

Molekulárně genetická diagnostika:



Iveta Valášková

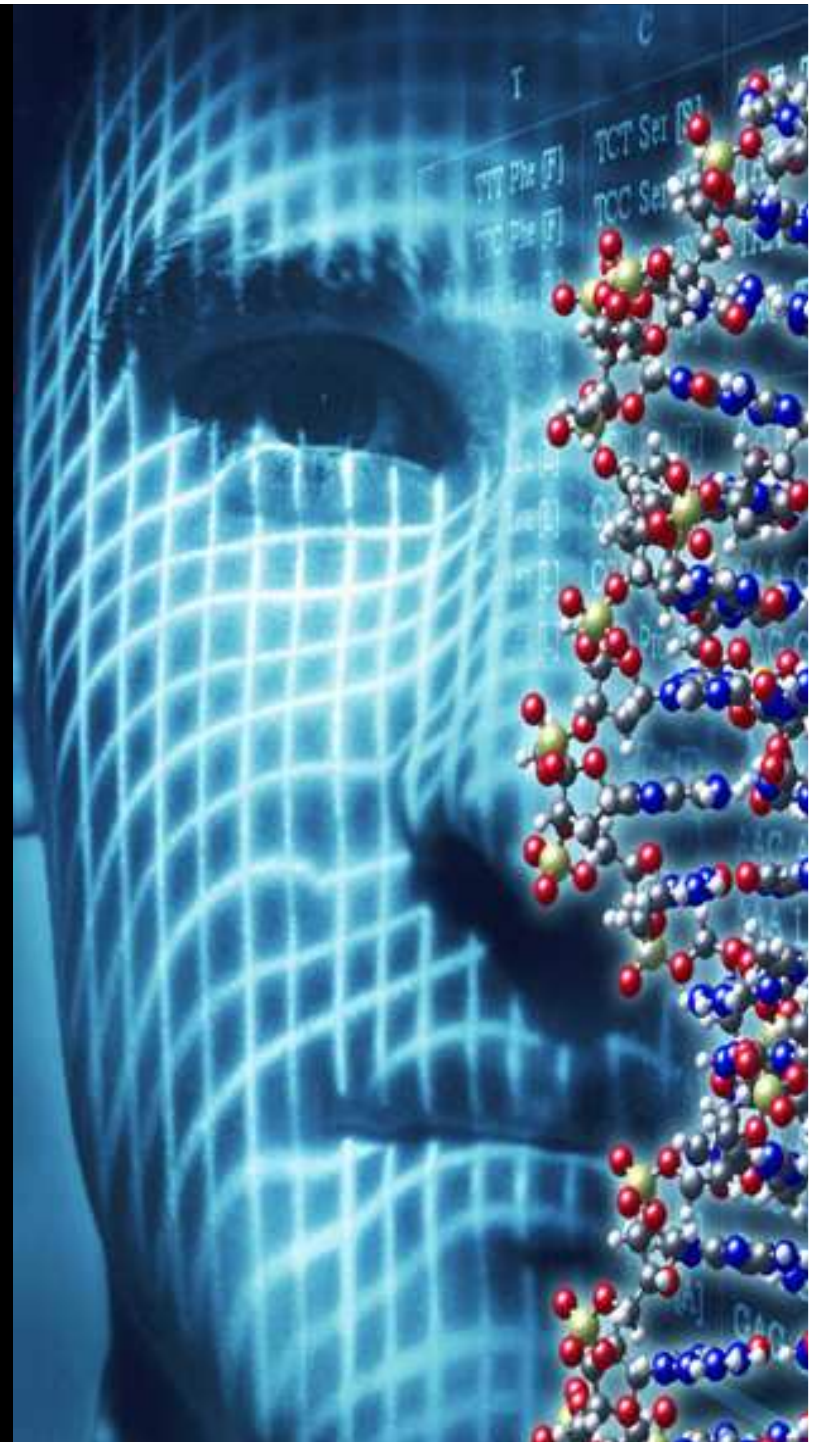
Oddělení lékařské genetiky FN Brno

Lékařská fakulta MU

Budoucnost medicíny: tahounem bude genetika

Prof. MUDr. Antonín Doležal, DrSc.

30. prosince 2008, MF Dnes



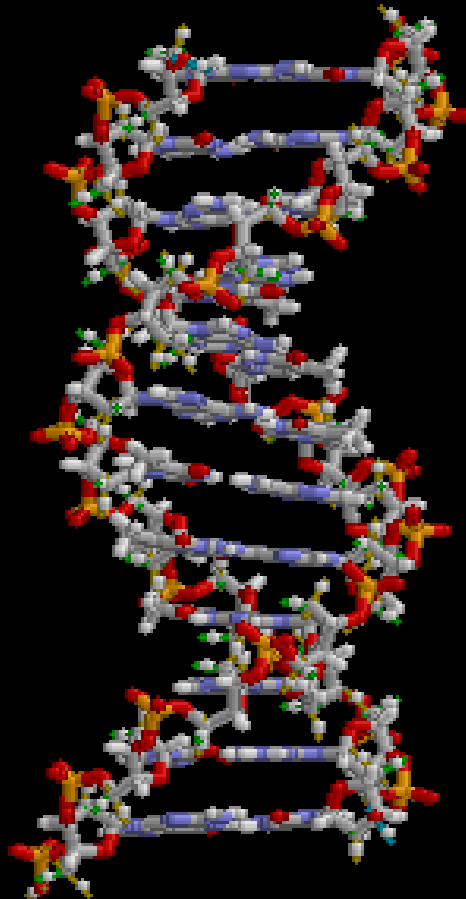
DNA

deoxyribonukleová kyselina

je nositelkou genetické informace všech organismů

je pro život nezbytnou látkou

je molekulární paměť
disponující úžasnou kapacitou



ve své struktuře kóduje a zadává
buňkám jejich program
a tím předurčuje vývoj
a vlastnosti celého organismu



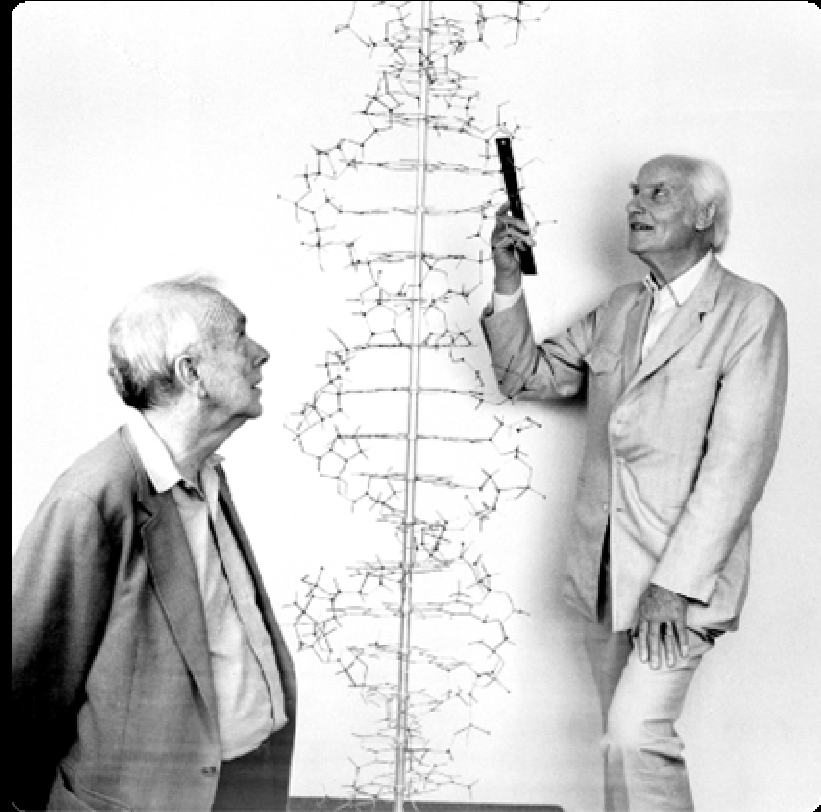
So what are you thinking about James?

Oh I just have an idea...



James Watson Francis Crick

„We have discovered the secret of life!“





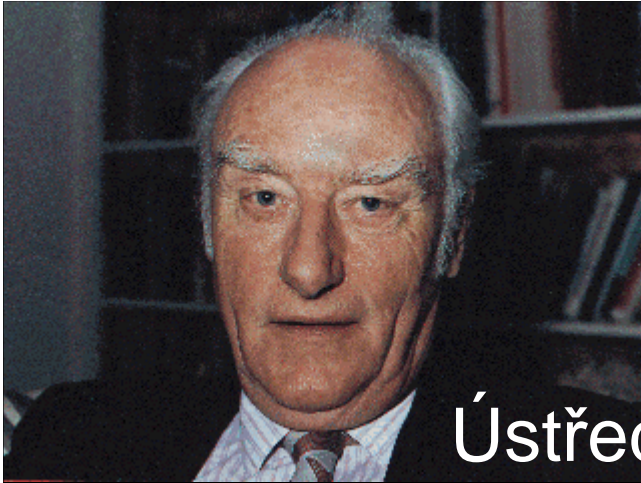
Rosalind Franklin



Crick and Watson's DNA molecular model, 1953.

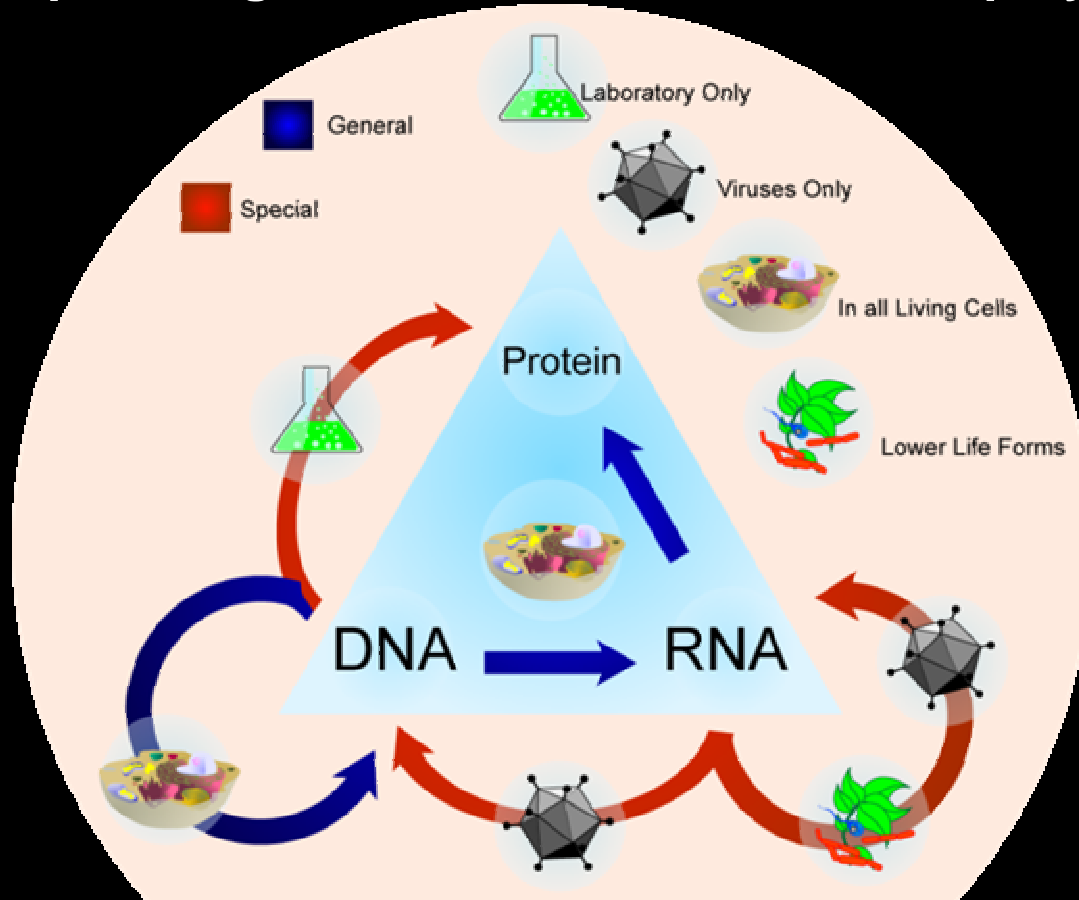
"Watson and Crick staring up at their model of the Double Helix is one of the most iconic pictures of the 20th Century. A replica of the model now gathers dust in a glass case in a dark corner of the top floor of the Science Museum. Here, a man glances at it as he walks past. Does he know the story?"

