

OPAKOVÁNÍ

DIAGNOSTIKA

RNA

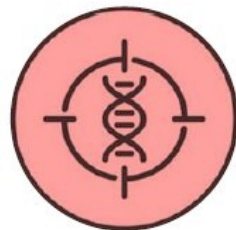
DNA

exprese

sestřihové mutace

(dříve – rozsáhlé geny → snížení počtu PCR)

detekce patogenů – molekulární mikrobiologie



OPAKOVÁNÍ

DIAGNOSTIKA

```
graph TD; A[DIAGNOSTIKA] --> B[PŘÍMÁ]; A --> C[NEPŘÍMÁ]
```

PŘÍMÁ

předpoklad – znalost kauzálního genu a jeho WT sekvence

NEPŘÍMÁ

předpoklad – znalost přibližné polohy lokusu, jehož porucha vede k rozvoji onemocnění

OPAKOVÁNÍ

PŘÍMÁ DIAGNOSTIKA

```
graph TD; A[PŘÍMÁ DIAGNOSTIKA] --> B[SCORING]; A --> C[SCANNING];
```

SCORING

scoring – „víme co hledáme“
(detekce známé varianty)

SCANNING

scanning – „víme kde hledat, ale
nevíme co přesně“
(vyhledávání neznámé varianty)

qPCR, Real-Time PCR

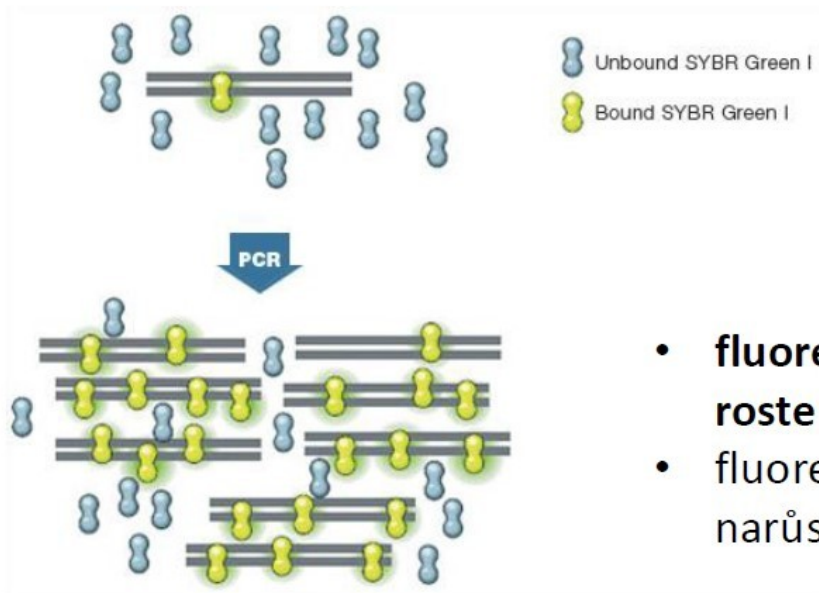
- qPCR = kvantitativní PCR
- Real-Time PCR = PCR v reálném čase
- varianta PCR umožňující přímou **kvantifikaci PCR produktu v průběhu reakce**
- princip – detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu, **množství fluorescenčního signálu závisí na množství PCR produktu**

qPCR, Real-Time PCR

- **PCR produkty musí být fluorescenčně značeny** → různé přístupy pro detekci
 - 1) **interkalační barviva**
 - 2) **fluorescenčně značené sondy**
 - 3) **fluorescenčně značené primery**
- v závislosti na použitém systému detekce – výhody/nevýhody

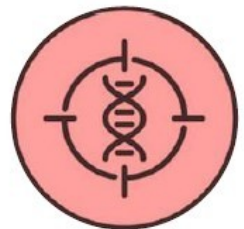
INTERKALAČNÍ BARVIVA

- váží se na dsDNA
- **vazba nezávislá na sekvenci**
- nejznámější – SYBR® Green



- volně v roztoku – nízký fluorescenční signál

- **fluorescenční signál po vazbě na DNA roste (až 1000x)**
- fluorescenční signál roste proporčně s narůstajícím množstvím PCR produktu



INTERKALAČNÍ BARVIVA

NEVÝHODY/OMEZENÍ

- nelze využít pro multiplexní reakce
- váže se na veškerou dsDNA → nelze odlišit nespecifické produkty

VÝHODY

- jednoduchý návrh oligonukleotidů nezbytných pro reakci (stačí pouze 1 pár specifických primerů)
- levnější než detekce s využitím sond

