

# Molekulární fyziologie genomu

*Historický úvod*

*Nukleové kyseliny a chromosomy*

*Poškození genomu*

*Systémy reparace*

*Cytogenetika*

*Architektura buněčného jádra*

*Replikace genomu*

*Exprese genomu*

# Historický úvod

*1632-1723 Anton van Leeuwenhoek – bakterie, nematody*

*1655 Robert Hook – první pozorování buňky*

*1828 Robert Brown – objev jádra*

*1838 Charles Darwin – evoluční teorie*

*1839 Schleiden, Schwann, Virchhof – buněčná teorie*

*1866 Ernst Haeckel – dědičná informace je v jádře*

*1869 Friedrich Miescher - nuclein*

*1866 J.G. Mendel – zákony dědičnosti*

*1882 Walter Fleming – pozoroval chromosomy (mitóza)*

*1889 Johann Miescher – izoloval DNA*

*1902 Teodor Boveri – chromosomová teorie dědičnosti*

*1910 Thomas Hunt Morgan – geny vázány na chromosomy, 1913 – crossing over*

# Historický úvod

*1928 F. Griffith – transformace bakterií*

*1944 Oswald Theodore Avery – DNA je dědičný materiál*

*1953 James Watson and Francis Crick – DNA struktura*

*1974 Roger Kornberg – Struktura nucleosomu*

*1982 Thomas Cremer – Teritoriální struktura  
chromosomů v interfázi, konfokální mikroskopie,  
FISH technika, CGH technika, CT-IC model*

# První pozorování pod mikroskopem

(Anton van Leeuwenhoek, 1632-1723, Delft, Holandsko)

*Pracoval v obchodě, kde se používaly zvětšovací sklíčka k počítání vláken v látce.*

*První viděl a popsal **bakterie, červy, spermie, krevní buňky a život v kapce vody**. Během svého života pozoroval svým mikroskopem velký počet věcí. Jeho pozorování otevřely nový svět.*



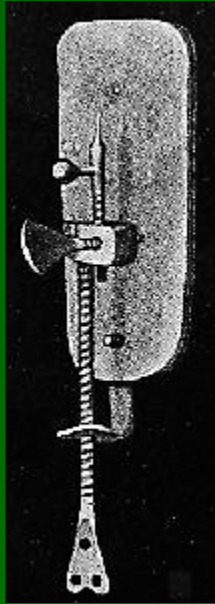
# První pozorování pod mikroskopem

(Anton van Leeuwenhoek, 1632-1723, Delft, Holandsko)

*Mikroskop – dva šrouby, objekt je umístěn na špičku hrotu, vyžaduje dobré osvětlení.*

*Mikroskop o dvou čočkách byl poprvé zkonstruován o 40 let dříve, roku 1595.*

*Na obr. jsou zelené řasy a bičíkovci.*



# Odkud pochází pojem buňka

*První pozorování buněk pod mikroskopem  
(Robert Hook, 1665 - Micrographia)*

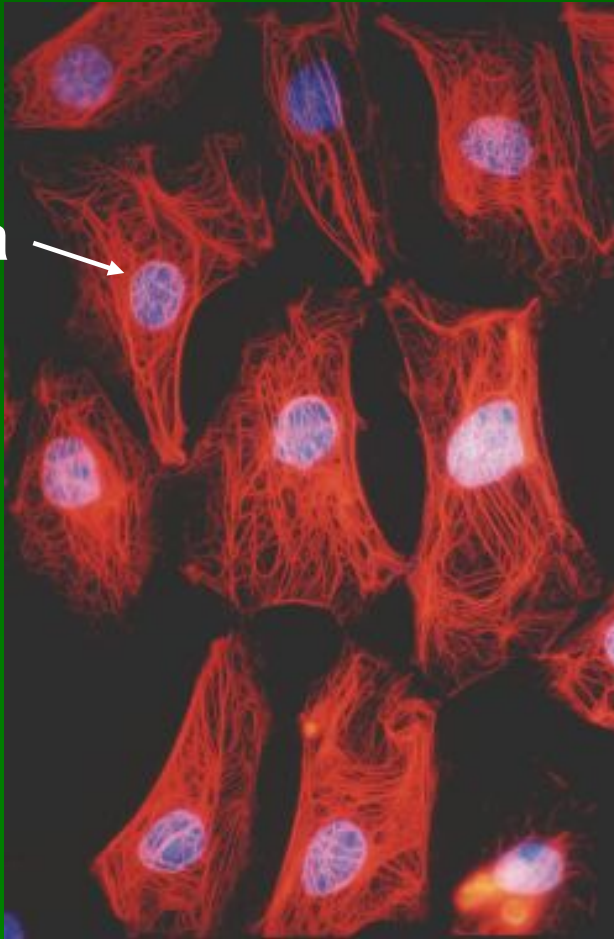
Houby, hmyz, prvky, buňky v korku



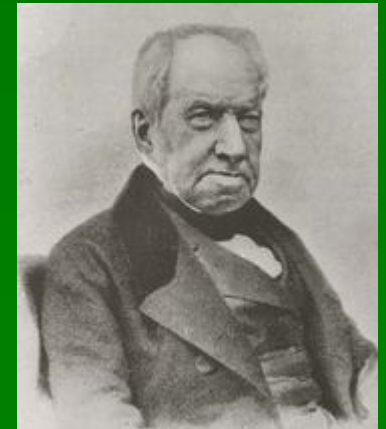
# Jádro buňky (Robert Brown, 1828)

## Buňky a jejich jádra

jádra



- 1) *Výprava do Austrálie*
- 2) *Objev Brownova pohybu*
- 3) *Objev jádra buňky*



# Evoluční teorie (Charles Darwin, 1838)

Anglický přírodovědec, na svých cestách se zabýval rozdělením různých forem života a fosílií na povrchu Země. Vymyslel **teorii přirozeného výběru** (1838) a přesvědčil vědeckou komunitu, že druhy se vyvíjejí v čase ze společného předchůdce – teorie evoluce.

