě primerů značený oligonukleotid -fluorescenční značka (R) a tzv. zhášedčem (Q)
- fluorescenční látka v těsné blízkosti zhášedče - 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

PCR

Polymerization

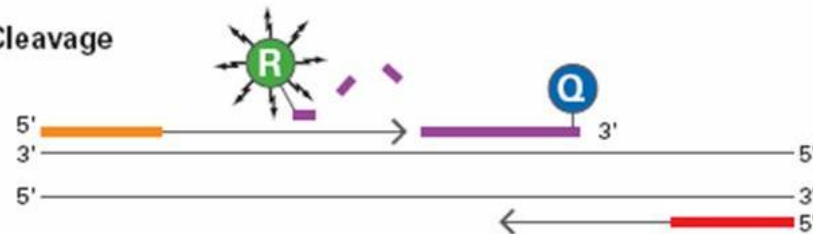
R = Reporter
Q = Quencher



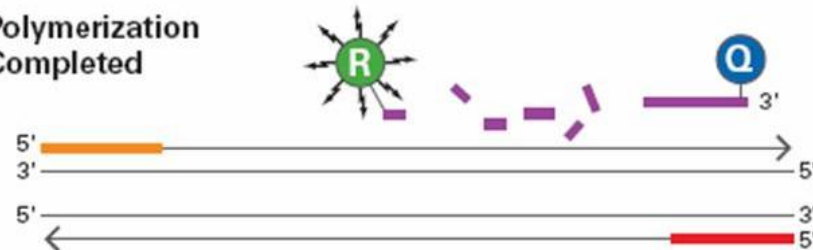
Strand Displacement



Cleavage



Polymerization Completed



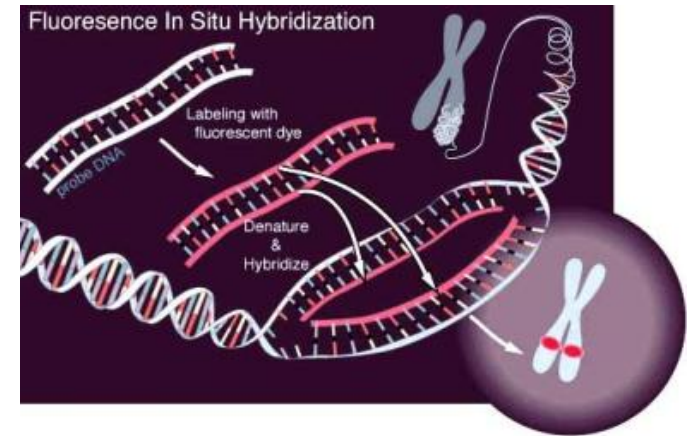


Molekulárně biologické metody

- 1) Hybridizace DNA
- 2) Klonování DNA
- 3) Sekvenování DNA
- 4) DNA Microarray
- 5) ELISA

Hybridizace NA

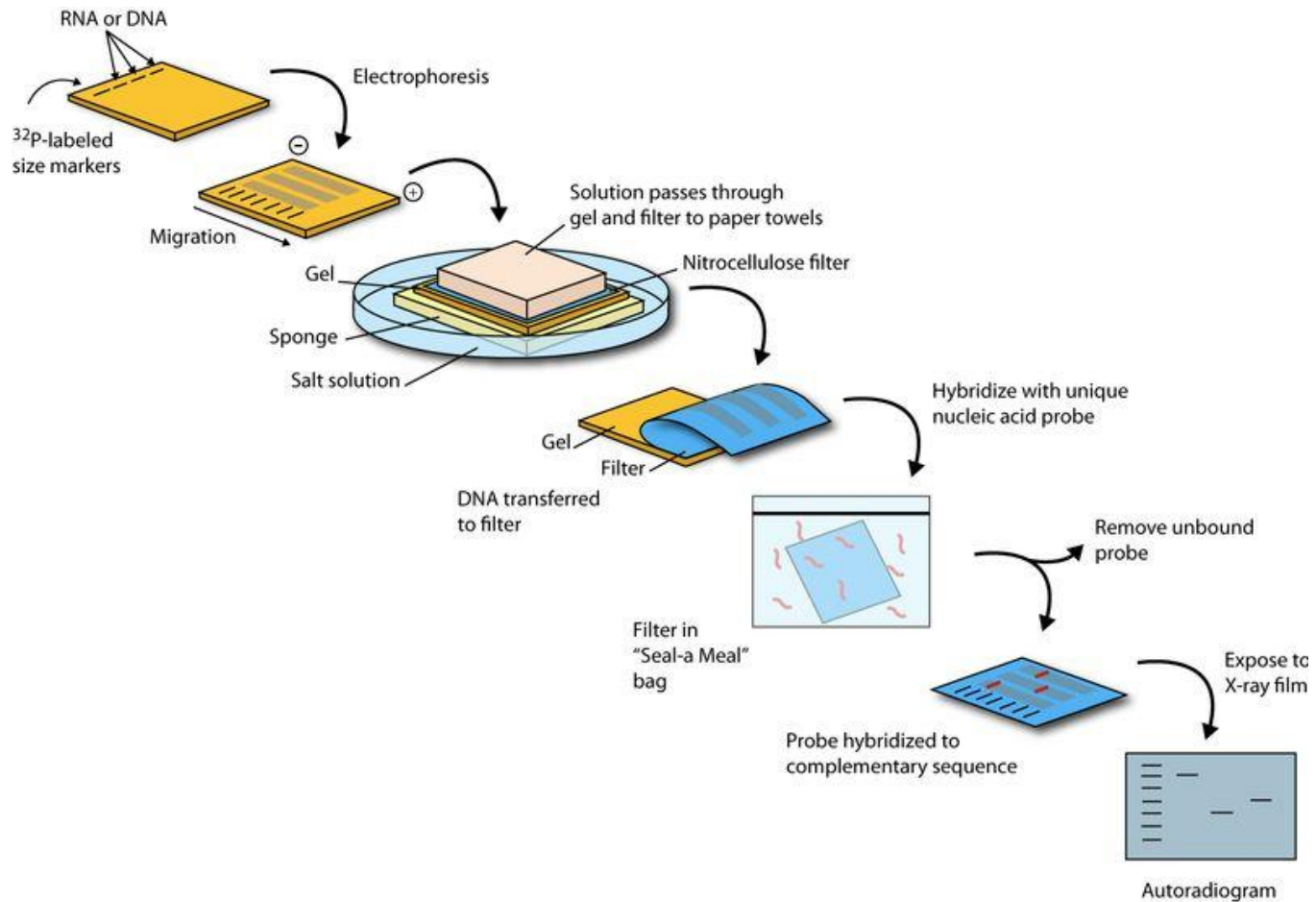
- **v preparátech chromozomů, buněk a tkání (*in situ*)**
- fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)



- **v roztoku**
- **na pevných podkladech** (nitrocelulózový filtr nebo nylonová membrána)
 - přenos po elektroforetické separaci
 - kapilární přenos
 - elektroforetický přenos
 - vakuový přenos
 - typ přenášených molekul
 - DNA - Southernův přenos (blotting)
 - RNA - Northernový přenos
 - proteiny - Westernový přenos

Hybridizace NA

1. Prehybridizace (obsazení volného místa na membráně)
2. Hybridizace (ponoření membrány do roztoku s ss sondou)
3. Promývání nenavázané sondy
4. Detekce sondy

