

DNA diagnostika

Hlavní cíle:

- *potvrdit diagnózu* choroby, která je podmíněna genovou mutací
- *zjistit genetické dispozice* k onemocnění v rodinách s určením rizika u potomků

Strategie :

- ***přímá* DNA diagnostika:** zjistí, zda analyzovaná DNA nese či nese mutaci
- ***nepřímá* DNA diagnostika:** užitím vazebních markerů v rodiných studiích odhalí chromozom v asociaci s nemocí v rodině

Přímá DNA diagnostika

Zjistí , zda DNA testované osoby nese gen normální nebo mutovaný

- **Detekce mutací v odpovědném genu vždy potvrdí klinickou diagnózu**

musíme znát:

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

Přímá DNA diagnostika

- *Metoda přímé detekce již známých mutací*

- *Detekce známé sekvencí změny je možná u:*
Metody přímého vyhledávání neznámých mutací

(*screenovací metody*)
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 (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)

Metody detekce známých mutací

Metoda	Poznámky
Restrikční analýza PCR produktu	mutací vzniká nebo zaniká specifické místo v DNA, rozlišované restrikčním enzymem
Hybridizace PCR produktu s alelově–specifickými oligonukleotidy (ASO) pomocí dot-blot, slot-blot nebo Southern blot	základní metoda pro detekci bodových mutací
PCR s alelově-specifickými primery (ARMS test)	základní metoda pro detekci bodových mutací
Oligonukleotid-ligační test (OLA)	metoda pro detekci bodových mutací
PCR s primery, ohraničujícími místo předpokládané delece v DNA nebo bodů zlomu v translokaci	úspěšná amplifikace odhalí přítomnost specifické přestavby DNA
Detekce expanze trinukleotidových repeticí v DNA	velké expanze se detekují pomocí Southern blot a menší pomocí PCR

Příklady chorob s vymezeným počtem mutací

Choroba	Příčina
Huntingtonova chorea, Myotonická dystrofie, Fragilní X sy	nestabilní expanze trinukleotidových repetací
Charcot-Marie-Tooth	duplikace 1,5Mb v 17p11.2
α - Thalasemie	různé delece v genu
β - Thalasemie	převážně bodové mutace
srpkovitá anémie	mutace E6V v HBB genu
Achondroplasia	mutace G380R v genu FGFR3
Cystická fibróza	mutace Δ F508 v genu CFTR
Hemofilie A	velká inverze v genu pro faktor 8
Tay-Sachsova choroba	inzerce 4bp v exonu 11 genu HEXA
Lebrova optická atrofie	mitochondriální mutace nukleotidu v pozici 3460, 11778 nebo 14484
deficience 21-hydroxylázy	30% mutací tvoří velké delece

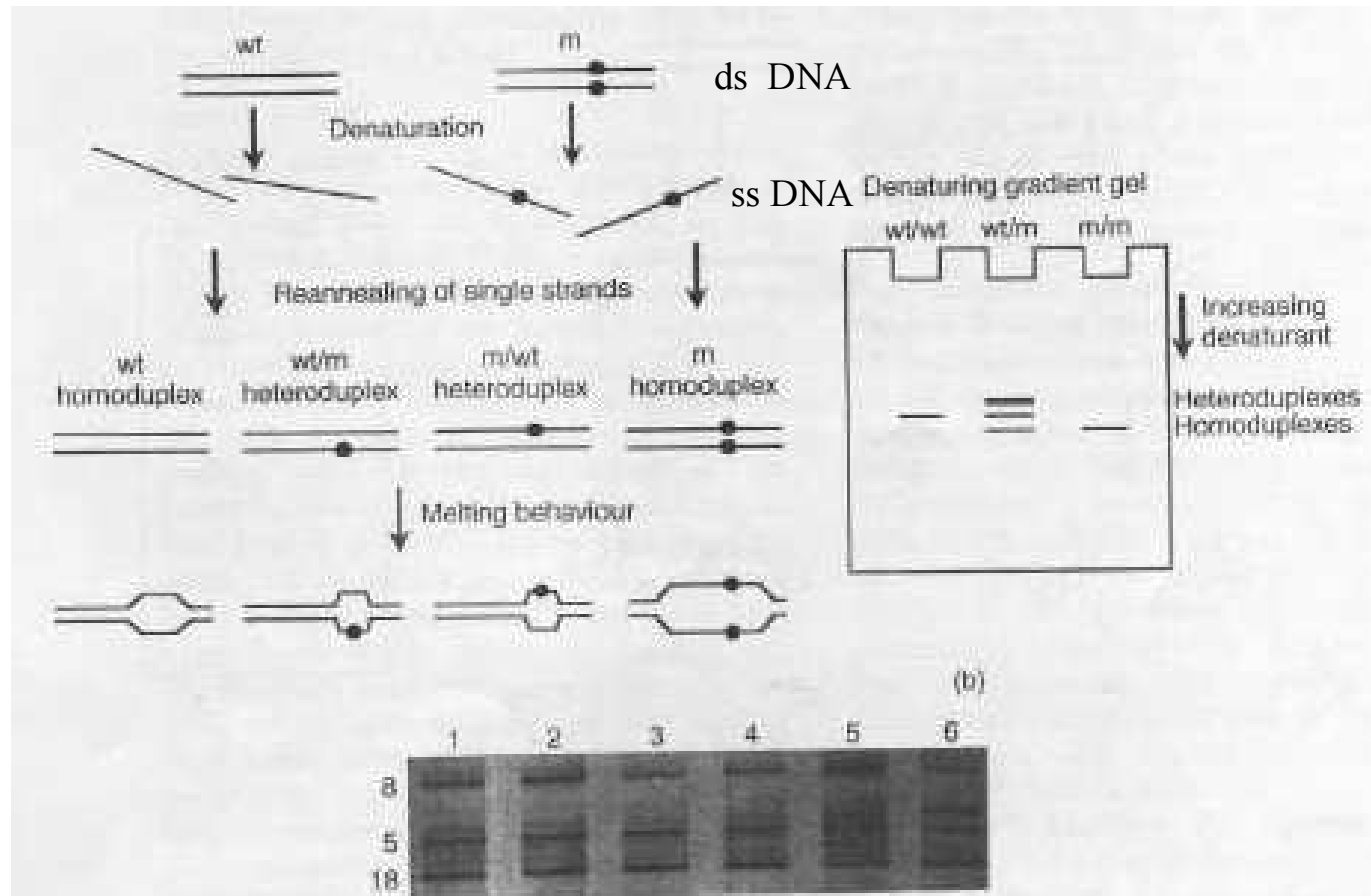
Přímá DNA diagnostika

- *Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (screenovací metody)*
 - odhalí jakékoliv odchylky v sekvenci DNA pacienta, avšak vždy jen ve srovnání se standardní sekvencí
 - neodliší patogenní a nepatogenní změny v sekvenci DNA
 - jsou náročnější časově i finančně

Nejčastěji používané vyhledávací metody

Metoda	Výhody	Nevýhody
Jednořetězcový konformační polymorfismus (SSCP)	jednoduchá metoda	doporučuje se pro krátké sekvence DNA neodhaluje pozici změny
Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	vysoká citlivost	primery s „GC- clampy“ neodhaluje pozici změny
Heteroduplexní analýza (HD)	velmi snadná	doporučuje se pro krátké sekvence DNA limitovaná citlivost neodhaluje pozici změny
Detekce zkráceného proteinu (PTT)	vysoká citlivost pro terminační mutace odhaluje pozici změny	pouze pro terminační mutace drahá a složitá metoda
Sekvenování	detekce veškerých změn v DNA sekvenci plně charakterizuje mutace	nadbytek informací pracná a drahá metoda
Chemické a enzymatické štěpení DNA	vysoká citlivost odhaluje pozici změny	práce s toxickými chemikáliemi experimentálně obtížné

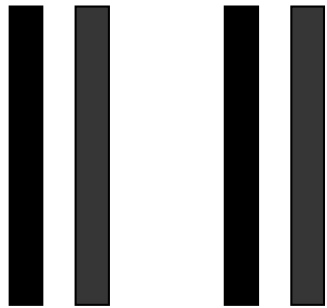
Princip metody DGGE



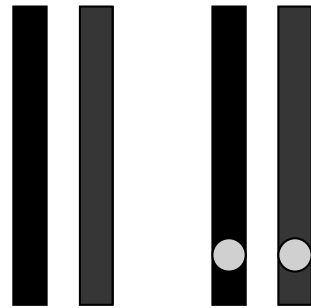
SSCP na gelu

(Single-strand conformation polymorphism)

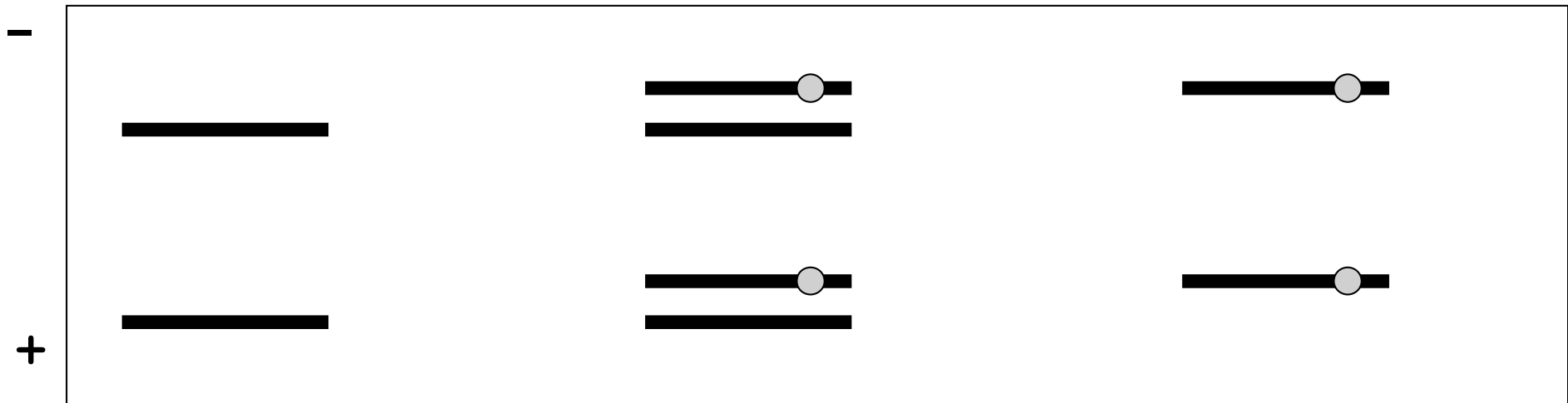
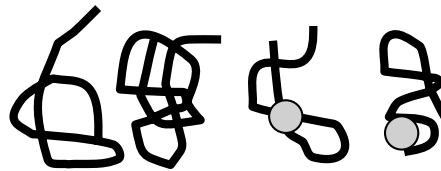
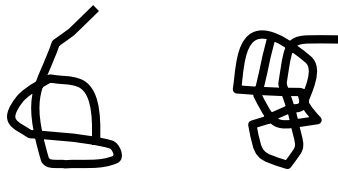
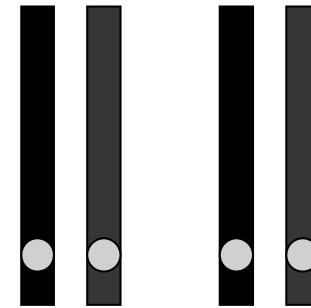
non mt/non mt



