

Princip molekulárně genetické diagnostiky

Rozpoznání a identifikace mutací v genech,
které jsou v asociaci s danou chorobou.

Jakmile je identifikována genetická příčina
onemocnění na úrovni DNA,
může se vyvinout specifický test
k analýze relevantních genetických charakteristik pacienta

Není zatím možné vyšetřit,
zda proband bude trpět jakoukoliv dědičnou chorobou,
vždy se vyšetřuje možnost poškození určitého konkrétního genu.

Existují i vyšetření, které nezapadají do této definice,
z těch běžných např. molekulárně genetická detekce aneuploidií

Princip molekulárně genetické diagnostiky

Rozpoznání a identifikace mutací v genech,
které jsou v asociaci s danou chorobou.

Jakmile je identifikována genetická příčina
onemocnění na úrovni DNA,
může se vyvinout specifický test
k analýze relevantních genetických charakteristik pacienta

SEKVENOVÁNÍ EXOMŮ, GENOMŮ

Existují i vyšetření, které nezapadají do této definice,
z těch běžných např. molekulárně genetická detekce aneuploidií

Molekulárně genetická diagnostika

V molekulárně genetické diagnostice jsou dva základní a navzájem zcela odlišné metodické přístupy vyšetření:

- nepřímé (*gene tracing*)
- přímé (*direct testing*).

Přímá molekulárně genetická diagnostika

Detekce kauzálních mutací v odpovědném genu
vždy potvrdí klinickou diagnózu

musíme znát:

- gen , který má být analyzován
- standartní (wild type) sekvenci tohoto genu

Přímá molekulárně genetická diagnostika

Metody detekce známých mutací (scoring)

v genu asociovaném s danou chorobou

Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)

v genu asociovaném s danou chorobou

Přímá molekulárně genetická diagnostika

Metody detekce známých mutací (scoring)

detekce určité kauzální mutace pro danou chorobu specifickou metodou

Detekce známé sekvenční změny je možná u:

- 1) chorob s předpokládanou alelickou homogenitou, tzn. že patologická alela příslušného genu je reprezentovaná
 - * jedinou mutací (srpkovitá anemie)
 - * omezeným počtem mutací (α 1-antitrypsinový deficit)
 - * rozsáhlou řadou mutací rozmístěných přes celý gen, kdy jedna nebo vícemutací se vyskytují s prevalující četností (CFTR, DMD)
 - * expanzí trinukleotidových opakujících se sekvencí (HD, MD)

- 2) v rodinách s již charakterizovanou mutací v příslušném genu

- 3) ve výzkumu (k potvrzení kandidátního genu a k odlišení nepatogeního polymorfismu)

Příklady chorob s vymezeným počtem mutací

Srpkovitá anemie	mutace E6V v HBB genu
Cystická fibróza	mutace F508del v CFTR genu
Huntingtonova chorea, Myotonická dystrofie, Fragilní X	nestabilní expanze trinukletidových repeticí
Hemofilie A	velka inverze v genu pro faktor 8
Duchennova muskulární dystrofie	60-70% mutací tvoří velké delece
Tay-Sachsova choroba	inzerce 4pb v exonu 11 genu HEXA
Lebrova optická atrofie	mitochondriální mutace nukleotidu v pozici 3460, 11778, 14484

Přímá molekulárně genetická diagnostika

Metody detekce známých mutací (scoring)

detekce určité kauzální mutace pro danou chorobu specifickou metodou

Amplifikace úseku s předpokládanou delecí	detekce delecí
Restrikční analýza PCR produktu	mutací vzniká nebo zaniká specifické místo v DNA, rozlišované restrikčním enzymem
Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy	detekce bodových mutací
PCR s alelově specifickými primery (ARMS test)	detekce bodových mutací
PCR s primery ohraničujícími předpokládané delece v DNA	úspěšná amplifikace odhalí přítomnost specifické přestavby v DNA
Analýza teploty tání PCR produktu pomocí real-time PCR	změna teploty tání v porovnání s pozitivní a standardní kontrolou odhalí specifickou sekvenční změnu
Triplet Primed PCR	detekce expanze trinukleotidových repeticí v DNA
Multiplex Ligation Probe Amplification MLPA	detekce rozsáhlých delecí a duplikací, vhodná pro stanovení SNP genotypů a testování metylací v promotorové oblasti genů

Přímá molekulárně genetická diagnostika

- **Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)**

postupné nebo multiplexní screenování úseků genu asociovaného s danou chorobou pomocí vyhledávacích metod

odhalí jakékoliv odchylky v analyzované sekvenci DNA pacienta
ve srovnání se standardní sekvencí

neodliší patogenní a nepatogenní změny v sekvenci DNA

jsou náročnější časově i finančně

Přímá molekulárně genetická diagnostika

Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)

Jednořetězcový konformační polymorfismus (SSCP)	jednoduchá metoda	doporučuje se pro krátké sekvence DNA neodhaluje pozici změny
Denaturační gradientová elektroforéza (DGGE)	vysoká citlivost	nutné primery s GC-clampy neodhaluje pozici změny
Heteroduplexní analýza (HD)	jednoduchá metoda	doporučuje se pro krátké sekvence DNA omezená citlivost neodhaluje pozici změny
Detekce zkráceného proteinu (PTT)	vysoká citlivost pro terminační mutace	pouze pro terminační mutace odhaluje pozici změny
Analýza teploty tání na real-time PCR, HRM	vysoká citlivost	doporučuje se pro sekvence cca 250 bp neodhalí pozici změny
Sekvenování	detekce veškerých změn v DNA	nadbytek informací plně charakterizuje mutace

Přímá molekulárně genetická diagnostika

Scoring kauzálních mutací \Rightarrow Scanning kódující oblasti genu



Identifikace dosud nepopsané mutace ???

Přímá molekulárně genetická diagnostika

neznámá mutace – kauzální mutace???

Aby mohla být sekvenční varianta detekována k prediktivnímu genetickému testování
potřeba nezávislého důkazu, že je patogenní

- genetická charakterizace - aspekty evoluční konzervace
 - kosegregace mutace s chorobou v nejméně 2 rodinách
 - absence u 100 zdravých kontrol (<1%)
- funkční charakterizace
 - rekombinantní *in vitro* exprese na definovaném genetickém pozadí
 - zkouška funkce proteinu s charakterizovanou mutací v *ex vivo* tkáních



V molekulárně genetické diagnostice jsou dva základní a navzájem zcela odlišné metodické přístupy vyšetření:

- nepřímé (*gene tracing*)
- přímé (*direct testing*).



Nepřímá molekulárně genetická diagnostika

Nepřímá diagnostika byla daleko více používána v minulosti, kdy u většiny chorob nebyla známa přesná molekulární povaha poškození genu, popř. ani který gen přesně je u dané choroby poškozen.

U nepřímé diagnostiky postačuje, je-li známa jen jeho přibližná poloha v genomu.

Dnes se tento typ vyšetření používá tehdy, kdy sice víme, porucha kterého genu je zodpovědná za daný patologický fenotyp, ale nevíme, jaké konkrétní poškození genu chorobu u vyšetřovaného jedince vyvolá.



Nepřímá molekulárně genetická diagnostika

nezkoumá se přímo přítomnost nebo nepřítomnost určité poruchy v genu, ale segregace markeru, který je ve vazbě na alelu genu, jejíž porucha vyvolá vadný fenotyp.

Marker, jehož segregace v rodokmenu se sleduje, se dědí totiž společně s genem, sám ale s chorobou nemá žádnou příčinnou souvislost.

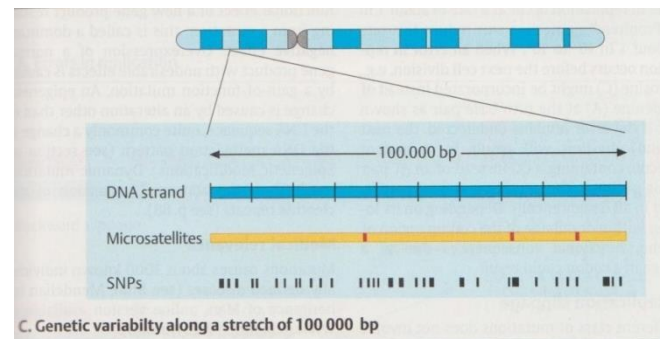
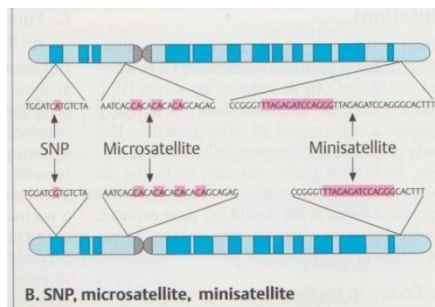
Ve zkoumaném rodokmenu se porovnává segregace markeru se segregací choroby


Jako markery se používají **DNA polymorfismy** .

DNA polymorfismy

Sekvence DNA se liší mezi jednotlivci.
Přítomnost několika alel v určitém místě.
tjako místo v sekvenci DNA, v němž jsou jedinci rozdílní.

- jednobodový polymorfismus
(*single nucleotide polymorphism – SNP*)
- minisatelitové polymorfismy
VNTR - variable number tandem repeats
- mikrosatelitové polymorfismy (*STR - short tandem repeats,*)





Jednobodový polymorfismus (*single nucleotide polymorphism – SNP*)

- rozdíly v jednom nukleotidu v určitém místě
- vyskytuje se asi jedenkrát na 1000 párů bází.
- celý lidský genom obsahuje více než 1,5 milionu SNPs
- vyskytují se v intronech, v extragenových oblastech
- jen asi 50 000 SNP v kódujících sekvencích genů

- přítomnost/nepřítomnost restriktč. místa,
vznik RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Jednobodový polymorfismus (*single nucleotide polymorphism – SNP*)

Detekce

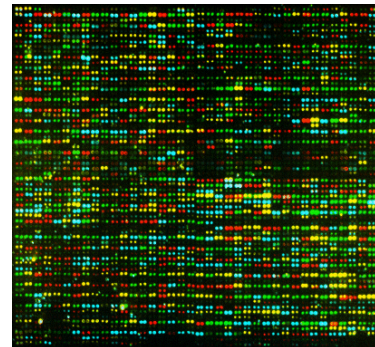
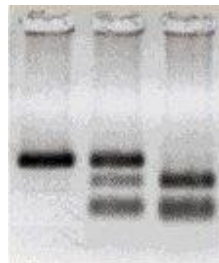
RFLP (restriction fragment length polymorphism)

restrikční štěpení genomické DNA s následným Southern blottingem

PCR amplifikace s následným restrikčním štěpením

PCR amplifikace s následnou sekvenací

DNA array (čipy) analýza až 100 tisíc SNP v jedné analýze



Minisatelity

(VNTR – Variable number of tandem repeats)

- Jedna třída polymorfizmů je způsobena tandemovou inzercí několika kopií sekvence DNA o délce 10 až 100 párů bází,
- je charakterizována větším počtem alel, které se liší podle toho, kolik kopií minisatelitu je přítomno.
- Délka základní repetície je větší než 6 bp a počet opakování repetície 10–100.
- Vyskytují se preferenčně v telomerických oblastech.
- Odhadovaný počet je cca 10^4 .
- Jejich využití je velmi omezené.

Hypervariabilní - 9–24 bp, hlavně v centromrických oblastech

Telomerické - 6 bp dlouhé (TTAGGG)_n, několik 1000 repeatů na telomerách



Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)

délka základní repetice 2 – 6 bp

počet opakování repetice 2 – 100 bp

Rozptýlené rovnoměrně v lidské genomu

Vyskytují se běžně v populaci

Nejsou přepisovány do proteinu

leží v intronech

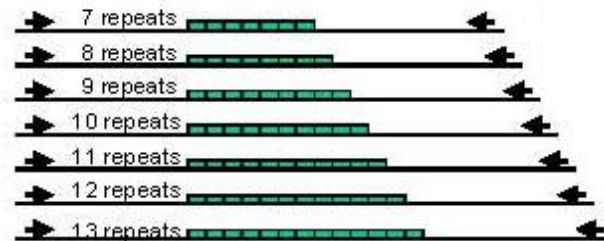
Nejsou příčinou choroby

Tvoří vzorce bez vztahu s fenotypem

Mezi jednotlivci se velmi liší

Odlišují jednoho člověka od druhého

```
TCCCAAGCTCTTCTCTTCCCTAGATCAATACAGACAGAAGACA  
GGTGGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
TAGATAGATATCATTGAAAGACAAAACAGAGATGGATGATAGAT  
ACATGCTTACAGATGCACAC
```



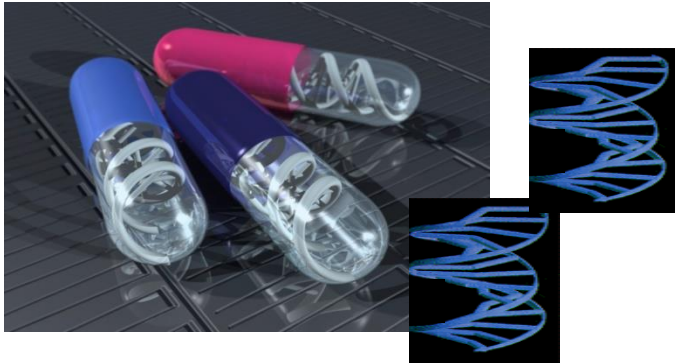
Target region
(short tandem repeat)

Využití polymorfních míst lidského genomu

- Identifikace osob/vzorků DNA (A. Jeffreys 1985)
(lidé obvinění z kriminálních činů, oběti katastrof)
- Určování paternity (VNTR, STR)
- Nepřímá diagnostika monogénních chorob
- Hledání nových genů (poziční klonování genů)
- SNP a multifaktoriální choroby

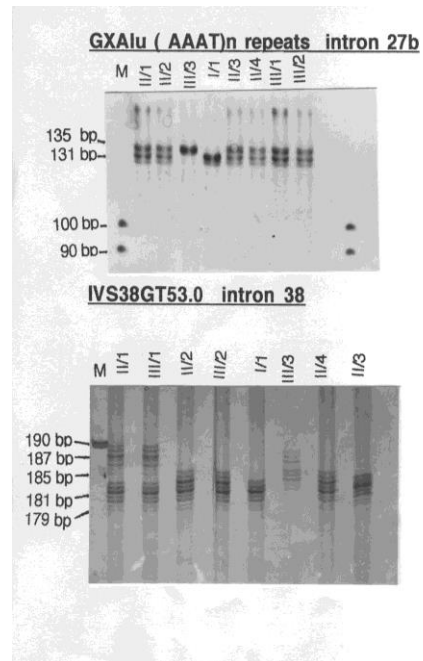


Nepřímá diagnostika



Nepřímá diagnostika

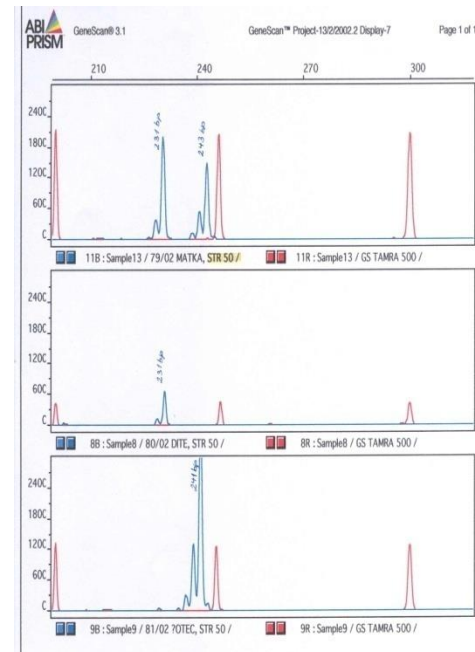
gelová elektroforéza



5% PAGE, 200V / 20°C / 2 h.
barveno AgNO₃

6,5% denurační PAGE,
50W / 50°C / 2,5 h.

kapilární elektroforéza



Nepřímá diagnostika

Vazebná analýza je umožněna:

- v rodinách s dvěma a více jedinci s klinicky potvrzenou diagnózou
- rozlišením dvou chromozomů pomocí markerů na DNA
- přiřazením DNA markerů (tj. chromozomu) k patologii v rodině

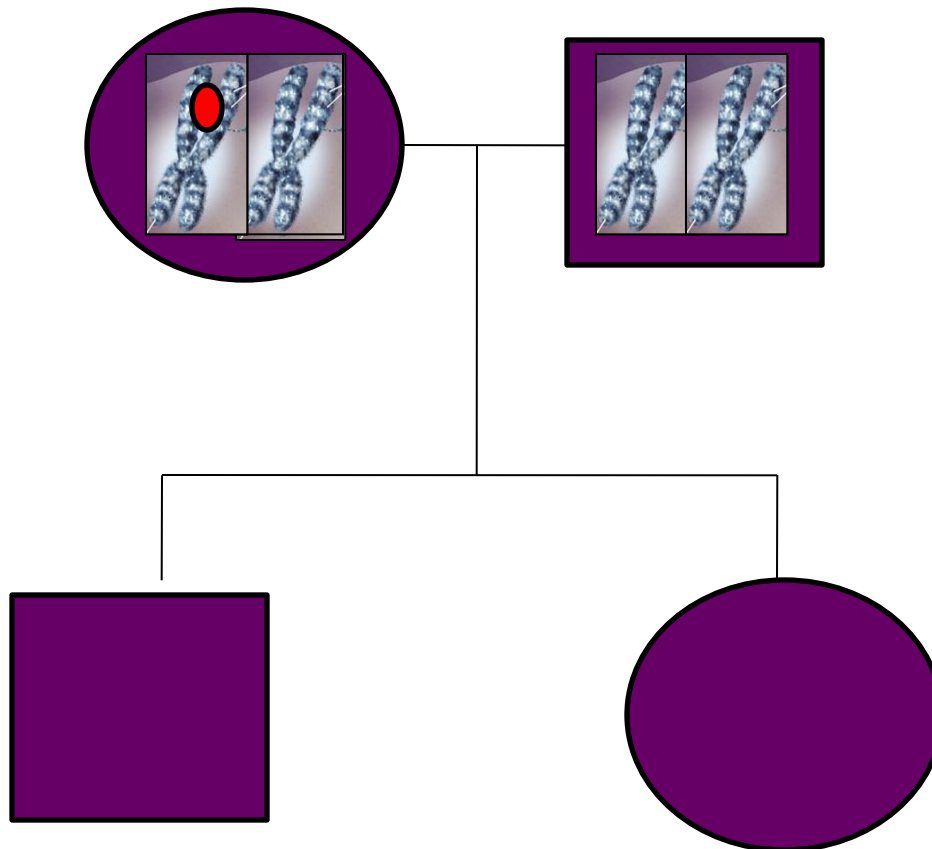
Základní principy nepřímé DNA diagnostiky

- 1) odlišení dvou chromozomů rodičů (heterozygota markerů)
- 2) určení fáze (určení haplotypu - souboru alel polymorfních míst ve vazbě)
- 3) určení haplotypu (chromozomu) asociovaného s patologií v rodině

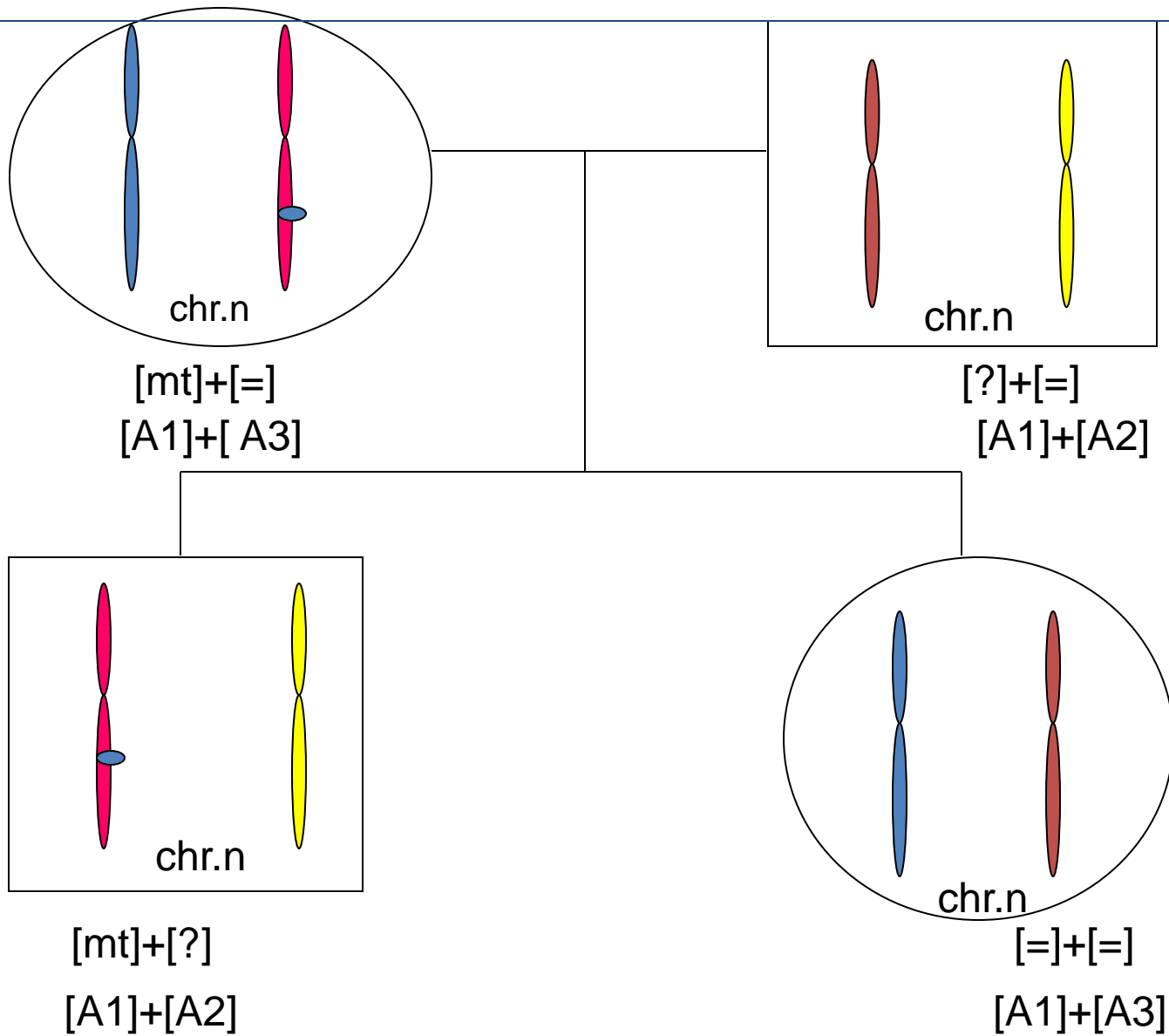
Přísná rodinná specifita
Nikdy nepotvrzuje diagnózu

Nepřímá diagnostika

užitím vazebných markerů v rodinných studiích odhalí chromozom v asociaci s nemocí v rodině

