



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace předmětu

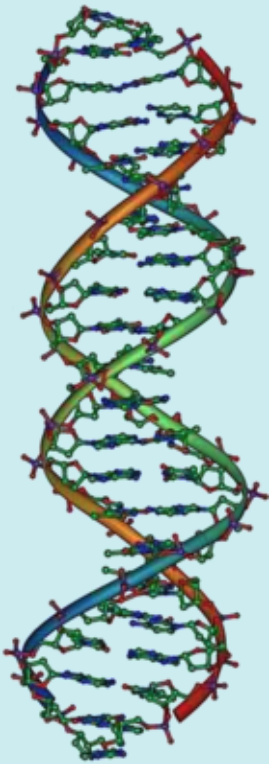
Genetika člověka GCPSB

„Propojení výuky oborů
Molekulární a buněčné biologie
a Ochrany a tvorby životního
prostředí.“

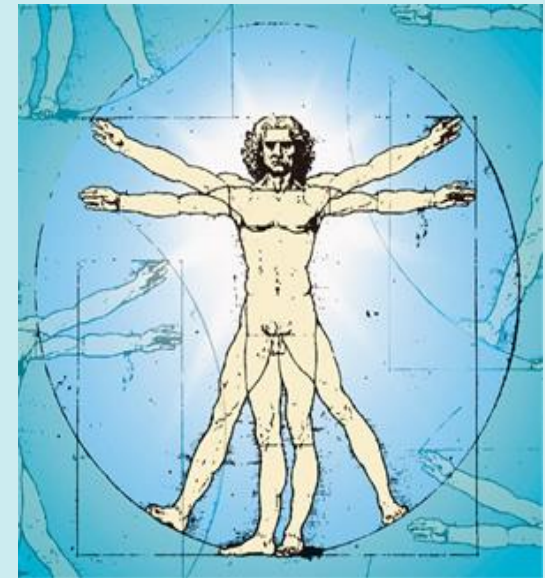
Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Genetika člověka / GCPSB

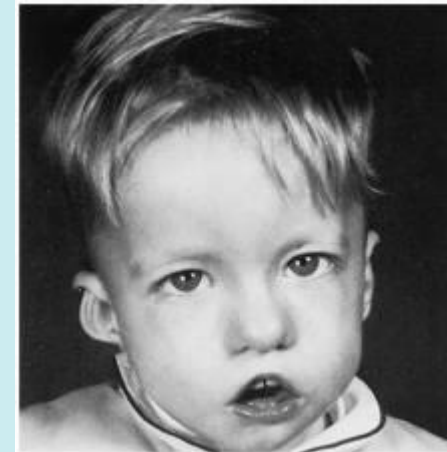
3. Chromosomy, Molekulární podstata genu



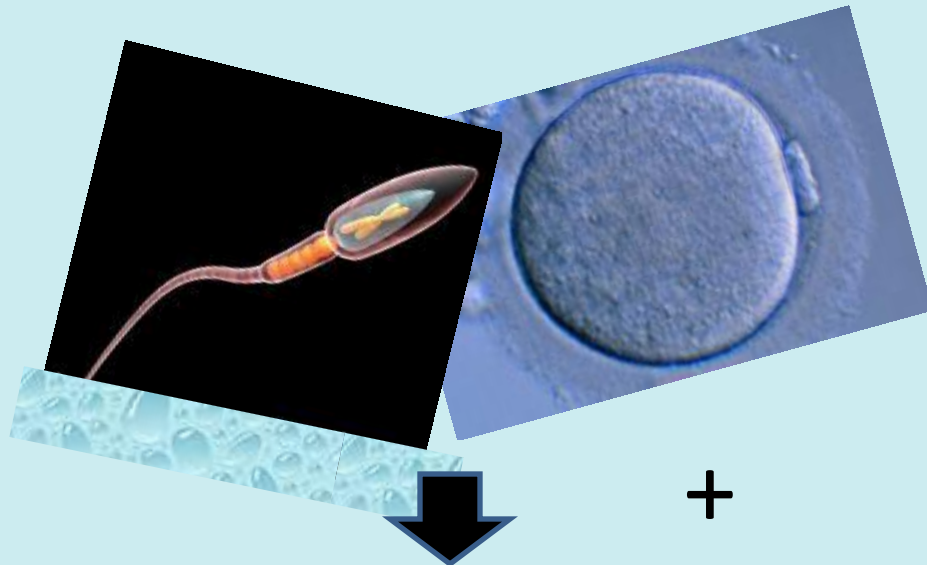
Radim Vrzal
2015



Analýza chromosomů a s nimi spojených nemocí (část I.)



Genetický materiál: Chromosomy



Zygota

Série
buněčných
dělení



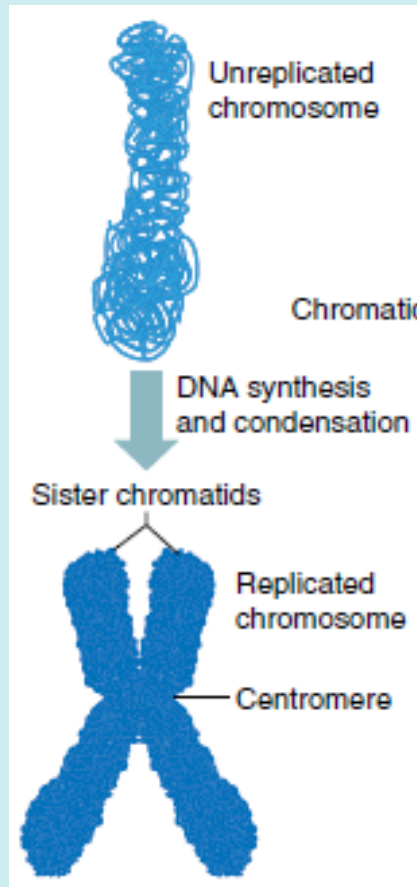
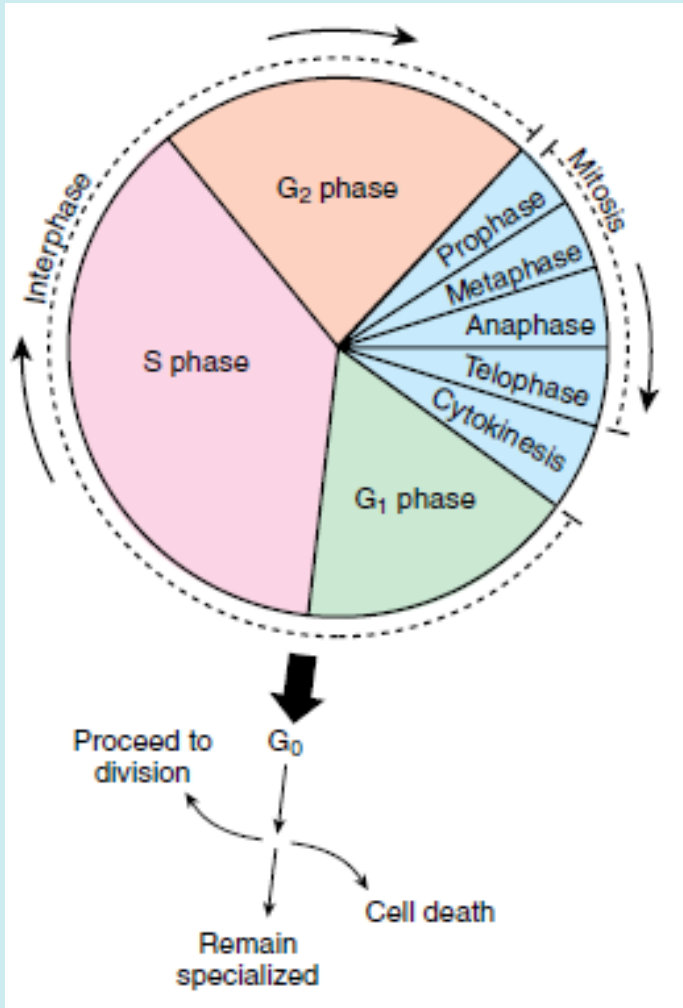
Úkoly genetického systému

- Jak každá buňka dostane kompletní sadu nosičů genetické informace?
- Jaký je způsob přenosu jednotek genetické informace?
- Jak je genetická informace zakódována a jak je dekódována?

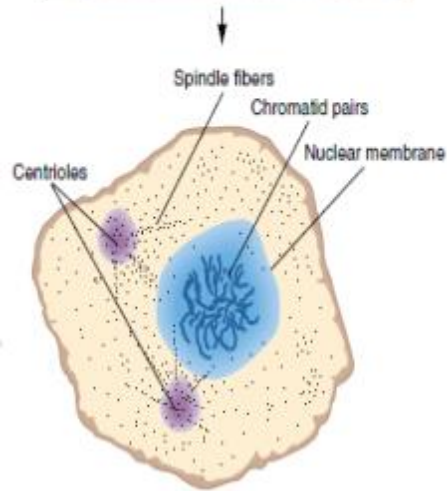
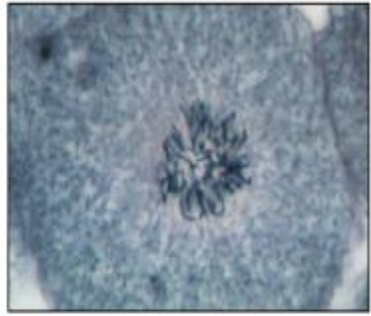
Buněčný cyklus

4 fáze buněčného cyklu

- gap 1 (G1)
- synthesis phase (S)
- gap 2 (G2)
- mitosis (M)

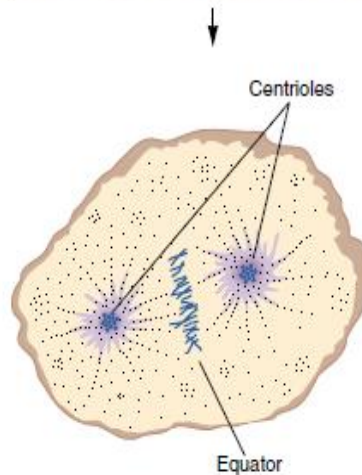
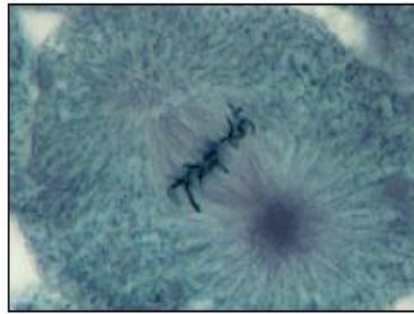


Mitosa ...aneb jak nepřibrat na váze



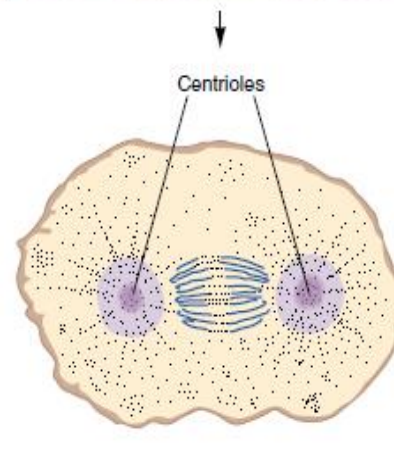
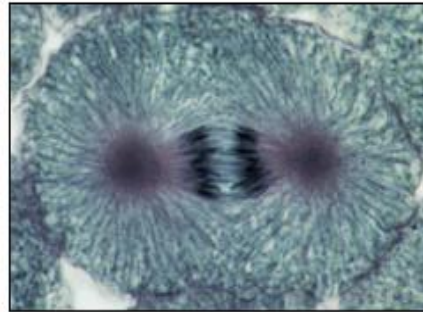
Profáze:

**Kondenzace
chromosomů
Pohyb centriol**

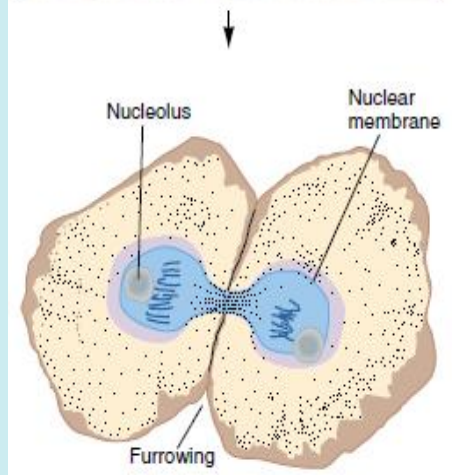
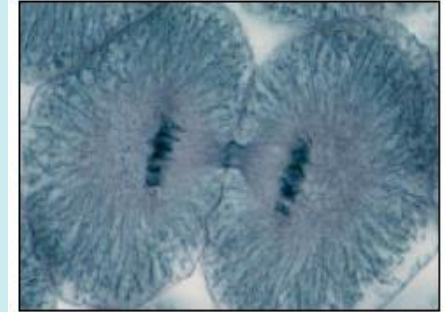


Metafáze:

**Vazba
mikrotubulul na
centrioly**



**Anafáze
(Disjunkce):
Separace
chromosomů**

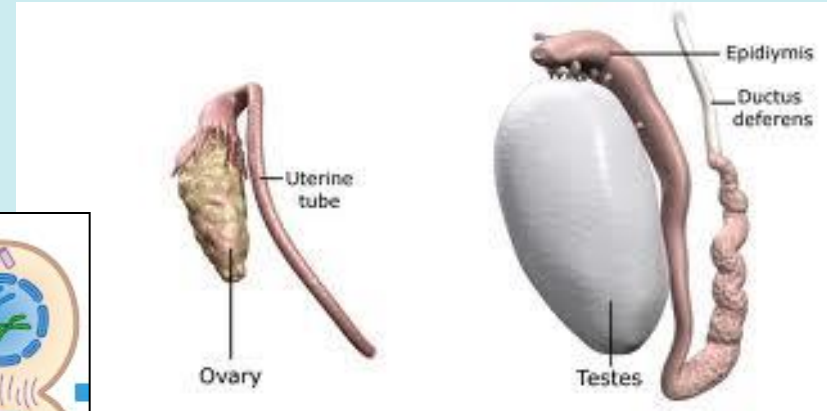
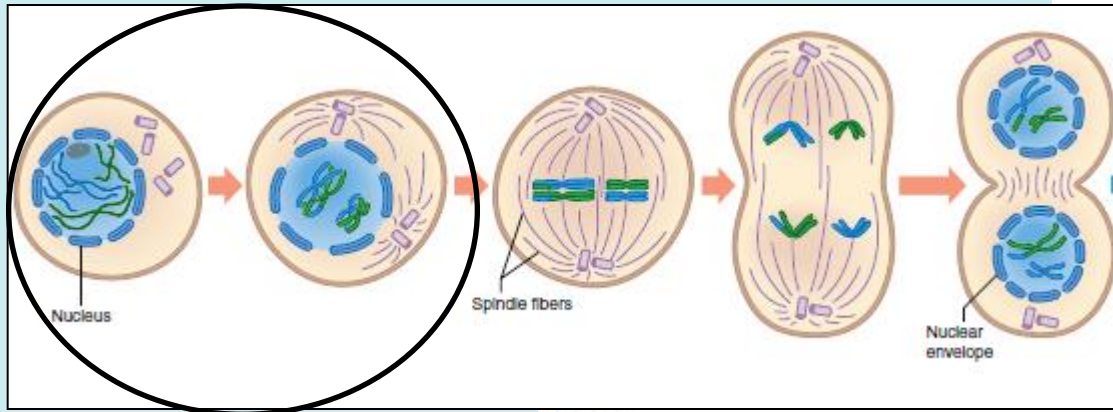


Telofáze:

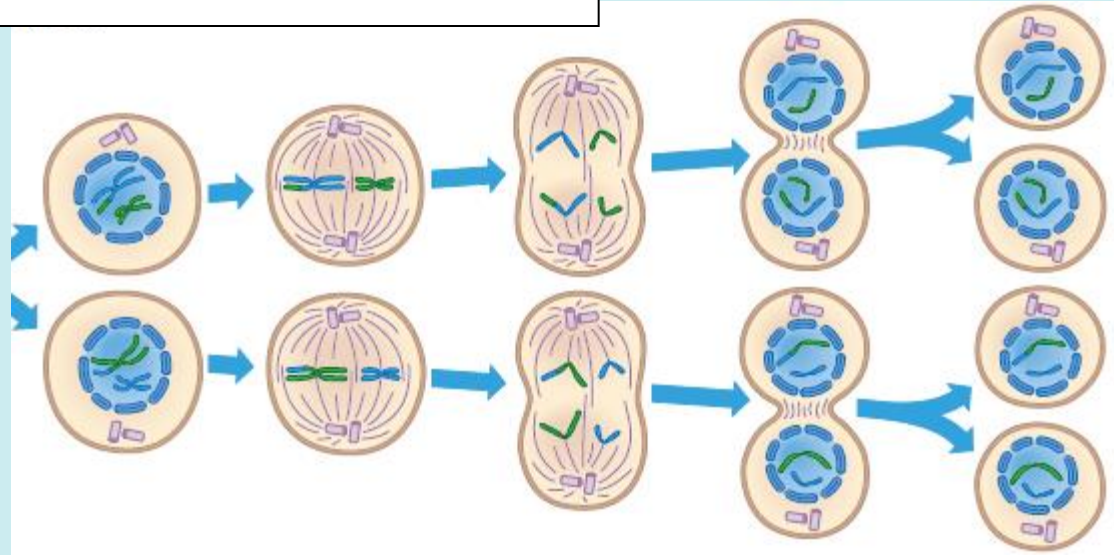
**Tvorba jaderné
membrány**

Meiosa...aneb jak efektivně zhubnout

- Jen v gonádách
- 2 dělení



Profáze I –
rozdělena do 5
stadií

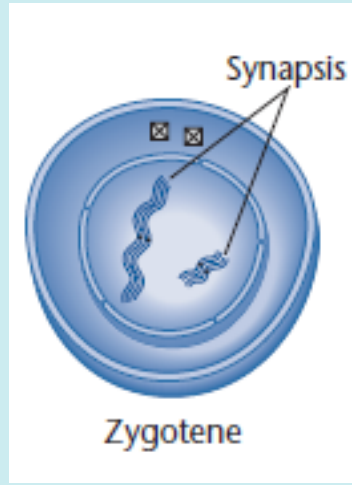


Meiosa...aneb jak efektivně zhubnout



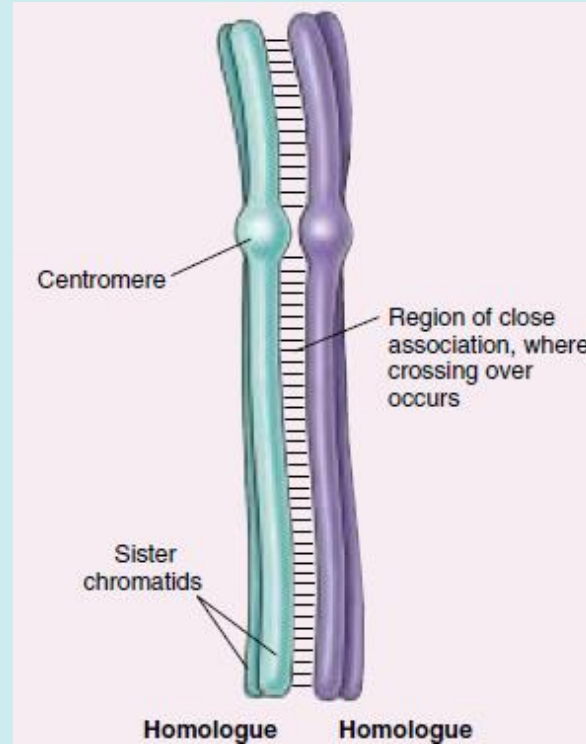
Leptotene

Zdvojené
chromosomy
začínají
kondenzovat



Zygotene

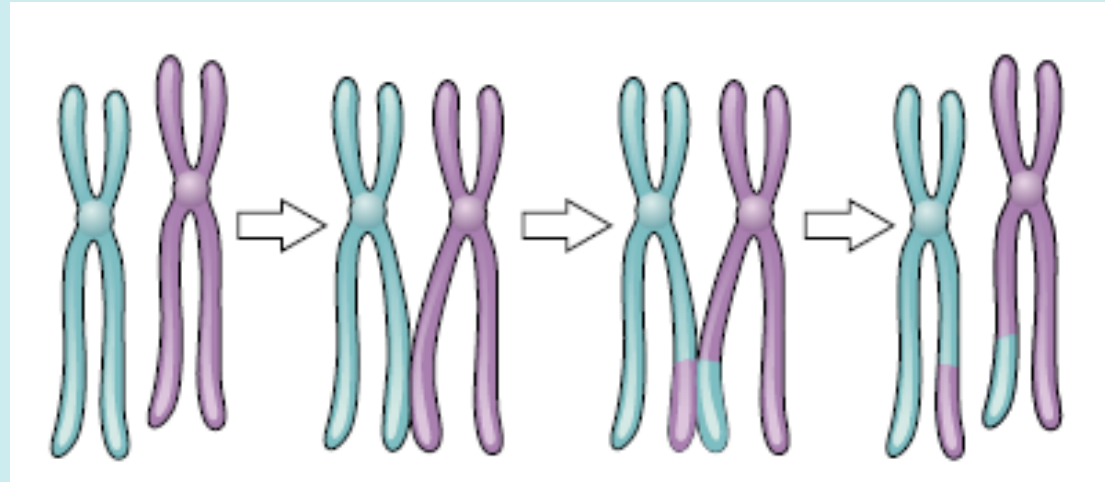
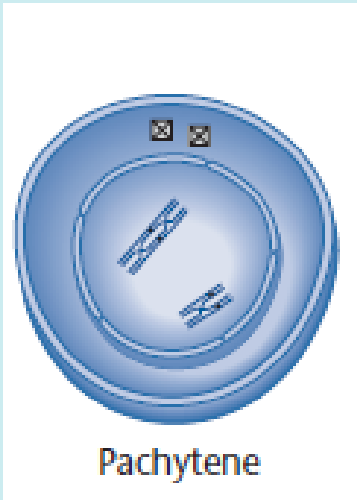
Podélné
spojení mezi
členy páru
chromosomů
(homologní) =
synapse



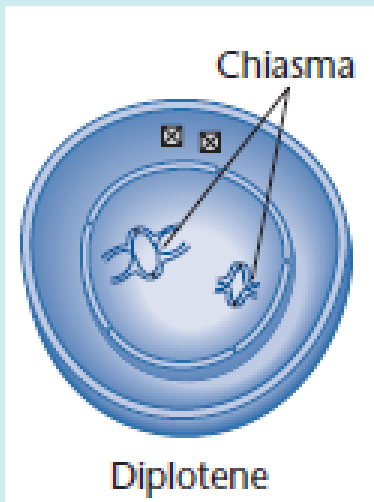
Bivalent

**Člověk =
23 bivalentů**

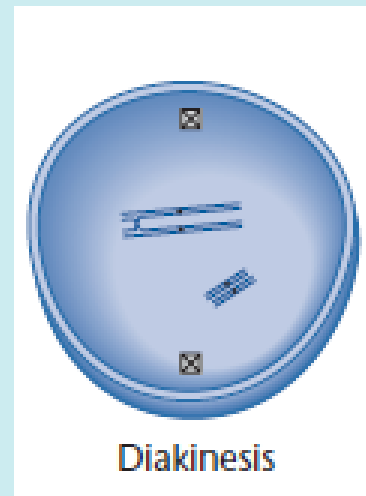
Meiosa...aneb jak efektivně zhubnout



Reciproká výměna chromosomálního materiálu = **crossing over** mezi nesesterskými chromatidami (podle nejnovějších poznatků už v zygotene)



Ústup synase s výjimkou několika míst (chiasmata). Bivalenty kondenzují.



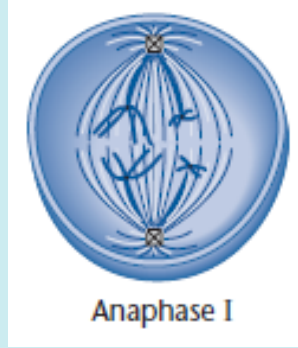
Chiasmata ustupují od centromer k telomerám. Centrioly jsou na opačných pólech, jaderná blána se rozpouští.

Meiosa...aneb jak efektivně zhubnout



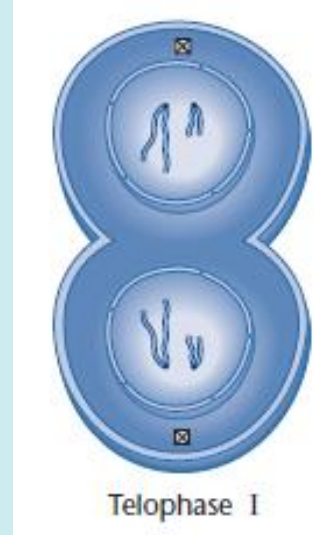
Metaphase I

Uspořádání v rovníku buňky.



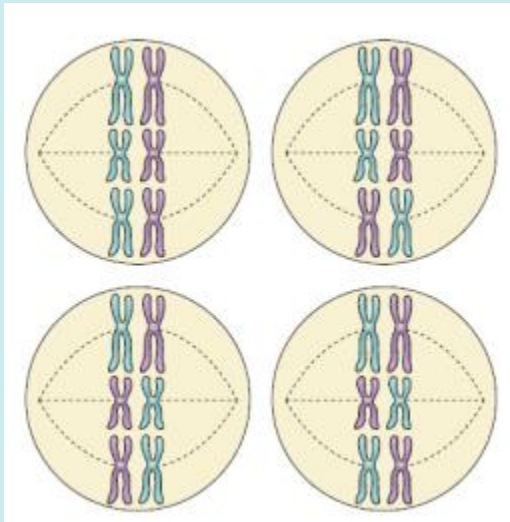
Anaphase I

Duplikované chromosomy (diády) z každého bivalentu se rozcházejí.



Telophase I

Vznik jaderné membrány a tvorba dceřiných buněk. Každá obsahuje 23 duplikovaných chromosomů.



2ⁿ kombinací uspořádání (n = počet chromosomových párů)

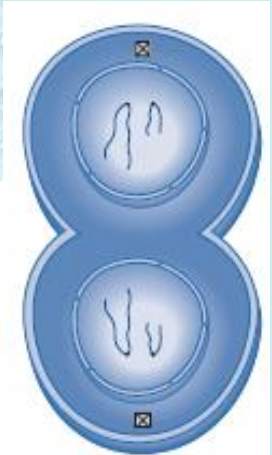
Meiosa II nemá S fázi. Na konci má každá buňka 23 jednoduchých chromosomů.



Metaphase II



Anaphase II



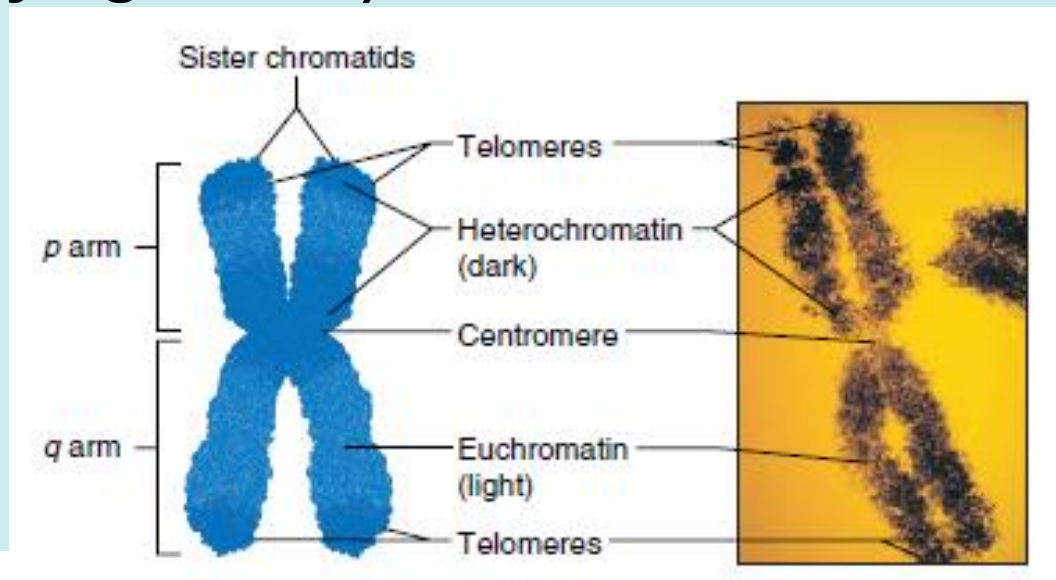
Telophase II

Charakterizace chromosomů

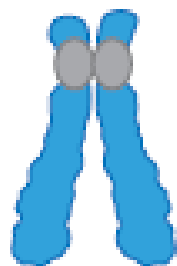
Cytogenetika – spojuje variace chromosomů k určitému znaku (spojení HUGO + cytogenetika)

Velikost a tvar → 22 párů drží pohromadě = **autosomy**
23. pár = **pohlavní chromosomy**,
u žen oba stejné = X,
muži = X + Y

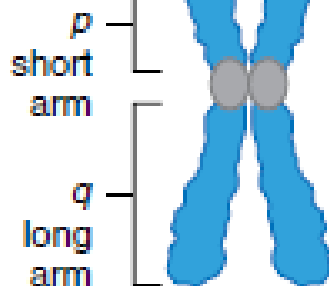
In vitro studie – metafázní blok (kolchicin)



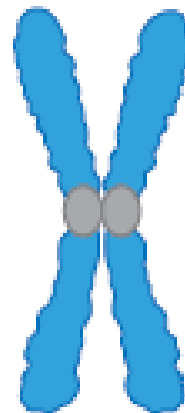
Telocentric



Acrocentric



Submetacentric



Metacentric

Místo primárního zaškrvení (centromera) - společný znak chromosomů → dvě raménka chromosomů → krátké (p), malé (q)

Charakterizace chromosomů

Rozdílná barvení – rozdílné proužkování

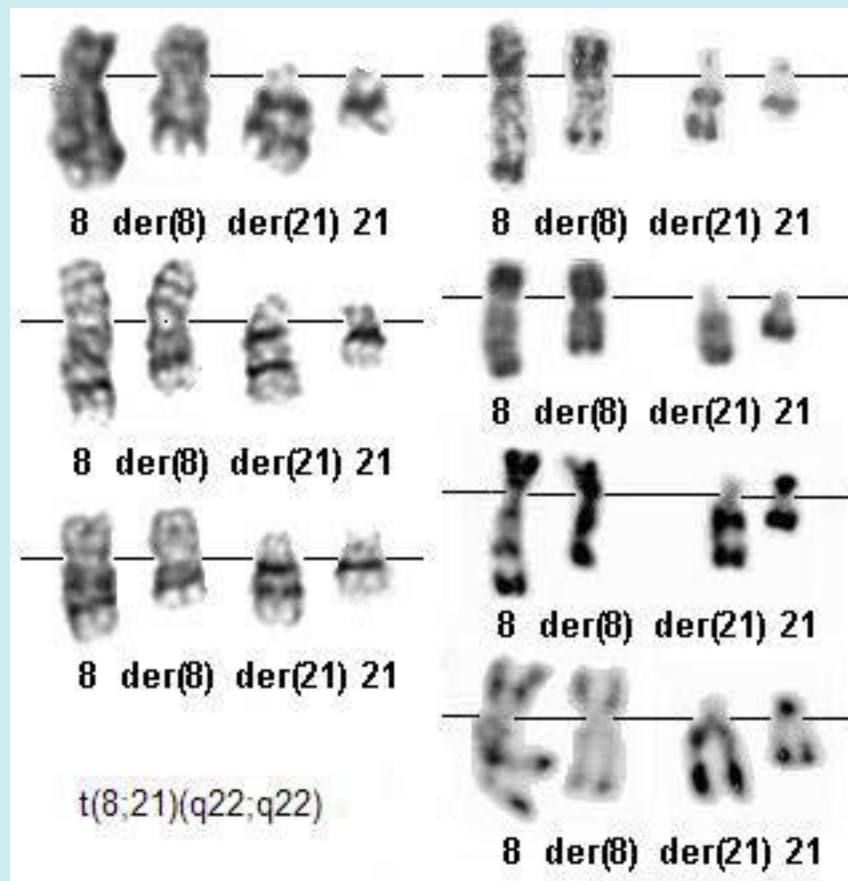
Proužek = band = ta část chromosomu snadno odlišitelná od sousedního segmentu jevící se tmavší či světlejší jednou z barvicích technik

G-banding – Giemsovo barvivo (směs methylenové modři + eosinu) po digesci trypsinem

