

Genom a nemoci

2. 5. 2005

Genomika=nauka o genomu

- **Strukturální genomika**-analýza DNA
- **Funkční genomika**- exprese ve mRNA tkáních
- **Proteomika**-nauka o bílkovinách.

Povaha informace skladované v DNA

- Každé vlákno DNA se skládá s tandemově uspořádaných genů délky 1-2000 kb.
- Geny jsou odděleny spacerovými sekvencemi, jejichž funkce není známa.
- Sekvence jednoho vlákna se přepisuje do komplementární molekuly RNA.

Povaha informace skladované v DNA

- Některé geny **kódují protein**. Jejich transkribovaná RNA se nazývá heterogenní nukleární RNA (**hnRNA**). Ta se upravuje (processing) na mRNA.
- Messenger RNA (**mRNA**) je lineární kód, který je možno převést (translace) do sekvence **AK** polypeptidu pomocí kodonů a antikodonů (o 3 znacích) pro každou AK.

Povaha informace v DNA

- Některé geny **nekódují protein**. Funkce transkribované RNA v tomto případě je:
- **processing** mRNA (malé nukleární RNA čili snRNA)
- **translace** mRNA do proteinu (transfer RNA-tRNA, ribosomální RNA-rRNA). tRNA a rRNA kóduje 3D strukturu ve výsledných produktech RNA, které umožňují jejich funkci.

Syntéza DNA ve zvířecích buňkách

- DNA je ve zvířecích buňkách ve formě chromosomů (1-10cm celkové délky). Každý chromosom má 2000 začátků (origins) replikace. Od každého tohoto místa probíhá obousměrně syntéza DNA. Až se jednotlivé kousky syntetizované z míst začátku replikace setkají, vzniká dceřinné vlákno DNA. Začátky jsou od sebe vzdáleny cca 30-100 μm .
- časová synchronizace syntézy 50000-60000 replikonů v každém genomu.

Struktura NK

- Nukleové kyseliny buňce umožňují:
- 1. **Skladovat informaci** v podobě lineární sekvence nukleotidů.
- 2. **Selektivně** tuto informaci **utilizovat** (daná buňka využívá jen asi 1% dostupné informace).
- 3. **Precisně** tuto informaci **reprodukovat**.

Struktura DNA

- **Báze** A, T (- vazby), G, C (= vazby)
- **Cukry-N-glykosidické** vazby bází mezi C1 deoxyribózy (DNA) a ribózy (RNA) a N1 pyrimidinových bází a N9 purinových bází.
- **Fosfáty** jsou esterifikovány na C5' deoxyribózy a vytvářejí dNMP
- $dNMT + P = dNDP + P = dNTP$

Množství informace v DNA (genomu) savčí buňky

- 3×10^9 bp /haploidní genom
- DNA kóduje sekvence všech proteinů a RNA exprimovaných v libovolném čase v průběhu života organismu. Umožňuje vývoj stovek rozdílných buněčných typů s charakteristickými funkcemi ve všech vývojových a životních stádiích.

Typy tkání podle regenerační schopnosti

- **Labilní** (intermitotické a postmitotické buňky: kůže, sliznice, hemopoetická tkáň, semenný epitel)
- **Stabilní** (reverzibilně postmitotické buňky: Játra-ledviny pankreas, endotelie, mezoteliální buňky, synoviální krycí buňky, vazivová tkáň, lymfocyty s dlouhým poločasem)
- **Permanentní** (irreverzibilně postmitotické buňky- gangliové, svalové, vaječné, plasmatické, makrofágy)

