

Josef Reischig, Jiří Hatina, Marie Ludvíková

OBECNÁ GENETIKA

Praktická cvičení



INVESTICE DO ROZVOJE VZDELAVANI

Popis průběhu spermatogeneze a meiózy u sarančat

Spermatocyty I. řádu po proběhlé S – fázi ($2n, 4C$) prochází prvním meiotickým dělením, v němž dochází ke crossing-overu a ke vzniku dvou dceřiných buněk - spermatocytů II. řádu ($n, 2C$). Mezi prvním a druhým meiotickým dělením nedochází v interfázi k syntéze DNA, a proto ze dvou spermatocytů II. řádu vznikají čtyři spermatidy (n, C). Protože u sarančat je chromozómové určení samčího pohlaví XO , obsahuje polovina spermií jeden X chromozóm a druhá polovina spermií nenese žádný pohlavní chromozóm. Při studiu meiózy se ukázalo, že sarančata jsou velmi vhodným objektem. Mají nízký počet dosti velkých chromozómů. Diploidní počet chromozómů většinou není vyšší než 24. Celá spermatogeneze je sice závislá na teplotě, ale v našich klimatických podmínkách trvá asi 3 týdny. Je proto třeba v tomto období vybrané druhy odchytit a ihned preparovat.

MEIÓZA I - první meiotické dělení (heterotypické dělení)

Profáze I

Profáze prvního meiotického dělení je mnohem komplikovanější a trvá mnohem déle než mitotická profáze. Má 5 rozeznatelných stupňů.

L e p t o t e n e - první stupeň profáze I. Každý chromozóm je velmi dlouhý a obsahuje chromomery lokalizované v kompaktním chromatinu. Ačkoli je přítomno $4C$ množství DNA, v každém chromozómu je zřejmé pouze jedno vlákno. Chromozómy jsou často polarisované a teloméry (konce chromozómů) se připojují k jadernému obalu v blízkosti centriol. Orientace do "kytice" může usnadnit počáteční párování homologních chromozómů (dále jen homologů).

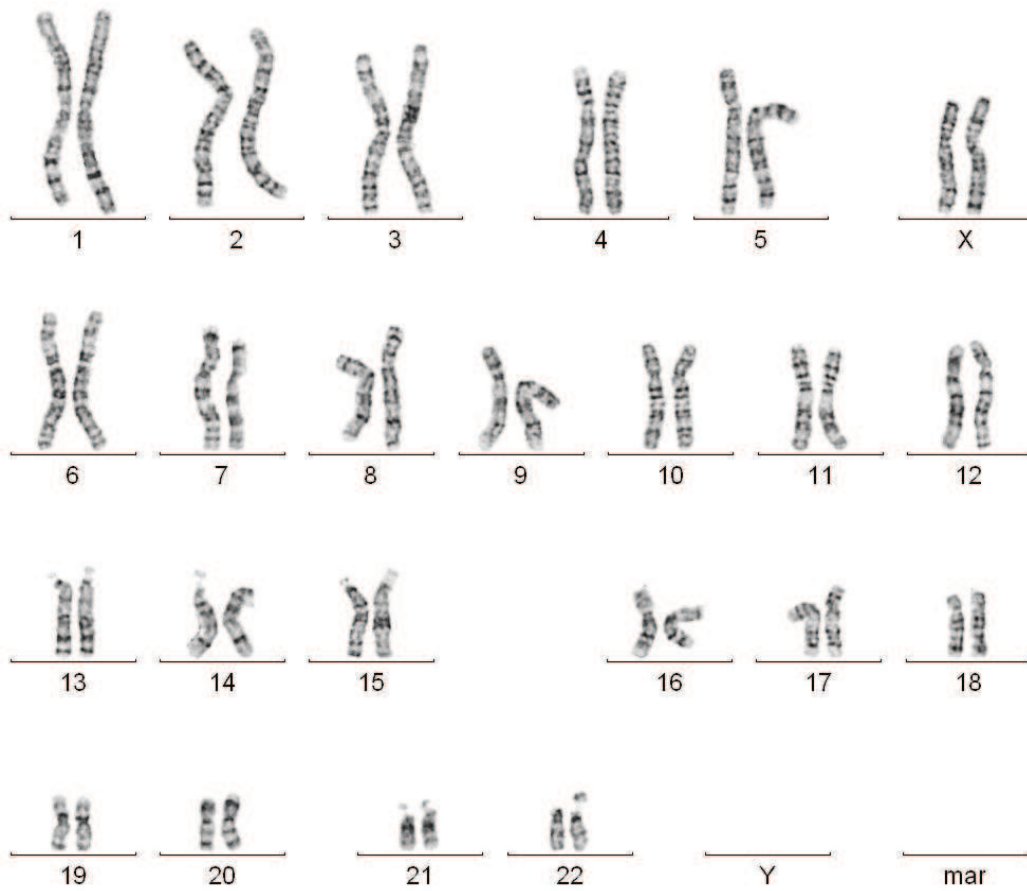
Z y g o t e n e - je charakterizováno párováním neboli synapsí homologů. Synapse začíná vždy podél chromozómů, ale nejčastěji se vyskytuje u vzájemně si odpovídajících párů chromozómů. Autozómy se začínají více kondenzovat.