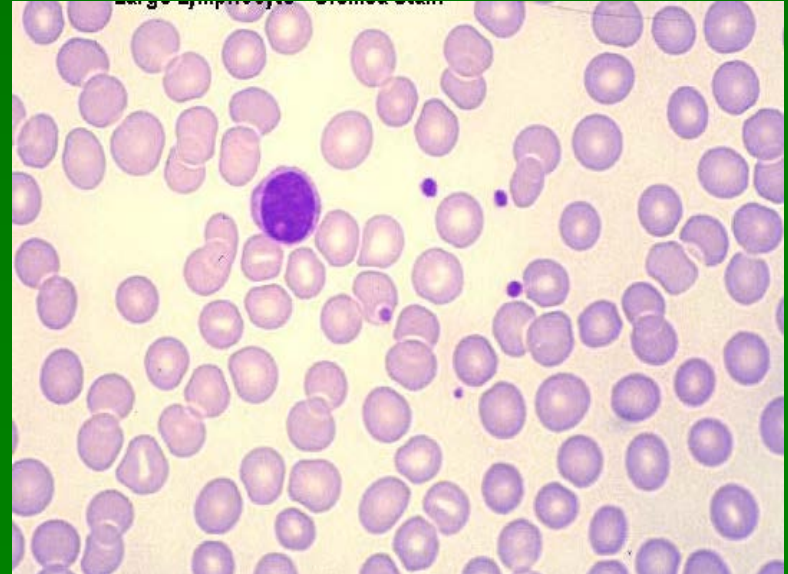
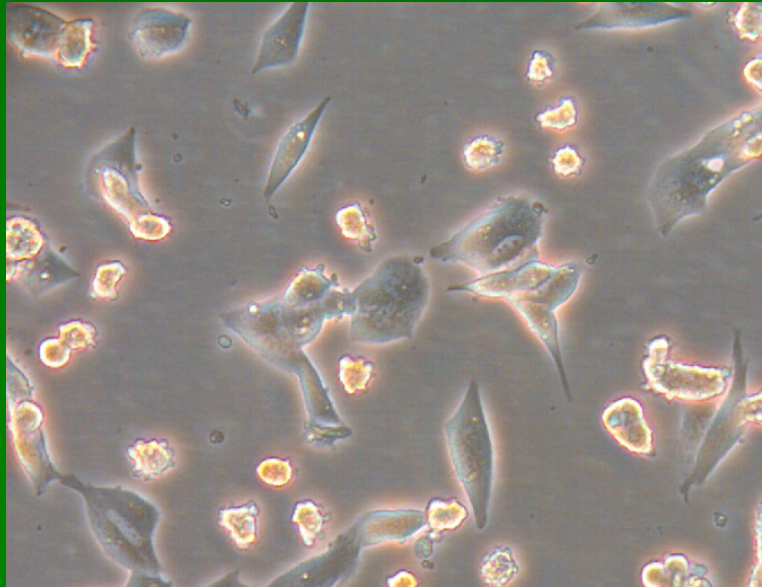
Na obr.: loď Beagle u břehu Jižní Ameriky, trasa lodi.





# **Buněčná teorie (19. stol. – první polovina, Schleiden, Schwann, Virchow a další )**

- 1) Všechny formy života jsou tvořeny jednou či více buňkami**
- 2) Buňky vznikají pouze z jiných buněk**
- 3) Buňka je nejmenší formou života**



# Dědičná informace je v jádře (Haeckel 1866)

*Ernst Haeckel byl německý biolog, filosof a fyzik. Objevil tisíce druhů, zmapoval genealogický strom všech form života. Je autorem **teorie recapitulace** (ontogeneze opakuje fylogenezi – viz obrázek dole vlevo).*



*Na obrázku – sasanky z knihy  
„Kunstformen der Natur“*



# Nuclein (Friedrich Miescher, 1869)

*Miescher objevil nukleovou kyselinu – molekulární substrát genetického kódu a nazval ji nuclein.*

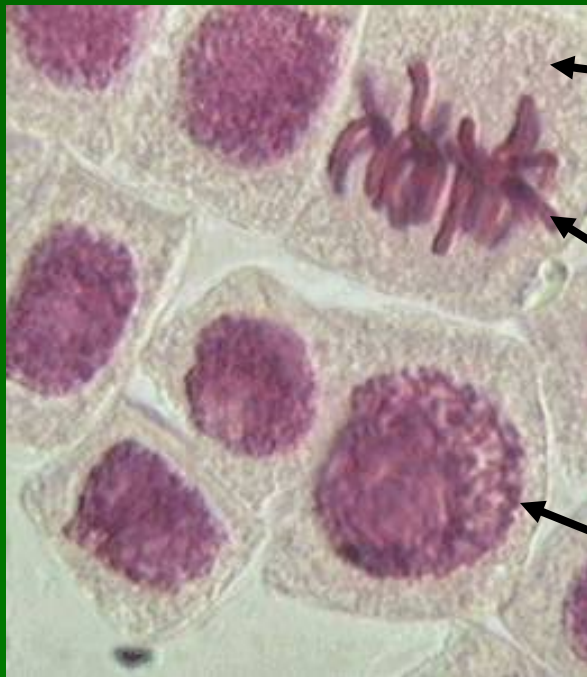
*Na buněčný extrakt působil pepsinem*

*Ukázal, že zůstane látka, která*

- 1) Je v jádře buněk*
- 2) Je rozpustná v louhu, né v kyselině*
- 3) Obsahuje fosfor (kromě C, H, O)*