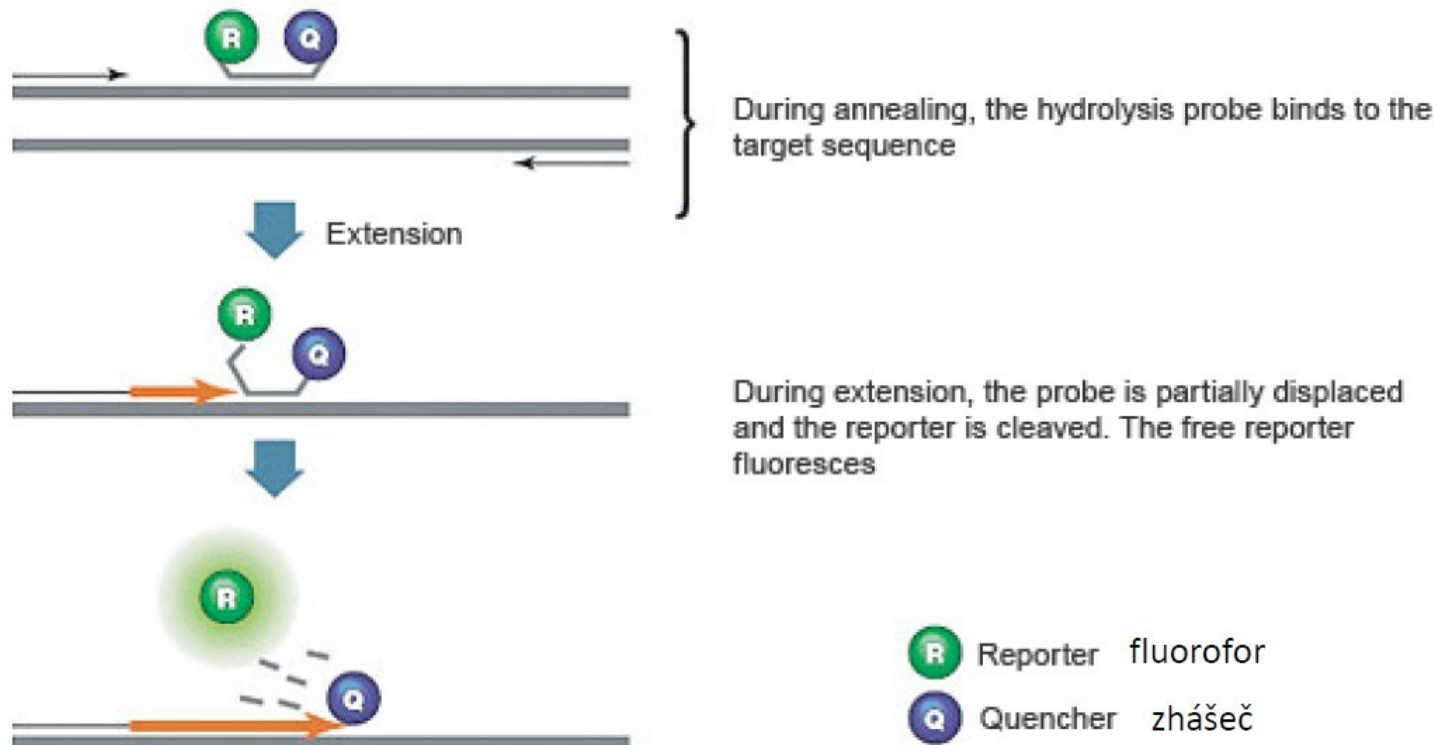
FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ SONDY

- váží se do střední části amplifikovaného produktu
- změna intenzity fluorescence je úměrná množství PCR produktu
- **sekvenční specifita** – nedetekujeme nespecifické produkty, ale není univerzální → výhoda/nevýhoda → záleží na aplikaci

- **různá technická řešení** – 2 nejčastější/nejznámější
 - hydrolyzační (TaqMan)
 - hybridizační (FRET)
- mimo tato existuje dnes již široká škála technických řešení detekce (firmy, platformy atd.)

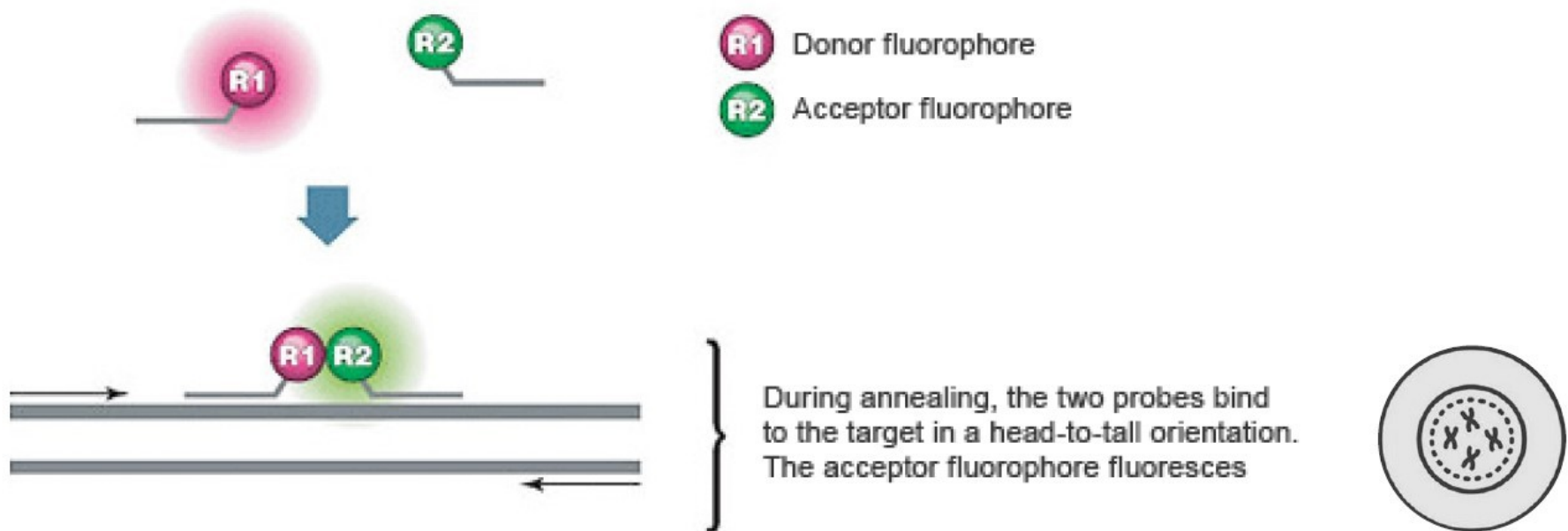
HYDROLYZAČNÍ SONDY (TaqMan)

- princip – oddělení molekuly fluoroforu a zhášeče během elongační fáze (5'→3' exonukleázová aktivita polymerázy) → ukončení zhášení a emise fluorescence



HYBRIDIZAČNÍ SONDY (FRET)