Dave Kinahan.



Francis Crick

Ústřední dogma molekulární biologie
přenos genetické informace mezi biopolymery



James Watson

*"Mysleli jsme si, že náš osud je zapsán ve hvězdách.
Nyní víme, že z velké části je zapsán v našich genech"*



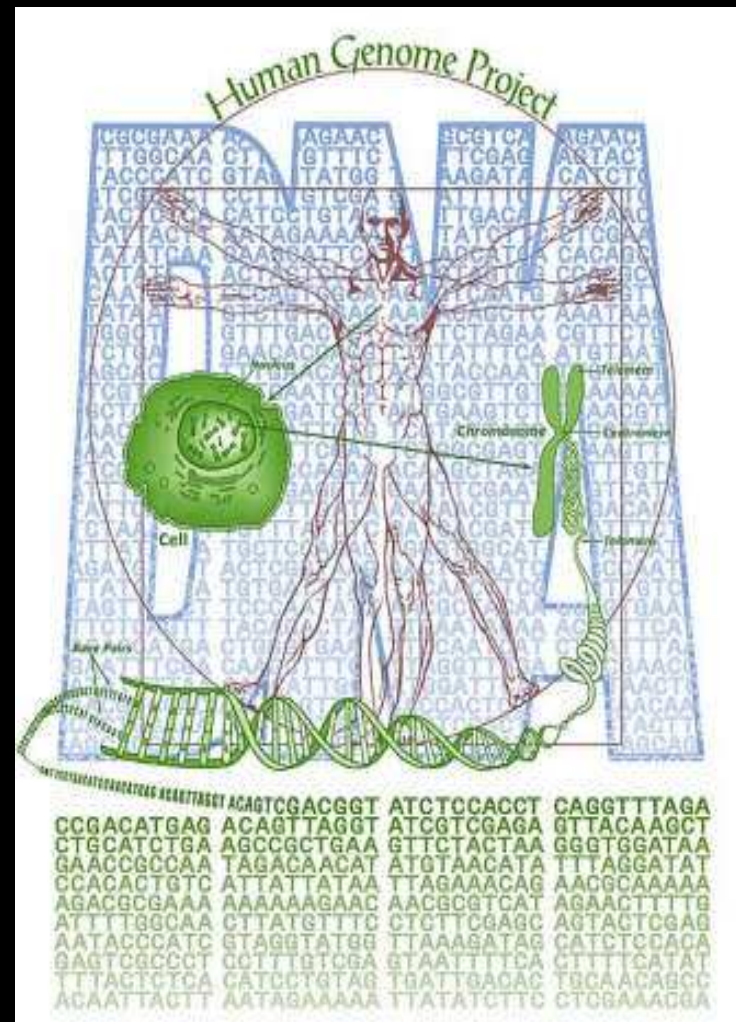
Genom u jedinců stejného druhu je stejný



Genotypy jedinců stejného druhu mohou být rozdílné

Human Genome Project

Projekt lidský genom



Human Genome Project

Projekt lidský genom

- 1986: Santa Fe
- James Watson:
- „vstoupit na cestu od dvojišroubovice
- k 3 miliardám schodů lidského genomu“
- 1988: Kongres USA schválil 15 letý projekt a dotaci 3 mld USD



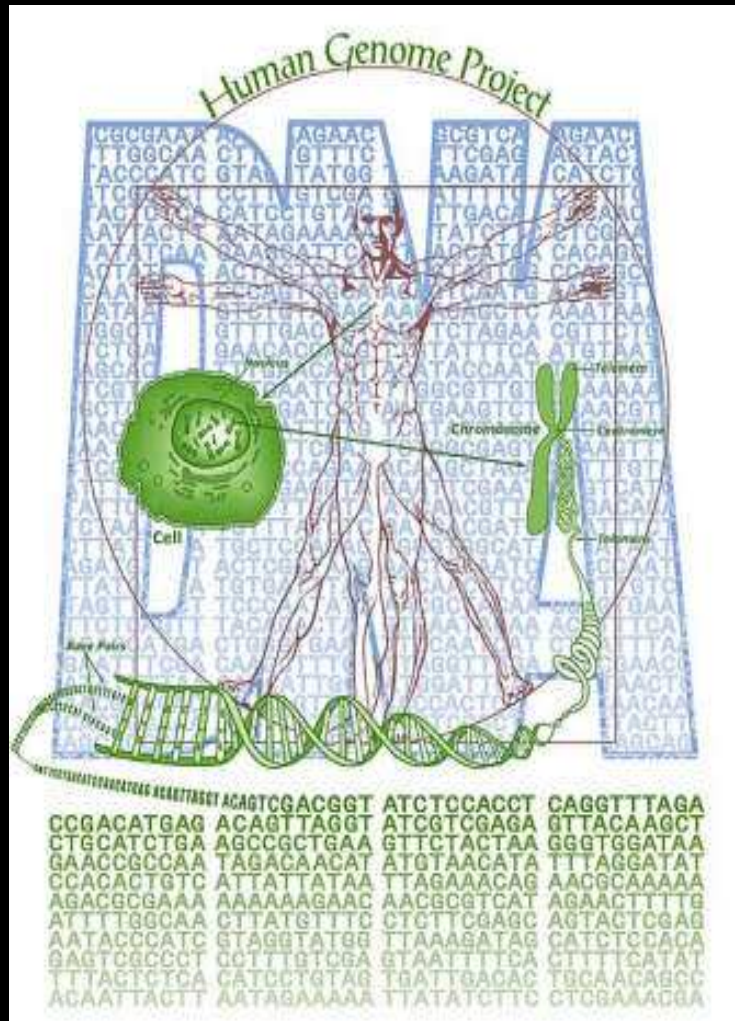
- 1990: začátek projektu
- 2005: předpokladané ukončení

- Walter Gilbert: „až budeme mít v ruce úplnou sekvenci lidského genomu, budeme vědět, co dělá člověka člověkem.“ ...



Human Genome Project

Projekt lidský genom



Cíle

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

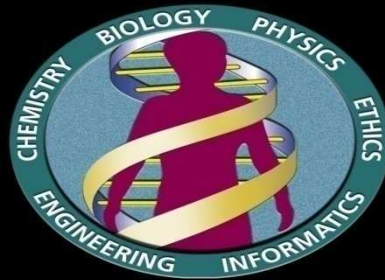
The Genome International Sequencing Consortium:
Initial sequencing and analysis of the human genome.
Nature 409,860-621,2001





Venter, J.C. et al.:
The sequence of the human
genome. *Science* 291:1304-1351, 2001

Human Genome Project Projekt lidský genom



**V roce 2003 vědci popsali
DNA sekvenci 3 miliard párů bází
tvořících lidský genom**

Human Genome Project

Projekt lidský genom



Frank Collins
Konsorcium HUGO



Craig Venter
Celera Genomics

Frank Collins



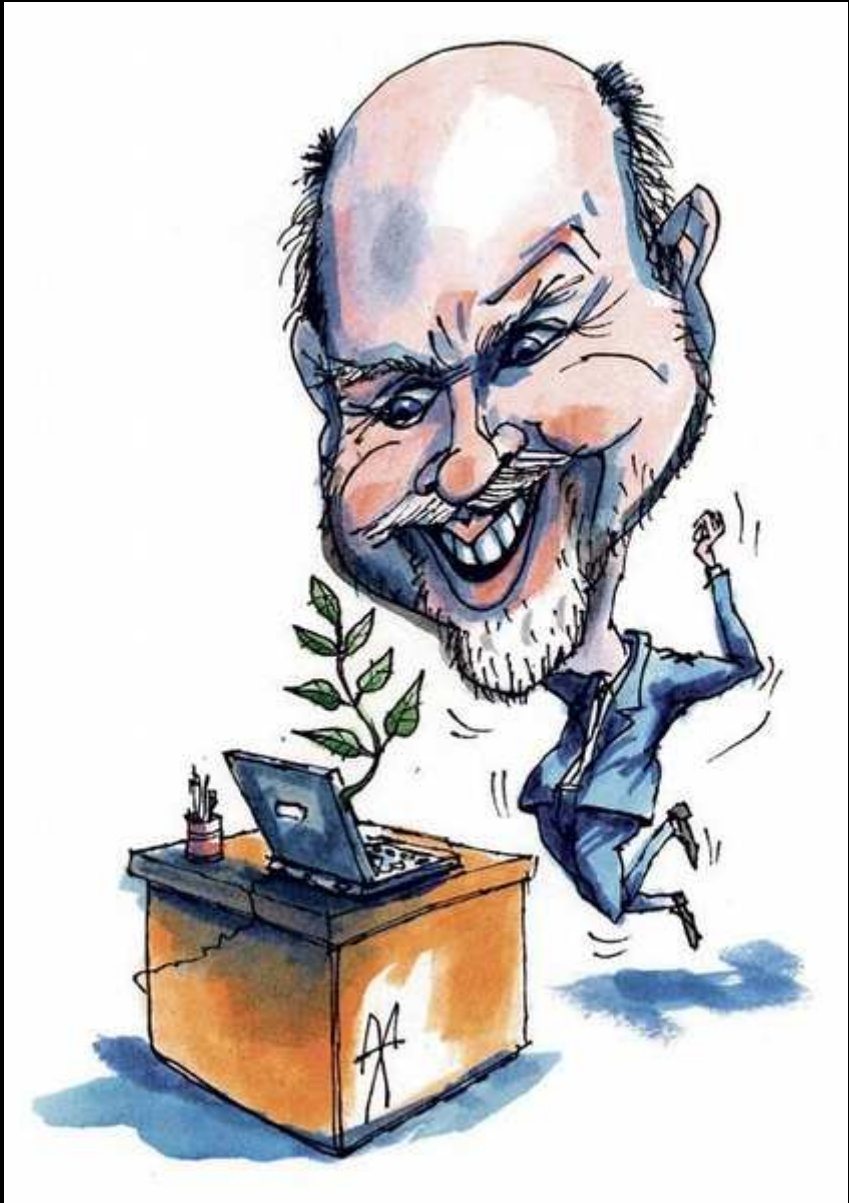
„Molekulární genetici jsou povinni využít poznatky o lidských genech v boji s chorobami.“