# Dělení buněk (Walther Flemming, 1882)



Buňka před dělením

Mitotické  
chromosomy

Interfázní  
buňka

Chromosom

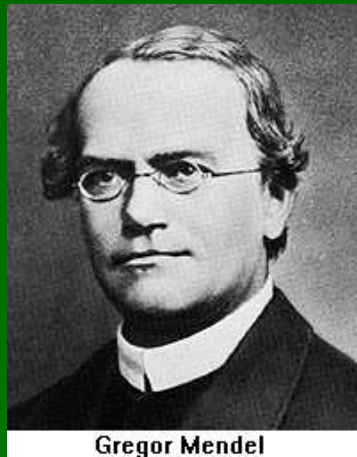
Centro  
mera



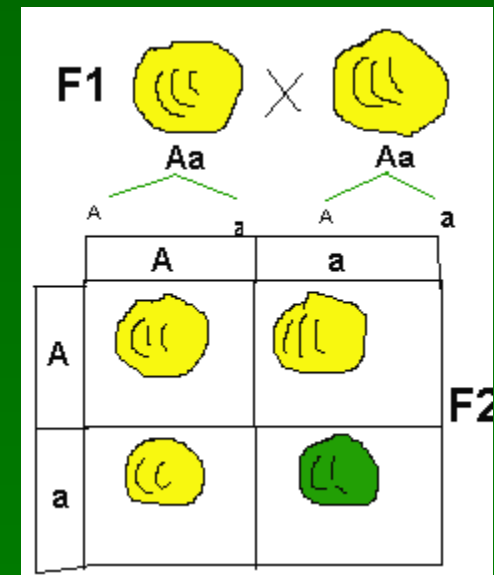
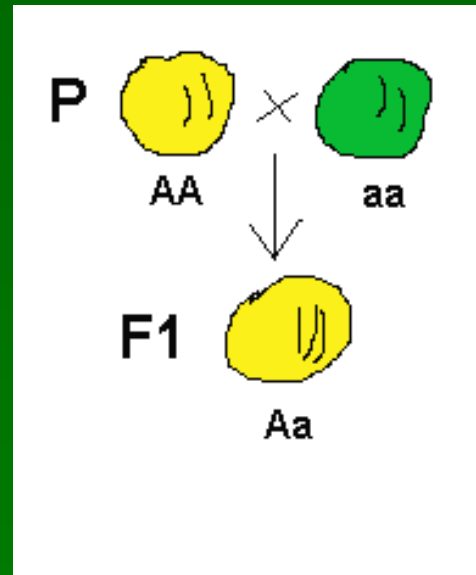
*Walther Flemming: první pozoroval dělení buněk, zavedl pojem mitóza a chromatin*

# Mendel: zákony dědičnosti (1866)

J. G. Mendel



Křížení vlastností v potomstvu



Dvojice alel genů kontrolují dědičnost znaků

Interakce dvou alel vede k expresi pouze jedné z nich

Dominantní alela (DA) – exprimuje se vždy

Recesivní alela (RA) – není exprimována v přítomnosti DA



# První představy o struktuře genomu

Dlouhou dobu se vědci domnívali, že nukleová kyselina v jádře buňky je rozprostřena náhodně všude se stejnou pravděpodobností.

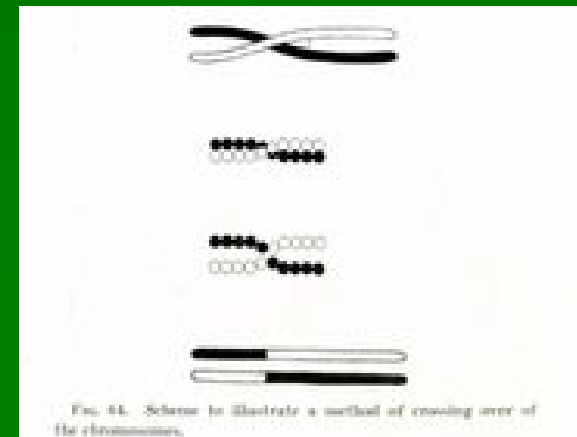
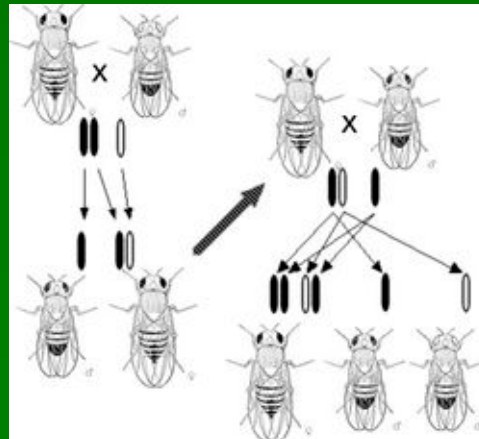
Pozorování mitotických chromosomů však vedlo již koncem 19. století některé badatele k závěru, že také v interfázi si mohou chromosomy uchovat svou identitu (genetickou a strukturální) (Rabl 1885, Boveri 1888).



