

Genetická toxikologie

**Bakalářské a magisterské studijní obory
ZSF**

prof. Ing. Václav Řehout, CSc.

Toxikologie

- **Věda o působení toxických látek na buňky, tkáně, orgány, organismy**

Genetická toxikologie

- **Věda o působení účinku toxických látek na genetický materiál**

Gonotoxicita

- **Potenciální škodlivé účinky chemických, fyzikálních, biologických, aj. látek na genetický materiál**

POZOR

- **Toxické látky** = toxický účinek
 - poškozují tkáně, orgány, funkce, ap.
 - poškození vyžaduje vyšší dávku tox. látky
- **Genotoxické látky** = genotoxický účinek
 - poškozují genetický materiál
 - poškození při mnohonásobně (řádově) menších koncentracích než toxické látky

Genotoxické látky

- Jsou látky přírodního (např. kolchicin) nebo umělého (např. vincristin) charakteru, které poškozují genetický materiál

Genetický materiál

- **Nukleové kyseliny, chromozomy, respektive všechny součásti buňky, buněčné organely, které nesou NK**

Genetické objekty

- **Všechny živé organizmy nebo jejich součásti (např. buňky, embrya, tkáňové kultury)**

Genetický materiál

Bakalářské a magisterské studijní obory
ZF, PF, ZSF

prof. Ing. Václav Řehout, CSc.

Genetický materiál

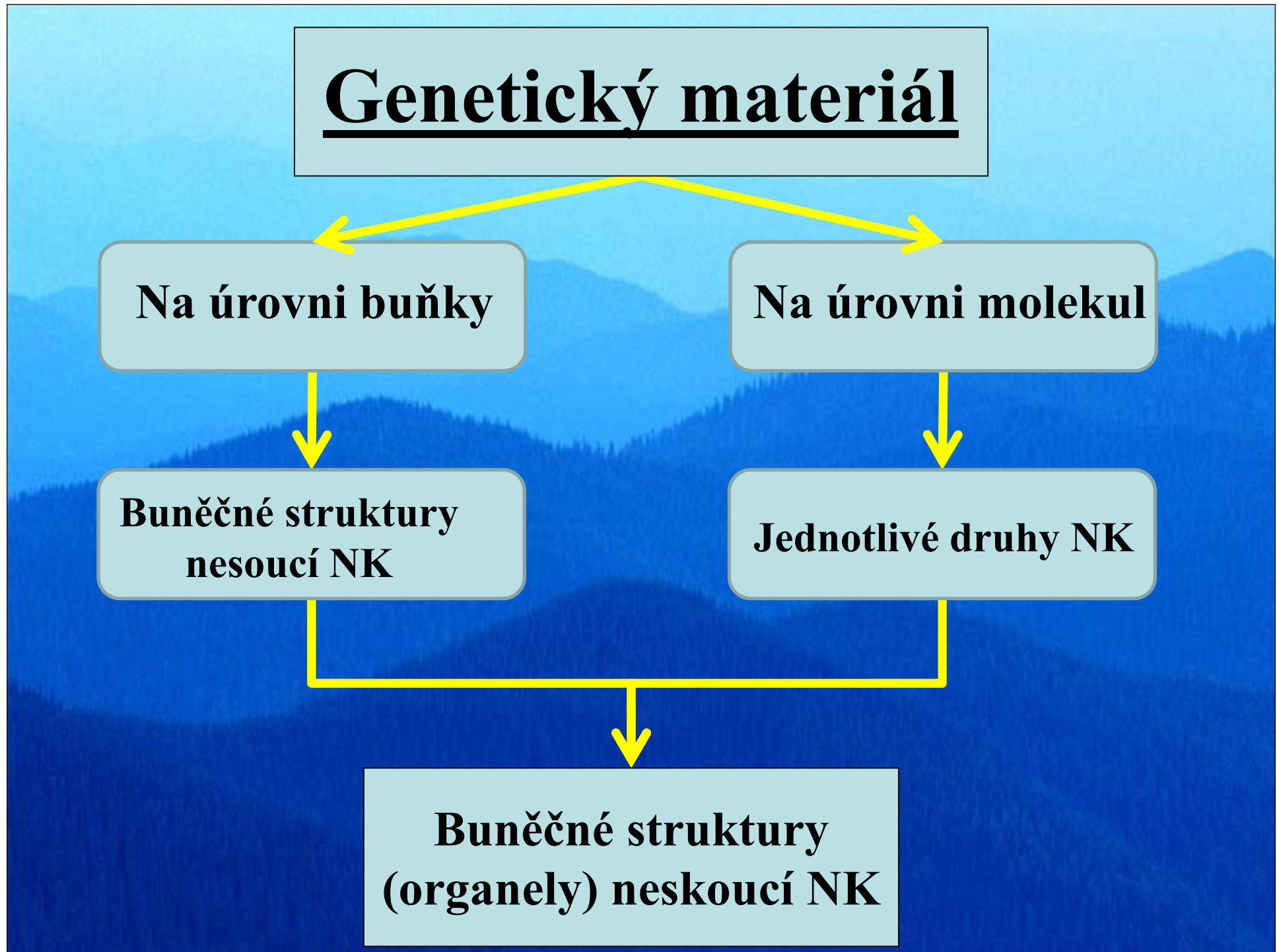
Na úrovni buňky

Na úrovni molekul

Buněčné struktury
nesoucí NK

Jednotlivé druhy NK

Buněčné struktury
(organely) neskoucí NK



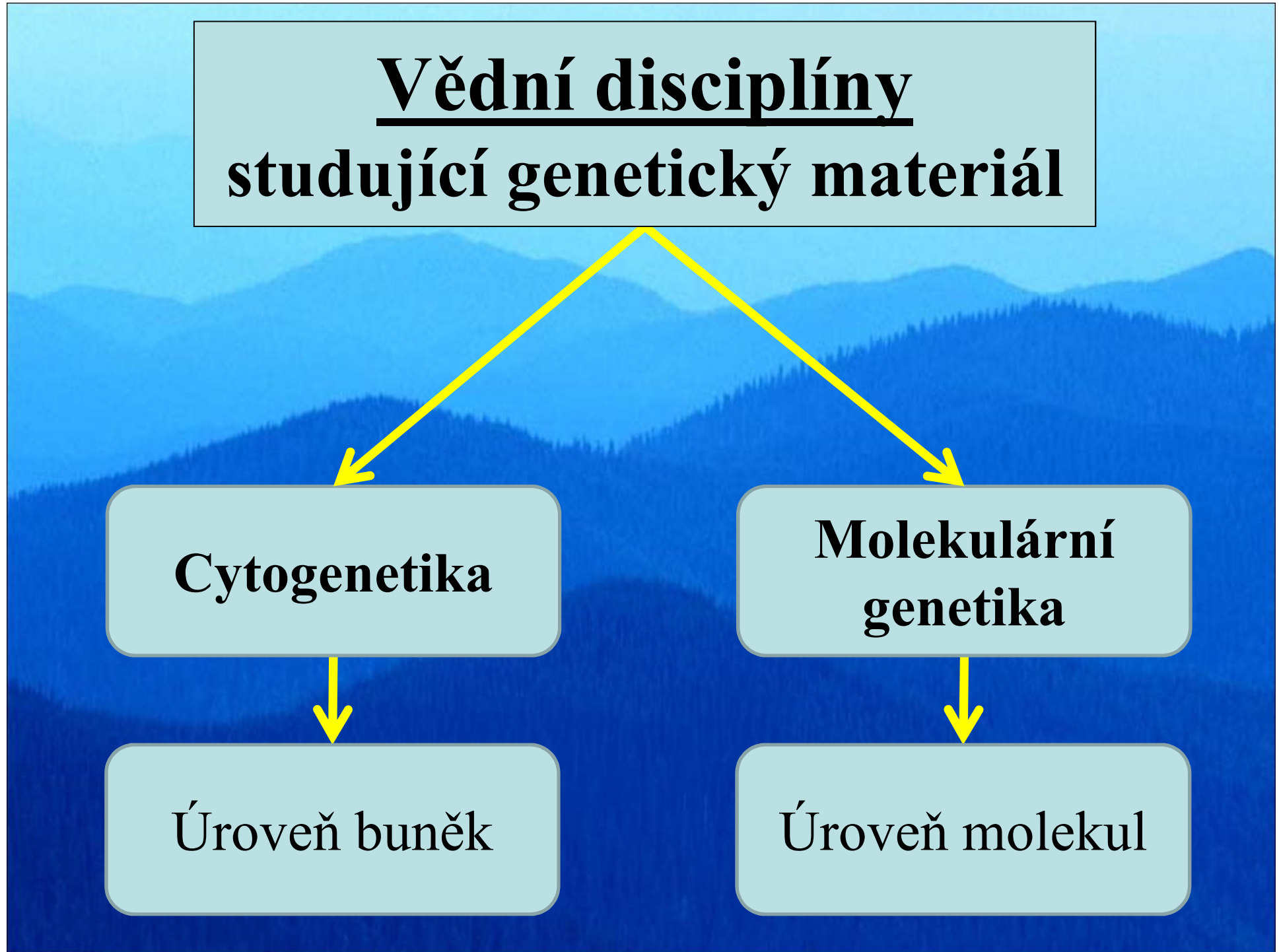
Vědní disciplíny studující genetický materiál

Cytogenetika

Úroveň buněk

**Molekulární
genetika**

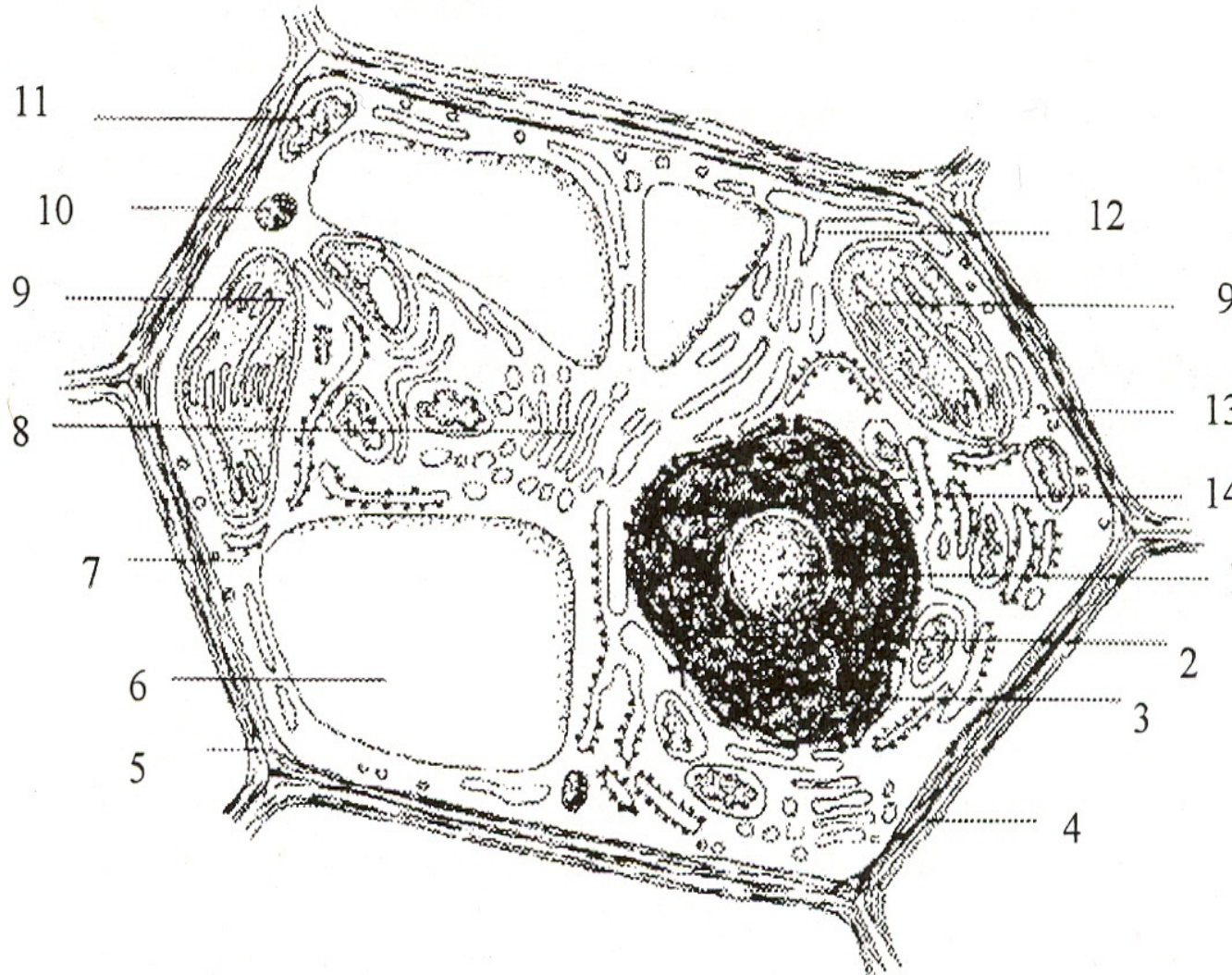
Úroveň molekul





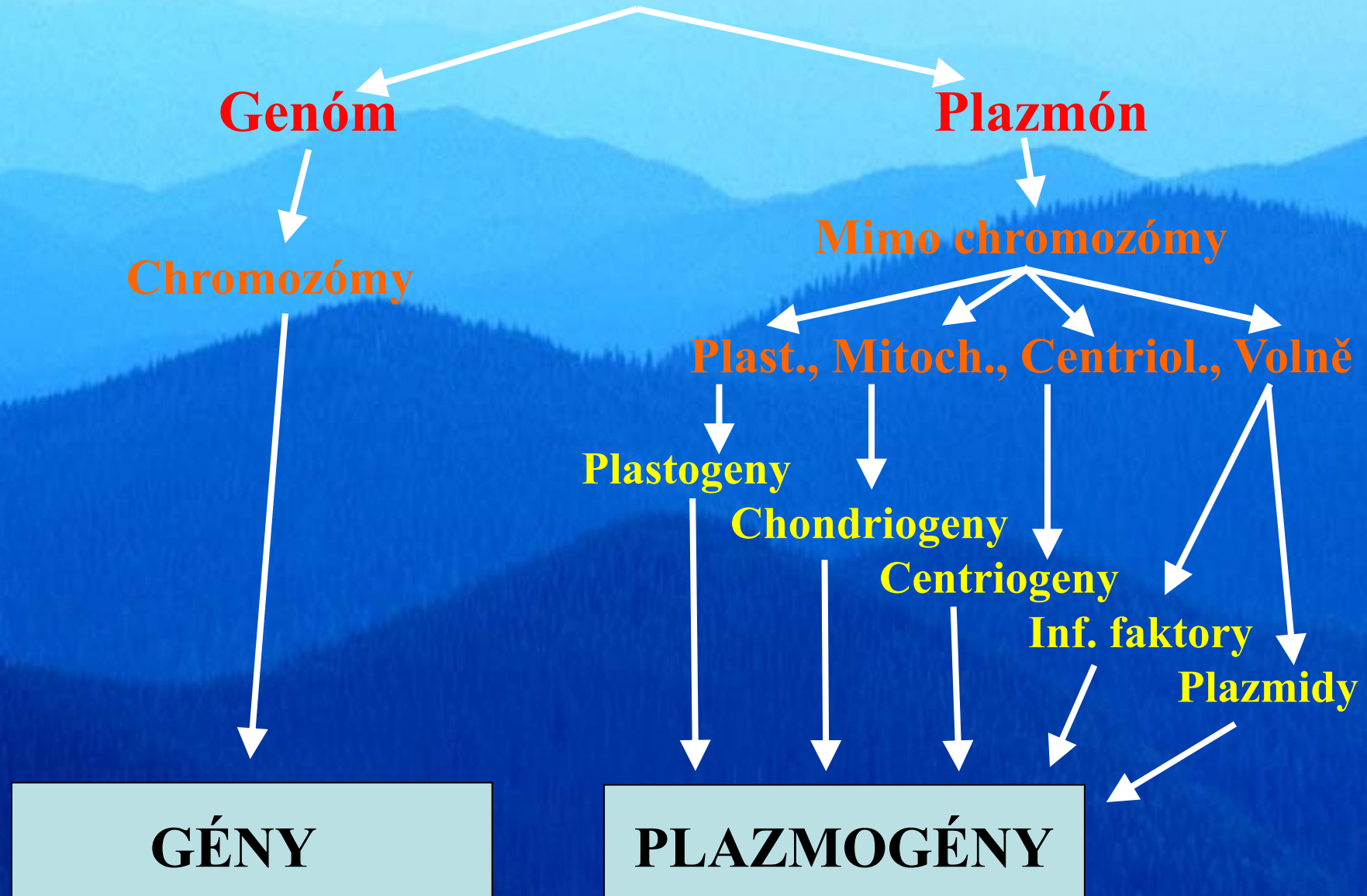
CYTOGENETIKA

Buňka



- 1 – jádro s jadérkem
- 2 – zahuštěný chromatin
- 3 – jaderná membrána
- 4 – buněčná stěna
- 5 – plazmatická membrána
- 6 – vakuola
- 7 – cytoplazma
- 8 – Golgiho aparát
- 9 – chloroplast
- 10 – tuková kapénka
- 11 – mitochondrie
- 12 – jemné endoplazmatické retikulum
- 13 – mikrotubuly
- 14 – drsné endoplazmatické retikulum

Celkový genetický materiál buňky



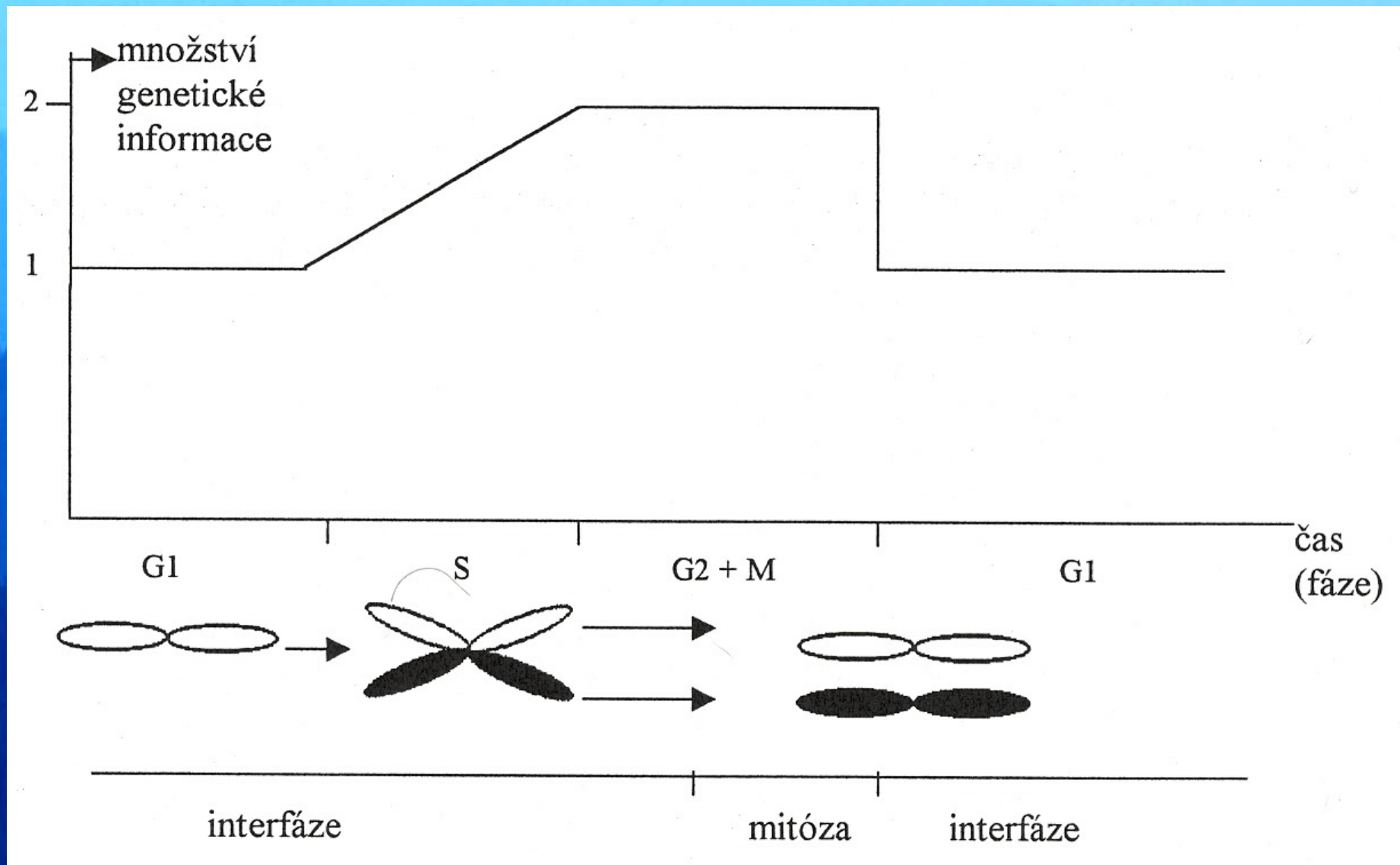
Genetický materiál

- NK ➡ jedn. druhy NK
- gény ➡ specifické struktury DNA
- alely ➡ formy existence génů
- genotyp ➡ soubor génů
(též soubor alel na 1 lokusu)
- genóm ➡ soubor génů v 1 haploidní sadě
➡ soubor génů gamety
- plazmón ➡ soubor cytoplasmatických génů
- genofond ➡ soubor génů určité populace