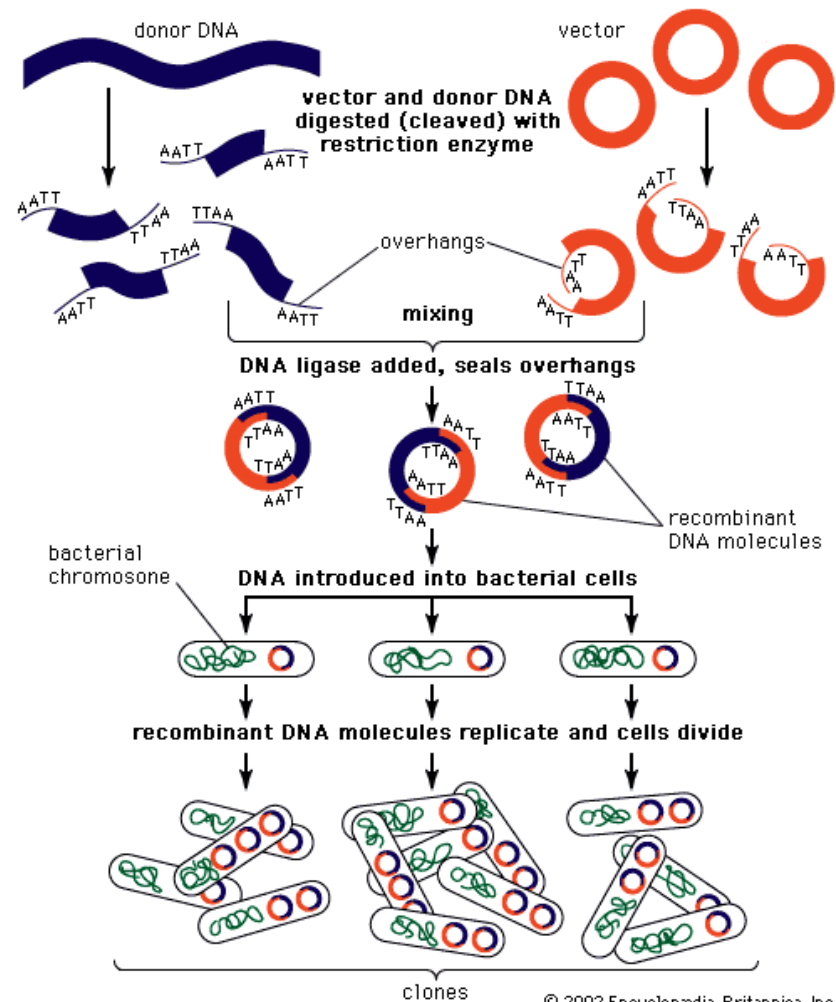


Klonování DNA

- tvorba souboru identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA (klonů DNA) např. množением rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (*in vivo*) nebo pomocí PCR (*in vitro*)
- rekombinantní DNA vznikne spojením inzertu (cizorodé DNA) s vektorem

Aplikace

- studium funkce izolovaných genů
- studium regulačních oblastí genů
- fyzikální a genetická analýza genomů
- exprese cizorodých genů a tvorba rekombinantních proteinů



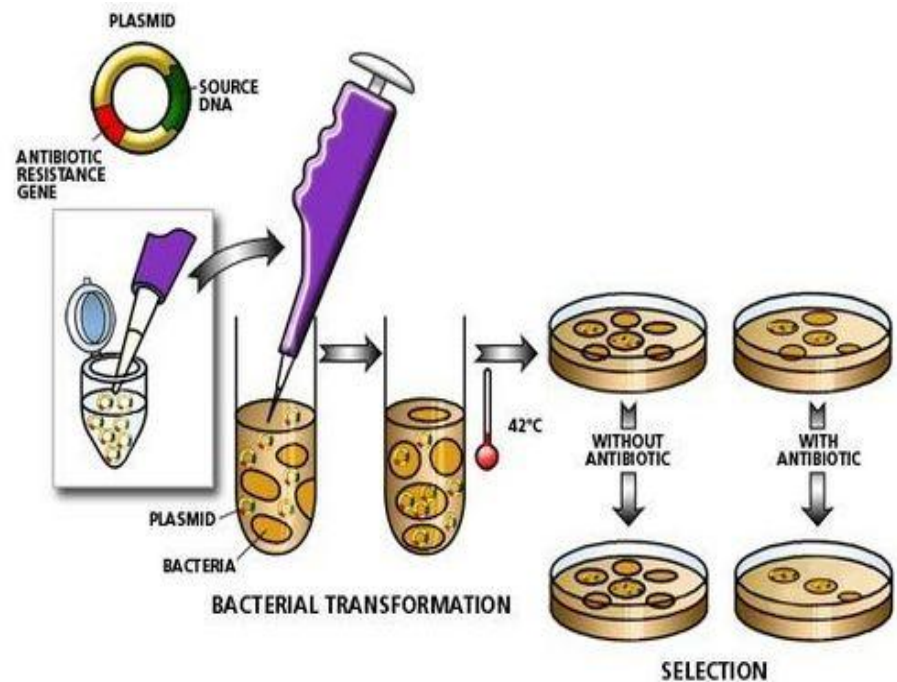
Klonování DNA

Postup

- příprava inzertu - gDNA, cDNA, PCR produkt
- přenos inzertu do vektoru - transformace, elektroporace
- selekce klonů obsahujících inzert - inzerční inaktivace, alfa-komplementace

Klonovací vektory

- plazmidové (2-15kb)
- fágové (37-52kb)
- kosmidy - hybridy mezi plazmidy a fágy (32-47kb)





Sekvenování DNA

Využití

- Diagnostika chorob a časně zjištění náchylnosti jedince k určitým nemocem (rakovina, kardiovaskulární onemocnění), genová terapie
- Celogenomové sekvenování (evoluční biologie)
- Fylogenetika (evoluční vývoj) organismů
- Antropologie: srovnávání DNA k zjišťování migrací lidských ras (zejména podle mitochondriální DNA a Y-chromozomální DNA)
- Forezní vědy: důkaz viny či nevin v zločinu, určení otcovství a podobně – mikrosatelity (test paternity)
- Zemědělství: geneticky modifikované plodiny

Dvě principiálně odlišné metody

- Chemická (Maxam-Gilbertova)
- Enzymatická (Sangerova) – v současnosti využíváno automatické sekvenování

- ELFO – horizontální, kapilární

Sekvenování DNA

Chemická metoda

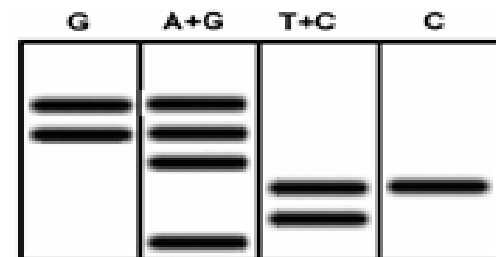
- štěpení zkoumané molekuly v místě modifikace



Postup

1. Příprava ssDNA
2. DNA na svém 5' konci radioaktivně označena fosforem ^{32}P
3. Rozdělení vzorku DNA do 4 částí a každá je vystavena chemikáliím,
4. v každé ze 4 nádob docíleno různě dlouhých sekvencí DNA
5. PAGE ELFO fragmentů DNA
6. Autoradiografická (nebo jiná) detekce fragmentů DNA