**Theodor Boveri: dědičnost je vázána na chromosomy (1887), po znovuobjevení Mendlových zákonů Hugo de Vriesem (1900) pokračuje ve výzkumu dědičnosti.**

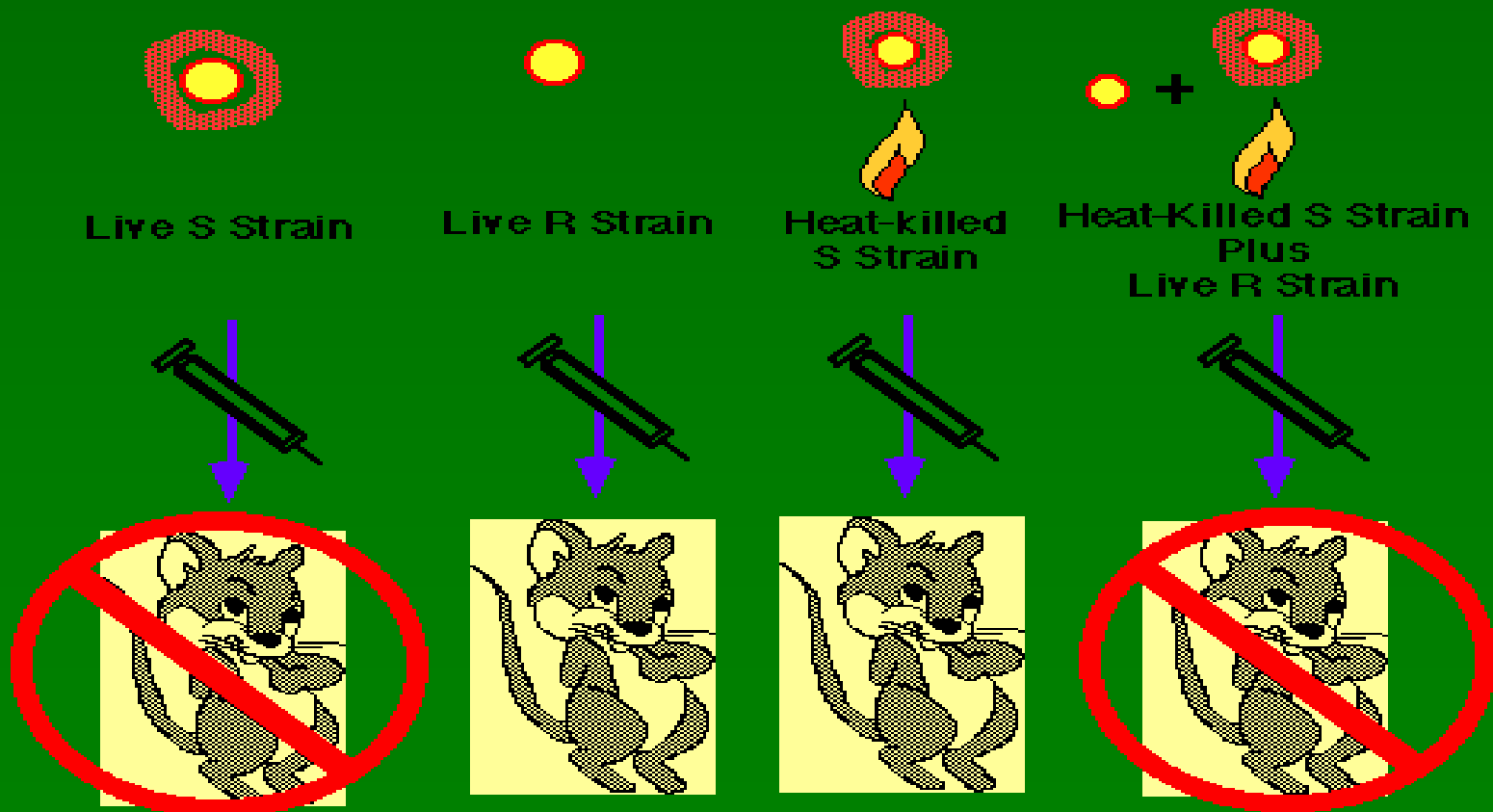
# Geny jsou na chromosomech (Thomas Hunt Morgan, 1910)

- v roce 1910 objevil pohlavně vázanou dědičnost, činí závěr, že gen „white“ se nachází na pohlavním chromosomu
- v roce 1913 objevil „crossing over“ a „linkage“ mezi geny
- ukázal, že geny se nacházejí v určitých místech na chromosomech, sestavil se studenty první chromosomovou mapu.



# Genetický materiál lze přenést do jiných buněk jako neživou látku (Griffith, 1928)

Myš, které je injikován S-kmen Pneumococcus umírá  
Myš, které je injikován R-kmen přežívá.  
Extrakt z S-kmene (buňky nedají kolonie) transformuje R-kmen na virulentní S-kmen