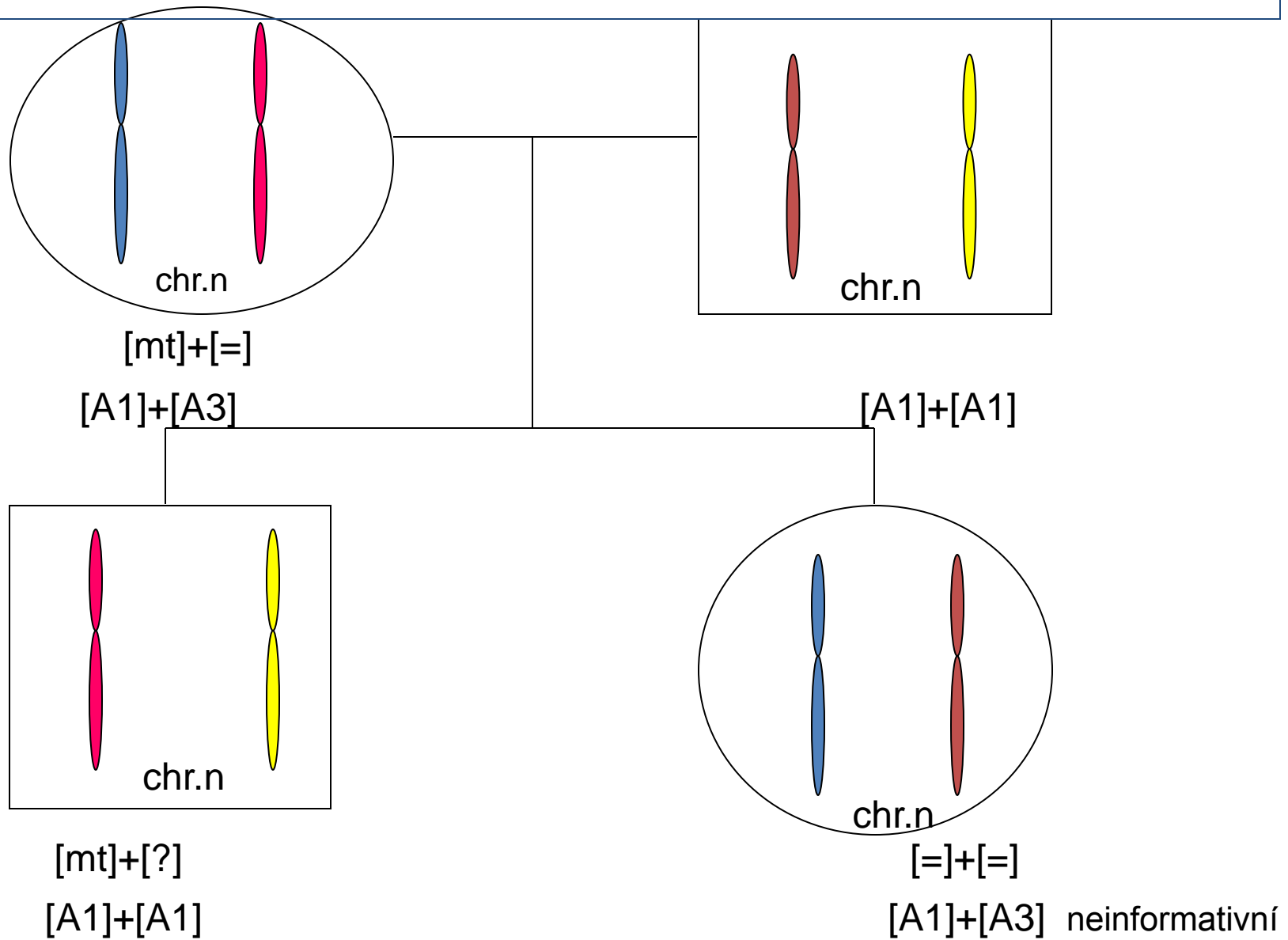


Nepřímá diagnostika



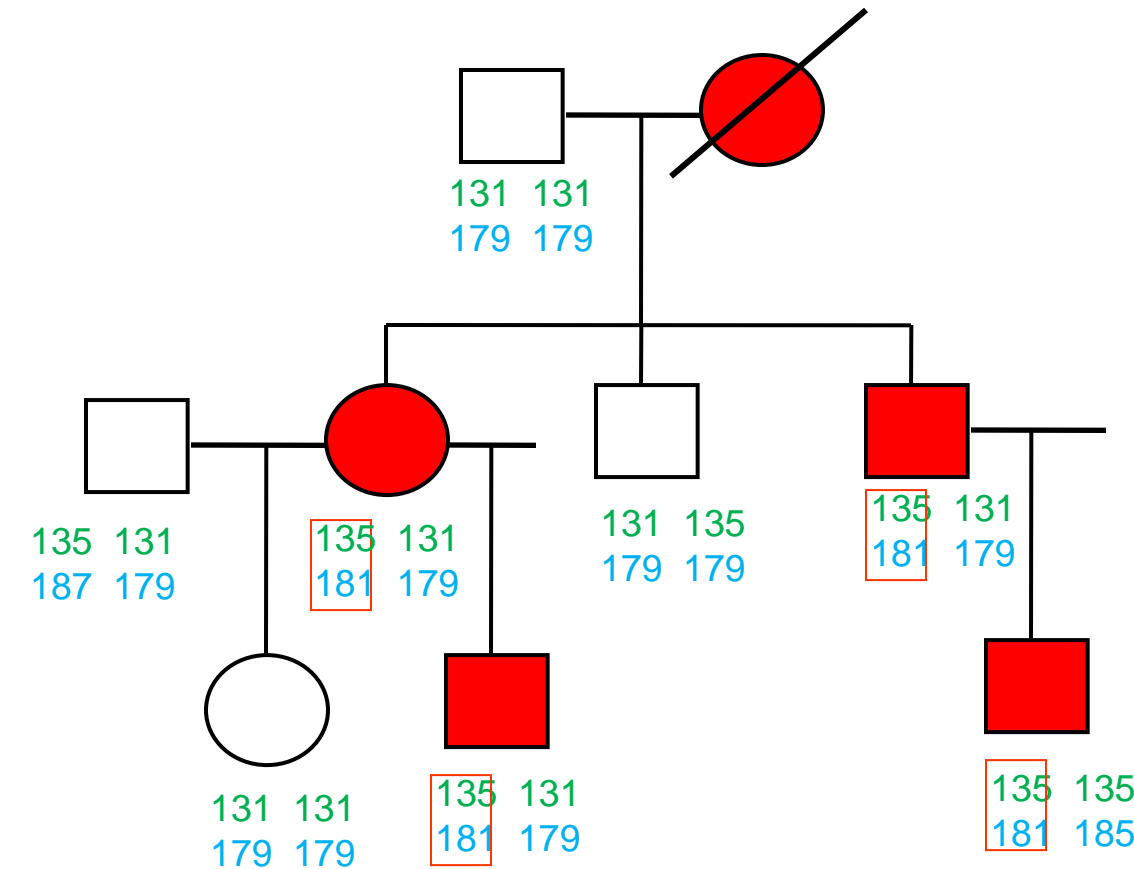
informativní

Nepřímá diagnostika



Nepřímá diagnostika Neurofibromatóza typu 1

Autozomálně dominantní dědičnost



Polymorfní systémy
GXAlu / i27b
IVS38GT / i38



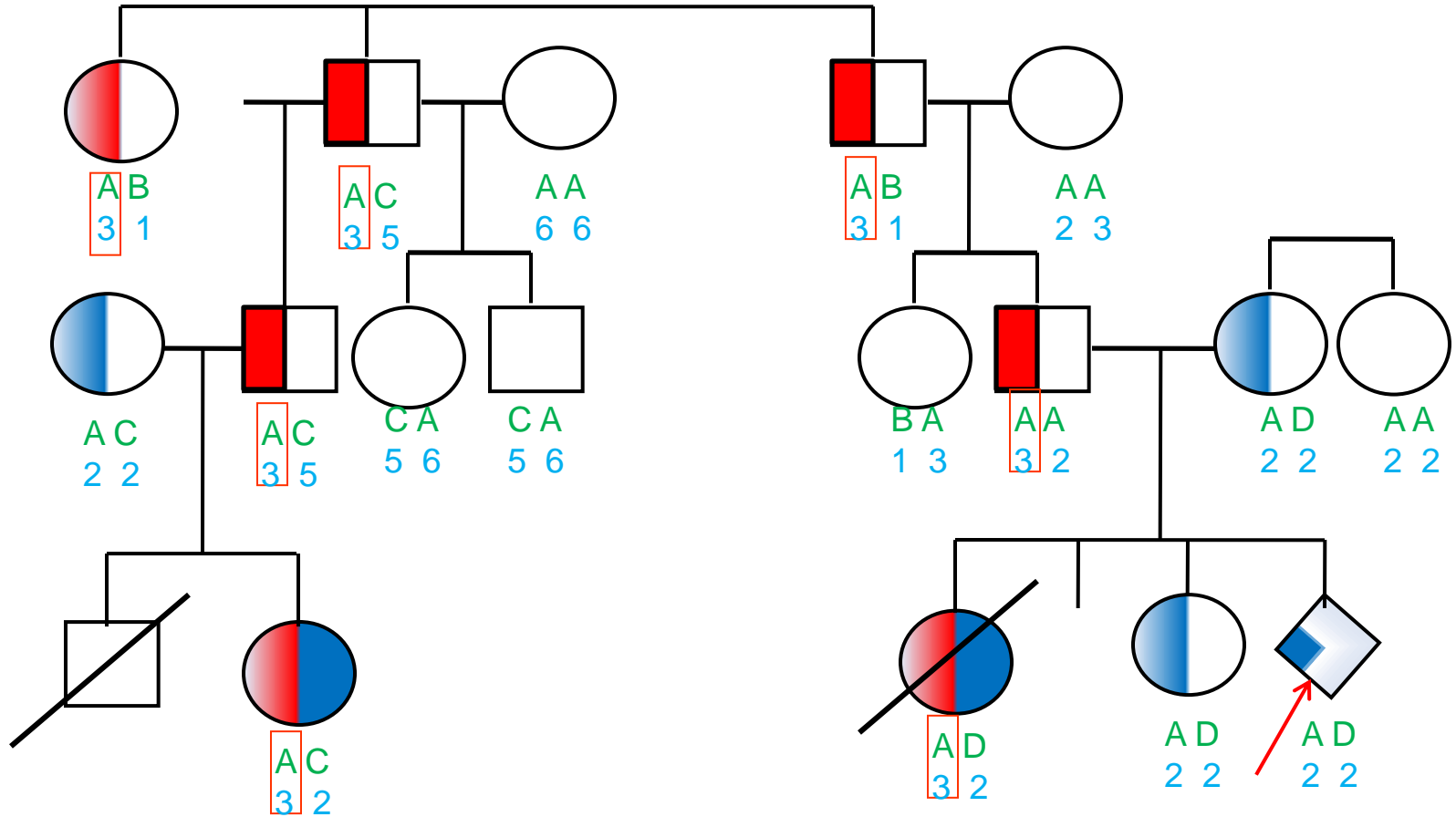
neznámá mutace



haplotyp v asociaci s neznámou mutací

Nepřímá diagnostika Cystická fibróza

Autozomálně recesivní dědičnost



F508del

neznámá mutace

Polymorfní systémy IVS17BTA alely 1 -6

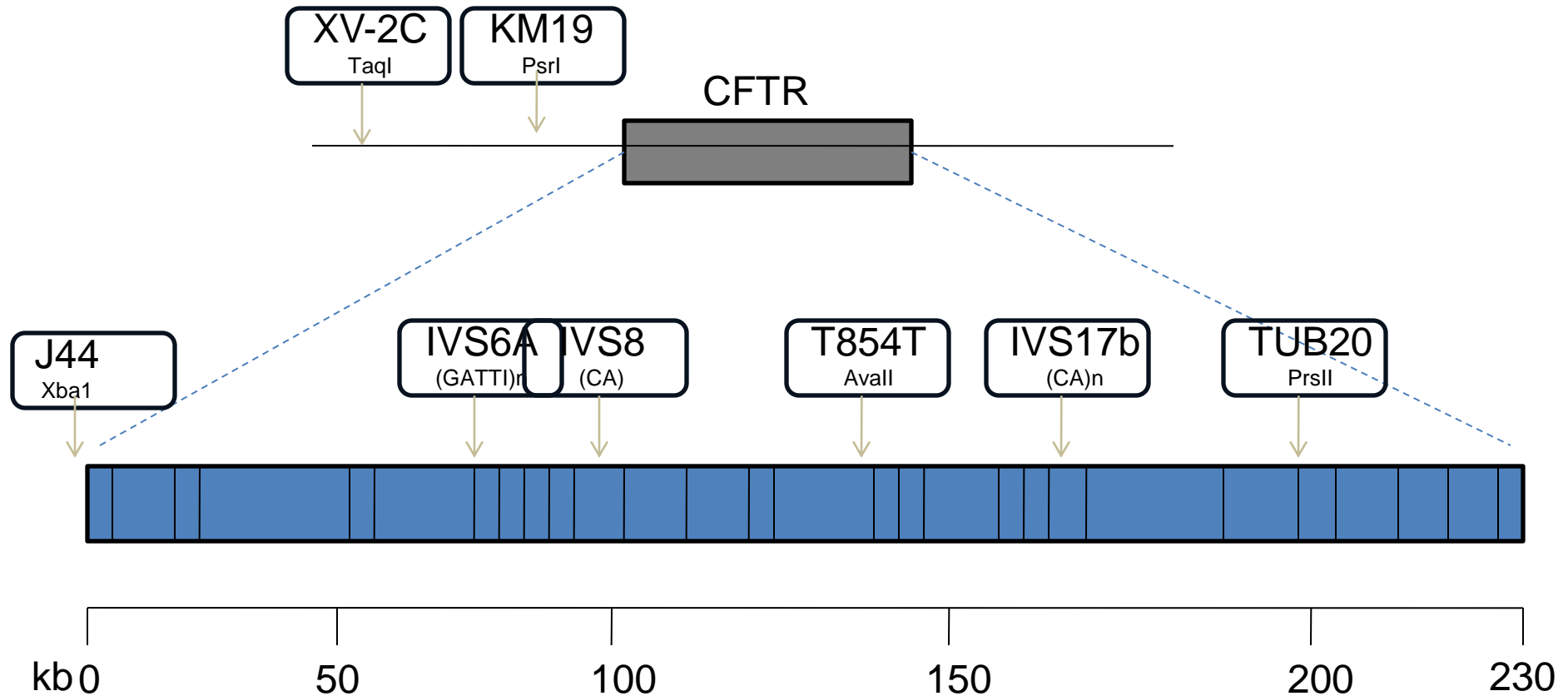
IVS8BTA alely A - D

haplotyp v asociaci s neznámou mutací

Cystická fibróza

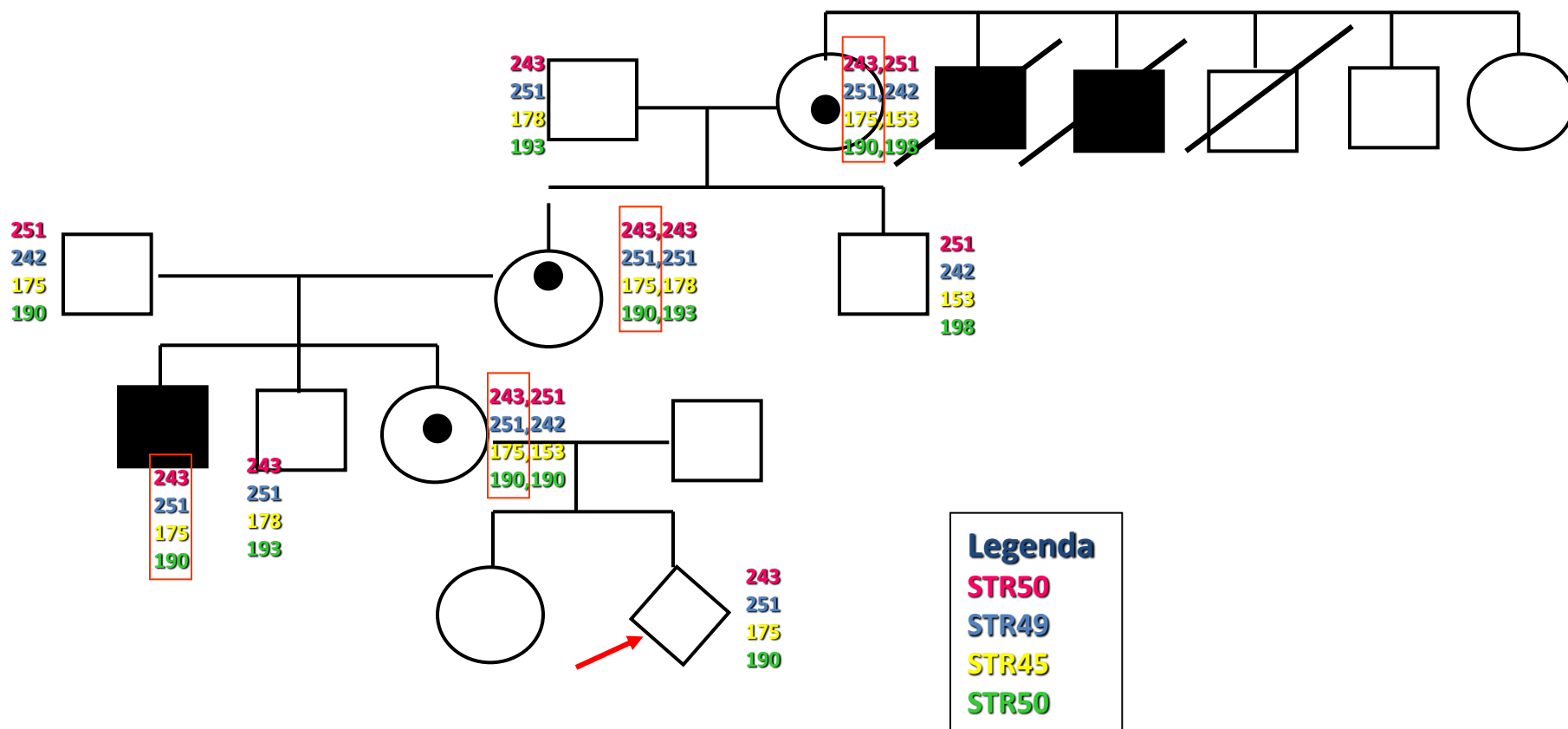
Nepřímá diagnostika

Lokalizace extra a intragenních polymorfních míst genu CFTR



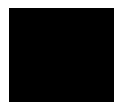
Nepřímá diagnostika Duchennova svalová dystrofie

X vázaná dědičnost



Legenda

- STR50
- STR49
- STR45
- STR50



neznámá mutace



haplotyp v asociaci s neznámou mutací

Duchennova svalová dystrofie

Nepřímá diagnostika

Polymorfní místa v dystrofinovém genu

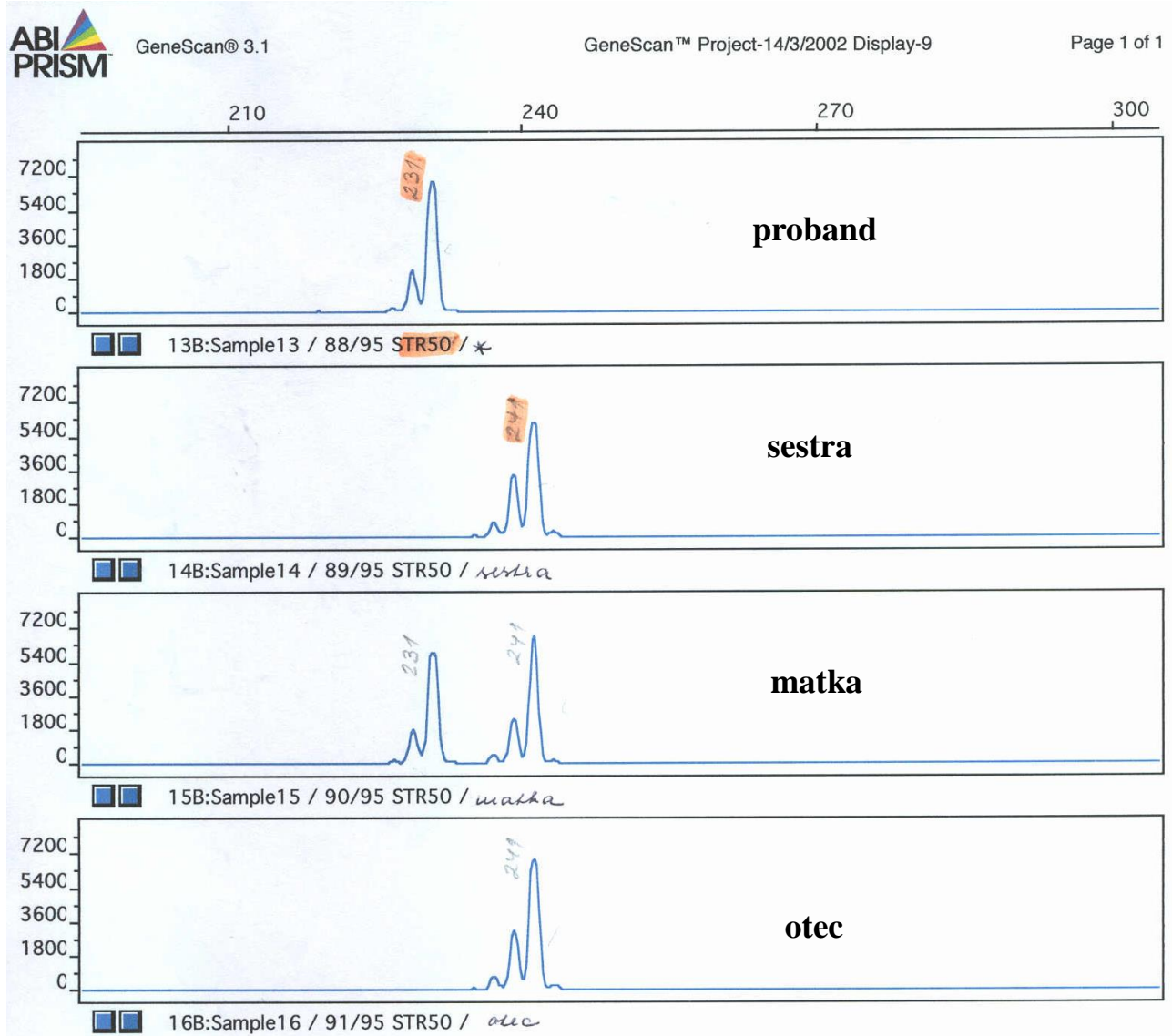


Legenda

- 5'(CA)n alely 172 – 184 pb
- pERT 87-8/Taq I alela 145 pb (-), 71 pb a 74pb (+)
- pERT 87-15/BamH I alela 216 pb (-), 166 pb a 50 pb (+)
- STR sekvence /(CA)n/: STR44 alely 174 – 204 pb, heterozygozyta 87%
- STR45 alely 156 – 184 pb, heterozygozyta 89%
- STR49 alely 227 – 257 pb, heterozygozyta 93%
- STR50 alely 233 – 251 pb, heterozygozyta 71%
- 3'(CA)n alely 131 – 137 pb

Duchennova svalová dystrofie

Nepřímá diagnostika



Faktory, které ovlivňují spolehlivost nepřímého molekulárně genetického vyšetření

1. Spolehlivost klinické diagnózy

Klinická diagnóza onemocnění musí být naprosto přesná.

Je-li vyslovena špatná klinická diagnóza, uvedené molekulární vyšetření nemá smysl, protože se sledovala segregace markeru vázaného na gen, který nemá s chorobou nic společného.

Výsledek molekulárního vyšetření je v tom případě nesmyslný a zavádějící.

2. Možnost rekombinace mezi markerem a genem

Mateřská a otcovská chromozomální DNA se v průběhu crossing-overu "promíchá" v rámci homologních chromozomů.

Pohlavní buňka pak nese nově "smíchanou" DNA - takto se vedle sebe mohou v gametě dostat informace, které spolu původně nesousedily

Např. marker původně v sousedství vadného genu na otcovské DNA se tímto "smícháním" octne v sousedství "zdravého" genu pocházející z mateřské DNA, neboť mezi ním a markerem došlo k rekombinaci.

Pravděpodobnost rekombinace roste se vzdáleností mezi sledovaným markerem a genem.

3 Spolehlivost biologických vztahů v rodokmenu

Biologické otcovství vyšetřovaných osob v rodokmenu musí souhlasit s údaji uvedenými v rodinné anamnéze, která je většinou sestavena na podkladě výpovědi probanda.

Je-li zapotřebí vyšetřit široký rodokmen, proband nemívá o těchto citlivých údajích týkajících se rodičů, prarodičů nebo vzdálenějších příbuzných znalost.