G - dimetylsulfát (DMS) + piperidin
G + A – kys. mravenčí + piperidin
C + T - hydrazin + piperidin
C – hydrazin + NaCl + piperidin



Sekvenování DNA

Enzymatická metoda

- amplifikace krátkých fragmentů očekávané délky

Postup

- Soubor ssDNA s fluorescenčně definovaným koncem lišících se o jednu bázi
- Rozdělení elektroforézou
- Vyhodnocení
- čitelnost: 25–50 nukleotidů za 3' koncem (purifikace, separace kap. ELFO)



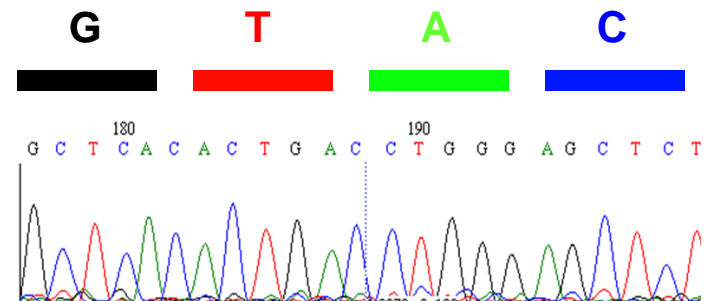
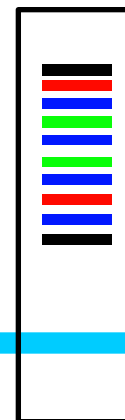
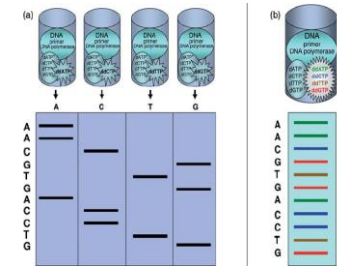
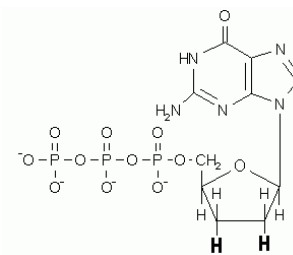
DNA templát

primer

ddNTP-fluorescenčně značen
dNTP (100x více než ddNTP)

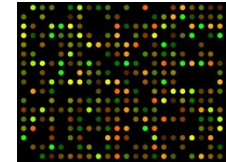
Taq DNA polymeráza

Puftr

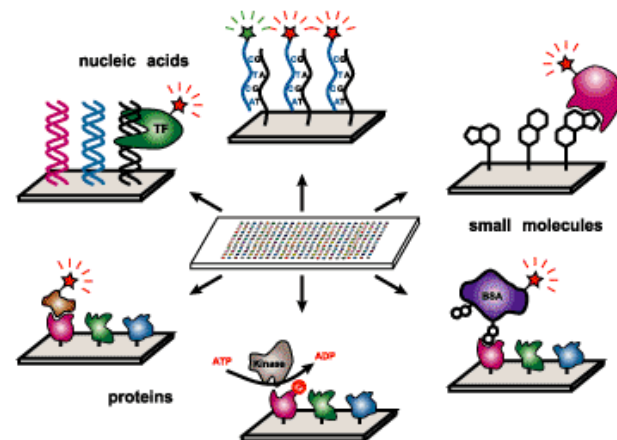


DNA Microarrays

- <http://www.youtube.com/watch?v=ePFE7yg7LvM&feature=related>
- analýza exprese genů
- DNA čip – oligonukleotid ssDNA (sonda) - destička (skleněná, silikonová) – mnoho sond
- vzorek – značená ssDNA
- hybridizace – komplementarita
- omytí čipu
- skenování čipu – excitace laserem, detekce na bázi fluorescence
- zpracování výsledků



- DNA čipy
- RNA čipy
- Proteinové čipy



ELISA

- z angl. **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**
- imunologická metoda sloužící k detekci protilátek
- metoda funguje na bázi imunoenzymatické reakce a lze s ní rovněž detekovat i antigen
- využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů
 1. schopnost proteinů (tedy imunoglobulinů) vázat se na povrch plastů (např. polystyrenu)
 2. schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty („nožička“ imunoglobulinu je tvořena těžkými řetězci, kt. tvoří krystalizující fragment) imunoglobulinových molekul
- **Antigen** - detekovaný v testovaném vzorku, známý, komerčně připravovaný
- **Protilátka** - detekovaná v testovaném séru, známá, komerčně připravovaná
- **Konjugát** - jedná se opět o protilátku proti protilátce (konkrétně proti druhově specifickým imunoglobulinům příslušného izotypu (proti IgG, IgM, IgA), na kt. je navázaný enzym
- **Substrát** - je chemická látka, která reaguje s enzymem, a tím změní svou barvu

ELISA

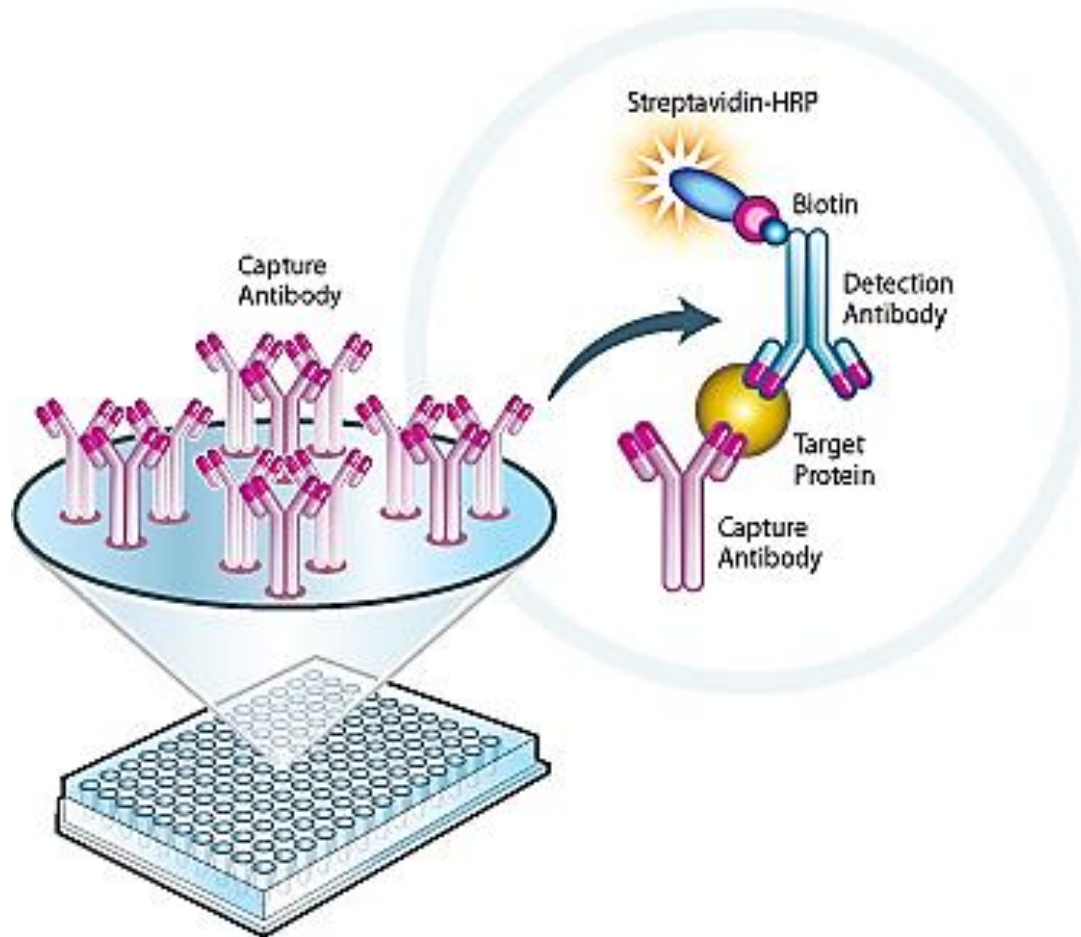
Přímý průkaz HIV infekce

- protein p24 je součástí kapsidy virionu HIV (jeho koncentrace v krvi strmě vzrůstá přibližně 2 týdny po proniknutí viru do organismu)