P a c h y t e n e - začíná v okamžiku kdy je párování ukončeno. Homologní chromozómy jsou kratší a silnější a těsně se stáčí jeden kolem druhého. Každý pár homologů je označován jako "bivalent". Ve spermatocytu sarančat, které budete pozorovat v úloze 2.2., se vyskytuje jediný nespárovaný chromozóm, který je více barvitelný než autozómy a je označován jako "univalent". Během pachytenního stádia se uskutečňuje výměna genetického materiálu - crossing over (viz). V pozdějším pachytenu se útvar "kytice" ztrácí.

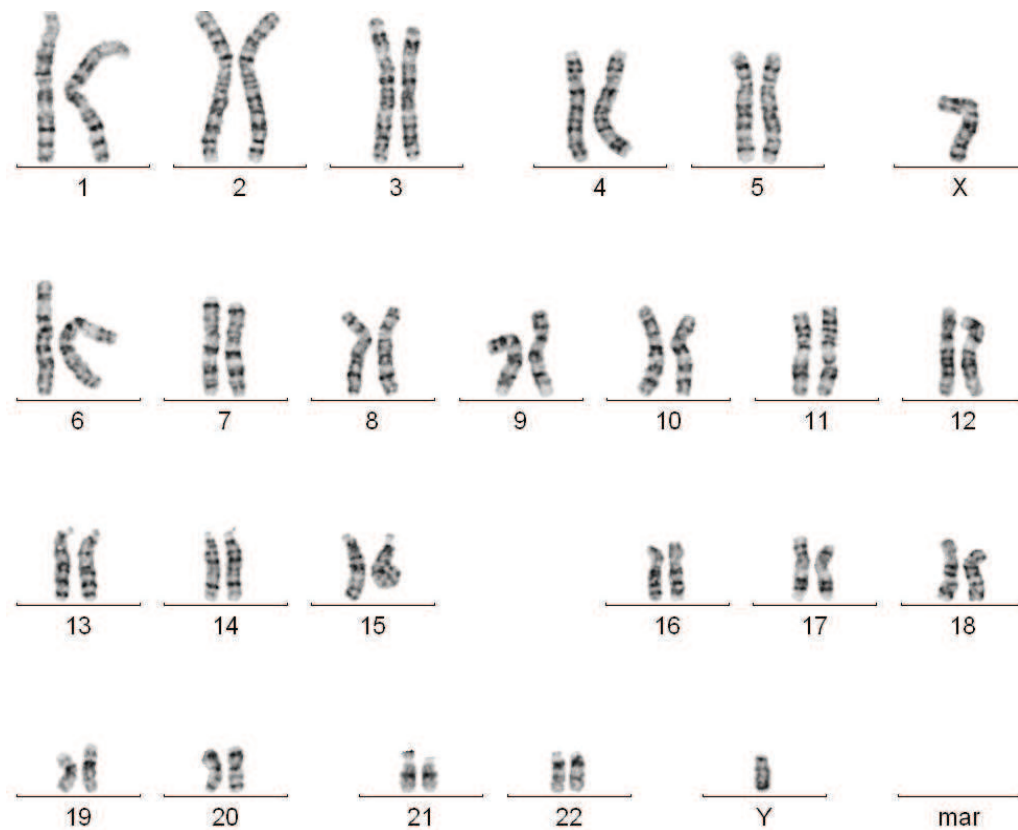
D i p l o t e n e - je typické dvouvláknové stádium, kde zanikají párovací síly a každý bivalent se rozvíjí. Jak jméno tohoto stádia naznačuje, nyní je patrné zdvojení každého chromozómu. Dalším rysem diplotenního stádia je chomáčkovitý vzhled každé chromatidy. Dvě chromatidy z každého homologa jsou nazývány "sesterské" chromatidy a chromatidy z různých homologů "nesesterské". V jednom nebo více bodech jsou u každého bivalentu křížem spojené nesesterské chromatidy. Tyto body se nazývají chiazmata. Každé chiazma reprezentuje bod genetické výměny (crossing over).