– **tmavé bandy** vázající barvu jsou většinou **AT**

R-banding – reversní k G-bandingu

– **AT**, heterochromatické, **světlé**; GC, euchromatické, tmavé



G-banding

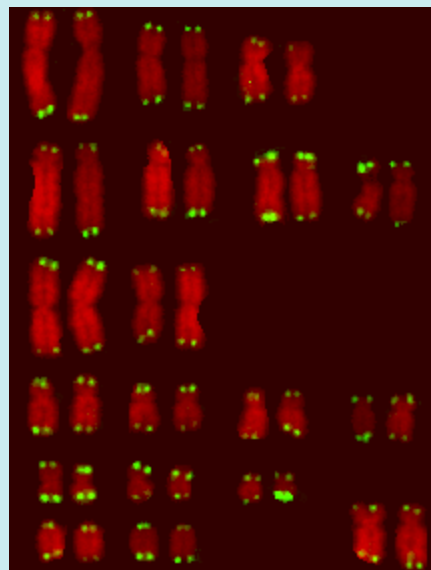
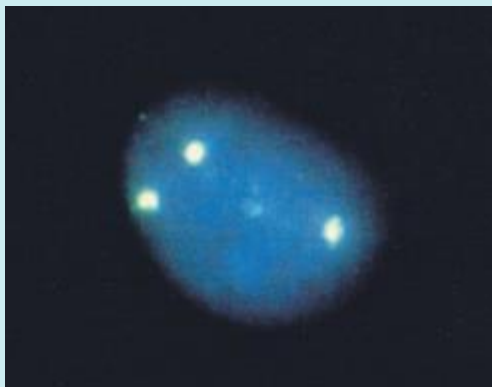
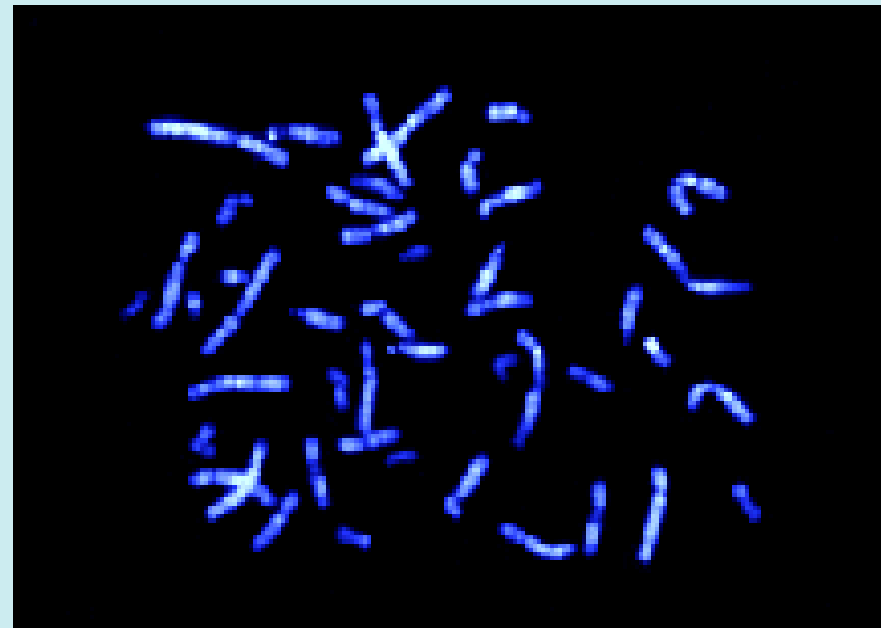
R-banding

Charakterizace chromosomů

Q-banding – fluorescenční **chinakrin**,
vzorec barvení je podobný G-bandingu
(pro Y)

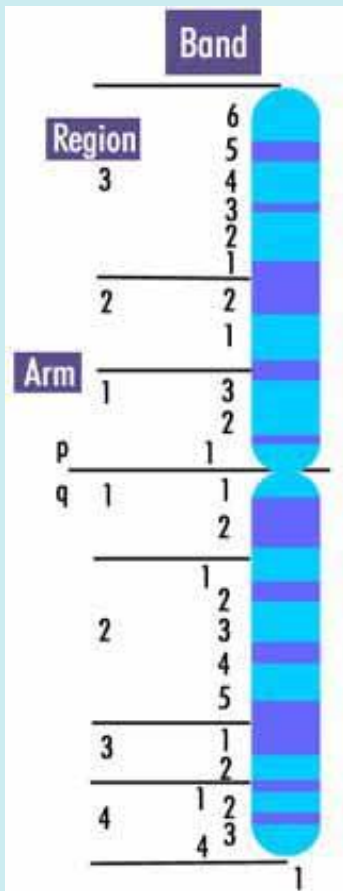
Barvení stříbrem (NOR) - AgNO_3 barví
asociované proteiny s oblastí
organizující jadérko

FISH – specifická DNA komplementární
oligonukleotid s fluorescenční značkou



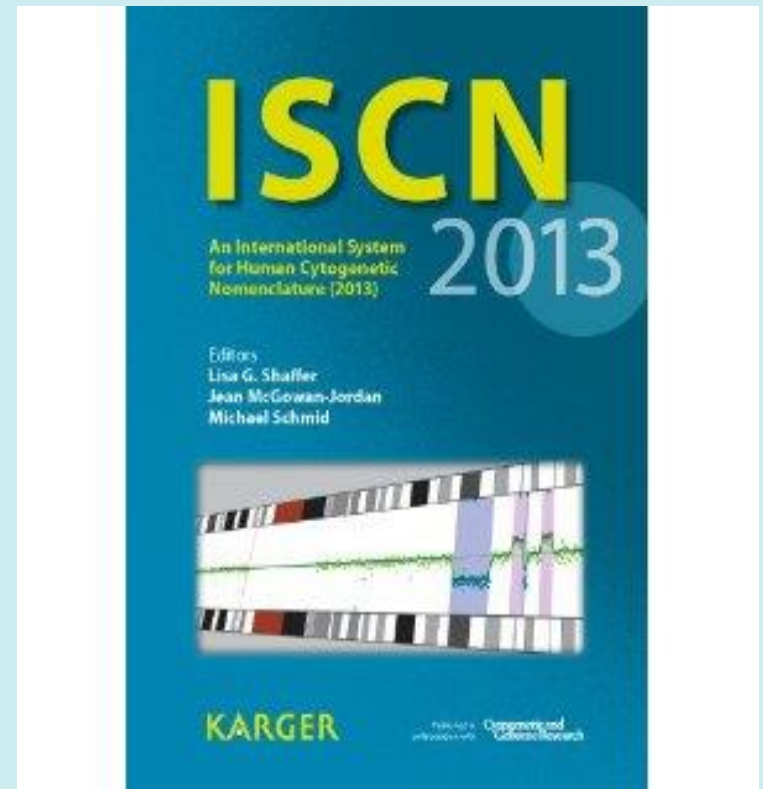
Charakterizace chromosomů

Chromosomová raménka rozdělena do oblastí (regions) – souhlasné a odlišné morfologické znaky (orientační body) byly použity k pojmenování každé oblasti



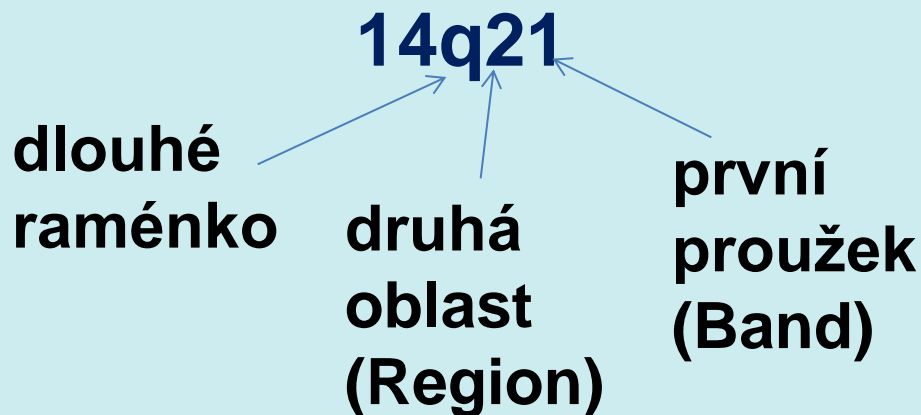
Oblast (Region) = úsek chromosomového raménka ležící mezi středy dvou orientačních bodů - značeny arabskými číslicemi od centromery směrem ke koncům

The International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)

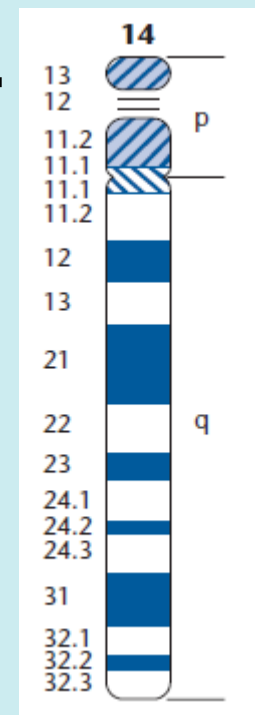


Charakterizace chromosomů

Chromosom 14

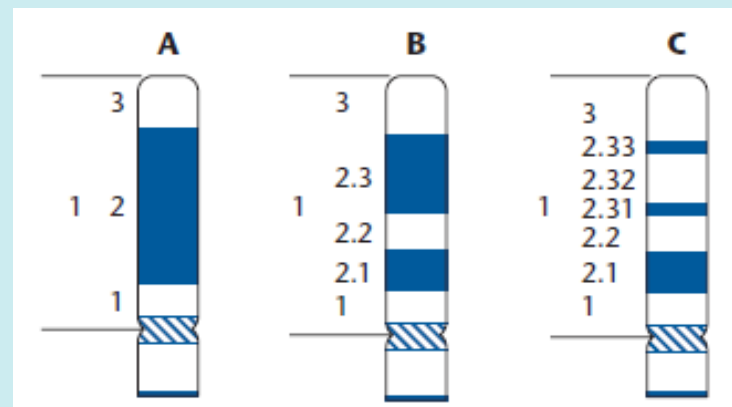


Ideogram, idiogram =
grafické schéma zobrazující
chromosomové bandy



Použití vysoko-rozlišovacích technik -
staré se „rozpadaly“ na větší počet →

Proužky rozděleny na podproužky



Chromosomové abnormality

Mitosa / meiosa nejsou bezchybné – občasná ztráta či zisk chromosomu v důsledku defektního mitotického vřeténka

Změna v počtu chromozomů = **aneuploidie**

Somatická buňka = ztráta schopnosti se dělit nebo v kombinaci s ostatními chromozomálními a buněčnými změnami → **rakovina**

Pohlavní buňka = ztráta schopnosti správně segregovat v meiose I či II (nondisjunkce) → gamety s chromosomem navíc či chybějícím

Výskyt extra chromosomu navíc (trisomie) ve většině případů vede k ztrátě embrya *in utero*.

Výjimky se týkají chromosomů 13, 18, 21 a X.

Trisomie chromosomu 21



Downův syndrom - 47, XX/Y, +21

- mentální retardace
- opožděný růst
- krátký nos
- široký, plochý obličej
- zkrácení kostí
- frekvence 1 : 800, roste s věkem matky
(1 : 952 – pod 30, 1 : 378 pod 35, 1 : 106 pod 40)

1866 – John Langdon Haydon Down – nepřesný výraz *mongoloidní* – neodůvodněná podobnost

1958 – odhaleno 47 chromosomů u osob s D.s.

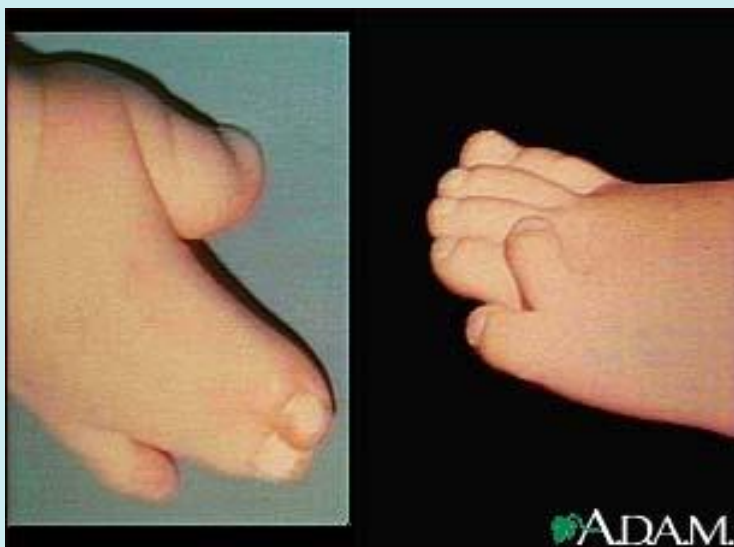
U osob starších 40 - černá vlákna a klubka amyloidu charakteristická pro Alzheimerovu chorobu

Vyšší riziko – 25 % vs. 6 % obecné populace

Trisomie chromosomu 18

Edwardsův syndrom - 47, XX/Y, +18

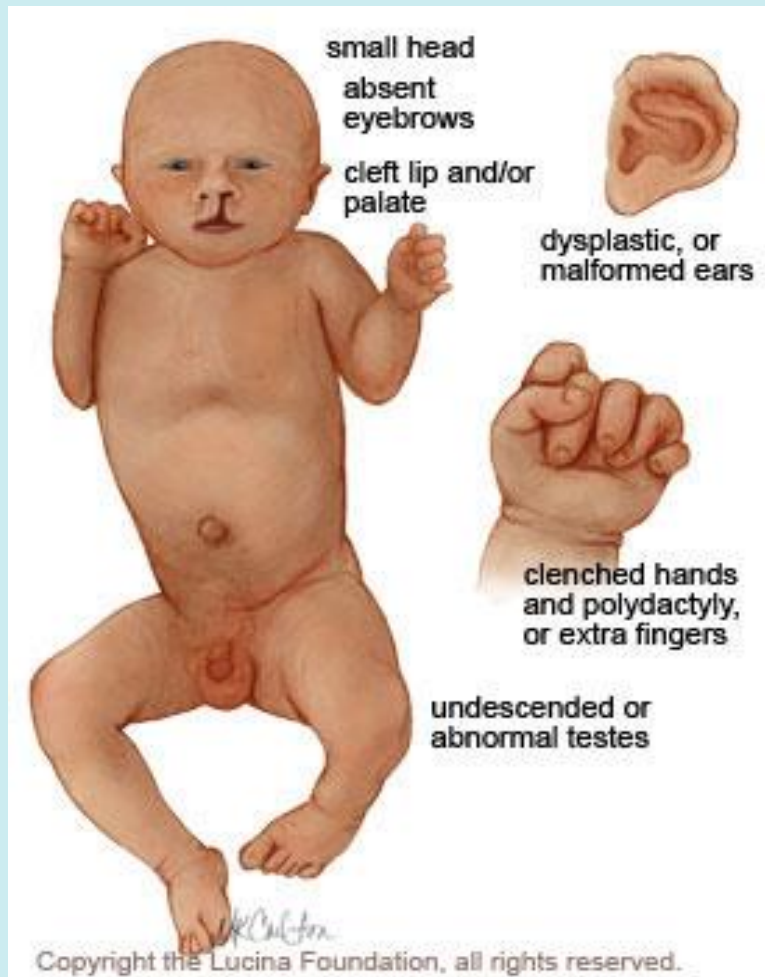
- mentální retardace
- malformace srdce
- zvláště sevřené pěsti
- frekvence 1 : 8 000
- většina případů v důsledku nedisjunkce v meiose II během vývoje oocyty



Trisomie chromosomu 13

Pataův syndrom - 47, XX/Y, +13

- těžké defekty v CNS, rozštěp patra
- fuse očí v jednu oku podobnou strukturu
- frekvence 1 : 25 000
- výskyt extra prstu či rozštěpu patra jsou dostatečné důkazy pro provedení chromosomové analýzy plodu
- ultrazvuk odhalí extra slezinu, abnormální strukturu jater

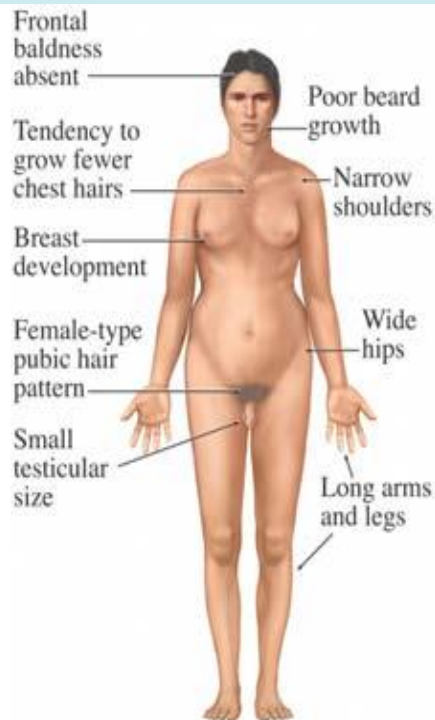


Chromosomové abnormality gonozomů

47, XXY

Klinefelterův syndrom

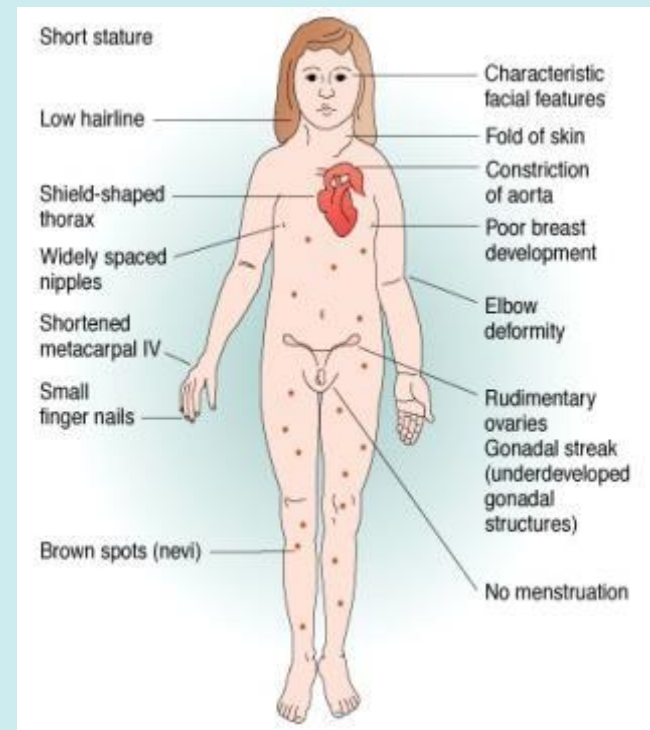
- 1 : 600 mužů
- neplodní muži, vysokí
- dlouhé paže a chodidla