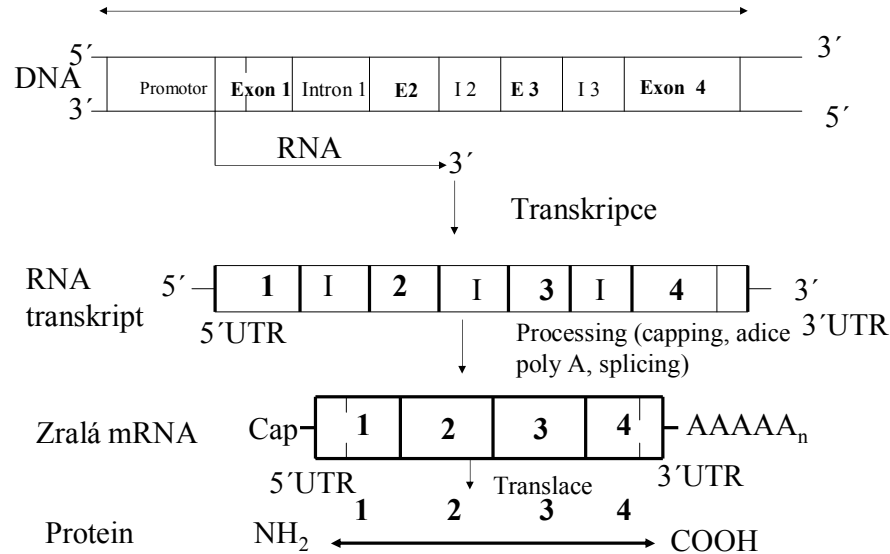
Ztráta kontroly nad syntézou DNA u rakoviny

- Během G1 fáze buněčného cyklu vnímá buňka signály z prostředí (hormony, vitaminy, látky poškozující DNA), které jí „sdělují“, zda vstoupit či nevstoupit do fáze syntézy DNA, replikace DNA a rozdělení buňky na dvě dceřinné. Jakmile se jednou buňka rozhodne replikovat DNA, následuje vždy její rozdělení. Pro buněčný růst a dělení je tedy rozhodujícím mechanismem začátek replikace DNA.

Ztráta kontroly nad syntézou DNA u rakoviny

- Buněčný cyklus je u zdravého jedince regulován tak, že každý buněčný typ v daném orgánu „ví“, kdy přestat s růstem. U dospělého jedince jsou téměř všechny tkáně kontinuálně regenerovány a buňky opět „vědí“, kdy přestat s dělením.
- **U rakoviny buňka selhává ve schopnosti přijmout nebo interpretovat signály prostředí.**

Lidský gen



Typy mutací

- Normální stav
- DNA
- ATGCAGGTGACCTCAGTG
- TACGTCCACTGGAGTCAC
- RNA
- AUGCAGGUGACCUCAGUG
- PROTEIN
- Met-Gln-Val-Thr-Ser-Val
- Mutace typu „missense“
- DNA
- ATGCAGCTGACCTCAGTG
- TACGTG ACTGGAGTCAC
- RNA
- AUGCAGCUGACCUCAGUG
- PROTEIN
- Met-Gln-Leu-Thr-Ser-Val
- **Příklady-hemoglobin S u srpkovité anemie**

Typy mutací

- Normální stav
- DNA
- ATGCAGGTGACCTCAGTG
- TACGTCCACTGGAGTCAC
- RNA
- AUGCAGGUGACCUCAGUG
- PROTEIN
- Met-Gln-Val-Thr-Ser-Val
- Mutace typu „nonsense“
- DNA
- ATGCAGGTGACCTGAGTG
- TACGTCCACTGGACTCAC
- RNA
- AUGCAGGUGACCUGAGUG
- PROTEIN
- Met-Gln-Val-Thr-Stop
- **Příklady: β⁰ thalasemie**

Typy mutací

- Normální stav
- DNA
- ATGCAGGTGACCTCAGTG
- TACGTCCACTGGAGTCAC
- RNA
- AUGCAGGUGACCUCAGUG
- PROTEIN
- Met-Gln-Val-Thr-Ser-Val
- Mutace typu trinukleotidové expanze
- DNA
- ATG(CAGCAGCAG)₂₀CAGGTGACCTCAGTG
- TA(GTCGTCGTC)₂₀GTCCACTGGAGTCAC
- RNA
- AUG (CAGCAGCAG)₂₀CAGGUGACCUCAGUG
- PROTEIN
- Met-(Gln-Gln-Gln)₂₀Gln-Val-Thr-Ser-Val
- **Příklady: Huntingtonova nemoc**