## **DNA je genetický materiál (Avery et al., 1944)**

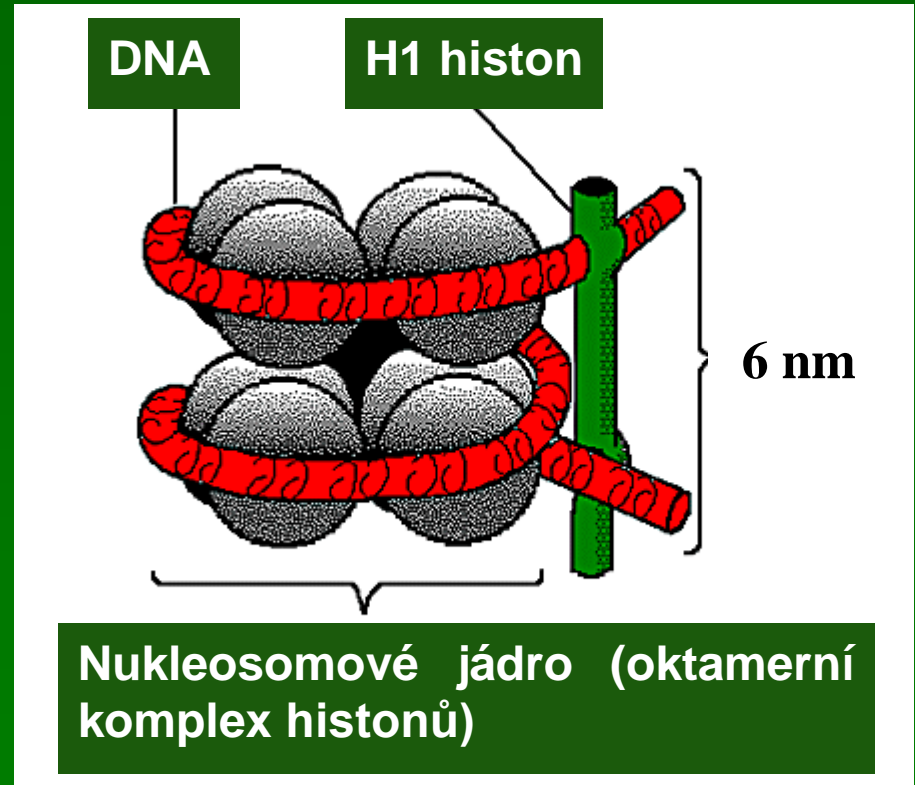
**Avery, MacLeod, and McCarty, 1944, vyčistili extrakt S-kmene, aby bylo možné lépe charakterizovat transformaci.**

- Extrakt byl rezistentní k proteázám, neobsahoval lipidy a uhlovodíky**
- Jestliže byla DNA v extraktu zničena, transformace nenastala**
- Čistá DNA izolované z S-kmene transformovala R-kmen**
- Avery opatrně naznačil, že genetickým materiálem je DNA**



# Nukleosom

Histony (H2A a H2B) a (H3 a H4) tvoří dimery, ty tvoří tetramery a dohromady pak vzniká oktamer

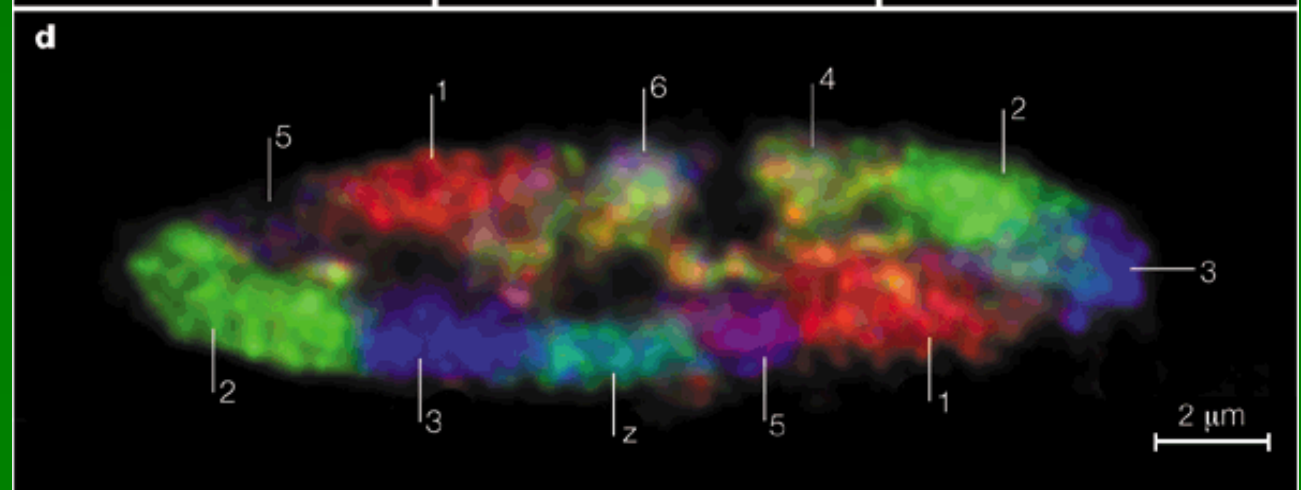
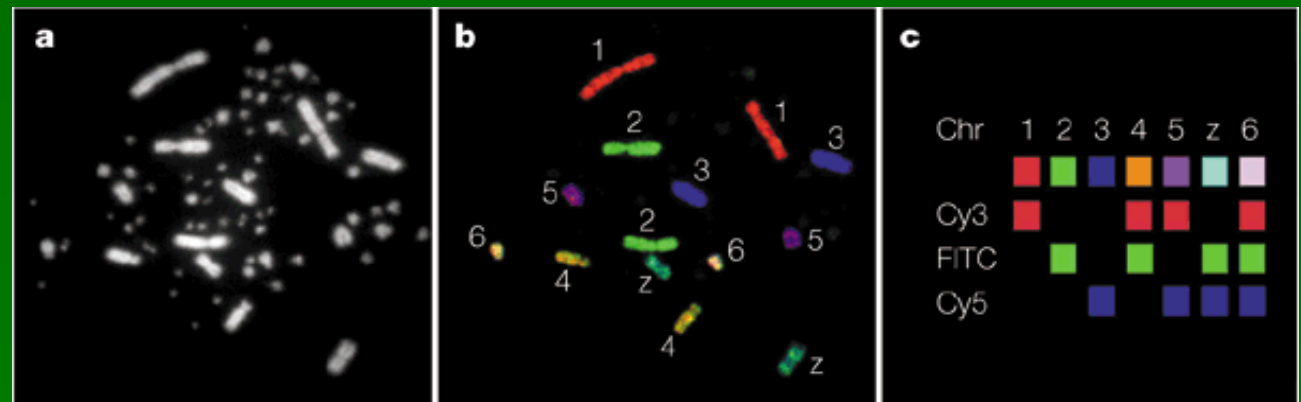