D i a k i n e z e - poslední stádium profáze I. Chromozómy jsou více kondenzovány a bezchmýřkaté. Přesto však přechod mezi pozdním diplotenem a ranou diakinezí není vždy jasný. Jak v diplotenu, tak i v diakinezi se může poloha některých chiazmat měnit následkem odpudivé síly homologů a samozřejmě jejich centromer. Chiazmata, která zpočátku byla ve středu ramene, se mohou pohybovat nebo plynout podél bivalentu směrem ke konci. Tento úkaz se nazývá terminalizace chiazmat. Konečná morfologie bivalentů závisí na délce chromozómů, počtu a počátečním umístění chiazmat a rozsahu terminalizace. V pozdní diakinezi se rozpouští prvopočáteční jaderná membrána a formuje se vřeténko. Spárované homology (bivalenty) se pohybují směrem k ekvatoriální rovině.

Příklady: Normální ženský karyotyp (46, XX) (fotografii poskytl Ústav lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň)



Normální mužský karyotyp (46, XY) (fotografii poskytl Ústav lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň)



5.2. Mutací způsobené změny v polypeptidovém řetězci tryptofansynthetázy u E.coli.

Do obrázku 5.1. nejdříve doplňte všechny kodony (viz tab.5.1.) u mRNA odpovídající zaměněným aminokyselinám, které se do označených poloh inkorporovaly vlivem mutací. Potom teprve zvažte, jaké nejpravděpodobnější mRNA kodony odpovídají původním aminokyselinám a doplňte je do obrázku 5.1. Na závěr запиšte, jakým způsobem se tyto změny projeví ve stavbě a funkci syntetizované bílkoviny (viz tab.5.1.2.). Změny, které nejvíce ovlivnily stavbu a funkci bílkoviny označte křížkem. Při tomto hodnocení předpokládejte, že v bílkovině vždy nastane pouze jediná změna v aminokyselinové sekvenci.

Při řešení postupujte podle vzoru ve dvou prvních vyřešených řádcích.

Tab. 5.1. Genetický kód

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

* STOP = terminační kodony (UAA, UAG, UGA), kodon UGA někdy slouží pro zařazení selenocysteinu (Sec)

⁺AUG = iniciační kodon (AUG)

Tab. 5.2. Chemické vlastnosti 21 aminokyselin, které se vyskytují v proteinech.

| | |
|------------------------------------|-------------------|
| Hydrofobní nepolární aminokyseliny | |
| alanin - Ala | fenylalanin - Phe |
| valin - Val | izoleucin - Ile |
| leucin - Leu | tryptofan - Trp |
| prolin - Pro | methionin - Met |
| glycin - Gly | |
| Tvorba S-S můstků | |
| cystein - Cys | |
| Tvorba Se-Se můstků | |
| Selenocystein - Sec | |

6.4. Dědičnost krevní skupiny MN. Člověk nemá tolik potomků, aby štěpné poměry bylo možné hodnotit v jednotlivých rodinách. Pro hodnocení štěpných poměrů musíme proto analyzovat expresi znaku u potomků v dostatečně velkém souboru rodin se stejným genotypem rodičů.

Mendelovská dědičnost u člověka byla dokumentována v klasických studiích dědičnosti krevních skupin. Výsledky vyšetření krevních skupin dětí v rodinách s oběma rodiči krevní skupiny MN jsou uspořádány do připojené tabulky. Zhodnocením celého souboru rodin určete typ dědičnosti antigenů krevní skupiny MN a očekávaný štěpný poměr.

(Adaptováno s laskavým dovolením podle: Kotlas et al: Návody a úkoly k praktickým cvičením z lékařské biologie a genetiky, Karolinum Praha 2009)

| rodina | krevní skupiny dětí |
|--------|------------------------------------|
| 1 | syn N, dcera M |
| 2 | dcera MN, syn M |
| 3 | dvě dcery MN, syn M a druhý syn MN |
| 4 | dva synové MN, dcera N |
| 5 | syn M, dcera N, syn MN |
| 6 | syn i dcera N |
| 7 | dcera M, syn MN |
| 8 | syn M, dcera MN |
| 9 | dvě dcery MN |
| 10 | syn M, dcera MN |
| 11 | syn MN, dcera M |
| 12 | dcera MN |
| 13 | dvě dcery M, syn N |
| 14 | syn MN, syn N |
| 15 | dva synové MN |
| 16 | syn M, syn N, dcera N |
| 17 | syn M a tři dcery MN |
| 18 | syn a dcera MN |
| 19 | dva synové MN, dcera M |
| 20 | syn MN, dcera M, dvě dcery N |

