

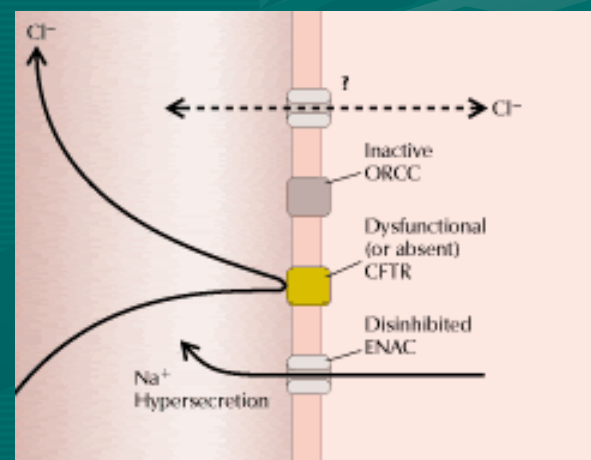
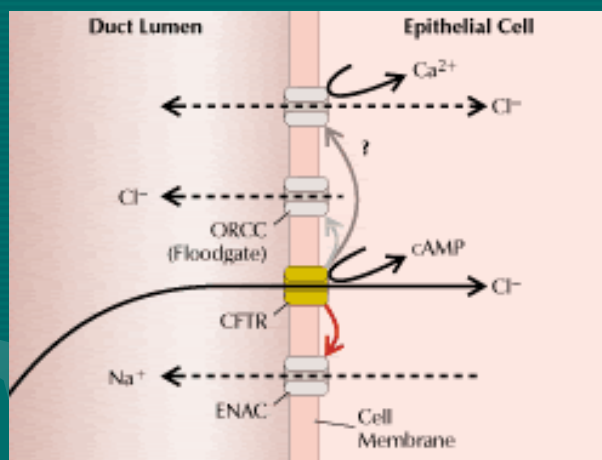
DNA analýza genu CFTR

The background is a solid teal color. In the lower half, there is a faint, semi-transparent image of two hands shaking, symbolizing agreement or partnership. The text is centered in the upper half.

Cystická fibróza

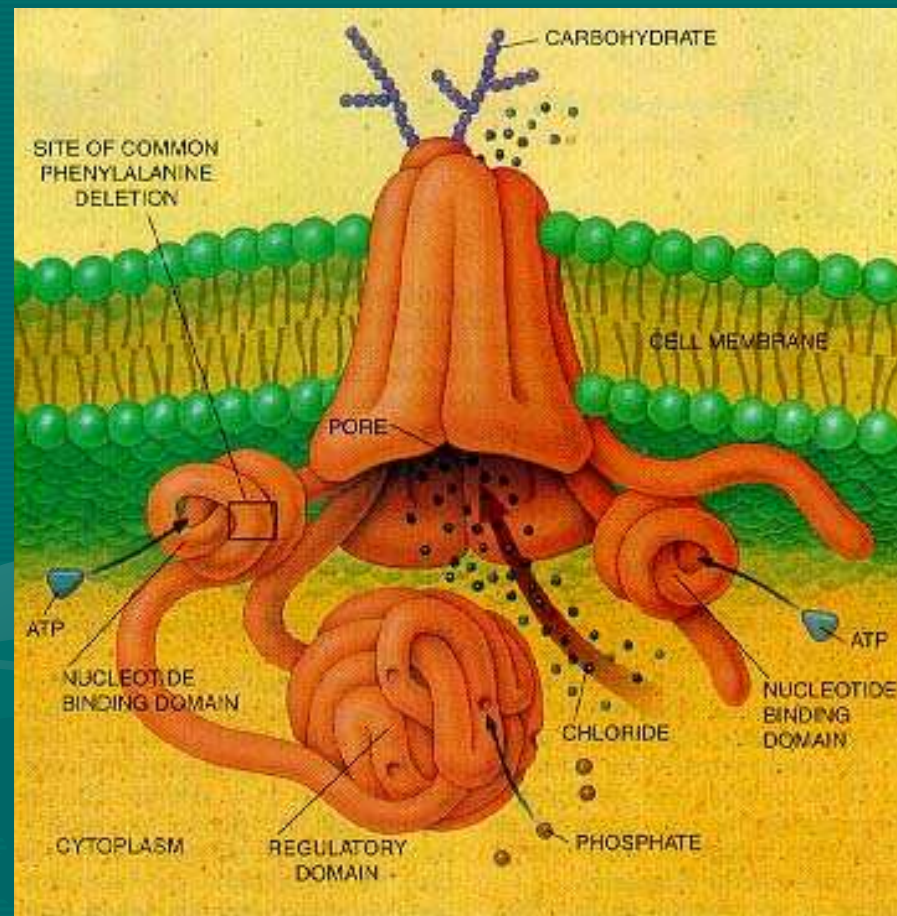
Molekulární postata choroby

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



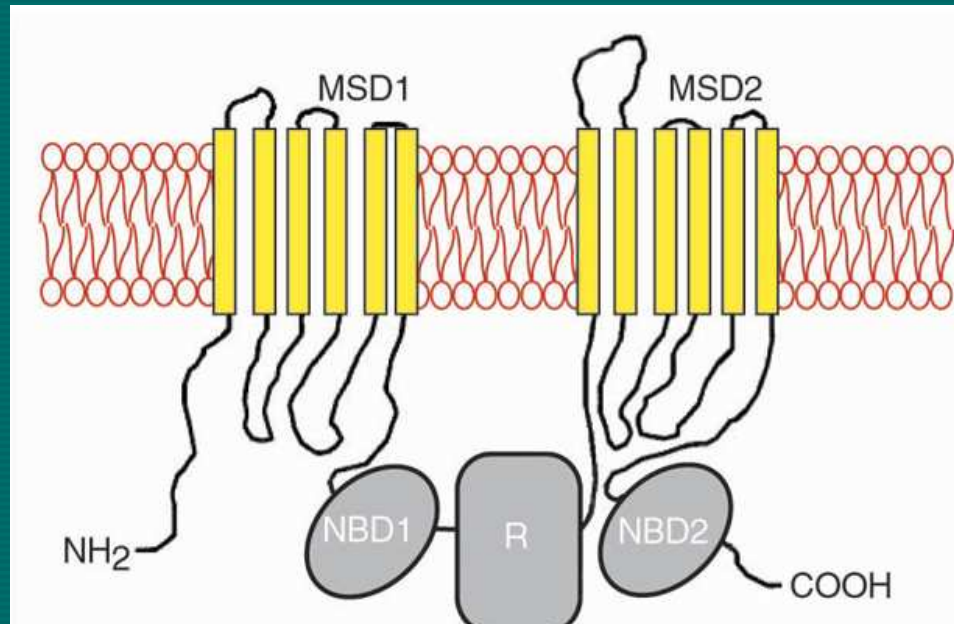
Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein - CFTR

chloridový kanál
regulující transport iontů přes buněčnou membránu



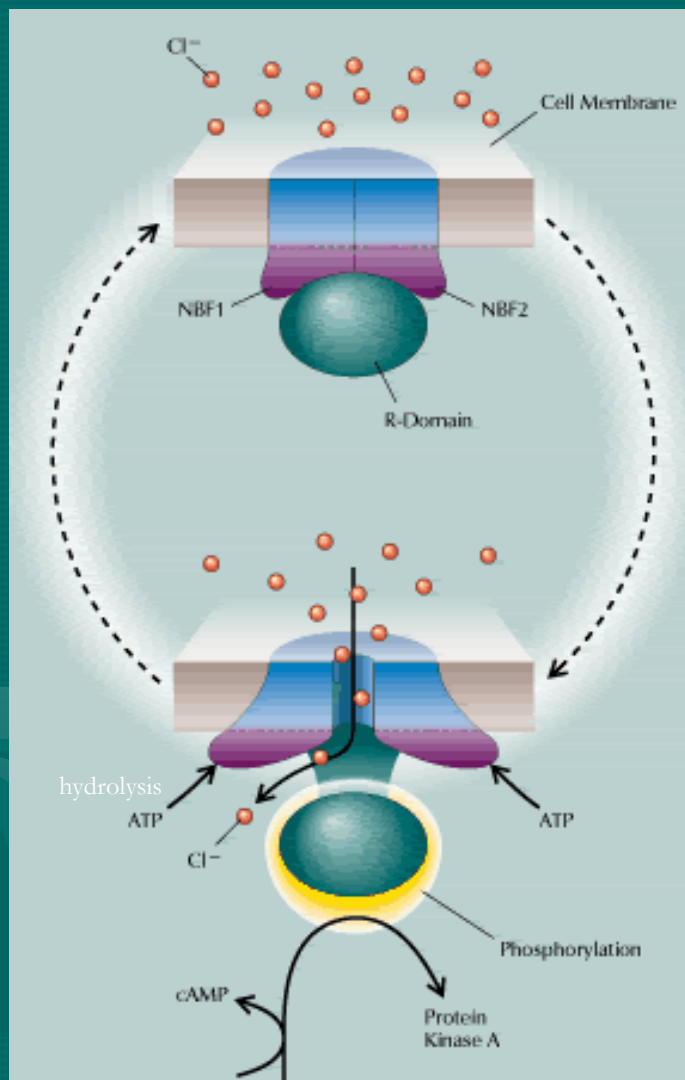
lokalizovaný v apikální membráně epitelálních buněk

Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein - CFTR



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

Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein - CFTR



klidové stádium

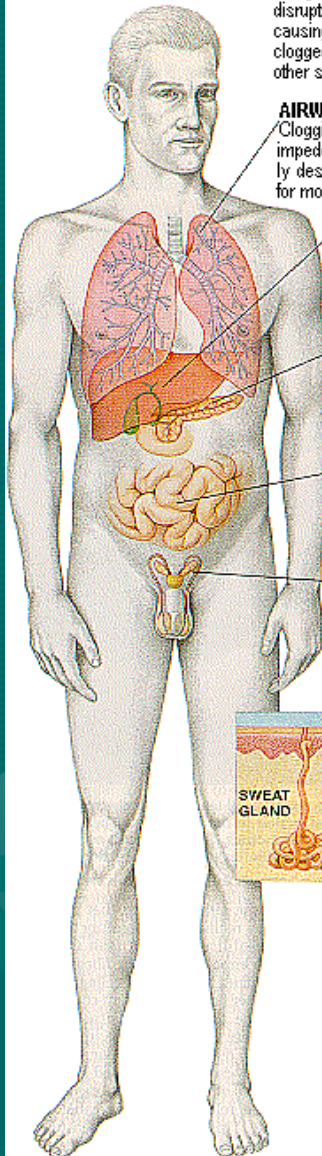
aktivní stádium

Vyžaduje:

- cyclic AMP
- protein kinase A
- ATP

Organs Affected by Cystic Fibrosis

The genetic defect underlying cystic fibrosis disrupts the functioning of several organs by causing ducts or other tubes to become clogged, usually by thick, sticky mucus or other secretions.



AIRWAYS

Clogging and infection of bronchial passages impede breathing. The infections progressively destroy the lungs. Lung disease accounts for most deaths from cystic fibrosis.

LIVER

Plugging of small bile ducts impedes digestion and disrupts liver function in perhaps 5% of patients.

PANCREAS

Occlusion of ducts prevents the pancreas from delivering critical digestive enzymes to the bowel in 85% of patients. Diabetes can result as well.

SMALL INTESTINE

Obstruction of the gut by thick stool necessitates surgery in about 10% of newborns.

REPRODUCTIVE TRACT

Absence of fine ducts, such as the vas deferens, renders 95% of males infertile. Occasionally, women are made infertile by a dense plug of mucus that blocks sperm from entering the uterus.

SKIN

Malfunctioning of sweat glands causes perspiration to contain excessive salt (NaCl). Measurement of chloride in sweat is a mainstay of diagnosis.

ROBERTO OSHI

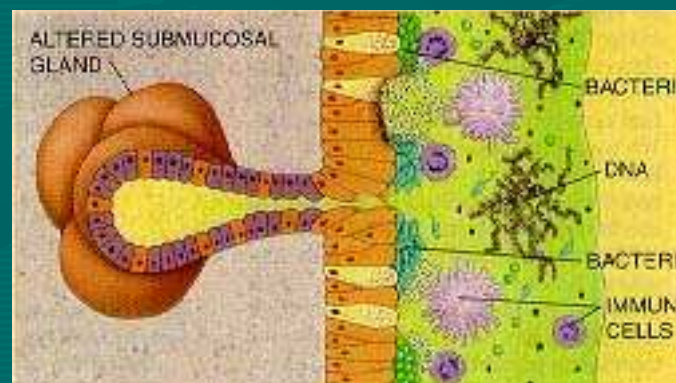
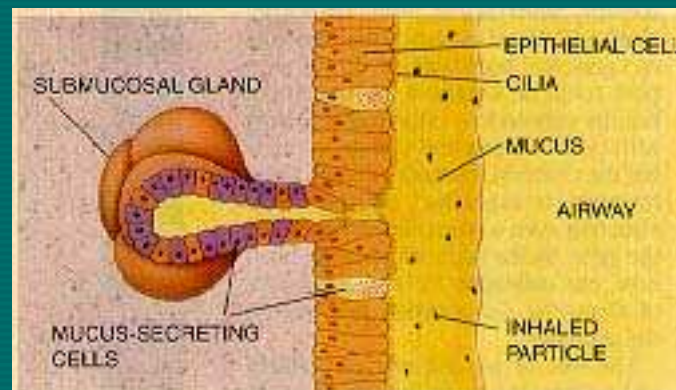
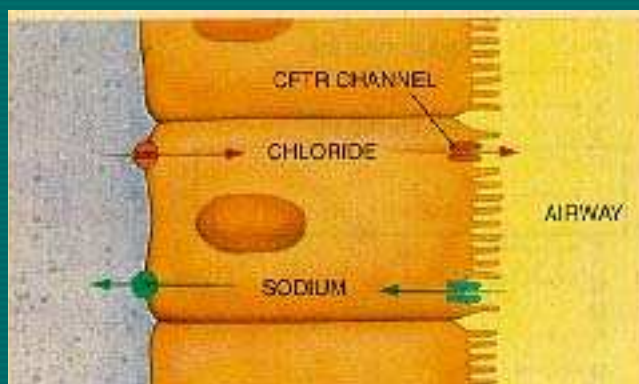
CFTR

exprese ve všech tkáních
(vyjma nervové)



multiorgánové onemocnění

CF plíce – molekulární podstata



Plíce

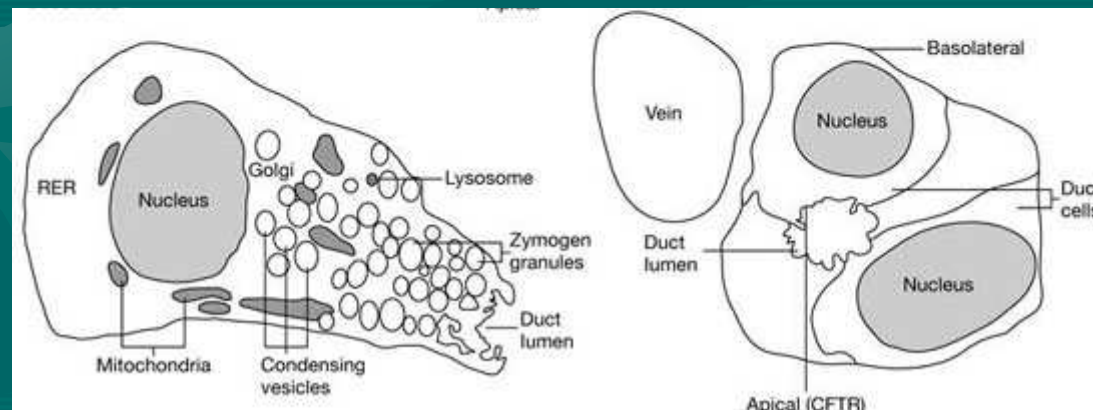
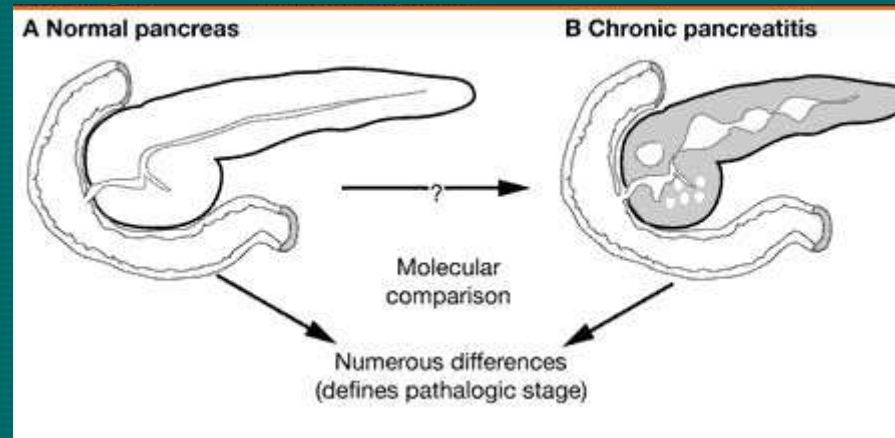