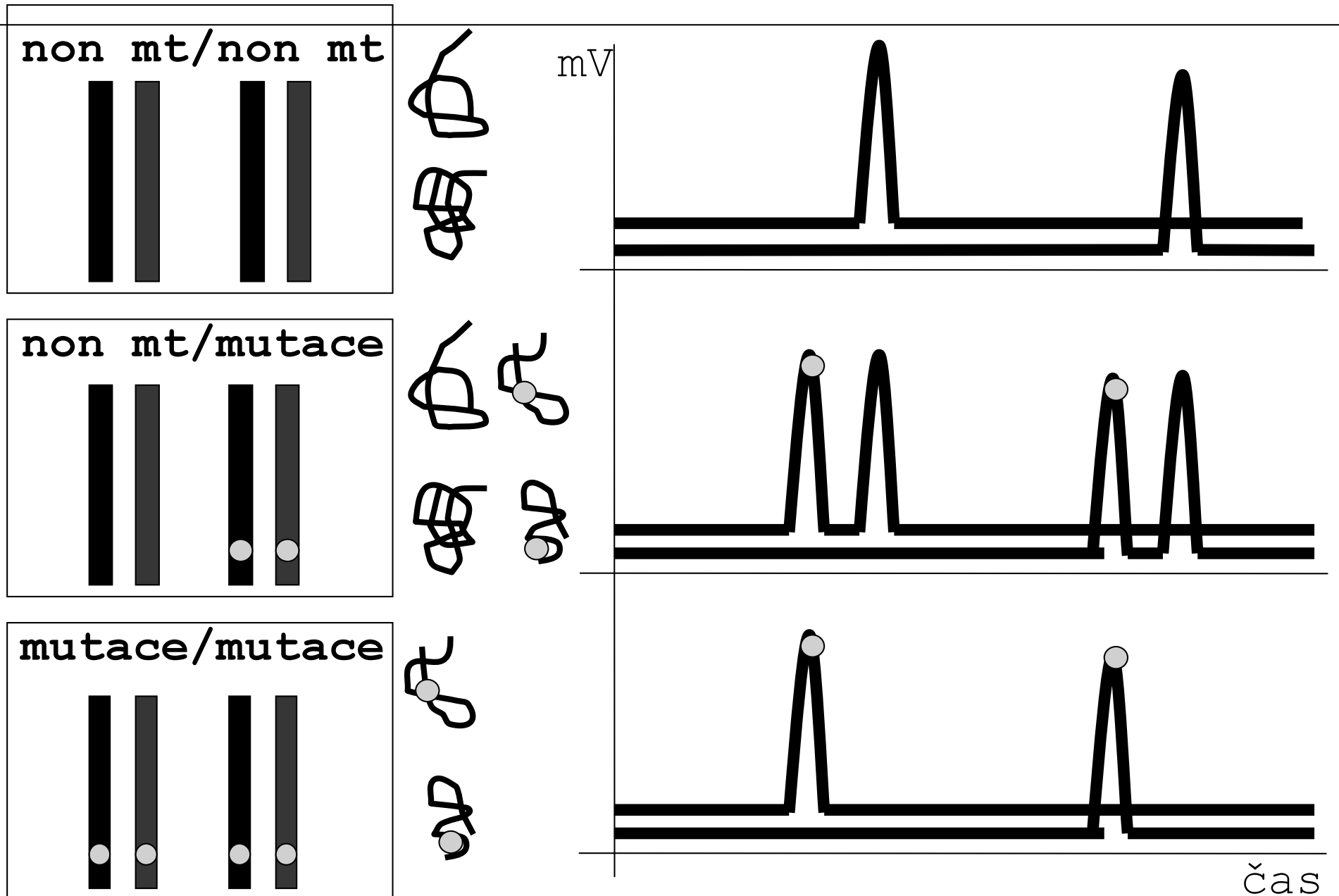
non mt/mutace



mutace/mutace



SSCP v kapiláře

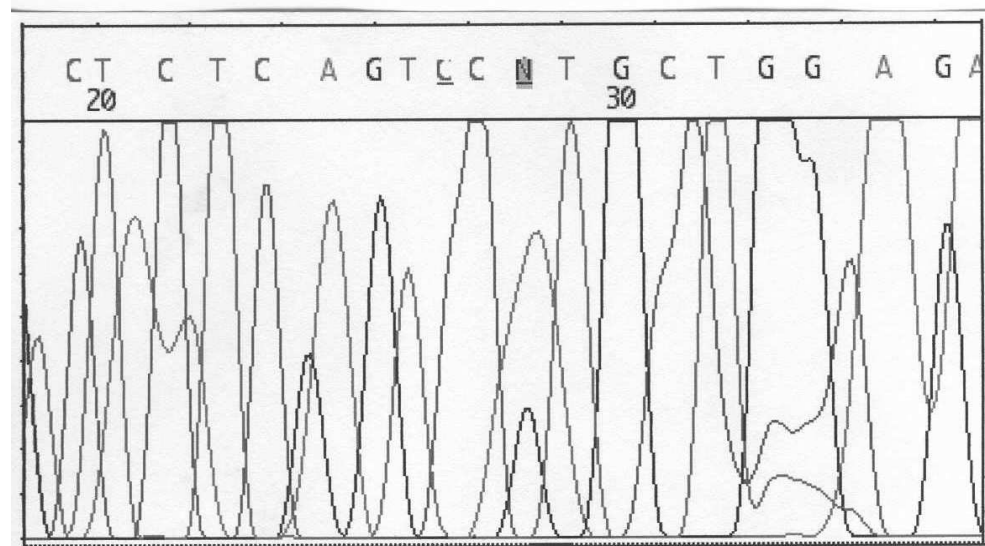
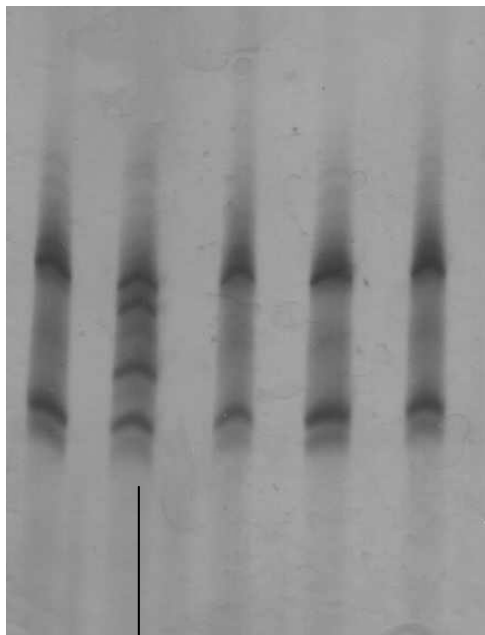


SSCP na gelu

SSCP

Sekvenace

Wt 1 2 3 4



G > A

dráha: 1.-4. DNA pacientů
5. wt

Cystická fibrosa /mukoviscidosa/

- -autosomálně recesivní onemocnění
- -frekvence 1:3000 živě narozených dětí
- -výskyt nositelů mutace v genu CF je 1:25

Základní fyziologický defekt

při onemocnění CF

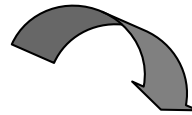
- Porucha absorpce iontů chloru, sodíku a vody buněčnou membránou
- Zasahuje různé orgány - plíce
 - - pankreas
 - - trávicí trakt
 - - reprodukční orgány

Basic defect in CF



Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein - CFTR is defective, reduced or absent in CF patient

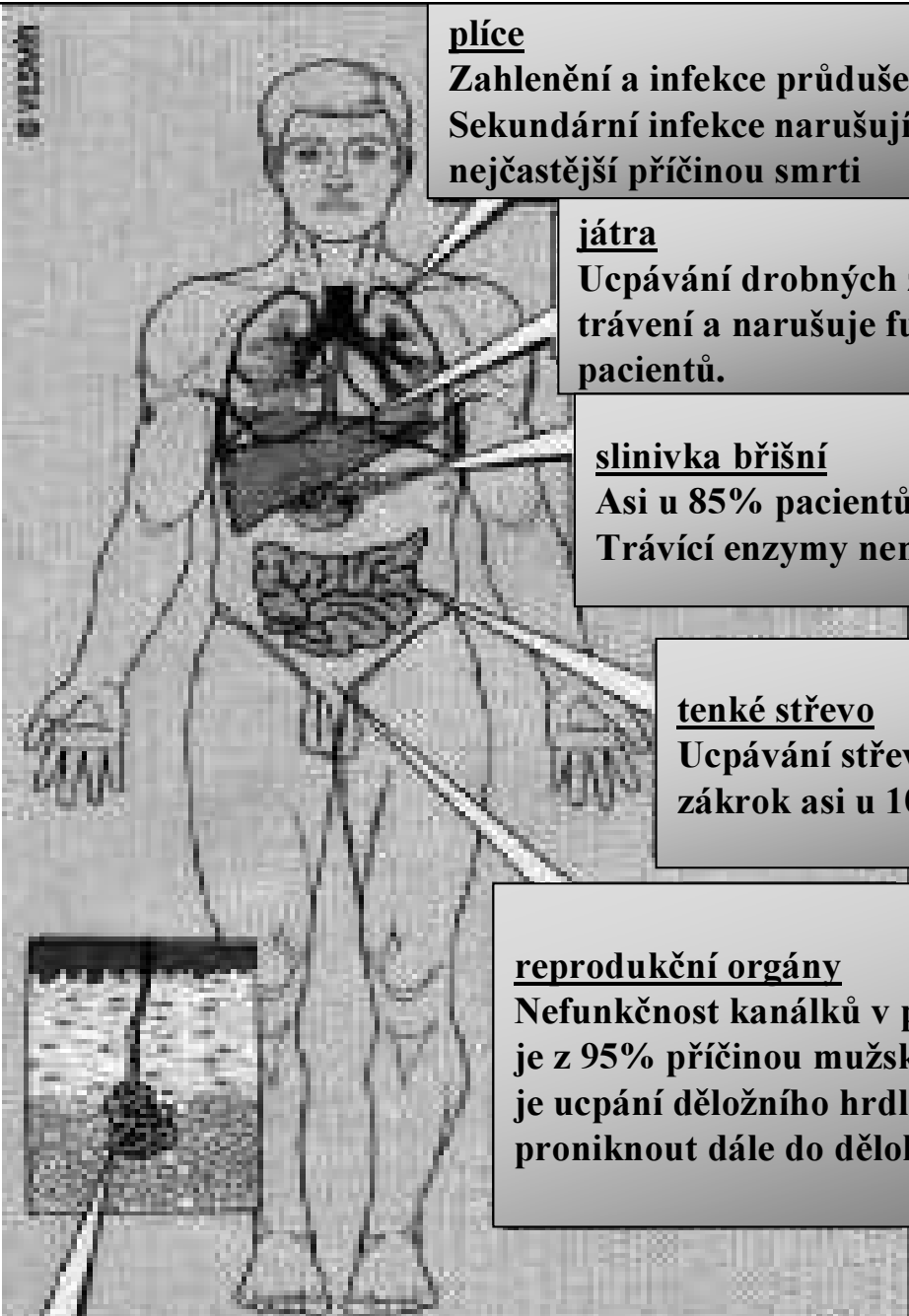
There is evidence of defective chloride ion transport across the apical membranes of certain specialized epithelial cells



resulting in production by some exocrine glands of a thickened, sticky mucus



which causes the major symptoms of the disease



plíce

Zahlenění a infekce průdušek znesnadňuje dýchání. Sekundární infekce narušující plíce jsou u lidí s CF nejčastější příčinou smrti

játra

Ucpávání drobných žlučovodů znesnadňuje trávení a narušuje funkci jater asi u 5% pacientů.

slinivka břišní

Asi u 85% pacientů dochází k uzavření jejích kanálků. Trávicí enzymy nemohou být dopraveny do střev.

tenké střevo

Ucpávání střeva hustou stolicí si vynucuje chirurgický zákrok asi u 10% novorozenců.

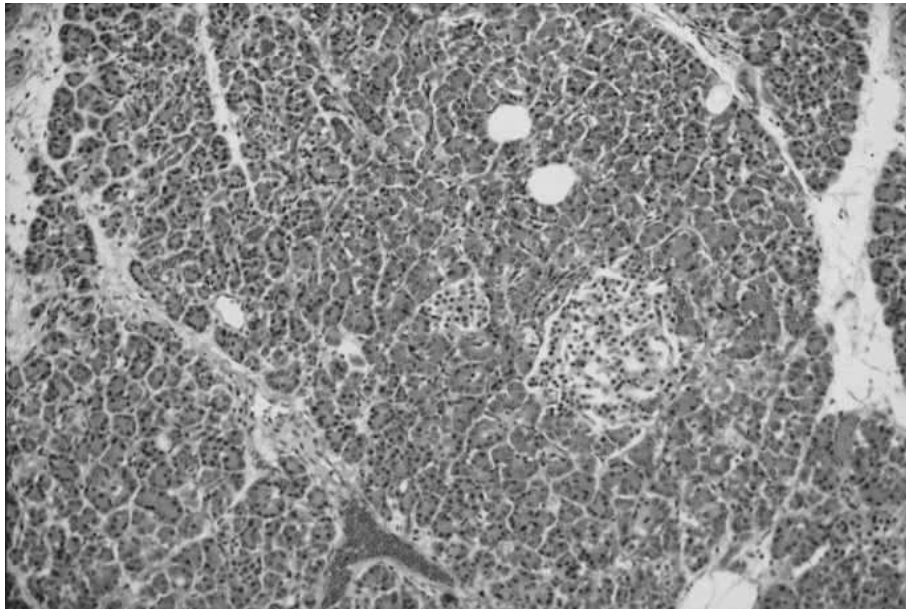
reprodukční orgány

Nefunkčnost kanálků v pohlavním ústrojí (např. vas deferenc) je z 95% příčinou mužské sterility. Příčinou neplodnosti u žen je ucpání děložního hrdla hleny, které znemožní spermii proniknout dále do dělohy.

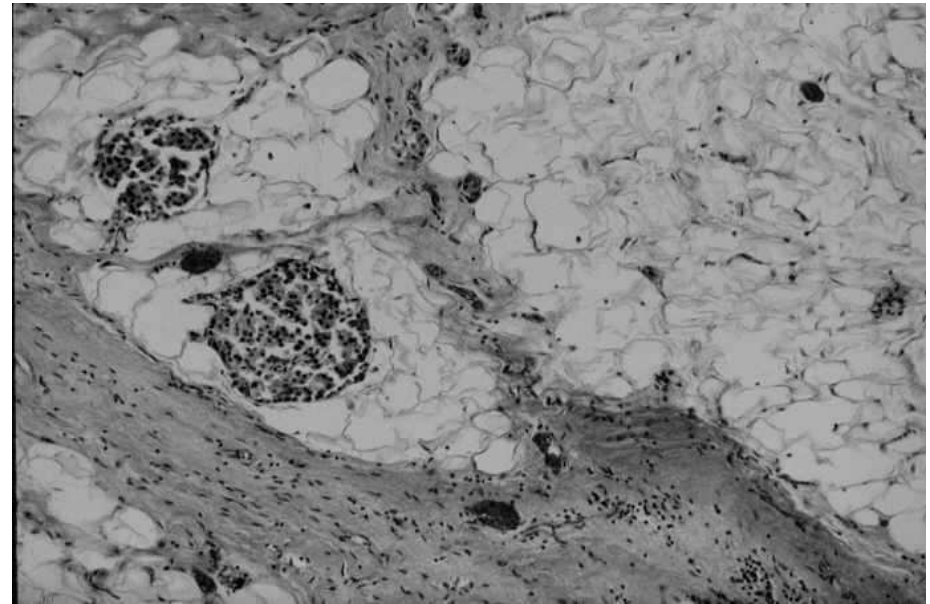
potní žlázy

Porušená funkce se projevuje nadměrným vylučováním solí (NaCl).