45, X

Turnerův syndrom

- 1 : 2500 žen
- krátké, neplodné
- tlustý krk



Trisomie X; 47, XXX

- 1 : 1 000 žen
- většina trpí problémy s učením
- menstruační nepravidelnosti

Disomie Y; 47, XYY – Syndrom Jacobsové

- 1 : 1 000 mužů
- normální
- 1961 poprvé identifikován u muže s nevázaným chováním
- 1967 – P. Jacobs – studie mezi vězni – asociace s agresivním chováním

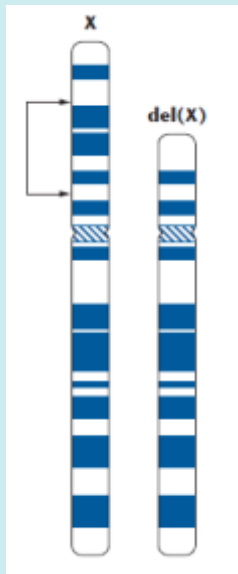
Změny ve struktuře chromosomů

- Vznikají při zlomení chromosomu a znovuspojení s jiným zlomeným kouskem chromosomové DNA

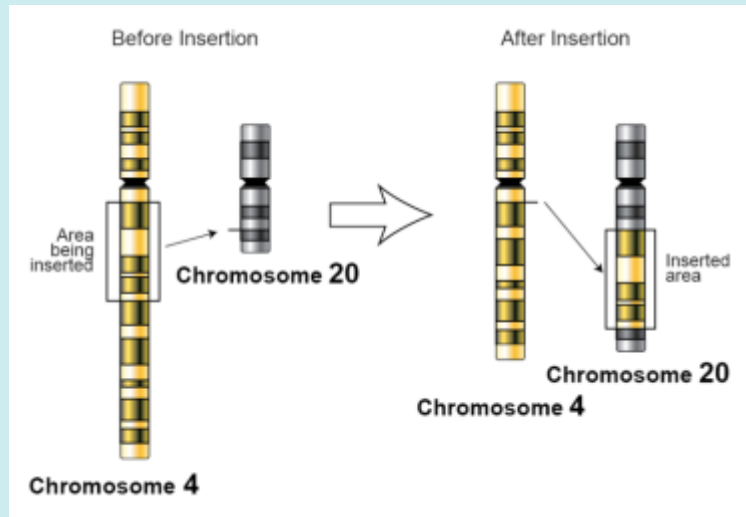
Většinou v S fázi – chybná oprava DNA nebo chyby během replikace

Rentgenové paprsky / chemikálie – indukce zlomů

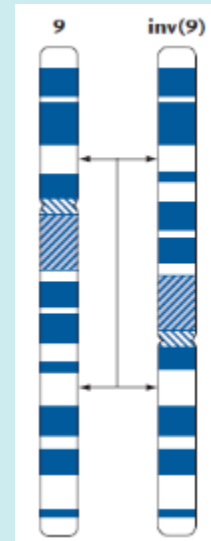
Delece



Insertce



Inverse



Nomenklature ISCN – zkratka pro popis abnormality – např. 46, XY, del(5)(p13)

Změny ve struktuře chromosomů

Cri-du-chat (kočičí pláč) – jakákoliv terminální delece chromosomu 5



- dítě vydává pláč, jako když kočka mňouká
- malé hlavy (mikrocefálie)
- široký rozestup očí (okulární hypertelorismus)
- malé čelisti (mikrognathia)
- výrazná mentální retardace

Inverze inv(9)(p11q12) – 1 : 100

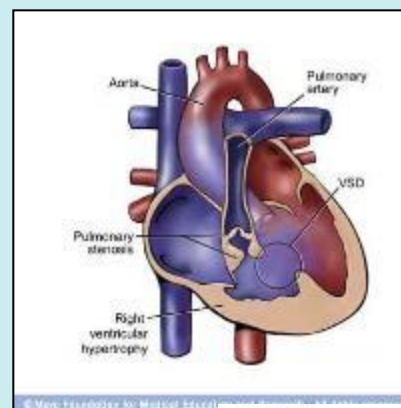
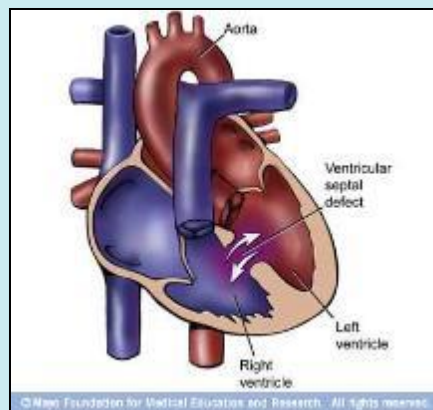
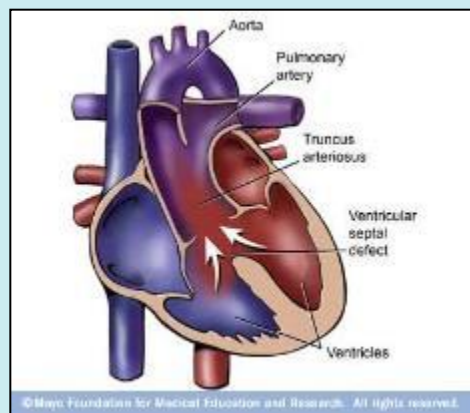
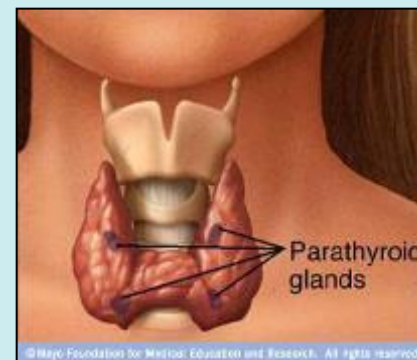
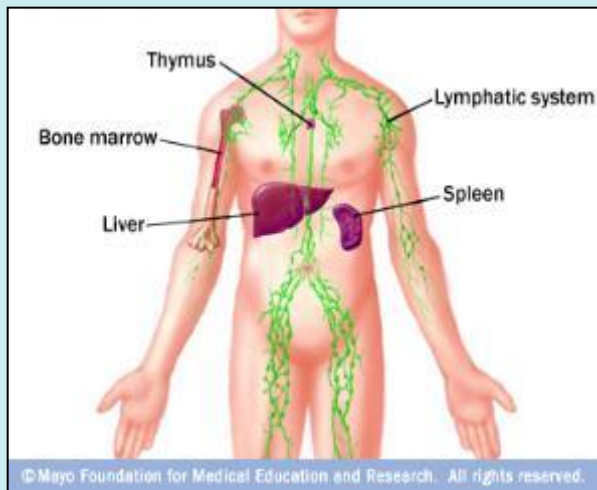
- žádné speciální fyzické abnormality
- mění pořadí sekvence informace podél chromosomu
- v nekritické oblasti
- genetická informace je zachována

Změny ve struktuře chromosomů

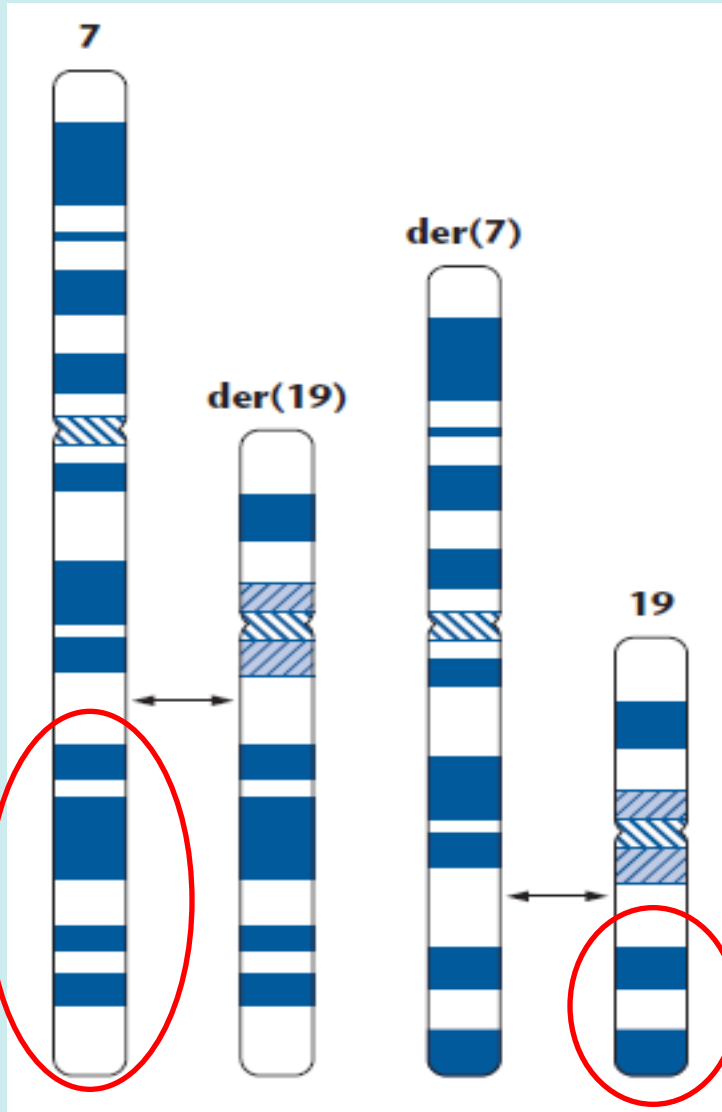
DiGeorge Syndrom (22q11.2 deleční syndrom)

– jakákoliv terminální delece chromosomu 22

- rozštěp patra
- defekty srdce
- snížená funkce imunitního systému
- hypoparathyroidismus



Změny ve struktuře chromosomů



- mezi nehomologními chromosomy – výměna části chromosomů bez ztráty materiálu = **reciproká / balancovaná translokace**

- většina rodinně specifická, i když existují výjimky $t(11; 22)(q23; q11.2)$

- zachování materiálu → žádný zvláštní vliv na fyzické / mentální schopnosti

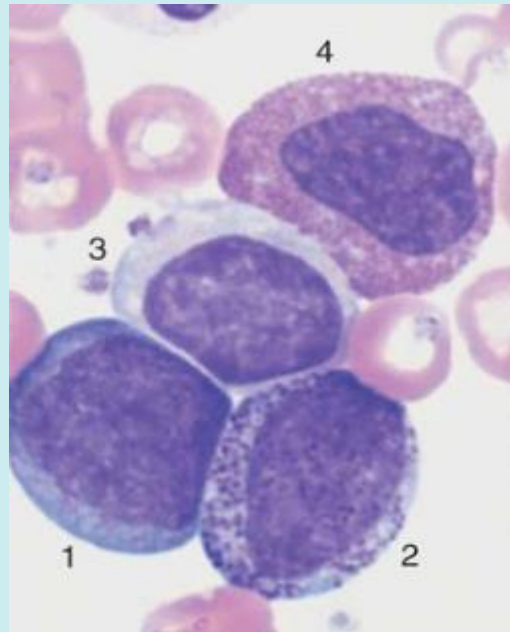
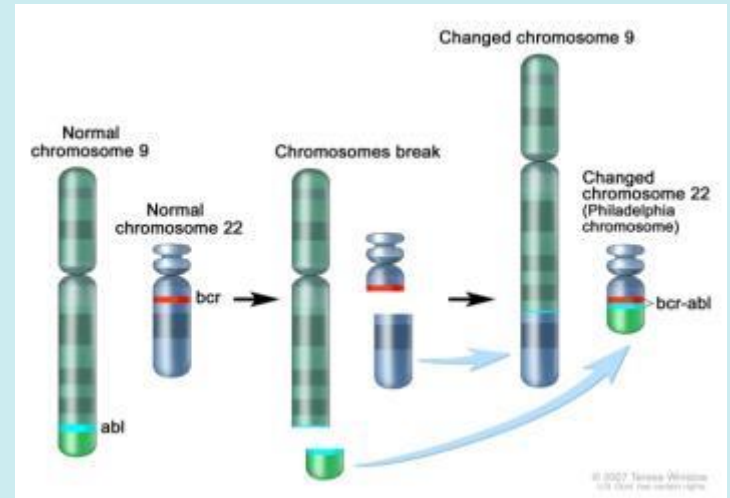
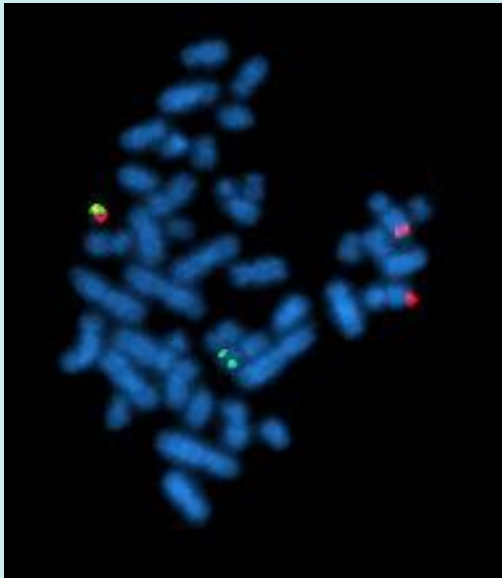
!!! Výjimky – u některých typů rakovin

$t(7; 19)(q22; q13.1)$

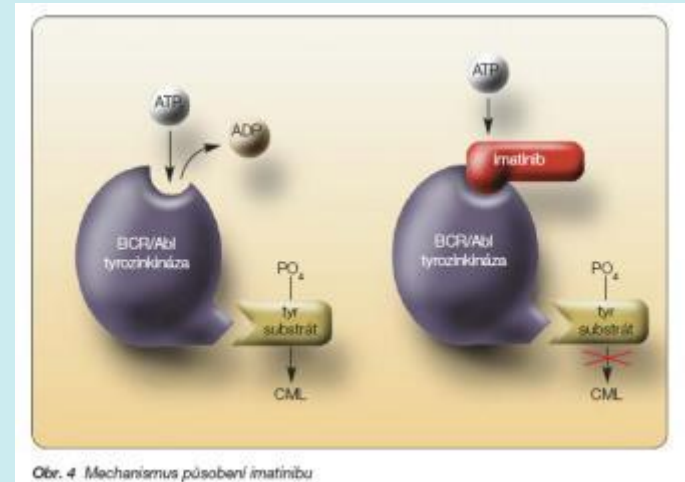
der = odvozený chromosom

Změny ve struktuře chromosomů

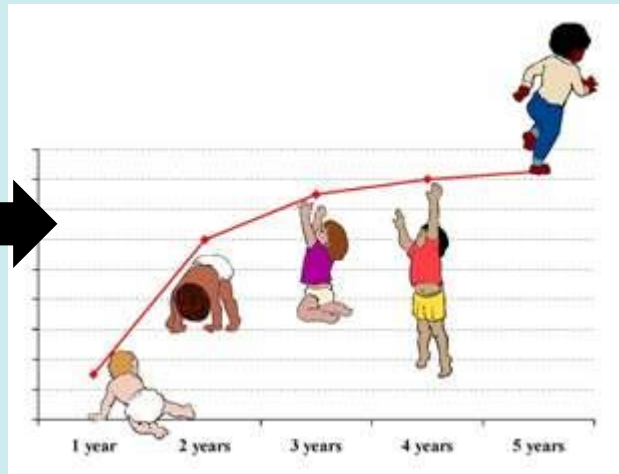
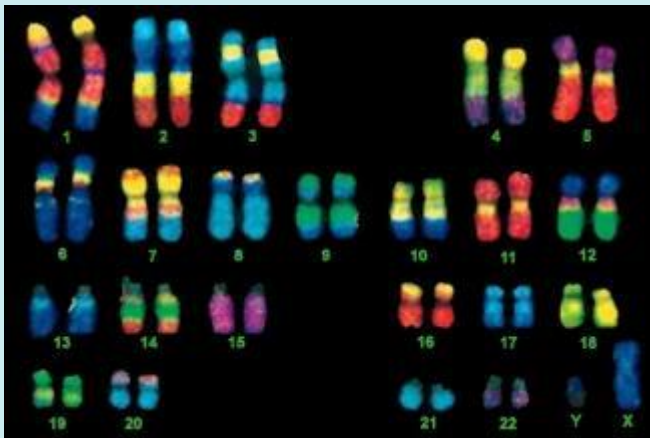
- **t(9;22)(q34;q11)** – nález u 95 % CML (Filadelfský chromosom; Philadelphský chr.)
- splenomegalie, anemie, leukocytosa, levý posun v řadě granulocytů
- fúzní protein BCR-ABL se zvýšenou Tyr kinasovou aktivitou