Craig Venter

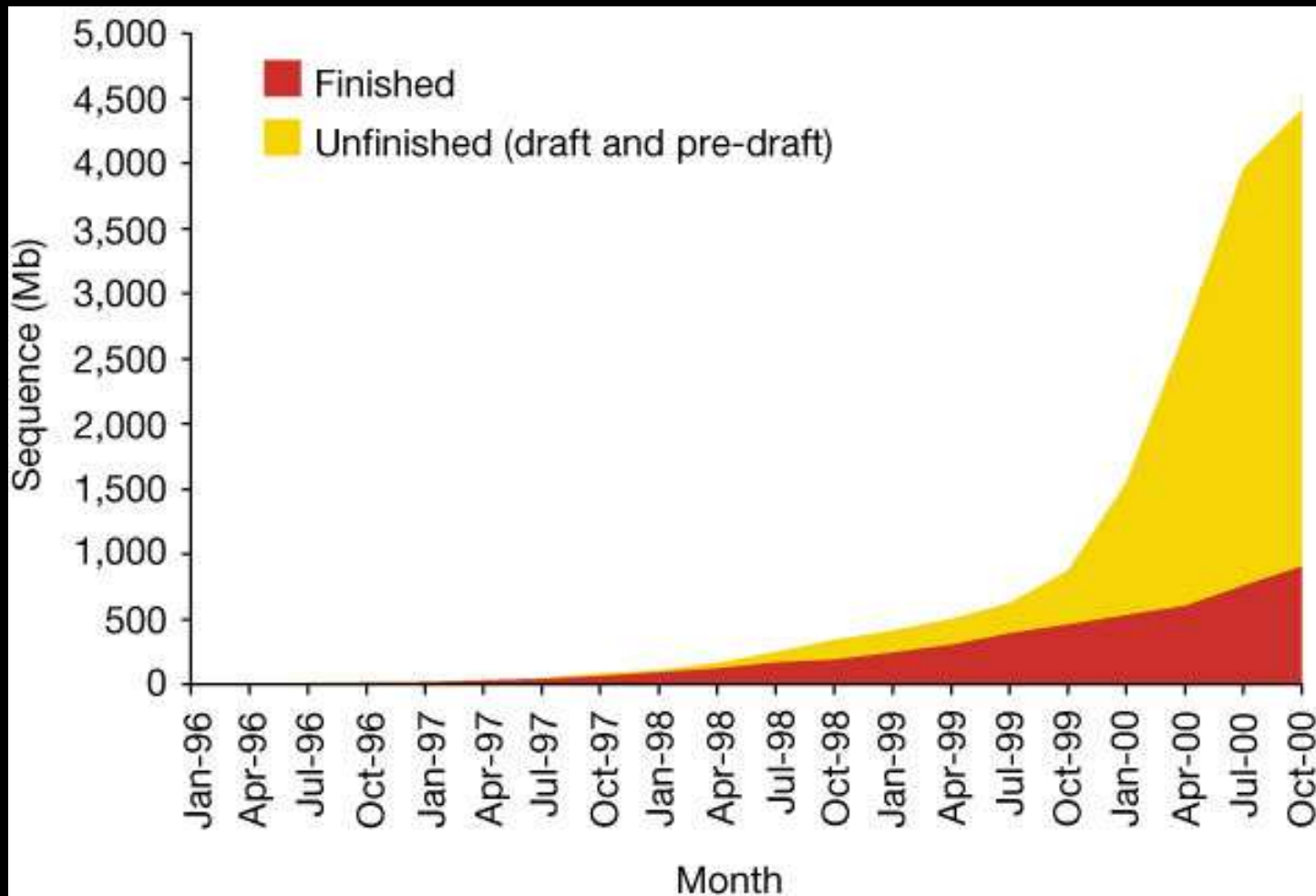


Člověk, který dal ke zkoumání svoji DNA

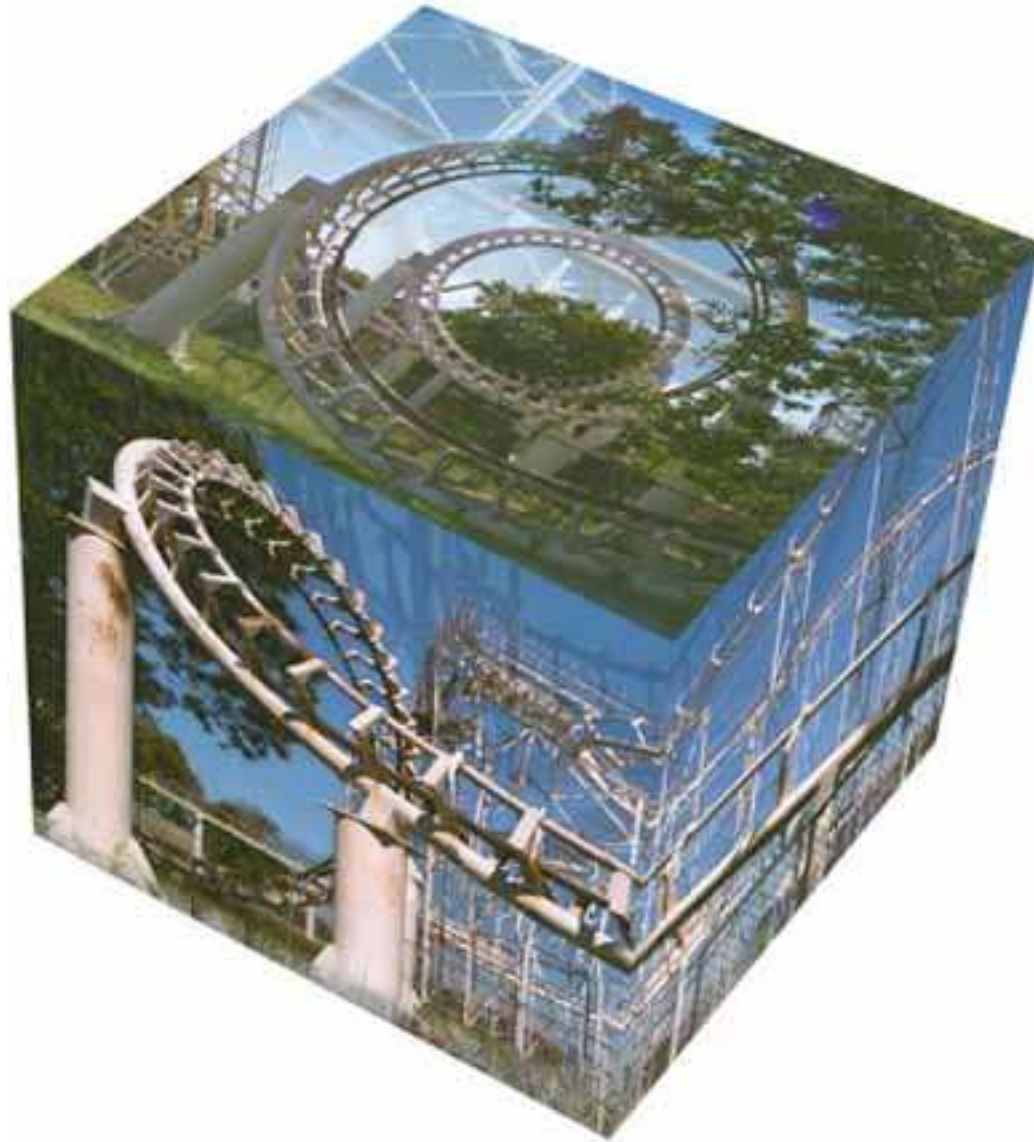
„Myslím, že největší překvapení je, že se jeden od druhého lišíme více, než jsme čekali.“



Nárůst údajů o sekvenci DNA



Faster and faster we go, so hang on!





Projekt lidského genomu

- 3-5% z ročního rozpočtu jde na ELSI (=Ethical, Legal, Social Issues), etické, právní, sociální otázky
- Vznikl tak největší etický projekt v historii planety
- Právo na genetické soukromí – před pojišťovny a zaměstnavateli
- Opačný problém: zruinování pojišťoven díky tomu, že klient zná svůj genom a volí optimální pojišťovací strategii

Etické otázky HGP

- je identifikováno čím dál tím víc lidských genů
- pokud budou objeveny geny, které indikují náchylnost ke kriminalitě, inteligenci nebo homosexualitě, jak by na to měla společnost reagovat?
- genetika versus kriminalita: když u zločinců manipulujeme prostředí vězením, nemohli bychom též manipulovat jejich genomem?

Etické otázky plynoucí z HGP

- Kdo bude mít přístup k osobním informacím o složení genomu jedince a jak budou tyto informace využívány?
- Kdo je majitelem informace o genomu jedince?
- Jak ovlivní informace o složení genomu jedince sebechápání daného člověka a jak tato informace ovlivní přijetí tohoto jedince společností?
- Jak informace o genomech jedinců ovlivní přijetí minoritních skupin společností?
- Jak připravíme lékaře na nástup „nové genetiky“ a jak připravíme na nástup nové genetiky veřejnost?
- Jak připravíme veřejnost, aby byla schopna uvážlivě a kvalifikovaně provést informovanou volbu?

Etické otázky plynoucí z HGP

- Jak společnost vyváží nutná vědecká omezení a sociální risk s dlouhodobým prospěchem?
- Mělo by se provádět genetické testování, pokud neexistuje terapie?
- Měli by mít rodiče právo nechat testovat děti na nemoc, která propukne až v dospělosti?
- Jsou genetické testy spolehlivé a interpretovatelné lékařskou komunitou?
- Způsobují geny, že se lidé chovají určitým způsobem?
- Mohou lidé vždy kontrolovat své chování?
- Kde se nachází linie mezi léčbou a vylepšením?
- Kdo vlastní geny a další sekvence lidské DNA?
- Bude patentování sekvencí DNA omezující pro jejich nedostupnost a zbrzdí se tím vývoj užitečných produktů?

Etické otázky plynoucí z HGP

- 1. Vyrůstající informovanost a genetické konstituci jedince a celých populací vede k otázce, kdo by měl kontrolovat získávání těchto informací a kde by tyto informace měly být přístupné. Do této otázky spadají otázky týkající se presymptomatického testování, screening přenašečů, genetický screening prováděný zaměstnavatelem za účelem zjištění vhodnosti uchazeče k dané práci atd.
- 2. V nedaleké budoucnosti budu zcela jistě možné manipulovat genom embryí za účelem změny genotypu i fenotypu
- 3. Vyrůstající informovanost obhledně genetického základu behaviorálních projevů zřejmě změní naše sebepochopení a ovlivní sociální instituce.[\[1\]](#)

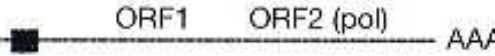
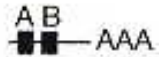
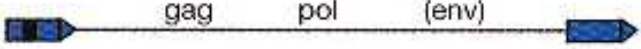
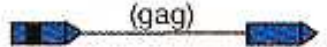
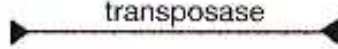

[\[1\]](#) Murray, T.H., (1991) Ethical issues in human genome research
FASEB Journal 5,55-60