Roger Kornberg, 1974

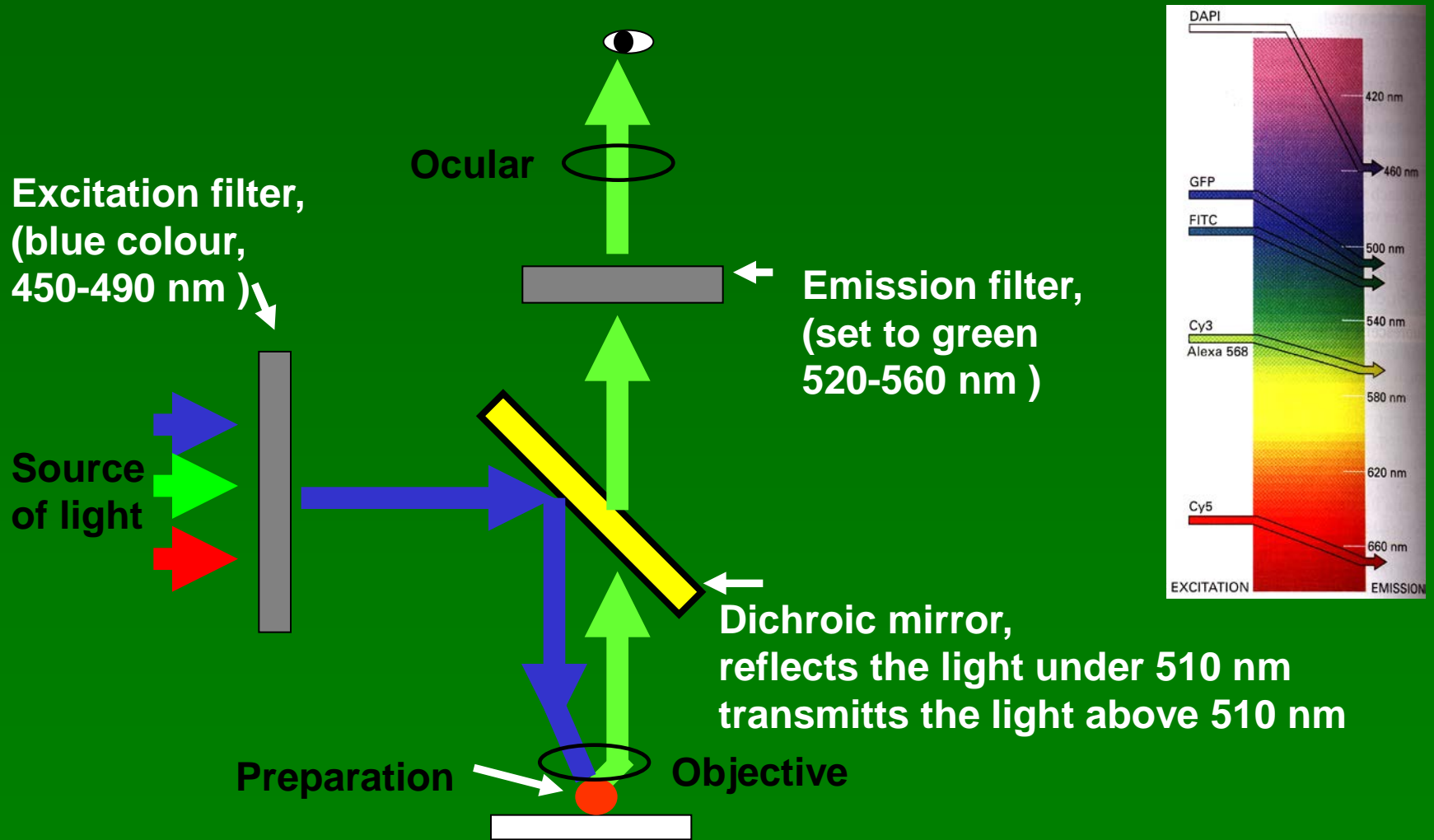


# Chromosomová teritoria (CT)

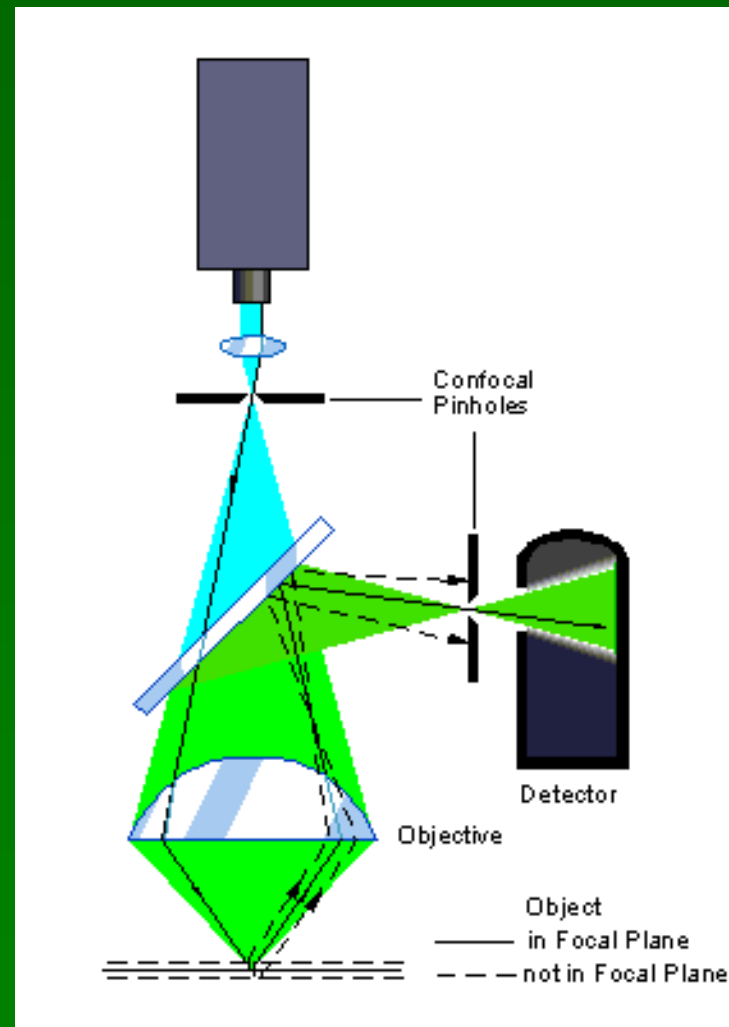
První experimenty, které vedly k závěru, že chromosomy se nacházejí v jádře v podobě ohraničených domén, byly pokusy T. Cremera v létech 1982-1984. Zavedení FISH podstatně urychlilo poznání chromosomů jak v mitóze, tak v interfázi.



