

Základy genetiky

1. PŘEDNÁŠKA

Genetika jako vědní obor vznikla na počátku 20. Století, ačkoli její principy se využívaly zejména ve formě křížení a šlechtění užitkových rostlin a domestikaci hospodářských zvířat již daleko dříve. Genetika (z řečtiny *gennaó* = plodím, rodím) je biologická věda, studující principy a příčiny dědičnosti a proměnlivosti živých organismů a pojem **gen** označuje jednotku dědičné informace. Tento název byl navržen Williamem **Batesonem** v roce 1906, ten definoval genetiku jako vědu zabývající se studiem křížení a šlechtění rostlin. Až později se uvažovalo o genetice v souvislosti s dědičností všech organismů a nejen rostlin. Za zakladatele genetiky je považován brněnský mnich **Gregor Johann Mendel**. Z historického hlediska genetiku jako vědní obor ovlivnily nejvíce tyto **tři velké milníky: 1. Objev pravidel dědičnosti znaků, 2. Identifikace materiálu, který je za tuto dědičnost zodpovědný, 3. Úplná analýza dědičného materiálu vybraných organismů.**

Prvním milníkem je tedy objev pravidel dědičnosti znaků. Ten je připisován českému přírodovědci a moravskému mnichu **Gregorovi Johannu Mendelovi** (20.7. 1822 – 6.1. 1884) působícímu Brně. G. Mendel studoval dědičnost různých znaků u hrachu setého (*Pisum sativum*) a své experimenty prováděl v ústraní klášterní zahrady. Principem jeho metody bylo systematické křížení rostlin, které vykazovaly rozdílné znaky, např. nízké rostliny křížil s vysokými, a tak přišel na pravidla a zákonitosti, kterým dědičnost podléhá a jak se dědičnost znaků projevuje v potomstvu. Své poznatky si pečlivě zapisoval a analyzoval. Ještě za svého života, tedy v 19. století, postuloval existenci dědičných faktorů zodpovědných za znaky, které studoval. Tyto faktory jsou nyní nazývány **geny**.

Pisum sativum, hrách setý patří do čeledi motýlokvetých, jedná se o zemědělskou plodinu existující v řadě variet, které byly kříženy úspěšně i v minulosti. Za normálních okolností je hrách samosprašný, takže jeho jednotlivé odrůdy jsou geneticky čisté (tvoří čisté linie). Mendel studoval několik znaků, genů hrachu jako je výška rostliny, barva květu, tvar a barva semene. Objevil, že znaky (geny) existují v různých formách (variantách), které dnes nazýváme **alely a že rostliny hrachu nesou dvě kopie každého genu**, které mohou být stejné nebo rozdílné. Během reprodukce se do každé pohlavní buňky neboli gamety dostává náhodně pouze jedna z těchto kopií. Během oplození se zase počet kopií genů zvyšuje na dvě (od každého rodiče). Snížení počtu kopií genů ze dvou na jednu během tvorby gamet a následné obnovení dvou kopií během oplození je základem pravidel dědičnosti, které Mendel objevil. Své objevy publikoval v Časopisu Přírodovědeckého spolku v Brně v roce 1866. Článek nezbudil žádnou pozornost, takže se začal věnovat jiným výzkumům. V roce 1900 byl jeho článek o experimentech s hrachem znovuobjeven a přeložen do anglického jazyka de Vriesem a Corrensem. Od této doby se datuje počátek vědního oboru – genetiky.

Druhým milníkem je objevení struktury molekuly DNA. Až v polovině dvacátého století se vědcům z Cambridge podařilo objasnit molekulární strukturu deoxyribonukleové kyseliny. James Watson a Francis Crick v roce 1953 publikovali práci v časopise Nature. Nukleové kyseliny jsou tvořeny základními stavebními jednotkami - **nukleotidy**. Vědělo se, že nukleotidy jsou spojené mezi sebou v řetězci a že tato spojení jsou tvořena chemickými vazbami mezi cukernou a fosfátovou složkou dvou vedlejších nukleotidů a dusíkaté báze do této cukr-fosfátové páteře nejsou zapojeny. Každý nukleotid se skládá z molekuly cukru (deoxyribóza u DNA a ribóza u RNA), molekuly fosfátu a

dusíkaté molekuly – báze (purinové nebo pyrimidinové báze). Celkem se jedná o pět různých bází – adenin, guanin, thymin, uracil a cytosin. DNA se od RNA liší nejen typem cukerné složky (deoxyribóza/ribóza), ale také složením nukleotidů. V DNA se vyskytuje adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G), v RNA pak adenin (A), uracil (U), cytosin (C) a guanin (G), DNA je většinou dvouvláknová, RNA je jednovláknová molekula. Watson a Crick odvodili uspořádání nukleotidů uvnitř DNA a také to, že molekula DNA je dvouvláknová - složena ze dvou řetězců, které se obtácejí navzájem okolo sebe jako **šroubovice** – odtud název dvoušroubovice nebo také **duplex**. Nukleotidy jsou spojeny slabými chemickými interakcemi mezi dvěma bázemi, vždy se páruje adenin a thymin a cytosin a guanin v případě DNA. V případě RNA pak adenin a uracil a opět cytosin a guanin. Báze jsou lineárně řazeny za sebou od jednoho konce nukleové kyseliny ke druhému konci a toto pořadí bází určuje tzv. sekvenci DNA. Na základě znalosti sekvence jednoho řetězce můžeme podle pravidel párování bází (A/T a C/G) určit i sekvenci druhého komplementárního vlákna DNA. Pořadí bází v řetězci DNA udává sekvenční podstatu nukleových kyselin a pravidla párování bází určují **komplementaritu** obou vláken DNA. Molekuly DNA obsahují až stovky milionů párů bází.

Třetím milníkem genetiky je projekt lidského genomu. Určení pořadí bází neboli sekvence bází v DNA určitého organismu se nazývá sekvenování. Soubor všech molekul DNA organismu se nazývá genom. První sekvenovaný DNA genom byl genom viru ΦX174 dokončený v roce 1977-1978 a jeho sekvenace trvala několik let. Tento projekt byl realizován Frederickem Sangerem, který je autorem metody sekvenování, používané dodnes. Projekt lidského genomu (Human Genome Project) byl celosvětovým úsilím o sekvenaci asi 3 miliard bází, ze kterých je složený lidský genom a jeho počátek se datuje do roku 1990. Projekt byl financován vládami zapojených států – USA, Velké Británie, Německo, Francie a Japonsko. V roce 2001 byl projekt završen dvěma rozsáhlými publikacemi. Podařilo se osekvenovat 2,7 miliardy nukleotidových párů lidské DNA. Tehdy se předpokládalo, že počet lidských genů je 30 000 – 40 000, nové analýzy upravily počet genů v lidském genomu na 20 000 - 25 000 (nejnovější studie mluví o 22 550 genech). Asi 8% lidského genomu zůstalo neosekvenováno. V rámci tohoto projektu byly sekvenovány také genomy jiných organismů zejména těch, které jsou používány jako modelové organismy v genetice, jedná se např. o bakterii *E. coli*, myš nebo octomilku. Vzniká vědní **obor genomika**, založený na analýze DNA jednotlivých genomů. Technologie sekvenování se neustále vyvíjí a díky robotice a bioinformatice, které nám umožňují analýzu stále většího objemu dat, dochází k vytváření ohromných sekvenčních databází spojeného s katalogizací genů a vznikem genové banky.

DNA reprezentuje genetický materiál buňky. Mezi jeho základní vlastnosti patří schopnost replikovat se (zopakovat se). Důsledkem je šíření genetické informace z mateřské na dceřinou buňku v rámci procesu reprodukce. Tento proces je založen na komplementární povaze vláken v rámci duplexu DNA, která je určena komplementárním párováním bází. Během replikace dojde samovolně k rozpletení vláken, následné syntéze nového vlákna- přiřazením komplementárních nukleotidů příslušnými enzymy k původnímu vláknu DNA. Z každého jednoho vlákna vznikají dvě identická duplexní vlákna. Původnímu vláknu DNA, které je replikováno, se říká templát nebo templátová DNA. DNA se replikuje velice přesně. Pokud dojde k chybě v replikaci, mluvíme o mutaci.

Transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu DNA molekuly a výsledkem je RNA molekula nebo také RNA transkript. Soubor všech RNA organismu se nazývá **transkriptom**, pokud se jedná o kódující oblasti tak **exom** (soubor všech exonů). RNA se v buňce vyskytuje v několika variantách, mezi

ty nejzákladnější patří mediátorová RNA (messenger RNA) - mRNA, transferová RNA - tRNA a ribozomální RNA – rRNA. Každá taková RNA má jasnou funkci.

Proces, při kterém je informace z RNA překládána do polypeptidového řetězce a následně do proteinu se nazývá **translace** (překlad) či **proteosyntéza**. Proteom je pak soubor všech proteinů v organismu. Lidé mají ve svém proteomu statisíce různých proteinů. Z toho vyplývá, že jeden gen může kódovat více než jeden protein. Geny nekódují jen proteiny, ale konečnými produkty mohou být také molekuly RNA neméně významné pro správné fungování buněk. Během translace jsou trinukleotidy (vždy tři nukleotidy) specificky přiřazovány k aminokyselinám a z těch je syntetizováno polypeptidové vlákno budoucího proteinu.

Celkem existuje 22 tzv. esenciálních aminokyselin, ze kterých se skládají bílkoviny. Genetický kód je dán 4 různými nukleotidy – A, T, C a G, které tvoří triplety, existuje tedy 4^3 (tedy 64) různých kombinací pro tzv. kódony – triplety nukleotidů a pro 22 různých esenciálních aminokyselin. Každá aminokyselina je kódována i několika triplety (kódony). O genetickém kódu je známo, že je univerzální a degenerovaný. **Metabolom** představuje všechny metabolity přítomné v daném organismu.

Posloupnost procesů replikace, transkripce a translace je podstatou tzv. **ústředního dogmatu molekulární biologie** a v rámci těchto tří procesů je zajištěno šíření genetické informace (replikace) i její vyjádření (transkripce a translace). Autorem centrálního dogmatu molekulární biologie je F. Crick. Informace tedy směřuje z genů složených z DNA k polypeptidům, složených z aminokyselin, přes meziprodukt složený z RNA. V některých případech může být první část centrálního dogmatu molekulární biologie převrácena a z RNA naopak vzniká DNA. Tento proces se nazývá **reverzní transkripce** a je typický pro některé viry (retroviry, např. virus HIV). Ještě v roce 2003 se věřilo, že 98% genetické informace je tvořeno tzv. nekódující DNA (junk DNA). V roce 2012 se již mluví o 80% tzv. nekódující DNA, která má nějaký biochemický (regulační) význam a může ovlivňovat rozdílnou penetranci a expresivitu genů. Epigenetické procesy jsou významnými činiteli ovlivňujícími přepis genů, kdy účinek genů může být utlumen nebo zesílen. Vzniká nový vědní obor **epigenetika** studující změny v genomu na úrovni jejich exprese a dostává se tak na úroveň variability fenotypu. **Genotyp** je genetická sestava organismu, **fenotyp** představuje pozorovatelné znaky organismu. Fenotyp je konečným viditelným projevem genotypu.

Mutace představuje změnu genetické informace a vzniká na úrovni replikace DNA. DNA může být nějakým způsobem poškozena např. elektromagnetickým zářením nebo chemickými látkami představujícími mutageny. Mutageny jsou biologické, chemické nebo fyzikální. Vzniklé poškození může být opraveno a opravný proces často zanechává „jizvy“ ve formě delecí (chybění) nebo duplikací (zdvojení) části genetického materiálu. Mutantní geny se projevují odlišným fenotypem. Příkladem mutace je bodová mutace beta globinu (záměna jedné báze způsobující nahrazení kys. glutamové za valin v polypeptidovém řetězci), který je příčinou srpkovité anemie u lidí.

Genetika významně přispívá ke studiu evoluce. Mutace se v DNA hromadí po mnoho generací a jejich vliv se projevuje v podobě rozdílů mezi organismy. V polovině 19. století vyslovili Charles Darwin a Alfred Wallace názor, že rozmanitost druhů vyplívající z jejich genetického materiálu, jim umožňuje, aby se během doby měnily, vyvíjeli se. Předpokládali existenci společného předka pro všechny formy organismů a jejich příbuznost. Historické vztahy mezi organismy na základě analýzy podobnosti jejich genomů zkoumá vědní obor **fylogenetika**. Vztahy jsou znázorňovány pomocí

fylogenetických stromů. Pojem **fylogeneze** znamená kmenový původ. Konstrukce fylogenetický stromů je dnes důležitou součástí studia evoluce a pro jejich tvorbu se dnes významně využívají sekvenční data z genomových projektů v kombinaci se získanými anatomickými údaji.

Úrovně genetický analýzy můžeme rozdělit na klasickou genetiku, molekulární genetiku a genetiku populací. Klasická genetika se týká období před objevením struktury DNA a analyzuje výsledky křížení. Je to genetika přenosu genů. Molekulární genetika byla odstartována objevem struktury molekuly DNA, objasněním procesů replikace, exprese a mutace, které jsou studovány na molekulární úrovni, na úrovni sekvencí. K tomu přistupují ještě genové manipulace, kdy mohou být geny nebo jejich části vyštěpeny a vloženy do jiné molekuly DNA za vzniku rekombinantních molekul. Ty se mohou replikovat in vitro za specifických podmínek a tím je konkrétní gen namnožen v miligramových množstvích. Genetika populací se zabývá četností specifických alel v populaci a změnou jejich četností v čase, udávající vývoj populace. Určení genetické variability v populaci je základem studia biologické evoluce.

Genetika v zemědělství se zaměřuje na zlepšování plodin a dobytka výběrovým šlechtěním a přináší nové zdomácnělé rostlinné i živočišné druhy. Příkladem jsou druhy skotu a kukuřice. Selektivní šlechtitelské programy se v zemědělství běžně využívají stále a od 80. let byly klasické přístupy nahrazeny přístupy molekulární genetiky. Vznikají tzv. GMO (geneticky modifikované organismy) organismy procesem umělé změny genomu původního organismu. Např. Bt-kukuřice nese gen z bakterie *Bacillus thuringiensis*, který kóduje protein toxický pro mnoho druhů hmyzu. Linie kukuřice nesoucí gen pro Bt-toxin, jsou odolné vůči napadení zavíječem kukuřičným, hmyzím škůdcem, který v minulosti způsoboval ohromné škody. Rostliny Bt-kukuřice si vytvářejí svůj vlastní insekticid. Vývoj GMO vyvolává ve světě rozporné reakce a některé země odmítají pěstovat Bt-kukuřici. Obavy vznikají z konzumace GMO potravin a také z možnosti, že Bt-kukuřice může usmrcovat neškodné druhy hmyzu – motýlů a včel. Tato problematika je řešena na více úrovních – ekologické, politické i etické. Vliv genetických manipulací a jeho důsledky, kdy jsou zvířata chována zejména pro hospodářský zisk, jsou známa viz www.otevrioci.cz.

Genetika v lékařství se týká zejména onemocnění způsobených mutantními geny. V roce 1909 sir Archibald Garrod, britský lékař a biochemik, vydává knihu nazvanou Vrozené poruchy metabolismu a ukazuje v ní, jak vysledovat spojení mezi metabolickými poruchami a mutantními alelami. Lékařská genetika zaznamenala obrovský pokrok vzhledem k rozvíjení nových diagnostických přístupů, které jsou stále přesnější a cílenější. Tento pokrok úzce souvisí s rozvíjením molekulární biologie jako takové. Nejčastější vrozené vývojové vady, metabolická onemocnění nebo vzácná onemocnění jsou již běžně diagnostikována v rámci preimplantačního, prenatalního nebo postnatálního screeningu. V rámci postnatálního vyšetření novorozenců je v české republice sledováno 13 geneticky podmíněných onemocnění. Další věkou kapitolou je nádorová genetika sledující predispozice pro různé malignity nebo v případě onemocnění jeho progresivitu a možnost vhodné cílené léčby. Lidská genová terapie je dalším prostředkem využívajícím k léčbě nemocí molekulárně-genetické technologie, která přináší nejen další možné výhody, ale i rizika v oblasti medicíny.

Doporučená literatura: SNUSTAD D.P. AND SIMMONS M.J.: Genetika. Přeloženo za ang. originálu Snustad DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 3.th ed. New York: John Wiley & Sons; 2003. Copyright Czech Edition © 2009, Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2/Kapitola 1

Otázky:

Jaké byly Mendelovy klíčové názory na dědičnost?

DNA i RNA se skládá z nukleotidů. Jaké molekuly se spojují k vytvoření nukleotidu?

Jaký je rozdíl mezi DNA a RNA molekulou?

Co je to exom?

Sekvence vlákna DNA je ATTGCCTC. Pokud toto vlákno bude sloužit jako templát pro syntézu DNA, jaká pak bude sekvence nově syntetizovaného vlákna?

Gen obsahuje 141 kodónů. Kolik nukleotidů je přítomno v jeho kódující sekvenci? Kolik aminokyselin lze očekávat v polypeptidu kódovaném tímto genem?

2. PŘEDNÁŠKA

Základní principy mendelovské dědičnosti

Gregor Johann Mendel (20. 7. 1822 Hynčice – 6. 1. 1884 Brno) žil v polovině devatenáctého století. Jeho rodiče byli chudí rolníci na moravském venkově. Ve 21 letech opustil domov a vstoupil do katolické církve (řád augustiniánů) v Brně. V roce 1874 byl vysvěcen na kněze a přijal řádové jméno Gregor. V Brně vyučoval na vyšší škole a snavštěvoval také univerzitu ve Vídni. Po návratu z Vídně pokračuje jako učitel a začíná se svými pokusy, které ho nakonec proslavily. Experimenty prováděl s mnoha druhy zahradních rostlin a experimentoval i se včelami. Největšího úspěchu dosáhl pokusy s hrachem, které ukončil v roce 1864.

V roce 1865 přednesl výsledky svého bádání před místní Přírodovědným spolkem a v roce 1866 je publikuje v ročence spolku. Jeho práce zůstává zcela nepovšimnuta. V roce 1900 ji znovuobjevují tři botanikové – Hugo de Vries v Holandsku, Carl Correns v Německu a Eric von Tschermak-Seysenegg v Rakousku, když hledají ve vědecké literatuře údaje podporující jejich teorie dědičnosti a zjišťují, že Mendel tedy uskutečnil podrobnou a pečlivou analýzu již před 35 lety. Mendelovy zákony byly rychle přijaty díky propagačnímu úsilí britského biologa Williama Batesona, který jeho práci nechal přeložit do anglického jazyka.

Mendlov úspěch vyplýval z výborně zvoleného materiálu, který si vybral ke svým pokusům. **Hrách setý** (*Pisum sativum*), dvoujdeložná samosprašná rostlina, se snadno pěstuje v pokusné zahradě nebo ve skleníku. Díky samosprašnosti je vysoce **imbridní** s malou nebo žádnou variabilitou přenášenou z generace na generaci. Variety hrachu jsou uniformní, čisté. Tyto variety se lišily v určitých znacích – párových znacích (vysoké/zakrslé rostliny, zelená/ žlutá semena apod.). Mendel využil párové znaky a vysvětlil na nich pravidla dědičnosti. Výsledky svých pokusů si pečlivě zaznamenával.

Monohybridní křížení a princip dominance a princip segregace.

Během experimentů Mendel uměle křížil vysoké a nízké rostliny. Hybridní semena, která vznikla z tohoto křížení, byla vyseta a vyrostly z nich pouze vysoké rostliny bez ohledu na směr křížení (vysoké otcovské a nízké mateřské nebo vysoké mateřské a nízké otcovské). Znak pro nízké rostliny jakoby zmizel v potomstvu křížení. Mendel dále zkoumal potomstvo těchto hybridů (celkem 1064 rostlin) po samooplození a v potomstvu se objevily jak vysoké, tak i nízké rostliny v poměru 787 vysokých : 277 nízkým. Překvapivě vznikly znovu nízké rostliny. Na základě toho Mendel pojmenoval

skrytý faktor jako **recesivní** a projevený faktor jako **dominantní**. V rámci tohoto monohybridního křížení objasnili princip dominance a princip segregace. Odvodil také, že se tyto dominantní a recesivní faktory při reprodukci hybridních rostlin od sebe oddělují a může se tak objevit znak pro nízké rostliny v další generaci. Mendel otestoval podobně dalších šest znaků (celkem testoval u hrachu 7 znaků), tvar semen, zbarvení semen, tvar lusků, zbarvení lusků, zbarvení květů a postavení květů. Tyto pokusy se nazývají **monohybridní křížení** a to proto, že je sledován pouze jeden znak. Mendel pozoroval, že se z dvojice párových znaků objevil u hybridů pouze jeden a že po samooplození těchto hybridů vznikají dva typy potomků v určitém poměru **3:1**. Zkoumané faktory se nyní nazývají geny. Tento termín zavedl šlechtitel Wilhelm Johannsen v roce 1909. Dominantní a recesivní formy genů se nazývají **alely**. Opakující se číselné vztahy napověděly, že geny se vyskytují v párech.

Mendel předpokládal, že každá z rodičovských variet, kterou použil pro pokusy, nese dvě identické kopie genu, jsou tedy **diploidní** a **homozygotní**. Ty se během reprodukce a tvorby gamet rozcházejí a redukují na jednu. Gamety obsahují pouze jednu kopii genu, jsou **haploidní**. Diploidní počet genů se obnoví při spojení samčích a samičích pohlavních buněk a vzniká **diploidní zygota**. Pokud spermie a vajíčko pocházejí z geneticky odlišných rostlin, hybridní zygota zdědí odlišné alely, jednu od matky a druhou od otce a potomek je **heterozygotní**. Mendel použil k popisu předpokládaných faktorů symboly, které jasně a stručně popisují dědičné fenomény. Alely pro recesivní znaky se označují malým písmenem a alely pro dominantní znaky velkým písmenem. Písmeno, které se vybírá pro označení genu je obvykle odvozeno od slova popisujícího tento recesivní znak (zakrslé rostliny – angl. dwarf - označení recesivního genu d a dominantního D). Nízká varieta je dd a vysoká varieta DD. Sestavu alel jednotlivých variet označujeme jako **genotyp**. Vzhled každé z variet (vysoký nebo nízký vzrůst) jako **fenotyp**.

Rodičovské variety se označují jako **P** (parentální), jejich potomstvo pak jako první filiální generace **F1**, druhá filiální generace **F2**. V případě vzrůstu křížení rodičovských rostlin DD x dd je genotyp F1 generace pouze jeden heterozygotní (Dd) pro alely zodpovědné za výšku rostliny (F1 generace vykazuje **uniformní** genotyp i fenotyp). Během meiózy tvoří rostliny F1 dva typy gamet D a d ve stejném poměru tzn. **segregují** se během tvorby gamet. Po samooplození F1 generace vznikají v F2 generaci 4 typy zygot DD, dD, Dd a dd. Z důvodů dominance budou mít tři z těchto genotypů stejný fenotyp a rostliny budou vysoké a nízké v poměru 3:1. Genotypový poměr bude 1 (DD): 2 (Dd) : 1 (dd). Samooplozením rostlin F2 generace vznikla generace F3, potomstvo nízkých rostlin bylo pouze nízké, potomstvo vysokých rostlin bylo dvojí, 1/3 z nich dala vznik pouze vysokým rostlin a 2/3 byly směsí vysokých i nízkých potomků. Třetina těchto vysokých potomků, která nesegregovala, byly rostliny homozygotní DD.

Na základě monohybridního křížení postuloval Mendel dva principy. 1. **Princip dominance** říká, že u heterozygota může jedna alela překrýt přítomnost druhé alely. Některé alely se fenotypově projeví, i když jsou v jedné kopii. 2. **Princip segregace** říká, že u heterozygota se dvě alely v průběhu tvorby gamet od sebe oddělují, segregují se. Alela se spolehlivě přenáší do další generace, i když byla u heterozygota přítomna s jinou alelou. Biologickou podstatou tohoto děje je párování a následná separace homologních chromozómů během meiózy.

Dihybridní křížení a princip nezávislé kombinace.

Medel křížil rostliny, které se lišily ve dvou znacích, jednalo se o zv. dvoufaktorové nebo dihybridní křížení. Křížil rostliny se žlutými a kulatými semeny s rostlinami se zelenými a hranatými semeny a chtěl zjistit, zda se dva znaky semen, barva a tvar, dědí nezávisle na sobě. Všechna semena F1 byla žlutá a kulatá, alely pro tyto znaky byly dominantní. Po samooplození F1 generace vznikla F2 generace se čtyřmi fenotypovými třídami (vznikly všechny možné kombinace zbarvení a tvaru semen) žlutá a kulatá, zelená a kulatá, žlutá a hranatá, zelená a hranatá v poměru 9:3:3:1. Každý znak byl tedy podmíněn jiným genem segregujícím dvě alely a tyto geny se dědí nezávisle. Výsledek této analýzy je založen na dvou předpokladech: 1) u každého genu dochází k segregaci alel, 2) že tyto segregace jsou na sobě nezávislé. Mendel postulovat třetí princip – **princip nezávislé kombinace**. Alely různých genů se segregují, nebo jak také říkáme, kombinují se nezávisle na sobě. Tento princip je dalším pravidlem genetického přenosu, založeného na chování různých párů chromozómů během meiózy.

Metoda Punnetovy tabulky

Používáme je pro monohybridní a dihybridní křížení, kdy sledujeme jeden nebo dva geny. Pro více genů jsou tyto tabulky nevhodné, nepřehledné. V rámci tabulky můžeme zapsat všechny gamety a kombinovat je systematicky mezi sebou a vytvořit tak soubor všech genotypů a zygot. Potom můžeme použít princip dominance a přiřadit k nim příslušné fenotypy. Odhadneme tak výsledky křížení pro generaci F2.

Metoda větvení

Představuje jiný způsob předpovědi výsledků. V diagramu rozvětřujících se linií přiřazujeme k sobě fenotypy jednotlivých genů. Tato metoda je vhodná pro trihybridní a více hybridní křížení. Např. křížení DdGgWw x DdGgWw můžeme rozdělit na tři mnohybridní křížení Dd x Dd, Gg x Gg a Ww x Ww, protože uvedené geny se kombinují nezávisle. U každého genu očekáváme fenotypový poměr 3:1. Použijeme-li metodu větvení, můžeme tyto jednotlivé poměry kombinovat do celkového fenotypového poměru potomstva křížení. Tuto metodu lze použít k analýze výsledků křížení mezi vícenásobně heterozygotními jedinci a vícenásobně homozygotními jedinci. Jiný název pro toto křížení je testovací křížení.

Metoda pravděpodobnosti

Alternativní a rychlejší metoda oproti Punnetově tabulce a metodě větvení je založena na principu pravděpodobnosti. Jestliže se kříží dva jedinci heterozygoti Aa x Aa pravděpodobnost, že zygota bude AA, se rovná pravděpodobnosti, že každá ze zúčastněných gamet obsahuje jednu alelu A, tedy $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$. Pravděpodobnost vzniku homozygota aa je také $\frac{1}{4}$. Pravděpodobnost vzniku heterozygota Aa je $\frac{1}{4} + \frac{1}{4} = \frac{1}{2}$. Rozdělení pravděpodobností vzniku genotypů po křížení Aa x Aa je $\frac{1}{4}$ (AA): $\frac{1}{2}$ (Aa): $\frac{1}{4}$ (aa). $\frac{3}{4}$ potomků budou mít dominantní fenotyp a $\frac{1}{4}$ potomků recesivní fenotyp. Pro 4 různé nezávisle se kombinující geny bude homozygotní pro všechny recesivní alely $\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{256}$ apod.

Výsledky křížení lze předpovědět systematickým spočítáním genotypů v Punnetově tabulce. Pokud se křížení týká více než dvou genů, používá se k předpovědi výsledků metoda větvení nebo metoda pravděpodobnosti.

Testování genetických hypotéz

Test chí-kvadrát je jednoduchá metoda, pomocí níž lze stanovit, zda se předpověď podle genetické hypotézy shoduje s údaji získanými z experimentu. Dobře formulovaná vědecká představa se nazývá **hypotéza**. Údaje získané z pozorování nebo z pokusů umožňující vědcům testovat hypotézy – tj. rozhodnout, zda příslušná hypotéza má být přijata nebo zamítnuta. Test chí-kvadrát se vypočítá jako $\sum (PP - OP)^2 / OP$, kde PP je pozorovaný počet a OP očekávaný počet. Kritická hodnota je bod, který určuje, kdy je již nepravděpodobné, že neshoda mezi pozorovanými a očekávanými počty je způsobená náhodně. Ke každé statistice chí-kvadrát je přidruženo číslo stupně volnosti, které se rovná počtu tříd údajů minus jedna.

Genová vazba Vazba/rekombinace/crossing over

Genová vazba je dána fyzickým vztahem mezi geny vyskytujícími se na témže chromozómu (tyto geny jsou většinou děděny společně). Vazba genů se projeví jako odchylka od Mendelova principu nezávislé kombinace. Čestnost kombinace je pak měřítkem intenzity genové vazby. Rekombinace je způsobena fyzickou výměnou mezi spárovanými homologickými chromozómy na začátku profáze I. meiotického dělení poté, kdy došlo k replikaci chromozómů. Rekombinace je způsobena procesem označovaným **crossing-over**, což je proces výměny pouze mezi dvěma ze čtyř chromatid v meiotické tetradě. Na konci profáze I jsou výměny mezi chromatidami viditelné jako chiazmata. Počátek crossing-overu probíhá v zygotene, vlastní crossing-over je viditelný v pachytene a jeho ukončení probíhá v diplotene.

Chromozomové mapy, chromozom obsahuje vazebnou skupinu genů – geny v témže lokusu jsou spolu vázány – vazba genů. Základy studia chromozómů, vycházející z kombinace genetických a cytologických výzkumů, položil **Thomas Hunt Morgan** (1866–1945), když prokázal, že gen pro bílé oči u drozofily je lokalizován na chromozómu X. Brzy poté Morganovi studenti odhalili další geny vázané na chromozóm X a posléze lokalizovali tyto geny do chromozómové mapy. Mapu tvořila přímka a každý gen byl na ní umístěn v určitém bodě, či lokusu. Struktura mapy vedla k závěru, že chromozóm je jednoduše lineárním uspořádáním genů. Postup mapování genů vymyslel Alfred H. Sturtevant, který založil svou metodu mapování na principu, že geny na témže chromozomu by se měly dědit společně.

Chromozómová teorie dědičnosti říká, že geny jsou vždy uloženy na chromosomu lineárně za sebou a geny jednoho chromosomu tvoří vazebnou skupinu. Počet vazebných skupin organismu je shodný s počtem párů homologních chromosómů příslušného organismu. Mezi geny homologického páru chromosomu může prostřednictvím crossing-overu probíhat genová výměna. Frekvence crossing-overu je přímo úměrná vzdálenosti genů.

Mendelovy principy v genetice člověka se začaly uplatňovat v roce 1900. Z genetického hlediska člověk není moc vhodný genetický materiál – není možné provádět záměrné křížení, nemnoží se rychle, má omezený počet potomků, nelze zjistit štepné poměry, nemůžeme ho zkoumat v regulovaném prostředí, je nositelem mnoha skrytých variant (genom je složen z tisíců genů). Z tohoto důvodu se humánní genetika soustřeďuje zejména na dědičná onemocnění a významné

odchylky s fenotypovým projevem. Jen vzácných dědičných onemocnění je popsáno více než 8000. Jedná se multisystémová onemocnění s velmi nízkým výskytem (prevalencí) v populaci, která mají dopad na kvalitu života a sociální začlenění pacienta, popř. ohrožují jeho život. Za vzácné onemocnění je považováno takové onemocnění, u něž je výskyt 1 jedinec na 2000 jedinců.

V humánní genetice jsou popisovány dominantní znaky (např. achondroplázie, brachydaktylie, vrozená šeroslepost, Ehler- Danlosův syndrom, Huntingtonova choroba, Marfanův syndrom, neurofibromatóza, PTC – vnímání chuti fenyltiokarbamidu, vlasová linie nad čelem do špičky, vlnité vlasy) a z toho plynoucí dominantní dědičná onemocnění, ale i onemocnění s recesivním typem dědičnosti, která jsou způsobena recesivními znaky (např. albinismus, alkaptonurie, ataxia telangiectasia, cystická fibróza, Duchennova svalová dystrofie, galaktosémie, porucha ukládání glykogenu, fenylketonurie, srpkovitá anémie, Tay-Sachsova choroba. Pro grafické znázornění dědičnosti se užívají rodokmeny, které graficky znázorňují vztahy mezi členy rodiny. Pro vytváření rodokmenů se užívají specifické symbolické značky.

Doporučená literatura: SNUSTAD D.P. AND SIMMONS M.J.: Genetika. Přeloženo za ang. originálu Snustad DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 3.th ed. New York: John Wiley & Sons; 2003. Copyright Czech Edition © 2009, Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2/Kapitola 3

Otázky:

Vysvětlíte pojem dominantní a recesivní znak?

Co říká chromozómová teorie dědičnosti?

Jak se vypočítá statistika chí-kvadrát?

Co je to crossing-over?

3. PŘEDNÁŠKA

V roce 1902 britský biolog William Bateson přeložil Mendelův text do anglického jazyka a přidal k němu krátké vysvětlení s názvem „Mendelizmus – principy dominance, segregace a nezávislé kombinace“. V roce 1909 vydal Mendelovy principy dědičnosti shrnující výsledky pokusných křížení u mnoha různých druhů rostlin i živočichů (hrách, fazol, slunečnice, bavlník, pšenice, ječmen, rajče, kukuřice, skot, ovce, kočky, myši, králíci, morčata, kuřata, kanáři, motýli atd.). Geny nazýval „jednotkové znaky“ (unit-character“), protože se slovo gen ještě nepoužívalo. V předmluvě ke své knize Bateson zdůraznil: „Studium dědičnosti se proto stává organizovaným odvětvím fyziologických věd, již bohatým na výsledky a v očekáváních nemajícím sobě rovna.“

Alelové varianty a funkce genů

Mendel svými experimenty prokázal, že geny mohou existovat v různých formách, kdy pro každý studovaný znak identifikoval dvě **alely**. To vedlo k poněkud zjednodušenému chápání alel – dominantní alely a recesivní alely, kdy jakoby jedná nedělá nic (recesivní) a druhá vše (dominantní) pro výsledný fenotyp. Výzkum na počátku 20. století prokázal, že geny mohou existovat ve více než dvou alelových formách.

