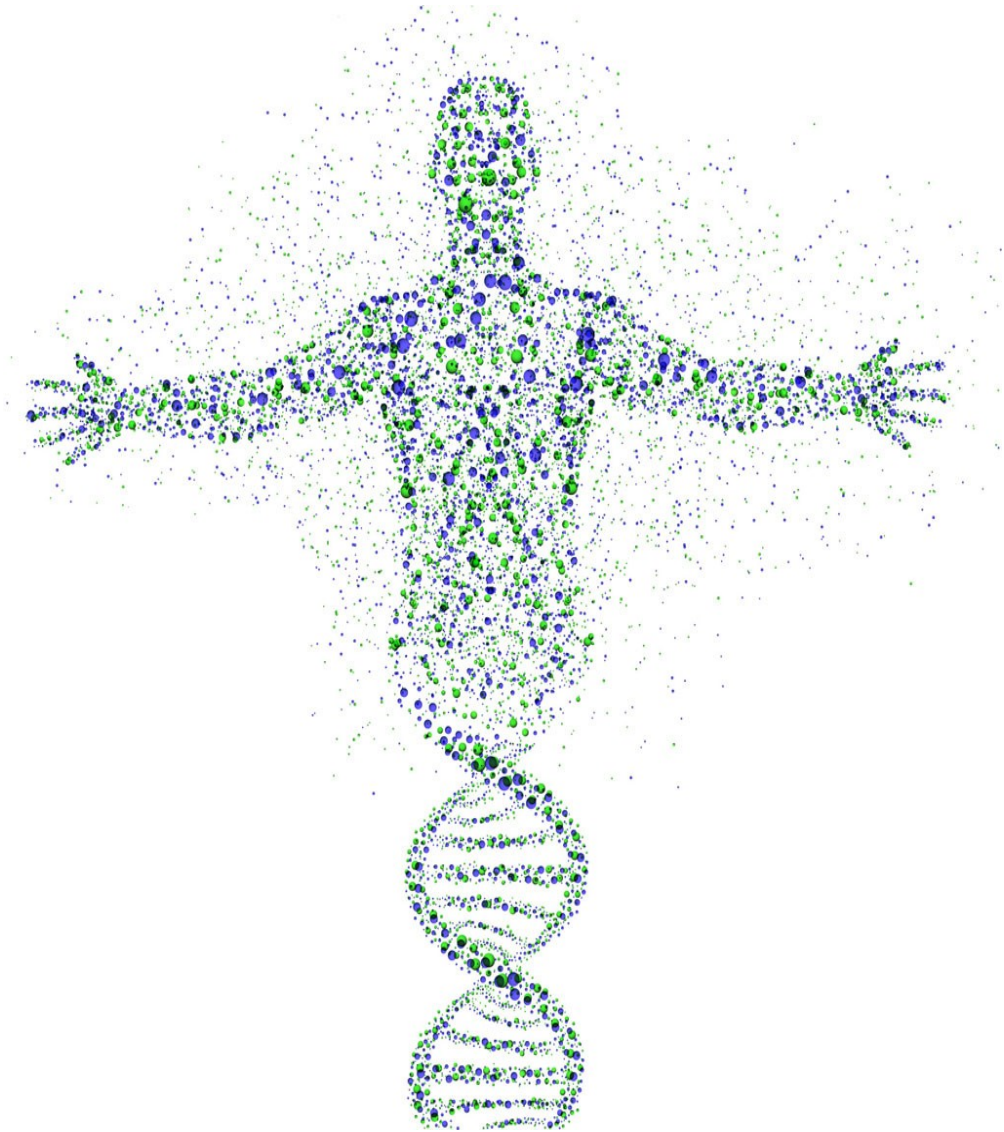


Genetika

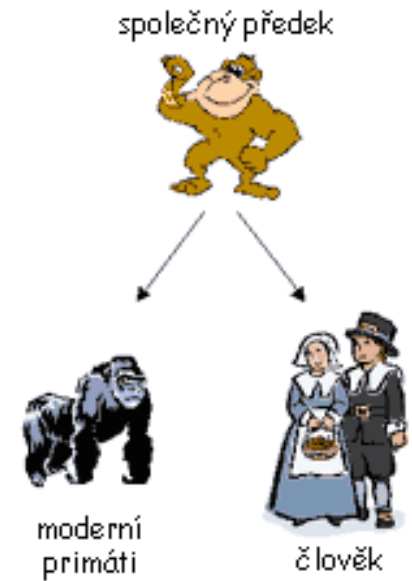
- Podstata dědičnosti
- Úvod do genetiky a genomiky
- Genetická variabilita (mutace × polymorfismus)
- Monogenní × komplexní nemoci
- Genová terapie
- Molekulární metody



Genetika

specializovaný biologický obor zabývající se variabilitou a dědičností

- **molekulární genetika**
 - studium struktury a funkce jednotlivých genů
- **populační genetika**
 - studium proměnlivosti populací
- **komparativní a evoluční genetika**
 - mezidruhové srovnání a studium evoluce druhů
- **klinická genetika**
 - zabývá se genetikou patologických stavů
 - zabývá se diagnostikou, léčením a prevencí genetických nemocí (u celé rodiny!)
 - genetické poradenství
- **cytogenetika**
 - studium chromozomů



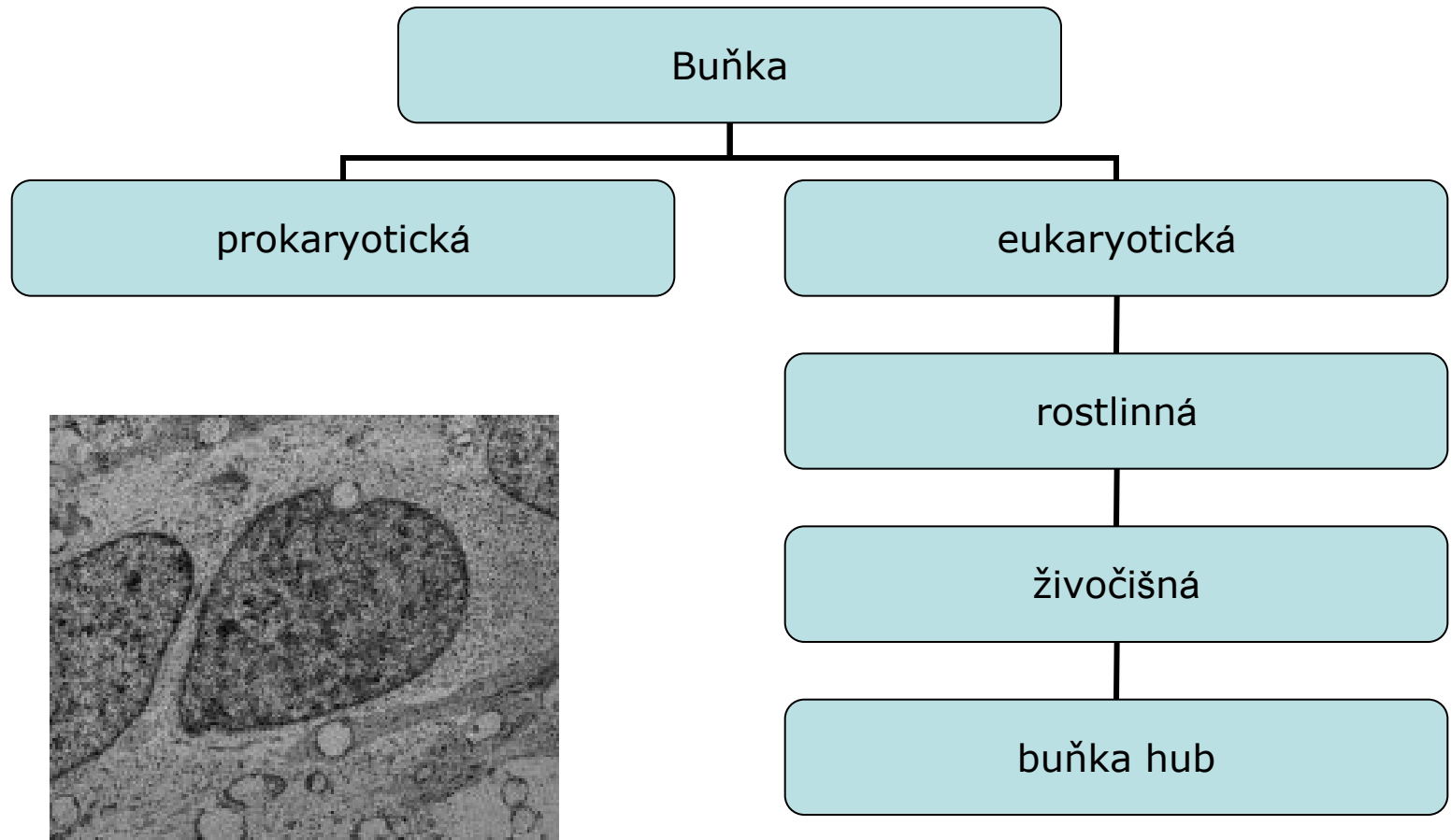
Genomika



- studuje strukturu a funkci genomů pomocí genetického mapování, sekvenování a funkční analýzy genů
- snaží se o pochopení veškeré informace obsažené v DNA živých organismů
 - **strukturní genomika** = pochopení struktury genomu
 - konstrukce detailních genetických, fyzických a transkripčních map genomů příslušných organismů
 - reprezentovala zejména iniciální fázi analýzy genomů; konečným cílem byla kompletní znalost DNA sekvence (např. HUGO projekt)
 - **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)
 - **bioinformatika** = shromažďování, analýza a vizualizace biologických souborů dat
 - využívá metod výpočetní techniky, tvorba databází a softwarů



Buňka



Eukaryotní živočišná buňka

Prostředí pro řadu biochemických dějů
(glykolýza, syntéza mastných kyselin, část močovinového cyklu)

Strukturní podpora a
vnitrobuněčný pohyb látek a
organel bez cytoplasmy

Transport látek

Transport proteinů
a jejich sekrece,
vyučování lipidů a
glykoproteinů

Místo syntézy
ribosomů

Kontrolní
centrum buňky
(syntéza DNA a
RNA)

Zajistění
prostupnosti
jaderné membrány

Podpora tvaru
jádra a regulace
průchodu materiálu
mezi jádrem a
cytoplasmou

Pohyb buněk

Transport látek pomocí váčků,
syntéza lipidů a sacharidů

Uvolňování energie z potravy a transformace energie
do ATP
(citrátový cyklus, dýchací řetězec, β -oxidace,
aktivace mastných kyselin, část močovinového cyklu)

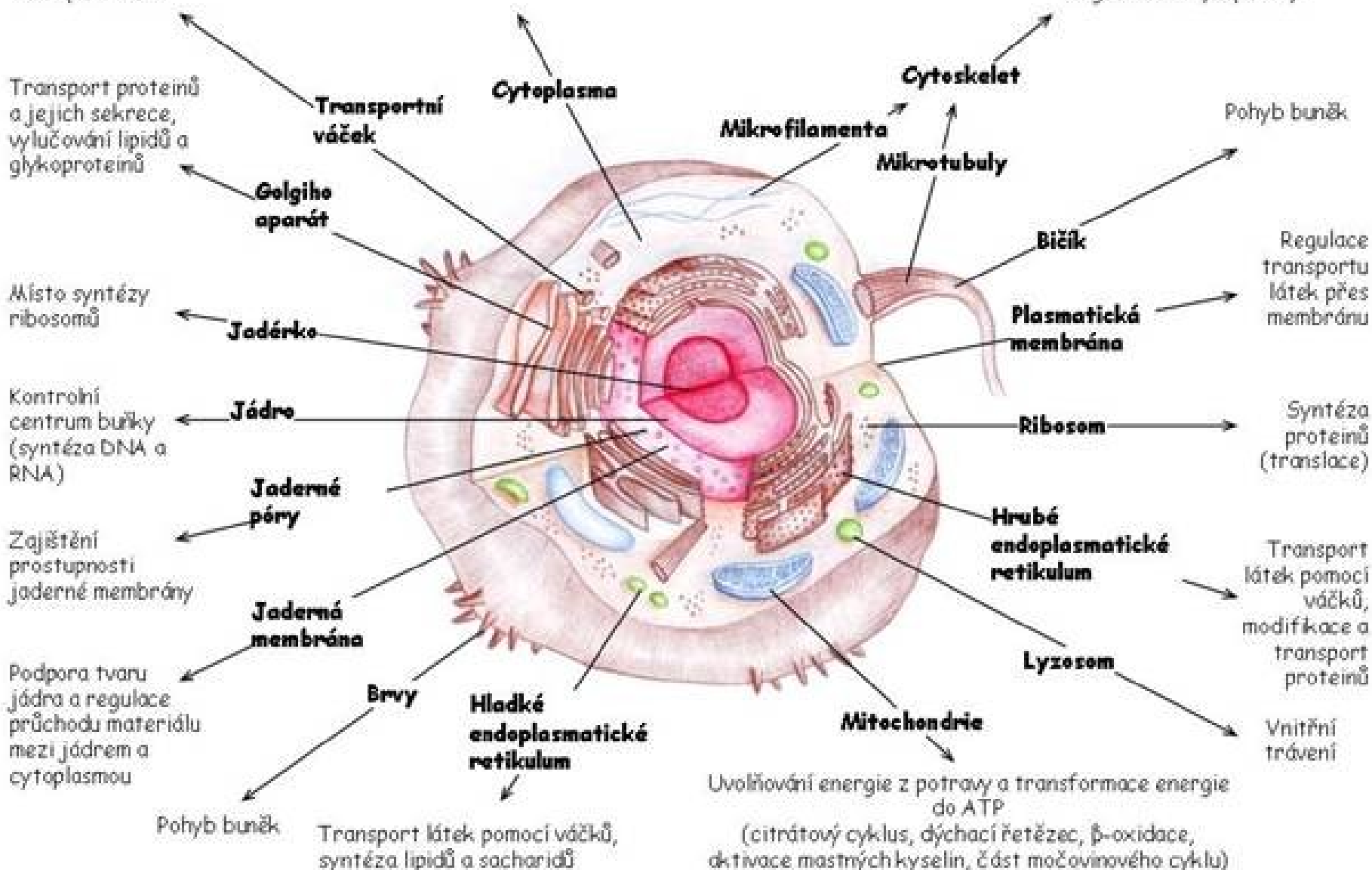
Pohyb buněk

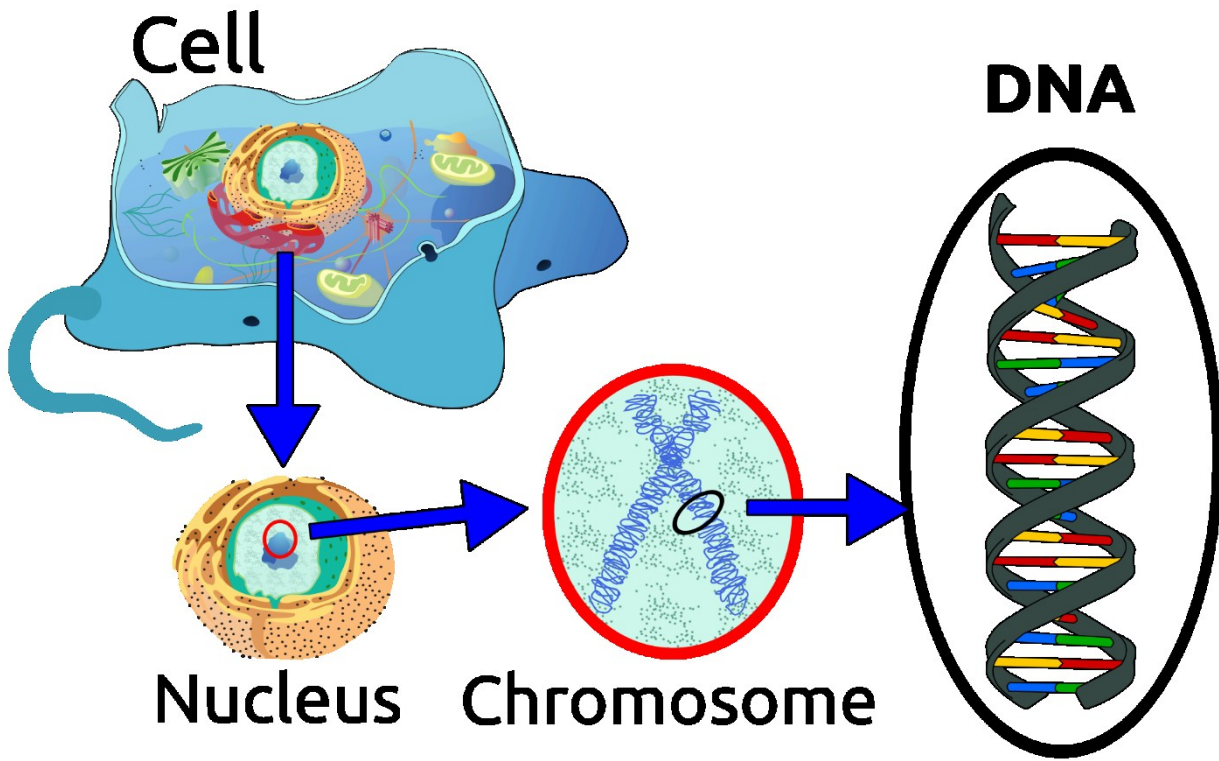
Regulace
transportu
látek přes
membránu

Syntéza
proteinů
(translace)

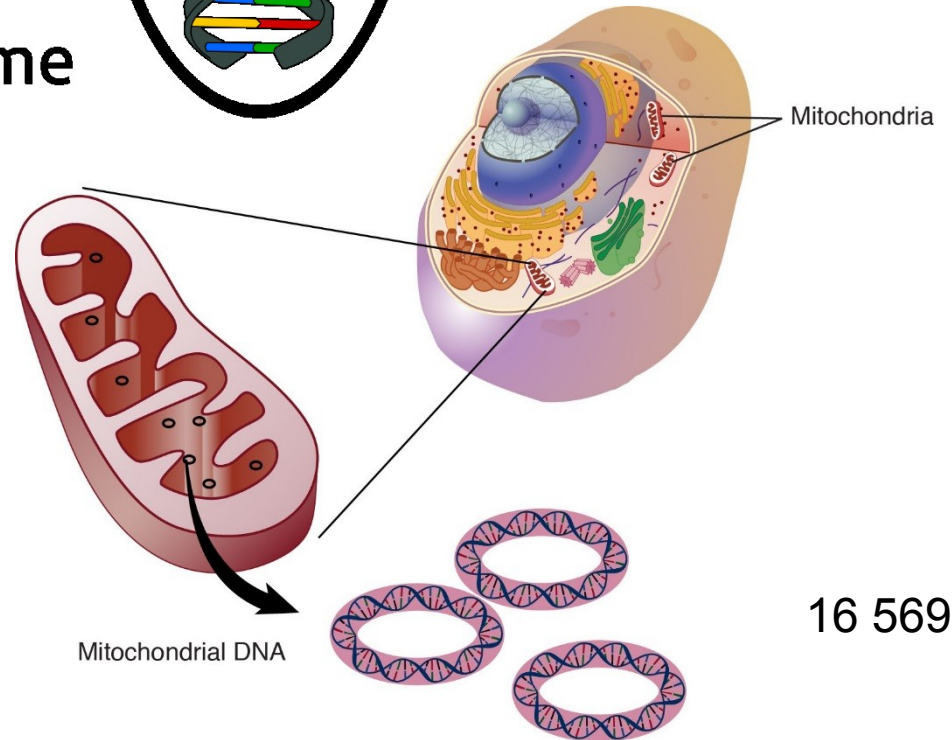
Transport
látek pomocí
váčků,
modifikace a
transport
proteinů

Vnitřní
trávení





3 400 000 000 pb



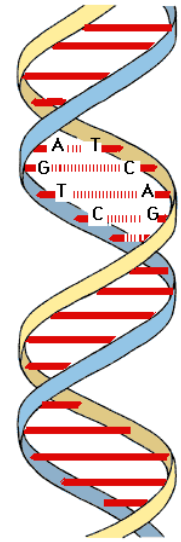
16 569 pb

Chromozomální podstata dědičnosti

- **DNA, RNA, proteiny**

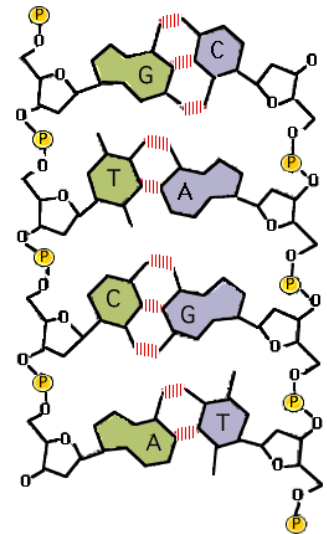
DNA: nese potřebnou informaci potřebnou pro regulaci vývoje, růstu, metabolismu a reprodukce

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



RNA: transport informace z jádra do cytoplazmy (mRNA, tRNA, smallRNA)

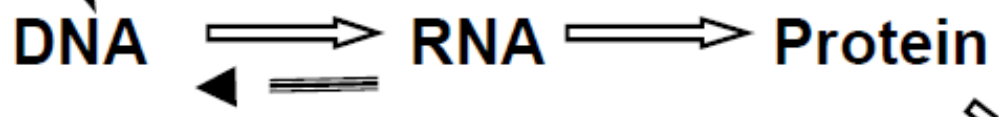
proteiny: základní stavební kameny



Molekulárně biologické dogma



Centrální dogma



Fenotyp

DNA do DNA → REPLIKACE

DNA do RNA → TRANSKRIPCE

RNA do Protein → TRANSLACE



RNA do DNA →

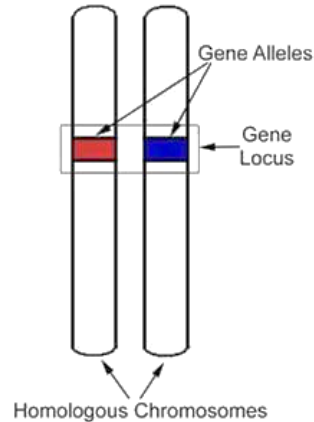
REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Jeden gen jeden enzym (protein/polypeptid)