Typy mutací

- Normální stav
- DNA
 - ATGCAGGTGACCTCAGTG
 - TACGTCCACTGGAGTCAC
- RNA
 - AUGCAGGUGACCUCAGUG
- PROTEIN
 - Met-Gln-Val-Thr-Ser-Val
- Mutace typu „frameshift“ (posun čtecího rámce)
 - DNA
 - ATGCAGGTGAACCTCAGTG
 - TACGTCCACTTGGAGTCAC
 - RNA
 - AUGCAGGUGAACCUCAGUG
 - PROTEIN
 - Met-Gln-Val-Asn-Leu-Ser
 - **Příklady: Duchennova**
muskulární dystrofie, β^0
thalasemie Tay-Sachsova
choroba

Typy mutací

- Normální stav
- DNA
 - ATGCAGGTGACCTCAGTG
 - TACGTCCACTGGAGTCAC
- RNA
 - AUGCAGGUGACCUCAGUG
- PROTEIN
 - Met-Gln-Val-Thr-Ser-Val
- Mutace typu „insece“
 - DNA
 - ATGCAGGTG-3000 bp-ACCTCAGTG
 - TACGTCCAC-3000 bp-TGGAGTCAC
 - RNA
 - AUGCAGGUG-3000 bp- ACCUCAGUG
 - PROTEIN
 - Met-Gln-Val-----?
 - **Příklady:**
 - **velké: Hemofilie A**

Typy mutací

- Normální stav
- DNA
 - ATGCAGGTGACCTCAGTG
 - TACGTCCACTGGAGTCAC
- RNA
 - AUGCAGGUGACCUCAGUG
- PROTEIN
 - Met-Gln-Val
- Mutace typu „delece“
 - DNA
 - ATGCAGGTG
 - TACGTCCAC
 - RNA
 - AUGCAGGUG
 - PROTEIN
 - Met-Gln-Val
 - **Příklady:**
 - **malé-cystická fibróza**
 - **velké: DMD**

Třídy mutací u lidské DNA

Třída	Výsledek
<i>1. Genové mutace</i>	
Bodové mutace	
Alterovaná struktura genového produktu (missense, nonsense mutace a porucha RNA splicingu)	Záměna jedné AK. Terminační kodón. Ztráta exonu.
Alterovaná kvantita genového produktu <ul style="list-style-type: none"> • mutace v regulačních sekvencích • mutace v processing RNA • v translaci 	Alterace transkripce. Alterace stability mRNA.
Insece nebo delece <ul style="list-style-type: none"> • 1-2 páry bází(frameshift mutace) • větší počet párů bází 	Posun čtecího rámce. Větší ztráty genu.
Expanze trinukleotidových repeat sekvencí	Alterace produkce nebo s truktury daného genu
<i>2. Chromosomální aberace</i>	Inverze, translokace, duplikace, genetická amplifikace

Typy chorob z hlediska dědičnosti

- „Monogenní“ (mendelistické):
- Vlastnosti:
 - jeden velký genetický faktor, obvykle se projevující již v dětství
 - nízká koncentrace nemoci v populaci (selekce velkého genetického faktoru)
 - mendelistická dědičnost v rodinách

Typy nemocí z hlediska dědičnosti

- Multifaktoriální
- Vlastnosti:
 - několik samostatně neutrálních genetických variant několika genů
 - interakce s prostředím
 - familiární výskyt
 - Civilizační choroby, výskyt v populaci v desítkách procent

Civilizační multifaktoriální choroby

- U všech osob může dojít k rozvoji těchto chorob
- V populaci je vnímavost ("susceptibility") k těmto chorobám odstupňovaná a kontinuální a je odrazem genetické variability, na ni navazující variability biochemických parametrů, fyziologických a patofyziologických procesů v interakci s podmínkami zevního prostředí.