- **FRET** = Fluorescence Resonance Energy Transfer = přenos energie fluorescenční rezonancí
- **dvojice** fluorescenčně značených **sond**
- emise energie z **donorového fluoroforu** na 3' konci první sondy excituje **akceptorový fluorofor** na 5' konci druhé sondy
- **podmínka** – dostatečně **malá vzdálenost** 10-100 Å (po navázání 1-5 nt)



qPCR – kvantifikace absolutní vs. relativní

ABSOLUTNÍ

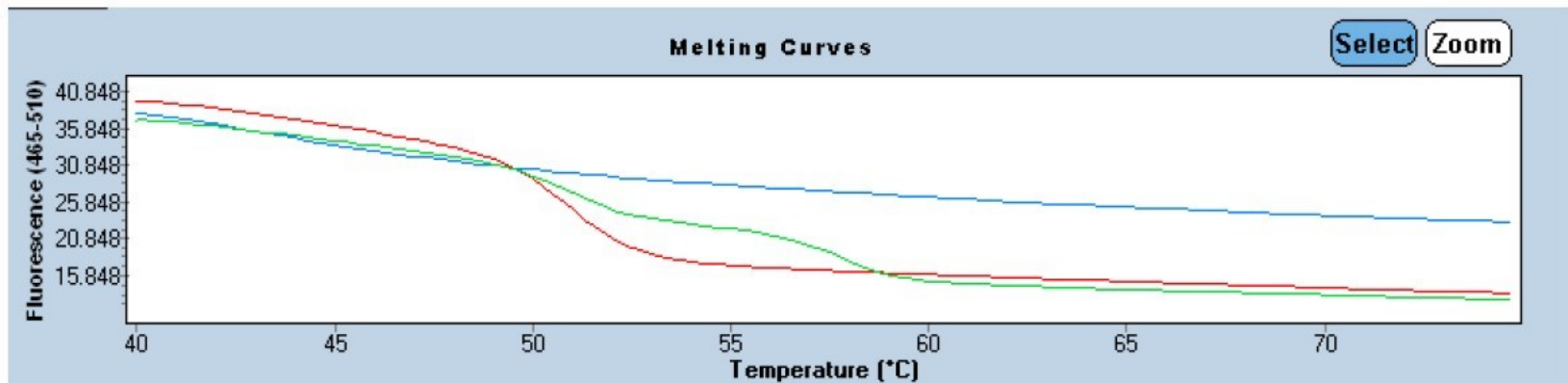
- standardní křivka (ředění standardu)
- kvantifikace vzorku vzhledem ke standardní křivce

RELATIVNÍ

- užití tzv. housekeepingových genů
- kvantifikace cílového genu vzhledem k housekeepingovému u stejného vzorku → normalizovaný poměr → relativní kvantifikace
- !brát v potaz účinnost reakce – nemusí být pro všechny stejná (2)!

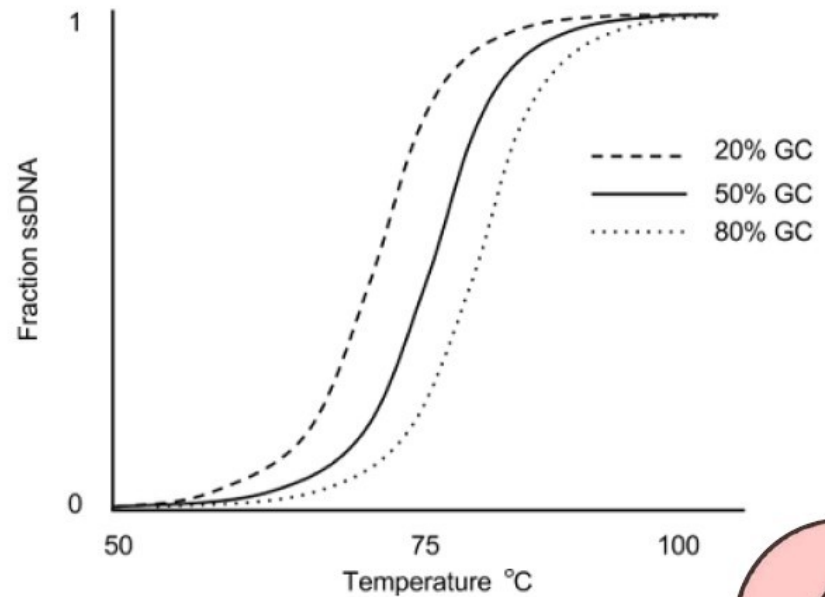
HRM

- **HRM** = High Resolution Melting = analýza křivek tání s vysokým rozlišením
- „tání“ DNA = proces denaturace dsDNA indukovaný zvyšováním teploty
- ↑teplota → „tání“ dsDNA → komplementární řetězce dsDNA se oddělují → uvolnění interkalačního barviva nebo FRET sond → pokles fluorescence
- získá tzv. křivky tání – měřením intenzity fluorescence v průběhu postupného, pomalého ohřevu dsDNA produktu v post-PCR fázi



TEPLOTA TÁNÍ

- T_m = melting temperature = teplota tání
 - teplota, při které dojde právě u poloviny dsDNA k denaturaci za vzniku ssDNA
- závislá na
 - 1) sekvenci fragmentu DNA
 - 2) délce
 - 3) obsahu CG