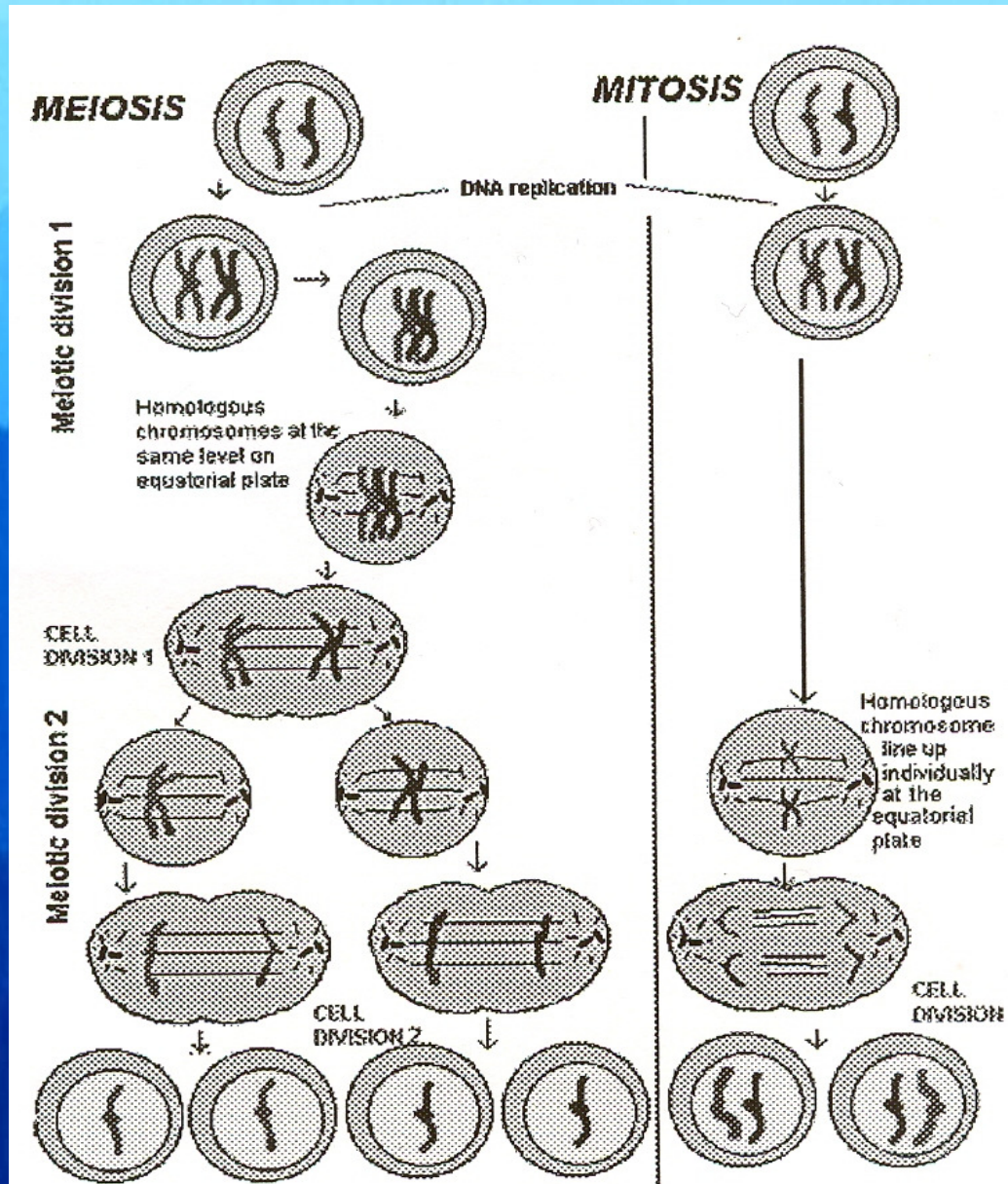
PODSTATA G. M.

Informační biol. makromolekuly

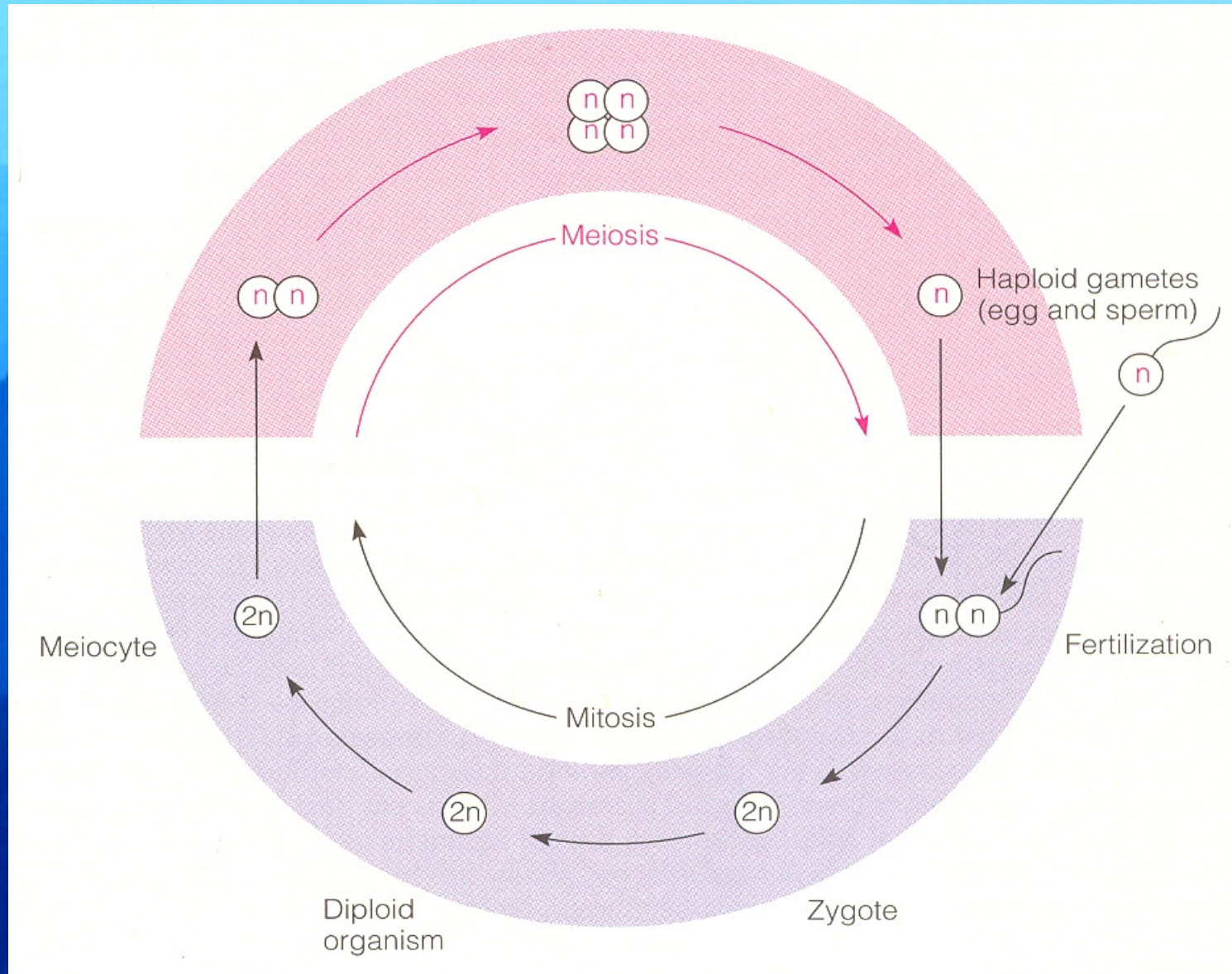
Buněčný cyklus



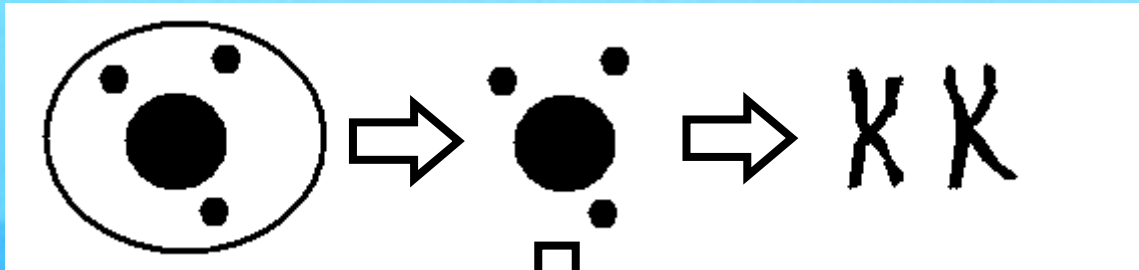
Mitosis & meiosis



Diplo-haploidní fáze u živočichů



Cytologie $\Rightarrow$ cytogenetika $\Rightarrow$ karyologie



Organely nesoucí DNA (RNA)

Člověk má cca 2m DNA

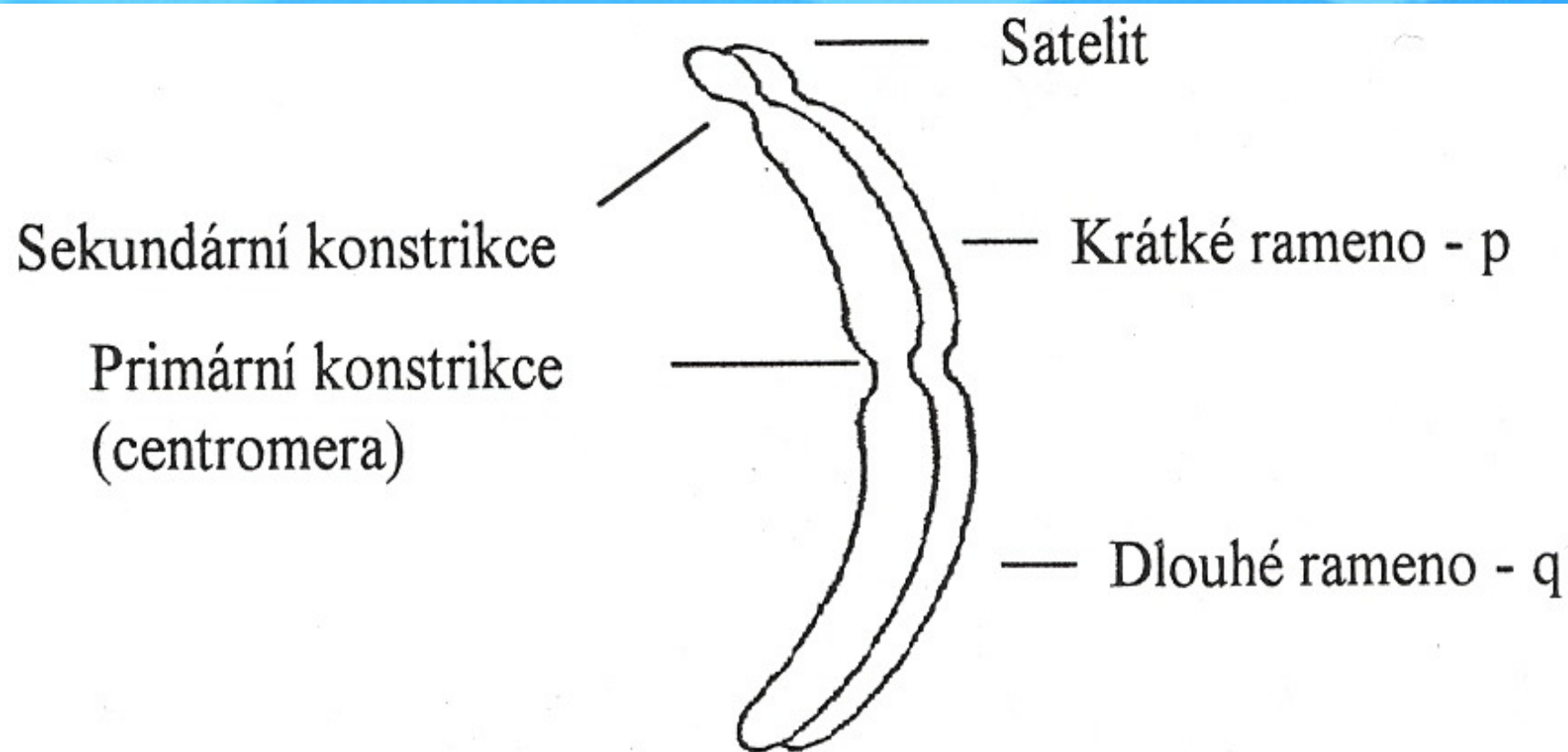


Na ní 20 000 genů (lokusů)