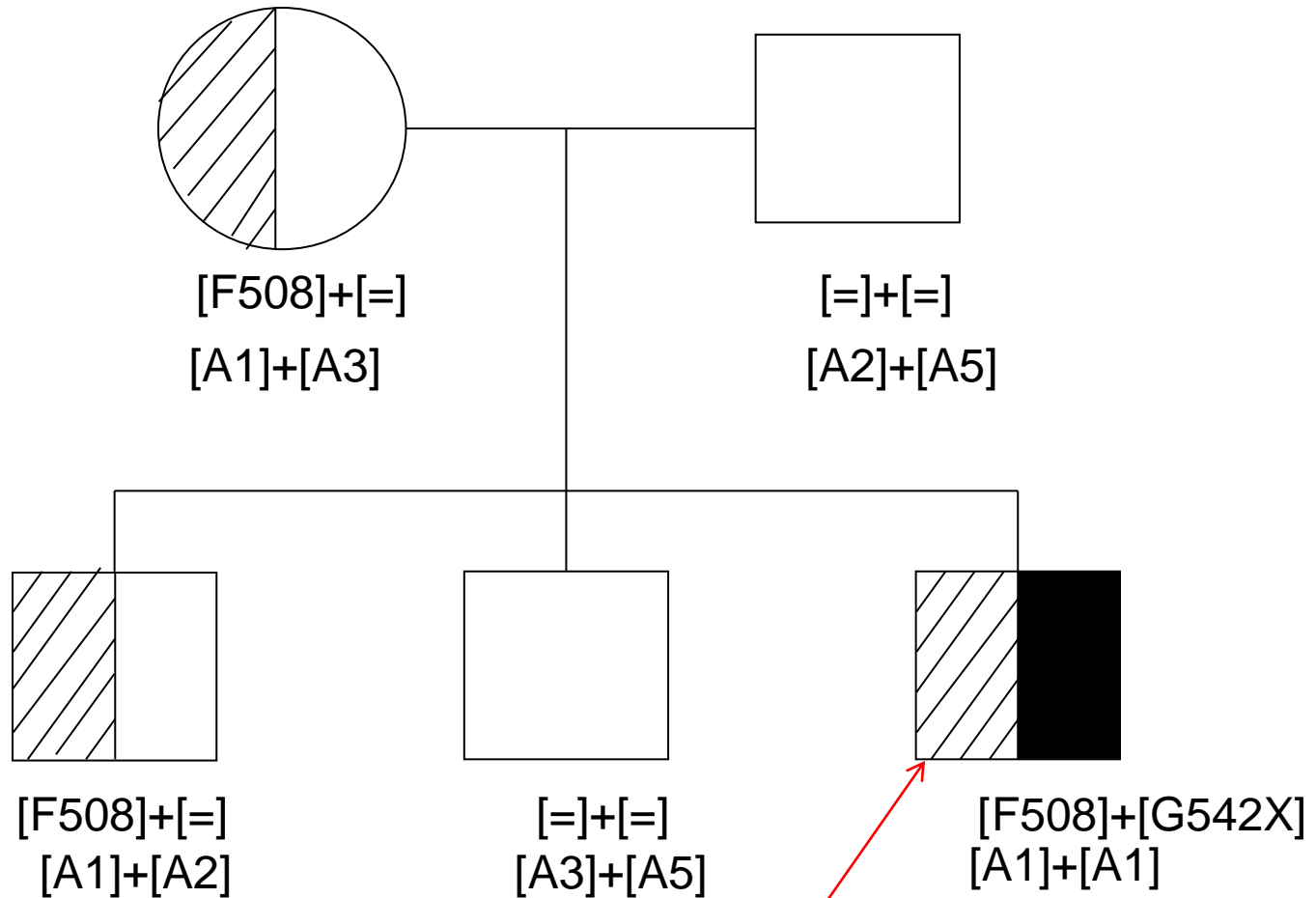
Někdy je jako vedlejší produkt nepřímého molekulárně genetického vyšetření odhaleno, že u některých osob nesouhlasí biologické vztahy v rodině.


Někdy může tato souvislost zůstat nepoznána a může vést k falešnému výsledku.



Cystická fibróza

Nepřímá diagnostika





K provedení **nepřímé diagnostiky** je u některých chorob nutné vyšetřit co největší okruh členů rodiny, tedy i zdravých, u kterých se nepředpokládá, že by mohli být nositeli patologie v(**partneři osob v riziku**).

Z praktického hlediska je to komplikované a někdy až nemožné, v některých rodinách se jejich členové ani příliš neznají a nemají ochotu podstupovat vyšetření kvůli probandovi, který je z jejich hlediska vzdáleným příbuzným.

Nepřímá molekulárně genetická diagnostika má mnoho nevýhod a její význam postupně klesá s tím, jak se vyvíjejí možnosti přímého molekulárně genetického vyšetření.

Molekulárně genetické vyšetření se provádí

prenatálně

postnatálně



Postnatální vyšetření

Pokud je prováděno u žijících osob, pak je cílem

- **potvrdit nebo upřesnit klinickou diagnózu**
- **identifikovat přenašeče genetických onemocnění**
- **stanovit presymptomatickou diagnózu,** identifikaci onemocnění před jeho manifestací tj. odhalit, jestli v genomu probanda je taková molekulární změna na určitém genu, která způsobí, že v průběhu svého života onemocní příslušnou chorobou.



Prenatální a preimplantační vyšetření

odhalují závažná onemocnění před narozením dítěte
má jasně preventivní úlohu

Jeho cílem je zabránit nebo se připravit
na narození postiženého dítěte.

Historie prenatální molekulárně genetické diagnostiky
se datuje od roku 1981,
kdy bylo poprvé u plodu diagnostikováno,
jestli bude postižen srpkovitou anémií,
pro kterou byla jeho matka přenašečkou.



Preimplantační genetické vyšetření



Preimplantační genetické vyšetření

Umožňuje vyšetřit embrya získaná metodami asistované reprodukce ještě před jejich přenosem do dělohy.

Z embryí jsou mikromanipulačními technikami odebrány

- jedna nebo dvě buňky (blastomery) získané z embrya starého 3 dny (72 hodin po oplodnění)
- více buněk z trofoektodemu blastocysty staré 5 dní

Vyšetření více buněk z trofoektodermu eliminuje riziko mozaicismu

Preimplantační genetické vyšetření embrya rozdělujeme na

- preimplantační genetický screening – PGS
využívá se pro screening nově vzniklých chromosomových vad (aneuploidií)
- preimplantační genetickou diagnostiku – PGD
při riziku vzniku přenosu monogenní choroby nebo chromosomové vady (strukturální aberace – translokace, ev. inverze) dané genotypem rodičů



Preimplantační genetický screening – PGS

PGS vyšetření metodou FISH, kdy jsou vyšetřeny pouze chromosomy 13, 18, 21, X a Y (ev. i chromosomy 15, 16, 22) se dnes již považuje za obsolentní.

Dává se přednost metodám na technologii mikročipů (např. array CGH, SNP array) eventuálně sekvenování nové generace – NGS.

Tyto metody dovolují vyšetřit aneuploidie všech 24 chromosomů



Preimplantační genetická diagnostika – PGS

PGD při chorobách s monogenní dědičností dosud většinou využívá nepřímou genetickou diagnostiku – PGH (preimplantation genetic haplotyping) pomocí STR markerů metodou PCR4

Zde je nutné vyšetření jak postiženého (postižených) rodinného příslušníka, tak rodičů.

Vhodnou metodou je tzv. karyomapping, kterým je možné současně provést i screeningové vyšetření chromosomových aneuploidií.

V blízké budoucnosti se rozšíří i využití metody sekvenování nové generace – NGS pro tyto účely



~~Preimplantační genetická diagnostika - PGS(aneuploidie)
- PGD (monogenní choroby)~~

Preimplantační genetický test PGT – A (aneuploidie)
M (monogenní choroby)



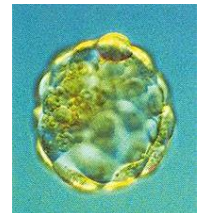
Preimplantační genetická diagnostika monogenně dědičných chorob

➤ **Selekce embryí pro in vitro fertilizaci (IVF)**

pro páry s rizikem přenosu dědičné choroby na potomky

Pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

1. Polární tělíška odebrané ze stádia oocyt/zygota
2. Buňky (blastomery) z embryí ve stádiu rýhování
3. Buňky trofoblastu z blastocyst



Monogenní choroby - metoda PCR

Komplikace : ADO (alelic drop out)

amplifikace jedné alely pod úrovní detekovatelnosti

Minimalizace ADO

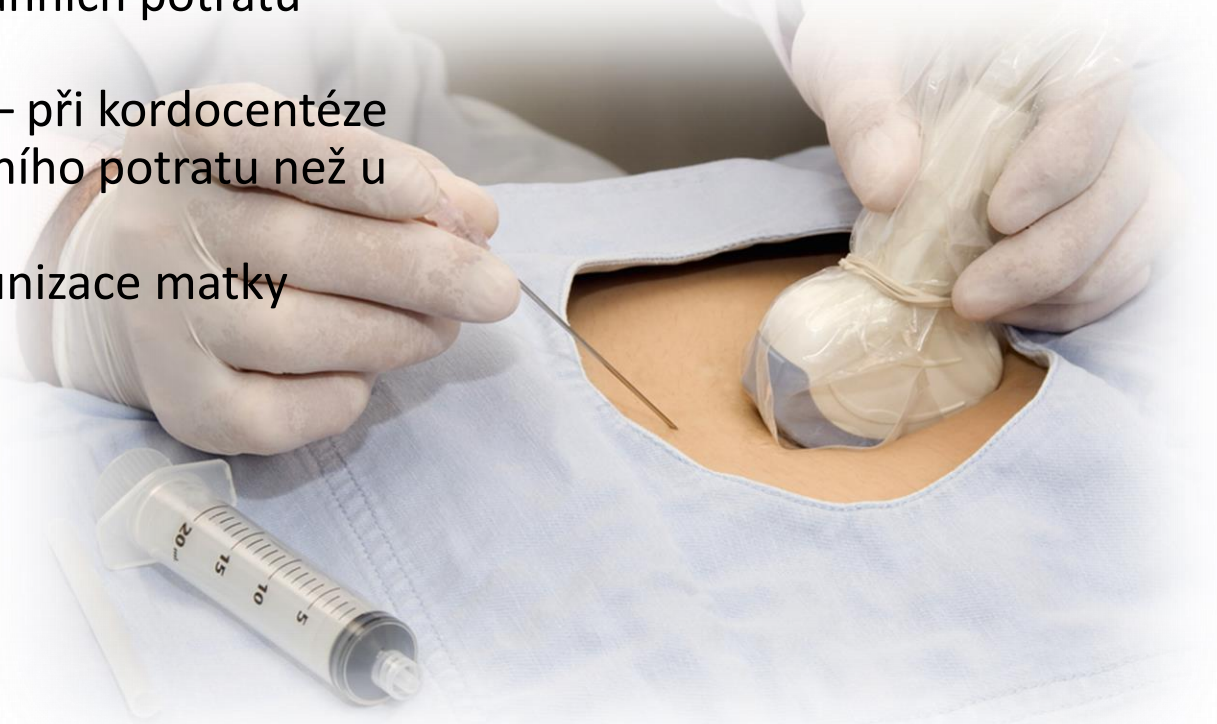
protokol monitorující výskyt ADO:

- *multiplex PCR* (koamplifikace mutace s polymorfními markery)
- *SSCP nebo DGGE analýzy* (detekující obě alely současně, potvrdí genotyp)
- *fluorescenční PCR* - redukuje výskyt ADO, detekce DNA fragmentu je až 1000x citlivější ve srovnání s konvenční PCR technikou

Prenatální vyšetření

Zdroje fetální DNA - invazivní výkony

- amniové fibroblasty – při amniocentéze
0,5-1% riziko spontánních potratů,
- choriové klky
0,5-1% riziko spontánních potratů
- fetální krevní buňky – při kordocentéze
vyšší riziko spontánního potratu než u
amniocentézy
vysoké riziko aloimunizace matky



Invazivní prenatalní genetické vyšetření



Prenatální vyšetření aneuploidií

Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR)



QF-PCR

Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR)

představuje metodu vhodnou k rychlé diagnostice
nejčastějších aneuploidií

a umožňuje okamžitý management patologických těhotenství



QF-PCR

Při analýze se využívá PCR amplifikace chromozom-specifických polymorfních STR markerů. Metody využíváme v prenatální i postnatální diagnostice a analýze potracených plodů



Klasické metody vyšetření

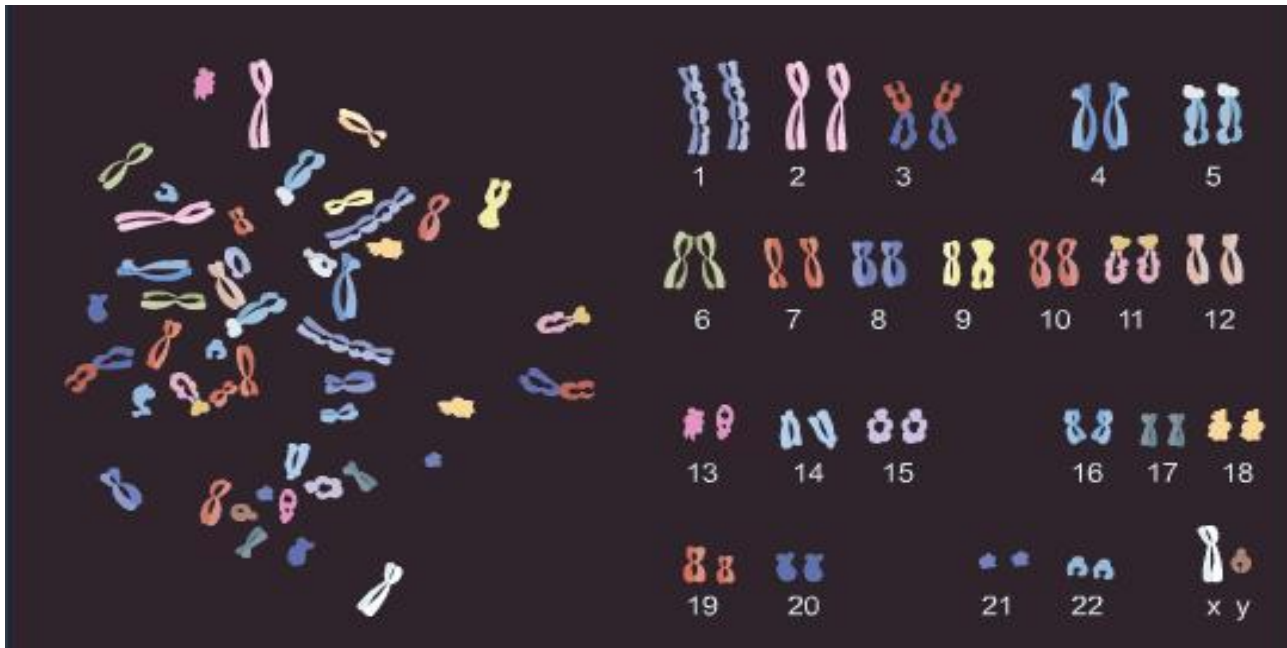
Vyšetření karyotypu (hodnocení barvených metafázických chromozomů v optickém mikroskopu)



Klasické metody vyšetření

Karyotyp

- je soubor všech chromosomů v jádře buňky.
- V buněčných jádrech určitého druhu je konstantní do počtu, velikosti i tvaru chromozómů a jako takový se používá jako druhový znak
- je jeden ze základních objektů **cytogenetiky**



hodnocení barvených metafázických chromozómů v optickém mikroskopu)

Vyšetření karyotypu

- základní metodou vyšetření karyotypu (nejen) v rámci prenatální diagnostiky chromozomálních aberací

Výhody

- možnost prohlédnout celý karyotyp, zhodnotit strukturu každého jednotlivého chromozomu - a i jejich počet.

Nevýhody

- časová náročnost

klasické vyšetření karyotypu vyžaduje kultivaci získaných buněk ve speciálním médiu, což výrazně prodlužuje dobu, která uplyne mezi samotným odběrem vzorku a vydáním výsledku.