Lidský genom

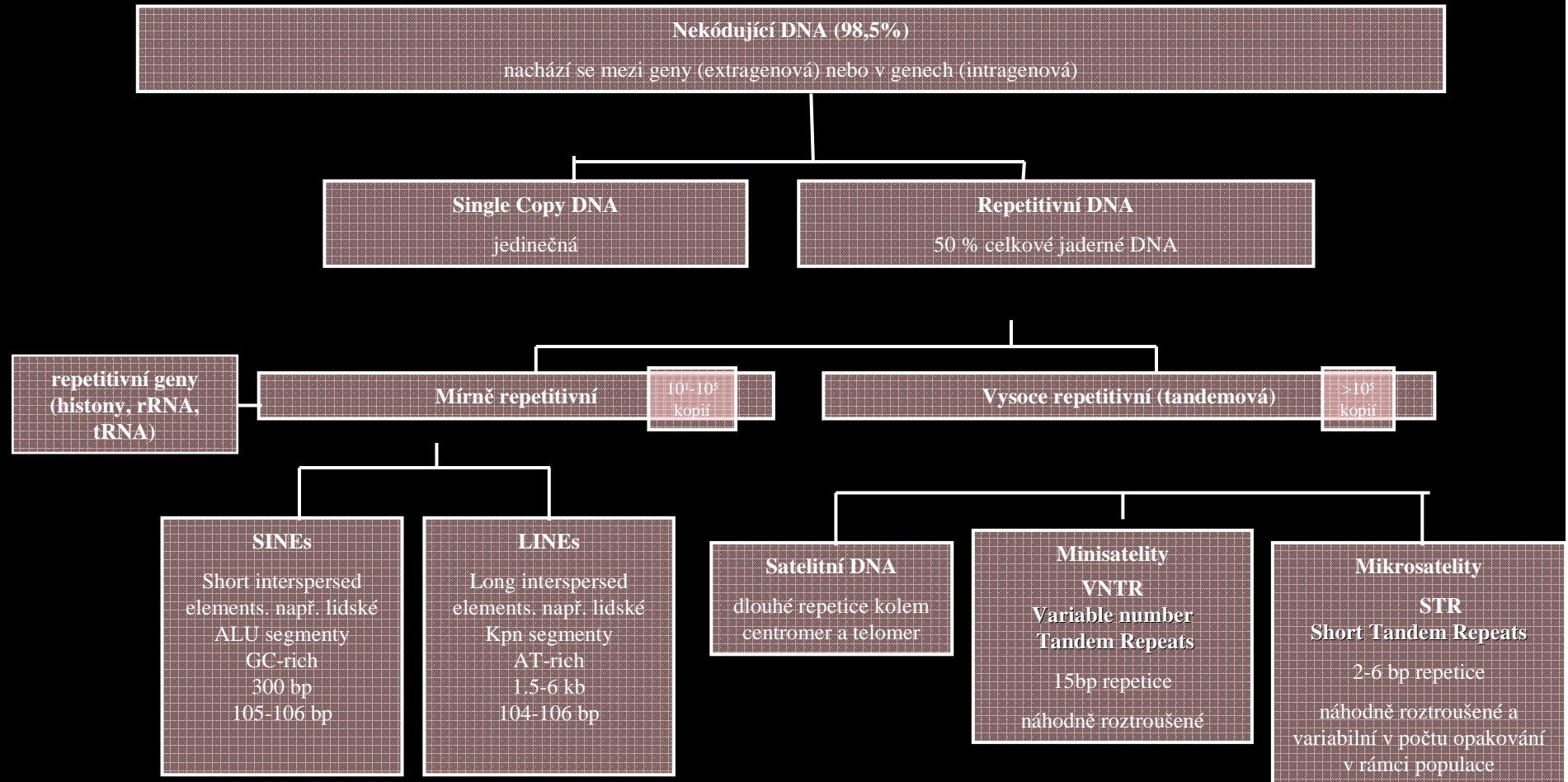
- má přibližnou velikost 3,2 Gb (haploidní stav)
- z nichž je 2,95 Gb tvořeno euchromatinem.
- 28% sekvencí je transkribováno do RNA a z těchto 28% je pouhých 5% přepisováno do proteinů; což je 1,1% - 1,4% absolutní velikosti celého genomu člověka.
- Přes 50% genomu je tvořeno repetitivními sekvencemi:
- 45% genomu je tvořeno jedním ze čtyř typů parazitických DNA elementů,
- 3% genomu tvoří repetice jen několika bází
- 5% genomu je tvořeno recentními duplikacemi velkých segmentů DNA. .
- Lidský genom tak z určitého úhlu pohledu připomíná moře repetitivních sekvencí s malou příměsí genů.

PARAZITICKÁ DNA

Classes of interspersed repeat in the human genome

| | | | Length | Copy number | Fraction of genome |
|--------------------------|----------------|--|-------------|-------------|--------------------|
| LINEs | Autonomous |  | 6–8 kb | 850,000 | 21% |
| | Non-autonomous |  | 100–300 bp | | |
| Retrovirus-like elements | Autonomous |  | 6–11 kb | 450,000 | 8% |
| | Non-autonomous |  | 1.5–3 kb | | |
| DNA transposon fossils | Autonomous |  | 2–3 kb | 300,000 | 3% |
| | Non-autonomous |  | 80–3,000 bp | | |

REPETITIVNÍ SEKvence EUKARYOTICKÉHO GENOMU



Lidský genom

- 22 287 genů kódujících proteiny

méně genů než se očekávalo: předpovídalo se 150,000 (před sekvenací), 30-40,000 (2001)

- Průměrně 9 genů na 1Mb
- Celkem 232 000 exonů (průměrně 10,4 exonu / gen)
- Identifikovaných asi 20 000 pseudogenů

Gen

Solitární gen:

- **v celém genomu v jediné kopii (asi polovina genů)**

Genová rodina:

- **skupina genů evolučně pocházející z jediného genu, v evoluci postupná diverzifikace sekvence a funkce**

Pseudogen:

- **gen který zmutoval natolik že nemůže být přepisován (v celém genomu > 20 000)**

Zpracovaný (“processed”) pseudogen:

- **pseudogen vzniklý zpětným přepisem mRNA a integrací do genomu**

Struktura genu

Structural elements of a gene:

Exons: Protein-coding DNA sequences of a gene

Introns: Non-coding DNA sequence of a gene located inbetween exons

5' Untranslated Region (UTR): Non-coding DNA sequence upstream of the translation start site

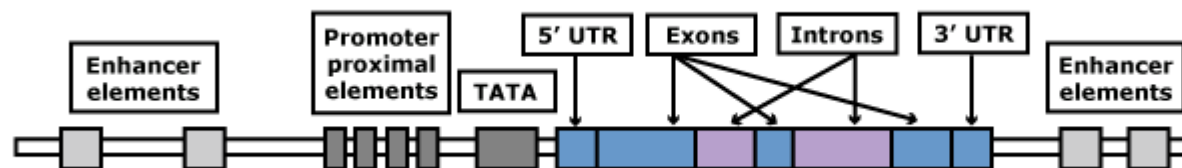
3' Untranslated Region (UTR): Non-coding DNA sequence downstream of the translation stop site

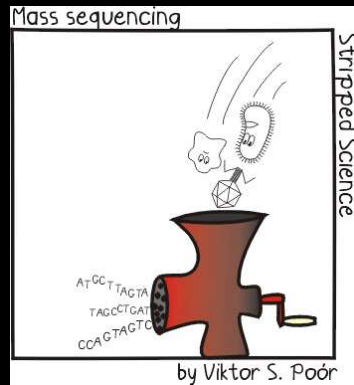
Transcription control regions of a gene:

TATA Box/Promoter Region: Binding site for transcription factors and RNA polymerase.

Promoter Proximal Elements: Transcription control regions that are located 100-200 base pairs upstream of the transcription start site.

Enhancer Elements: Transcription control regions that are located further away (sometimes thousands of base pairs from the start site). These elements may occur upstream or downstream of the start site, or they may even occur within an intron of the gene.





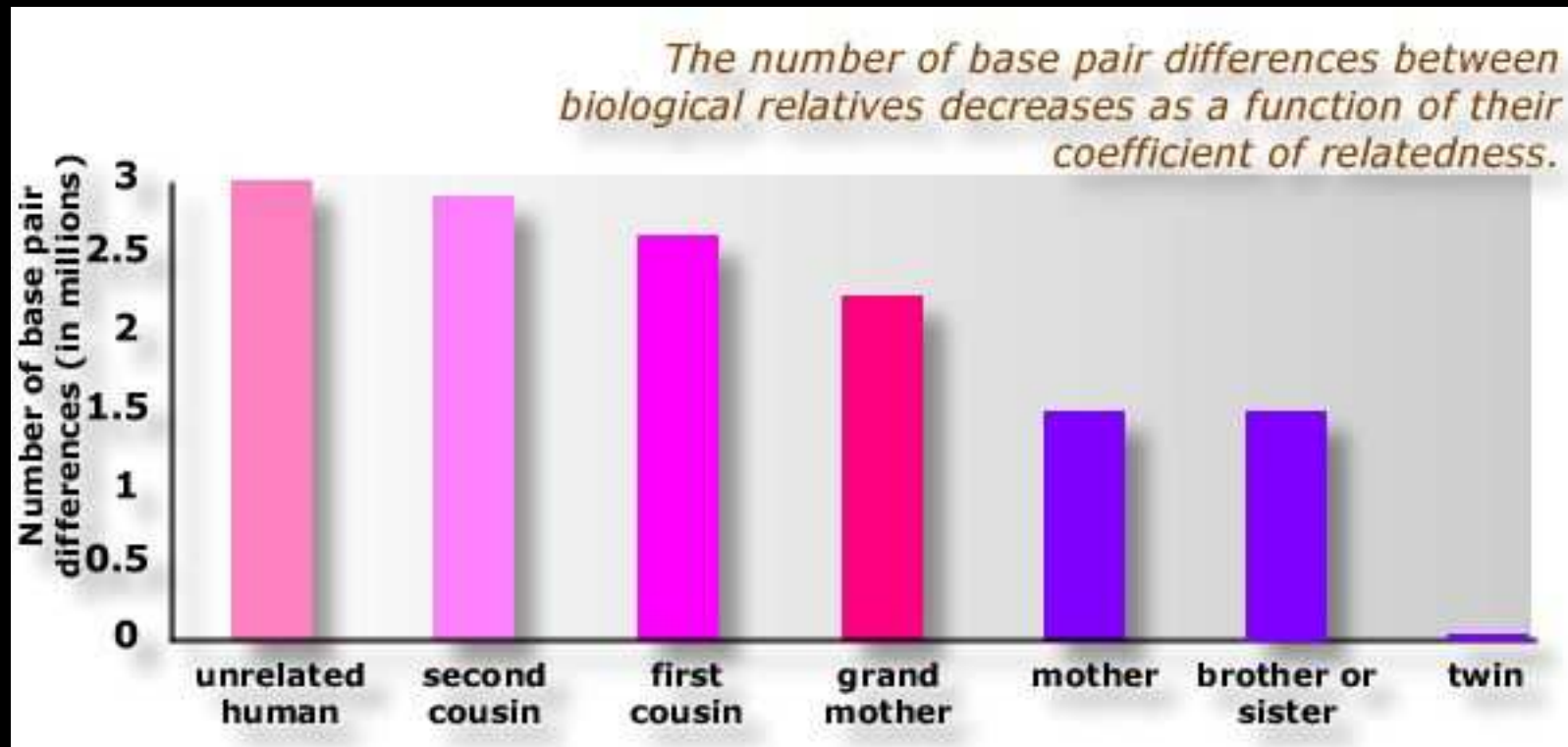
| organismus | Velikost (Mbp) | počet genů |
|--|----------------|-------------|
| člověk (<i>Homo sapiens</i>) | 3 200 | 22 000 |
| lidská mitochondriální DNA | 0.016 | 37 |
| laboratorní myš (<i>M. musculus</i>) | 2 600 | ± 25.000 |
| rýže (<i>Oryza sativa</i>) | 430 | ± 60.000 |
| huseníček (<i>A. thaliana</i>) | 125 | 25.498 |
| kukuřice (<i>Zea mays</i>) | 2 500 | ± 40-60.000 |
| pšenice (<i>Triticum aestivum</i>) | 15 000 | ± 40-60.000 |
| hlíst (<i>C. elegans</i>) | 97 | ± 19.000 |
| octomilka (<i>D. melanogaster</i>) | 137 | 13.472 |
| kvasinka (<i>S. cerevisiae</i>) | 12.1 | 5.770 |
| bakterie (<i>E. coli</i>) | 4.6 | 4.377 |
| virus (HIV) | 0.009 | 9 |