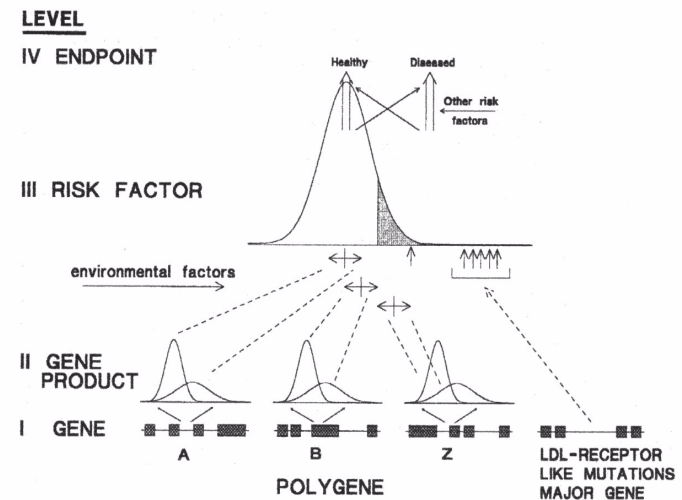
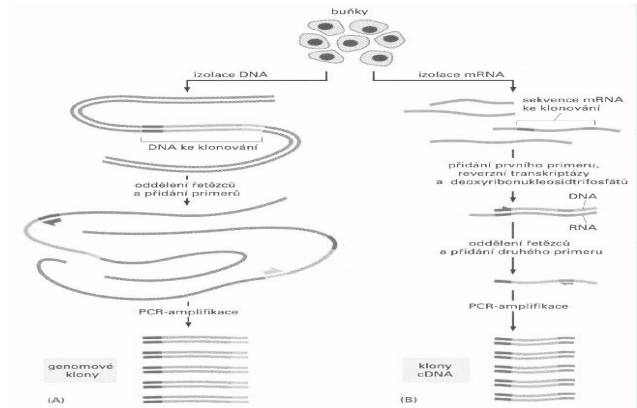


Fig. 1. A general model depicting the role of polygenes, major genes and environmental factors in the aetiology of a chronic multifactorial disease (adapted from Ref. [7] with permission from the authors and Oxford University Press, Oxford). The figure illustrates how genetic variation at level I (in polygenes, indicated by genes A, B...Z and in major genes indicated by LDLR mutations at the right) through altered gene products (level II, indicated by shifts in the distribution) and interactions between them and environmental factors contribute to variations in biological risk factors (level III) and ultimately to disease outcome (level IV). Note that the contribution of polygenic variation to biological risk factor variability is far more than that of major genes.

Civilizační multifaktoriální nemoci

- Protože tyto nemoci zahrnují interakci mnohých faktorů na mnoha hierarchických úrovních příčinnosti, vztahy mezi fenotypy a genotypy jsou komplexní, a to očekávatelně.
- Alelická variabilita genů vyvolávajících malé až střední účinky přispívá k variabilitě biologických rizikových faktorů v populaci mnohem více než mutace v jednom genu s velkým účinkem.



mi oligonukleotidy (primery) které se párují s templátovou DNA na počátku a konci amplifikovaného fragmentu, každý s jiným vláknem původní dvouřetězcové molekuly DNA. Protože primery musí být chemicky syntetizovány, PCR může být použita pouze pro klonování DNA, u které známe alespoň začátek a koncovou nukleotidovou sekvenci. Pomocí těchto primerů nasyntetizuje DNA-polymeráza obvykle několik miliard kopií požadované sekvence. Celá metoda je vysvětlena na obr. 10-22. PCR je velice citlivá metoda, která umožňuje-