Pankreas

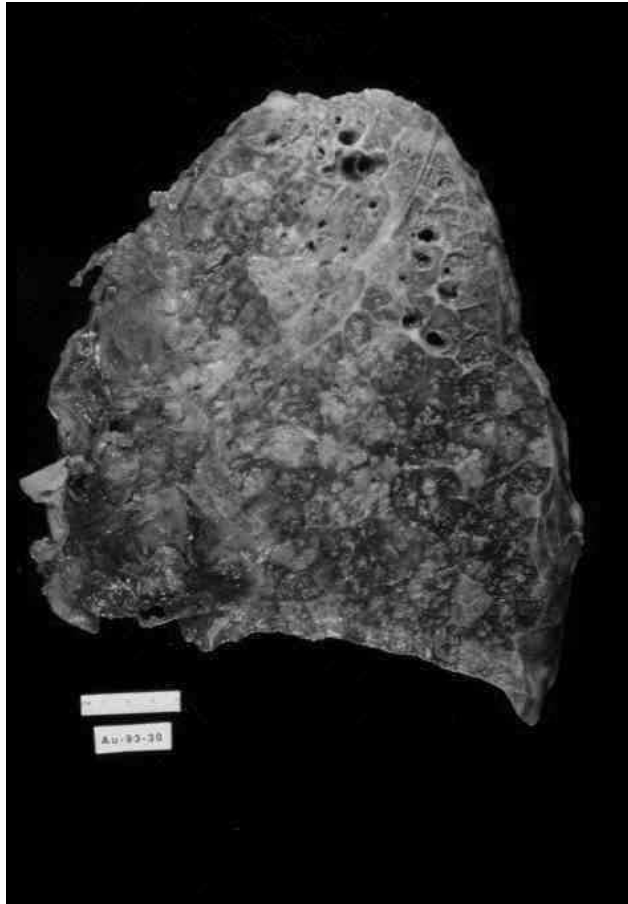


zdravý



CF

Plíce



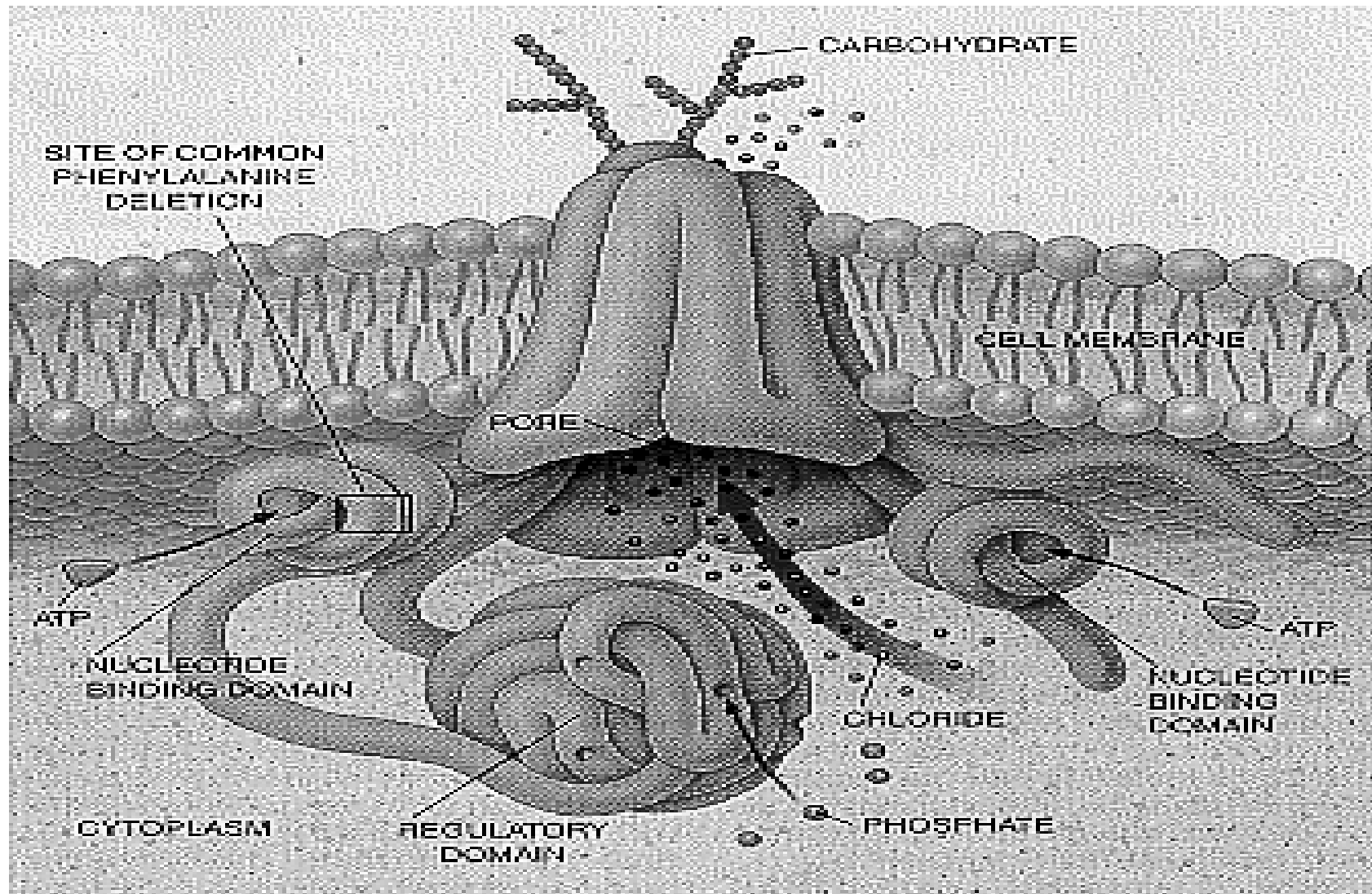
zdravá



CF

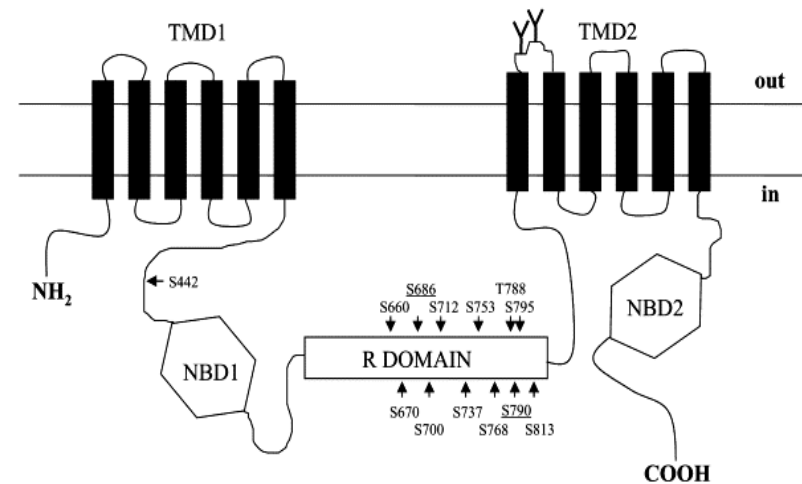
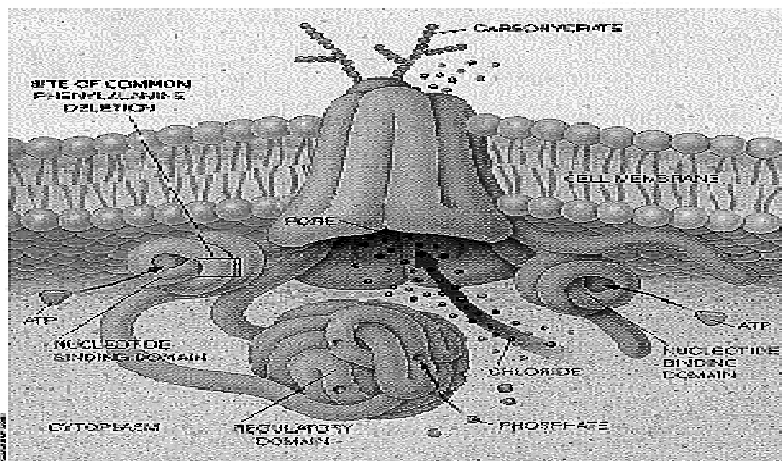
CFTR protein

(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)

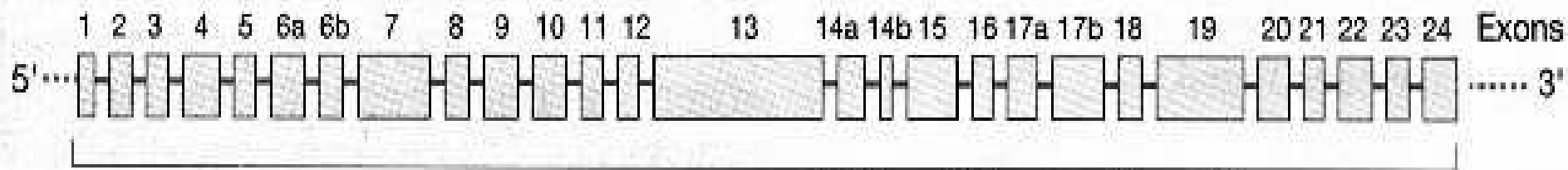


Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein CFTR protein

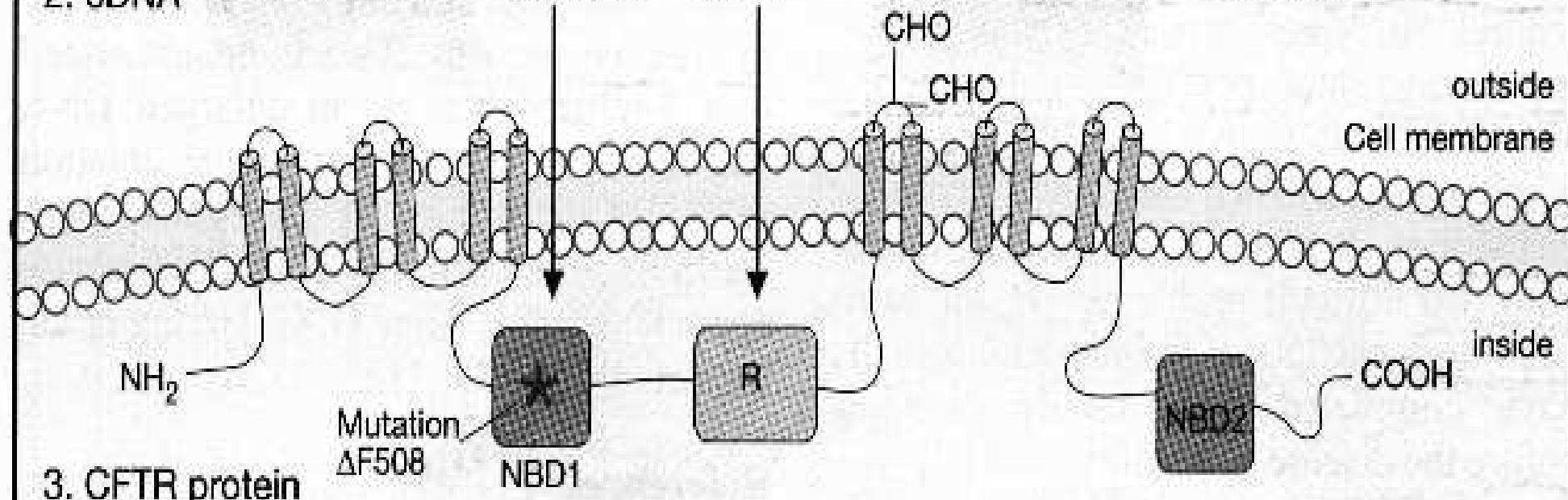
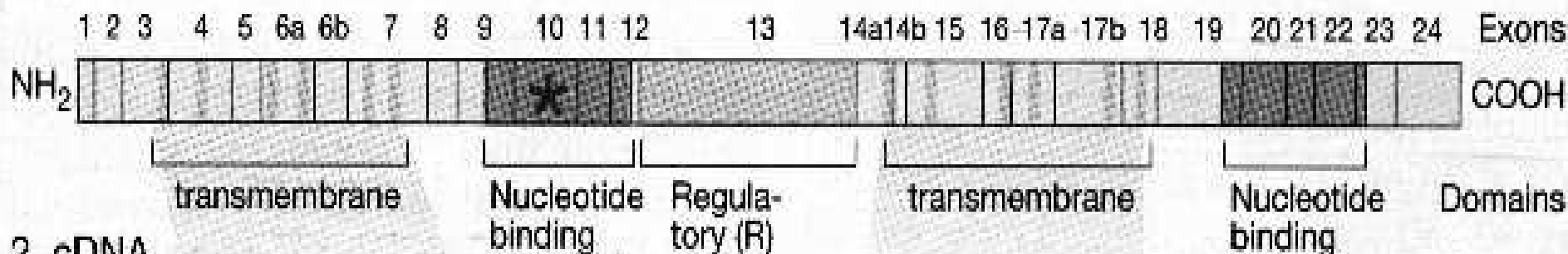
- cyclic adenosine monophosphate – regulated chloride channel
- localised in the apical membrane of epithelial cells



- made up of five major domain:
 2 membrane spanning domains
 2 nucleotide binding domains
 1 regulatory domain