normální plíce

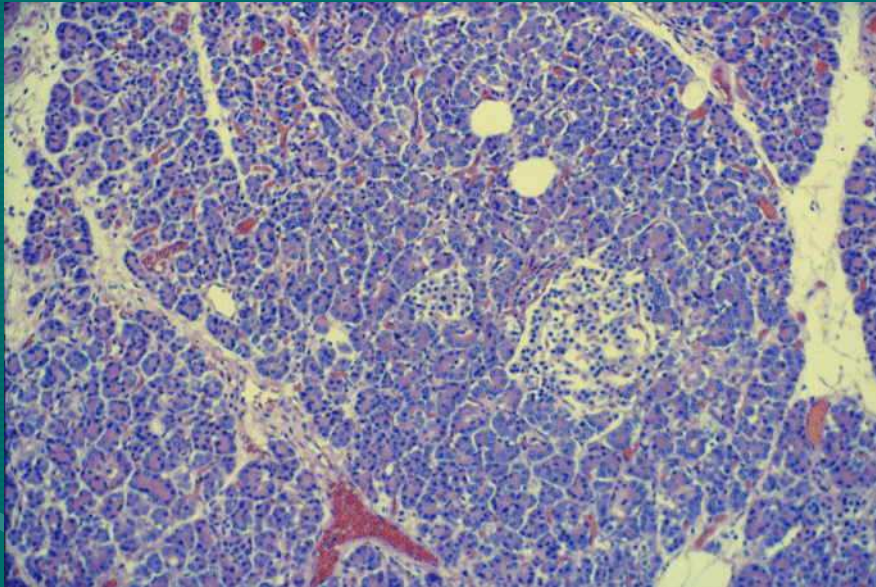


plíce z CF pacienta

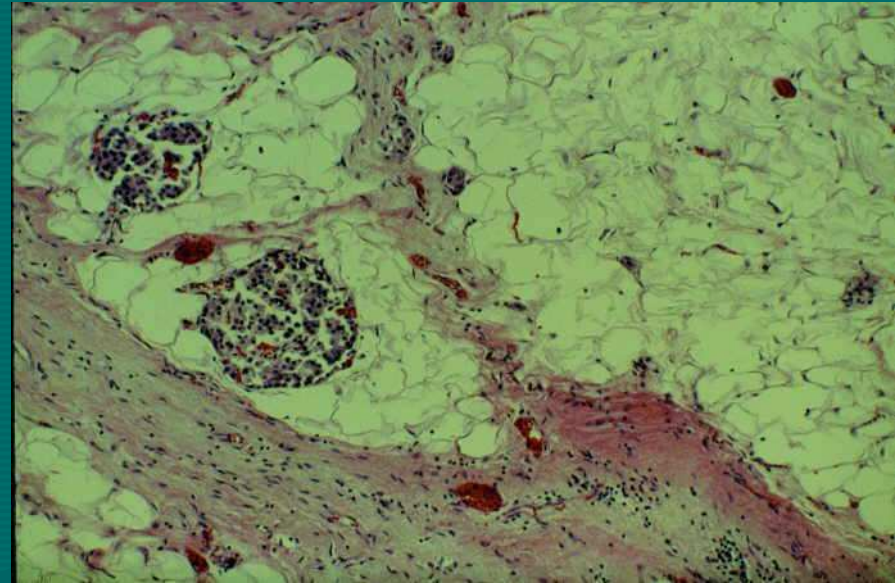
CF pancreas – molekulární podstata



Pankreas

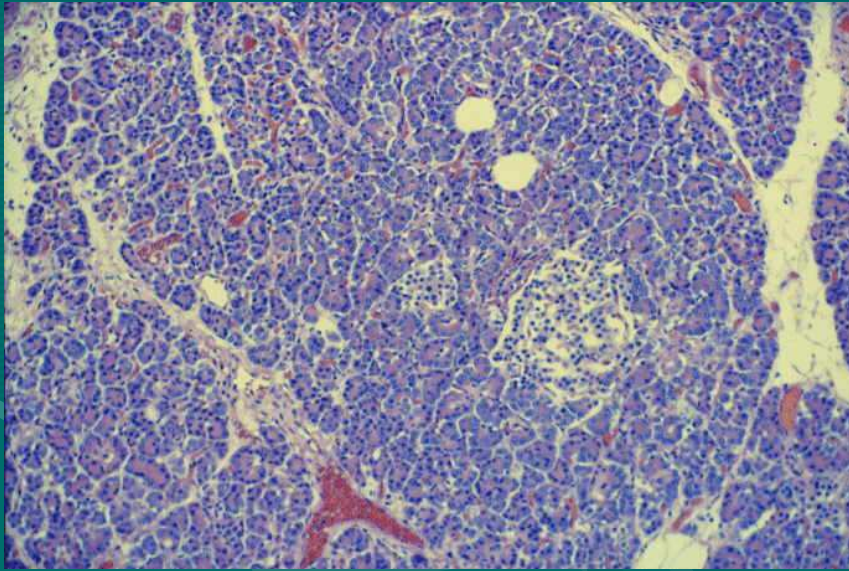


zdravý

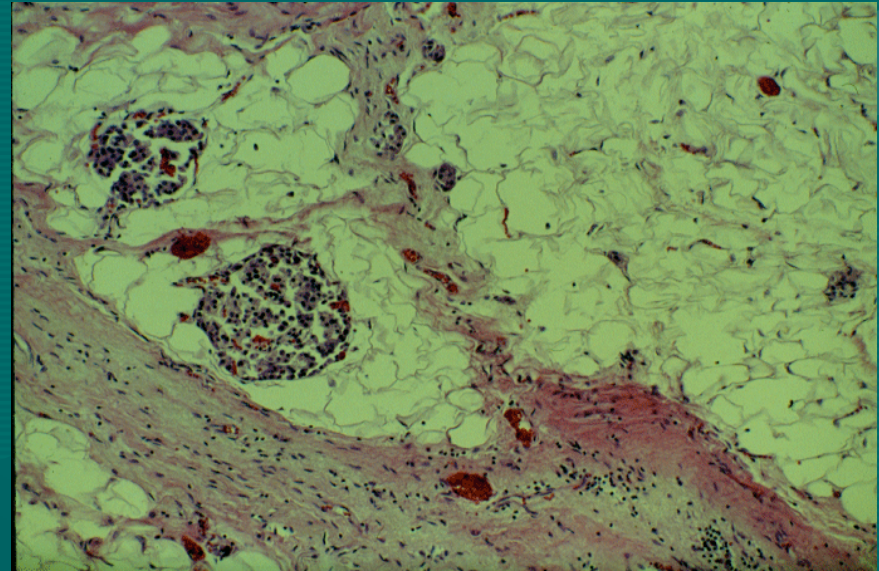


CF

Pankreas

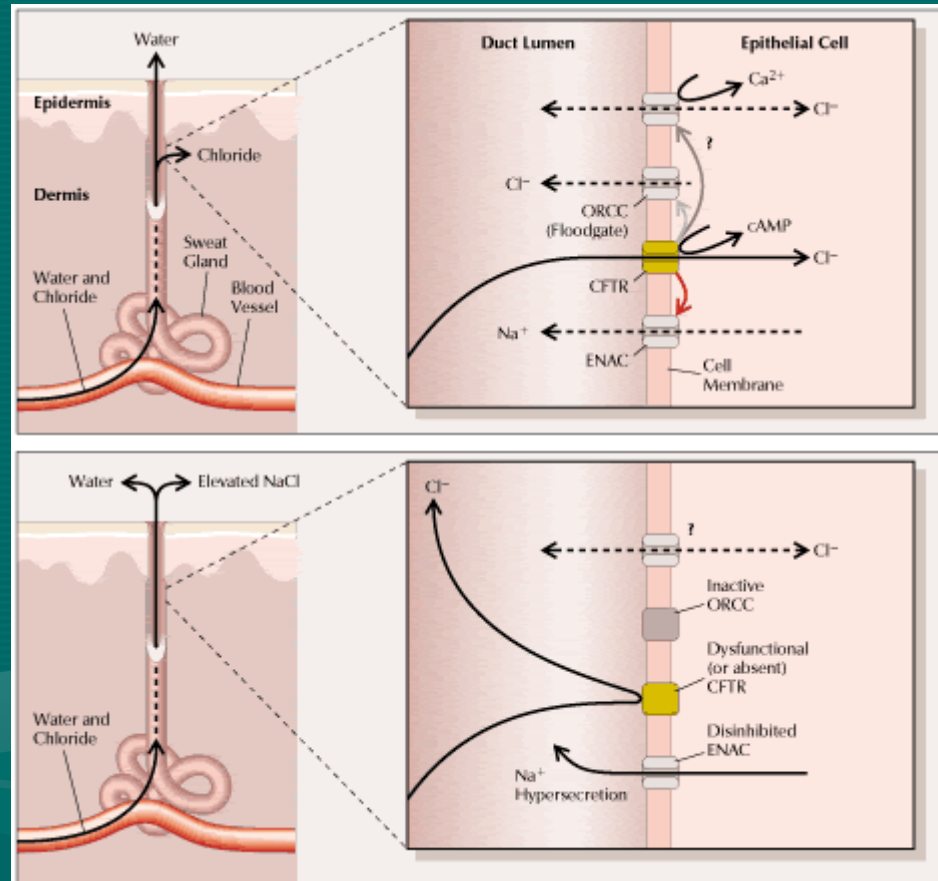


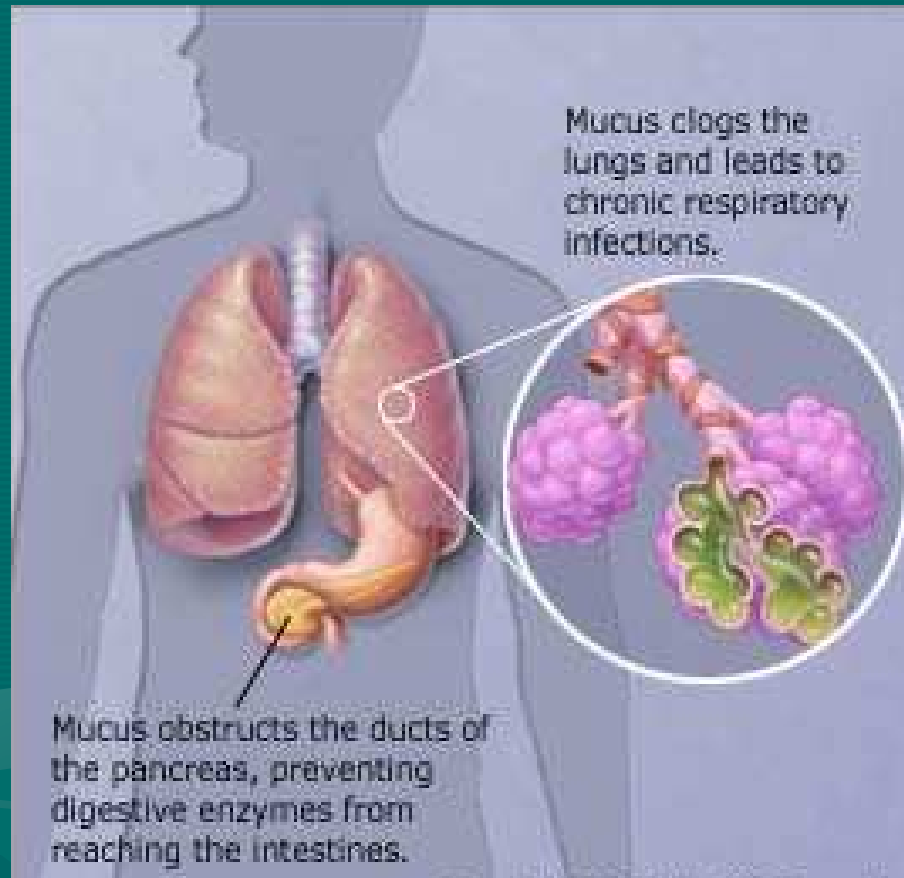
normální pankreas



pankreas z CF pacienta

CF potní žlázy – molekulární podstata

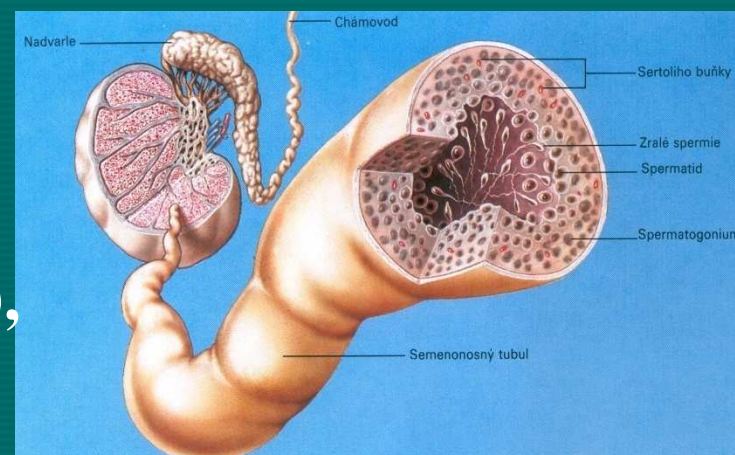




Fertilita nemocných CF

Muži

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