Lidský genom

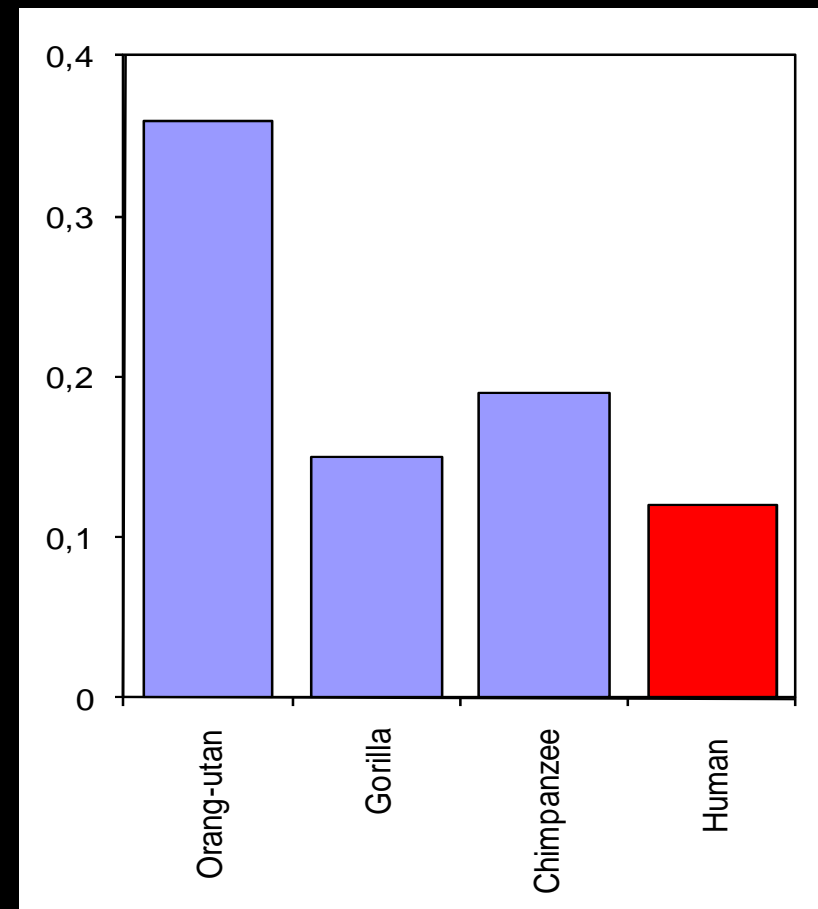
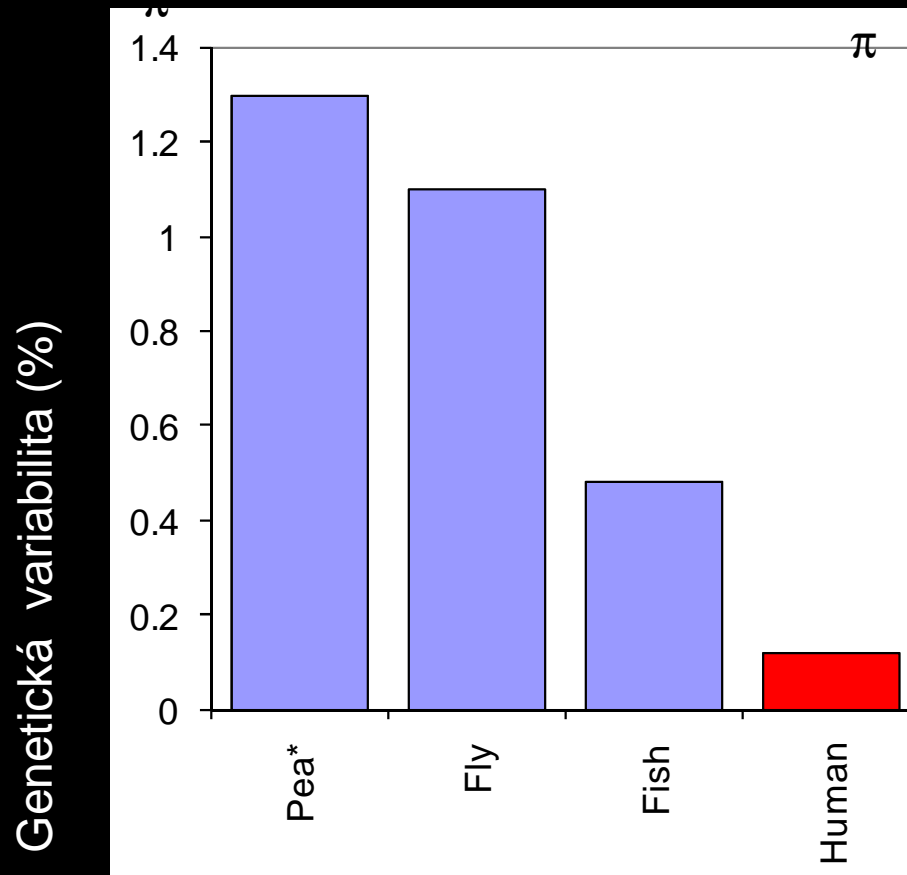
odlišnosti uvnitř druhu *Homo sapiens* v rámci celého genomu 0.1 – 0,5%
(většina je v nekódujících sekvencích)

- 1,5 milionu pb - rozdíl mezi matkou a dítětem
- 2,25 milionů pb - rozdíl mezi babičkou a vnučkou
- 3 miliony pb - rozdíl mezi dvěma náhodnými lidmi na Zemi

Všichni lidé si jsou nápadně podobni



Humans show little genetic variation compared with other species



Lidský genom

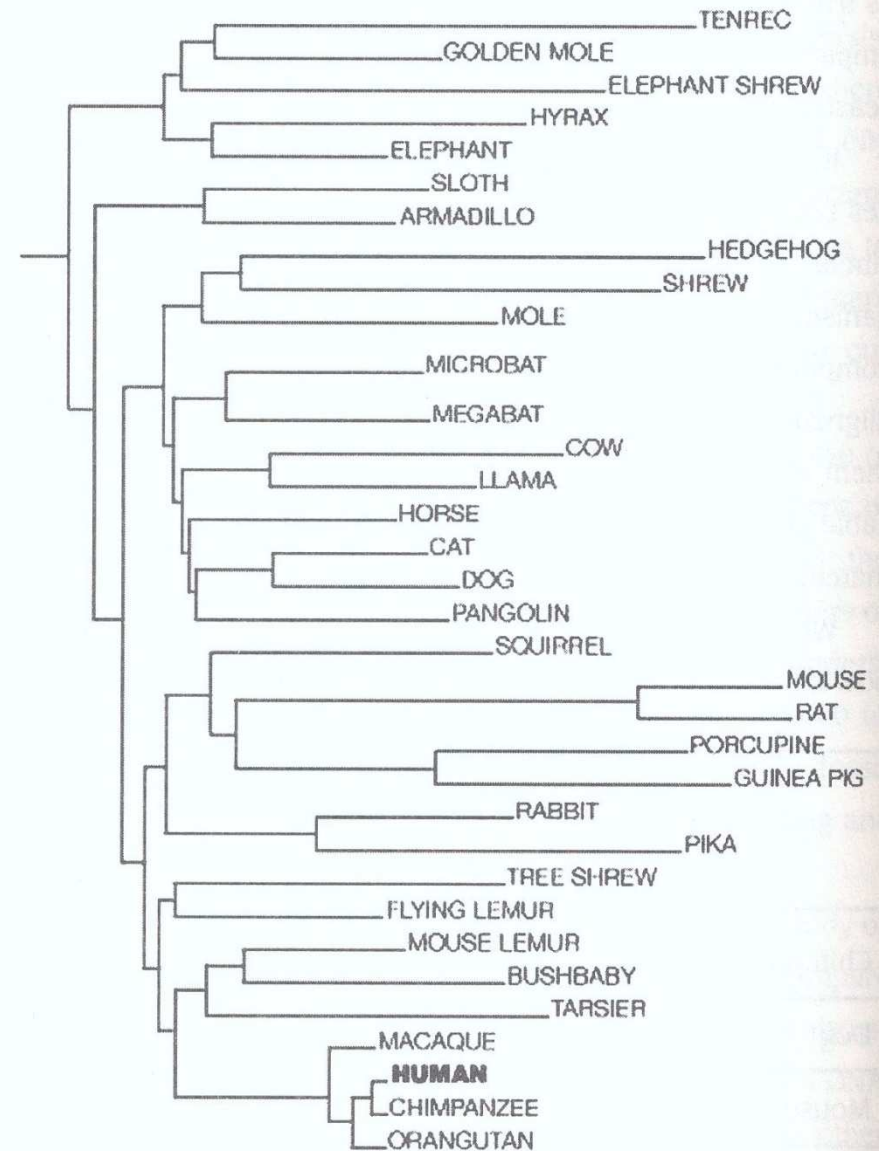
lidé sdílí překvapivé množství genetického materiálu
s ostatními organismy

- 99% homologie s ostatními primáty (v genech), 96% (celkem)

Tento „strom života“ vznikl
POUZE na základě
podobností sekvence DNA,
nebylo přihlíženo ke
stávajícím zoologickým
systémům či vnější podobě
organismů

Collins, F., (2006) *The Language of God*. Free Press, New York, p. 128)