Základní genetické pojmy

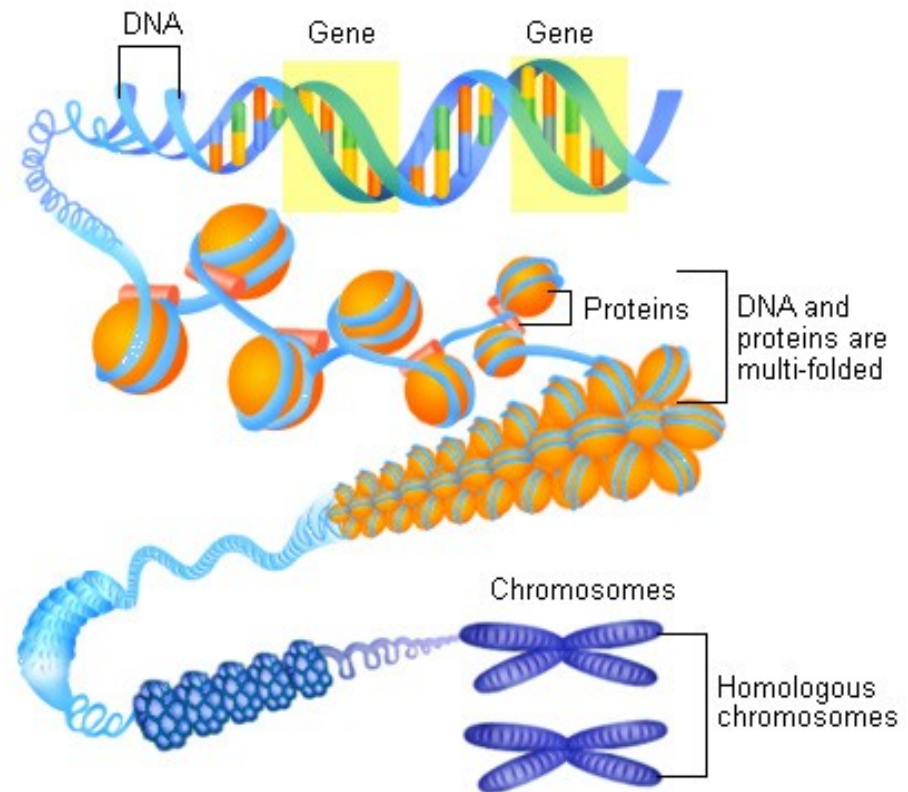
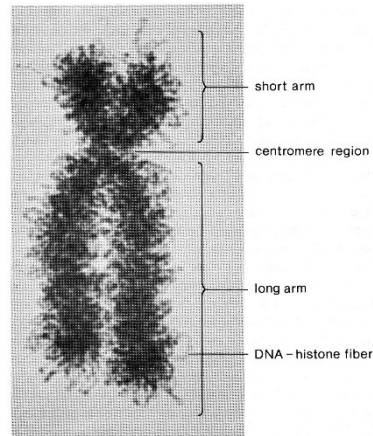
- **gen, alela, genom, chromozom**

- lokus
- alely
- dominantní
- recesivní



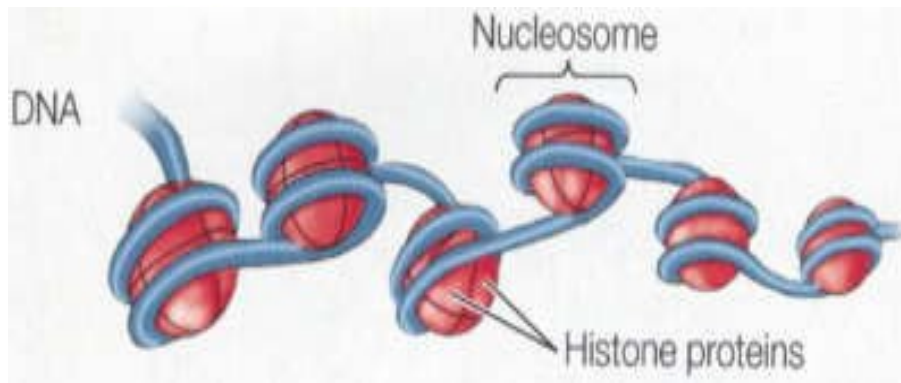
- homozygot
- heterozygot

- genotyp
- fenotyp

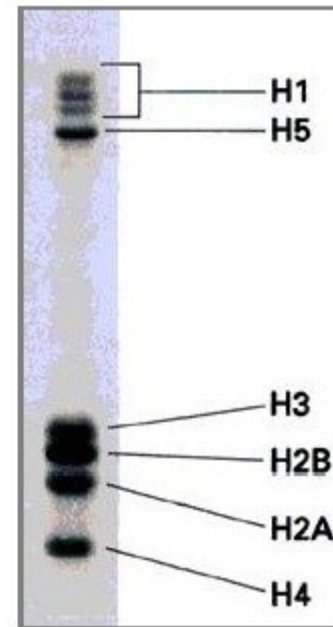


Histony

Chromozom je nukleohistonový komplex



Histony obsahují pozitivně nabitě (bázické) aminokyseliny. Ty se vážou k negativně nabitým vláknům DNA, která mají kyselý charakter.



Historie

- brněnský kněz a středoškolský profesor **Johann Gregor Mendel** (1865) se zabýval křížením různobarevných odrůd hrachu

- Genotypové zákony:

- **Zákon o samostatnosti alel**

Genotyp je soubor samostatných genů určujících znaky. Každý znak je určen dvojicí samostatných alel.

- **Zákon o segregaci alel**

Dvojice samostatných alel se při zrání rozcházejí a do každé gamety přechází jedna z obou alel.

- **Zákon o nezávislé kombinaci alel**

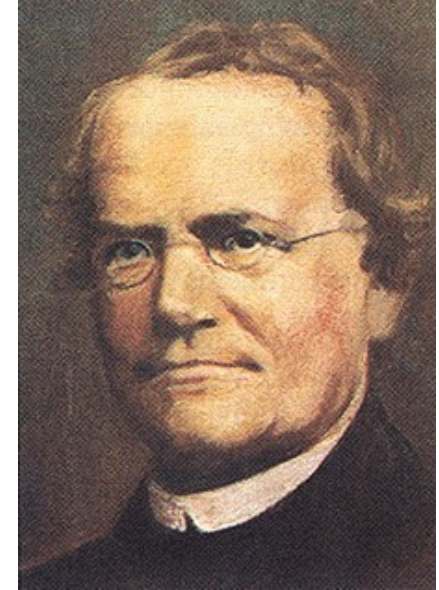
- Fenotypové zákony

- **Zákon o uniformitě hybridů**

Křížíme-li dominantního homozygota s homozygotem recesivním, jsou jejich potomci F1 generace v sledovaném znaku všichni stejní. Reciproká křížení u jakýchkoliv jedinců F1 generace dávají shodné výsledky.

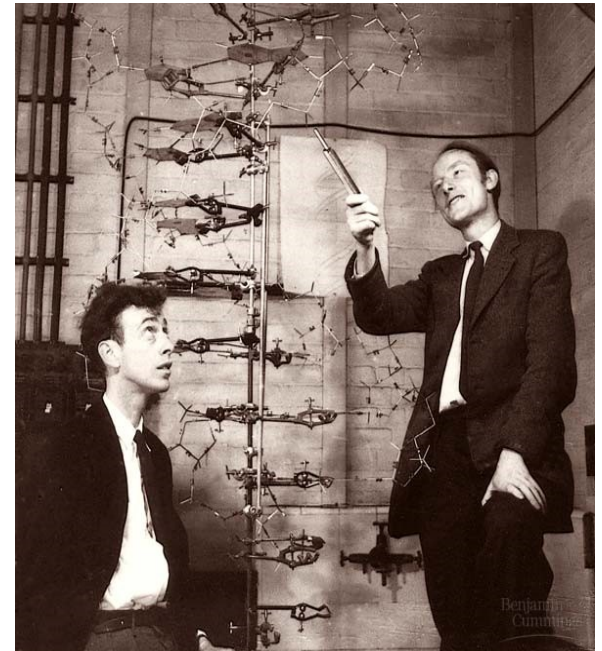
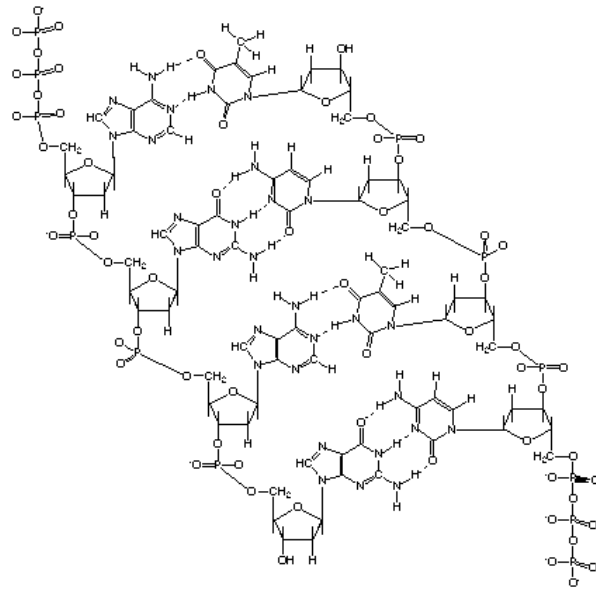
- **Zákon o štěpení v potomstvu hybridů**

Při křížení heterozygotů lze genotypy a fenotypy vzniklých jedinců vyjádřit poměrem malých celých čísel. Vzniká genotypový a fenotypový štěpný poměr.



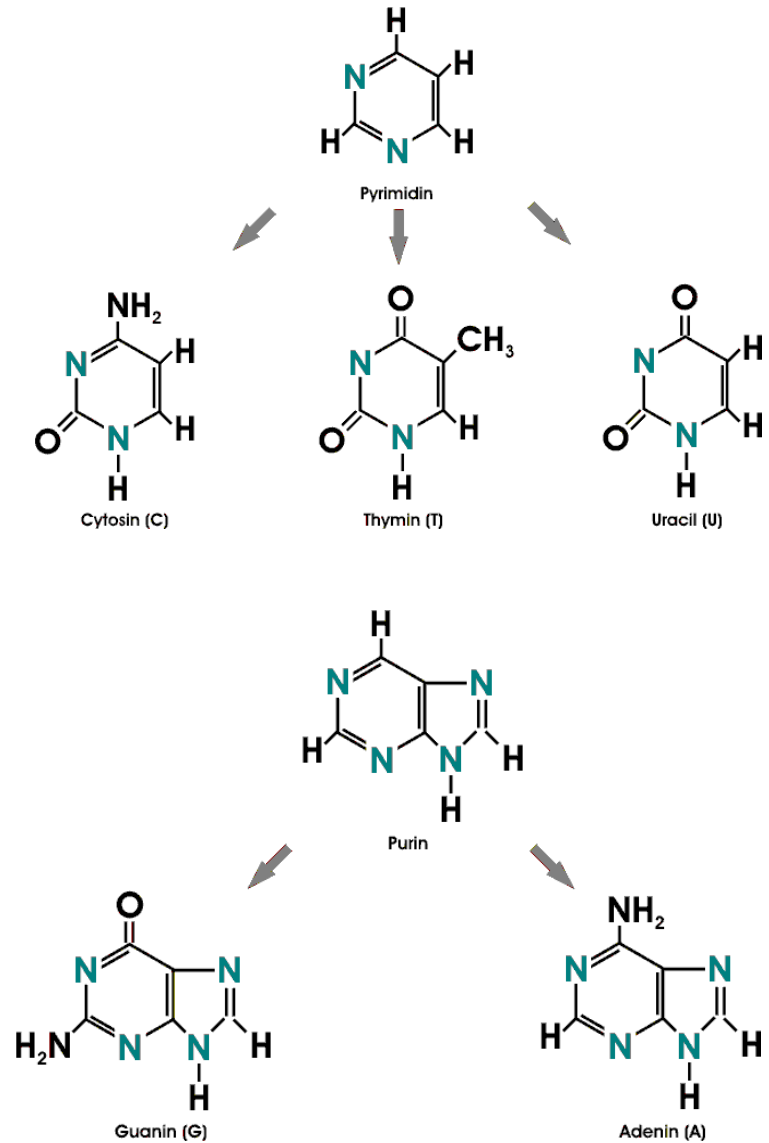
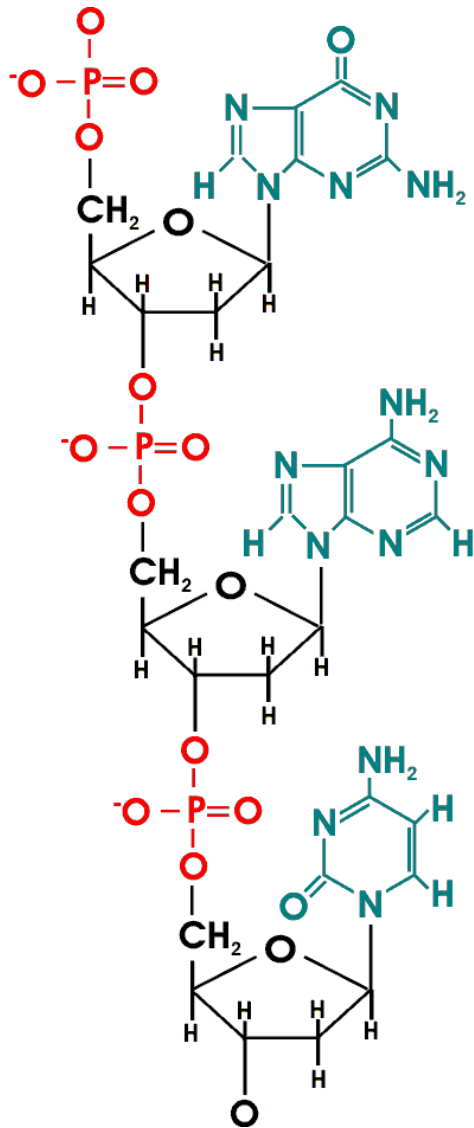
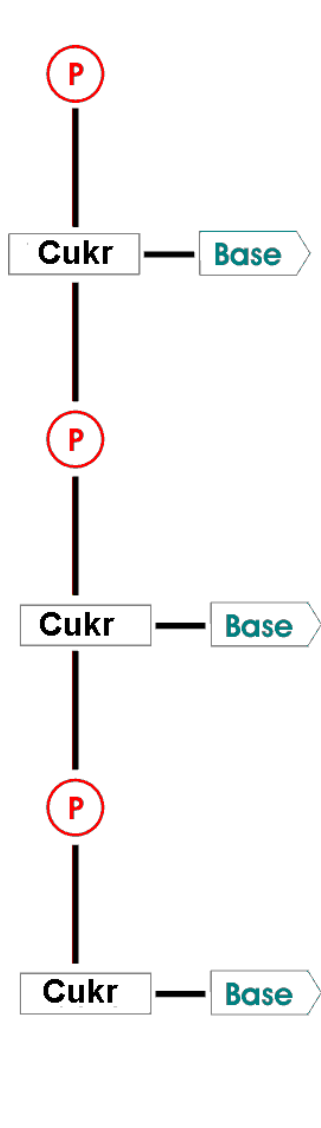
DNA

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



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

Nukleosid ■ nukleotid ■ báze ■ DNA



Gen

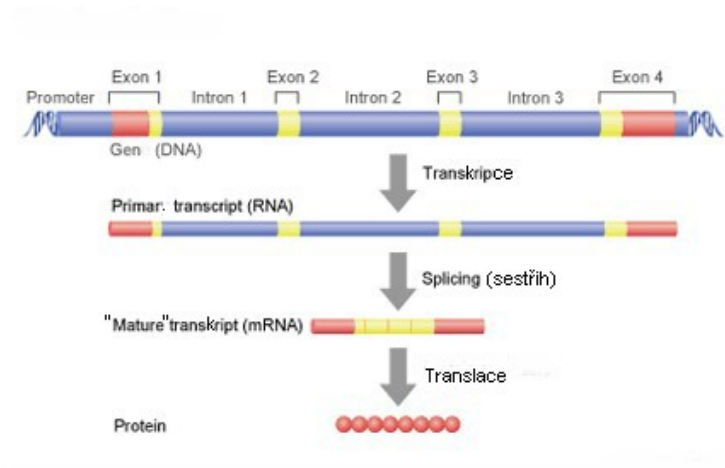
základní jednotka dědičnosti

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

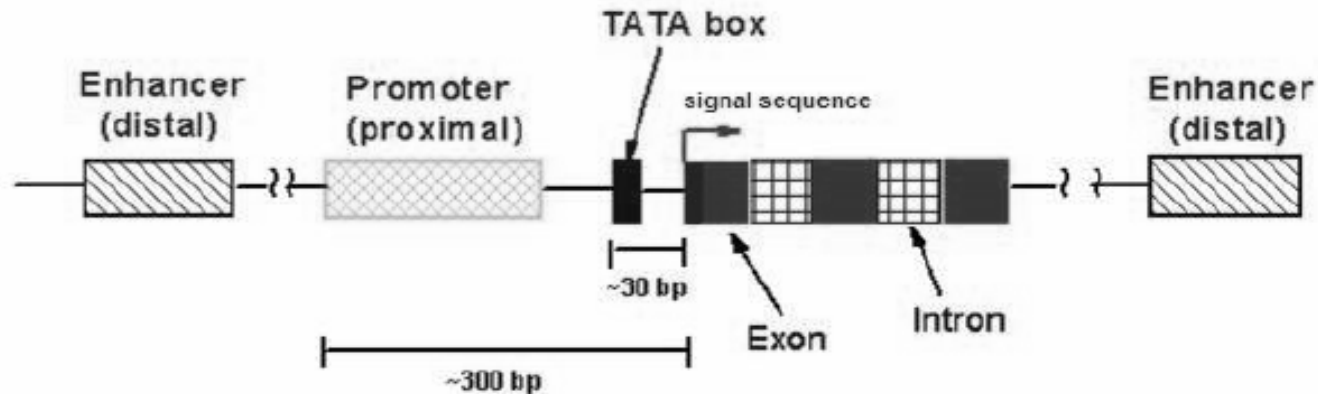
- geny strukturní
- geny pro RNA
- geny regulační (promotory)
- **exony** = funkční úseky genu, které jsou přepisovány do mRNA a dále translantovány při proteosyntéze
- **introny** = úseky genu, jejichž funkce dosud nebyla zcela objasněna a které nejsou využívány pro translaci

Dle jejich obsahu geny dělíme na:

- **jednoduché - obsahují pouze exony**
- **složené - obsahují i introny**
- **genové rodiny** = sekvenčně podobné geny, které vznikly zřejmě duplikací během evoluce, např. geny pro (hemo)globiny, imunoglobuliny...



Struktura genu



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

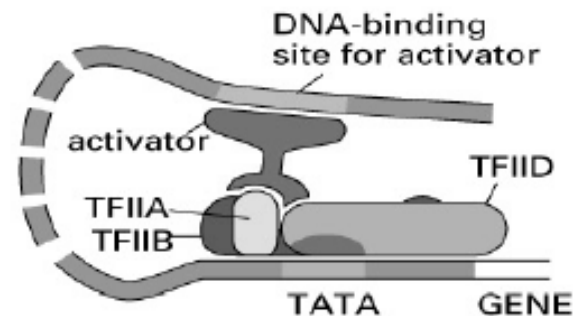


Figure 7-44. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

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

Struktura genu

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

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

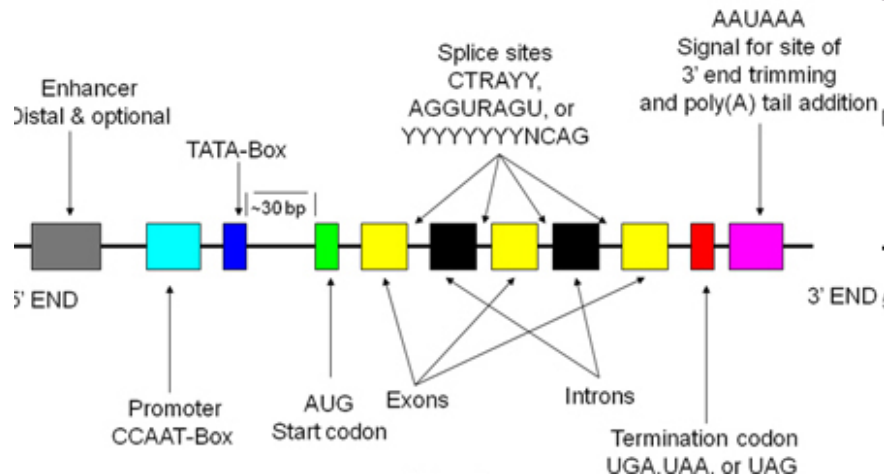
Enhancer: Část sekvence genu která interaguje s transkripčními faktory a tak zvyšuje účinnost transkripce. Je umístěna upstream nebo downstream od kódující sekvence a může být stovky bází daleko od kódující sekvence kterou kontroluje.

Silencer: Opak enhanceru.

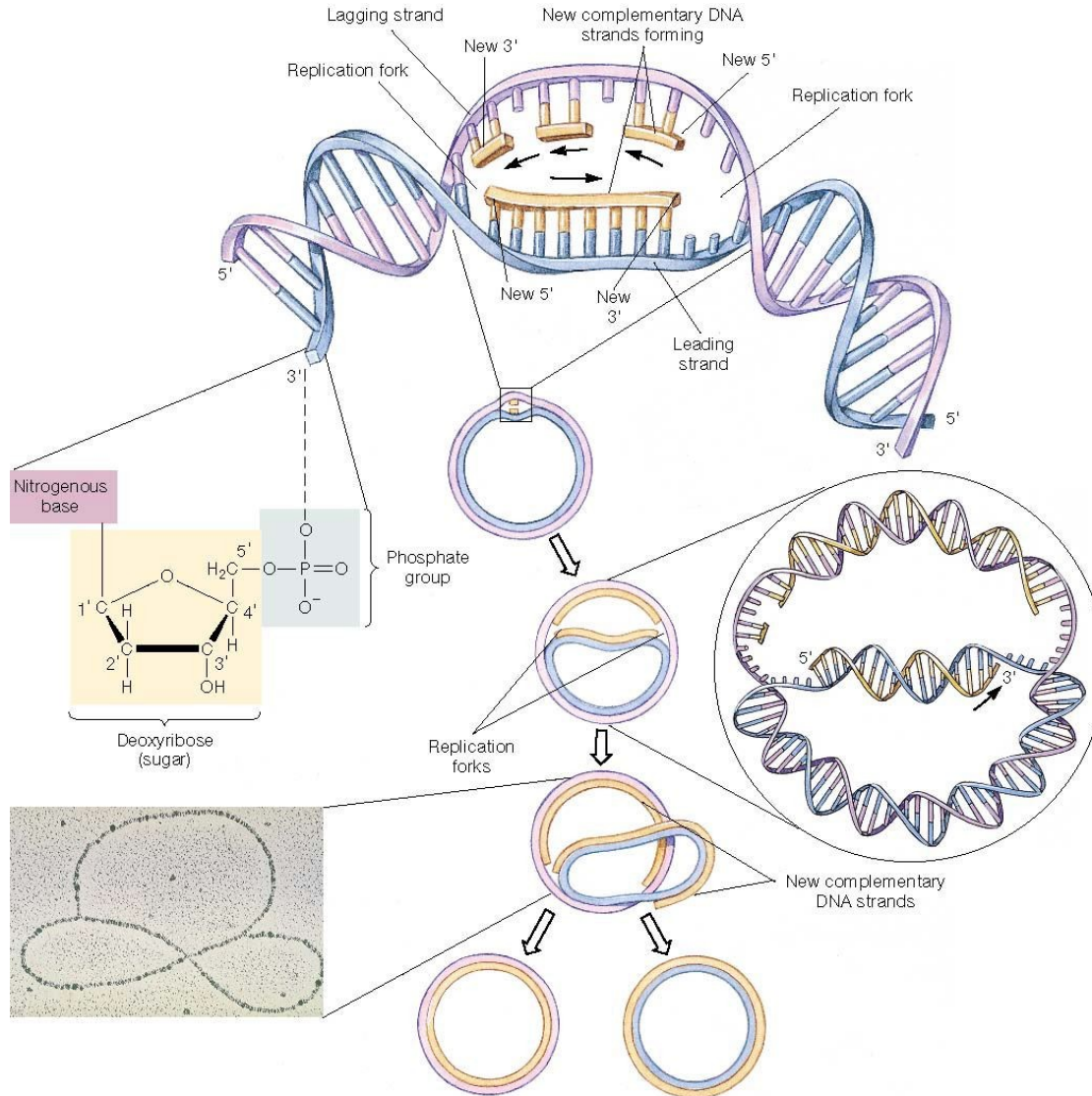
Transkripční faktory: Proteiny interagující se specifickou sekvencí DNA, většinou ovlivňující terciální strukturu DNA a tak regulují transkripční jednotku. Jsou buď aktivátory nebo represory viz výše.

