

Molekulárně genetická diagnostika

Iveta Valášková
Oddělení lékařské genetiky
FN Brno



Vrah studentky se zabil ve vězení

V případě ubodané dívky na pedagogické fakultě v Brně použili kriminalisté poprvé v Česku metodu analýzy DNA

Serial o nejzajímavějších případech, které se v dějinách moderní kriminalistiky udály na jižní Moravě, dnes pokračuje druhým dílem. Je o vraždě studentky na vysoké škole.

Sředeční ráno 27. června 1990 přivezl vlak z Blanska do Brna dvě kamarádky - studentky Pedagogické fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Jedna z dívek - třidvacetiletá Jana Krkošková - nesla přes rameno velkou červenou cestovní tašku s učebnicemi. Cestou od tramvajové zastávky požádala kamarádku, aby přidala do kroku, protože musela na záchod. Od setkání s vrahem ji dělilo necelých deset minut.

Násilník byl časovaná bomba

Šestadvacetiletý Milan Lubas byl z vězení propuštěn na základě amnestie. Svou zločineckou kariéru začal už v sedmnácti letech, kdy znásilnil mladou ženu. Sotva vyšel z vězení, vyřhl si další oběť, které britovou zohyzdil obličej.

Znalci označili Lubase za psychopatickou osobnost se značným sklonem k sexuální agresivitě. Dostal šest a půl roku vězení a zároveň mu soud uložil ústavní sexuologickou léčbu.

Po propuštění z vězení se Lubas potuloval po Brně. Noc na 27. červen 1990 proflámoval v bytě své tety, která bydlela kousek od pedagogické fakulty. Při zábavě si rozhlí rifle, a teta mu proto půjčila svo- je, v nichž také ráno odešel.



OBĚŤ. I zkušené kriminalisty zaskočila brutalita vraha, jenž na brněnské fakultě ubodal studentku.

Před osmou vyrazí záchranka k ubodané ženě na záchodě pedagogické fakulty na Poříčí 31. Vrahova brutalita zaskočila i zkušené kriminalisty. Kachličky po celém obvodu jsou samá krev. Uprostřed umývárny v tratolišti krve leží na zádech dívka, svetr vyhrnutý ke krku, kalhotky shrnuté, i na oděvu jsou patrné bodné rány. Stopy naznačují, že se dívka snažila z místnosti utéct a vrah ji honil a bodal. Nikdo nic neslyšel.

Okolí i zdrčení rodiče označili Janu Krkoškovou za bezproblémovou

dívku, která patřila mezi nejlepší studentky v ročníku. Ráda sportovala, v biatlonu byla dokonce členkou reprezentantce. Neměla vážnou známost, s nikým neměla spory.

Na těle měla celkem 31 bodných ran včetně oblasti genitálií. Oběť nebyla znásilněna. Vše ukazovalo na sexuálního agresora.

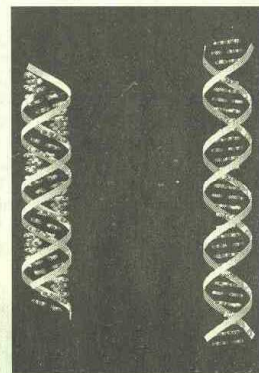
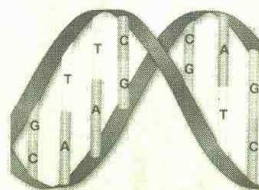
Každý zkušený kriminalista v podobné situaci přemýšlí, který z jeho minulých „klientů“ by mohl připadat v úvahu. Vladimír Matoušek si vzpomněl na Milana Lubase. Věděl, že kdysi bydlel jen několik domů od

budovy pedagogické fakulty. Zjistil, že Lubase v lednu propustili.

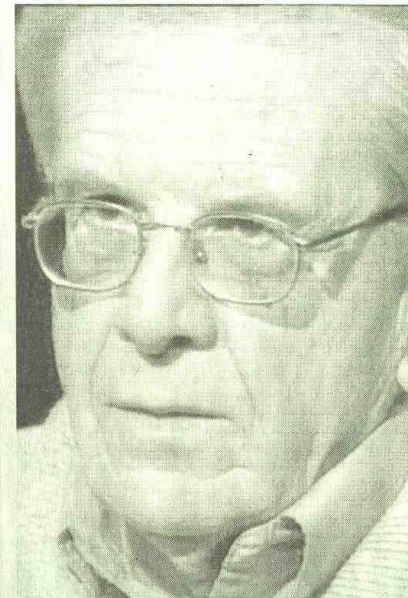
Když k němu policisté přišli, Lubas bez zjevného rozrušení popsal, co dělal. Když šel ráno z mejdanu, v tramvaji se dostal do konfliktu s cikány, kteří na něho vytáhli nůž. Jak se bránil, chytil čepel nože do ruky a při tom se pořezal. Než šel spát, řekl přítelkyni, aby mu oblečení vyprala.

Stále chyběl klíčový důkaz

Kriminalisté se rozjeli do bytu Lubas-



STRUKTURA DNA. Genetická analýza trvala 166 hodin.



USVĚDČIL HO. Vladimír Ferák analyzoval vzorky DNA pro potřeby kriminalistů. FOTO: ARCHIV

krvni skupinu. Stále chyběl nezvratný důkaz, že se dostali do kontaktu.

První analýza DNA

Začátkem září 1990 zazvonil v pracovně docenta Vladimíra Feráka z katedry molekulární biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě telefon. Vyšetřovatel z Brna se tázal, zda je možné v jeho laboratorii provést analýzu DNA. Specialista odvětil, že zatím neprovádějí žádnou analýzu pro praktické použití. Nicméně jsou s to ji udělat.

Metodu analýzy lidské DNA pro praktické využití vypracoval britský genetik Alec Jeffreys z Leicesterské univerzity v roce 1984. Původně byla určena pro výzkum příznaků dědičných chorob. O dva roky později byla metoda DNA využita i v kriminalistice, a to ve Velké Británii.

Docent Ferák měl k dispozici vzorky krve z riflí zasažené agresivním pracím práškem a zředěné vodou. Několik dnů po sobě okna laboratoře svítila dlouho do noci.

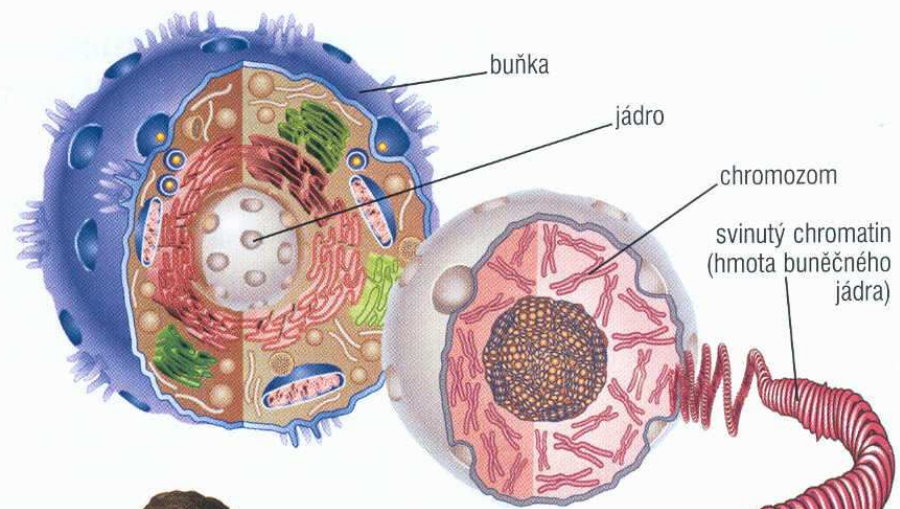
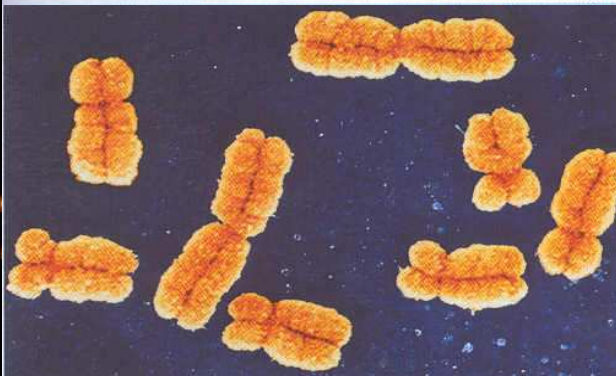
Docent Ferák ve svém znaleckém posudku uvedl, že výskyt dalšího muže se stejným genetickým profilem, jako měl Lubas, je teoreticky možný v číselném poměru jedna ku milionu. Zbývala poslední otázka - jak soud posoudí první důkaz tohoto druhu v dějinách české justice.

Soud Lubase poslal coby nebezpečného recidivistu na 24 let do vězení s nejpřísnějším režimem. Důkaz DNA byl na prvním místě.

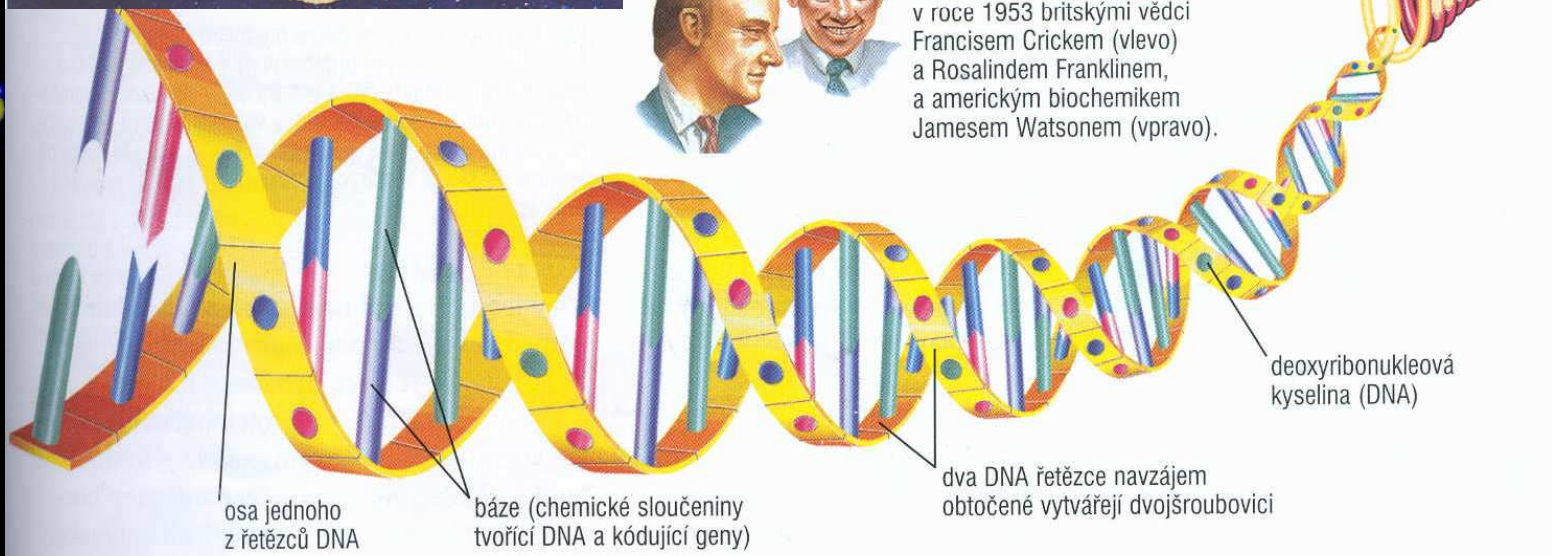
4. února 1993 spáchal Milan Lubas ve své cele ve věznici na Mírově sebevraždu.

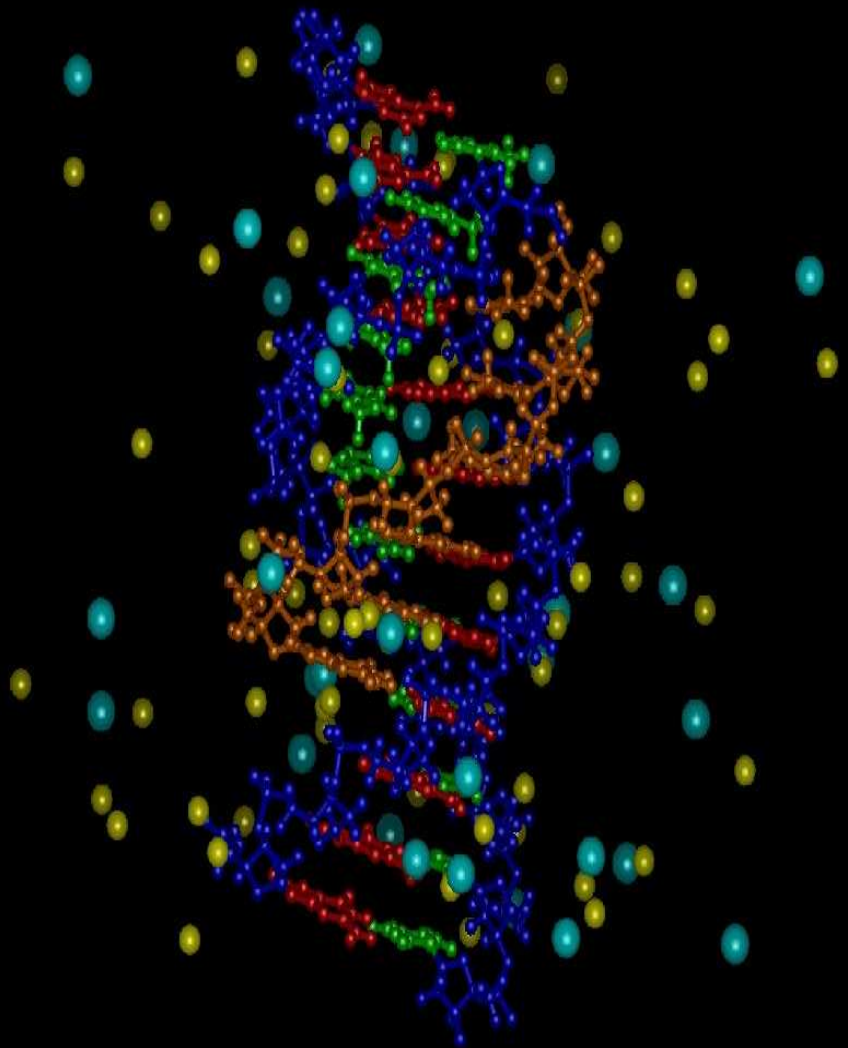
MILOSLAV JEDLIČKA

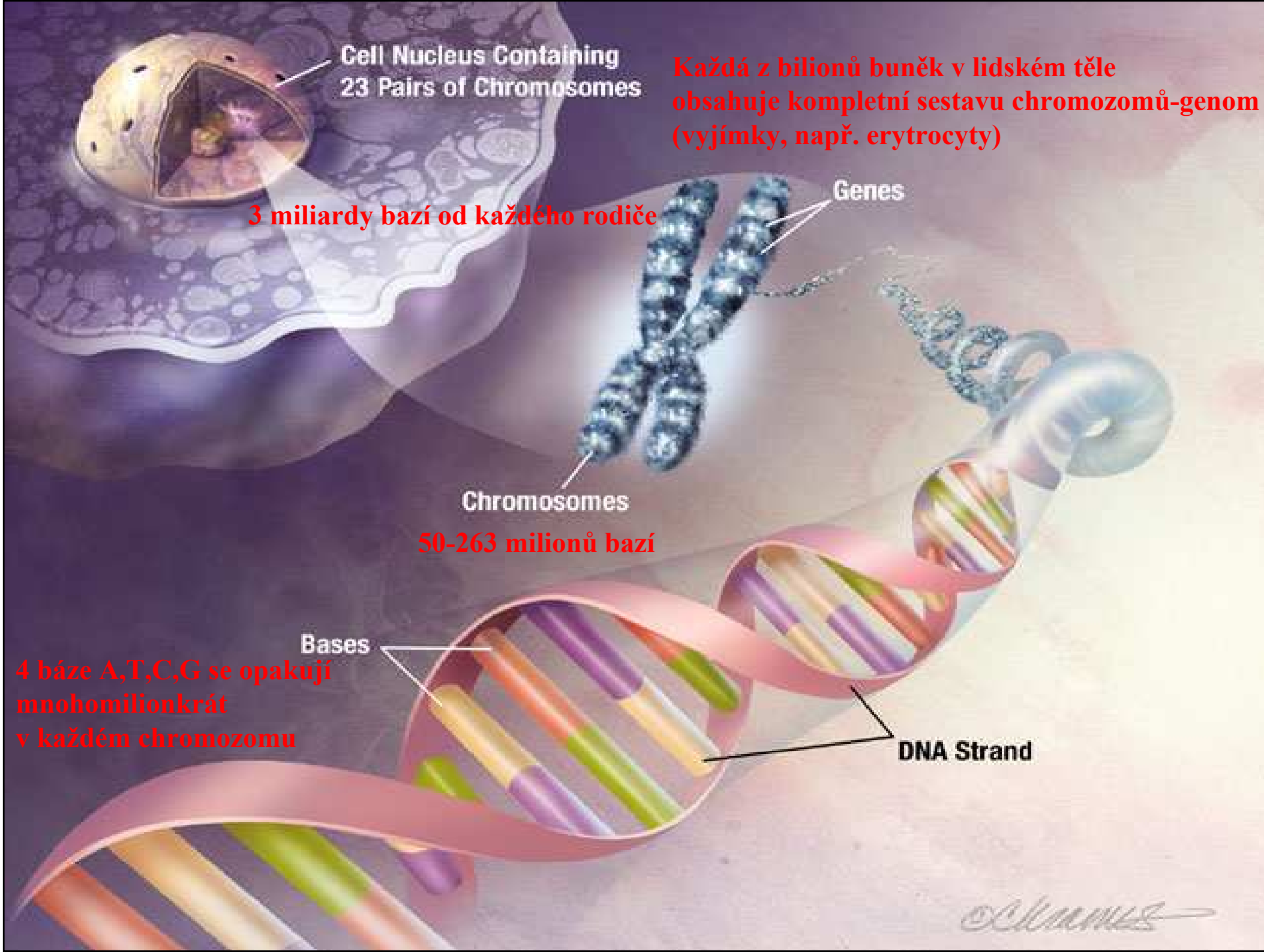
Chromozomy se nacházejí v jádru téměř každé buňky. Každý z chromozomů obsahuje soubory informací, zvané geny.



Struktura DNA byla objevena v roce 1953 britskými vědci Francisem Crickem (vlevo) a Rosalindem Franklinem, a americkým biochemikem Jamesem Watsonem (vpravo).







Cell Nucleus Containing
23 Pairs of Chromosomes

**Každá z bilionů buněk v lidském těle
obsahuje kompletní sestavu chromozomů-genom
(vyjimky, např. erythrocyty)**

3 miliardy bazí od každého rodiče

Genes

Chromosomes

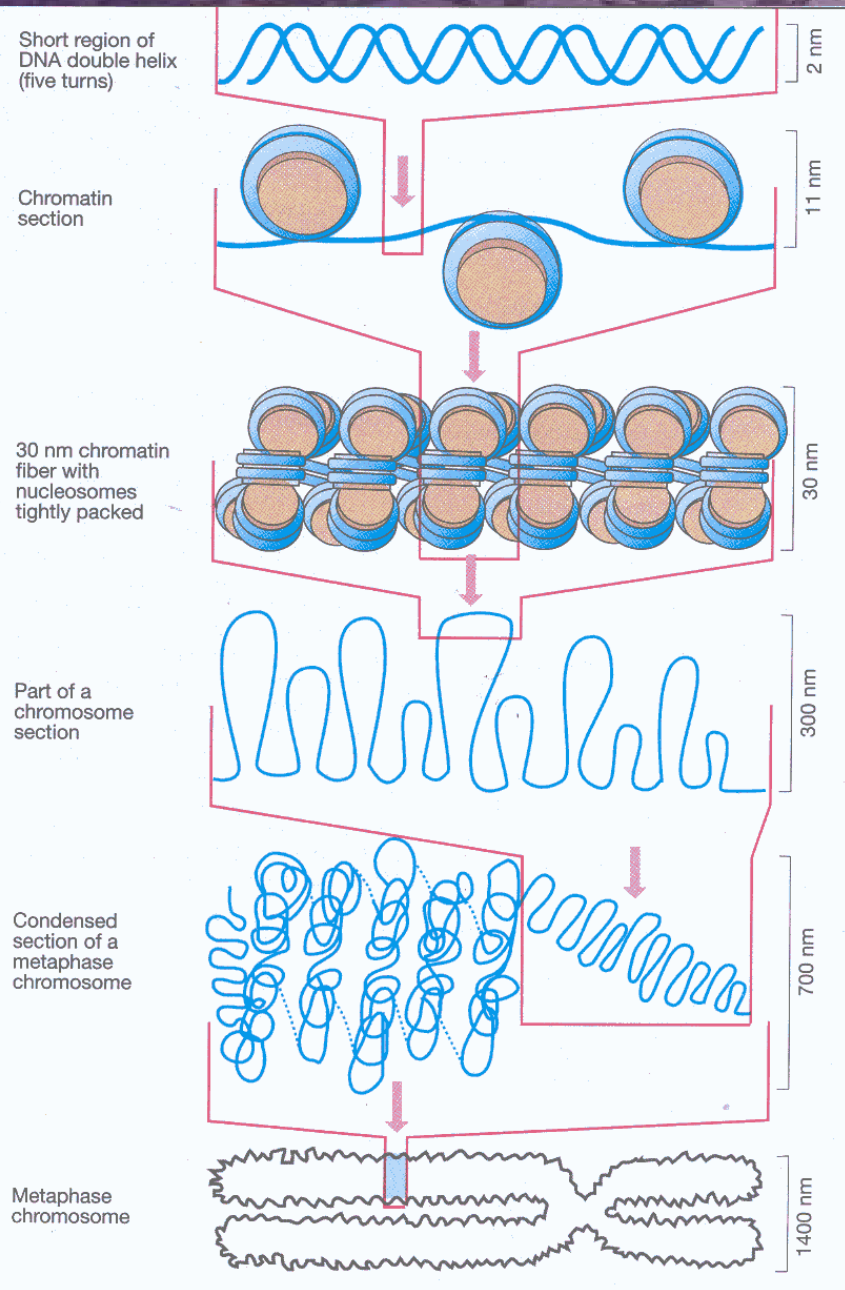
50-263 milionů bazí

Bases

**4 báze A,T,C,G se opakují
mnohemiliónkrát
v každém chromozomu**

DNA Strand

© Science



ining
osomes

- Každý z 46 lidských chromozomů je tvořen jednou molekulou dvoušrobovicové DNA
- DNA z jedné buňky je dlouhá přibližně 2 metry
- Proteiny zvané histony tvoří jádro, kolem kterého je DNA navinuta v dvojité smyčce tvořené přibližně 146 pb – NUKLEOZÓM
- Stovky sekvenčně specifických DNA-vazebných proteinů, které rozpoznávají krátké úseky DNA
- Jejich vazba má důležitý význam pro regulaci genové aktivity (genové exprese)

DNA Strand

© 2000

Cell Nucleus Containing
23 Pairs of Chromosomes

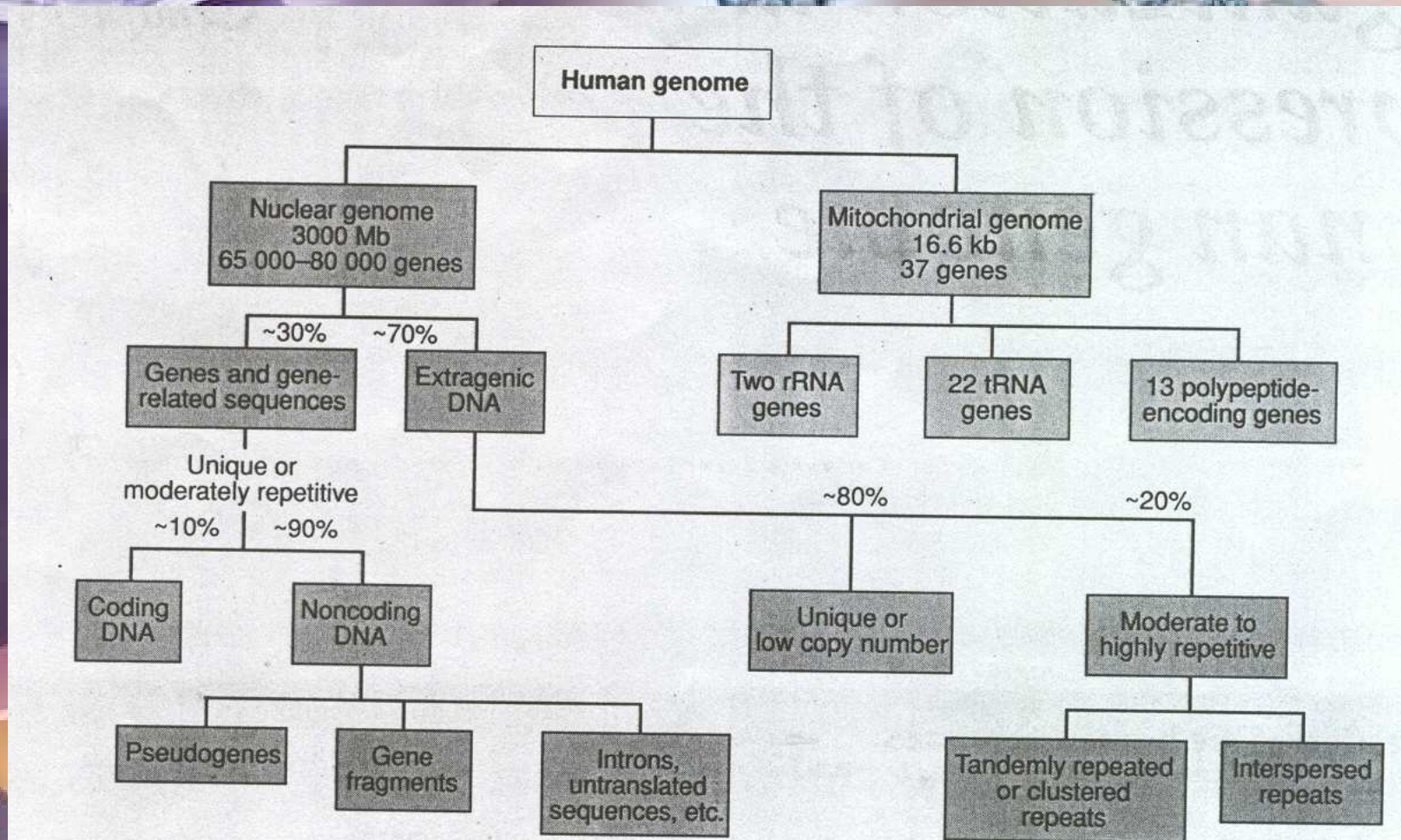
Lidský genom

**Veškerá genetická informace (obsažená v DNA)
v lidských buňkách**

Je tvořen :

- **jaderný genom**
- **mitochondriální genom**

Genes

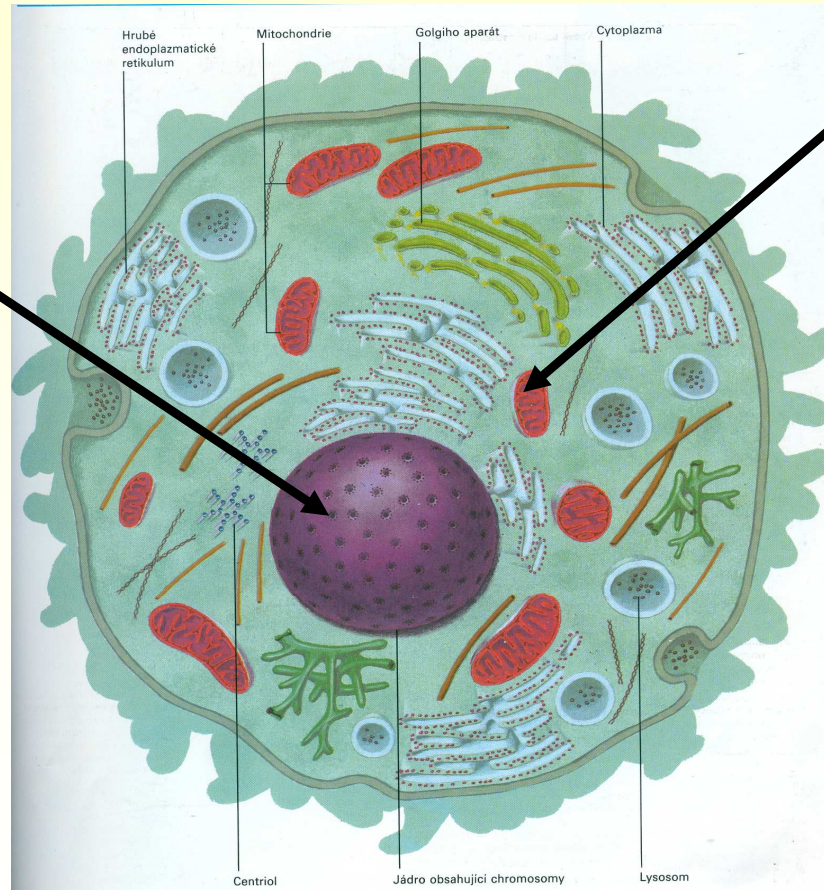
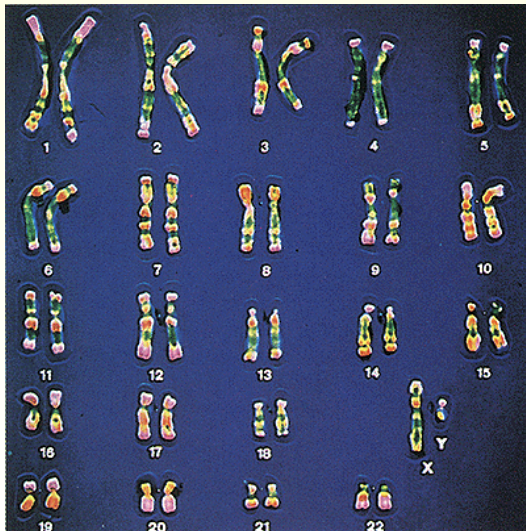


Genom

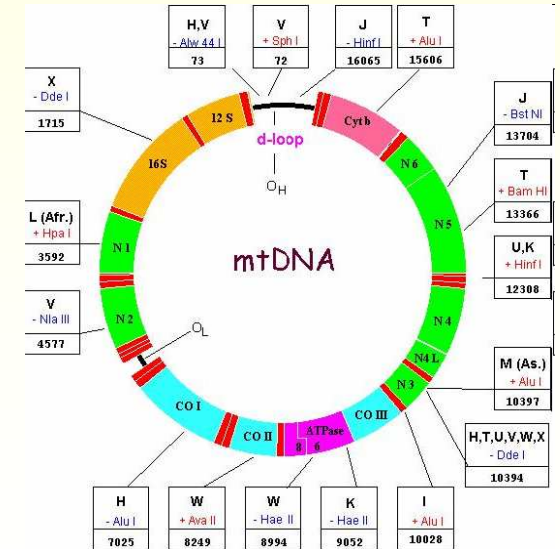
Soubor všech genů daného organismu

Veškerá genetická informace (obsažená v DNA) v lidských buňkách

☐ jaderný genom

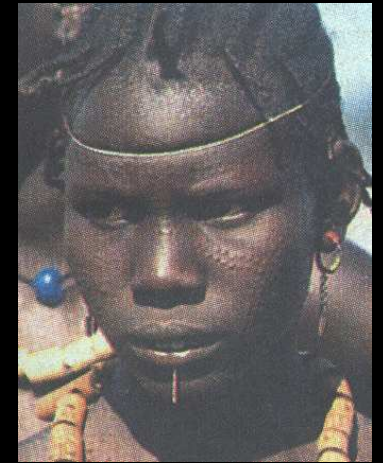
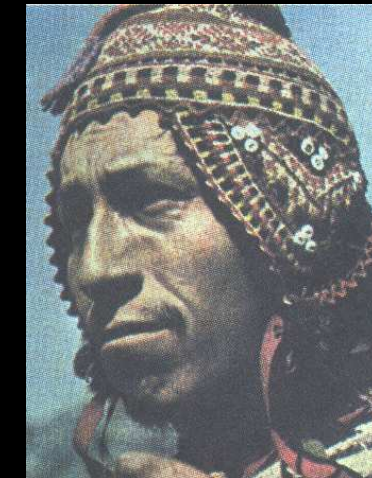
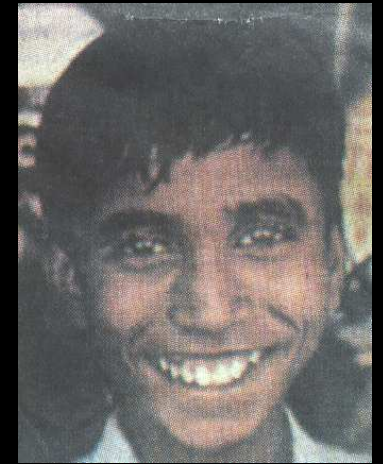


☐ mimojaderný genom
– mitochondriální



Genom u jedinců stejného druhu je stejný

Genom x Genotyp



Genom u jedinců stejného druhu je stejný
Genotypy jedinců stejného druhu mohou být rozdílné

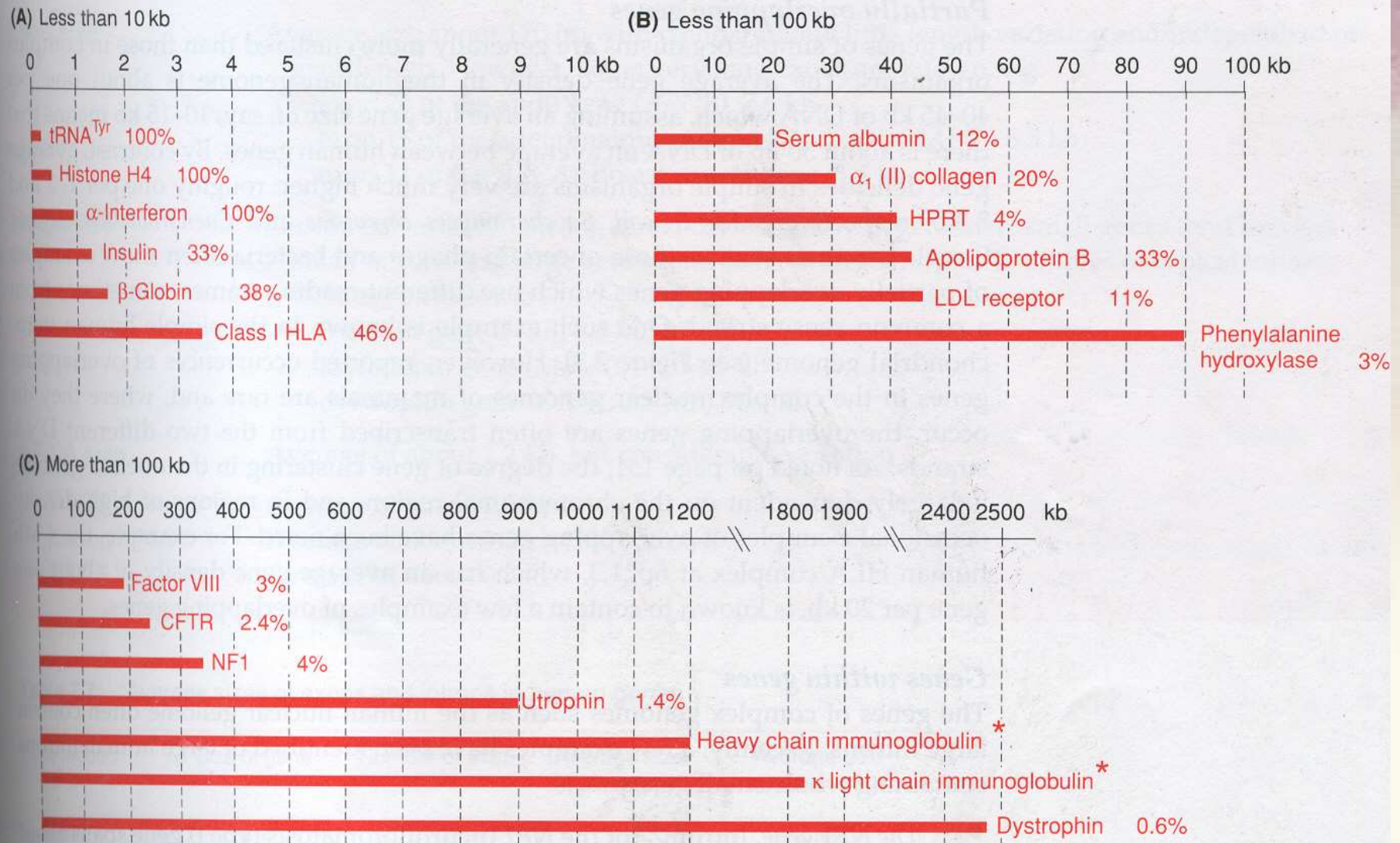


Figure 7.6: Human genes vary enormously in size and exon content.