- amniocentéza či odběr choriových klků je nutné počítat v průměru s minimálně dvoutýdenní lhůtou (výsledky CVS bývají obecně o něco dříve díky většímu růstovému potenciálu choriových buněk).

- kordocentéza má v tomto případě značnou výhodu rychlého zpracování vzorku (obecně jen několik dní), neboť je odebírána fetální krev (velký růstový potenciál lymfocytů).

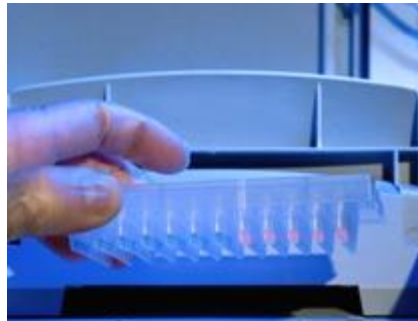
- omezená schopnost detekovat určité chromozomální přestavby malého rozsahu (například mikrolece)
- určovat původ marker chromozomů apod.

V této oblasti pak nastupují metody molekulární cytogenetiky jako je například FISH (fluorescent in-situ hybridization - fluorescenční in-situ hybridizace).

QF-PCR

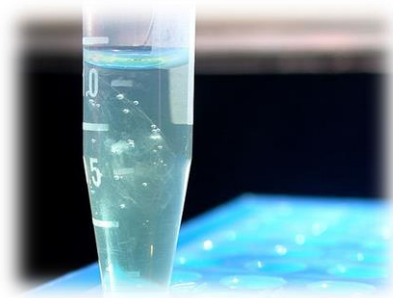
**neboli kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (Quantitative
Fluorescent Polymerase Chain Reaction)**

- speciální aplikací klasické PCR metody, sloužící k namnožení definovaného úseku DNA.
- V rámci prenatální diagnostiky se lze také setkat s označením amnioPCR (v souvislosti s amniocentézou - jako metodou, použitou k získání vzorku).
- Tato metoda umožňuje vyloučit / potvrdit numerické odchylky vybraných chromozomů a to v extrémně krátkém časovém období jednoho, maximálně dvou dnů.
- Nejčastěji jde o chromozomy, jejichž numerické abnormality tvoří většinu (cca 90 %) chromozomálních aberací: 13, 18, 21, X a Y.

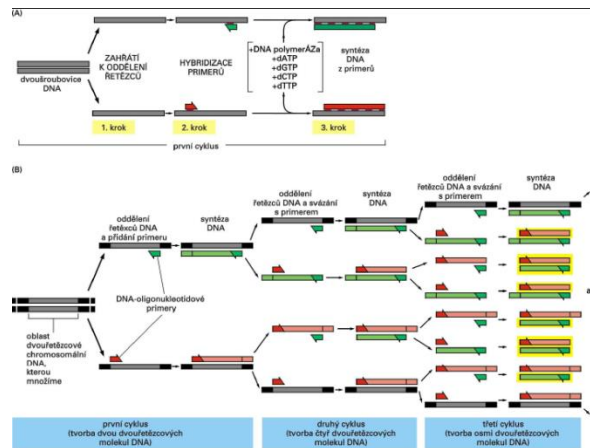


QF-PCR

- Ze vzorku AMC, CVS se pomocí některé ze standardních metod nejprve izoluje DNA.



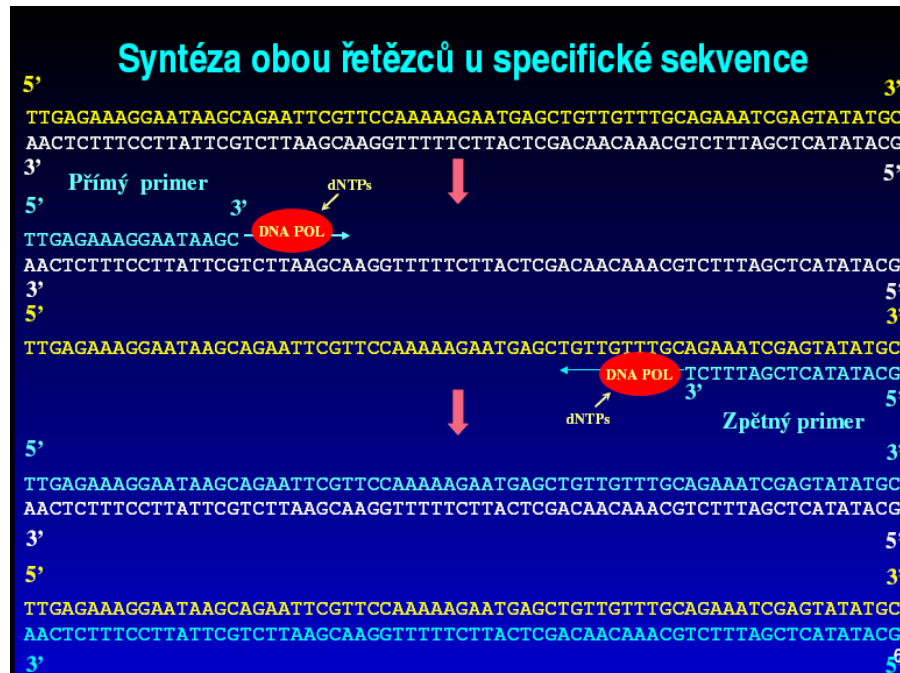
- Polymerázová řetězová reakce-PCR



QF-PCR

Pro vlastní **PCR** metodu jsou připravené speciální „kity“
s fluorescenčně značenými primery.

Tyto primery ohraničují specifické lokusy na příslušných chromozomech (13, 18, 21, X a Y), které se pro potřeby této metody též označují jako markery. Jedná se o takové úseky, které obsahují vysoce polymorfní sekvence **mikrosatelitní DNA - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)**.

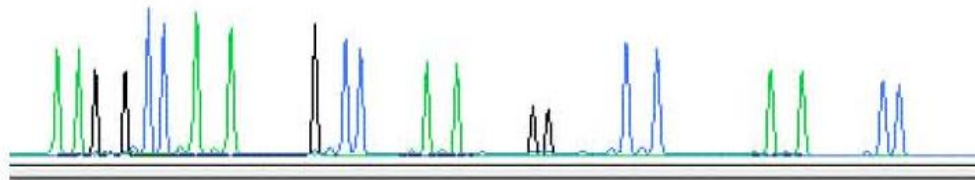
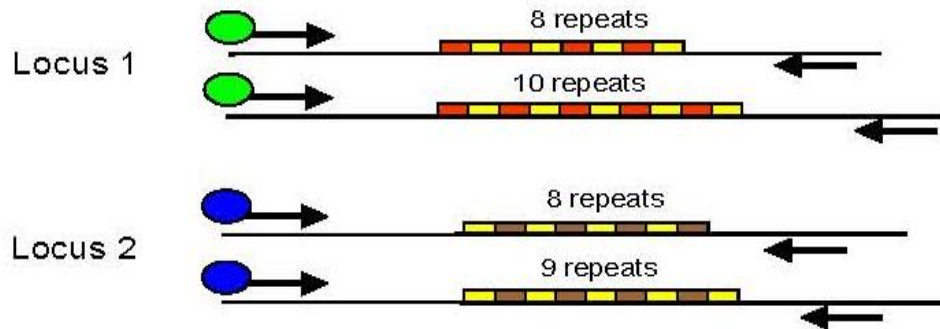


QF-PCR

Metoda PCR amplifikuje STR oblasti a vytváří fluorescenčně značené amplicony za pomoci lokus specifických primerů



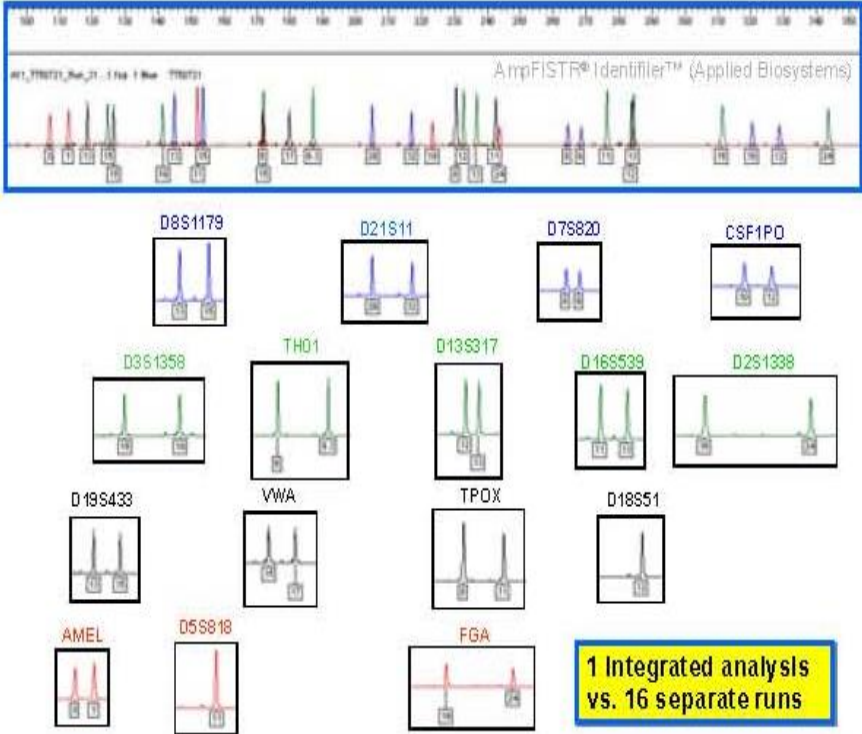
Scanned Gel Image



Capillary Electropherogram

QF-PCR

Multiplex PCR



QF-PCR

Multiplex PCR

- 7 markerů pro diagnostiku chromosomu 21
- 7 markerů pro diagnostiku chromosomu 18
- 7 markerů pro diagnostiku chromosomu 13
- 7 markerů pro diagnostiku chromosomů XY.

8. Výsledky a analýza (pokrač.)

Přehled markerů

Devyser™ Complete Mix 1

Název Markeru	Pozice	Velikost markeru (bp)* POP-4/POP-6	Velikost markeru (bp)* POP-7	Barva fluoroforu
13A	13q12	234 - 327	232 - 323	Zelená
13B	13q21	370 - 430	365 - 425	Modrá
13C	13q31	425 - 474	425 - 474	Žlutá
13D	13q13	420 - 490	413 - 479	Zelená
18A	18q11	190 - 230	190 - 230	Zelená
18B	18q12	180 - 228	180 - 228	Žlutá
18C	18q12	298 - 350	298 - 350	Modrá
18D	18q22	330 - 408	325 - 403	Zelená
18I	18q21	360 - 415	360 - 415	Žlutá
21A	21q21	160 - 205	160 - 207	Modrá
21B	21q21	220 - 283	220 - 285	Modrá
21C	21q22	256 - 350	256 - 353	Žlutá
21D	21q22	440 - 492	440 - 492	Modrá

*Na základě pozorovaných a kalkulovaných velikostí markerů. Píky markerů s velikostmi mimo dané rozpětí se mohou vyskytnout, ale nezahrnují se do analýzy v rámci Devyser™ Complete. Doporučujeme pro tyto případy použít Devyser™ Resolution soupravy.

8. Výsledky a analýza (pokrač.)

Přehled markerů

Devyser™ Complete Mix 2

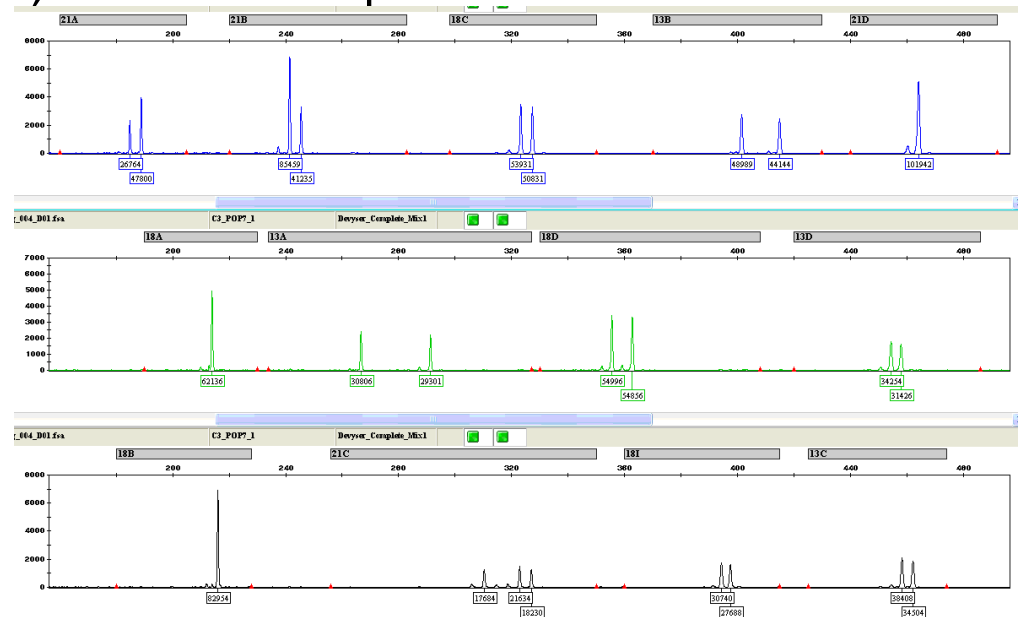
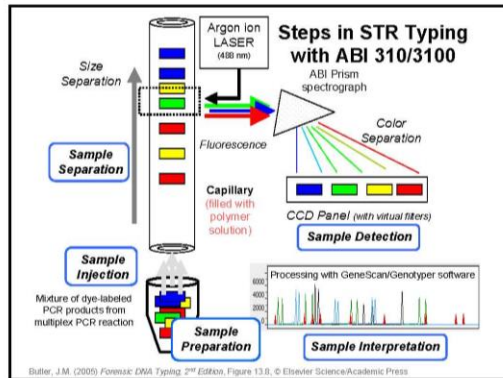
Název Markeru	Pozice	Velikost markeru (bp)* POP-4/POP-6	Velikost markeru (bp)* POP-7	Barva fluoroforu
13E	13q32	160 - 248	160 - 248	Žlutá
13F	13q12	260 - 320	260 - 320	Modrá
13G	13q14	314 - 415	314 - 415	Zelená
18G	18q11	326 - 380	326 - 380	Modrá
18J	18p11	430 - 487	430 - 487	Žlutá
21E	21q22	370 - 410	370 - 410	Žlutá
21F	21q22	386 - 445	388 - 449	Modrá
21G	21q22	430 - 490	430 - 490	Zelená
XY1	Xp22/Yp11	X = 105 Y = 110 (+/- 2bp)	X = 106 Y = 111 (+/- 2bp)	Zelená
XY2	Xp22/Yp11	180 - 220	182 - 222	Modrá
X1	Xq26	120 - 170	120 - 170	Zelená
X2	Xq13	230 - 260	230 - 260	Zelená
X3	Xq26	262 - 315	262 - 315	Žlutá
Y1	Yp11	235 (+/- 2bp)	236 (+/- 2bp)	Modrá
7X	7q34/Xq13	7 = 182 X = 202 (+/- 2bp)	7 = 182 X = 202 (+/- 2bp)	Zelená

*Na základě pozorovaných a kalkulovaných velikostí markerů. Píky markerů s velikostmi mimo dané rozpětí se mohou vyskytnout, ale nezahrnují se do analýzy v rámci Devyser™ Complete. Doporučujeme pro tyto případy použít Devyser™ Resolution soupravy.