Neúplná dominance a kodominance

Dominantní alela má stejný fenotypový účinek v homozygotním i heterozygotním stavu. Vyrábí tedy dva fenotypově nerozlišitelné, ale genotypově rozdílné jedince. Pojem **neúplná**

(částečná) dominance znamená, že heterozygot vykazuje odlišný fenotyp od obou homozygotních fenotypů. Příkladem může být barva květů hledíku většího (*Antirrhinum majus*). Bílé (*ww*) a červené (*WW*) variety jsou homozygotní pro různé alely genu určující barvu květu, v případě heterozygota (*Ww*) vznikne růžová varieta. Alela pro červenou barvu (*W*) je neúplně dominantní nad alelou pro bílou barvu květu (*w*). Intenzita zbarvení je pravděpodobně dána množstvím produktu, který kóduje gen pro zbarvení květu a homozygoti *WW* obsahují dvakrát více produktu (barvy) než homozygoti *ww*. Neúplně dominantní alela se někdy označuje jako **semidominantní** (z lat. polodominantní).

Pokud heterozygot vykazuje fenotypové znaky obou odpovídajících homozygotů, mluvíme o kodominanci. **Kodominance** znamená nezávislé fungování alel a v tomto případě žádná alela není dominantní nad jinou a to ani neúplně dominantní. Příkladem může být dědičnost krevních skupin a detekce antigenů M a N u krevních buněk pomocí aglutinačního testu se specifickými antiséry. Kodominantní alely nerozlišujeme velkými a malými písmeny jako u dominantních a recesivních alel, ale horním indexem u symbolu genu. Příkladem kodominance je také geneticky vázané onemocnění srpkovitá anémie (na úrovni syntézy hemoglobinu jsou normální i defektní alela exprimovány jako kodominantní, na úrovni fyziologické funkce je normální alela neúplně dominantní a abnormální alela neúplně recesivní, na klinické úrovni se srpkovitá anémie chová jako recesivní znak).

Alelové série

Původní mendelovská představa, podle níž geny neexistují ve více než dvou alelových variantách, musela být modifikována poté, co byly nalezeny geny s více alelami (3 a více). Klasickým příkladem **alelové série** je gen pro barvu srsti u králíků. Gen je označován malým písmenem *c* (colorless = albín) a má celkem čtyři alely: *c* (albino, albín), *c^h* (himalayan, himalájský), *c^{ch}* (chinchilla, činčila), *c⁺* (standardní). V homozygotním stavu má každá z alel svůj charakteristický fenotypový projev (4 barvy králíka). Většina králíků v přírodních populacích je homozygotní pro alelu *c⁺*, tato alela se označuje jako **standardní**, anglicky wild type (divoký typ). Standardní alely se v genetice značí horním indexem + za písmenem popisujícím gen. Další alely genu *c* jsou **mutantní**, tedy pozměněné formy standardní alely, které vznikly během evoluce králíka. Mutantní alely jsou popsány horním indexem u normální alely. Geny se většinou označují podle názvu mutované alely, podle té s nejvíce abnormálním fenotypem, v tomto případě je to písmeno *c* (bezbarvý ang. colorless neboli albín) a většina mutovaných alel je recesivní. Někdy je mutovaná alela dominantní a gen je pojmenován podle odpovídajícího fenotypu, např. gen pro délku myšího ocasu, kdy heterozygoti mají zkrácený ocas.

Jiným příkladem alelové série je dědičnost krevních skupin u člověka systém A, B, AB a 0. Pokud se na povrchu buněk vyskytuje antigen A, jedná se o krevní skupinu A, pokud je přítomen antigen B, jde o krevní skupinu B. Pokud se vyskytují oba antigeny současně, jedná se o krevní skupinu AB, a pokud není přítomen ani jeden antigen, jde o skupinu 0. Gen pro tvorbu antigenů se označuje písmenem *I* a má celkem tři alely: *I^A*, *I^B* a *i*. V rámci šesti různých genotypů (*I^AI^A*, *I^Ai*, *I^BI^B*, *I^Bi*, *I^AI^B*, *ii*) rozlišujeme celkem čtyři fenotypy – krevní skupiny A, B, AB, 0. V tomto systému jsou alely *I^A* a *I^B* kodominantní, alela *i* je recesivní vůči alelám *I^A* a *I^B*. Všechny tři alely se v lidské populaci vyskytují s výraznou četností a proto gen *I* označujeme jako **polymorfní** (z řeč. „mající mnoho forem“).

Série alel

Funkční vztahy mezi alelami téže série se studují pomocí vytváření různých genotypových kombinací u heterozygotů. Čtyři alely genu *c* u králíka lze kombinovat za vzniku šesti různých heterozygotů. V tomto případě je možné studovat vztahy dominance mezi alelami. Standardní alela (wild type) je dominantní nad všemi ostatními alelami ve skupině. Alela chinchilla je neúplně dominantní nad alelou himalayan a alelou albino, alela himalayan je úplně dominantní nad alelou albino ($c^+ > c^{ch} > c^h > c$). Hierarchie dominance odpovídá účinku alel na barvu srsti králíka. Alely hinchilla a himalayan jsou **částečně funkční**, tzn. kódují částečné zbarvení srsti. Alela albino – **nefunkční alela**, tzv. nulová (amorfní) a nulové alely jsou většinou recesivní alely. **Hypomorfní alely** jsou částečně funkční, jsou recesivní vůči alelám více funkčním a standardním alelám.

Testování genových mutací na alelismus.

Mutace je proces, při kterém se standardní alela změní v jinou genetickou variantu. Vždy dochází k změně fyzického složení genu. Mohou vznikat nové alely ovlivňující fenotyp. Fenotyp (např. barva srsti) je určována více geny a mutace v jakémkoli z nich může redukovat nebo změnit, nebo zcela eliminovat původní projev (fenotyp). Pokud se objeví nová vlastnost, nevíme, který gen zmutoval. K určení alelové identity nové mutace lze použít jednoduchý test, který stanoví, zda nová mutace je recesivní, jedná se o **testování genových mutací na alelismus**. Podstata testu je v křížení jedinců homozygotních pro novou mutaci s jedinci homozygotními pro recesivní mutace známých genů. Jestliže hybridní potomstvo vykazuje mutantní fenotyp, potom nová mutace a testovací mutace jsou alelami téhož genu. Pokud potomstvo vykazuje standardní fenotyp, je tomu naopak, nová a testovaná mutace nejsou alelami stejného genu. Principem testu je skutečnost, že mutace stejného genu narušují stejnou genetickou funkci. Test lze použít pouze pro recesivní mutace. Dominantní mutace nemohou být takto testovány, protože jejich efekt se projeví vždy a tedy i když je v genotypu přítomna standardní alela.

Rozmanitost účinku jednotlivých mutací

Geny jsou identifikovány pomocí mutací, které nějakým viditelným způsobem mění fenotyp. Obrovská rozmanitost účinku jednotlivých mutací naznačuje, že u každého organismu s velkým množstvím genů může v kterémkoli z nich dojít různými způsoby ke vzniku mutací. V přírodě proto mutace obstarávají výchozí materiál pro evoluci.

Viditelné mutace mění některý morfologický znak (tvar, barva) a jsou většinou recesivní. Některé mutace omezují rozmnožování a zabraňují reprodukci mírně, zasahují obě pohlaví nebo pouze samce anebo samice. Mohou být dominantní i recesivní. **Sterilní mutace** úplně zabraňují reprodukci. **Letální mutace** zasahují základní životní funkce a jejich fenotypovým projevem je smrt. Mohou být recesivní i dominantní. **Dominantní letální mutace**, které se projeví v časných fázích života, se ztrácí hned v následující generaci, protože jedinci, kteří je nesou, umírají. Pokud se dominantní letální mutace objeví až po reprodukčním období, jsou přeneseny do další generace. **Recesivní letální mutace** přetrvávají v populaci po dlouhou dobu (v heterozygotním stavu se neprojeví). Zjistí se obvykle tak, že se v potomstvu heterozygotních jedinců – přenašečů objeví neobvyklé štěpné poměry.

Geny slouží k tvorbě polypeptidů

Vědci G. Beadle a E. Tatum v polovině dvacátého století potvrzují, že produkty genů jsou polypeptidy. Polypeptidy jsou makromolekuly tvořené lineárním řetězcem aminokyselin a tvoří základní složku proteinů. Každý organismus vytváří tisíce různých polypeptidů, z nichž každý je charakterizován specifickou sekvencí aminokyselin. Beadle a Tatum se domnívali, že každý gen kóduje jeden konkrétní polypeptid. Mutace genu znamená, že nevznikne daný polypeptid, nebo je pozměněn, čímž se mění i jeho funkce v organismu. Z moderních výzkumů vyplývá, že produkty genů nemusí být pouze polypeptidy, ale mohou to být také molekuly RNA.

Recesivní mutace dávají vzniknout alelám se ztrátou funkce (**loss of function**). Dominantní mutace mohou vyvolat mutantní fenotyp i v heterozygotním stavu, za přítomnosti standardní alely, principem je zesílení funkce genového produktu (vzniká nový polypeptid, exprese standardního polypeptidu v neobvyklém místě nebo čase), jedná se o tzv. alely se získáním funkce (**gain of function**). Toto rozdělení mutací vysvětluje pojmy dominance a recesivita. **Mutace dominantně negativní** interferují s funkcí standardní alely, kódují polypeptidy, které inhibují, omezují nebo narušují aktivitu normálního polypeptidu. **Recesivní amorfní alela** se ztrátou funkce kóduje nefunkční polypeptid, vzniká mutantní fenotyp (těžké poškození) označeno malým písmenem **a**. **Recesivní hypomorfní alela** se ztrátou funkce kóduje částečně funkční polypeptid, projevem je mutantní fenotyp (střední poškození), označované jako **a^h**. **Dominantně negativní alela** kóduje polypeptid, který interferuje se standardním polypeptidem, výsledkem je mutantní fenotyp (těžké poškození) označované **a^p**.

Působení genů: od genotypu k fenotypu

Fenotyp závisí na prostředí i na genetických faktorech. Geny musí fungovat v kontextu vnitřního i vnějšího prostředí. Fenotyp je dále ovlivněn dalšími faktory, jako jsou penetrance a expresivita genu a genové interakce - **epistaze a pleiotropie**. Vliv vnějšího prostředí na expresi genů člověka je známý např. u recesivního onemocnění fenylketonurie, kdy strava ovlivňuje zásadně fenotyp. Vnitřní biologické prostředí organismu může také ovlivnit fenotypovou expresi genů. Příkladem je předčasná plešatost u člověka. V tomto případě hraje významnou roli pohlaví. Plešatost je podmíněna alelou, které se u každého z pohlaví exprimuje jinak. U homozygotních i heterozygotních mužů dochází v důsledku této alely k tvorbě pleše, u žen pouze homozygoti mají tendenci k mírnému plešatění, projevujícím se jako celkové prořídnutí vlasů. Exprese je pravděpodobně řízena mužským pohlavním hormonem testosteronem (ženy ho vytvářejí méně než muži).

Neúplná penetrance znamená, že specifický genotyp se neprojeví fenotypově. Příkladem je polydaktylie (přítomnost nadbytečných prstů), která se nemanifestuje u všech jedinců. **Variabilní expresivita** označuje skutečnost, že konkrétní znak se nemanifestuje stejným způsobem u všech jedinců, kteří ho nesou. Výsledkem je existence řady fenotypů mezi dvěma extrémy (homozygoty). Neúplná penetrance a variabilní expresivita bývá způsobena vlivem vnějšího prostředí a faktory genetického pozadí.

Pojem **epistáze** znamená, že znak je ovlivněn dvěma nebo více geny, alela jednoho z nich má nadřazený vliv nad ostatními, je epistatická vůči ostatním genům, podílejícím se na fenotypu (epistáze z řečtiny „stát nad“). Příkladem je drozofila. Její tvorbu očního pigmentu podmiňuje velké množství genů, pokud je homozygotní pro nulovou alelu kteréhokoli z těchto genů, metabolická dráha je zablokována a vzniká abnormální barva očí. Alela anulují účinek dalších genů a překrývá jejich podíl na fenotypu. To znamená, že mutantní alela jednoho genu je epistatická vůči mutantní

alele druhého genu, jestliže maskuje její přítomnost. Dalším příkladem je experiment Batesona a Punnetta, kteří sledovali barvu květů u hrachoru (*Lathyrus odoratus*). Původní barva hrachoru bílá a nachová je ovlivněná dvěma nezávisle segregujícími geny *C* a *P*, které řídí syntézu antokyanu. Každá z těchto alel má recesivní alelu zabraňující tvorbě pigmentu (*cc* nebo *pp*). Výsledkem křížení bílého hrachoru (*CCpp*) a bílého hrachoru (*ccPP*) je v F1 generaci uniformní potomstvo *CcPp* s nachovou barvou. Křížením F1 generace získáme generaci F2 se dvěma fenotypy v poměru 9 (nachová) : 7 (bílá). Každá z recesivních alel je epistatická nad dominantní alelou druhého genu. Dominantní alela zřejmě kóduje enzym kontrolující určitý krok při syntéze antokyanu. Další příklad epistáze poskytl G. Shull ve svém experimentu na kokošce pastuší tobolce (*Capsella bursa-pastoris*), kdy zkoumal tvar šešulek (oválný/trojboký). Oválné šešulky vzniknou pouze v případě, pokud je rostlina recesivní homozygot pro oba geny.

Pleiotropie

Pleiotropní gen je takový gen, který ovlivňuje více fenotypových znaků. Příkladem je onemocnění fenylketonurie. Primární funkce recesivní mutantní alely je tvorba toxických sloučenin, které se akumulují v mozku a způsobují mentální postižení. Vedle toho také interferuje se syntézou barviva melaninu a výsledkem je světlá barva vlasů. Gen tedy ovlivňuje metabolismu aminokyseliny fenyl-alaninu a současně i barvu vlasů. Dalším příkladem je tvorba chloupků u drozofily, mutovaní homozygoti *singed* mají krátké zkrácené chloupky, dále je ovlivněna tvorba zdravých vajíček schopných oplození (sterilní mutace). Gen *signed* ovlivňuje vytváření chloupků a vajíček u samiček, u samečků pak pouze vytváření chloupků.

Inbriding

K inbridingu dochází, pokud mají rodiče společné předky. Jedná se o příbuzenské křížení. Toto křížení mezi příbuznými se označuje také jako konsangvinita. Rodiče mají společné předky nebo dochází ke křížení mezi sourozenci. V mnoha kulturách jsou sňatky mezi nejbližšími příbuznými (mezi sourozenci i nevlastními sourozenci) zakázány, protože inbriding vede k častějšímu narození nemocných dětí. Je zde větší šance, že se spojí recesivní alely. Tento typ křížení je naopak typický pro modelové organismy, kdy vznikají tzv. imbrední (čistě) linie, to znamená geneticky uniformní linie, které pak nese segregují různé alely. Imbrední deprese znamená ztrátu životaschopnosti. Opakem je heteroze – hybridní zdatnost. Koeficient *inbridingu* F je $(\frac{1}{2})^n$, kdy n je počet jedinců v každé imbrední cestě. Vlastní sourozenci mají $F = (\frac{1}{2})^3 + (\frac{1}{2})^3$, nevlastní sourozenci mají $F = (\frac{1}{2})^3$. *Inbriding* zvyšuje četnost homozygotů a snižuje četnost heterozygotů. Důsledky *inbridingu* jsou přímo úměrné hodnotě koeficientu *inbridingu*, což je pravděpodobnost, že jedinec má dvě kopie genu identické, neboť pocházejí ze stejného předka. Koeficient příbuznosti vyjadřuje podíl genů, které dva jedinci sdílejí na základě toho, že mají společného předka.

Doporučená literatura: SNUSTAD D.P. AND SIMMONS M.J.: Genetika. Přeloženo za ang. originálu Snustad DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 3.th ed. New York: John Wiley & Sons; 2003. Copyright Czech Edition © 2009, Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2/Kapitola 4

Otázky:

Co to je standardní alela a jak se označuje?

Co znamená pojem letální mutace?

Vysvětlete pojem pleiotropie, uveďte příklad pleiotropní dědičnosti?

4. PŘEDNÁŠKA

Chromozómy

Studium chromozómu bylo umožněno spojením dvou vědních oborů – cytologie a genetiky, vzniká tak vědní disciplína cytogenetika. Na počátku cytogenetiky stál genetik T.H. Morgan a cytolog E. Wilson. Wilson zkoumal chování chromozómů, rozdílů v chromozómové výbavě u obou pohlaví a zjistil, že obě pohlaví se liší zvláštním párem chromozómů nazývaných pohlavní chromozómy. Morgan identifikoval gen, který způsobil odlišné fenotypové poměry u samců a samic a předpokládal, že tyto geny jsou uloženy na jednom z pohlavních chromozómů. Morgan dále prokázal, že geny jsou lokalizovány na chromozómech. Mnoho nových poznatků bylo objasněno během studia vzácně se vyskytujících jedinců, u nichž pohlaví neodpovídalo sestavě pohlavních chromozómů.

Chromozómová teorie dědičnosti

Výzkumy dědičnosti znaků vázaných na pohlaví u drozofily přinesly první důkazy o tom, že chování chromozómů v meióze je základem pro vysvětlení Mendelových principů segregace a nezávislé kombinace. V roce 1910 vznikla úvaha, že geny jsou umístěny na chromozómech, která byla bez důkazu. Bylo tedy nezbytné najít gen jednoznačně svázaný s určitým chromozómem, kdy alela genu musela být jednoznačně rozpoznatelná a stejně tak chromozóm musel být morfologicky rozlišitelný. Tuto teorii objasnil americký biolog T. H. Morgan, když objevil zvláštní mutaci ve zbarvení očí drozofily, která se dědí společně s chromozómem X. Teorii definitivně ji potvrdil jeho student C.B. Bridges.

Experimentální důkazy spojující dědičnost genů s chromozómy

Na počátku byl mutantní sameček drozofily s bílými očima (standardní barva očí – červená), který byl křížen se samičkou s červenými očima, v F1 generaci vznikají potomci pouze s červenými očima. Křížení potomků F1 generace vzniká zvláštní segregace, kdy mají všechny samičky, ale pouze polovina samečků, červené oči. Tzn. barva očí je vázána na pohlavní chromozómy. Gen pro barvu očí je lokalizován na chromozómu X, za bílý a červený fenotyp jsou zodpovědné 2 alely – w (mutantní) a w^+ (standardní). Sameček zdědí pouze jednu kopii tohoto genu. V tomto případě hemizygotní jedinec (sameček) nese pouze jednu kopii genů a proto má bílou i červenou barvu očí.

Bridges použil pro objasnění pokus, kdy křížil bělooké samičky s červenoookými samečkami. V F1 generaci vznikly červenoooké samičky i běloocí samečci dle očekávání, ale objevuje se také několik zvláštních jedinců – bělooké samičky a červenoocí samečci. Pokud tyto jedince zkřížil, všichni neobvyklí samečci jsou sterilní a samičky jsou fertily. Zvláštní samičky F1 vznikaly velmi vzácně, vyprodukovaly mnoho abnormálních potomků. Abnormální jedinci vznikly v důsledku abnormálního chování chromozómů X v meióze, které se odehrálo v generaci samiček P, kdy nedošlo ke správné segregaci chromozómů a vznikají dva typy vajíček, vajíčko se dvěma X (diplo-X) a vajíčko bez X chromozómu. Celkem vznikly čtyři typy zygot: XXY – bělooké samičky, XO , červenoocí sterilní samečci, XXX metasamice (obvykle hyne) a YO sameček hyne. XO byli samečci – tzn. chromozóm Y nehraje pro určení pohlaví žádnou roli, ale samečci byli sterilní, tzn. Y chromozóm je důležitý pro samčí pohlavní funkci. Z toho vyplývá, že drozofila vyžaduje pro životaschopnost alespoň jednu kopii X

chromozómu. Anomálie chování chromozómu byla označena jako nondisjunkce (porucha rozchodu chromozómů během meiotického dělení). **Nondisjunkce** během meiózy vede k abnormálním počtům chromozómů v gametách, a tím v zygotách.

Morganova výzkumná skupina postupně zjišťuje, že na pohlavním chromozómu se vyskytuje více genů, které nesegregují podle Mendelova principu, přičemž geny mimo pohlavní chromozóm segregují podle Mendelovského principu, ale nesegregují v závislosti na pohlaví, tzn. leží na některém ze tří autozómu drosofilu. Každý chromozóm tedy obsahuje rozdílnou skupinu genů. Hypotéza, že geny jsou uspořádány na chromozómu lineárně (chromozómy jsou dlouhá tenká vlákna) byla inspirována cytologickými důkazy, které popisovaly chromozómy jako dlouhá tenká vlákna. Vzniká nový pojem **lokus** - z lat. „místo“, místo na chromozómu. Geny se nacházejí na různých místech tedy lokusech lineární struktury chromozómu. Postupně vznikají genetické mapy – schémata znázorňující polohy genů a relativní vzdálenosti mezi nimi. Definuje se také fyzická struktura chromozómů (následně došlo k propojení linearitu chromozómů s lineární strukturou DNA). Všechny geny jsou lokalizovány na chromozómech a Mendelovy principy lze vysvětlit vlastnostmi přenosu chromozómů v průběhu reprodukce = **CHROMOZÓMOVÁ TEORIE DĚDIČNOSTI**.

Chromozómy

Chromozómy byly objeveny v 2. polovině 19. století W. Waldeyerem (německý cytolog). Chromozómy můžeme nejlépe pozorovat v dělících se buňkách s použitím vhodných barviv, během dělení jsou chromozómy zhuštěny do malého objemu, takže vypadají jako kompaktní válcovitá tělíska, což potvrzuje teorii, že genom je segmentovaný. **Interfázní chromozómy** (interfáze – fáze, kdy se buňka nedělí) mají tvar tenkých, volně stočených vláken vyplňujících celou oblast jádra). Tvoří tedy difúzní síť vláken, kterou označujeme jako **chromatin**. Po obarvení můžeme pozorovat světlejší a tmavší oblasti chromatinu. Světlé oblasti chromatinu nazýváme **euchromatin**, tmavé oblasti chromatinu nazýváme **heterochromatin**. Oba typy chromatinu mají jiný funkční význam. Počet chromozómů u jednoho druhu je tvořen téměř vždy sudým násobkem základního chromozómového čísla – n . Základní chromozómové číslo u člověka je 23 ($n=23$), počet odpovídající počtu chromozómů ve zralém vajíčku nebo spermii. Somatické buňky člověka mají dvojnásobný počet chromozómů a tedy 46, výjimkou jsou některé specializované buňky, např. buňky jater, které mají 92 chromozómů. **Haploidní**, nebo také základní chromozómové číslo (n) charakterizuje sadu chromozómů, kterou označujeme jako haploidní genom. Většina somatických buněk nese ve své sadě vždy dvojici týchž chromozómů (homologní chromozómy), a proto je označujeme jako **diploidní** ($2n$). Buňky se čtyřmi kopiemi identických chromozómů označujeme jako **tetraploidní** ($4n$), v případě osmi kopií jako **oktoploidní** ($8n$). Většina organismů má 10 – 40 chromozómů. Každý druh má sadu chromozómů charakteristickou jejich počtem a strukturou.

Pohlavní chromozómy

U některých druhů živočichů mají samice o jeden chromozóm navíc oproti samcům (př. kobyly). Tento zvláštní chromozóm, jenž byl původně nalezen u hmyzu, byl označen jako chromozóm X. Samice mají dva chromozómy X, samci pouze jeden chromozóm X, z cytogenetického hlediska mají samice konstituci XX a samci X0, kde 0 znamená absenci pohlavního chromozómu. V průběhu meiózy se u samic oba chromozómy párují a následně rozcházejí. Ve vzniklých vajíčkách je vždy jeden chromozóm X. U samců se chromozóm X pohybuje nezávisle na ostatních chromozómech,

začleňuje se do poloviny spermií, druhá polovina spermií chromozóm X neobsahuje. Oba typy zygot vznikají se stejnou pravděpodobností a celkový poměr pohlaví 1:1 zůstává zachován.

U mnoha jiných živočišných druhů včetně člověka mají samci a samice stejný počet chromozómů, protože u nich existuje zvláštní samčí chromozóm Y, jenž se páruje s chromozómem X. Chromozóm Y má výrazně odlišnou strukturu od chromozómu X. Chromozómy X a Y obsahují malé množství stejného genetického materiálu v jejich koncových oblastech nazývaných **pseudoautozomální oblasti**, které jsou vůči sobě homologní. Během meiózy vznikají u samců dva typy gamet – spermie s chromozómem X nebo Y. Samice tvoří pouze jeden typ gamet – X. Chromozómy X a Y označujeme jako pohlavní chromozómy (**gonzómy**), všechny ostatní chromozómy v genomu označujeme jako **autozómy**. Pohlavní chromozómy se u všech organismů nějakým způsobem liší, autozómy jsou u obou pohlaví stejné. Geny na autozomech mají **homozygotní** nebo **heterozygotní** vztah, geny na pohlavních chromozómech mají **hemizygotní** vztah dědičnosti (netýká se to pseudoautozomálních oblastí). Jedinec, který nese pouze jednu kopii genů, se označuje jako **hemizygotní**. Mezi zajímavosti patří, že lidské spermie s Y jsou lehčí a pohybují se rychleji, mají reprodukční výhodu, takže skutečný poměr pohlaví zygot je 1,3 : 1 ve prospěch chlapců, ale mužské zygoty jsou méně životaschopné než ženské, porody probíhají v poměru pohlaví – 1,07 :1 ve prospěch chlapců, teprve v období reprodukční dospělosti je převaha mužů úplně eliminována a poměr pohlaví seupraví na poměr 1:1.

Dědičnost pohlaví

Pohlaví vždy není determinováno jen přítomností pohlavních chromozómů XY jako je tomu u člověka nebo absencí jednoho chromozómu jako u kobylek. Pohlaví může být určeno i **negeneticky** – vlivem teploty, vlhkosti, vlivem sociálního prostředí. U kobylek mají samice o 1 chromozóm víc než samci (samice XX, samci X0). Dalším typem je typ **Abraxas** typický pro ptáky a motýli, pohlavní chromozómy se označují Z a W, ZZ je samec ZW je samice. Typ **Drosophila** je typický pro savce, většinu hmyzu, některé plazy atd. XX jsou samice, zatímco XY samci nebo XX jsou samice a X0 samci, to platí pro rovnokřídý hmyz a ploštice. Existuje také **haplodiploidní** určení pohlaví. V tomto případě jsou samci haploidní (n) a vznikají z neoplozeného vajíčka, samice jsou diploidní (2n) a vyvíjejí se z oplozeného vajíčka, toto je typické pro včely a mravence.

Geny vázané na pohlaví u člověka

Hemofilie je X vázaná porucha srážlivosti krve, kdy postižení jsou hlavně muži, jejich matky jsou nepostižené přenašečky. Ty předávají mutaci svým dcerám, postižení muži nikdy nepřenášejí mutantní alelu na své syny, příklad – carská rodina (4 dcery, 1 postižený syn Alexej). Dříve se jednalo o smrtelnou nemoc (smrt nastala před 20 rokem života), dnes je dostupná léčba.

Barvoslepost (daltonismus) je dalším typem postižení vázaných na pohlaví. 5-10% mužů je barvoslepých k červené a zelené barvě, existuje pouze 1% postižených žen. Na X chromozómu jsou dva geny zodpovědné za vnímání barev – červenou a zelenou, 3 gen pro vnímání modré barvy je lokalizován na jiném chromozómu.

Geny na chromozómu Y. Jedná se celkem 307 genů, přičemž na chromozómu X je jich více než 1000, některé geny na Y chromozómu jsou důležité z hlediska mužské plodnosti (gen SRY), takže

pokud se vyskytne mutace v takovém genu, ovlivní to schopnost reprodukce a mutace není přenesena do další generace.

Některé geny jsou na chromozómu X i Y – tzv. geny **pseudoautozomální oblasti**, nevykazují X- nebo Y-vázanou dědičnost, ale do další generace jsou přenášeny stejně jako autozomální geny. Tyto geny zprostředkovávají párování X a Y chromozómů během buněčného dělení.

Pseudoautozomální oblasti

Pseudoautozomální oblasti jsou specifické oblasti pohlavních chromozómů (X i Y). V těchto oblastech jsou umístěny geny, které mají (ve stejném pořadí) své homologní kopie i na druhém typu **heterochromozomu**. V případě chromozomu X - nepodléhají tyto geny lyonizaci. Pro geny umístěné v těchto oblastech platí autozomální typ dědičnosti. Jedná se o dva úseky – PAR 1 (větší úsek, cca 2,7Mb = miliónů bazí, 24 genů) na konci krátkých ramének a PAR 2 (menší úsek, cca 330kb = tisíců bazí, 5 genů) na konci dlouhých ramének chromozómu X a Y. Díky těmto oblastem (především pak PAR1) se mohou chromozómy X a Y párovat, tvoří tzv. "homologní" pár. Mezi geny v těchto oblastech může docházet ke crossing-overu. Ačkoli by se mohlo jevit jako logické, že PAR1 a PAR2 představují pozůstatek původního autozomu, ze kterého chromozom X a chromozom Y vzešly, ukazuje se, že oblast PAR1 byla k oběma chromozómům přidána před 29-44 miliony let složitým procesem několikanásobných translokací. PAR2 chromozomu Y je odvozena z chromozomu X, k jejímu přenosu došlo v rámci evoluce primátů před cca 4-10 milióny let. Příkladem genu v oblasti PAR1 může být gen SHOX (Short Stature Homeobox; Xp22.32; OMIM: *312865) a jeho homolog gen SHOXY (Yp11.2; OMIM: *400020).

Determinace pohlaví u člověka

U člověka se vyskytuje dominantní vliv mužského chromozómu Y, jedinci s pohlavními chromozómy X jsou ženy, jedinci XXY jsou vždy muži. Dominantní vliv Y chromozómu se projevuje v průběhu časného embryonálního vývoje a Y řídí vývoj primordiálních gonád směrem ke vzniku varlat, ty produkují testosteron a ten stimuluje vývoj sekundárních pohlavních znaků muže. TDF (testes-determinující faktor) je produktem genu SRY (sex-determining region Y) a je umístěn poblíž pseudoautozomální oblasti p-ramene Y chromozómu. K objevení SRY vedla identifikace zvláštních jedinců, mužů XX a žen XY. Pojem **testikulární feminizace** znamená, že došlo k mutaci X vázaného genu Tfm, který kóduje receptory pro testosteron. Mutace tfm se přenáší z matek na hemizygotní potomky XY (fenotypově ženy), způsobem typickým pro X vázanou dědičnost. Důsledkem je, že u pohlaví XY chybí receptory pro navázání testosteronu na receptory a tím pádem se vyvinou ženské sekundární pohlavní znaky.

Lyonizace

Lyonizace je vlastně inaktivace X- vázaných genů u samic savců způsobená inaktivací jednoho z X chromozómů. Lyonizace byla popsána v roce 1961 britskou genetičkou Mary Lyonovou (studium myši). K inaktivaci dochází v časném stádiu embrya, které skládá se z několika tisíce buněk. Jeden z chromozómů X je umlčen, zcela náhodně a všechny buňky, které vzniknou z této původní buňky, budou mít inaktivovaný stejný chromozóm X. Důsledkem je vznik genetické mozaiky, chromozóm X zděděný od matky je inaktivován přibližně u ½ buněk těla a chromozóm X zděděný od otce je inaktivován v té druhé polovině buněk. Samice heterozygotní pro X-vázaný gen vykazují dva odlišné

fenotypy. Příkladem je zbarvení srsti u koček a myší (želvovinová kočka, cargo kočka). V tomto případě chromozóm X obsahuje geny zodpovědné za pigmentaci srsti, heterozygotní samice mají skvrny světlé a tmavé srsti, každá barevná skvrna je vyvolána jiným klonem buněk produkujících pigment (melanocyty). V lidských buňkách se vyskytují tzv. **Barrova tělíška**, která u mužů zcela chybí, jedná se o inaktivované X chromozómy. Jsou to tmavě zbarvené struktury kondenzovaných X chromozómů (vznikají v důsledku methylace) vyskytující se v blízkosti jaderné membrány. V důsledku lyonizace jsou jedinci s více chromozómy X fenotypově normální ženy, ale mají více Barrových tělísek (počet chromozómu X mínus jedna).

Tak zvané X – inaktivační centrum (XIC) je počátkem inaktivace chromozómu X. Ne všechny geny na chromozómu X jsou transkripčně neaktivní, gen XIST (X inactive specific transkript) je uvnitř XIC oblasti, jedná se o 17 kb dlouhý transkript, bez otevřených čtecích rámců, nekóduje tedy protein, ale produkuje polyadenylovanou RNA, která se vyskytuje pouze v jádře a je specificky lokalizovaná na inaktivovaném chromozómu X.

Barvení chromozómů

Pro vizualizaci chromozómů se používají různé barvicí techniky:

G-pruhování (G-banding): Pomocí této metody můžeme chromozomy nejen rozdělit do skupin, ale také je vzájemně odlišit a přesně určit. G-pruhování je založeno na působení trypsinu a následném obarvení Giemsovým roztokem. Nyní jsou na chromozomu odlišitelné světlé a tmavé pruhy. Každý G-pruh má své číslo.

Q-pruhování: Zde používáme fluorescenční barvivo chinakrin, proto používáme zkratku Q (jako Quinacrine). Dostáváme podobné výsledky jako u G-pruhování, ale metoda je finančně nákladnější. Pro prohlížení takto obarvených chromozómů potřebujeme fluorescenční mikroskop.

R-pruhování (R-banding, reverse banding): Využíváme vysokou teplotu k částečné degradaci chromozómů. Poté barvíme Giemsou. Výsledek získáváme poněkud odlišný, R-pruhy mají opačné zbarvení než G-pruhy, tzv. reverzní značení.

C-pruhování (C-banding): Používáme hydroxid barnatý a následně obarvíme Giemsovým roztokem. Tímto způsobem můžeme vizualizovat oblasti konstitutivního heterochromatinu.

Barvení koloidním stříbrem (Ag-NOR): Pokud chceme zvýraznit p-raménka akrocentrických chromozómů, volíme tuto metodu. Můžeme tedy vyšetřit aberace na akrocentrických chromozómech (hlavně identifikovat tzv. markery akrocentrického původu). Používáme dusičnan stříbrný, který působí na proteiny nacházející se právě v sousedství NOR (Nucleolar Organizer Regions).

Doporučená literatura: SNUSTAD D.P. AND SIMMONS M.J.: Genetika. Přeloženo za ang. originálu Snustad DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 3.th ed. New York: John Wiley & Sons; 2003. Copyright Czech Edition © 2009, Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2/Kapitola 5

Otázky:

Vysvětlete pojem hemizygotní jedinec?

Co znamená nondisjunkce?

Uveďte příklad onemocnění člověka vázaného na pohlavní chromozóm?