6.5. Dědičnost achondroplazie. Achondroplazie představuje středně závažnou formu nanismu s typickými krátkými končetinami, při zachování fertility. Tento fenotyp se dědí dominantně, choroba je ovšem rovněž homozygotně letální. Jaké potomstvo a v jakém poměru budete očekávat od sňatku dvou achondroplazických jedinců?

| | | | |
|-------------------|---|-------------------|---|
| $\frac{ABC}{abc}$ | x | $\frac{abc}{abc}$ | vazbová fáze cis (v původní terminologii z r. 1911 tzv. coupling) |
|-------------------|---|-------------------|---|

| | | | |
|-------------------|---|-------------------|--|
| $\frac{AbC}{aBc}$ | x | $\frac{abc}{abc}$ | vazbová fáze trans (v původní terminologii z r. 1911 tzv. repulsion) |
|-------------------|---|-------------------|--|

| | | | |
|-------------------|---|-------------------|--------------------------------|
| $\frac{ABc}{abC}$ | x | $\frac{abc}{abc}$ | vazbová fáze trans (repulsion) |
|-------------------|---|-------------------|--------------------------------|

| | | | |
|-------------------|---|-------------------|--------------------------------|
| $\frac{Abc}{aBC}$ | x | $\frac{abc}{abc}$ | vazbová fáze trans (repulsion) |
|-------------------|---|-------------------|--------------------------------|

G E N E T I C K Á M A P A představuje pořadí genů, popř. jiných definovaných lokusů na chromozómu a relativní vzdálenosti mezi nimi v cM; genetická vzdálenost mezi lokusy se označuje symbolem θ (théta). Genetická mapa je sestavena genetickým mapováním, tj. zjištěním frekvencí rekombinace mezi jednotlivými lokusy.

F Y Z I K Á L N Í M A P A představuje pořadí genů, popř. jiných definovaných lokusů na chromozómu a relativní vzdálenosti mezi nimi v párech bází DNA, popř. v kilobazích (Kb = 1000 pb) či megabazích (1 Mb = 1 000 000 pb). Pro člověka přibližně platí, že vzdálenost 1 cM genetické mapy je ekvivalentní vzdálenosti 1 Mb fyzikální mapy. Jedním ze způsobů fyzikálního mapování je tzv. somatická hybridizace.

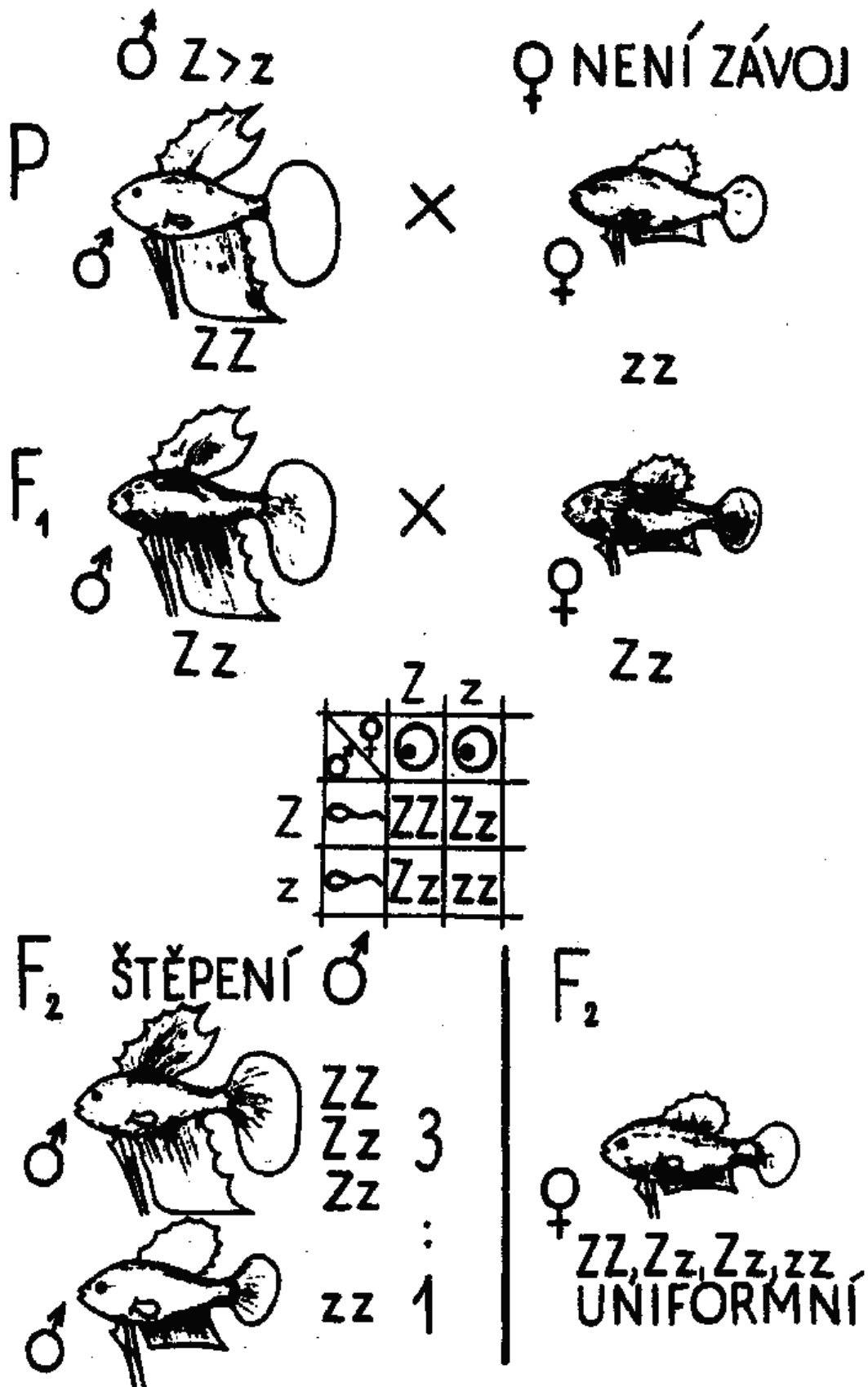
S O M A T I C K Á H Y B R I D I Z A C E představuje speciální postup, jakým můžeme přiřadit jeden nebo více genů či jiných definovaných lokusů na konkrétní lidský chromozóm či jeho část. Metoda je založena na fúzi dvou různých buněčných kultur pěstovaných in vitro, které jsou často odvozeny z organismů různých druhů (často jsou např. lidské buňky fúzovány s buňkami myši či křečka). Vzniklý fúzní produkt, tzv. heterokaryon, je geneticky nestabilní a během prvních buněčných dělení spontánně ztrácí chromozomy. Z jedné fúze tak můžeme získat rozsáhlou sestavu buněčných klonů, které se liší jednotlivými konkrétními chromozomy, které byly takto ztraceny. Geny lokalizované na témže chromozomu budou vždy ztraceny současně.