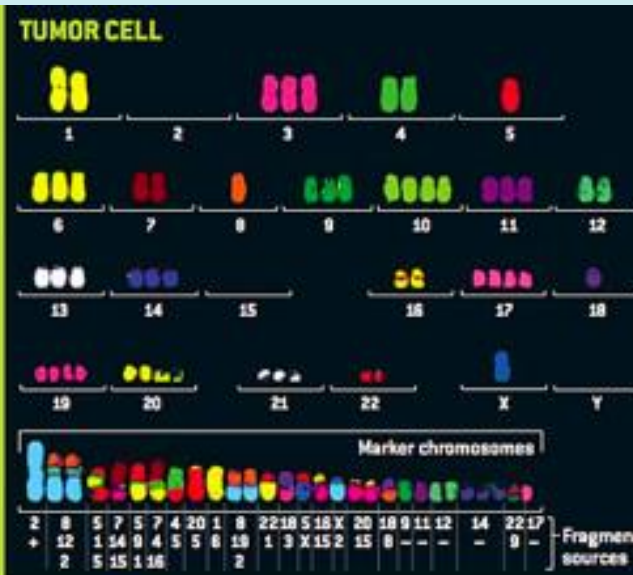
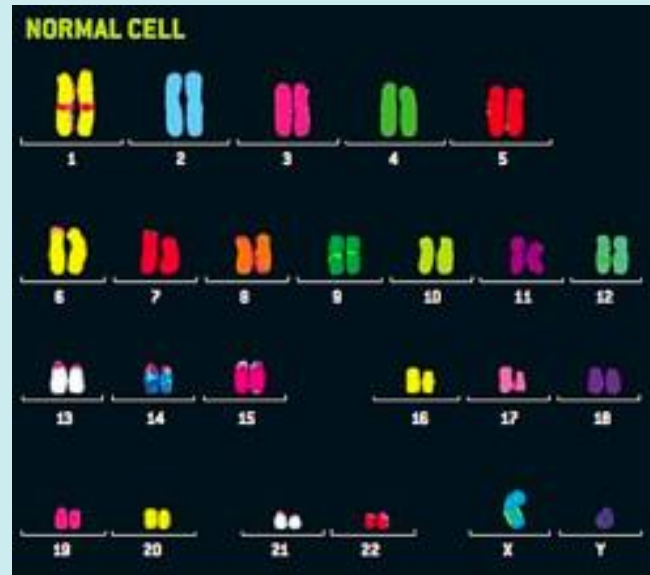
- 1 - myeloblast, 2 - promyelocyt,
- 3 - myelocyt s defektní granulací,
- 4 - nezralý eosinofil



Shrnutí části I.:

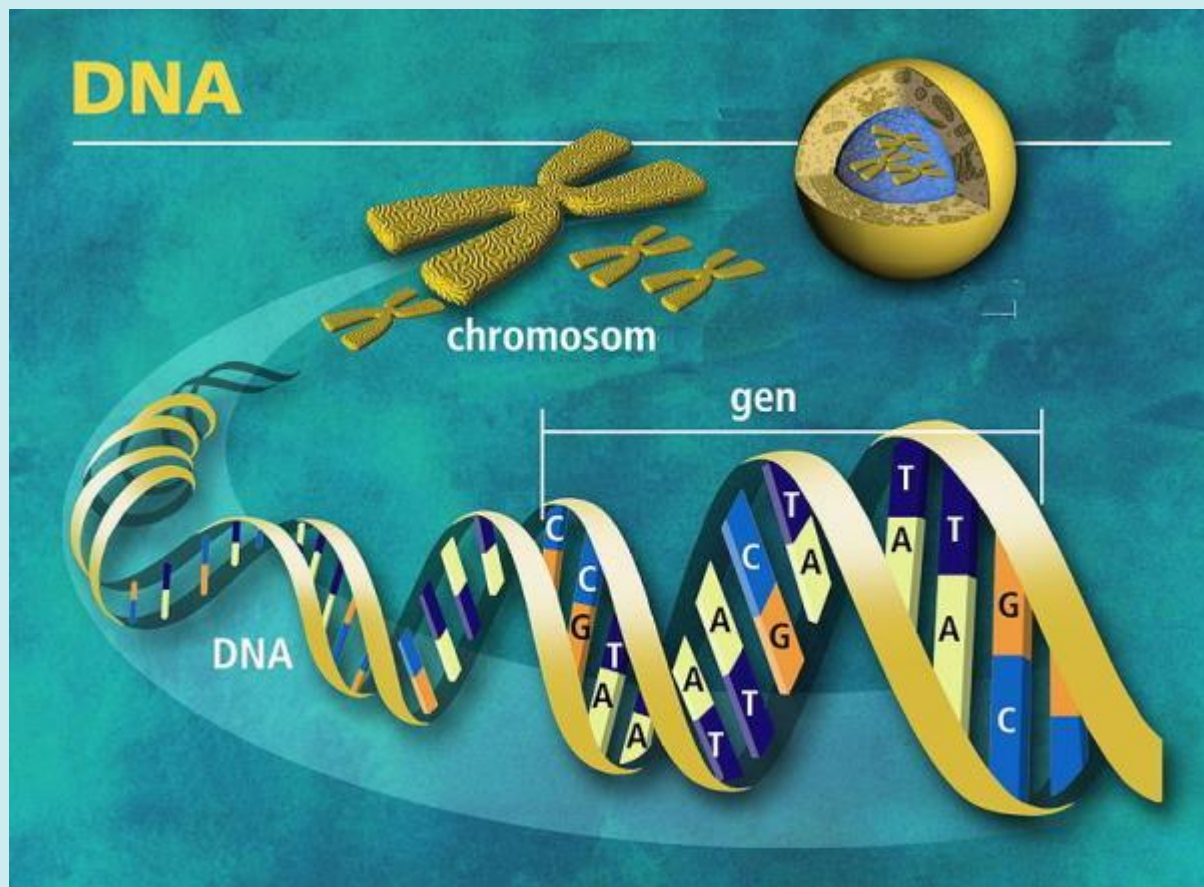


Správný počet chromosomů a množství genetické informace jsou esenciální pro normální vývoj.



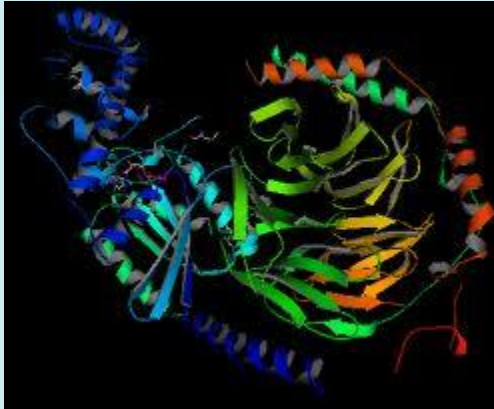
Přeuspořádání chromosomů je typickým znakem rakoviny.

Část II. - Molekulární biologie genu

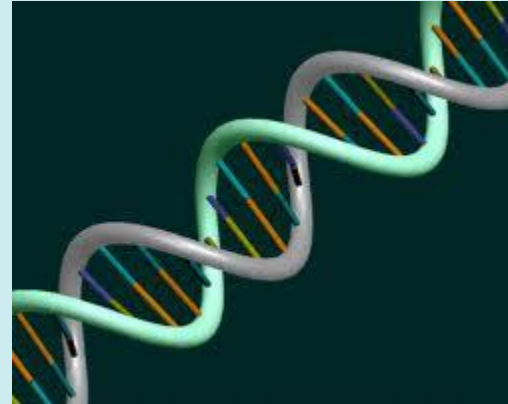


Molekulární biologie genu

Otázka : **Co je gen? Protein nebo DNA?**



?



E.B. Wilson (1899) – nukleová kyselina (DNA) by mohla být genetickým materiálem

Pozornost na protein – důvod?

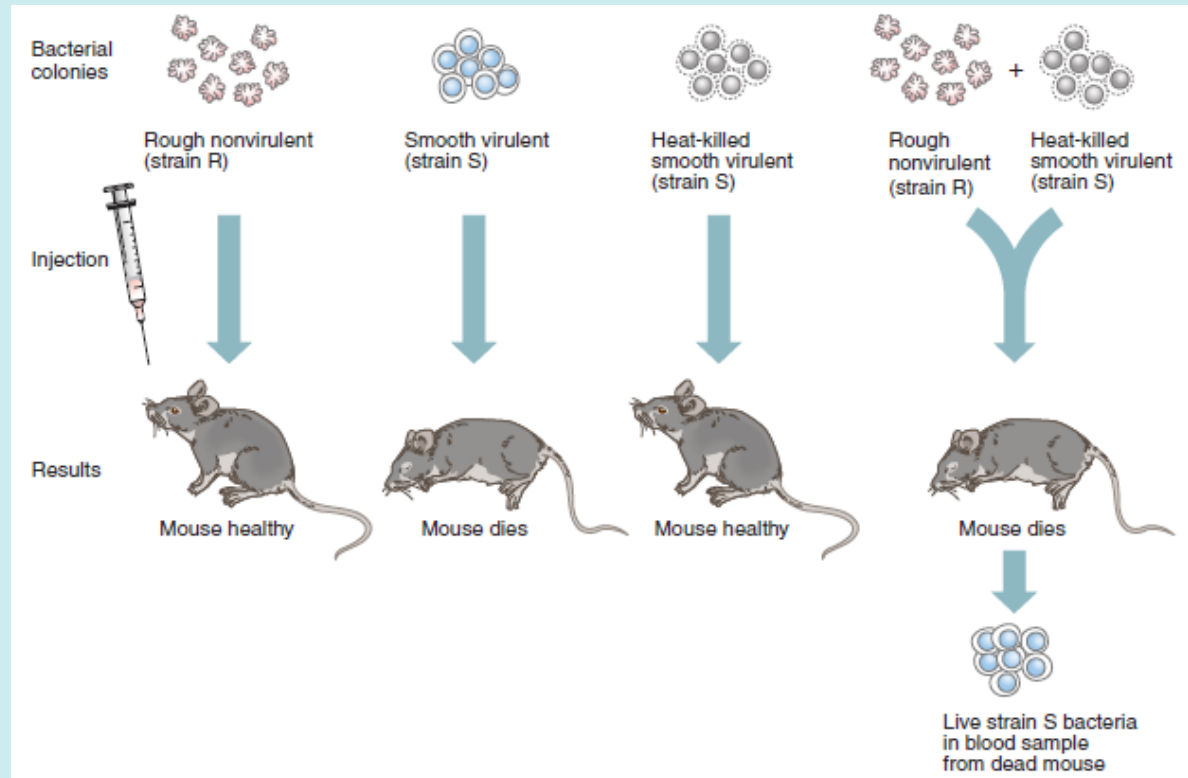
- DNA - „jen“ 4 báze
- protein - rozmanitější, dle Garrodovy práce – kauzální vztah mezi geny a enzymy

Vlastnosti genetického materiálu

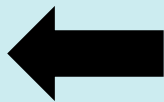
1920 - H.J. Muller – Nobelova cena (1945)

- 1) kóduje informaci pro produkci sloučenin určujících fenotyp
- 2) musí být schopen replikace
- 3) musí podstupovat změny, které mohou být zachovány

1928 - F. Griffith - myši s pneumonií – *Diplococcus pneumoniae* – dva typy R (rough) a S (smooth)



Jaká je
příčina?



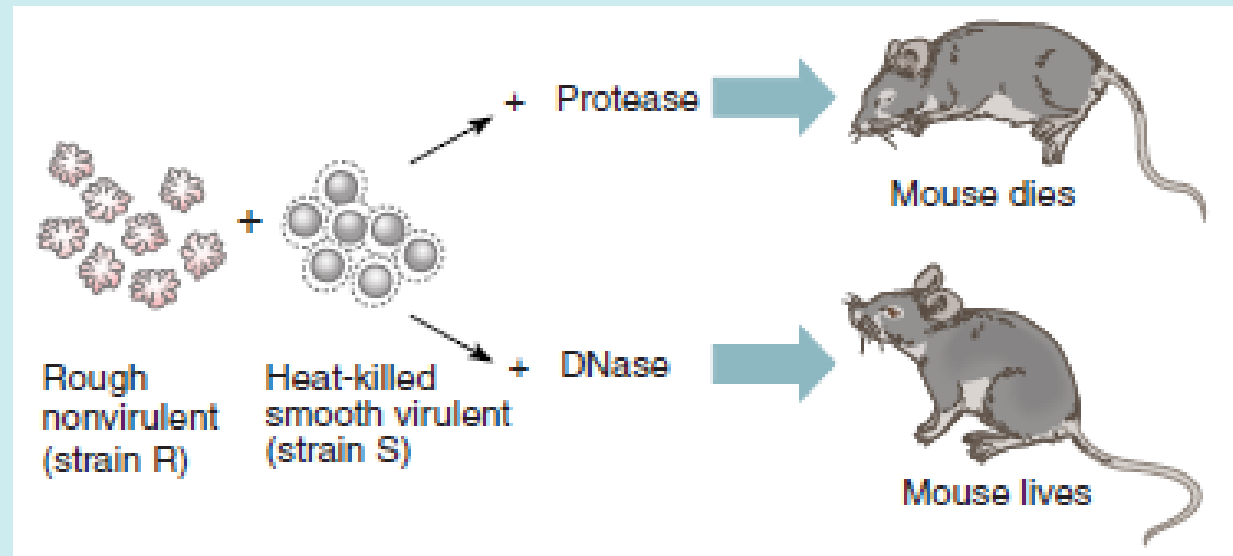
Vlastnosti genetického materiálu

1944 – O. Avery, C. MacLeod, M. McCarthy –

- typ R + mrtvý S (proteasou/DNAsou) → transformace
proběhla/neproběhla → **DNA přešla z S na R** → výroba polysacharidové
vrstvy nezbytné k virulenci



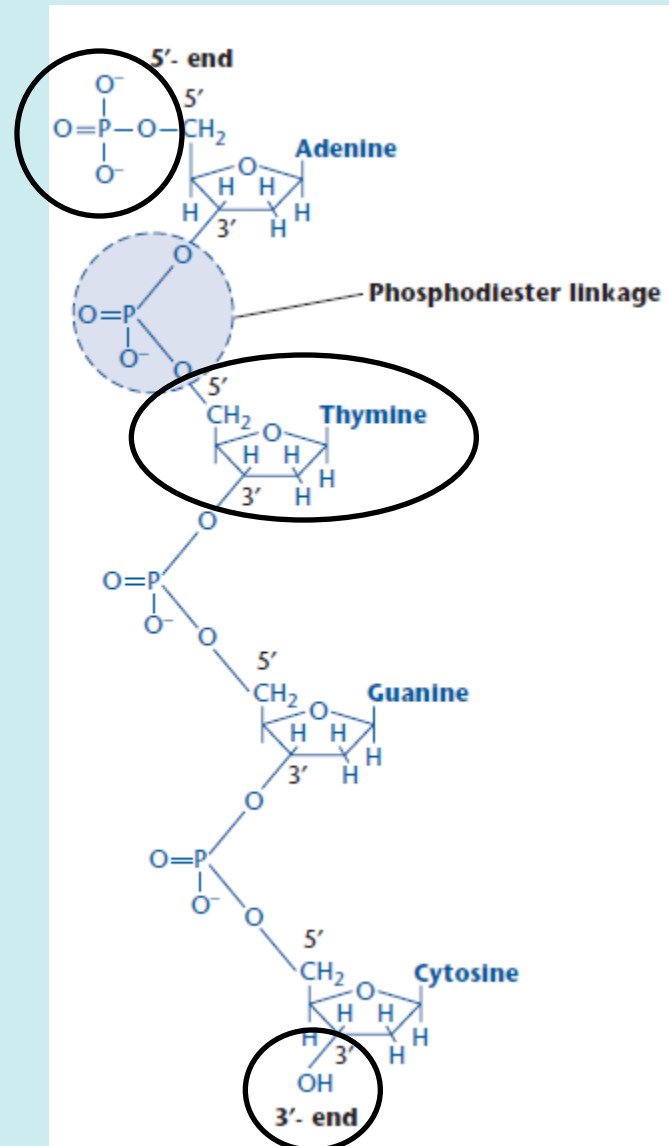
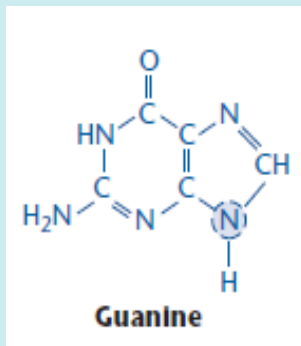
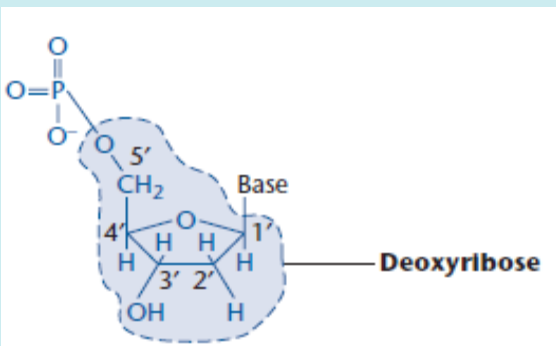
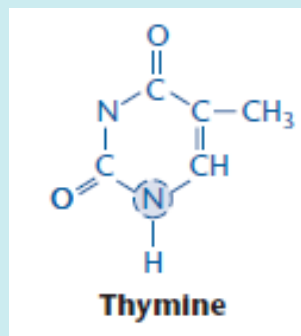
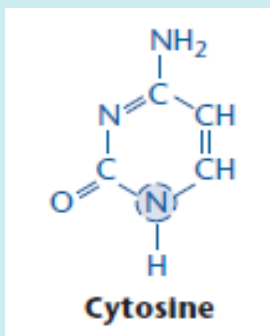
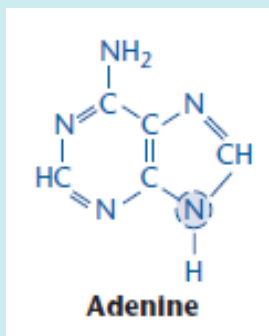
**DNA řídí syntézu
specifických
buněčných
produktů, které
přispívají k
fenotypu**



- 1) Jaká je struktura DNA ?
- 2) Jak může struktura přispívat k základním vlastnostem genetického materiálu ?