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

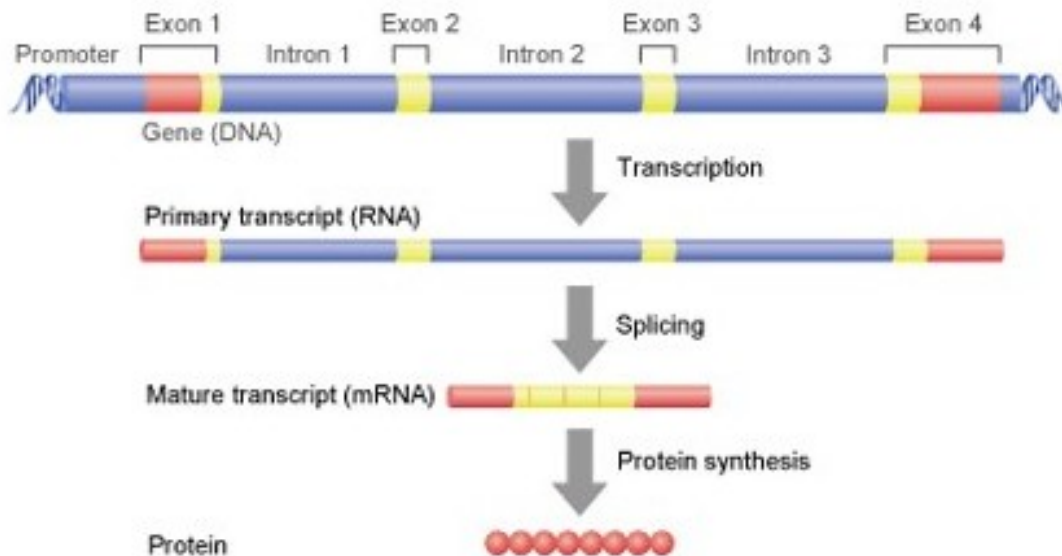
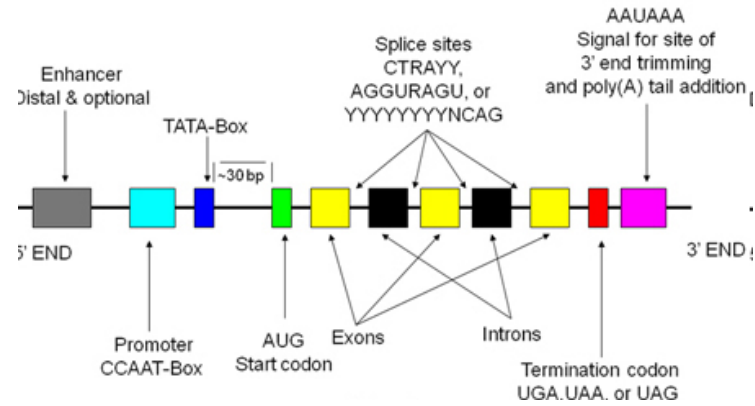
Signální sekvence: kóduje signální peptid, který předurčuje zacílení proteinu na buněčné úrovni a následně se odštěpuje.



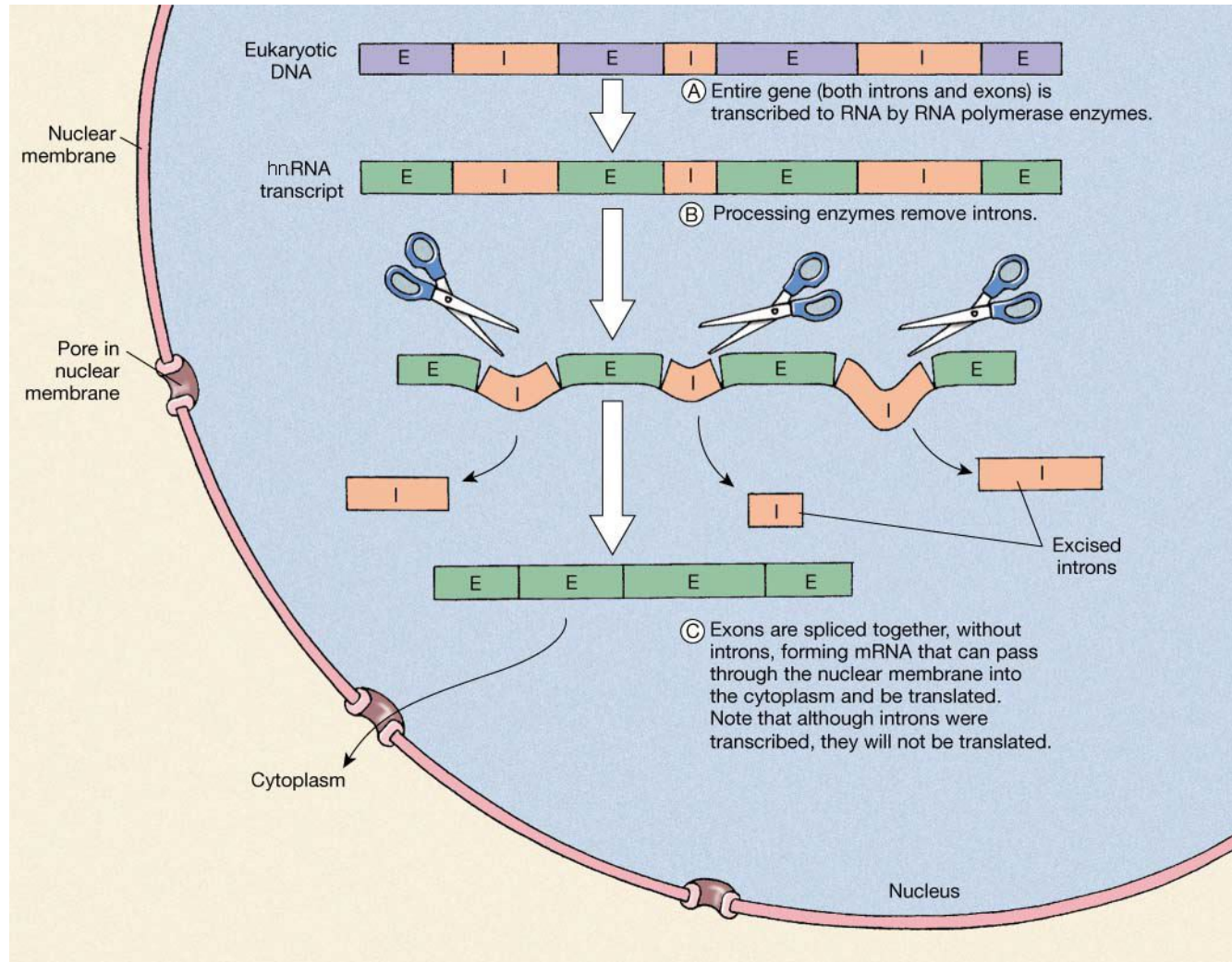
DNA replikace



transkripce

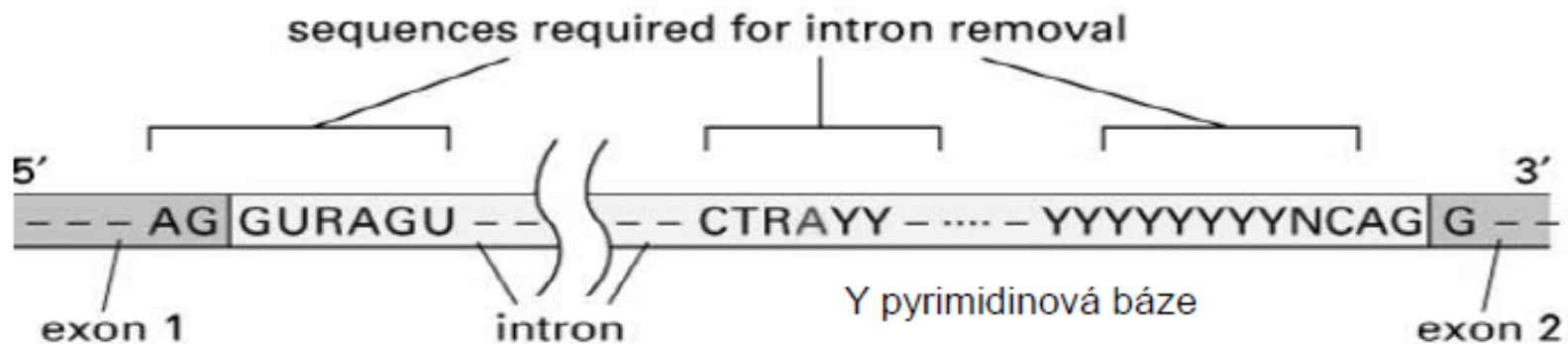


transkripce - RNA “splicing”

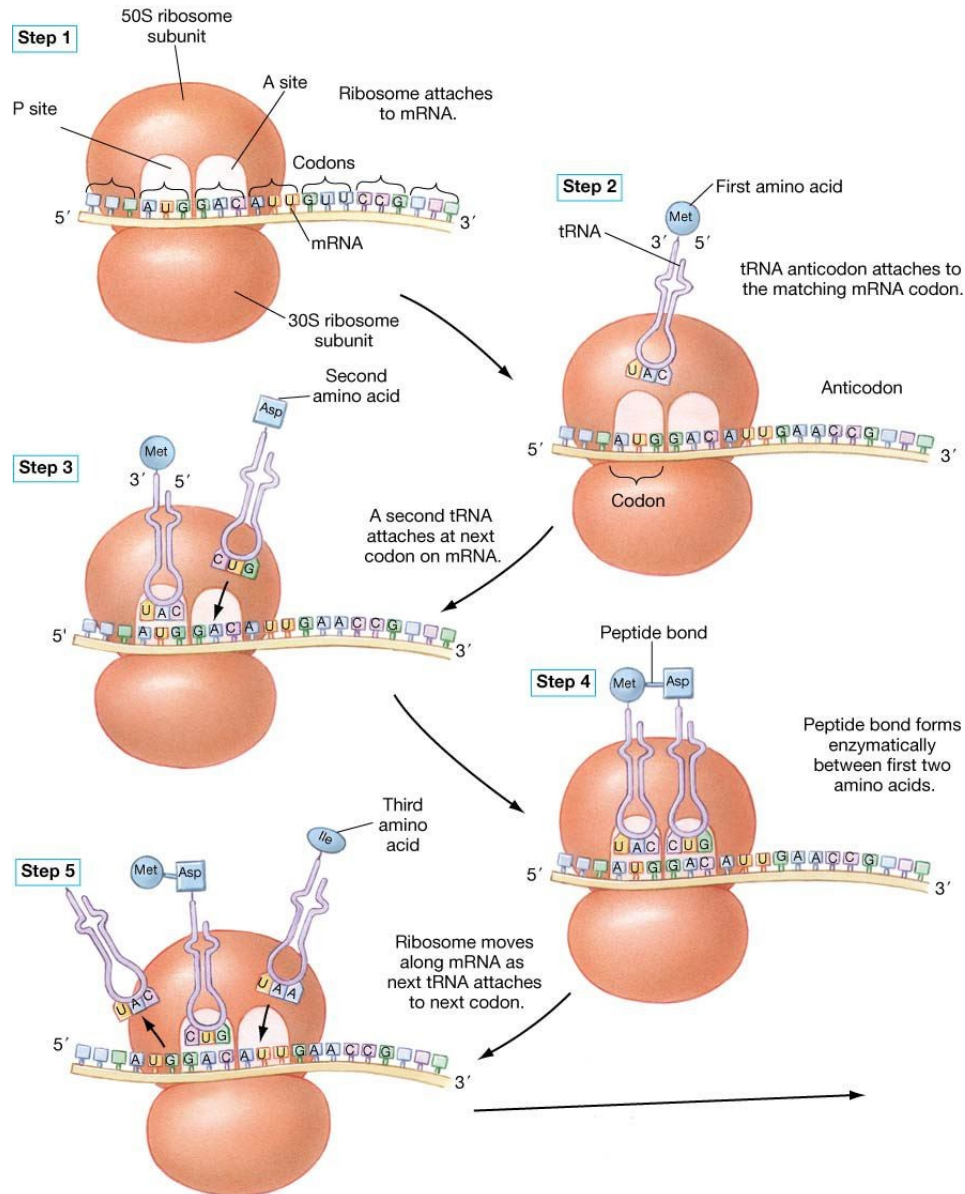


Posttranskripční úpravy mRNA

- **Čepička (capping).** modifikovaný guanozin (m^7G) je přidáván na 5'-konec většiny mRNA. Stabilita mRNA a podílí se na vazbě k ribozomu.
- **Polyadenylace.** 100-200 bp dlouhá sekvence polyadenozinu je přidávána na 3'-konec většiny eukaryotické pre-mRNA. PolyA konec není kodován v DNA.
- **Sestřih intronů a exonů.** introny jsou vyštěpeny a exony spojeny dohromady ve struktuře zvané spliceozom.



Translase

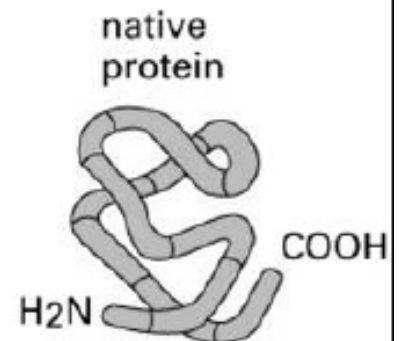


RNA ---- protein

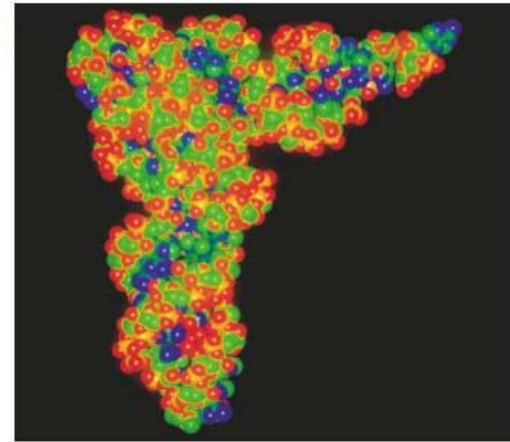
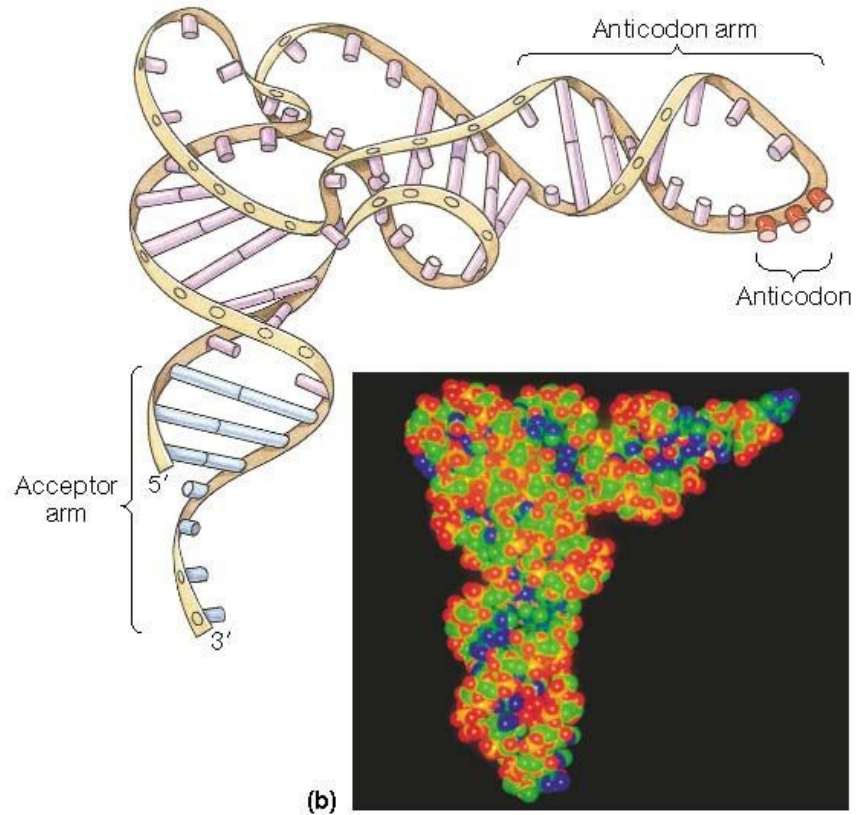
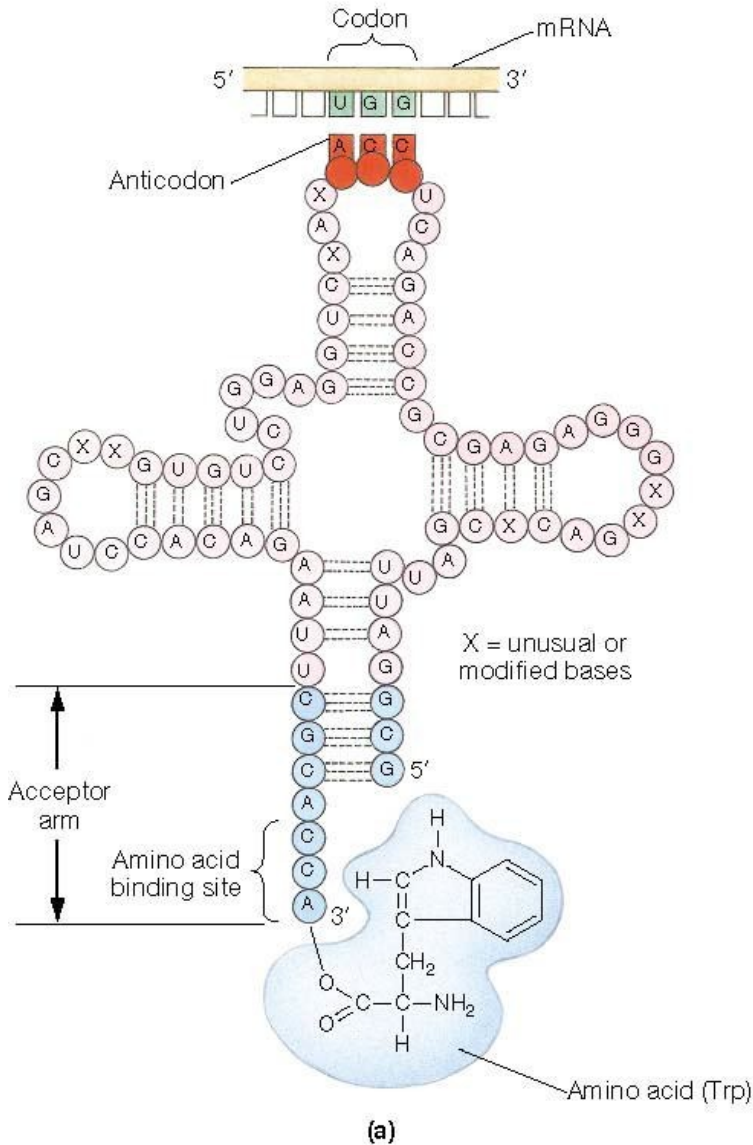
- **Translace** (syntéza proteinů): Translace je proces přeměny informace z RNA do aminokyselinového řetězce (polypeptidu) probíhající v cytoplasmě. Zralá mRNA je transportována do cytoplasmy k ribozomům (mnohdy vázané na endoplasmatickou retikulární síť).
- **Ribozóm** se skládá ze strukturní rRNA a 80 různých proteinů, které tvoří malou a velkou podjednotku.
- **Iniciace**: Zachycení mRNA a nalezení start kodonu **AUG**, který koduje methionin.
(M je odštěpen během postranslačních úprav nebo společně se signálním peptidem)
- **Elongace**: Přidávání různých AK v aktivované formě vázané na tRNA a vytváření peptidové vazby mezi amino a karboxylovou skupinou.
- **Terminace**: STOP kodón (**UAA, UAG nebo UGA**)

Posttranslační úpravy:

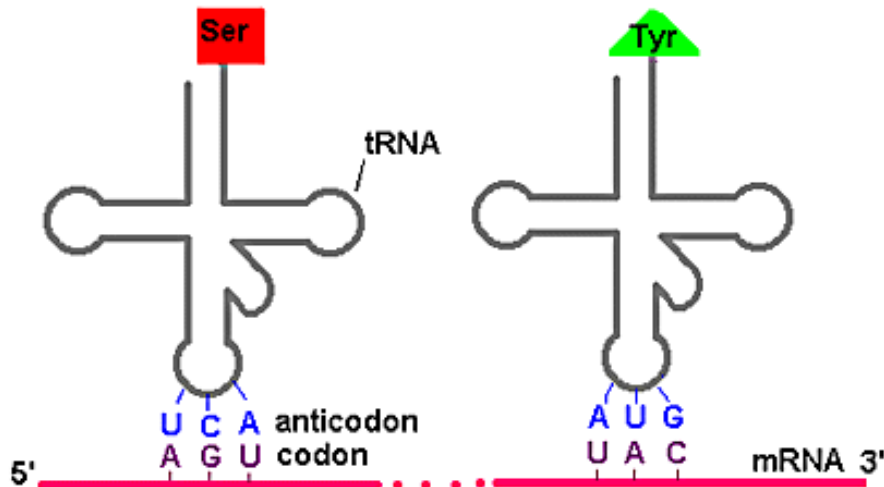
- Fosforylace, glykosylace, organelové cílení a odštěpení signálního peptidu, složení do aktivního stavu (vytvoření terciální a kvartérní struktury).