Exon content is shown as a percentage of the lengths of indicated genes. *Note* the generally inverse relationship between gene length and percentage of exon content. Asterisks emphasize that the lengths given for the indicated Ig heavy chain and light chain loci correspond to the germline organizations. Immunoglobulin and T-cell receptor genes have unique organizations, requiring cell-specific somatic rearrangements in order to be expressed in B or T lymphocytes respectively (see page 177). CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyl transferase; NF1, neurofibromatous type 1.

Cell Nucleus Containing
23 Pairs of Chromosomes

Table 7.7: Average sizes of exons and introns in human genes

Gene product	Size of gene	Number of exons	Average size of exon (bp)	Average size of intron (kb)
tRNA ^{tyr}	0.1	2	50	0.02
Insulin	1.4	3	155	0.48
β -Globin	1.6	3	150	0.49
Class I HLA	3.5	8	187	0.26
Serum albumin	18	14	137	1.1
Type VII collagen	31	118	77	0.19
Complement C3	41	29	122	0.9
Phenylalanine hydroxylase	90	26	96	3.5
Factor VIII	186	26	375	7.1
CFTR (cystic fibrosis)	250	27	227	9.1
Dystrophin	2400	79	180	30.0

Cell Nucleus Containing
23 Pairs of Chromosomes

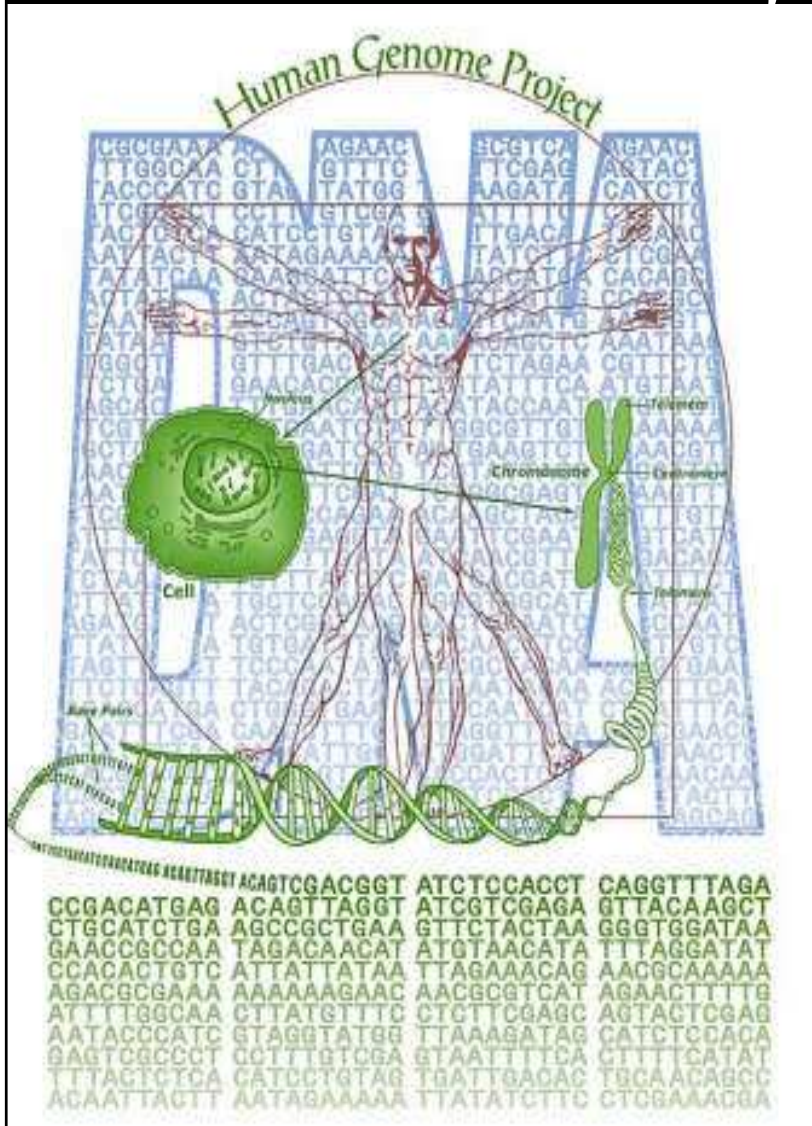
Lidský jaderný a mitochondriální genom

Genes

	Nuclear genome	Mitochondrial genome
Size	3000 Mb	16.6 kb
No. of different DNA molecules	23 (in XX) or 24 (in XY) cells, all linear	One circular DNA molecule
Total no. of DNA molecules per cell	23 in haploid cells; 46 in diploid cells	Several $\times 10^3$
Associated protein	Several classes of histone and nonhistone protein	Largely free of protein
No. of genes	~65 000–80 000	37
Gene density	~1/40 kb	1/0.45 kb
Repetitive DNA	Large fraction, see <i>Figure 7.1</i> .	Very little
Transcription	The great bulk of genes are transcribed individually	Continuous transcription of multiple genes
Introns	Found in most genes	Absent
% of coding DNA	~3%	~93%
Codon usage	See <i>Figure 1.22</i>	See <i>Figure 1.22</i>
Recombination	At least once for each pair of homologs at meiosis	None
Inheritance	Mendelian for sequences on X and autosomes; paternal for sequences on Y	Exclusively maternal

Human Genome Project

Projekt lidský genom

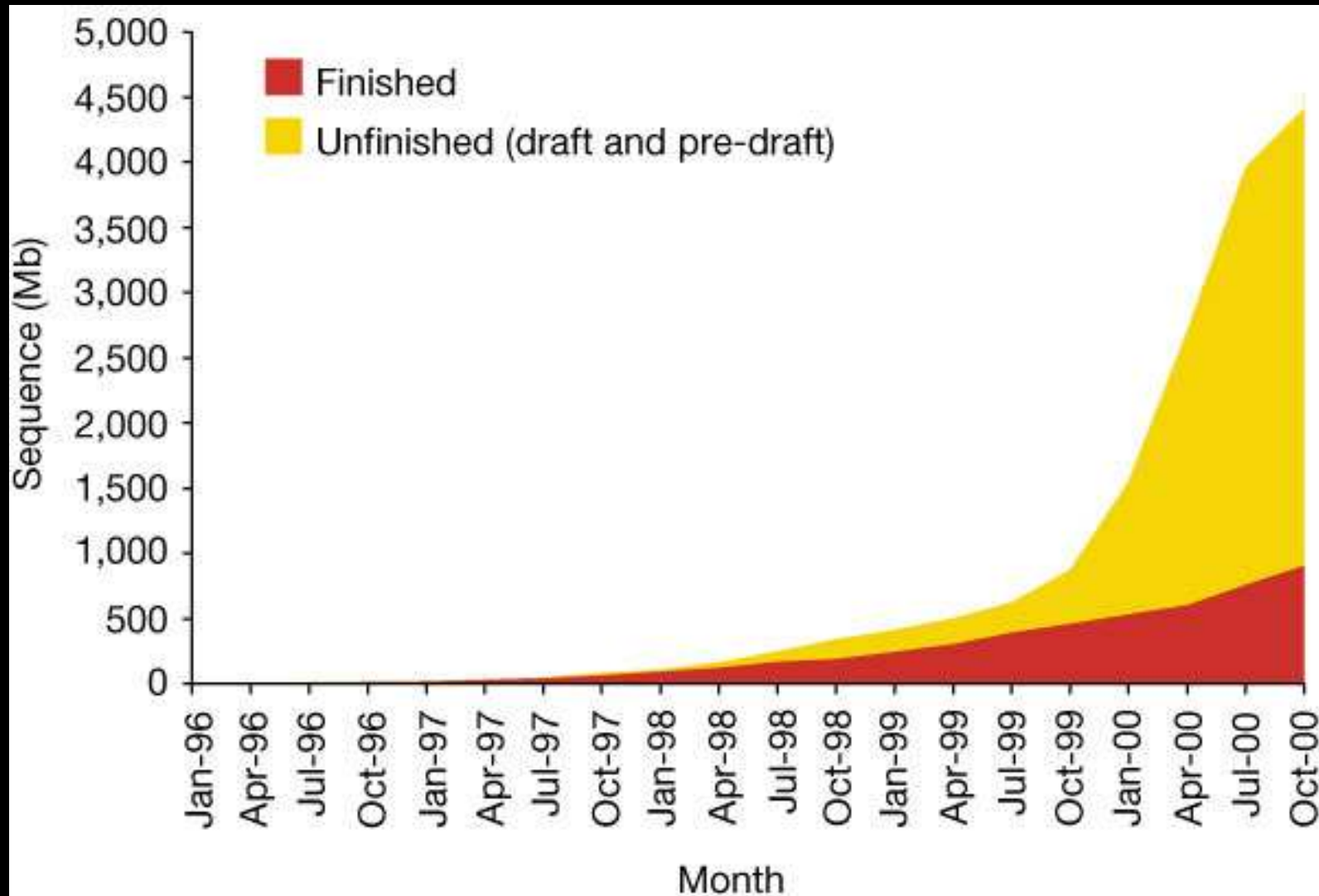


- 1986: Santa Fe - DoE Intl. Meeting
 - James Watson:
„vstoupitna cestu od dvojišroubovice k 3 miliardám schodů lidského genomu“
 - 1988: Kongres USA schválil 15 letý projekt a dotaci 3 mld USD
 - 1990: začátek projektu
 - 2005: předpokladané ukončení
- Koordinace:
1988: HUGO (Human Genome Organization)
HUGO Europe – Americas - Pacific

HUGO - cíle

- Triangulovat genom pomocí DNA markerů
- Identifikovat a mapovat geny, určit jejich strukturu a funkci v zdraví i v patologii
- Identifikovat důležité mimogenové sekvence
- Určit úplnou sekvenci genomu (3,2 Gb)
- Všechny data uložit v veřejně přístupných databázích
- Sekvenovat genómy modelových organizmů
(drozofila, myš, *C. elegans*, *A. thaliana* a i.)
- Zkoumat etické, právní a sociální aspekty

Nárůst údajů o sekvenci DNA



15 February 2001

nature

ISSN 0950-0804 PUBLISHED WEEKLY

www.nature.com

the
human
genome



Cell Nucleus Containing
23 Pairs of Chromosomes

Human Genome Project

Table 11. Genome overview.

Size of the genome (including gaps)	2.91 Gbp
Size of the genome (excluding gaps)	2.66 Gbp
Longest contig	1.99 Mbp
Longest scaffold	14.4 Mbp
Percent of A+T in the genome	54
Percent of G+C in the genome	38
Percent of undetermined bases in the genome	9
Most GC-rich 50 kb	Chr. 2 (66%)
Least GC-rich 50 kb	Chr. X (25%)
Percent of genome classified as repeats	35
Number of annotated genes	26,383
Percent of annotated genes with unknown function	42
Number of genes (hypothetical and annotated)	39,114
Percent of hypothetical and annotated genes with unknown function	59
Gene with the most exons	Titin (234 exons)
Average gene size	27 kbp
Most gene-rich chromosome	Chr. 19 (23 genes/Mb)
Least gene-rich chromosomes	Chr. 13 (5 genes/Mb), Chr. Y (5 genes/Mb)
Total size of gene deserts (>500 kb with no annotated genes)	605 Mbp
Percent of base pairs spanned by genes	25.5 to 37.8*
Percent of base pairs spanned by exons	1.1 to 1.4*
Percent of base pairs spanned by introns	24.4 to 36.4*
Percent of base pairs in intergenic DNA	74.5 to 63.6*
Chromosome with highest proportion of DNA in annotated exons	Chr. 19 (9.33)
Chromosome with lowest proportion of DNA in annotated exons	Chr. Y (0.36)
Longest intergenic region (between annotated + hypothetical genes)	Chr. 13 (3,038,416 bp)
Rate of SNP variation	1/1250 bp

*In these ranges, the percentages correspond to the annotated gene set (26,383 genes) and the hypothetical + annotated gene set (39,114 genes), respectively.

Chumley

Dědičné choroby

Narozené děti

5% vrozená choroba

0,5% chromozomální anomálie

1% monogenně dědičné choroby

Ostatní choroby jsou multifaktoriálně dědičné nebo způsobené vnějšími faktory.

Většina z nositelů vrozené choroby umírá před jejich 65 rokem života.

Vrozené choroby jsou 5. nejčastější příčina úmrtí.

Většina úmrtí je způsobena

1. vrozené choroby srdce
2. anomálie centrálního nervového systému a urogenitální anomálie
3. gastrointestinální anomálie

Hlavní typy genetických chorob

Geneticky determinované choroby jsou klasifikovány do 4 hlavních kategorií

- **Chromozomální choroby**

- ✓ Jsou výsledkem adicí nebo delecí celých chromozomů nebo jejich částí
- ✓ Většina je charakterizována růstovou retardací, mentální retardací a rozmanitými somatickými abnormalitami
- ✓ Klinicky signifikantní chromozomální abnormality jsou příčinou 2,5% dětských úmrtí

- **Monogenní choroby**

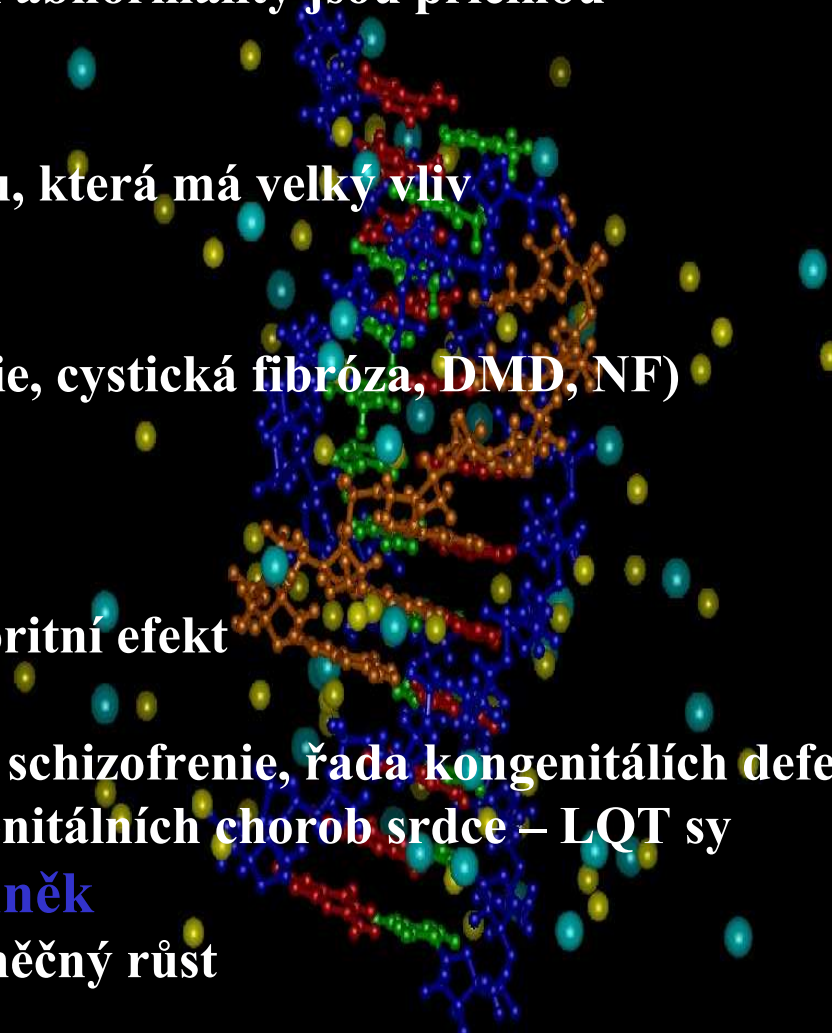
- ✓ Jsou způsobeny mutací v jednom genu, která má velký vliv na pacientovo zdraví
- ✓ Mendelistická dědičnost
- ✓ Známo 6 000 chorob (srpkovitá anemie, cystická fibróza, DMD, NF)
- ✓ Příčina 5-10% dětských úmrtí

- **Polygenní choroby**

- ✓ Vznikají interakcí multiplexu genů, každý z nich může mít relativně minoritní efekt
- ✓ Příčina 25-30% dětských úmrtí
- ✓ Příklad: diabetes melitus, hypertenze, schizofrenie, řada kongenitálních defektů jako rozštěp rtu a patra, většina kongenitálních chorob srdce – LQT sy

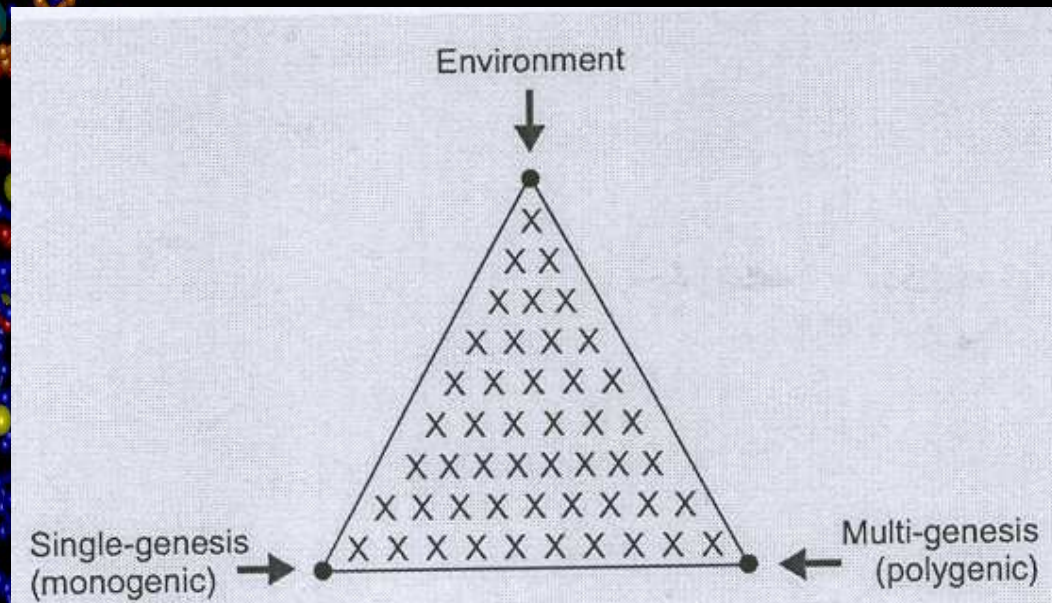
- **Genetické defekty somatických buněk**

- ✓ Mutace v genech, které kontrolují buněčný růst



Geny a choroby

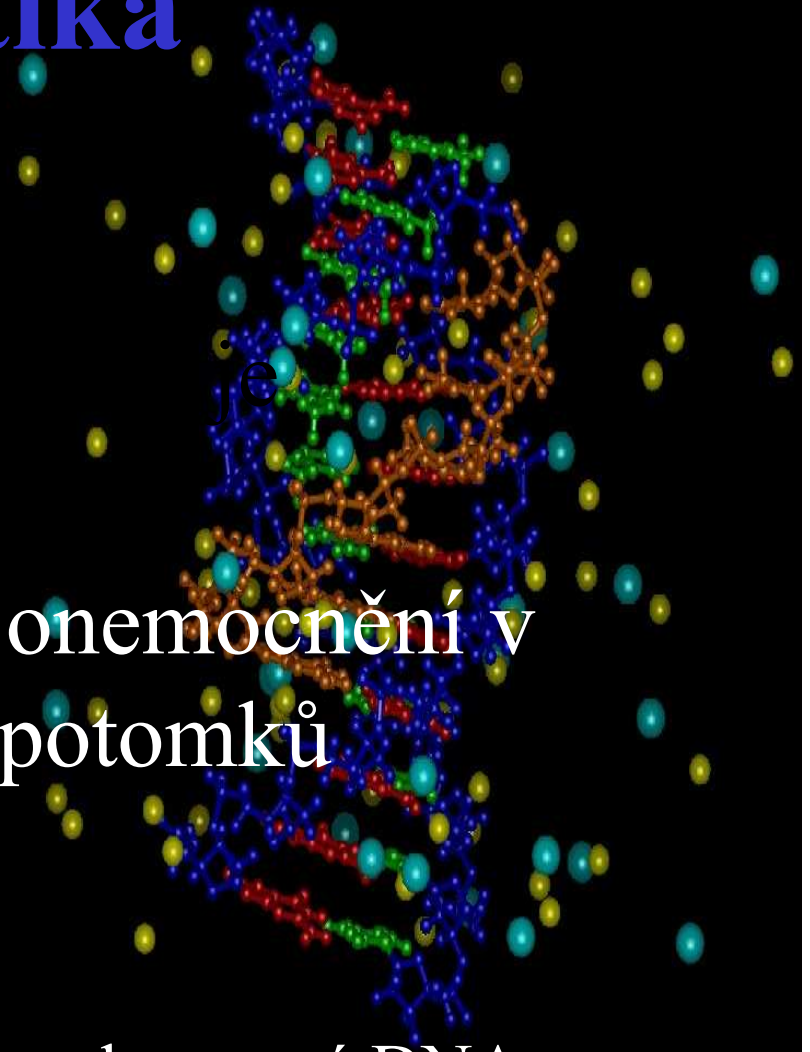
Scéma vztahu mezi monogenními, polygenními a multifaktoriálními chorobami



Geny mohou vždy být více či méně silnými predispozičními faktory pro rozvoj nemoci

DNA diagnostika

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

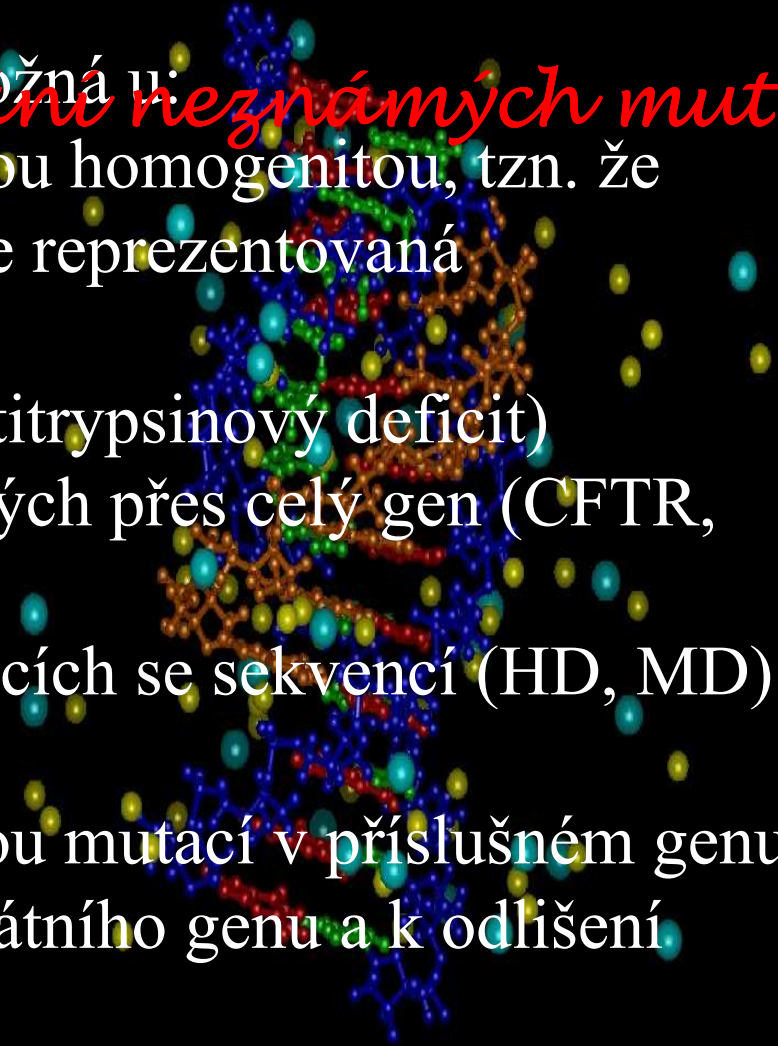
musíme znát:

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



Prímá DNA diagnostika

- *Metoda přímé detekce již známých mutací*
- Detekce známé sekvenční 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 nepatogenního polymorfismu)





Mutace

- jakákoliv dědičná změna v genetické materiálu
- změny v DNA, jejichž frekvence je nižší než 1%

Epimutace – nejsou to změny ve fenotypu, které jsou důsledkem změny sekvence DNA (poruchy metylace aj.)