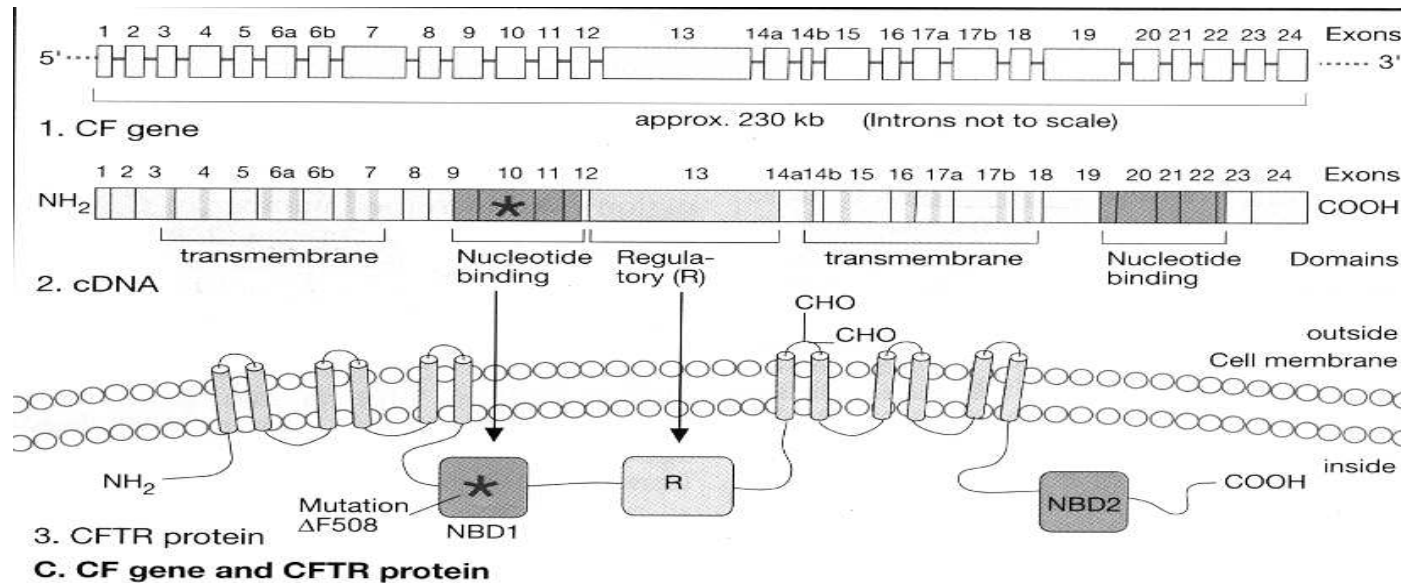
1. CF gene approx. 230 kb (Introns not to scale)



C. CF gene and CFTR protein

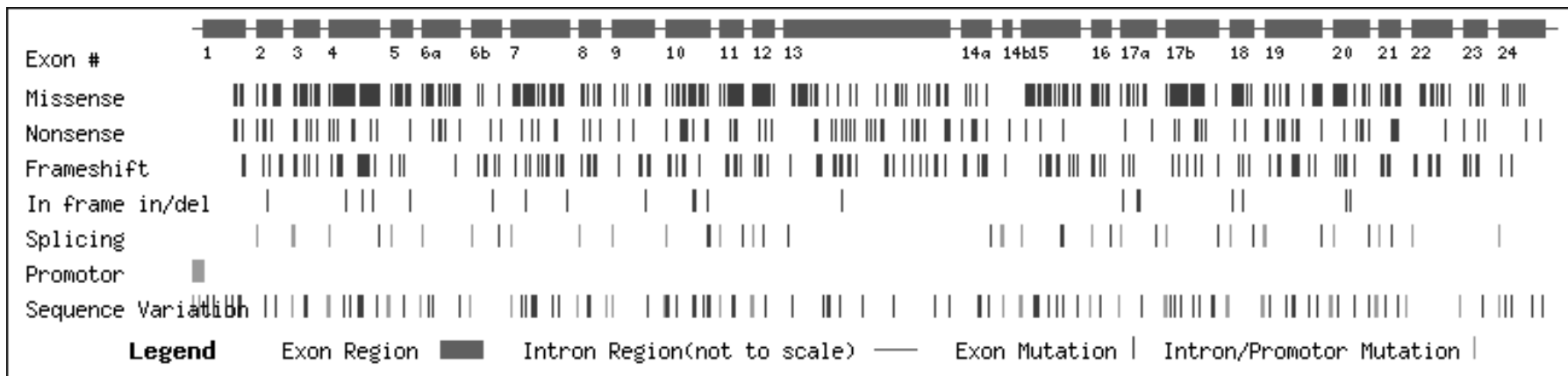
CFTR gene

- encoded CFTR protein
- localised on the long arm of chromosome 7 (7q31)
- 250 kb length
- comprised of 27 exons
- cDNA sequence of 6129 bp codes 1480 amino acids of CFTR protein



CFTR Mutations

- to date, more than 1500 CFTR mutations have been found
(CFTR Mutation Table; <http://www.genet.sickkids.on.ca./cftr-cgi-bin/FullTable>)
- many of these are rare, „private“ or their relationship to disease has yet to be established
- fewer than 20 mutations account for majority of cases of CF
- the wide range of mutation frequency is observed in different populations
- the most common mutation $\Delta F508$ is found in approximately 70% of CF patients



Mutace v genu CFTR u českých CF pacientů (k 1.7.1999)

- dF508 71,57%
- dele2,3(21kb) 4,64%
- G551D 4,03%
- N1303K 3,02 %
- G542X 2,22%
- 1898+1GtoA 2,02%
- 2143delT 1,21%
- R347P 0,81%
- W1282X 0,60%

- 4374+1GtoA, 1717-1GtoA, R1162X, E92X, 2184insA, 3849+10kb
každá 0,4%
- R334W, R553X, 621+1GtoT,
každá 0,2%

Cílená mutační analýza CF genu je prováděna:

- **A, pro potvrzení diagnózy**

1. u pacientů s dg. CF
2. u členů rodin s výskytem CF
3. prenatálně u plodů v riziku s pozitivní CF rodinnou anamnézou
4. prenatálně u plodů s patologickým ultrazvukovým nálezem (abnormalita střevních kliček)
5. u novorozenců s mekoniovým ileem
6. u mužů s poruchami reprodukce

- **B, prevence**

1. u příbuzenských párů
2. u manželských párů zařazených do IVF programu
3. u dárců gamet a embryí
4. u partnerů (partnerek) heterozygotů

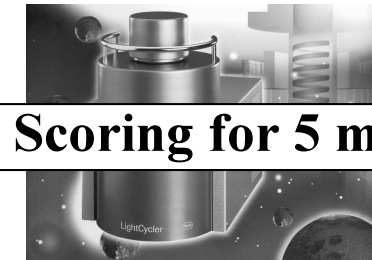
Přehled mutací CFTR genu vyšetřovaných na OLG, FN Brno

- **Základní vyšetření:**
- dF508, dele 2,3(21kb), G542X, G551D, R553X
- **Rozšířené vyšetření:**
- N1303K, 1717-GtoA, W1282X, S1251N, R560T, 3905insT, Q552X, dI507, 394delTT, G85E, 621+1GtoT, R117H, 1078delT, R347P, R334W, E60X, 711+5GtoA, 2789+5GtoA, R1162X, 3659delC, 3849+10kbCtoT, 2143delT, A455E, 2183AAtoG, 2184delA
- Celkově vyšetřováno 30 mutací v genu CFTR
- 95% všech mutací detekovaných u CF pacientů v ČR

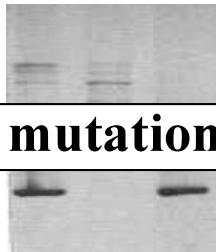
Our „cascade“ strategy

of the routine molecular diagnosis cystic fibrosis

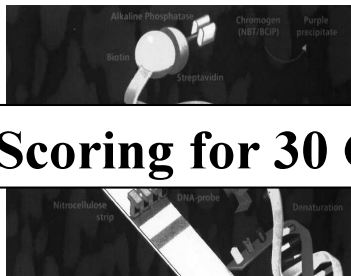
suspicious CF patient or carrier



Scoring for 5 major CFTR mutations



one or both CF aleles not identified



Scoring for 30 CFTR mutations

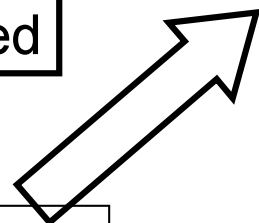
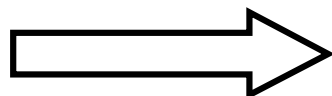
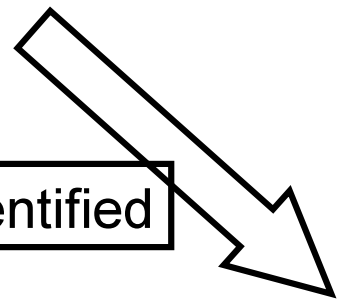
one or both CF aleles not identified



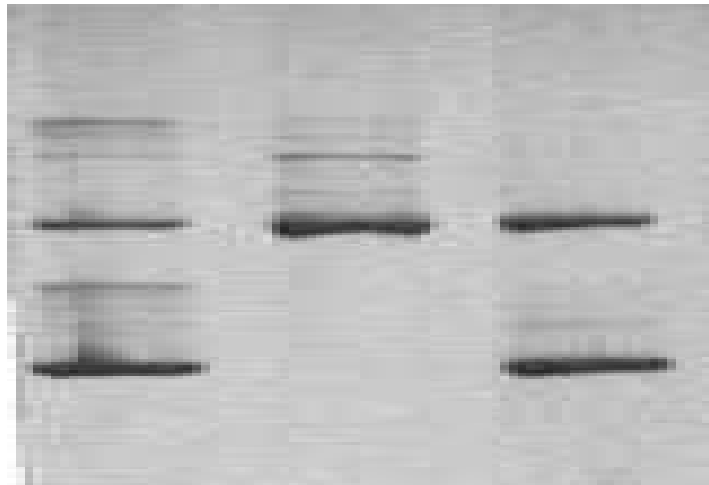
Scanning of the whole CFTR-coding sequence

both CF aleles identified

CF diagnosis determined

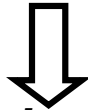


**Detekce 5ti nejčastějších CF mutací
klasickými
molekulárně genetickými
metodami**



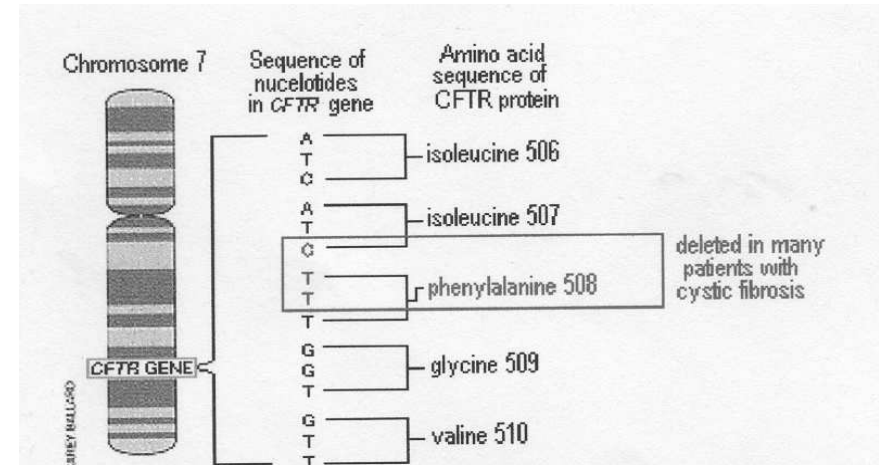
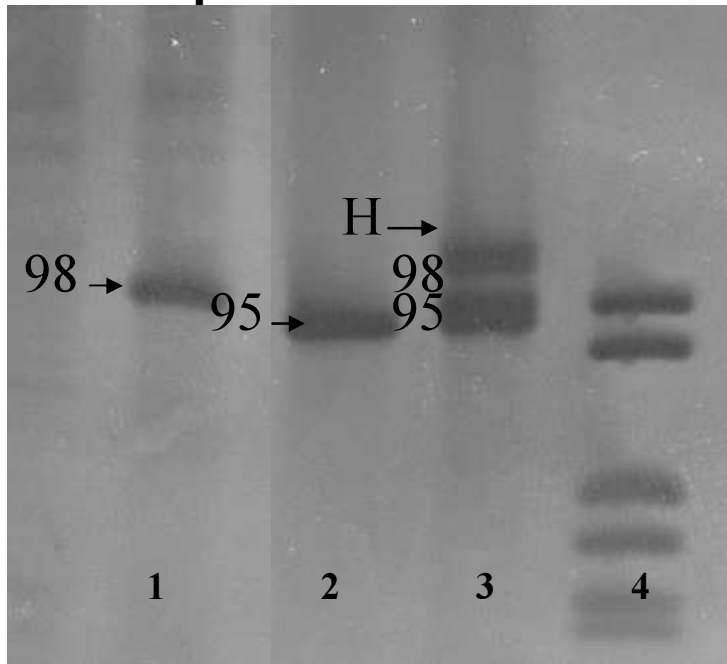
Detekce mutace dF508