Translace – detail tRNA / AK



Genetický kód



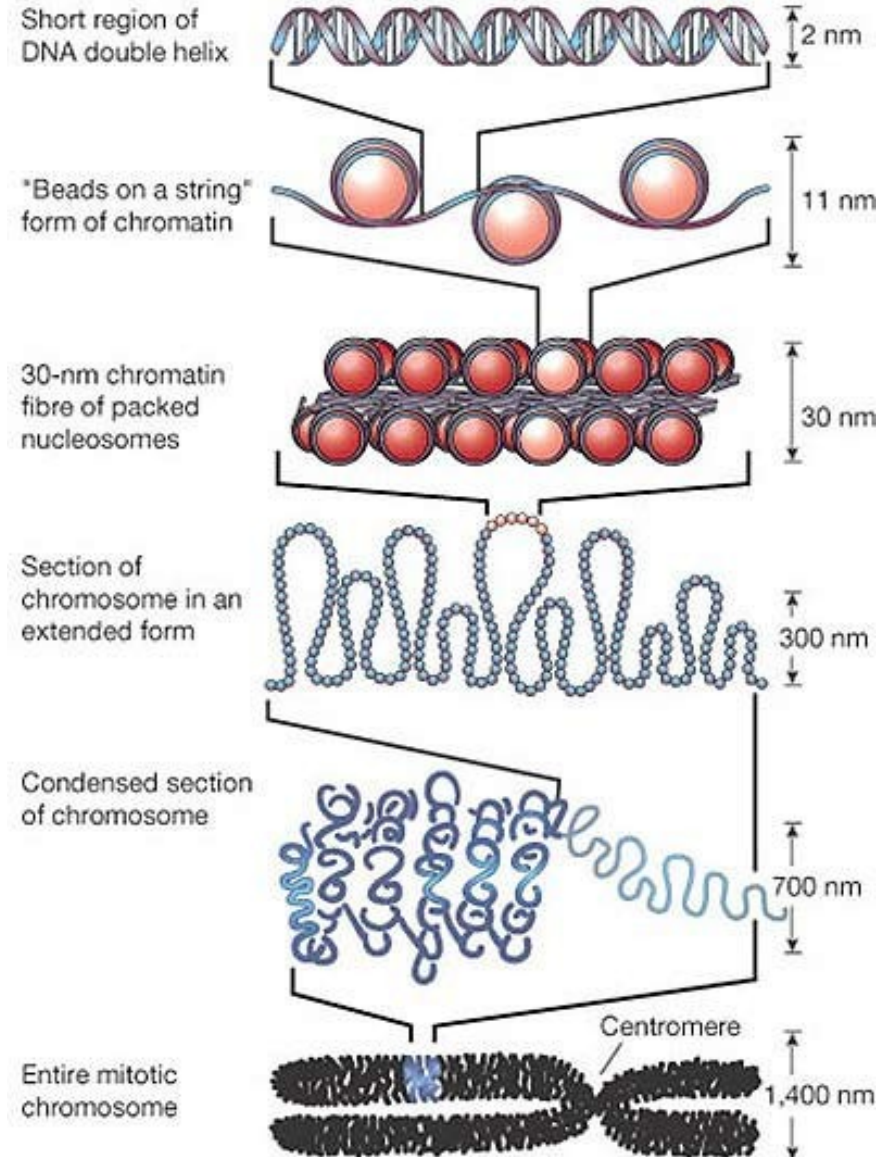
1. pozice 2. pozice 3. pozice

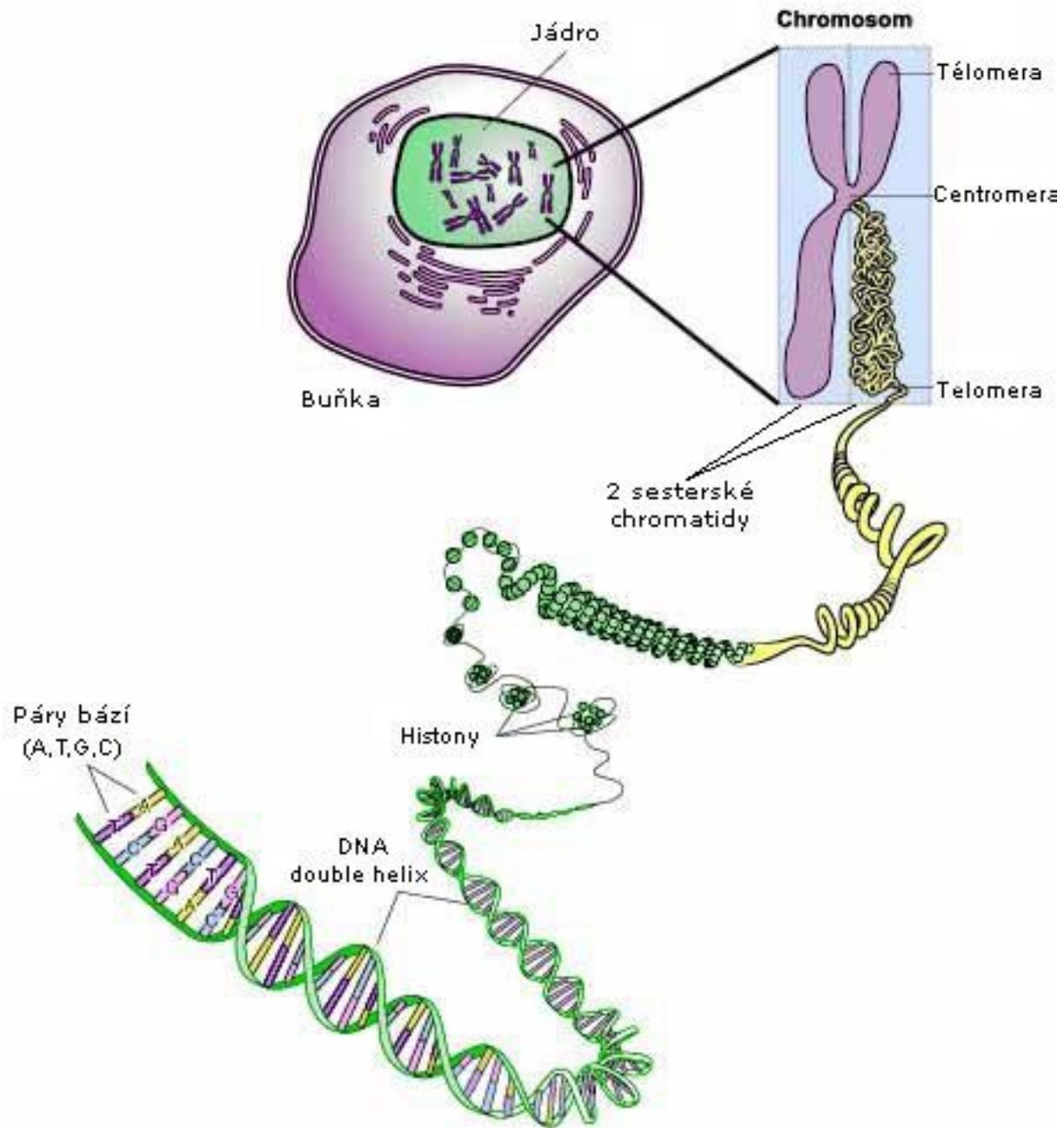
| | U | | C | | A | | G | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|---|
| U | UUU | Phe | UCU | Ser | UAU | Tyr | UGU | Cys | U |
| | UUC | Phe | UCC | Ser | UAC | Tyr | UGC | Cys | C |
| | UUA | Leu | UCA | Ser | UAA | Stop | UGA | Stop | A |
| | UUG | Leu | UCG | Ser | UAG | Stop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

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

Chromatin ■ chromatida ■ chromozom

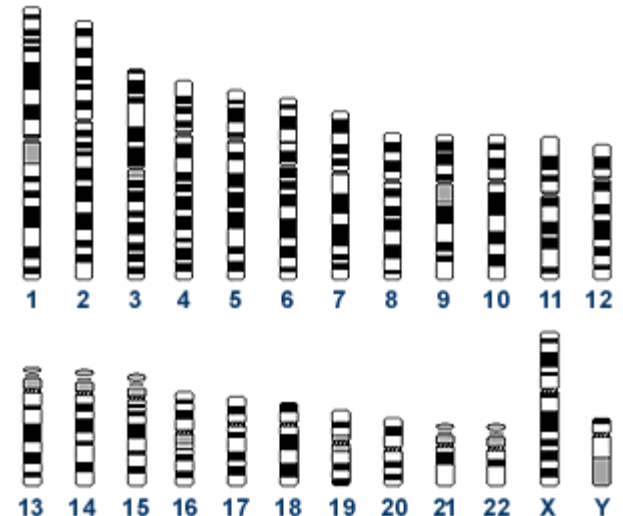
- DNA je organizována v **chromozomech**
 - chromatin + chromozomální proteiny (histony)
- chromozom = lineární sekvence genů přerušovaných nekódujícími úseky
- v nedělicí se buňce je **chromatin** rozprostřen volně v jádře
- u dělicí se organizuje do viditelných chromozomů
- struktura chromozomu
 -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



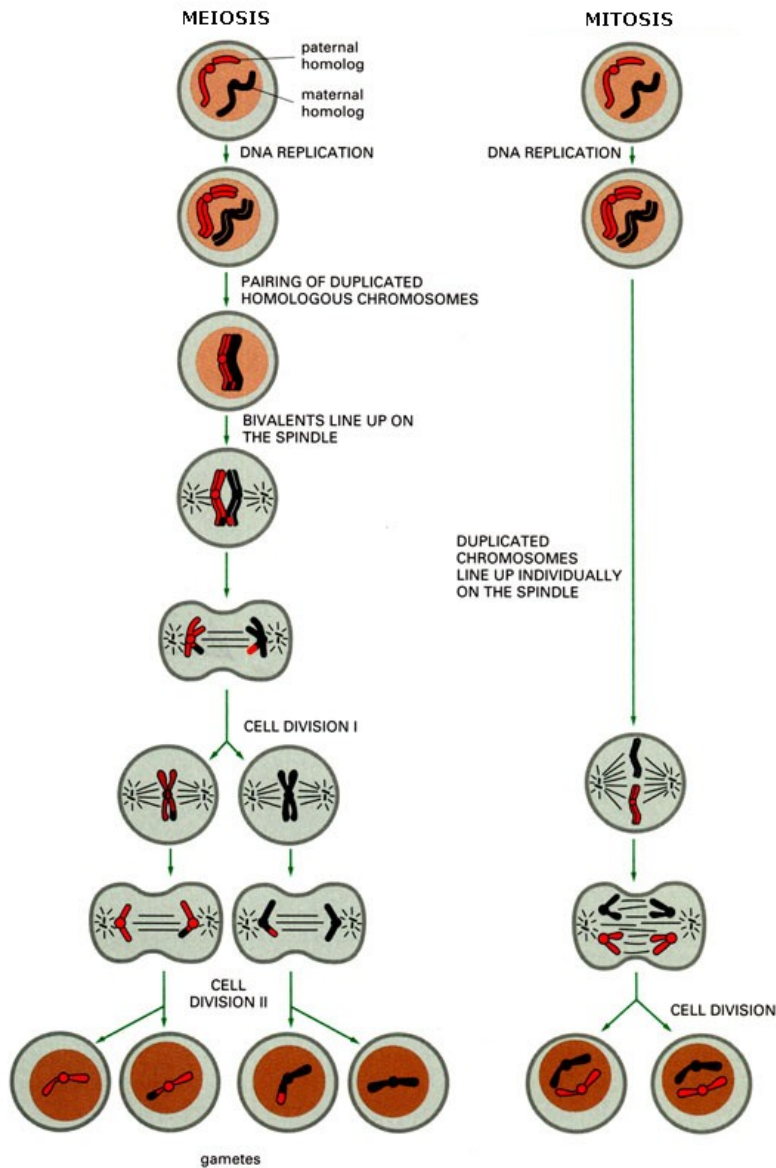


Karyotyp člověka

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



Dělení buněk



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

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

1.meiotické (redukční) dělení – rozdělení homologních chromozomů

významné – odehrává se zde meiotický crossing-over (rekombinace) – žádná z gamet není identická!

poruchy rozestupu – např. trisomie

2.meiotické dělení – rozestup sesterských chromatid

2 dceřinné buňky s haploidním počtem chromozomů

vznik pohlavních buněk (spermie, vajíčko)
dodatečné promíchání genetického materiálu crossing-overem

Mitóza - detail

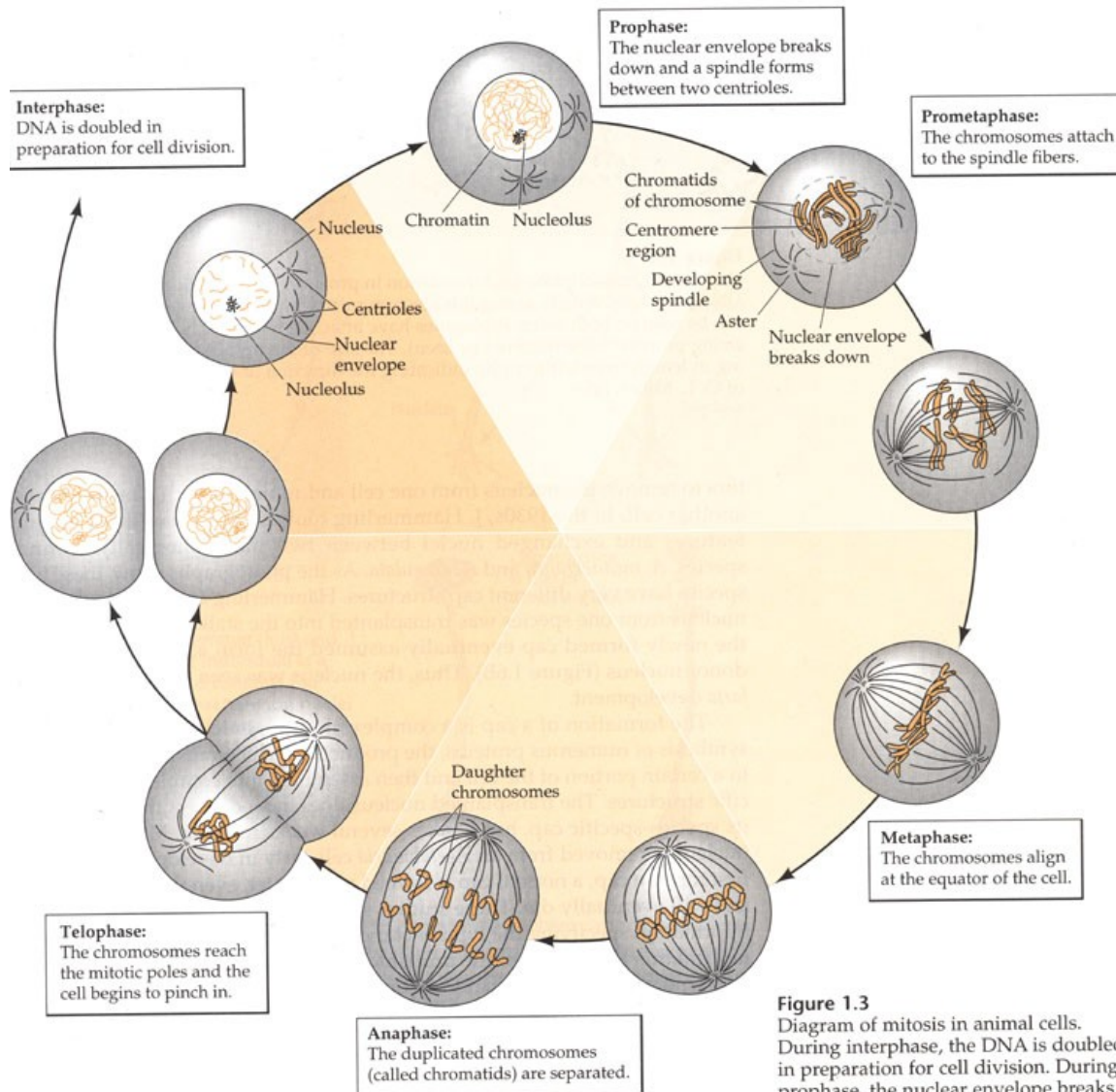
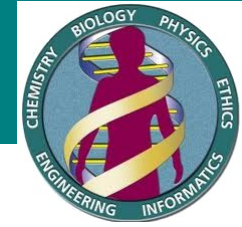


Figure 1.3
Diagram of mitosis in animal cells. During interphase, the DNA is doubled in preparation for cell division. During prophase, the nuclear envelope breaks down and a spindle forms between the

Lidský genom



Human Genome Project (HUGO)

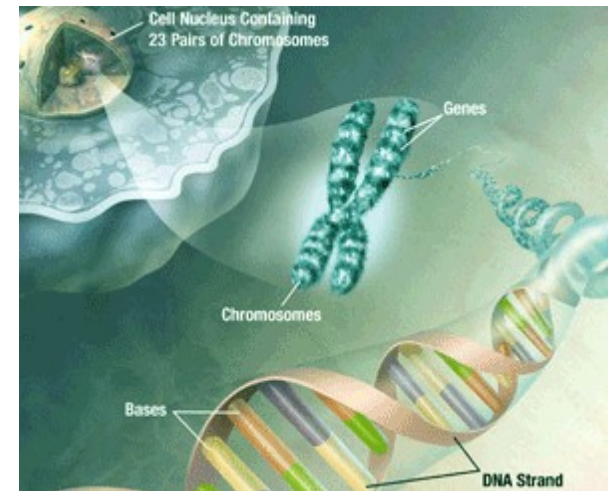
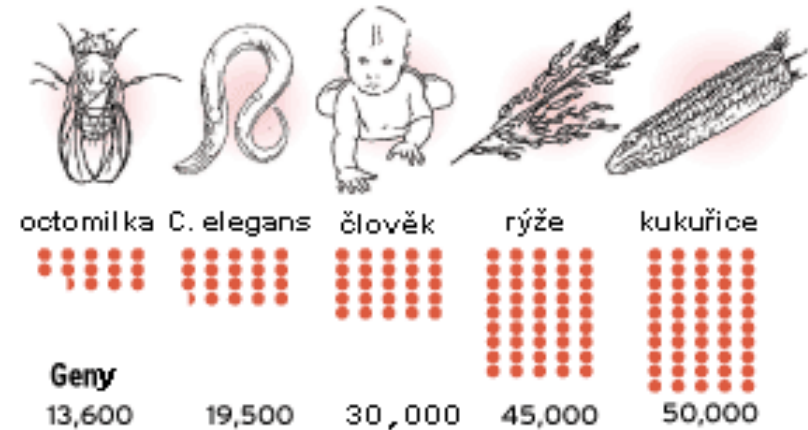
J. Watson (1990- 2003)

(The first complete human genome was only decoded in 2007)

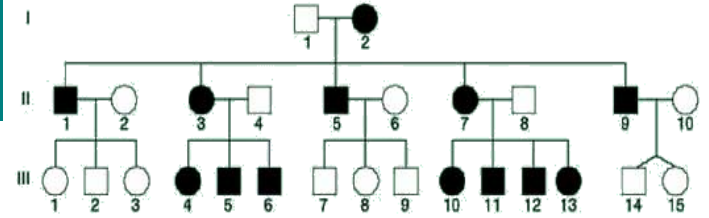
haploidní genom obsahuje cca 3.3×10^9 bp

- **gen** = konkrétní úsek molekuly DNA nesoucí informaci pro tvorbu proteinu nebo NA (rRNA, tRNA...)
~ 21 tisíc genů (2011)
- **pseudogen** = sekvence DNA, která je podobná genu, ale nedochází k jejímu přepisování v RNA (transkripci)
~ 20 tisíc pseudogenů
- **genom** = soubor všech genů v jedné buňce,
genom jaderný a mitochondriální (mtDNA)
několik desítek genů kódujících proteiny zapojené v mitochondriálních procesech
přenos pouze od matky!
v jádru diploidní lidské buňky 22 párů chromozomů (autozomy) a pár pohlavních chromozomů X/Y (gonozomy) = karyotyp
- hustota genů na jednotlivých chromozomech heterogenní
 - pouze ~ 10 % kódující sekvence
 - ~ 75 % se skládá z jedinečné (neopakující se) sekvence
 - zbytek repetitivní sekvence

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

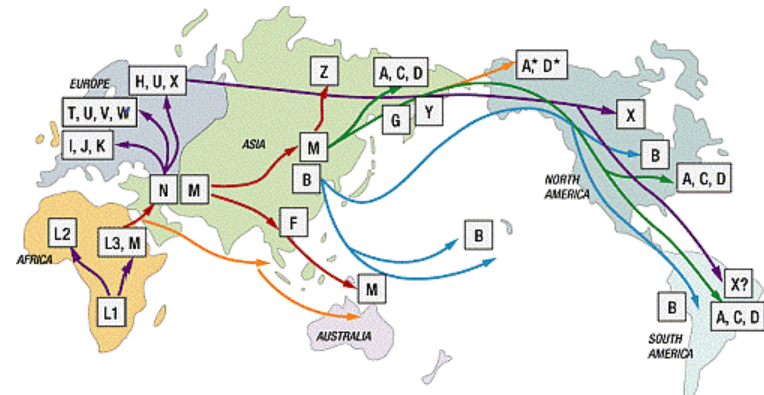
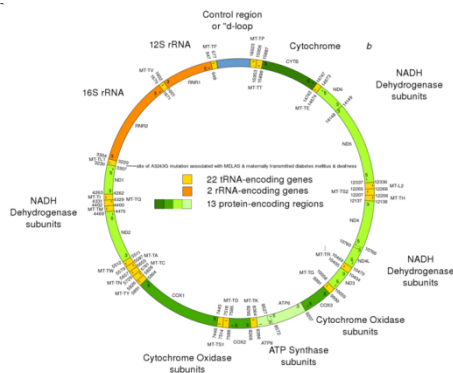


Mimojaderná DNA



mitochondriální DNA

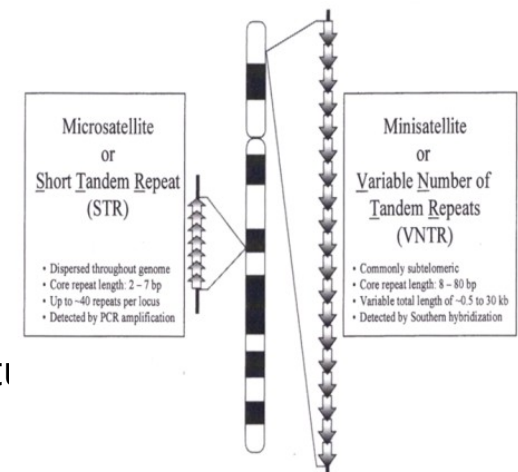
- původ: alfaproteobakterie pohlcena eukaryotickou buňkou
- mnoho genů během evoluce bylo z mtDNA horizontálně přeneseno do buněčného jádra (geny v jádře kódující různé mitochondriální proteiny silně připomínají bakteriální proteiny)
- ~ 16,5 tisíce bp
- kóduje 37 genů
 - 24 genů pro různou nekódující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



Repetitivní sekvence

Repetitivní sekvence = DNA s vysokým množstvím kopií

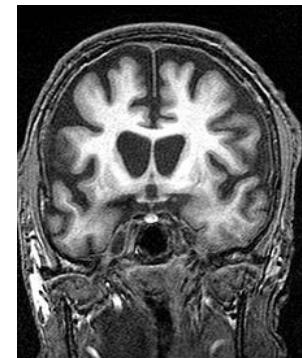
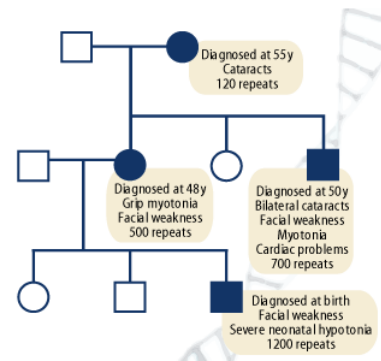
- se podílí na formování vyšších nukleoproteinových struktur, jako jsou telomery nebo centromery
 - při chromozomových přestavbách, mají vliv na regulaci genové exprese při procesu zvaném RNA interference, zajišťují ochranu konců lineárních chromozomů, řídí správný průběh mitotického i meiotického dělení buňky
 - zřejmě udržují strukturu chromozomů, možná jsou "evoluční" rezervou
-
- **rozptýlené**
 - DNA transpozony (př. „Sleeping Beauty“ – genová terapie)
 - retrotranspozony
 - endogenní retroviry = LTR
 - autonomní – LINE – L1-repetice
 - neautonomní – SINE – Alu-repetice
 - **tandemové** = za sebou jdoucí identické repetice, VNTR
 - mikrosatelity – opakování 1- 5 bp
 - minisatelity - v rozsahu kilobází, které se více vyskytují v oblastech chromozomů
 - genetické markery