Mutace - pozitivní (zdroj variability, selekce)
- negativní (4500 monogenně dědičných chorob, stárnutí)
- neutrální

Každý člověk 5 – 10 patologických mutací

Mutace

spontální x indukované
gametická x somatická
dominantní x recesivní
přímé x zpětné

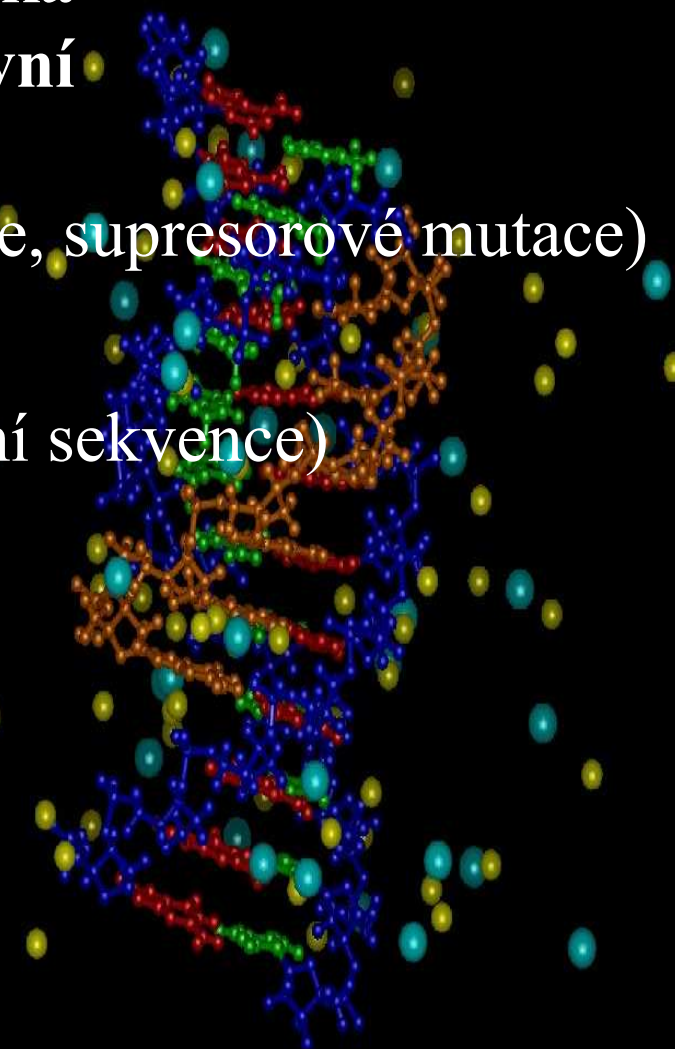
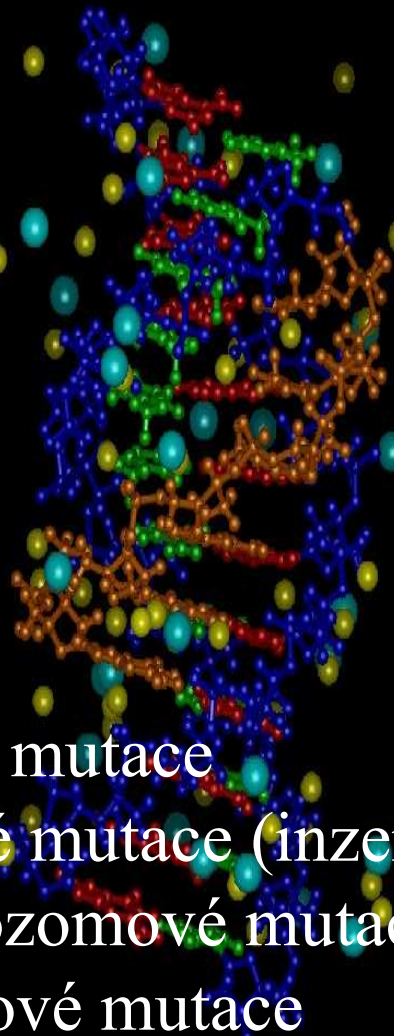
(reverze, supresorové mutace)

Bodové mutace

Blokové mutace (inzerční, deleční, repetitivní sekvence)

Chromozomové mutace

Genomové mutace



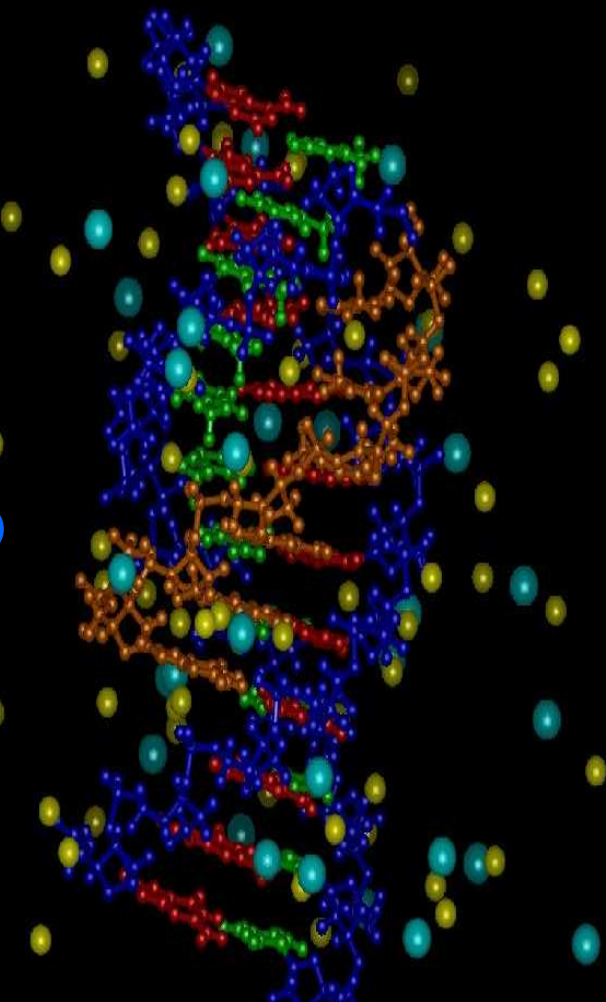
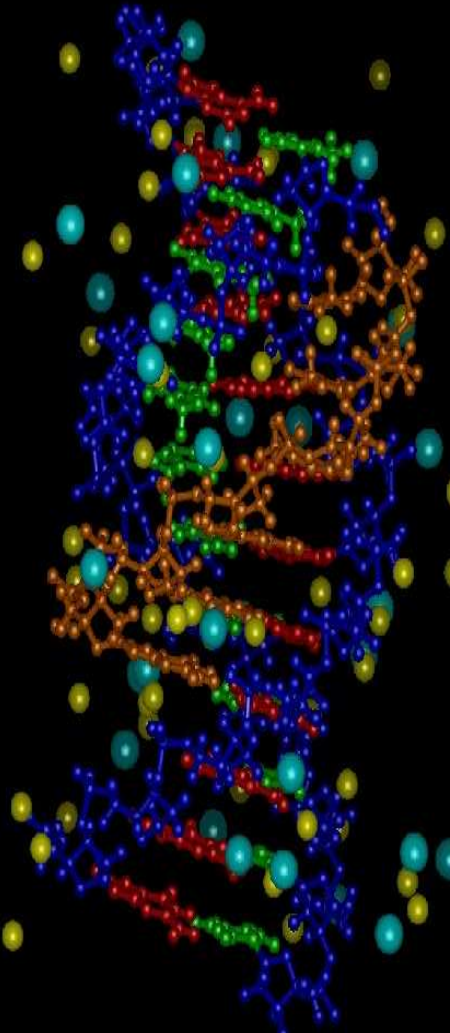
Hlavní třídy mutací

- **delece**
od 1 bp po megabáze
- **inzerce**
včetně duplikací
- **jednobázové substituce**
missense transverze
nonsense tranzice
splice site
- **posunové (frameshift)**
v důsledku delecí, inzercí, poruch
splicingu
- **„dynamické“ (expanzia rep. sekv.)**
tandemové repetice, které často
expandují během meiózy

Podle sekvence:

kódující sekvenci

v nekódující sekvenci



Typy mutací dle funkce



Nuliformní - žádný funkční protein
- většinou recesivní
- enzymopatie

Hypomorfní

Hypermorfní

Získ nových vlastností



Klasifikace mutací z hlediska efektu na genový produkt

1. Produkt se sníženou až nulovou funkcí (*loss-of-function*)

- nejčastěji je produktem genu enzym
- častým typem mutace je delece genu

2. Produkt s abnormální funkcí (*gain-of-function*)

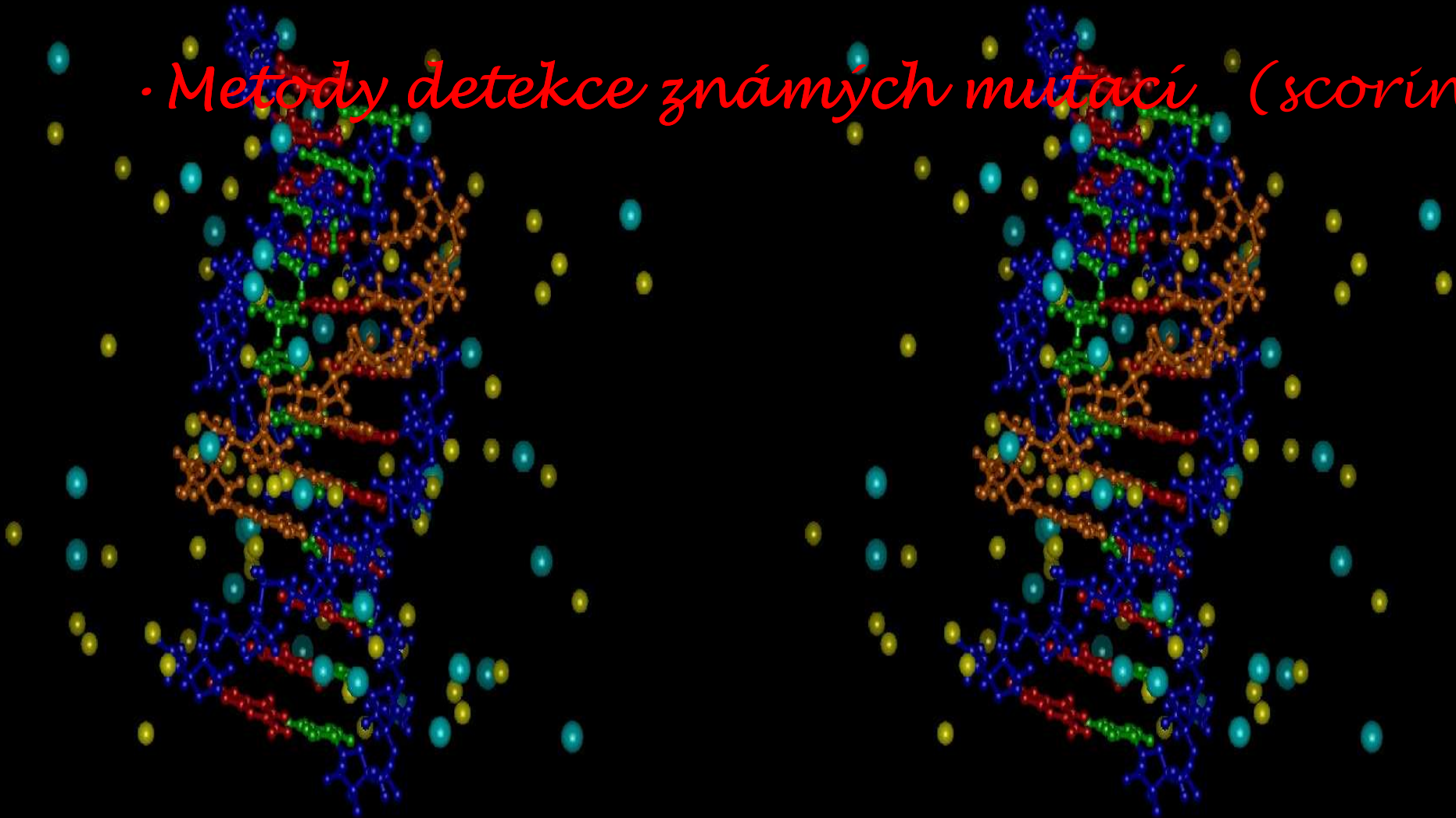
- nejčastěji je produktem neenzymatický protein
- časté u nádorů (somat. mutace), zřídka u monogenních onemocnění
- delece genu se neuplatňuje (nevede k nové funkci)

všeobecně mutace typu 1 jsou nejčastěji recesivní

- u některých genů jsou známy oba typy (výsledkem je *heterogenita*)

Přímá DNA diagnostika

• Metody detekce známých mutací (scoring)



Příklady chorob s vymezeným počtem mutací

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

Metody detekce známých mutací

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 bodu 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



Excellent try, my dear Watson, but . . .
could you bring me a mirror, old boy?

SIMON '98

Přímá DNA diagnostika

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

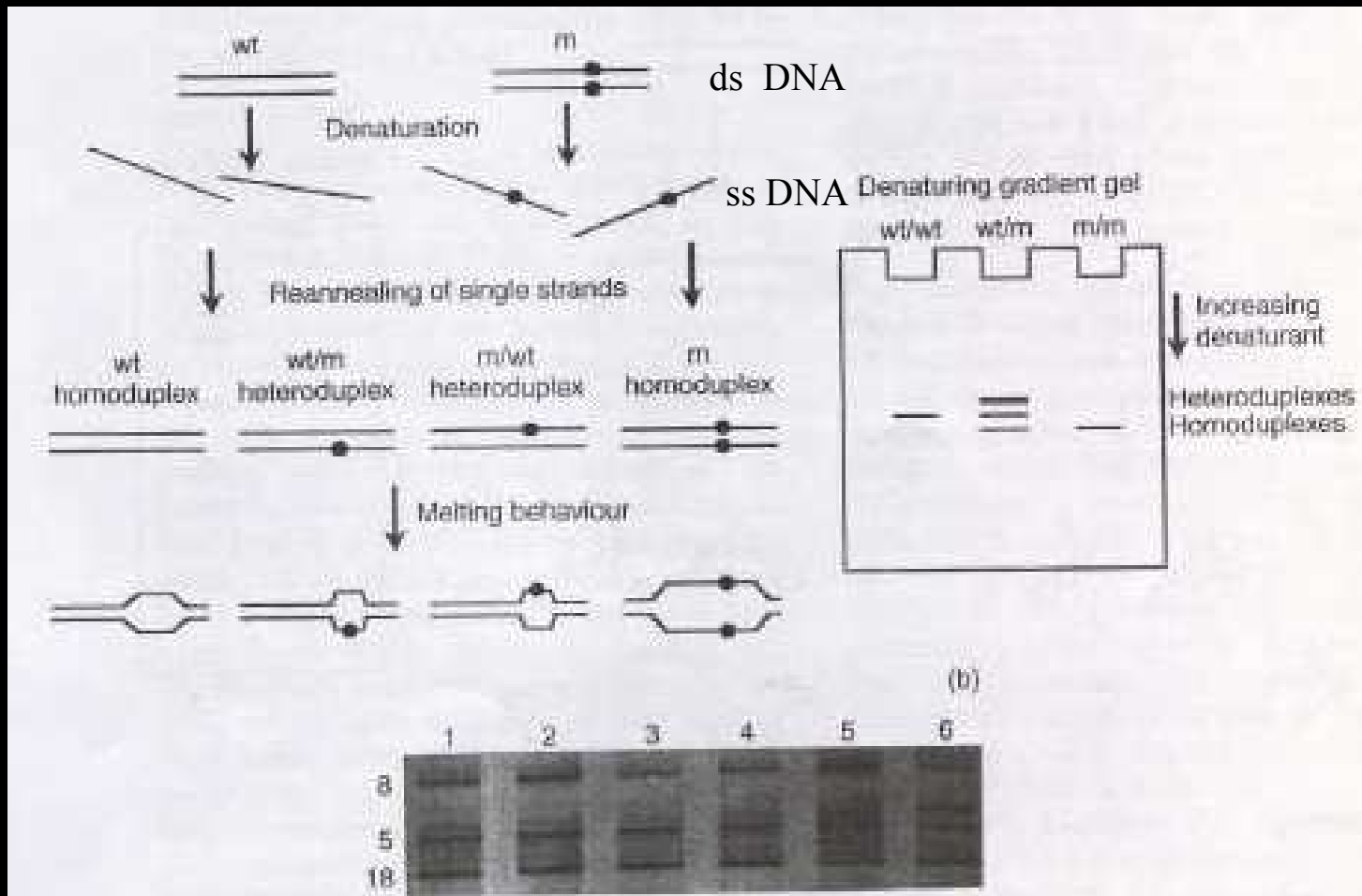


Nejčastěji používané vyhledávací metody

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

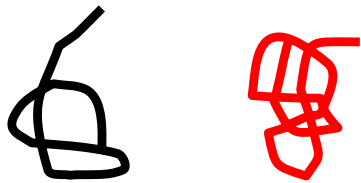
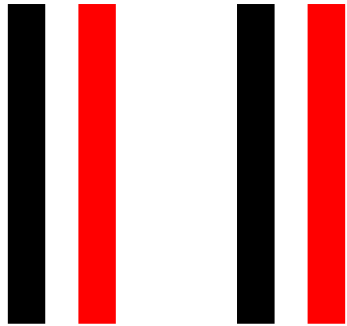


Princip metody DGGE

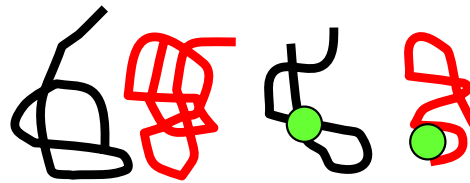
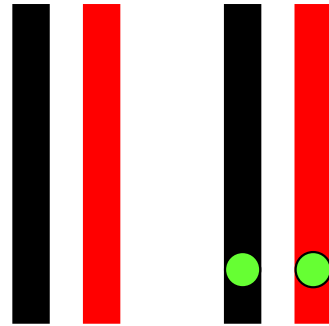


SSCP na gelu

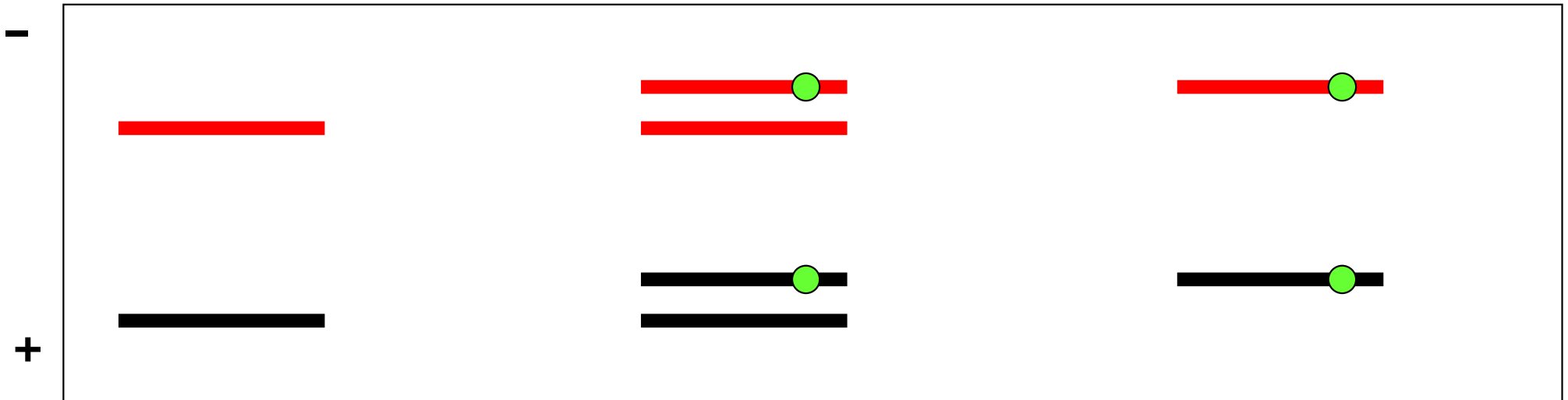
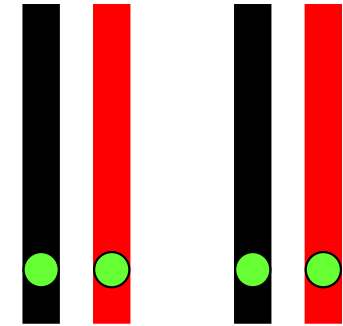
non mt/non mt



non mt/mutace

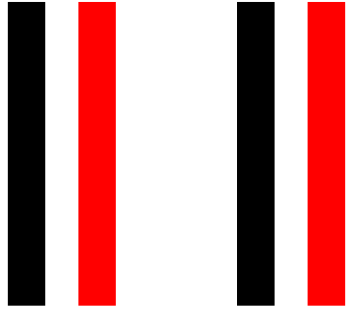


mutace/mutace

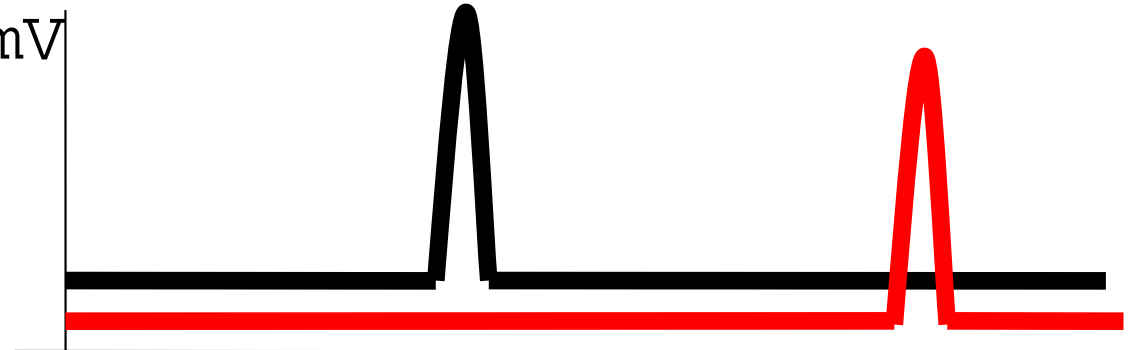


SSCP v kapiláře

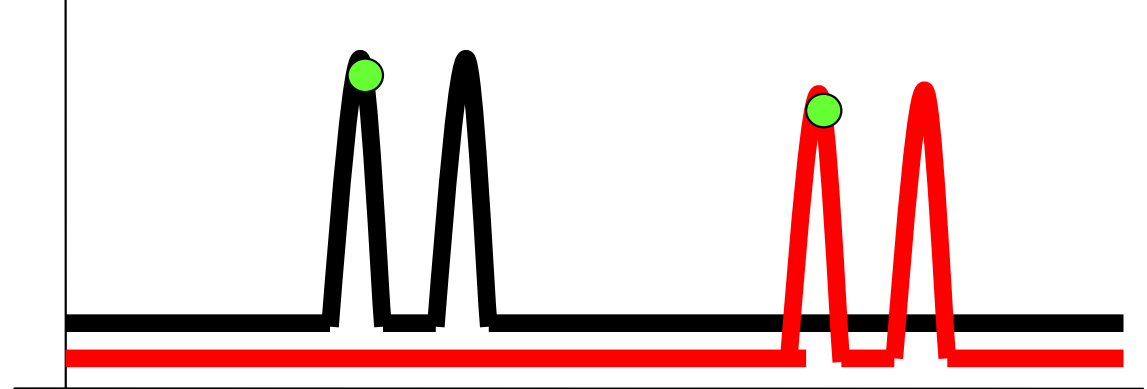
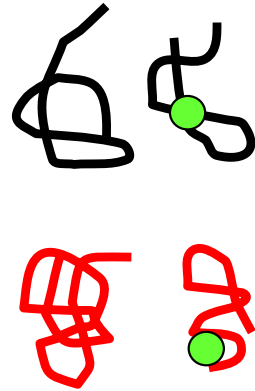
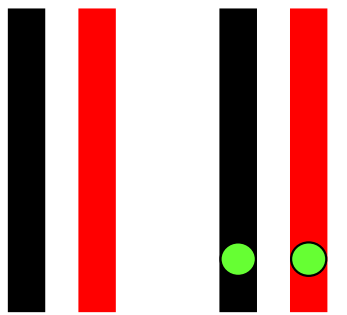
non mt / non mt



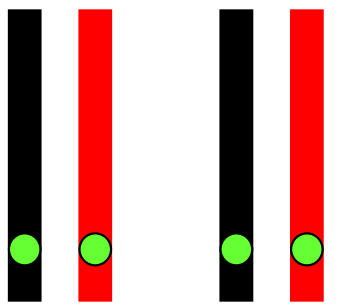
mV



non mt / mutace

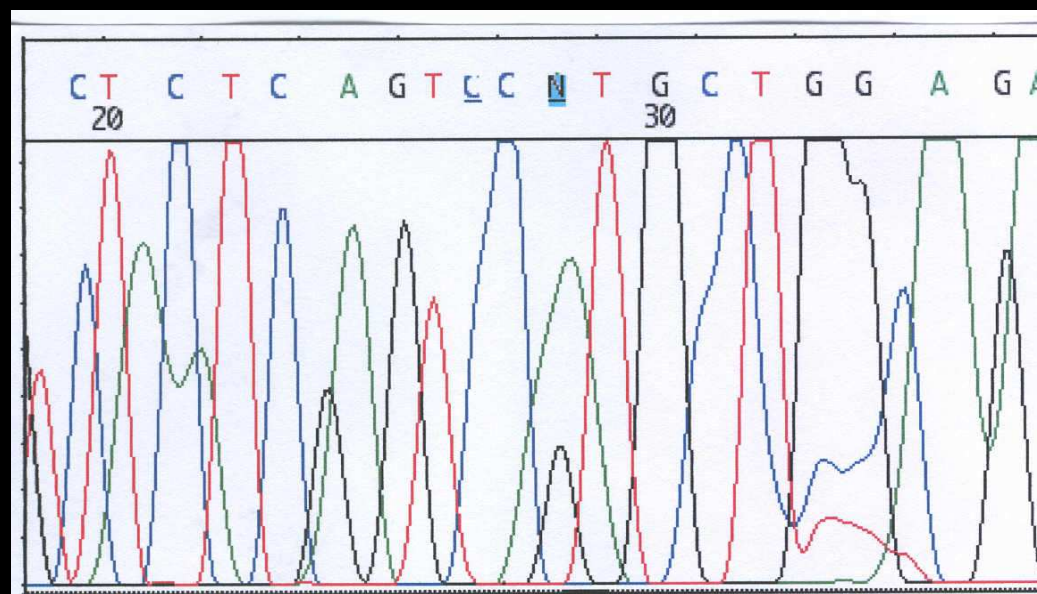
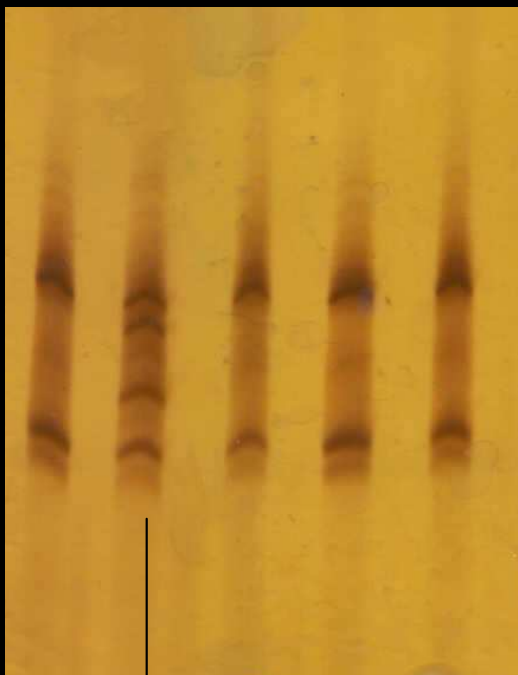


mutace / mutace



čas

SSCP na gelu



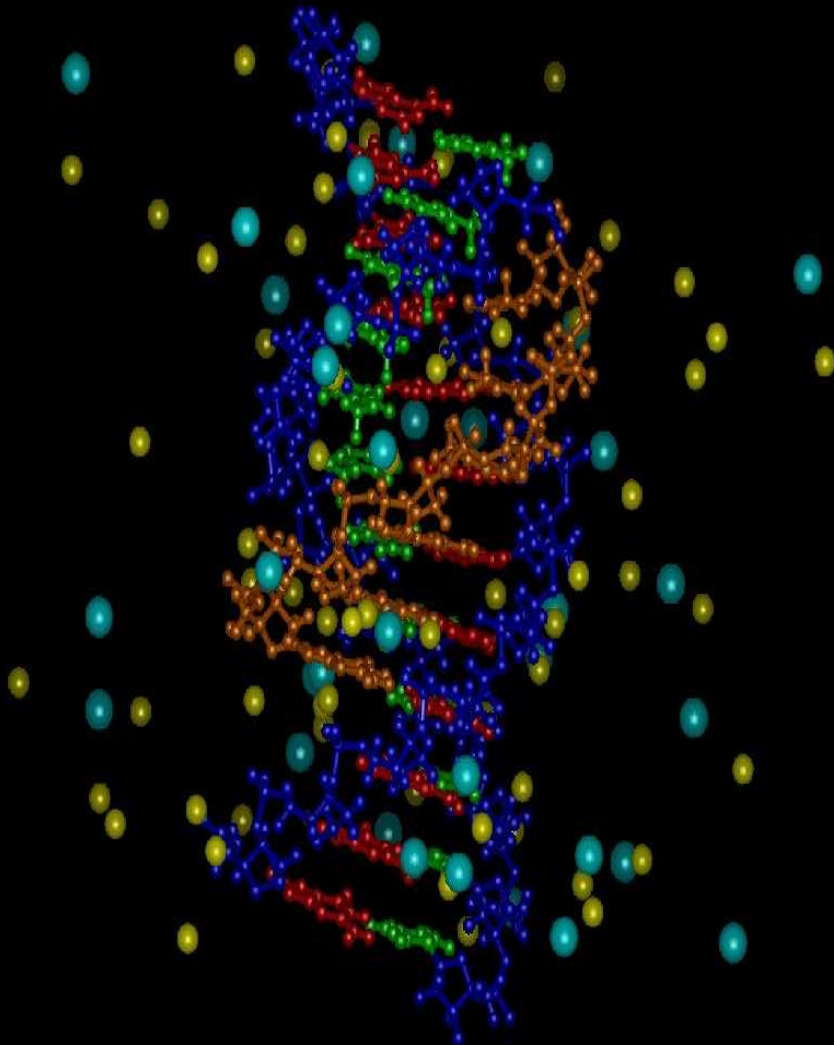
dráha: 1.-4. DNA pacientů

5. wt

Nomenklatura mutací

Human Gene Mutation Database:

www.hgmd.org



- **Substituce aminokyselin**

(jedno- alebo trojpísmenové symboly)

- R117H nebo Arg117His: substituce arg za his na AA 117
- G542X: glycín 542 nahrazený stop-kodónem

Substituce nukleotidů

(A z inic. kodónu ATG je vždy +1)

- 1162G>A: výmena G na pozicii 1162 za A
- IVS4+2G>T: záměna G za T v druhé bázi intronu 4

Delece a inserce

(symboly del resp. ins)

- F508del: delece fenylalaninu 508
- 622-626del: delece 5 nt začínající 622
- 409-410insC: vložení C mezi 409 a 410

Cystická fibróza



- **Incidence 1 : 3000 živě narozených dětí**
- **Frekvence přenašečů 1 : 25**
- **V ČR se každý rok rodí 40 – 50 dětí s CF**

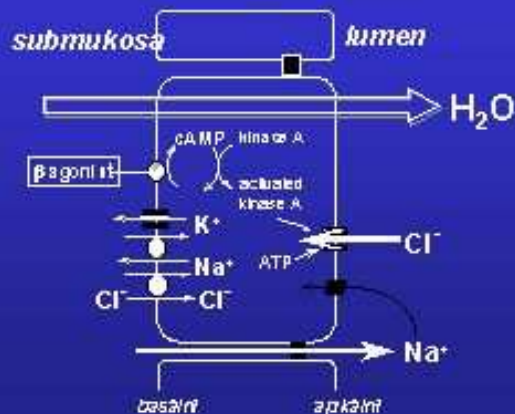
Základní fyziologický defekt při onemocnění CF

porucha v transportu iontů
chlóru, sodíku a vody
přes apikální membránu
specializovaných epiteliálních
buněk

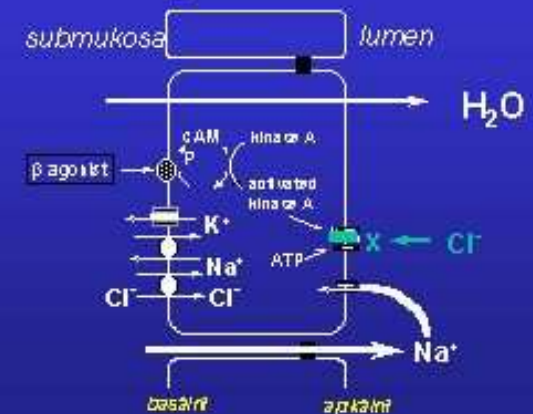
některé exokrinní žlázy produkují
hustý, lepkavý hlen

tím zapříčiněny
hlavní symptomy nemoci

Normální stav



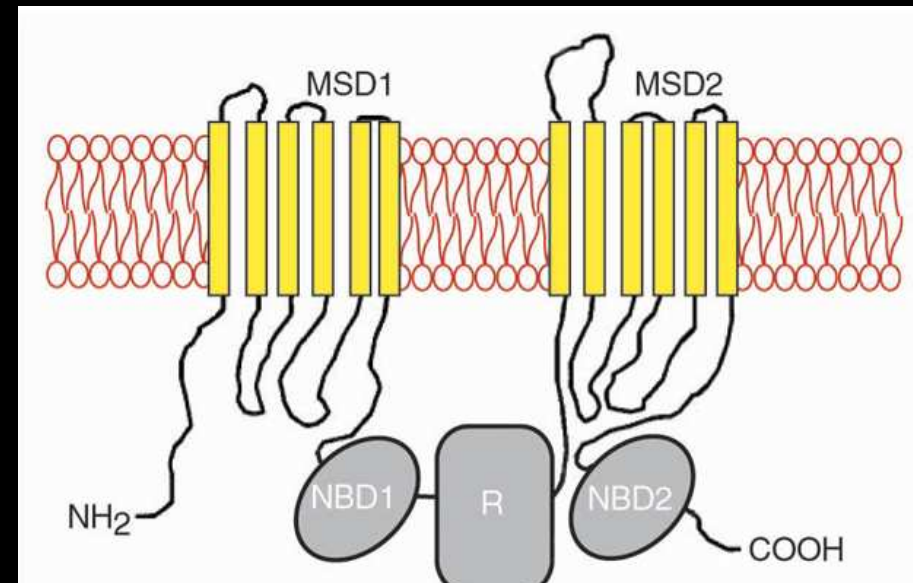
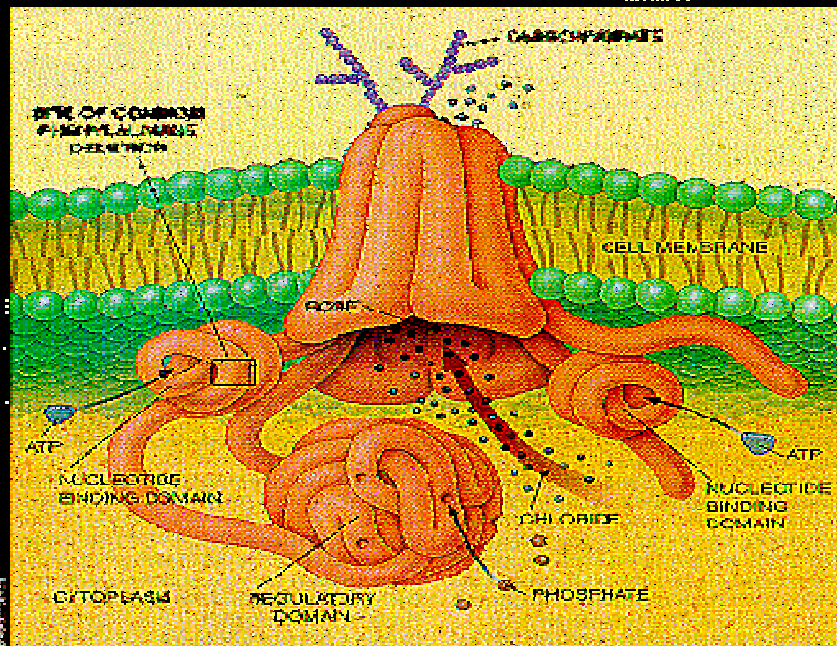
Cystická fibróza



Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein CFTR

chloridový kanál regulující transportů přes buněčnou membránu

- cyklický adenosin monofosfát
- lokalizovaný v apikální membráně epitelálních buněk