VYUŽITÍ HRM

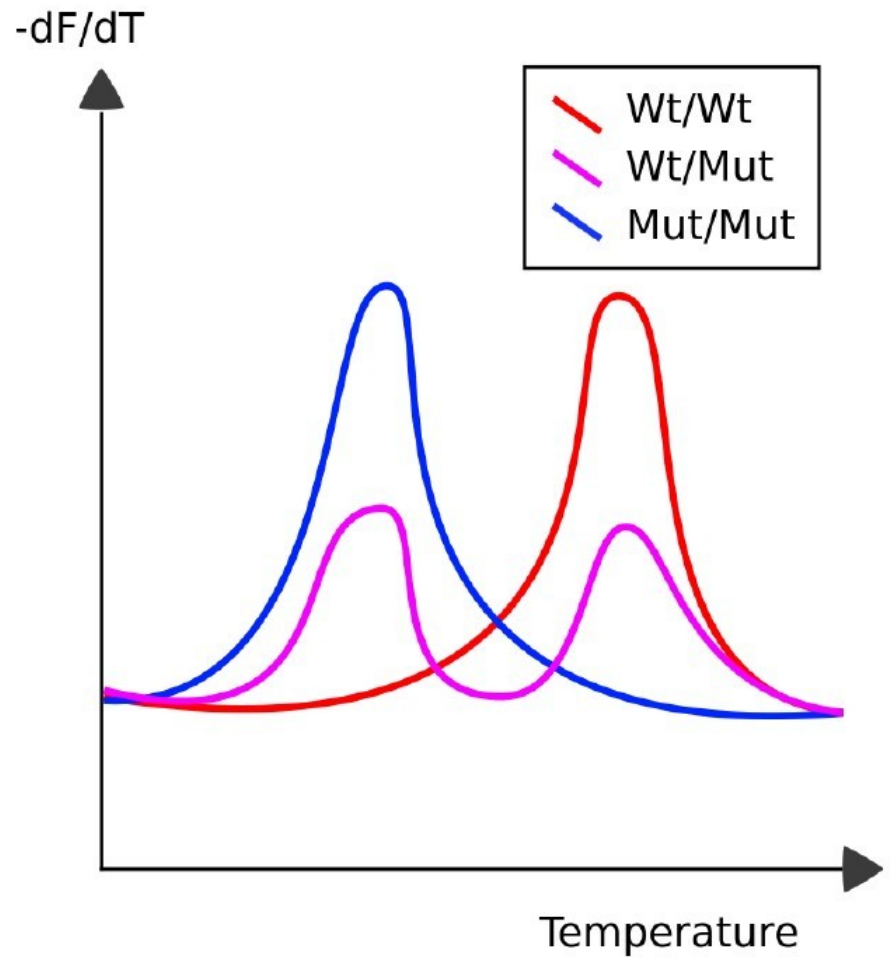
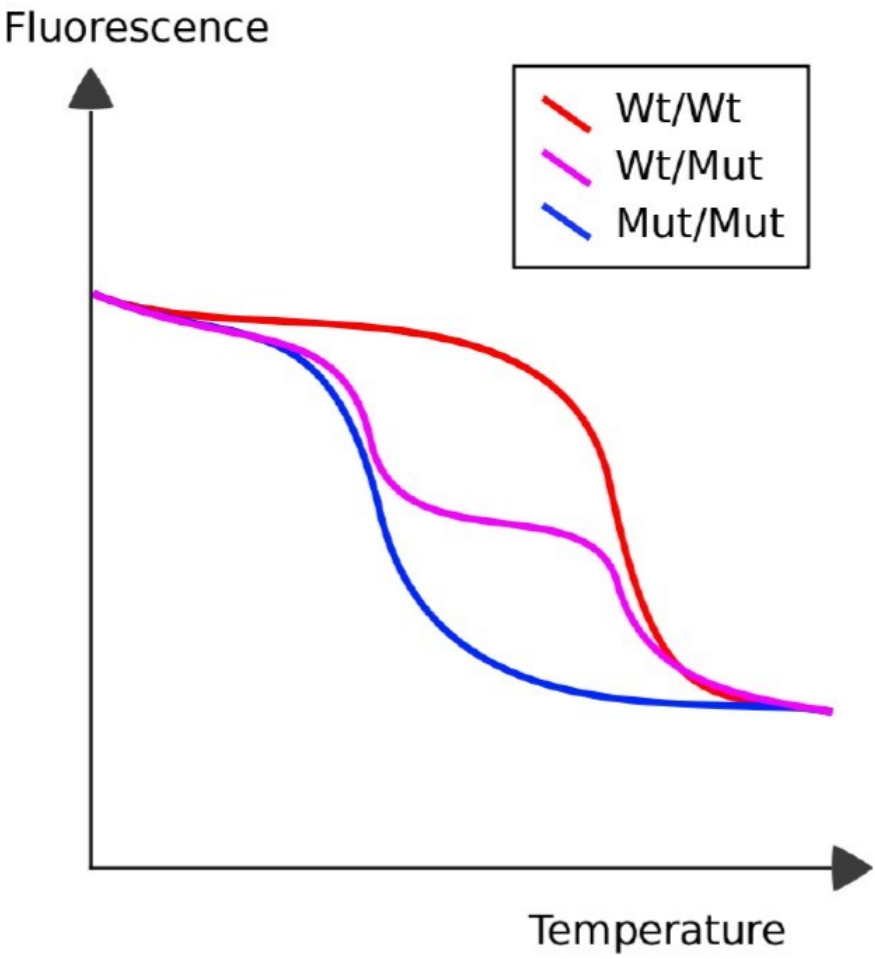
- **i jednonukleotidová záměna se projeví změnou T_m**
 - možnost využití k detekci sekvenčních změn v daném PCR produktu

SCANNING

- interkalační barvivo + porovnání křivek tání vzorku a standardu (WT) → odlišuje se → víme, že je přítomna nějaká sekvenční odchylka od WT sekvence → sekvenace

SCORING

- využívány sekvenčně specifické sondy pokrývající místo předpokládané mutace
- srovnání T_m kontrol (WT, MT) a vzorku → genotypizace vzorku