Repetitivní sekvence-význam

expanze trinukleotidových repetit

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



Telomery a jejich funkce

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

Hayflickův limit pro každou buňku

telomery - mitotické hodiny

repetice TTAGGG

telomeráza - v zárodečných buňkách

- v nádorových buňkách

telomerázová terapie:

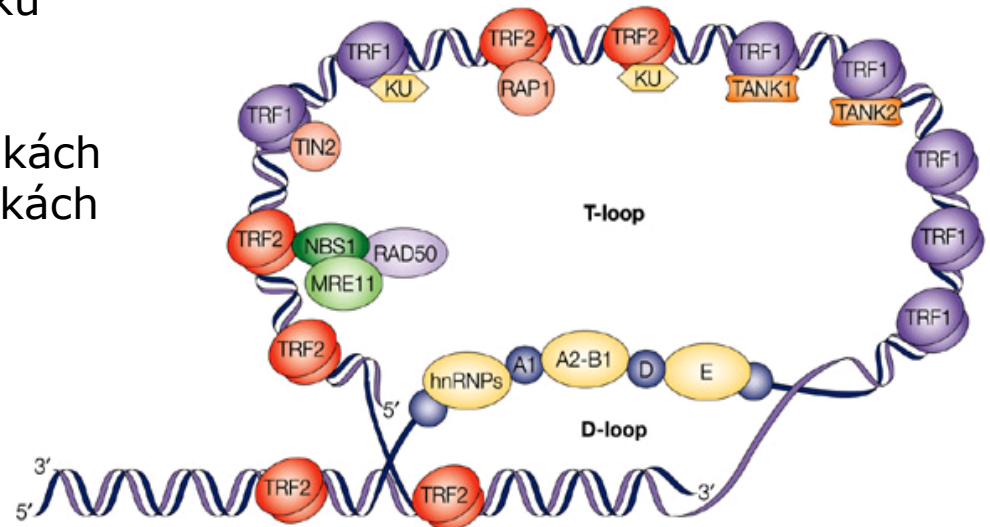
nízkomolekulární inhibitory

antisense oligonukleotidy

RNA interference

genová terapie

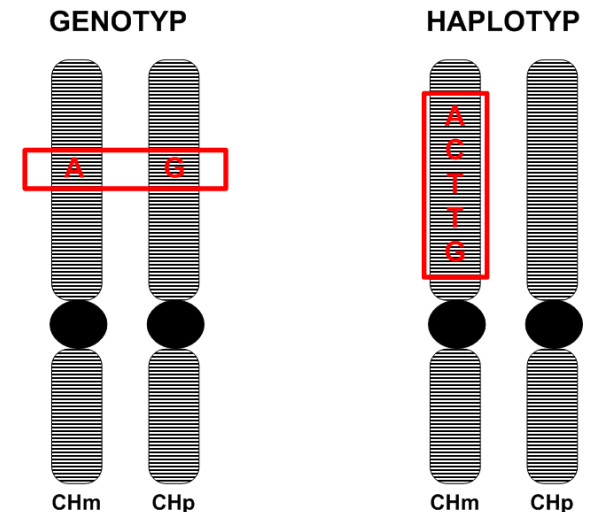
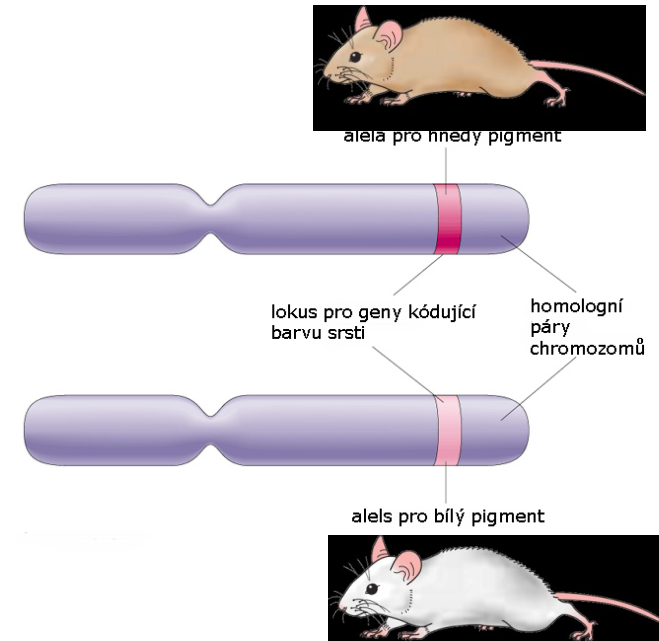
imunoterapie



Aktivace x blokace

Gen ■ alela ■ genotyp ■ fenotyp

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



Jak velký genom sdílí člověk s banánem?

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



Epigenetika

- Genom eukaryotického organismu obsahuje tisíce genů, nejsou exprimovány v každé buňce
- Buňky si syntetizují jen ty proteiny, které potřebují ke své funkci
- Genetická výbava každé buňky jedince je však identická.



EPIGENETICKÁ DĚDIČNOST

Pojmenovaná britským biologem Conradem Waddingtonem r. 1940 - Něco „navíc“, „mimo“ v porovnání s mendelistickou genetikou

Umožňuje buňkám s identickým genotypem vznik odlišných fenotypů a přenos informace do dalších buněk

Epigenetické faktory ovlivňují fenotyp bez změny primární struktury genotypu, t.j. epigenetická informace není zakódovaná v sekvenci nukleotidů

Samotný epigenom je tvořen během buněčné diferenciace v embryonální fázi, kdy se z pluripotétních buněk vyvíjejí buňky specializované

Diferenciační proces je ve změně exprese genu, aktivní geny se mohou vypnout a neaktivní geny zapnout, výsledkem je diferencovaná buňka - tato buňka nese tzv. „vzor“ genové exprese, který je dědičný a specifický pro daný buněčný typ.

Epigenetická dědičnost

Spontánní a reverzibilní.

Epigenetické mechanismy zasahují na úrovni:

A. transkripční aktivity genů:

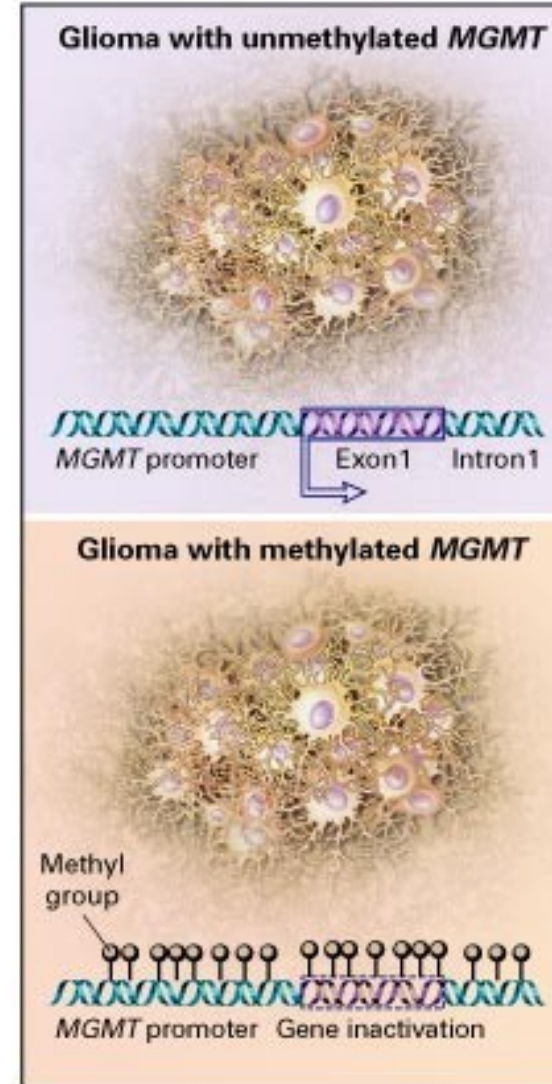
1. DNA metylace (CpG metylace)
2. Modifikace histonů (acetylace a deacetylace histonů)

B. post-transkripční aktivity genů:

1. RNA interference (RNAi)

1. DNA Metylace

- Typ modifikace, která je děděna bez změny sekvence DNA
- Stabilizuje kondenzovanou konformaci chromatinu- udržuje geny v inaktivním stavu
- Má důležitou roli v genomovém **imprintingu a inaktivaci chromozómu X**
- Podstatou metylace je přidání metylové skupiny na cytosin v CpG párech za vzniku 5 - metylcytosinu za přítomnosti enzymu DNA metyltransferázy (DNMTázy)
- Některé DNMTázy metylují DNA de novo, ale většina metyluje jen nemetylované vlákno v hemimetylované DNA, tzv. dědičná metylace
- CpG jsou seskupené do CpG ostrůvků, přítomné v oblasti **promotoru**, regulační oblast pro mnoho genů
- Metylace DNA se podílí na umlčování genů
- Abnormální hypermetylace CpG v promotoru tumor-supresorových genů v maligním nádoru vede k utlumení transkripce tumor-supresorových genů
- Cílená léčba nádorových onemocnění spočívá v inhibici DNA metyltransferáz a dosažení exprese tumor-supresorových genů.



2. Modifikace histonů

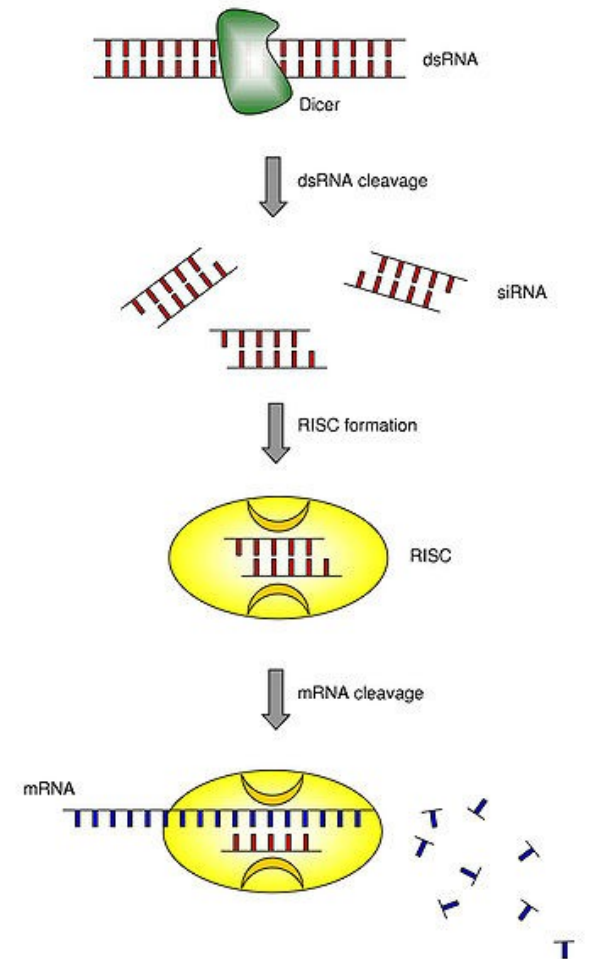
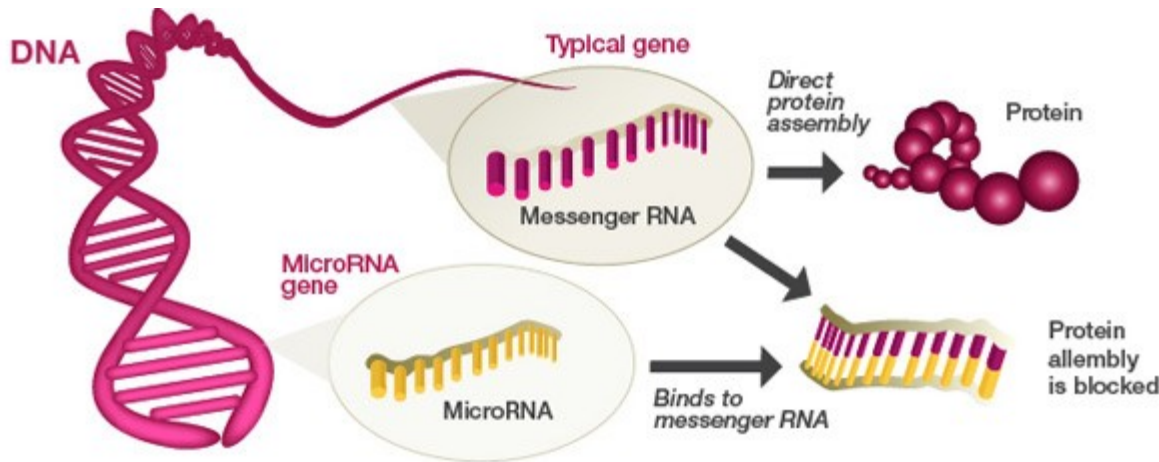
- Samotná struktura chromatinu je důležitá pro regulaci transkripce.
- Modifikace histonů vede k vytvoření transkripčně **neaktivního heterochromatinu**.
- Velký význam má NH₂ – skupina lysinu, která má kladný charakter, proto se může vázat s negativně nabitými fosfáty v DNA.
- Ionovou vazbou se DNA v oblasti lysinu váže těsně s histony a tím dochází k blokování transkripce.
- Modifikace histonů a tedy také úroveň transkripce je regulovaná pomocí **deacetyláz a acetyláz**.
- Účinkem deacetyláz dochází k tvorbě inaktivního chromatinu a tím zastavení transkripce genu.
- Acetylázy eliminují pozitivní náboj lysinů v histonech a tím se poruší těsná interakce DNA-histon. Transkripční faktory mají přístup k DNA a transkripce genu může začít.

3. RNA interference (RNAi)

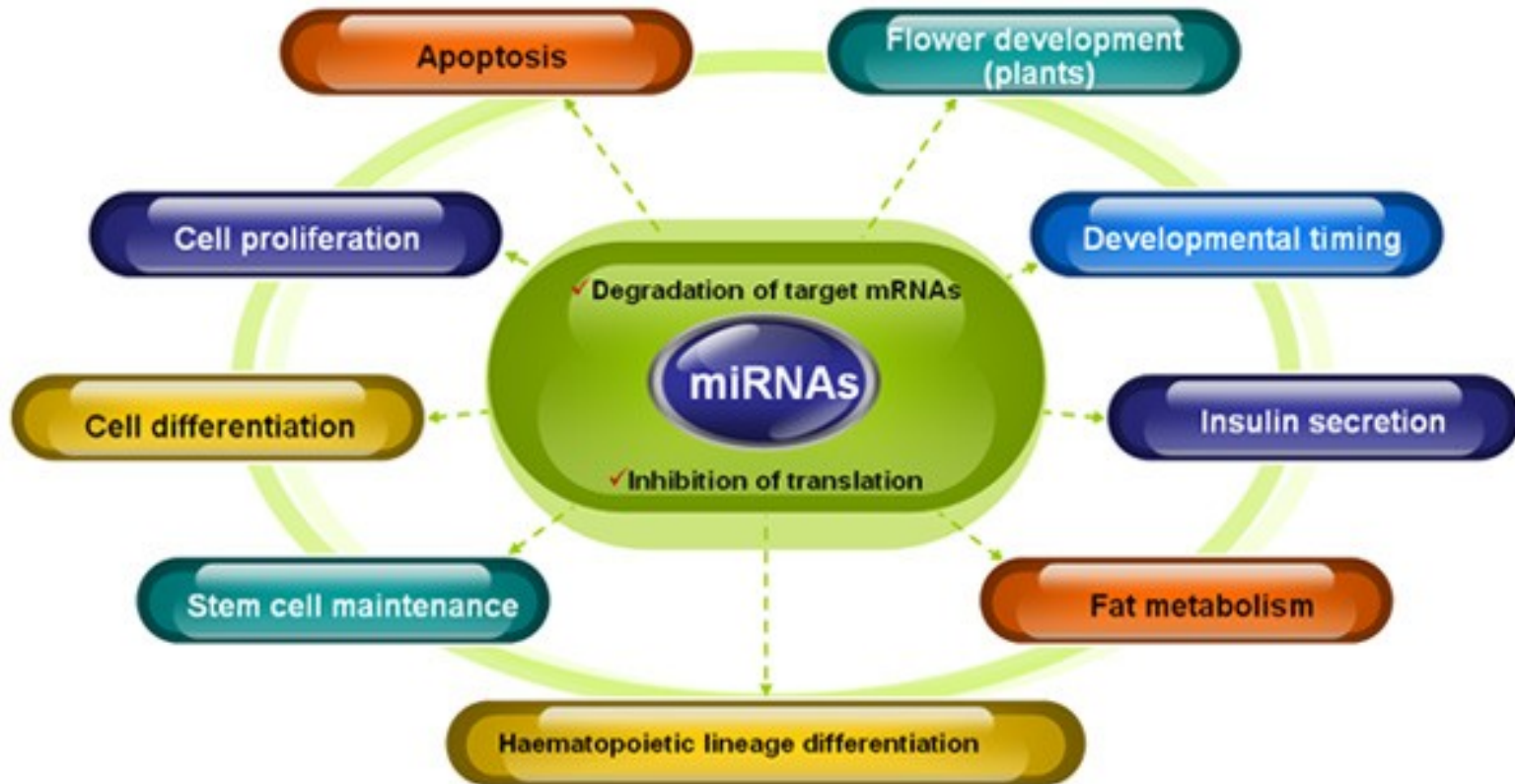
Proces, při kterém interferují (párují se) nekódující molekuly RNA s cílovými úseky mRNA, což má za následek zabránění genové exprese těchto mRNA. Řadíme ho mezi posttranskripční mechanismy genové exprese.

microRNA

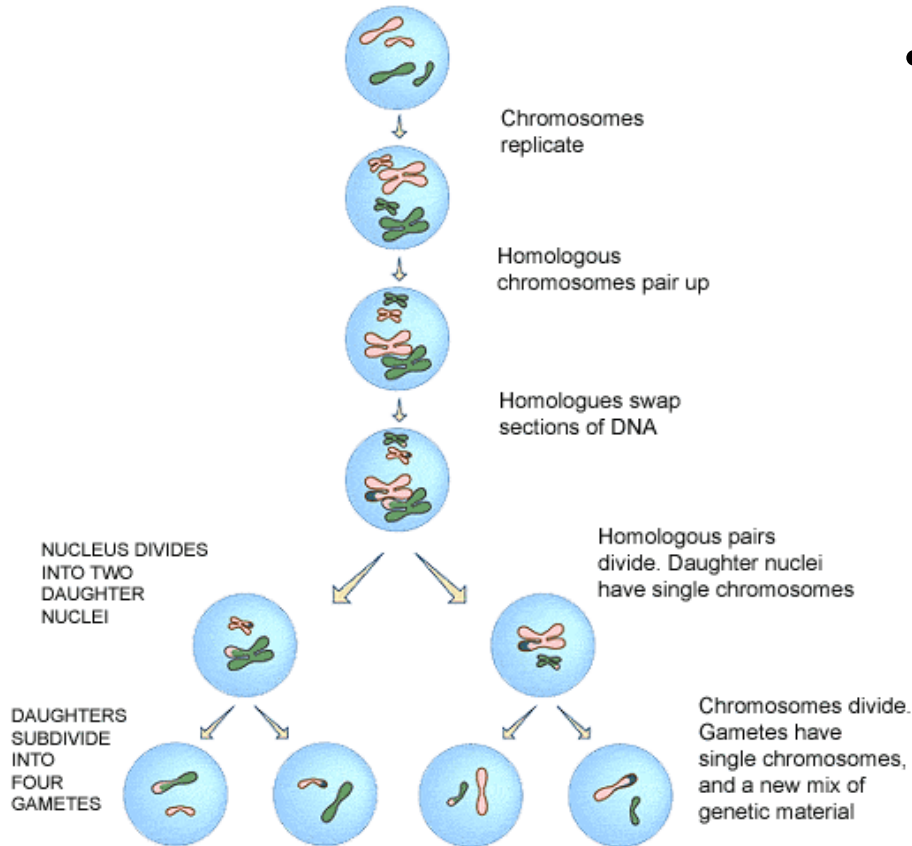
jednovláknové řetězce nekódující RNA o délce 21-23 nukleotidů, které se podílejí na regulaci genové exprese. miRNA vznikají transkripcí z genů v DNA, ale následně nedochází k jejich translaci v protein.



microRNA



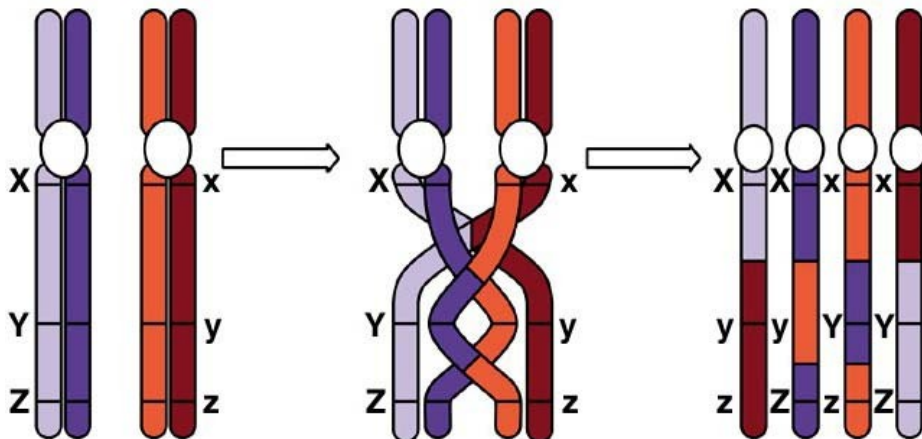
Genetická variabilita (~0.1%)