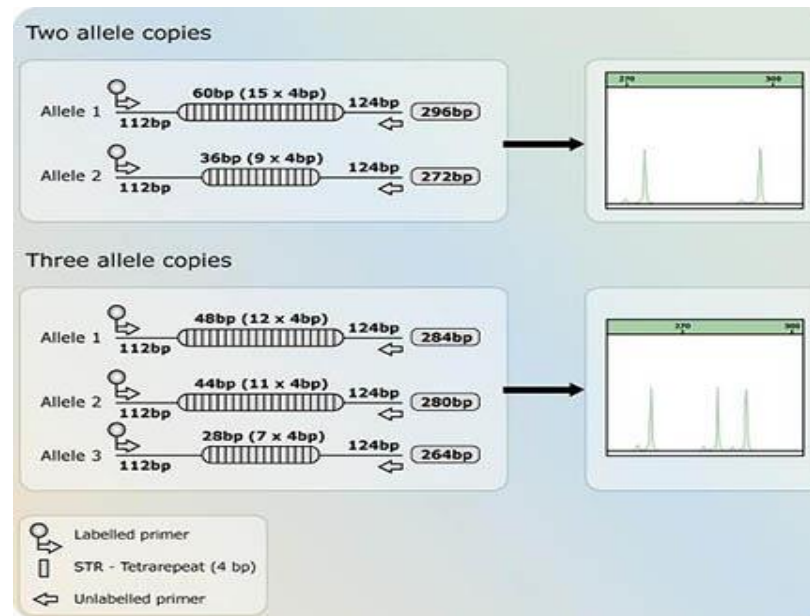
QF-PCR

- Vzniklé PCR produkty jsou separovány a analyzovány pomocí automatického genetického analyzátoru.
- Relativní množství každé STR alely je kvantifikováno pomocí výpočtu poměru obsahu píků, příp. jejich výšek.
- STR se liší mezi jedinci velikostí, podle toho, kolikrát se opakují trojice, čtveřice nebo pětice nukleotidů.



QF-PCR

- V případě diploidie, je signál dvou alel 1:1, když se jedná o homozygota, pak jeden peak s dvojitým signálem.
- Při trizomii dostaneme signál 2:1, 1:2, nebo 3 peaky 1:1:1.
- Chybějící chromozom X u Turnerova syndromu je detekován pomocí poměru X vs. 7. chromosom. U normální ženy je tento poměr 1:1, u postižené je 1:2.



QF-PCR

- DNA amplifikovaná z normálního heterozygotního jedince (má alely s různou velikostí) pro specifickou STR sekvenci bude mít dva píky s odlišnou délkou v daném rozsahu

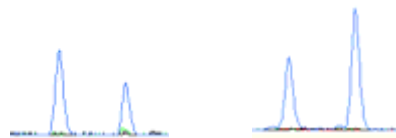


Heterozygotní marker (poměr ploch 1:1)

- DNA amplifikovaná z trizomických jedinců vykáže buď další pík (tři různé alely) se stejnou plochou nebo jen dva píky (dvě různé alely), z nichž jeden má dvojnásobnou plochu, než ten druhý



Trizomický troj-alelický marker (poměr ploch 1:1:1)



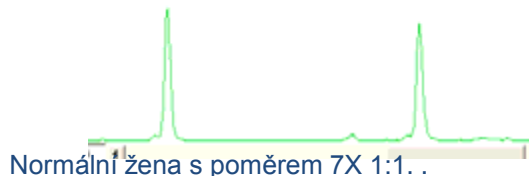
Trizomický dvoj-alelický marker (8.3: poměr ploch 2:1; 8.4: poměr ploch 1:2)

QF-PCR

- QF-PCR Homozygotní jedinci (mají alely se stejnou délkou) nebo monozomní vykážou pouze jeden pík

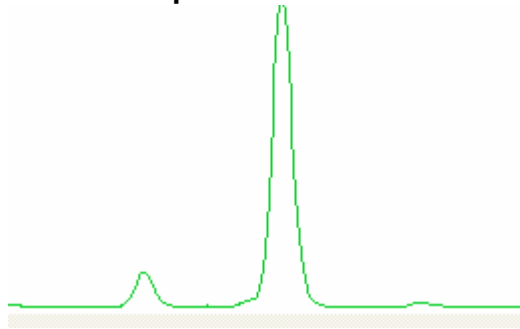


Jedinci homozygotní nebo monozomní jsou největším problémem pro testování abnormalit pohlavních chromozomů. Pokud použijeme STR specifické pro chromozom X, některé vzorky z normální ženy XX můžou vykazat homozygotní QF-PCR výsledek, který nelze odlišit od vzorků s jediným X, jako při Turnerově syndromu. Začleněním dalších STR markerů chromozomu X do analýzy redukuje pravděpodobnost homozygotnosti, ale neeliminuje ji zcela. Problém monosomie X řeší 7X marker pro relativní kvantifikaci chromozomů 7 a X. Pro normální ženu je poměr 7X 1:1 Pro normálního muže a ženu s monosomií X je typický poměr 2:1

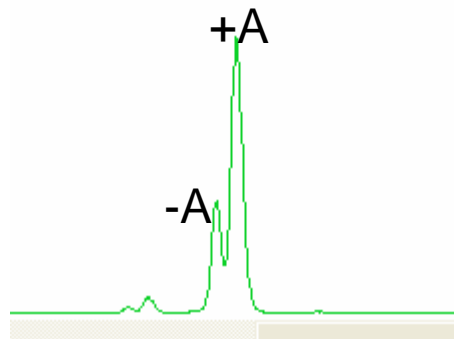


Artefakta QF-PCR

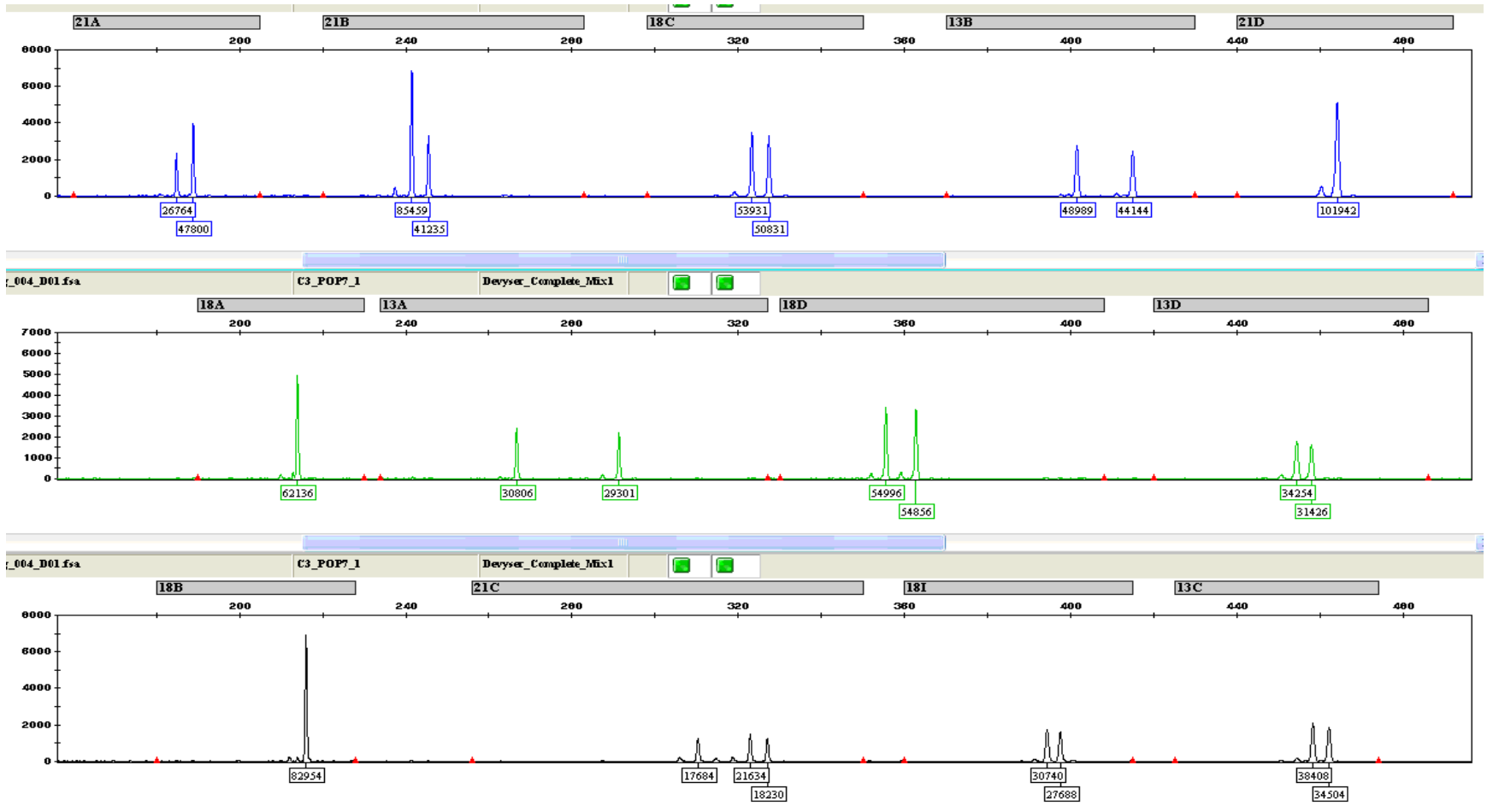
- Stutter píky jsou detekovány jako samostatné píky, které jsou o jednu nebo několik repetic menší, než aktuální STR alela. Typický stutter pík má obsah menší, než 15% vůči příslušnému STR píku.



- -A píky (obr. 8.9) jsou detekovány jako samostatné píky, které jsou o jeden pár bazí kratší, než PCR produkt s plnou délkou (+A pík)



QF-PCR



Typical electrophoretogram (Mix 1) showing the profile of a trisomic sample (47, XY +21)

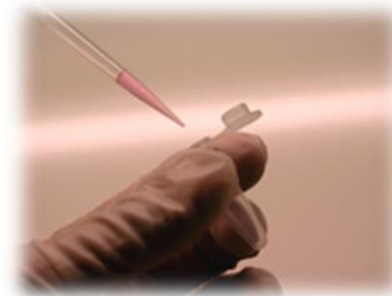
Hodnocení QF-PCR

Review Report

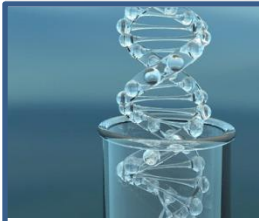
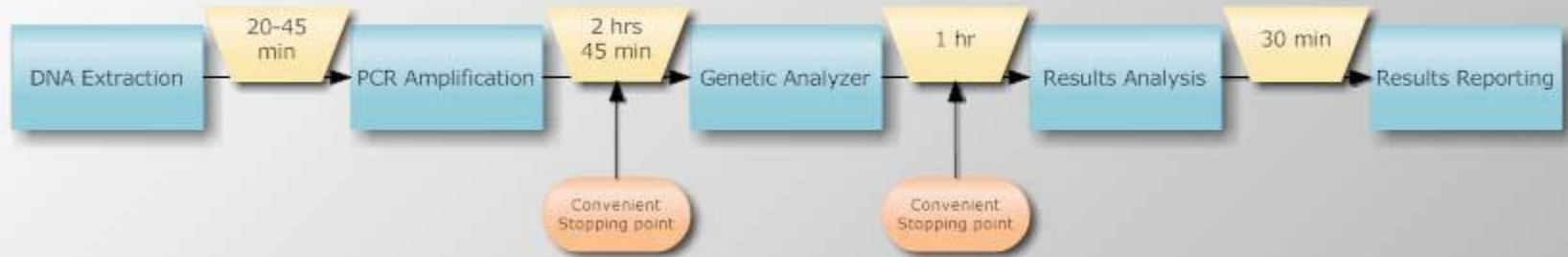
Chromosome 13 Chromosome 18 Chromosome 21 Chromosome XY

MarkerID	Include	Size	Height	Alle	Ratio	Relative peak area (%)	Comment
21A	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	185	731	7953	1:2		
	<input checked="" type="checkbox"/>	189	1210	12038			
21B	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	242	823	8113	2:1		
	<input checked="" type="checkbox"/>	246	511	4441			
21C	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	318	257	2554	1:1:1		
	<input checked="" type="checkbox"/>	323	287	3266			
	<input checked="" type="checkbox"/>	327	254	2658			
21D	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Non-informative
	<input type="checkbox"/>	457	150	1790			Suspected stutter or A peak
	<input checked="" type="checkbox"/>	465	1733	20511			
21E	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	387	854	10779	1:2		
	<input type="checkbox"/>	394	105	797			Suspected stutter or A peak
	<input checked="" type="checkbox"/>	395	1533	17246			
21F	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	391	856	8711	1:1:1		
	<input checked="" type="checkbox"/>	415	778	8556			
	<input checked="" type="checkbox"/>	419	723	7947			
21G	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative

Approve



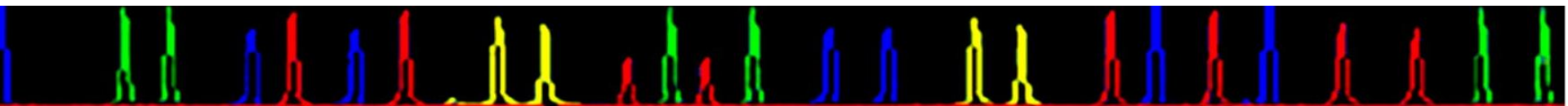
Flowchart Devyser® QF-PCR



Sample	Index	Sex	Height	Weight	Age	DOB	Residence	Case
21A	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21B	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21C	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21D	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21E	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21F	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21G	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21H	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21I	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21J	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21K	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21L	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21M	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21N	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21O	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21P	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21Q	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21R	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21S	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21T	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21U	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21V	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21W	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21X	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21Y	185	M	170	70	20	1985	10102	10102
21Z	185	M	170	70	20	1985	10102	10102

Výhody QF-PCR

- odstraňuje nutnost opakovat některé testy s nejasným výsledkem (jako u kayotypizace), protože je každý syndrom analyzován pomocí mnoha STR současně.
- pro každý chromozom jsou zahrnuty i velmi krátké STR úseky, díky nimž lze analyzovat i částečně degradovanou DNA.
- test odhalí kontaminaci mateřskými buňkami, není nutné analyzovat současně vzorky rodičů.
- test zjistí i případný mosaicismus
- detekce Turnerova syndromu
- reagentie v alikvotech zjednodušují použití a snižuje možnost kontaminace
- analýza trvá méně než 5 hodin, takže lze mít výsledky ještě týž den.
- Hands-on doba je cca 90 minut



Neinvazivní prenatalní genetické vyšetření



Prenatální vyšetření

Zdroje fetální DNA - neinvazivní výkony

– fetální buňky v mateřské periferní krvi

- neuplatnilo se pro nevýhodný poměr mateřských a fetálních buněk
- technologicky obtížné oddělení fetálních a mateřských buněk
- v krvi matky je lze identifikovat až 27 let po porodu plodu - *tato skutečnost znemožňuje využití fetálních buněk v neinvazivní prenatální diagnostice, protože ne jsme schopni spolehlivě rozlišit, ze kterého těhotenství buňky pocházejí.*

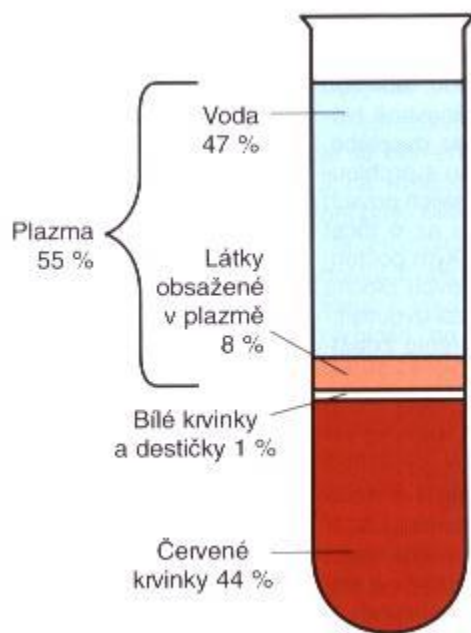
– volná (nebuněčná) fetální DNA

- fetální DNA z plazmy matky

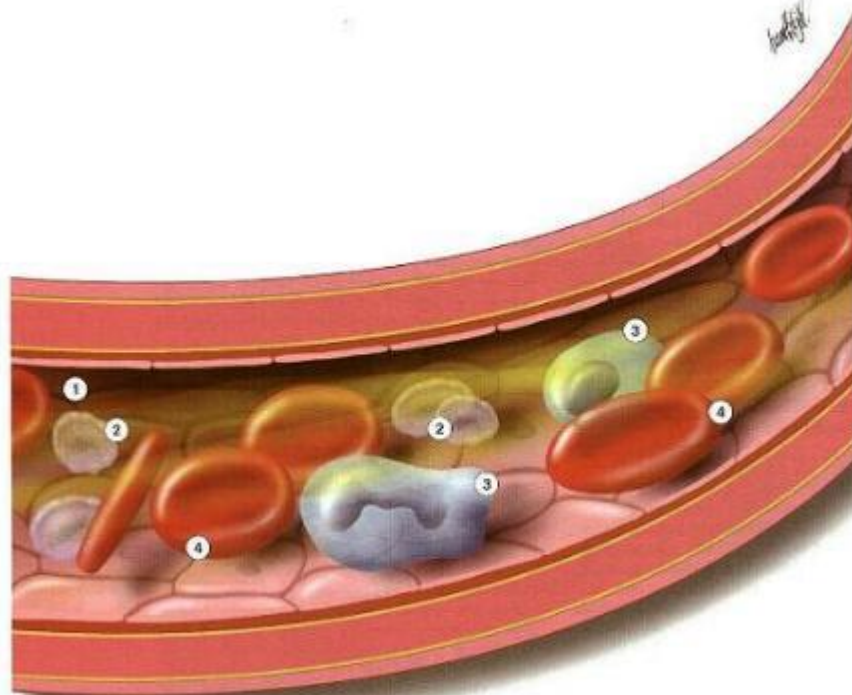
Volná DNA cfDNA

Krev je složena z buněk a plazmy.