PŘÍKLAD VYUŽITÍ – CF (F508del)

Subset: F508del

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A
B
C
D
E
F
G
H

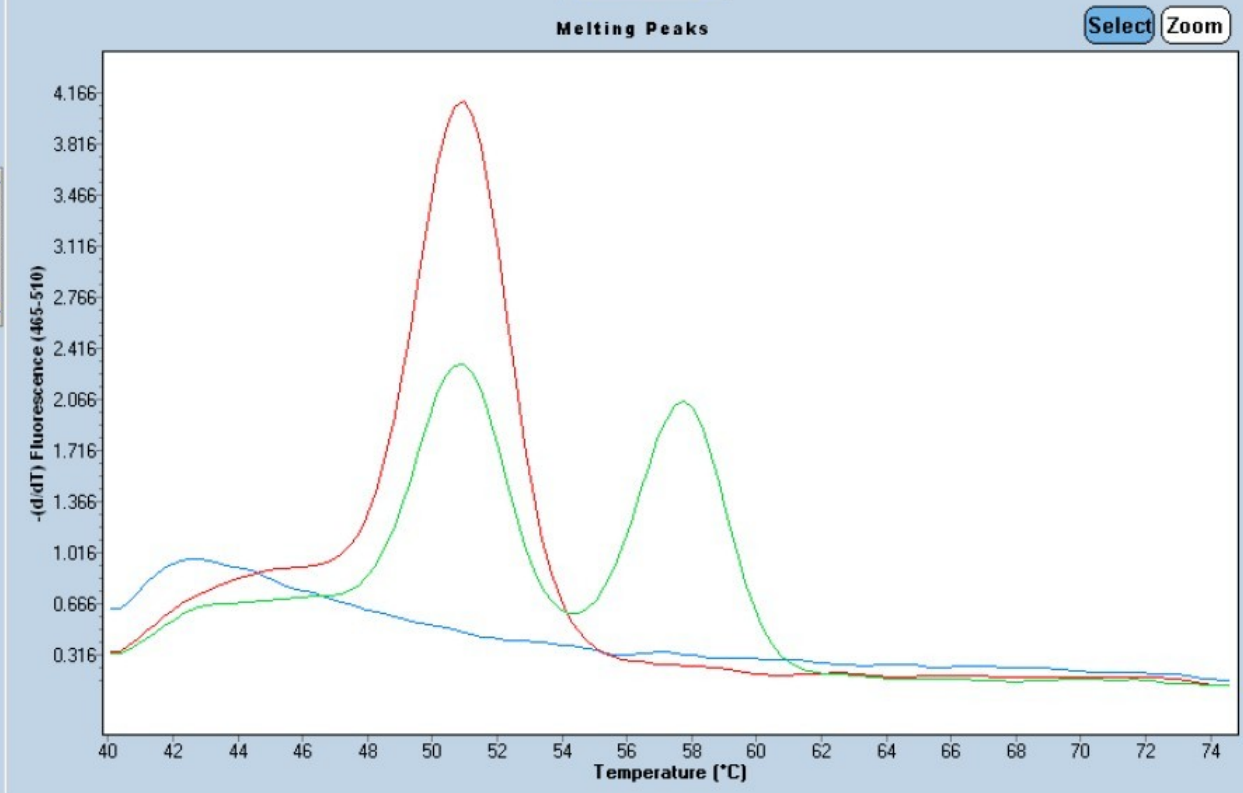
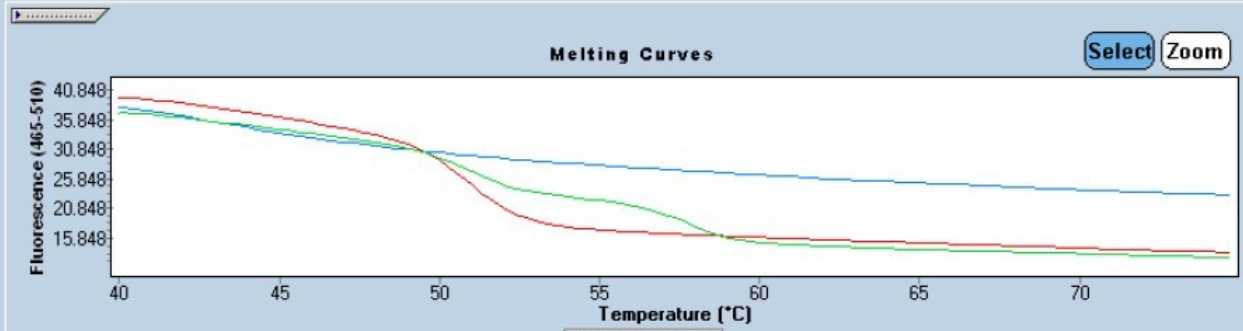
Tm results

None 1 2

Display

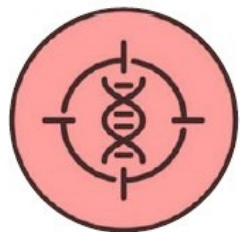
Shoulders Tm Area Height Width

Samples				Melting Peaks	
Inc...	C...	P...	Name	Tm1	Tm2
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	K-			
<input checked="" type="checkbox"/>	B6	96/19		51.03	
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	K+		50.92	57.85



F508del

- nejčastější mutace u CF – F508del (c.1521_1523delCTT, p.Phe508del)
- nachází se v exonu 11
- jedná se o delecii 3 bp, která vede ke ztrátě fenylalaninu (F) na pozici 508 v proteinu CFTR
- nachází se u 60-70 % pacientů s CF
- v ČR je asi u 67 %



CYSTICKÁ FIBRÓZA (CF)