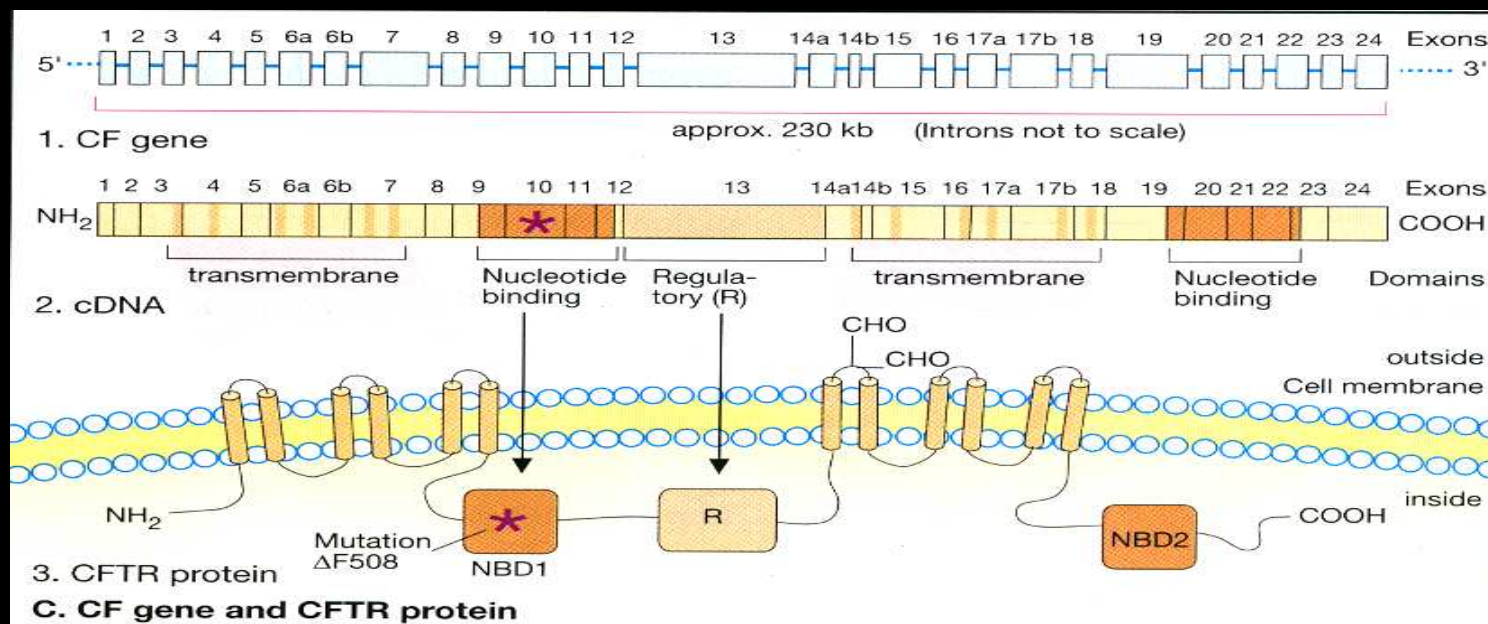


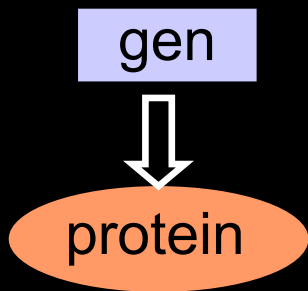
- Tvořen 5ti doménami:
 - 2 membrane spanning domains
 - 2 nucleotide binding domains
 - 1 regulatory domain

CFTR gen

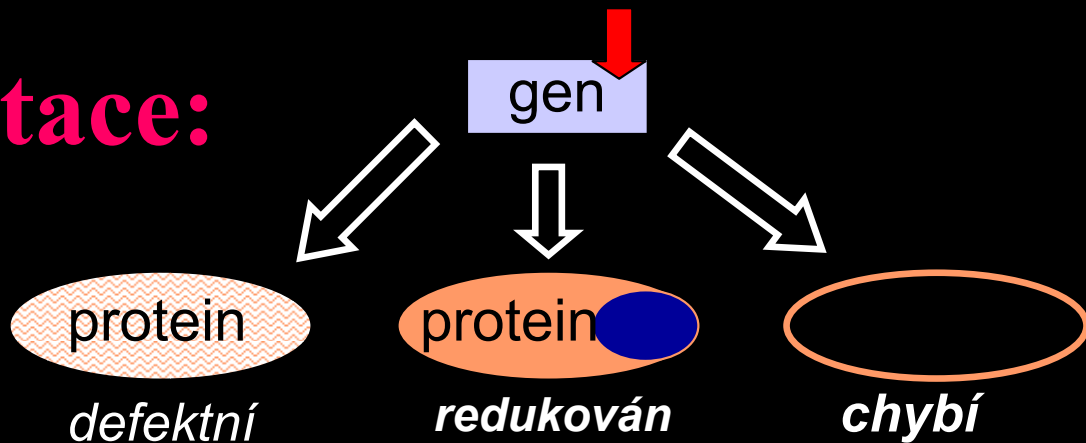
- kóduje CFTR protein
- lokalizován na chromozomu 7 (7q31)
- 250 kb dlouhý
- 27 exonů
- cDNA sekvence dlouhá 6129 bp kóduje 1480 aminokyselin CFTR proteinu

Mutace v tomto genu způsobují onemocnění CF

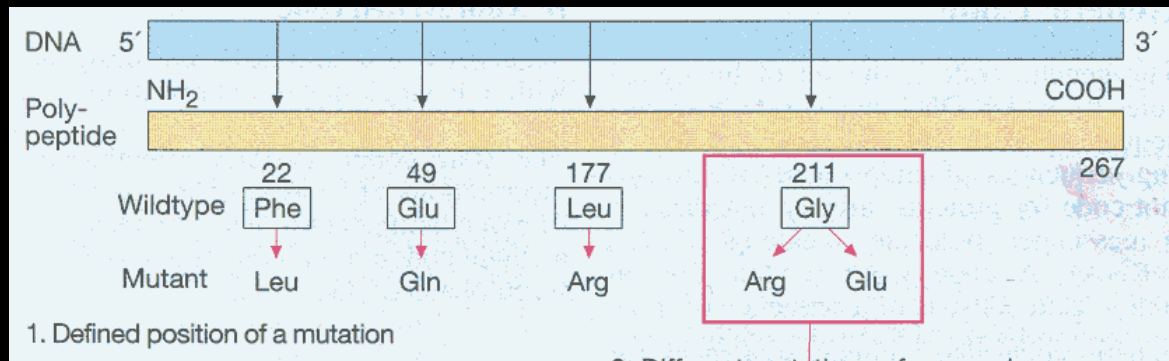




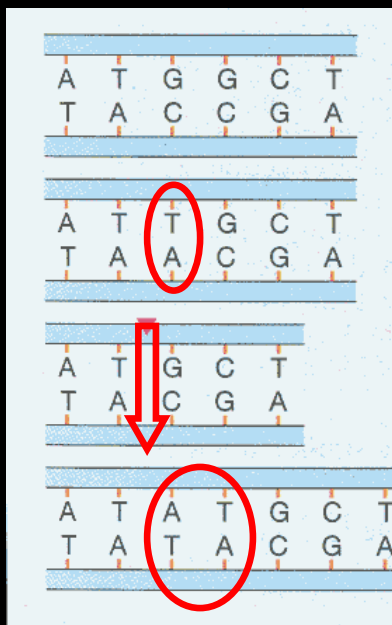
Mutace:



onemocnění



Typy mutací



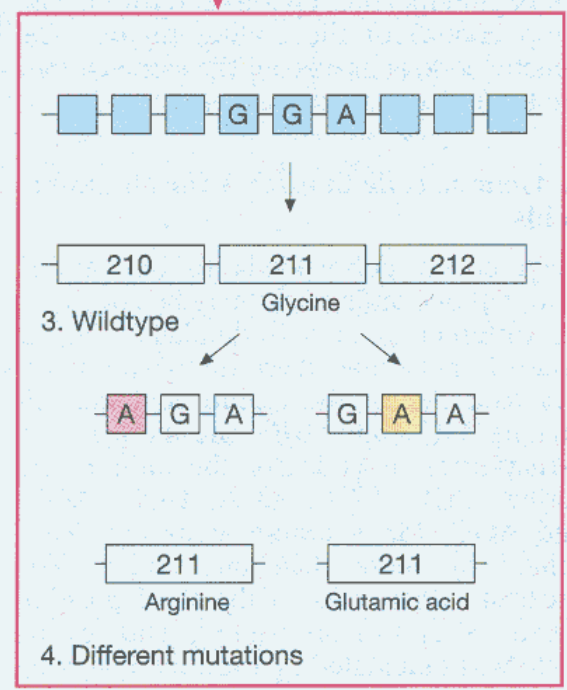
wildtype

substituce nonsense → G542X
 missense → N1303K

delece → dF508

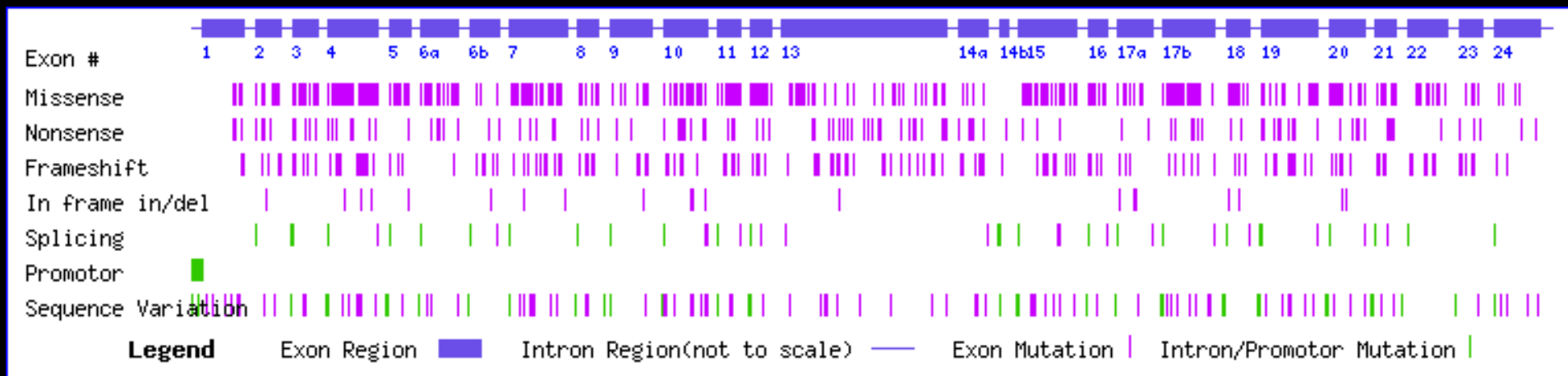
inzerce → 390insT

2. Different mutations of one codon



CFTR mutace

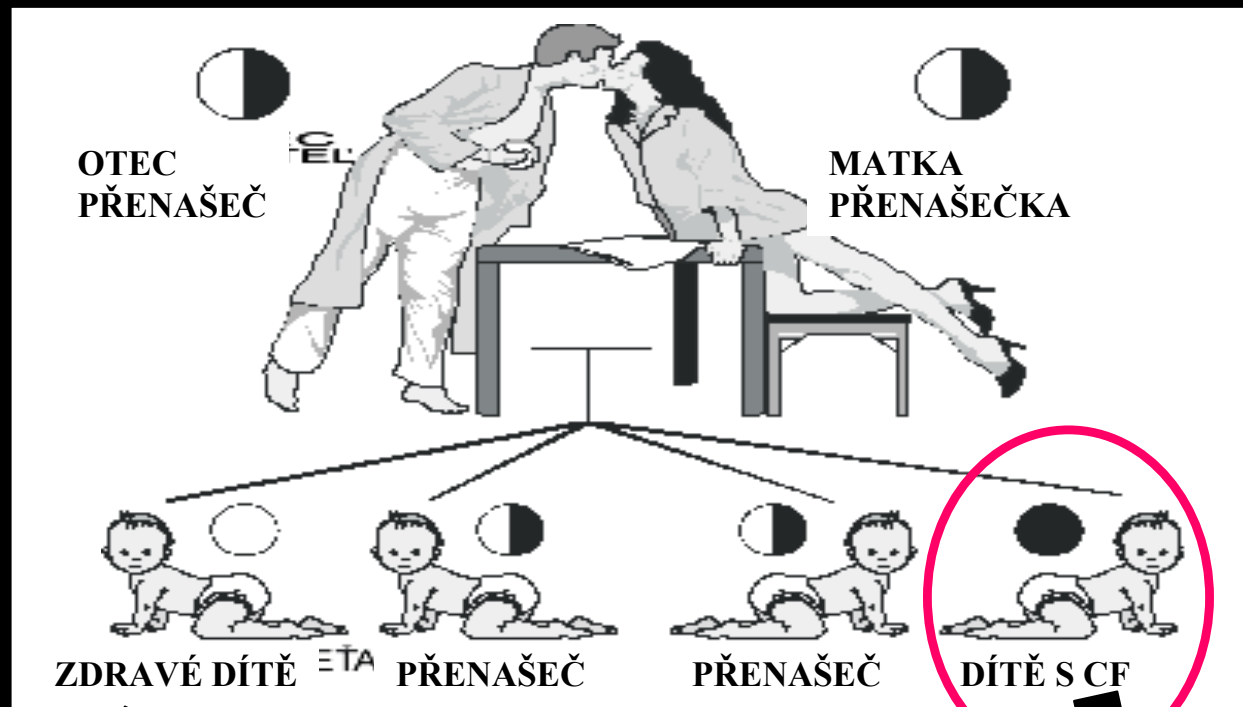
- **1291 CFTR mutací bylo nalezeno v CFTR genu**
(CFTR Mutation Table; <http://www.genet.sickkids.on.ca./cftr-cgi-bin/FullTable>)
- **Většina z nich je raritní, „privátní“ nebo jejich vztah k CF nebyl prokázán**
- **Z celkového počtu 30ti doposud u nás nalezených mutací (zahrnujících celkem 95% všech CF alel) se pouze 8 mutací vyskytuje na více než 1% CF patologických alel**
- **Je pozorováno široké rozpětí ve frekvenci jednotlivých mutací u různých populací**
- **Nejčastější mutace $\Delta F508$ je detekována u cca 70% CF pacientů**



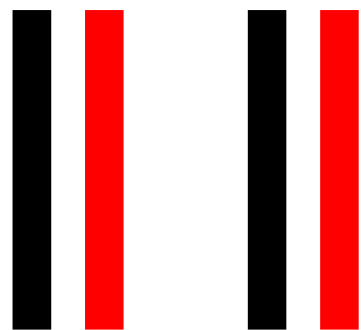
Mutace v genu CFTR u českých CF pacientů

F508del	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%

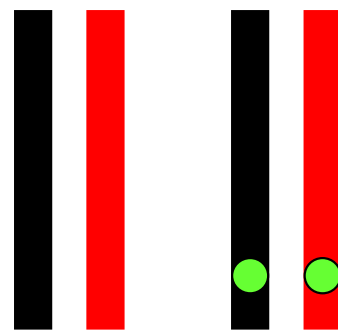
CF - autosomálně recesivní dědičnost



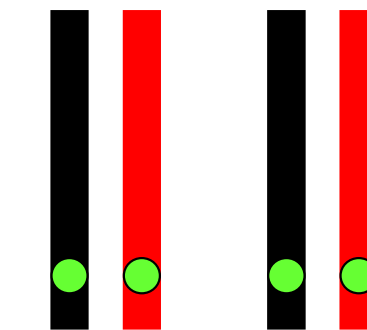
non mt / non mt



non mt / mutace



mutace / mutace

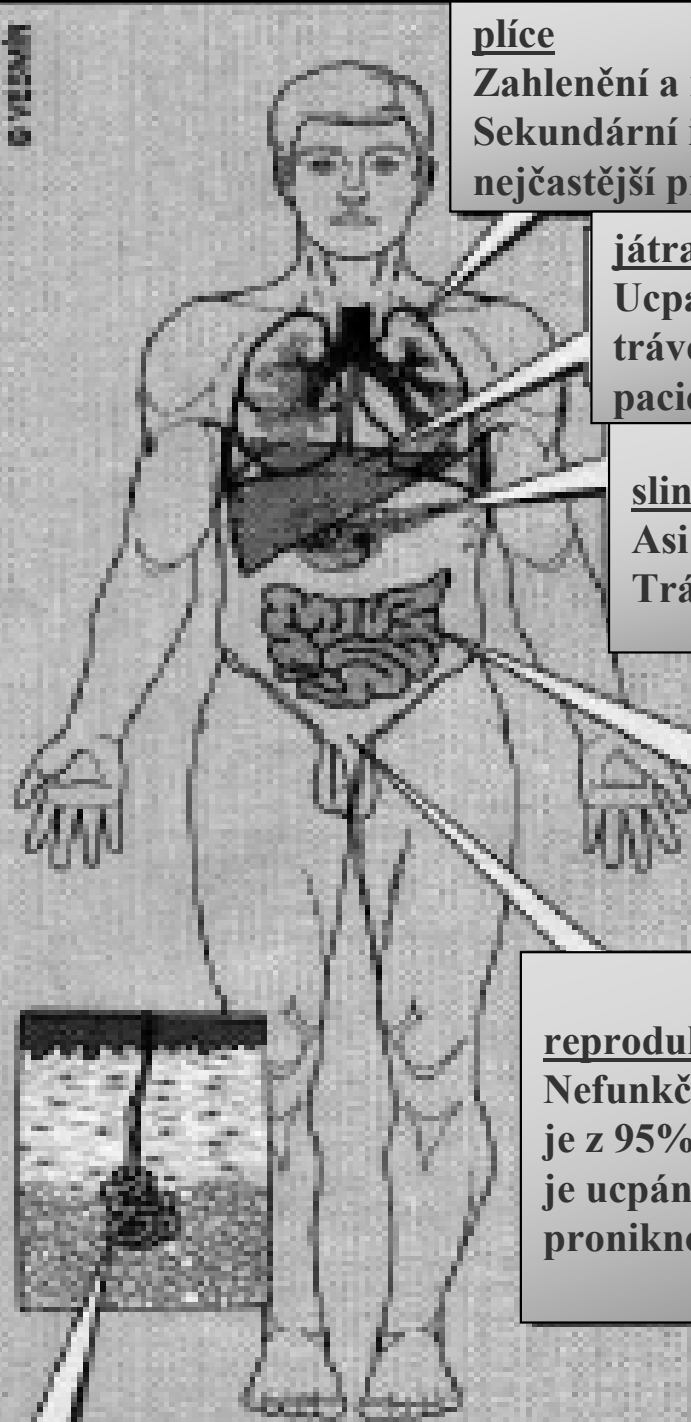


1. alela 2. alela

CF

polysystémové onemocnění

- **Zasahuje různé orgány**
 - **plíce**
 - **pankreas**
 - **trávicí trakt**
 - **reprodukční orgány**



plíce

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

játra

Ucpávání drobných žlučvodů 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.

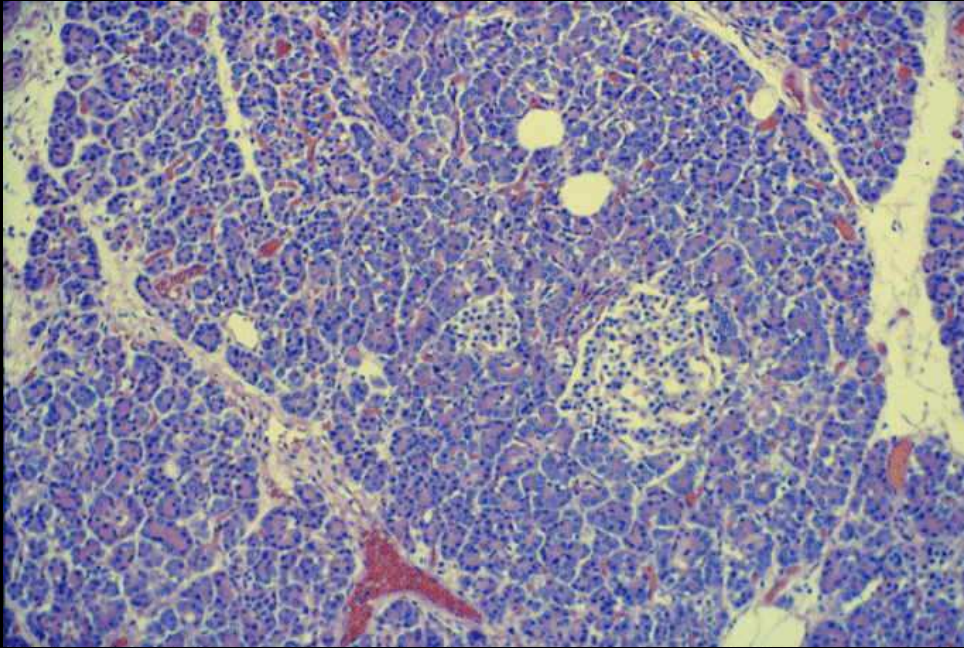
reprodukční orgány

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 spermiím proniknout dále do dělohy.

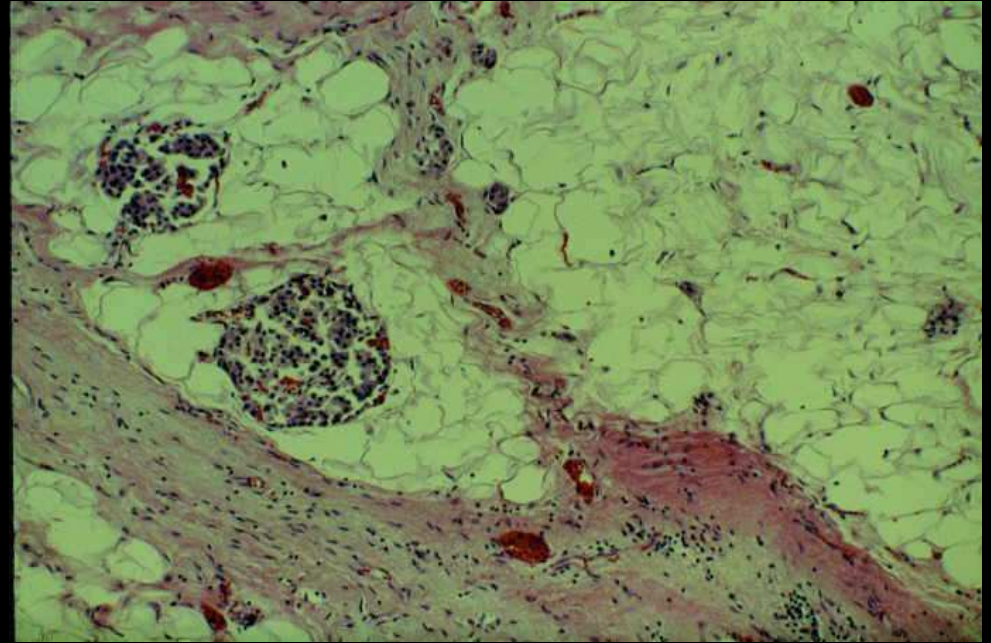
potní žlázy

Porušená funkce se projevuje nadměrným vylučováním solí (NaCl).

Pankreas

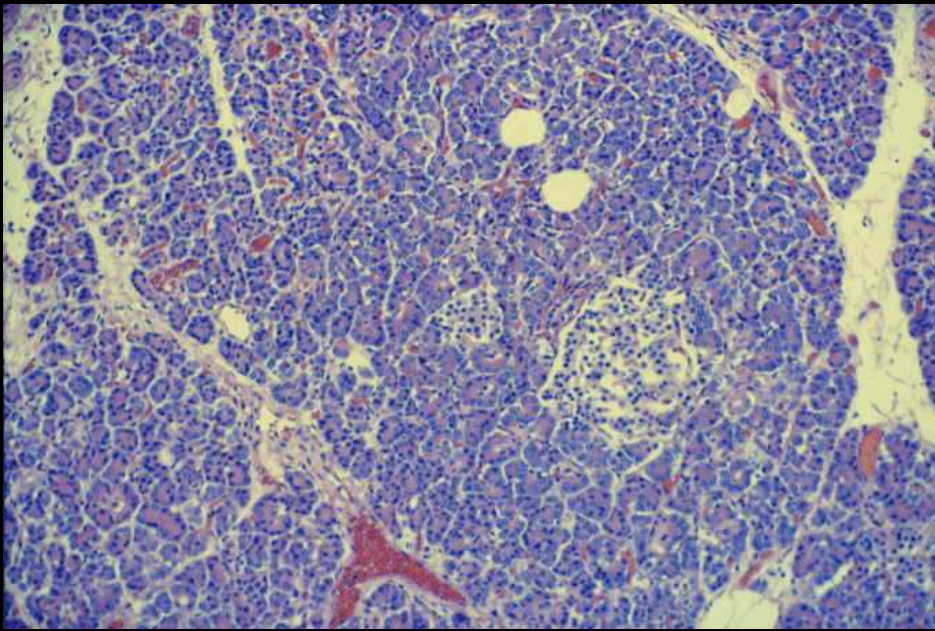


zdravý

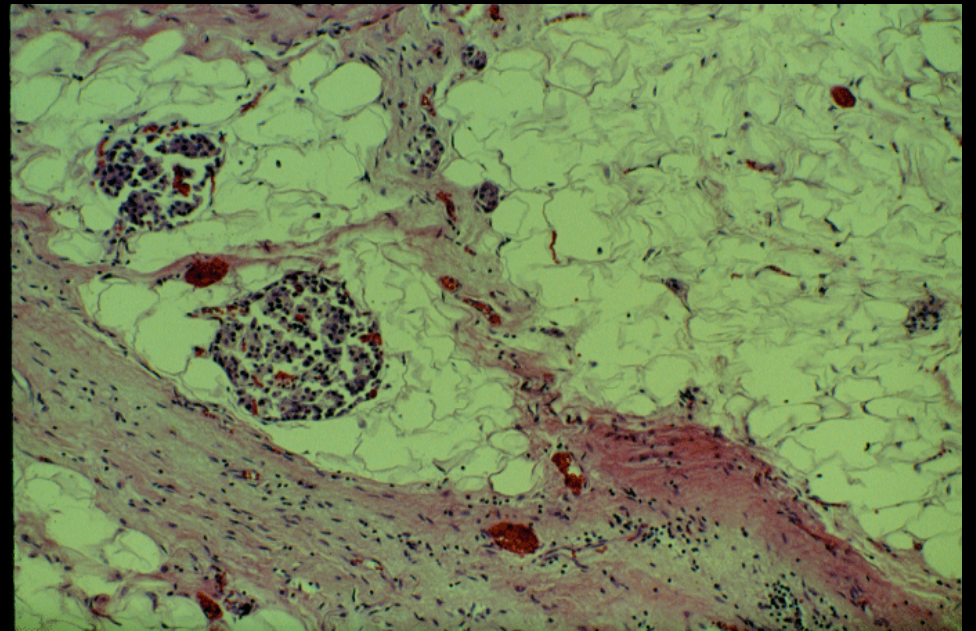


CF

Pankreas



normální pankreas



pankreas z CF pacienta

Plíce



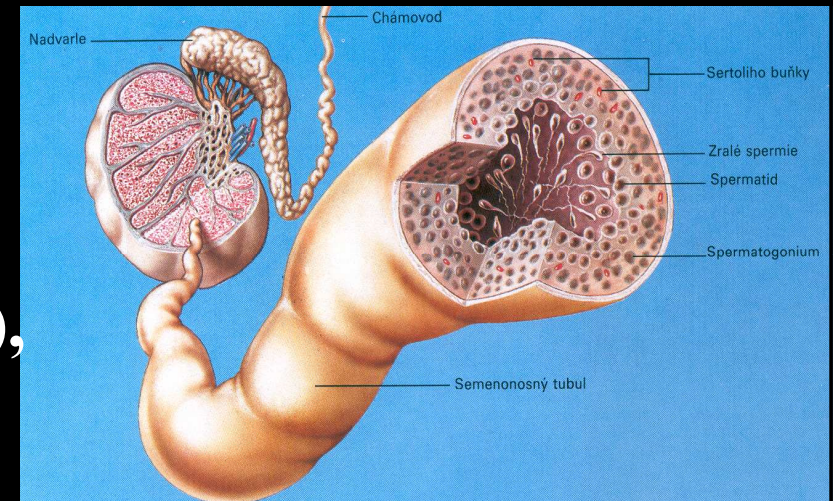
normální plíce



plíce z CF pacienta

Fertilita nemocných CF

- Sterilní v 95%
- Porucha vývoje vas differentia (CBVAD), epididymis a vesiculi seminalis



Obstruktivní azoospermie může být zcela izolovaným příznakem

Nejčastější mutace asociované s CBVAD:

**5T varianta v intronu 8
R117H**

- Plodnost snížena pro viskozitu cervikálního hlenu
- Častá primární nebo sekundární amenorrhea v důsledku poruch výživy a plicních změn

Cílená mutační analýza CFTR 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 ultrazvukový 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

Cystická fibróza

„Kaskádovitá“ strategie rutinní molekulárně genetické diagnostiky CF

suspektní CF pacient nebo přenašeč

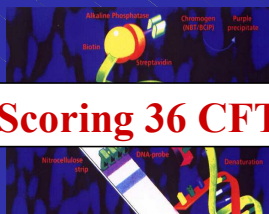
partner přenašeče přenašeč

Scoring 6 nejčastějších CFTR mutací



jedna nebo obě alely neidentifikovány

Scoring 36 CFTR mutací



obě CF alely identifikovány

CF diagnóza potvrzena

jedna nebo obě alely neidentifikovány

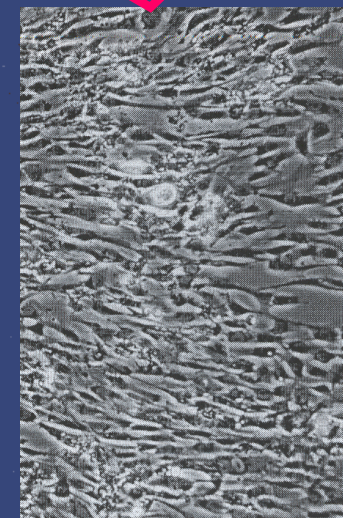
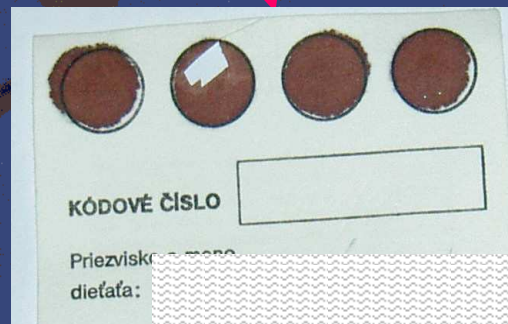
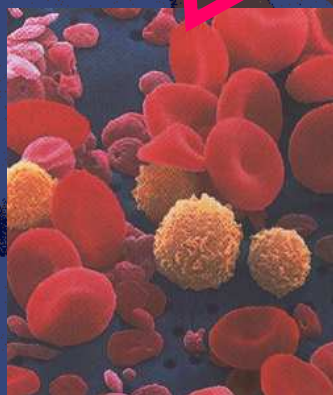
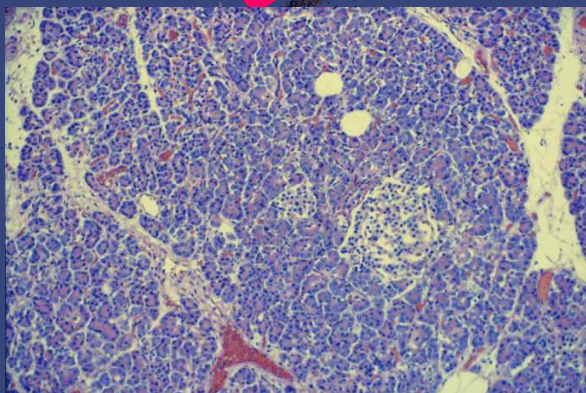
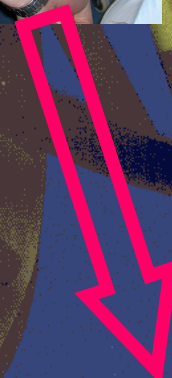
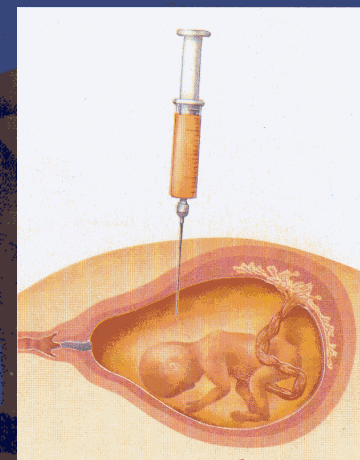
Scanning celé CFTR-codující sekvence