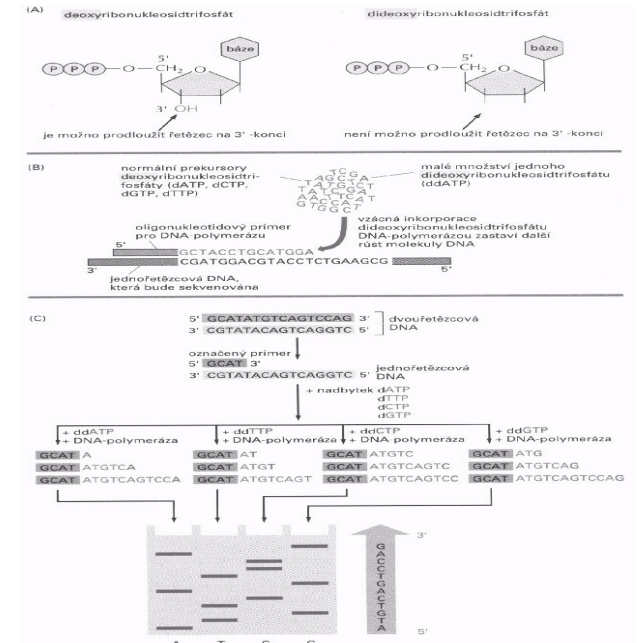
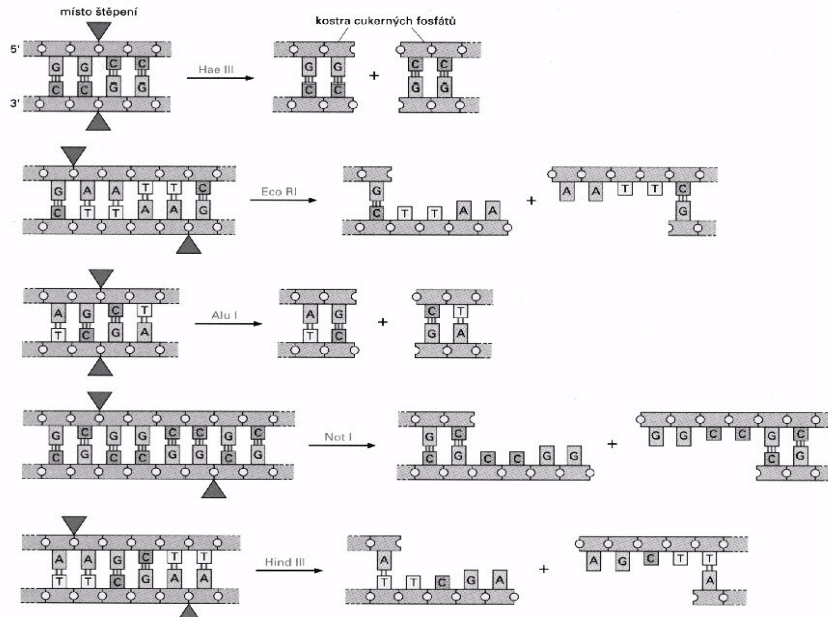
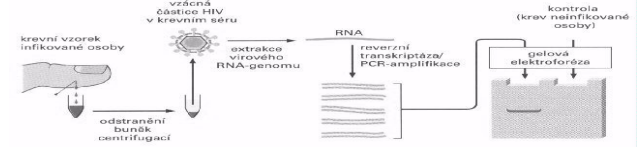


Fig. 1: G(8002)A ET-1: genotypes

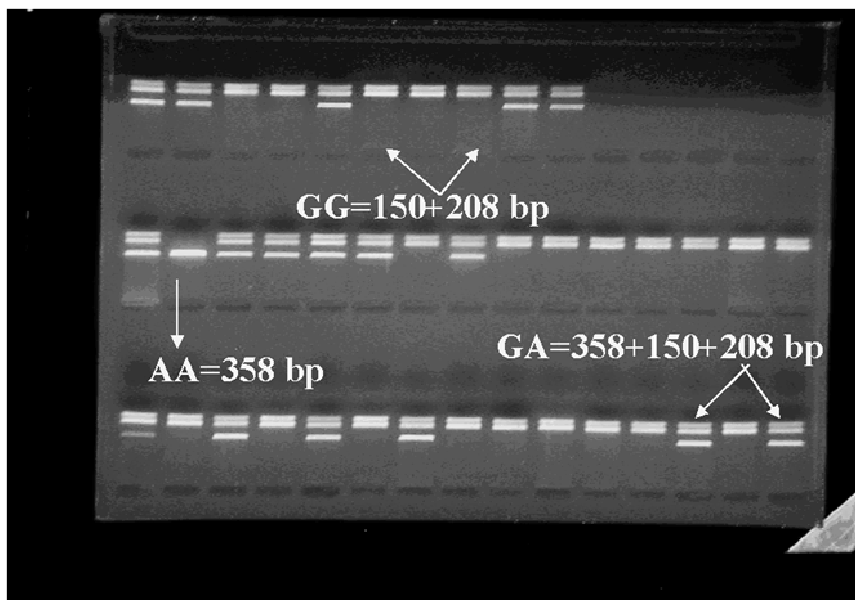
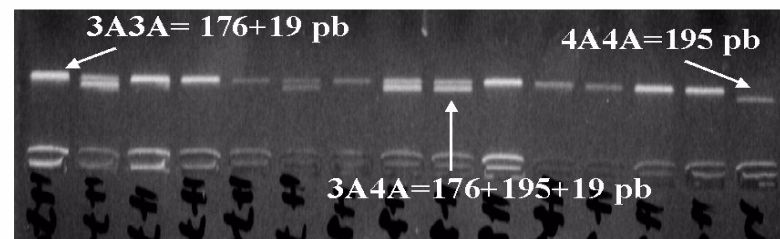
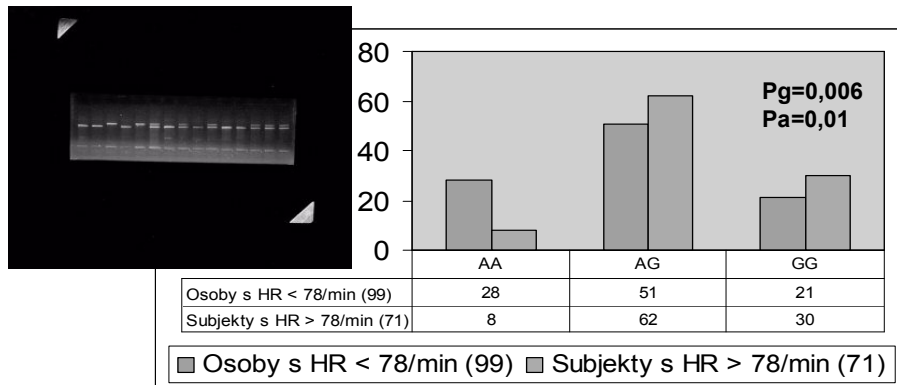