Obstruktivní azoospermie může být zcela izolovaným příznakem

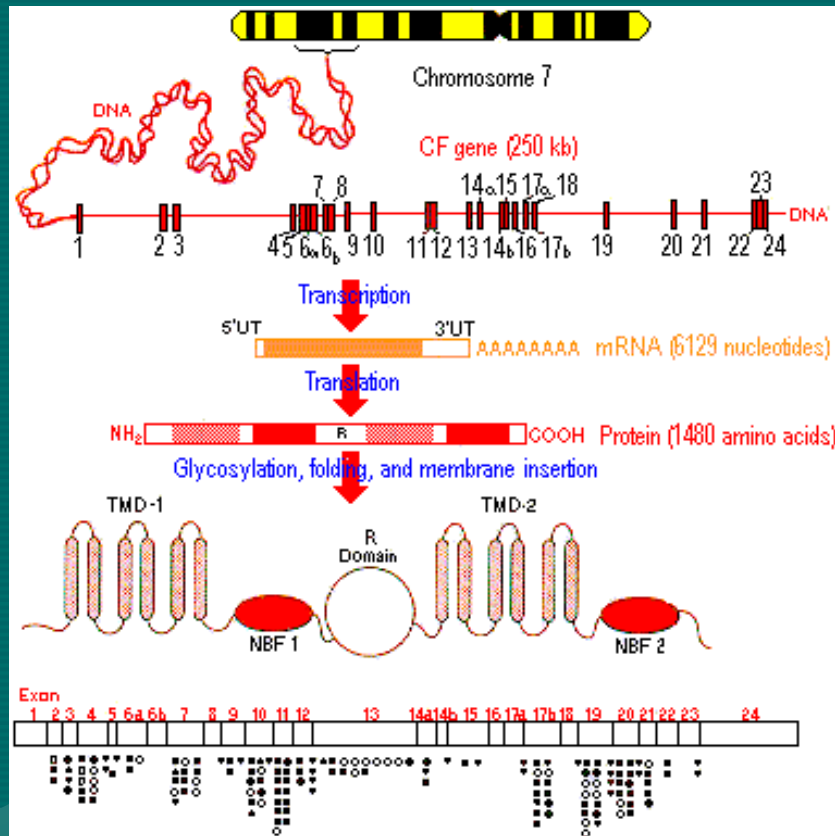
Nejčastější mutace asociované s CBVAD:

5T varianta v intronu 8
R117H

Ženy

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

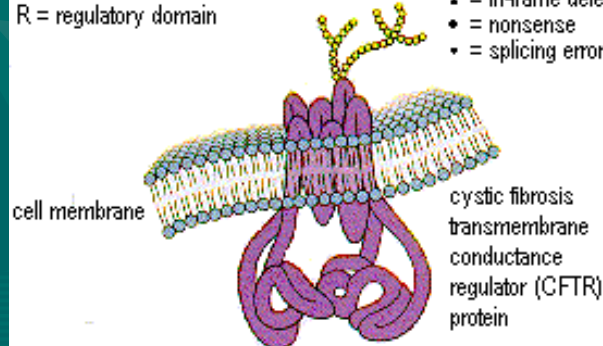
CFTR gen



TMD-1, TMD-2 = transmembrane domains
 NBF-1, NBF-2 = nucleotide-binding folds
 R = regulatory domain

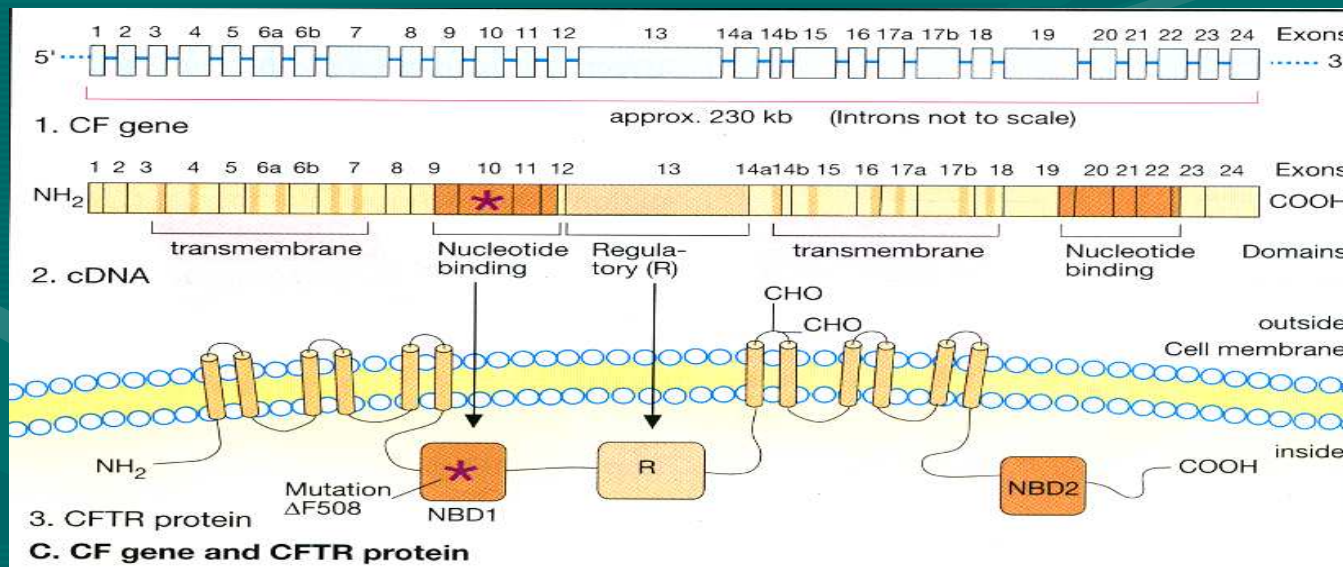
mutation types

- = in-frame deletion
- = nonsense
- = splicing error
- = missense
- = frame-shift