Izolace DNA

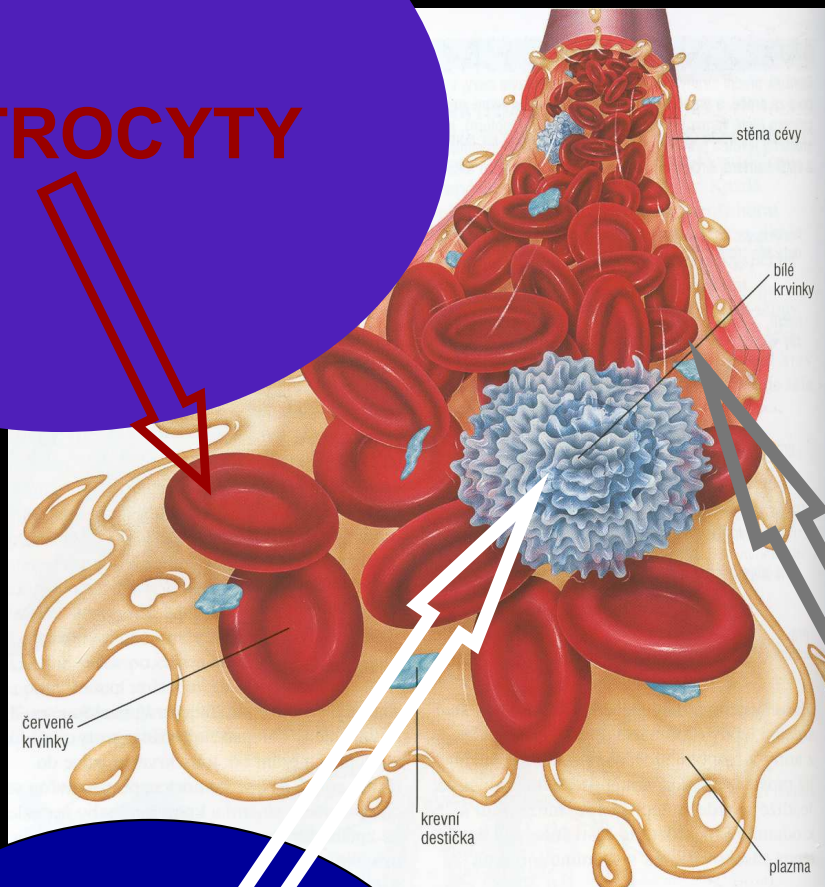


Biologický materiál pro izolaci DNA



Periferní krev

ERYTROCYTY



LEUKOCYTY

KREVNÍ DESTIČKY



Naředěná periferní krev před zpracováním





Erythrocyty

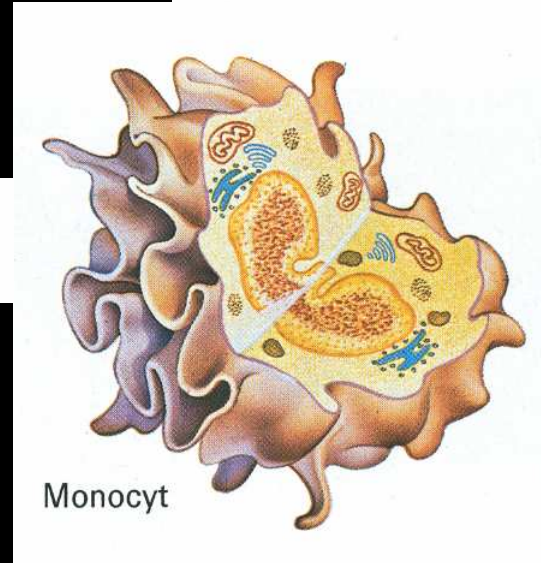
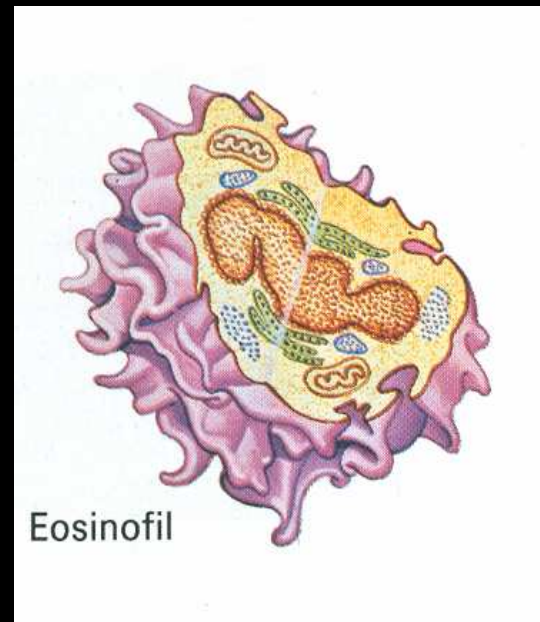
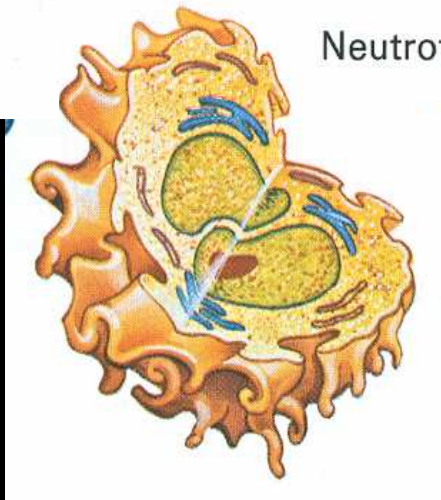
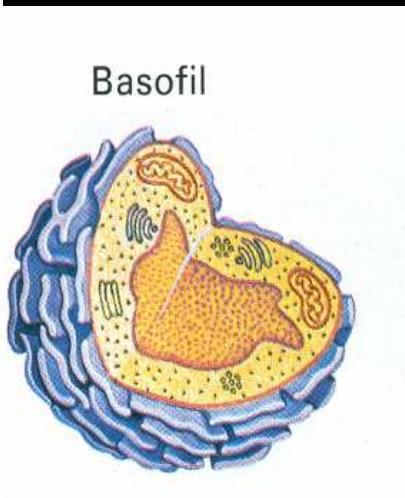
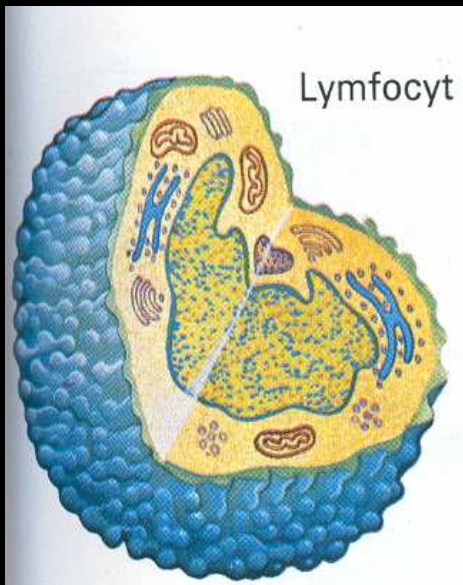
Odstranění erytrocytů

Sediment leukocytů



Leukocytv

IZOLACE DNA Z JEJICH JADER





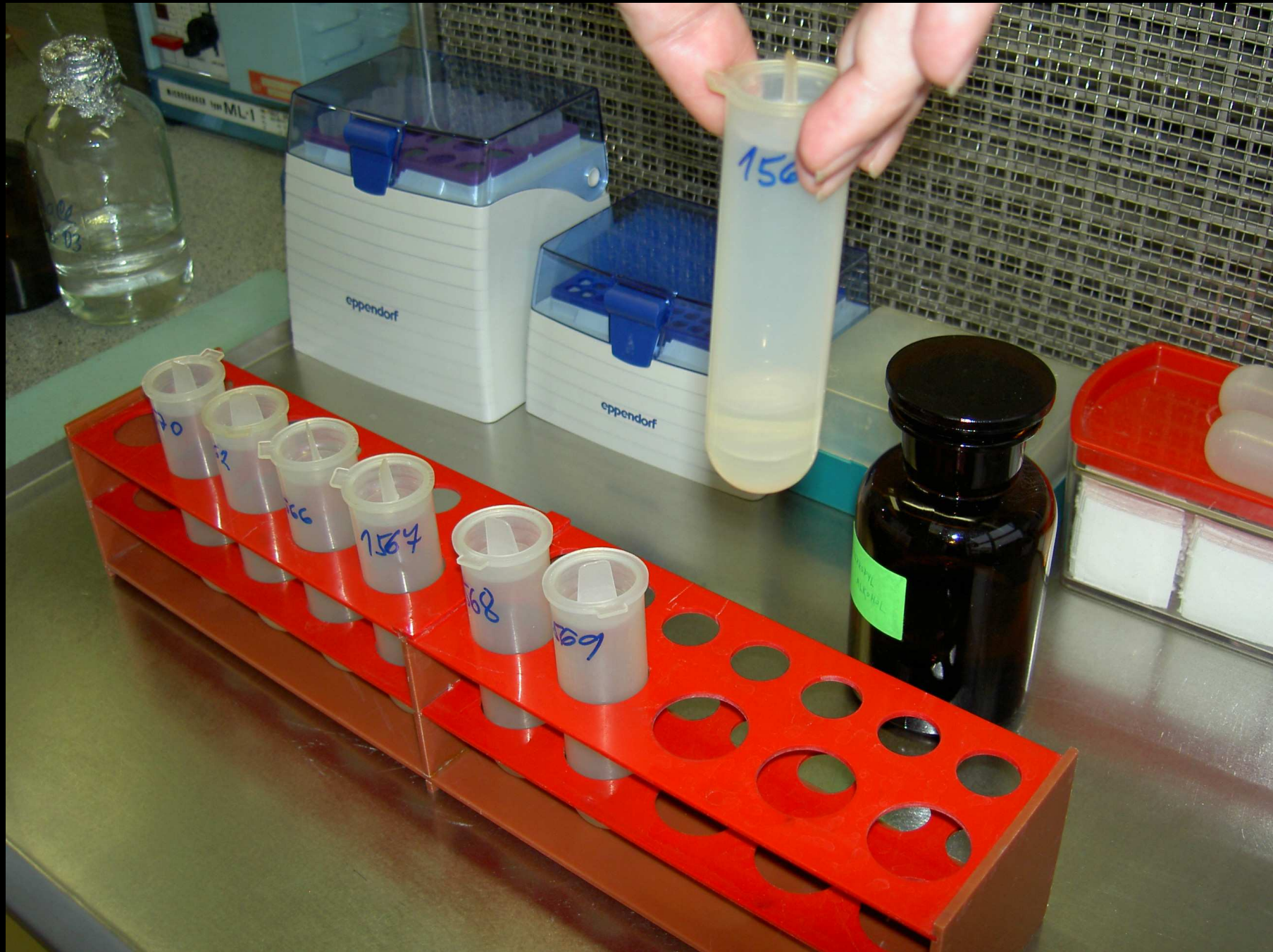
PROBLEMOWANIE
DLA CZĘŚCI SERWISU

Biofuge *stratus* Heraeus

Varifuge 20 RS

Heraeus
SER

Stav po deproteinaci



Vysrážená DNA



Vysrážená DNA



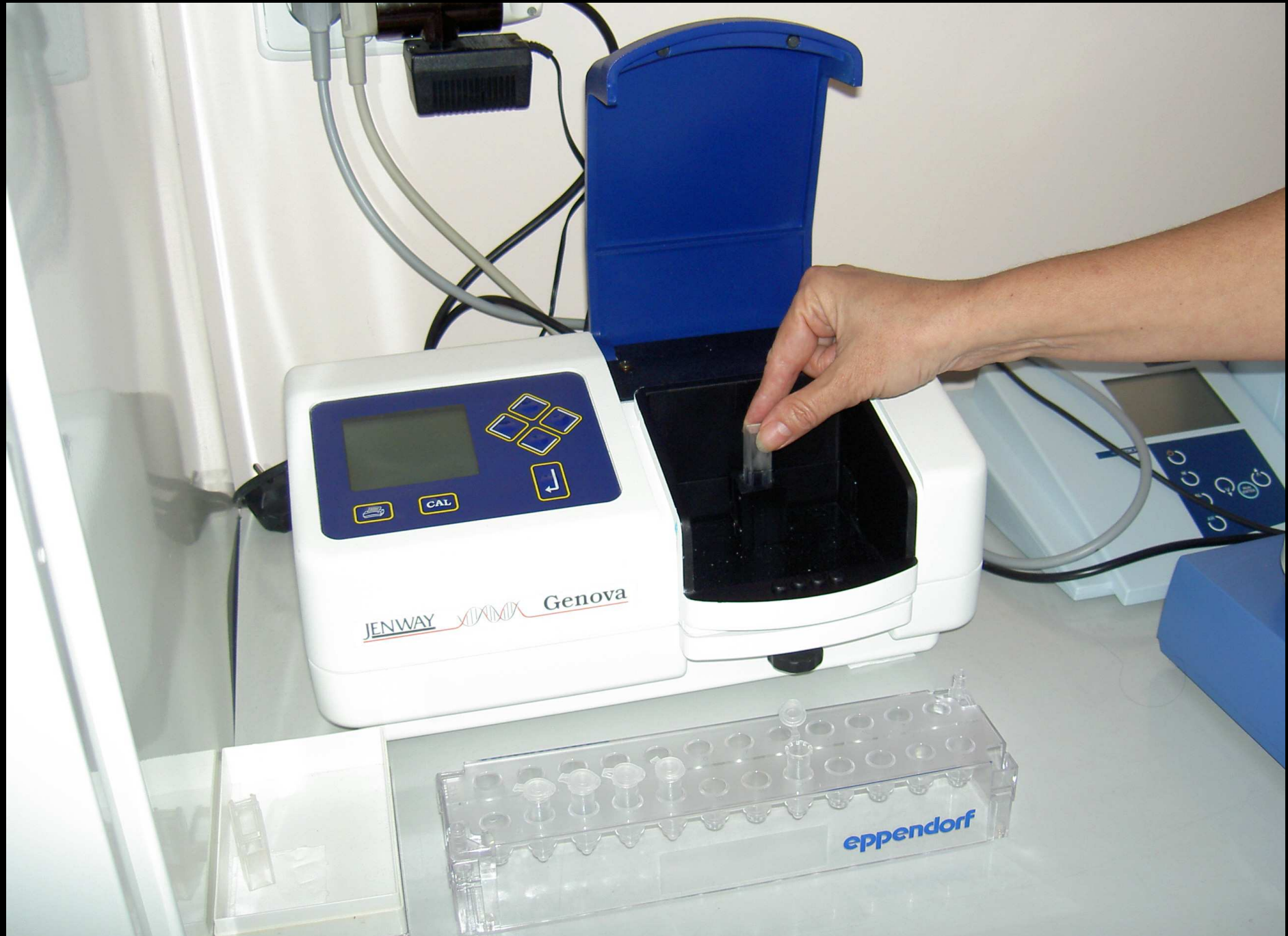
Vysrážená DNA



Vysrážená DNA



Měření koncentrace DNA na spektrofotometru



DNA banka



Polymerázová řetězová reakce (PCR)



- dNTP
- primery
- DNA polymeráza

možnost zvolení úsek DNA

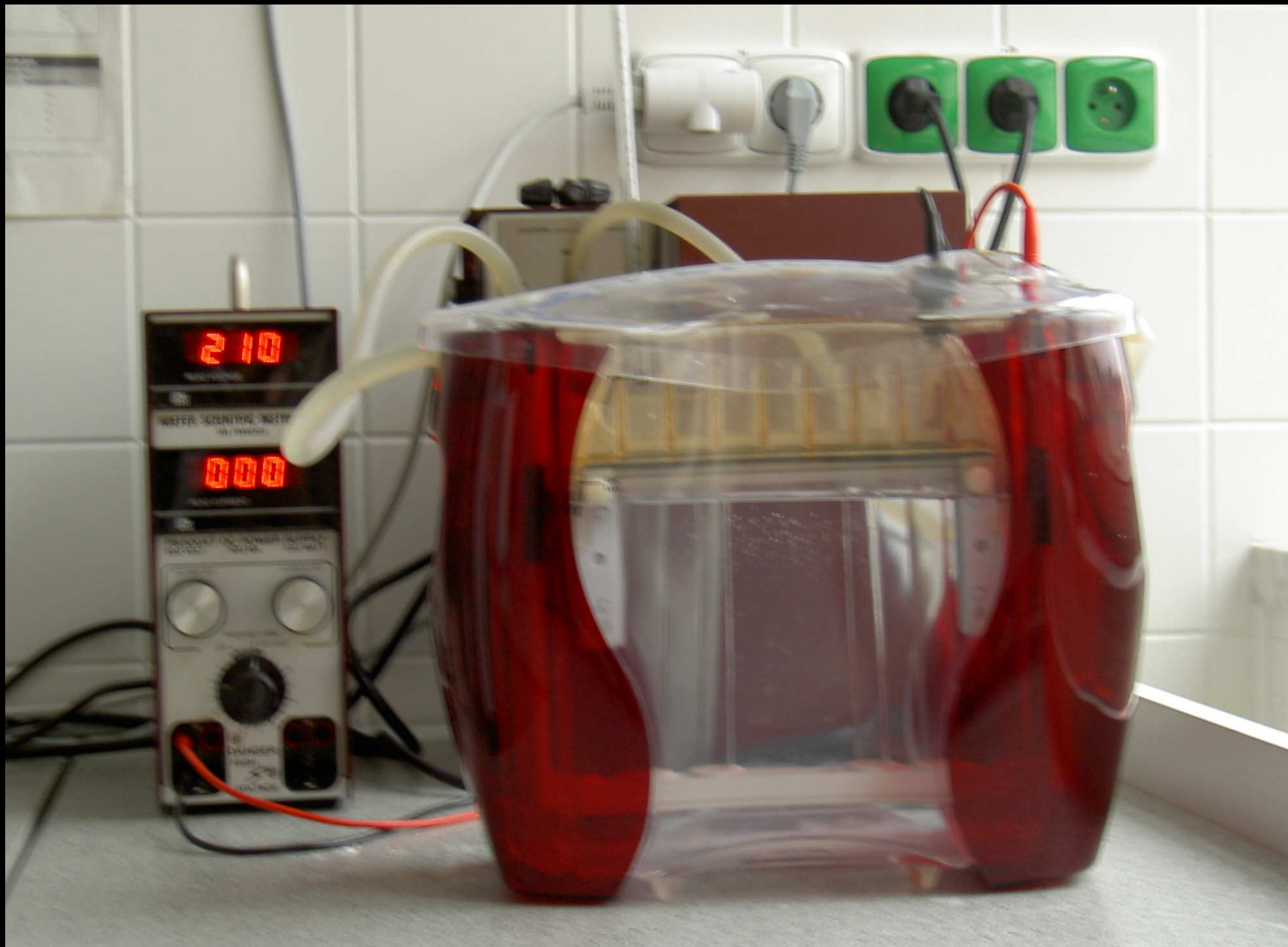
**Detekce 5ti nejčastějších CF mutací
klasickými
molekulárně genetickými
metodami**













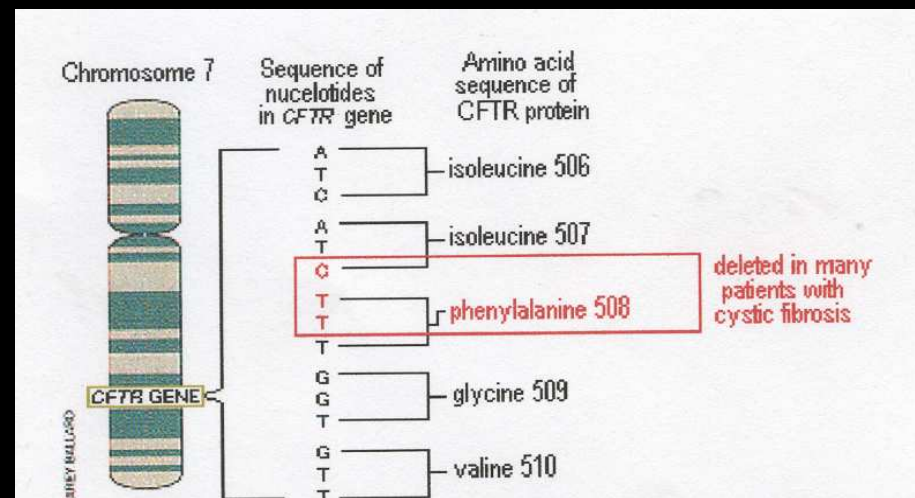
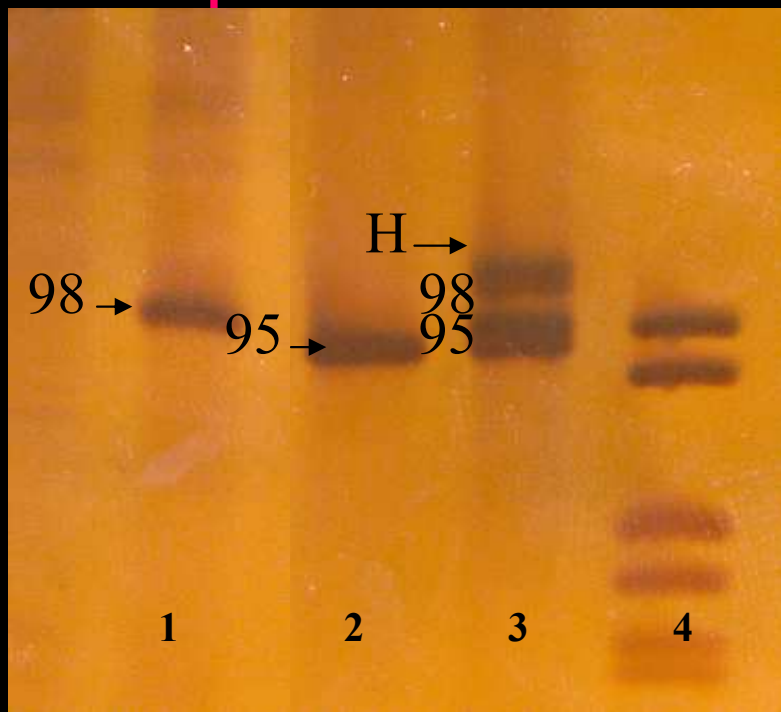
Detekce mutace dF508

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**



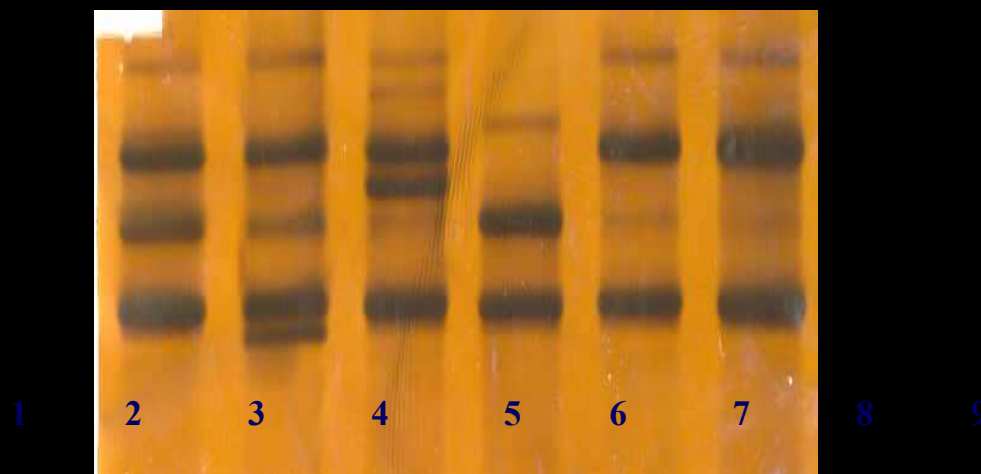
- *Bandy značené 95,98 jsou 95- a 98-párů bází dlouhé PCR produkty*
- *Band značené H jsou heteroduplexy formované chybně spárovanými jednořetězci DNA (95/98 a 98/95)*

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

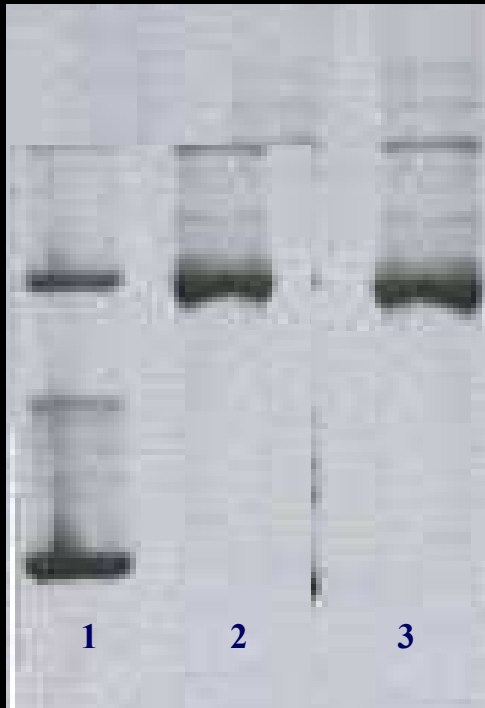


ELFO - 8% PAGE (40:1), 150V, 20°C, 16 hodin

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

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

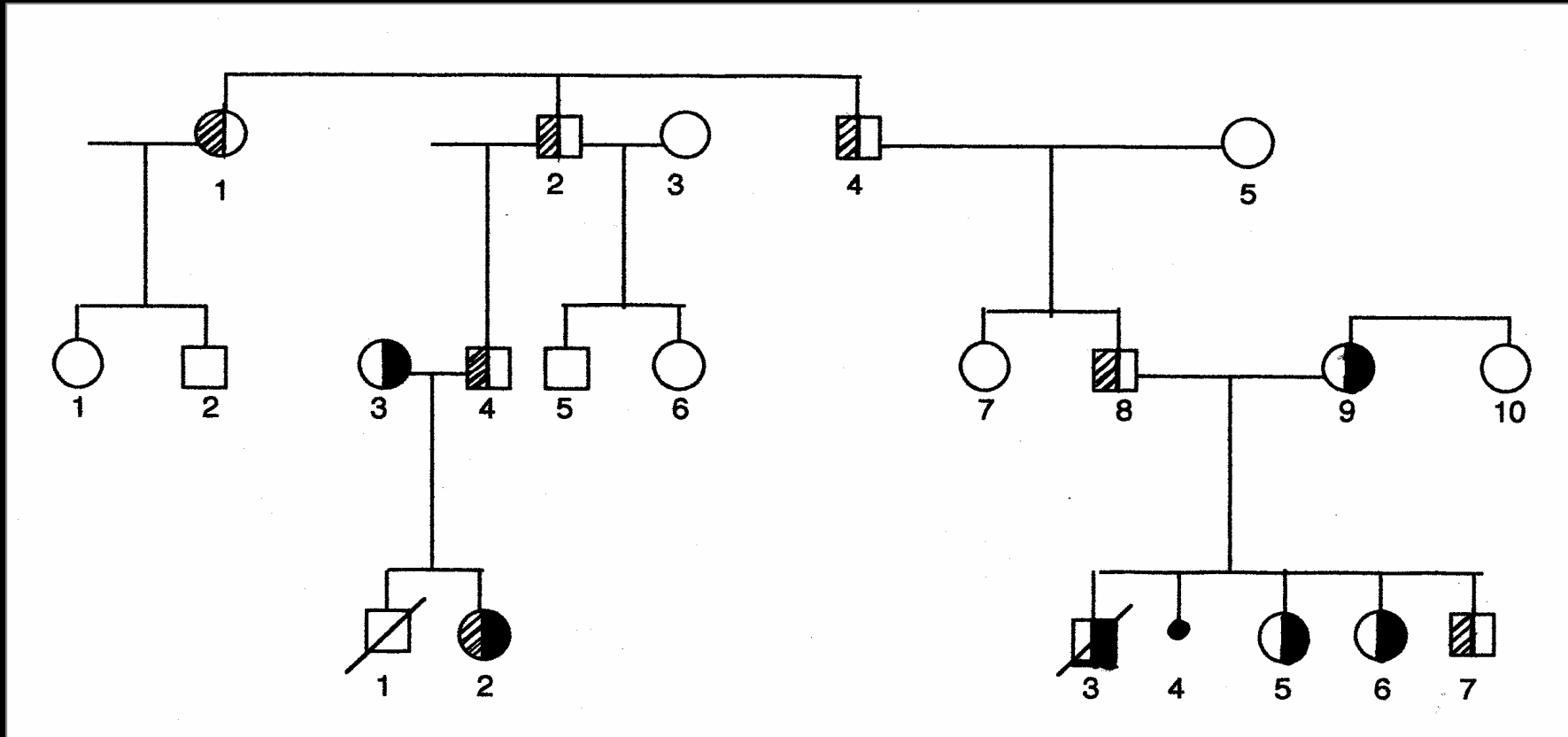


nepřítomnost delece


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

Rodokmen rodiny P.

I.
II.
III.



 $\Delta F508 / \text{non}$

 $\text{CFTRdele2,3(21kb)} / \text{non}$

Pacient J.F.

Suspektní CF

Věk: 30 let !