5. PŘEDNÁŠKA

Funkce genetického materiálu

Genetický materiál se musí replikovat, řídit růst a vývoj organismu a umožnit mu přizpůsobovat se změněnému prostředí. Mendel prokázal tři základní funkce genetického materiálu:

1) genotypovou funkci – **replikaci**, genetický materiál musí uchovávat genetickou informaci a přesně ji předávat z rodičů na potomstvo, z generace na generaci;

2) fenotypovou funkci, **genovou expresi**, genetický materiál musí řídit vývoj fenotypu organismu, tzn. že genetický materiál určuje růst organismu od jednobuněčné formy – zygoty až k dospělému jedinci;

3) evoluční funkci, **mutaci**, genetický materiál musí podléhat změnám, aby vznikaly varianty, které organismům umožňují přizpůsobit se změnám prostředí, může tedy probíhat evoluce.

Genetická informace většiny živých organismů je uložena v DNA (deoxyribonukleová kyselina). U některých virů je genetická informace uložena v RNA (ribonukleová kyselina).

Viroidy jsou infekční molekuly samotné RNA. Priony jsou infekční děditelné proteiny. Jedná se o abnormální formy savčích proteinů, kódované savčími geny. Po jejich vytvoření působí jako předloha, která přeměňuje další molekuly z normální buněčné formy tohoto proteinu na infekční prionovou formu. Priony se shlukují a zabíjejí hostitelské buňky. Mozek nemocných zvířat je pak houbovitý se vzniklými dutinami po usmrčených buňkách. Onemocnění postupuje rychle, nervové buňky degenerují a organismus umírá.

Složení chromozómů

Chromozómy jsou složeny z proteinů a nukleových kyselin – DNA i RNA. Výsledky studií ze 40. a 50. let 20. století jasně prokázaly, že genetická informace je uložena v nukleových kyselinách nikoli v proteinech.

Struktura DNA a RNA

Nukleové kyseliny jsou složeny z opakujících se podjednotek zvaných nukleotidy. **Nukleotid** se skládá ze tří částí: fosfátové skupiny, pětiuhlíkatého cukru (pentózy), cyklické dusíkaté složky zvané báze (purinu nebo pirimidinu). V DNA je cukrem **2-deoxyribóza**, v RNA je cukernou složkou **ribóza**. V DNA se běžně vyskytují čtyři báze: **adenin (A), guanin (G), thymin (T) a cytozin (C)**. RNA obsahuje adenin, guanin a cytozin, ale místo thyminu má odlišnou bázi – **uracil (U)**. Adenin a guanin jsou bicyklické báze zvané puriny; cytosin, thymin a uracil jsou monocyklické báze nazývané pirimidiny. V polynukleotidech jako DNA a RNA jsou tyto podjednotky propojeny do dlouhých řetězců. RNA obvykle existuje jako **jednovláknový** polymer, DNA je obvykle **dvouvláknová** molekula. Každý polynukleotidový řetězec se skládá ze sekvence nukleotidů spojených navzájem fosfodiesterovými vazbami ty propojují sousední deoxyribózové skupiny. **Dvě polynukleotidová vlákna** jsou držena pohromadě ve **šroubovicovité** konfiguraci vodíkovými vazbami mezi bázemi opačných vláken, výsledné páry bází jsou uspořádány nad sebou mezi dvěma řetězci kolmo k ose molekuly jako schody

točitého schodiště. Vrstvené páry bází vytvářejí hydrofobní jádro (uplatňují se zde **hydrofobní vazby**). Kovalentní vazby se uplatňují v bázích a cukrech a také ve **fosfodiesterových vazbách**. Párování bází je specifické, adenin se vždy páruje s thyminem a guanin s cytozinem. Z toho vyplývá, že všechny páry bází se skládají z jednoho purinu a z jednoho pirimidinu. Párování bází je umožněno vznikem vodíkových vazeb mezi puriny a pirimidiny. Ve svých běžných strukturních konfiguracích tvoří adenin s thyminem dvě **vodíkové vazby** a guanin s cytosinem tři vodíkové vazby. Jakmile je známa sekvence bází v jednom vlákně dvoušroubovice DNA, je známa i sekvence bází ve druhém vlákně na základě specifického párování bází. Tyto dvě vlákna jsou tedy komplementární. **Komplementarita** dvou vláken dvojité šroubovice činí z DNA jedinečný nástroj pro uložení a přenos genetické informace z generace na generaci. Dvě vlákna dvojité šroubovice DNA mají opačnou chemickou polaritu. Funkční molekuly DNA v buňkách mají záporné **nadšroubovicové vinutí**.

Stabilita dvojité šroubovice DNA vyplývá částečně z velkého počtu vodíkových vazeb mezi páry bází a částečně z hydrofobních vazeb mezi sousedními páry bází. Vrstvení párů bází je nejlépe znázorněno pomocí tzv. **kalotového modelu**. Na tomto modelu je vidět, že dva žlábků dvojité šroubovice nejsou stejné, jeden – velký žlábek – je mnohem širší než druhý – malý žlábek. Rozdíl mezi velkým a malým žlábkem je důležitý při zkoumání interakcí mezi DNA a proteiny, které regulují genovou expresi. Některé proteiny se vážou do velkého žlábků, jiné do malého žlábků.

Existují tři různé alternativní formy šroubovice DNA. Watson-Crickova dvoušroubovicová struktura se nazývá **B-DNA**. Je pravotočivá, má 10 pb na otáčku a průměr 1,9 nm. Jedná se o konformaci, kterou DNA zaujímá za fyziologických podmínek (ve vodných roztocích s malým obsahem solí). Velká většina molekul DNA, které jsou přítomny ve vodném prostředí protoplazmy živých buněk, existuje v konformaci B. Avšak DNA není statickou molekulou, ale vykazuje značnou konformační flexibilitu. Při vysokých koncentracích solí nebo v částečně dehydratovaném stavu existuje DNA jako **A-DNA**, která je pravotočivou šroubovicí stejně jako B-DNA, ale s 11 páry nukleotidů na otáčku. A-DNA je kratší a silnější dvojité šroubovice o průměru 2.3 nm. V této konformaci se DNA in vivo pravděpodobně nevyskytuje. A-DNA je důležitá pro heteroduplexy DNA-RNA nebo duplexy RNA-RNA. Poslední konformací DNA je levotočivá dvouřetězcová forma zvaná **Z-DNA** (zig-zagged trajektorie cukr-fosfátových páteří této struktury). **Z-DNA** se vyskytuje u dvojitých šroubovic bohatých na G:C a obsahujících střídající se purinové a pirimidinové zbytky, má 12 párů bází na otáčku a průměr 1.8 nm a jediný hluboký žlábek. Její funkce v živých buňkách nebyla dosud objasněna.

Každý eukaryotický chromozóm obsahuje jednu obrovskou molekulu DNA o délce 1-20 cm (10⁴ až 2x10⁵ μm), která je sbalena do 11 nm elipsoidních tělísek zvaných **nukleozómy**. Nukleozóm („korálek“) je podjednotkou chromatinu a jeho jádro se skládá ze 146 bp a dvou molekul každého z histonů- H2A, H2B, H3 a H4, jedná se o tzv. **histonové oktamer**.

Kondenzované chromozómy, které se vyskytují při mitóze a meióze a šetrně izolované interfázni chromozómy jsou složeny z 30 nm vláken chromatinu. V metafázi se tato vlákna člení na domény pomocí lešení, které je složeno z nehistonových proteinů chromozómů. Centromery (oblasti přichycení dělicího vřeténka) a telomery (konce) chromozómů mají zvláštní strukturu, která pak umožňuje jejich funkce. Eukaryotické genomy obsahují opakované sekvence DNA, z nichž některé jsou přítomny více než milionkrát, jedná se o tzv. **repetitivní DNA**.

Replikace DNA

Replikace DNA je komplexní a vyžaduje účast velkého počtu proteinů. Syntéza DNA probíhá průběžně na dceřiném vedoucím vlákně, které se syntetizuje ve směru 5' → 3' a přerušovaně na dceřiném opožďujícím se vlákně, které se syntetizuje ve směru 3' → 5'. Nové řetězce DNA jsou iniciovány krátkými primery RNA syntetizovanými DNA-primázou. Enzymy a DNA-vazebné proteiny zapojené do replikace se v každé replikační vidlici sestavují do **replizomu** a vzájemně kooperují při pohybu vidlice podél rodičovské DNA. Velké molekuly DNA eukaryotických chromozómů se replikují z většího počtu počátků oběma směry.

Syntéza DNA - replikace je katalyzována enzymy zvanými DNA-polymerázami. Všechny DNA polymerázy vyžadují vlákně primery, které se prodlužují a vlákně templátu, které je kopírováno. Všechny DNA polymerázy striktně vyžadují 3'-OH na vlákně primery a syntéza všech DNA probíhá ve směru od 5' → 3'. Exonukleázové aktivity 3' → 5' DNA polymeráz provádějí korekce vznikajících vláken DNA bezprostředně po jejich syntéze, odstraňují všechny chybně spárované nukleotidy na 3' koncích primerových vláken. Dvě nebo tři DNA-polymerázy (α, δ a/nebo ϵ) se u eukaryot vyskytují v každé replikační vidlici. Telomery, tj. jedinečné sekvence na koncích chromozómů, prodlužují chromozómy působením speciálního enzymu zvaného **telomeráza**.

Replikace prokaryot

Replizom *E. coli* – úplný replikační aparát – obsahuje **holoenzym DNA-polymerázy III**, ten má dvě katalytická jádra – pro replikaci obou vláken, primozom rozplétá rodičovskou molekulu DNA a syntetizuje RNA primery potřebné pro přerušovanou syntézu opožďujícího se vlákna. Replikace začíná v místě **oriC (iniciační místo)**, vzniká replikační bublina (interagují předprimerové proteiny a oriC). Dojde k vytvoření replikační vidlice a nastává iniciace syntézy nových vláken DNA pomocí RNA-primerů. Replikace vedoucího vlákna vyžaduje 1 primer, pro replikaci opožďovaného vlákna je vyžadován RNA primer pro každý **Okazakiho fragment**. Iniciace replikace Okazakiho fragmentů zajišťuje **primozom** – komplex **DNA-primáza** a **DNA-helikáza**. Syntézu DNA zajišťuje **DNA polymeráza III**. **DNA topoizomerázy** zajišťují přechodové zlomy sloužící jako místa rozvíjení DNA bránící jejímu nežádoucímu propletení. Terminace replikace dochází v různých místech uvnitř oblastí terA a terB, ty brání pohybu replikačních vidlic. DNA topoizomerázy a rekombinantní enzymy usnadňují oddělení nových vláken DNA. Replizom *E. coli* obsahuje 13 proteinů.

Komplexní replikační aparát u eukaryot

Jak již bylo výše uvedeno, replikace DNA je komplexní proces, který vyžaduje koordinovanou činnost velkého počtu proteinů, zejména enzymů. Zúčastněné enzymy: DNA polymeráza – syntéza DNA, DNA ligáza – kovalentní spojení mezer, DNA primáza – syntéza RNA - primerů, DNA helikáza – katalýza rozplétání DNA, DNA topoizomeráza – katalýza přerušování molekul DNA (zlomy).

Replizom *E. coli* má 13 proteinů, zatímco replizom kvasinek a savců má celkem 27 složek. Rozplétání vlákna zajišťuje **DNA topoizomeráza** a **DNA helikáza**. Rozpletená vlákna udržuje v nataženém stavu protein, který váže ssDNA – replikační protein A (Rp-A). Jsou zde přítomny tři různé **polymerázy** – α, δ a ϵ . **Pol α** je nutná pro iniciaci replikace na počátku a pro syntézu primerů Okazakiho fragmentů, je v komplexu s **DNA-primázou**, primáza syntetizuje RNA primery, které **Pol α** prodlužuje přidáváním deoxyribonukleotidů za vzniku řetězce RNA-DNA o velikosti 30 nt. Primerové

řetězce RNA-DNA prodlužuje **Pol δ** nebo **Pol ε**. **Pol δ** katalyzuje většinu syntézy DNA, přičemž interaguje s proteinem **PCNA (proliferační antigen buněčného jádra)** a **replikačním faktorem C (Rf-C)**. PCNA funguje jako klouzavá svorka a váže polymerázu k DNA, protein Rf-C uchycuje PCNA k DNA. Pol δ a ε mají 3' → 5' exonukleázovou aktivitu nutnou pro korekční funkci. RNA primery se vyštěpují **ribonukleázou H1** – ta degraduje RNA v duplexech RNA-DNA a ribonukleázou FEN-1. Pol δ zaplňuje mezery a DNA-ligáza spojuje rozpojené řetězce za vzniku dceřiných kovalentně uzavřených vláken. U eukaryot existuje 13 různých DNA polymeráz, které mají specifické funkce.

Během replikace dochází k rozpadu nukleozómu a jeho rychlému sestavení. Tohoto procesu se účastní mnoho proteinů – zejména **Nap-1** protein pro sestavování nukleozómů a **CAF-1**, faktor pro sestavování chromatinu. Nap 1 přenáší histony z místa syntézy v cytoplazmě do jádra a CAF-1 je přenáší do míst na chromozómu, kde se sestavují nukleozómy. CAF1 přenáší histony do místa replikace tím, že se váže s PCNA (proliferační antigen buněčného jádra) – to je svorka udržující DNA polymerázu δ na templátu DNA.

Transkripce u prokaryot

Transkripce – první krok genové exprese – přenáší genetickou informaci uchovávanou v DNA (genech) do molekul mediátorové RNA, které nesou informaci k ribozomům, tj. místům syntézy proteinů v cytoplazmě. Základní rysy transkripce jsou stejné u eukaryot i prokaryot, liší se ovšem v detailech. Ta část, která se přepisuje do jedné molekuly RNA, se označuje jako transkripční jednotka. Proces transkripce lze rozdělit do tří stádií: **iniciace** nového řetězce RNA, **elongace** řetězce a **terminace** transkripce s uvolněním vzniklé molekuly RNA.

Iniciace řetězců RNA obnáší vazbu **holoenzymu RNA polymerázy** do promotorové oblasti DNA, lokální rozvinutí obou vláken RNA polymerázou, tvorba fosfodiesterových vazeb mezi několika prvními ribonukleotidy vznikajícího řetězce RNA. **Elongace** řetězců RNA je katalyzována **RNA polymerázou**, prodlužování řetězce probíhá v transkripční bublině. RNA polymeráza umí DNA rozvinout i svinout, oblast přechodového párování bází mezi rostoucí RNA a DNA je krátká 3 pb. Rychlost u *E. coli* je 40 ribonukleotidů za sekundu, délka transkripční bubliny 18 nt. **Terminace** řetězce RNA nastává, když RNA polymeráza zachytí terminační signál, transkripční komplex se rozpadá a uvolňuje vzniklou molekulu RNA. Primární transkript je modifikován několika způsoby: 1. k 5' konci je připojena methyl-guaninová čepička, 2. ke 3' konci je připojen poly(A) úsek, 3. vyštěpují se introny.

Transkripce se účastní **RNA polymerázy – I, II a III**, **RNA polymeráza I** je přítomna v jádru a produkuje rRNA mimo 5S rRNA, **RNA polymerázy II a III** jsou v jádře a **RNA polymeráza II** produkuje jaderné pre-mRNA, **RNA polymeráza III** produkuje tRNA, 5S rRNA a další malé jaderné RNA. *E. coli* má pouze jednu RNA polymerázu složenou z 5 polypeptidů, dva z nich jsou identické (α , β , β' , σ). Sigma faktor se účastní pouze iniciace a pak odpadá, jeho funkcí je rozeznat a navázat RNA-polymerázu k místům pro iniciaci transkripce nebo promotorům v DNA. Transkripce, translace a degradace molekul mRNA u prokaryot obvykle probíhá současně.

Transkripce u eukaryot

Probíhá u eukaryot v jádře. Eukaryotické RNA polymerázy nemohou iniciovat transkripci samotné, ale vyžadují součinnost s proteinovými transkripčními faktory. Transkripční faktory se váží

do promotorové oblasti DNA a vytváří příslušný iniciační komplex. **RNA polymerázy I, II a III** využívají různé promotory a transkripční faktory. Pomocí iniciace syntézy pre-mRNA RNA polymerázou II se přepisuje většina eukaryotických genů. Nejprve dochází k lokálnímu rozvinutí DNA, což vyžaduje interakci několika transkripčních faktorů se specifickými sekvencemi promotorů transkripčních jednotek. Promotory se skládají z krátkých konzervativních modulů, umístěných proti směru transkripce, konzervativní element nacházející se nejbližší k místu začátku transkripce se nazývá **TATA-box** a obsahuje konzervativní sekvenci 5'-TATAAAA-3' - ten je důležitý pro nastavení začátku transkripce. Druhý konzervativní element je **CAAT-box**, obsahuje konzervativní sekvenci GGCCAATCT. TATA box a CAAT-box jsou u většiny jaderných genů umístěny ve stejných pozicích. V promotorech RNA polymerázy II se mohou vyskytovat další dva konzervativní elementy: **CG-box** (konz. sekvence GGGCGG) a **oktamerový box** (konz. sekvence ATTTGCAT). Oba ovlivňují účinnosti iniciace transkripce.

Účinnost iniciace je ovlivněna transkripčními faktory a regulačními sekvencemi, které se nazývají **zesilovače (enhancers)** a **tlumiče (silencers)**. Základní transkripční faktory se nazývají **TFIIX (Transcription Factor for polymerase II)**, přičemž X je písmeno označující konkrétní faktor).

Iniciace transkripce

Navázání transkripčních faktorů probíhá přesně, musí interagovat s promotory ve správném pořadí: 1. vazba **TFIID**, který obsahuje TATA vazebný protein **TBP**. 2. **TFIIA** a po něm **TFIIB**. **TFIIF** se spojuje s RNA-polymerázou II a pak k transkripčnímu iniciačnímu komplexu. Podjednotka **TFIIF** umí rozvinout DNA – což je nutná podmínka iniciace transkripce. Následně se připojí **TFIIE**, váže se k DNA po směru transkripce, pak se připojí **TFIIH** a **TFIIV**. **TFIIH** má helikázovou aktivitu, odvíjí vlákna v místě transkripce. Iniciace transkripce RNA polymerázami I a II probíhá podobně jako u RNA polymerázy II, ale je jednodušší. Používá jiné promotory.

Elongace transkripce

Po uvolnění eukaryotické RNA polymerázy z iniciačního komplexu, začínají katalyzovat **elongaci** řetězce RNA, stejným způsobem jako u prokaryot. Na počátku elongace modifikují 5'- konce pre-mRNA přidáním **7-methylguanozinové čepičky (7-MG čepička)**, ty se připojí k řetězci RNA o velikosti 30 nt. 7-MG čepičky jsou rozeznány proteinovými faktory souvisejícími s iniciací translace a chrání rostoucí řetězec před degradací nukleázami.

Během elongace se nukleozómy částečně rozpadají na histonové hexazómy, tzn. odpadají dimery histonů H2A/H2B, když se RNA polymeráza II dostane za nukleozóm komplex **FACT** (proteinový komplex – facilitates chromatin transctiption) spolu s dalšími proteiny obnoví strukturu nukleozómu. Chromatin obsahující aktivní geny je méně kompaktní a obsahuje histony s mnoha acetylovanými skupinami, naopak chromatin neaktivní s inaktivními geny je více kompaktní a obsahuje histony s menším počtem acetylových skupin.

Terminace transkripce

3'-konce RNA-transkriptů syntetizovaných RNA polymerázou II vznikají endonukleázovým štěpením primárních transkriptů namísto terminace transkripce. Terminace transkripce nastává 1000 až 2000 nt po směru transkripce od místa, které se stane 3'- koncem zralého transkriptu, tzn. transkripce pokračuje za místo, které se stane koncem a distální část se odštěpí endonukleolytickým štěpením a to v místě 11 – 30 nt po směru transkripce od konzervativní sekvence AAUAAA a proti

směru transkripce od sekvence bohaté na GC umístěné blízko konce transkripční jednotky. Pak dochází k **polyadenylaci** pomocí enzymu **poly(A)-polymerázy** – tedy přidání úseku poly(A) o velikosti až 200 zbytků adenosinmonofosfátů. Připojení poly(A) k transkriptům je možné, pokud je přítomna specifická složka rozeznávající sekvenci AAUAAA a stimulační faktor, který se váže k sekvenci bohaté na GU. **Poly(A)-konce** stabilizují eukaryotické mRNA a hrají důležitou úlohu při transportu z jádra do cytoplazmy.

Editace RNA

Informační obsah některých eukaryotických transkriptů se mění **editací RNA**, která pozměňuje nukleotidové sekvence transkriptů před jejich translací. Normálně se genetická informace v RNA nemění, existují výjimky. Důvodem mohou být zajištění změn profilů genové exprese. Editace probíhá dvěma způsoby: změnou struktury jednotlivých bází (dojde k substituci jedné báze) nebo insercemi nebo delecemi zbytků uridinmonofosfátu (dojde k velkým změnám v polypeptidech určenými těmito mRNA).

Exony a introny

Většina, ale ne všechny eukaryotické geny jsou rozděleny na kódující a nekódující sekvence zvané **exony** a **introny**. **Exony** (exprimované sekvence) jsou většinou kódující oblasti. Zůstávají zachovány ve zralých molekulách RNA kódujících i nekódujících. **Introny** (intervenující sekvence) jsou nekódující sekvence. Vyštěpují se ze zralých molekul RNA. Introny přerušují většinu, ale ne všechny eukaryotické geny a jsou typické tím, že se v nich hromadí mutace mnohem rychleji než v exonech. Některé geny obsahují velmi velké introny, jiné geny velký počet malých intronů. Biologický význam intronů ovšem zůstává otevřenou otázkou. Pro správný sestřih pre-mRNA existují přesné sestřihové signály, sestřih musí být přesný a exonové sekvence se musí spojit s přesností jednoho nukleotidu pro správné přečtení kodonů během translace.

Konzervativní dinukleotidové sekvence na koncích intronů jsou: Exon-GT...intron...AG-exon. Odstranění intronových sekvencí probíhá sestřihem RNA třemi různými mechanismy: 1. **endonukleolytickým štěpením** následovaným DNA-ligací za přítomnosti speciální sestřihové endonukleázy a ligázy, 2. **autokatalytickou reakcí**, tu zajišťuje samotná molekula RNA, 3. introny transkriptů jaderných pre-mRNA (hnRNA) se sestřihují dvousupňovými reakcemi za pomoci **spliceozomů**.

Molekuly RNA

Existuje 5 typů RNA molekul: **Mediátorová RNA – mRNA**, molekuly RNA, které jsou překládány na ribozomech, intermediáty přenášející genetickou informaci z DNA do ribozomů, kde se syntetizují proteiny. **Transferová RNA- tRNA** představuje malé molekuly RNA, fungující během translace jako adaptéry mezi aminokyselinami a kodony (tRNA). **Ribozomová RNA- rRNA** představuje strukturní a katalytické složky ribozomů, tj. složitých molekulárních strojů převádějících nukleotidové sekvence mRNA do aminokyselinových sekvencí polypeptidů (rRNA). **Malá jaderná RNA – snRNA** představuje strukturní složky spliceozomů, tj. jaderných struktur, které vyštěpují introny jaderných genů. **Mikro RNA – miRNA** představuje krátké ssRNA molekuly o velikosti 10-22 nukleotidů, odštěpují se od malých prekurzorů tvaru vlásenek a blokují expresi komplementárních nebo částečně komplementárních mRNA, kdy zajistí jejich degradaci, nebo represí jejich translace.

Translace – syntéza proteinů

Genetická informace nesená sekvencemi nukleotidů v molekulách mRNA se **translací** přenáší do sekvencí aminokyselin v polypeptidových genových produktech pomocí složitých makromolekulárních zařízení zvaných ribozomy. Proces translace je komplikovaný a vyžaduje účast mnoha různých molekul RNA a proteinů. Translace se účastní 3 typy RNA, které vznikají transkripcí DNA. Chromozomová DNA se přepíše do prekurzoru rRNA, mRNA a tRNA pomocí enzymu RNA polymerázy. Prekurzor rRNA je upravován, takže vzniká 5S, 16S a 23S rRNA (podjednotky ribozómu) a spolu s ribozomovými proteiny tvoří volné ribozomové podjednotky (velká a malá). mRNA je po úpravách pre-mRNA translatována na ribozomech a vzniká polypeptidové vlákno. tRNA je upravena a je na ní navázána specifická AK pomocí souboru aktivujících enzymů zvaných **aminoacyl-tRNA-syntetázy**.

Translace probíhá na **ribozomech** – makromolekulárních systémech umístěných v cytoplazmě. Každý ribozom je složen z 3-5 molekul RNA (rRNA) a 40 – 60 malých molekul tRNA. Jsou tvořeny z ½ proteiny a z ½ RNA. Ribozomy se skládají ze dvou podjednotek, velké a malé, které se po dokončení translace od sebe oddělují a znovu se sestavují při iniciaci translace. Podjednotky obsahují velké složené molekuly RNA, ze kterých se sestavují ribozomové proteiny. Velikost ribozomů je vyjádřena ve **Svedbergových jednotkách** podle rychlosti, s jakou sedimentují při centrifugaci). Prokaryotický ribozom je velký 70S (20nm x 25 nm) a je složen z 30S malé ribozomové podjednotky obsahující molekulu 16S RNA a 21 různých polypeptidů, velká – 50S podjednotka je složená ze dvou molekul RNA – 5S a 23S a 31 polypeptidů. Eukaryotický ribozom je velký 80S, malá podjednotka 40S obsahuje molekulu 18S a 33 polypeptidů a velká podjednotka 60S tři molekuly RNA – 5S, 5.8S, 28S a 49 polypeptidů. U eukaryot probíhá syntéza rRNA v jadérku a je katalyzována RNA-polymerázou I.

Geny pro rRNA se vyskytují v mnohanásobných kopiích – jedná se o tzv. redundantní rRNA. Jadérko se nachází uvnitř jádra a je specializováno na syntézu molekul rRNA a jejich sestavování do ribozomů. Transkripce vznikají prekurzory větší než molekuly rRNA v ribozomech a procházejí posttranskripčními úpravami genového transkriptu a také podléhají posttranskripčním methyloacím – methyloace je chrání před degradací ribonukleázami. Geny pro 5.8S, 18S a 28S rRNA eukaryot jsou v chromozomech uspořádány v tandemových řadách v oblastech organizátoru jadérka (u člověka jsou na p ramenech chromozómů 13, 14, 15, 21 a 22, tzn. akrocentrických chromozómů). Geny pro 5S rRNA leží na několika chromozómech.

Ribozom má 3 specifická místa pro vazbu tRNA – **A** (aminoacylové) místo, **P** (peptidylové) místo a **E** místo exitu. Aminoacylové místo (A) váže přiváděnou aminoacyl-tRNA, peptidylové místo (P) váže tRNA, ke které je připojen rostoucí polypeptid a místo exitu E váže odcházející nenabitou tRNA.

Molekuly transferových RNA fungují jako adaptéry, které zprostředkovávají interakce mezi aminokyselinami a kodony v mRNA. Transferová RNA (tRNA) je tvořena malými adaptérovými molekulami (4S, dlouhé 70-95 nt), které obsahují tripletovou nukleotidovou sekvenci tzv. antikodon, pro každou aminokyselinu existují 1-4 tRNA molekuly. tRNA se aktivují (nabíjí) aminokyselinami ve dvoustupňovitém procesu katalyzovaném **aminoacyl-tRNA-syntetázou**. Karboxylová skupina aminokyseliny se naváže na 3' - hydroxylový konec tRNA velice reaktivní vazbou. Aminoacyl-tRNA jsou

substráty pro syntézu polypeptidů na ribozomech, každá aktivovaná tRNA rozeznává správný kodon mRNA a prezentuje aminokyseliny v takové sférické konfiguraci, která usnadňuje tvorbu peptidové vazby. tRNA vznikají transkripčními geny, původně jsou to větší prekurzorové molekuly, které procházejí posttranskripčními úpravami (štěpení, zkrácení, methylace). Zralé molekuly tRNA obsahují na rozdíl od prekurzorů nukleotidy typu **inozin**, **pseudouridin** apod. tRNA molekula je velice specifická, obsahuje antikodonovou sekvenci, je přesně rozeznatelná **aminoacyl-tRNA-synthetázami** a je schopná vázat se na příslušná místa ribozomů.

Translace nukleotidové sekvence v molekule mRNA do aminokyselinové sekvence polypeptidového produktu se může rozdělit do tří fází: iniciace, elongace a terminace polypeptidového řetězce. Proces translace se řídí pravidly genetického kódu.

Iniciace translace u prokaryot

1. **iniciace** polypeptidového řetězce – děj, který předchází tvorbě peptidové vazby mezi prvními dvěma aminokyselinami nového polypeptidového řetězce. U *E. coli* se procesu iniciace účastní 30S podjednotka ribozomu, speciální iniciační tRNA, molekula mRNA, tři iniciační faktory **IF-1**, **IF-2** a **IF-3** a jedna molekula **GTP**. Translace probíhá na ribozomech 70S, ty se po každém dokončení syntézy polypeptidového řetězce rozpadají na malou a velkou podjednotku (30S a 50S). Syntézu polypeptidu zahajuje vždy **tRNA^{Met}**, která má aminoskupinu blokovanou formylovou skupinou (index f)– jako odpověď na iniciační translační kodon **AUG** (někdy **GUG**). Syntéza všech polypeptidů začíná methioninem, ten se může následně odštěpit (tzn. funkční proteiny nemusí mít na aminokonci Methionin). Iniciace začíná tvorbou dvou komplexů – 1. obsahuje IF-2 a metionyl- tRNA^{Met}, 2. obsahuje molekuly mRNA, podjednotku ribozomu 30S a IF-3. Bez IF-3 se komplex 30S podjednotky a mRNA nevytvoří, tento komplex závisí na párování bází mezi nt sekvencí v blízkosti 3'- konce 16S rRNA a sekvencí v blízkosti 5'- konce molekuly mRNA. U prokaryot se jedná o konzervativní purinovou oblast **AGGAGG** tzv. **Shinenovu-Dalgarnovu** sekvenci umístěnou 7 nt proti směru transkripce od AUG iniciačního kodonu. Pokud se tato sekvence pozmění, nedojde k translaci, nebo slabé translaci. Oba vzniklé komplexy se spojují.

Posledním krokem je iniciace translace je připojení podjednotky 50S k iniciačnímu komplexu 30S za vzniku úplného ribozomu 70S. Před tím dochází k uvolnění IF-3 a připojení vyžaduje energii GTP a uvolnění IF-1 a IF-2. Iniciační tRNA s methioninem je po připojení 50S navázáno do P-místa ribozomu, tato tRNA je jedinou tRNA, která se váže přímo na P místo a nemusí se nejprve vázat do A místa ribozomu. Iniciační kodon je umístěn v P místě a druhý kodon mRNA v místě A, může dojít k elongaci.

Iniciace translace u eukaryot

Iniciace je složitější než u prokaryot, ale celý proces probíhá podobně s výjimkou dvou aspektů. 1. aminoskupina methioninu iniciační tRNA eukaryot není lokována formylovou skupinou jako u prokaryot. 2. iniciační komplex se tvoří na 5' konci mRNA, ne v místě určeném **Shinenovou-Dalgarnovu sekvencí** a AUG jako u *E. coli*. Iniciační komplex u eukaryot prohlíží mRNA od 5'- konce a hledá kodon AUG pro iniciaci translace. Proto translace začíná často kodonem AUG umístěným nejbližší 5'- konci molekuly mRNA. Vliv na iniciaci translace má také optimální iniciační sekvence 5'-GCC(A nebo G)CCAUGG-3', nejdůležitější je purin A nebo G umístěný 3 báze proti směru translace od iniciačního kodonu a G, který za ním bezprostředně následuje. Ty ovlivňují účinnost translace více než

10-tinásobně. Jiné změny v této sekvenci snižují účinnost translace v menší míře. Jedná se o tzv. **pravidla Kozakové**. Iniciační tRNA je opět tRNA^{Met} (i znamená iniciační). 7-methylganozinová čepička na 5' - konci mRNA váže protein CBP (cap-binding protein), ke komplexu CBP-mRNA se váží iniciační faktory následované malou podjednotkou ribozomu 40S. Celý iniciační komplex se pohybuje ve směru 5' → 3' konci po molekule mRNA a hledá kodon AUG, pokud ho najde, iniciační faktory odpadají a ke komplexu se váže velká podjednotka ribozomu 60S, vzniká úplný ribozom 80S. Komplex 80S/mRNA/tRNA je připraven pro elongaci řetězce.

Elongace translace

Elongace translace probíhá stejně u prokaryot i eukaryot. Přidání aminokyseliny do rostoucího polypeptidu vyžaduje tři kroky: 1. vazbu aminoacyl-tRNA do místa A ribozomu, 2. přenos rostoucího polypeptidového řetězce z tRNA v místě **P** na tRNA v místě **A** tvorbou peptidové vazby a 3. translokaci ribozomu po mRNA, aby se v místě **A** objevil další kodon.

Během kroku 3 se vznikající polypeptid navázaný na tRNA translokuje z místa **P** do místa **E**, tyto tři kroky se během elongace cyklicky opakují. Elongační faktor **Tu** nesoucí molekulu GTP (**EF-Tu GTP**) je nezbytný pro párování tří nukleotidů antikodonu vstupující aminoacyl-tRNA a kodonu mRNA přítomnými v místě A. GTP se štěpí po vytvoření peptidové vazby a EF-Tu GDP se z ribozomu uvolní, je ale inaktivní. Elongační faktor **Ts** (**EF-Ts**) umožní přechod **EF-Tu GDP** do aktivní formy **EF-Tu GTP**, EF-Tu interaguje se všemi aminoacyl-tRNA mimo methionyl-tRNA. Enzym **peptidyltransferáza**, jehož aktivita je spojena s podjednotkou 50S, katalyzuje odstranění spojení mezi rostoucím polypeptidem a tRNA v místě P a řetězec se kovalentně váže k tRNA v místě A. Jeho aktivita je soustředěna do 23S rRNA. Tvorba peptidové vazby vyžaduje hydrolýzu GTP (přichází od EF Tu-GTP) během 1. fáze. **Elongační faktor G (EF-G)** – působí ve třetí fázi elongace – během posunu o tři nukleotidy směrem ke 3' konci mRNA dojde k translokaci peptidyl-tRNA z místa A do místa P a nenabitá tRNA se translokuje z místa P do místa E. Ribozom přitom prochází konformačními změnami a může se pohybovat po molekule mRNA, energie vzniká hydrolýzou GTP. Po translokaci zůstává místo A prázdné a může dojít k dalšímu cyklu elongace. Elongace je rychlý proces, syntéza polypeptidu obsahujícího 300 aminokyselin trvá 15 sekund.