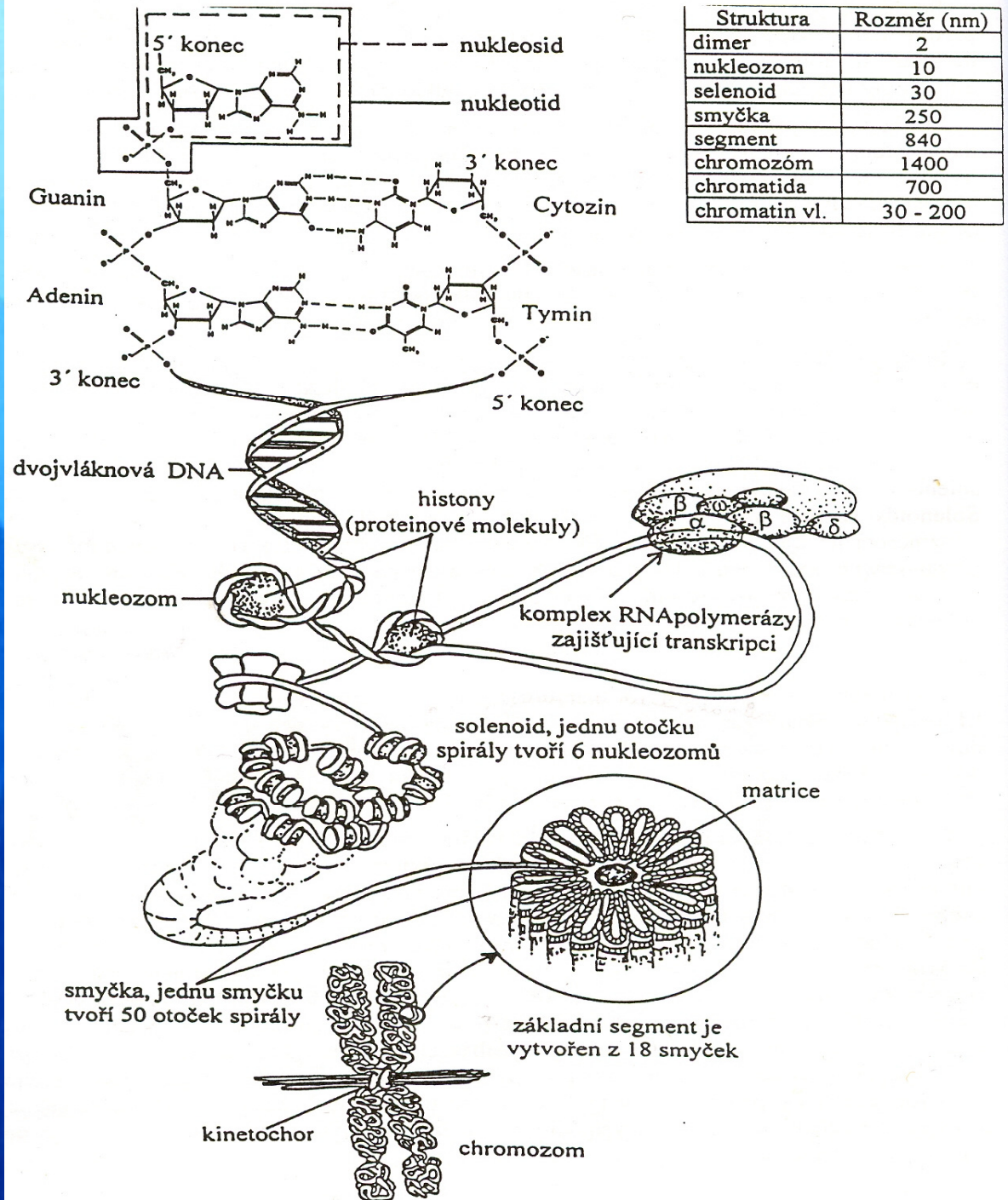
Rozdělených na 46 chromozomů

**V interfázi despiralizovaná DNA 2m = 2000km vlasce
rozprostřeného v místnosti 4x4m**

Morfologie chromozomů



Submikro- skopická struktura chromozomu



Tvary chromozomů



a



b



c



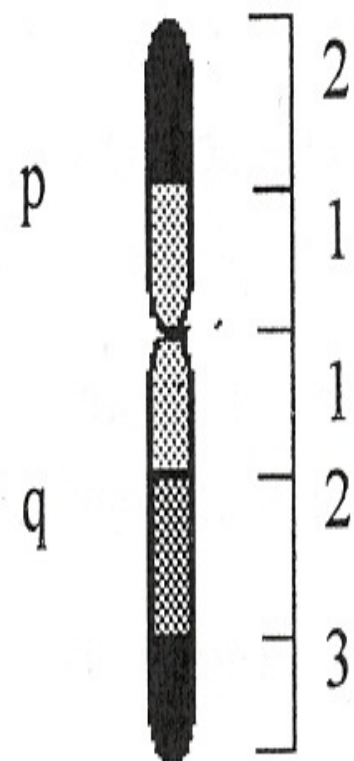
d

a) metacentrický

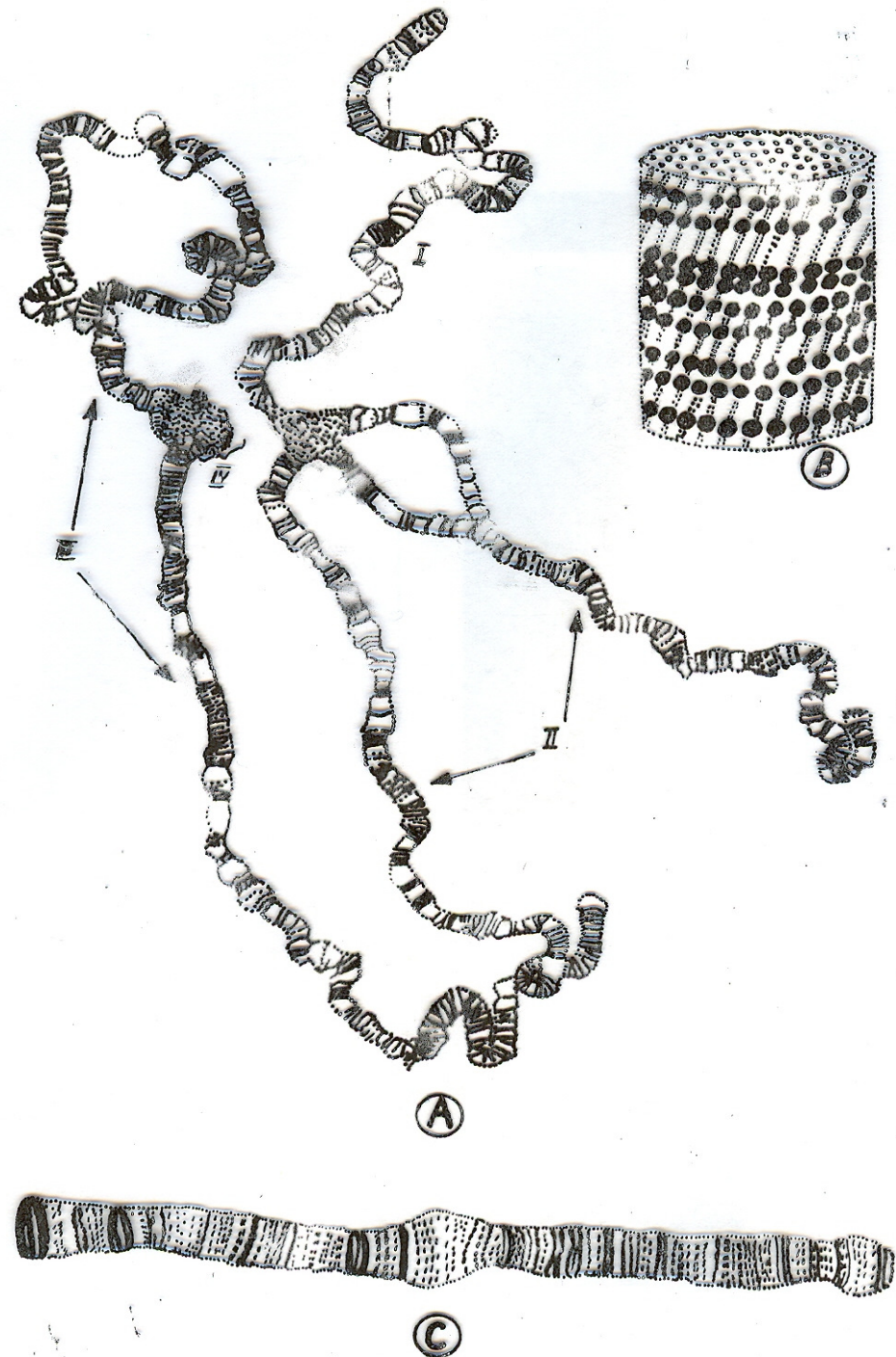
b) submetacentrický

c) akrocentrický

d) telocentrický



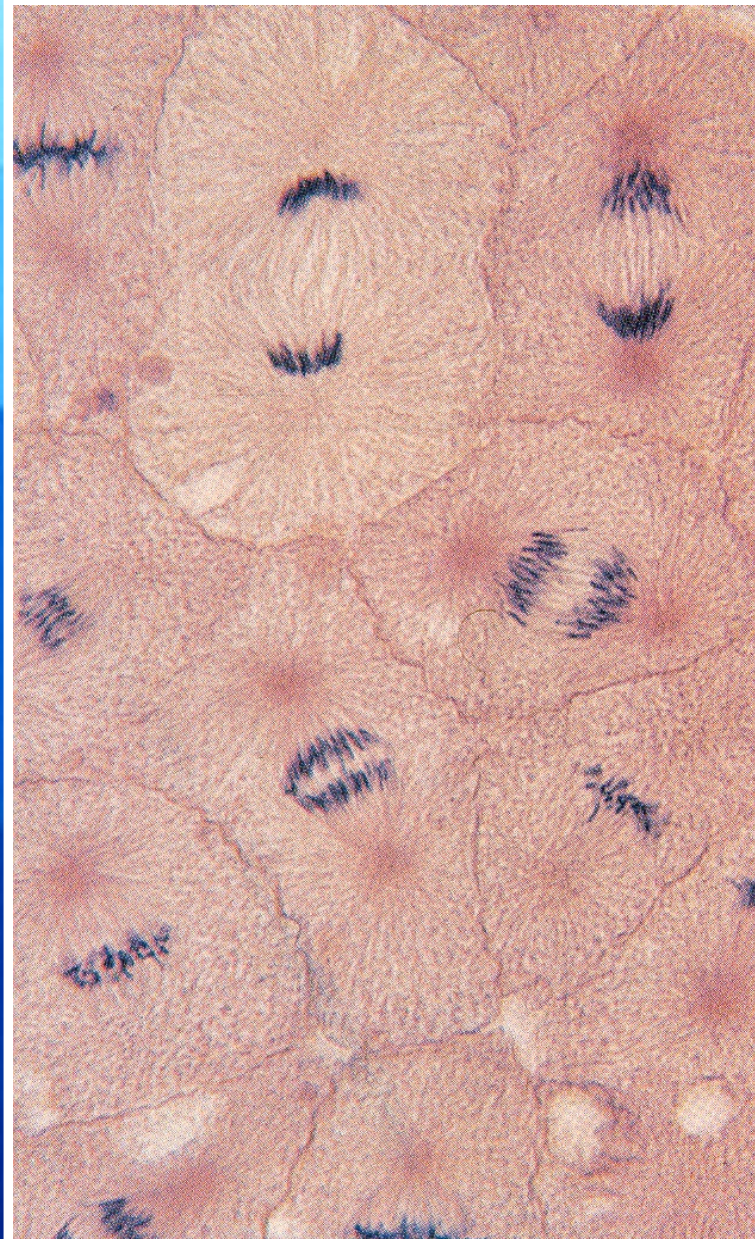
Polytenní chromozomy



Diploidní chromozomální počty

Druh	2 n	Druh	2 n
Plasmodium malariae	2	Kůň - Equus caballus	66
Nezmar - Hydra vulgaris	32	Šimpanz – Anthropopithecus troglodytes	46
Klíště – Ixodes ricinus	28	Člověk - Homo sapiens	46
Pavouk - Aranea diademata	26	Řepka - Brassica napus	38
Bourec - Bombyx mori	28 ,26	Mák-Papaver somniferum	22
Včela – Apis mellifica	16,32	Řepa - Beta vulgaris	18
Muška – Drosophila melanogaster	8	Angrešt - Ribes grossularia	16
Štika – Esox lucius	18	Třešeň - Prunus avium	16
Kapr – Cyprinus carpio	104	Višeň - Prunus cerasus	32
Kur domácí – Gallus gallus	78	Hrušeň - Pyrus communis	34,68
Myš – Mus musculus	40	Jetel - Trifolium pratense	14
Pes – Canis familiaris	78	Akát - Robinia pseudacacia	20
Liška – Vulpes vulpes	38	Buk - Fagus silvatica	24
Kočka – Felis domestica	38	Chmel - Humulus lupulus	20
Skot – Bos taurus	60	Brambor - Solanum tuberosum	48
Koza – Capra hircus	60	Rajče - Lycopersicum esculentum	24
Ovce – Ovis aries	54	Pšenice - Triticum vulgare	42
Prase – Sus scropha	40	Ječmen - Hordeum vulgare	14
Osel – Equus asinus	66	Oves - Avena sativa	42

Mitoza – metafáze

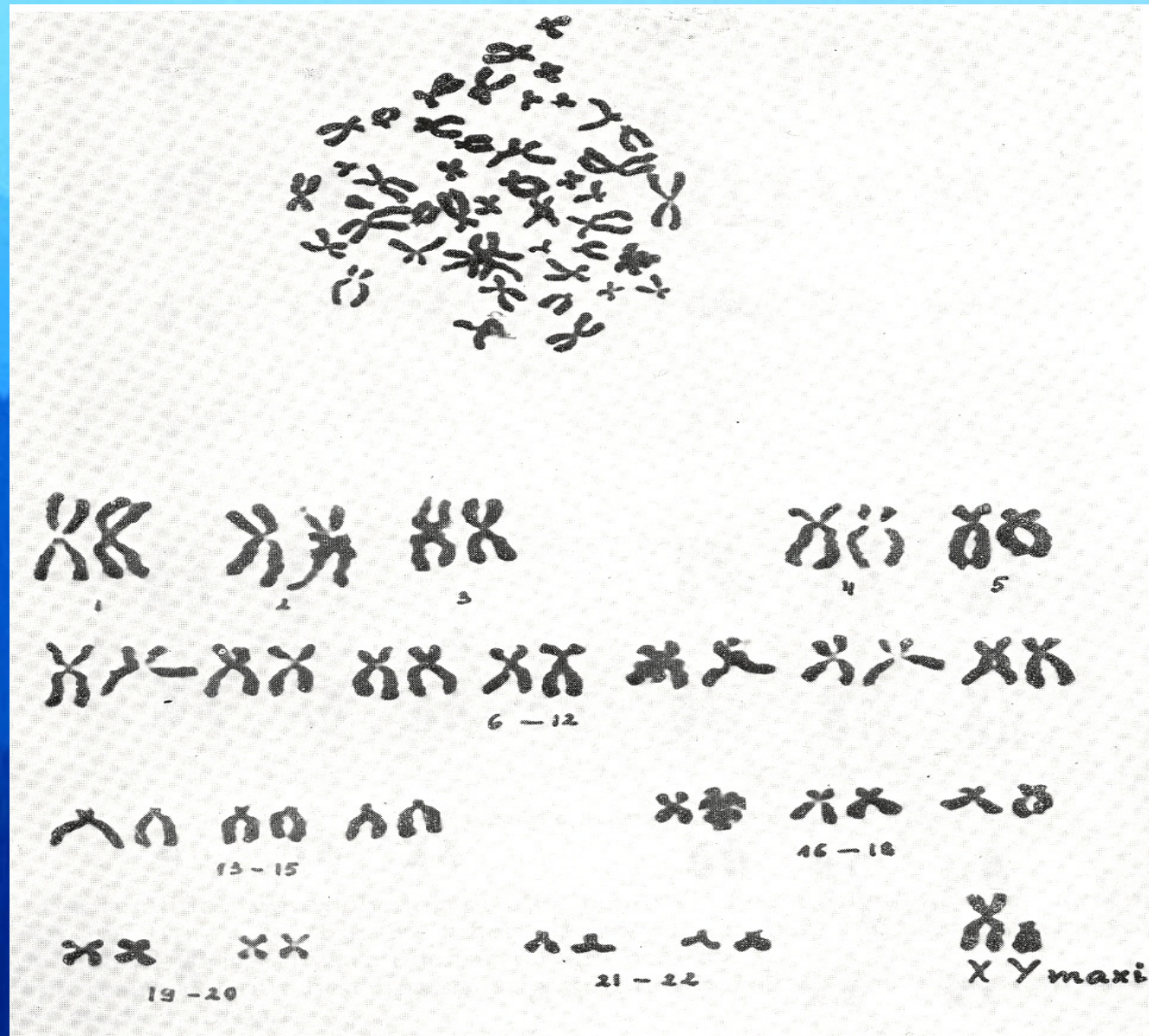


Zpracování karyotypu

- klasické metody (monochromatické barvení)
- moderní metody (např. proužkovací techniky)



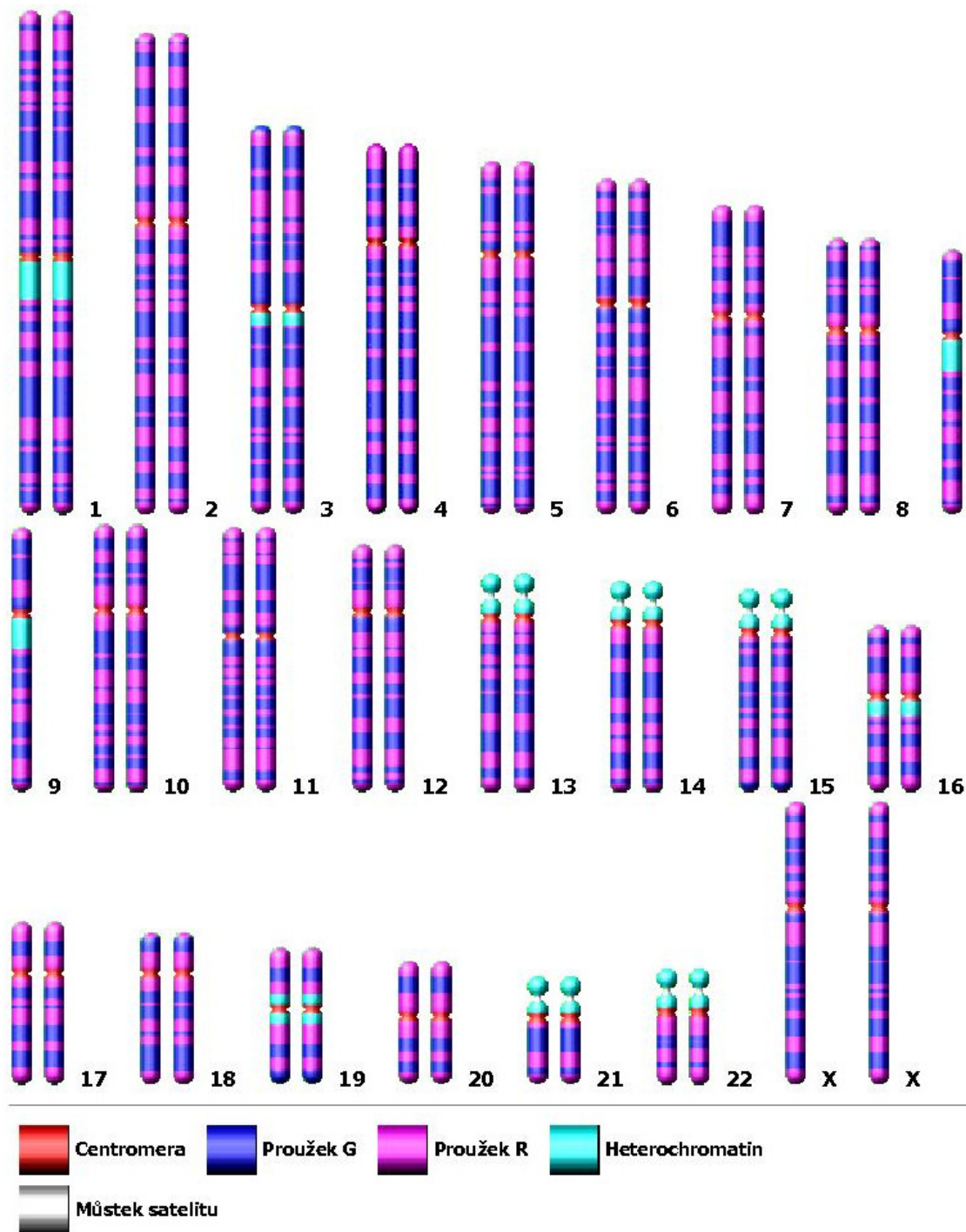
Karyotyp člověka



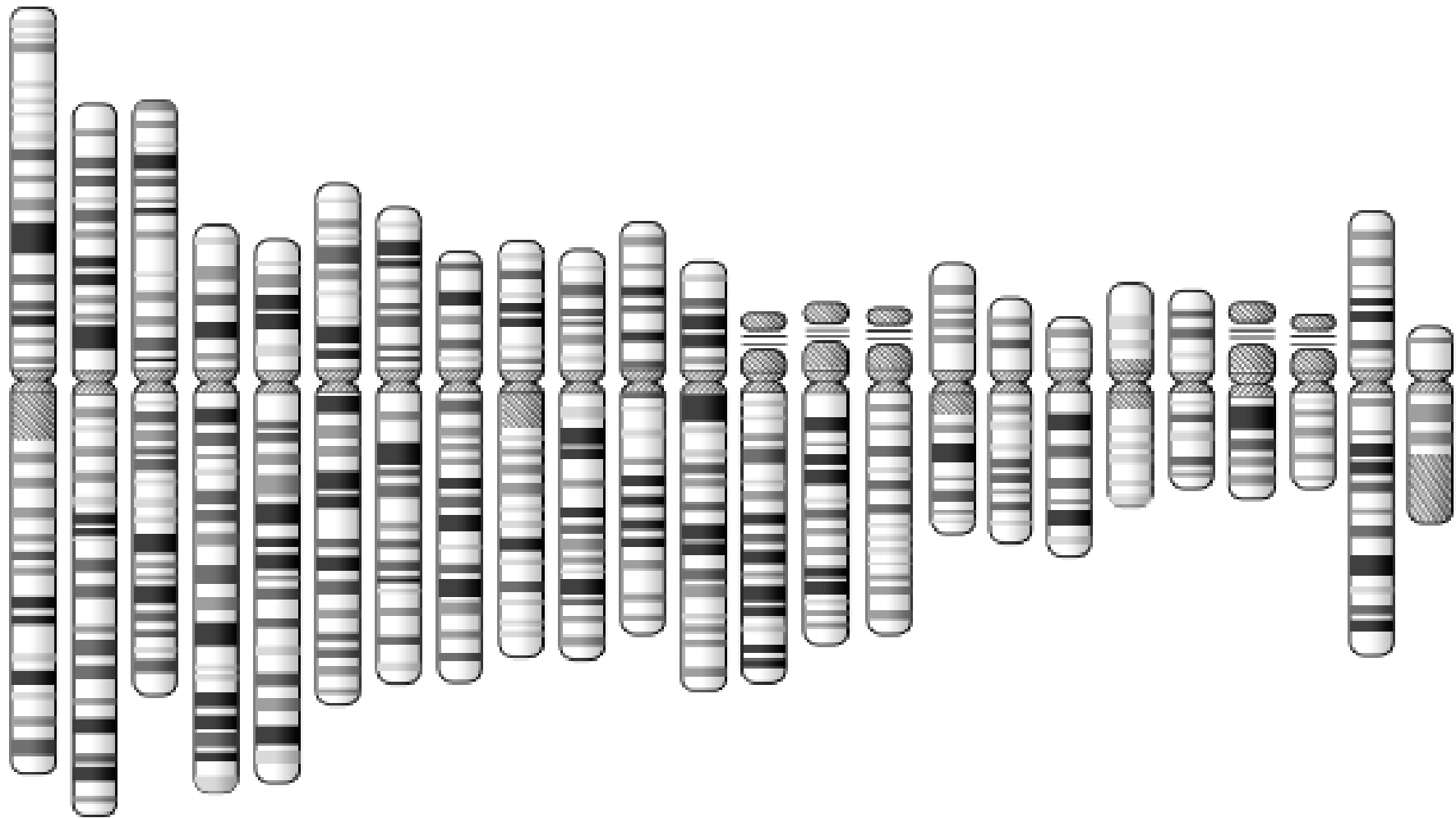
C – metafáze (proužkované chromozomy)



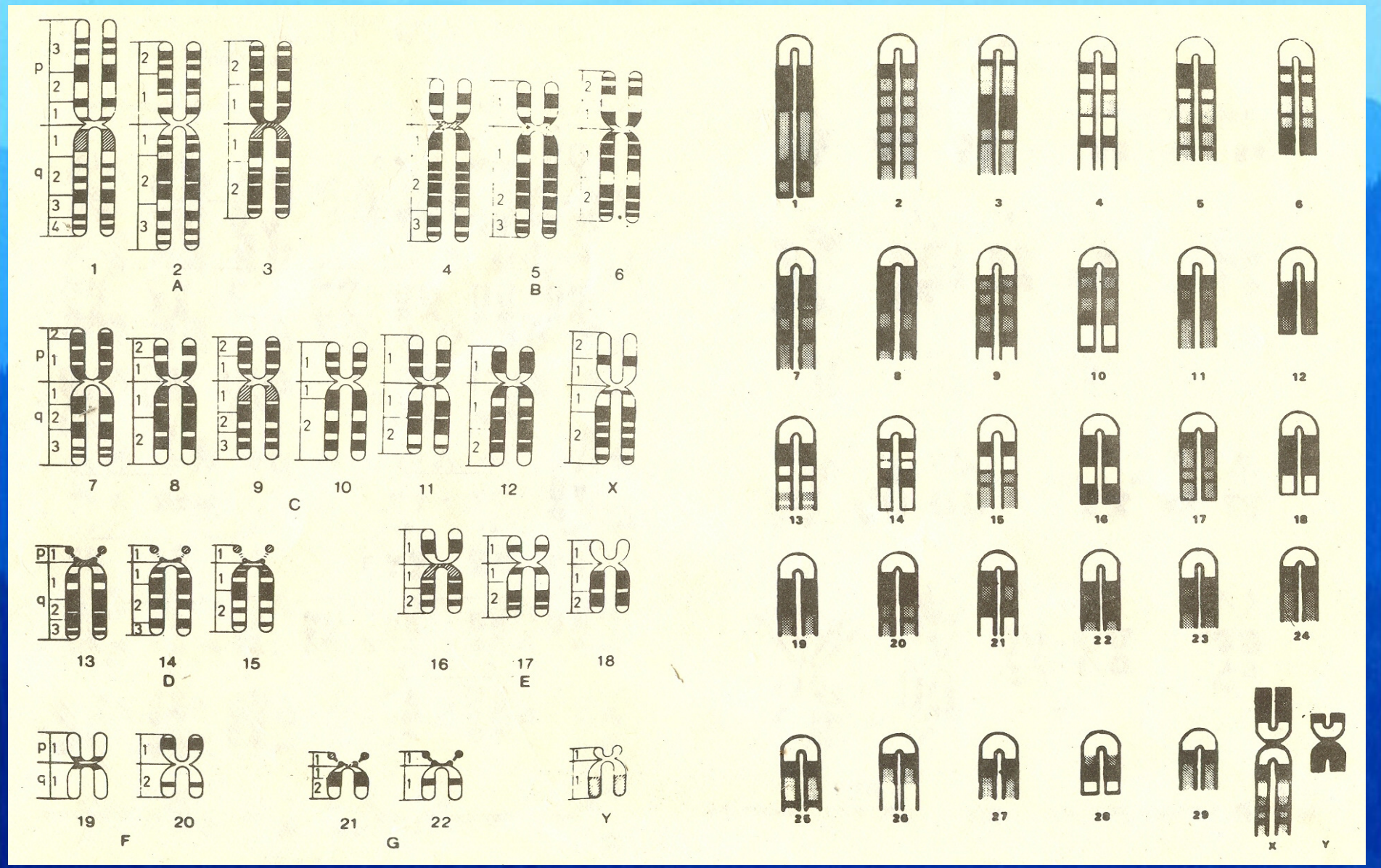
Diploidní karyotyp člověka (proužkování)



Haploidní karyotyp člověka (proužkování)



Idiogram člověka a skotu (proužkování)