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

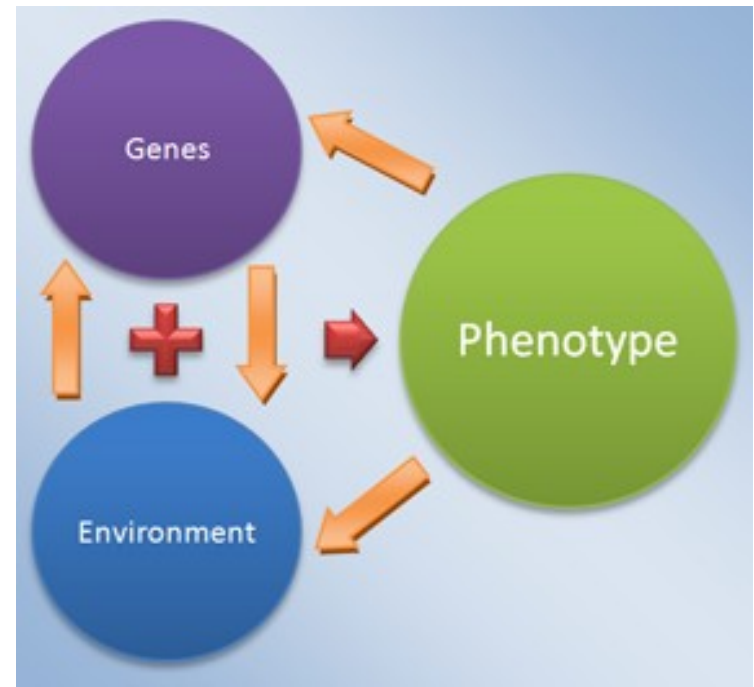
Crossing-over a rekombinace

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



Vliv prostředí na lidský genom

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



Genetická proměnlivost

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

Mutace

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

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

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

Mutace

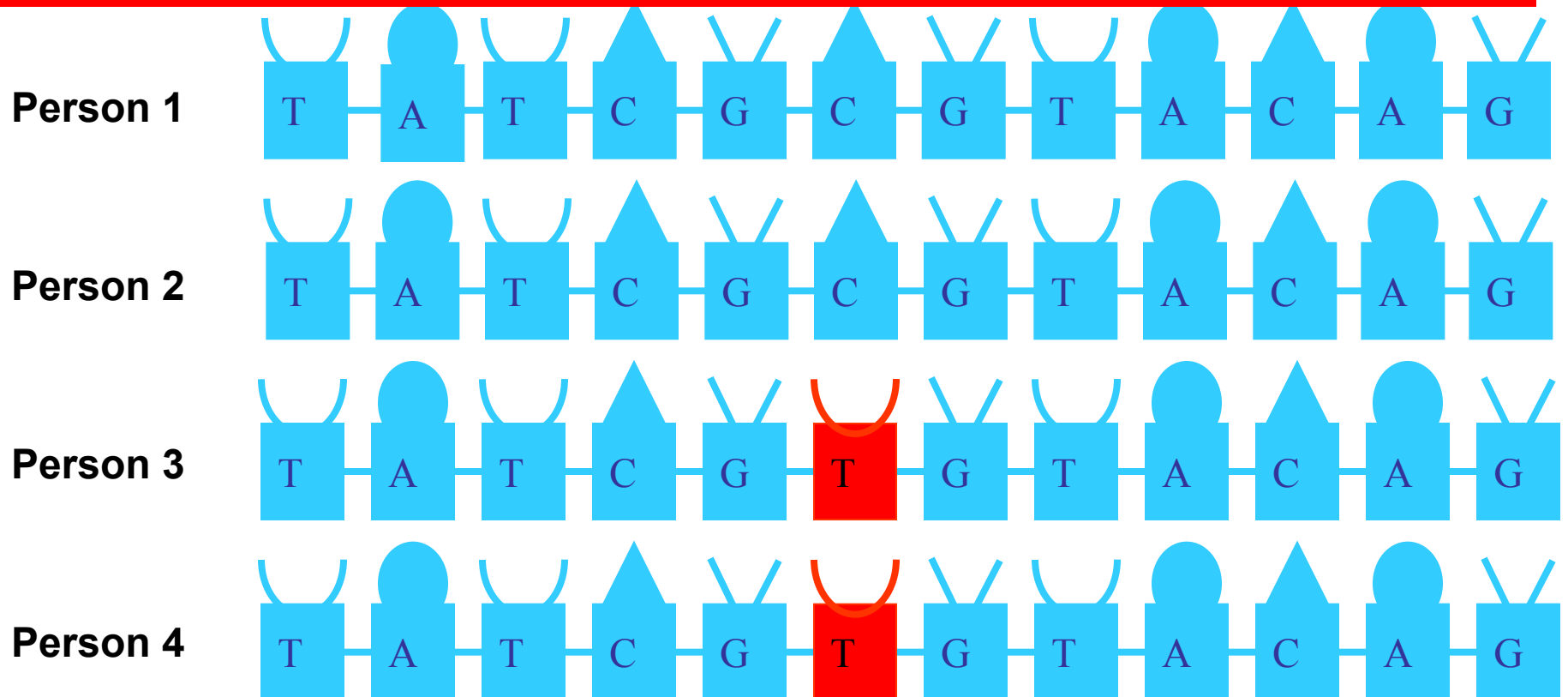
- **vzácné mutace** - jsou výrazně patologické a tudíž jsou z populace odstraňovány selekcí, nebo vznikly nedávno a nestačily se v populaci rozšířit, vyskytuje se v populaci méně než v 1 %
- **germinativní mutace** - přenášeny na potomstvo (často příčinou zániku plodu), u potomka přítomny ve všech buňkách, mají vliv na vývoj druhu, „úspěšnost“ germinativní mutace 1:100000
- **somatické mutace** - vznikají v somatických buňkách v průběhu života (maligní transformace x žádný fyziologický vliv)

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

mutace = méně častá alela má populační frekvenci <1%

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

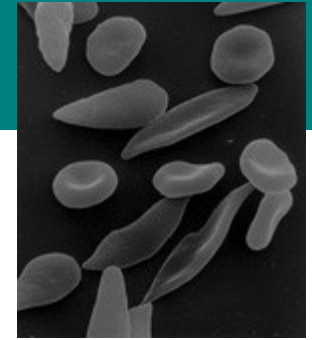
Most Variants Change a Single DNA Base: Single Nucleotide Polymorphism (“SNP”)



Genové mutace

- mění jednotlivé geny (alely), většinou jsou indukované
- podstata je molekulární, mění se struktura DNA, ale nenarušuje se celistvost stavby chromozomu
- v somatických nebo v pohlavních buňkách
- mutace v regulačních genech pro množení a diferenciaci → nádorového onemocnění
- **bodové mutace - substitute** = záměna páru nukleotidu za jiný (→ změna AA sekvence, změna v regulaci, ovlivnění transkripce a translace... nebo tvorba STOP kodonu), transverze/transzice, spíše v exonech
- **delece/inzerce** = ztráta/zařazení nukleotidů (→ možný posun čtecího rámce), spíše v intronech

Genové mutace



Srpkovitá anemie

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

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

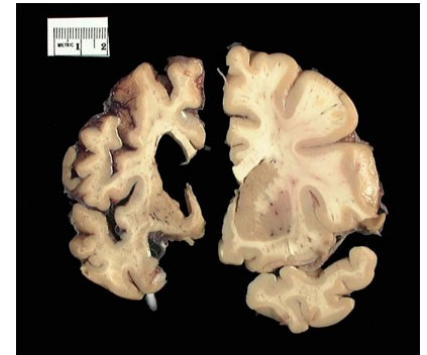
- Srpkovité červené krvinky mnohem hůř přenášejí kyslík. Lidé se srpkovitou anémií mají proto ve srovnání s obyčejnými lidmi červených krvinek víc. **To jim dává proti malárii velkou výhodu, díky níž mají lepší šanci přežít.**

Genové mutace

β^0 thalasemie

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

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



Huntingtonova choroba

- trinukleotidová expanze

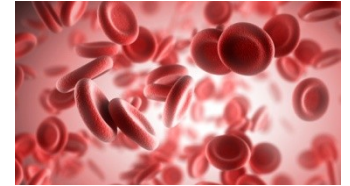
| | ancestral | mutant |
|------|-----------------|--|
| DNA | ...TAC-GTC-... | ...TAC-(GTC-GTC-GTC) ₂₀ -GTC-... |
| mRNA | ...-AUG-CAG-... | ...-AUG-(CAG-CAG-CAG) ₂₀ -CAG-... |
| AA | ...-met-gln-... | ...-met-(gln-gln-gln) ₂₀ -gln-... |

Genové mutace

Hemofilie A

= nedostatek srážecího faktoru VIII

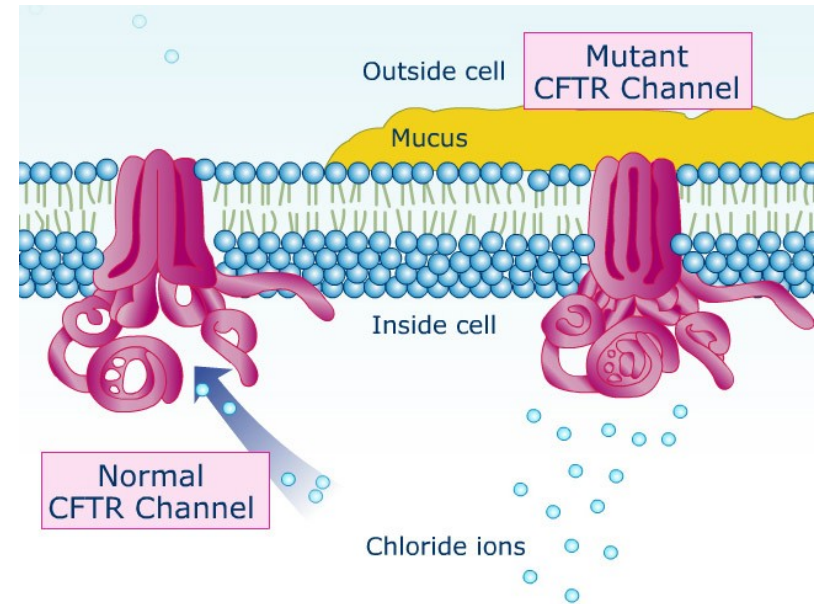
- inzerce 3000 bp – snížení tvorby proteinu
- gonozomálně recesivní – vazba na X chromozom
- žena je přenašečka



Genové mutace

Cystická fibróza

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

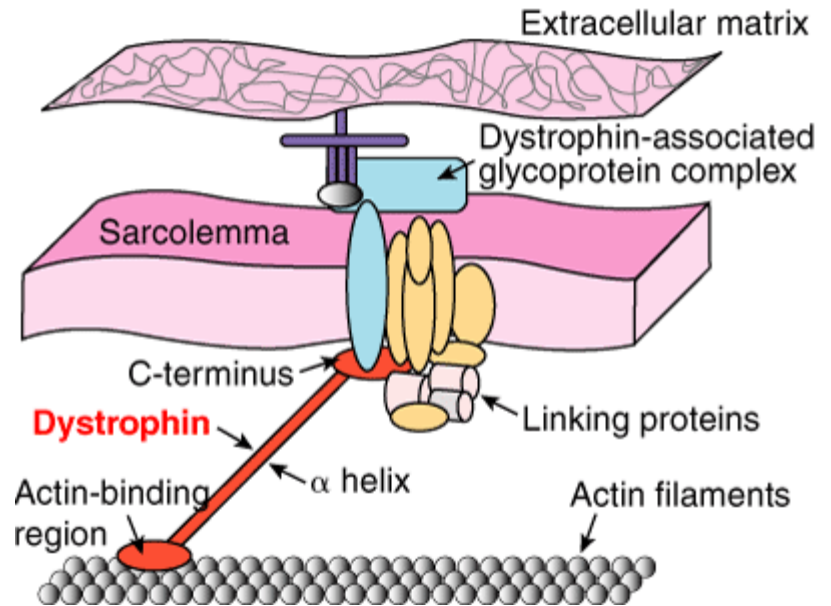


| | ancestral | mutant |
|------|----------------------------|------------|
| DNA | -TAG- AAA -CCA- | -TA A-CCA- |
| mRNA | -AUC- UUU - GGU- | -AUU-GGU- |
| AA | -ile- phe -gly- | -ile-gly- |

Genová mutace

Duchennova svalová dystrofie

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



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

Chromozomové mutace - aberace

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

Strukturní chromozomové aberace

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

Genomové mutace

Numerické chromozomové aberace

- způsobeny abnormálním počtem chromozomů v karyotypu
- struktura chromozomů je neporušená, patologicky se uplatňuje nestandardní množství genů
- vznikají díky chybě při rozchodu chromozomů do dceřiných buněk během buněčného dělení (nondisjunkce) nebo abnormalitami fertilizace či časně embryogeneze
- **aneuploidie** - numerická odchylka se týká pouze určitého chromozomu nebo chromozomů, ne však celé sady. Konkrétní chromozom může být buď znásoben - **trisomie** (3x - tři kopie chromozomu), **tetrasomie** (4x - čtyři kopie chromozomu), nebo naopak ztracen - **monosomie** (1x - jedna kopie chromozomu), **nulisomie** (0x - žádná kopie chromozomu)
- **polyploidie** - znásobena je celá chromozomová sada - porucha rozdělení celých sad nebo oplození spermii (dispermie]), u člověka přichází v úvahu zejména triploidie ($3n = 69$ chromozomů) a tetraploidie ($4n = 92$ chromozomů), většinou ale:
 - těhotenství je potraceno
 - molla hydatidosa (a pak těhotenství nutno ukončit potratem)
 - porod novorozence s triploidíí – velmi časná letalita

Genomové mutace

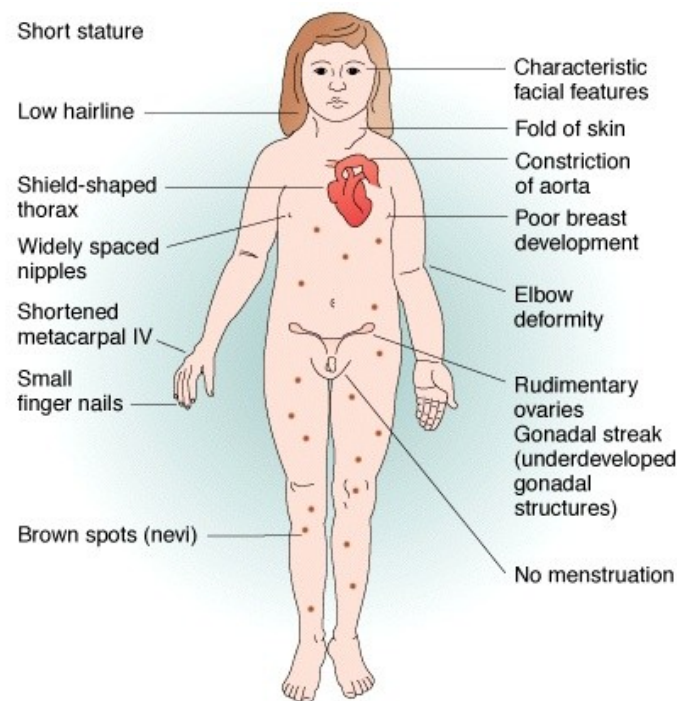
Aneuploidie (změna počtu chromozomů v sadě)

- **monosomie**

- gonozomální
 - Turnerův sy. (45, X0)

- **trisomie**

- autozomální
 - Downův sy. (47, XX/XY + 21)
 - Edwardsův sy. (47, XX/XY +18)
 - Patauův sy. (47, XX/XY +13)
- gonozomální
 - Klinefelterův sy. (47, XXY)
 - XXX sy.
 - XYY sy.



Genová terapie

- Zahrnuje jakoukoliv proceduru, určenou k léčení nemoci genetickou modifikací buněk pacienta.
- Do buněk se transferují: geny, jejich části nebo oligonukleotidy.
- Genová terapie in vivo: transfer přímo do buněk pacienta
- Genová terapie in vitro: genové modifikace probíhají mimo organismus
- Genová terapie ex vivo: modifikované buňky se vracejí do organismu

Klasická genetická terapie (dopřít geny do vhodných cílových buněk, aby bylo dosaženo optimální exprese vnesených genů) s cílem:

1. zajistit produkci látky, která chybí
2. aktivovat buňky imunitního systému ve snaze pomoci odstranit nemocné buňky

Varianty

- Inhibice exprese genů asociovaných s patogenezi
- Korekce genetického defektu a obnovení normální genové exprese
- Současná genová terapie se omezuje na terapii somatických mutací.
- Etické problémy s potenciální terapií zárodečných mutací.

Genetický transfer

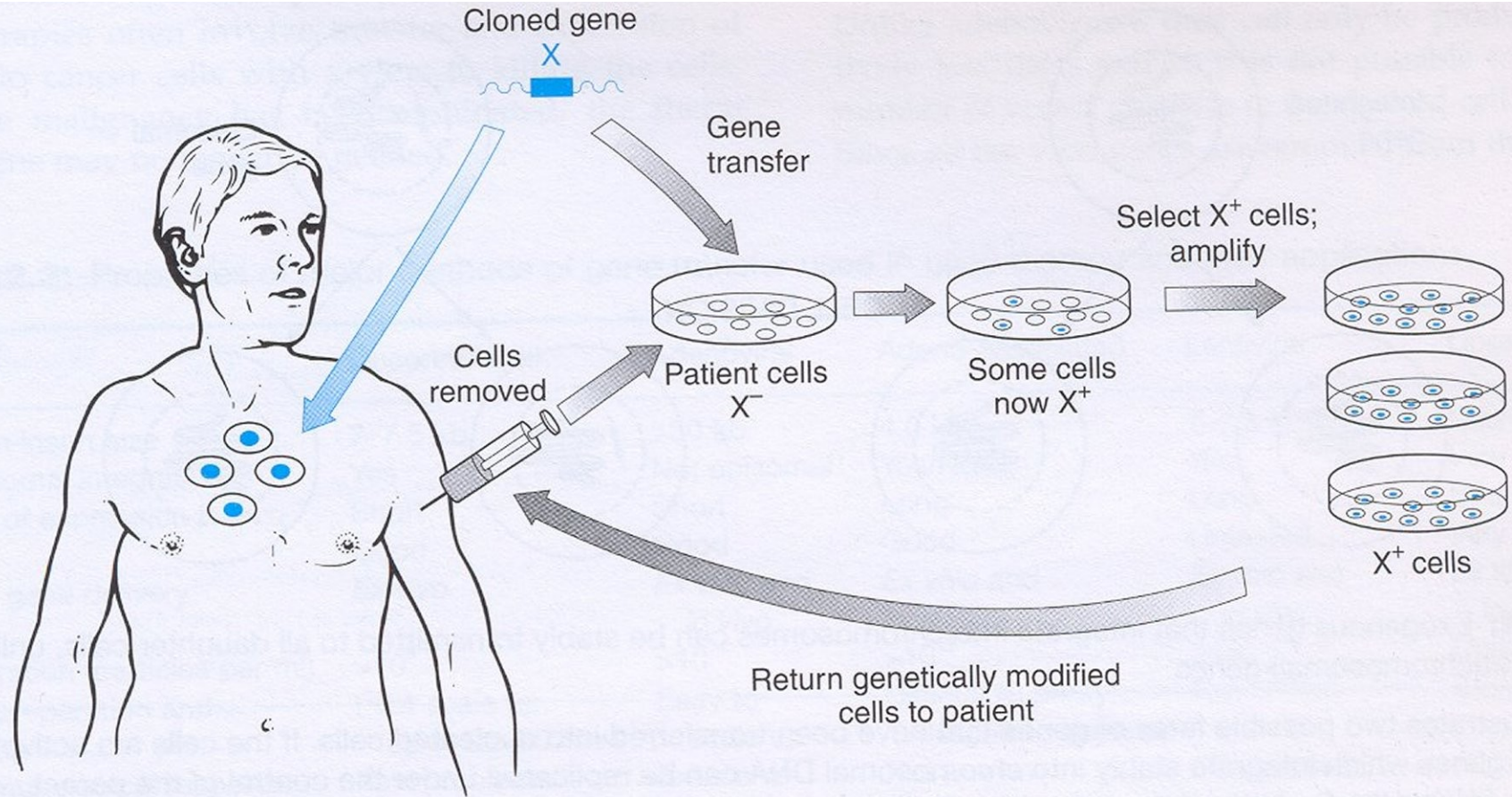
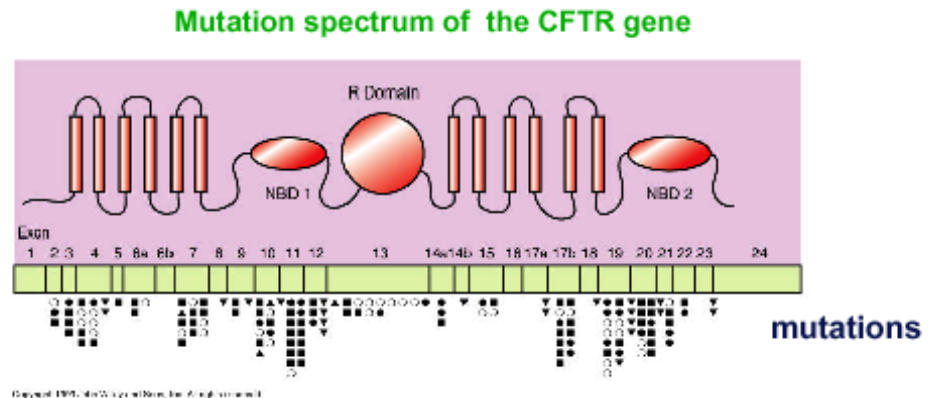
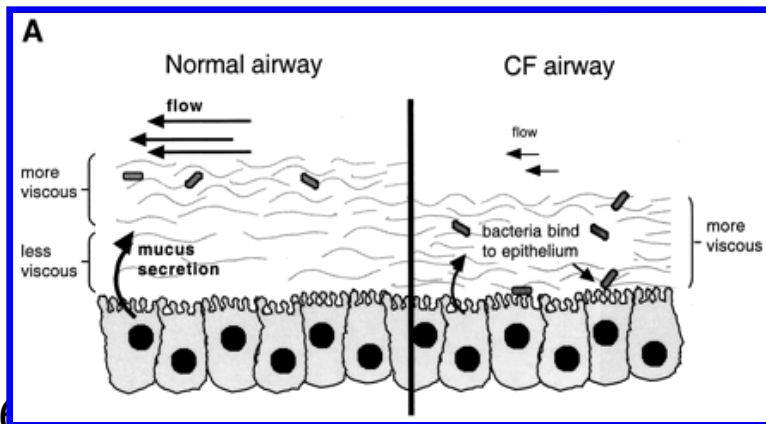


Figure 22.3: *In vivo* and *ex vivo* gene therapy.

Cystická fibróza

- mutace v iontovém přenašeči CFTR transmembrane conductance regulator
- nejvíce postihuje plicní alveoly, střevní epitel a pankreas – zvýšená produkce hlenu, citlivost k plicním infekcím.
- výhodou pro terapii je že stačí pouze několik molekul proteinu na buňku aby se jí vrátila normální funkčnost.
- úspěšné pokusy v kulturách a na myších transformovaných pomocí liposomů
- u lidí se zavedla jako pomocná léčba sprejování adenoviru nesoucího transgen CFTR do nosu, účinné v plicích, nepůsobí na slinivku



GMO produkující vitamíny

GM rostliny s „přidanou hodnotou“

- **"Zlatá rýže"** (zrna rýže žlutou barvu)
rýže obsahující beta-karoten -výchozí látka pro tvorbu *vitamínu A*
1999 - švýcarští a němečtí vědci
Výhody : Levná a výnosná tvorba plodiny, která napomáhá lidskému zdraví.
Betakaroten - působí antioxidačně, chrání tělní buňky, sliznice a kůži, ochrana před UV zářením.,
obrana proti nádorům, infekčním chorobám, dně a překyselení organismu,
nezbytný pro správnou funkci zraku.
Nová zlatá rýže - původní zlatá rýže -1,6 mikrogramu provitaminu A/1 gram rýže
nyní - 37 mikrogramů provitaminu.
- **Arabidopsis thaliana** - zvýšení obsahu vitamínu C o 100 %.