delece tří nukleotidů CTT v CF exonu 10



*Ztráta jedné aminokyseliny – fenylalaninu
v pozici 508 v CFTR proteinu*

**Polyacrylamidová
gelová elektroforéza
PCR produktů exonu 10**



Bandy značené 95,98

jsou 95- a 98-párů bází dlouhé PCR produkty

Band značené H jsou heteroduplexy

*formované chybně spárovanými jednořetězci DNA
(95/98 a 98/95)*

ELFO - 5% PAGE, 200 V, 20°C, 2hod

1. non dF508 / non dF508

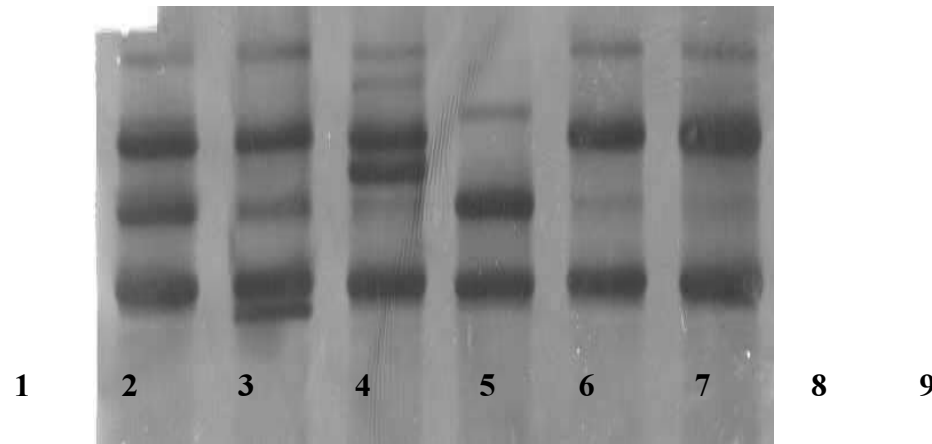
2. dF508 / dF508

3. dF508 / non dF508

4. marker pBR322/Alu1

Detekce CF mutací G542X, G551D, R553X

SSCP analýza PCR produktů exonu 11



ELFO - 8% PAGE (40:1), 150V, 20°C, 16 hodin

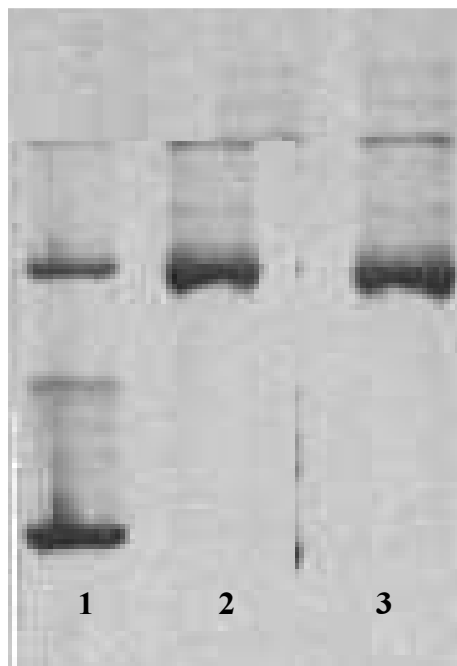
1. G542X / non mt exon 11
2. R553X / non mt exon 11
3. G551D/ non mt exon 11
4. G542X/G542X
- 5.-9. wt

Mutace CFTR Dele 2,3 (21 kb)

- Druhá nejčastější mutace v CFTR genu v naší populaci, řadí se do základní mutační analýzy pěti nejčastějších mutací CFTR genu.
- Delece v úseku tohoto genu od intronu 1 až po intron 3 v délce 21 080 pb
- Zahrnuje okolo 25% in.1, ex.2, in.2, ex.3, a okolo 45% in.3.
- Analýza transkriptu ukazuje nepřítomnost ex.2 a 3 v epiteliální CFTR mRNA.- výsledek : předčasně ukončená translace v kodonu 106 v ex. 4.
- Dele 2,3, (21 kb) je frekventována u populace západo - a východoslovanského původu.

Detekce mutace CFTRdele2,3(21kb)

Polyacrylamidová gelová elektroforéza
duplex PCR produktu:



ELFO: 5% PAGE,
200 V, 20°C, 2hours

- 1. CFTRdele2,3(21kb) / non
- 2. wt
- 3. CFTRdele2,3(21kb) / non

1. Primery 2,3F a 2,3R -ohraničují deleční bod zlomu



amplifikace 207bp dlouhého produktu



přítomnost delece

2. Kontrolní primery 3i-5 a 3i-3



amplifikace 309bp dlouhého produktu obsahujícího exon 3



nepřítomnost delece

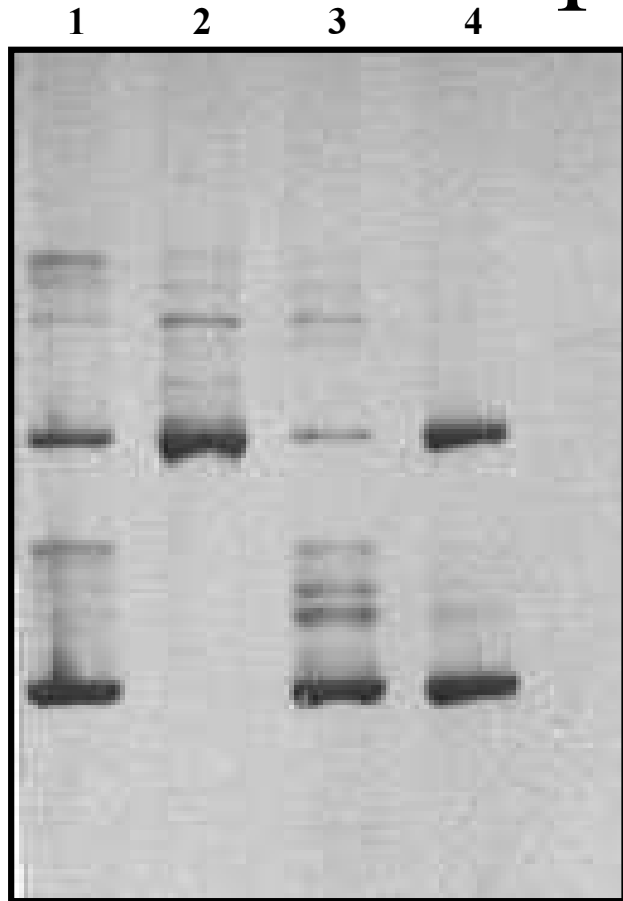
*Duplex PCR zajišťuje interní amplifikační kontrolu
a umožňuje rozlišit mezi homozygtem a heterozygotem
pro deleci*

Artefakt při analýze

- kontrolní produkt 3i5 a 3i3 (309 pb)
projevuje nižší intenzitu než 207pb dlouhý spojov.
fragment - falešně pozitivní výsledek
- heterozygot se jeví jako homozygot
- chybu způsobuje i nízká mol.hmotnost DNA a její
snížená kvalita



Ověření pozitivního výsledku



1.- 3. DNA pacientů
4. dele / non dele - kontrola

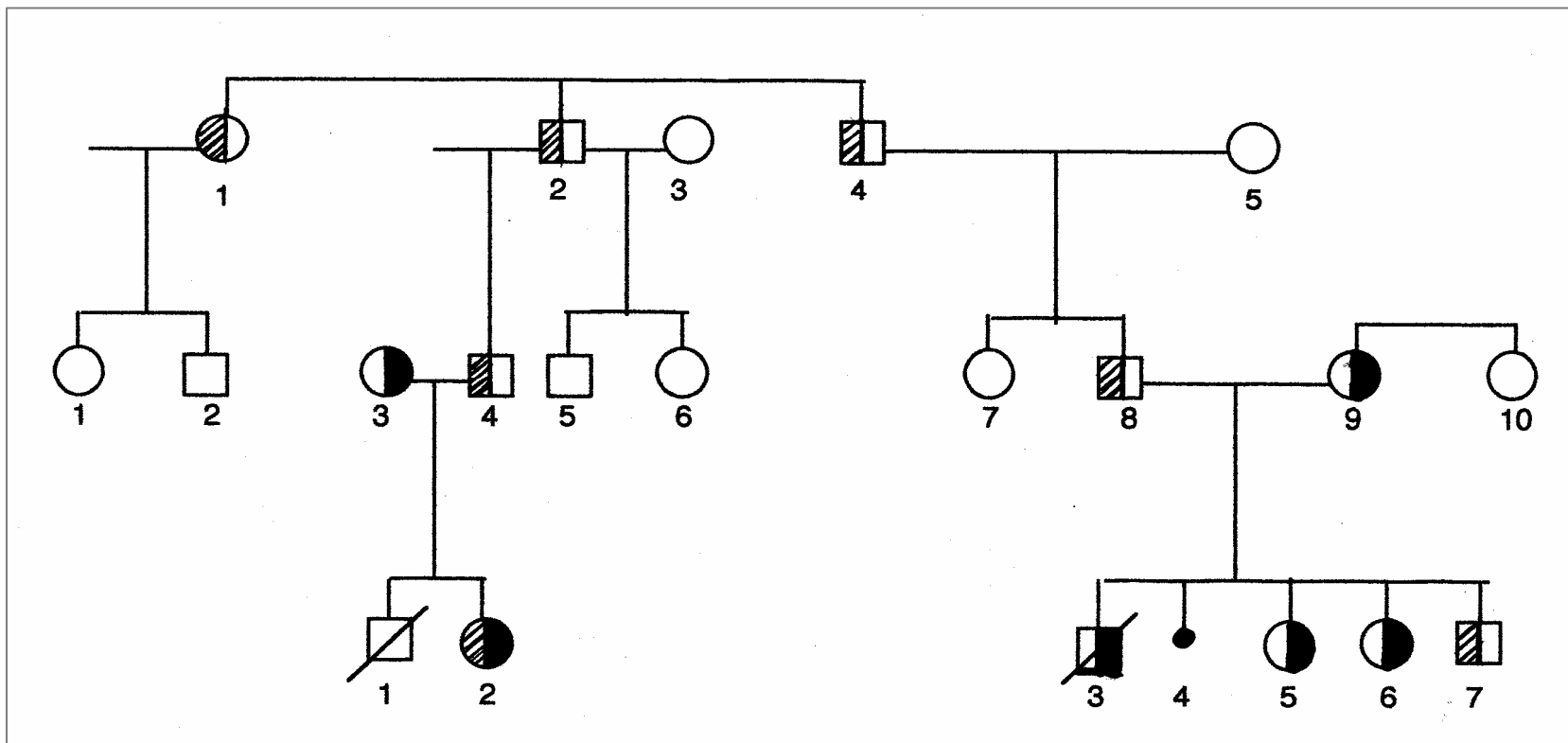
Výsledek :

1. dele / non dele -heterozygot
2. non dele/ non dele - zdravý
3. dele/non dele - kontrolní PCR produkt
slab. intenzity

ELFO: 5% PAGE,
200V, 25°C,
90 min

Rodokmen rodiny P.

I.



II.

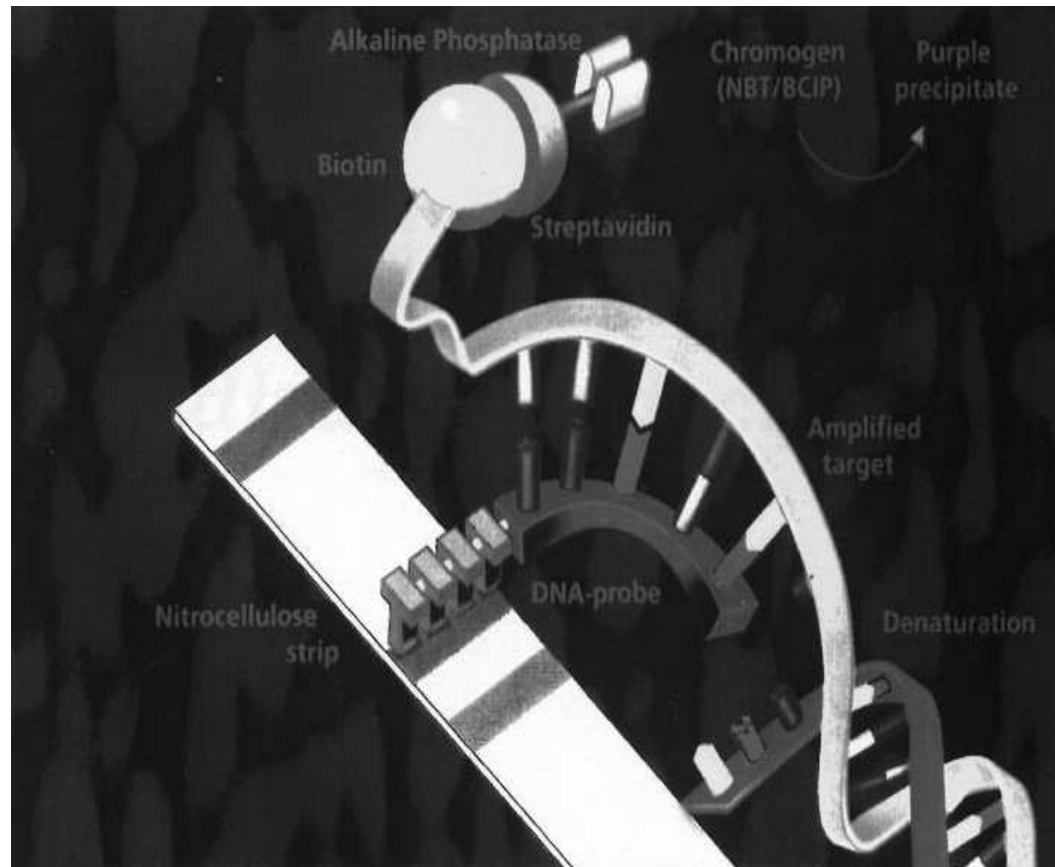
III.