ELISA

1. k pevné fázi (polystyrénová destička) je přichycena protilátka proti p24
2. přidán vzorek testovaného séra, na nějž bylo předtím působeno detergenčním činidlem (pro rozrušení virionů a uvolnění volných antigenů)
3. v přítomnosti antigenu p24 v séru vazba na protilátky
4. odmytí zbytku séra
5. přidána protilátka proti p24 s navázaným biotinem
6. přidán streptavidin v komplexu s peroxidázou
7. avidin se naváže na biotin, a vázaná peroxidáza poté přemění substrát (např. tetrametylbenzidin) na barevný produkt

ELISA





CCR-5 - HIV a infekce

Nature. 1996 Aug 22;382(6593):722-5.

Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.

Samson M et kol.

Abstract

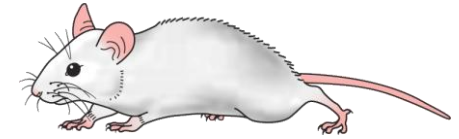
HIV-1 and related viruses require co-receptors, in addition to CD4, to infect target cells. **The chemokine receptor CCR-5** (ref.1) was recently demonstrated to be **a co-receptor for macrophage-tropic (M-tropic) HIV-1 strains**, and the orphan receptor LESTR (also called fusin) allows infection by strains adapted for growth in transformed T-cell lines (T-tropic strains). Here we show that **a mutant allele of CCR-5 is present at a high frequency in caucasian populations** (allele frequency, 0.092), but is absent in black populations from Western and Central Africa and Japanese populations. **A 32-base-pair deletion within the coding region results in a frame shift, and generates a non-functional receptor that does not support membrane fusion or infection by macrophage- and dual-tropic HIV-1 strains.** In a cohort of HIV-1 infected caucasian subjects, no individual homozygous for the mutation was found, and the frequency of heterozygotes was 35% lower than in the general population. White blood cells from an individual homozygous for the null allele were found to be highly resistant to infection by M-tropic HIV-1 viruses, confirming that CCR-5 is the major co-receptor for primary HIV-1 strains. The lower frequency of heterozygotes in seropositive patients may indicate partial resistance.

Vznik mutace před 1200 lety – severní Evropa

Infekce využívající CCR5 receptor pro vstup do buňky:

černé neštovice - *Variola major*, dýmějový mor (14. stol.) - *Yersinia pestis*,

Genomika



- studuje strukturu a funkci genomů pomocí genetického mapování, sekvenování a funkční analýzy genů
- stanovení úplné dědičné informace jednotlivých organismů = stanovení sledu všech nukleotidů
- snaží se o pochopení veškeré informace obsažené v DNA živých organismů

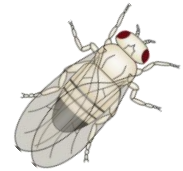
Bioinformatika

- shromažďování, analýza a vizualizace biologických souborů dat
- využívá metod výpočetní techniky, tvorba databází a softwarů

Genomika

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)



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)



Další obory

Transkriptomika

- stanovuje soubor mRNA transkriptů v určitém typu buněk a změny exprese genů vyvolávané chorobami

Metabolomika

- analyzuje metabolom, úplný soubor malých molekul v buňce, a hledá jeho změny v čase

Strukturní proteomika

- cílem je určit strukturu všech proteinů kódovaných určitým genomem

Funkční proteomika

- zjišťuje, které soubory proteinů jsou přítomny v buňce a jak na sebe vzájemně působí

Proteomika

- proteom je soubor proteinů, které jsou produkovány z genomu daného organismu
- pojem proteom byl poprvé použit Markem Wilkinsem v roce 1995
- **buněčný proteom** je soubor proteinů, který se právě nachází v určité buňce, nebo buněčném typu, za daných podmínek (př. ve proteom dělící se hematopoietické buňky v anafázi)
- **kompletní proteom** je potom proteom organismu, tedy suma proteomů všech buněčných typů. Do tohoto pojmu jsou zahrnuty i proteiny, které se v organismu pouze mohou vyskytovat, ale v danou chvíli syntetizovány nejsou.



Proteomika

- proteom je větší než genom, zejména u eukaryot
- je to hlavně díky alternativnímu splicingu a posttranslačním modifikacím proteinů, jako fosforylace, nebo štěpení peptidového řetězce
- genom je relativně stabilní, proteiny se v buňce naopak mění velmi rychle a různým způsobem → analýza proteomu složitější
- všechny proteiny dané buňky jsou analyzovány současně

Bezprostřední cíle proteomiky

- proteom lidské plazmy (500 proteinů)
- proteom fagosomu (250 proteinů)
- proteom organel
- vytvořit panel protilátek proti všem proteinům

Proteomika

Analýza proteomu probíhá ve dvou krocích

1. separace proteinů

- použití dvoudimenzionální elektroforézy (2D PAGE) je možno v jednom vzorku oddělit několik tisíc proteinů

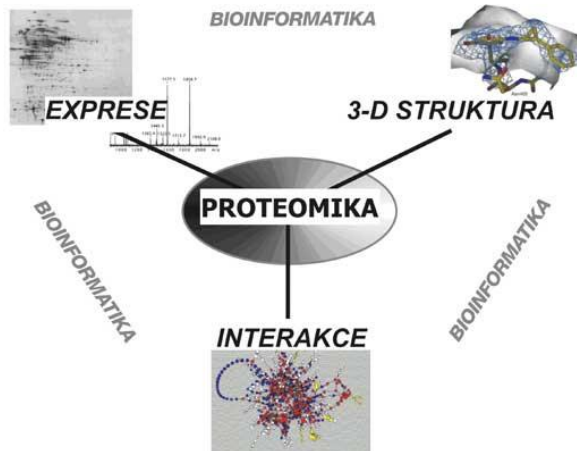


2. identifikace proteinů

- hmotnostní spektrofotometrie: MALDI (Matrix assisted laser desorption/ionisation), SELDI-TOF (surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight)
- od každého proteinu se získá jednoznačná charakteristika – Peptide Mass Fingerprints, která se porovnává s databází (SWISSPROT, LocusLink)

Proteomika

- proteiny jsou většinou denaturované, ztrácí se informace jak o terciární a kvarterní struktuře, tak o přirozené tvorbě komplexů a funkci = **expresní proteomika**
- variantou je studium změn v proteinovém složení = **diferenční proteomika**
- **funkční proteomika** = použití technik, které nedenaturují proteiny např. tvorba komplexů, posttranslační modifikace, interakce, funkce





Využití metod molekulární biologie

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




Využití metod molekulární biologie

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
- evoluční biologie



Identifikace patogenů molekulárně biologickými metodami

- kvalitativní i kvantitativní průkaz virové nebo bakteriální nukleové kyseliny ve vzorku
- velký význam pro sledování rozvoje virové infekce nebo odpovědi na léčbu antivirotiky (např. u infekcí HIV, hepatitidy B a C, CMV infekce)
- detekce úseku genomu zodpovědného za přenos rezistence
- možnost přesně určit sekvence jednotlivých bází, identifikovat genotypy viru nebo bakterie, prokazovat mutace

VariOr Dento - diagnostický test pro identifikaci parodontálních patogenů

- *Fusobacterium nucleatum*
- *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Tannerella forsythensis*
- *Treponema denticola*
- *Peptostreptococcus micros*
- *Prevotella intermedia*

Identifikace patogenů molekulárně biologickými metodami

Tabulka 4. Rozdělení parodontálních patogenů podle závažnosti.