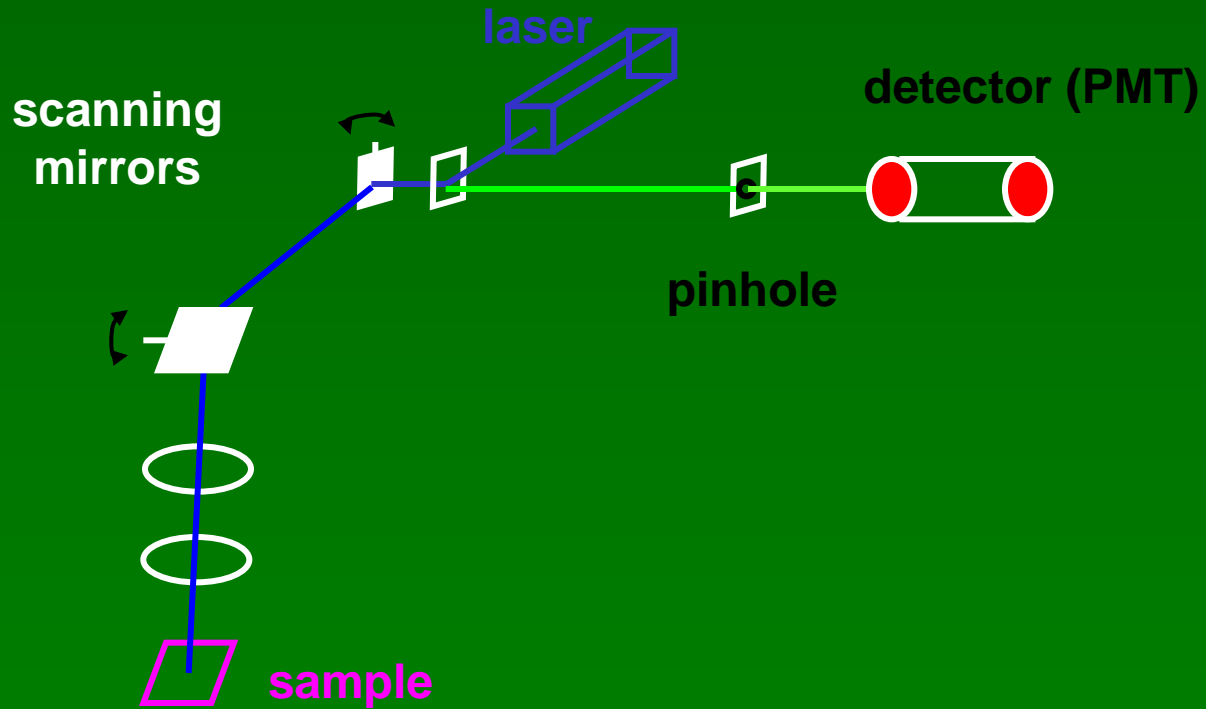
# Principle of fluorescence microscopy (filters are most important)



# Principle of confocal microscopy



# LSCM microscope



# Fluorescenční *in situ* Hybridizace (FISH)

Chromosomová DNA

A T  
C G  
T A  
G C  
A T  
T A

Denaturace



A  
C  
T  
G  
A  
T

T  
G  
A  
C  
T  
A

DNA proba (sonda)