$\Delta F508 / non\Delta F508$

dele / non dele

Spektrum analyzovaných CF mutací je rozšířeno použitím

INNO-LiPA CFTR 12 INNO-LiPA CFTR 17 + Tn

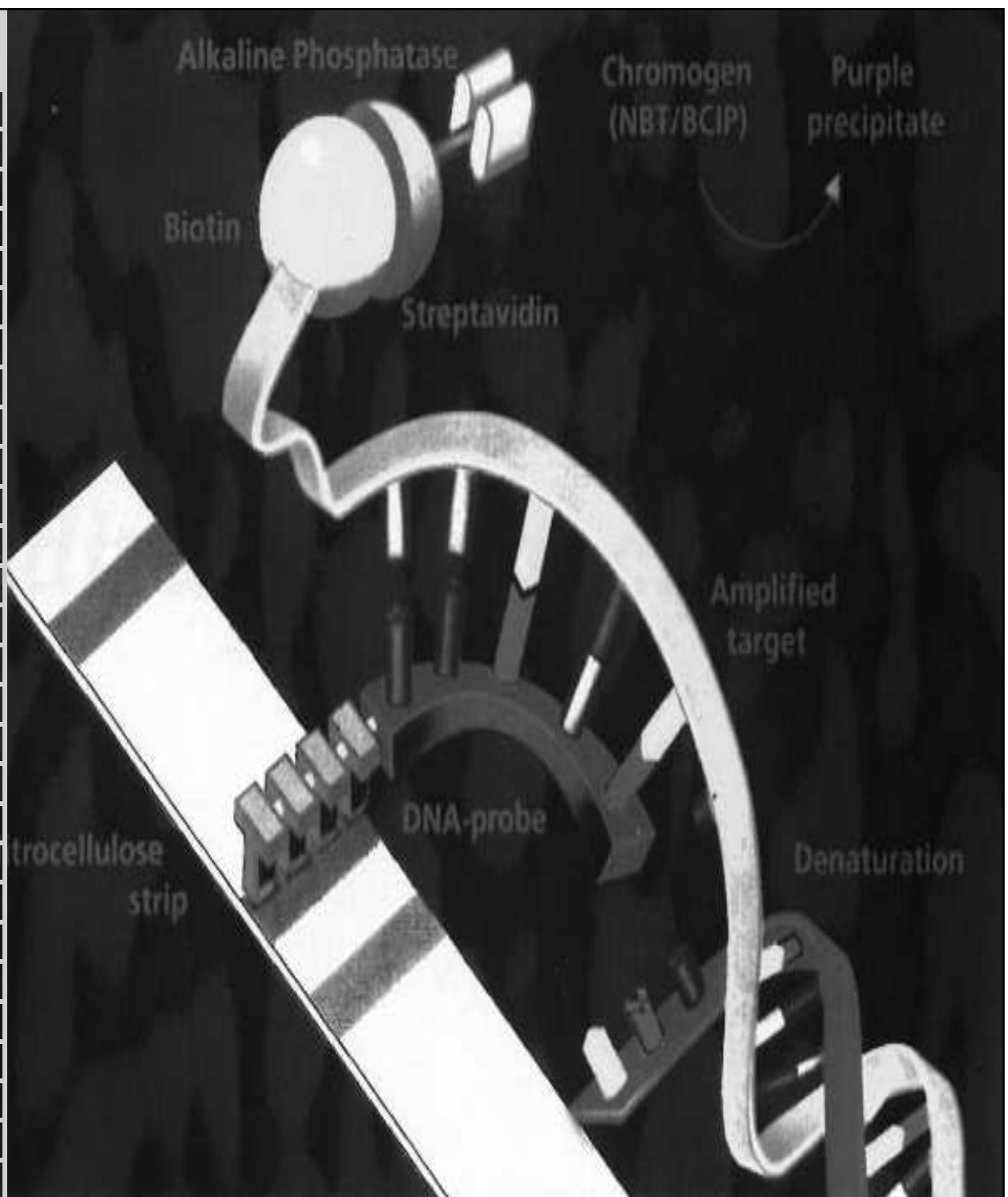


12 a 17 CF mutací
a jejich wild-type sekvence

Identifikuje

polymorphism Tn (intron 8)
asociovaný s CBVAD

Mutace	INNO-LiPA	INNO-LiPA
	CFRT12	CFTR17+Tn
Delta F508	X	
G542X	X	
N1303K	X	
1717-1G>A	X	
W 1282X	X	
G551D	X	
R553X	X	
Delta 1507	X	
R560T	X	
390 insT	X	
Q552X	X	
S1251N	X	
394delTT		X
G85E		X
621+1G>T		X
R117H		X
1078delT		X
R347P		X
R334W		X
E60X		X
711+5G>A		X
R1162X		X
3659delC		X
3849+10kbC>T		X
2143delT		X
A455E		X
2183AA>G		X
2184delA		X

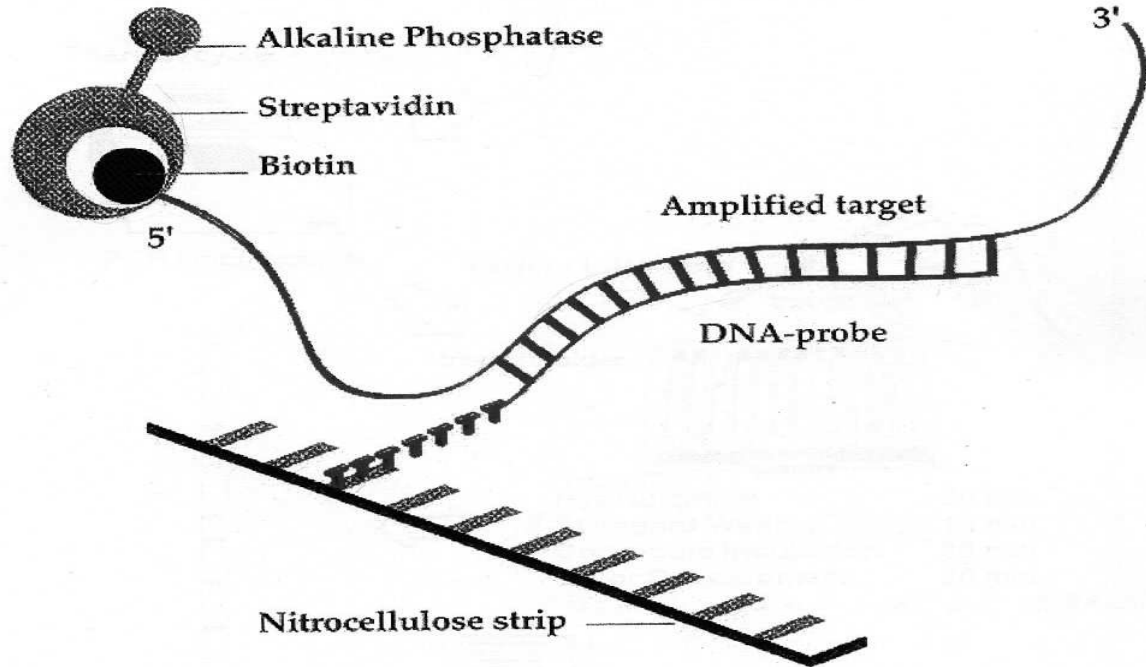


INNO-LiPA

Reverse hybridization principle

Chromogen
(NBT/BCIP)

Purple
precipitate



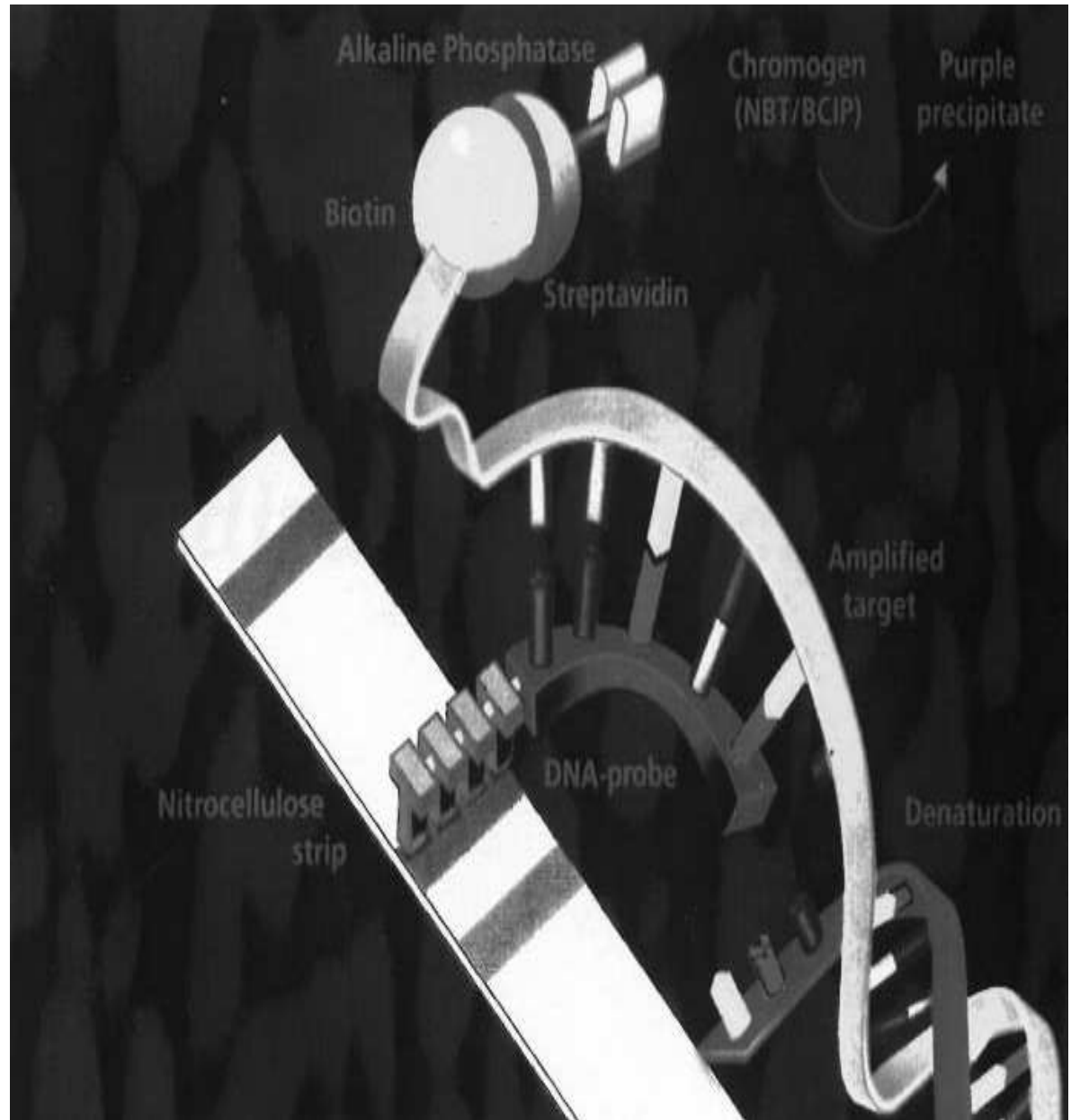
Nitrocellulose
str

Jeden vzorek

Jedna amplifikace

Jeden strip

**Výsledek
multihybridizace do
3 hodin po amplifikaci**

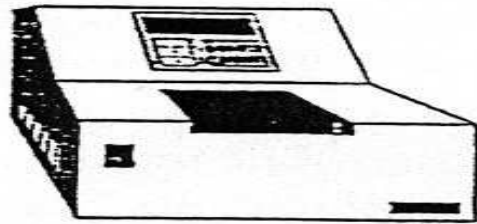


dTTP, dATP, dGTP, dCTP
Biotinylated primers

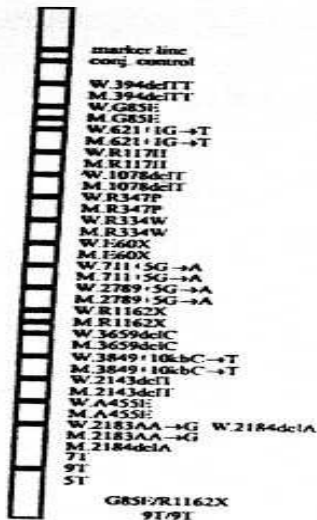
DNA Target

Taq-polymerase

Thermal cycler

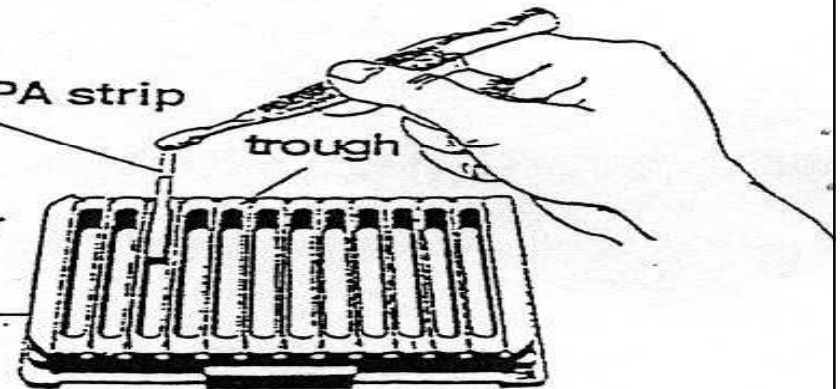
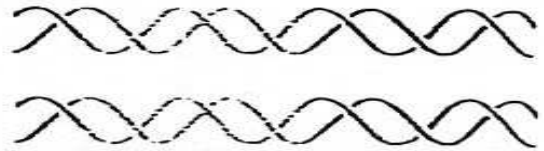


PCR amplification

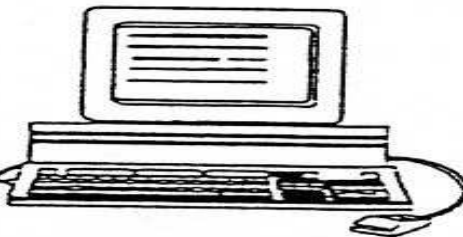


INNO - LiPA strip

troughholder



Hybridization	30 min
Stringent Wash	10 min
Conjugate Incubation	30 min
Color Development	30 min