L O D S C O R E představuje způsob vyjádření genetických vzdáleností lidských genů. Hodnota lod score odpovídá desetinnému logaritmu podílu pravděpodobnosti, že dva genové lokusy jsou geneticky vázány ve vzdálenosti θ , a pravděpodobnosti, že ve vazbě nejsou ($\theta = 0,5$).

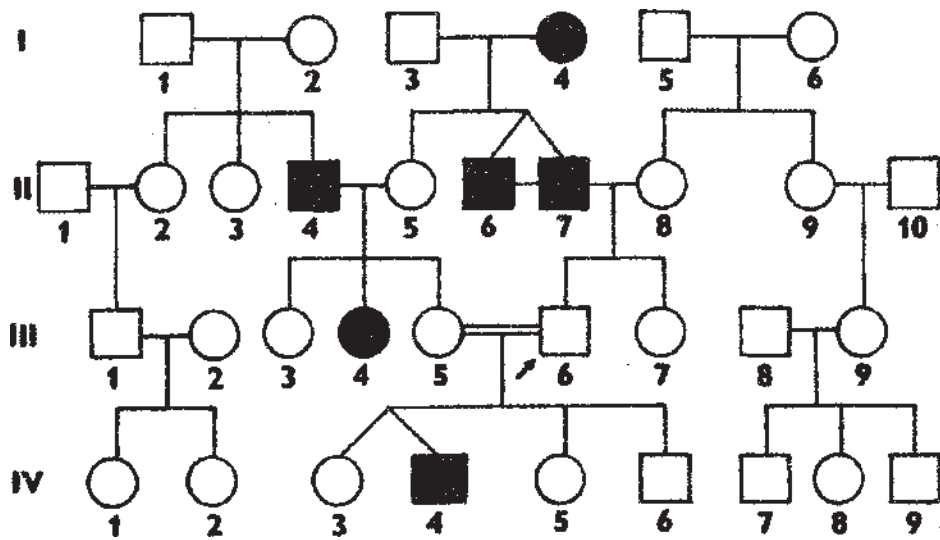
$$\text{lod score} = \log_{10} \frac{P(\theta)}{P(0,5)}$$

Při analýze vazby metodou lod score se obvykle provádí počítačová simulace různých vzdáleností θ a pro každou z nich se vypočítává hodnota lod score. Maximální hodnota lod score pak udává spolehlivost vypočítané hodnoty vazby; lod score 3 znamená, že pravděpodobnost, že dva geny jsou ve vazbě je tisíckrát větší než pravděpodobnost, že vázány nejsou. Hodnota genetické vzdálenosti odpovídající maximální hodnotě lod score pak představuje nejpravděpodobnější genetickou vzdálenost mezi analyzovanými lokusy.