Terminace translace

Elongace polypeptidového řetězce přechází v **terminaci**, jakmile do místa A vstoupí **terminační kodon (stop kodon)** – UAA, UAG nebo UGA. Terminační kodony jsou rozeznány **uvolňovacími faktory (RF)**, u *E. coli* se jedná o **RF-1** (rozezná UAA a UAG) a **RF-2** (rozezná UAA a UGA). U eukaryot rozezná všechny tři terminační kodony jediný uvolňovací faktor **eRF**. Přítomnost uvolňovacího faktoru v místě A mění aktivitu peptidyltransferázy a připojuje ke karboxylovému konci vznikajícího polypeptidu molekulu vody. Touto reakcí se polypeptid uvolňuje z molekuly tRNA v místě **P** a indukuje translokaci volné tRNA do místa **E**. Terminace končí uvolněním molekuly mRNA z ribozomu a rozpadem ribozomu na podjednotky, které jsou pak připraveny pro iniciaci dalšího kola proteosyntézy.

Doporučená literatura: SNUSTAD D.P. AND SIMMONS M.J.: Genetika. Přeloženo za ang. originálu Snustad DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 3.th ed. New York: John Wiley & Sons; 2003. Copyright Czech Edition © 2009, Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2/Kapitola 9, 10, 11, 12

Otázky:

Jaké funkce musí splňovat genetický materiál?

Jak vypadá komplexní replikační aparát u eukaryot?

Co znamená pojem editace DNA?

6. PŘEDNÁŠKA

Rozmnožování buněk

Buňky, které představují jednotky všech živých organismů, jsou na povrchu obklopeny plazmatickou membránou. Chromozómy, což jsou buněčné struktury nesoucí geny, se skládají z DNA a proteinů; během transkripce obsahují i RNA. V eukaryotických buňkách se chromozomy nacházejí uvnitř jádra ohraničeného membránou, v prokaryotických buňkách se jádro nevyskytuje. Eukaryotické buňky obsahují složitý systém vnitřních membrán tvořících organely, např. mitochondrie, chloroplasty nebo endoplazmatické retikulum. **Haploidní** eukaryotické buňky obsahují pouze jednu kopii každého chromozómu, **diploidní** obsahují dvě kopie.

Postupným dělením původní buňky vzniká klon, kdy buňky jednoho klonu jsou identické. Mateřská buňka se dělí za vzniku dvou dceřiných buněk. U prokaryot mluvíme o příčném dělení, obsah mateřské buňky je více méně rovnoměrně rozdělen do dceřiných buněk. Chromozóm je zdvojen a předán do dceřiných buněk v jedné kopii. Dělení probíhá každých 20-30 min. (př. *E. coli* za 24 hodin vyprodukuje 250 buněk). Pokud dojde k nahromadění velkého počtu buněk, rychlost dělení se snižuje (omezené živiny, hromadění odpadních látek). Za jeden den vzniká masa buněk, která se nazývá **kolonie**. U eukaryot představuje buněčné dělení složitější proces, je zde více chromozómů, pro které musí být zajištěno přesné rozdělení do dceřiných buněk, ovšem distribuce organel do dceřiných buněk není úplně rovnoměrná. Mitochondrie a chloroplasty se rozdělují náhodně. Endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát se rozpadají na fragmenty, které jsou v dceřiných buňkách obnoveny.

Buněčný cyklus má čtyři fáze nazývané **G1 – S – G2 – M fáze**. V S fázi probíhá syntéza DNA a duplikace chromozómů. M-fáze je fáze dělení, složená z mitózy a cytokineze. Mitóza je fáze rozdělení chromozómů, cytokineze je fáze fyzického oddělení buněk.

G1 a G2 fáze představují pauzy mezi fázemi S a M (z angl. gaps). Délka buněčného cyklu se pohybuje od 30 minut (v embryích) po několik měsíců. Např. buňky nervových tkání a svalových vláken se přestávají dělit pokud dosáhnou svých specializovaných funkcí. Proces buněčného dělení je kontrolován a jeho deregulace může vést ke vzniku nádorů.

Jeden chromozóm = jedna dvouřetězcová molekula DNA a proteiny. Prokaryotické buňky obsahují normálně 1 chromozóm nebo několik menších molekul DNA – plazmidů – (kružnicovité molekuly DNA), to je stejné jako u mitochondrií a chloroplastů eukaryot. Molekuly DNA v eukaryotických buňkách jsou naopak lineární. Somatické buňky jsou diploidní, pohlavní buňky jsou haploidní gamety, ty vznikají ze zárodečné linie (rozmnožovací tkáň organismu). U rostlin se vyskytují oba typy gamet (spermatické i vaječné buňky) současně. Eukaryotické chromozómy jsou viditelné ve

světelném mikroskopu (zvětšení 20x, 500x), prokaryotické jsou viditelné pouze v elektronovém mikroskopu.

Chromozóm je ve fázi dělení složený ze dvou identických tyčinek spojených centromerou tzv. **chromatid**, které jsou tvořeny chromatinem. Chromatin je složen z DNA a proteinů. Jedná se o dva typy proteinů – **bazické histony** (kladně nabitě; H1, H2A, H2B, H3 a H4), heterogenní kyselé proteiny – **nehistonové chromozómové proteiny** – záporně nabitě. Ve spermích se místo histonů nacházejí protaminy. Eukaryotický chromozóm má velikost 1 - 20 cm DNA.

Během buněčného dělení dochází ke kondenzaci nebo sbalování molekul DNA. Toto sbalování DNA v chromozómech probíhá na třech úrovních – vznikají **nukleozómy** – podjednotky chromatinu, chromatin a chromatinová vlákna. V první úrovni dochází ke **kondenzaci** negativní nadšroubovice do nukleozómů a vytvoření interfázního chromatinového vlákna o průměru 11 nm. Účastní se histony H2A, H2B, H3 a H4. Druhá úroveň kondenzace – další sbalování – představuje proces **superspiralizace** a vznik 30 nm chromatinového vlákna. Účastní se histon H1. Třetí úroveň kondenzace probíhá za pomoci nehistonových proteinů, které tvoří lešení, vznikají pevně sbalené metafázní chromozómy.

Zvláštní strukturu na chromozómu mají **centromery** a **telomery**, které představují oblasti vysoce repetitivní DNA. Centromery různých chromozómů daného druhu jsou si strukturně velice podobné. Při přechodu z metafáze do anafáze vznikají dvě funkční centromery. **Acentrické** fragmenty chromozómů se v průběhu dělení ztrácejí. Centromery u kvasinek jsou složeny z **CEN** oblastí a ty jsou vzájemně zaměnitelné. U eukaryot jsou složitější, např. u člověka obsahuje každá centromera 5 000 – 15 000 kopií sekvence o délce 171 bp, ta se nazývá **alfa satelitní sekvence**. **Telomery** – konce eukaryotických buněk, přinášejí stabilitu chromozómům, mezi jejich funkce patří obrana před deoxyribonukleázami, aby odbourávali konce lineárních molekul DNA, bránit fúzím konců s jinými molekulami DNA a umožnit replikaci konců lineárních molekul DNA beze ztráty materiálu. U eukaryot jsou tvořeny krátkými sekvencemi – **tandemovými repeticemi** – TTAGGG je opakující se jednotka. Mírně se liší u různých druhů organismů, ale v rámci druhu jsou vysoce konzervovány. V normálních somatických buňkách je 500 až 3 000 těchto repeticí a ty se postupně zkracují s věkem, odrážejí tedy stáří buňky. V zárodečných a nádorových buňkách se telomery nezkracují.

Mitóza

Mitóza je dělení eukaryotické buňky za vzniku dvou identických dceřiných buněk. Rovnoměrné rozdělení každého duplikovaného chromozómu do dceřiných buněk je podstatou mitózy, přičemž duplikace chromozómů probíhá v S-fázi buněčného cyklu. V průběhu mitózy se chromozómy zkracují a zesilují – kondenzují se, jsou rozeznatelné. Na konci mitózy se **dekondenzují** a obnovuje se původní chromatin. **Interfáze** je období mezi děleními, fáze buněčného cyklu mimo mitózu, v této fázi chromozómy nejsou rozeznatelné. Duplikáty chromozómů se nazývají **sesterské chromatidy** a jsou těsně přiloženy k sobě a spojeny v oblasti centromery. Rozdělení genetického materiálu do dceřiných buněk zajišťují **mikrotubuly**, komponenty cytoskeletu. Mikrotubuly jsou dutá vlákna tvořená tubulinem, umí se napojit na chromozómy a pohybují s nimi uvnitř buňky, v průběhu M fáze tvoří uskupení zvané **vřeténko**. **MTOC – mikrotubuly organizujícího centra** – se podílí na tvorbě vřeténka a vyskytují se v cytoplazmě eukaryotických buněk v blízkosti jádra. U živočichů jsou MTOC tvořena centrozomy. **Centrozom** obsahuje dvě válcovité **centrioly**, ty se orientují kolmo k sobě a jsou obklopeny difúzní hmotou zvanou **pericentriolární oblast**. Tato oblast pak iniciuje formování mikrotubulů a vznik mitotického vřeténka. Centrozomy se duplikují během interfáze. Ve fázi vstupu

do M se formuje **aster** – růžicovitý útvar tvořený z centrozomů a mikrotubulů. Centrozomy putují kolem jádra a zaujímají protilehlé pozice, určují póly dělicí se mateřské buňky a takto vzniká podélná osa pro nadcházející buněčné dělení tzv. **ekvatoriální rovina**.

Jakmile buňka vstoupí do mitózy, její duplikované chromozómy se kondenzují do podoby tyčinkovitých útvarů (**profáze**). V průběhu mitózy se chromozómy přesouvají do ekvatoriální roviny buňky (**metafáze**). Později během mitózy dochází k rozdělení centromer, které původně držely pohromadě sesterské chromatidy duplikovaných chromozómů, sesterské chromatidy se oddělí jedna od druhé (**anafáze**). V závěru mitózy se chromozómy dekondenzují a obnovuje se kolem nich jaderný obal (**telofáze**). Každá z obou dceřiných buněk vzniklých procesem mitózy a **cytokineze** obsahuje tutéž sadu chromozómů, dceřiné buňky jsou tedy geneticky identické. Celý proces mitózy probíhá v těchto fázích – profáze, metafáze, anafáze, telofáze s cytokinezí:

Profáze – zahájení tvorby vřeténka a kondenzace duplikovaných chromozómů. Rozpad buněčných organel (endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát), není vidět jádrko. Mitochondrie a chloroplasty jsou neporušeny. Fragmentace ER je spojená s rozpadem jaderného obalu na množství malých měchýřků a mikrotubuly vnikají do prostoru jádra. Některé se napojují na **kinetochory**. **Kinetochor** je proteinová struktura spojená s centromerami duplikovaných chromozómů. Připojení vřeténka ke kinetochorům znamená vstup buňky do metafáze.

Metafáze - chromozómy se přesouvají doprostřed buňky, do polohy uprostřed mezi póly vřeténka. Délka mikrotubulů se mění (motorové proteiny), nenapojené mikrotubuly na chromozómy stabilizují strukturu a tvar vřeténka. Chromozómy se shromáždí v **ekvatoriální rovině** (jiný název – metafázní destička) uprostřed buňky. Každá ze sesterských chromatid je připojena k opačnému pólu pomocí mikrotubulů navázaných na její **kinetochor**. Jedná se o polární orientaci zajišťující přesné a rovnoměrné distribuce genetického materiálu do dceřiných buněk.

Anafáze – sesterské chromatidy se rozcházejí, oddělují díky zkracování kinetochorových mikrotubulů a degradaci proteinů v místě centromery. Sesterské chromatidy jsou taženy k opačným pólům buňky a oddělené sesterské chromatidy se nazývají chromozómy. Jakmile jsou chromozómy přesunuty k pólům, póly se vzdalují a dvě sady chromozómů jsou rozděleny do různých částí dělicí se buňky.

Telofáze - dochází k dekondenzaci chromozómů do podoby chromatinových vláken, a znovu se formují i organely, každá sada chromozómů se obalí jadernou membránou.

Cytokineze - nakonec se dceřiné buňky oddělí separací plazmatické membrány, u rostlin vzniká rovnoběžná buněčná stěna.

Meióza

Součástí pohlavního rozmnožování je mechanismus, pomocí něhož se počet chromozómů v buňce snižuje na polovinu (počet chromozómů v gametě je n /haploidní, počet chromozómů v zygotě je $2n$ /diploidní). Vzniklé haploidní buňky jsou přímo gametami nebo se dále dělí a gamety vznikají později. Meióza je klíčová pro rozmnožování eukaryot.

Chromozómy vytvářejí v buňce dvojice tzv. homologní páry, které se od sebe odlišují a nesou rozdílnou sadu genů (jeden od otce, druhý od matky). Chromozómy v jednom páru se nazývají

homologní, homology. Chromozómy z různých párů jsou vůči sobě **heterologní, heterology.** V průběhu meiózy jsou homology těsně spojeny.

Proces meiózy zahrnuje dvě buněčná dělení: předchází duplikace chromozómů v S-fázi buněčného cyklu (4c), pak nastává I. Meiotické dělení (2c) a II. Meiotické dělení (1c), kdy c je obsah DNA v buňce.

Meióza I je složitější než **meióza II** a také časově delší. Chromozómy jsou již duplikovány v S-fázi a každý je tvořen dvěma sesterskými chromatidami. Meióza I. se skládá z těchto fází: profáze I. (zahrnuje 5 stádií: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene, diakineze), metafáze I. (putování chromozómů k opačným pólům dělicího vřeténka), anafáze I. (definitivní oddělení chromozómů, chromozómová disjunkce), telofáze I. (rozpad dělicího vřeténka a rozdělení dceřiných buněk plazmatickými membránami, dekondezace chromozómů).

Meióza I

Podrobný popis **profáze I:**

Leptotene – „tenká vlákna“, kondenzace duplikovaných chromozómů.

Zygotene – „spojená vlákna“, těsné spojení homologních chromozómů, vzniká tzv. synapse – proteinová struktura mezi chromozómy – tzv. synaptonemální komplex – 3 tyčinkovité útvary – dva laterální elementy spojené s chromozómy, uprostřed je centrální element, nevyskytuje se ovšem u všech buněk.

Pachytene – „silná vlákna“ – zesílení chromozómů díky kondenzaci do stále menšího objemu. Chromozómy jsou spárované – jsou pozorovatelné světelným mikroskopem. Každý pár je tvořen dvěma duplikovanými chromozómy a čtyřmi sesterskými chromatidami, nazývají se bivalenty (dva chromozómy) nebo tetrády (4 chromatidy). Dochází ke crossing-overu.

Diplotene – „dvě vlákna“ – oddělování spárovaných chromozómů, ale jsou stále v kontaktu v místě překřížení – v chiazmatech (chiazma = kříž). Stádium může trvat dlouho (u žen i více než 40 let).

Diakineze - „pohyb skrz“ – chromozómy se kondenzují, jaderná membrána se rozpadá a tvoří se dělicí vřeténko, mikrotubuly vřeténka pronikají do jádra a připojují se na kinetochory chromozómů, chromozómy se pohybují k ekvatoriální rovině (je kolmá na osu dělicího vřeténka).

Po profázi I následuje metafáze I, anafáze I, telofáze I.

Metafáze I – putování chromozómů k opačným pólům dělicího vřeténka. Chiazmata se posouvají směrem od centromery ke koncům chromozómů – jedná se o terminalizaci chiazmat, mezi chromozómy roste napětí.

Anafáze I – definitivní oddělení chromozómů, chromozómová disjunkce, je podmíněna zkracováním mikrotubulů dělicího vřeténka, rozdělené chromozómy se shromáždí u opačných pólů a první meiotické dělení končí.

Telofáze I – rozpad dělicího vřeténka a rozdělení dceřiných buněk plazmatickými membránami, dekondezace chromozómů a obnovení jaderného obalu. U některých druhů není

dekondenzace chromozómů úplná, nevytvoří se nová jádra a dceřiné buňky vstupují rovnou do druhého meiotického dělení.

Po prvním meiotickém dělení buňky obsahují haploidní počet chromozómů, ale každý je tvořen ze dvou sesterských chromatid, které nemusí být geneticky identické v důsledku rekombinačních procesů s homologním partnerem během profáze I.

Meióza II

Meióza II je složena z těchto fází:

Profáze II - chromozómy se opět kondenzují a připojují k novému dělicímu se vřeténku.

Metafáze II – chromozómy se přesouvají do ekvatoriální roviny a jejich centromery se oddělují.

Anafáze II – chromatidy se rozdělí a putují k opačným pólům buňky.

Telofáze II – oddělené chromatidy (chromozómy) se shromažďují u pólů a obnoví se jaderné obaly – vznikají nová dceřiná jádra, každé obsahuje haploidní počet chromozómů.

Cytokineze – haploidní dceřiné buňky jsou odděleny svými plazmatickými membránami.

Variabilita pohlavních buněk

V meióze I se od sebe oddělují celé homologní chromozómy, jeden pochází od otce a druhý od matky, při seřazování v ekvatoriální rovině se homology náhodně orientují vzhledem k pólům vřeténka a pak se oddělují. Každý chromozómový pár se odděluje nezávisle na ostatních párech – pokud máme 23 párů chromozómů, vzniká 223 možností dceřiných buněk (více než 8 000 000 kombinací). Dalším zdrojem rekombinace je crossing-over a jeho další možné kombinace.

Různé osudy gamet

U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se produkty meiózy se dále mitoticky dělí a vzniká populace haploidních buněk. Houba – plíseň *Neurospora crassa* – zde dalším mitotickým dělením vznikají vlákna – hyfy, tvořící tělo houby. Za vhodných podmínek tvoří pohlavní buňky – gamety. Spojením gamet vzniká diploidní zygota, která vstupuje do meiózy. Tyto organismy se vyskytují převážně jako haploidní. Nejedná se o klasické samčí a samičí pohlaví, ale o párovací typy – u kvasinek je to **a** a **alfa** a u Neurospory **A** a **a**, k oplození dochází spojením pohlavních buněk opačných párovacích typů.

Nižší rostliny – mechy – haploidní buňky se mitoticky dělí a tvoří rozvětvená vlákna, která mohou diferencovat do pletiv a orgánů, stonků, listů. Jedná se o haploidní rostliny, jako dospělé tvoří gamety – vaječné nebo spermatické buňky – nazývají se gametofyty. Po oplození vzniká diploidní zygota, mitoticky se dělí a vytváří sporofyt.

Vyšší rostliny, zde převládá sporofyt, gametofyt je z několika buněk. Meióza probíhá v odlišných samčích a samičích pletivech ve sporofytu vyšších rostlin. Jedna ze čtyř haploidních buněk se vyvíjí do gametofytu tzv. megaspora, čtyři haploidní buňky se samčí meiózy se nazývají mikrospory a vyvíjí se také do gametofytu. Střídání haploidní a diploidních organismů v životním cyklu se nazývá střídání generací.

Živočichové – haploidní produkty meiózy se vyvíjejí do gamet. Samičí meióza produkuje pouze jedno vajíčko – ovum. Zbývající tři buňky jsou póloocyty a degenerují. Všechny čtyři haploidní buňky vzniklé samčí meiózou se vyvíjejí ve spermie. Proces vytváření gamet – gametogeneze – probíhá v gonádách. Oogeneze ve vaječnících a spermatogeneze ve varlatech. Na počátku je nediferencovaná buňka oogonium nebo spermatogonium, které vstupuje do meiózy a tvoří haploidní buňky.

Modelové organismy

Modelové organismy mají tyto vlastnosti: snadná kultivace v laboratoři, krátký životní cyklus, vykazují genetickou variabilitu. Příklady modelových organismů: *Escherichia coli* – bakterie, *Saccharomyces cerevisiae* – pekařská kvasinka, *Drosophila melanogaster* – octomilka, bezobratlí, *Caenorhabditis elegans* – hlístice, bezobratlí, *Mus musculus* – myš, obratlovci, *Arabidopsis thaliana* – huseníček rolní, rostlina.

Bakterie *Escherichia coli*

Jedná se o tyčinkovitou bakterii, používanou pro mikrobiální genetiku. Přirozeně se vyskytuje ve střevě různých živočichů. Lze ji jednoduše kultivovat na živném médiu v laboratoři, přístupná pro biochemické analýzy a snadno se u ní izolují mutantní kmeny lišící se v růstových parametrech. Tvoří desítky miliard kopií během krátkého časového intervalu. Velikost genomu je 4.6×10^6 bp, který je tvořen jedním kružnicovitým chromozómem o délce 1,4 mm. Kompletní sekvence genomu byla získána v r. 1997, obsahuje 4288 genů kódujících proteiny. Po sekvenaci dalších genomů byly zjištěny rozdíly v obsahu DNA i počtu genů – existují tedy různé kmeny této bakterie. Na tomto modelovém organismu byly objasněny mechanismy replikace, transkripce, translace.

Pekařská kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*

Jednobuněčná houba, snadno se kultivuje na jednoduchém médiu, z jedné mateřské buňky je možné v několika dnech získat obrovský počet dalších buněk. Snadno lze izolovat mutantní kmeny, lišící se v růstových vlastnostech. Jedná se o eukaryotický organismus. Genom má 16 chromozómů v buněčném jádře, složených z DNA a proteinů, obsahuje mitochondrie a je tvořen 12×10^6 bp, obsahuje celkem 6268 genů. Její sekvence byla popsána v roce 1996, jednalo se o první analyzovaný eukaryotický genom. *S. cerevisiae* umí tvořit také dlouhá vlákna. Rozmnožuje se pohlavně i nepohlavně pučením (mitotické dělení haploidního jádra). Jedno ze vzniklých jader se přesune do pupenu, který se oddělí cytokinezí. Pohlavní rozmnožování je uskutečněno, pokud se přiblíží haploidní buňky obou párovacích typů (a a alfa), dojde k párování a vzniká diploidní buňka, která vstupuje do meiózy. Výsledkem jsou čtyři haploidní askospory ve váčku zvaném askus.

Drosophila melanogaster

Octomilka se začíná od roku 1990 využívat pro genetické experimenty. Snadno se chová v laboratoři, má krátký životní cyklus (10 dnů při teplotě 25 °C) a dostatečný počet potomstva. Dospělá je velká 2 mm, má složitý nervový systém a řadu specializovaných tkání a orgánů, tři páry nohou a pouze jeden pár křídel a haltery (malé přívěsky). Na povrchu těla jsou senzorké chloupky a štětiny, ty jsou spojené s nervovým systémem. Oči a tykadla jsou umístěny na hlavě, rozmnožovací ústrojí na spodní straně zadečku. Samička může vytvořit stovky vajíček. Po oplození vzniká embryo a po jeho vylíhnutí vzniká larva. Ta se několikrát svléká a zvětšuje (larvální stádium mezi svlékáním je instar),

třetí instar se nazývá imago a je poslední před metamorfózou do dospělého jedince. Skupiny buněk – imaginární disky – rostou a diferencují se do struktur dospělého (oči, křídla, nohy), za 4 dny vylézá dospělá drozofila z kukly. Mutantní kmeny jsou typické neobvyklým tvarem očí, barvou těla, abnormální anatomii (haltery změněny na křídla apod.). Její anatomická složitost umožňuje studium formování částí těla a jeho genetické řízení. Velikost genomu je 170×10^6 bp, jedná se o 3 autozomy a jeden pár pohlavních chromozómů a celkem 13 792 genů.

Caenorhabditis elegans

Háďátka obecná je nepatogenní půdní červ volně žijící v půdě. Dospělý je dlouhý 1 mm, rychle a efektivně se množí, snadno se kultivuje na agarových plotnách, naočkovaných *E. coli* (potrava). Životní cyklus se skládá z těchto fází: vajíčko – larvální stádium – dospělec – a trvá 3 dny. Jedná se o hermafrodita, jedinec tvoří i spermie i vajíčka současně, které se mohou navzájem oplodnit. Existují i jedinci se striktně samčím pohlavím. Hlístice je průhledná, je možné pozorovat dělení buněk a změnu jejich polohy po oplození vajíčka a sledovat utváření tkání a orgánů během celého vývoje. Velikost genomu je 100×10^6 bp a skládá se z 20 516 genů.

Mus musculus

Myš se využívá zejména pro biomedicínský výzkum účinnosti léků, působení chemikálií, vlivu potravy apod. Genetika myši začíná počátkem 20. století a zpočátku je zaměřena na dědičnost barvy srsti. Probíhá intenzivní příbuzenské křížení a vznikají speciální kmeny myší – geneticky uniformní. Statisíce mutantních kmenů pomáhají identifikovat geny a mapovat chromozómy. Genomy myši a člověka jsou porovnávány a zjišťuje se tak funkční důležitost konkrétních sekvencí. Genom o velikosti 2.9×10^9 bp zahrnuje 25 396 genů.

Danio rerio

Malá sladkovodní ryбка. Studována od 60.-70. let 20. století (George Streisinger). Snadný chov, generace se střídají po 5 -6 měsících. Průhledná vajíčka, oplození probíhá mimo organismus. Genom o velikosti 1.6×10^9 bp s 23 524 geny.

Arabidopsis thaliana

Huseníček rolní, brukvovitý. Malá rostlina s krátkou generační dobou (5 týdnů). Samosprašná, křížením variet se získávají hybridy. Genom má velikost 157×10^6 bp, je tvořen 5 chromozómy a 27 706 geny. Stejně geny jsou i u dalších zemědělsky významných plodin. Experimenty s touto rostlinkou přinášejí informace o vývoji rostlin, jejich odolnosti vůči chorobám, fotosyntéze, toleranci k chladu apod.

Kmenové buňky

Kmenové buňky se nacházejí v různých tkáních a orgánech lidského těla. Mají dvě velmi mimořádné vlastnosti: schopnost sebeobnovy, schopnost diferenciaci - tj. změny v takový buněčný typ, který je v daném místě potřeba.

Doporučená literatura: SNUSTAD D.P. AND SIMMONS M.J.: Genetika. Přeloženo za ang. originálu Snustad DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 3.th ed. New York: John Wiley & Sons; 2003. Copyright Czech Edition © 2009, Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2/Kapitola 2

Otázky:

Ze kterých fází se skládá buněčný cyklus a co se v jednotlivých fázích děje?

Jaký je rozdíl mezi mitózou a meiózou?

Kdy dochází během buněčného dělení ke crossing-overu?

7. PŘEDNÁŠKA

Mutace

Mutace jsou dědičné změny genetického materiálu poskytující nové genetické varianty, které umožňují evoluci organismů. To ovšem neplatí ve všech případech. Mutaci můžeme obecně definovat jako 1. změnu genetického materiálu; 2. proces, během kterého tato změna vzniká. Mutant – je pak organismus, který má v důsledku mutace změněný genotyp. Mutace vznikají de novo nebo jsou výsledkem rekombinačních procesů vytvářejících nové genetické kombinace již dříve existujících genetických variant. Mutacemi ne vždy vznikají nové fenotypy a to ve velmi nízkých četnostech. Mutační změny probíhají na různých úrovních, zahrnují změny struktury nebo počtu chromozómů, nebo změny na úrovni jednotlivých genů. Mutace na úrovni párů bází se nazývají bodové mutace (záměna báze, inserce, delece). Mutace bývají hlavním zdrojem genetické variability a poskytují prvotní materiál pro evoluci. Bez mutací by geny existovali v jedné formě (nebyly by alely) a možná genetická analýza by byla zbytečná. Populace by nebyly schopny evoluce a adaptace na změny životního prostředí.

Dělení mutací

Mutace můžeme rozdělit na základě různých kritérií. Např. podle jejich výskytu, pokud se vyskytují u všech organismů, vznikají spontánně, nebo jsou indukované mutagenními látkami a pak se vyskytují pouze u organismů vystaveným danému mutagenu. Jsou tedy rozdělovány na **spontánní** a **indukované**. Obvykle se jedná o náhodný neadaptivní proces.

Spontánní mutace vznikají bez zjevné vnější příčiny. Vznikají v důsledku metabolických poruch v organismu nebo jsou vyvolány neznámou látkou přítomnou v prostředí. Vyskytují se sporadicky. U eukaryot je rychlost vzniku spontánní mutace $10^{-7} - 10^{-9}$ na nukleotidový pár na generaci. Pokud je průměrná délka kódujícího genu 1000 bp, pak je rychlost $10^{-4} - 10^{-7}$ na generaci. **Indukované mutace** vznikají po působení fyzikálních nebo chemických látek s mutagenním účinkem, tj. navozujícím změny v DNA (popř. RNA u některých virů). Tyto látky se nazývají mutageny. Působení mutagenů zvyšuje rychlost vzniku mutací o celé řády. Silný mutagen může zvýšit četnost mutací na gen o více než 1%.

Mezi mutageny patří mutageny **fyzikální**, jedná se různé formy záření (neionizující UV záření, ionizující záření - paprsky X, záření gama a kosmické záření). Dále mutageny **chemické**, ty jsou zastopeny různými chemickými látkami. Jsou to látky, které vyvolávají mutace při replikaci i v nereplikující se DNA, např. alkylační látky a kyselina dusitá nebo látky vyvolávají mutace pouze při replikaci DNA, jedná se o analogy purinových nebo pyrimidinových bází, jejichž struktura je podobná normálním bázím, např. akridinová barviva, která se vmezeřují do DNA (interkalace) a způsobují její prohýbání nebo zkroucení, což vede k delecím nebo adicím, dále alkylační látky jako yperit, alkylsulfáty – MMS a EMS). Poslední skupinou jsou **biologické** mutageny – zejména viry, př. EB virus.

Mutace můžeme dělit také podle typu buněk, ve kterých se vyskytují na **somatické** a **gametické**. **Gametické mutace** jsou mutace, které se vyskytují pouze u buněk zárodečné linie. Tyto mutace se přenáší do další populace. Vznik mutace v gametě znamená, že mutantní alelu zdědí pouze jeden potomek. Vznik v primordiální zárodečné linii varlat nebo vaječníků znamená, že se mutantní alela dostane do více gamet a bude postiženo více potomků. Je tedy zvýšen potenciál pro přenos do další generace. Pro projev mutace je tedy stěžejní stádium vzniku v rámci reprodukčního cyklu a její dominance. **Dominantní mutace** se projeví v potomstvu bezprostředně, **recesivní mutace** jsou potlačeny v důsledku diploidního stavu. **Somatické mutace** se vyskytují pouze u somatických buněk a nepřenášejí se do další populace.

Původ mutací: mutace jako náhodný neadaptivní proces

Mezi příklady mutací, které vznikly jako náhodné neadaptivní procesy, patří krysy ve městech odolné vůči jedům (antikoagulantům), mouchy masařky odolné k chlornanu (jed), dále sem řadíme odolnost hmyzu vůči různým insekticidům (mouchy, vši apod.), rezistenci na antibiotika. Všechny tyto rezistence jsou podmíněny mutacemi, citlivé organismy zahynou a životaschopní mutanti se množí a vznikají nové rezistentní populace. Ačkoli to tak nevypadá, jednoznačně bylo prokázáno, že původ mutací je není způsoben podmínkami vnějšího prostředí, ale jedná se o náhodný neadaptivní proces. K tomu posloužil experiment z roku 1952 Joshua a Esther Ledergergových, kteří pomocí tzv. **razítkovací metody** prokázali, že v bakteriální kultuře jsou přítomni mutanti rezistentní vůči antibiotiku ještě před působením antibiotika. Vědci Jean Lamarck a Trofim Lysenko propagovali zcela zcestnou teorii dědičnosti získaných znaků, tzn. mutace vznikají u organismů vlivem faktorů vnějšího prostředí.

Adaptivní mutagenese

Adaptivní mutace poskytuje selekční výhodu mutantním organismům, pokud rostou v prostředí, ve kterém vznikly. Adaptivní mutagenese je popisována zejména u bakterií. U bakterií se jedná o mutagenesi stacionární fáze – bakterie přestávají růst – vstupují do této stacionární fáze – v důsledku nedostatku živin nebo environmentálního stresu (nepříznivé životní podmínky). **Náhodné mutace** jsou neadaptivní mutace, adaptivní mutace jsou indukované stresem. Během zvýšené mutagenese dochází k indukci mechanismů chybné opravy DNA označované jako SOS odpověď.

Reverzní mutace

Mutantní alela může mutovat zpět na formu, která obnovuje standardní fenotyp. Mutace je tedy reverzibilní neboli vratný proces. **Přímá mutace** je mutace standardního genu do formy, která je příčinou mutantního fenotypu. Reverze pak probíhá dvěma způsoby, jednak pomocí **zpětné mutace**, tzn. druhé mutace vzniklé ve stejném místě jako původní mutace, původní sekvence nukleotidů je obnovena, nebo vznikem **supresorové mutace** – tzn. druhé mutace, která se nachází jinde v genomu (v různých oblastech stejného genu, nebo i na jiných chromozómech), ale svým působením vyrovnává efekt první mutace. Původní sekvence nukleotidů pak není obnovena. Některé mutace primárně revertují prostřednictvím zpětných mutací, jiné výhradně pomocí supresorových mutací. Rozlišení zpětné nebo supresorové mutace je umožněno pomocí zpětného křížení mezi fenotypovým revertantem a původním standardním organismem (pokud jde o supresorovou mutaci, bude původní mutace v potomstvu neustále přítomna, pokud jde o zpětnou mutaci, všichni potomci budou mít standardní fenotyp).

Různé fenotypové účinky mutací

Izoalely jsou geny obsahující mutace bez fenotypového projevu nebo s minimálním fenotypovým projevem. **Nulové alely** jsou produkty mutovaných genů, které nejsou funkční nebo se genové produkty vůbec netvoří. Mutace **recesivně letální** vznikají z nulové alely v genech potřebných pro růst a vývoj organismu. Mutace mohou být **recesivní** nebo **dominantní**, jejich fenotypový projev pak záleží na homozygotním nebo heterozygotním stavu genu. Obecně platí, že většina mutací je škodlivých a recesivních. Mutace **neutrální** pak vznikají z důvodu degenerovaného genetického kódu a nemají vliv na fenotyp.

Některé příklady mutací u člověka

Srpkovitá anémie, AR (autorzomálně recesivní) onemocnění, mutace v beta-globinovém řetězci. Substituce valinu za kys. glutamovou (T:A za A:T), vznik abnormálního tvaru červených krvinek.

Fenylketonurie – AR onemocnění, porucha fenylalanin-tyrozinového metabolismu, nepřítomnost enzymu fenylalaninhydroxylázy (přeměňuje fenylalanin na tyrozin), řešením je přísná dieta s minimálním obsahem fenylalaninu. Projev – mentální retardace.

Tyrozinóza – AR onemocnění, nedostatek enzymu tyrozinaminázy, velice vzácné onemocnění, většina novorozenců umírá v průběhu šesti měsíců na selhání jater.

Albinismus – mutace blokující přeměnu tyrozinu na tmavý pigment melanin, AR onemocnění, může být způsobeno absencí enzymu tyrozinázy nebo je zablokován některý z dalších kroků přeměny tyrozinu na melanin. Heterozygoti mají normální úroveň pigmentace, jedinci postižení albinismem, kteří mají mutaci v různých genech, budou mít děti s normální pigmentací.