Komplex	Patogen	Závažnost
Červený komplex	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Treponema denticola</i> <i>Bacteriodes forsythus</i>	Zřetelná asociace s hloubkou chobotů a krvácivostí (BOP – Bleeding On Probing)
Oranžový komplex	<i>Prevotella intermedia</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Peptostreptococcus micros</i>	Stále ještě významná spojitost s hloubkou chobotů
Žlutý/zelený komplex	<i>Eikenella corrodens</i> <i>Streptococcus sanguis</i> a další mikroorganismy	Patogeny žlutého a zeleného komplexu mají podstatně menší význam pro klinickou potřebu než červený a oranžový komplex.
	<i>A.actinomycetemcomitans</i>	Podle Sokranského patří sice do zeleného komplexu, má ale výjimečný terapeuticko-diagnostický význam

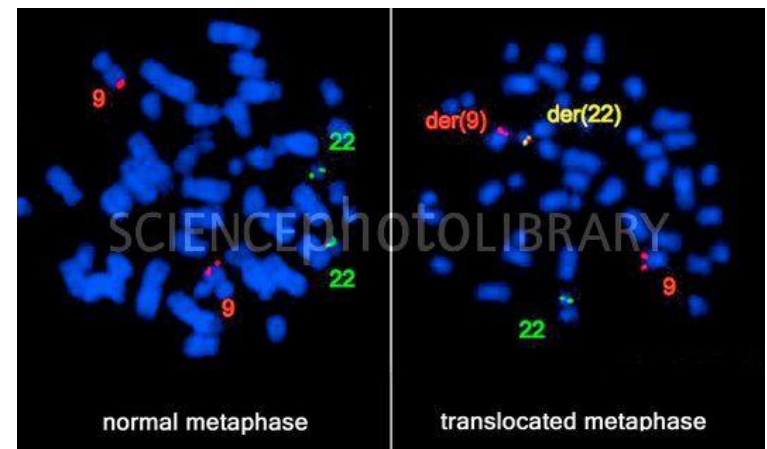
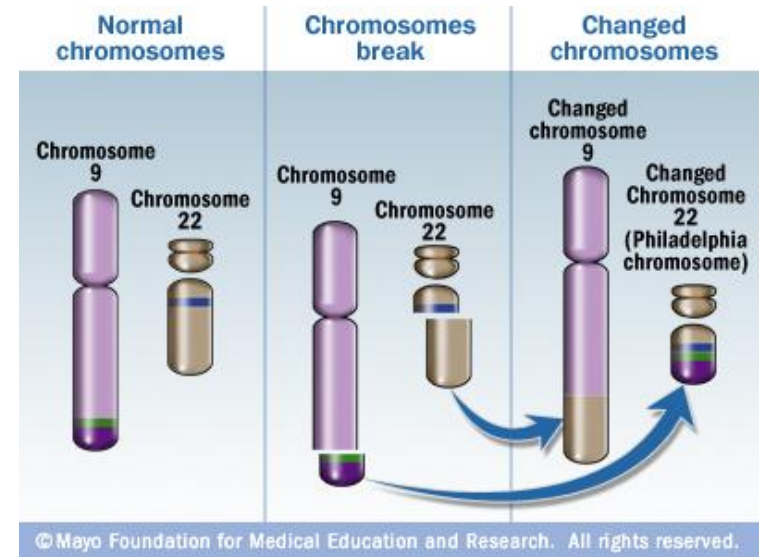


Identifikace onkogenů

- podstata nádorové transformace je genetická
- mutace postihují geny signálních drah, kontrolních bodů buněčného cyklu, buněčné diferenciace, apoptózy, reparace DNA...
- v průběhu buněčných dělení jedné buňky nastává postupná akumulace několika mutací v uvedených skupinách genů, které resultují v její nádorovou transformaci

Filadelfský chromozom

- derivovaný chromozom 2
- vzniká reciproknou translokací mezi chromozomy 9 a 22, při níž je **protoonkogen abl** z koncové části dlouhého raménka chromozomu 9 fúzován s **genem BCR**
- gen BCR se nachází na dlouhém raménku chromozomu 22, a jelikož má velice silný promotor, dochází touto fúzí k vzniku **aktivního onkogenu**
- FISH



Metody léčby

Symptomatická

- substituční terapie - dodání proteinu, který je v daném organismu defektní nebo zcela chybí (př. enzymopatie hemofilie - dodání faktoru VIII)
- karenční terapie - vyloučení nebo omezení složky potravy, která v důsledku defektu enzymu není odbourávána (př. fenylketonurie - potrava bez phe)

Kauzální

- genová terapie - náhrada mutovaného, nefunkčního genu standardními, funkčními geny



Genová terapie

- zahrnuje všechny postupy, které využívají přenosu genetického materiálu do buněk pacienta k léčebným účelům
- metodologie GT je uplatnitelná tam, kde je známa molekulární podstata nemoci
- vzhledem k tomu, že poznatků o patogenezi chorobných stavů na molekulární úrovni přibývá, rozšiřuje se i okruh indikací pro GT
- v nejbližších letech změní zásadním způsobem léčbu mnoha lidských nemocí



Genová terapie

Využití při léčbě

- vrozených chorob – korekce abnormality (nemoci monogenní i polygenní)
- i získaných chorob - jakákoliv manipulace s DNA, která příznivě ovlivní průběh nemoci (zhoubné nádory, léčba kardiovaskulárních a metabolických chorob, degenerativních nervových onemocnění, AIDS, v transplantační medicína

Principy

- nahrazení nefčného genu fčným (homologní rekombinace)
- oprava nefčného genu (cílené mutace)
- přenesení nového genu (terapeutický gen)



Genová terapie

Co je třeba znát před začátkem genové terapie?