Fig.2: -3A/-4A (-138) ET-1: genotypes



Zdraví čeští dobrovolníci středního věku (41-50 let)
Polymorfismus -596 A/G v genu pro IL-6

Srdeční frekvence

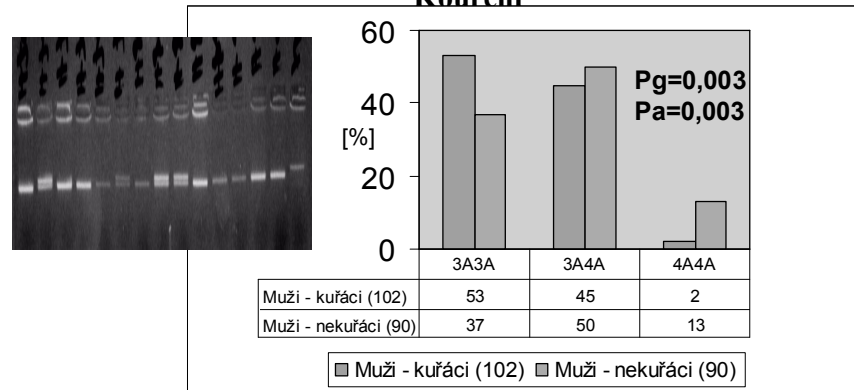


Genotypy AG+GG uvedeného polymorfismu jsou častější u jedinců s vyšší srdeční frekvencí (OR=4,27, 95% KI 1,66-10,98, P=0,0009).

Vašků A et al. *Physiol Res* 2003

Zdraví čeští dobrovolníci středního věku (41-50 let)
Polymorfismus -3A/4A v genu pro endotelin-1 (EDN1)

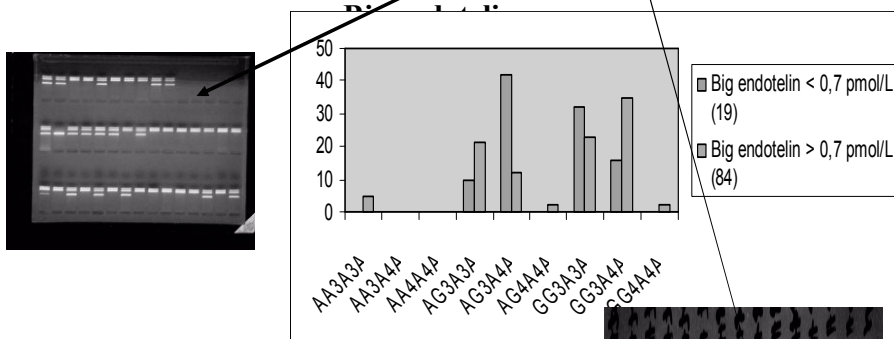
Kouření



Genotypy 3A3A a 3A4A jsou častější u zdravých mužů kuřáků oproti mužům nekuřákům (OR = 7,69, 95% KI 1,67-35,38, P=0,002).