Tay-Sachsova choroba – homozygoti pro mutantní gen se rodí jako normální, ale během několika měsíců (6-12) dochází neurologické degeneraci a mentální retardaci. Děti umírají ve 3-4 roce života. V tomto případě pomůže pouze preimplantační screening.

Molekulární podstata mutací

Tautomerní přesmyky vznikají v případě, že vodíkové atomy přechází z jedné pozice purinu nebo pyrimidinu na jinou pozici. Jsou vzácné, ale mají význam pro metabolismus DNA. Mění způsob párování bází. Normálně se vykytuje stabilní ketoforma thyminu a guaninu a stabilní aminoforma adeninu a cytozinu. V důsledku tautomerních přesmyků pak vznikají bodové mutace, zejména nestabilní enol- a iminoformy, přičemž báze existují v těchto tautomerních formách krátce, ale pokud jsou přítomny v okamžiku replikace nebo při začleňování do nově vznikajícího řetězce DNA, může vzniknout mutace, která je fixována.

Existují různé typy tautomerních mutací: **tranzice** vzniká záměnou purinu za purin nebo záměna pyrimidinu za pyrimidin, **transverze** znamená záměnu purinu za pyrimidin a naopak. Pro každý pár existují 3 možné typy substitucí – 1 tranzice a 2 transverze, celkem jsou možné 4 různé tranzice a 8 různých transverzí. Další typem je **inzerce** nebo **delece** jednoho nebo více párů bází – tzv. posunové mutace, ty mění čtecí rámec všech tripletů v genu. Tranzice, transverze i posunové mutace nacházíme v případě spontánních mutací. Čestnější jsou inzerce a delece a ty vedou k nefunkčním genovým produktům. Vznik těchto mutací je podmíněn přesností mechanismu replikace DNA,

účinností reparačních mechanismů podílejících se na opravách DNA a míře expozice mutagenním látkám přítomným v prostředí.

Další názvy rozdělení bodových mutací je následující: **missence** mutace měnící smysl kodonu, kdy je zařazena jiná aminokyselina (AK), tzn. jedná se o substituci AK; **silent** mutace tzv. tiché, kdy je zařazena stejná AK; **nonsense** mutace a tedy nesmyslné mutace, vzniká nový stop kodon. Pokud vzniká v důsledku mutace zkrácený protein, je degradován procesem odbourávání mRNA zprostředkované nesmyslnou mutací „**nonsense-mediated mRNA decay**“. Jedná se celkově asi o 12% mutací. **Mutace sestřihu** RNA představují asi 10% mutací. V tomto případě je narušen správný sestřih intronů a exonů, tzn. mutují nezbytné báze v donorovém nebo akceptorovém místě nebo nukleotidové substituce intronu, které vytvářejí alternativní donorová a akceptorová místa, která s normálními místy při sestřihu soutěží. Výsledkem je zralá mRNA se špatně vystřiženými introny. **Frame-shift** mutace jsou posunové mutace zahrnující delece, inserce.

Mutace se vyskytují na úrovni genomu, chromozómu nebo genu. Změny ve struktuře chromozómu (chromozómové mutace) zahrnují inverze –pericentrické a paracentrické, translokace balancované a nebalancované, Robertsonské translokace, spojené chromozómy, izochromozomy, duplikace (amplifikace) nebo delece.

Inverze vzniká tehdy, když na chromozómu dojde ke dvěma zlomům a úsek mezi nimi se převrátí, existují dva typy inverzí – paricentrická (nezahrnuje centromeru) a pericentrická (zahrnuje centromeru).

Translokace znamená přemístění nebo výměnu chromozomového segmentu mezi různými (většinou nehomologními) chromozómy. Během reciproké translokace dochází k dokonalé výměně translokovaných segmentů mezi dvěma nehomologními chromozómy bez ztráty genetického materiálu, jedná se o balancované translokace. Nereciprokou translokací nazýváme takovou translokaci, kdy dojde k výměně translokovaných segmentů mezi dvěma nehomologními chromozómy se ztrátou genetického materiálu v důsledku delece nebo vznikem nového genetického materiálu (amplifikace), pak se jedná o nebalancovanou translokaci. Příkladem translokace je **Filadelfský chromozóm**, vznikajícím translokací chromozómu 22 na chromozóm 9, jeho produktem je fúzní gen Bcr/abl. Abl je protoonkogen a bcr má silný promotor, fúzí dojde ke vzniku aktivního onkogenu. Vznik fúzního proteinu bcr-abl způsobí nekontrolovatelnou proliferaci buňky. Cytogenetický zápis této translokace je t(9;22)(q34;q11).

Robertsonská translokace vzniká spojením nehomologních chromozómů. Název má dle svého objevitele cytologa F.W. Robertsona. Robertsonská translokace vzniká fúzí dvou akrocentrických chromozómů za vzniku metacentrického chromozómu, oba chromozómy ztrácejí svá krátká ramena, jedná se o tzv. Robertsonské fúze (jsou časté pro evoluci karyotypu u mnoha organismů).

Jev kdy dochází k fúzi homologních chromozómů nebo sesterských chromatid v jeden celek se nazývá **izochromozóm**. Výsledný izochromozóm má pak pouze obě p ramena nebo obě q ramena. **Delece** znamená ztrátu genetického materiálu, **duplikace** (amplifikace) pak zmnožení genetického materiálu. Další příkladem chromozómové mutace je vznik **kruhového chromozómu** (ring-chromosome).

Všechny předešlé chromozómové mutace obnášeli nějakou změnu v počtu kopií DNA. Existují také mutace, během kterých nedochází k žádné změně v množství genetického materiálu, jedná se o tzv. **uniparentální disomie (UPD)**. Genetický materiál je v tomto případě na obou homologních chromozómech buď jen od matky, nebo jen od otce (tedy pouze od jednoho z rodičů). UPD může být vrozená nebo i získaná. Příkladem onemocnění způsobeného UPD je mikrodeleční Prader-Willi syndrom a Angelmanův syndrom, týkající se chromozómu 15 (UPD15q11-q13).

Změny na úrovni genomu označujeme jako **aneuploidie**, jedná se o přidání nebo chybění jednoho nebo více chromozómů a **polyploidie**, což znamená zmnožení kompletní sady chromozómů. Genomové mutace vznikají narušením segregace chromozómů, frekvence je 10⁻² na buněčné dělení. K chybné segregaci dochází v jednom na 25-50 meiotických buněčných dělení (jedná se o přibližný odhad, spontánní potraty nejsou často vůbec identifikovány), narušené segregace se často vyskytuje u nádorových buněk. Chromozómová mutace vzniká s frekvencí 6x10⁻⁴ na buněčné dělení. Chromozómové mutace jsou méně časté než genomové (1 přestavba na 1700 dělení), ovšem jsou časté u nádorů. Genomové i chromozómové mutace jsou většinou neslučitelné se životem nebo normální reprodukcí. Genové mutace – mutace páru bází se vyskytují s frekvencí: 10⁻¹⁰ na jeden pár bází na buněčné dělení a 10⁻⁵ - 10⁻⁶ na lokus a generaci. Chyby replikace DNA jsou většinou rychle odstraněny a opraveny procesem zvaným „proofreading“ (korektura). Replikace je velmi přesný proces, pokud by mutace vznikaly s frekvencí 1 na 1 000 000 bp, bylo by to pro organismus neúnosné a druh by vyhynul. Replikační aparát a DNA polymeráza dokáže duplikovat ssDNA s jedním chybně vloženým nukleotidem na 10 miliónů bází (rychlost replikace je 20 bp/s). Následující kontrola replikačních chyb opraví 99.9% chyb vzniklých během replikace. Diploidní lidský genom obsahuje 6x10⁹ párů bází, tzn. během replikace, dochází k méně než jedné mutaci na buněčné dělení. Mutace vzniklé při opravě poškozené DNA vznikají během samovolné chemické reakce (depurinace, demethylace, deaminace) s chemickými mutageny přítomnými v prostředí a expozicí UV-záření nebo ionizujícímu záření. Tyto mutace často přetrvávají jako trvalé mutace.

Rekombinace

Rekombinace může vést k nahromadění příznivých mutací. Chromozómové přestavby, především inverze, mohou naopak potlačovat rekombinaci. Rekombinace je řízena geneticky. Vazba genů se projevuje jako odchylka od Mendelova principu nezávislé kombinace. Četnost rekombinace je měřítkem intenzity vazby. Rekombinace je způsobena fyzickou výměnou mezi spárovanými homologickými chromozomy na začátku profáze meiotického dělení poté, kdy došlo k replikaci chromozómů. V jakémkoli místě na chromozómu dochází k procesu výměny (crossing-overu) pouze mezi dvěma ze čtyř chromatid v meiotické tetradě. Na konci profáze I jsou výměny mezi chromatidami viditelné jako chiazmata. **Crossing-over** je proces, kterým si homologické chromatidy vyměňují genetický materiál mechanismem zlomu a znovuspojení svých molekul DNA během meiózy. Vzniká pak unikátní kombinace genů, která se nevyskytovala u rodičů a jeho důsledkem je rekombinace. Graficky je crossing-over znázorněn jako **Hollidayův model** crossing-overu nebo Holliday-Whitehousův model rekombinace.

Genová konverze vzniká v důsledku opravné syntézy DNA, ke které dochází v průběhu rekombinačního procesu. Je to typ nerekiproké rekombinace, v důsledku genové konverze vždy dochází ke kopírování alely přítomné na homologickém chromozómu a nevzniká alela nová. Genová

konverze je důsledkem jevů vznikajících během crossing-overu, kdy dojde k opravné syntéze DNA související se zlomy, vyštěpením a znovuspojením, k nimž dochází v průběhu crossing-overu.

Doporučená literatura: SNUSTAD D.P. AND SIMMONS M.J.: Genetika. Přeloženo za ang. originálu Snustad DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 3.th ed. New York: John Wiley & Sons; 2003. Copyright Czech Edition © 2009, Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2/Kapitola 13

Otázky:

Co je to somatická mutace?

Co znamená pojem reverzní mutace?

Co to je tautomerní mutace?

Co brání rekombinaci genů?

Co to je paracentrická inverze?

PŘEDNÁŠKA 8

Cytogenetika

Obor **cytogenetika** má obrovský diagnostický význam pro medicínu. Vlastní cytogenetická analýza se provádí v průběhu mitotického dělení. K získání co největšího počtu mitoticky aktivních buněk se dříve používal materiál přirozeně obsahující velké množství dělících se buněk (embrya živočichů, kořenové špičky rostlin). Dnes umíme za pomoci kultivační technik přimět buňky k buněčnému dělení a tento proces uměle zastavit v metafázi buněčného dělení. Konvenční cytogenetické analýzy se provádějí na mitotických chromozómech v dělících se buňkách, modernější molekulárně-cytogenetické analýzy pak i na interfázních jádrech. **Pruhovací barvicí postupy** s využitím **chinarinu** nebo **Giemsova** barviva vytvářejí na každém chromozómovém páru jedinečné uspořádání pruhů, pomocí něhož můžeme v buňce individuálně rozpoznat všechny chromozómy. Karyotyp je obrázek mitotických chromozómů, které jsou seřazeny do párů a skupin podle dohodnutých pravidel pro účely cytogenetických analýz.

Zpracování buněk pro cytogenetickou analýzu se skládá z těchto kroků:

- 1.Odběr vzorku krve.
- 2.Separace buněk ze séra centrifugací.
- 3.Izolace bílých krvinek a kultivace in vitro.
- 4.Stimulace dělení buněk.
- 5.Rozrušení tvorby mitotického vřeténka.
- 6.Přidání hypotonického roztoku.
- 7.Fixace, kapání buněk na sklo a barvení.
- 8.Pozorování chromozómů pod mikroskopem.

Formy dědičnosti

Mezi základní formy dědičnosti týkající se oblasti **autozómů** patří **autozomálně dominantní dědičnost a autozomálně recesivní dědičnost**, v případě pohlavních chromozómů (**gonozómů**) se jedná o **gonozomálně dominantní dědičnost a gonozomálně recesivní dědičnost**. Dalším typem dědičnosti je **mimojaderná dědičnost** mitochondrií a tedy mitochondriální dědičnost a dědičnost ovlivněná rodičovským původem tzv. **genetický imprinting**.

Autozomálně dominantní dědičnost.

V tomto případě se fenotyp se objeví u heterozygota, tedy osoby nesoucí mutaci na jedné alele a dominantního homozygota. Příkladem onemocnění s **autozomálně dominantní dědičností** je např. MODY diabetes, neurofibromatóza, achondroplázie, Marfanův syndrom, Familiární hypercholesterolemie, Huntingtonova chorea, ADPKD. Riziko přenosu mutace (nemoci) na každé dítě je 50% pro obě pohlaví. Je zde významné riziko opakování v rodině. Mutace vzniklá *de novo* u prvního jedince v rodině se přenesou do další generace s 50% pravděpodobností a vždy se projeví. Zdraví zůstávají pouze recesivní homozygoti. Vyskytuje se zde možnost **anticipace** nemoci tzn. zhoršování projevů genetického onemocnění v každé další generaci.

Autozomálně recesivní dědičnost

Fenotyp se objeví u pouze u recesivního homozygota – osoby nesoucí mutaci na obou alelách. Příkladem onemocnění s tímto typem dědičnosti je cystická fibróza, kongenitální adrenální hyperplazie (CAH), fenylketonurie (PKU), difuzní forma vrozeného hyperinzulinismu, thalasemie, srpkovitá anemie, metabolické vady: galaktosemie, glykogenózy, Wilsonova choroba, Tay-Sachsova choroba, syndrom Hurlerové. Riziko pro opakování v rodině je 25% pro výskyt nemoci, 50% pro přenašečství mutované alely a 25% pro narození dravého dítěte. Všichni potomci postiženého budou přenašeči nemoci, pokud bude druhý rodič zcela zdravý a to bez rozdílu pohlaví. Riziko opakování nemoci v rodině se výrazně zvyšuje u příbuzenských sňatků. Pokud nese nemocný jednu mutaci na jedné alele a druhou mutaci ve stejném genu na druhé alele, pak je označován jako složený heterozygot. Projevy i riziko přenosu jsou stejné.

X-vázaná dědičnost dominantní

Mutantní fenotyp se projeví u obou pohlaví, ženy jsou heterozygotky, muži jsou hemizygoti. Příkladem onemocnění je Incontinentia pigmenti, Rettův syndrom, X-vázaná hypofosfatemická rachitis. Riziko opakování v rodině neboli riziko přenosu je 33% pro děti postižené ženy. Muži většinou umírají před reprodukčním obdobím. Tento typ dědičnosti je velmi vzácný.

X-vázaná dědičnost recesivní

Fenotyp se projeví pouze u postižených mužů (hemizygoti). Ženy jsou přenašečky. Příkladem onemocnění je hemofilie, Duchenneova i Beckerova muskulární dystrofie, Syndrom X fragilního chromozomu, daltonismus. Riziko přenosu nemoci na potomky je 25% (50% pro chlapce a 0% pro dívky). 0% pro syny postiženého muže. 100% pro dívku, která se narodila postiženému muži (ta bude vždy přenašečka). Mutace je přítomna v genu uloženém pouze na X chromozómu. Vzácně se může nemoc projevit i u žen, pokud je matka přenašečka a otec postižený – např. u daltonismu.

Mimojaderná dědičnost

Mitochondriální dědičnost

Fenotyp závisí na množství postižených mitochondrií. Příkladem onemocnění je MELAS syndrom, maternálně dědičný diabetes a hluchota (MIDD), syndrom Kearnsův-Sayerův, Leighův syndrom. Riziko pro opakování v rodině jde pouze přes matku (postiženou nebo přenašečku) bez rozdílu pohlaví postižených potomků. **Heterospasmie** je současný výskyt mitochondrií nesoucích mutovanou DNA i mitochondrií bez mutace v DNA jednoho vzorku.

Genomický imprinting

Fenotyp závisí na tom, od jakého rodiče pochází mutace. **Genomický imprinting** souvisí s procesy jako je metylace DNA a modifikace histonů v germinálních buňkách. Tento proces je nezávislý na běžných typech mendelovské dědičnosti. Určitý gen je aktivní pouze v případě, pokud je zděděn od určitého rodiče, zatímco stejný gen zděděný od druhého rodiče je rovnou inaktivní. Velmi záleží na tom, od koho je mutace v genu zděděna. Uplatňuje se pouze u malého počtu genů. Příkladem nemoci je Angelmanův syndrom, Prader-Willy syndrom, Beckwithův-Wiedermannův syndrom, Silverův-Russelův syndrom, některé fokální formy vrozeného hyperinzulinismu. Riziko výskytu nemoci u sourozenců a dětí závisí na pohlaví osoby přenášející mutaci.

Incidence/prevalence

Incidence neboli nemocnost je demografický ukazatel a odpovídá poměru nově vzniklých případů onemocnění v daném časovém období k celkovému počtu osob ve sledované populaci.

Prevalence je demografický ukazatel ukazující poměr počtu všech existujících případů (tj. bez ohledu na dobu jejich vzniku) daného onemocnění k počtu obyvatel v dané lokalitě ve sledovaném časovém období.

Nejčastější geneticky podmíněná onemocnění u člověka

Mezi nejčastěji postižené chromozómy u člověka patří chromozóm 21, 13, 18 a pohlavní chromozómy X a Y.

Trizomie chromozómu 21

Incidence Downova syndromu je 1 : 650-800 živě narozených dětí. Příčinou je v 95% případů trizomie 21 (cytogenetický zápis: 47,XX,+21 nebo 47,XY,+21), ve 3-4% je to Robertsonská translokace (fúze nadbytečné kopie chromozomu 21 s jiným akrocentrickým chromozómem), a v 1-2% je příčinou mozaika. Downův syndrom patří mezi nejznámější a nejtypičtější syndromy způsobené chromozomální aberací. V klasické formě jde o nejčastější syndrom způsobený trizomií chromozomu a zároveň je nejčastější vrozenou příčinou mentální retardace. Dalšími charakteristickými znaky jsou vrozené vady srdce a typický „mongoloidní“ vzhled. Díky moderním metodám prenatální diagnostiky lze tento syndrom v drtivé většině případů diagnostikovat již v průběhu těhotenství.

Z molekulárně-genetického hlediska je Downův syndrom velice komplikovanou klinickou jednotkou. Patologický fenotyp totiž není způsoben nefunkčními geny, jako je tomu například u hemofilie a jiných monogeně podmíněných chorob. Naopak – zde se uplatňují zcela funkční geny (a

to stovky genů!), ovšem nesprávné je celkové množství genetické informace. Navíc je pravděpodobné, že na patogenezi Downova syndromu se podílejí jak kódující, tak nekódující sekvence chromozomu 21 a dále také komplexní interakce těchto sekvencí s ostatními součástmi genotypu. V současné době již bylo identifikováno několik genů, které se na rozvoji fenotypu Downova syndromu pravděpodobně podílejí. Jde například o sérii genů označovaných jako DSCR (Down Syndrome Critical Region, DSCR 1-4) nebo gen APP (Amyloid Beta A4 Precursor Protein; 21q21; OMIM: +104760), potenciálně spojeného se vznikem Alzheimerovy choroby. U dětí s Downovým syndromem se častěji vyskytují srdeční vady, poruchy funkce štítné žlázy a vznik leukemie v časném věku.

Trizomie chromozómu 13

Patauův syndrom je podmíněn karyotypem **47,XX,+13** nebo **47,XY,+13** (trizomie chromozomu 13) a jeho výskyt je asi 1/10 000. Mezi fenotypové znaky patří rozštěpy rtu a patra, polydaktylie, anomálie obratlů, mnohočetné vady srdce, ledvin, CNS, pohlavních orgánů, hluchota, anomálie ušních boltců, těžká psychomotorická retardace a mikrocefalie (86 %). Postižení umírají většinou ještě v kojeneckém věku do 2 měsíců života, 50 % pak během prvního měsíce života.

Trizomie chromozómu 18

Edwardsův syndrom je komplexní genetický syndrom podmíněný karyotypem **47,XX,+18** nebo **47,XY,+18** (trizomie chromozomu 18). Vyskytuje se asi 1 případ na 5000 zdravých dětí, závisí na věku matky. Fenotypové znaky u novorozenců jsou zastoupeny četnými vadami: rozštěp rtu a patra, ustupující brada, malformace některých vnitřních orgánů – srdeční vady různého rozsahu, malá ústa a nos, hypoplazie prstů, mikrognácie, pes equinovarus, těžká psychomotorická retardace, prominující záhlaví; opožděný duševní vývoj (100 %), mikrocefalie (70 %), 90 % postižených umírá do 6 měsíců po narození.

Achondroplázie a hypochondroplázie

Achondroplázie je charakterizována jako disproporcionální trpaslictví s krátkými končetinami a průměrným vzrůstem v dospělosti 125 cm (v dospělosti muži průměrně 131 cm, ženy 124 cm). Příčinou je mutace genu FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3 protein), který kóduje protein fibroblastového růstového faktoru. Jedná se o tyrosinkinázový receptor, na který se váží růstové faktory fibroblastů a řídí růst a diferenciaci různých mezenchymálních a neuroektodermálních buněčných systémů. Důsledkem je porucha enchondrální osifikace všech kostí (mutace 4. chromozómu – gen pro FGFR3, OMIM: 134934;). Specifické mutace způsobují různé fenotypy – achondroplazii a hypochondroplazii se stejnými klinickými příznaky. Ovšem hypochondroplázie se projevuje mírněji.

Toto onemocnění patří k nejčastějším kostním dyspláziím (výskyt 1:27 000 živě narozených). Jedná se o autozomálně dominantně dědičné onemocnění, avšak až 90 % dětí se rodí na podkladě sporadických mutací (rizikovým faktorem zejména věk otce nad 36 let), homozygoti se většinou rodí mrtví. Perichondrální (dezmozogenní a periostální) osifikace probíhá normálně, nejvíce je vyjádřeno postižení růstu dlouhých kostí. Epifýzy a kloubní plochy mají normální tvar, šířka kortikalis je normální, intelekt je zcela normální. Neobyčejně malý vzrůst postižené sociálně hendikepuje (např.

nedosáhnou na vypínač světla, tlačítka výtahu, kohoutek umyvadla, obtížné používání hromadného dopravního prostředku.

Syndrom fragilního X

Syndrom fragilního X (Syndrom fragilního X chromozomu, syndrom Martinův-Bellové) je onemocnění, které dostalo svůj název dle specifické chromozomální abnormality – fragility v subterminální části dlouhých ramen X chromozomu (pruh Xq27.3 – FRAXA), která se vyskytuje v části buněk za speciálních kultivačních podmínek (malý obsah séra, snížený obsah kyseliny listové v médiu). Je to jedna z nejčastějších geneticky podmíněných příčin nedostatečnosti intelektu a vyskytuje se u 1:2500-3700 mužů a 1:7000 žen).

U postižených mentálně retardovaných mužů se v promotoru genu FMR1 (fragile X mental retardation 1), který v této oblasti X chromozomu leží, vyskytuje amplifikace (zmnožení) sekvencí trinukleotidů CGG. Tato mutace vzniká z tzv. premutace vyskytující se u matek postižených mužů, které mají tuto amplifikaci v menším rozsahu (50–200 kopií). I normální osoby mají určité opakování této sekvence, ale v daleko menší míře než osoby s premutací (5–49 kopií). tzv. šedá zóna je 50-58 opakování (možnosti expanze v dalších generacích). Přeměna nestabilní premutace (59-200 kopií) v plnou mutaci (tj. zvětšení délky amplifikátu na více než 200 kopií) nastává pouze při přenosu ženou, při průchodu elementu spermiogenezi k prodloužení nedochází. Plná mutace, tj. zvětšení opakování trinukleotidů nad 200 kopií vede k metylaci tohoto elementu, a protože se nachází v promotoru genu, dochází k zástavě transkripce genu a k mentální retardaci a dalším klinickým projevům. Ženy s plnou mutací FMR1 genu sice mají fyzické i psychické znaky syndromu, bývají ale obvykle postiženy v menší míře. Postižení intelektu může být různě závažné, od lehkého postižení u dívek až po velmi těžké u chlapců. Jedinci s mozaikou pro rozsah opakování CGG nebo odchylkou metylace mají spíše mírnější postižení. Vzácně je syndrom způsoben delecí nebo ztrátovou mutací FMR1. Jedná se o X-vázanou chorobu a riziko opakování tedy závisí na pohlaví dítěte a na pohlaví rodiče, případného nositele vady.

Klinefelterův syndrom

Klinefelterův syndrom vzniká přítomností nadpočetného chromozomu X u muže, jde tedy o gonozomální numerickou aberaci. Nejčastěji je způsoben karyotypem **47,XXY**, možné jsou i varianty s více chromozomy X (**48,XXXY** či **49,XXXXY**), které mají výraznější manifestaci. Existují i mozaikové formy. Syndrom je velmi častý, prevalence je 1: 500-1000. Z praxe je známo, že do puberty, ale bohužel i během puberty a pak v dospělosti bývají klinické znaky snadno přehlédnuty a diagnóza je stanovena až z důvodu neplodnosti (tvoří 5-15% příčin infertility mužů). Riziko opakování pro další dítě je nízké.

Marfanův syndrom

Marfanův syndrom (dolichostenomelie; OMIM: 154700) zahrnuje širokou skupinu příznaků, při úplném vyjádření bývá postižen systém kostní, oční a kardiovaskulární. Syndrom je způsoben mutací v genu FBN1 (fibrilin-1). Základní kritéria jsou vysoká postava (80%), dlouhé tenké končetiny, dlouhé tenké prsty (arachnodaktylie), dislokace oční čočky (ectopia lentis), anomálie srdce a cév (dilatace aorty).

Jde o autozomálně dominantní dědičné onemocnění, avšak spontánní mutace jsou časté, četnost onemocnění je přibližně 1:5 000 - 10 000. Riziko opakování pro rodinu je nízké, ale vyšší než populační. Syndromem trpěl například houslista Niccolò Paganini. Častou příčinou úmrtí u tohoto syndromu v nižším věku bývá ruptura aneuryzmatu, disekce aorty nebo srdeční selhání v důsledku vzniklé aortální regurgitace (ev. mitrální regurgitace).

Neurofibromatóza typu 1 (NF1)

Neurofibromatóza je relativně časté autozomálně dominantní dědičné onemocnění, s výskytem 1:3 000 novorozenců, vycházející z buněk odvozených z neurální lišty. Riziko opakování NF1 je 50% v případě, že rodič je také postižený. Pokud jsou rodiče dítěte s NF1 zdraví, je riziko opakování nízké. Onemocnění se projevuje na kůži jako skvrny barvy mléčné kávy („café au lait“), přičemž záleží na jejich počtu a velikosti (6 a více skvrn, velikost >5 mm prepubertálně a > 15mm postpubertálně), nebo jako pihy v axilách a/nebo inguinách nebo přítomností vícečetných kožních neurofibromů. Onemocnění je typické výraznou predispozicí k vzniku benigních i maligních nádorů. Onemocnění patří mezi hereditární nádorové syndromy, vyskytuje se ve dvou formách. Familiární formy těchto syndromů vznikají jako následek vrozené mutace tumor-supresorových genů. Určité procento těchto syndromů vzniká jako následek nových mutací. Molekulárně-genetická analýza NF1 genu je v dnešní době dostupná pro definitivní potvrzení této diagnózy.

Turnerův syndrom

Turnerův syndrom patří mezi klasické syndromy způsobené numerickou chromozomální aberací, mezi které patří i syndromy Downův, Edwardsův, Patauův, Klinefelterův či syndromy 47,XXX a 47,XYY (dříve nazývané "Superfemale" a "Supermale"). Na rozdíl od těchto syndromů, které jsou (ve většině případů) způsobeny trizomií ať již somatického nebo pohlavního chromozomu, představuje Turnerův syndrom, způsobený nejčastěji karyotypem **45,X** zřejmě jedinou kompletní monozomii, jejíž nositelé jsou schopni dlouhodobě přežít.

Turnerův syndrom postihuje 1: 2 500 – 3 000 živě narozených dívek. Jeho klinická prezentace je velmi variabilní. Podezření obvykle vyvolají typické lymfedémy nártů nohou a hřbetu rukou při narození, selhávání růstu během dětství a opoždění či absence puberty. V 50% případů je příčinou monozomie 45,X (chybí celý nebo část chromozómu X), u 20% způsobuje mozaika, kdy jedna buněčná linie je 45,X, další příčiny jsou parciální delece X chromozómu, izochromozom, kdy chybí krátké raménko Xp a dlouhé raménko Xq je zdvojené, nebo prstencový chromozóm X. Syndrom se vyskytuje sporadicky s nízkým rizikem opakování. U postižených je indikována léčba růstovým hormonem, inteligence bývá normální. Dívky jsou neplodné, ale v případě darování vajíčka v rámci asistované reprodukce mohou otěhotnět.

Syndrom Noonanové

Syndrom Noonanové je relativně časté autozomálně dominantní geneticky podmíněné onemocnění. Vyskytne se asi u jednoho z 1000 - 2 500 narozených dětí a postihuje chlapce i dívky. Příčinou vzniku syndromu jsou genetické mutace. Již nyní je známá řada genů, jejichž mutace syndrom Noonanové vyvolá a předpokládá se, že mnoho dalších genů ještě nebylo odhaleno. U 50% dětí lze prokázat mutaci PTPN11 genu (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11), vzácněji

jsou postiženy geny SOS1, RAF1 a KRAS. Syndrom je často výsledkem *de novo* mutace s nízkým rizikem opakování v rodině. Penetrance vady je kompletní, ale expresivita je velmi variabilní.

Mezi projevy patří typická nízká postava nemocných (trpaslictví), častý je i snížený intelekt v podobě mentální retardace, poruch učení a poruch chování, 80% pacientů má vrozenou srdeční vadu nebo hypertrofickou kardiomyopatii. Hlava bývá velká, čelo vysoké a široké, oči daleko od sebe a dolní čelist je abnormálně drobná. Tvar obličeje je proto trojúhelníkový, krk bývá krátký. Nemocní často trpí zkřivením páteře a někdy i méně závažnými deformacemi končetin a hemokoagulačními poruchami.

Nepříjemné jsou srdeční vady s nálezem zúžených srdečních chlopní asi u 80 % pacientů. U chlapců se vyskytují nesestouplá varlata. Vývoj dítěte bývá narušen i různými vadami trávicího traktu, které jsou spojené se zvracením, poruchami polykání a příjmu potravy. U postižených je velice často snížená krevní srážlivost. Tvoří se u nich snadno modřiny i při malých úrazech.

Angelmanův syndrom

Angelmanův syndrom (AS, Happy puppet syndrome) je mikroleční syndrom, způsobený nejčastěji delecí v úseku 15q11-13 na maternálním chromozómu (70%) nebo uniparentální dizomií otcovského chromozómu 15 (10%). Prevalence toho syndromu je asi 1/12 000 – 20 000. Etiologie Angelmanova syndromu úzce souvisí se syndromem Prader-Willi. Oba syndromy mají rozlišný fenotyp, ale úsek delecce je shodný u obou. O tom, kterým z nich bude jedinec postižený, tak rozhoduje genomový imprinting. V 10% případů je prokazatelný defekt genu UBE3A (ubiquitin protein ligase E3A), který kóduje ligázu účastnící se degradace poškozených proteinů.

Mezi fenotypové projevy patří málo rozvinutá řeč - pouze minimum slov, spíše neverbální projev, těžká mentální retardace v pásmu debility až imbecility, motorické problémy - ataktické pohyby, strnulá chůze (připomínající pohyby loutky), bezdůvodné záchvaty smíchu. Pokud se delecce objevila u dítěte v rodině poprvé, je riziko přenosu nízké. Pokud je mutace zděděná po matce, riziko opakování představuje 50%.

Prader-Williho syndrom

Prevalence syndromu je 1: 10 000 – 30 000. Projevuje se již od novorozeneckého věku. Syndrom je v 70% případech způsoben **paternální** delecí a asi ve 20% **maternální UPD**. Riziko opakování záleží na tom, jak je kritická oblast chromozómu 15 alterována. Pokud jde o ztrátu paternální oblasti kvůli delecce nebo UPD, je riziko opakování menší než 1%. Pokud je rodič nositelem mutace ovlivňující imprinting, může být riziko opakování až 50%. Pokud je rodič nositelem chromozomální přestavby, je riziko opakování pro další dítě relativně vysoké v závislosti na typu přestavby.

Při porodu mají děti s Prader-Williho syndromem snížené celkové svalové napětí (hypotonie), spíše podprůměrnou velikost a jen pomalu přibírají na váze. To se s postupem času mění, nastupuje chorobná žravost a vzniká obezita. Nemocný jídlu vyžaduje a není prakticky možné ho od příjmu potravy odradit. Intelekt nemocného jedince je narušený, opožděje se vývoj řeči a nacházíme mentální retardaci různého stupně. Vzrůstem jsou nemocní spíše nižší, puberta u nich nastupuje opožděně a pohlavní znaky nebývají dostatečně vyvinuty. Postižení Prader-Williho syndromem jsou často neplodní, u chlapců se vyskytuje porucha sestupu varlat.

Z anatomických odchylek nacházíme u nemocných malé ruce a nohy, obličej je kulatý s mandlovýma očima, nos z něj výrazně vyčnívá, čelo je úzké a horní ret je tenký.

Syndrom Silverův-Russellův

Výskyt tohoto syndromu je 1-30 na 100 000, tedy velmi sporadický, jedná se o syndrom s autozomálně dominantní dědičností. Z fenotypových projevů dominuje velmi malý prenatální a postnatální vzrůst v kontrastu s normálním růstem hlavy, která se pak vzhledem k velikosti těla zdá velká. Intelekt není narušen. Příčinou je ve 35% metylace na chromozómu 11p15, v 10% maternální UPD na chromozómu 7, u 40% je genetická příčina neznámá.

Velokardiofaciální syndrom

Expresivita uvnitř rodin i mezi nimi bývá velmi variabilní, prevalence je 1 : 4 000, dědičnost je autozomálně dominantní. Karyotyp může být normální, u 95% je pak FISH analýzou detekována delece oblasti 22q11.2, vzácné jsou translokace zahrnující tuto oblast, někteří nesou mutaci TBX1 genu (T-box transcription factor 1). V 93% případů se jedná o nově vzniklou deleci a riziko pro přenos je nízké. Jedinci s delecí 22q11.2 mají 50% riziko pro přenos této delece na potomky. Mezi fenotypové projevy patří opoždění vývoje, problémy v učení, vrozené srdeční vady, anomálie patra a další.

Syndrom Williamsův-Beurenův

Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění s prevalencí 1:7 500 - 10 000. V 99% případů se jedná o deleci 7q11.23 zahrnující gen ELN kódující gen pro elastin. Tato delece způsobuje problémy pojivové tkáně. Většinou se jedná o mutaci de novo s nízkým rizikem přenosu, postižení jedinci mají 50% riziko přenosu mutace na potomstvo. Mezi fenotypové projevy patří malý vzrůst, neprospívání, hypertenze, srdeční vady, snížený intelekt, hypersenzitivita na zvuk, problémy s pozorností apod.