- kompletní informace o defektním genu - umístění, mechanismus patologického účinku
- znalost přesné sekvence zdravého genu
- volba vhodného vektoru, vytipování cílových buněk
- souhlas pacienta

Genová terapie

- opravu, vložení, vyřazení genu lze provádět *in vivo*, *in vitro* a nejč. *ex vivo*
- odběr bb. z pacienta -> kultivace *in vitro* -> modifikace DNA -> selekce -> proliferace selektovaných bb. -> přenos zpět do pacienta)
- geny lze do genomu začlenit v časně embryogenezi (léčba v zárodečné linii)
- gen může být začleněn pouze do somatických bb., které jsou nejvíce poškozené (v tomto případě se geneticky opravená DNA nepředává následujícím generacím potomků)



Genová terapie

Postup při genové terapii

- vytvoření genetické informace určené pro transport do buněk
- vytipování cílových buněk (provedení *in vivo* x *in vitro* /*ex vivo*)
- vpravení vektoru (vektory = nosiče pro vpravení genetické informace do cílových buněk)

Vlastnosti ideálního **vektoru**

- průnik do velkého počtu cílových buněk
- přenos genu v transkripčně aktivním stavu
- netoxický pro cílové buňky

- plazmidy, virové částice

Genová terapie

Virové vektory

- interakce s receptory na povrchu cílových buněk
- vybavení regulačními elementy zajišťujícími účinnou expresi transgenů
- integrace transgenů do buněčného genomu
- náročnější příprava (mimo jiné se musí se zbavit všech virových genů, aby nebyly infekční)
- malý rozměr částic
- vyšší biologická rizika (hrozí nebezpečí rekombinace a vzniku viru schopných replikace)
- nejčastěji používané virové vektory – retroviry (dělící se bb.), adenoviry (začlení se i do nedělících se bb.), poxviry, adenoasociované viry (AAV) a herpetické viry



Genová terapie

Monogenně podmíněná onemocnění teoreticky vhodná pro genovou terapii

- Parkinsonova choroba (gen pro dopamin -> do bb. subst. nigra)
- cystická fibróza (gen CFTR -> epitel v plicích, pankreatu aj.)
- fenylketonurie (gen pro phenylalanin hydroxylázu -> hepatocyty)
- hemofilie A, B (gen pro faktor VIII a IX -> hepatocyty)
- Duchennova svalová dystrofie (gen pro dystrophin -> svaly)
- α -, β -talasemie (gen pro α -, β -globin -> ery)
- srpkovitá anémie (gen pro β -globin -> ery)

Genová terapie

Genová terapie nádorových onemocnění

1. zvýšení účinnosti přirozených obranných mechanismů

- stimulace specifických tumor infiltrujících lymfocytů (TIL):
 - izolace TIL z primárního tumoru → kultivace TIL in vitro → aktivace TIL interleukinem 2 → přenos TIL do pacienta (autologní přenos) → TIL zničí tumor
- začlenění genů pro – tumor asociované antigeny, IL-2, interferon

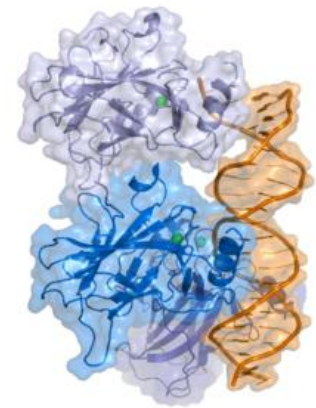
2. přenos vražedných nebo sebevražedných genů

- TIL obsahující vražedný gen (např. gen pro TNF – tumory nekrotizující faktor)

3. protinádorové vakcíny

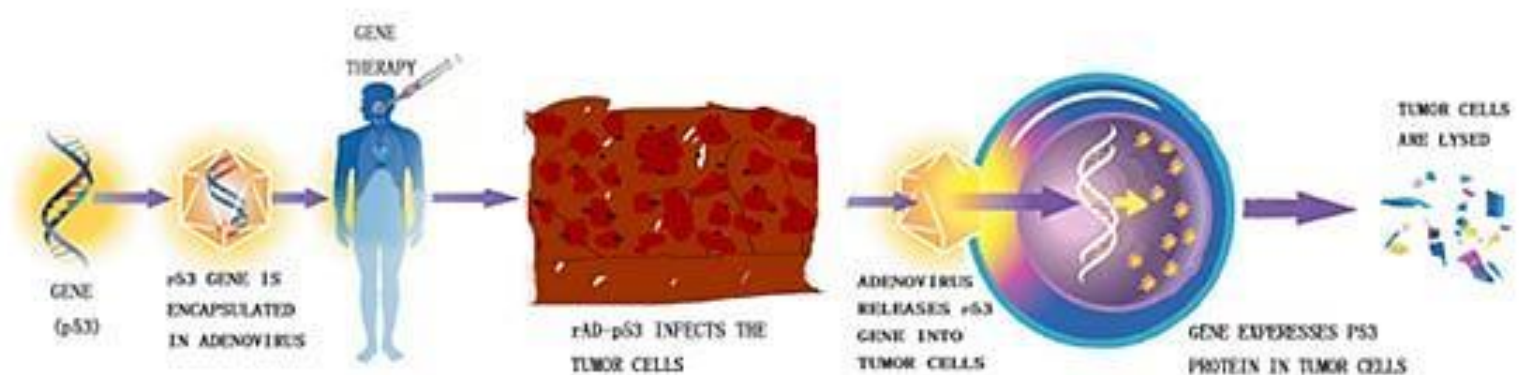
- nádory mají vyvolávat imunitní reakci
- reakci je možno podpořit imunizací tumor specifickými peptidy
- v případě, že nádor neexprimuje HLA, je možné přenést do bb. DNA kódující tento antigen a tím vyvolat imunitní reakci
- je také možné vytvořit hybridní rekombinantní molekulu – tvořena epitopem nádoru spojeným s velmi antigenním epitopem

Genová terapie



GENDICINE

- dostupný od r. 2004
- povolen v Číně pro léčbu dlaždicobuněčného karcinomu (head and neck squamous cell carcinoma)
- virové částice (adenovirus) v injekční formě s genem p53
- injekce 1 týdně (po 8 týdnech kompletní remise u 64% pacientů a u 32% částečná regrese)