Struktura DNA

40. léta 20. st. = DNA složena z nukleotidů = sacharid (2-deoxyribosa) + fosfát + báze (A, G, C, T)



Struktura DNA

1953 – **Watson + Crick** – struktura DNA z rentgenografické analýzy

- Dvouřetzcová šroubovice - držena vodíkovými vazbami
- Komplementární báze – A+T (2 vodíkové můstky), C+G (3)
- Počet párů bazí (bp) = popis délky řetězce (chr. 1 cca = 263 Mb)

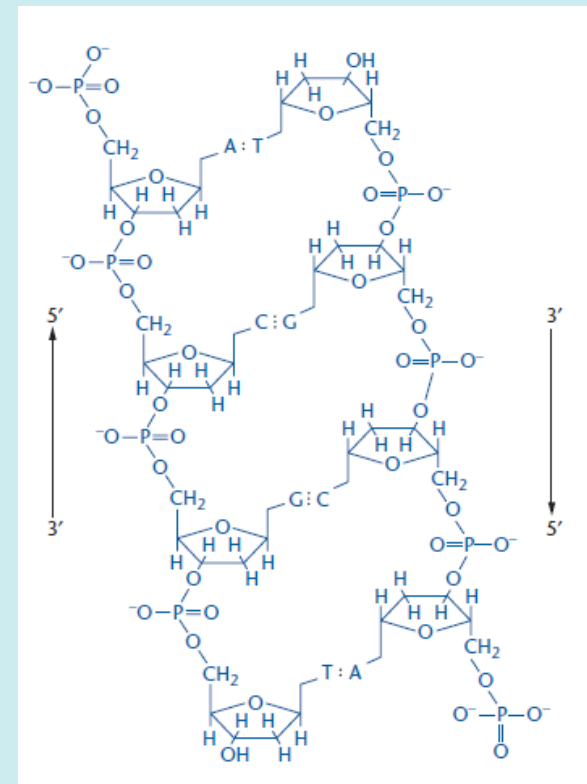


Sekvence 1 řetězce určuje druhý řetzec = **komplementarita**

Řetězce jsou **antiparalelní**

Struktura odpovídala požadovaným kritériím:

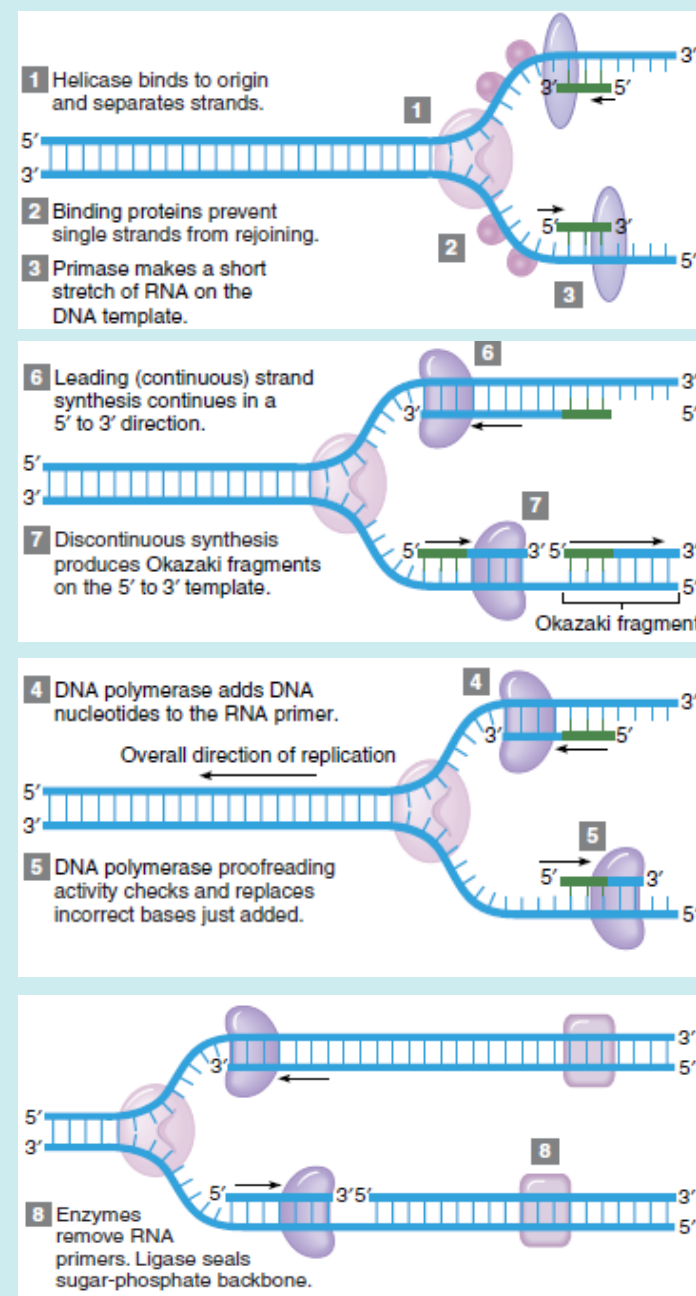
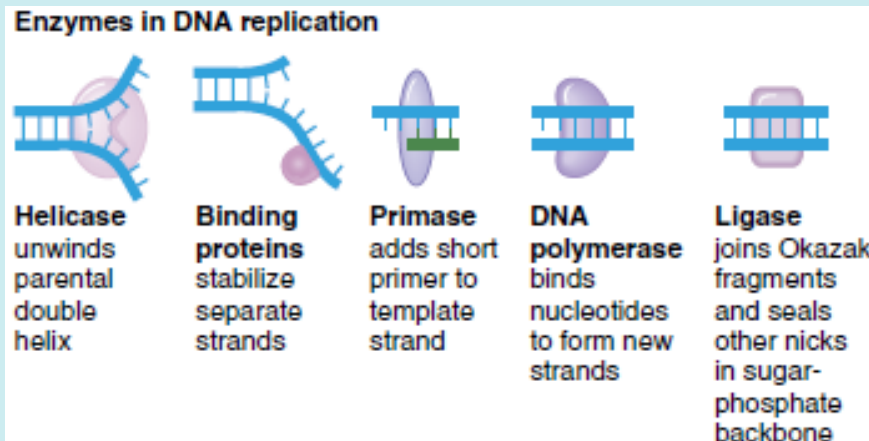
- 1) Genetická informace kódována sekvencí nukleotidů
- 2) Každý řetzec je templátem pro produkci nového řetězce
- 3) Změna v bázi změní informaci a ta je předávána replikací dále



Replikace DNA

= **syntéza DNA** - každý řetězec templát - **semikonzervativní**

- Sekvence nukleotidů určována na základě komplementarity bazí
- Fosfo-skupina je enzymaticky připojena k 3'-OH skupině předcházejícího nukleotidu
- Nukleotidy = trifosfo nukleosidy odštěpí se poslední dva fosfáty
- Cca 3 000 nukleotidů / min (savci)
- Mnoho počátků replikace (lidský genom)
- Telomerasy
- Využití = PCR

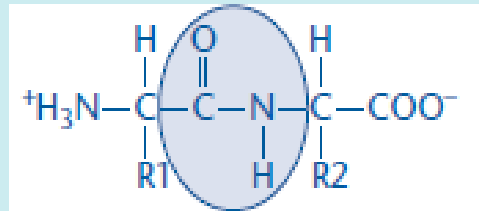
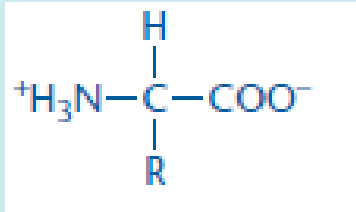


Od DNA k proteinu

Mnoho genů kóduje informaci pro produkci proteinů

- katalýza chem. reakcí, kontrola permeability, struktura buněk

Všechny proteiny se skládají z aminokyselin.



20 kódovaných AK

1 AK má volnou NH_2 a poslední $COOH$ skupinu → N- a C-konec

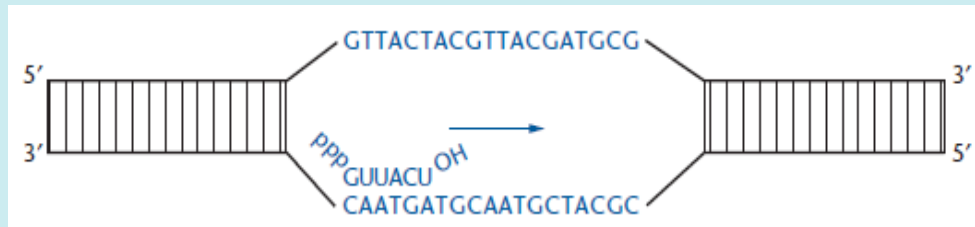
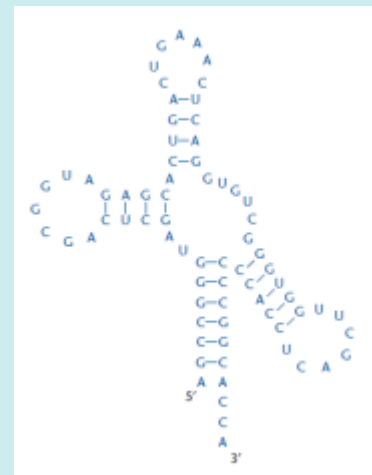
Amino acid	Three-letter designation	Single-letter designation
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	Q
Aspartic acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamic acid	Glu	E
Glutamine	Gln	N
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Iso	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Proteiny se skládají do
patričného tvaru na
základě umístění AK
reziduí.

Dekódování
informace
zajišťuje RNA.

Od DNA k proteinu

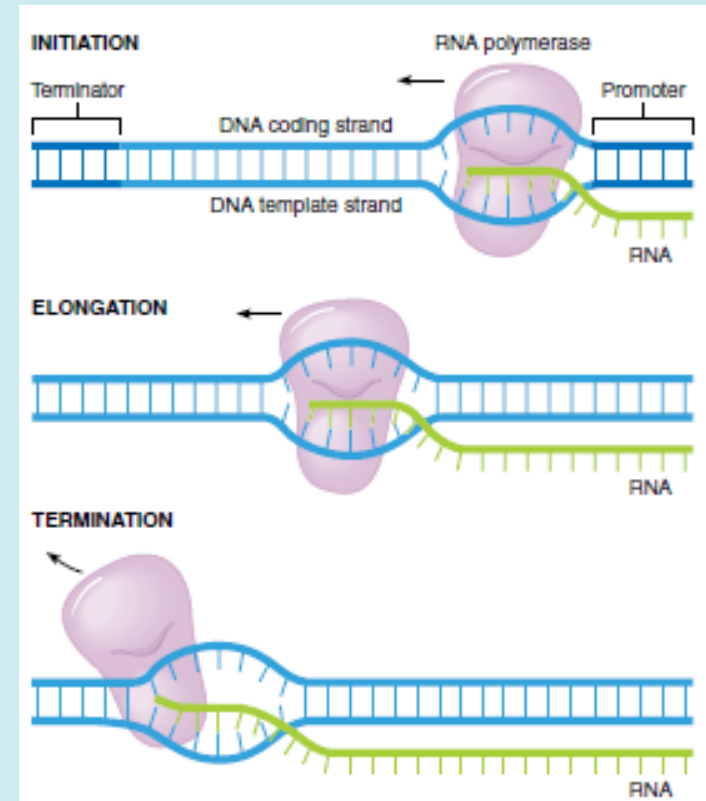
- RNA = lineární polynukleotid
- Odlišnost od DNA - sacharid (ribosa) + jedna z bazí (U)
- 3 druhy – mRNA, rRNA, tRNA – transkripce různými RNA polymerasami



Pouze úseky DNA jsou transkribovány – signální oblasti uvnitř DNA určující začátek a konec transkripce

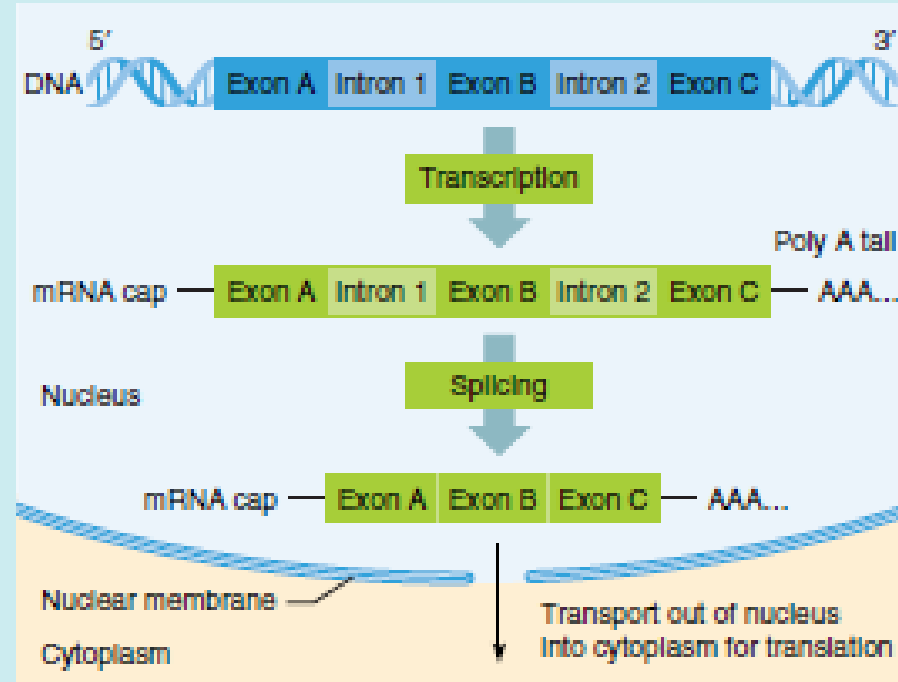
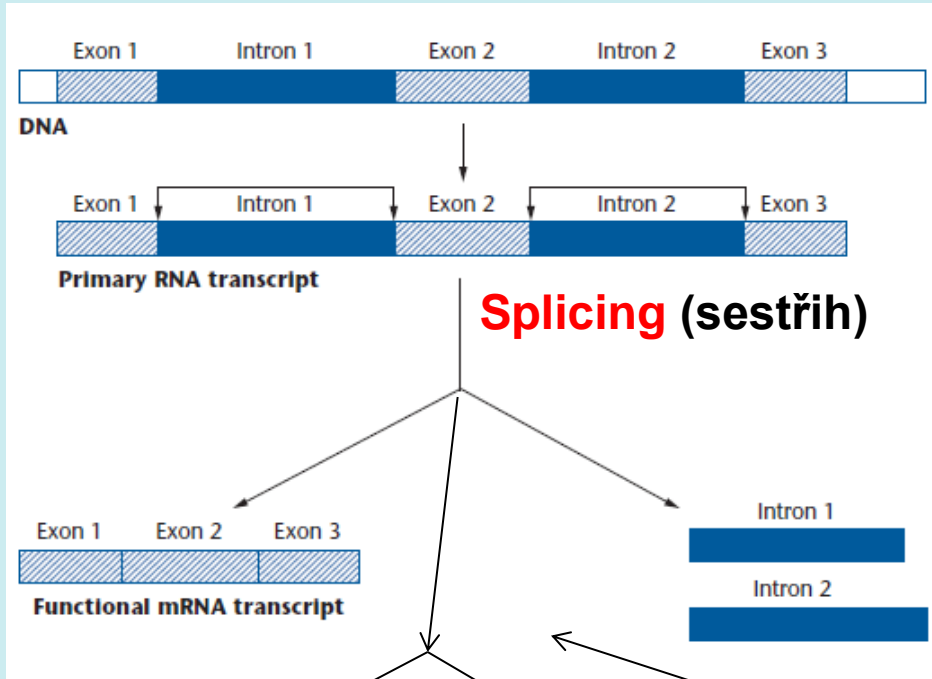
Segment předcházející genu = 5'-flanking (upstream) region

Segment následující po genu = 3'-flanking (downstream) region

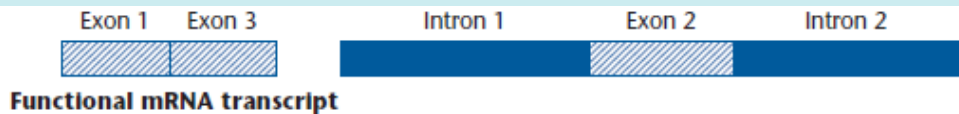


Od DNA k proteinu

U eukaryot – kódující sekvence (**exony**), nekódující sekvence (**introny**)