The Language of God



Lidský genom

Jaderný genom
3 000 Mb
cca 22 000 genů

Mitochondriální genom
16,6 kb
37 genů

Intragenová
DNA

Extragenová
DNA

2 rRNA
geny

22 tRNA
genů

13 strukturálních
genů

Kódující
DNA

Nekódující
DNA

Unikátní
sekvence

Repetitivní
sekvence

Pseudogeny

Genové
fragmenty

Introny
Nepřekládané
oblasti

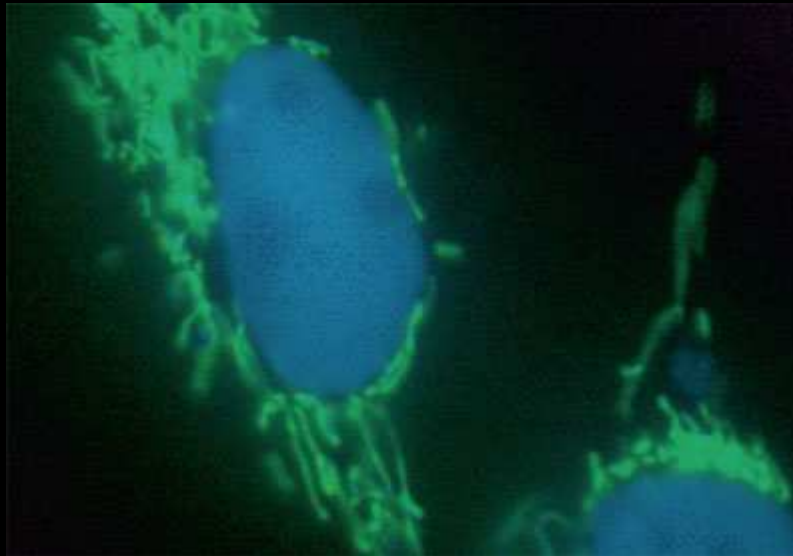
Tandemové
sekvence

Roztroušené
sekvence

1% DNA kóduje nějaké znaky

Lidský genom

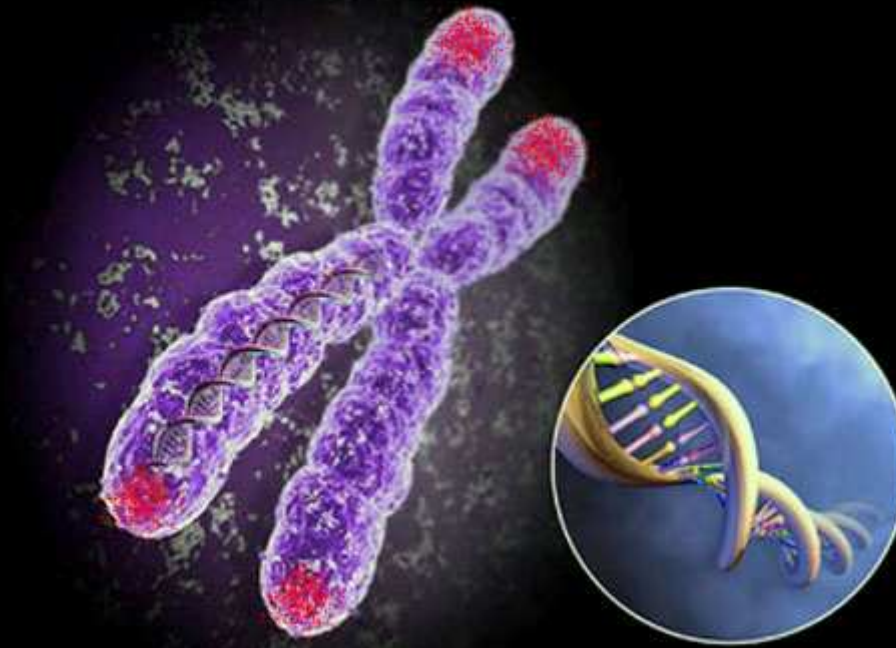
- jaderný
- mitochondrialní



Buněčné jádro obklopené mitochondriemi

Jaderný genom

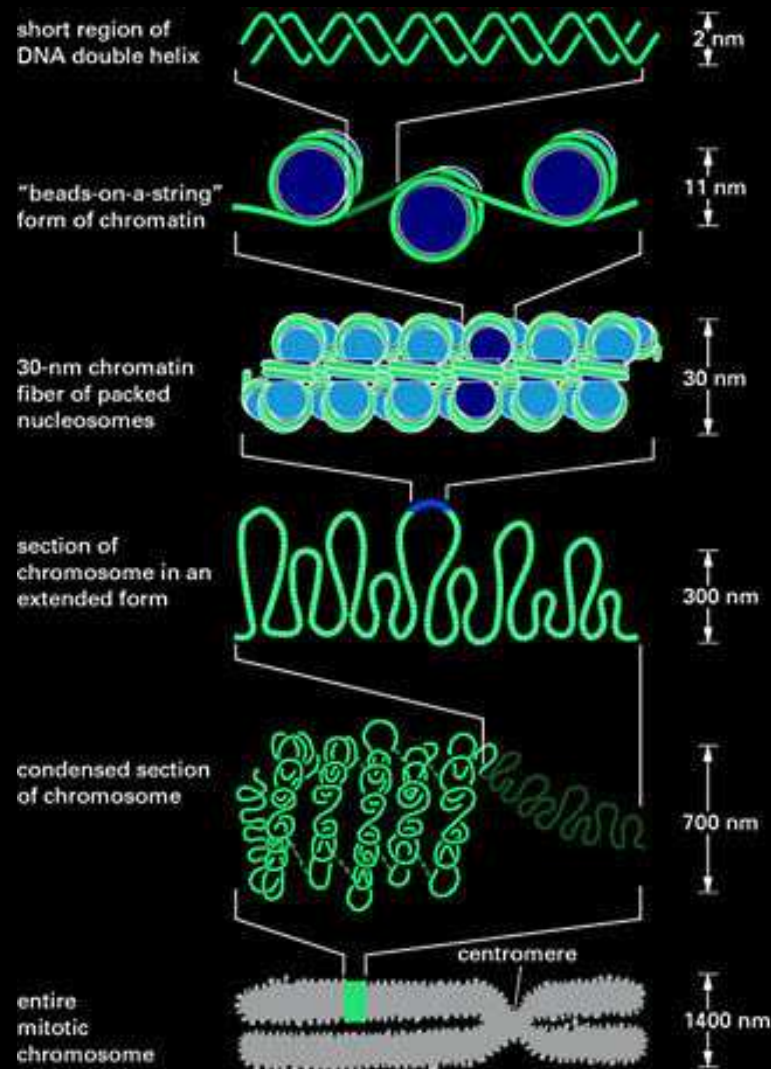
Každá DNA molekula je sbalena do **chromosomu**



Každý ze **46 chromosomů** člověka je tvořené jednou molekulou dvoušroubovicové

Chromosomes are tightly coiled microscopic structure

an elaborate system of coiling, which also seem to be involved in the control of gene expression is present in mammalian cells



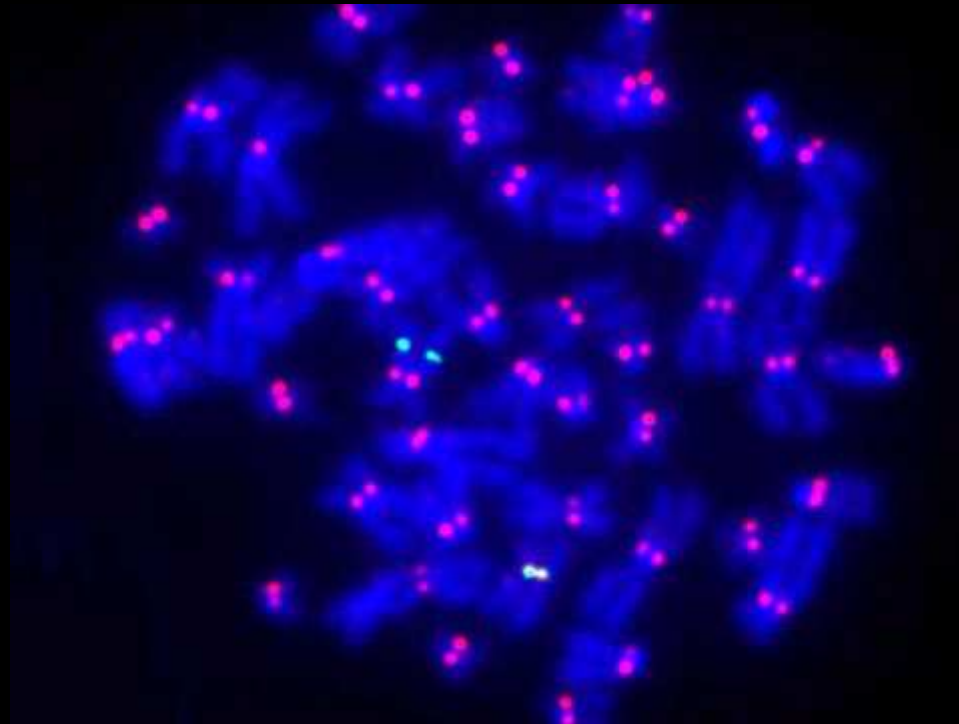
basic proteins called **histones** provide a core around which **DNA** is wound in a double loop composing approximately 146bp of DNA - **NUCLEOSOME**

if stretched out, the DNA from a single cell would extend **approximately 2 meters** in length

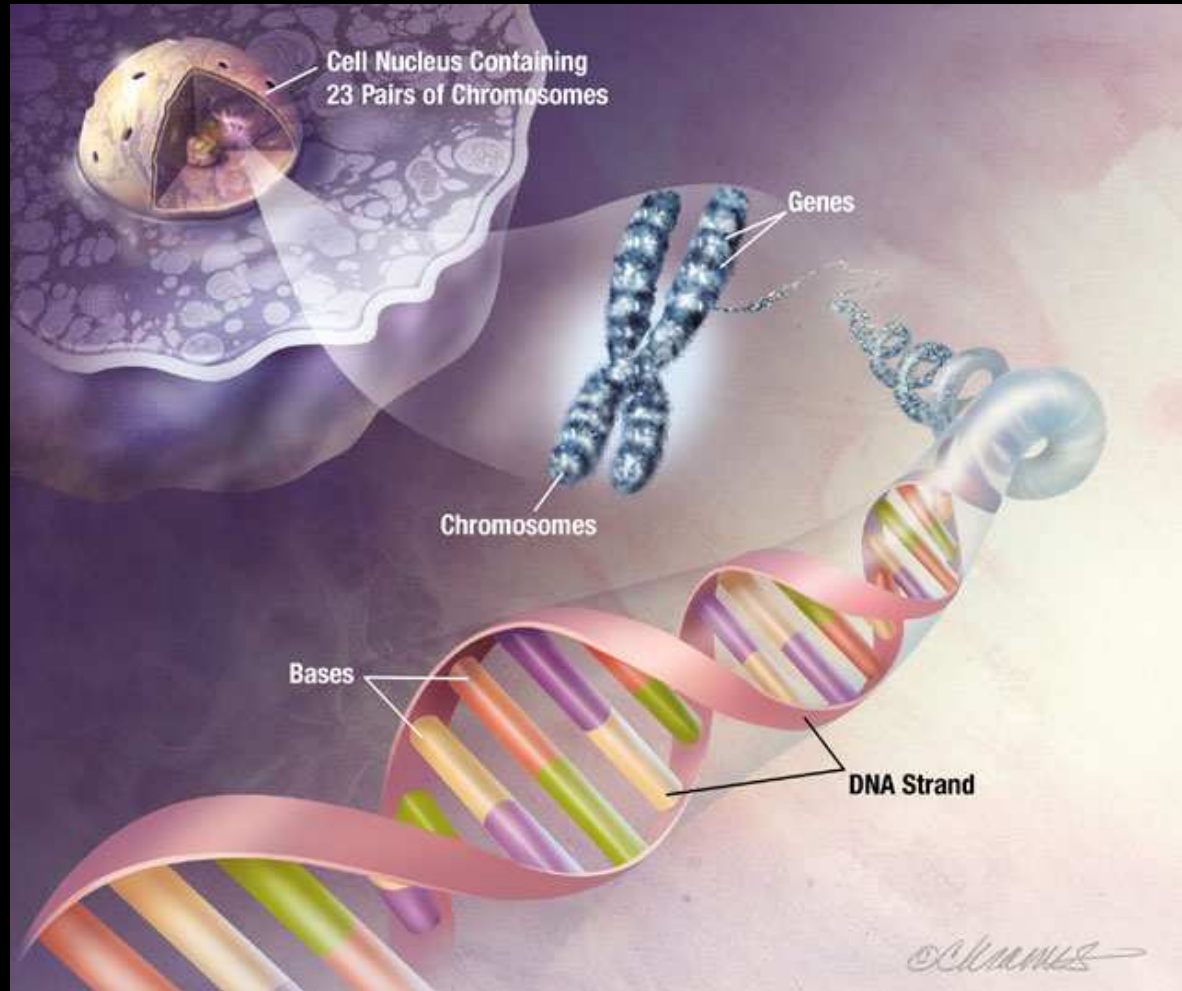
mitotic chromosome is 50 000 times shorter than its extended length

Nuclear genome

Uvnitř buněčného jádra je genetická informace soustředěna do molekul
DNA,
"zabalených" do chromozómů.



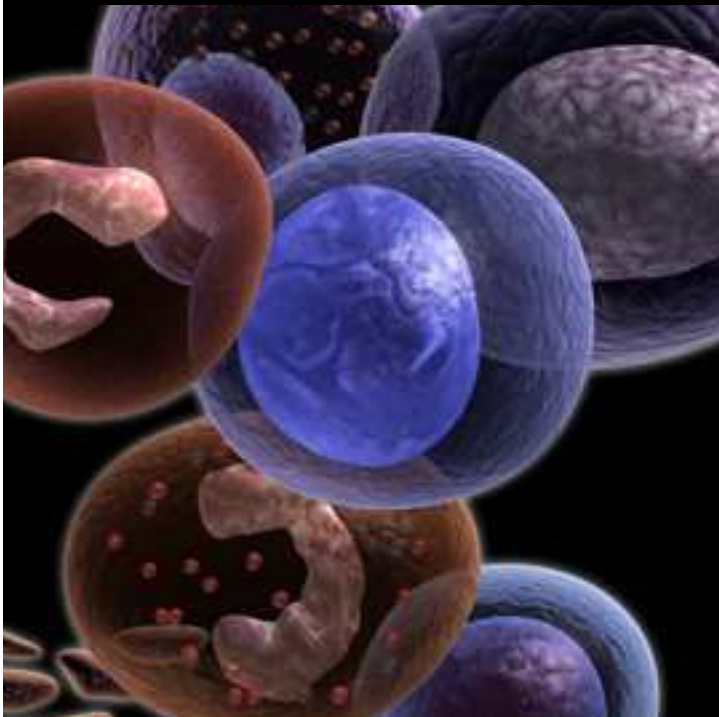
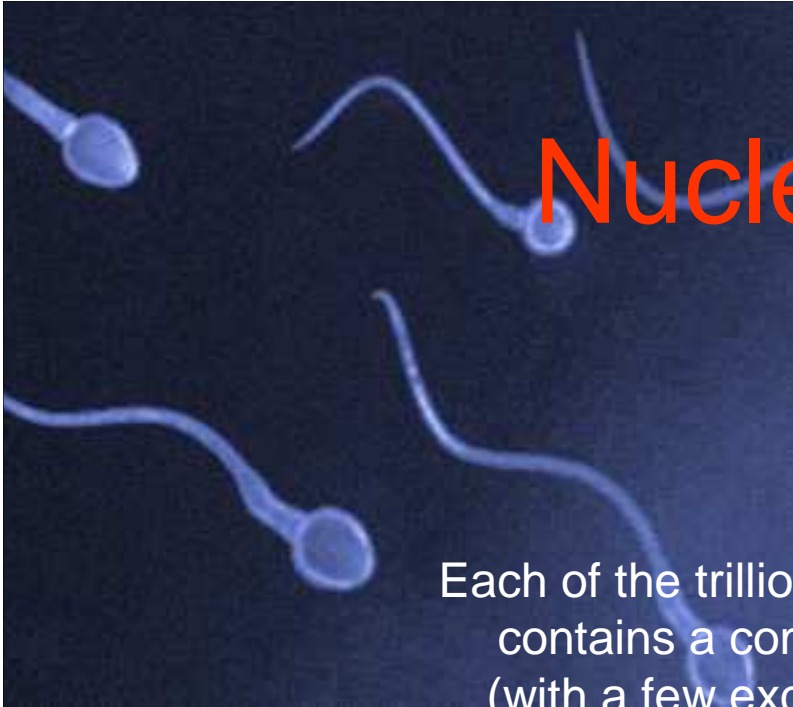
Jaderný genom