Genová terapie

DM 1. typu

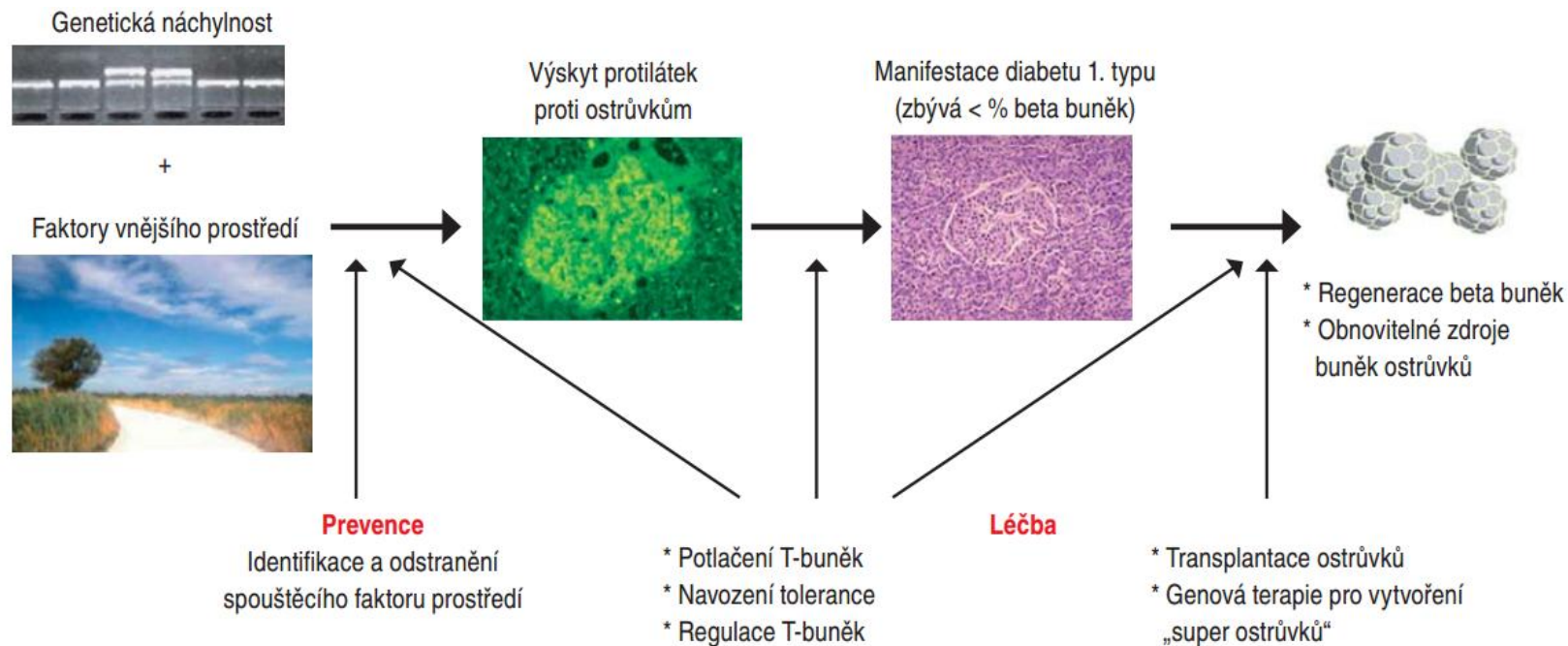
- vnesení genu pro inzulín do jader některých buněk => produkce inzulínu přímo v lidském organismu (testováno na myších)
- možnost získání většího množství buněk produkujících inzulin je důležitým tématem nejen jako zdroj materiálu pro transplantace ostrůvků, ale především jako lákavá možnost přímé kauzální léčby diabetu nahrazením buněk autoimunitním procesem již zničených.
- Probíhají experimenty s diferenciací nových beta buněk z různých pankreatických tkání po jejich dediferenciaci, z multipotentních pankreatických prekurzorů i cíleným množením beta buněk již nějakou cestou regenerovaných

Genová terapie

DM 1. typu

- kmenové buňky, ať již embryonální nebo dospělé, nabízejí další potenciální zdroj pro diferenciaci beta buněk
- při použití dospělých kmenových buněk z jiných linií by navíc nedocházelo k autorejekcím, protože by mohly být použity přímo autologní kmenové buňky pacienta. Podobná strategie léčby je založena na přeměně jiných somatických buněk na buňky produkující inzulin, jmenovitě hepatocytů po vložení genu pro inzulin pod kontrolou promotorového genu pro myší inzulin
- buňky ostrůvků se sníženou imunogenicitou, pocházející z transgenních prasat, jsou připravovány k prvním klinickým testům u lidí jako další možnost
- technické obtíží - při trvale probíhající autoimunitní reakci bez vhodné imunomodulace
- cíl: produkce buněk méně imunoreaktivních a nějakým způsobem provedenou blokádu autoreaktivních T lymfocytů

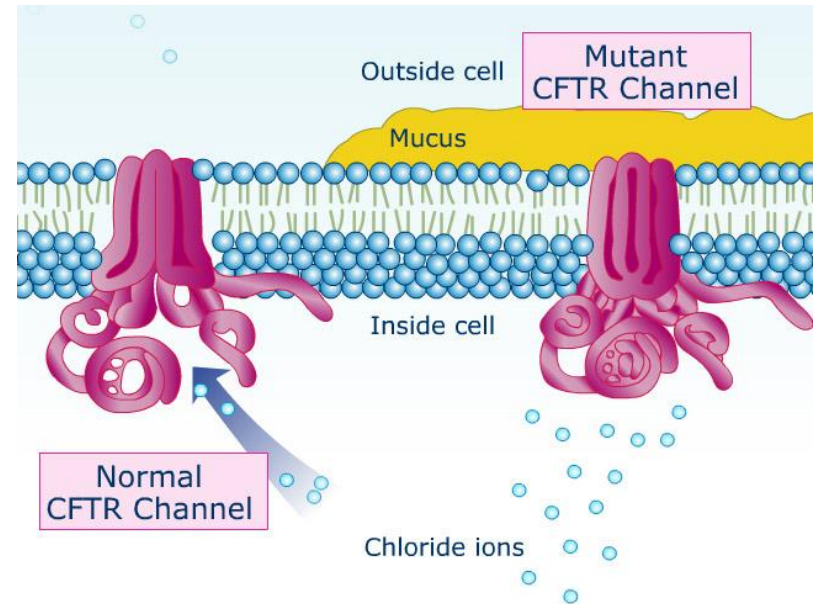
Genová terapie



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

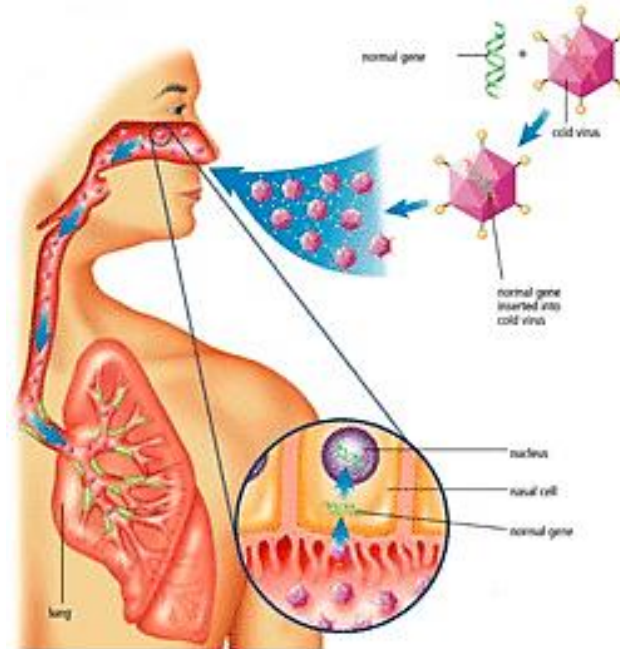


	ancestral	mutant
DNA	-TAG- AAA -CCA-	-TA A-CCA-
mRNA	-AUC- UUU -GGU-	-AUU-GGU-
AA	-ile- phe -gly-	-ile-gly-

Genová terapie

Cystická fibróza

- genová terapie v prenatálním období



Gene therapy could deliver a working gene into a CF patient's cells.

(courtesy of BC Science 9, © McGraw-Hill Ryerson Limited, 2008.)