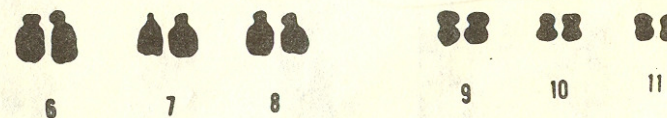
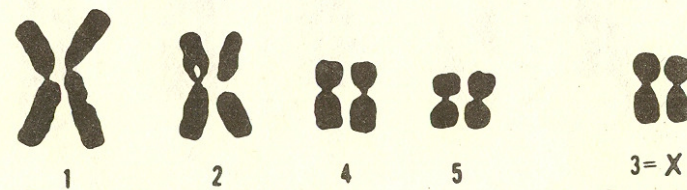
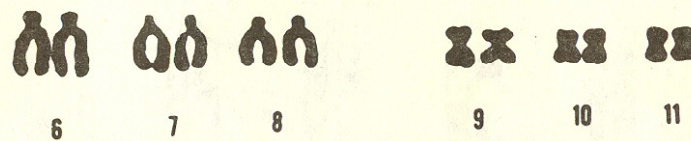
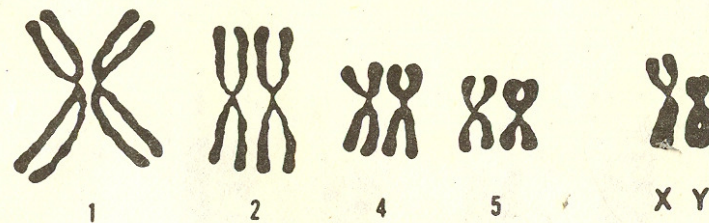
Karyotyp křečka

Critellus griseus / Křeček čínský/

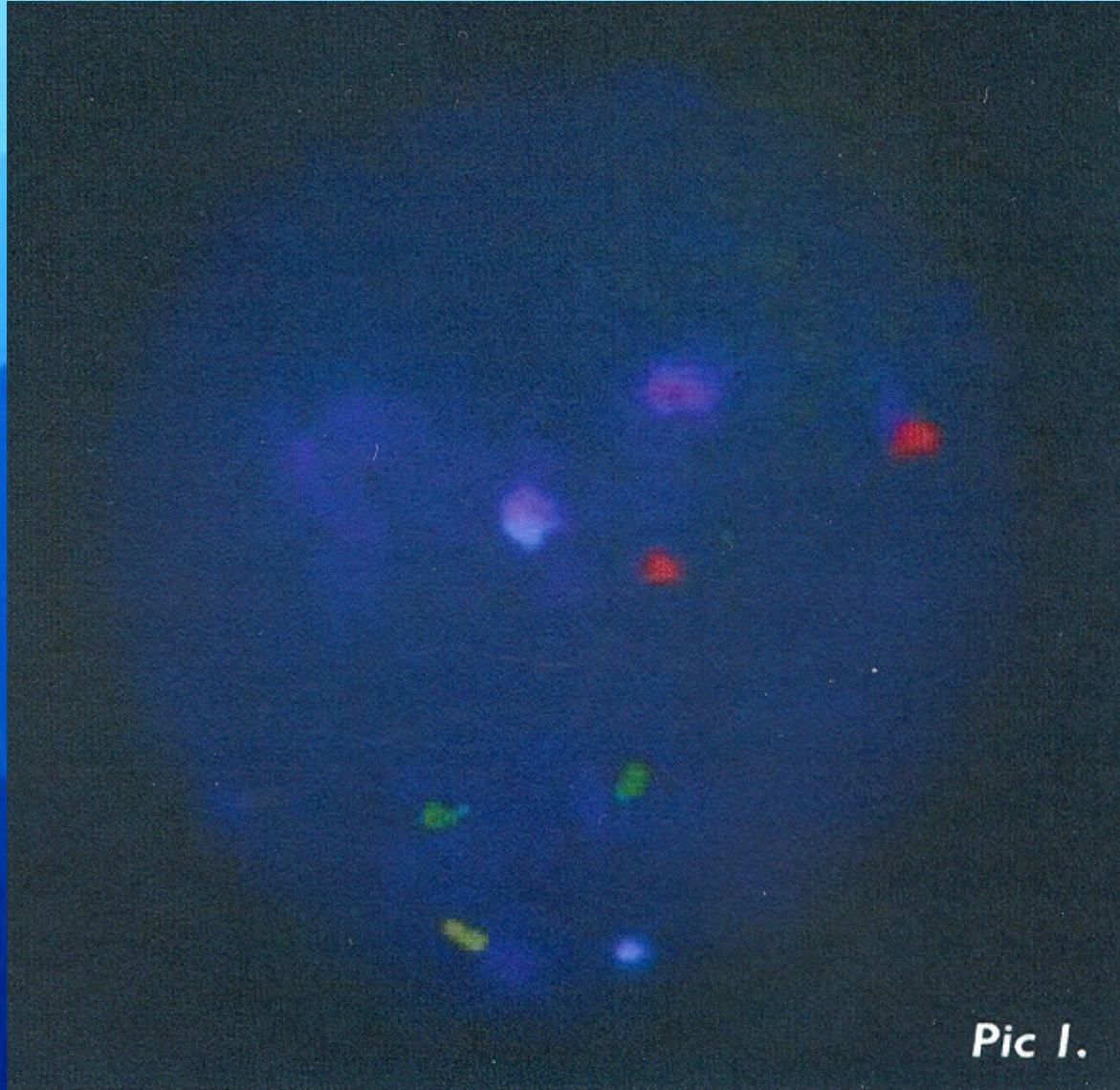
$2n = 22$

Autosomy: 14 M, SM
6 ST

Sex chromozómy: X ST
Y ST

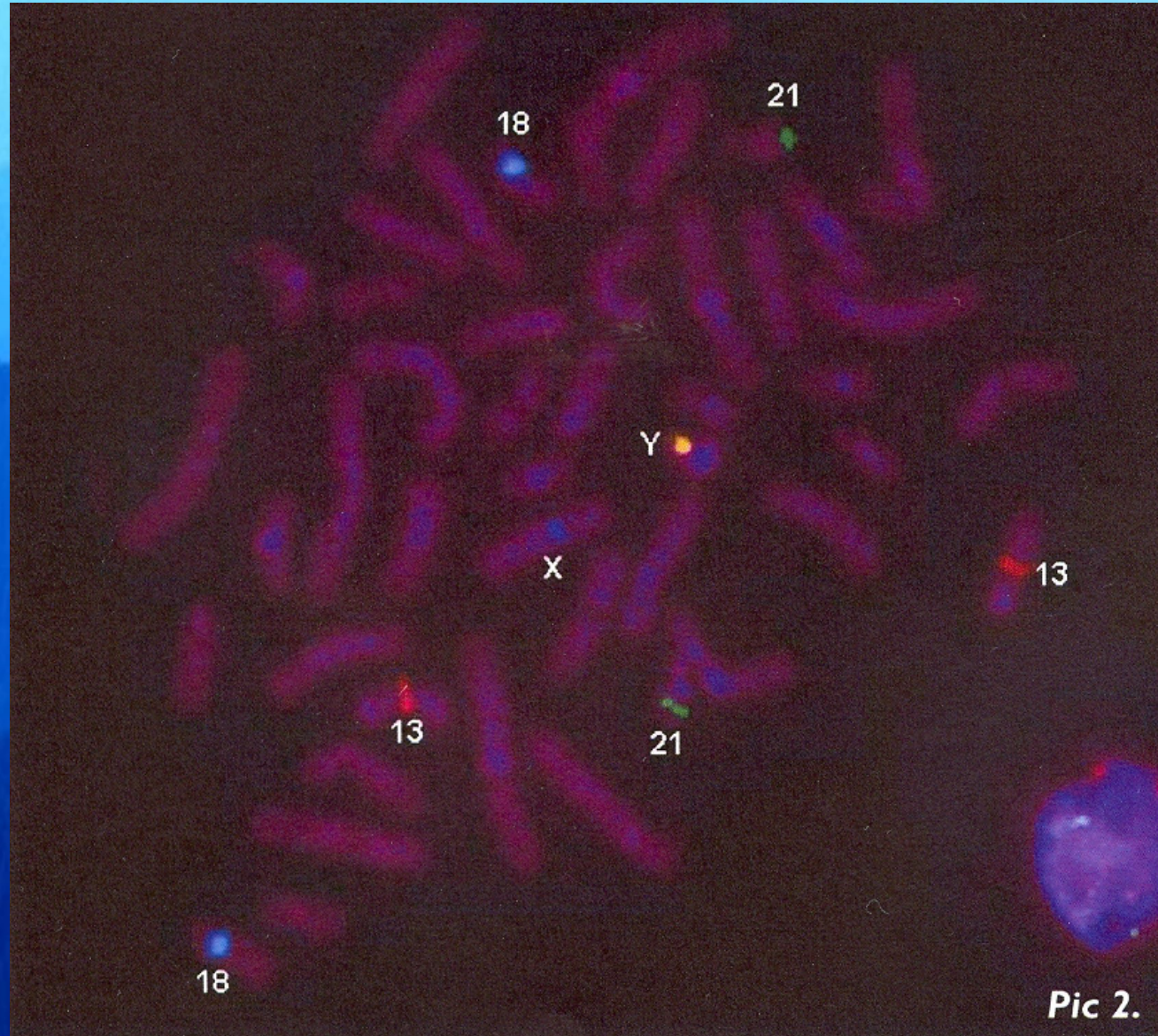


Fluorescence in situ hybridization (FISH)

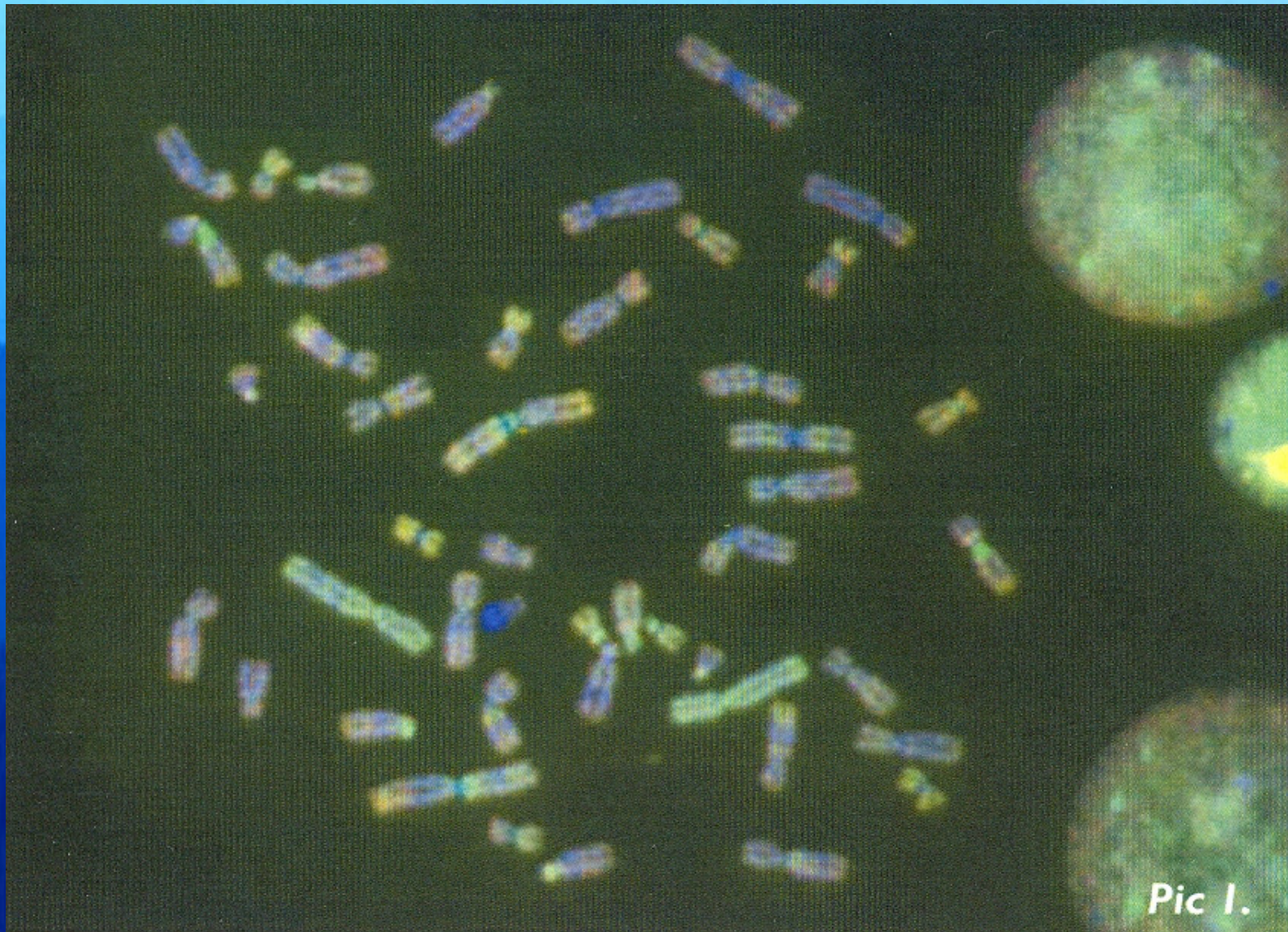


Pic 1.

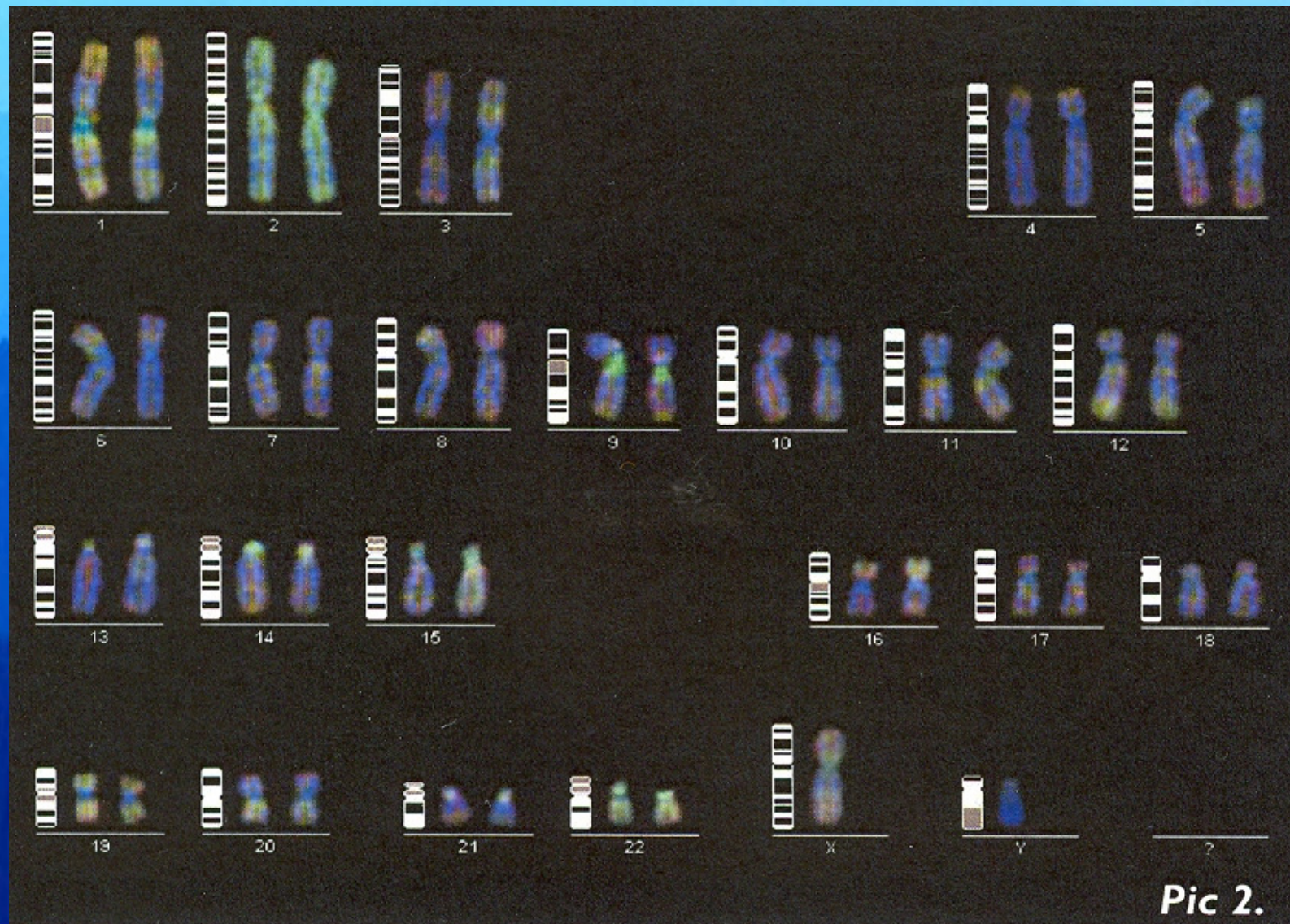
Fluorescence in situ hybridization (FISH)



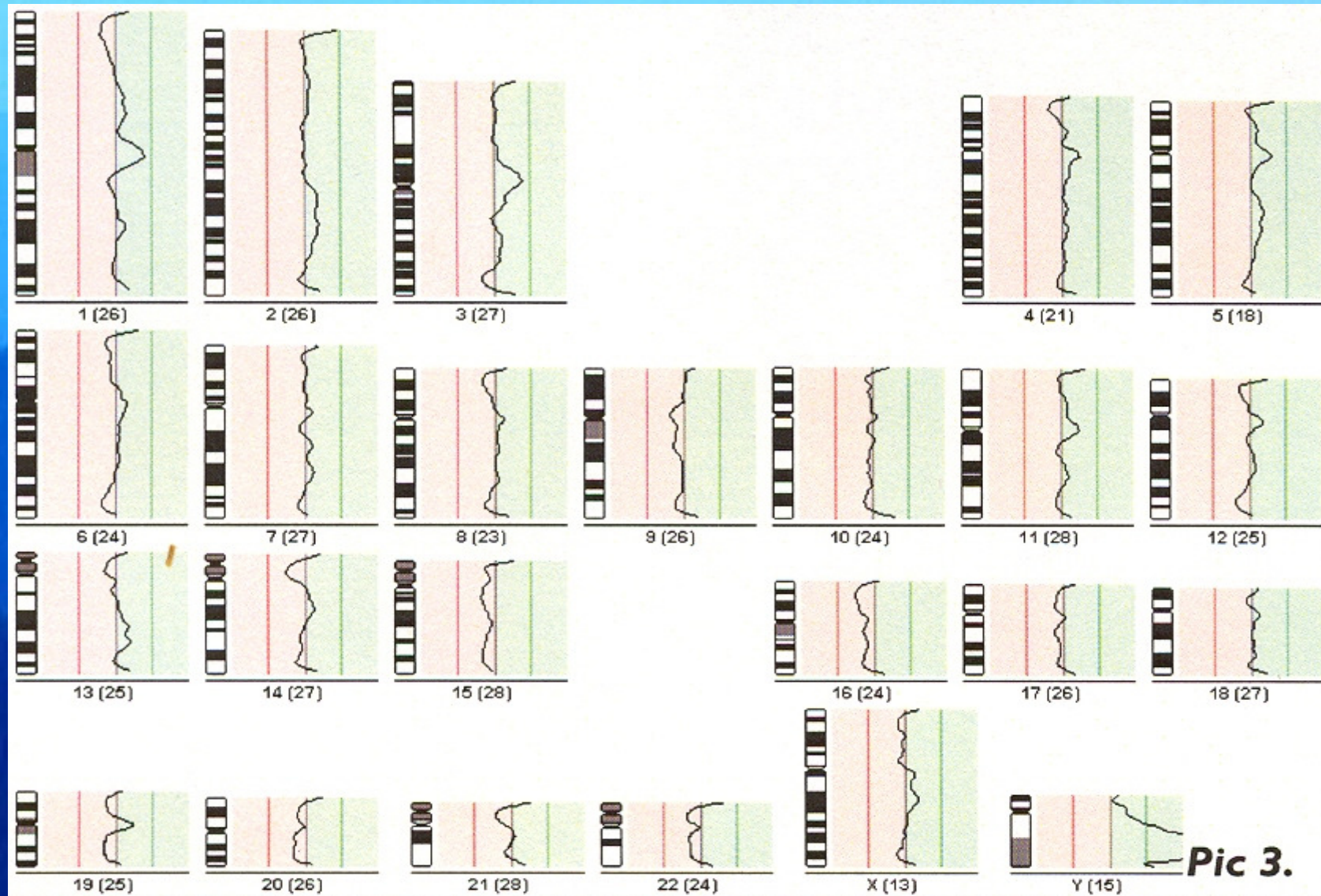
Comparative genomic hybridization (CGH)