Mikrodeleční syndromy

Mikrodeleční syndromy zahrnují skupinu syndromů spojených s velmi malou delecí, někdy i cytogeneticky viditelnou, nebo zjistitelnou metodou FISH. Tyto syndromy se nazývají též syndromy přilehlých genů („contiguous gene syndrome“) nebo syndromy autozomální segmentální aneuzomie, neboť jejich klinické příznaky jsou většinou způsobeny chyběním funkce více genů. Intersticiální delece, které jsou příčinou onemocnění u většiny pacientů s těmito syndromy, vznikají nerovnoměrným crossing overem mezi homologními chromozomy nebo nerovnoměrnou výměnou mezi sesterskými chromatidami. Patří sem i syndromy spojené s poruchou imprintingu, kde delece postihuje vždy chromozom určitého rodičovského původu (Prader-Willi syndrom, Angelmanův syndrom). U těchto syndromů spojených s poruchou imprintingu a u některých dalších existují i jiné příčiny kromě delece, které vedou k projevům onemocnění. Mezi nejznámější „mikrodeleční syndromy“ patří DiGeorgeův syndrom, syndrom kočičího oka, Charcot-Marie-Tooth syndrom, neurofibromatóza, ichtyóza, Williamsův syndrom, Prader-Williho syndrom a Angelmanův syndrom, Smith-Magenisův syndrom a dup(7)(p11.2) a další.

SNUSTAD D.P. AND SIMMONS M.J.: Genetika. Přeloženo za ang. originálu Snustad DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 3.th ed. New York: John Wiley & Sons; 2003. Copyright Czech Edition © 2009, Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2/Kapitola 6

NUSSBAUM, MCLNNES AND WILLARD: Klinická genetika Thompson and Thompson. 6. vydání © 2001 by W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, Translation © Petr Goetz a kol., 2004, © Triton, 2004. ISBN 80-7254-475-6/Kapitola 9

ŠKVOR J., PRŮCHOVÁ Š.: Základy klinické genetiky pro pediatriickou praxi. © Mladá fronta a.s., 2014. ISBN 978-80-204-3413-5

Otázky:

Popište proces zpracování cytogenetického preparátu vedoucí k vizualizaci karyotypu?

Uveďte nejčastěji se vyskytující trizomie u člověka?

Co to je mikrodeleční syndrom?

Znáte příklad monozomie u člověka, která je slučitelná se životem? Charakterizujte ji.

9. PŘEDNÁŠKA

Proteiny v organismu

Enzymy jsou biologické katalyzátory, zprostředkující přeměnu substrátu na produkt – existují i katalytické RNA, ale většinou se jedná o proteiny. **Provozní proteiny** – přítomny téměř ve všech buňkách a plní zásadní úlohy pro udržování její funkce a struktury. Jedná se o 90% proteinů.

Specializované proteiny – jsou produkovány v jednom nebo v omezeném počtu buněčných typů. Mají jedinečné funkce, které přispívají k individualizaci buněk. Jedná se o 10% proteinů. Eukaryotické tkáně exprimují cca 22 550 genů.

Patogeneze nemoci je ovlivněna různými faktory – místem exprese proteinu, druhotným vlivem na jiné tkáně, nepředvídatelným místem vzniku vzhledem k místu postižení (tkáně s mutovaným proteinem jsou nepostižené), klinický projev postižení provozních proteinů je většinou omezen na jednu nebo několik tkání, kde je nejvíce exprimován nebo plní speciální funkci.

Různé **enzymopatie** se počítají na stovky a jsou téměř vždy recesivní. Většina enzymů je vytvářena ve výrazně vyšším množství, které přesahuje minimální biochemické potřeby, tzn. heterozygot s přibližně 50% reziduální aktivitou enzymu je klinicky normální. Mnoho enzymů může zachovat normální hladiny substrátu a produktu při enzymových aktivitách nižších než 10% ve srovnání s kontrolními vzorky. Základní funkcí enzymu je přeměna substrátu na produkt, tzn. patofyziologické důsledky enzymopatií mohou být připsány akumulaci substrátu, nedostatku produktu nebo nějaké kombinaci obojího.

Difúzní versus makromolekulární substráty, malé versus velké molekuly

Je rozdíl, pokud se enzymový defekt týká situace, kdy je substrátem malá molekula např. fenylalanin roznášení difúzí nebo transportem do všech tělních tekutin nebo defektem v němž je substrátem makromolekula, jako mukopolysacharid, který zůstává zadržen ve své organelle nebo buňce.

Patologie makromolekulárních chorob je omezena na tkáně, v nichž se substrát akumuluje, zatímco sídlo choroby u poruch malých molekul je nepředvídatelné, protože nemetabolizovaný substrát nebo jeho deriváty se volně pohybují po celém organismu a mohou poškozovat buňky, které normálně k postiženému enzymu nemají žádný vztah.

Ztráta mnohočetných enzymových aktivit

Jeden pacient může mít ztrátu funkce více než jednoho enzymu v těchto případech: enzymy používají stejný kofaktor, enzymy sdílí společnou podjednotku nebo aktivační, modifikující nebo stabilizující protein, enzymy mohou být modifikovány běžným modifikujícím enzymem a v jeho nepřítomnosti mohou být inaktivní nebo může být porušen jejich vstup do organel, skupina enzymů chybí nebo je neúčinná, je-li abnormální organela, v níž se normálně nacházejí.

Patologie a klinické projevy, které jsou výsledkem enzymového defektu, jsou často shodné pro nemoci způsobené defektem různých enzymů, které se uplatňují ve stejné oblasti metabolismu, různé nemoci vznikající v důsledku parciálního nebo kompletního defektu enzymu. Existují tzv. částečné defekty projevující se klinickými abnormalitami pozorovanými u úplného deficitu.

Poruchy metabolismu aminokyselin

Hyperfenylalaninémie přináší vzestup hladiny fenylalaninu v krvi, př. je fenylketonurie (PKU). Jedná se o ztrátové mutace (mutace vedoucí ke ztrátě funkce proteinu) v genu pro fenylalaninhydroxylázu (PAH) nebo v genech potřebných pro syntézu nebo reutilizaci jejího kofaktoru – tetrahydrobiopterinu (BH₄), v tomto případě se jedná o sekundární poruchu.

Fenylketonurie (PKU)

Fenylketonurie (PKU; OMIM: 261600) patří mezi dědičné metabolické poruchy - dědičné enzymopatie s autozomálně recesivní dědičností. Její výskyt je 1/2900 živě narozených dětí. Onemocnění objevil Fröhling v roce 1934 – jednalo se o první průkaz genetického defektu jako příčiny mentální retardace.

Příčinou onemocnění je mutace genu pro fenylalaninhydroxylázu (PAH; 12q24.1; OMIM: 612349) – tento enzym u zdravých jedinců hydroxyluje fenylalanin na tyrosin, u lidí s PKU však fenylalaninhydroxyláza zcela chybí nebo má jen velmi nízkou aktivitu, fenylalanin se u nich nehydroxyluje na tyrosin, ale hromadí se v tělních tekutinách a poškozuje myelinizaci vyvíjejících se nervových vláken, zároveň se uplatní metabolická cesta, která je běžně nevýznamná a část fenylalaninu je fenylalaninamino-transferasou přeměněna na fenylpyruvát, tvoří se také zvýšená množství kys. pyrohroznové (vylučována močí), která ve zvýšeném množství poškozuje tkáně a mozek. Je tedy poškozen vyvíjející se CNS v raném dětství a následně i funkce dospělého mozku. Fenylpyruvát, fenyllaktát a fenylacetát jsou ve zvýšené míře vylučovány močí (→ odtud název nemoci fenylketonurie) a dodávají jí zápach po myšince.

PKU se projeví až po narození, protože v těhotenství je přebytek fenylalaninu a dalších metabolitů plodu odstraňován z těla plodu placentou. Jakmile začne novorozenec pít mateřské mléko, hladina fenylalaninu v jeho krvi začne stoupat a poškozuje vývoj mozku, během kojeneckého a batolecího věku se postupně rozvíjí mentální retardace, která dále progreduje ve slabomyslnost

(imbecilita a idiocie). Neuropatologický mechanismus poškození mozku není dosud znám. Léčbu představuje úprava stravy.

Variantní PKU a nefenylketonurická hyperfenylalaninémie

Při běžné PKU chybí aktivita PAH (pod 1% normálních hodnot). Vyskytují se také méně závažné fenotypy – non-PKU hyperfenylalaninémie a variantní PKU. V tomto případě má mutovaná PHA reziduální aktivitu, u non-PKU hyperfenylalaninémie je definována plazmatickou koncentrací fenylalaninu pod 1 mM při normální dietě pacienta (10x zvýšená hodnota proti normálu), je to méně škodlivé pro mozek a může být i benigní, je-li zvýšení malé < 0.4 mM. Variantní PKU – pacienti tolerují hyperfenylalanin na přechodu mezi PKU a non-PKU, potřebují určité omezení fenylalaninu v dietě. Jedná se o klinickou fenotypovou heterogenitu.

Kritickým obdobím je těhotenství fenylketonuriček: aby se narodilo zdravé dítě, je nutné držet přísnou dietu již před početím a během těhotenství, tři měsíce před početím a během těhotenství musí být fenylalaninémie (hladina fenylalaninu v krvi) matky v mezích normy. Fenylalanin z krve matky by totiž přecházel do krve plodu a jeho vysoká hladina by poškodila vývoj plodu. Důsledkem takzvané mateřské fenylketonurie jsou mentální retardace, mikrocefalie, srdeční vady a plod je postižen bez ohledu na svůj genotyp (tzv. fenokopie). Stejně tak je nutné, aby dietu držely pacientky s HPA, jelikož i u těch by mohla hladina fenylalaninu plod poškozovat.

Molekulární defekt PAH je provázen vysokou alelovou heterogenitou, vyskytuje se více než 400 různých alel, většinou se jedná o vzácné mutace. Šest mutací představuje 2/3 všech známých mutací v evropské populaci. Šest jiných mutací odpovídá za 80% mutací PAH v asijské populaci. Klinická heterogenita je dána výskytem složených heterozygotů (tzn. vyskytují se u nich dvě různé kauzální mutace). Znalost genotypu PAH ale nedokáže jistě předpovědět podrobnosti fenotypu – tzn. ani monogenní znaky typu PKU nejsou jednoduché.

1-3% PKU dětí je PAH normální, ale genetický defekt se týká tvorby nebo recyklace tetrahydrobiopterinu (BH4). BH4 pacienti nereagují na dietu s nízkým obsahem fenylalaninu, přesto se u nich vyvinuly vážné neurologické problémy v raném dětství. BH4 je kofaktorem pro dva enzymy tyrozinhydroxylázu a tryptofanhydroxylázu, ty jsou kritické pro syntézu monoaminových neurotransmiterů – dopa, norepinefrin, epinefrin a serotonin. Narušena je biosyntéza BH4 nebo regenerace BH4. Léčba se liší v obou případech, normalizují se neurotransmitery v mozku podáváním L-dopy.

Poruchy metabolismu purinů

Lesh-Nyhanův syndrom se projevuje jako porucha pohybu, spasticita (zvýšené svalové napětí), variabilní mentální retardace, sebepoškozování. Nadprodukce kys. močové způsobuje dnu a močové kameny. Příčinou je mutace v genu pro Hprt, který kóduje X-vážený enzym hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferázu.

Pacienti bez aktivity Hprt – mají Lesh-Nyhanův syndrom, pokud je aktivita enzymu snížena na 1- 30 % normálu, je manifestován částečný fenotyp (hyperurikémie a dna) bez dramatických neurologických nálezů, jedná se o méně než 2% dospělých pacientů mužů postižených dnou. Neurologické abnormality mohou být výsledkem změn hladiny purinů v mozku způsobených nemocí v souladu s teorií, že některé neurotransmitery jsou puriny.

Lysozomové střeďavé choroby

Lysozomy jsou membránové organely obsahující řadu hydrolytických enzymů, ty se účastní degradace různých biologických makromolekul. Genetické poruchy hydroláz vedou k akumulaci jejich substrátů uvnitř lysozomu, to vede k poruše buněčných funkcí popř. k vyvolání apoptózy.

Principiálně dochází k postupnému střeďání substrátu (nezadržitelná progresse příznaku onemocnění), to vede ke klinické manifestaci - zvýšení hmoty postižených tkání a orgánů. Pokud je postižen mozek, dochází k neurodegeneraci. Celkem existuje více než 48 různých deficitů lysozomálních hydroláz nebo poruch lysozomálního membránového transportu, které mají většinou autozomálně recesivní typ dědičnosti.

Tay-Sachsova choroba

Jedná se skupinu heterogenních lysozomálních střeďavých chorob, **GM2-gangliosidóza**, kdy není degradován sfingolipid GM2-gangliosid, jehož hlavní syntéza probíhá v mozku, biochemickou poruchou je výrazný deficit hexosaminidázy (hexA), nemoc se projeví téměř výhradně postižením mozku.

Katalyticky aktivní hexA je produktem systému tří genů (alfa a beta podjednotky enzymu – HEXA a HEXB a aktivátorovým proteinem). Mutace v genu HEXA postihují alfa podjednotku, ruší aktivitu hexA a způsobují Tay-Sachsovu chorobu, defekty v genu HEXB nebo v genu pro aktivátorový protein poškozují hexA, hexB a způsobují Sandhoffovu chorobu.

Tay-Sachsova choroba má tragický průběh, postižené děti jsou normální do 3-6 měsíců, pak dochází k progresivní neurologické deterioraci a smrti ve 2-4 letech. V lokusu pro hexA byly identifikovány četné alely způsobující mimořádnou klinickou heterogenitu deficiencie hexA. Existují varianty s pozdějším nástupem onemocnění, kdy je přítomno malé množství funkčního enzymu. Chronická forma může nastoupit až v dospělosti, v tomto případě zůstává zrak a inteligence normální.

Mukopolysacharidóza (MPS)

Mukopolysacharidy (neboli glykosaminoglykany, zkratka GAG) jsou polysacharidové řetězce syntetizované buňkami pojivové tkáně jako normální součást mnoha tkání. Jedná se o dlouhá opakování disacharidových podjednotek, jejich degradace probíhá v lysozomech za přítomnosti mnoha enzymů.

Mukopolysacharidózy jsou heterogenní skupinou střeďavých onemocnění, kdy se v lysozomech akumulují mukopolysacharidy, což je způsobeno deficiencí jednoho z enzymů nezbytného pro jejich degradaci. Může se akumulovat jeden nebo více GAGů, kdy je defektní enzym důležitý pro jejich katabolismus, GAGy se objevují v moči – zde mohou být prokázány screeningovým testem.

V roce 1917 byl rozpoznán syndrom Hunterův – X vázaný – autozomálně recesivní syndrom a v roce 1919 těžší autozomálně recesivní syndrom Hurlerové. Fenotyp je reprezentován hrubými obličejovými rysy, postižené děti jsou mentálně retardované s malou postavou a abnormalitami skeletu atd.

Syndrom Hurlerové je označován jako **mukopolysacharidóza I.** (MPS I, synonymum: dysostosis multiplex). Jedná se o defekt: deficit α -L-iduronidázy (defekt v genu kódujícím enzymový protein), kdy dochází k hromadění dermatansulfátu (DS). Klinické projevy se manifestují jako zvětšení lebky, silné vlasy, výraz chrliče (nízké čelo, široký nos, zvětšené rty), slepota, hluchota, mentální retardace, krátký krk, deformity hrudníku, hepatosplenomegalie atd., přičemž spektrum závažnosti klinického projevu je velmi široké, od těžké (m. Hurler) až po mírnou formu (m. Scheie) se zachováním intelektu. Vlastní klinické symptomy Hurlerovy nemoci se rozvíjejí po různě dlouhém asymptomatickém období, většinou začínají mezi 6.- 19. měsícem věku. Postupně se objevuje kraniofaciální dysmorfie (hrubé rysy obličeje, gargoylismus), zpomalení, zástava a regrese psychomotorického vývoje, hepatosplenomegalie, kardiomyopatie často s postižením chlopní, kostní a kloubní změny s poruchou růstu, zákal rohovky, porucha sluchu. Časté jsou pupeční a tříselné kýly a opakované respirační infekty. Onemocnění je infaustní, pacienti umírají většinou před 10. rokem života na kardiorespirační selhání

Scheiova nemoc je klinicky mírnější formou MPS I. Onemocnění začíná kolem 5 let a růst a inteligence jsou normální. Nápadná je tuhost kloubů, zákal rohovky, postižení srdečních chlopní a komprese nervů.

Klinický fenotyp **Hurler -Scheie** začíná kolem 3. roku, růst je opožděn, ale inteligence normální. Typický je zákal rohovky a hluchota. Je zde intermediární fenotyp mezi Hurlerové a Scheieho syndromem.

Léčba je u některých případů možná před výrazným rozvinutím klinických příznaků transplantací kostní dřeně (v případě nalezení vhodného dárce) a u lehčích forem se testuje i dodání chybějícího enzymu; neléčené onemocnění končí smrtí dítěte do 10 let (nejčastěji na srdeční selhání).

Diagnóza MPS I je potvrzena stanovením deficitu aktivity α -L-iduronidázy v leukocytech izolovaných z periferní krve, nebo v kultivovaných kožních fibroblastech. Doplňujícím vyšetřením u případů s potvrzenou diagnózou je analýza DNA. Dochází k akumulaci glykosaminoglykanů v lysozomech a v moči je zvýšené vylučování DS ve dvou frakcích a proměnlivé množství HS (heparan sulfátu). Celkové množství GAG vylučovaných močí se snižuje s věkem pacienta.

Syndrom Hunterův je **mukopolysacharidóza II. typu.** Jedná se o gonozomálně recesivní onemocnění a druhý nejčastější typ MPS. Příčinou je deficit L-iduronosulfátasylasy a hromadění heparansulfátu (HS). Klinické projevy jsou podobné jako u MPS I - u pacientů však není zákal rohovky a degenerace retiny je mírnější. Spektrum závažnosti klinického projevu je velmi široké, od těžké až po mírnou formu se zachováním intelektu. U mírné formy začínají první projevy v mladším školním věku (postižení se mohou dožít i 50 let). Mezi hlavní klinické projevy patří zpomalený růst, flekční držení prstů rukou (vadí při psaní), retinitis pigmentosa, nedoslýchavost a normální intelekt. U těžší formy první projevy začínají kolem 1. - 3. roku, je zde rychlejší progresse onemocnění (postižení umírají do 15. roku života - často na srdeční selhání). Mezi hlavní projevy patří makrocefalie, prominující čelo, široký nos, malformované zuby, makroglosie, krátký krk, hepatosplenomegalie, poruchy sluchu, demence, kardiomegalie, zúžení koronárních cév, hypertrofické dásně. Léčba zatím není dostupná.

Dochází k akumulaci glykosaminoglykanů v lysozomech a v moči je zvýšené vylučování DS ve dvou frakcích a proměnlivé množství HS. Diagnóza MPS II je potvrzena stanovením deficitu aktivity

iduronát-2-sulfatázy v leukocytech izolovaných z periferní krve, nebo kultivovaných kožních fibroblastech. Doplnujícím vyšetřením u případů s potvrzenou diagnózou je analýza DNA, pro potvrzení heterozygotního stavu je však nezbytná. Celkové množství GAG vylučovaných močí se snižuje s věkem pacienta.

Prenatální diagnostika v rodinách s enzymaticky prokázanou diagnózou je možná analýzou choriových klků, plodové vody a amniocytů; doplňujícími vyšetřeními jsou analýza ultrastruktury choriových klků a dvojrozměrná elektroforéza GAG izolovaných z plodové vody.

Test komplementace

Test komplementace se používá pro zjištění, zda je onemocnění se stejnými projevy, ale u různých jedinců způsobené poruchou stejného proteinu nebo jiného proteinu. Pokud v komplementačním testu dojde k vzájemné opravě, genetické defekty se komplementují, postižené geny tedy musí být různé a dochází k **intergenové komplementaci**. Komplementační test nevyžaduje znalost genu nebo proteinu, je schopný zkoumat u buněk korekci mutantního fenotypu během kokultivace buněk. U heterokaryot mohou komplementační testy poskytnout pozitivní výsledek i v případě postižení stejného genu, jedná se o intragenovou komplementaci a pacienti mají různé alelické mutace.

Xenoderma pigmentosum

Jedná se o skupinu onemocnění, která jsou heterogenně podmíněná a dědí se autosomálně recesivně. Postižení mají porušenou schopnost opravovat mutace, konkrétně mají vadný gen zodpovědný za nucleotide excision repair (NER). Frekvence výskytu v Evropě je 1:2 000 000. Pacienti mají 2 000x zvýšenou frekvenci rakoviny kůže indukované slunečním zářením. Mutace se nachází v jednom z 8 genů, 7 z nich kóduje reparační proteiny potřebné pro excizní opravu DNA.

Celkem se vyskytuje se 7 typů XP (značených písmeny A-G), jejichž příčinou jsou mutace genů zodpovědných za NER. Nejčastější jsou A a C (dohromady asi polovina všech XP), méně časté jsou D a F a zbylé tři typy jsou vzácné. Ještě se vyskytuje variantní XP, která je způsobena vadnou DNA polymerázou ϵ .

Defekty receptorových proteinů

Familiární hypercholesterolémie (FH) je v současné době považována především (ale ne výlučně) za receptorovou nemoc. Je to autosomálně dominantně přenášené monogenní onemocnění, jehož základem je buď defekt LDL-receptoru, nebo defekt apolipoproteinu B-100 (FDB), případně odchylka v enzymu nazývaném proprotein konvertáza subtilisin-kexin-9 (PCSK-9). Je charakterizována zvýšením plazmatického cholesterolu přenášeného LDL, hlavním plazmatickým transportním proteinem cholesterolu. Vyhledávání nemocných s familiární hypercholesterolémií je zcela zásadní a zahájení účinné terapie ve specializovaném centru může dramaticky zlepšit jejich prognózu.

Familiární hypercholesterolémie není tak vzácným onemocněním, jak se dříve předpokládalo. Homozygoti se v populaci vyskytují v četnosti 1 : 1 000 000, ale výskyt heterozygotů je odhadován na 1 : 250 až 1 : 500. Homozygoti jsou postiženi více, mohou mít klinicky významnou ischemickou chorobu srdeční v dětství a jen někteří přežijí třetí dekádu života. Heterozygoti mají hladinu

plazmatického cholesterolu asi dvojnásobnou oproti kontrolám. Koncentrace celkového cholesterolu se pohybují kolem 7–10 mmol/l u heterozygotů a kolem 15–30 mmol/l u homozygotů.

V genu pro LDL receptor bylo identifikováno více než 400 různých mutací, rozložených po celé sekvenci genu. Třídy mutací v LDL receptoru můžeme rozdělit do pěti skupin: mutace 1. třídy – nulové alely, receptor se netvoří, mutace 2. jsou označovány jako s poruchou transportu a LDL receptory se akumulují v místě vzniku – v endoplazmatickém retikulu, mutace 3. třídy produkují receptory dosahující buněčného povrchu, ale bez schopnosti vazby LDL, mutace 4. třídy narušují lokalizaci receptoru do povlečené jamky a vázaný LDL není internalizován, mutace 5. třídy jsou alely s defektní recyklací, mutace brání uvolnění ligandu a vede k degradaci receptoru.

Asi 1 z 20 osob v populaci se zvýšeným cholesterolem a hyperlipoproteinemií typu 2 má familiární hypercholesterolémii, většinou se jedná o necharakterizovanou hypercholesterolémii multifaktoriálního původu. Základem léčby je terapie statiny nebo kombinační léčba vysokou dávkou statinu s ezetimibem, někdy i s pryskyřicí.

Poruchy transportu

Cystická fibróza (CF) neboli mukoviscidóza (OMIM: 219700) je multisystémové geneticky podmíněné onemocnění, které se v klasické formě projevuje chronickým onemocněním dýchacích cest, insuficiencí zevní sekrece pankreatu, vysokou koncentrací elektrolytů v potu a obstruktivní azoospermií. Ženy mají sníženou plodnost, více než 95% mužů s CF je infertilních, protože postrádají vas deferens. Tento fenotyp je znám jako kongenitální bilaterální absence vas deferens (CBAVD). Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění.

Cystická fibróza je nejčastější život ohrožující dědičné onemocnění bílé rasy. Výskyt v ČR je odhadován na 1:2500 s frekvencí přenašečů 1 na 25, ročně se tedy narodí 35–45 dětí s CF (všechny případy ale nejsou diagnostikovány). Defektní gen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; OMIM: 602421) se nachází na dlouhém raménku 7. chromosomu (7q31.2) a je velký 250 kb DNA, obsahuje 27 exonů a kóduje protein o velikosti 170 kDa. Tento gen kóduje chloridový kanál. Je známo asi 1000 mutací tohoto genu (u 68 % je mutace $\Delta F508$).

Příčinou onemocnění je porucha transportu iontů apikální membránou buněk (chloridový kanál regulovaný pomocí cAMP). Následkem mutace CFTR je v potu velká koncentrace chloridů a sodíku. V dýchacích cestách, GIT a reprodukčním systému vede zvýšená koncentrace chloridových aniontů k excesivní reabsorpci sodíku. Sodík je pasivně následován vodou a tím dochází k dehydrataci hlenu a tedy ke zvýšení jeho viskozity. Zahuštěním hlenu lze zjednodušeně vysvětlit většinu klinických projevů CF. Periciliární tekutina má být normálně hypotonická, u CF je izotonická, což porušuje schopnost baktericidie a působení antimikrobiálních peptidů (defenzinů). Tímto se vysvětluje iniciální bakteriální kolonizace. Infekce stimuluje buňky k další tvorbě hlenu, a tím zhoršuje obstrukci.

Původci infekce dýchacích cest jsou nejčastěji *S. aureus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* event. *Burkholderia* (velmi rezistentní k ATB). *Pseudomonas* se běžně vyskytuje v zevním prostředí, pacienty osidluje hlavně její mukózní forma. Prevalence pseudomonádových infekcí stoupají s věkem, často se přenáší z jednoho CF pacienta na druhého, a proto se doporučuje striktní separace nemocných s CF. Pro zdravé jedince není pseudomonáda nebezpečná. Některé kmeny *Burkholderia cepacia* vyvolávají tzv. cepacia syndrom (septický s disperzní pneumonií), vede rychle k úmrtí na abscedující pneumonii

a sepsi. Vzácné nejsou ani mykotické komplikace (*Aspergillus*). Tyto infekce vyvolávají závažné chronické změny – trvalé poškozují kapiláry i stěny dýchacích cest. Chronickou bronchitidu komplikují bronchiektázie, atelektázy a emfyzém či chronická pansinusitida, často provázena nosní polypózou. Léčba CF se zaměřuje zejména na kontrolu plicních infekcí a zlepšení výživy.

Poruchy strukturních proteinů

Duchenneova a Beckerova muskulární dystrofie

Duchenneova muskulární dystrofie (DMD) je vrozené dědičné onemocnění charakterizované ztrátou aktivní svalové hmoty. Jedná se o X-vázanou recesivní chorobu. První symptomy se objevují v několika prvních letech života postižených chlapců, první až dva roky života jsou chlapci normální. Vyskytuje se s četností 1:3300 narozených chlapců. DMD je zapříčiněna mutací genu, který má na starost tvorbu specifické strukturální bílkoviny sarkolemy, která se nazývá dystrofin. Svalové dystrofie s její abnormalitou se nazývají dystrofinopatie.

Gen pro dystrofin je lokalizován na krátkém raménku chromozomu X, byl zmapován v 80. letech, celý průběh mapování byl jednodušší než např. u cystické fibrózy právě proto, že bylo známo, že se jedná o onemocnění vázané na pohlaví. Velikost dystrofinového genu je 2300 kb a tvoří 1.5 % X-chromozómu, gen je tvořen asi 87 exony a obsahuje 7 tkáňově specifických promotorů vedoucí k produkci tkáňově specifických a vývojově regulovaných proteinových isoform. Mutační intenzita tohoto genu je vyšší o jeden řád (10⁻⁴) oproti ostatním genům, každý muž produkuje jednu spermii (normální produkce spermií je 8x10⁷ denně) s novou DMD mutací genu každých 10-11 sekund, u 1/3 pacientů vzniká mutace de novo a u 2/3 postižených se jedná o matky přenašečky.

U Duchenneovy muskulární dystrofie dochází k úplnému ukončení tvorby dystrofinu. V rodinách, kde je znám výskyt DMD je možná prenatální diagnostika, tím pádem, pokud je dodržena prevence, nemusí se další postižený chlapec v rodině vůbec narodit.

Mírnější formu nemoci představuje tzv. Beckerova muskulární dystrofie (1:18 000), kdy je dystrofin tvořen sice v malém množství a poškozený, nástup nemoci je pozdější a celková progresse pomalejší (jde o jiný typ mutace v dystrofinovém genu).

NUSSBAUM, MCLNNES AND WILLARD: Klinická genetika Thompson and Thompson. 6. vydání © 2001 by W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, Translation ©Petr Goetz a kol., 2004, ©Triton, 2004. ISBN 80-7254-475-6/Kapitola 9/Kapitola 12

Otázky:

Co je příčinou metabolických onemocnění?

Existuje léčba pro Syndrom Hurlerové , pokud ano, jaká?

Co to Duchenneova muskulární dystrofie?

Popište příčinu Tay-Sachsovy choroby?

Uveďte příklad poruchy metabolismu purinů?

10. PŘEDNÁŠKA

Rakovina: genetické onemocnění

Nádor je výsledkem genetických poruch, které mohou být vyvolány a zhoršovány faktory prostředí (strava, nadměrné slunění, chemické znečištění životního prostředí). Nádory vznikají, když dojde k mutacím kritických genů – to vede k nekontrolovatelné proliferaci buněk. Důsledkem je porucha systému kontroly buněčného dělení. Buňky bez regulace se nepřetržitě dělí a rosou jedna přes druhou. Pokud se uvolňují a napadají další tkáň, jedná se o maligní typ nádoru, pokud nenapadají okolní tkáň, jedná se o benigní typ nádoru. Maligní nádory se v těle šíří a tvoří sekundární nádory v rámci procesu **metastázování**.

Nejrozšířenější typy nádorů jsou odvozeny z populací buněk, které se aktivně dělí – př. epitelální buňky střeva, plic a prostaty. Vzácnější formy nádorů vznikají z populací buněk, které se typicky nedělí – diferencované svalové buňky, nervové buňky. Nádorové buňky lze po odebrání z nádoru kultivovat in vitro neomezeně dlouho.

Nádorové buňky mohou být také odvozené z kultur normálních buněk pomocí karcinogenů (záření, chemické mutageny, viry). Typický neregulovaný růst vypadá tak, že buňky rostou jedna přes druhou a tvoří vícevrstvou buněčnou masu, nereagují na chemické signály, které inhibují buněčné dělení a nemohou tvořit stabilní spojení se svými sousedními buňkami. Mají poruchy cytoskeletu, syntetizují nenormální proteiny, mají abnormální počet chromozómů (aneuploidie).

HeLa buňky (HeLa Cells) představují buněčnou linii lidských epitelových buněk. Byly odebrány v roce 1951 z maligního karcinomu děložního čípku Henrietty Lacksové. Ukázalo se, že se chovají jako tzv. nesmrtelná buněčná linie, tedy jsou velmi invazivní, stále se dělí a to již nepřetržitě od roku 1951. Pro své vlastnosti našly HeLa buňky komerční využití a přežívají Henriettu Lacksovou již více než šedesát let. Později vědci zjistili, že jádro HeLa buněk obsahuje aneuploidní sadu chromozómů. Zatímco normální lidská somatická buňka obsahuje 46 chromozómů, HeLa buňky jich mají 55 (třikrát mají chromozomy 6, 8, 17 a čtyřikrát chromozom 12). Jejich neustálé množení umožňuje ale hlavně aktivita enzymu telomerázy.

Rakovina a buněčný cyklus

Podle současné představy o řízení buněčného cyklu je přechod mezi jednotlivými fázemi cyklu (G1, S, G2 a M) regulován v tzv. **kontrolních bodech**. Kontrolní body jsou mechanismy, které zastavují další postup buněčným cyklem, dokud není dokončen kritický krok (syntéza DNA, oprava poškozené DNA). Významné proteiny pro regulaci buněčného cyklu jsou **cykliny a cyklin-dependentní kinázy (CDK)**. Komplex cyklin/CDK způsobí, že buněčný cyklus postoupí do další fáze. CDK jsou katalyticky aktivní složky mechanismu buněčného cyklu, regulují aktivitu dalších proteinů přenosem fosfátové skupiny, fosforylační aktivita je závislá na přítomnosti cyklinů. Pokud nejsou přítomny cykliny, netvoří se komplex cyklin/CDK a CDK je neaktivní.

Jeden z nejvýznamnějších kontrolních bodů buněčného cyklu se nazývá **START** nebo také kontrolní bod restriktce. Tento bod je na konci G1 fáze, kdy buňka přijímá externí i interní signály k určení, zda je správný čas postoupit do S-fáze buněčného cyklu. V případě přítomnosti poškozené DNA se v tomto bodě buněčný cyklus zastaví a dojde k jejím opravám. Normální buňky jsou naprogramovány k tomu, aby se pozastavily v kontrolním bodě START a zkontrolovaly, zda je oprava

DNA zajištěna. Buňka přijímá externí i interní signály k tomu, jestli se bude dělit nebo ne. Kontrolní bod je regulován cykliny typu D ve spojení CDK4. Působením komplexu cyklin D/CDK4 se buňka dostává za kontrolní bod START a dochází k replikaci. Inhibiční proteiny vnímající problémy v pozdní G1 fázi jako je nedostatek živin nebo poškození DNA, mohou zabrzdit komplex cyklin/CDK a brání buňce ke vstupu do S-fáze. Pokud je vše v pořádku, komplex cyklin D/CDK4 pohání buňku ke konci G1 fáze a do S fáze (iniciace replikace DNA). Nádorové buňky jsou deregulované v důsledku mutací v genech pro cykliny nebo CDK, nebo v dalších proteinech regulujících vznik těchto komplexů. Buňky s nefunkčním bodem START jsou náchylné k nádorovému bujení, vstupují do S-fáze s poškozenou DNA. Během několika buněčných cyklů se tyto mutace mohou akumulovat a způsobit deregulaci buněčného cyklu. Klon buněk s nefunkčním START se může stát velmi agresivním.