Interpretation



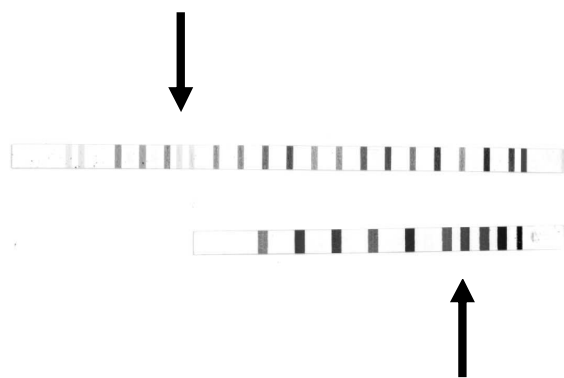
INNOGENETICS
BIOTECHNOLOGY FOR HEALTH CARE

Pacientka Z.V., 15 let

důvod vyšetření: rok trvající kašel

- CT prokázalo četné bronchiektasie v obou horních plicních lalocích
- hyperplazie maxilárních, nosních a sphenoidálních dutin
- pankreas, játra bez odchylek
- vyšetření chloridů v potu opakovaně se zvýšenými hodnotami (82 - 88 mmol/ml)
- zvažována dg.CF

154 / 00



Výsledek mutační analýzy CFTR genu

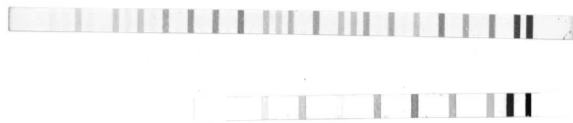
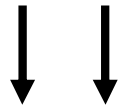
genotyp : dF508 / 3849+10kb

Dg.CF potvrzena

Pacientka Z. M., 6 let

důvod vyšetření: časté infekty, trvalý kašel

- Zánětlivá ložiska v plicích
- Opakovaně řídké stolice
- Pankreas a játra beze změn
- Potní testy hraniční



140/01

Výsledek mutační analýzy genu CFTR

genotyp: R347P / 711+5 GtoA

dg. CF potvrzena

*Uvedenými postupy však nejsme schopni detekovat
rarity a neznámé CF mutace,
k jejichž odhalení musí být využívány rozličné vyhledávací metody*

Analýza celé CFTR kódující sekvence a přilehlých oblastí Denaturační gradientová gelová elektroforéza multiplex systémy



- rychlá analýza 23 CFTR exonů
doplněná simplex DGGE analýzou zbylých exonů
- Sekvence úseků se zachycenou sekvenční změnou

DGGE multiplex systems

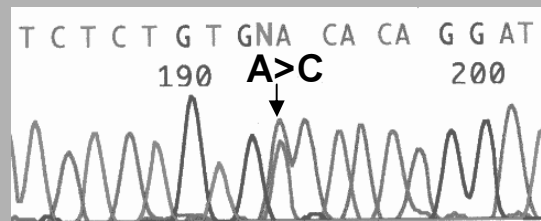
Multiplex	Exon	Length of fragments (bp)	Run time (h)	Denatur. gradient (%)	Annealing temperature (°C)
A	11	224	3	10-60	50
	14b	168			
	17b	266			
B	14a	276	5	10-60	55
	15	390			
	20	302			
C	3	323	3	10-60	50
	12	296			
	23	242			
D	6a	345	5	10-60	55
	9	375			
	21	272			
E	5	235	3	10-60	45
	8	302			
	18	277			
F	2	240	3,5	10-60	50
	6b	301			
	13 (2)	454			
G	4	369	5	10-60	55
	19	407			
	22	340			
H	10	336	3,5	10-60	55
	16	323			

DGGE simplex systems

Exon	Length of fragments (bp)	Run time (h)	Denatur. gradient (%)	Annealing temperature (°C)
1	451	7	40-80	55
7	365	6	10-60	50
13 (1)	516	2	25-75	55
17a	283	4	10-60	50
24	362	4	30-80	60

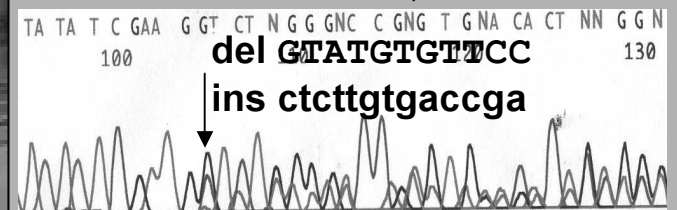
Proband	DGGE analysis				
	Mutations (direct analysis)	Determined mutations		Determined SNP	
		Localization	Mutation	Localization	SNP
1	[?]+[?]	In 12	1898+1G>A	Ex14a	T854T
2	[ΔF508]+[?]	Ex14a	2668del11>ins13	Ex14a	T854T
3	[ΔF508]+[?]	In 23	1371-1G>T	-	-
4	[?]+[?]	In 12	1898+1G>A	-	-
5	[ΔF508]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
6	[ΔF508]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
7	[ΔF508]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
8	[ΔF508]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
9	[ΔF508]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
10	[ΔF508]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
11	[?]+[?]	-	-	Ex20	P1290P
12	[ΔF508]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
13	[ΔF508]+[?]	Ex 15	1952I	Ex14a	T854T
14	[ΔF508]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
15	3849-10kbC>T +[?]	Ex 7	1336K	Ex14a	T854T
16	[?]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
18	[?]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
19	[?]+[?]	Ex 23	3140I	Ex14a	T854T

4334 AtoC, E1401A, AAC>CAC



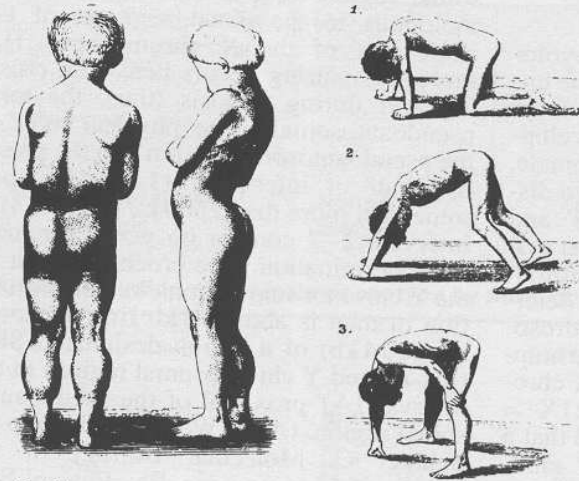
novel mutations

2668del11>ins13, frameshift



Duchennova muskulární dystrofie

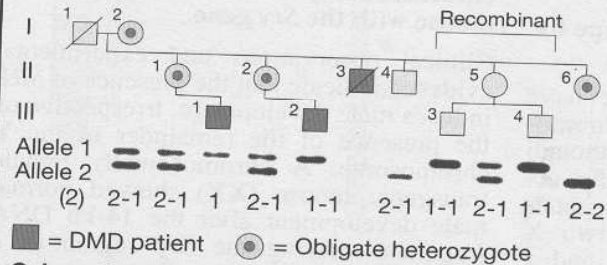
- těžká X-recesivní monogenně dědičná choroba
- primární příčina: mutace v dystrofinovém genu (Xp21)
- incidence choroby 1:3500 novorozených chlapců
- destrukce svalových vláken
- fenotyp:
 - 1) špatné držení těla, potíže při zvedání se ze země
 - 2) narůstající svalová slabost
 - 3) pseudohypertrofie lýtek
 - 4) lordóza
- většina pacientů má abnormální EKG
- zvýšenou hladinu kreatinkinázy
- někteří trpí gastroparézou
- 1/3 vykazuje mírnou mentální retardaci



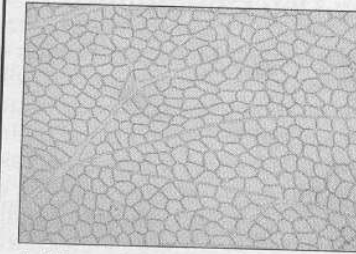
1. Calf hypertrophy and lordosis

2. Difficulty in rising (Gower's sign)

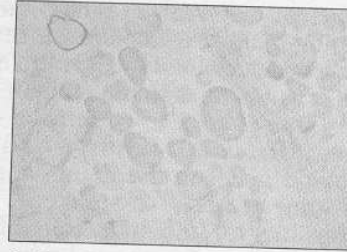
A. Clinical signs of Duchenne muscular dystrophy



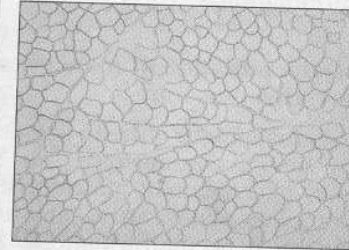
C. Investigation of a family with DMD by DNA marker



1. Normal dystrophin



2. Dystrophin absent



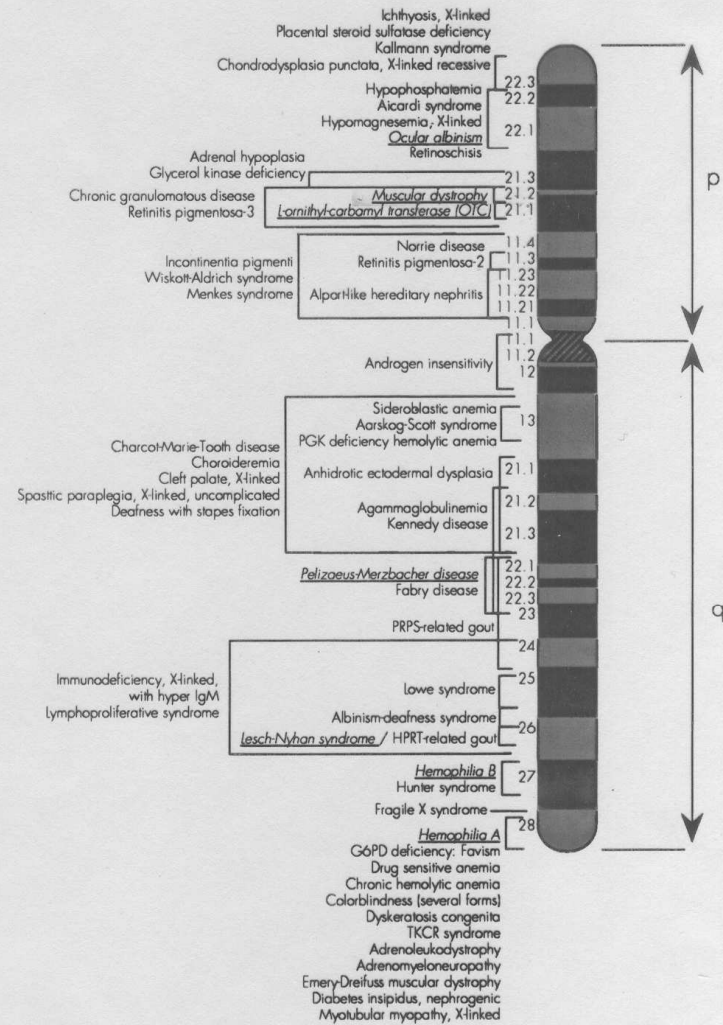
3. Areas lacking dystrophin in heterozygotes

B. Dystrophin analysis in muscle cells

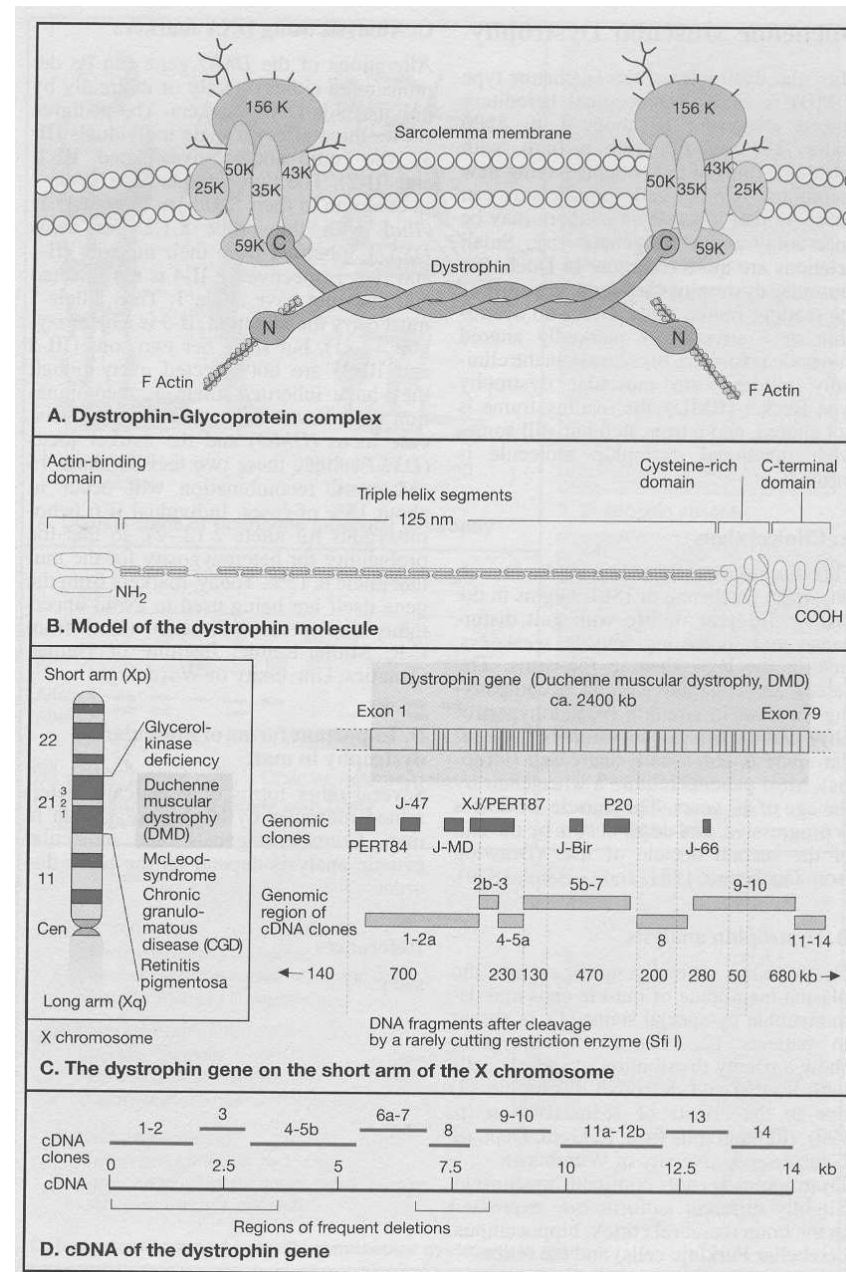
Disease	Chromosomal location	McKusick Nr.
X-chromosomal:		
Muscular dystrophy Duchenne	Xp21.2	310200
Muscular dystrophy Becker (allelic with DMD)	Xp21.2	310200
Muscular dystrophy Emery-Dreifuss	Xq28	310300
Autosomal dominant:		
Myotonic dystrophy	19q13	160900
Facioscapulo-humeral dystrophy	4q35-qter	158900
Oculo-pharyngeal muscular dystrophy	Unknown	164300
Autosomal recessive:		
Duchenne-like muscular dystrophy	13q12-13	253700
Congenital muscular dystrophy-type Fukuyama	9q31-33	253800
Limb-girdle muscular dystrophy	15q15-q22, other loci	253600