Vašků A et al. *Experimental and Clinical Cardiology* 2003

**Chronické srdeční selhání
Asociovaný genotyp 8002 G/A a -3A/4A EDN -1**

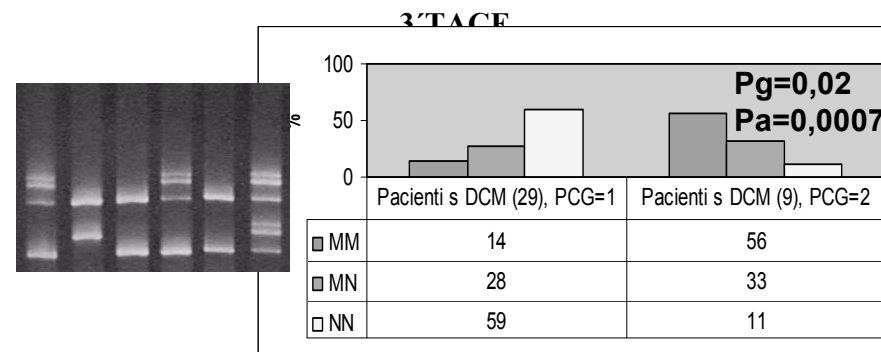


Asociovaný genotyp AG3A4A nese 5x vyšší OR pro chronické srdeční selhání ve skupině s nízkou hladinou big endothelinu oproti skupině pacientů s vysokou hladinou:

OR = 5,38;
95% KI = 1,75-16,58;
P = 0,005

Vašků A et al. *Experimental and Molecular Pathology* 73: 230-233, 2002

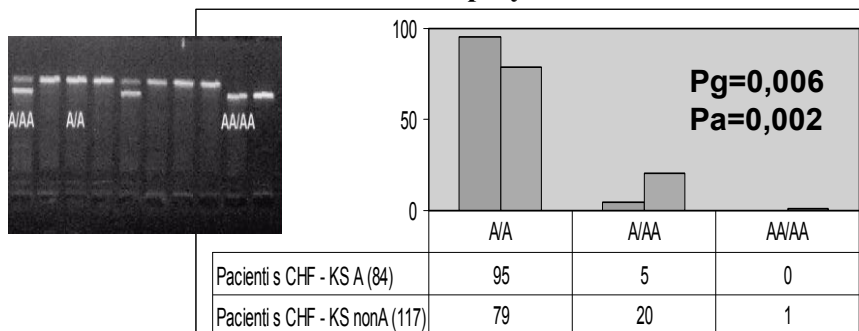
**Chronické srdeční selhání
Dilatační kardiomyopatie (DCM), plicní městnání (PCG)**



Genotyp MM nese 8x vyšší OR pro DCM s PCG=2 oproti DCM s PCG=1: OR=7,81, 95% KI = 1,45-42,17, P=0,02

Goldbergová M et al. *Clinical Genetics*, v recenzi

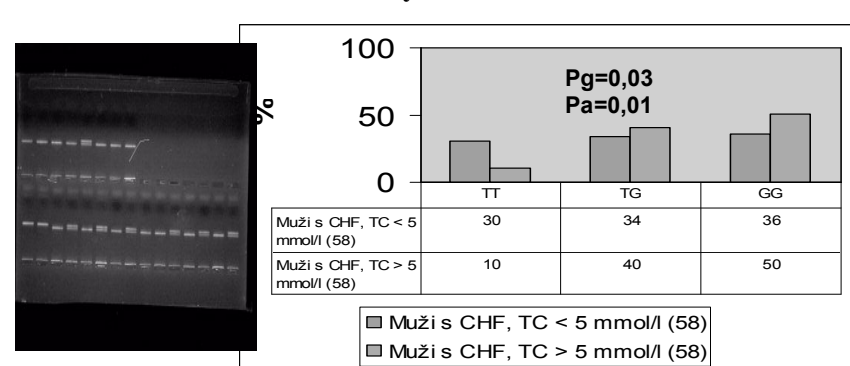
**Chronické srdeční selhání
Polymorfismus RXRα 39526 A/AA
Krevní skupiny ABO**