Apoptóza je programovaná buněčná smrt, která je součástí normálního programu vývoje. Apoptóza (z řec. apoptosis – padání) je mechanismus sloužící k eliminaci nepotřebných či poškozených buněk (např. během embryonální vývoje při tvorbě prstů). Jedná se o zánik jednotlivé buňky způsobený aktivací cysteinových proteáz **kaspáz** a následně pak jaderných endonukleáz – dochází k poškození jaderné DNA a k zástavě všech biosyntetických pochodů v buňce. Velký význam hraje v ontogenezi, kdy napomáhá k formování orgánů. Apoptóza byla objevena při studiu *C. elegans* a je velice významná v prevenci výskytu nádorů. Pokud je buňka s abnormální schopností usmrcena, nemůže se dále dělit a tvořit nádor. Během apoptózy nedochází na rozdíl od nekrózy k nafouknutí, prasknutí a vylití obsahu buňky, které by způsobilo zánět, ale naopak k její kondenzaci, fragmentaci DNA a rozpadu na malé části, jež mohou být snadno fagocytovány.

Pro apoptózu je klíčová rodina proteolytických enzymů, nazývaných **kaspázy**. Jedná se o proteolytické enzymy odstraňující malé části proteinů štěpení peptidových vazeb, čímž inaktivují cílové proteiny (např. laminy na vnitřní straně jaderné membrány a některé složky cytoskeletu). Dochází k proteolytickému štěpení, buňky ztratí svou integritu, chromatin se rozpadá, na povrchu se tvoří měchýřky s cytoplazmou a buňky se zmenšují. Buňka je pak pohlcena fagocyty, což jsou „popelářské“ buňky imunitního systému. V případě poškození nebo inaktivaci apoptického systému přežívá i mutovaná buňka, která se množí a má potenciál vytvořit nádorový klon.

Apoptóza může být **spontánní** (fyziologická), významná pro redukci buněčných populací v embryogenezi, zánik buněk postnatálně se obměňujících (krevní elementy, enterocyty, keratinocyty...), likvidace buněk v hyperplastické populaci, návrat k normě po hormonální stimulaci nebo redukce buněk při snížené hormonální stimulaci (např. zmenšení mléčné žlázy po ukončení laktace). Nebo existuje **apoptóza indukovaná** patologickým podnětem, uplatní se při likvidaci buněk infikovaných virem TC a NK lymfocyty, numerická atrofie buněk po ucpání vývodů žláz, chemoterapie nádorů.

Nekróza (z řecky Νεκρός = mrtvý) je intravitální (v živém organismu) smrt buněk a tkání. Jedná se o souhrn změn pozorovatelných histologicky až v určitém časovém odstupu po biologické smrti buňky. Nekróza postihuje skupiny na sebe navzájem naléhajících buněk a vzniká jako následek nevratného poškození buněk. Typické znaky nekrózy jsou buněčný edém (buňka se nafoukne), vakuolizace, pokles bazofilie a vzestup acidofilie plazmy, struktury v ní se ztrácejí, karyolýza (rozpuštění buněčného jádra), pokles bazofilie, pyknóza, karyorexe, v okolí nekrózy vzniká reparativní zánět.

Genetická podstata rakoviny

Důkazy o tom, že základní příčiny rakoviny bývají genetické, jsou následující: nádorový stav je klonálně dědičný, některé typy virů mohou u pokusných zvířat indukovat tvorbu nádorů a nádory mohou vyvolávat i látky, které způsobují mutace. Dalším důkazem je i to, že některé typy rakoviny mají tendenci se vyskytovat v určitých rodinách. Např. retinoblastom (nádor oka) nebo nádor střeva se dědí jednoduše jako autozomálně dominantní onemocnění, i když s neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou. Protože dispozice k těmto specifickým typům nádorů je dědičná, je možné, že podstatou všech nádorů by mohly být genetické defekty – buď zděděné mutace, nebo somatické mutace získané během života člověka. Dále se ví, že leukémie a lymfomy (jedná se o rakovinu bílých krvinek), jsou vždy spojeny s výskytem specifických chromozomálních aberací.

K přeměně normální buňky v nádorovou je nutný ne jeden, ale spíše několik genetických defektů. Vědci zkoumající rakovinu identifikovali dvě velké skupiny mutovaných genů souvisejících s rakovinou, tzv. onkogeny, které aktivně podporují buněčný cyklus a tumor-supresorové geny naopak selhávají v potlačení buněčného cyklu.

Onkogeny

Mnoho druhů rakoviny je spojeno se zvýšenou expresí některých genů nebo s abnormální aktivitou jejich mutovaných produktů. **Onkogeny** zahrnují různé skupiny genů důležité pro regulaci biochemických dějů uvnitř buněk a dějů souvisejících s buněčným dělením. Poprvé byly objeveny v genomech virů RNA, ty mohou indukovat nádory svých hostitelů. Později byly objevovány protějšky těchto virových onkogenů u různých organismů včetně člověka. Onkogeny mají dominantní efekt.

Retroviry

V roce 1910 byl objeven Peytonem Rousem první virus indukující nádory – virus Rausova sarkomu. Jedná se o RNA virus nesoucí 4 geny: **gag** (kapsidový protein), **pol** (reverzní transkriptáza), **env** (protein virové obálky), **v-src** (proteinkináza, která se připojuje k plazmatické membráně infikovaných buněk). Pouze gen **v-src** je zodpovědný za tvorbu nádorů. Pokud je z viru odstraněn, je virus stále infekční, ale není schopen vyvolat nádor. Jedná se tedy o onkogen.

Existuje asi 20 různých virových onkogenů – značí se **v-onc** – jsou příbuzné genům kódujícím růstové faktory. Onkogen viru opičího sarkomu **v-sis** kóduje variantu růstového faktoru odvozeného z krevních destiček (PDGFR plateled-derived growth factor). PDGFR se normálně tvoří v krevních destičkách a podporuje hojení poranění stimulací růstu buněk v místě zranění. Geny **v-sis** indukují nádory u opic. Virové onkogeny kódují proteiny, které se podobají růstovým faktorům a hormonálním receptorům, kódují tyrozin-kinázy, transkripční faktory apod.

Protoonkogeny

Protoonkogeny nebo normální buněčné onkogeny jsou buněčné homology virových onkogenů. Označují se **c-onc** (**v-scr je c-scr**) a mají důležité regulační funkce. Jejich identifikace byl umožněna na základě izolace buněčných homologů virových onkogenů.

Buněčný homolog **v-src** byl získán screeningem knihovny genomové DNA neidentifikovaných kuřecích buněk. Gen **v-src** byl použit jako hybridizační sonda. Kuřecí buňky obsahují gen **c-src**, který se podobá **v-src**, je tedy evolučně příbuzný, ale liší se přítomností 11 intronů. V samotném **v-src** není žádný intron. Gen **v-src** se možná vyvinul z normálního genu přičemž ztratil své introny, **v-src** a **c-src** se liší v 18 nukleotidech.

Transfekční test

Důkaz spojení nádorů a mutantních genů **c-onc** byl získán při studiu rakoviny močového měchýře (R. Weinberg). Princip **transfekčního testu**: DNA je extrahována z nádoru a následně fragmentována na malé části, každý fragment je připojen k segmentu bakteriální DNA, který sloužil jako molekulární značka (marker). Označené DNA fragmenty byly zavedeny do buněk rostoucích v kultuře, aby určily, zda některý z fragmentů je schopný transformovat buňky na nádorové. Nádorová transformace je viditelná jako schopnost buněk tvořit malé shluky (ložiska) během kultivace. Z těchto buněk extrahovali DNA a zjišťovali, zda obsahuje molekulární značku napojenou na původní fragment. Pokud ano, opakovaně testovali schopnost fragmentu indukovat nádorový růst. Tak byl identifikován fragment DNA z původního nádoru močového měchýře, který buňky transformoval. Jednalo se o alelu c-H-ras (homolog onkogenu Harveyova kmene viru krysího sarkomu). Fragment byl osekvenován a byla nalezena substituční mutace ve 12 kodonu (záměna valinu za glycin), která způsobuje poškození hydrolýzy substrátu GTP, protein je neustále aktivní a stimuluje buňky k nekontrolovatelnému růstu.

Mutované varianty c-ras jsou typické pro mnoho lidských nádorů (střevo, prsa, prostata, močový měchýř, neuroblastomy). Vždy je mutace přítomna v pozici 12, 59 a 61. Jsou to dominantní aktivátory nekontrolovatelného buněčného růstu a mutovaná je pouze jedna alela.

Chromozómové přestavby a rakovina

Filadelfský chromozóm vzniká reciprokou translokací mezi chromozomy 9 a 22, při níž je protoonkogen ABL z koncové části dlouhého raménka chromozomu 9 fúzován s genem BCR. Gen BCR se nachází na dlouhém raménku chromozomu 22, a jelikož má velice silný promotor, dochází touto fúzí k vzniku aktivního onkogenu. Protein, který je výsledkem přepisu tohoto fúzního genu BCR-ABL je díky přítomnosti silného promotoru exprimován ve velké míře, a buňky jsou tak stimulovány k nekontrolovatelné proliferaci. Filadelfský chromozóm nacházíme velmi často u onkologických pacientů s chronickou myeloidní leukémií.

Burkittův lymfom je lymfom (typ nádorového onemocnění) postihující především B-lymfocyty. Příčinou je reciproká translokace zahrnující vždy chromozóm 8 a jeden ze tří chromozómů 2, 14 a 22, které nesou geny kódující imunoglobuliny. Nejčastěji se vyskytuje translokace 8 a 14 chromozómu – t(8;14), kdy se spojí onkogen c-myc (původně chromozóm 8) kódující transkripční faktor s geny pro těžký imunoglobulinový řetězec (IGH) na chromozómu 14, vzniká fúze IGH/c-myc a mění buňky na nádorové. Je pojmenován po objeviteli tohoto lymfomu, chirurgovi D. P. Burkittovi.

Nádorové supresorové geny

U mnoha nádorů jsou inaktivovány geny, jejichž produkty hrají významnou roli v regulaci buněčného cyklu. Normální alely genů jako jsou **c-ras** a **c-myc**, kódují proteiny, které regulují buněčný cyklus. Když je exprese těchto genů zvýšená, nebo když tyto geny kódují proteiny působící jako

dominantní aktivátory, je buňka disponována k tomu, aby se stala nádorovou. Plný vývoj nádorového stavu ale obvykle vyžaduje další mutace a ty typicky ovlivňují geny, které normálně potlačují buněčný růst. Tyto mutace proto vymezují druhou skupinu genů spojených s nádory, tzv. **antionkogenů** nebo jiným názvem **nádorových supresorových genů**.

Tumor supresorové geny (zvané taky **antionkogeny** nebo **recesivní onkogeny**) mají zásadní úlohu v maligním procesu. Jejich produkty regulují buněčné dělení. K poruše kontroly buněčného cyklu vede chybění obou alel určitého supresorového genu (např. delecí), změna struktury těchto genů (např. bodovou mutací) nebo inaktivace jimi kódovaného proteinu. To všechno může mít za následek maligní zvrát buňky. Mutace v tumor supresorových genech mají recesivní charakter. Na rozdíl od onkogenů proteiny kódované antionkogeny mají antiproliferační účinek, podporují diferenciaci a apoptózu.

V každé somatické buňce je asi 40 tumor-supresorových genů. Aby se staly tumorigenními, musí být mutovány obě jejich alely – proto název recesivní onkogeny. S tím souvisí tzv. dvouzásahová teorie (poprvé formuloval **Knudson**, když vysvětloval vznik vzácného hereditárního retinoblastomu). Na rozdíl od mnohem častějšího sporadického retinoblastomu, kde se jedná o náhodné mutace jedné a posléze druhé alely v buňce sítnice, je u hereditární formy jedna mutovaná alela zděděna, příslušný jedinec je heterozygot, u něhož se zděděná nádorová predispozice zatím neprojevuje. Dojde-li však k mutaci/eliminaci druhé alely, iniciuje se rozvoj nádorového klonu buněk sítnice. Tomuto procesu se říká **ztráta heterozygoty (LOH – loss of heterozygoty)**.

Knudsonova hypotéza dvou zásahů

Klasická teorie vzniku hereditárního nádorového onemocnění vyslovená Knudsonem tedy pracuje s tzv. dvěma zásahy. Tumor-supresorový gen je totiž zcela vyřazen z funkce až mutací obou jeho alel. V případě sporadického výskytu nádorového onemocnění je potřeba, aby byla buňka postižena dvěma zásahy po sobě, které postupně vyřadí obě alely příslušného genu. Naopak, pokud člověk již mutaci jedné alely příslušného genu zdědil (první zásah) - stačí pak v každé tělesné buňce jakýkoliv další zásah ke kompletnímu vyřazení funkce příslušného genu (druhý zásah).

Ačkoliv Knudsonova teorie dvojího zásahu byla všeobecně přijatá jako mechanismus působení pro všechny tumor supresorové geny, úplně na všechny dědičné formy rakoviny nesedí. Proto se v roce 1997 přistoupilo k dalšímu rozdělení těchto genů na dvě skupiny: „gatekeeper“ a „caretaker.“ Autory tohoto rozdělení jsou Kenneth W. Kinzler a Bert Vogelstein.

Gatekeepers – „vrátný“ – je označení tradičního tumor supresorového genu, který přímo reguluje růst nádoru. Pokud jsou obě alely tohoto genu inaktivní, dojde k neřízenému množení buněk (vznikne například nezhoubný adenom tlustého střeva).

Caretakers – „strážce“ – je naopak gen, který neřídí přímo buněčný cyklus, ale funguje jako „opravář“ poškozené DNA. Inaktivace obou alel vede k neschopnosti buňky opravovat genetické poškození, což způsobuje výrazně zvýšené riziko zhoubné mutace.

Celkem existuje asi 20 dědičných nádorových syndromů a téměř u všech je příčinou mutace v nádorovém supresorovém genu, nikoli v onkogenu.

Nádorový supresorový protein pRB

Protein retinoblastoma (pRB) je klíčový pro regulaci buněčného cyklu. Gen RB, lokalizovaný na chromozómu 13q14.2, který normálně zabraňuje vzniku retinoblastomu, bývá spojován i s jinými typy nádorů. RB gen patří mezi nejznámější tumor supresorové geny.

Retinoblastom je zhoubný nádor sítnice. Dvě třetiny retinoblastomů se diagnostikují v prvních 3 letech života, maximum výskytu je v prvním a druhém roce věku. Po šestém roce života se vyskytuje jen velmi vyjíměčně. Téměř ve třetině případů je oboustranně. Incidence je 1 na 20 000 nově narozených dětí. Pokud je retinoblastom v době diagnózy pouze uvnitř oka, je úspěšnost léčby 90–100 %, pokud již retinoblastom zasahuje mimo oblast oka, znamená to 10% přežití.

Produkt genu RB = pRB má velikost 105 kDa. Protein pRB se na počátku G1 fáze váže na transkripční faktory E2F. Dokud jsou transkripční faktory E2F navázány na pRB, nemohou se vázat na specifické sekvence zesilovačů cílových genů a buněčný cyklus je zastaven, pRB je fosforylován cyklin-dependentními kinázami (CDK) a může uvolňovat transkripční faktory E2F, ty aktivují cílové geny a indukují postup buňky do S-fáze. K opětovné aktivaci RB dochází (defosforylací určitými fosfatázami) až během následující mitózy. Geny z rodiny RB (do níž mimo RB patří ještě geny p107 a p130) hrají roli v širokém spektru buněčných dějů, ale nejlépe jsou známy jako regulátory buněčného cyklu savců.

TP53 – transkripční faktor

Gen TP53 (OMIM: 191170) patří mezi důležité tumor supresorové geny. Ovlivňuje genovou expresi na úrovni transkripce a v buňce má funkci senzoru poškození DNA. Nádorovému supresorovému proteinu P53 se přezdívá "strážce genomu", právě pro jeho klíčovou roli v reakci na poškození genomu. Vrozené mutace TP53 jsou spojené s Li-Fraumeniho syndromem, vzácným autozomálně dominantním onemocněním, v rámci kterého se může vyvinout některý z typického spektra nádorů. Tento syndrom se projeví při mutaci obou genů TP53. Somatické mutace inaktivující obě kopie genu TP53 jsou také spojovány s nejrůznějšími nádory.

Protein P53 je jaderný protein o velikosti 53 kDa, patří mezi transkripční faktory a v buňce má funkci senzoru poškození DNA. Při fyziologickém stavu je protein P53 inaktivní a v cytoplazmě je navázán na přenašeč MD2. Při poškození DNA dojde k navození signalizační kaskády, jejímž výsledkem je fosforylace přenašeče MD2 a uvolnění proteinu P53, čímž se P53 aktivuje. V jádře působí na gen p21, jehož produkt působí jako inhibitor cyklin dependentních kináz. Tím dojde k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, což zajistí buňce čas na reparaci (opravy). Pokud proběhne úspěšná oprava DNA, buňka může pokračovat v buněčném cyklu. Pokud je reparace neúspěšná, potom buňka navodí apoptózu, neboli řízenou programovanou smrt.

Recesivní onkogen pAPC

Protein pAPC (310 kDa) byl objeven při studiu adenomatózní polyposis coli, dědičného onemocnění, které vede k vývoji kolorektálního nádoru. Jedná se o brzdu buněčné proliferace, ačkoli mezi jeho základní funkce patří obnovování buněk výstelky tedy epitelu tlustého střeva, pAPC řídí proliferaci a diferenciaci buněk v epitelu střeva.

Pokud je funkce pAPC ztracena, buňky tvořící vychlípeniny ve střevním epitelu zůstanou v nediferenciovaném stavu, pokračují v dělení (vzniká mnoho kopií), výsledné zvýšení buněk vede ke vzniku mnoha malých benigních nádorů střevního epitelu zvaných adenomy nebo polypy.

Predispozice pro adenomy a polypy se dědí jako vzácně autozomálně dominantní onemocnění nazývané dědičná adematózní polypóza (FAP), s výskytem 1:7000. U pacientů s FAP se vyvíjejí mnohočetné adenomy kolem 20. roku života, jsou benigní, ale existuje vysoká pravděpodobnost, že se některý z nich přemění na maligní nádor (u nositele mutace FAP se plně maligní nádor vyvine průměrně ve 42 letech, dle statistiky USA).

Mnohočetné adenomy se vyvíjejí také ve střevě jedinců heterozygotních pro mutaci APC. Druhá mutace vzniká během života, kdy dochází k tvorbě nefunkčního pAPC a buněčné dělení probíhá bez omezení. Pokud není v genomu přítomna mutace v APC genu, mnohočetné adenomy se tvoří vzácně.

Buněčná proliferace indukovaná ve střevním epitelu je nezbytná, tato tkáň ztrácí každý den obrovské množství buněk (1011 u člověka), které musí nahradit. Nově vzniklé buňky normálně ztratí svou schopnost se dělit a postupují do zralé části epitelu (nedostávají extracelulární signály k dělení). Protein pAPC tvoří komplex s β -kateninem, ten je odbouráván a nemůže se vázat na transkripční faktory. Ve zralých buňkách udržuje pAPC nízkou hladinu β -kateninu. V případě mutace pAPC buňky nemohou kontrolovat hladinu β -kateninu a zůstávají neustále ve stavu buněčného dělení, nediferencují se ve zralé buňky a vznikají nádory.

phMSH2

Protein phMSH2, kódovaný genem hMSH2, je lidský homolog bakteriálního a kvasinkového proteinu MutS, který se účastní oprav DNA. Jeho účast na vývoji lidských nádorů byla odhalena při studiu dědičných nepolypózních kolorektálních nádorů (HNPCC) onemocnění s autozomálně dominantní dědičností a četností v populaci 1:500. Pro HNPCC je typický výskyt malého počtu adenomů (rozdíl od FAP). Ztráta funkce hMSH2 byla stanovena jako příčina obecné genové nestability pozorované u nádorů HNPCC. Gen hMSH2 je v nádorech pacientů s HNPCC inaktivní.

MLH1 gen

Gen MLH1 je důležitý pro reparaci DNA a jeho mutace jsou příčinou tzv. Lynchova syndromu 2 asi v 50% případů. Lynchův syndrom 2 patří mezi molekulární varianty **hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu, HNPCC**. Onemocnění má autozomálně dominantní dědičnost s vysokou penetrací, při kterém dochází k časnému rozvoji kolorektálního karcinomu, endometriálního karcinomu a dalších malignit. Na podkladě Lynchova syndromu vzniká zhruba 1–3 % kolorektálních karcinomů, 2 % endometriálních karcinomů. Incidence Lynchova syndromu je poměrně vysoká, odhady se pohybují v rozmezí 1:2000 až 1:550.

Nádorové supresorové geny BRCA1, BRCA2

Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovaria je nejčastěji spojován s mutacemi genů BRCA1 a BRCA2. Jedná se o dědičné formy nádorů, které se vyznačují rychlým růstem a mladým věkem pacientek, projeví se zhruba o 7 – 10 let dříve než je medián výskytu nádorového onemocnění v dané populaci.

Geny BRCA1 a BRCA2 kódují sekvenčně nepříbuzné proteiny, které jsou součástí multiproteinových komplexů významných především pro udržení stability genomu. Gen BRCA1 byl lokalizován v roce 1990 na chromozomu 17q12-21. Jeho sekvence, složená z exonů 2-24, kóduje 7,8 Kb dlouhý transkript a poprvé byla identifikována v roce 1995. Výsledný protein o velikosti 1863 aminokyselin a 220 kDa s E3 ubiquitin ligázovou aktivitou a fosfopeptidovou vazebnou aktivitou je exprimován ve všech buňkách lidského těla se zvýšenou hladinou exprese pozorované zejména v ováriích, varlatech a brzlíku. Gen BRCA2 byl lokalizován v roce 1994 na chromozomu 13q12-13, jeho kódující sekvence složená z exonů 2-27 byla identifikována v roce 1995. BRCA2 kóduje polypeptid o velikosti 384 kDa.

Odhaduje se, že 5 – 10 % nádorů prsu nebo vaječníků je dědičného původu. Asi v 80 % případů je příčina v zárodečné mutaci genu BRCA1 nebo BRCA2. Jejich dědičnost je autozomálně dominantní, to znamená, že je zde 50% riziko přenosu mutace z rodičů na děti. U nosiček mutace v genech BRCA1 a BRCA2 vzniká celoživotní riziko karcinomu prsu a ovárií od 40 do 85 % (pro BRCA1 až 60 %, pro BRCA2 10-20 %). Do 40 let věku onemocní 19 % nosiček mutace genu BRCA1 a 12 % nosiček genu BRCA2. Do věku 80 let se objeví nádor prsu až u 87 % žen a nádor vaječníků až u 40-60 % žen s mutací BRCA1. U mužů je celoživotní riziko karcinomu prsu s mutací v BRCA2 genu 6 %, to znamená 100x vyšší než u normální zdravé populace, zvyšuje se i celoživotní riziko rakoviny prostaty na 14-26 %. U nosičů těchto mutací může být zvýšené riziko i pro jiné malignity, patří mezi ně nádory vejcovodů, dělohy, děložního čípku, kolorekta, žaludku, slinivky, žlučníku a žlučových cest a maligní melanomy.

CDKN2A a CDK4

Oba geny souvisí s onemocněním FAMMM - Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome – syndrom familiárního melanomu. Je známo, že 5-10% ze všech diagnostikovaných případů melanomů je dědičného charakteru.

Gen CDKN2A kóduje proteiny p16 a p14 s tumor supresorovou aktivitou, které vznikají alternativním splicingem. Nejčastější příčinou FAMMM jsou mutace v genu CDKN2A (cyklin-dependent kinase inhibitor 2A) lokalizovaného v oblasti chromozomu 9p21. Další kandidátní gen pro toto onemocnění je CDK4 (cyklin-dependent kinase 4). Zárodečná mutace v těchto genech je nacházena u 20-40% jedinců s FAMMM.

Mutace v genu CDKN2A způsobují v evropské populaci cca 60% celoživotní riziko onemocnění melanomem a průměrně 53x zvýšené (30 – 70krát) riziko oproti ostatní populaci. Kromě rizika melanomů může být u přenašečů mutace zvýšené riziko nádorů pankreatu o 11 – 17%. V některých studiích se uvádí také vyšší riziko nádorů prsu u nosiček mutace genu CDKN2A.

Gen CDK4 kóduje serin-threoninovou kinázu a je lokalizován na chromozómu 12q14, protein je katalytickou podjednotkou protein-kinázového komplexu důležitého pro pokračování G1 fáze. Mutace u FAMMM jsou nacházeny v CDK4 spíše vzácně.

Česká republika dlouhodobě obsazuje 1. místo v Evropě v četnosti výskytu rakoviny tlustého střeva. Nejčastějším zhoubným onemocněním u mužů je karcinom plic; výrazně však přibýlo i karcinomů tlustého střeva, konečníku a prostaty. Snižuje se naopak výskyt karcinomu žaludku. Nejčastějším zhoubným onemocněním u žen je pak karcinom prsu; zářející je výrazný nárůst

nových případů karcinomu plic, povzbuzující je naopak pokles výskytu karcinomu žaludku a nezvyšující se nálezy karcinomu děložního čípku (důvodem jsou především zdokonalené preventivní prohlídky). Každoročně onemocní v České republice rakovinou více než 77 000 lidí (data za rok 2010).

Lékařská charakterizace nádorů je prováděna na základě tří různých hledisek a nazýváme je **typing, grading a staging**.

Typing vychází z hlediska biologického chování nádoru a rozděluje je na maligní – zhoubné a benigní – nezhoubné. Typing z hlediska histologie prozrazuje, z jaké tkáně se nádor původně vyvinul, rozeznáváme mezenchymové nádory, epitelové nádory, neuroektodermové nádory, germinální nádory atd.

Grading je mikroskopické určení stupně diferencovanosti (vyzrálosti) nádoru. Označuje se písmenem G. Jedná se o důležitý prognostický a prediktivní údaj. Obvykle platí, že čím je nádor méně diferencovaný, tím je agresivnější, ale zároveň citlivější k léčbě.

Staging znamená určení rozsahu nádoru. Ke stagingu se používá celá řada systémů, přičemž nejfrekventovanější je systém TNM (T – tumor, N- nodus, M- metastázy). Ve finále tvoří nádory 5 různých stádií s rozdílnou prognózou.

SNUSTAD D.P. AND SIMMONS M.J.: Genetika. Přeloženo za ang. originálu Snustad DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 3.th ed. New York: John Wiley & Sons; 2003. Copyright Czech Edition © 2009, Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2/Kapitola 22

Otázky:

Vysvětlete Knudsonovu teorii dvou zásahů?

Popište funkci proteinu p53?

Co to je protoonkogen?

Jaký je rozdíl mezi onkogeny a tumor-supresorovými geny?

11. PŘEDNÁŠKA

Genetická diagnostika

Genetickou diagnostiku můžeme rozdělit na preimplantační, prenatalní, postnatální a nádorovou.

Preimplantační genetická diagnostika

Preimplantační genetická diagnostika (PGD – Preimplantation Genetic Diagnosis) je relativně nová, vysoce specializovaná metoda určená k identifikaci chromosomálních aberací či monogenně dědičných chorob a to ještě před implantací embrya do dělohy budoucí matky. Tuto metodu je tedy možné použít pouze v souvislosti s programem in vitro fertilizace (IVF) v rámci asistované reprodukce.

Indikací k této metodě je velmi vysoké riziko vrozené chromosomální aberace či závažné monogenně dědičné choroby pro potomka příslušného páru. Dále jde o páry, zatížené dlouhodobě

neúspěšnou léčbou neplodnosti (včetně neúspěšných IVF cyklů), opakovanými potraty apod. Současným trendem je spektrum indikací rozšiřovat.

Provedení metody vyžaduje základní protokol IVF. Materiál k příslušnému vyšetření se získává biopsií: pólového tělíska (typicky v zemích, kde není legislativně povolen zásah do embryí), blastomery (nejčastěji) blastocysty. Následuje molekulárně-genetické či cytogenetické (případně molekulárně cytogenetické) vyšetření získaného materiálu.

Principem metody je implantovat pouze „zdravá“ embrya – což jsou ta, u kterých nebyla v rámci PGD prokázána sledovaná abnormalita (vyloučení mutace sledovaného genu samozřejmě nevyklučuje možnost mutace jiného – nevyšetřovaného genu).

Nevýhodou této metody je limitované množství materiálu k vyšetření (často jen 1 buňka!). Velkým problémem tudíž může být chromosomální mozaika u konkrétního embrya. Tato metoda je vzhledem k zásahu do lidského embrya poměrně kontroverzní a ne ve všech státech je její aplikace legální.

Preimplantační genetická diagnostika a etika

Trendy v PGD jsou následující: využití PGD v případě vyššího věku matky, které využívají pro početí nabídky asistované reprodukce a IVF. U těchto žen dosahuje podíl aneuploidních embryí až 60% s rizikem samovolného potratu až 40%. Takže PGD je cesta pro snížení emocionálních i finančních nákladů. Toto testování je nazýváno PGS – preimplantační genetický skrining (na rozdíl od PGD – preimplantační genetická diagnostika, která se zaměřuje na vyšetřování konkrétních geneticky podmíněných onemocnění). Techniky PGD a PGS se společně nazývají **preimplantační genetické testování**. Dnes nabízí PGS vyšetření všech 24 chromozómů (22 párů autozómů a pohlavních chromozómů) současně. 60% embryonálních transferů s PGD probíhá u žen nad 38 let.

Nejčastější důvody k PGD jsou věk matky, opakované neúspěšné implantace, opakované samovolné potraty, těžká mužská infertilita nebo subfertilita. Velice vhodné využití PGD je v případě výskytu monogenních onemocnění (myotonická dystrofie 1), neurofibromatóza, cystická fibróza, thalasemie, hemofilie, Duchenneova a Beckerova muskulární dystrofie, Syndrom fragilního X.

Chromosomální přestavby se normálně vyskytují u 0.9% nově narozených dětí a souvisí s 50 - 60% spontánních potratů v I. Trimestru. Techniky PGD jsou vhodné zejména pro přenašeče balancovaných a Robertsonských translokací.

PGD se také využívá v případě HLA typizace, konkrétně pro jedince s malignitami typu leukémie a lymfomů, beta-thalasémie, srpkovité anemie apod., případě plánované alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk.

Přístupy pro vyšetření embrya před 6 dnem početí:

1. Vyšetřeno je **polární tělísko** a genetická analýza se týká prvního nebo druhého polárního tělíska. Geneticky normální oocyt je použit pro IVF, jedná se o tzv. prekoncepční diagnostiku, kdy není snížen počet buněk v embryu. Je známo, že 95% aneuploidii vzniká v maternální meióze.

2. Biopsie **blastomery** probíhá ve třetím dnu, kdy má embryo 6-8 buněk, po narušení zóny pelucidy je vyjmuta 1-2 buňky pro genetickou analýzu.

3. Biopsie **trofoektodermu** probíhá v 5.-6. dnu života. Je již vyvinutá 120 buněčná blastocysta a pro analýzu je použito více buněk, což znamená přesnější výsledek. Kultivace probíhá 2-3 dny a neprogredující nebo aneuploidní embrya jsou přirozeně deselektována.

Různé techniky PGD

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a metody na principu PCR jsou vhodné pro cílené vyšetření nejčastějších abnormalit tzn. chromozómů 13, 18, 21, 16, 22, X a Y a monogenních onemocnění. Dnes máme k dispozici nové technologie jako komparativní genomová hybridizace (CGH), microarray CGH, SNP array, metody masivního sekvenování (NGS), které umí vyšetřit celý genom (22 párů autozómu i pohlavní chromozómy) v rámci jednoho experimentu v poměrně krátkém čase.

Velice důležitou roli u PGD hraje čas a přesnost vyšetření. Vyšetření polárního tělíska znamená více času pro laboratoř a méně invazivní přístup pro embryo. Může být ale ovlivněn reprodukční potenciál embrya. 33% a více embryonálních aneuploidí je způsobeno chybami v meióze I, jedná se o nondisjunkce z 10% a PSSC (premature separation of sister chromatids) z 90%, tzn. 90% embryí je euploidních.

Biopsie embrya je naopak více invazivní pro embryo, ale zachytí meiotické abnormality maternální i paternální a také mitotické chyby a někdy i mozaicismus. Provádí se ve 3 a 5 dnech stáří embrya. Úspěch implantace je snížen z 50 na 30%.

Největší limitací PGD je **mozaicismus** embrya. 29% všech embryí jsou genetické mozaiky a mnoho z nich nebude implantováno úspěšně. Implantace embryí vyšetřených ve stádiu blastocytu je bezpečnější.

Biopsie polárního tělíska – zachytí 40% genetických chyb a nejistota výsledku je 45%, biopsie blastomery signifikantně sníží reprodukční potenciál embrya o cca 40%, nejvýhodnější je tedy biopsie trofoektodermu.

Prenatální diagnostika

Počátky **prenatální diagnostiky** se datují do roku 1966, kdy Steele a Breg ukázali, že chromozomální konstituce plodu lze určit analýzou kultivovaných buněk z plodové vody. Prenatální diagnostika obnáší genetické poradenství založené na znalosti rodinné anamnézy a kombinuje ultrazvuková a biochemická vyšetření s genetickými testy v období těhotenství.

Prenatální diagnostika nám umožňuje diagnostikovat řadu chorob a patologií u dosud nenarozeného lidského jedince. Hlavním úkolem prenatální diagnostiky je tak právě (co možná nejčasnější) diagnostika těchto patologických stavů. Na základě zjištěné diagnózy můžeme: informovat matku (rodiče) o diagnóze plodu, její prognóze (jak v těhotenství, tak v postnatálním období) a dalším možném postupu, přijmout specifická opatření pro další průběh těhotenství, pro vedení porodu (porod císařským řezem) či pro následnou péči (porod ve speciálním centru s návazností na akutní chirurgickou či jinou léčbu), zahájit prenatální terapii plodu, v případě nepříznivé diagnózy je v České republice možné v souladu se současnou právní normou (Zákon 66/1986 Sb. – O umělém přerušování těhotenství) těhotenství uměle ukončit z genetických důvodů, a to až do 24. týdne gravidity, ovšem v případě extrémně nepříznivé diagnózy (se životem neslučitelné onemocnění –

např. anencefalie) umožňuje stejný zákon uměle ukončit těhotenství kdykoliv (i po 24. týdnu gravidity). Systematické využití screeningu geneticky rizikových těhotenství a prenatalní vyšetření jejich plodů umožňuje snížit počet postižených novorozenců. Organizace prenatalní diagnostiky vyžaduje součinnost porodníka, laboratorního odborníka a genetika.

Hlavní indikace k prenatalní diagnostice je pokročilý věk matky, předchozí těhotenství s plodem s *de novo* vzniklou chromozomální vadou, přítomnost strukturální chromozomální vady u jednoho z rodičů, rodinná anamnéza dědičného onemocnění, které lze diagnostikovat nebo vyloučit biochemickým nebo DNA vyšetřením, rodinná anamnéza X-vázaného onemocnění, pro které neexistuje specifické prenatalní vyšetření (pak se sleduje pohlaví plodu), riziko defektu neurální trubice, indikativní screening maternálního séra a ultrazvuk.