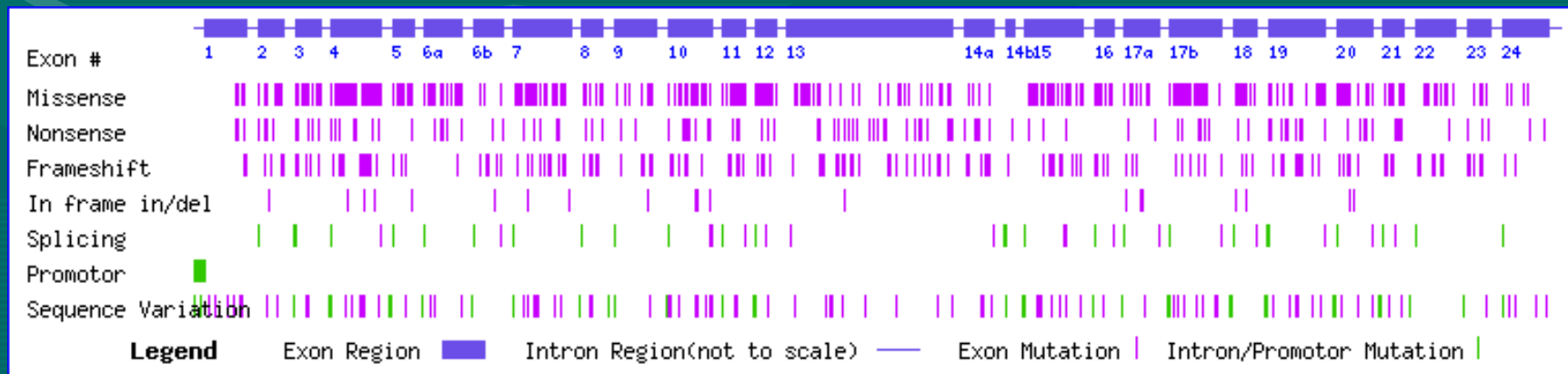
CFTR gen

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



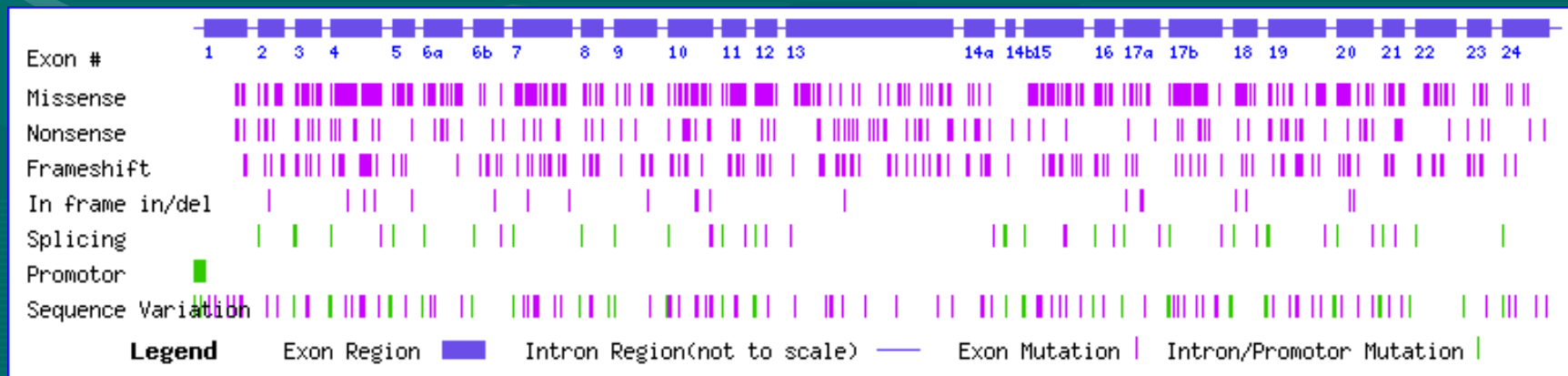
CFTR mutace

- 1500 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
- pouze 7 mutací vyskytuje na více než 1% CF patologických alel
- Je pozorováno široké rozpětí ve frekvenci jednotlivých mutací u různých populací
- nejčastější mutace F508del je detekována u cca 66% CF pacientů

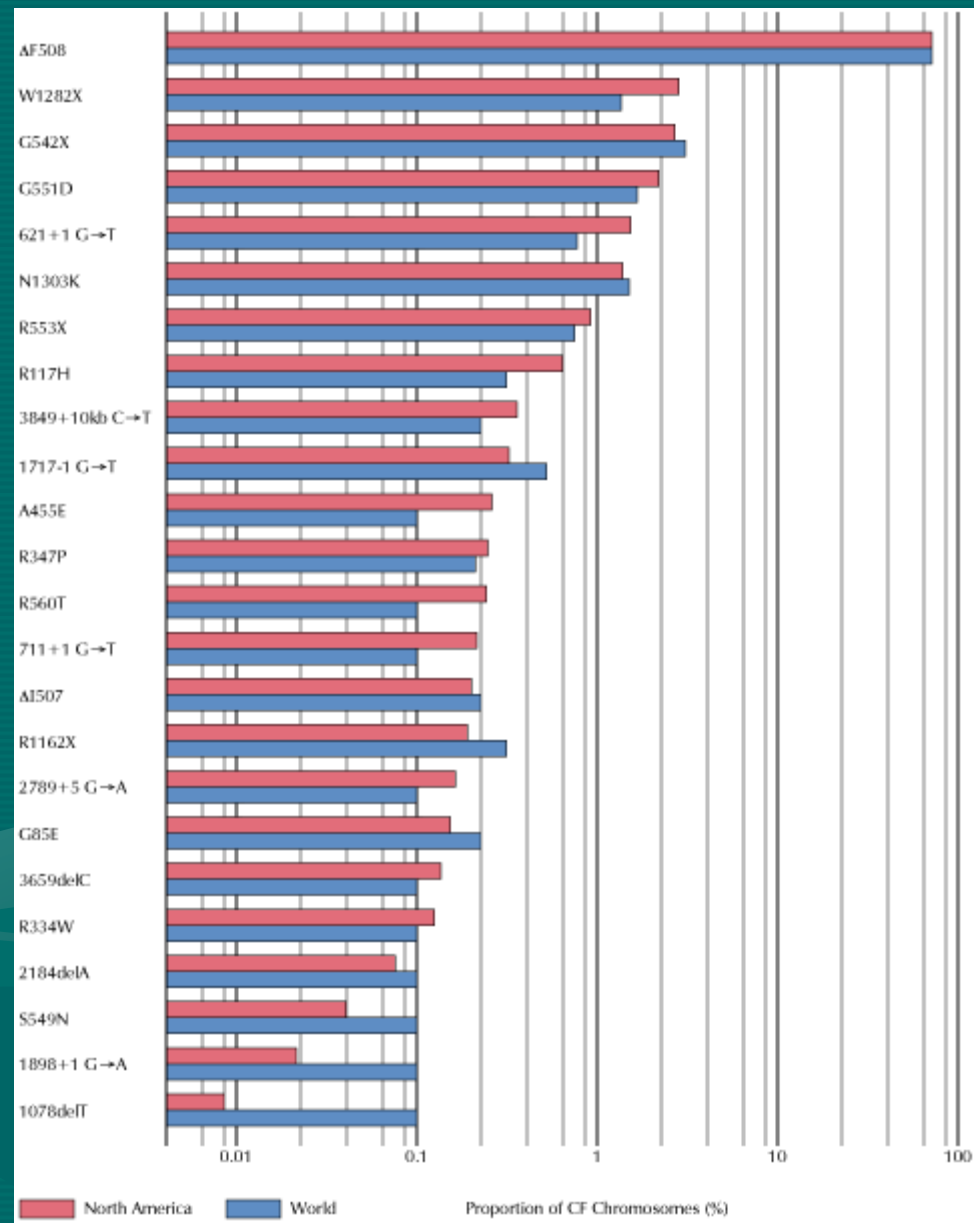


CFTR mutace

- delece
od 1 bp po kilobáze
- inzerce
včetně duplikací
- jednobázové substituce
missense transverze
nonsense tranzice
splice site
- posunové (frameshift)
v důsledku delecí, inzercí, poruch
splicingu



CFTR mutace - frekvence ve světě



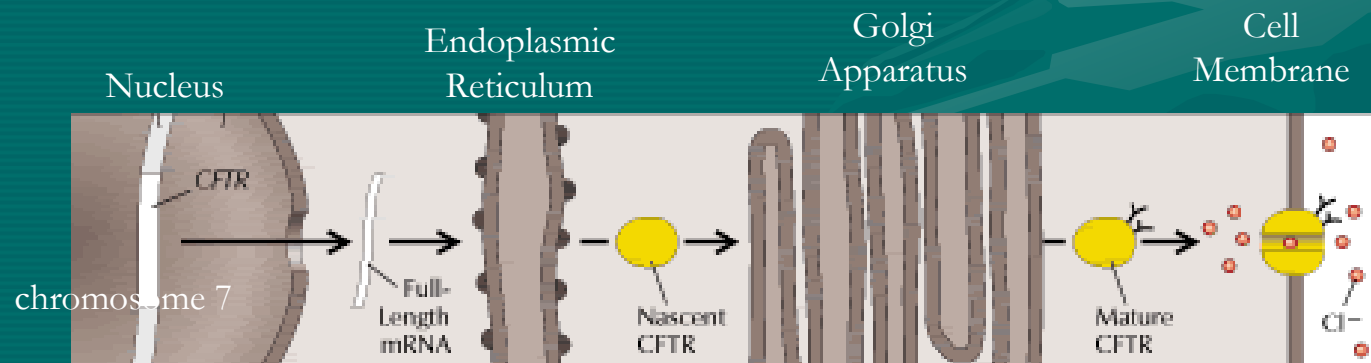
CFTR mutace - frekvence v ČR

• delF508	71,57%
• CFTRdele2,3(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%