Alternativní sestřih – odlišný produkt, ale ze stejného genu = isoforma

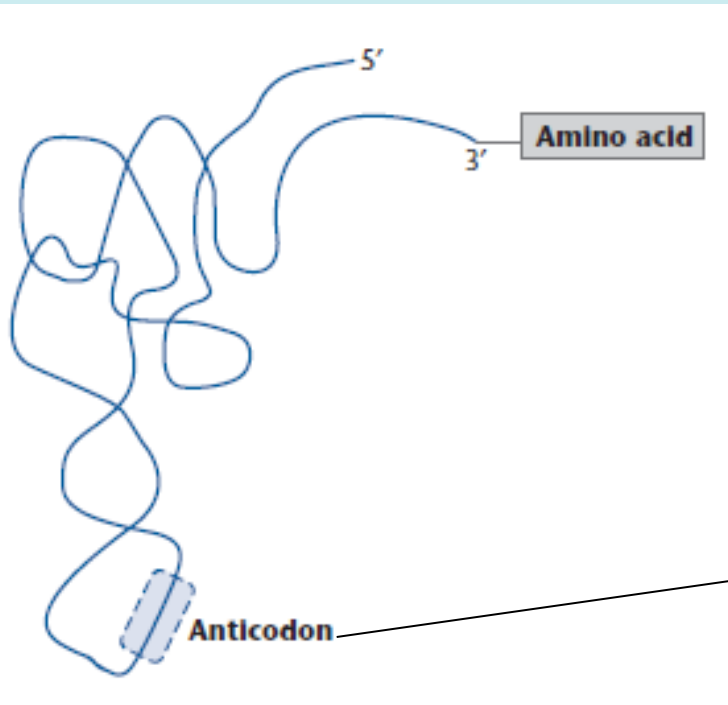


Od DNA k proteinu

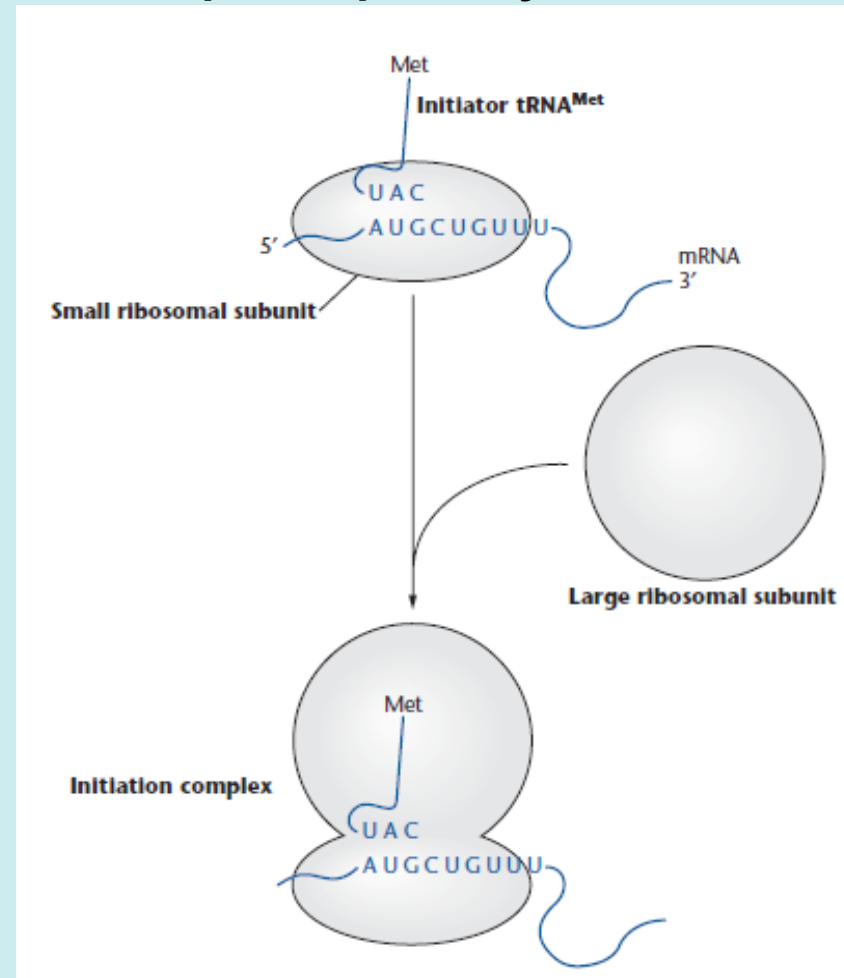
V metabolicky aktivních buňkách: 3 - 5 % mRNA, 90 % rRNA, 4 % tRNA

rRNA tvoří velkou a malou podjednotku ribosomu spolu s proteiny – syntéza proteinů = translace

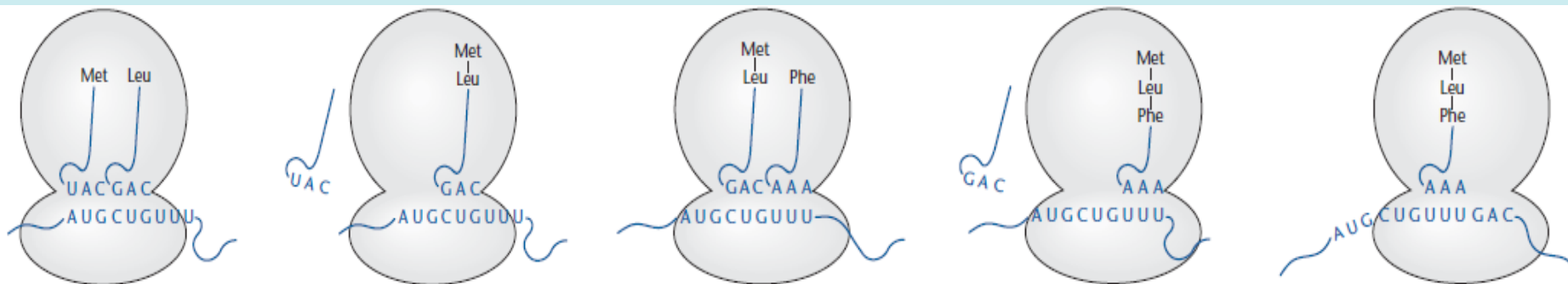
tRNA – tvar L – AK je enzymaticky spojena s 3'-koncem tRNA



Páruje se
s
kodonem
v mRNA



Od DNA k proteinu...translace

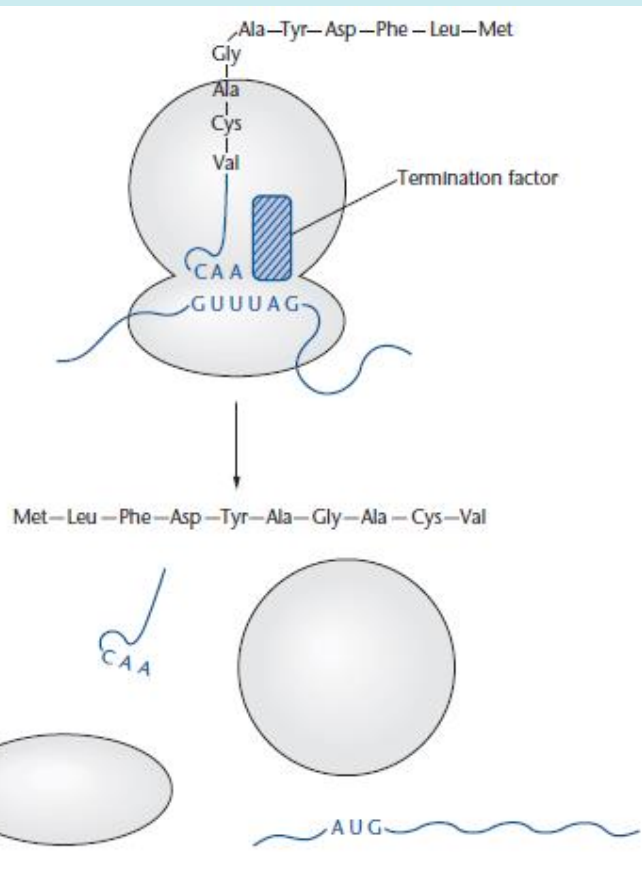


Terminační /stop kodon – UAG, UAA, UGA

Po translaci – modifikace – fosforylace, glykosylace, selektivní proteolýza

Kompletní genetický kód = 64 kodonů

- 3 stop
- 1 iniciační
- 1 Trp
- pro ostatní AK – 2 - 6 kodonů



Regulace transkripce

- Prováděna **transkripčními faktory** – většinou vazba na DNA, na sekvence cca 10 bp
- Místa vazby faktorů – „DNA moduly, boxy, iniciátorové elementy, „**responsivní elementy**“

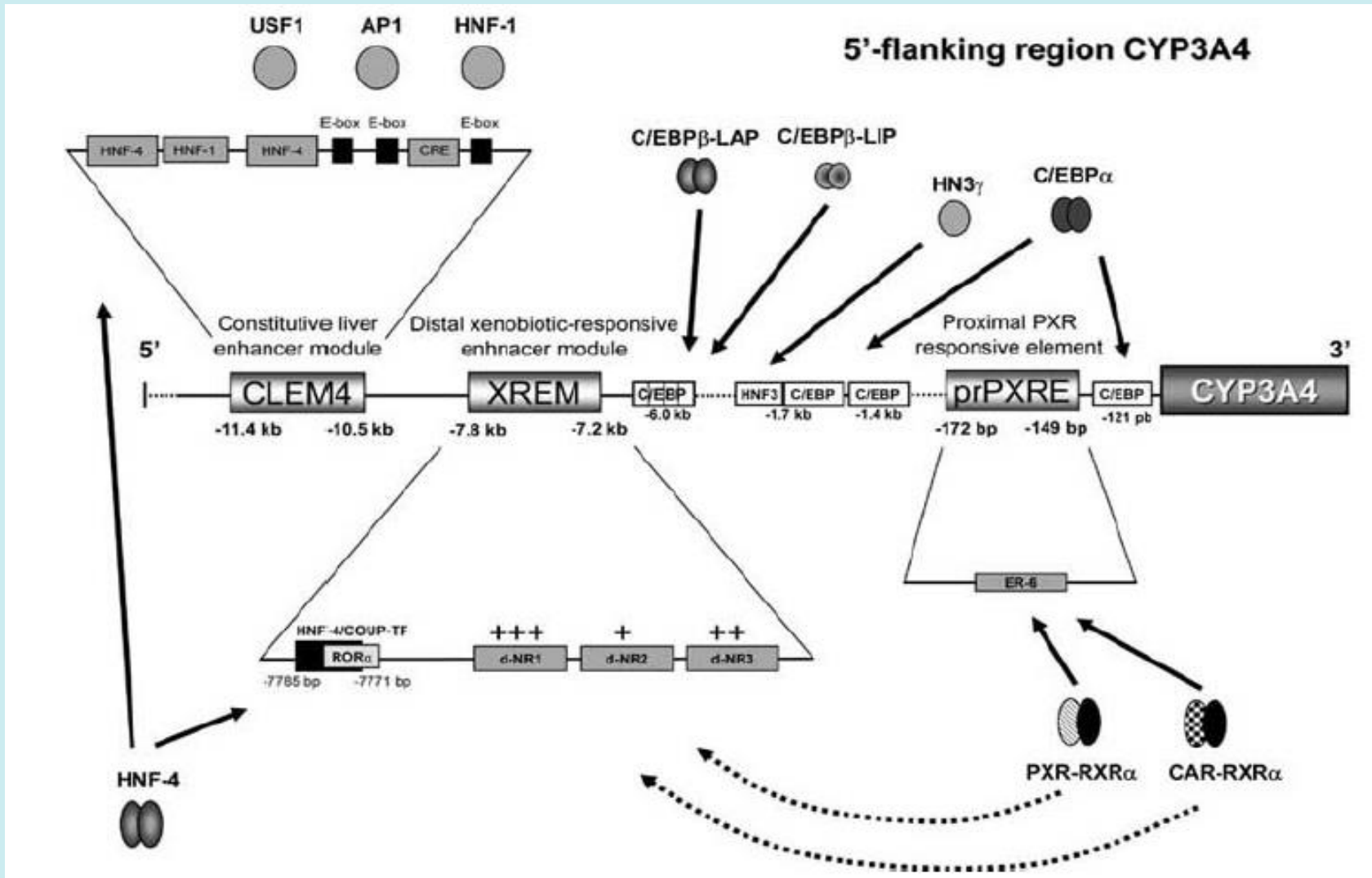


Representativní strukturální gen – promotorová sekvence obsahuje TATA box, „CAT“ box, GC box

- 1) Vazba IID (TATA-binding protein; TBP) na TATA sekvenci
- 2) Vazba dalších TF přilehlých k TATA boxu
- 3) Vazba RNA polymerasy II

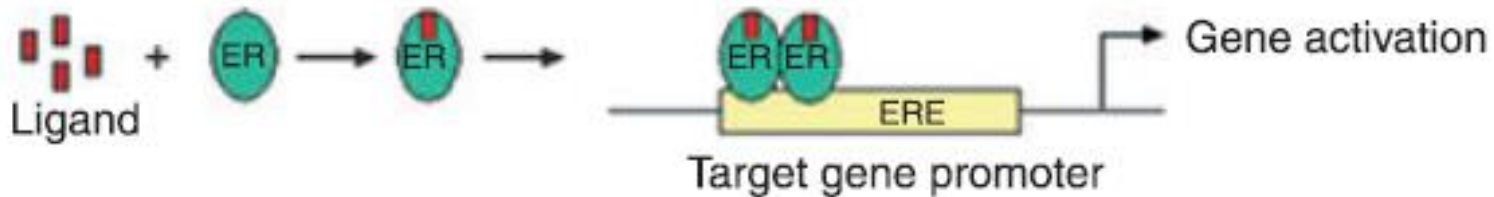
Enhancerové sekvence – stovky až tisíce bp od +1

Regulace transkripce

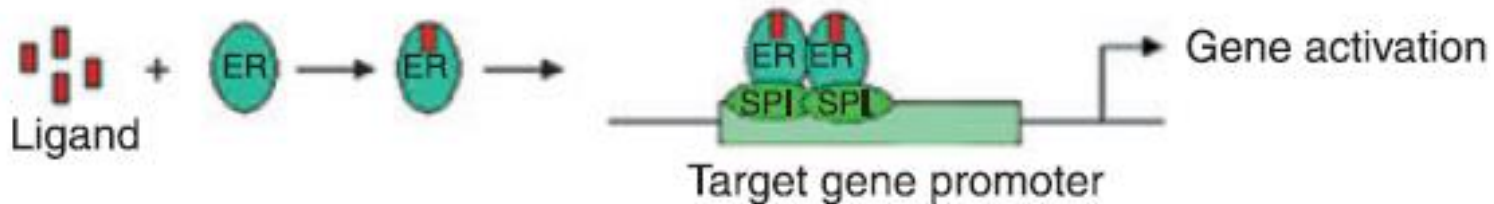


Regulace transkripce

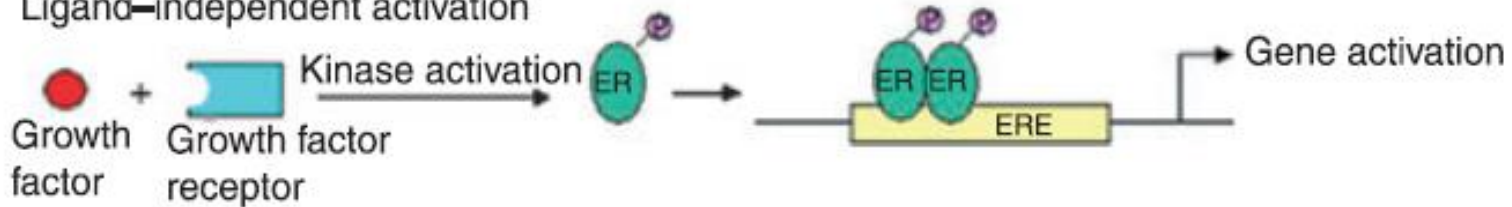
Direct activation



Indirect activation



Ligand-independent activation

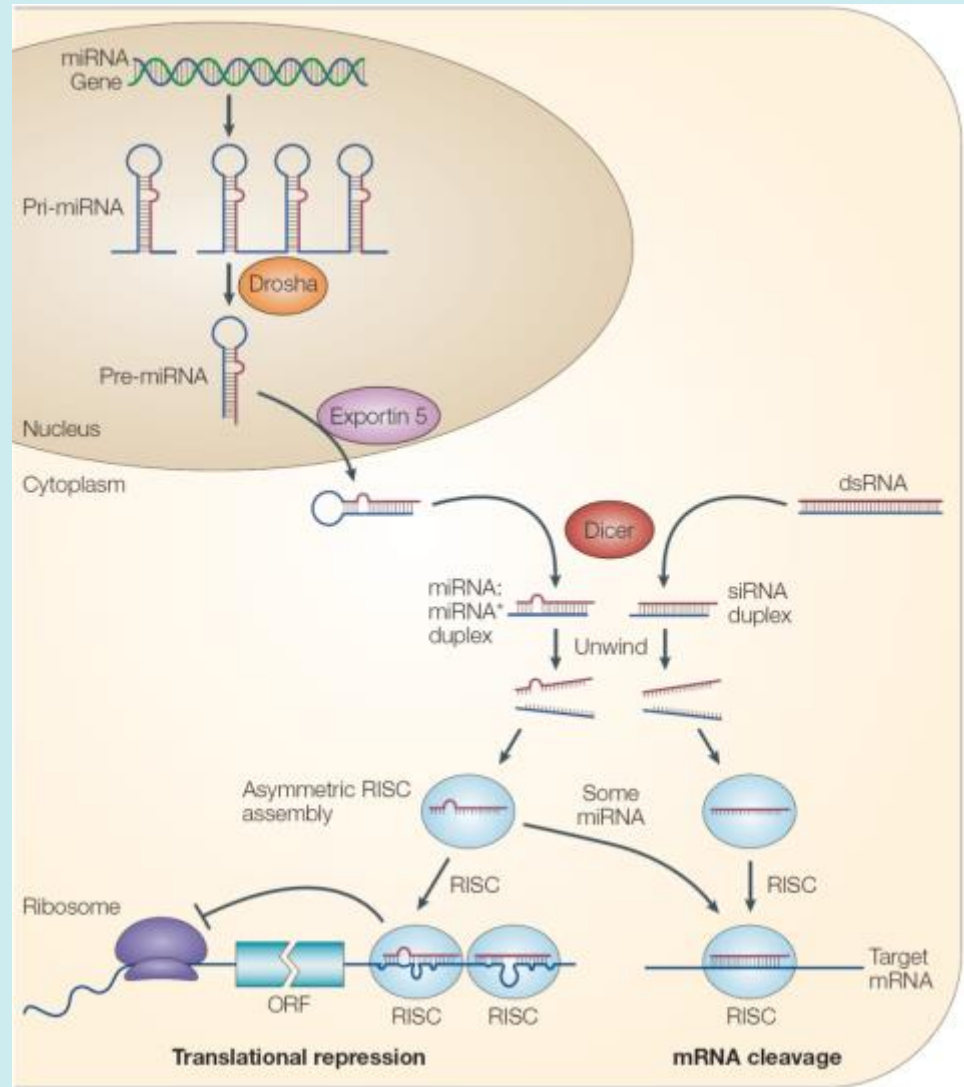


Některé geny jsou spouštěny specifickým extracellulárním signálem, např. hormonem.