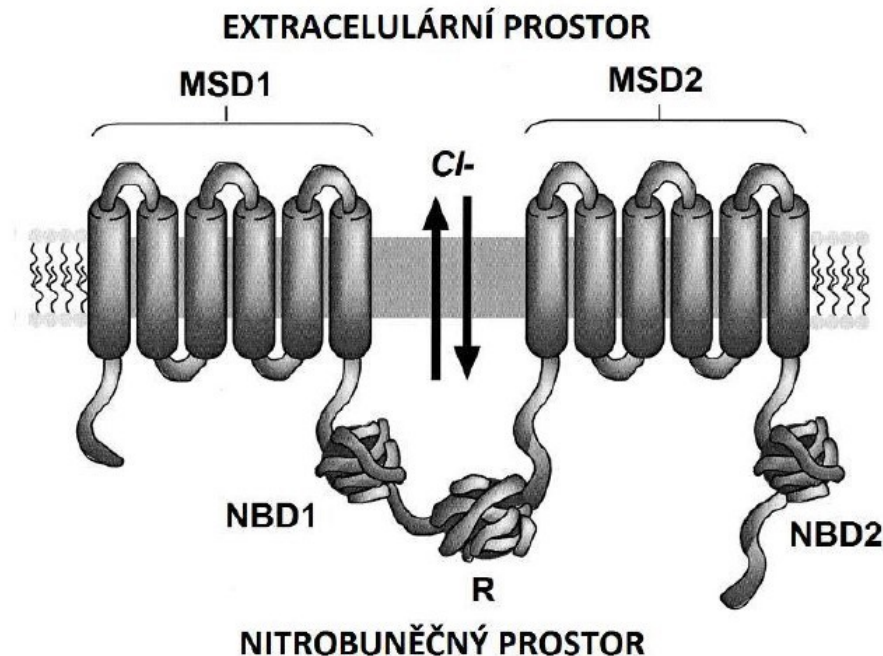
- **nejčastější autozomálně recesivní onemocnění evropských populací**
- **multiorgánové onemocnění**
- **primární příčina – mutace v genu kódujícím CFTR protein → iontový kanál**

VÝSKYT CF

- především u evropských populací , v neevropských populacích je výskyt CF výrazně nižší
- frekvence přenašečů přibližně 1 z 26 30
- výskyt u 1 dítěte na 2500 4500 novorozenců
- v ČR udáván 1 ze 4023 (dle výsledků NS nižší 1 z 6946→ vliv prenatální a preimplantační diagnostiky???)

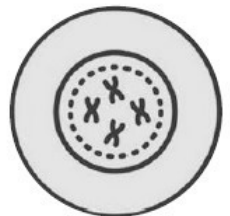
CFTR PROTEIN

- exprimován hl. na epitelových buňkách
- nachází se na **apikální membráně epitel. buněk**
- složen ze 1480 amk → **5 domén**
 - 2 transmembránové (MSD)
 - 2 domény vázající aktivované nukleotidy (ATP) (NBD)
 - 1 regulační doména (R)



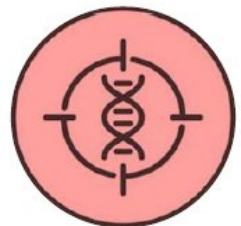
FUNKCE PROTEINU

- hlavní funkce CFTR proteinu – **chloridový kanál** → přenos chloridových aniontů přes membránu
- chybějící/nefunkční protein
 - nerovnováha iontového prostředí
 - porucha transportu vody
 - abnormálně viskózní hlenovitý sekret na epitelech
 - klinické projevy