Detekována mutace $\Delta F508$ na obou alelách genu CFTR

genotyp $\Delta F508 / \Delta F508$

potvrzena dg. CF

50% CF pacientů diagnostikováno do 3 let života

90% CF pacientů diagnostikováno do 10 let života

Využití Real – Time PCR v detekci CF mutací



Test založený na analýze bodu tání fluorescenčně značených prob po vysokorychlostní PCR na přístroji LightCycler

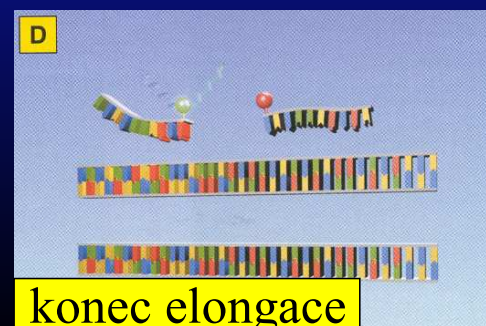
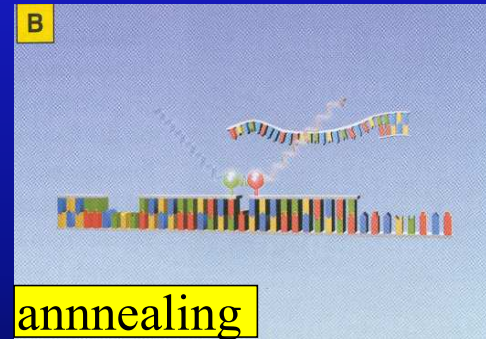


- rychlý
- bezpečný
- snadno interpretovatelný

Princip detekce mutací na přístroji Light Cycler

PCR: primer F,R

hybridizace: donor, akceptor proby



LightCycler

Roche



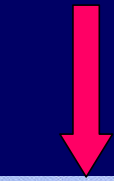
CFTRdele2,3(21kb)

G542X

G551D

R553X

dF508



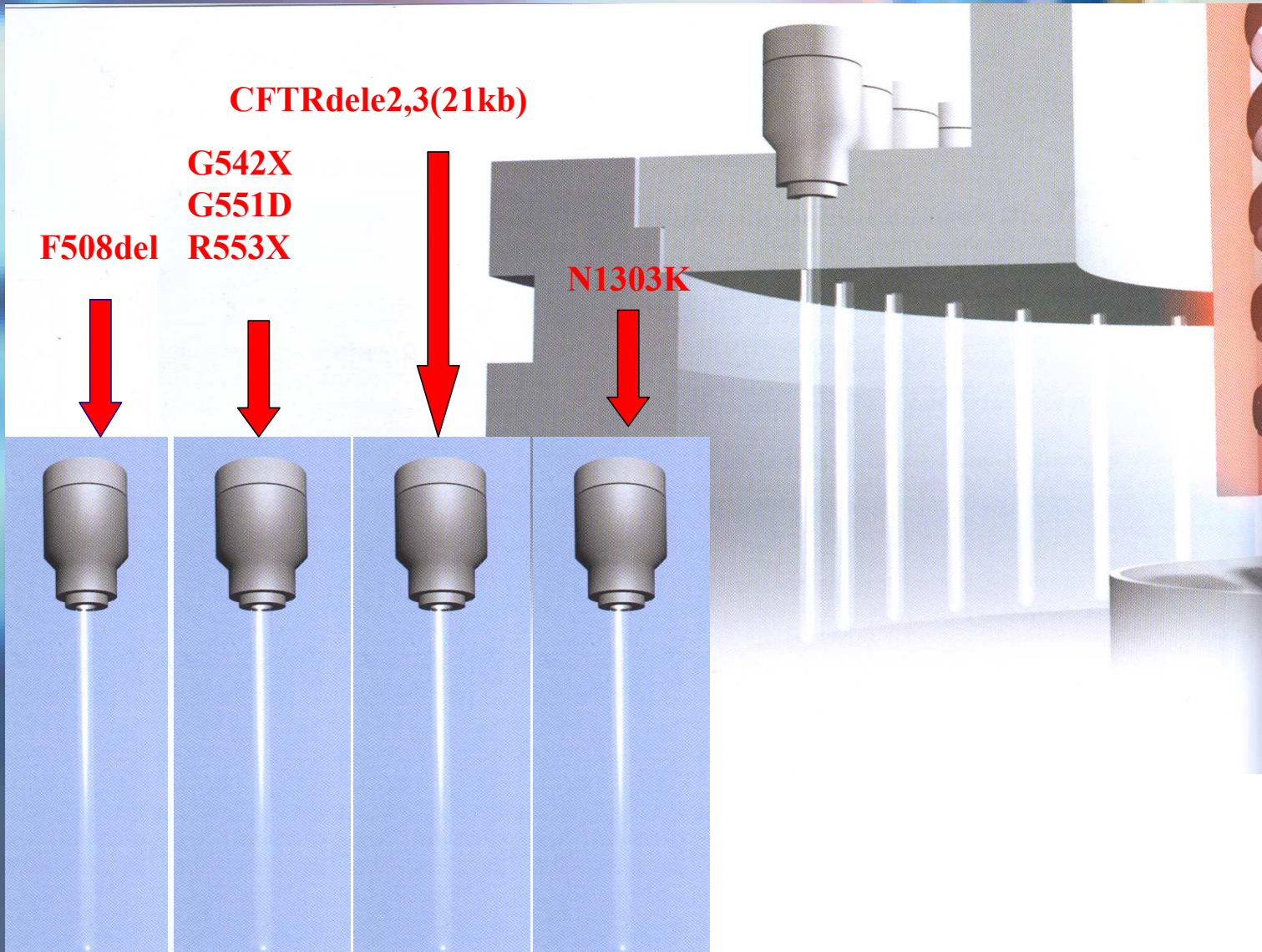
- Set 3 separovaných PCR reakcí u jednoho testovaného jedince
- 5 nejčastějších CF mutací je detekováno za 1 hodinu

LightCycler

Roche

Cystická fibróza

scoring nejčastějších mutací

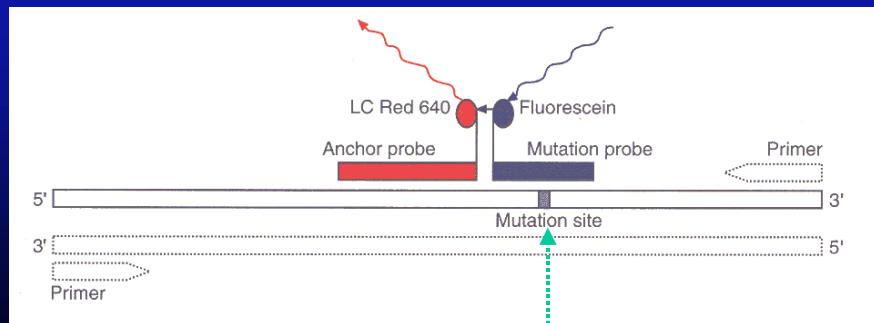




Detekce mutace dF508

PCR:
jeden pár primerů

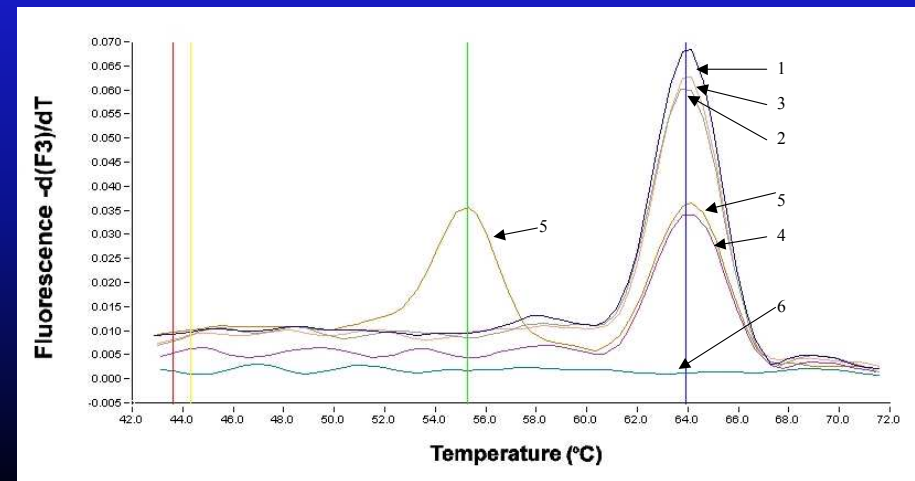
Analýza bodu tání:
jeden systém prob



according to Burgraf, 2001

Fluorescenční monitoring dF508 lokusu

- 1 — wt
- 2 — wt
- 3 — wt
- 4 — wt
- 5 — dF508/nondF508
- 6 — K⁻DNA



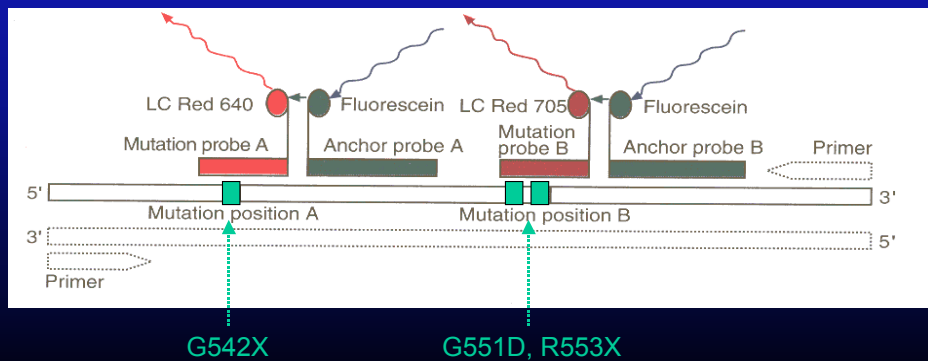
LightCycler



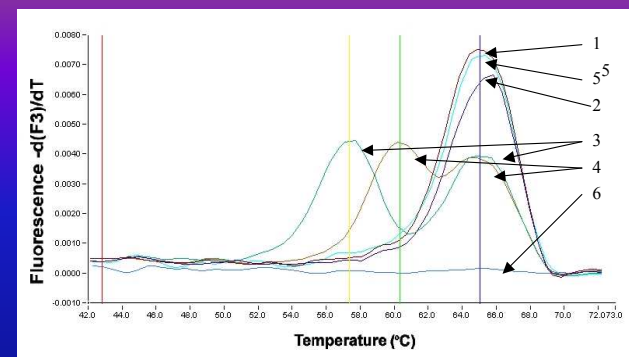
Detekce mutací G542X, G551D a R553X

PCR:
jeden pár primerů

Analýza bodu tání:
dva systémy prob

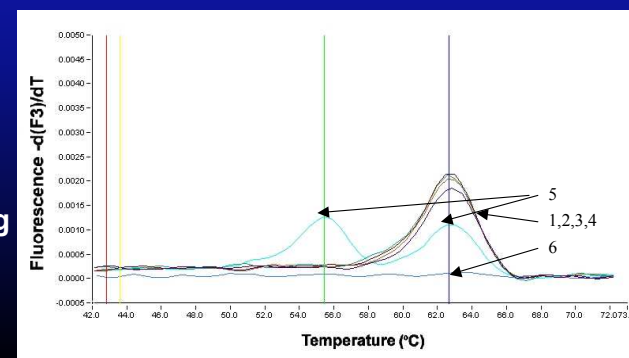


**Fluorescenční monitoring
G551D/R553X lokusu**



- 1 — wt
- 2 — wt
- 3 — R553X/non
- 4 — G551D/non
- 5 — G542X/non
- 6 — K-DNA

**Fluorescenční monitoring
G542X lokusu**



according to Burgraf, 2001

LightCycler

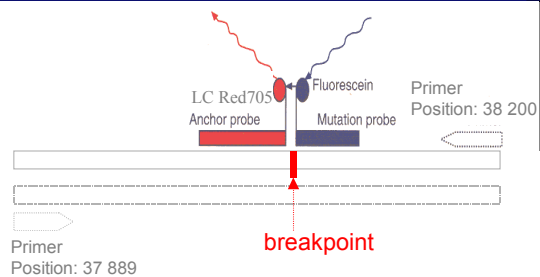


Detekce mutace CFTRdele2,3(21kb)

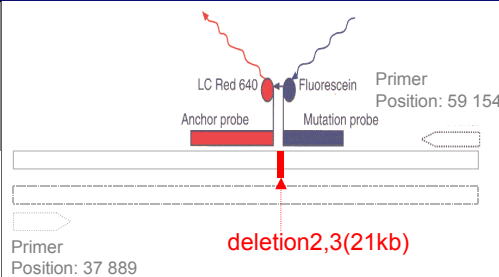
PCR:
jeden F primer
dva specifické R primery

Analýza bodu tání:
dva systémy prob

Fluorescenční analýza lokusu s delecí



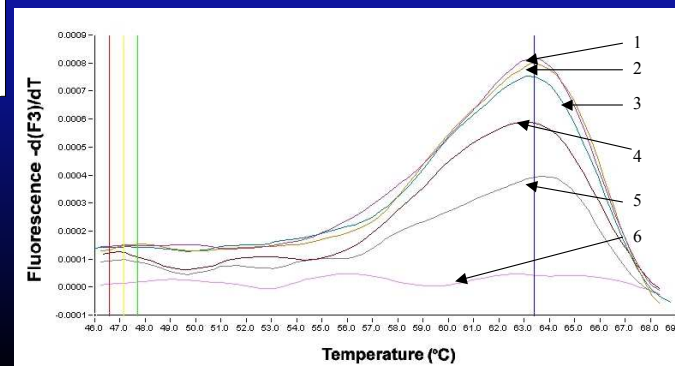
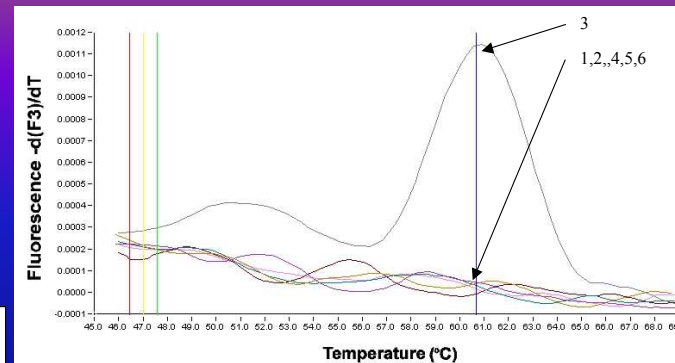
Alela bez delecce - wt



Alela s delecí - mt

- 1 — wt
- 2 — wt
- 3 — CFTRdele2,3(21kb)/non
- 4 — wt
- 5 — wt
- 6 — K-DNA

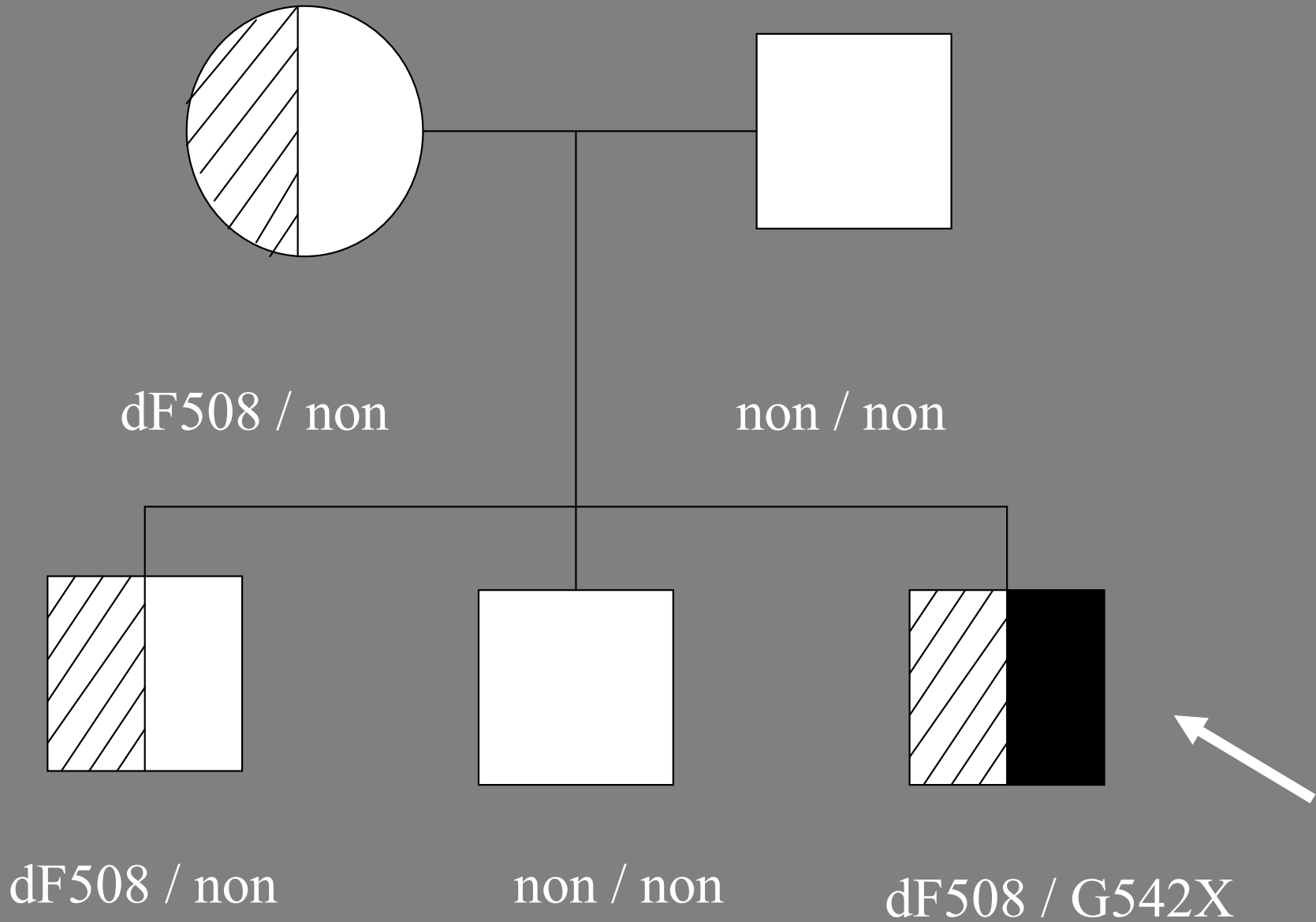
Fluorescenční analýza lokusu bez delecce



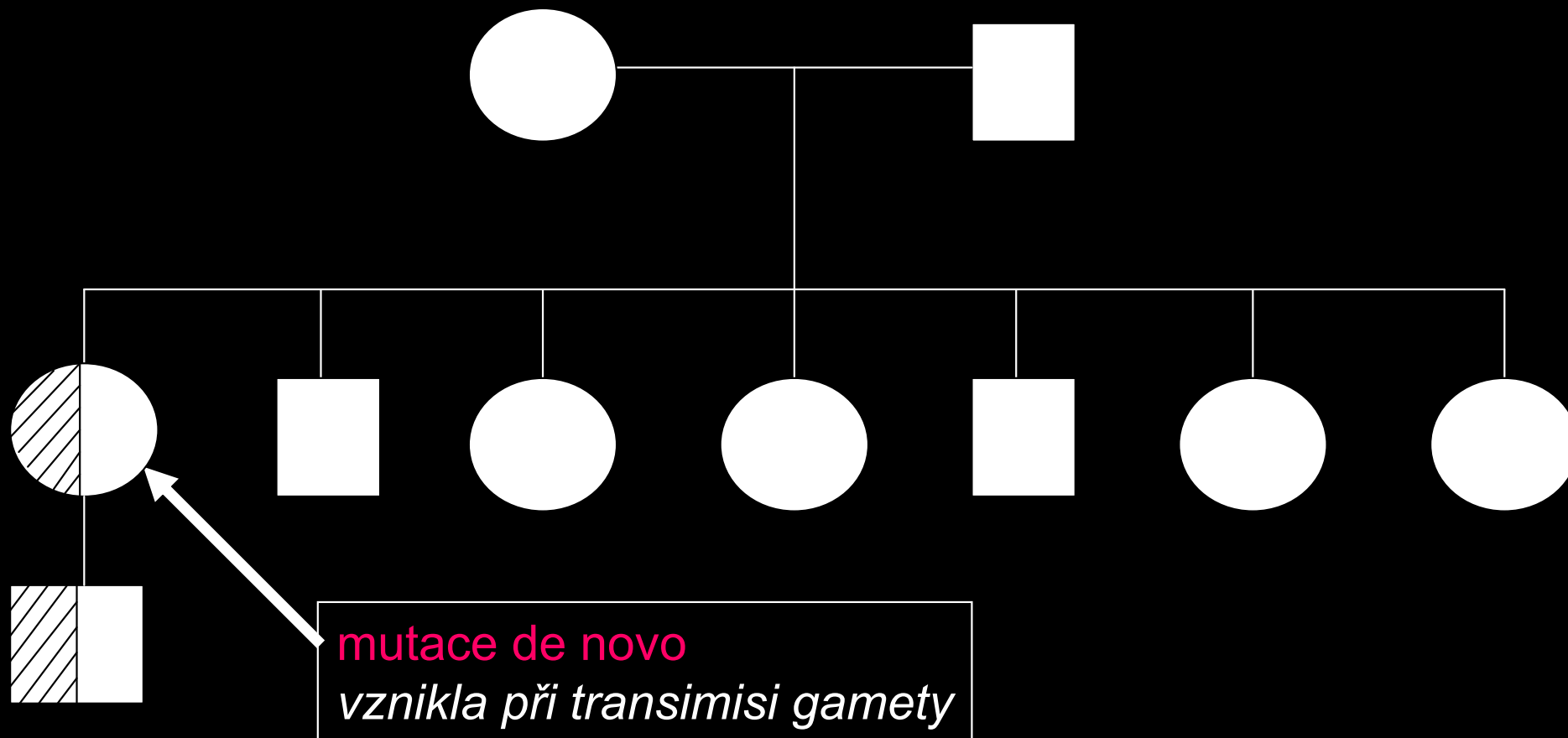
LightCycler



Rodina M.



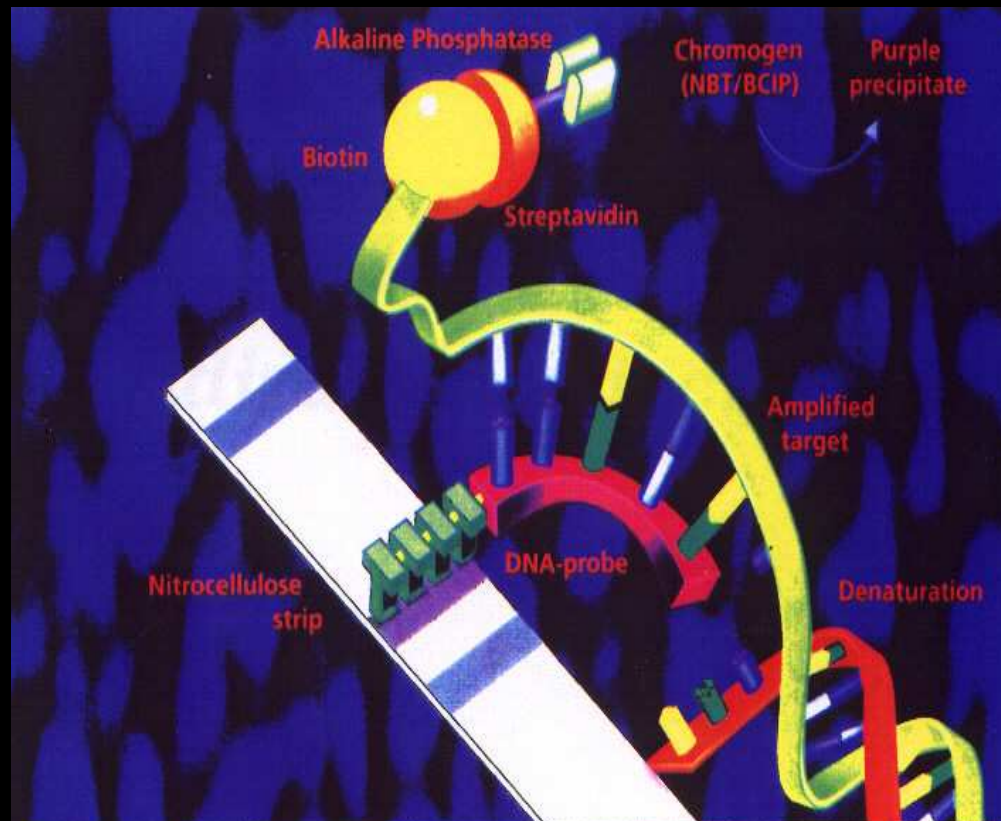
Rodina E.,K.



  CFTRdele2,3 / non

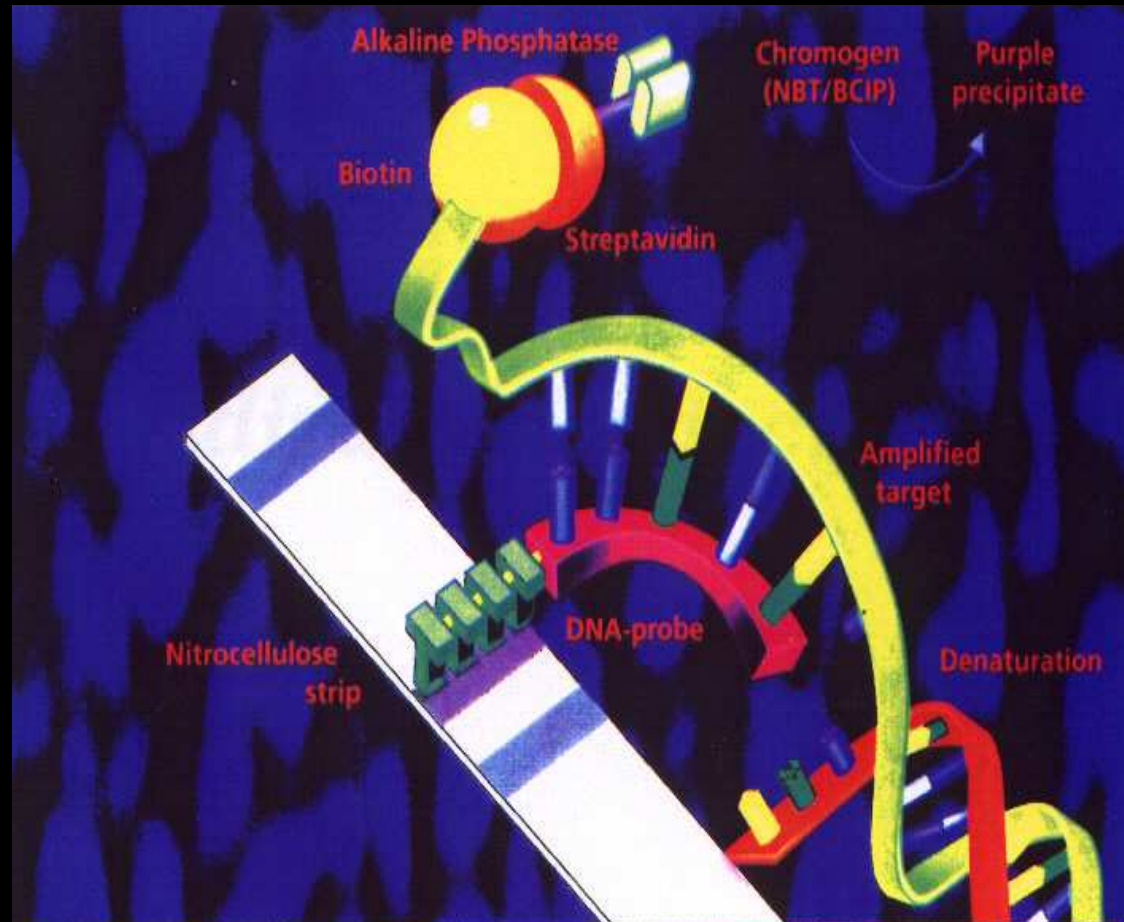
  non / non

Analýza CF mutací pomocí hybridizační techniky INNO - LiPA



Spektrum analyzovaných CF mutací je rozšířeno použitím

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



19 a 17 CF mutací
a jejich wild-type sekvence

Identifikuje

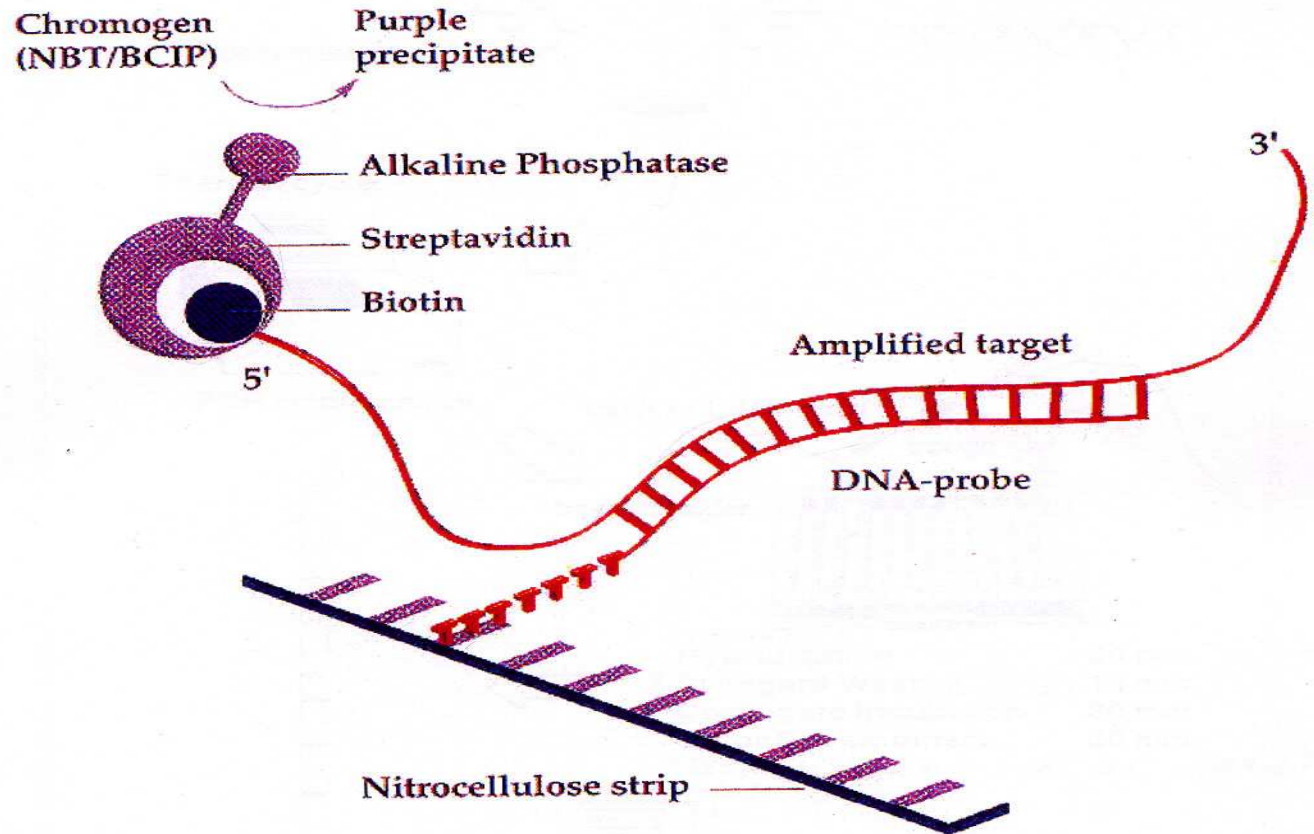
polymorphism Tn (intron 8)
asociovaný s CBVAD

Mutace	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



Nitrocellulose
strip

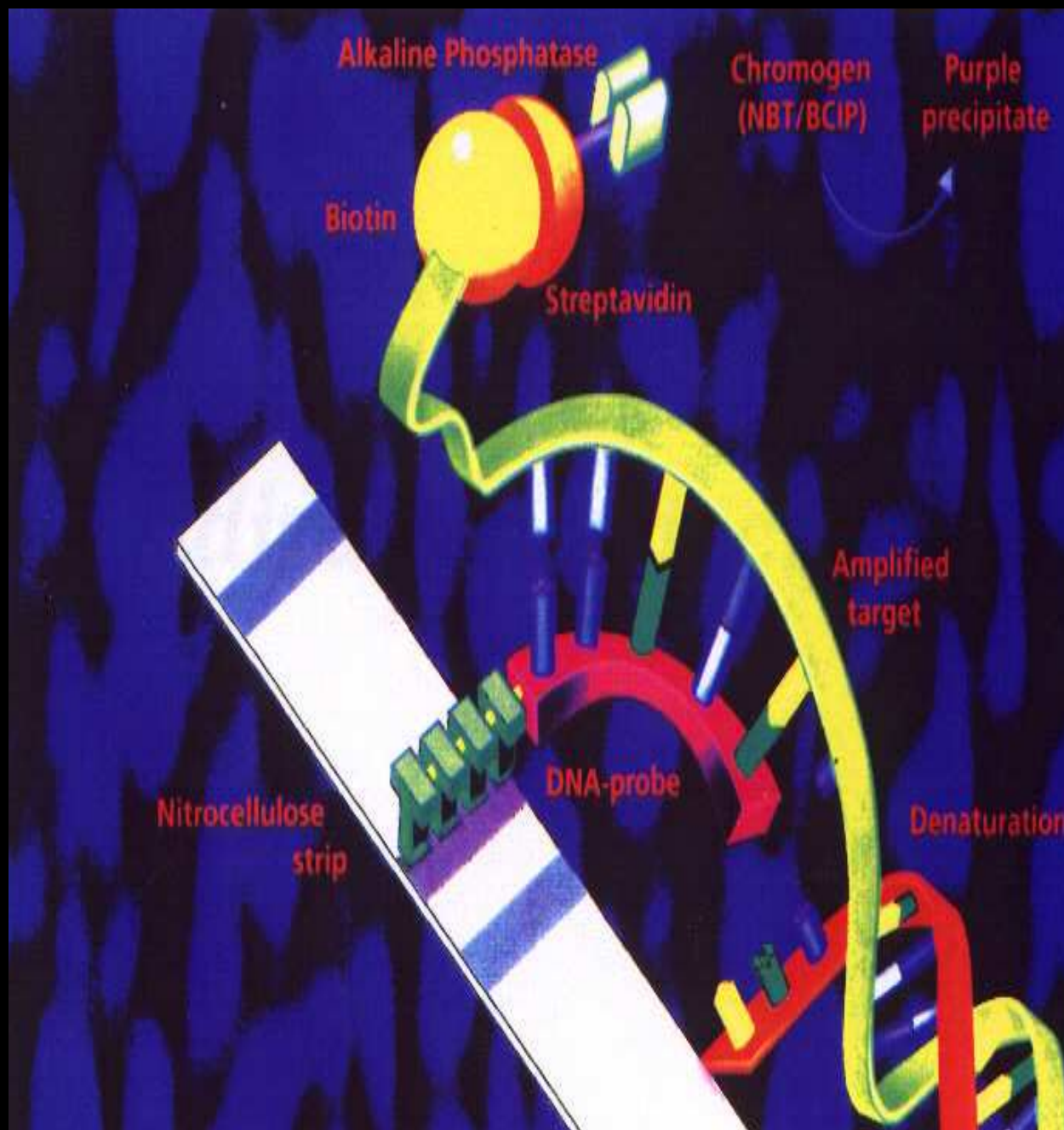


Jeden vzorek

Jedna amplifikace

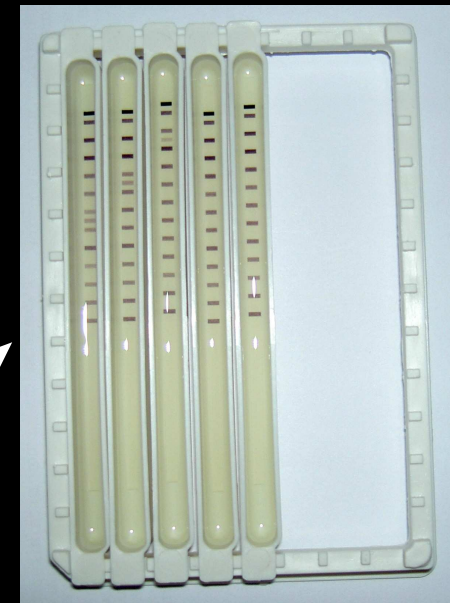
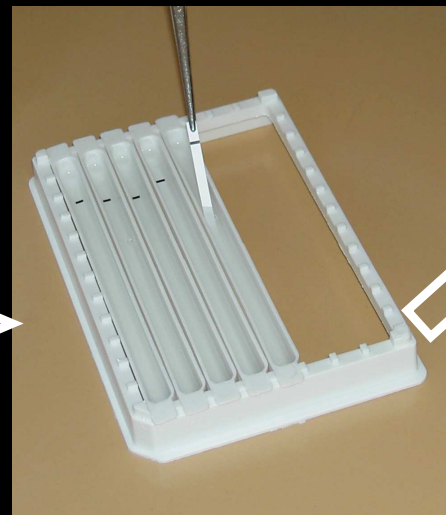
Jeden strip