The four bases are repeated millions of times to form each chromosome
Lidský chromosom je délky od 50 milionů do 263 milionů bazí

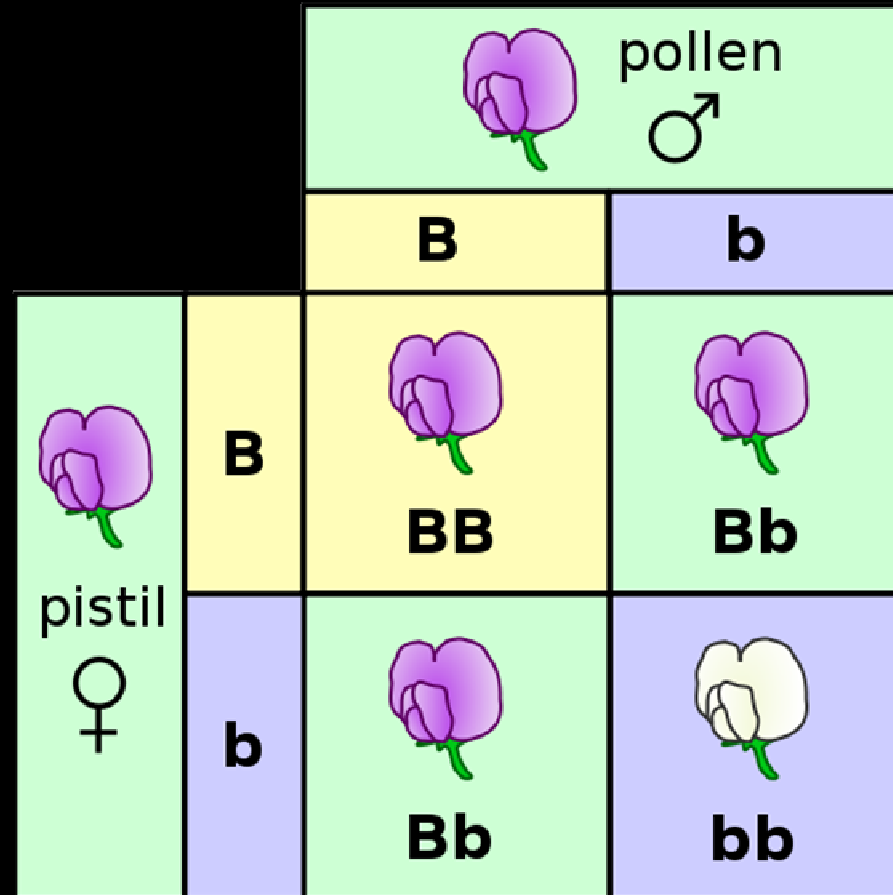
Nuclear genome

Each of the trillions of cells in the human body contains a complete set of chromosomes (with a few exceptions e.g. red blood cells)



Nuclear genome

Mendelian inheritance

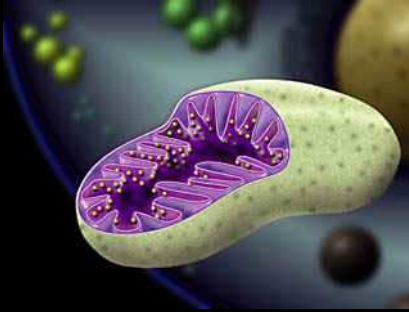


Mitochondrial genome



Many mitochondria are found in each cell, all containing mtDNA

Mitochondrial genome



Mitochondriální dvoušroubovicová DNA tvoří jednu kruhovou molekulu

Mitochondria have their own DNA, a relic from the distant past when they were free-living organisms.
•Evidence of this is the slightly different genetic codes found in nonplant mitochondria. For example:

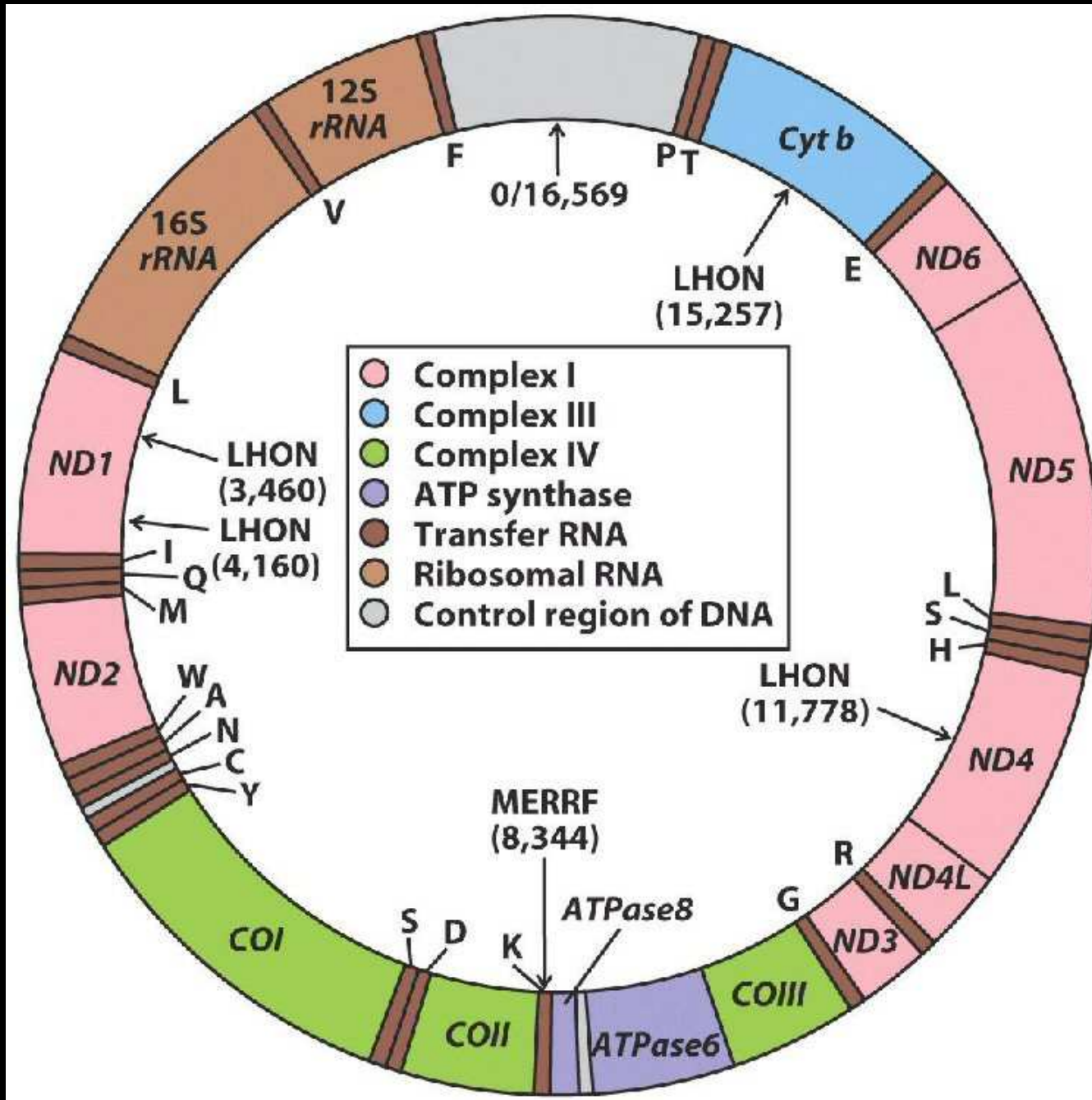
| Organism | Code | Amino Acid (standard) |
|----------------------|------|-----------------------|
| All nonplant species | UGA | Tryptophan (stop) |
| Mollusks | AGA | Serine (Arginine) |
| Yeast | CUU | Threonine (Leucine) |

Mitochondrial genome

Exclusively maternal inheritance



The male mtDNA within the sperm's tail is lost as it enters the egg



mtDNA vs. choroby

- [cyclic vomiting syndrome](#) –přestavby rozáhlých segmentů mtDNA
- [Leber hereditary optic neuropathy](#) - mutace v genech *MT-ND1*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, and *MT-ND6*
- [mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes](#) - mutace v genech *MT-ND1*, *MT-ND5*, *MT-TH*, *MT-TL1*, and *MT-TV*
- [myoclonic epilepsy with ragged-red fibers](#) - mutace v genech *MT-TK*, *MT-TL1*, *MT-TH*, and *MT-TS1*
- [neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa](#) - mutace v genu *MT-ATP6*
- [nonsyndromic deafness](#) - mutace v genech *MT-RNR1* a

MT-TS1

- cancer, including breast, colon, stomach, liver, and kidney tumors, cancer of blood-forming tissue (leukemia) and cancer of immune system cells (lymphoma) – somatické mutace
- age-related disorders: heart disease, Alzheimer disease, and Parkinson disease - somatické mutace

The human nuclear and mitochondrial genomes

differ in many aspects of their organisation and expression

| | 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 | 22 000 | 37 |
| Gene density | $\sim 1/40$ 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 | 1 – 2 % | $\sim 93\%$ |
| 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 |

Polymerázová řetězová reakce PCR

Genetici potřebují pro své analýzy
značné množství studovaného úseku DNA

PCR zmnoží zvolený úsek DNA
Rychle a spolehlivě

Syntéza obou řetězců u specifické sekvence



Polymerázová řetězová reakce PCR

Kery Mullis

V roce 1983 PCR metodu
vynalezl
a postaral se o jednu z
největších revolucí
v molekulární genetice



Když v r. 1993 Kary Mullis z rukou švédského krále přijímal Nobelovu cenu za objevení realizaci PCR, sám skromně charakterizoval svůj obdivuhodný nápad a deset let práce na jeho uskutečnění jako souběh náhod, vědecké naivity a série šťastných omylů.

Molekulárně - genetická diagnostika

- **Diagnostika infekcí**

diagnostiky detekujících virová, bakteriální, mykotické a parazitální patogeny v různých tělních tekutinách

- **Diagnostika geneticky podmíněných chorob**

postnatální, prenatální, preimplantační diagnostika, populační screening

- **Diagnostika nádorových onemocnění**

analýza tumorsupresorových genů a onkogenů, diagnostická vyšetření zaměřená na detekci kauzálních markerů a prognostických faktorů ve vztahu k onkologickým onemocněním, monitorování terapie rakoviny, zjišťování minimální reziduální choroby.