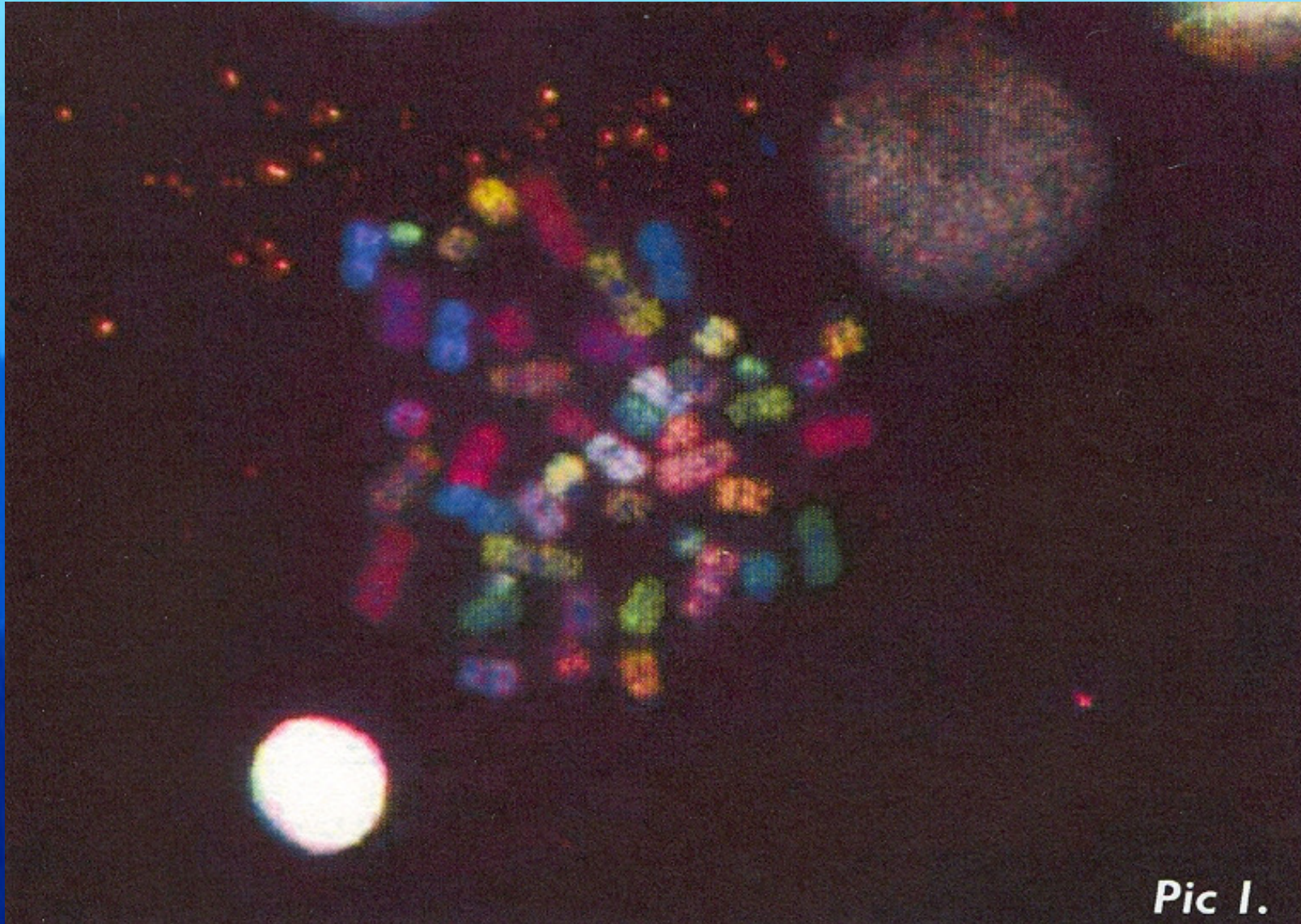
Comparative genomic hybridization (CGH)



Comparative genomic hybridization (CGH)



Multicolor fluorescence in situ hybridization (MFISH)



Multicolor fluorescence in situ hybridization (MFISH)



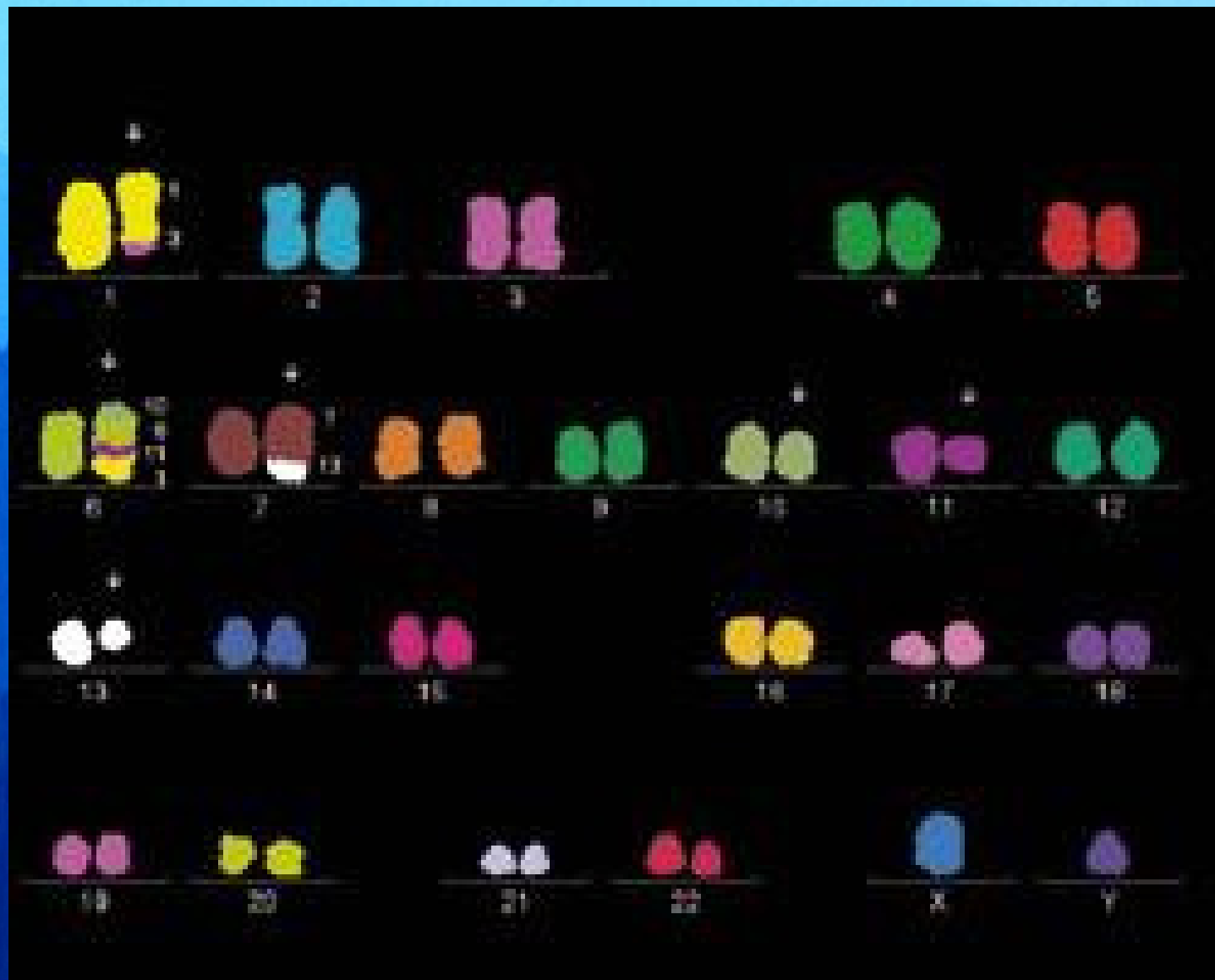
Pic 2.

Multicolor fluorescence in situ hybridization (MFISH)

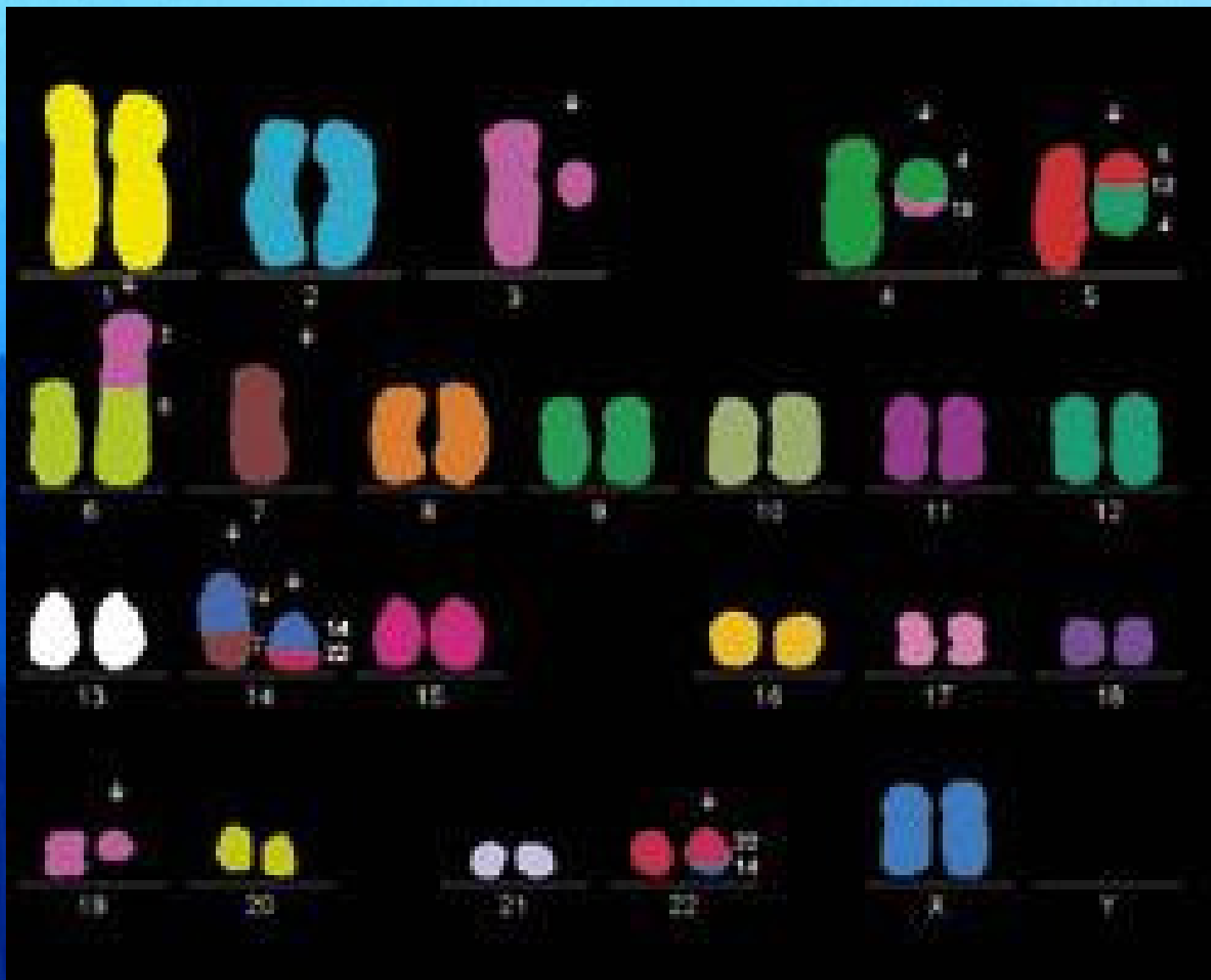


Abnormální karyotyp

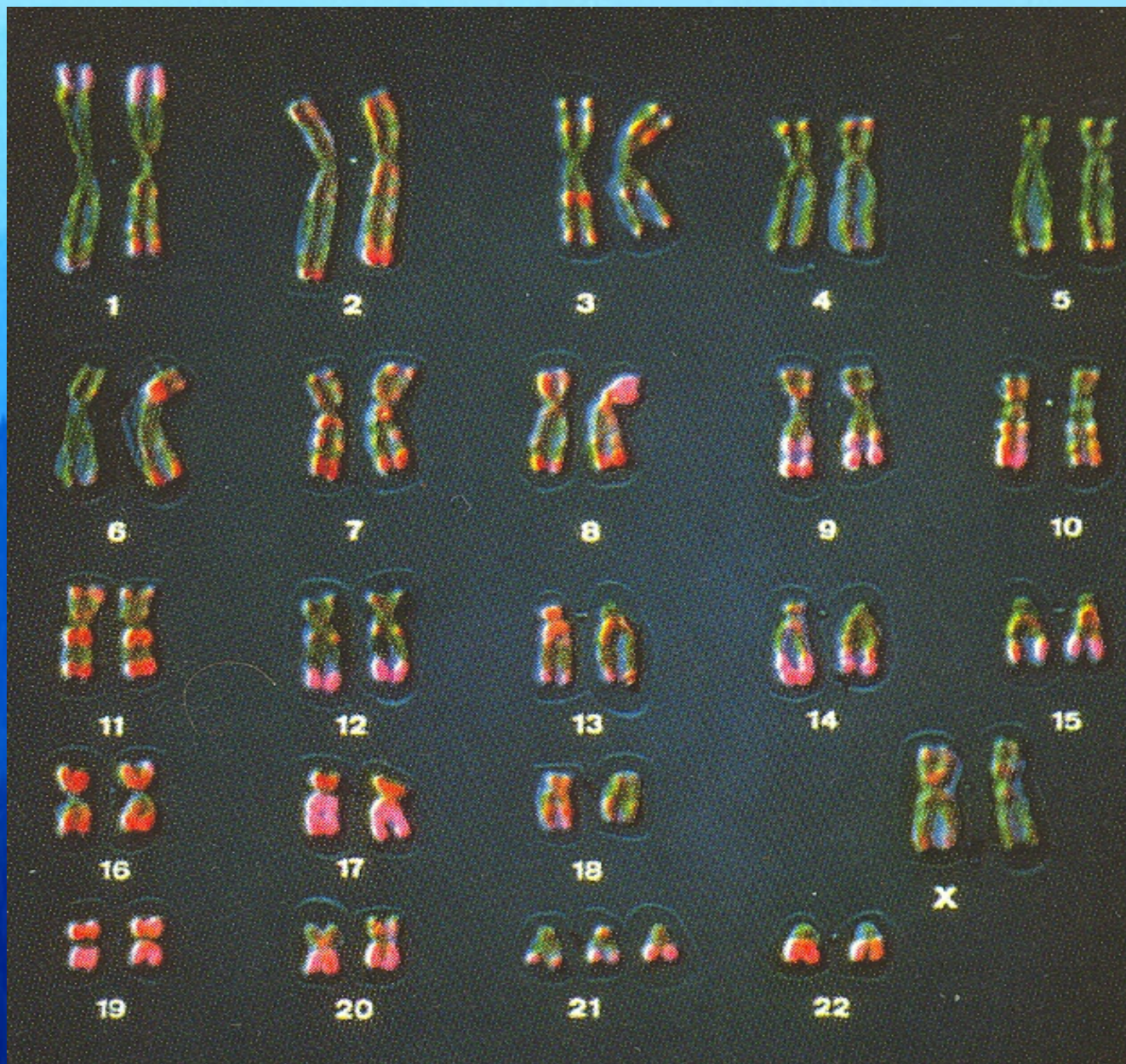
(metoda FISH)



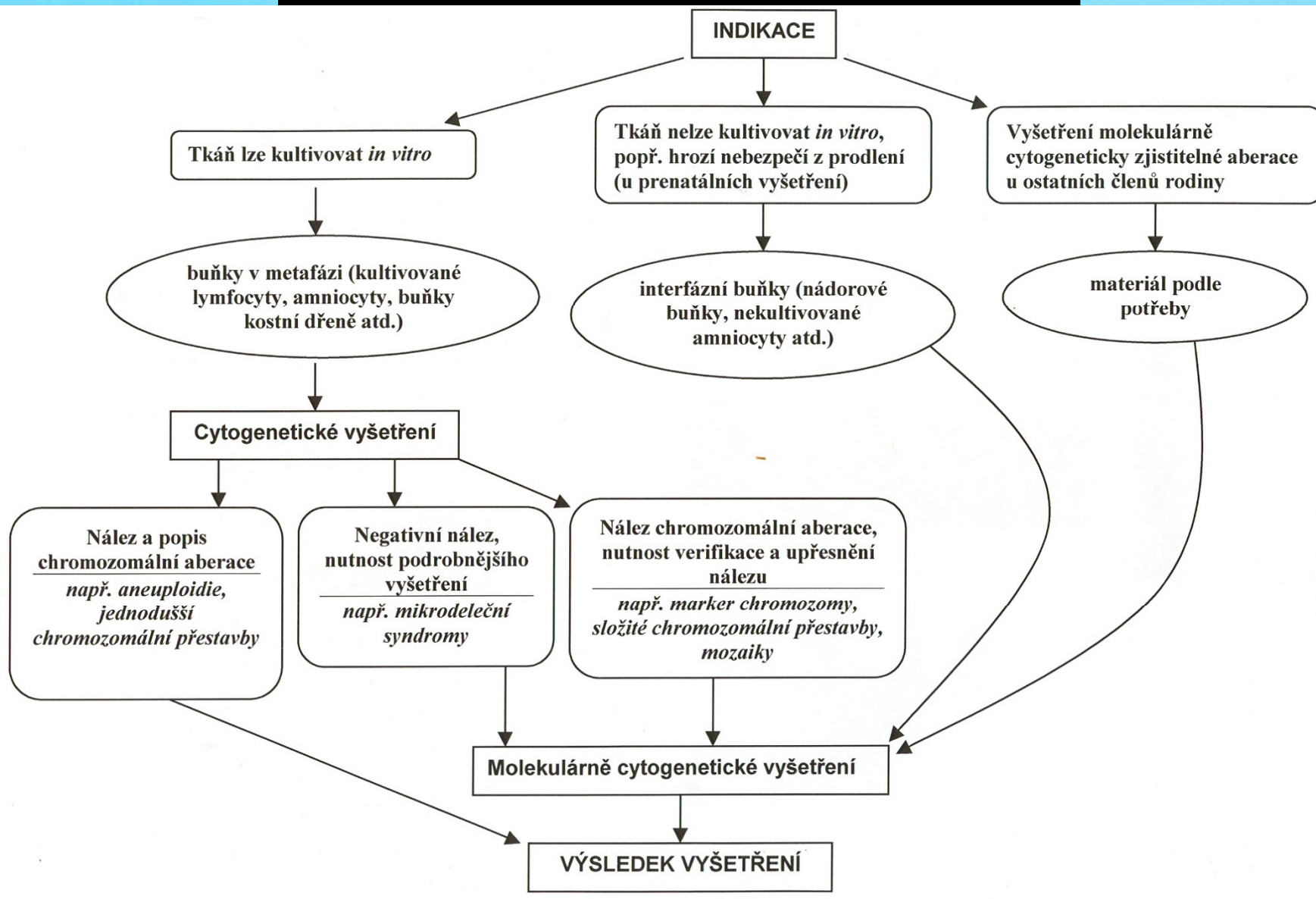
Abnormální karyotyp (metoda FISH)



Karyotyp trisomie 21



Cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření



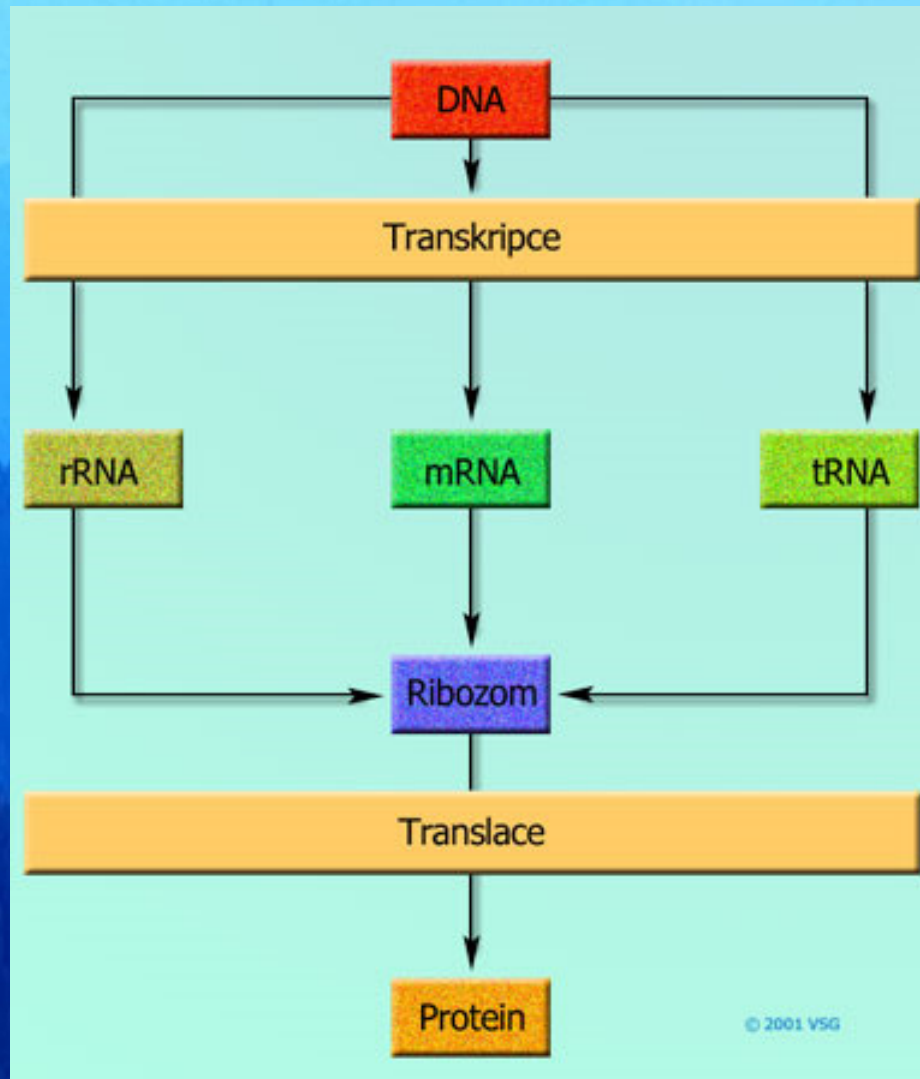


MOLEKULÁRNÍ GENETIKA

Úvod

- **molekulární genetika** - studium procesů podmiňujících dědičnost a proměnlivost na molekulární úrovni
- **genetická informace (GI)** je **zakódována v DNA** - uložena v J buňky v chromozómech
- **Odhalení funkce NK – Avery (1944)** – „Averyho bomba“
- **odhalení genetického kódu (GK)** - Watson a Crick (1953) - zlomový objev pro další rozvoj molekulární genetiky
- **v posledních desetiletích bouřlivý rozvoj MG**
- projekty:

Tok genetické informace



Expres genetické informace je komplexní proces a lze si jej představit jako informační tok (přesun informace pomocí informačních molekul z sekvence nukleotidů do sekvence AA) v buňce. Souhrnně tyto procesy (směr "toku" genetické informace) představují tzv.