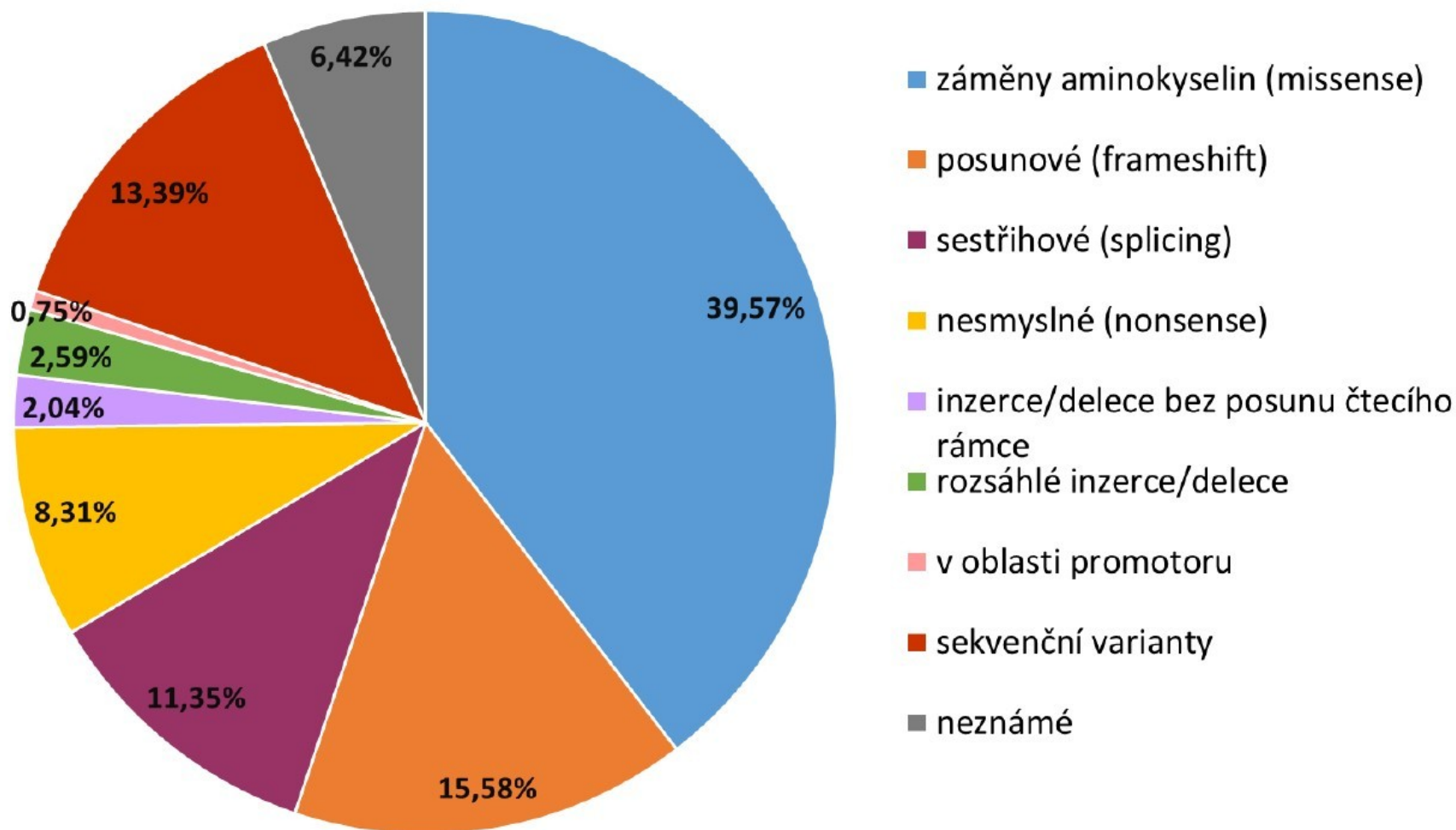
GEN *CFTR*

- lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 7 v oblasti 7q31
- **27 exonů**
- dnes známo **více jak 2 000 sekvenčních variant**
- mutace *CFTR* genu jsou zárodečného původu (tzv. **germinální mutace**)
- mutace ***de novo*** jsou velmi **vzácné**
- nejčastějším typem mutace je tzv. missense (vyskytují se i další typy)

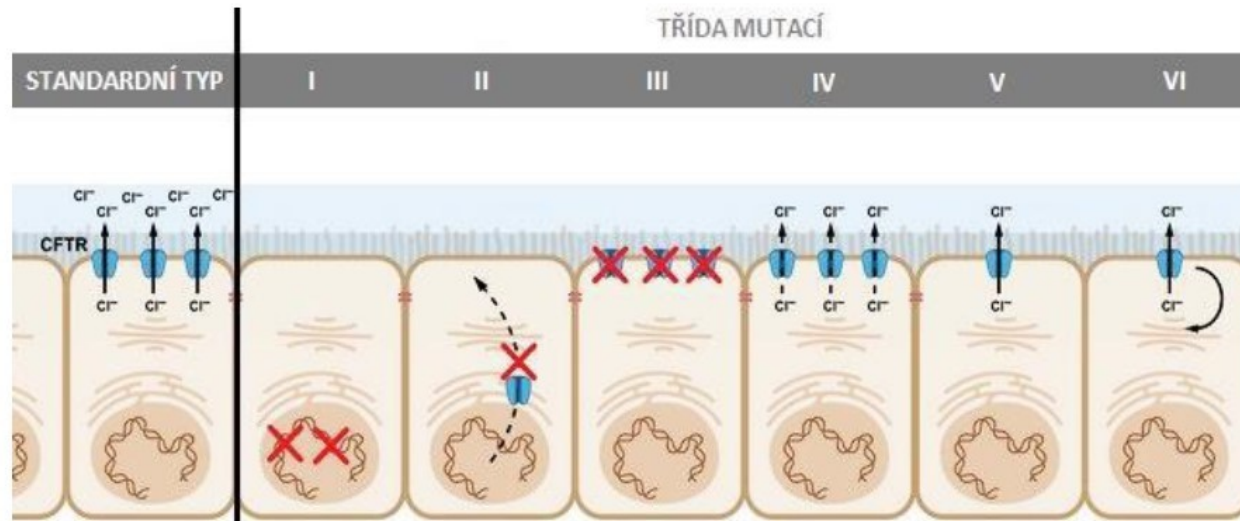


MUTACE *CFTR* GENU

Frekvence výskytu jednotlivých typů mutací v *CFTR* genu



MUTACE *CFTR* GENU



Amaral, M.D., 2015. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. J. Intern. Med. 277, 155–166. upraveno