- **Farmakogenetika**

stanovení tolerance k farmakům

- **DNA typizace osob (soudní lékařství, transplantologie)**

Molekulárně - genetická diagnostika

- **Diagnostika infekcí**

diagnostiky detekujících virová, bakteriální, mykotické a parazitální patogeny v různých tělních tekutinách

Cílem je detekovat infikované buňky

na pozadí mnohonásobně početnějších neinfikovaných buněk

Provádí se za použití PCR na DNA nebo cDNA cizírodých organismů

Konvenční diagnostické metody

-vypěstování organismu v kultuře

-detekce přítomnosti organismů za použití protilátek

Časově náročné

Někdy málo citlivé

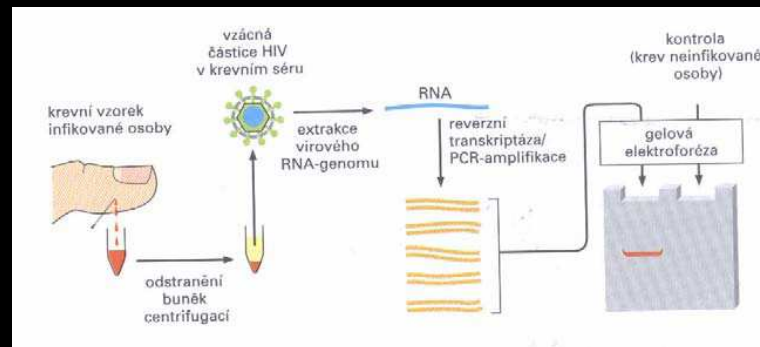
Molekulárně - genetická diagnostika

- Diagnostika infekcí

HIV

Přítomnost virová RNA naznačuje aktivní infekci

Lze prokázat provedením PCR za použití cDNA jako templátu vytvořených pomocí RT z RNA infikovaných buněk



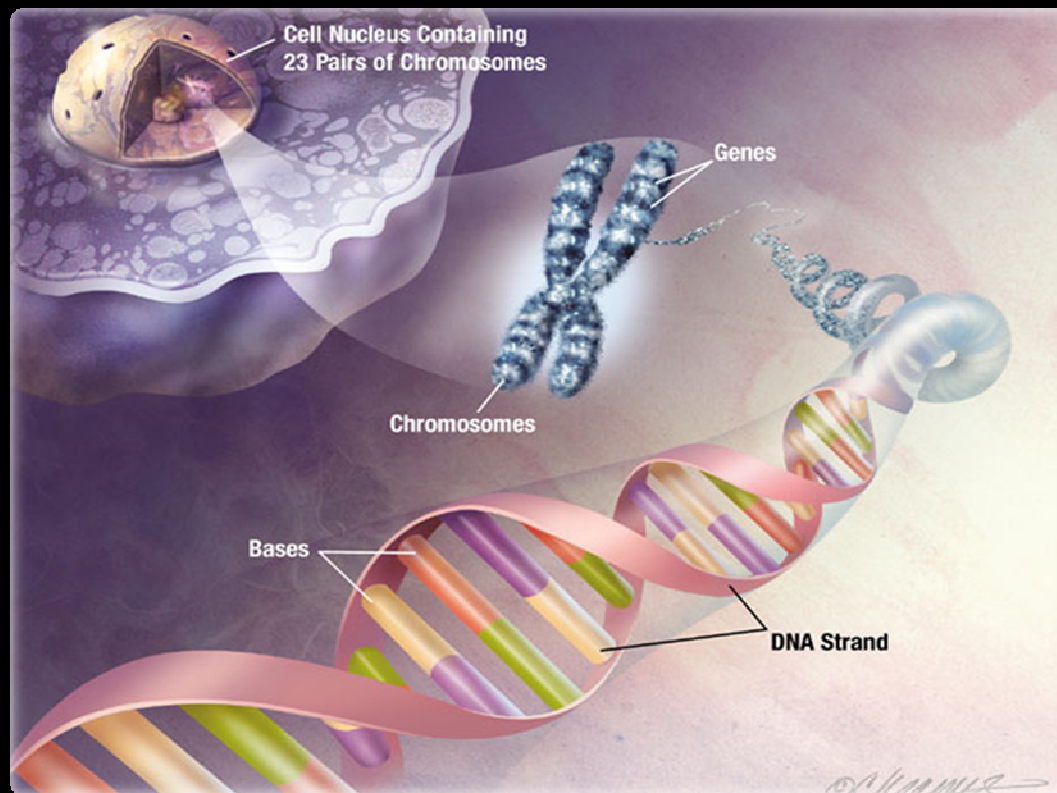
Tuberkulóza

Pomocí PCR prokazován některý z vysoce konzervativních genů mykobakterií pomocí primerů připraveným k těmto sekvencím

Amplifikovaný fragment je hybridizován se sondami vysoce specifickými pro daný kmen

Lze detekovat je 10 bacilů na 10000000 eukaryotických buněk

Molekulární diagnostika geneticky podmíněných chorob



Genetické choroby



a) Somatické

- vznikají v somatických buňkách
- mutantní změnu obsahují pouze části tkání,
které vznikly dělením původní mutantní buňky

b) Gametické

- předávány v zárodečné linii
 1. rodič je nositelem mutace
 2. mutace vzniká při tvorbě gamety
 3. mutace vzniká v gametogoniu,
vzniká gonodální mozaika
- všechny buňky jedince,
který vznikl z příslušné zygoty, obsahují mutantní změnu



Genetické choroby

- 1) Genomové
 - dojde ke změně celého genomu (polyploidie, aneuploidie)
- 2) Chromozomové
 - mutační změna postihla strukturu chromozomu (chromozomové aberace)
- 3) Genové
 - mutační změna v genu

Genové choroby

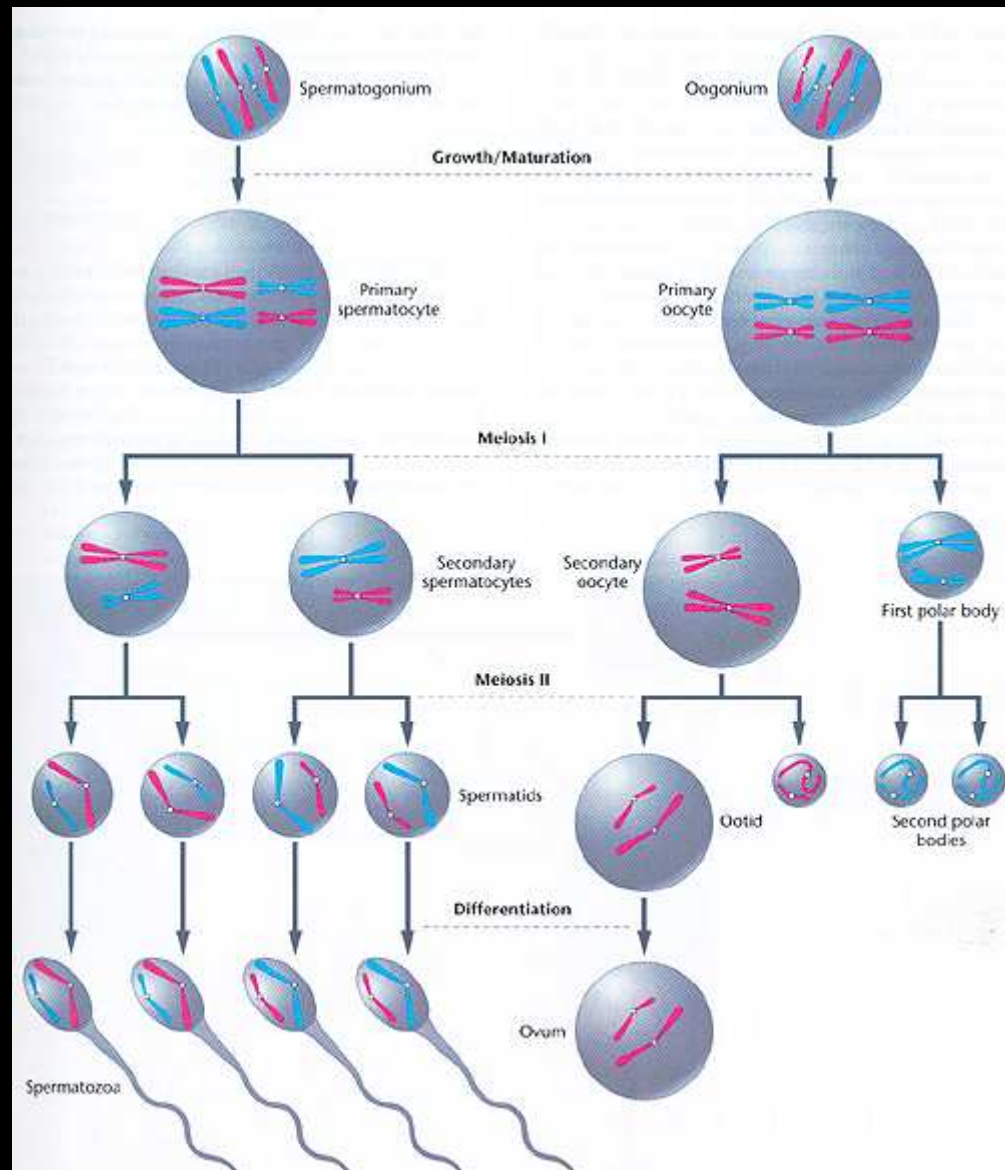


A) POLYGENNÍ nemendelovská dědičnost

- pravděpodobnost choroby závislá na variantách více genů + obvykle výrazně ovlivněna vlivem prostředí
- riziko stanovováno empiricky/statisticky na základě populačních studií
(diabetes, vrozené srdeční vady, schizofrenie, astma.....)

B) MONOGENNÍ mendelistická dědičnost

- vlastnosti (choroby) se dědí v závislosti na jediném genu (lokusu DNA), obvykle změněném mutací
- pravděpodobnost výskytu znaku/choroby u potomků
– Mendelovy zákony



Princip molekulárně genetické diagnostiky

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

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

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

Existují i vyšetření, které nezapadají do této definice,
z těch běžných např. molekulárně genetická detekce aneuploidií
(tato oblast byla donedávna zcela vyhrazena cytogenetice).





Molekulárně genetické vyšetření se provádí

prenatálně

postnatálně



Postnatální vyšetření

Pokud je prováděno u žijících osob, pak je cílem

- **potvrdit nebo upřesnit klinickou diagnózu**
- **identifikovat přenašeče genetických onemocnění**
- **stanovit presymptomatickou diagnózu,**

identifikaci onemocnění před jeho manifestací

tj. odhalit, jestli v genomu probanda je taková molekulární změna na určitém genu, která způsobí, že v průběhu svého života onemocní příslušnou chorobou.



Prenatální a preimplantační vyšetření

odhalují závažná onemocnění před narozením dítěte
má jasně preventivní úlohu

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

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





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

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



Přímá molekulárně genetická diagnostika

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

musíme znát:

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



Přímá molekulárně genetická diagnostika

Metody detekce známých mutací (scoring)

- v genu asociovaném s danou chorobou

- **Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)**
v genu asociovaném s danou chorobou



Metody detekce známých mutací (scoring)

detekce určité kauzální mutace pro danou chorobu specifickou metodou

Detekce známé sekvenční změny je možná u:

- 1) chorob s předpokládanou alelickou homogenitou, tzn. že patologická alela příslušného genu je reprezentovaná
 - * jedinou mutací (srpkovitá anemie)
 - * omezeným počtem mutací (α 1-antitrypsinový deficit)
 - * rozsáhlou řadou mutací rozmístěných přes celý gen, kdy jedna nebo vícemutací se vyskytují s prevalující četností (CFTR, DMD)
 - * expanzí trinukleotidových opakujících se sekvencí (HD, MD)
- 2) v rodinách s již charakterizovanou mutací v příslušném genu
- 3) ve výzkumu (k potvrzení kandidátního genu a k odlišení nepatogeního polymorfismu)



Příklady chorob s vymezeným počtem mutací

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



Metody detekce známých mutací (scoring)

detekce určité kauzální mutace pro danou chorobu specifickou metodou

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

Přímá DNA diagnostika

- **Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)**
postupné nebo multiplexní screenování úseků genu
asociovaného s danou chorobou pomocí vyhledávacích
metod

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

neodliší patogenní a nepatogenní změny v sekvenci DNA

jsou náročnější časově i finančně

Přímá DNA diagnostika

Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)

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

Přímá DNA diagnostika

Scoring RYR1 kauzálních mutací

Restrikční analýza

ARMS

Hybridizace

Analýza teploty tání (Real-time PCR)



Scanning RYR1 genu

Vyhledávací metody

(SSCP, DGGE, DHPLC)

Přímé sekvenování



Identifikace dosud nepopsané mutace

???

Přímá DNA diagnostika

neznámá mutace – kauzální mutace???

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

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

Vyšetřované genové choroby

<http://www.uhkt.cz/nrl/db>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>

<http://www.eurogentest.org/web/>

<http://www.genetests.org/>

<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>