**Centrální dogma
molekulární
genetiky:**

"DNA → RNA → protein"

Nukleové kyseliny

DNA = deoxyribonukleová k.
(deoxyribonucleic acid)

RNA = ribonukleová kyselina
(ribonucleic acid)

dvouvláknová - dvoušroubovice

jednovláknová

Funkce: DNA - nositel GI *)

RNA - podíl na realizaci GI

*) u některých virů je nositelem GI: RNA

- např. medicínsky důležité viry:

- virus chřipky

- virus HIV (Humane Immunodeficiency Virus) - vyvolává AIDS

chromozómy se skládají z řady makromolekul:

- cca 60–90 % tvoří zhruba ve stejném poměru DNA a histony (bázické proteiny),
- dále nehistonové proteiny a molekuly RNA

DNA



Struktura NK

Základní stavební kamen NK:

nukleotid = cukr + fosforečný zbytek + dusíkatá báze

- pětiuhlíkatá **ribóza** (v RNA)
- **deoxyribóza** (v DNA)

na 3. a 5. atomu uhlíku
fosfátová skupina
spojuje molekuly cukru navzájem do řetězce

nukleotid X nukleosid

↓
pětiuhlíkatý cukr
+ fosfátová skupina
+ dusíkatá báze

↓
báze + deoxyribóza

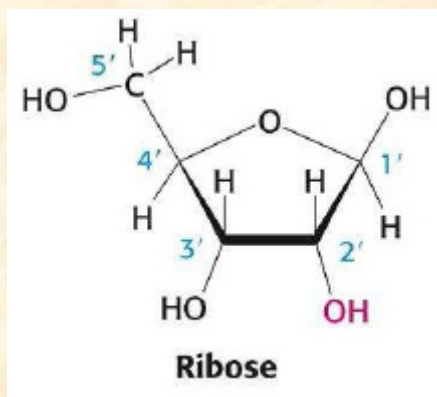
na 1. atomu uhlíku cukru
- **purinové** A, G
- **pyrimidinové** báze T,

- DNA: A, **T**, G, C
- RNA: A, **U**, G, C

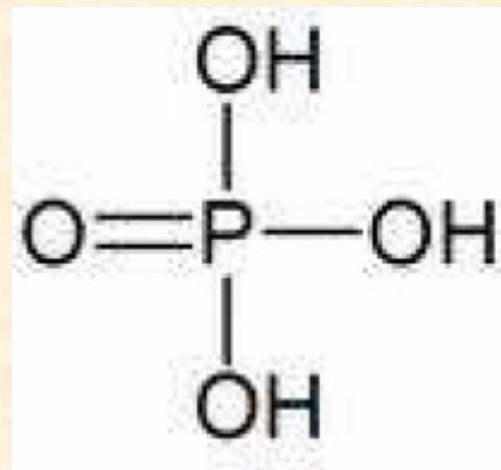
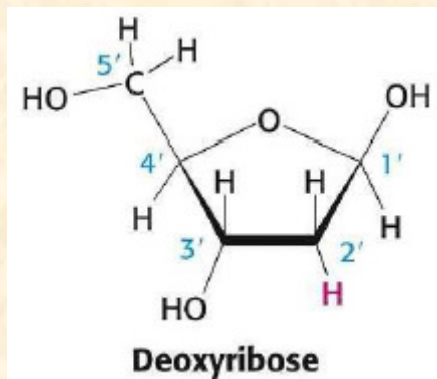
Cukerná složka

Zbytek H_3PO_4

u RNA



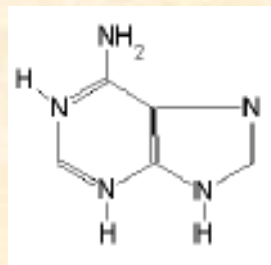
u DNA



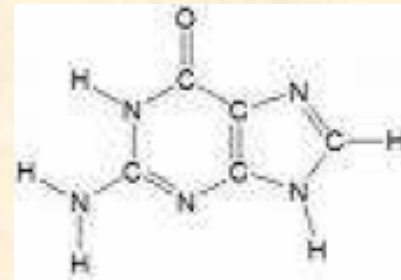
Dusíkaté báze

Purinové

adenin A

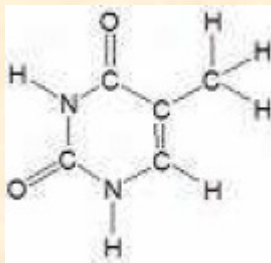


guanin G

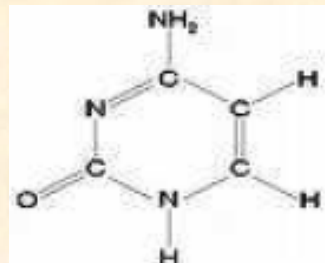


Pyrimidinové

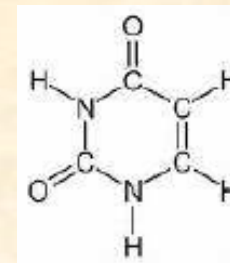
thymin T



cytosin C

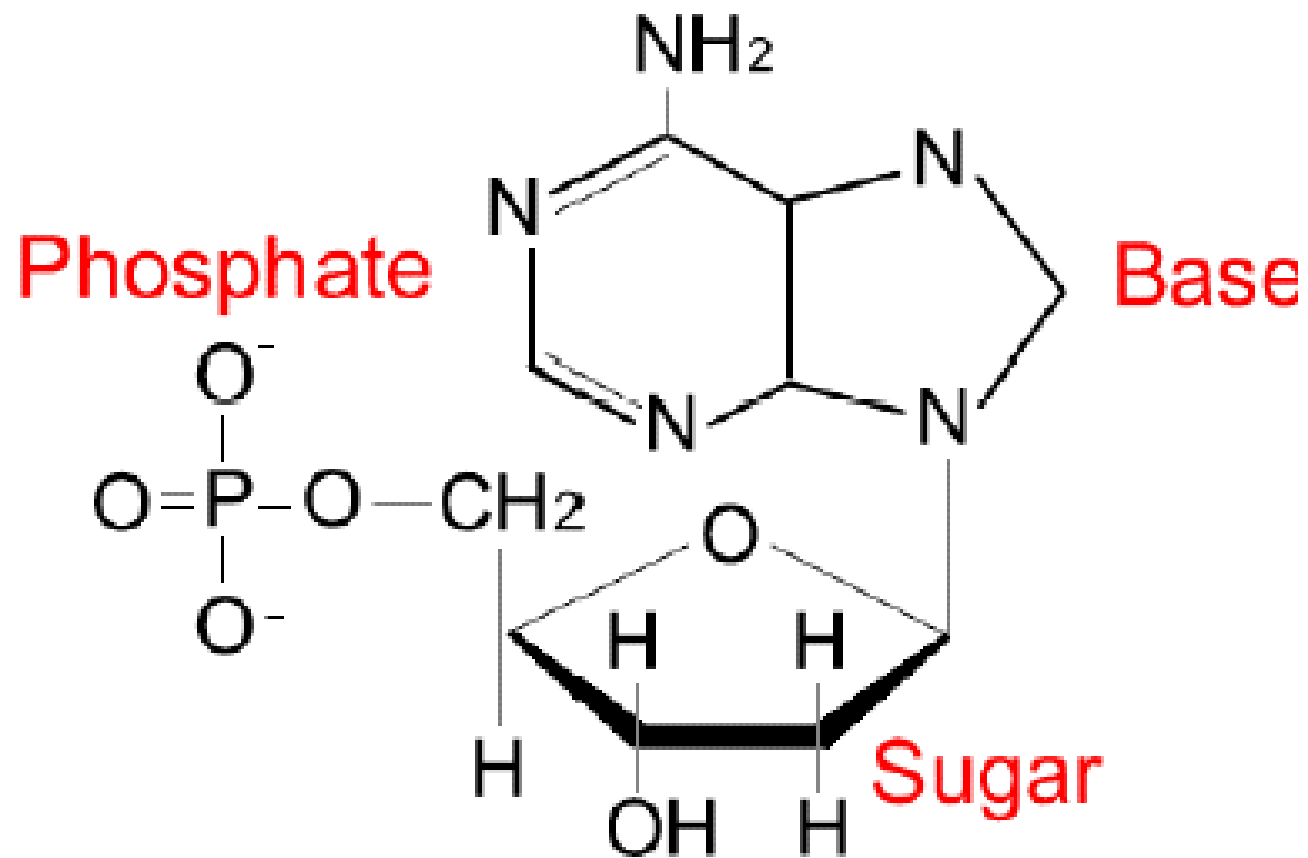


uracil U

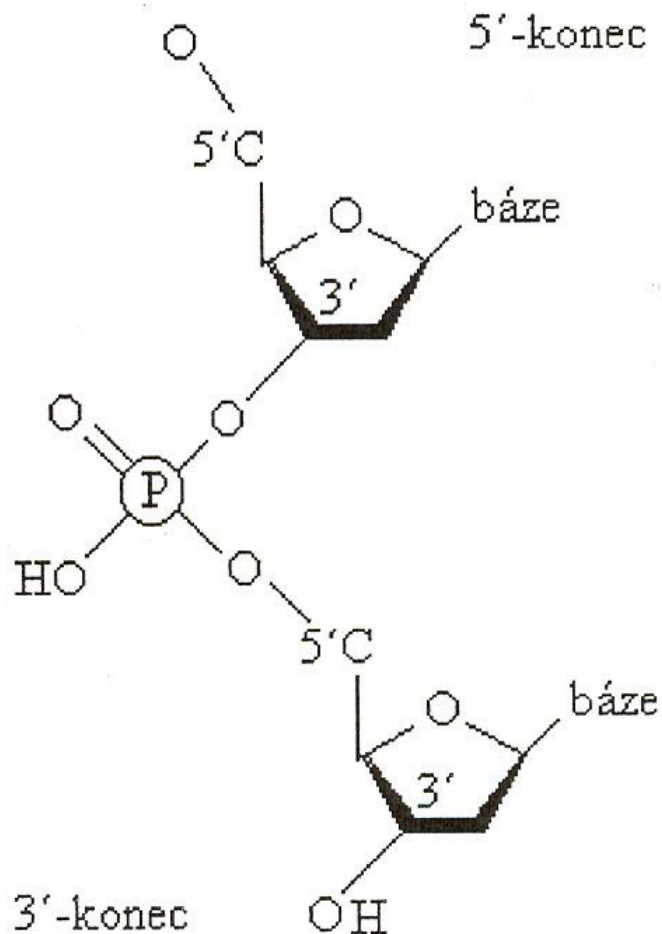


Nukleotid

Nucleotide structure



Řetězec nukleotidů 3' - 5'

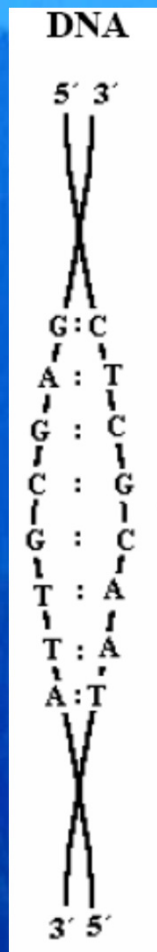


V DNA - dva protisměrné nukleotidové řetězce:

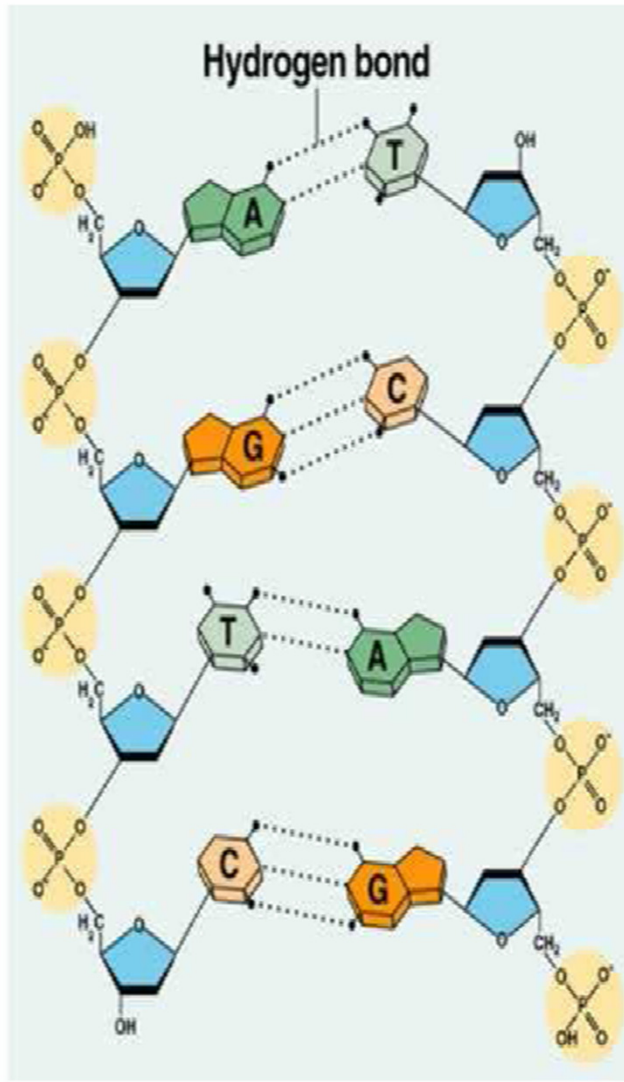
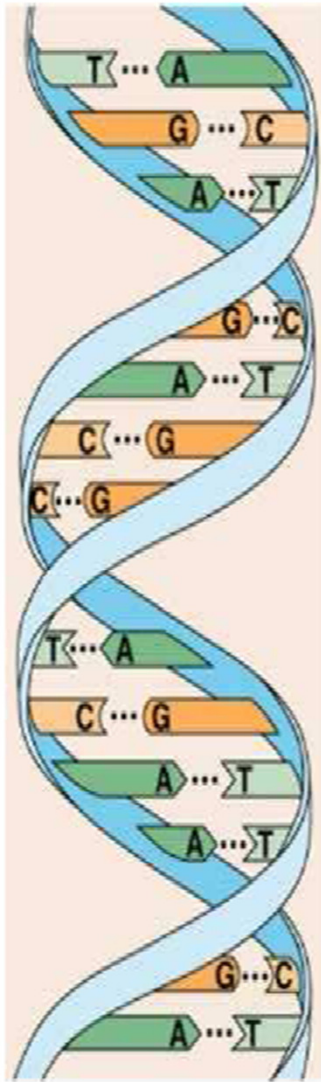
1. ve směru **5' - 3'** „dolů“ („po směru“)
2. **3' - 5'** „nahoru“ („proti směru“)

navzájem jsou spojeny do dvoušroubovice prostřednictvím **vodíkových můstků** mezi komplementárními bázemi

A - T (2 můstky)
a G - C (3 můstky).



DNA



Strukturu DNA můžeme přirovnat k točitému schodům, jejichž "bočnice" jsou tvořeny spojením cukr - fosfátová skupina (monotónně se opakuje). Poloviny jednotlivých stupňů jsou tvořeny dusíkatou bází, která se napojuje na druhou polovinu - komplementárního partnera ze druhého vlákna.

Komplementarita bází

A - T
C - G

DNA

A - U
C - G

RNA

Příklad komplementarity:

1. vlákno AGTCAGTC

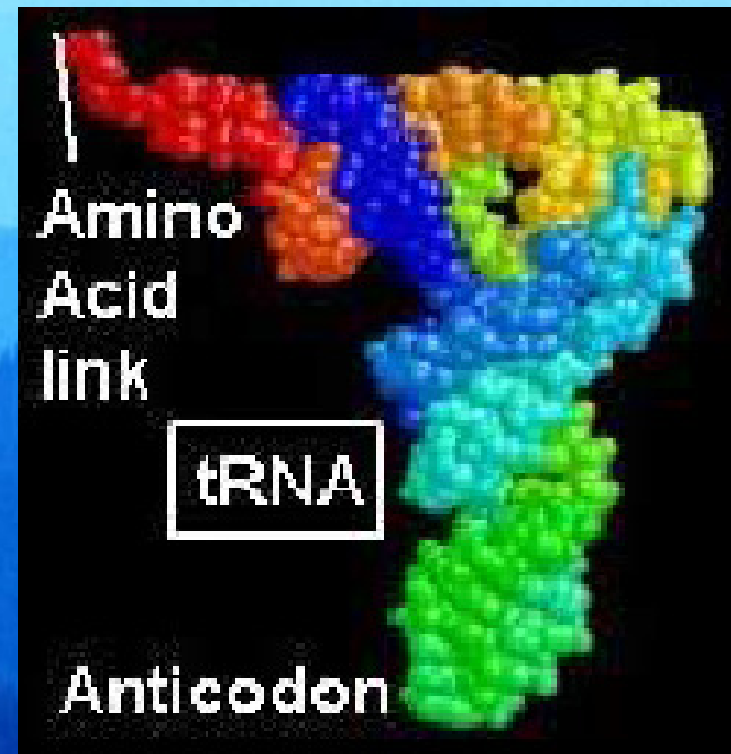
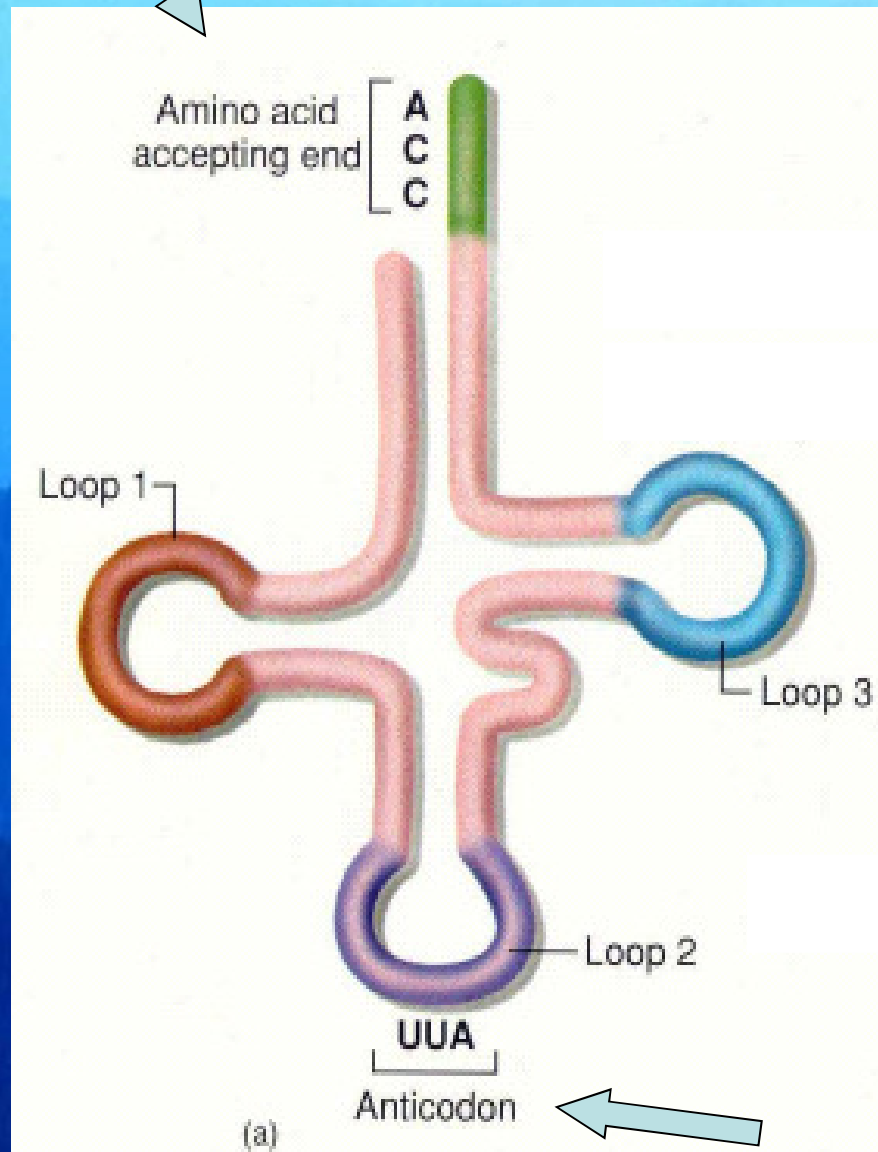
2. vlákno TCAGTCAG