Výsledek
multihybridizace do
3 hodin po amplifikaci



Komponenty pro PCR

- dNTP
- primery značené biotinem
- DNA polymeráza



PCR



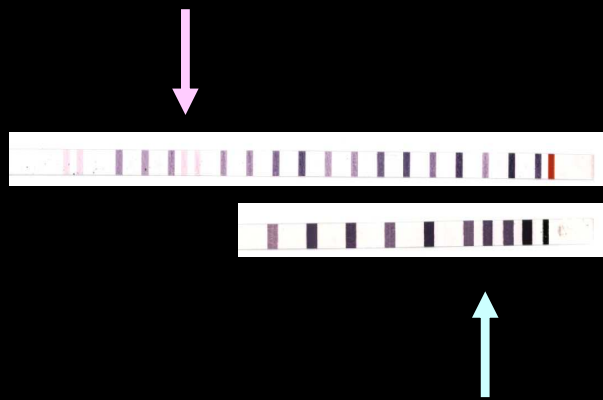
hybridizace

barvení

Pacientka Z.V., 15 let

důvod vyšetření: rok trvající kašel

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



Výsledek mutační analýzy CFTR genu

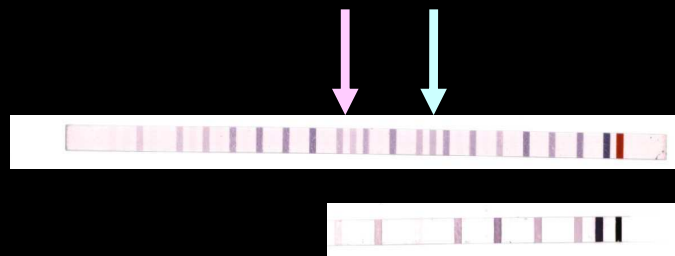
genotyp : **dF508 / 3849+10kb**

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



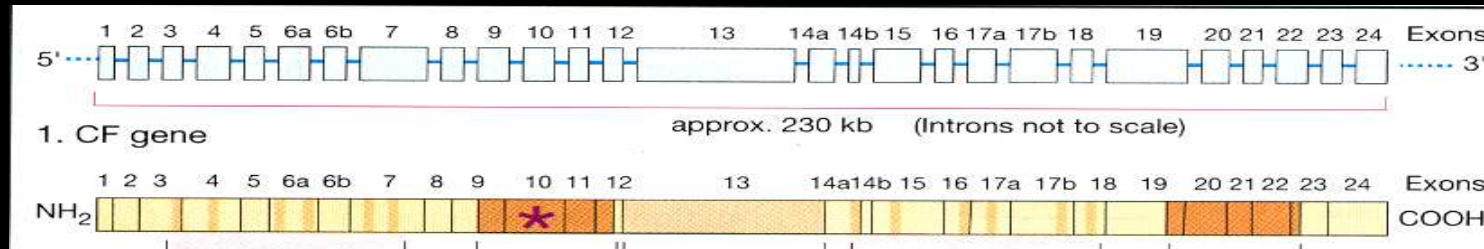
Výsledek mutační analýzy genu CFTR

genotyp: R347P / 711+5 GtoA

dg. CF potvrzena

**Uvedenými postupy však nejsme schopni detekovat
raritní 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

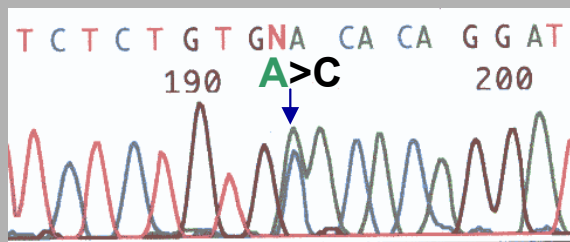
Exon	Length of fragments (bp)	Run time (h)	Denatur. gradient (%)	Annealing temperature (°C)
1	451	7	40-80	55
7	365	6	10-60	50
13 (1)	516	2	25-75	55
17a	283	4	10-60	50
24	362	4	30-80	60





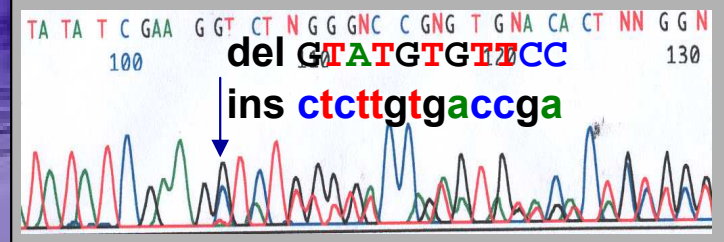
Proband	Mutations (direct analysis)	DGGE analysis			
		Determined mutations		Determined SNP	
		Localization	Mutation	Localization	SNP
1	[?]+[?]	In 12	1898+1G>A	Ex14a	T854T
2	[ΔF508]+[?]	Ex14a	2668del11>ins13	Ex14a	T854T
3	[ΔF508]+[?]	In 23	4374+1G>T	-	-
4	[?]+[?]	In 12	1898+1G>A	-	-
5	[ΔF508]+[?]	-	-	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	M952I	Ex14a	T854T
14	[ΔF508]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
15	[3849+10kbC>T]+[?]	Ex 7	I336K	Ex14a	T854T
16	[?]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
18	[?]+[?]	-	-	Ex14a	T854T
19	[ΔF508]+[?]	Ex 23	E1401A	Ex14a	T854T

4334 AtoC, E1401A, AAC>CAC



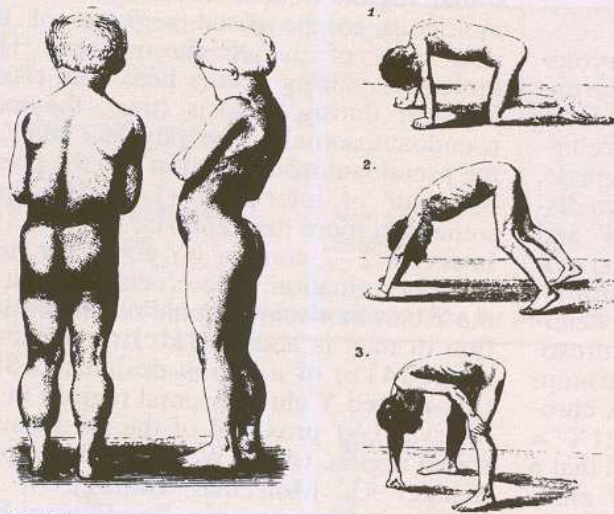
nové mutace

2668del11>ins13, frameshift



Duchennova muskulární dystrofie

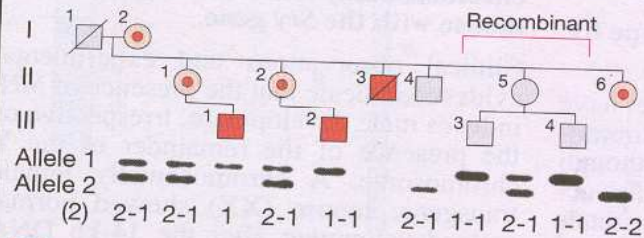
- těžká X-recesivní monogenně dědičná choroba
- primární příčina: mutace v dystrofinovém genu (Xp21)
- incidence choroby 1:3500 novorozených chlapců
- destrukce svalových vláken
- fenotyp:
 - 1) špatné držení těla, potíže při zvedání se ze země
 - 2) narůstající svalová slabost
 - 3) pseudohypertrofie 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

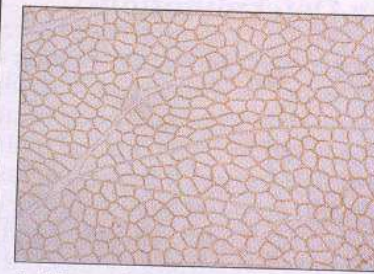
2. Difficulty in rising (Gower's sign)

A. Clinical signs of Duchenne muscular dystrophy



■ = DMD patient ● = Obligate heterozygote

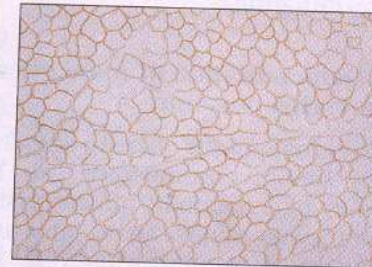
C. Investigation of a family with DMD by DNA marker



1. Normal dystrophin



2. Dystrophin absent



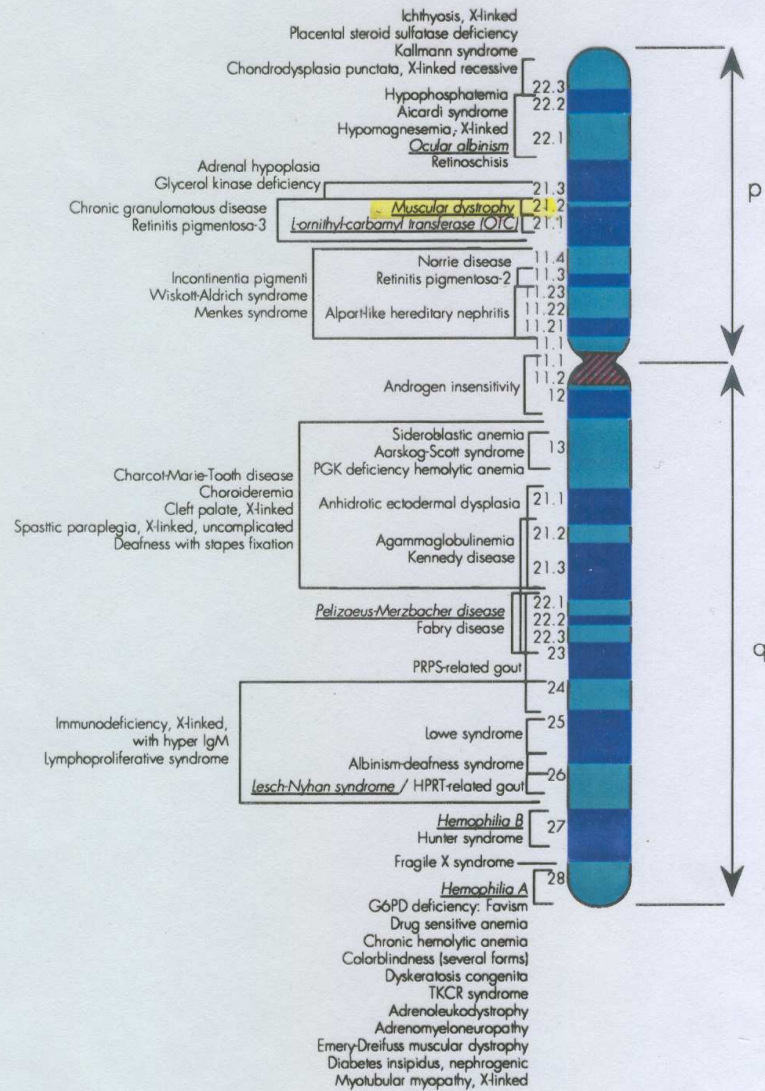
3. Areas lacking dystrophin in heterozygotes

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

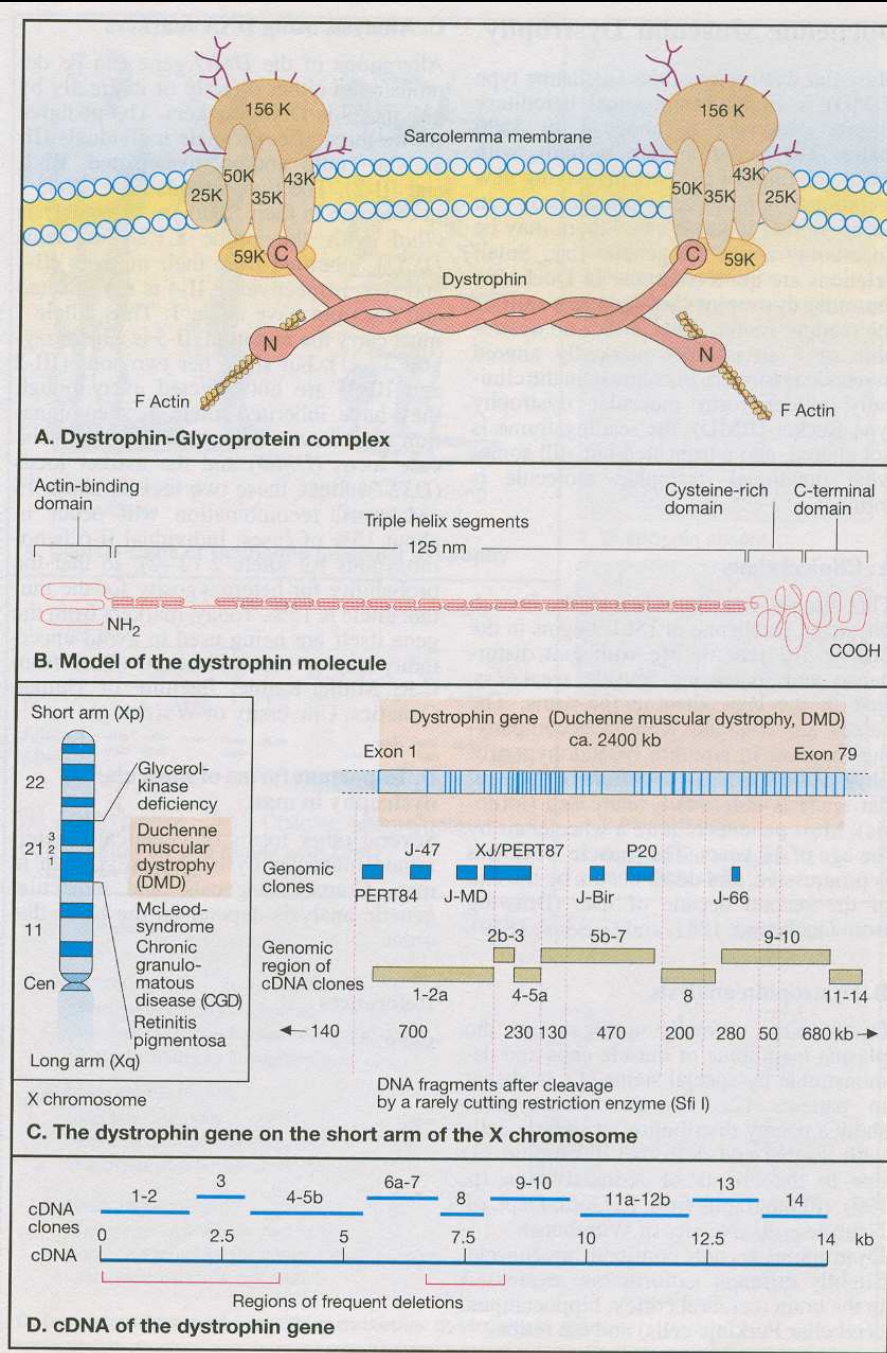
CHROMOSOME X LINKED DISEASES

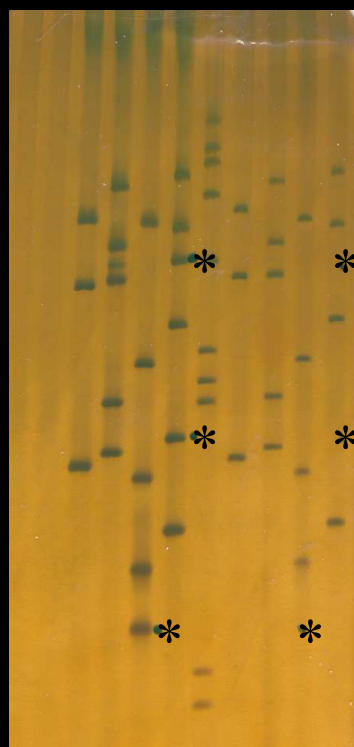


- gen pro dystrofin: Xp21
- 2,4 MB (1% X chromozomu)
- 79 exonů
- nejčastější mutace:
 - delece 1 a více exonů (65%)

–posun čtecího rámce

– 1/3 pacientů mutace *de novo*





ex51

ex53

ex52

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

Hemofílie A

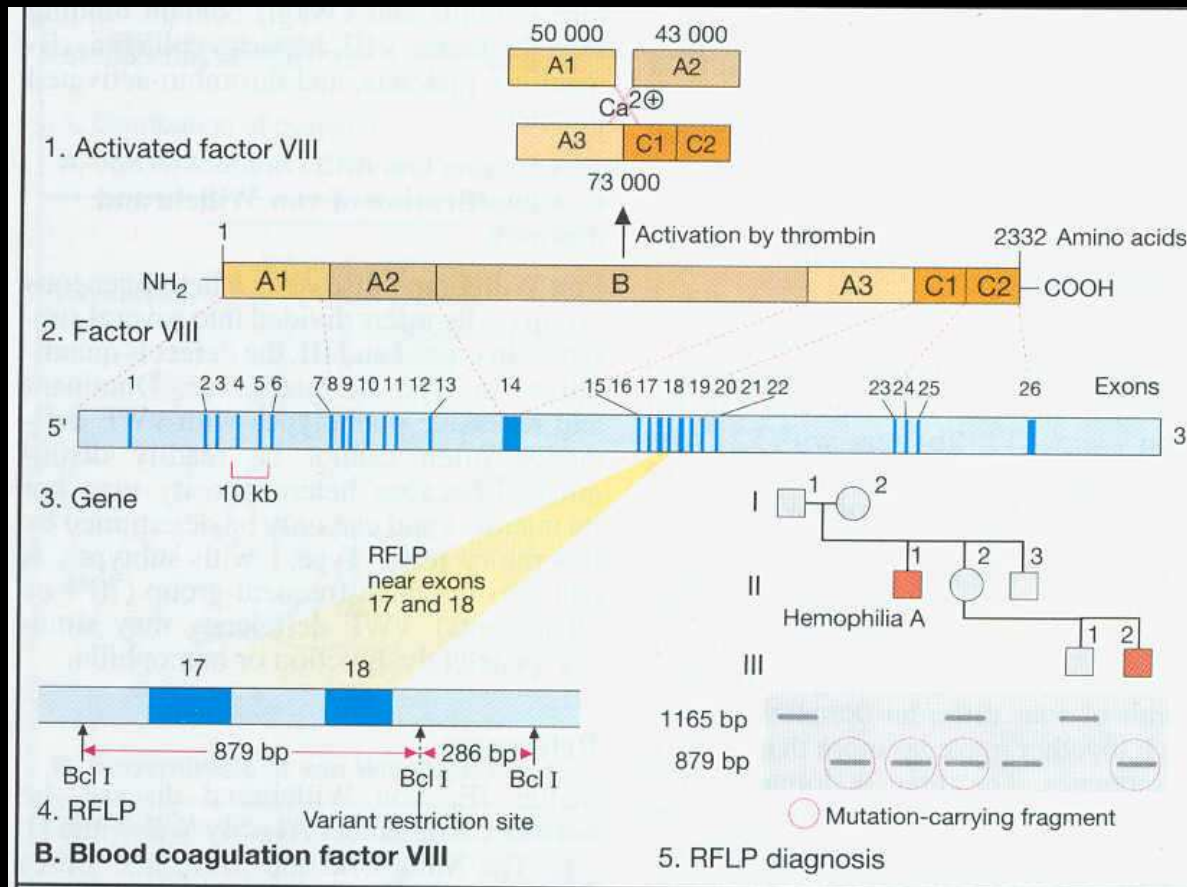
- incidence : 1/10.000 novorozených chlapců
- deficiencie koagulačného faktoru VIII
- X-vázaná choroba

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%

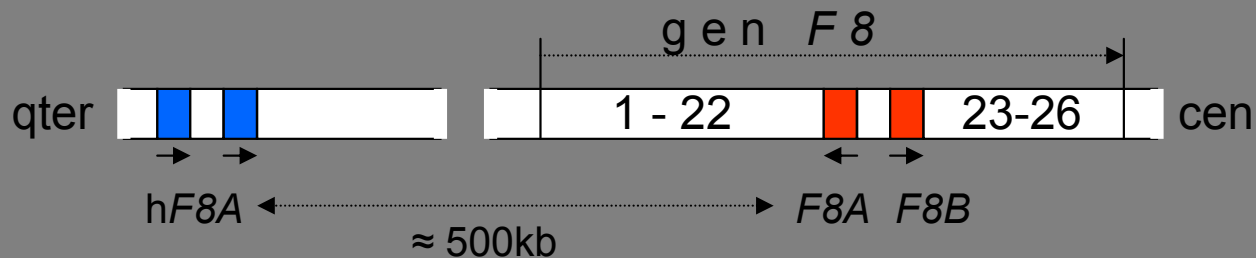
C. Severity of hemophilia A and factor VIII activity

- 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

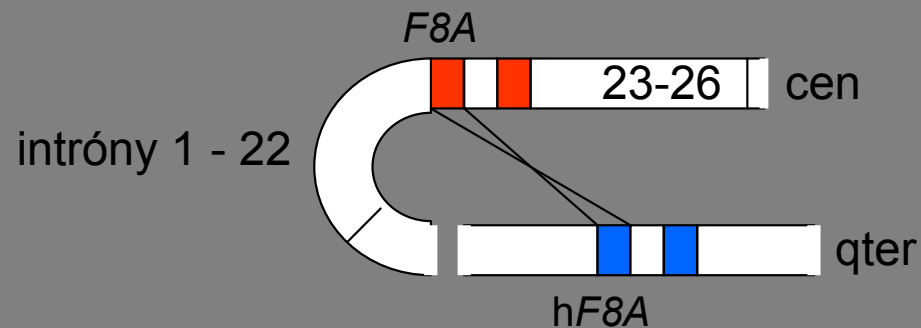


Inverze v genu *F8*: nejčastější příčina hemofílie A



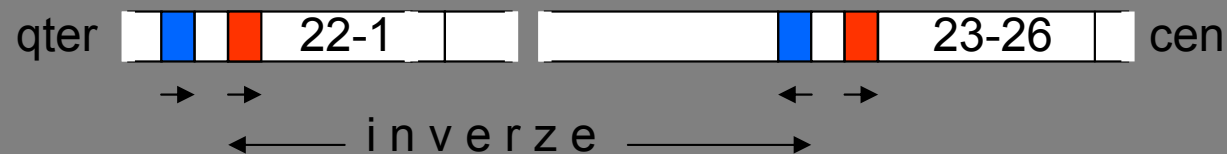
v intronu 22 jsou geny *F8A* a *F8B*; 500kb před genem je homologní *F8A* (*hF8A*)

→ ← orientace génov

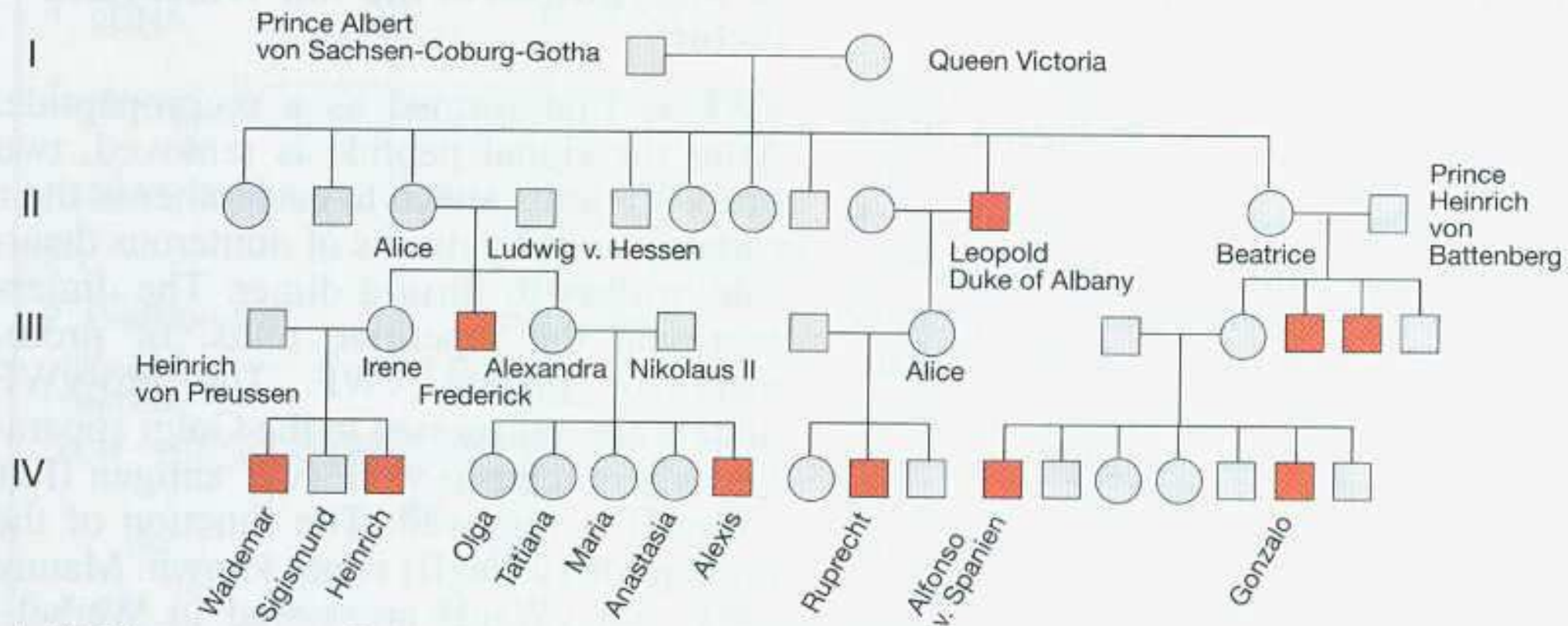


interchromatidová rekombinace mezi *F8A* a *hF8A*

inverze části *F8* genu



přibližně 45% všech mutací *F8* genu při hemofílii A představuje tato inverze



A. X-Chromosomal inheritance of hemophilia A

Myotonická dystrofie typu 1 (MD1)

- autozomálně dominantní neuromuskulární choroba
- nejčastější forma svalové dystrofie
 - ↳ celosvětová frekvence výskytu 1:8000
- polysystémová manifestace
- klinicky extrémně variabilní

patří mezi onemocnění TREDs

příčina



expandované trinukleotidové repetice (TREs)

TR
*trinucleotide
repeat*

mutace

TREs
*trinucleotide
repeat expansion*

TRED
*trinucleotide
repeat expansion
diseases*

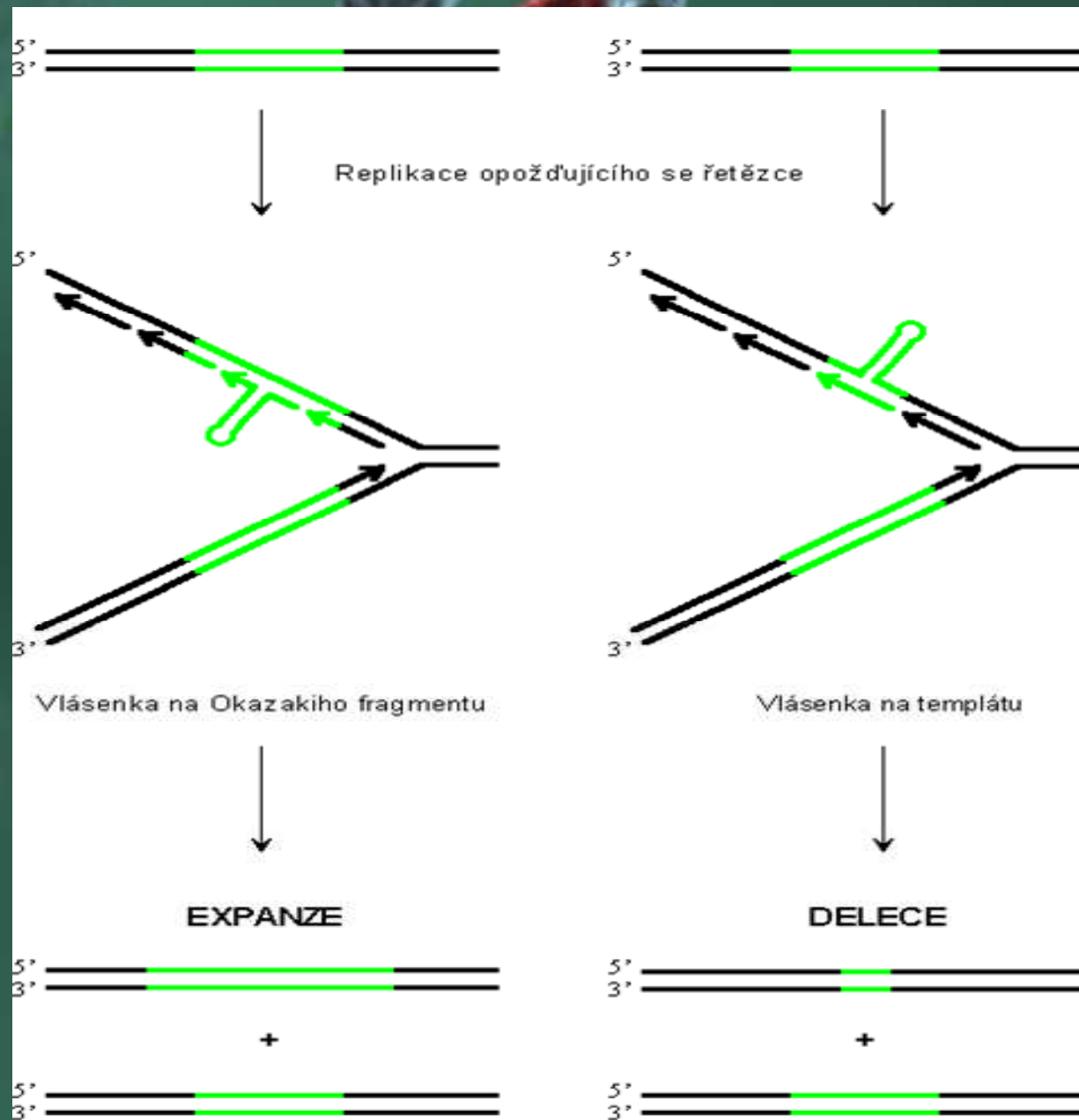
expanze
nový typ mutace, popsán 1991



TR - trinukleotidové repetice

- široce rozšířeny v lidském genomu
 - * v intronech
 - * uvnitř čtecích rámců (exonech)
 - v překládaných
 - nepřekládaných
- oblastech
- nestabilita, závisící na:
 - * typu sekvence
 - * délce repetitivní sekvence

Expanze a delece trinukleotidů při replikaci



Rozdělení chorob zapříčiněných expanzí trinukleotidových repetetic podle lokalizace

TREs

1 TR lokalizovány uvnitř ORF

→ expanzí narušená struktura proteinů
(Huntingtonova chorea)

2 TR lokalizovány vně ORF - v 3'UTR nebo 5'UTR

- v intronech

→ patrně inaktivují nebo ovlivňují expresi genu
(Myotonická dystrofie)

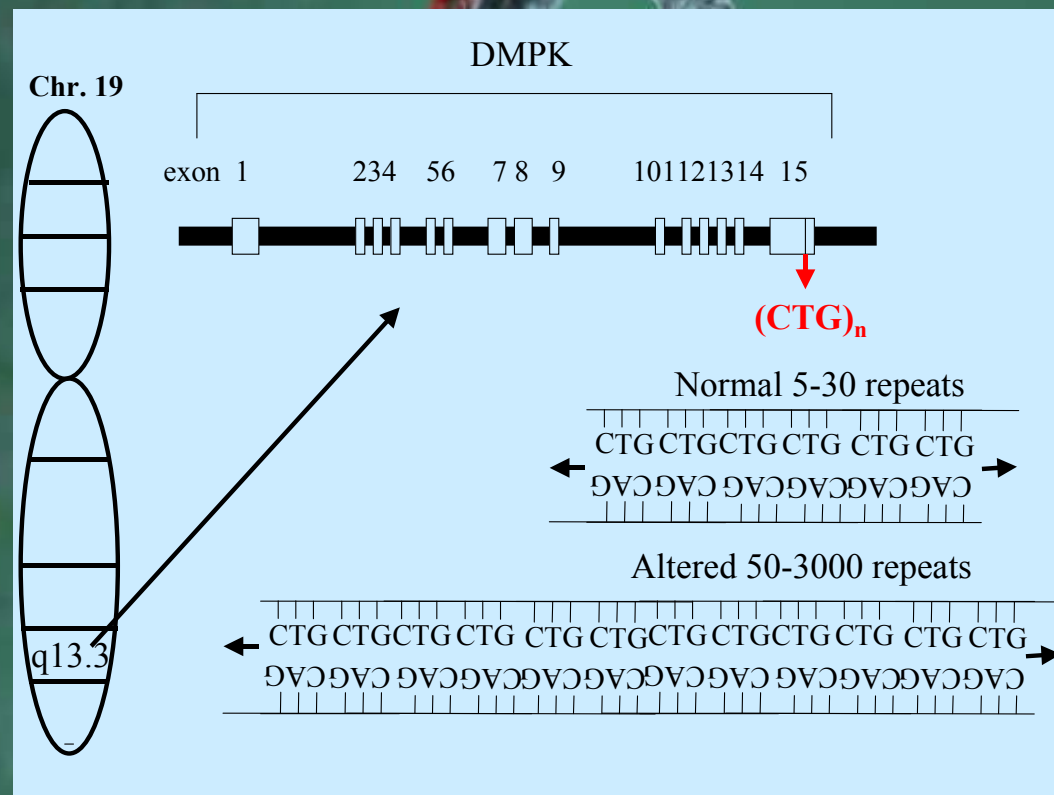
Přehled a základní charakteristika některých chorob asociovaných s expanzí trinukleotidů

Disease	Chromosome	Description	Repeat sequence	normal size	size in affected	Parent in whom expansion usually occurs	gene affected	protein	frequency	type of transmission	position of expansion
Fragile X syndrome (FRAX-A)	Xq27.3	Mental retardation, large ears and jaws, face dysmorfology, macroorchidism in males	CGG	005-54 (60-230 premutation)	(230 to >2,000)	Exclusively through mother	FMR-1 (FRAXA)	RNA binding protein	1:1250 male 1:2000 female	X	5'-UTR
Huntington disease	4p16.3	Loss of motor control, dementia, affective disorder	CAG	011-034	(35-121)	More often in father	IT-15	huntingtin	1:5000 to 1:15000	AD	ORF
Machado-Joseph disease MJD (SCA 3)	14q32.1	Cerebellar ataxia, peripheral nerve palsy, bulging eyes, facial tics, 3 clinic types	CAG	012-037 14-40	(68-79) exceeds 61	parental	MJD 1 SCA3	SCA3/MJD1	1:50000	AD	ORF
Myotonic dystrophy	19q13.3	Muscle loss, cardiac arrhythmia, cataracts, frontal balding, other problems	CTG	012-038	(50 to >2,000)	Either parent but expansion to congenital form through mother	DMPK	DMPK prot. kinase	1:8000 to 1:8500	AD	3'-UTR
Spinocerebellar ataxia type 1 (olivo-pontocerebellar ataxy)	6p22-23	Progressive ataxia, dysarthria, dysmetria	CAG	012-039 006-036	(41-81) 39-83	More often through father	SCA1	ataxin I	?	AD	ORF
spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy disease) SBMA	Xq11-12	weakness and atrophy of proximal muscles, fascikulation, gynecomastitis, testicular atrophy, fertility probl.	CAG	012-034	40-62	?	AR	androgen receptor	?	XR	ORF
Friedreich ataxy FA (FRDA)	9q13-21.1	hyporeflexia, Babinski responses, sensory loss, cerebel. dysarthrie, cardiomyopathy	GAA	007-022	200-900	maternal(contract ion, expansion) parental(contract ion)	FRDA1 X25	frataxin	1-2:50 000	AR	Intron 1 within Alu-seq.