V plazmě každému z nás kolují kreví úlomky jeho vlastní dědičné informace, jeho DNA. Pocházejí z rozpadlých jader uhynulých a zničených buněk nejrůznějších orgánů.



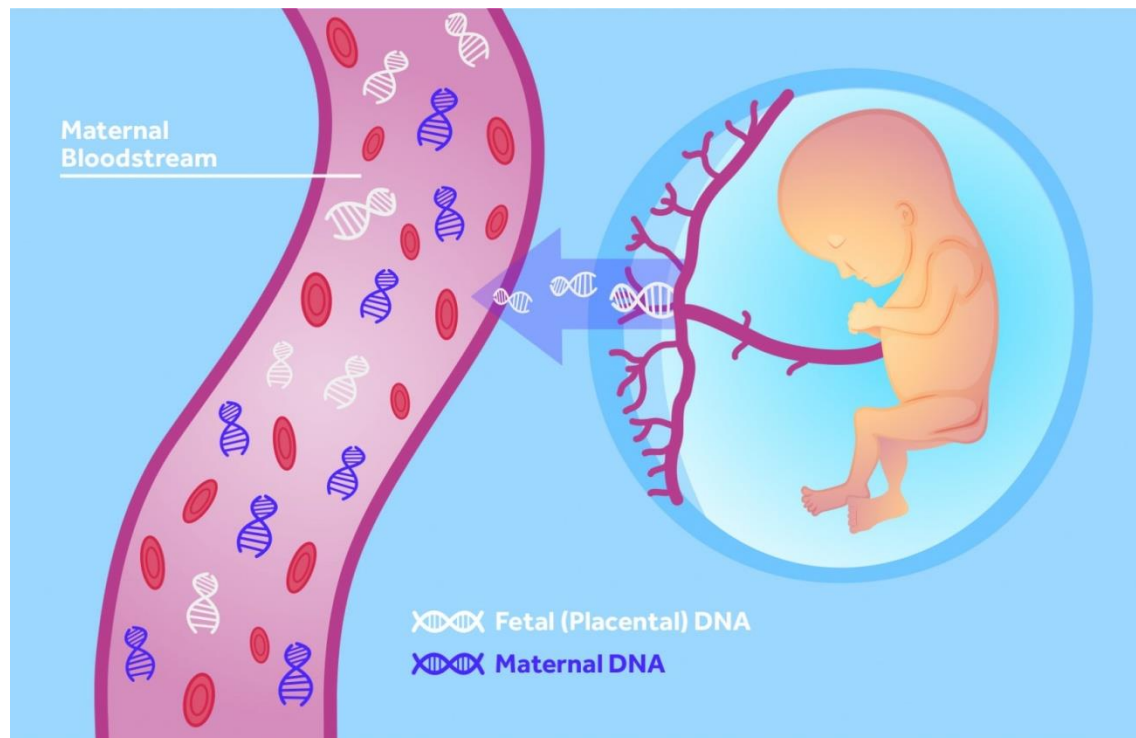
- 1 Plazma
- 2 Destičky
- 3 Bílé krvinky
- 4 Červené krvinky



Volná fetální DNA cffDNA

Ženám se poměrně záhy po otěhotnění objeví v krvi také zlomky dědičné informace vyvíjejícího se embrya. V plazmě těhotné ženy se nachází směs úlomků DNA matky a plodu.

„Dětské“ fragmenty tvoří asi desetinu všech zlomků DNA, jež lze v krvi matky najít.



Volná fetální DNA krvi matky byla objevena v roce 1997
Hongkongský genetik Dennis Lo prokázal,
že z „dětských“ zlomků lze teoreticky poskládat kompletní dědičnou informaci.
Nic z ní nechybí. V krvi matky se nachází genom jejího dítěte
a nabízí se k přečtení. Jen je třeba vybrat z nepřehledné hromady zlomků ty správné.



Prof. Dennis Lo Yuk-ming,
Li Ka Shing Professor of Medicine and Chairman of the Department of Chemical Pathology
at The Chinese University of Hong Kong (CUHK)

Lo *et al.* vzali v úvahu podobnost mezi rychle rostoucím plodem a tumorem.
Na základě poznatku, že v plazmě a séru onkologických pacientů lze detekovat **volnou nádorovou DNA**

a využít ji pro molekulární diagnostiku (Sorenson *et al.*, 1994),
zkoumali, zda se v těhotenství do plazmy matky uvolňuje volná DNA plodu.
Dokázali pomocí PCR přítomnost sekvencí chromozomu Y (gen DYS14)
v mateřské plazmě i séru.

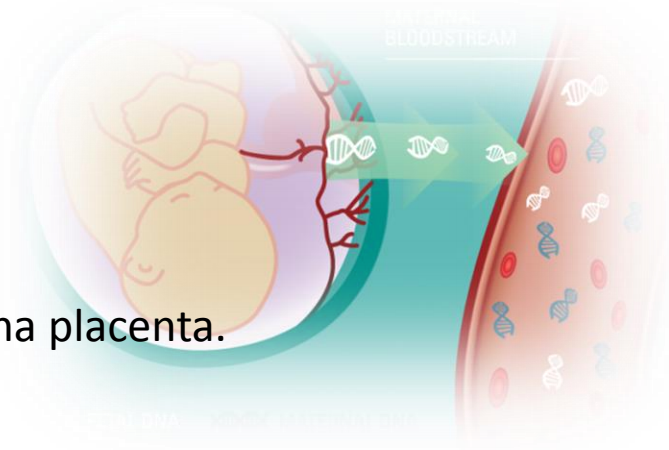
Z 30 žen nesoucích plod mužského pohlaví byl pozitivní signál
u 24 (80%) vzorků mateřské plazmy,
u 21 (70%) vzorků mateřského séra,
u 5 (17%) při vyšetření jaderných buněk plodu v krvi matky.

Pro kontrolu byl stejný postup proveden i u netěhotných žen a u žen nesoucích ženský plod.
U žádné z nich nebyla nalezena sekvence chromozomu Y.



Prof. Dennis Lo Yuk-ming,
Li Ka Shing Professor of Medicine and Chairman of the Department of Chemical Pathology
at The Chinese University of Hong Kong (CUHK)

Volná fetální DNA cffDNA



Za primární zdroj cffDNA v krvi matky je považována placenta.

Apoptóza buněk trofoblastu –
uvolňování fetální DNA do krve matky ve formě cell-free DNA (mimobuněčné DNA).


Cell-free DNA (cfDNA) má charakter krátkých DNA fragmentů

V těhotenství se v krvi matky nachází jak, cfDNA matky, tak také cfDNA plodu

Množství fetální cff DNA představuje jenom část z celkové cfDNA(4 –25%)

Buňky plodu se dostávají do krevního řečiště na základě principu apoptózy placentálních buněk, tzn., že placentální buňky odumřou a odpadnou od stěny placenty a jsou nahrazeny buňkou novou. Odumřelé buňky jsou pak odnášeny cirkulující krví a nakonec jsou vyplaveny z těla ven. Jelikož buňky odumírají a jsou nahrazovány novými.

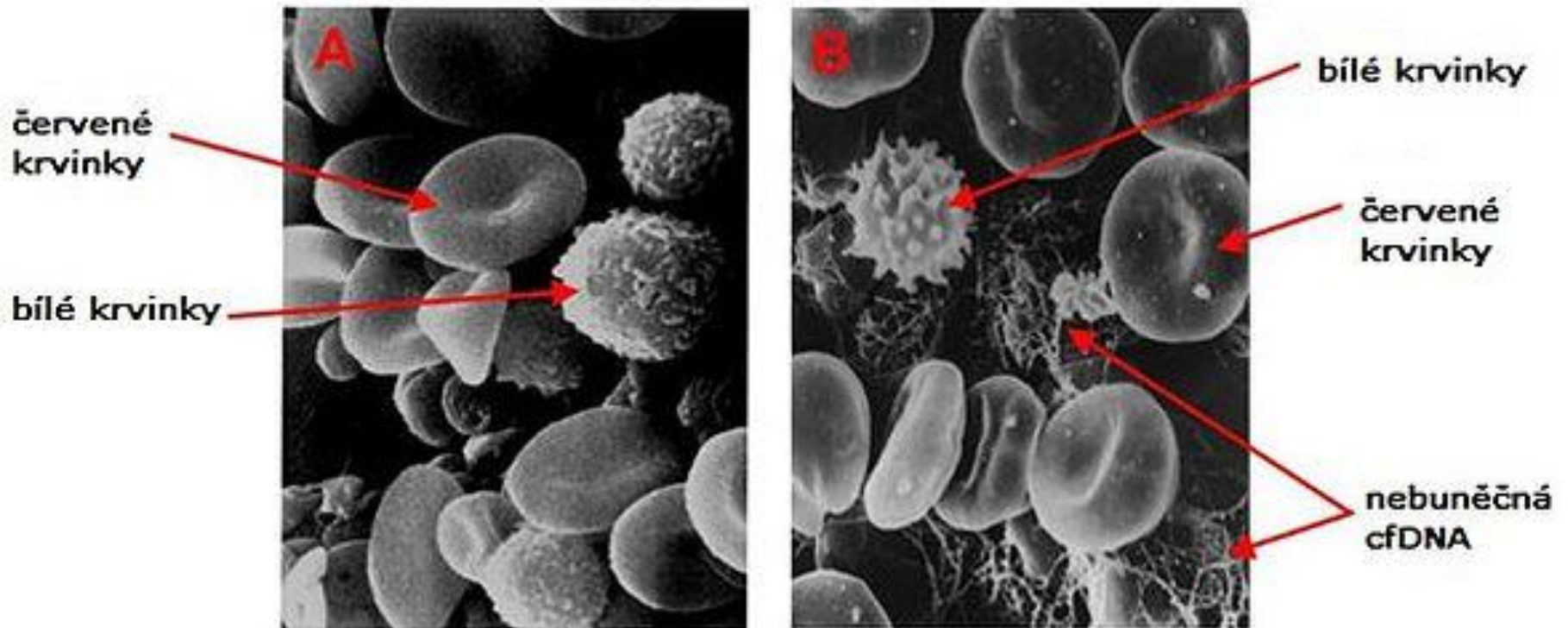
Tento proces probíhá po dobu celého těhotenství.



*Objev fetální DNA
cirkulující v krvi matky
byl významným přínosem
pro prenatální diagnostiku*

Volná fetální DNA cffDNA

Vzorek krve (zvětšeno 15 000 krát)



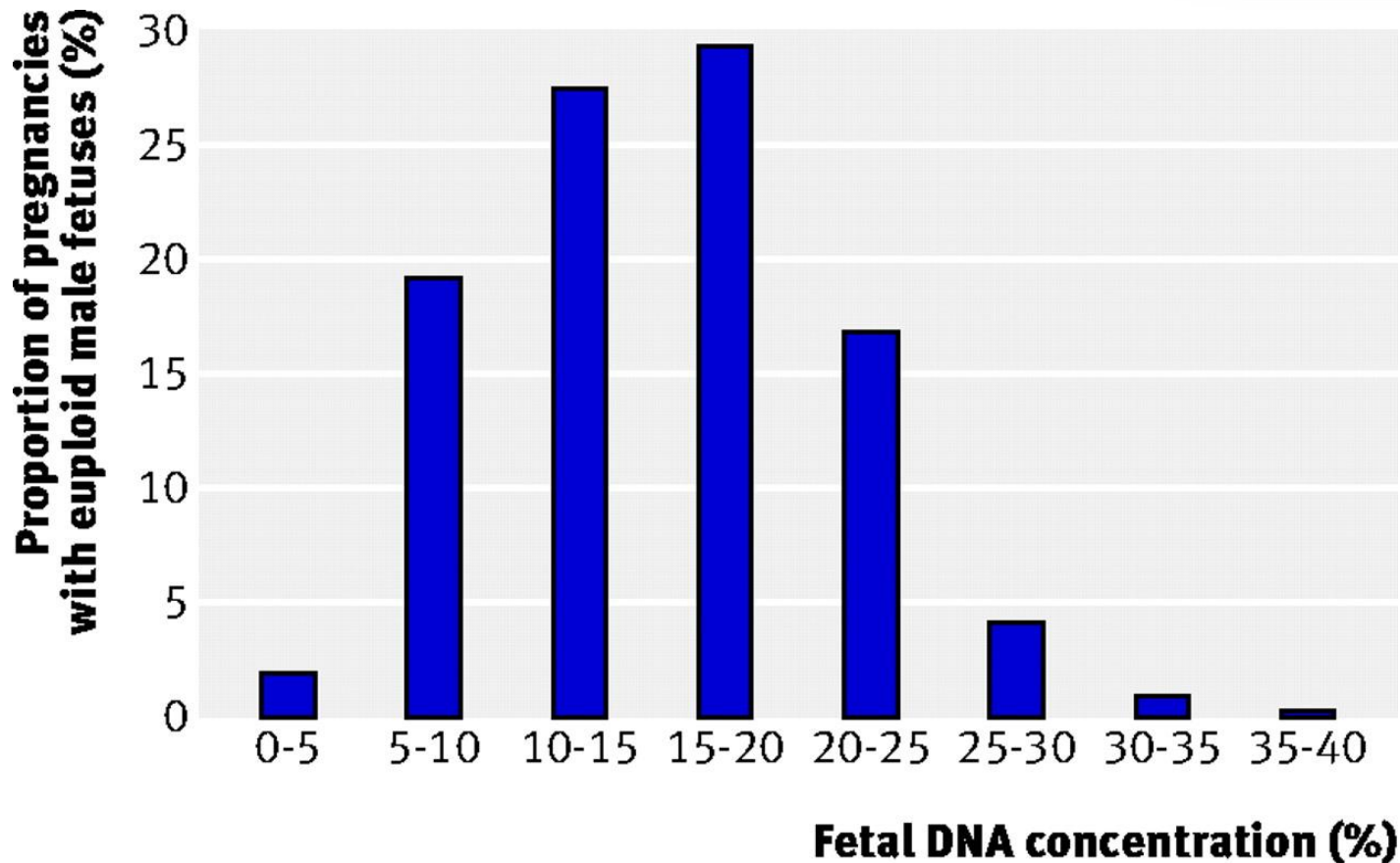
Fotografie lidské krve pod elektronovým mikroskopem (15 000 krát zvětšeno), A. krev ženy před otěhotněním, B. krev ženy v 9. týdnu těhotenství obsahující molekuly nebuněčné cfDNA.