RNA

Typy RNA:

- 1. transferová (tRNA)** - přenos aktivovaných AA na místo biosyntézy bílkovin (ribozómy)
- 2. ribosomální (rRNA)** - součást ribozómů, které jsou místem biosyntézy bílkovin
- 3. mediátorová (mRNA)** - přenos GI z DNA na bílkoviny
(messenger = poslíček) (ve formě specifické sekvence nukleotidů)
- různá délka (několik set až tisíc nukleotidů)

t-RNA

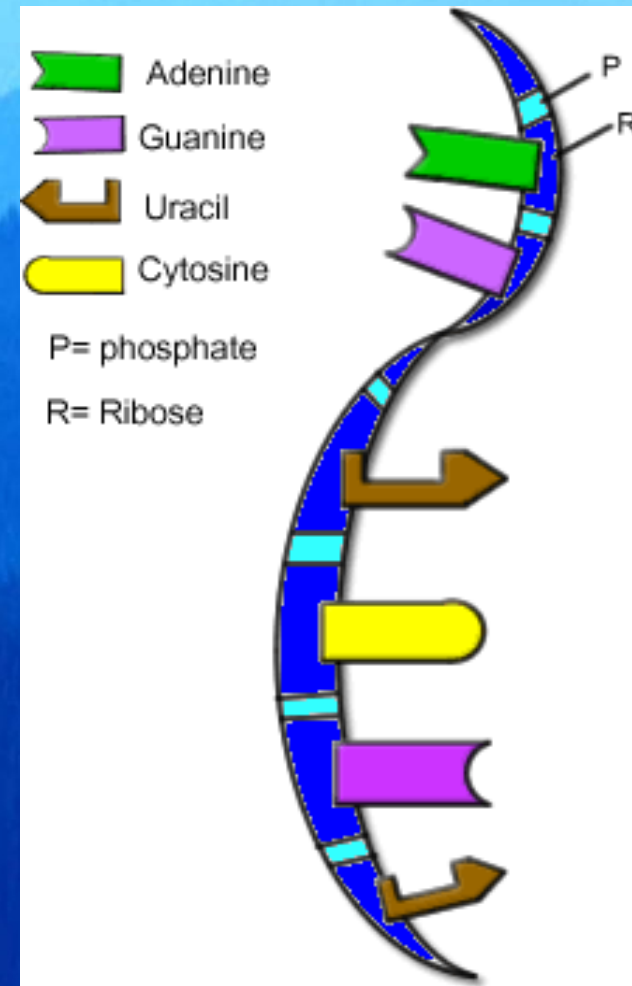


Transferová RNA
- tvar připomínající trojlístek

rRNA



mRNA



Rozdíly mezi DNA a RNA

DNA

- deoxyribóza cukr
- A, T, G, C báze
- dvouvláknová počet vláken
- 1 typ DNA *) počet typů
- stejná fce **) funkce

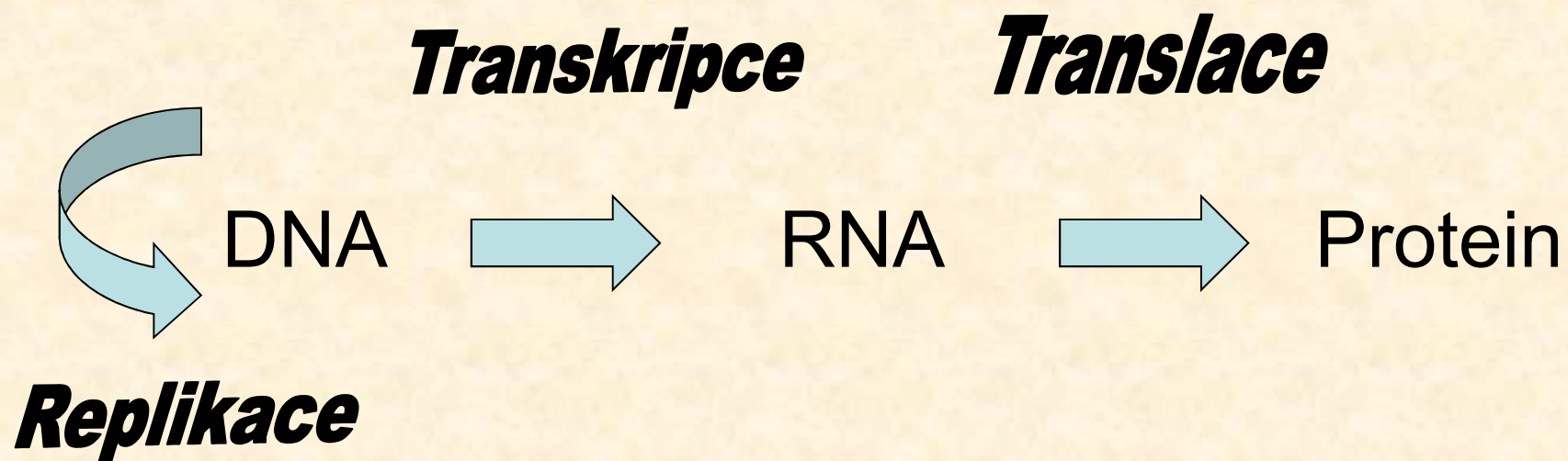
RNA

- ribóza
- A, U, G, C
- ± 1vláknová
- 3 typy RNA
- rozličné fce

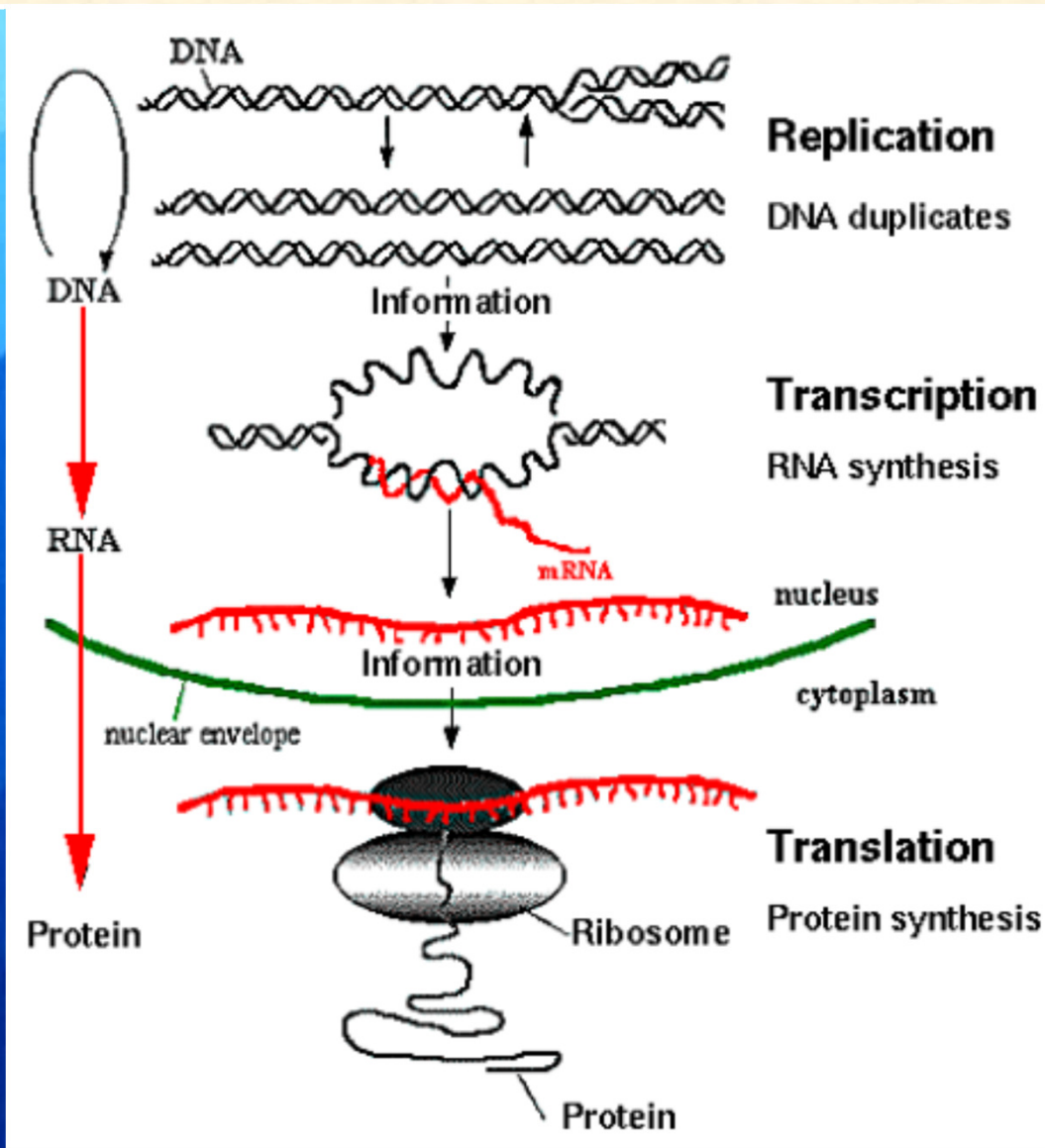
*) u všech živých organismů

**) uchovávání a přenos GI

Přenos GI



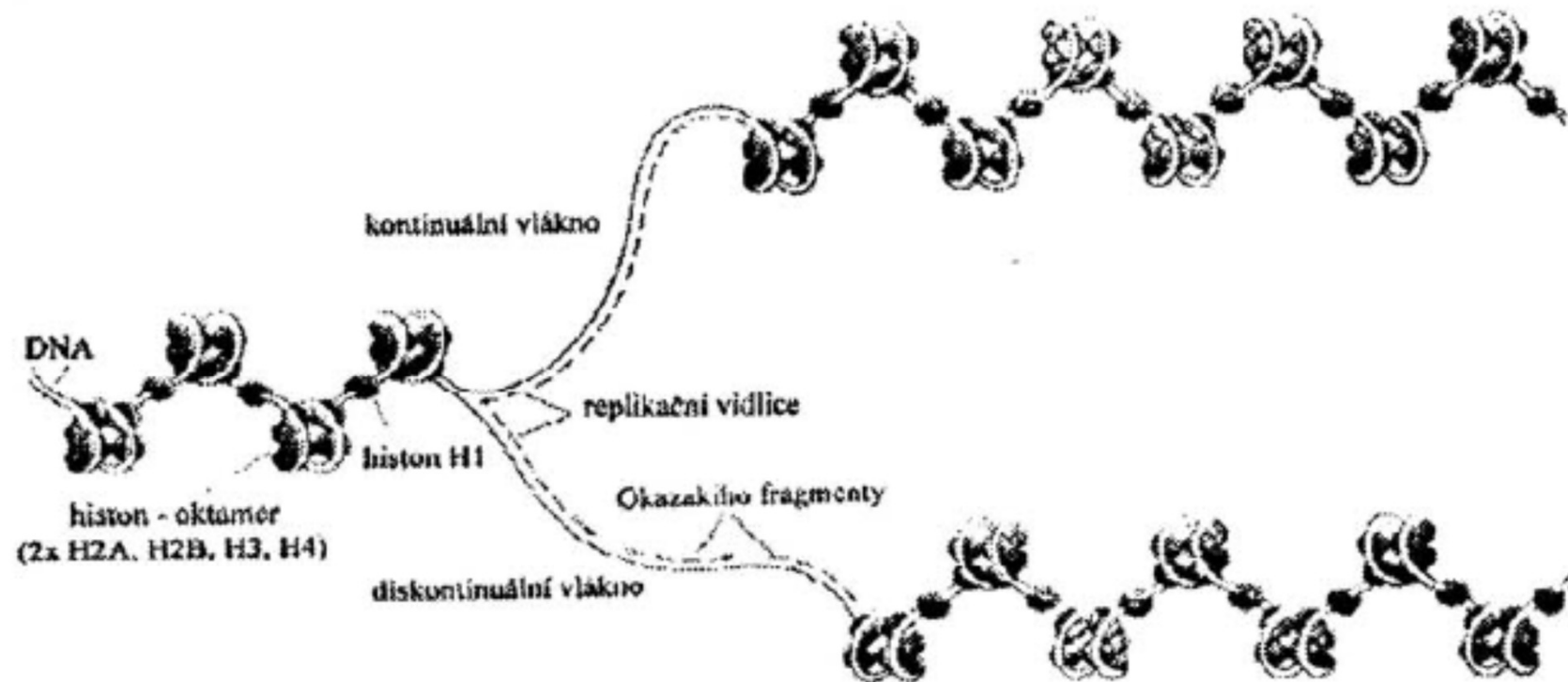
Replikace, transkripce, translace



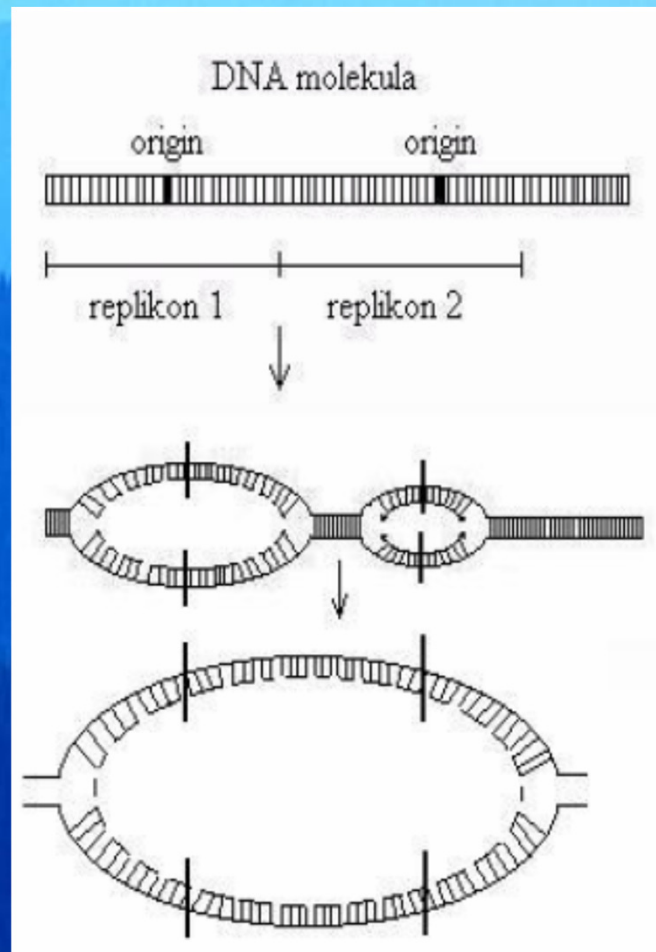
Replikace DNA

- Struktura ve formě dvoušroubovice a komplementarita bází umožňují **semikonzervativní replikaci DNA - z 1 mateřské dvoušroubovice DNA → 2 dceřinné** (každá z nich 1 vlákno původní - mateřské a 1 nově syntetizované).
- Replikace je zajišťována **DNA polymerázami**.
- **Replikační vidlička** - místo, kde probíhá syntéza nového vlákna
- Dvoušroubovice DNA se rozpojí, každé vlákno je předlohou pro vznik komplementárního vlákna DNA. Postupně jsou na nově vznikající vlákno připojovány nukleotidy, které mají dusíkatou bázi komplementární k bázi na původním vláknu DNA.
- Syntéza probíhá v obou směrech, obě replikační vidličky se od sebe vzdalují a vytvářejí tak útvar, který je možné pozorovat v elektronovém mikroskopu jako **replikační bublinu**.
- V prokaryontních buňkách je DNA syntetizována jako jednotka, tj. celý chromozóm je jeden replikon, v eukaryontních je rozčleněna do více částí - **replikonů**.
- Replikace probíhá v S fázi buněčného cyklu.

Schéma replikace



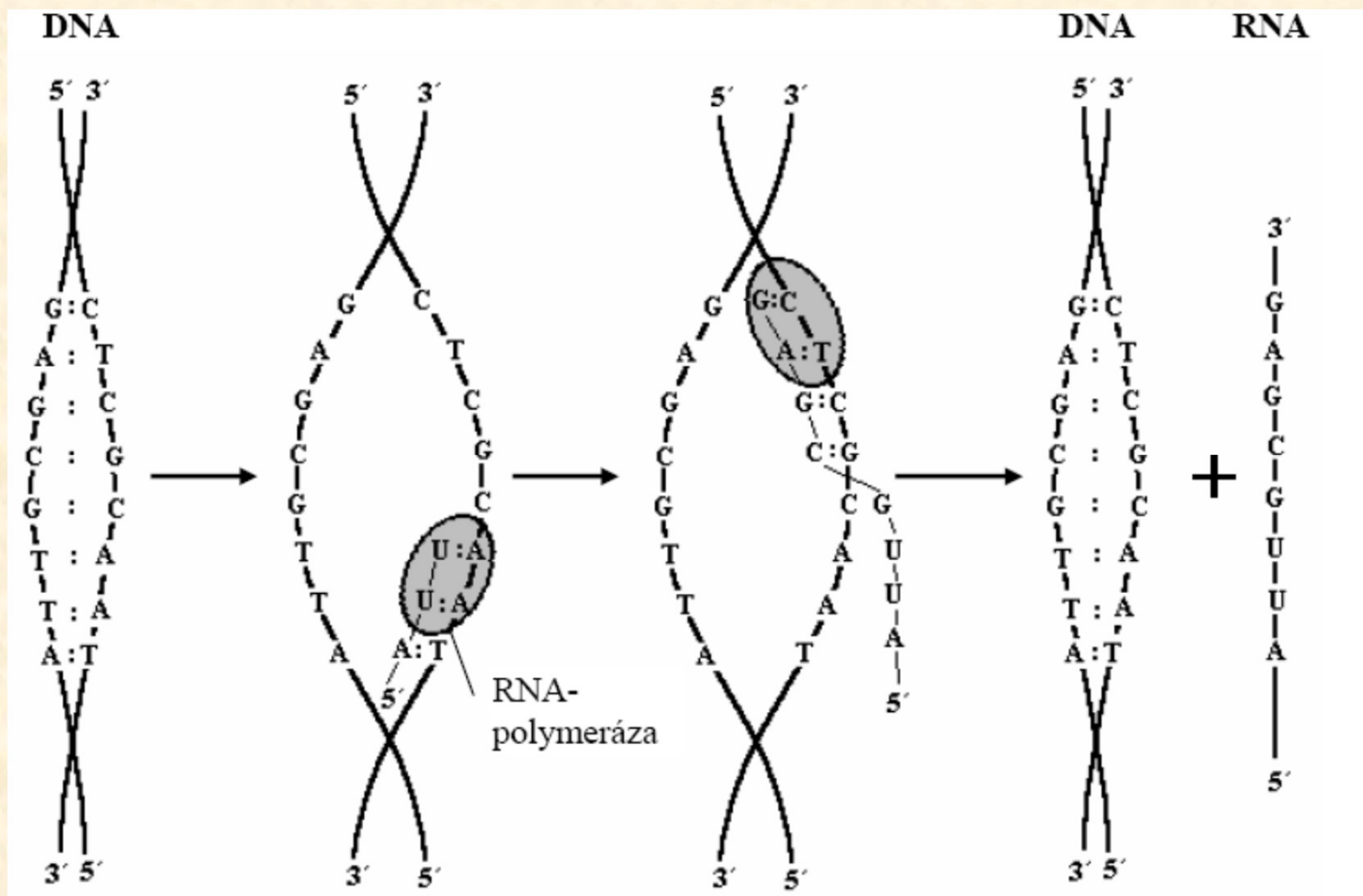
Replikon



Transkripce

- podle předlohy v DNA syntetizována RNA
- 1 mechanismus transkripce pro všechny RNA
- **Přepisována, transkribována je sekvence nukleotidů v DNA, podle které vzniká komplementární sekvence nukleotidů v RNA.**
- Tento proces je enzymaticky zajišťován **RNA polymerázami**.
- Signální sekvence DNA před genem, na které se váže RNA polymeráza se nazývá **promotor**. Na promotor se naváží transkripční faktory (proteiny), dále RNA polymeráza a za přítomnosti volných ribonukleotidů probíhá syntéza nového řetězce mRNA.
- Produktem transkripce je prekurzorová **pre-mRNA** (kromě vlastního genu obsahuje také introny a okrajové části genu) → **maturace** (dozrávání) mRNA - dojde k enzymatickému rozštěpení pre-mRNA a spojení **exonů** (kódujících částí). **Introny** (nekódující části) zůstávají v jádře. Tento proces se nazývá **splicing** (=sestřih).