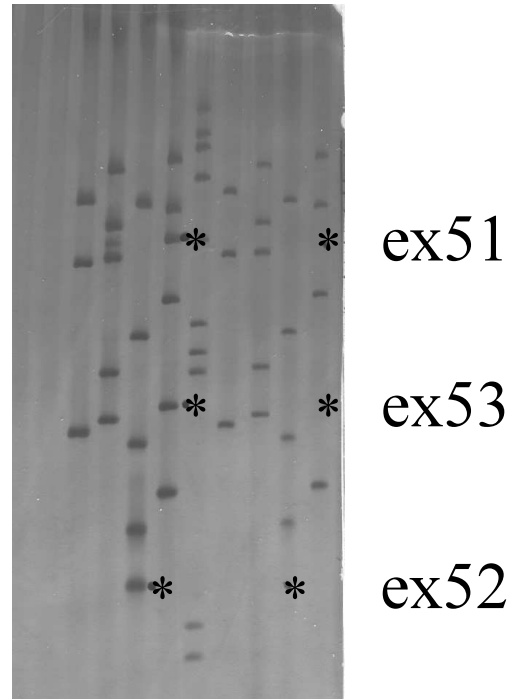
D. Important forms of hereditary muscular dystrophy in man

CHROMOSOME X LINKED DISEASES



- gen pro dystrofin: Xp21
- 2,4 MB (1% X chromozomu)
- 79 exonů
- nejčastější mutace:
 - delece 1a více exonů (65%)
 - posun čtecího rámce
 - 1/3 pacientů mutace *de novo*





Výsledek multiplex PCR (19 exonů) u kontrolní DNA(od zdravého jedince - A) a DNA probanda s dg DMD (B) s delecí exonů 51,52,53 v genu pro dystrofin.

Amplifikační produkty byly analyzovány v polyakrylamidovém gelu a následně barveny dusičnanem stříbrným.

Starty 1,6 - exony 4(196bp),8(360bp),19(459bp)

2,7 - exony Pm(535bp),3(410bp),6(202bp),13(238bp),43(357bp)

3,8 - exony 47(181bp),49(439bp),50(271bp),52(113bp),60(139bp)

4,9 - exony 42(155bp),44(426bp),45(307bp),

48(506bp),51(388bp),53(212bp)

5 - marker pBR322/AluI

Hemofile A

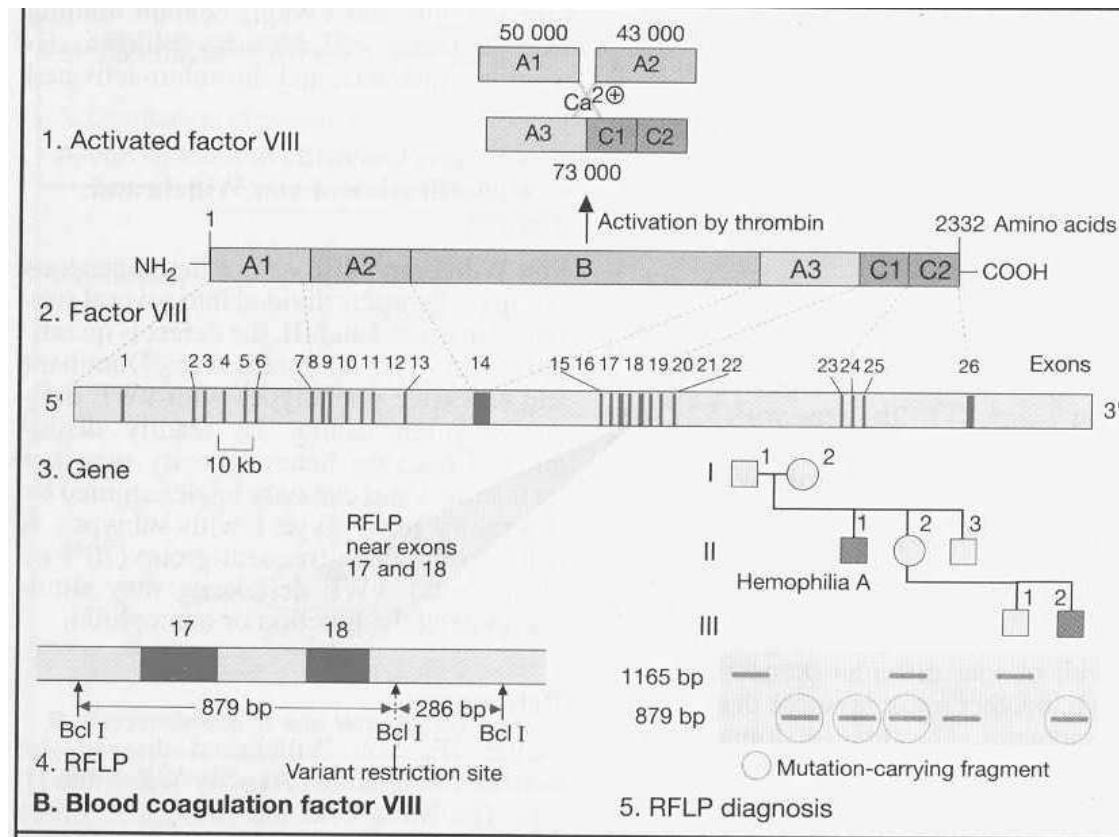
- incidence : 1/10.000 novorozených chlapců
- deficiencie koagulačního faktoru VIII
- X-vázaná choroba

Hemophilia A	Factor VIII activity		
	under 2%	2 - 10%	10 - 30%
Severity	Spontaneous bleeding into joints, muscle, internal organs	Bleeding after light trauma, sometimes spontaneously	Bleeding after trauma
Proportion of patients	48%	31%	21%

C. Severity of hemophilia A and factor VIII activity

- gen pro faktor VIII :
 - lokalizace Xp28
 - 26 exonů
 - 186 kb (0,1 % celého X chromozomu)
 - 9kb mRNA

mutace v genu pro f VIII:
 susbstituce, inzerce, delece, duplikace
 30% de novo



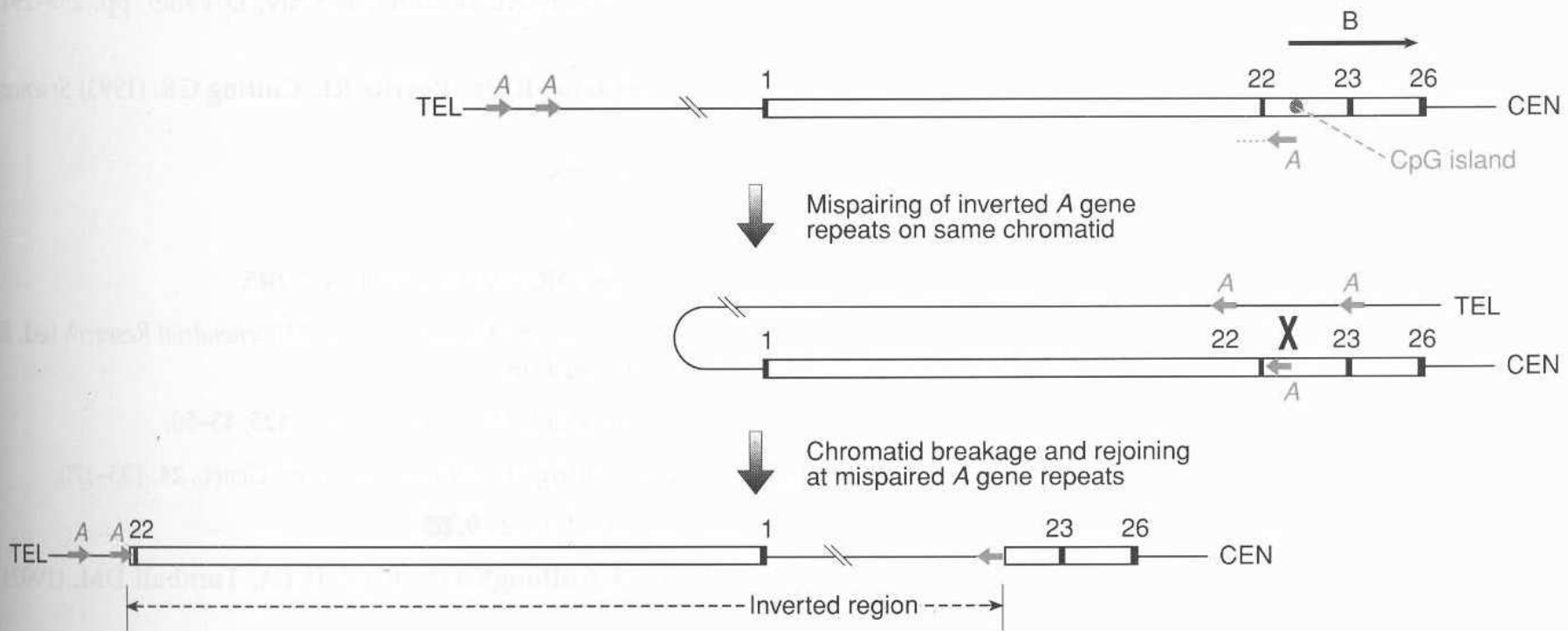
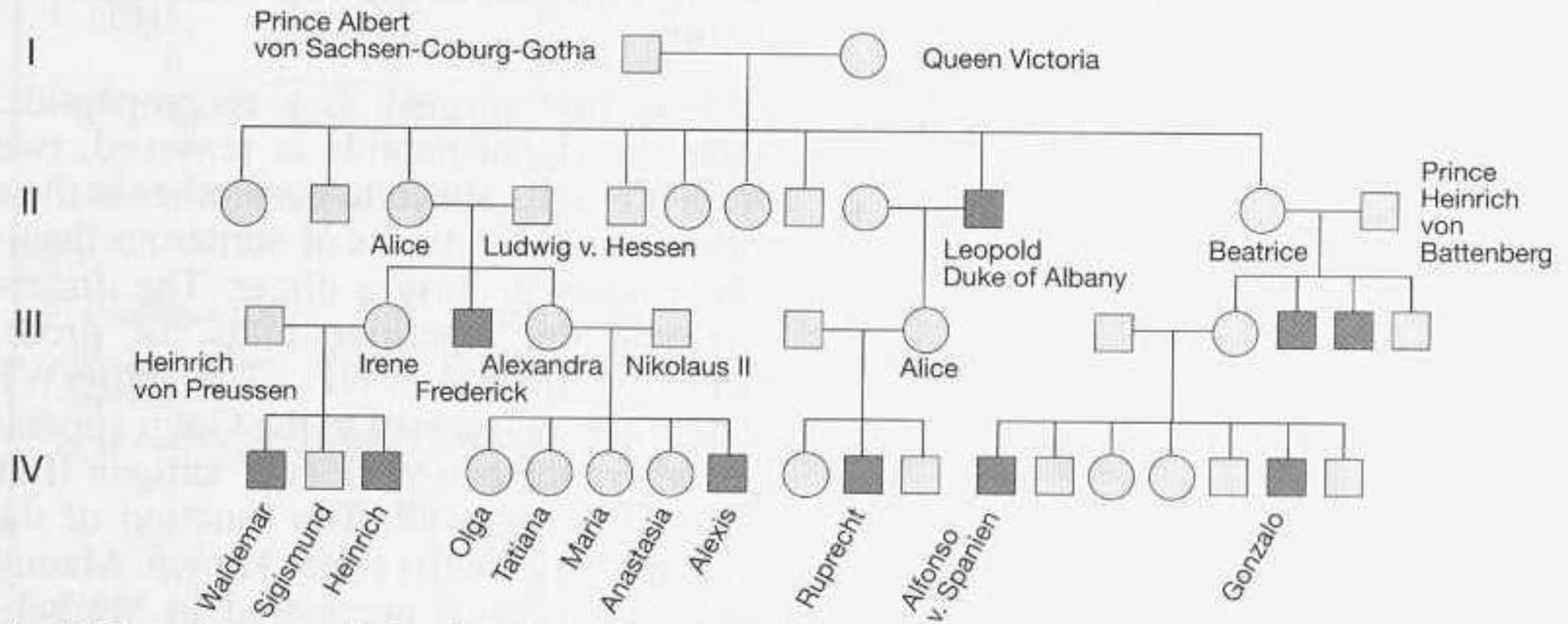


Figure 10.18: Inversions disrupting the factor VIII gene result from intrachromatid recombination between inverted repeats.



A. X-Chromosomal inheritance of hemophilia A