Alela AA přináší 5x vyšší OR pro pacienty s CHF a krevní skupinou nonA (B+AB+O): OR=5,16; 95%KI 1,72-15,50; P=0,0009

Goldbergová M et al. *Journal of Endocrinology*, v recenzi

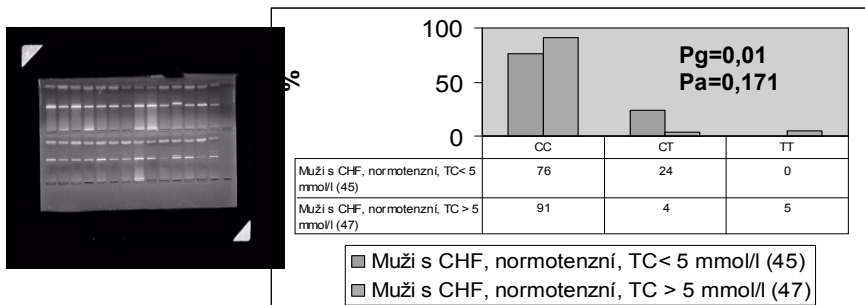
**Chronické srdeční selhání
Polymorfismus -790T/G v genu pro MMP-2
Celkový cholesterol**



Genotypy TG + GG přinášejí 3,59x vyšší OR pro muže s CHF a vyšší hladinou celkového cholesterolu: OR=3,59; 95% KI 1,30-9,93; P=0,009

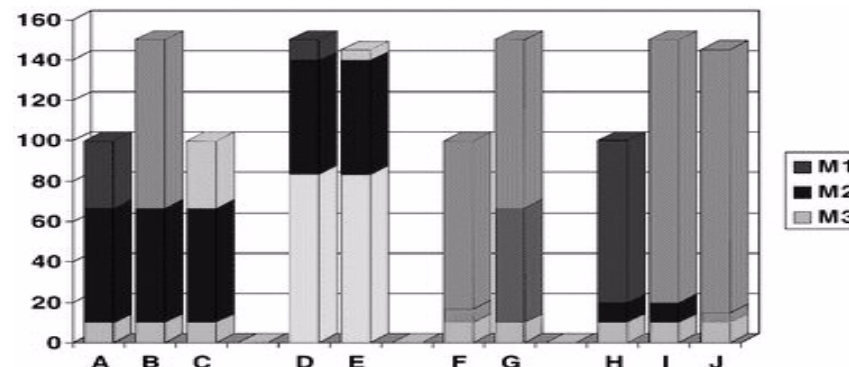
Vašků A et al. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2003

**Chronické srdeční selhání
Polymorfismus -735C/T v genu pro MMP-2
Hypertenze
Celkový cholesterol**



Genotyp CT přináší 7,28 x vyšší OR pro muže s CHF, normotenzi a vyšší hladinou celkového cholesterolu: OR=7,28; 95% KI 1,51-35,03; P=0,006
Vašků A et al. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2003

Model terapie hypertenze (podle Lindpaintnera, březen 2003)



A=fyziologický stav: tři molekulární mechanismy (M1, M2, M3) se podílejí na determinaci znaku (TK), B=hypertenze D1: selhání M1 (příčina/účast)
C=hypertenze D1: kauzální terapie T1 (cílená na M1), D= hypertenze D3: selhání M3 (příčina účast), E=hypertenze D3, léčení T1: terapie není kauzální,
F=hypertenze D1, paliativní terapie T2, cílená na M2, G=hypertenze D1, terapie T2, refrakterní varianta na T2 v M2, H= fyziologický stav: odlišný podíl M1 a M2 na normálním znaku, I = varianta hypertenze D1: selhání M1; J =varianta hypertenze D1: terapie T2

Viz také

- http://www.bio.davidson.edu/courses/Immunology/Flash/RT_PCR.html
- http://www.rvc.ac.uk/Extranet/DNA_1/7_PCR.htm