Volná fetální DNA cffDNA

- fragmenty volné fetální DNA jsou v krevním oběhu matky detekovatelné zhruba od čtvrtého týdne těhotenství.
- velikost se pohybuje přibližně v rozmezí od 100 - 700 bp,
- fragmenty nad 1 kb patří převážně matce
- jejich zastoupení v poměru k volné mateřské DNA je v průměru kolem 10 %
- koncentrace se postupně zvyšuje
 - I. trimestr do 3 %
 - II. trimestr až 6 %



Volná fetální DNA cffDNA



Volná fetální DNA cffDNA



FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ HLADINU cffDNA

Faktory lze rozdělit podle toho, zda se přímo týkají matky nebo těhotenství a jeho/ s ním spojených komplikací.

Charakteristiky matky

- 1. Váha a BMI**
- 2. Fyzická aktivita**
- 3. Kouření**
- 4. Ostatní**

Charakteristiky těhotenství

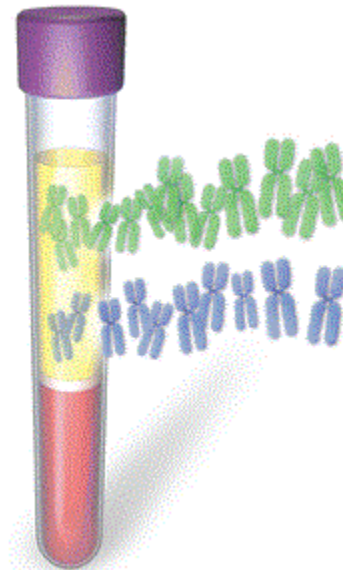
- 1. Vícečetná těhotenství**
- 2. Preeklampsie**
- 3. Předčasný porod**
- 4. Aneuploidie**

Volná fetální DNA cffDNA



Volná DNA plodu (cffDNA) zůstává stabilní až 24 hodin po odběru krve, za tu dobu nedojde ke změně její koncentrace. Oproti tomu koncentrace volné maternální DNA se zvýší již 6 hodin po odběru.

Prodleva mezi časem odběru a zpracováním vzorku tedy ovlivňuje pouze celkové množství volné DNA (cfDNA), nikoliv množství volné DNA plodu (cffDNA).



Volná fetální DNA cffDNA

Clearance

Fetální DNA vykazuje rychlé vymizení z krve po porodu, na rozdíl od fetálních buněk, které byly nalezeny v krvi i po několika desítkách let, což může komplikovat vyšetření při dalším těhotenství.

Vaginálním porod

Není detekovatelné množství cffDNA již jeden den po porodu.

Porod císařským řezem

Průměrný čas, za který vymizí 50 % koncentrace cffDNA na 16,3 minuty (rozmezí 4-30 minut).

U většiny žen není po 120 minutách od porodu cffDNA detekovatelná.

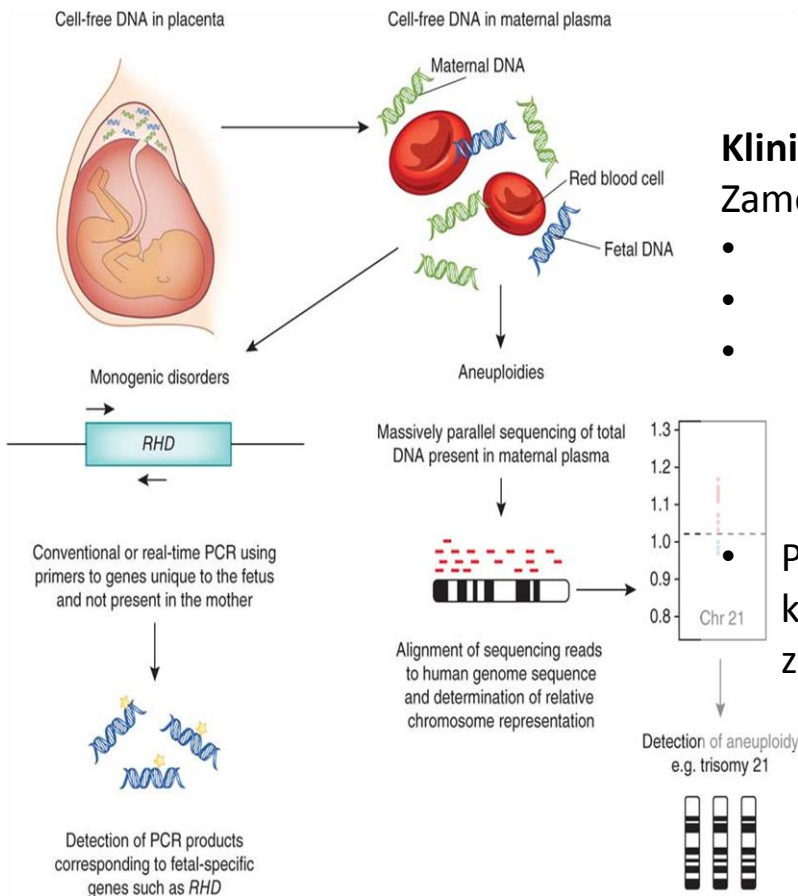


A close-up photograph showing a healthcare professional in a white lab coat drawing blood from a patient's arm. The professional is wearing white gloves and using a syringe. The patient's arm is resting on a surface. The background is a plain, light-colored wall.

~~Neinvazivní prenatální testování NIPT~~

Neinvazivní prenatální screening NIPS

Neinvazivní prenatalní screening NIPS



Klinické aplikace neinvazivního prenatalního screeningu
Zaměřené na identifikaci fetálních specifických DNA sekvencí

- **determinace pohlaví fetu**
- **rhesus D genotypizace u rhesus negativních matek,**
- **monogenní choroby**

získané od rodičů
de novo

Pokročilé technologie analyzující jednotlivé molekuly DNA
kdy je kvantifikována fetální i mateřská cffDNA,
zejména **vyšetření aneuploidií**

Neinvazivní prenatalní screening NIPS

Detekce fetálních aneuploidií

Metodou masivně paralelní sekvenace (MPS)



Masivně paralelní sekvenování (MPS)



Ion Torrent PGM

Kapacita 2GB/běh



Ion Proton

Kapacita 10+GB/běh



Ion S5

Kapacita 10+GB/běh

HiSeq X Ten – kapacita 18.000 genomů ročně, cena za genom \$1.000, cena \$10M



HiSeq 4000

Kapacita 12 genomů/běh
(24/týden), 1,5TB/běh



NextSeq 500

Kapacita 1 genom/běh
(3/týden), 120GB/běh



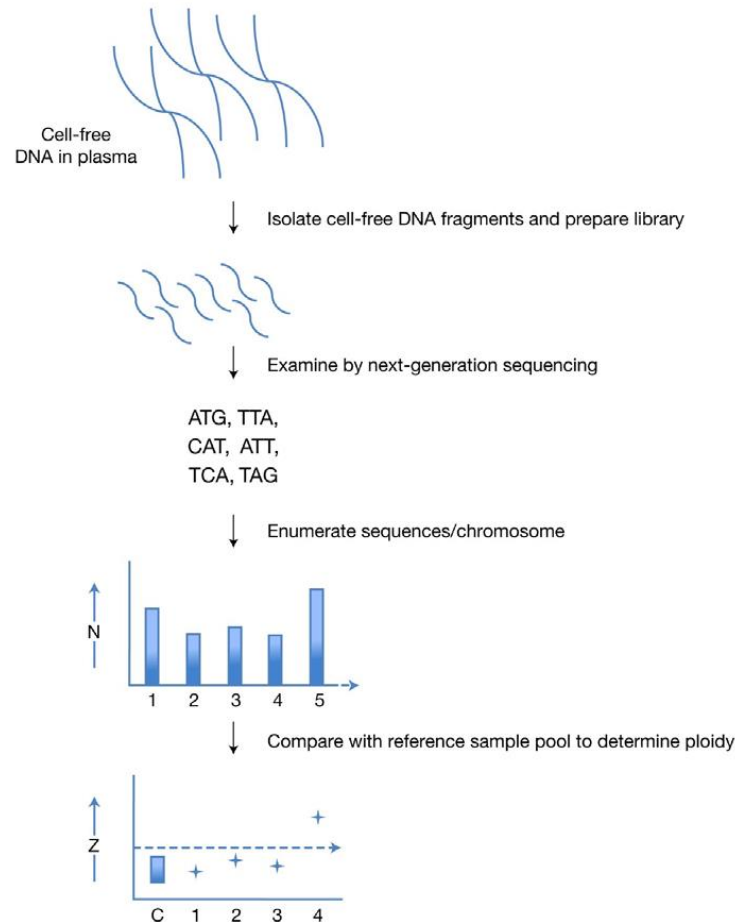
MiSeq

Kapacita 0,15
genomu/běh,
15GB/běh

Detekce fetálních aneuploidií

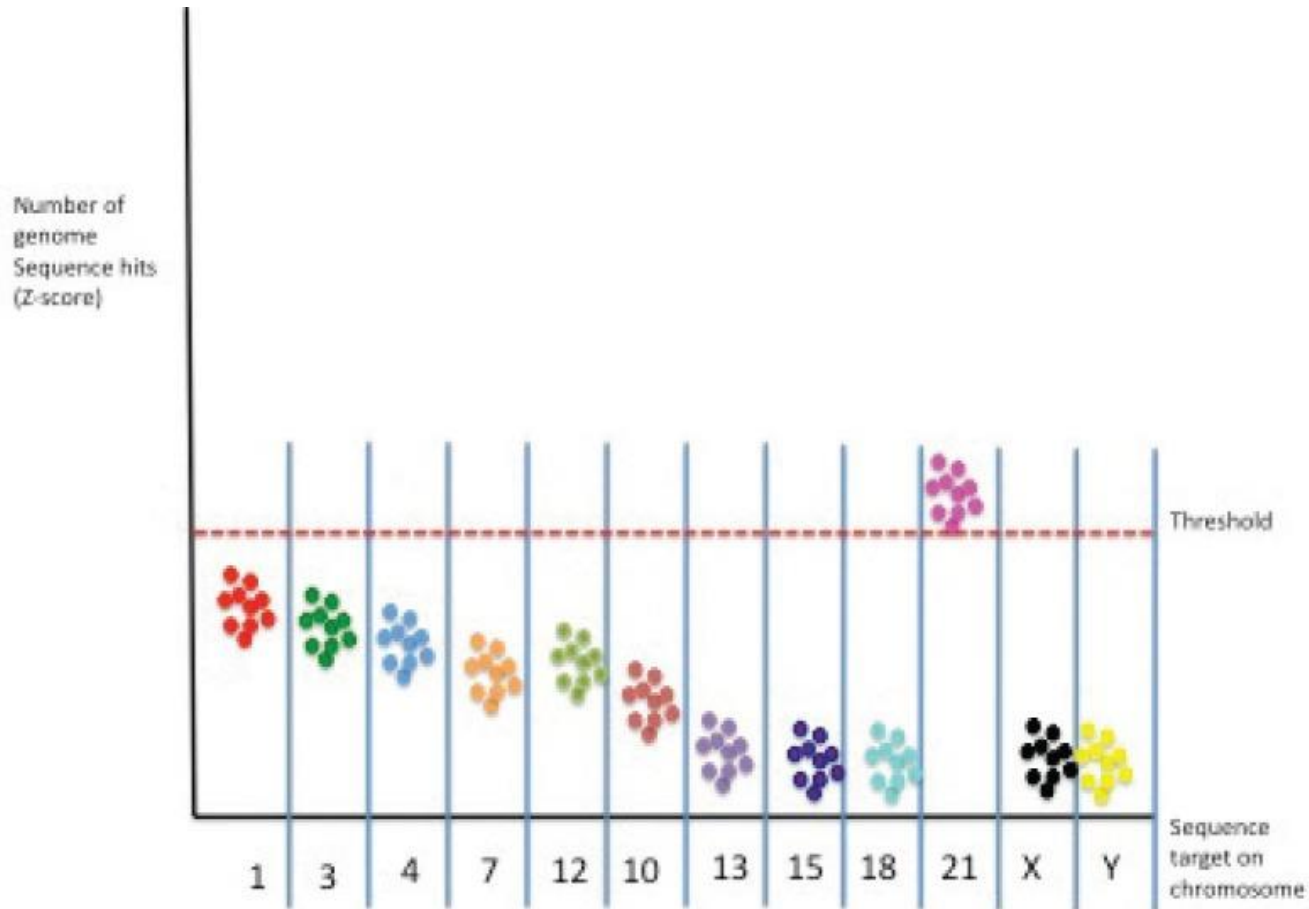
Metodou masivní paralelní sekvenace (MPS)

Ize každý z milionů úlomků DNA v plazmě matky přiřadit k chromozomu, ze kterého pochází, a zjistit nadbytek DNA určitého chromozomu,



Detekce fetálních aneuploidií

Metodou masivní paralelní sekvenace (MPS)



Detekce fetálních aneuploidií

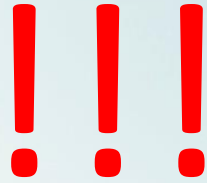
Metodou masivní paralelní sekvenace (MPS)

NIPS – srovnání										
	Chromozomy	Aneuploidie, pohl.chr.	Mikrodeleční syndromy	Vícečetná těhotenství	IVF	Stanovení fetální frakce	Výsledek	Týden těhotenství	Nepro-kazatelny výsledek	Cena
MaterniT21 PLUS Sequenom, US	21, 18, 13, X, Y, 16, 22	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	do 7 dnů	10	< 1,5 %	25.500,- Kč
VisibiliT Sequenom, US	21, 18, Y	ne	ne	ANO	ANO	ANO	do 7 dnů	10	< 1,5 %	13.850,- Kč
Harmony Ariosa, US	21, 18, 13, X, Y	ANO	ne	ANO (dvojčata)	ANO	ANO	do 11 dnů	10	< 4 %	16.500,- Kč
Prenascan BGI, Honkong	21, 18, 13, X, Y	ANO	ANO	ANO	ANO	ne	Do 2-3 týdnů	10	v řádu procent	13.950,- Kč
Verifi Verinata, US	21, 18, 13, X, Y	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	7-11 dnů	10	?	cca 1000 USD
Panorama Natera	21, 18, 13, X, Y	ANO	ANO	ne	ne	ANO	9-12 dnů	9	?	Cca 800 USD
LifeCodexx Germany	21, 18, 13	ne	ne	ne	?	ne	6 / 10	10	?	1.150/825 EUR
Gendia Belgium	21, 18, 13	ne	ne	ANO (dvojčata)	?	?	Do 2 týdnů	10	?	690 EUR
BambniTest, Berry Genomics Co.,Ltd, Shanghai	21, 18, 13, X, Y	ANO	ne	?	?	?	?	?	?	cca 500 USD
Clarigo Multiplicon Belgium	21, 18, 13, X, Y	ANO	ne	ne	ANO	ANO	Do 2 týdnů	12(8)	v řádu procent	12.500,- Kč

* Informace uvedené v tabulce jsou doplněny na základě dostupných publikací a firemních materiálů

Výsledky všech těchto prací ukázaly,
že metodou masivního paralelního sekvenování
lze odhalit téměř 100 % hledaných chromozomálních aberací,
přičemž počet nevyhodnotitelných vzorků (příliš malé množství volné fetálníDNA)
byl zanedbatelně nízký.





**DNA TEST OTCOVSTVÍ BĚHEM TĚHOTENSTVÍ Z MATEŘSKÉ KRVE
JIŽ V 9. TÝDNU JIŽ OD 29900,- KČ**



Bioquest Diagnostics DNA Center



Volná fetální cfDNA (DNA plodu)

K potvrzení otcovství je nutná shoda v pěti SNP lokusech.

C T A **A** G T A

Version 1

C T A **G** G T A

Version 2

u domnělého otce analyzovat kromě krve a slin i další biologické vzorky, například sperma, nehty, zubní kartáček, nedopalek cigarety a podobně.