A  
C  
T  
G  
A  
T

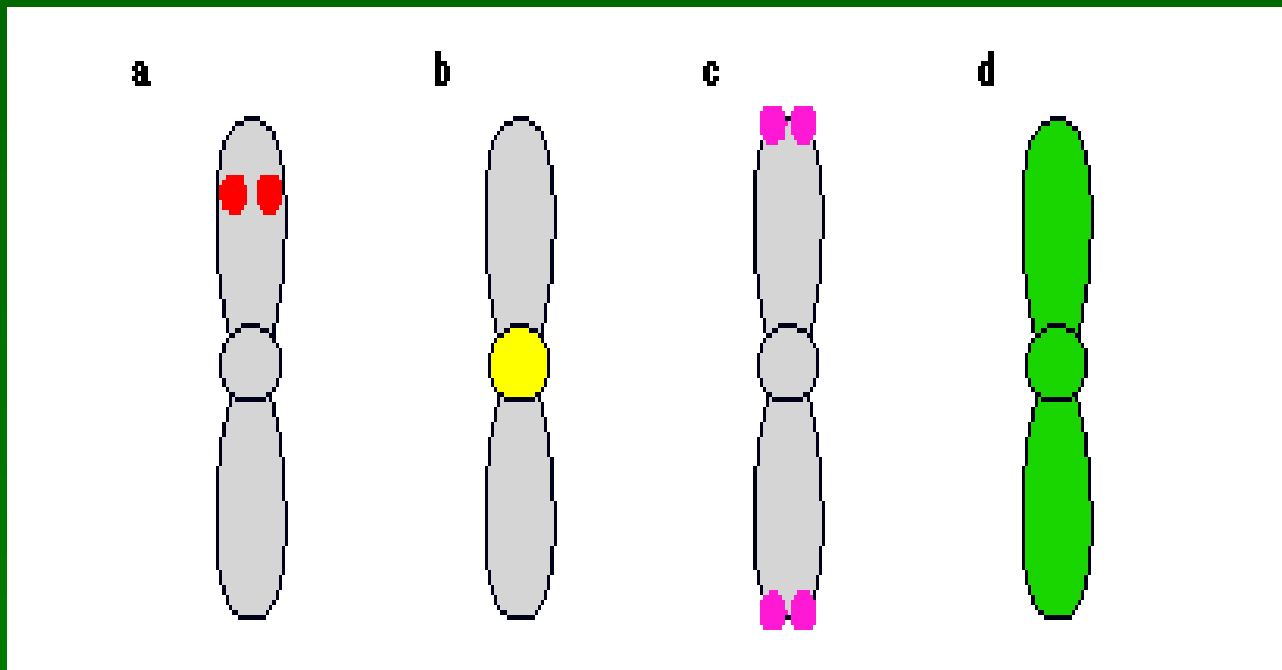
Hybridizace



A T  
C G  
T A  
G C  
A T  
T A

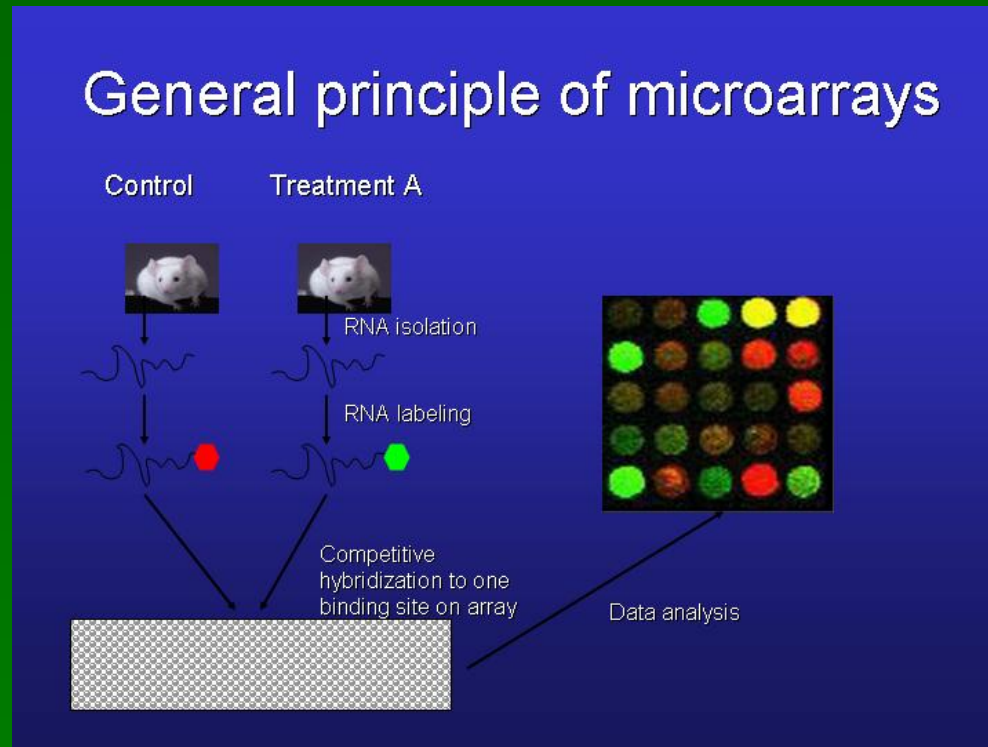


# Druhy sond pro FISH



- a) Sondy specifické pro určité geny (sekvence)
- b) Sondy specifické pro repetitivní sekvence v okolí centromer
- c) Sondy specifické pro telomery
- d) "Paintingové" sondy pro celé chromosomy

# Princip DNA microarrays



**Obarvená RNA se váže k malému spotu na sklíčku, kde je komplementární sekvence. Intenzity červené a zelené se snímají skenerem a vyhodnocují.**

# Funkční uspořádání genomu v jádře