□ Třídy CFTR mutací

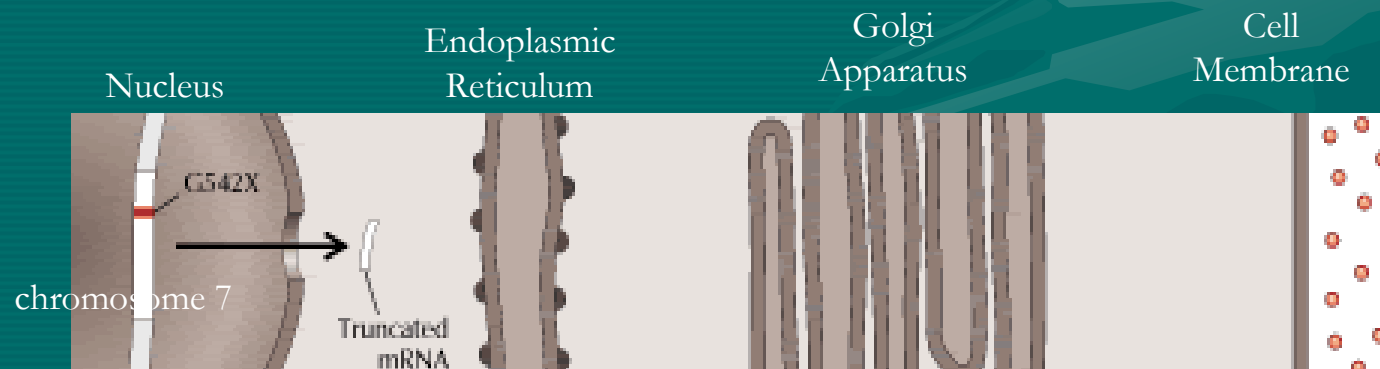
Normalní CFTR



- CFTR gen - přepsán (transkribce) do messenger RNA
- mRNA CFTR - přeložena (translace) do proteinu
- CFTR protein – postranslační modifikace (glycosylace)
- CFTR maturovaný protein – umístěn v buněčné membráně

□ Třidy CFTR mutací

CF mutace: třída I

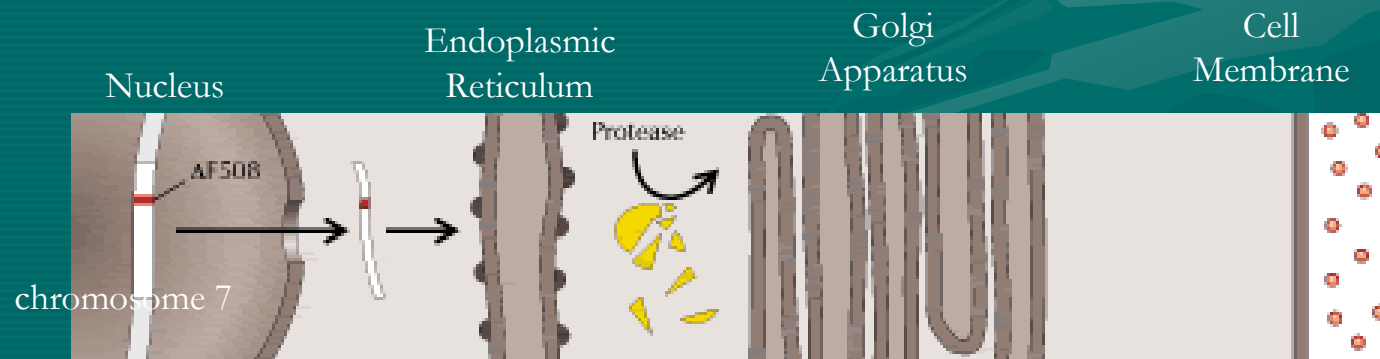


• CFTR gen – stop kodón

↙ zkrácená, nefunkční messenger RNA

Třidy CFTR mutací

CF mutace: třída II

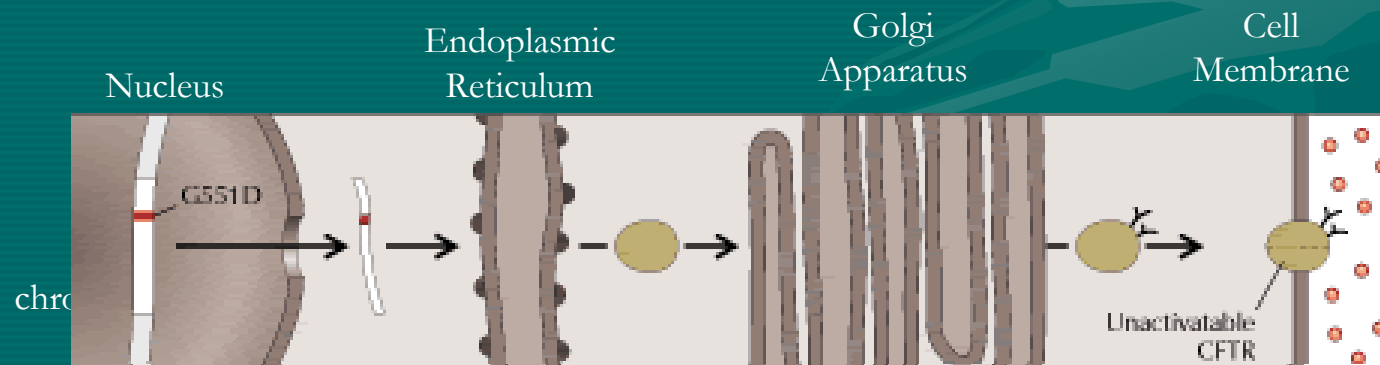


- CFTR gen - přepsán (transkribce) do messenger RNA
- mRNA CFTR - přeložena (translace) do proteinu

mutace F508del dává CFTR nesprávný tvar
↓
degradován proteolýzou

Třídy CFTR mutací

CF mutace: třída III

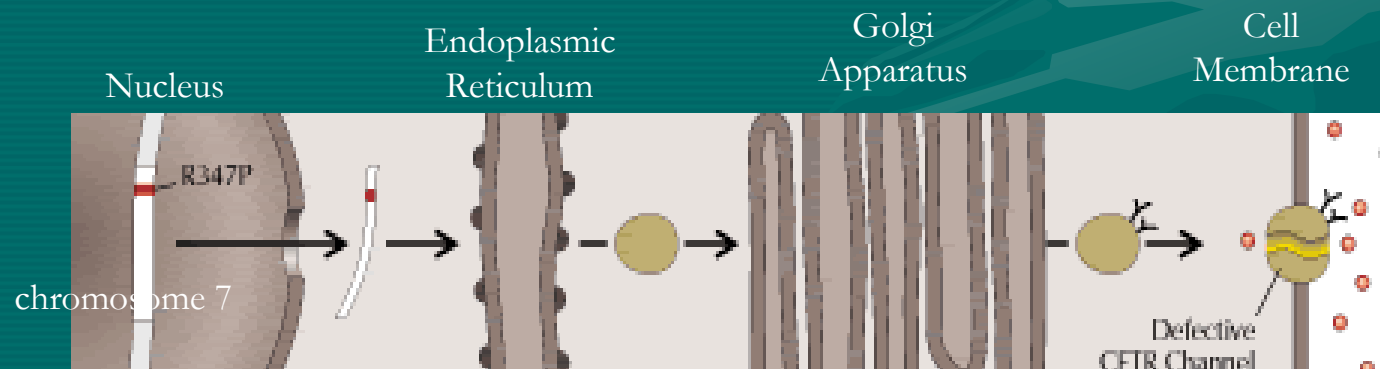


- CFTR gen - přepsán (transkribce) do messenger RNA
- mRNA CFTR - přeložena (translace) do proteinu
- CFTR protein – postranslační modifikace (glycosylace)
- CFTR maturovaný protein – umístěn v buněčné membráně

mutace G551D – nefukční NBD1 doména

Třídy CFTR mutací

CF mutace: třída IV

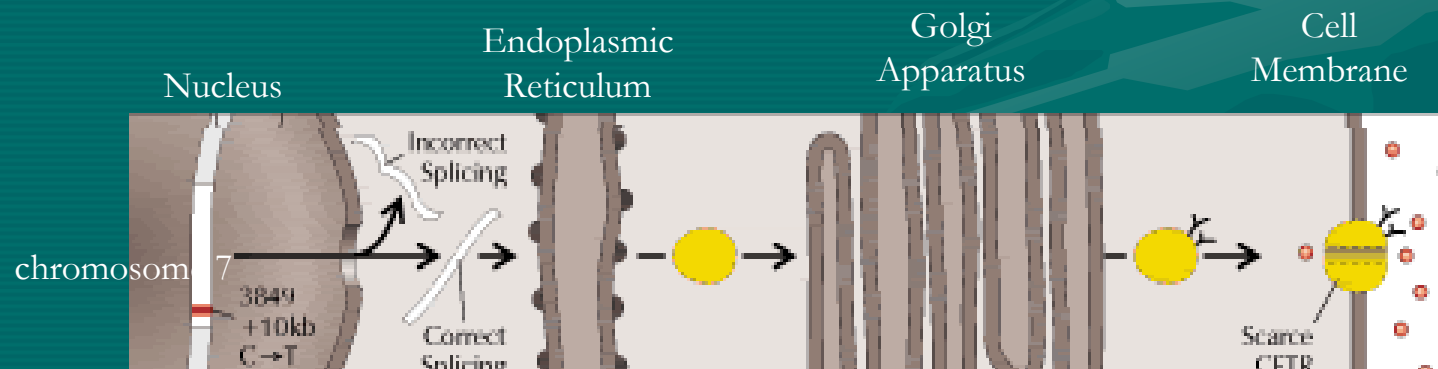


- CFTR gen - přepsán (transkribce) do messenger RNA
- mRNA CFTR - přeložena (translace) do proteinu
- CFTR protein – postranslační modifikace (glycosylace)
- CFTR maturovaný protein – umístěn v buněčné membráně
-