Genová terapie



Nevýhody genové terapie

- vysoká finanční náročnost
- technická a technologická náročnost
- problémy s uchycením vnášené genetické informace => nízká úspěšnost
- nebezpečí spuštění maligních procesů
- etické problémy - léčebná terapie x cílené ovlivňování genotypu lidí (tzv. superlidé)



Farmakogenetika a farmakogenomika

Farmakogenetika

- zabývá se hledáním vztahu mezi metabolismem, případně efektivitou léčiva a přítomností jednotlivých genetických variant (polymorfismů) genů, které se na absorpci, distribuci, metabolismu, eliminaci podílejí

Farmakogenomika

- zkoumá vztah účinku léku na úrovni celého genomu, resp. transkriptomu
- screening známých genových polymorfismů
- účelná farmakoterapie, minimální nežádoucí účinky



Farmakogenetika a farmakogenomika

Farmakogenetika

- pro určení, který dostupný lék bude mít u konkrétního pacienta největší terapeutický benefit, zatímco nežádoucí účinky budou minimální.
- volba nejefektivnější a nejbezpečnější způsobu léčby

Farmakogenomiky

- identifikace a genetické určení tzv. „drug targets“ (cílových struktur léčiva)
- stanovení genetických polymorfismů, které mohou tyto cílové struktury pozměňovat i polymorfismů asociovaných s rozvojem choroby a lékovou odpovědí
- vývoj účinnějšího léčiva s menším počtem nežádoucích účinků

Farmakogenetika a farmakogenomika

Kandidátní geny

- enzymy lékového metabolismu
- membránové transportní přenašeče
- receptorové proteiny
- proteiny iontových kanálů



Proteiny iontových kanálů

- geny kódující proteiny Na a K iontových kanálů (geny skupiny LQTS)
- nalezeno v nich bylo přinejmenším 35 SNPs
- některé nalezené polymorfismy vedou k dramatické redukci hustoty kanálů nebo ke změně jejich elektrofyzologie, tj. ke změnám v aktivaci, inaktivaci a regeneraci kanálu
- tyto mutantní změny pak mohou vyústit až v patologickou arytmií
- mutace v genu pro Na kanál a souvislosti s rozdílnou odpovědí pacientů na antikonvulziva, rovněž jako s dědičnou dispozií k epilepsii (sledovány jsou především oblasti vazebných domén)

Farmakogenetika

Protinádorová terapie

Azathioprin

- je antimetabolit purinových bází, který se používá při léčbě hematologických onemocnění u dětí, k terapii autoimunitních onemocnění nebo střevních zánětů u pacientů rezistentních k jiné léčbě
- pro odbourávání je zásadní enzym thiopurinmethyltransferáza (TPMT)
- u evropského obyvatelstva je TPMT polymorfní, s výskytem přibližně 11 % jedinců, kteří mají jednu funkčně deficitní alelu v genomu → snížení katalytické aktivity enzymu → myelotoxicita po podání azathioprinu
- analýza genotypu TPMT je před zahájením podávání azathioprinu doporučována zejména u dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií, protože v případě deficitu TPMT je u pacientů nutné z důvodu toxicity odložit cyklus chemoterapie a tudíž je u nich potom horší prognóza



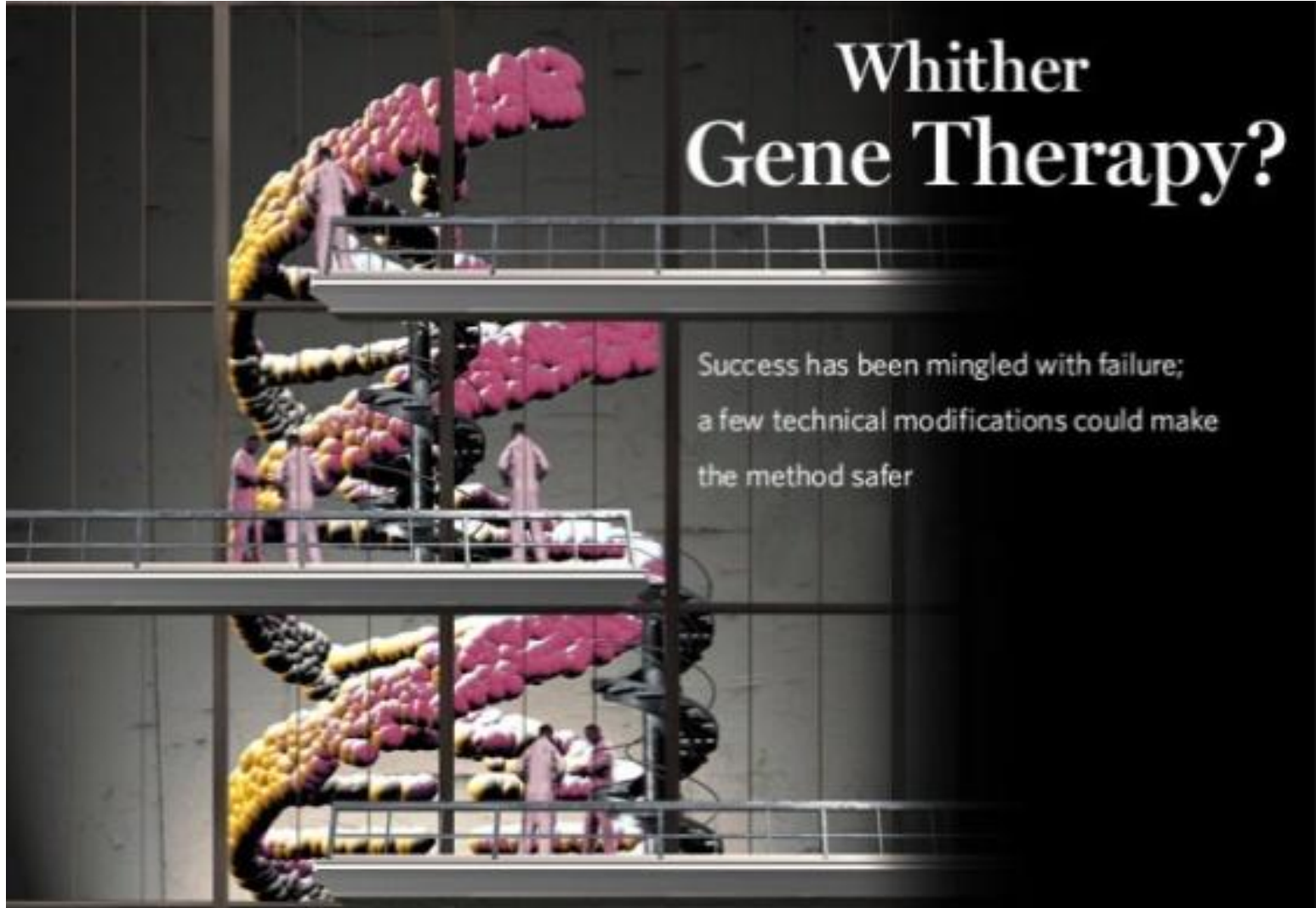
Farmakogenetika a farmakogenomika

Výhody individualizace farmakoterapie

- maximální účinnost léčby (efektivita farmakoterapie i z hlediska finančního pohledu)
- minimální nežádoucí účinky léčby (ochrana zdraví a prevence závažných komplikací)

Limity

- nezbytnou předchozí identifikací významných genových polymorfismů na základě dlouhodobých klinických výzkumů
- Variabilita lékové odpovědi není obvykle dána jen variabilitou jednoho genu (monogenní variabilita) ale variabilitou mnoha genů (multigenní variabilita), neboť do odpovědi organismu na léčivo je zapojeno mnoho genů a tedy i mnoho genových polymorfismů. Všechno dohromady to pak vytváří „**individuální lékovou odpověď**“
- negenetické faktory, tj. faktory vnějšího prostředí znemožňuje předpovědět účinnost nebo bezpečnost léčiva POUZE na základě farmakogenetické informace. Genotyp sice není citlivý na vnější faktory, ovšem interakce drug-drug (léčivo s léčivem) a léková odpověď pacienta mohou být těmito vnějšími faktory ovlivněny.
- geneticky podmíněné rozdíly nejsou jen mezi jednotlivými osobami, ale i mezi celými populacemi



Whither Gene Therapy?

Success has been mingled with failure;
a few technical modifications could make
the method safer