"Chemické továrny"

- GM mikroorganismy produkující vitamíny B2 a B12, E, A, C
- Výhody: rychlý růst, nenáročná kultivace, "environmentally friendly" (minimum energie a odpadu, větší výtěžky)



krystalky B2

Klasifikace geneticky podmíněných nemocí

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

Monogenní nemoci

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

Monogenní nemoci

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

| | dominantní | recesivní |
|-------------|-----------------------------|----------------------------|
| autozomální | autozomálně dominantní (AD) | autozomálně recesivní (AR) |
| X-vázaný | X-dominantní (XD) | X-recesivní (XR) |

Monogenní nemoci

- typy přenosu

- autozomální

- geny na obou autozomech aktivní

- gonozomální (X-chromozom vázané)

- muži hemizygotní
 - u žen 1 X-chromozom inaktivován!!

- jiné

- imprinting, mozaicismus, ...

- podle projevu genotypu ve fenotypu

- **recesivní**

- nemoc jen u mutovaného homozygota

- **dominantní**

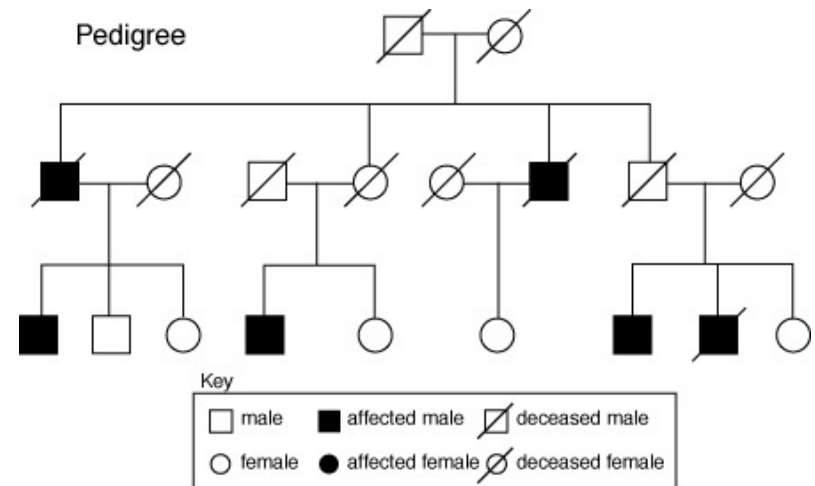
- nemoc stejná u heterozygota a mutovaného homozygota

- **neúplně dominantní**

- odstupňovaná tíže nemoci u heterozygota a mutovaného homozygota

- **kodominantní**

- jak normální tak patologická alela jsou vyjádřeny ve fenotypu



Monogenní nemoci - AR

- u heterozygotů s 1 mutovanou alelou stačí produkt k udržení normální funkce
- manifestní onemocnění u heterozygota je důsledkem:
 - **haploinsuficience** - pro normální funkci je potřeba >50% aktivního genového produktu
 - **dominantě negativního efektu** - syntéza abnormálního proteinu, který "soutěží" s normálním a ovlivňuje fenotyp (např. osteogenesis imperfecta)
 - **zesílení funkce** ("gain-of-function") - mutací je posílena přirozená vlastnost proteinu
 - **ztráty heterozygoty** (loss-of-heterozygosity, LOH) v somatické buňce - např. familiární predispozice k nádorům v důsledku mutací v supresorových genech (např. retinoblastom)
- **velmi často enzymové defekty (enzymopatie)**
- postižen je mutovaný homozygot (popř. sourozenci), heterozygotní rodiče jsou přenašeči (asymptomatictí) - riziko $0.50 \times 0.50 = 0.25$
- frekvence přenašečů nemoci v populaci >>> frekvence nemocných
- nejčastější AR nemocí u bělochů je **cystická fibróza** (f nemocných 1/2000, f přenašečů 1/22), **fenyketonurie, galaktosemie....**
- konsanguinita (příbuzní rodiče) a geneticky izolované populace (např. Aškenazi židé - Tay-Sachsova choroba)

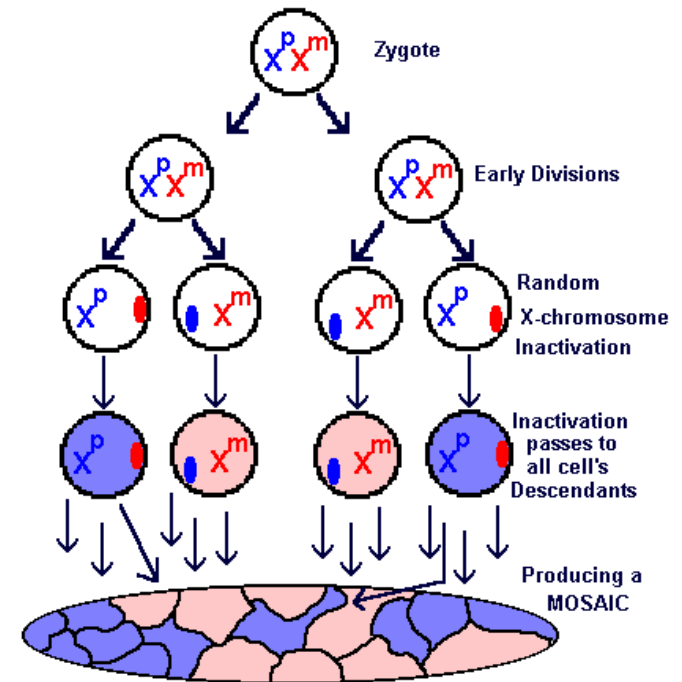
Monogenní nemoci - AD

- nemoci jsou důsledkem jak mutací přenášených mezi generacemi tak vzniklých nově
- nemoc se **projevuje v každé generaci** - postižený jedinec má postiženého rodiče (a prarodiče), a to matku nebo otce
- riziko pro potomka 0.50 (pokud by byli oba rodiče postižení pak 0.75, ale to je vzácné)

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

Monogenní nemoci - X-vázané

- ženy 3 genotypy, muži pouze 2
- X-vázané nemoci se manifestují u všech mužů, kteří zdědili mutaci, a pouze u homozygotních žen
- **hemofilie A**
- **Duchenneova muskulární dystrofie**
- **Wiskott-Aldrichův syndrom (imunodeficiency)**
- **inaktivace X-chromozomu u žen**
 - kompenzace dávky a exprese X-vázaných genů u muže
 - hypotéza Lyonové ("lyonizace")
 - v somatických bb. je 1 X inaktivovaný a v interfázi se zobrazuje jako "Barrovo" tělíčko (viz sporné identifikace pohlaví)
 - proces je náhodný, může se týkat jak otcovského tak mateřského X
 - důsledkem je variabilní exprese X-vázaných genů u heterozygotek ("manifestující přenašečka")
 - funkční mozaicismus



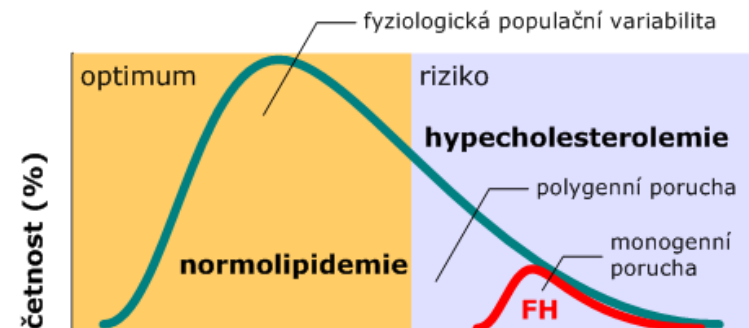
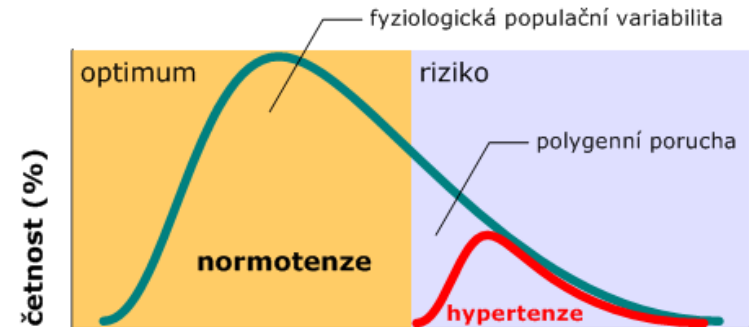
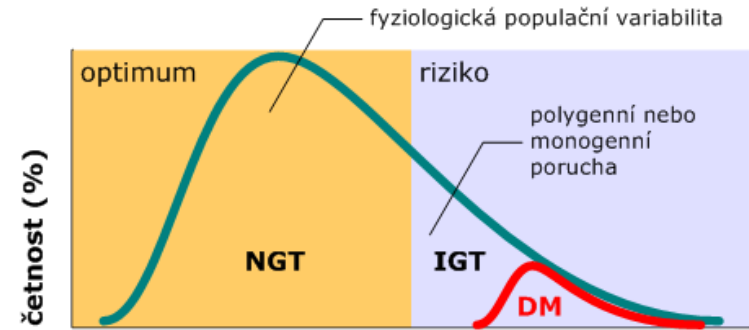
Komplexní nemoci

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

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

Komplexní choroby

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



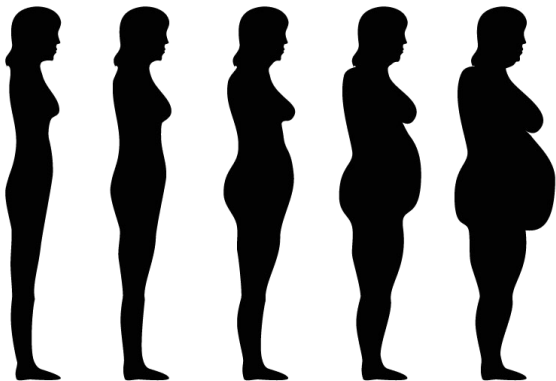
Komplexní nemoci

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

Komplexní nemoci

Obezita-„thrifty genotype“

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



Multifaktoriální (polygenní) HLP

▪ hypotéza “strádatvého genotypu”

- v minulosti se osvědčily ty alely genů, které zajišťovaly nejvyšší okamžitou dostupnost energetických substrátů (glukóza, lipidy, ...) ale také zásoby (tuková tkáň)
- pro přežití byl navíc výhodný ↑ pro-thrombotický a pro-zánětlivý
- selektivní výhoda nositelů těchto alel vedla k jejich **genetické selekci**
- dnes je v podmínkách více méně neomezeného přístupu k zdrojům energie (přínejmenším v rozvinutých společnostech) stejná genetická
- výbava zodpovědná za zvýšenou incidenci tzv. civilizačních (komplexních) chorob



▪ komplexní = geny + prostředí

▪ genetika lipidového metabolismu

- funkční variabilita v genech kódujících např.
 - enzymy zapojené v tuk. metabolismu (TAG i CH)
 - nukleární receptory (PPAR, RXR, LXR, ...)
 - apolipoproteiny
 - receptory apolipoproteinů
 - hormony a jejich receptory
 - ▾ glukokortikoidy, hormony št. žlázy, ...
 - ▾ faktory determinující inzulínovou sensitivitu

| | JEDNOLOKUSOVÉ NEMOCI | KOMPLEXNÍ NEMOCI |
|-----------|----------------------|------------------|
| Závažnost | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Genetické studie

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

Genetické studie

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

Linkage (vazebná) analýza

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

Asociační studie

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

Klinická genetiká

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

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

Klinická genetik

Prenatální diagnostika

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

Rizikové faktory:

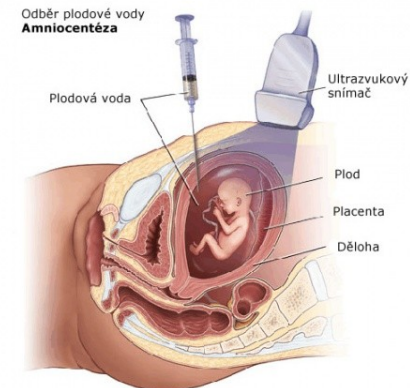
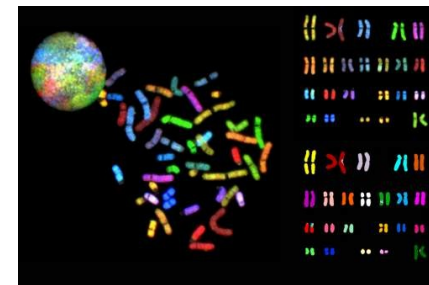
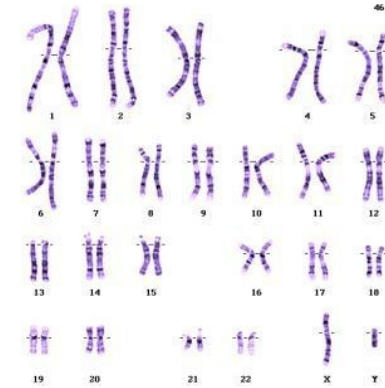
- věk matky v době porodu je vyšší jak 35 let
- pozitivní biochemický screening z krve matky
- ultrazvukový nález, který zvyšuje riziko přítomnosti chromozomální aberace (nahromadění tekutiny v podkoží, nepřítomnost nosní kůstky, srdeční vada plodu aj.)
- přítomnost chromozomální aberace v rodině



Klinická genetika

Vyšetření karyotypu plodu

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



Klinická genetika

Stanovení pohlaví plodu

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

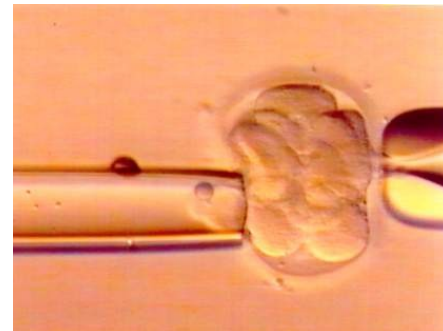


Preimplantační diagnostika

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

Postnatální diagnostika

- např. trombofilie, cystická fibróza...



Klinická genetika



Novorozenecký screening

V České republice se tč. vyšetřuje 13 onemocnění:

- vrozená snížená funkce štítné žlázy (**kongenitální hypotyreóza - CH**)
- vrozená nedostatečnost tvorby hormonů v nadledvinách (**kongenitální adrenální hyperplazie - CAH**)
- vrozená porucha tvorby hlenu (**cystická fibróza - CF**)

dědičné poruchy látkové výměny aminokyselin

- vrozená porucha látkové výměny aminokyseliny fenylalaninu (**fenylketonurie - PKU a hyperfenylalaninemie - HPA**)
- vrozená porucha látkové výměny větvených aminokyselin (**leucinóza, nemoc javorového sirupu - MSUD**)
- **glutarová acidurie typ I (GA I)**
- **izovalerová acidurie (IVA)**

dědičné poruchy látkové výměny mastných kyselin

- deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (**deficit MCAD**)
- deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (**deficit LCHAD**)
- deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (**deficit VLCAD**)
- deficit karnitinpalmitoyltransferázy I (**deficit CPT I**)
- deficit karnitinpalmitoyltransferázy II (**deficit CPT II**)
- deficit karnitinacylkarnitintranslokázy (**deficit CACT**)

Klinická genetika

Cystická fibróza

- více než 30 mutací, které způsobují toto onemocnění

důvody k vyšetření jsou:

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



Mikrobiom - druhý lidský genom

- tělo obsahuje 10krát více bakterií, plísní a jiných mikroorganismů než lidských buněk
- 2011 projekt lidského mikrobiomu (Human Microbiome Project, viz <http://commonfund.nih.gov/hmp/>)
- *střevní mikrobiom je velice specifický (individuální) pro každého jedince. Hovoří se o „střevních skupinách“ neboli **enterotypech**.*
- *střevo má po mozku nejvíce nervových buněk, a proto se někdy také hovoří o „druhém mozku“. Střevní mikroorganismy přímo interagují s enterickým NS a **ovlivňují naše chování**.*
- *složení a vlastnosti střevní mikrobioty se liší u jedinců **s obezitou** ve srovnání s jedinci hubenými.*
- *komensální bakterie se účastní pochodů, které rozhodují o příjmu energie z potravy, jež se mění v tukovou tkáň. Dá se předpokládat, že lidé určitého enterotypu budou mít větší sklony k obezitě, protože mikroorganismy jejich střeva budou schopny zpracovat z potravy více živin a energie.*
- *Složení střevní mikrobioty tedy ovlivňuje i metabolické děje - je známo, že tzv. „low grade inflammation“ (chronický subklinický zánět) je spojen s funkcí mikrobioty a je přítomen právě u lidí, kteří mají sklon k obezitě*
- *tzv. fekální transplantace - tj. přenosu stolice od zdravých dárců do střeva pacientů s těžkou střevní infekcí nebo **diabetem***

Vliv metabolismu

HEALTH AND MEDICINE

What You Eat Could Be Affecting Your Genes

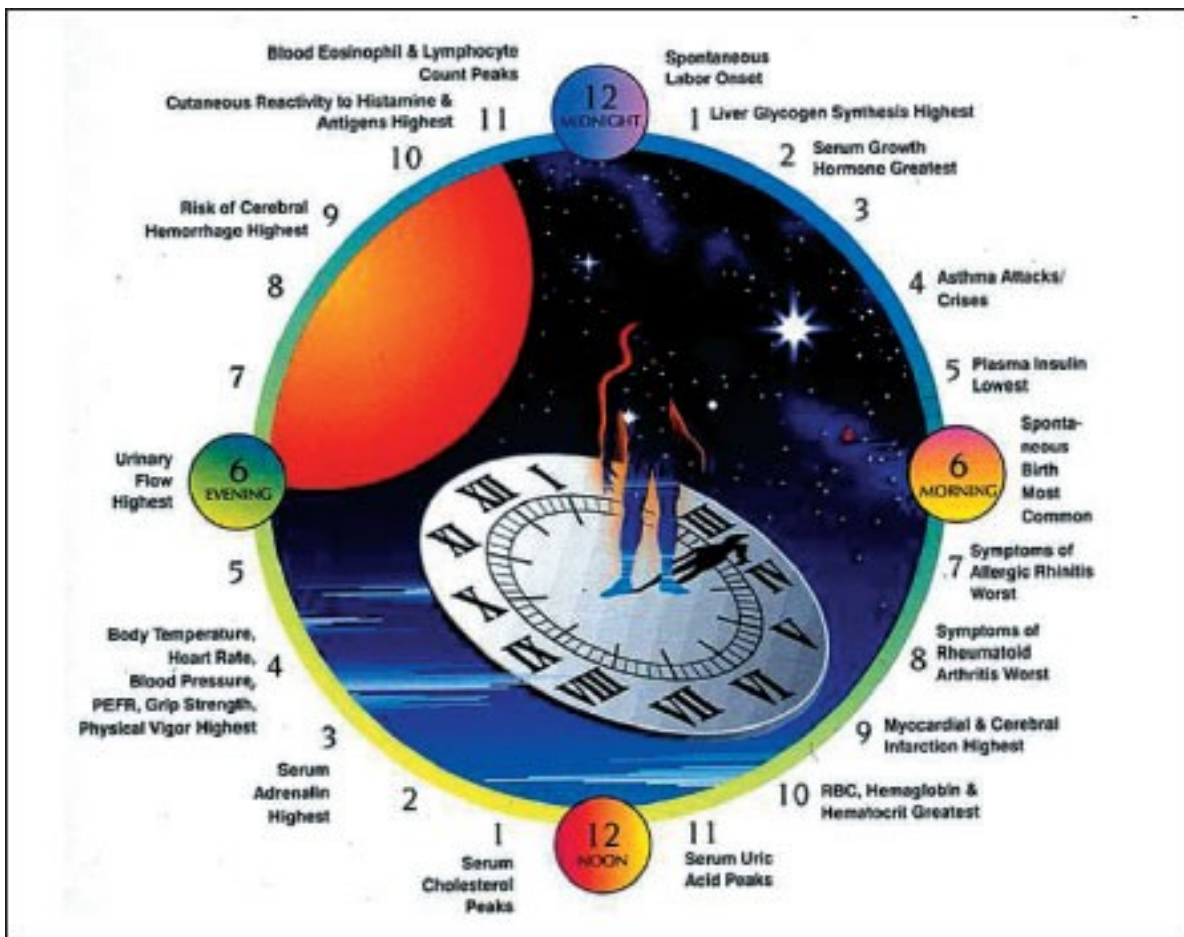
February 13, 2016 | by Justine Alford



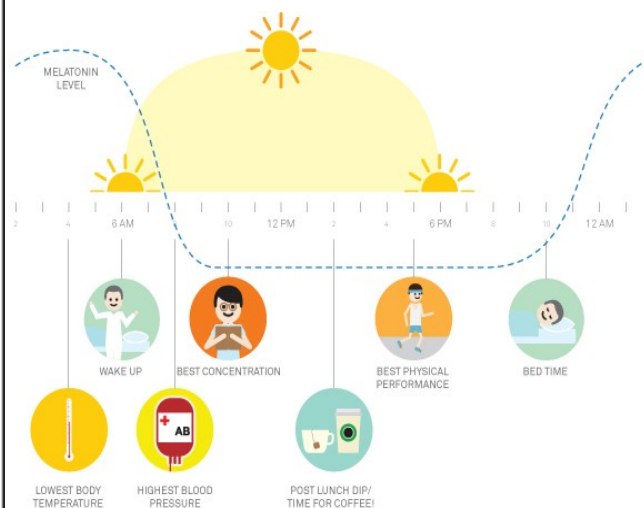
photo credit: Nutrient availability could affect gene expression. Ezume Images/Shutterstock

The classical view is that genes control how nutrients are broken down into important molecules, but we've shown that the opposite is true, too: **how the nutrients break down affects how our genes behave.**

Cirkadiánní rytmicita



Adaptace metabolismu k změnám v prostředí umožňuje předvídat náhle změny a adekvátně na ně reagovat