Myotonická dystrofie typu 1

expanze trinukleotidu CTG
ve 3'UTR (3'untranslated region)
genu DMPK (myotonic dystrophy protein kinase gene).

lokus 19q13.3





DMPK gen $\xrightarrow{\text{normální produkt}}$ DMPK protein

*expanzivní
mutace*

neovlivněná funkce DMPK proteinu

vznik patologického fenotypu neobjasněn

pravděpodobné příčiny vzniku MD:

- *narušený transport a úprava mRNA*
- *narušení struktury chromatinu expandovaným repetitivním traktem \rightarrow porucha exprese genů lokalizovaných v okolí genu DMPK*
- *vysycení DNA vazebných proteinů \rightarrow narušení funkce genů v okolí genu DMPK*



Alely genu DMPK

Normální alela

5 - 35 CTG repetice → počet je stabilní z generace na generaci

Premutantní alela

35 – 49 CTG repetice → může expandovat během gametogeneze, transmise alely s delší trinukleotidovou repetice než má rodič

Mutantní alela

50 a více CTG repetice → asociováno s manifestací choroby u 100% jedinců s MD1

Klinická anticipace spojená s expanzivním prodlužováním trinukleotidových repetice

asymptomatický prarodič
(MD1 : 5 - 50 CTG repetice)

rodič s mírným klinickým projevem
(MD1: 100 CTG repetice)

potomek s těžkým průběhem choroby
(MD: 1500 CTG repetice)



Korelace genotypu a fenotypu u MD1

	premutace	klinická forma myotonické dystrofie		
		mírná	klasická	neonatální
počet CTG trinukleotidů	35 - cca. 49	50 - cca. 150	100 - 1000 až 1500	1000 až cca. 3000
propuknutí choroby ve věku	-	21 - 40 let	11 - 20 let	od narození do cca. 10 let
průměrná délka života	normální	64 let	48 - 55 let	přežije neonatální
klinické projevy	žádné postižení vyjimečně katarakta	katarakta mírná myotonie	svalová slabost myotonie katarakta předčasné srdeční aritmie postižení endokrinního systému další	těžká hypotonie respirační problém postižení srdce mentální retardace další typický výraz obličeje "maska"

Kongenitální MD (CMD)

**CMD je považována za subtyp MD,
ale symptomy a rozvoj choroby je odlišný od MD**

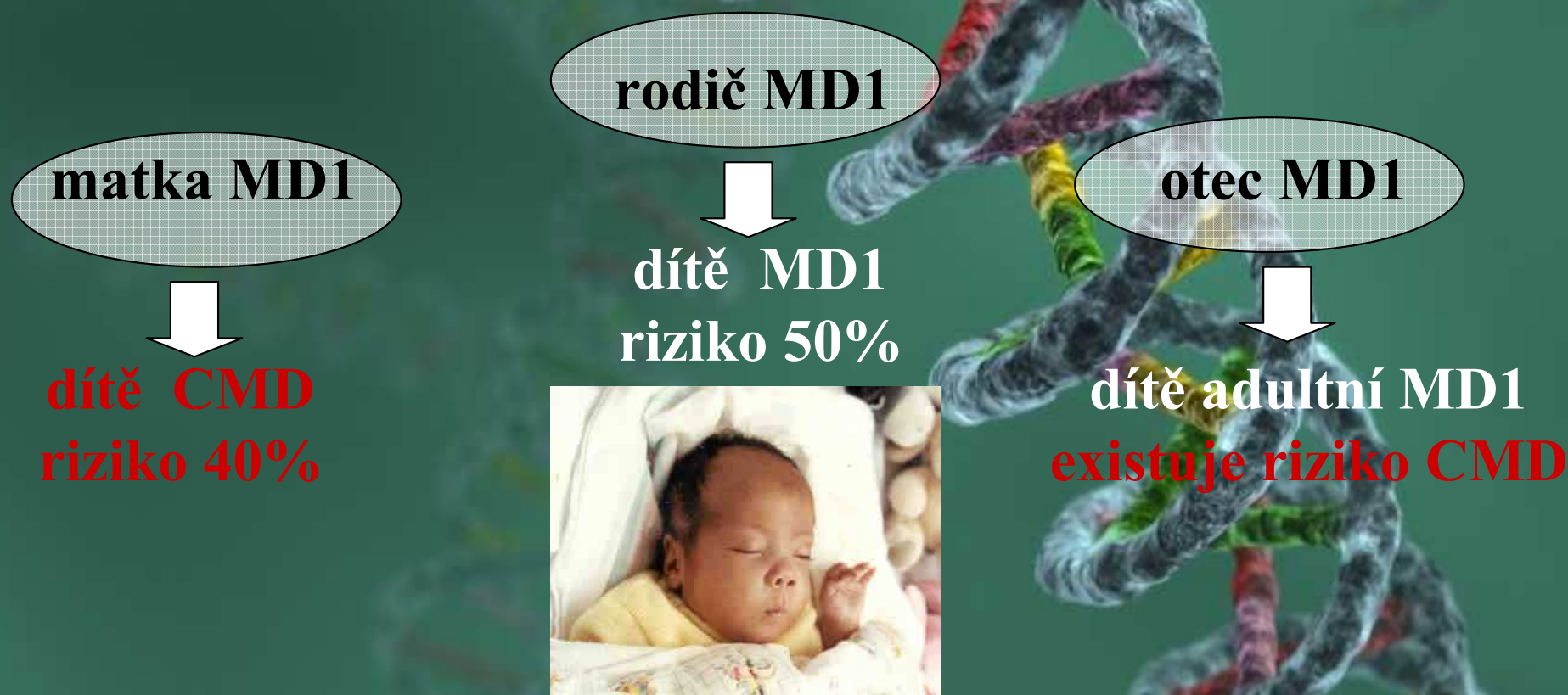
- ochablost svalstva
 - těžká hypotonie
 - obličejová ochablost
 - respirační problémy
 - postižení srdce
 - mentální retardace
 - strabismus
- neprojevuje se mytonie
katarakta



rozdíví se později

Kongenitální MD (CMD)

- nejzávažnější forma MD
- popsána pouze u MD typu 1
- dědí se převážně maternální cestou
- popsány případy CMD po přenosu expandované alely od otce



Pohlavím ovlivněné efekty na transmisi CMD

expandované alely se dědí od otce i od matky



nestabilita alel je převážně maternální



CMD se dědí převážně maternální cestou
příčina

- snížená fertilita mužů s adultní formou MD1
- kontrakce repetitivního traktu během transmise mužských gamet
- maternální dědičnost abnormalit mitochondriální DNA, která interaguje s produktem genu DMPK
- maternální imprinting
- transplacentární faktory

Diagnostika MD1

Klinické vyšetření
neurologické vyšetření
EMG, EEG
kardiologické vyšetření

Histologické vyšetření
postižených svalů
histochemie
elektron. mikroskopie

**Molekulárně
genetické
vyšetření**
PCR, TP PCR

**jednoznačně
vyvrátí
nebo
potvrdí diagnózu**

Diagnostika MD1

- prováděna u členů rodiny se zátěží MD1
- analýza DNA extrahované z fetálních buněk

↓
získané

- amniocentéza (14.-19.tg)
- biopsie choriových klků (10.-12.tg)

- testování přítomnosti expandované alely DMPK

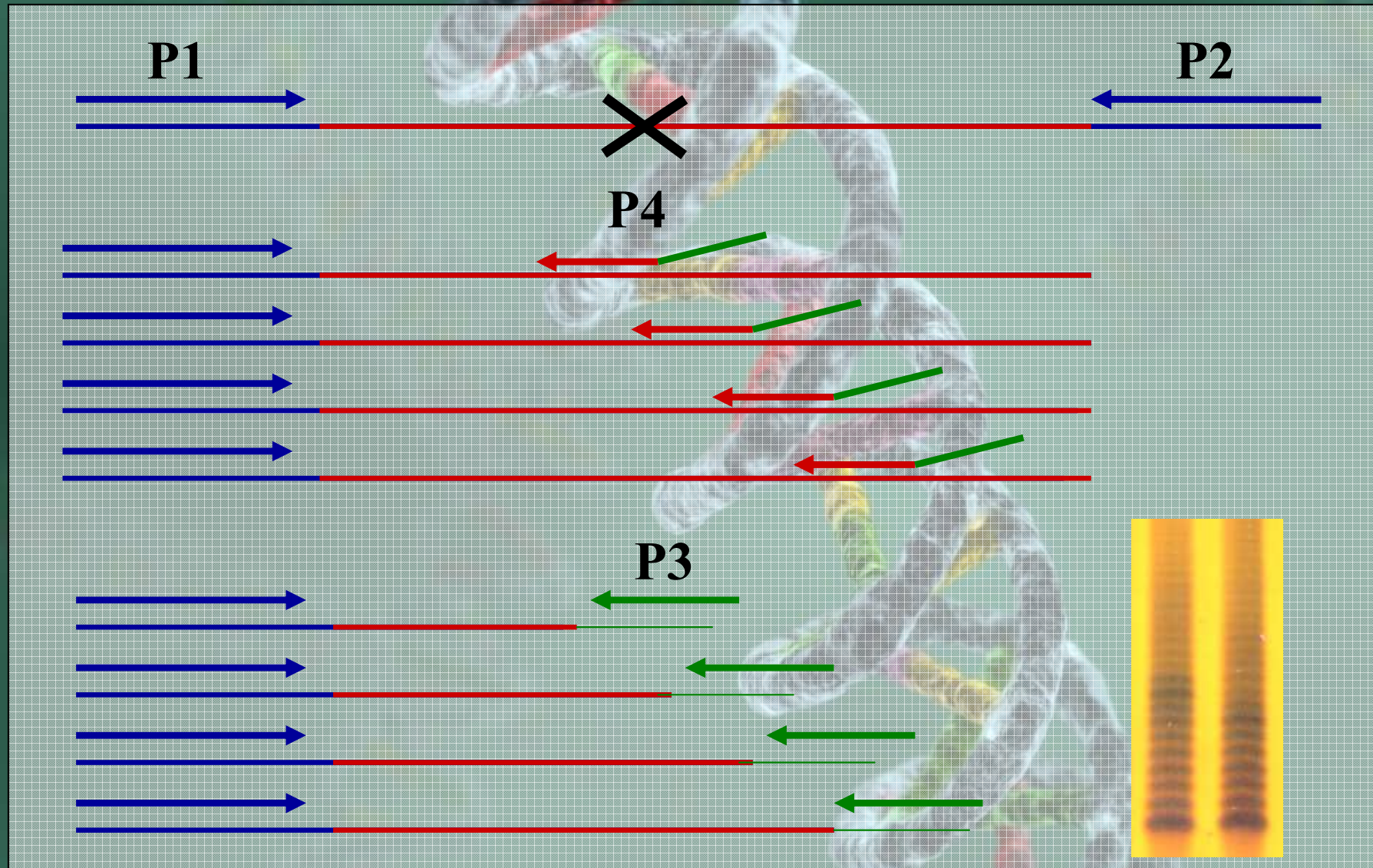


jednoduchý PCR systém zahrnující 2 PCR reakce

PCR P1/P2

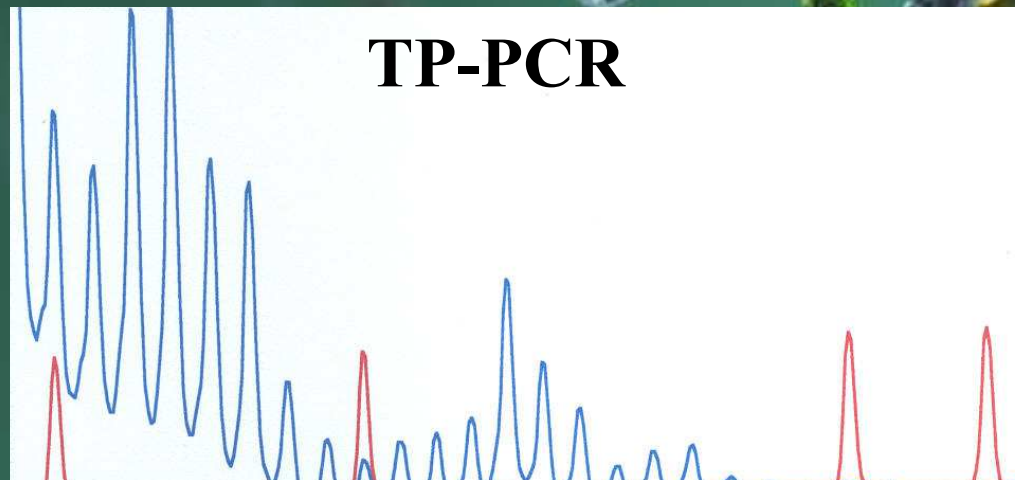
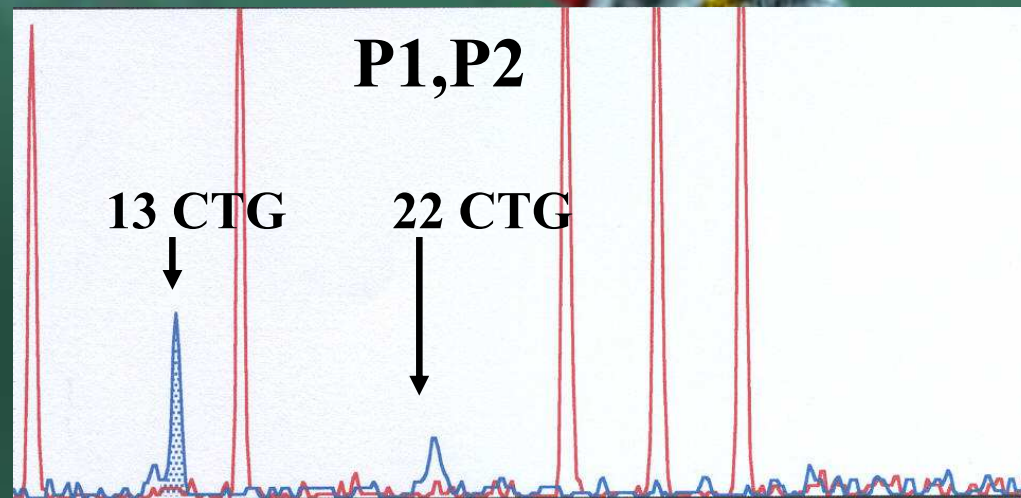


Triplet Primed PCR



Preimplantační genetická diagnostika MD1 naše první zkušenosti

Fluorescenční PCR



Strategie molekulárně genetického vyšetření MD1

DNA pacienta (susp. MD1)

PCR P1/P2

detekce 2 alel genu DMPK

detekce 1 alely genu DMPK

vyloučení diagnózy

TP PCR

zdravý homozygot

heterozygot
s expandující alelou

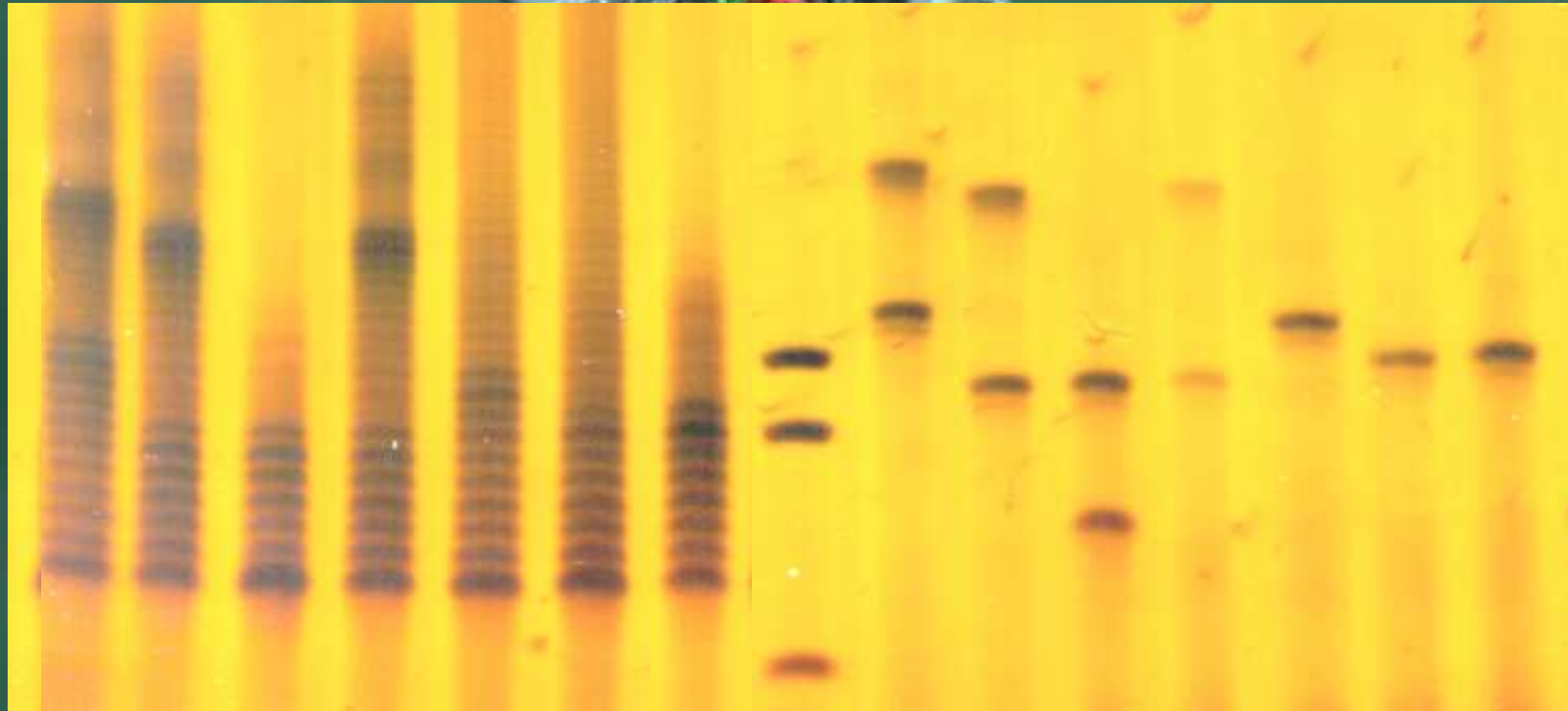
vyloučení diagnózy

potvrzení diagnózy

TP PCR

PCR (P1/P2)

1 2 3 4 5 6 7 M 1 2 3 4 5 6 7



* *

Stanovení dg. MD1 při prenatálním vyšetření

asymptomatický

[13],[expanze]

[5],[13]

symptomy MD

[13],[expanze]

[13],[expanze] - genotyp (CTG)_n
prokázána expanze trinukleotidových repetice
na jedné alele genu DMPK

[5-13],[13-21] - genotyp (CTG)_n
velikost repetice je na obou alelách
ve fyziologickém rozhraní

[13],[21]

[21],[expanze]

↓
prokázána MD1

Průkaz expanze CTG repetice v genu DMPK metodou TP-PCR

- nemůže být stanoven věk nástupu nemoci a její závažnost

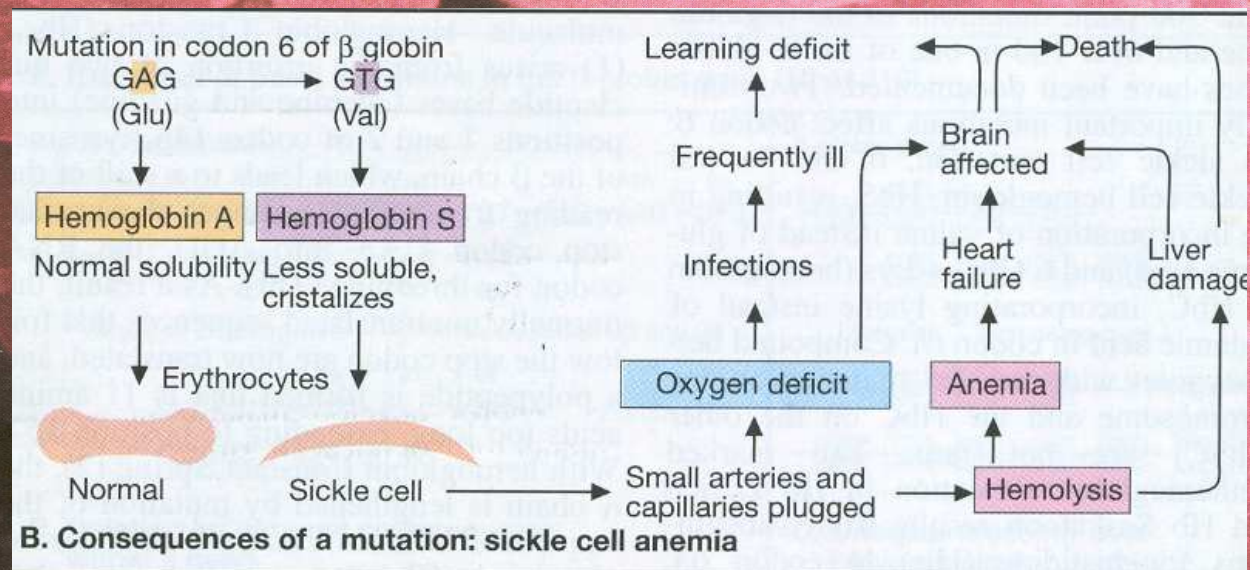


- expanze CTG repeticí asociována se 3 fenotypy
- možnost somatického mozaicismu



- přesné určení délky expanze:730-1000 a více repetic
velmi pravděpodobná asociace s CMD
- ultrazvukové vyšetření ve 2. a 3. trimestru může odhalit CMD:
 - zmenšený fetální pohyb
 - polyhydroamnion

Srpkovitá anemie



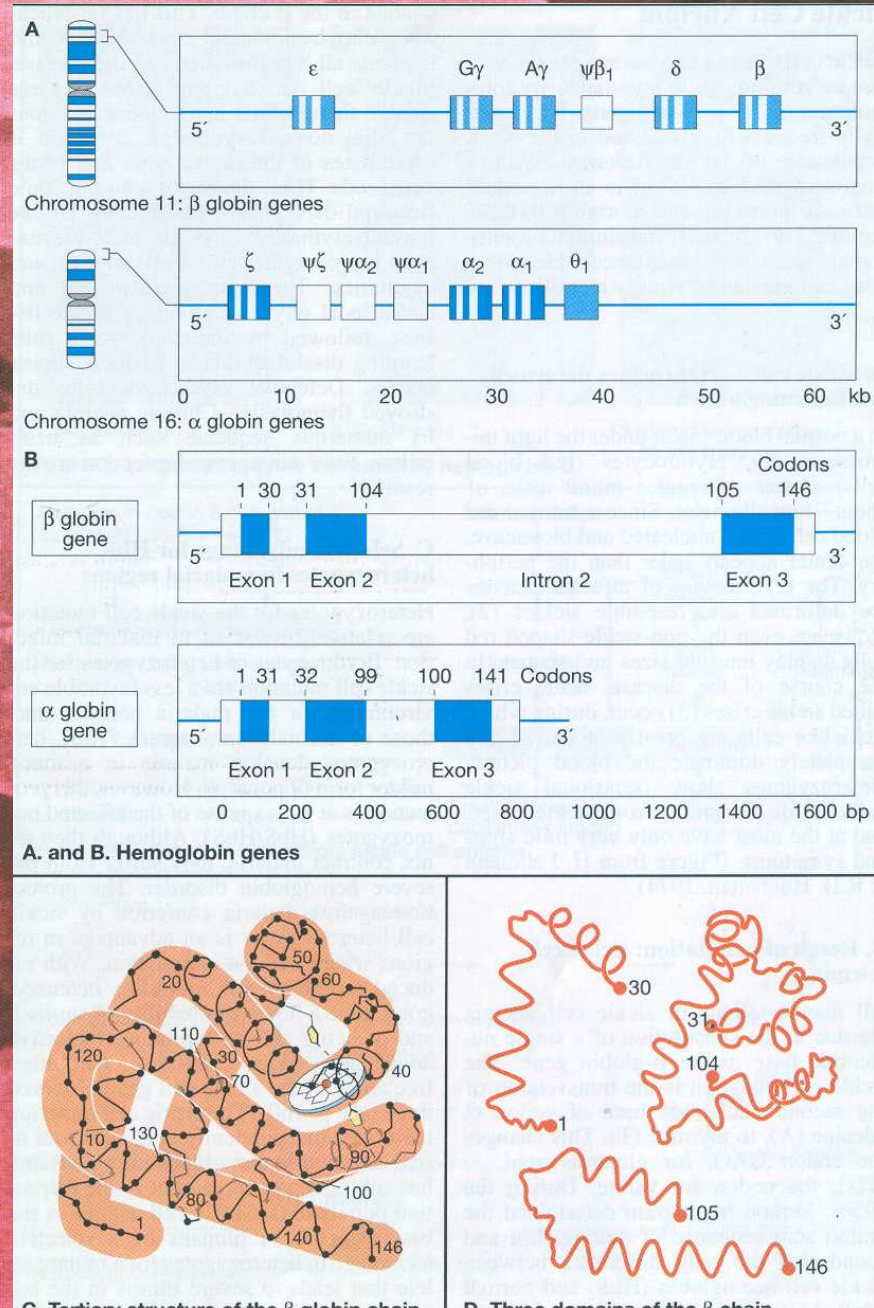
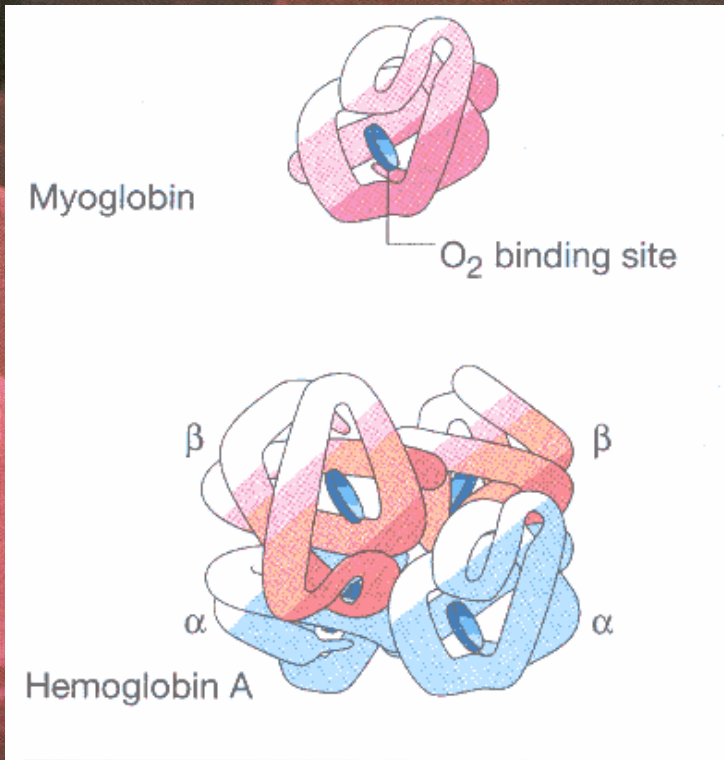
•frekventovaná v Africe a černé populaci severní Ameriky



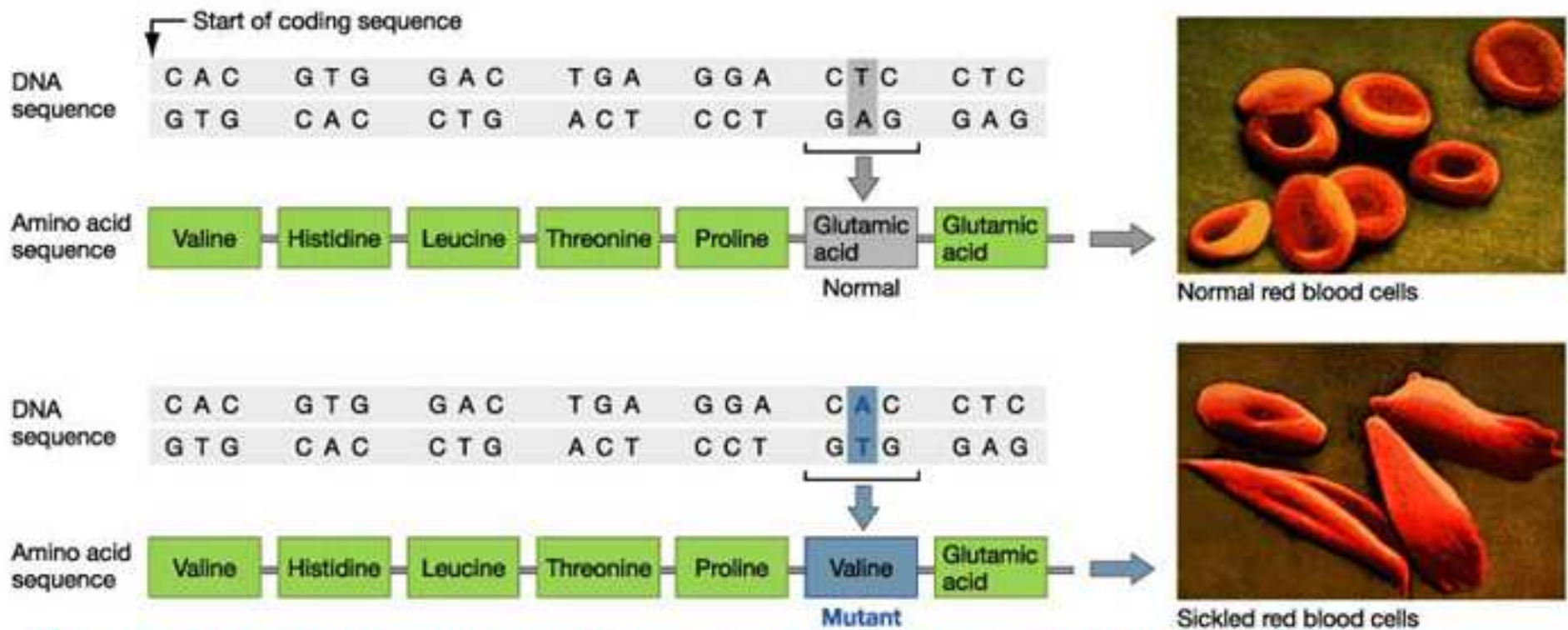
1: 500

•autozomálně recesivní dědičnost

Hemoglobin



Srpkovitá anemie



The change in amino acid sequence causes hemoglobin molecules to crystallize when oxygen levels in the blood are low. As a result, red blood cells sickle and get stuck in small blood vessels.

Srpkovitá anemie