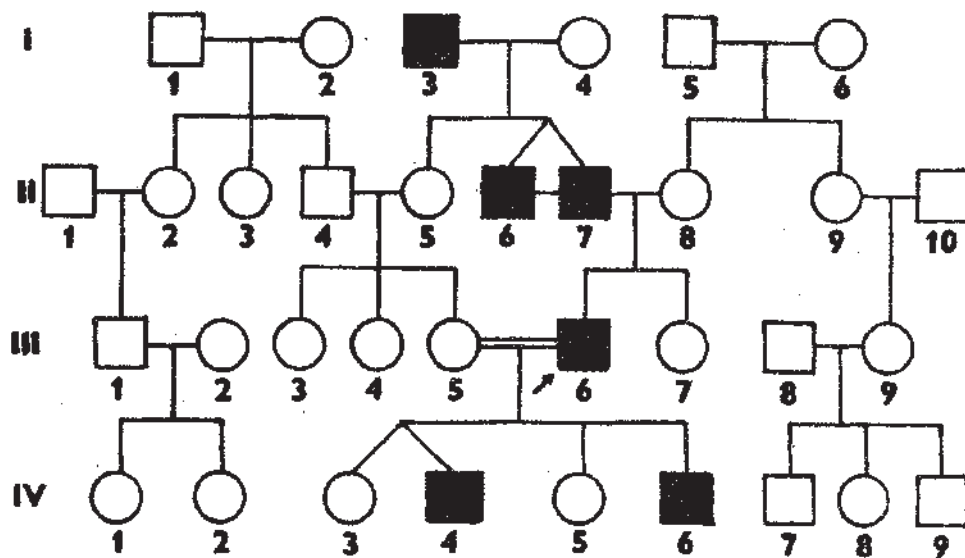
Obr. 9.1. Dědičnost délky ploutví u druhu *Betta splendens*. Dědičnost pohlavně ovládaná.



Obr. 10.5. Gonozomálně recesivní (GR) typ X vázané dědičnosti.



Obr. 10.6. Holandrický typ Y vázané dědičnosti.



Inhibice:

| | | | | |
|--------|----|----|----|----|
| gamety | AB | Ab | aB | ab |
| AB | | | | |
| Ab | | | | |
| aB | | | | |
| ab | | | | |

Štěpný poměr B₁:

Kompenzace:

| | | | | |
|--------|----|----|----|----|
| gamety | AB | Ab | aB | ab |
| AB | | | | |
| Ab | | | | |
| aB | | | | |
| ab | | | | |

Štěpný poměr B₁:

Duplicita kumulativní bez dominance:

| | | | | |
|--------|----|----|----|----|
| gamety | AB | Ab | aB | ab |
| AB | | | | |
| Ab | | | | |
| aB | | | | |
| ab | | | | |

Štěpný poměr B₁:

11.2. Určení typu interakce na základě fenotypových štěpných poměrů. Předpokládejme, že u papouška andulky vlnkované (*Melopsittacus undulatus*) je barva peří podmíněna interakcí genů F a O.

| genotyp | barva peří (fenotyp) |
|---------|----------------------|
| F_O_ | zelená |
| F_oo | žlutá |
| ffO_ | modrá |
| ffoo | bílá |

- Křížením zelených a modrých papoušků byla polovina potomků zelená a polovina modrá. Jaké byly genotypy rodičů?
- Žlutý papoušek byl křížen s modrým. Narodili se jim potomci zelení, modří, žlutí i bílí. Jaké byly genotypy rodičů a jaký měl být ideální štěpný poměr u potomků? Použijte rozvětovací metodu.

c) O jakou genovou interakci se jedná?