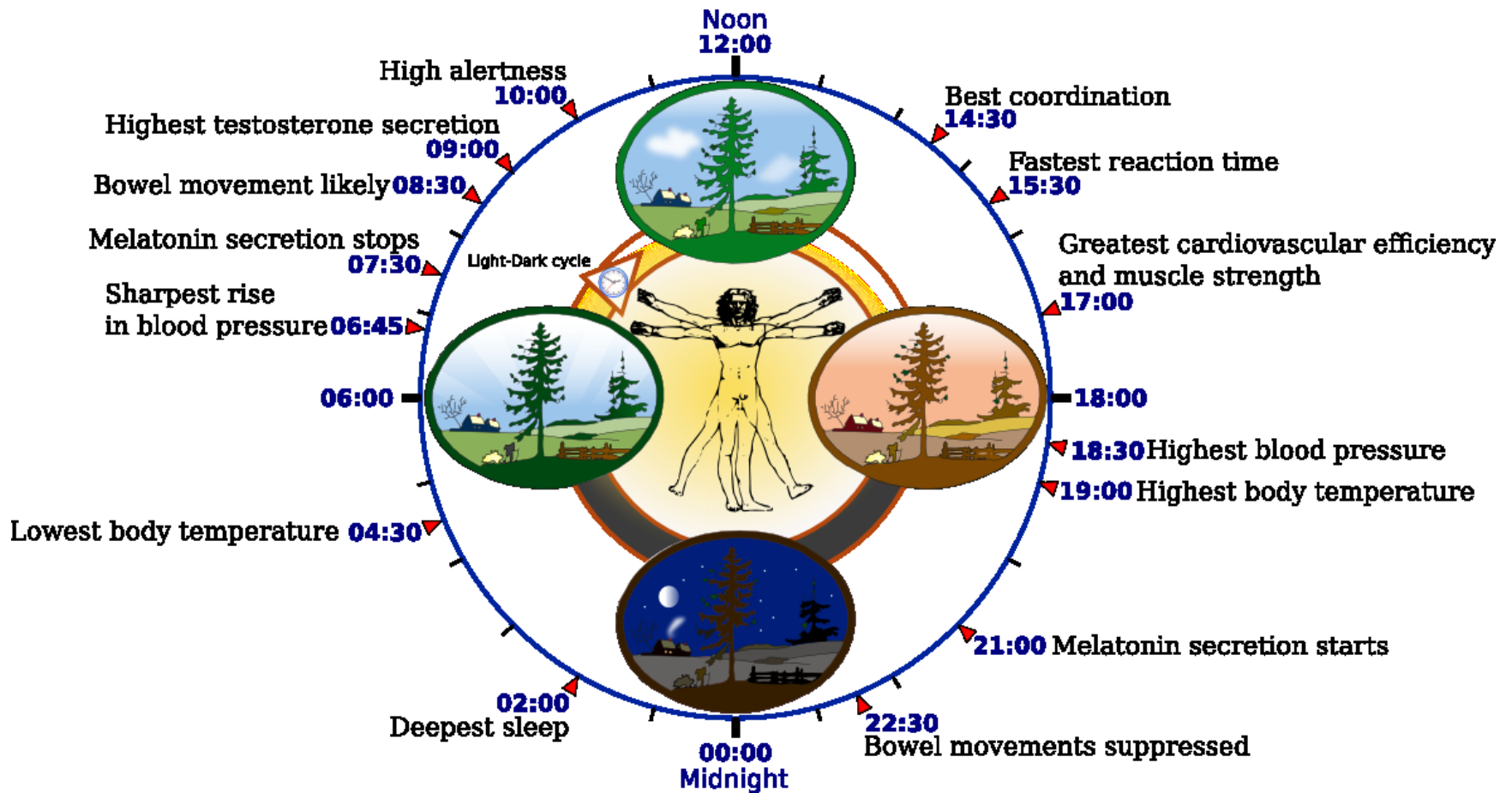


Synchronizace procesů v organismu k cyklické změně fáze dne a noci

DEN - vyšší metabolická a fyzická činnost

NOC - pokles tělesné teploty, snížení metabolismu

cca 24 h rytmus biochemických, fyziologických a metabolických funkcí



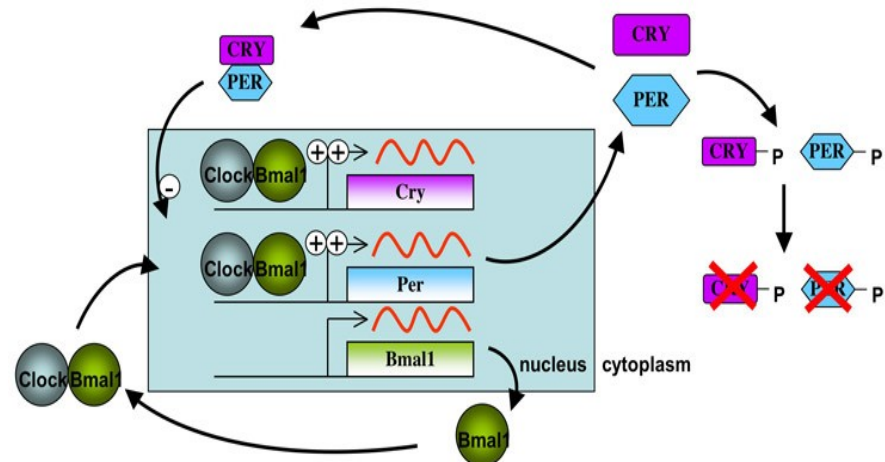
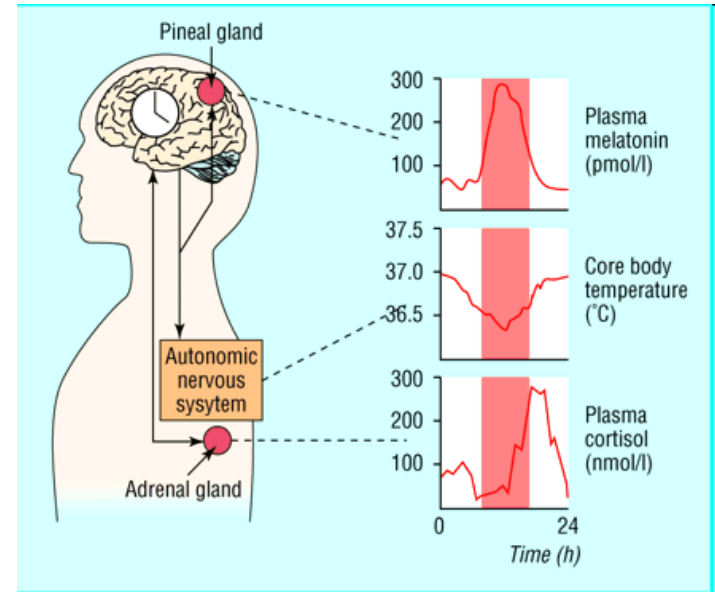
Circadianní hodiny

Centrální : Hypothalamus
Central pacemaker
 skupina neuronů in SCN
 informace o míře světelnosti skrze buňky retiny
 vylučování melatoninu

Periferní: **Tkáně a buňky**
Periferní oscilátory v jednotlivých tkáních a buňkách
 (autonomní ale přijímají signály z SCN)

influenced by neurohumoral factors

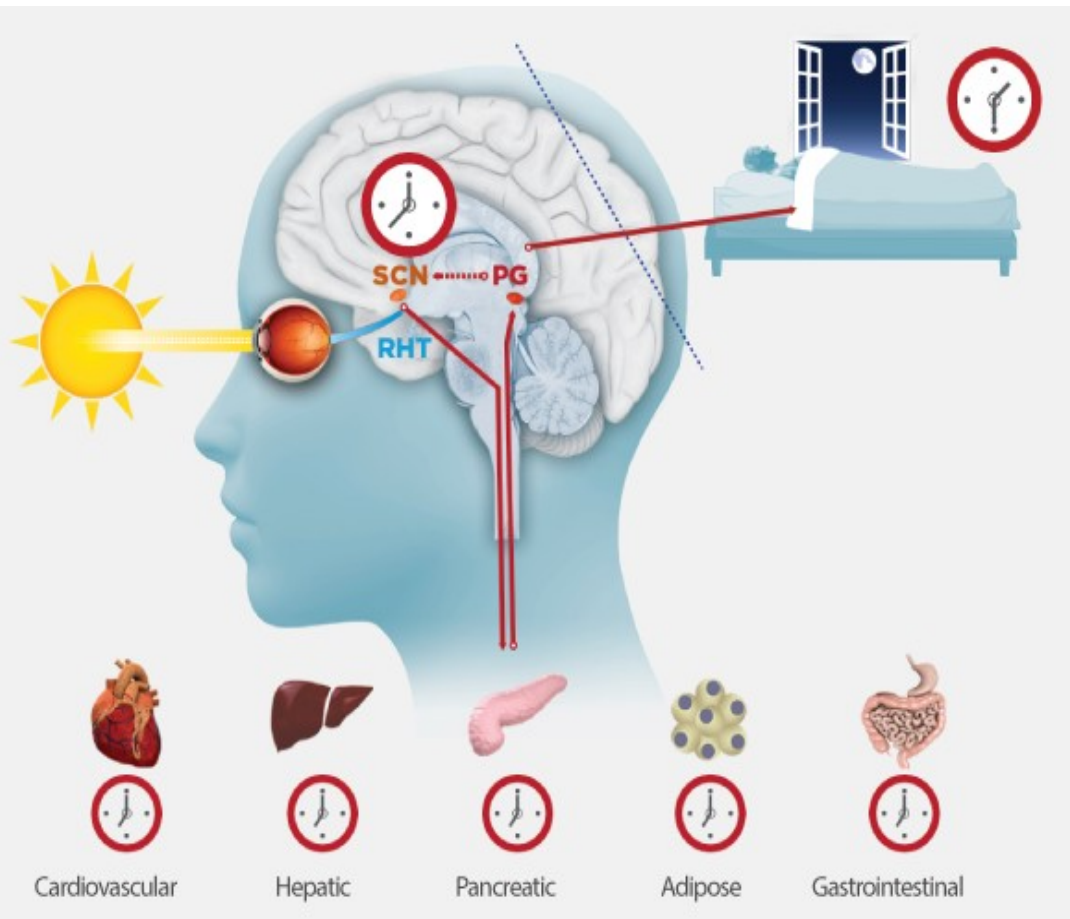
Endogenní buněčný systém rytmicky
 exprimovaných proteinů
 zpětnovazebné smyčky



Mechanismus cirkadiánní regulace

Multioscilátorový model

Centrální hodiny: Hypothalamus

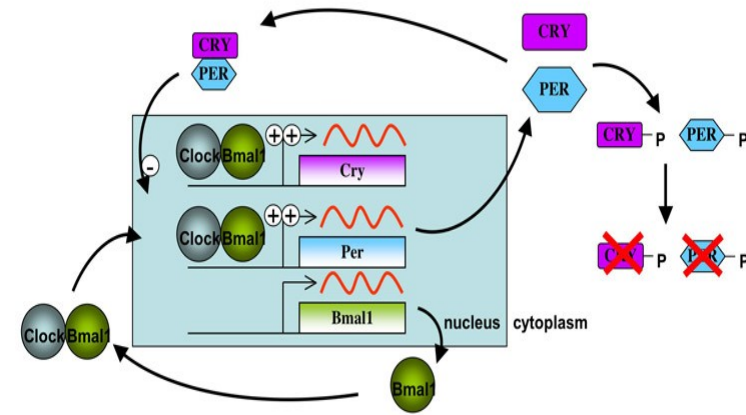


Periferní oscilátory: buňky

Clock geny

1. autoregulace - TTFL model
(transcription/translation feedback loop)

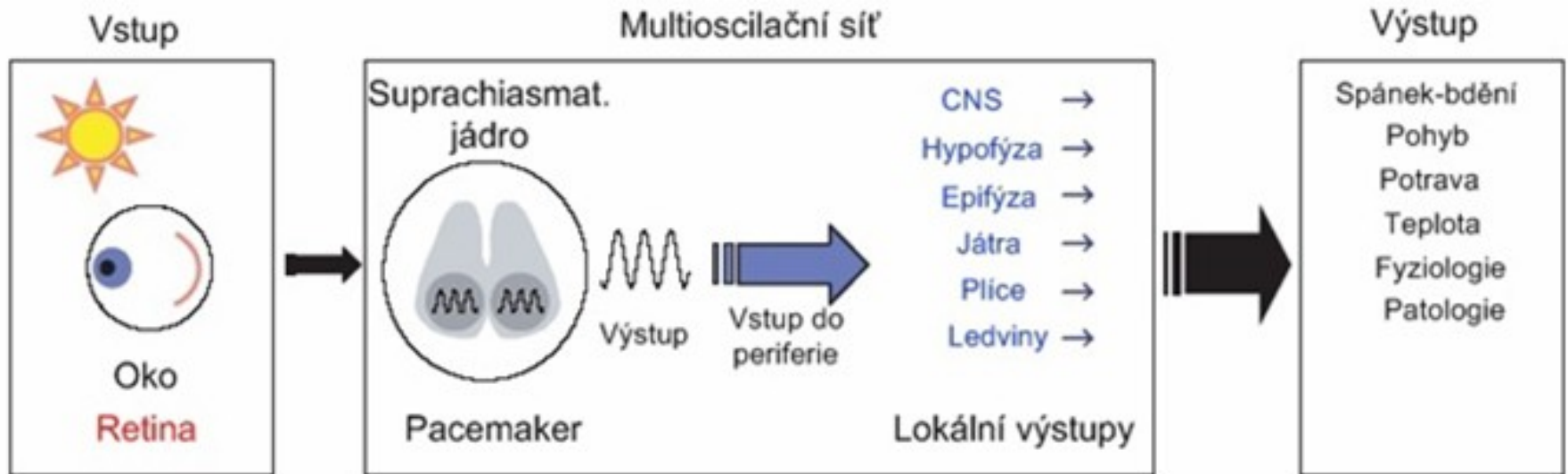
2. přímá indukce světlem
(cAMP, cGMP)



3. melatonin, kortizol, glukóza...

Cirkadiální rytmy

1. Primární „hodiny“ - SCN – sekrece melatoninu



2. Periferní „oscilátory“ – játra, plíce, slezina, slinivka, jícn, kůže....

1. Nezávislost na externích faktorech - jsou endogenní (buněčné autonomní) - mohou být aktivovány endogenními faktory „zeitgebers“ (světlo)
2. Schopnost znovunastavení změnami prostředí (cyklus dne a noc, teplota)
3. Schopnost předvídat změny prostředí a reagovat na ně

Chronotyp

endogenní spánková preference a „social jetlag“



RANNÍ

5/5 genotyp (10%)
(morningness)



Period3 VNTR

Ebisawa, 2000

NEUTRÁLNÍ

4/5 genotyp (45%)

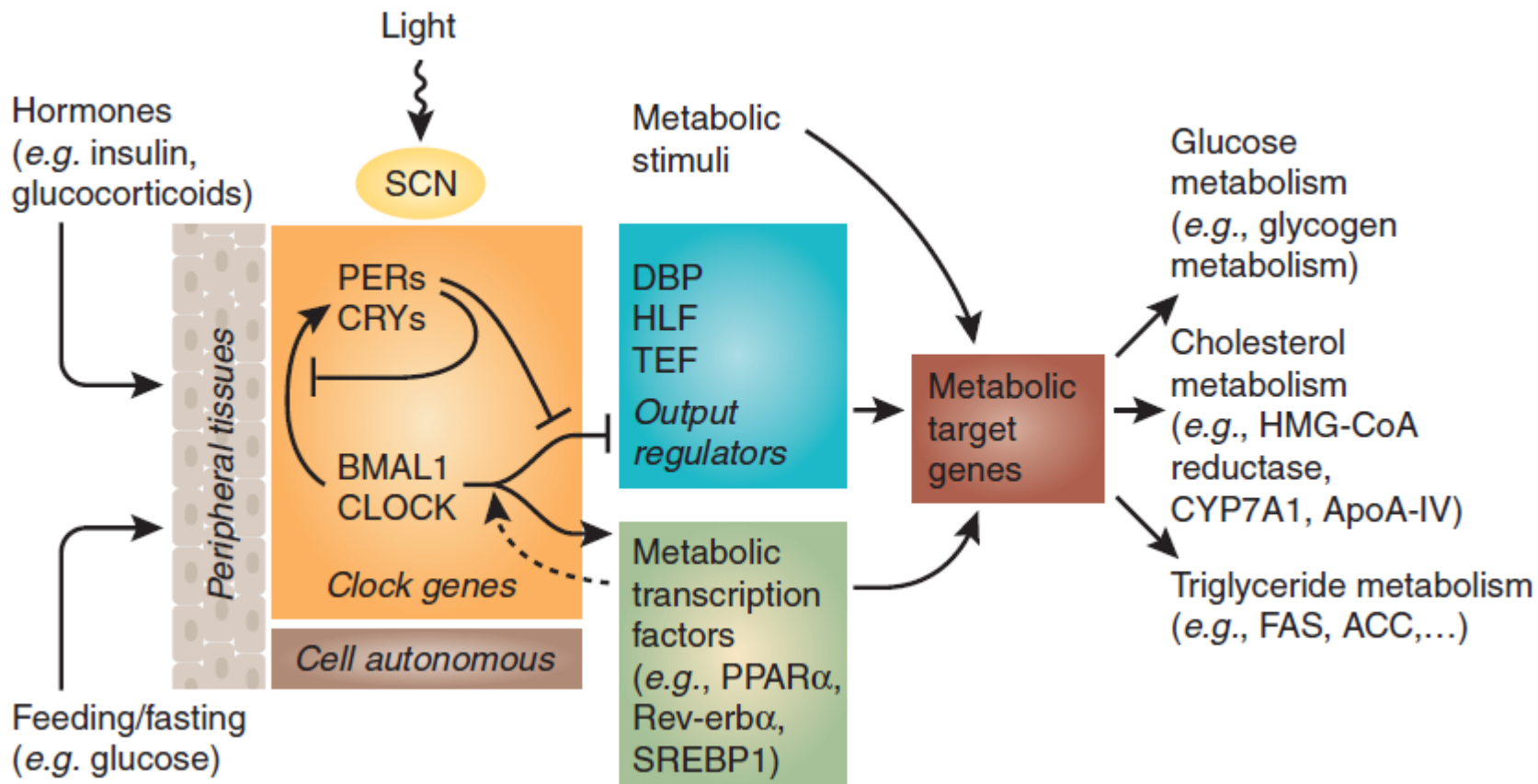


ODPOLEDNÍ

4/4 genotyp (45%)
(eveningness)

- vliv na exprese (nižší exprese Per3)
- vyšší kvalita spánku, horší kognitivní funkce po spánkové deprivaci
- zvýšená predominance sympatiku a snížená aktivita parasympatiku
- časnější nástup bipolární poruchy (tendence k depresím)
- zvýšená koncentrace cirkulujících IL-6, ILGF-1
- větší riziko vzniku některých nádorů (prsu)
- silnější korelace s rytmy melatoninu a kortizolu

- DSPD (delayed sleep phase disorder)
- lepší kognitivní performance, verbální IQ a paměťové schopnosti
- horší „academic performance“
- vyšší tendence závislost na heroinu



poruchy cirkadiánní rytmicity

1. SCN
2. Jednotlivých buněk
3. Interakce



**poruchy spánku a poruchy chování
metabolický syndrom (obezita)
hormonální nerovnováha
nádorové bujení
kardiovaskulární funkce**

Poruchy cirkadiánních rytů

3 -10 % transkriptů-cirkadiánní rytmicita

Poruchy cirkadiánních rytů (Práce na směny, vystavení světlu, nedostatek spánku, časový posun) :

- změna vnímavosti buňky ke stimulům (adrenalin, insulin) nebo změna ve vytváření zásob (triglyceridy, lipidy)

- poruchy spánku a poruchy chování
- metabolický syndrom (dyslipidémie, insulin rezistence, obezita, hypertenze)
- hormonální nerovnováha, rakovina
- **Clock** SNP, **Bmal1** delece - okamžitá arytmicita (Bunger *et. al.*, 2000; Takahashi *et. al.*, 1997)
- **Cry1/Cry2** a **Per1/Per2** mutanti - ztráta cirkadiánních rytů po navození konstantních podmínek (Van der Horst *et. al.*, 1999; Bae *et. al.*, 2001)
- **Clock** polymorfismy - metabolický syndrom, **BMAL1** - diabetes typu II a hypertenze (Scott *et. al.*, 2007; Woon *et. al.*, 2007)
- **Per2, 3** polymorfismy - poruchy spánku (spánková deprivace - zvýšený apetit, snížená sekrece leptinu) (Groeger *et. al.*, 2008)

Clock geny a metabolické interakce

Table 1. Mediators of circadian clock metabolism interaction

| Factor | Tissue | Function | Targets | References |
|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| Clock genes | | | | |
| <i>Bmal1</i> | Liver | Glucose mobilisation | <i>Slc37a4, Pck2, Ak3l1, Slc2a2</i> | Lamia et al. (2008) |
| | Adipocytes | Adipogenesis | <i>Pparg2, Ap2, Srebp-1, C/EBPs</i> | Shimba et al. (2005) |
| <i>Clock</i> | Hypothalamus | Appetite regulation | <i>Orexin, Ghrelin, Cart</i> | Turek et al. (2005) |
| | Heart | Oleate oxidation | <i>Slc27a1</i> | Bray et al. (2008) |
| | | Oxygen consumption | <i>Ndufa3/b3</i> | |
| <i>Per2</i> | Hypothalamus | Appetite regulation | α -MSH | Yang et al. (2009) |
| | Adipose tissue | Adipocyte differentiation | <i>Pparg2</i> | Wang and Lazar (2008) |
| | Liver, serum, kidney | Triglyceride catabolism | <i>APOC-III, VLDL triglycerides</i> | Raspe et al. (2002) |
| | Skeletal muscle | Fatty acid oxidation | <i>Cpt1, Caveolin-3</i> | Lau et al. (2004) |
| Metabolic sensors | | | | |
| <i>Ppara</i> | Liver | Lipid and energy metabolism | <i>Bmal1, REV-ERBα</i> | Canaple et al. (2006); Gervois et al. (1999) |
| <i>Pparg</i> | Adipose tissue | Adipocyte differentiation | REV-ERB α | Fontaine et al. (2003) |
| <i>Pgc-1α</i> | Liver, skeletal muscle | Gluconeogenesis and energy metabolism | <i>Bmal1, REV-ERBα</i> | Liu et al. (2007) |
| <i>Sirt1, Nampt, redox state</i> | Liver, mouse embryonic fibroblasts | Cellular metabolism | CLOCK (NPAS2) /BMAL1-mediated transcription | Nakahata et al. (2009); Ramsey et al. (2009); Rutter et al. (2001) |
| <i>CO, heme</i> | Liver, HeLa cells | Oxidative metabolism | REV-ERB α , NPAS2 | Dioum et al. (2002); Kaasik and Lee (2004); Yin et al. (2007) |

Clock geny x obezita

čas příjmu potravy působí jako „zeitgeber“ – změna fáze clock genů v periferních orgánech (játra) (Halberg *et. al.*, 1995)

1. savci: **CLOCK** mutant (-/-) - zvýšená konzumace potravy– obezita (Turek *et. al.*, 2005)

expresní urovneň Clock - zvýšená u obézních myší (high fat diet) (Kaneko *et. al.*, 2009)
Model obezity

Per2 mutace – změna doby podávání jídla (bez zvýšené konzumace) - obezita (Yang *et. al.*, 2009)

BMAL1 a CLOCK deficiencie – porucha glukoneogeneze, glukózová tolerance, insulin sensitivita (Rudik *et. al.*, 2004)

2. obézní pacienti: poruchy spánku (Resnick *et. al.*, 2003)

lidé pracující na směny (Patel *et. al.*, 2006)

Studie na myších a na člověku ukazují, že obezita způsobuje změny cirkadiánní regulace na úrovni chování, na fyziologické i na molekulární úrovni



Look!
Stem cells!

Dist. by King Features

PODAN
TIRARO.
1.11.13

BIZARROCOMICS.COM Facebook.com/BizarroComics