Třída I – Narušená syntéza proteinu

Třída II – Abnormální zpracování a intracelulární transport proteinu

Třída III – Porucha regulace proteinu

Třída IV – Narušení vodivosti chloridového kanálu

Třída V – Redukovaná syntéza a zhoršený intracelulární transport proteinu

Třída VI – Snížená stabilita proteinu

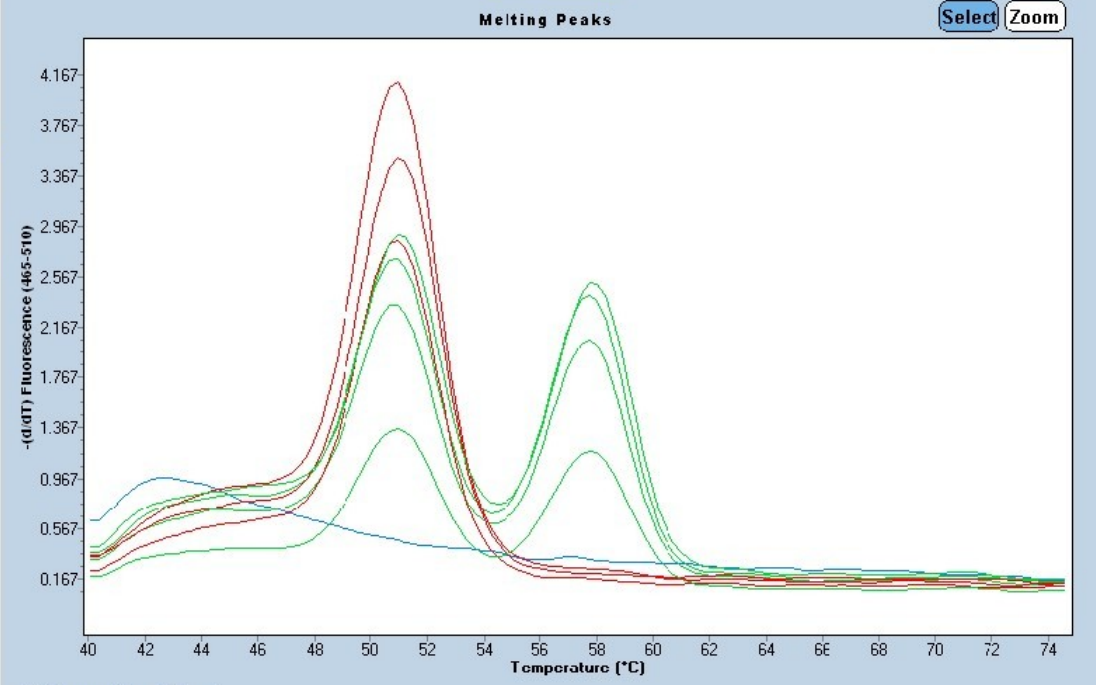
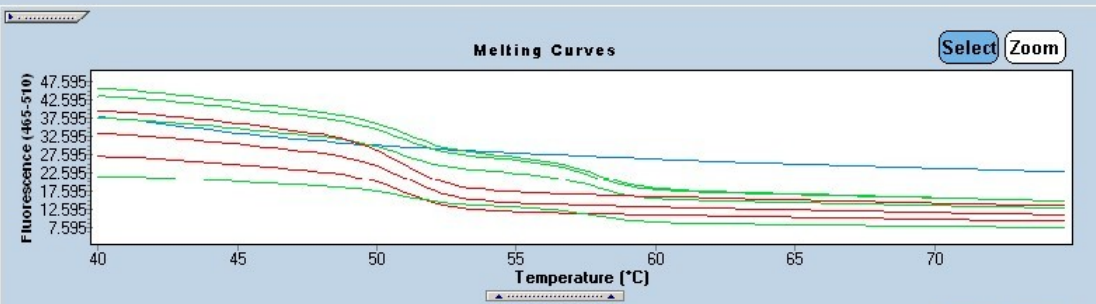




Experiment
Analyses Tm Calling for F508del
Information Program: melting, Color Compensation: Off
Subset Editor Subset: F508del
Sample Editor
Analysis
Report
Sum.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●
C				●	●							
D												
E												
F												
G												
H												

Tm results
 None 1 2



Display
 Shoulders Tm Area Height Width

Samples			Melting Peaks	
Inc...	C...	P... Name	Tm1	Tm2
<input checked="" type="checkbox"/>	●	B2 K-		
<input checked="" type="checkbox"/>	●	B4 45/:19	50.88	57.85
<input checked="" type="checkbox"/>	●	B5 77/:19	50.91	57.87
<input checked="" type="checkbox"/>	●	B6 96/:19	51.03	
<input checked="" type="checkbox"/>	●	B7 102/:19	51.05	
<input checked="" type="checkbox"/>	●	B8 104/:19	50.99	57.92
<input checked="" type="checkbox"/>	●	B9 105/:19	51.14	
<input checked="" type="checkbox"/>	●	B10 110/:19	51.08	58.01

Apply Template | Notes | Calculate | Color Comp (Off) | Filter Comb 465-510 | Max Peaks (2 or less) | HybProbe Format

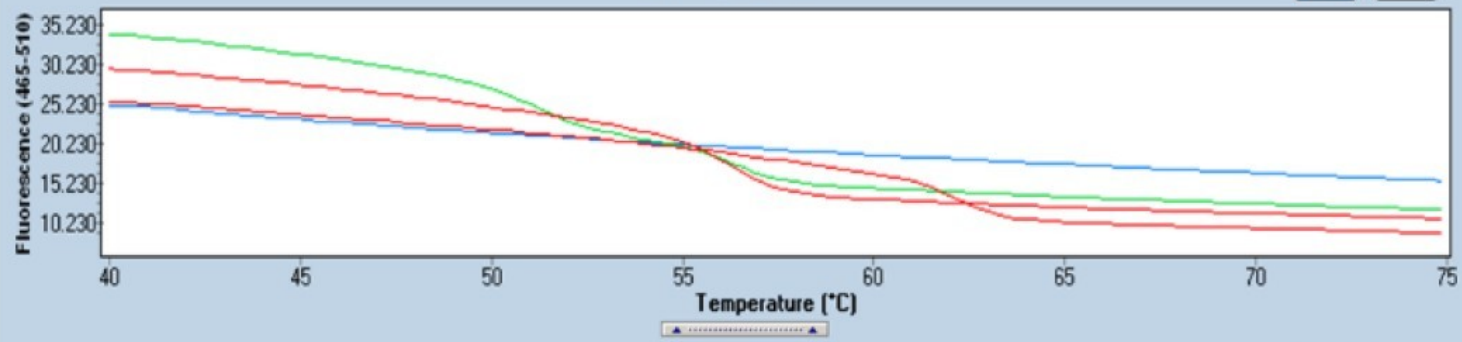


Information 3/20/2019 11:59:18 AM Instrument Warm Up. This may take several minutes.
 Information 3/20/2019 12:01:23 PM Instrument Warm Up finished.



Melting Curves

Select Zoom



Melting Peaks

Select Zoom