Regulace translace

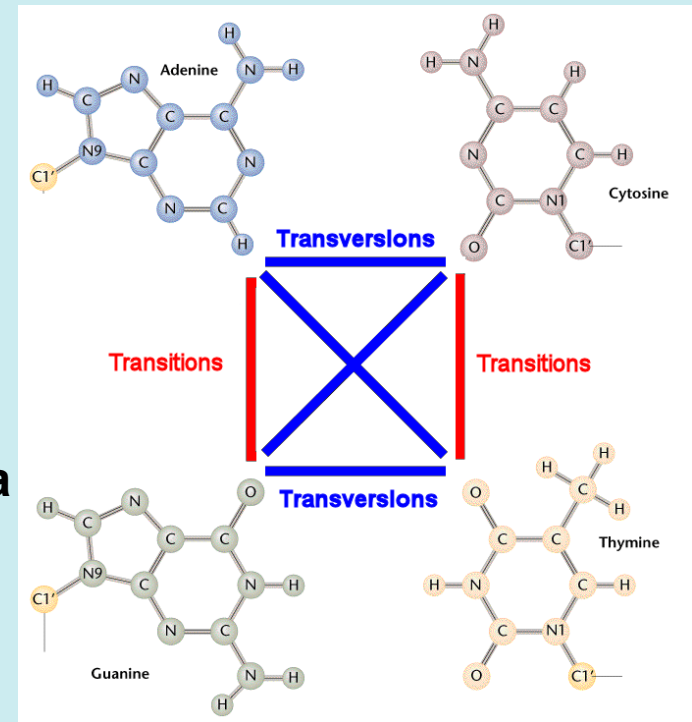
Malé nekódující RNA (snRNA)

- **miRNA** – 19-23 bp **ssRNA**
 - blokáce translace
 - z jednoho dlouhého transkriptu tvořící vlásenkovou strukturu
- **siRNA** – 21-25 bp **dsRNA**
 - usnadňují degradaci mRNA
 - ze dvou odlišných řetězců vzájemně se párujících



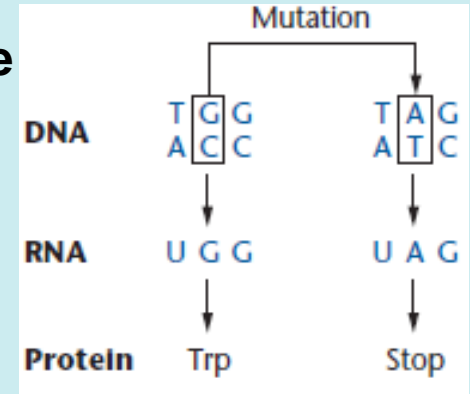
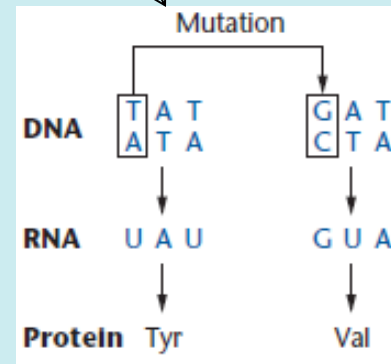
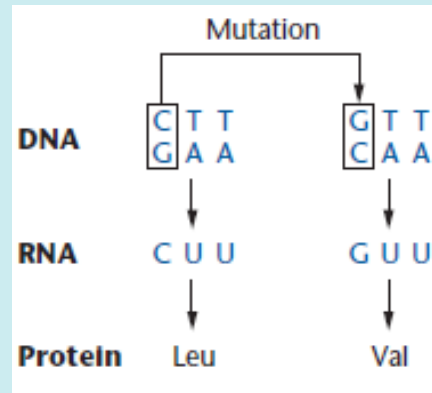
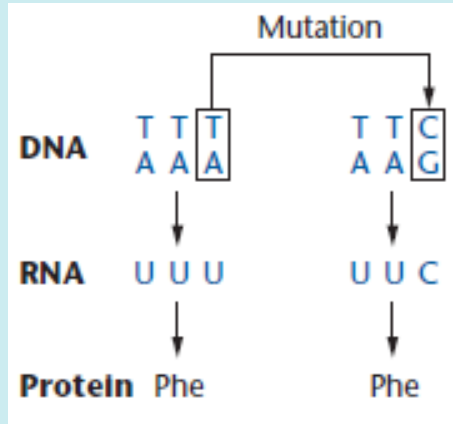
Změna sekvencí - mutace

- Replikace není bezchybný proces
- Chyby jsou vytvářeny i vnějším zásahem – UV záření, radioaktivní sloučeniny, rozličné sloučeniny
- **Změna v genetickém materiálu = mutace**
- Rozsah – od změny báze (**bodová mutace**) až po části chromozomů (**chromozomové aberace**)
- Mutace v genu strukturálního proteinu – záměna kodonu a následně i AK v proteinu = změna funkce = změna fenotypu
- Mutace v buňkách ze kterých nevznikají gamety = **somatické mutace** – nepřenáší se na potomstvo
- **Mutace v zárodečných buňkách** – přenos na potomstvo
- Triplet v DNA = transkribovaný triplet → templát pro kodon
- Komplementární DNA = kódující triplet
- Kódující + transkribovaný triplet = DNA kodon

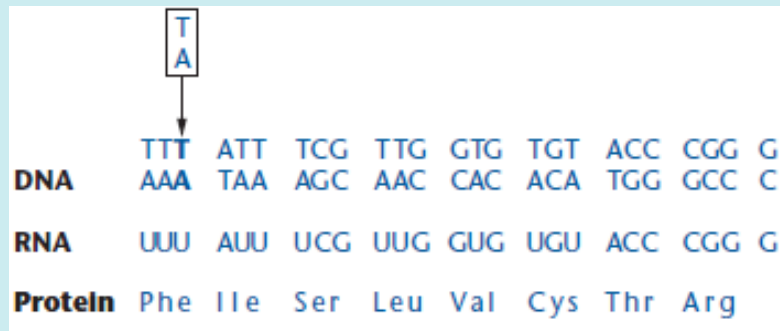


Změna sekvencí - mutace

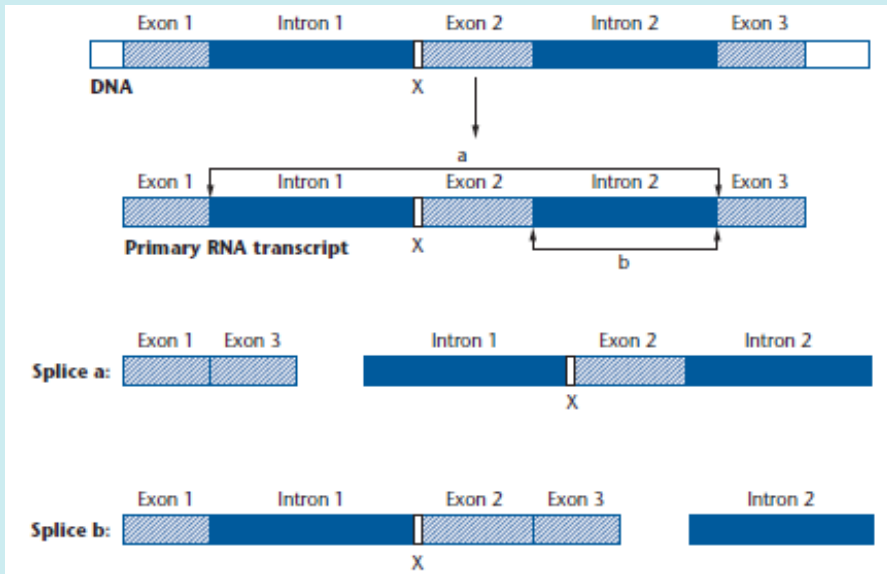
Mutace v kodonu DNA – silent, neutral, missense, nonsense



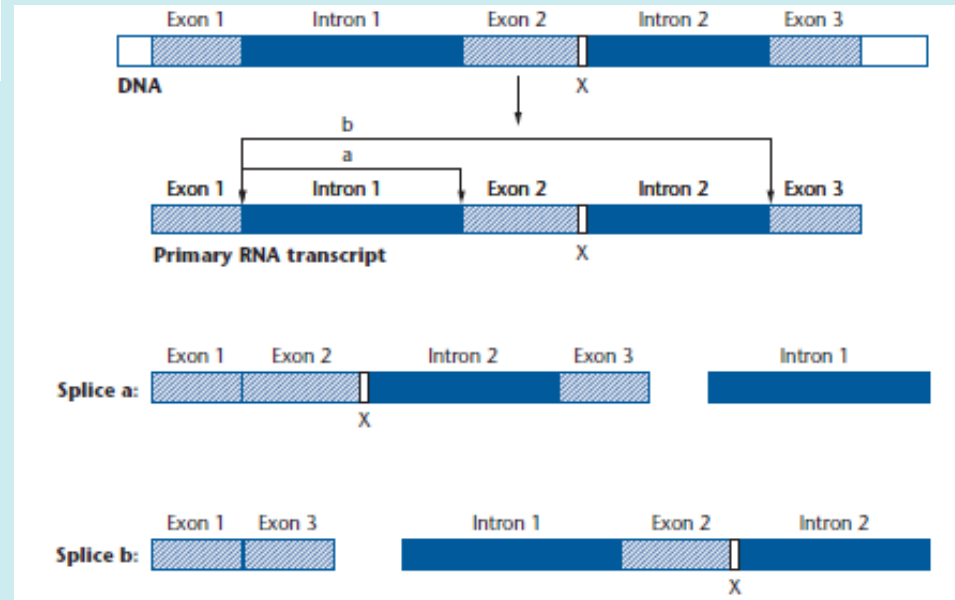
Delece či inserce páru bazí → posun čtecího rámce – devastující účinek



Vliv mutace na splicing

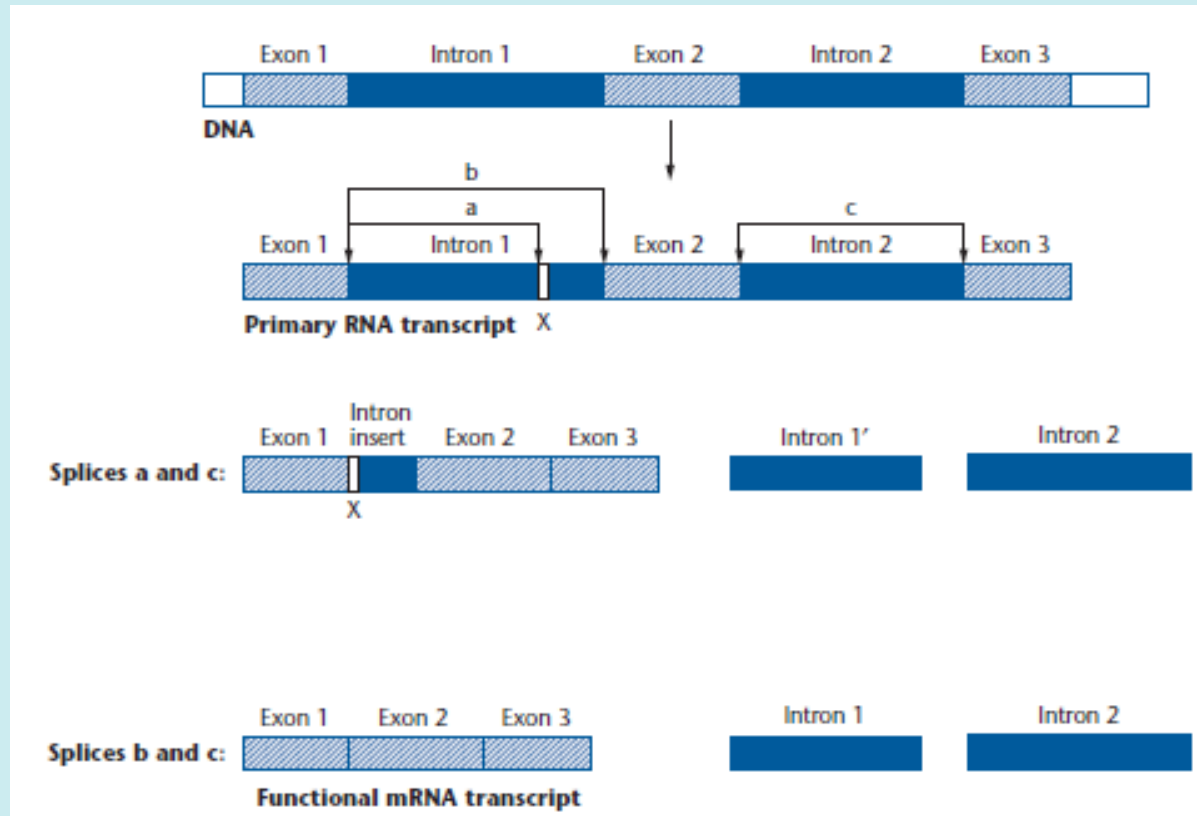


3' konec intronu mutován
= exon skipping



5' konec intronu mutován
= exon skipping

Vliv mutace na splicing



Mutace v intronu vytvoří nové splicing místo.

Nomenklatura mutací –

- záměna A → T na pozici 279
- základ mutace pro allelu na úrovni DNA součást jména – FGFR3*1138A
- záměna AK v proteinech – Asp89Gly (D89G); Arg81X(ter)
- posun rámce – 351delAT, 106insT; 109del27
- splicingové mutace- G -> T + 5IVS20

Dominantní mutace

Dominance a recesivita = otázka fenotypu

Běžné je se odkazovat na dominantní/recesivní gen

Většina mutací = recesivní účinek

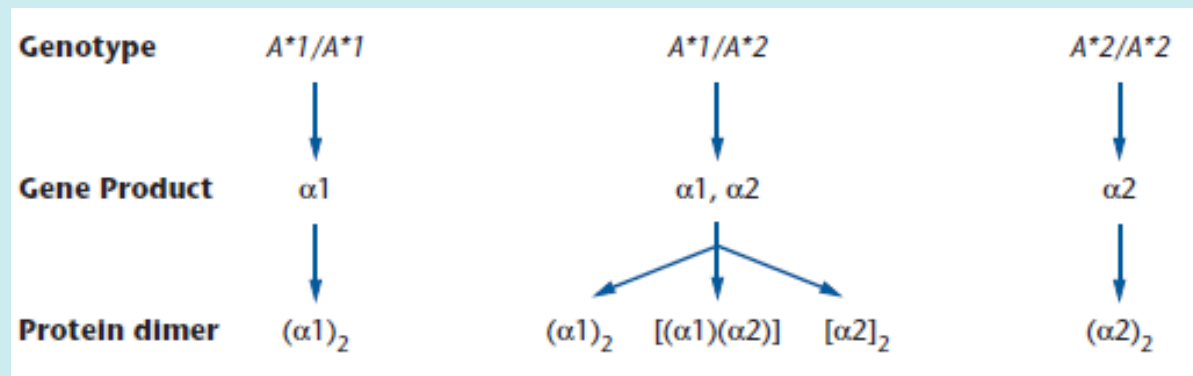
Mnoho nemocí důsledek jedné dominantní alely – jak je to možné?

- nedostatečná/nadbytečné produkce proteinu
- tvorba toxického produktu
- tvorba produktu s nezvyklou funkcí
- mutace v místě degradace - snadná precipitace - tvorba agregátů
- chromosomová translokace - tvorba „hybridního“ produktu

Mutace typu:

„Loss of function“

„Gain of function“



Slovo závěrem k části II.

...mutace skoro nikdy nevedou k výhodě !!!