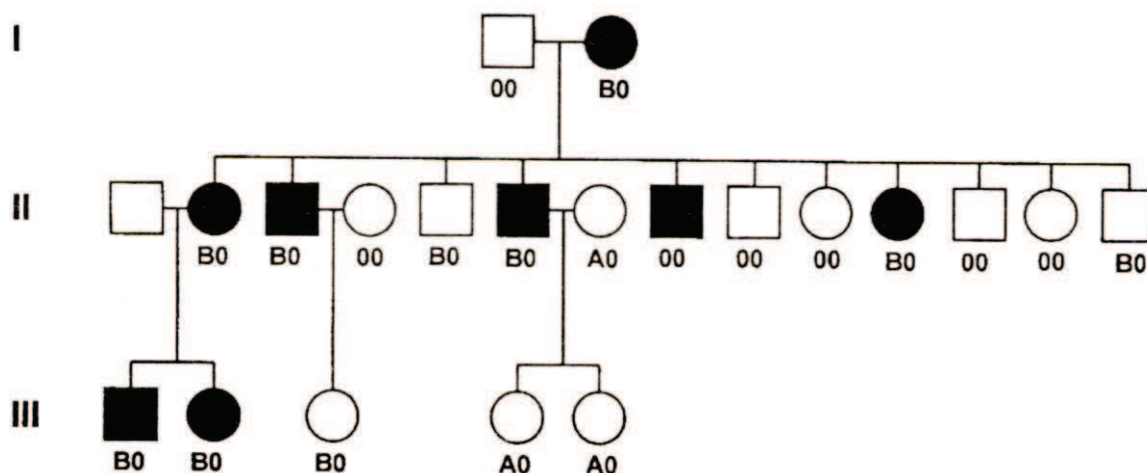
12.2. Sekretorství antigenů ABO systému. U některých lidí lze prokázat krevně skupinové antigeny A a B ve slinách. Schopnost vylučovat tyto antigeny do tělních tekutin je podmíněna genem Se. Jedinci s genotypem sese jsou nonsekretoři.

Ve studii byly vyšetřeny děti souboru manželských párů genotypu A0Sese x A0Sese na přítomnost antigenu A ve slinách. U jak velkého podílu dětí očekáváte, že přítomnost antigenu A byla ve slinách prokázána?

(Převzato s laskavým dovolením z: Kotlas et al: *Návody a úkoly k praktickým cvičením z lékařské biologie a genetiky, Karolinum Praha 2009*)

12.3. Vazba u syndromu nehet-patella. Na následujícím obrázku je rodokmenové schéma vzácného syndromu poškození nehtů a patelly. Ve schématu jsou zapsány genotypy krevně skupinového systému ABO.

(Převzato s laskavým dovolením z: Kotlas et al: *Návody a úkoly k praktickým cvičením z lékařské biologie a genetiky, Karolinum Praha 2009*)



a) Za předpokladu, že dědeček 1/1 nebyl přenašečem genu pro syndrom nehet-patella, rozhodněte jaký typ dědičnosti determinuje tento syndrom (AD, AR, GD, GR).

b) Domníváte se na základě tohoto rodokmenu, že existuje vazba mezi lokusem pro ABO krevní skupiny a lokusem pro syndrom nehet-patella?

CVIČENÍ 14

GENETICKÁ PROGNÓZA

KLÍČOVÁ SLOVA

Genetické poradenství, genetická prognóza a její stanovení, lékařská genetika a metody genetické prevence, penetrance, expresivita, prenatální diagnostika.

POZNÁMKY

GENETICKÉ PORADENSTVÍ je základní činnost v lékařské genetice. Zabývá se informováním rodiny s rizikem dědičné choroby a pomáhá členům rodiny se přizpůsobit vlivu a důsledkům této choroby.

GENETICKÁ PROGNÓZA spočívá ve stanovení pravděpodobnosti s jakou čekané či plánované dítě bude v uvažovaném znaku zdravé či postižené. Závisí především na typu přenosu a na segregčních poměrech.

PENETRANCE je pravděpodobnost fenotypové exprese genu. Vyjadřuje tedy, jaké procento osob s určitým genotypem bude skutečně postiženo. Je-li frekvence exprese fenotypu menší než 100%, hovoříme o **neúplné penetranci**.

EXPRESIVITA je stupeň exprese fenotypu. Fenotyp má **variabilní expresivitu**, pokud je závažnost choroby odlišná u lidí se stejným genotypem.

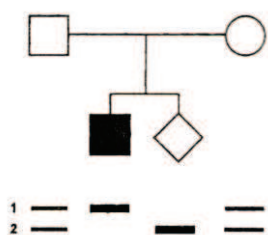
Smyslem **PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY** je zjistit, zda je plod postižen daným onemocněním. Podstoupení prenatálního vyšetření v žádném případě neznamená závazek ukončit těhotenství, bude-li nalezena vrozená vada.

KOEFICIENT PŘÍBUZNOSTI (r) vyjadřuje pravděpodobnost, s jakou dva příbuzní mají totožnou alelu pocházející od jejich společného předka.

KOEFICIENT INBREDINGU (F) je definován jako pravděpodobnost, s jakou může jedinec nést v daném lokusu dvě identické alely, pocházející od společného předka jeho rodičů.

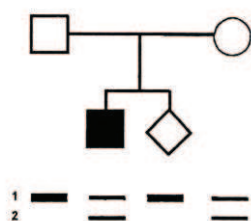
Příklady úspěšné DNA analýzy (AR onemocnění):

Obr. 15.6.