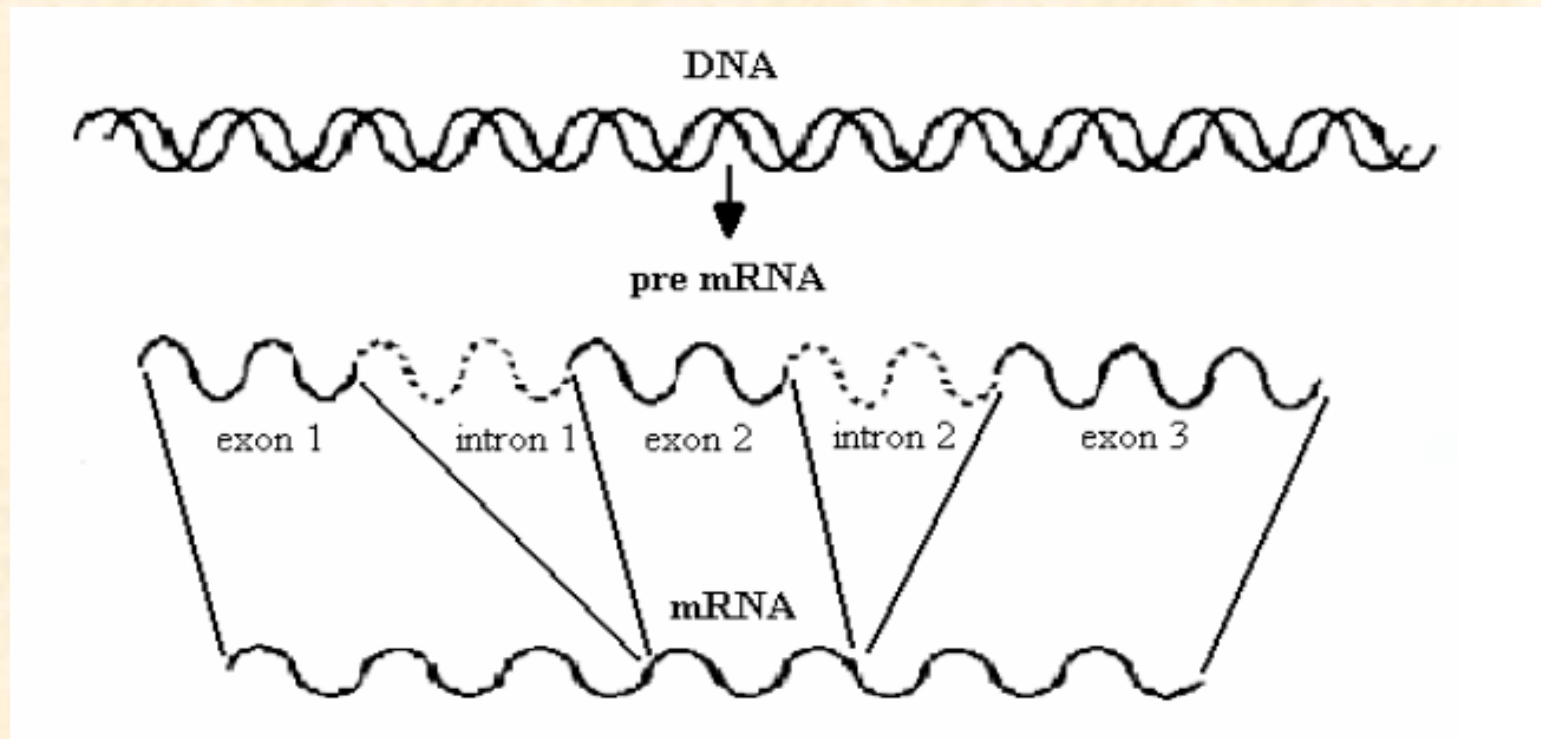
Schéma transkripce



Posttranskripční úpravy

- po ukončení transkripce - vznik pre-mRNA => zrání (maturace)
- pre-mRNA - 2 typy úseků: **exony** a **introny**
- **SPLICING** = sestřih - „vystřížení“ intronů

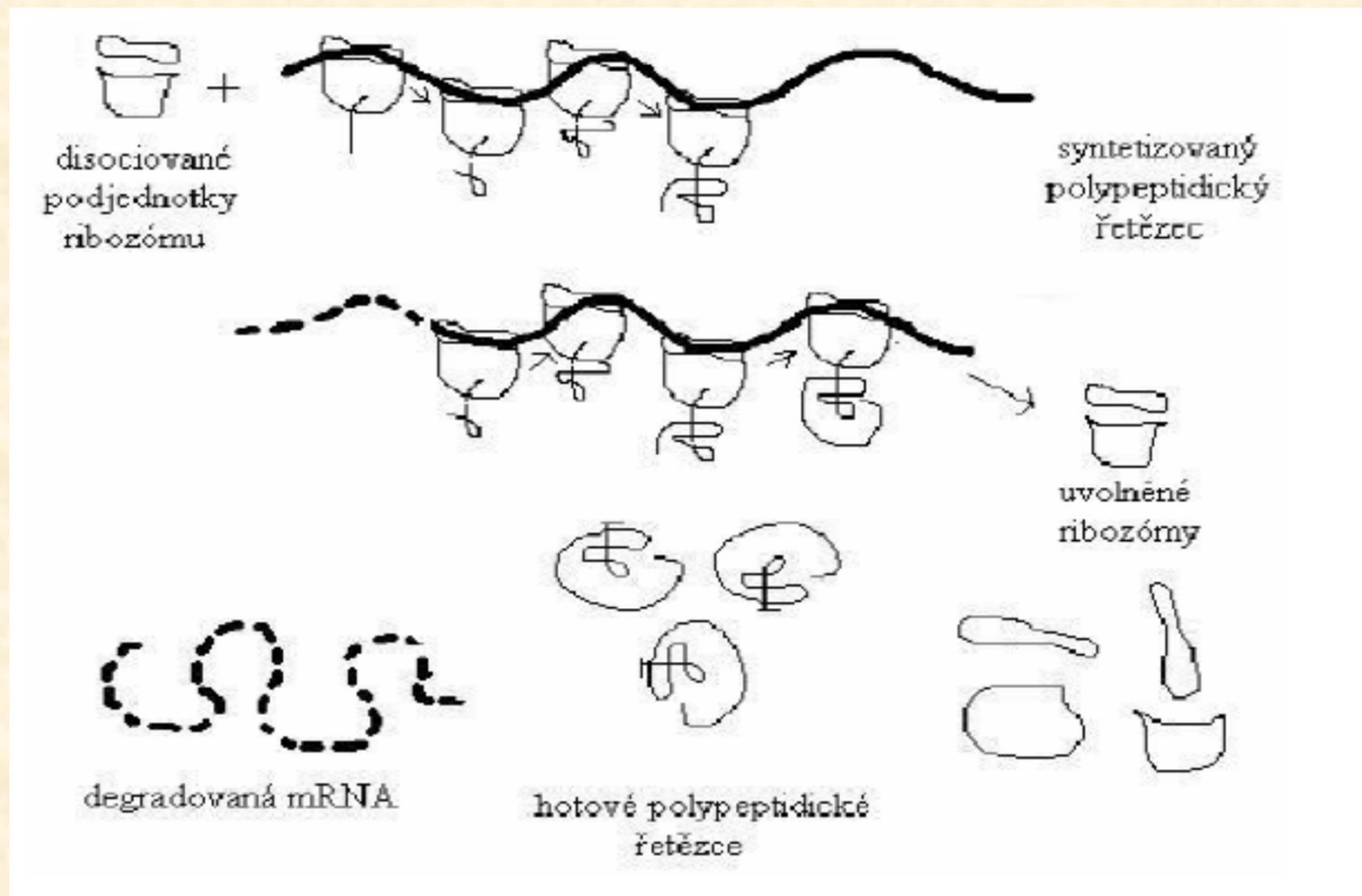
Schéma splicingu



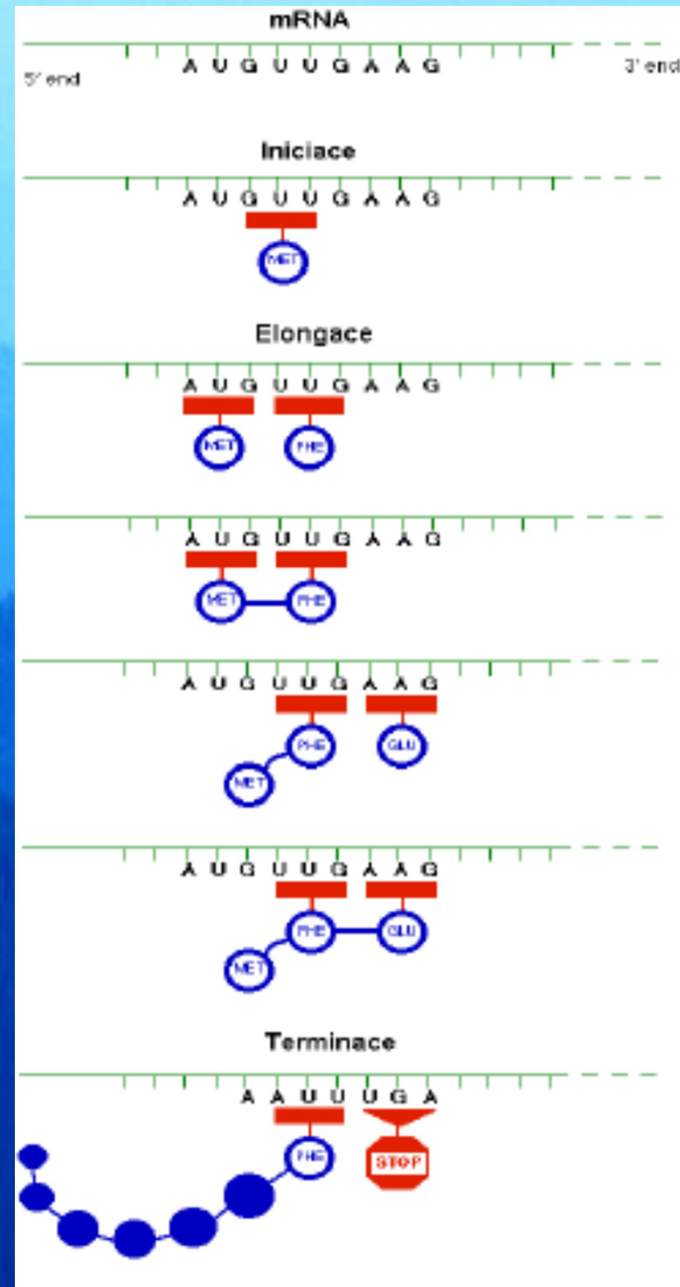
Translace

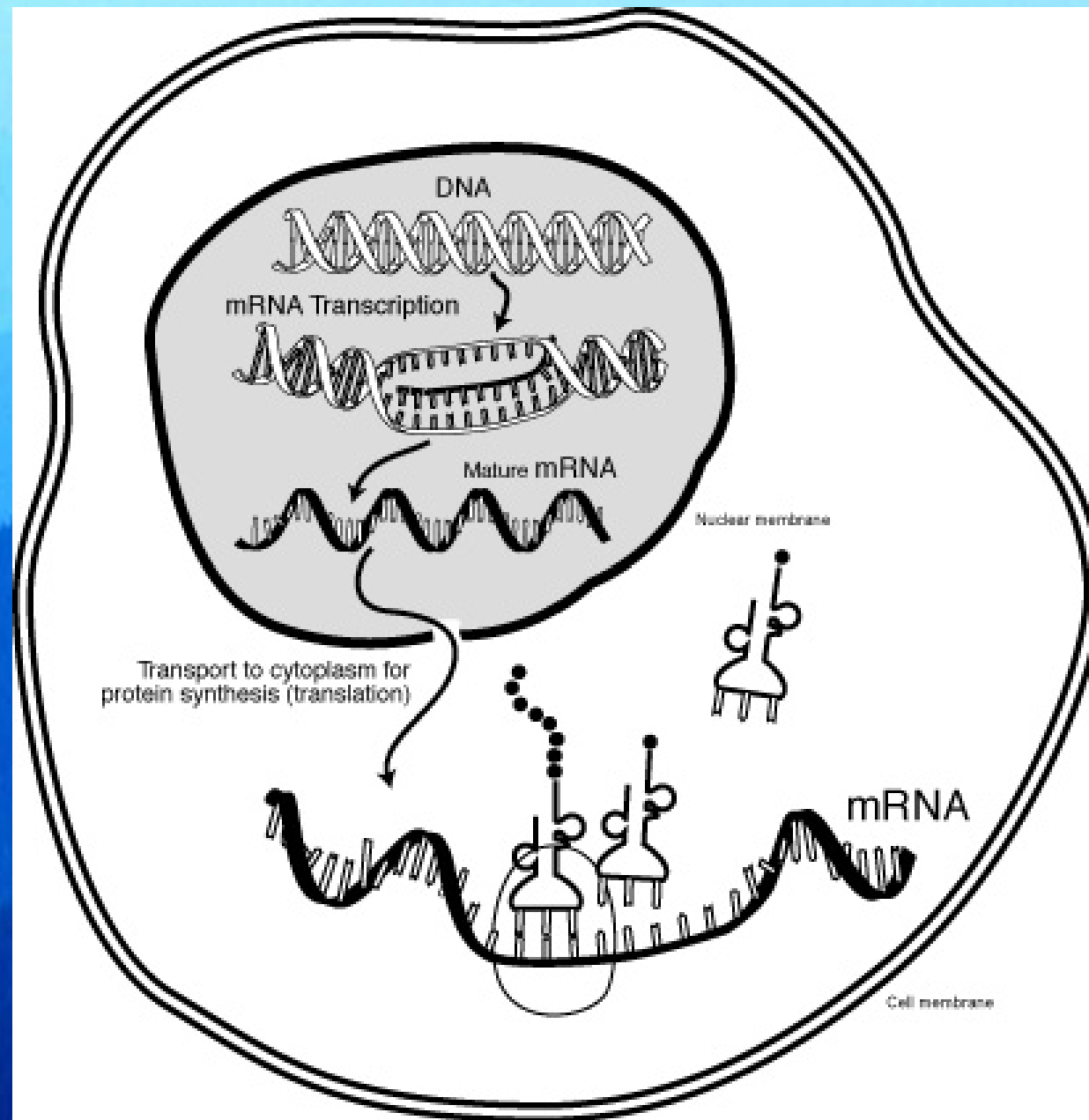
- = přepis informace o sekvenci nukleotidů v mRNA do sekvence AA (aminokyselin) ve vznikajícím proteinu (překlad nukleotidů do pořadí AA v polypeptidovém řetězci)
- probíhá na **ribozómech** (komplex několika typů rRNA a proteinů)
- volné AA jsou vázány na tRNA, transportovány do ribozómu, kde tRNA nasedá svým **antikodonem** (specifická trojice bází) na **kodon** na mRNA
- pořadím tří bází na kodonu je dána AA, která bude na příslušném místě v syntetizovaném proteinu
- na sousední kodon nasedá další tRNA s AA, mezi aminokyselinami vzniká **peptidová vazba**, dále ve směru 5' - 3' nasedají další tRNA a navazují se další AA

Schéma translace



Translace



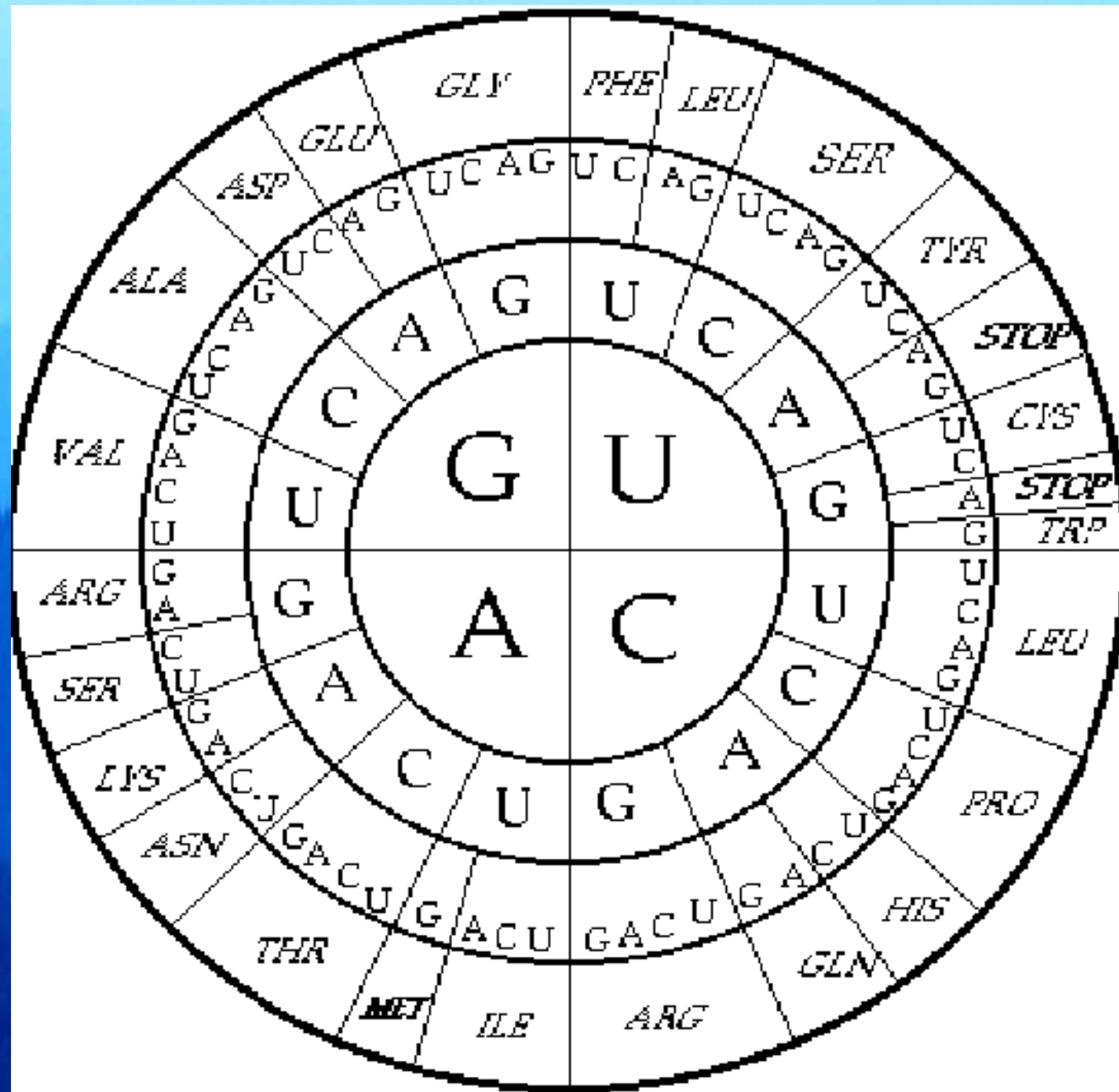


Genetický kód

- soubor pravidel, podle kterých se genetická informace uložená v DNA, resp. RNA, převádí na primární strukturu bílkovin - tj. pořadí aminokyselin v řetězci

Vlastnosti - GK je:

- 1. tripletový** - pořadí tří nukleotidů určuje aminokyselinu - trojice bází kóduje 1 AA (trojice nukleotidů = **kodon**, triplet)
- 2. univerzální** - u všech organismů kóduje 1 a ten samý triplet stejnou AA (pravidlo platí pro velkou většinu kodonů, u některých organismů mají některé kodony odlišný smysl)
- 3. degenerovaný** (nadbytečný) - 1 AA může být determinována více kodony (1 AA je kódována více triplety)
- 4. bez mezer a nepřekrývající se** - jednotlivé kodony v molekulě NK následují bezprostředně za sebou



Ze tří různých bází v kodonu je možné sestavit celkem 64 kombinací !

1. báze	2. báze				3. báze
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	term.	term.	A
	Leu	Ser	term.	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met, inic.	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Gen

= úsek DNA, která má:

1. **specifickou funkci** v buňce a v celém organismu - musí být schopen utvářet dědičný znak nebo spolupracovat při utváření několika takovýchto dědičných znaků
2. je schopen **vytvářet přesné vlastní kopie** - přenášet svou funkci z generace na generaci
3. charakteristickou vlastností genu je **schopnost náhle změnit svou strukturu a tím i funkci**, tj. podléhat mutacím. Zmutovaný gen replikuje svou změněnou podobu.

Lokus - **místo** na chromozomu, na kterém je gen umístěn

Alely - **odlišné formy téhož genu**, které u různých jedinců téhož druhu alterují na jednom lokusu (uspořádání lokusů je pro druh konstantní)

Gen

- 1) **Strukturní gen** - úsek DNA, který je přepisován do primární struktury polypeptidu:
Strukturní gen - transkripce - mRNA - translace - polypeptid.
- 2) **Gen pro funkční RNA** - úsek DNA, který je přepisován do tRNA, rRNA nebo jiného typu RNA, avšak **neprobíhá podle něj translace**.
- 3) **Gen jako regulační oblast** - úsek DNA, identifikovaný specifickým proteinem, který zahajuje nebo zastavuje transkripci. Podle regulační oblasti se tedy netvoří žádný produkt, ani RNA, ani polypeptid.

Struktura genomu

U eukaryot je DNA: v **jádře buňky v chromozomech**,
v **mitochondriích** (živočiš. buňky),
v **chloroplastech** (rostlinné buňky).

Mimojaderné geny však hrají v eukaryontní buňce významnou roli, u rostlin probíhá v chloroplastech fotosyntéza, u živočichů v mitochondriích oxidázový cyklus.