Neinvazivní vyšetření

Vyšetření fetální DNA z krve matky

V tomto případě je biologický materiál získán z periferní krve těhotné ženy. Mimobuněčná DNA plodu se v krvi matky vyskytuje od 4. gestačního týdne, jedná se o velmi malé fragmenty DNA, které představují zhruba 5-20 % z mateřské mimobuněčné DNA a mizí 24 hodin po porodu. Fetální buňky se v krvi matky nachází od 7. gestačního týdne a přetrvávají i více jak 25 let, zastoupení v poměru k buňkám matky je 0.001%.

Biochemický screening

Neinvazivní metody prenatalní diagnostiky se dobře hodí pro celoplošný screening a používají se k vyšetření u všech těhotných. Jedná se o vyšetření biochemických markerů z periferní krve matky. Odběr krve se provádí po 16. ukončeném gestačním týdnu. Jde o tzv. triple test – v mateřském séru se vyšetřují hladiny alfa-fetoproteinu (AFP), choriového gonadotropinu (hCG) a nekonjugovaného estriolu (uE3).

Zvýšené hodnoty AFP jsou markerem vrozených vad plodu nekrytých kůží – např. rozštěp páteře, snížené hodnoty AFP a zvýšené hodnoty hCG jsou charakteristické pro plody s Downovým syndromem. uE3 odráží celkové riziko těhotenství. Pro přesnější hodnocení jsou odchylky hladiny vyjadřovány v násobcích mediánů (MoM) a pro jejich vyhodnocení byly zpracovány počítačové programy hodnotící nejen délku těhotenství, ale i věk těhotné, její hmotnost a vycházejí z mediánů konkrétní laboratoře.

Invazivní vyšetření je doporučováno, je-li screening pozitivní, tj. při rizicích vyšších než 1:350. Negativní výsledek screeningu znamená, že riziko vyhledávaných vad je nižší než riziko, které je důvodem k invazivnímu vyšetření. Ve II. trimestru se vyšetřují Rh protilátky, krevní obraz, oGTT.

Ultrazvukový screening

Ultrazvukové vyšetření v 6., 13., 20. a 32. týdnu gravidity patří do rámce standardní péče o těhotné. Při zjištění odchylek má být těhotná odeslána ke konziliárnímu ultrazvukovému vyšetření a eventuálně i ke genetické konzultaci. Mezi nepřímé známky svědčící o postižení plodu patří retardace vývoje, málo nebo mnoho plodové vody. Disproporce vývoje jednotlivých částí plodu a jsou indikacemi chromozomálního vyšetření.

Cílené ultrazukové vyšetření je dosud neúčinnější metodou prenatalní diagnostiky. Umožňuje diagnostikovat u plodu např. poruchy vývoje hlavy (anencefalii), rozštěpy páteře, srdeční vady, vady ledvin (ageneze, polycystóza), atrézie močových cest, Turnerův syndrom, s menší jistotou lze zachytit např. rozštěpy rtu, neprůchodnost GIT, menší redukční deformity končetin.

Ve 13.–14. týdnu gravidity se provádí UZ měření nuchální řasy – nuchální translucence. Pomocí UZ se hodnotí tloušťka anechogenní zóny v nuchální oblasti plodu mezi kůží a pojivem, které pokrývá krční páteř. Při ztluštění > 3 mm je zvýšené riziko chromozomální aberace, je tedy indikována prenatalní diagnostika karyotypu plodu (amniocentéza).

V 18.–20. týdnu se provádí změření velikosti plodu (biparietální průměr, obvod hlavičky, délka femuru), nuchální translucence a detekce vrozených somatických vad, aby bylo možno provést potrat do 24. týdne (kultivace u amniocentézy trvá 3 týdny).

Ve 30. týdnu se provádí změření velikosti a polohy plodu, vyloučí se placenta praevia.

Genetická vyšetření v těhotenství - invazivní

Mezi **invazivní vyšetření v těhotenství** patří odběr choriových klků (CVS), odběr plodové vody, odběr fetální krve – kordocentéza, cílená punkce pod UZ-kontrolou a fetoskopie.

Odběr choriových klků (CVS, Chorionic villus sampling) se provádí dříve než amniocentéza, a to zhruba mezi 10. a 13. gestačním týdnem. Odběr choriové tkáně se provádí speciální jehlou pod ultrazukovou kontrolu, nejčastěji transabdominálně, méně často pak transcervikálně (ne v ČR). Výhodou odběru choriových klků (CVS) oproti amniocentéze je možnost časnější diagnostiky (například v návaznosti na prvotrimestrální screening vývojových vad). Kultivace buněk choria (pro cytogenetické vyšetření) je rovněž rychlejší (buňky trofoblastu mají vysokou mitotickou aktivitu a karyotyp lze vyšetřit po přidání kolcemidu po 1–2 hodinách) než kultivace amniocytů získaných amniocentézou. Riziko výkonu je stejné jako v případě amniocentézy (riziko ztráty těhotenství je 0,5–1 %). Určitou nevýhodou CVS je riziko placentárního mozaicismu, který může být zdrojem diagnostických nejistot. Zjištěné chromozomální odchylky proto musí být ještě potvrzeny vyšetřením plodové vody, neboť nález v buňkách trofoblastu nemusí ještě znamenat stejné postižení tkání plodu.

Amniocentéza (AMC) představuje odběr vzorku plodové vody jehlou přes stěnu břišní pod kontrolou ultrazukem. Obvykle se provádí mezi 16. a 18. týdnem gravidity a umožňuje vyšetření kultivovaných buněk i nekultivovaných buněk plodové vody a biochemické vyšetření plodové vody. Z buněk plodové vody lze vyšetřit karyotyp plodu po 10–20 dní trvající kultivaci, biochemické vyšetření plodové vody je zaměřeno především na hodnocení hladiny AFP. Riziko potratu po výkonu je menší než 1 %.

Kordocentéza (CC) neboli punkce pupečnicku je další invazivní metodou. Vyšetření lze provádět až relativně později – obecně od 18. gestačního týdne. Punkce pupečnicku a odběr fetální krve z pupečnickové vény se provádí speciální jehlou pod ultrazukovou kontrolu. Získané krevní elementy (lymfocyty plodu) lze opět užít k vyšetření karyotypu plodu či pro molekulárně genetické vyšetření. Karyotypizace lymfocytů plodu je velmi rychlá, výsledky jsou k dispozici během 48–72 hodin. Kordocentézu lze tak s úspěchem použít pro opakované – rychlé vyšetření karyotypu, pokud předchází odběr s kultivací (amniocentéza, CVS) selhal nebo přinesl nejednoznačné výsledky. Krev plodu je cenným diagnostickým materiálem, který lze mimo jiné použít ke stanovení krevní skupiny

plodu, k diagnostice aloimunizace plodu, infekce plodu či k diagnostice některých dědičných chorob a poruch (např. hemoglobinopatie). Dále umožňuje samozřejmě i vyšetření imunologické (průkaz protilátek) a biochemické (ionty). Riziko výkonu je ve zkušených rukách srovnatelné s rizikem amniocentézy (pod 1 % fetálních ztrát). Punkce pupečníku se užívá jako přístupu v rámci intraumbilikální transfuze, což je terapeutický výkon (prenatální terapie) prováděný například v případě aloimunizace plodu vyvolané často inkompatibilitou v Rh systému.

Vyšetření pomocí **fetoskopie** spočívá v zavedení optického systému (fetoskopu) do amniové dutiny z malého řezu v břišní stěně. Umožňuje vizualizaci plodu a odběr vzorku tkáně (kůže, svaly, játra) pro další vyšetření (podezření na dědičné choroby či vady, pokud není možná DNA diagnostika). Provádí se nejčastěji v 18.–20. týdnu, riziko výkonu 3–10 %. Právě z důvodu vysokého rizika se dnes již jako čistě diagnostická metoda prakticky nepoužívá.

Nutrigenetika

Nutrigenetika, nebo nutriční genetika je nový vědecký obor, který zkoumá závislost účinku jednotlivých složek nebo druhů diety na variantách (polymorfismech) genů jedince. Jedná se tedy o sloučení věd o výživě a genetiky. Klasickým příkladem nutrigenetické interakce je fenylketonurie, kdy nositelé mutovaného genu PAH nemohou přeměňovat fenylalanin na tyrosin. Při minimalizaci přívodu fenylalaninu stravou (tedy dietním zásahem) lze jinak závažným příznakům fenylketonurie prakticky zcela předejít. Konečným cílem nutrigenetiky je optimalizace výběru kvality i kvantity stravy, přizpůsobené individuálně každému pacientovi. Nutriční intervence založená na znalosti jak konkrétního nutričního stavu a potřeb, tak genotypu (individualizovaná výživa) může být užita k prevenci, zmírnění nebo léčení chronických nemocí. Mezi nejčastější potravinové intolerance patří celiakie, fenylketonurie, intolerance laktózy nebo perzistující tolerance laktózy, intolerance fruktózy.

Farmakogenomika

Farmakogenetika/farmakogenomika bývá definována jako obor studující dědičné faktory ve vztahu k inter- a intra-individuální variabilitě lékové odpovědi. Jedná se o podobor spadající do oblasti personalizované medicíny. **Farmakogenomika** studuje působení léků na organismus na základě genetické výbavy člověka, zejm. přítomnosti genových polymorfismů u genů důležitých pro účinek léku či jeho metabolismus. Na jejím základě se podávají např. jen léky, které jsou u konkrétní nemoci u daného pacienta účinné. Uplatňuje se v praxi např. při použití některých cytostatik pro léčbu některých nádorů. K vyšetření se využívá komerčních čipů (microarray), od r. 2005 je vyšetření k dispozici i v ČR: Microarray identifikuje polymorfismy cytochromu CYP450, které jsou zásadní pro metabolismus mnoha léků.

Genetika imunitního systému

Imunogenetika je poměrně mladý vědní obor, vzniklý průnikem imunologie a genetiky. Zabývá se studiem genetické podmíněnosti složek imunitního systému a genetickou regulací imunitních reakcí.

Dědičnost HLA systému se řídí Mendelovským typem dědičnosti. MHC nebo HLA alely jsou lokalizovány na chromozómu 6 (6p21.3) a jsou velice těsně vázány, takže celá oblast se přenáší vcelku jako haplotyp. Jedinec má 2 haplotypy – od otce a od matky. Pravděpodobnost, že 2 děti budou mít stejné haplotypy, je $\frac{1}{4}$. Geny HLA I. třídy a II. třídy jsou kodominantní a známe 5 HLA komplexů: HLA –

A, HLA – B, HLA – C, HLA – D, HLA – DR (D-region related – ve vztahu k oblasti D). Každý z nich má množství alel (dnes známo nejméně 20 alel pro HLA – A, 40 alel pro HLA – B, 8 a více pro zbylé tři). Sada HLA genů na jednom chromosomu tvoří haplotyp, jedinec má tedy dva haplotypy (od každého z rodičů) a v každém haplotypu 5 determinantů.

U pacientů s některými onemocněními se vyskytují některé alely lokusů HLA častěji než ve skupinách zdravých pacientů. Je zřejmá asociace těchto chorob s určitými alelami HLA. Řada těchto onemocnění postihuje klouby, žlázy s vnitřní sekrecí a kůži. Vyšetření HLA je nutné zejména v případě transplantčních programů. Genotypizace je prováděna na dvou úrovních – LR – low resolution (nízké rozlišení) a HR high resolution (vysoké rozlišení).

K nejsilnějším asociacím s HLA systémem patří onemocnění M. Bechtěrev (ankylozující spondylitis), které se vyskytuje spolu s alelou HLA-B27, postihuje a postupně znehybňuje klouby páteře a končetin, zejména kyčelní kloub. Dalším onemocněním jsou spondyloartropatie – chronická systémová zánětlivá revmatická onemocnění, kdy je postiženo pohybové ústrojí, páteř a klouby. Uveitida je zánětlivé onemocnění očí. Ulcerózní kolitida, Crohnova choroba znamená postižení trávicího traktu. Lupénka postihuje kůži. Reiterův syndrom představuje revmatické onemocnění mladých mužů. Mezi další onemocnění asociované s HLA patří: reaktivní artritida, juvenilní revmatoidní artritida, revmatoidní artritida, neurologické onemocnění – narkolepsie a potravinová intolerance lepku - celiakie.

Doporučená literatura: NUSSBAUM, MCLNNES AND WILLARD: Klinická genetika Thompson and Thompson. 6. vydání © 2001 by W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, Translation ©Petr Goetz a kol., 2004, ©Triton, 2004. ISBN 80-7254-475-6/Kapitola 18

Otázky:

Co znamená zkratka PGD?

Které buňky se vyšetřují v rámci PGD?

Popište úskalí PGD?

Proč se dělá prenatální diagnostika?

Vyjmenujte invazivní metody prenatálního screeningu?

12. PŘEDNÁŠKA

Genomika

Genomika je podobor genetiky zabývající se mapováním, sekvenováním a funkční a srovnávací analýzou genomů. Poprvé tento výraz použil Thomas Roderick v roce 1986. Postupně se genomika dělí na strukturní genomiku (studuje strukturu genomu), funkční genomiku (studuje funkci genomu), komparativní genomiku neboli srovnávací genomiku – (studuje evoluci genomu). Funkční genomika zahrnuje analýzu **transkriptomu** (kompletní sada molekul RNA přepisovaných určitým genomem) a analýzu **proteomu** (kompletní sada proteinů kódovaných určitým genomem). Nově vzniká obor **proteomika** – cílem je určení struktury a funkce všech proteinů určitého organismu. Strukturní genomika pracuje již s pokročilými informacemi, funkční genomika je teprve na začátku, ale exponenciálně se rozvíjí.

Korelované genetické, cytologické a fyzické mapy chromozómů

Genetická mapa používá jednotku cM (centimorgan). Genetické mapy jsou sestaveny na základě četnosti rekombinace, kdy 1 centimorgan je roven vzdálenosti odpovídající průměrné četnosti 1% rekombinace. Genetické mapy s malými vzdálenostmi a tedy o vysoké hustotě se sestavují s využitím molekulárních markerů, jako jsou rozdílné délky restričních fragmentů (polymorfismus délky restričních fragmentů, restriction fragment length polymorphisms, RFLP).

Cytologické mapy jsou založeny na rozdílném pruhování jednotlivých chromozómů pozorovatelných pod mikroskopem po jejich obarvení.

Fyzické mapy, jako např. restriční mapy, jsou založeny na molekulových vzdálenostech – párech bází (bp – base pairs), kilobázích (kb = 1000 bp) a megabázích (Mb, 1 milion bp) oddělujících různé oblasti obřích molekul DNA přítomných v chromozómech. Fyzické mapy často vyjadřují umístění překrývajících se klonů neboli kontigů a jedinečných nukleotidových sekvencí nazývaných STS (sequence-tagged sites – místa se sekvenční adresou). Paralelně existují krátké sekvence získané přepisem mRNA do cDNA nazývané EST (expressed sequence tags – místa s expresní adresou). Markery, které byly zmapovány jak geneticky, tak fyzicky se nazývají kotevní markery, protože ukotví fyzickou mapu do genetické mapy a naopak. STS i EST můžeme využít jako hybridizačních sond a propojit tak fyzické mapy do RFLP map a cytologických map.

Mezi fyzickými vzdálenostmi a vzdálenostmi na genetických mapách není přímá korelace, protože četnosti rekombinace nejsou vždy úměrné molekulové vzdálenosti. V euchromatinových oblastech chromozómů je však obojí často v rozumné korelaci. U lidí je 1cM ekvivalentní v průměru asi 1 Mb DNA.

Genetické mapy chromozómů jsou tedy založeny na četnosti rekombinace mezi markery. Cytogenetické mapy jsou založeny na lokalizaci markerů uvnitř nebo v blízkosti cytologicky definovaných znaků chromozómů, viditelných pod mikroskopem. Fyzické mapy chromozómů jsou založeny na vzdálenostech oddělujících markery a jsou definovány v párech bází, kilobází nebo megabází. Pro mnoho chromozómů, včetně všech chromozómů lidských, byly sestaveny mapy o vysoké hustotě (denzitě), integrující genetické, cytologické a fyzické chromozómové mapy.

Poziční klonování genů

Podrobné genetické, cytogenetické a fyzické mapy chromozómů umožňují izolovat geny postupným „procházením“ nebo „přeskakováním“ po chromozómech. **Poziční klonování** se využívá k identifikaci jakéhokoli genu, je-li k dispozici mapa chromozómové oblasti, ve které gen leží. Postup při pozičním klonování je následující: 1. analýza rodokmenu, 2. genetické mapování – určení polohy na chromozómu, 3. fyzické mapování – klony s velkými inzerty ve vektorech YAC a BAC, 4. mapování transkriptu – nalezení kandidátních genů, 5. sekvenování genu – standardní alela studovaného genu a mutovaná alela studovaného genu. Tímto způsobem byly objeveny geny pro cystickou fibrózu nebo Huntingtonovu chorobu.

Projekt lidského genomu

Začátek projektu lidského genomu je datován do roku 1990. Jeho cílem bylo zmapovat všechny lidské chromozómy, sestavit podrobnou fyzickou mapu celého lidského genomu, určit nukleotidovou sekvenci všech 24 lidských chromozómů do roku 2005. Vzniká **HUGO** – organizace pro výzkum lidského genomu (Human Genome Organization).

Postupně klesá odhad počtu lidských genů na 22 287 genů kódujících proteiny. První osekvenované genomy jsou genomy D. Watsona a J.C. Ventera. Nedávno bylo zmapováno 8 dalších lidských genomů různého původu (africký, asijský, evropský). Mezi genomy existuje velká genetická variabilita. 1.1% genomu kóduje sekvence aminokyselin, zbytek je velkou neznámou. Vzniká konsorcium **ENCODE** (Encyclopedia of DNA elements) s cílem identifikovat všechny negenové funkční elementy v lidském genomu.

Asi 60% predikovaných proteinů vykazuje podobnosti s proteiny jiných druhů s osekvenovanými genomy. Více než 40% predikovaných lidských proteinů nese podobnosti s proteiny drozofily a *C. elegans*. Obratlovci mají specifických pouze 94 z 1278 rodin proteinů vykonávajících významné základní buněčné funkce.

Genová banka

V roce 1979 Walter Goad, fyzik, přišel s myšlenkou databáze, která by obsahovala všechny dostupné sekvence DNA. Během let 1982-1992 vkládali Goad a kolegové sekvence do této databáze. Dnes se tato databáze jmenuje **GeneBank** a provozuje ji NCBI (Národní centrum pro biotechnologické informace – the National Center for Biotechnology Information), to je součástí Národní lékařské knihovny (the National Library of Medicine – NLM) při národních ústavech pro zdraví (the National Institutes of Health – NIH) v Bethesda ve státě Maryland. Koncem roku 1982 obsahovala genová banka 680 338 nukleotidových párů, v roce 2008: 90 miliard párů nukleotidů.

Podobné databáze existují v Evropě a Japonsku (Datová knihovna Evropské laboratoře molekulární biologie (the European Molecular Biology Laboratory – **EMBL** – Data Library) byla ustanovena v Německu v roce 1980 a DNA Databanka Japonska (the DNA DataBank of Japan – **DDJB**) byla založena v roce 1984. GeneBank, EMBL a DDJB se následně spojily a vytvořily mezinárodní spolupráci pro databáze nukleotidových sekvencí, která umožňuje prohledávat všechny tři databáze najednou (International Nucleotide Sequence Database Collaboration).

Systém vyhledávání ENTREZ přístupný v roce 1992 NCBI se stal velice užitečným nástrojem a od roku 1994 je ENTREZ zpřístupněn zdarma na internetu (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Stránka obsahuje databáze sekvencí DNA a proteinů a obrovskou bibliografickou databázi nazvanou PubMed, která pokrývá většinu medicínských a vědeckých časopisů.

HAPMAP projekt

Lidský projekt HAPMAP sleduje malé změny v lidském genomu, tzn. jednobázové nebo několikabázové inserce nebo delece. Nejčastější změnou v lidském genomu jsou substituce nukleotidových párů, kdy vznikají takzvané polymorfismy – **jednonukleotidové polymorfismy – SNP** (single-nucleotide polymorphisms). Mohou být detekovány např. pomocí genových čipů.

Většina SNP se nachází v nekódujících oblastech genů a není příčinou mutantních fenotypů. Průměrně se nachází 1 SNP na 1200 bp. Individuální SNP mohou být přítomny v jedné populaci, zatímco v jiné populaci zcela chybí. Jejich četnosti se liší.

Většina SNP známých u lidských populací vznikla u jednoho jedince jedinou mutací, která se rozšířila v celé populaci. Každý SNP je asociovaný s dalšími SNP přítomnými na původním chromozómu v době, kdy došlo k mutaci. Těsně vázané SNP mají tendenci přecházet na potomstvo

ve skupině tedy jako jeden celek (malá pravděpodobnost rekombinace je pro ně typická). SNP na určitém chromozómu nebo na segmentu určitého chromozómu, které se dědí společně, tvoří genetickou jednotku zvanou **haplotyp**.

Haplotypy mohou být asociovány s konkrétními onemocněními, pak mohou sloužit k předpovědi rizika pro vznik daného onemocnění, popř. k identifikaci genu zodpovědného za onemocnění.

Mimojaderná DNA

Mitochondrie jsou semiautonomní organely eukaryotních buněk. Původ mitochondrií se odvozuje od symbiózy Archebakterií (Prokaryota) s eukaryotními buňkami. Během evoluce Archebakterie ztratily schopnost samostatně existovat a naopak pro existenci eukaryotní buňky se jejich přítomnost stala nezbytnou. Jedním z argumentů této tzv. endosymbiotické teorie je analogie v uchování genetické informace v mitochondriích (a chloroplastech) na jedné straně a v prokaryotech na straně druhé.

Mitochondriální DNA se označuje jako mtDNA a její velikost se pohybuje od 6 kb až 2500 Kb. Každá mitochondrie obsahuje několik kopií DNA, každá buňka má mnoho mitochondrií. Oocyt obratlovců obsahuje 108 kopií mtDNA, somatické buňky obsahují méně kopií (méně než 1000). MtDNA je většinou cirkulární molekula, u řasy *Chlamydomonas reinhardtii* a nálevníka *Paramecium aurelia* je mtDNA lineární. U rostlin je mtDNA větší a variabilnější, obsahuje introny, mtDNA živočichů nikdy neobsahuje introny.

Mitochondriální genové produkty jsou funkční uvnitř mitochondrií, ale do mitochondrií jsou importovány také produkty jaderných genů (př. ribozomy). Další polypeptidy potřebné pro aerobní metabolické pochody jsou syntetizovány v cytosolu.

Mitochondriální genom je nositelem mimojaderné dědičnosti. Znaky kódované mtDNA jsou děděny výhradně od matky, jedná se o tzv. matroklinní dědičnost.

Genom chloroplastů je označován jako cpDNA. Plastidy jsou rostlinné organely (zahrnující chromoplasty, amyloplasty, elaioplasty), které se vyvíjejí z protoplastů. Protoplasty obsahují stejnou molekulu DNA. Velikost cpDNA se pohybuje od 120 -160 kb u vyšších rostlin, u řas je to až 2000 kb. Počet molekul cpDNA v bunce je velmi variabilní.

Chloroplastová DNA kóduje geny pro rRNA, tRNA, ribozomové proteiny, polypeptidové komponenty fotosystémů, katalyticky aktivní podjednotku enzymu ribulóza-1.5-bisfosfátcarboxylázy a 4 podjednotky RNA-polymerázy specifické pro chloroplasty. Vývoj funkčního chloroplastu závisí na expresi jaderných i chloroplastových genů.

Doporučená literatura: SNUSTAD D.P. AND SIMMONS M.J.: Genetika. Přeloženo za ang. originálu Snustad DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 3.th ed. New York: John Wiley & Sons; 2003. Copyright Czech Edition © 2009, Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2/Kapitola 16

Otázky:

Co studuje funkční genomika?

Jaké genetické mapy znáte?

Co to je jeden centimorgan a jak se používá?
Popište vlastnosti mitochondriální DNA?

13. PŘEDNÁŠKA

Genetika populací

Teorie genetiky populací je teorie alelových četností. Každý gen v genomu existuje v různých alelových variantách (heterozygoti, homozygoti). V populaci můžeme vypočítat četnosti různých typů homozygotů a heterozygotů v daném genu a z těchto četností určíme četnost alel genu. Tyto výpočty tvoří základ genetiky populací.

Stanovení alelových četností

Pomocí stanovení alelových četností můžeme např. vypočítat četnost krevních skupin M-N s kodominantní dědičností ve vzorku 6129 jedinců, kdy známe přesné počty jedinců s konkrétním genotypem a tedy i jejich krevní skupinu (fenotyp) krevní skupin M je zastoupena genotypem LMLM a 1787 jedinci, krevní skupina MN pak genotypem LMLN a 3039 jedinci a krevní skupina N genotypem LNLN a 1303 jedinci. Celkový počet alel ve vzorku je $2 \times 6129 = 12258$. Četnost alely M se vypočítá jako $(2 \times 1787) + 3039 / 12258 = 0.5395$, četnost alely N je $(2 \times 1303) + 3039 / 12258 = 0.4605$. Pokud označíme četnost alely M jako p a četnost alely N jako q , kdy $p = 0.5395$ a $q = 0.4605$, pak platí, že $p + q = 1$.

Jestliže se studovaný gen nachází na chromozómu X, stačí pouze spočítat různé alely u samčího pohlaví. Například ve vzorku 200 mužů má 24 X-vázanou barvoslepost a všichni ostatní normální barevné vidění. Předpokládáme-li, že každý barvoslepý muž je hemizygotní pro tutéž mutantní alelu, pak četnost této alely je $24/200 = 0.12$ a četnost standardní alely je $1 - 0.12 = 0.88$.

Toto nemůžeme použít u dominantní dědičnosti, kdy nerozpoznáme heterozygoty od dominantních homozygotů. Stanovení alelových četností je možné použít pro **hemizygotní** geny pro výpočet četnosti určité alely u mužů.

Četnosti některých alel jsou velice nízké (0.01 a nižší), pro jejich stanovení potřebujeme velký vzorek populace. Pokud má druhá nejčetnější alela genu četnost vyšší než 0.01 hovoříme o genetickém polymorfismu.

Hardy-Weinbergův zákon

Britský matematik G.H. Hardy a německý lékař W. Weinberg nezávisle na sobě studovali otázky kolem výpočtu alelových četností a jejich prediktivní hodnoty, v roce 1908 každý z nich publikoval práci popisující matematický vztah mezi alelovými a genotypovými četnostmi. Tento se nazývá Hardyho-Weinbergův zákon (princip) a umožňuje z alelových četností v populaci předpovědět její genotypové četnosti.

Předpokládejme, že v populaci je určitý gen, který segreguje dvě alely A a a. Četnost alely A je p , četnost alely a je q . V populaci, kde platí náhodné oplození, se v následující generaci budou tvořit diploidní genotypy náhodným spojováním haploidních vajíček a haploidních spermií, bude pravděpodobnost, že vajíčko nese alelu p a pravděpodobnost, že nese alelu a je q . Pravděpodobnost

vzniku homozygota AA v populaci je $p \times p = p^2$ a pravděpodobnost, že vznikne homozygot aa je $q \times q = q^2$. Heterozygot Aa může vzniknout dvěma způsoby: spermie A se spojí s vajíčkem a, nebo spermie a se spojí s vajíčkem A. Obě tyto možnosti se vyskytují se stejnou pravděpodobností $p \times q$, a proto bude pravděpodobnost vzniku heterozygota $2pq$. Je-li tedy v populaci náhodné oplození, očekávané četnosti tří genotypů v populaci jsou následující: $p^2 + 2pq + q^2$. Vidíme, že se jedná o binomický výraz: $(p + q)^2$ a $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$. Očekávané četnosti se nazývají **Hardyho-Weinbergovy genotypové četnosti**. Podmínkou je náhodné oplození, pak můžeme mluvit o stavu Hardyho-Weinbergovy rovnováhy. Podíl jednotlivých alel se v panmiktické populaci nemění.

Vyjímky z Hardyho-Weinbergova principu jsou následující:

1. **nenáhodné oplození** (příbuzenské oplození) nebo výběrové (asortativní) oplození, redukuje se četnost heterozygotů a zvyšuje se četnost homozygotů, v případě příbuzenského oplození můžeme tento vliv kvantifikovat koeficientem imbridingu (F).
2. **nestejně přežívání**, zygoty vzniklé náhodným oplozením mají různý stupeň přežívání, neočekáváme pak, že jedinci vzniknuvší z těchto zygot, budou odpovídat Hardyho-Weinbergově principu.
3. **rozdělení populace**, populace tvořící jednu skupinu se nazývá panmiktická. Panmixie znamená, že se kterýkoli člen populace může spářit kterýmkoli jiným členem populace, v populaci nejsou žádné geografické nebo ekologické bariéry páření. Alelové četnosti v celé populaci nejsou stejné.
4. **migrace**, jedinci přemísťující se z jednoho areálu do jiného nesou své geny s sebou, dochází k vnášení genů do původní populace.

Přírodní výběr - selekce

Přírodní výběr (selekce) jako hlavní síla a příčina evolučních změn byl poprvé popsán Charlesem Darwinem. Alelové četnosti v populacích se v důsledku selekce systematicky mění při rozdílném přežívání a reprodukci genotypů. Přírodní výběr tedy ovlivňuje schopnost přežití a reprodukce, které společně označujeme jako **zdatnost (fitness)**.

Fitness je parametr označovaný písmenem w . Když $w = 0$, člen populace nepřežije nebo se nereprodukuje; $w = 1$ pokud přežije a zplodí jednoho potomka, $w = 2$, pokud přežije a zplodí dva potomky atd. Průměr těchto hodnot je průměrná zdatnost populace. Rozdíly ve zdatnosti mezi jedinci mohou vést ke změnám struktury populace, pro různou zdatnost zavádíme pojem relativní zdatnosti nebo adaptivní hodnota. Intenzita přírodního výběru je dána selekčním koeficientem, což je koeficient výběru. Vztahy mezi zdatností tří genotypů hmyzu ve dvou různých prostředích jsou následující: genotyp AA má tmavý fenotyp a relativní zdatnosti v hustém lese 1, relativní zdatnost v otevřené krajině je pak $1 - s_2$, genotyp Aa má tmavý fenotyp, relativní zdatnost v hustém lese je 1 a relativní zdatnost v otevřené krajině je $1 - s_2$, genotyp aa má světlý fenotyp, relativní zdatnost v hustém lese je $1 - s_1$ a relativní zdatnost v otevřené krajině je 1. V hustém lese je tedy aa slabším soupeřem vůči AA a Aa. O kolik je slabší, záleží na hodnotě selekčního koeficientu s_1 . Jestliže se s_1 rovná 1, pak genotyp aa je letální (jeho relativní zdatnost je 0) a dá se očekávat, že přírodní výběr bude snižovat četnost alely a v populaci. Pokud je hodnota alely s_1 velmi malá, např. 0.01, pak bude přírodní výběr také snižovat četnost alely a, ale velmi pomalu.

Usměrňující výběr preferuje extrémní hodnoty znaku na jednom konci rozdělení těchto hodnot. Divergentní výběr preferuje extrémní hodnoty znaku na úkor středních hodnot (je to vlastně usměrňující výběr).

Stabilizující výběr – udržuje rozdělení kvantitativního znaku tím, že preferuje střední hodnoty, střední hodnoty jsou spojené s vysokou zdatností a extrémní hodnoty jsou spojené s nízkou zdatností (př. porodní hmotnost u kojenců).

Náhodný genetický posun (drift)

Četnosti alel se v populaci nepředvídatelně mění v důsledku náhodnosti během reprodukce. Náchylnost populace k náhodnému genetickému posunu závisí na její velikosti, ve velkých populacích je vliv driftu minimální, v malých populacích je zásadní evoluční silou.

Vlivem **driftu** se mění četnost heterozygotů tzv. **heterozygotnost**. U diploidních organismů je rychlost ztráty genetické variability náhodným genetickým posunem daná výrazem $1/(2N)$, kde N je velikost populace. Malé populace jsou k driftu citlivější než velké. Drift vede k fixaci jedné alely daného lokusu a ztrátě všech ostatních alel; pravděpodobnost, že alela bude nakonec fixována, se rovná její aktuální četnosti v populaci.

Populace v genetické rovnováze

Evoluční síly – mutace, výběr a drift mohou působit proti sobě a ustavit dynamickou rovnováhu, ve které se četnosti alel nemění. Zvýhodnění heterozygotů umožňuje balancující výběr, příkladem je srpkovitá anemie. Rovnováha mezi mutacemi a výběrem je **dynamická rovnováha** v případě eliminace škodlivých alel vznikajících rekurentní mutací pomocí přírodního výběru. Přírodní výběr působí proti škodlivým alelám v homozygotním i heterozygotním stavu, nazývá se také purifikující výběr. Rovnováha mezi mutacemi a driftem: genetický drift eliminuje variabilitu a mutace doplňují variabilitu. **Heterozygotnost = H, homozygotnost = 1-H.**

Evoluční genetika

Evoluční genetika je samostatný vědní obor. Charles Darwin kdysi vyslovil teorii, že druhy se vyvíjejí přírodním výběrem. Genetická variabilita přírodních populací může být studována na genotypové, chromozómové či molekulární úrovni.

Fylogenetické stromy založené na srovnávání sekvencí DNA a proteinů ukazují evoluční vztahy mezi organismy. Rychlost molekulární evoluce může být zjištěna výpočtem průměrného počtu aminokyselinových nebo nukleotidových změn, které se odehrály v určitém místě molekuly od doby, kdy se dvě linie začaly oddělovat od společného předka.

V evoluční genetice je druh definován jako skupina populací, které sdílejí společný genový fond. Klíčovým procesem **speciace** je vývoj reprodukční izolace mezi populacemi.

Speciace se může odehrávat v případě, kdy jsou populace geograficky oddělené (alopatrické), nebo spolu žijí na stejném území (sympatrické).

Neživotaschopnost nebo sterilita mezidruhových hybridů může být způsobena inkompatibilitou mezi geny, které se změnily v průběhu evoluce druhů.

Doporučená literatura: SNUSTAD D.P. AND SIMMONS M.J.: Genetika. Přeloženo za ang. originálu Snustad DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 3.th ed. New York: John Wiley & Sons; 2003. Copyright Czech Edition © 2009, Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2, kapitola 24 a 25

Otázky:

Co je to genetický drift?

Jak se stanoví alelové četnosti v populaci?

Co říká Hardyho-Weinbergův zákon?

Vyjmenujte výjimky z Hardyho-Weinbergova principu?

Jak je definován v evoluční genetice druh?