1. Postižený syn je homozygot v délce restrikčních fragmentů (1,1) Z toho plyne, že fragmenty 1 jsou u obou rodičů ve vazbě s mutovanou alelou. Jestliže druhé dítě je homozygot (2,2), znamená to, že bude zdravý homozygot ve sledovaném genu.

Obr. 15.7.

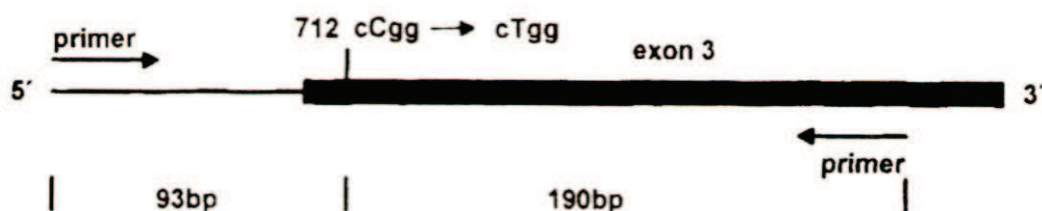


2. Otec (1,1), matka (1,2), postižený syn (1,2) musí mít fragment 1 od otce a od matky fragment 2, který je ve vazbě s mutovanou alelou. Druhé dítě (1,1) má od matky fragment 1, který nese zdravou alelu a od otce také fragment 1, ale nevíme, zda s mutovanou nebo zdravou alelou. Prognóza: 50 % heterozygot, 50 % zdravý homozygot ve sledovaném genu — fenotypově zdravé.

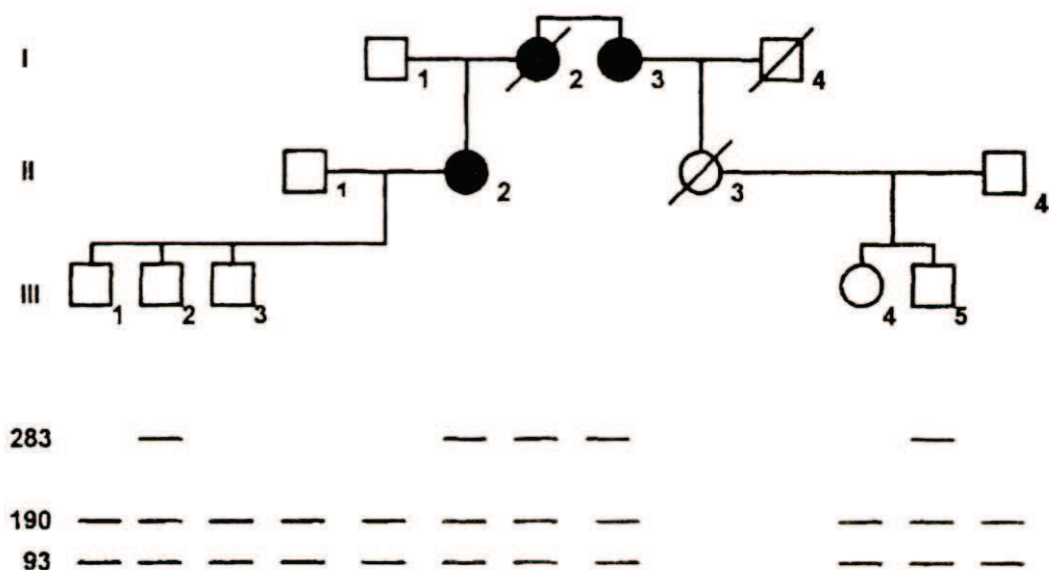
(Převzato s laskavým dovolením z: Kotlas et al: Návody a úkoly k praktickým cvičením z lékařské biologie a genetiky, Karolinum Praha 2009)

d) V téže rodině byla u nemocných s VHL zjištěna mutace CCG (Arg)→TGG (Trp) v exonu 3, kodonu 238, nt. 712 VHL genu (obr. č. 16.5.a). Tato mutace vede ke ztrátě restrikčního místa pro MspI (CCGG). Po PCR amplifikaci exonu 3 VHL genu a restrikčním štěpení MspI byly získány tyto výsledky: (obr. č. 16.5.b).

Obr. 16. 5.a



Obr. 16.5.b



Určete pomocí přímé detekce mutace, kteří příslušníci III. generace jsou nositeli mutované alely. Porovnejte možnosti vyšetření pomocí genové vazby s možnostmi přímé diagnostiky v situaci, kdy několik členů rodiny není dostupno vyšetření.

(Převzato s laskavým dovolením z: Kotlas et al: Návody a úkoly k praktickým cvičením z lékařské biologie a genetiky, Karolinum Praha 2009)