mutace R347P – snižuje chloridovou konduktanci

Třídy CFTR mutací

CF mutace: třída V



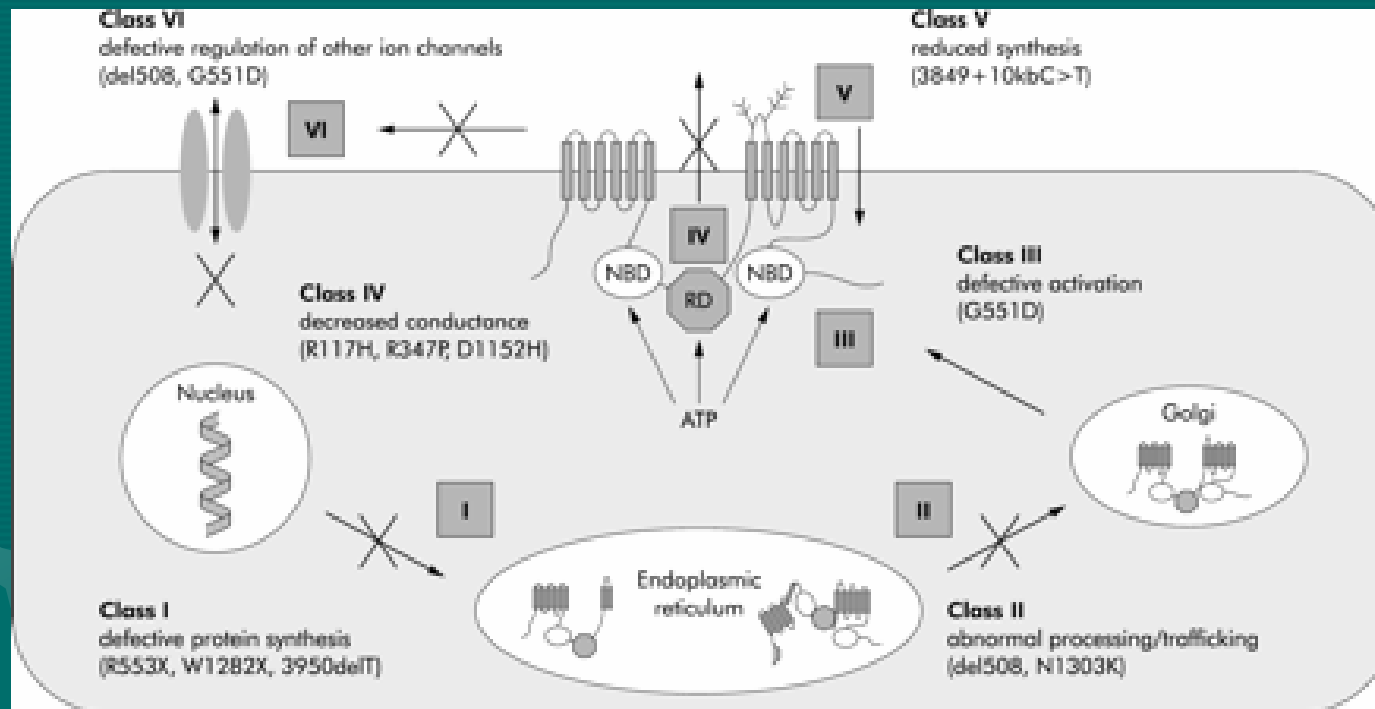
• CFTR gen – sestřihová mutace

Část mRNAs defektní

↓
snížené množství CFTR proteinu

mutace 3849+10kb sestřihová (splicing) mutace

Trždy CFTR mutací



□ Sekvenční varianty genu CFTR

196 sekvenčních variací v genu CFTR

Poly-T alelické varianty (T_n) v intronu 8 genu CFTR

konfigurace polypyrimidinového traktu:

9 tymidinů – účinné akceptorové místo sestřihu

7 tymidinů – účinné akceptorové místo sestřihu

5 tymidinů – neúčinné akceptorové místo sestřihu



5T alela považována za mutaci
asociovanou s širokým spektrem příznaků

Žena: zdravá ----- atypická CF ----- typická CF

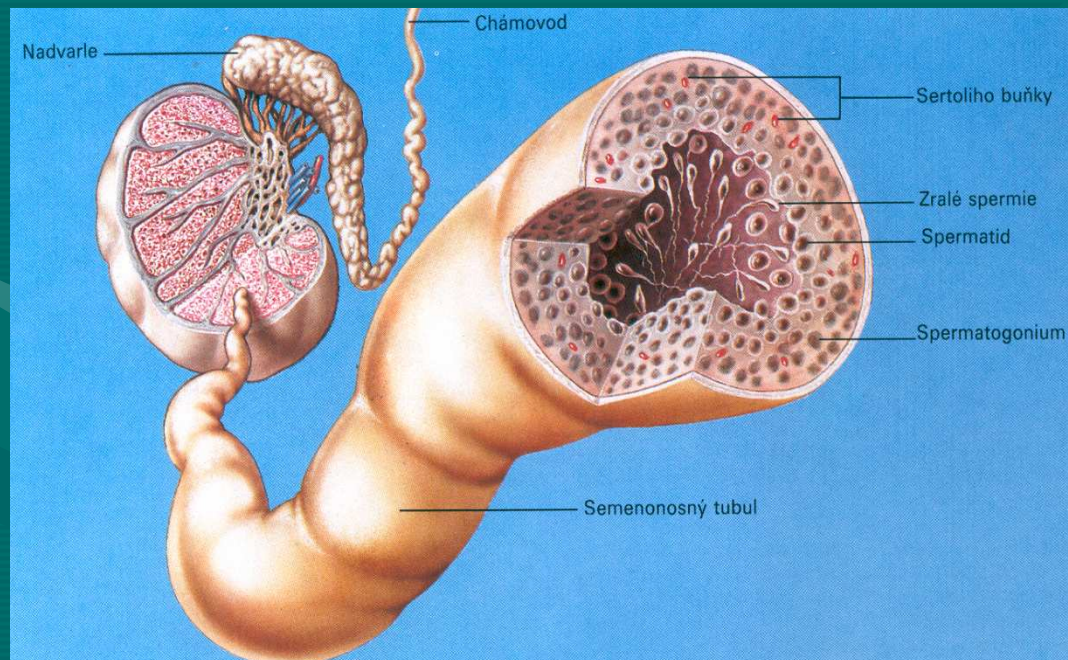
Muž: CBVAD ----- atypická CF ----- typická CF

Kongenitální bilaterální absence vas deferens (CBVAD)

popsáno 25 mutací asociovaných s CBVAD

v exonech
v intronech

missense
mRNA splicing defekt



Frekvenkventované
CBVAD mutace:

- 5T vatianta v intrv IVS8
- R117H
- 10,11,12 TG v IVS8

Molekulárně genetická diagnostika CF



Kaskádovitá“ strategie rutinní molekulárně genetické diagnostiky CF

suspektní CF pacient nebo přenašeč

Scoring 6 nejčastějších CFTR mutací



jedna nebo obě alely neidentifikovány

Scoring 36 CFTR mutací



jedna nebo obě alely neidentifikovány

Scanning celé CFTR-kodující sekvence



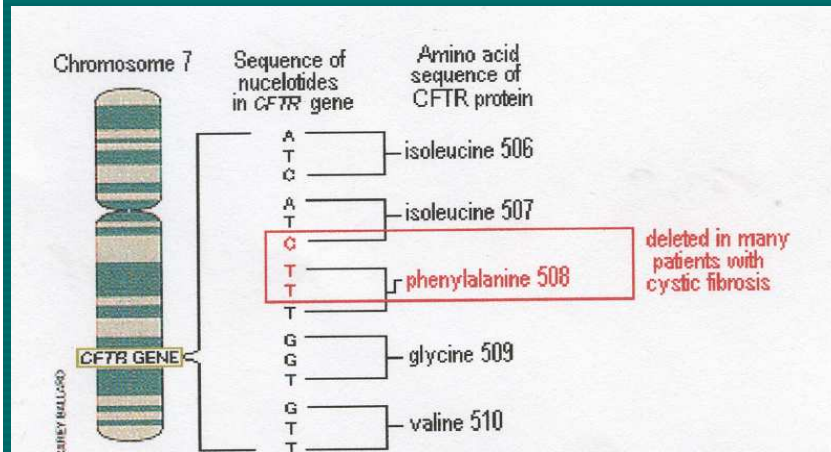
obě CF alely identifikovány

CF diagnóza potvrzena

□ Scoring CFTR genu

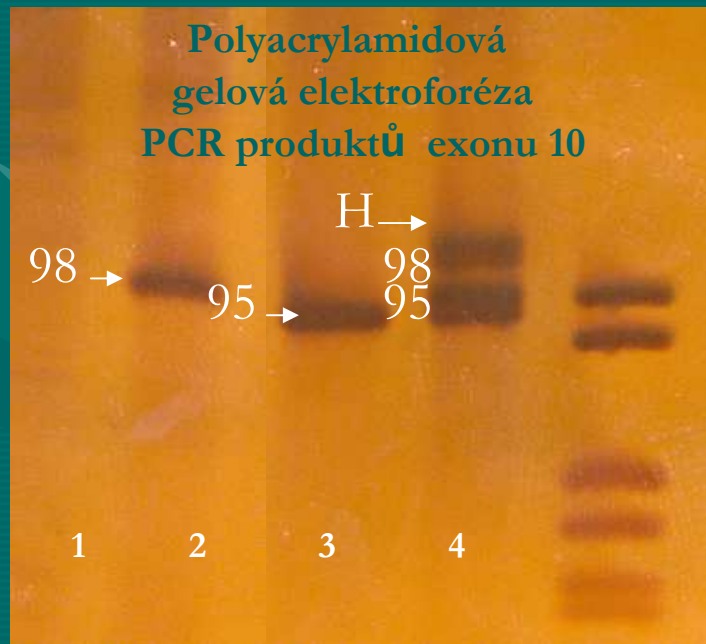


Detekce mutace F508del



delece tří nukleotidů CTT v CF exonu 10

↓
*ztráta jedné aminokyseliny – fenylalaninu
v pozici 508 v CFTR proteinu*

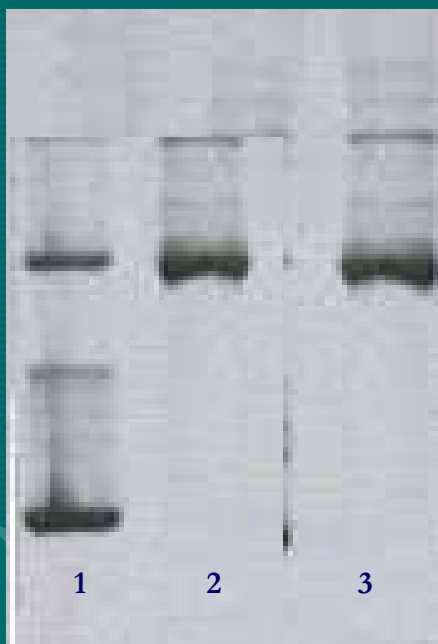


ELFO - 5% PAGE, 200 V, 20°C, 2hod

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

1. non dF508 / non dF508
2. dF508 / dF508
3. dF508 / non dF508
4. marker pBR322/Alu1

Detekce mutace CFTRdele2,3(21kb)



ELFO: 5% PAGE,
200 V, 20°C, 2hours

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

Polyacrylamidová gelová elektroforéza
duplex PCR produktu:

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*

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

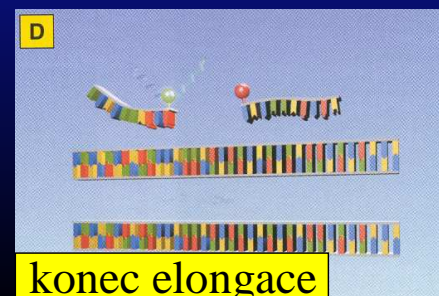
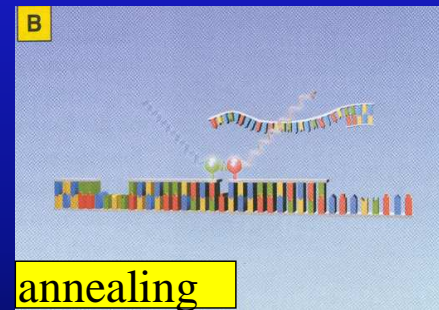


- rychlý
- bezpečný
- snadno interpretovatelný

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

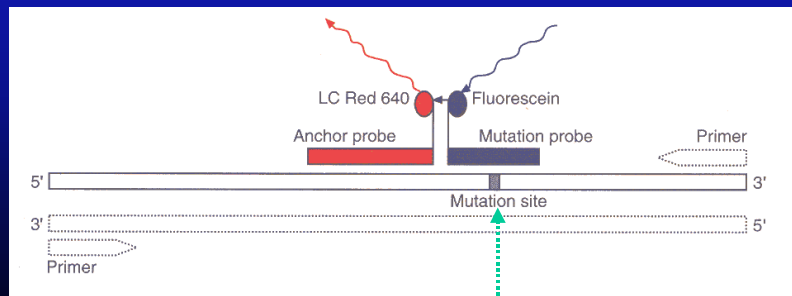
LightCycler



Detekce mutace dF508

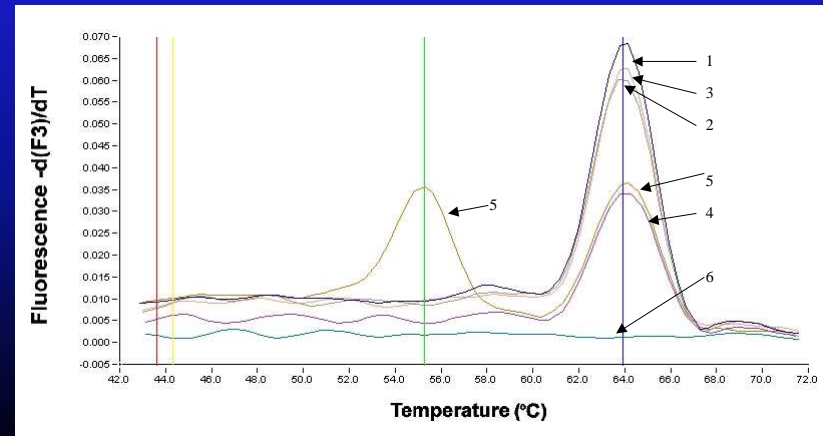
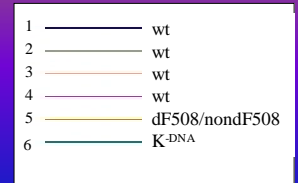
PCR:
jeden pár primerů

Analýza bodu tání:
jeden systém prob



according to Burgraf, 2001

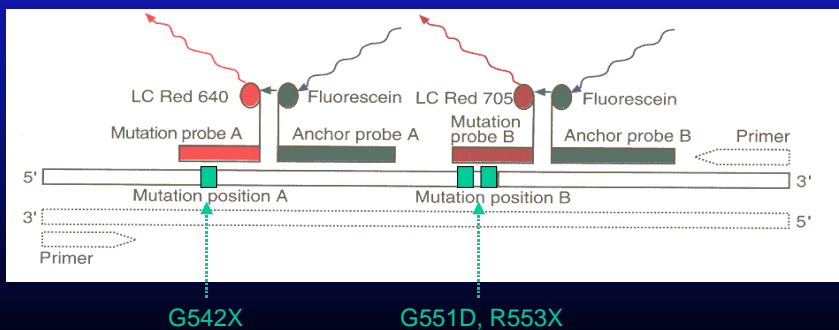
Fluorescenční monitoring dF508 lokusu



Detekce mutací G542X, G551D a R553X

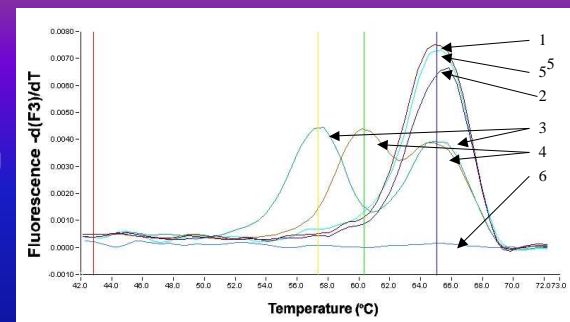
PCR:
jeden pár primerů

Analýza bodu tání:
dva systémy prob

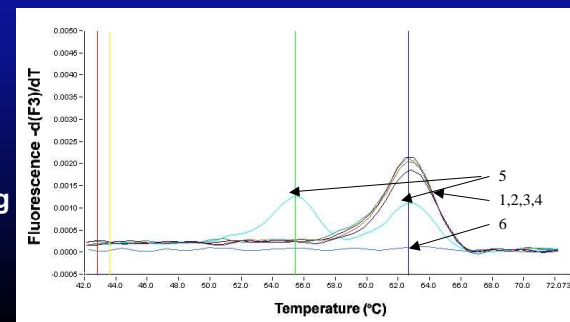


according to Burgraf, 2001

Fluorescenční monitoring
G551D/R553X lokusu



Fluorescenční monitoring
G542X lokusu



LightCycler

Roche

Detekce mutace CFTRdele2,3(21kb)

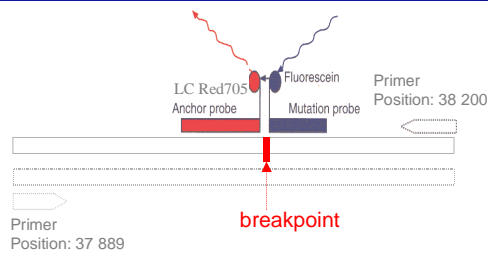
PCR:

jeden F primer
dva specifické R primery

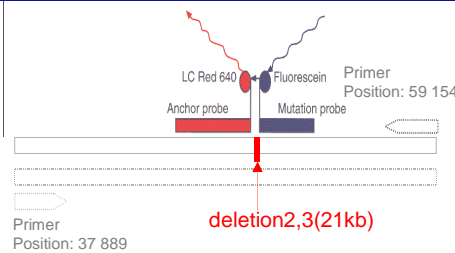
Analýza bodu tání:

dva systémy prob

Fluorescenční analýza lokusu s delecí



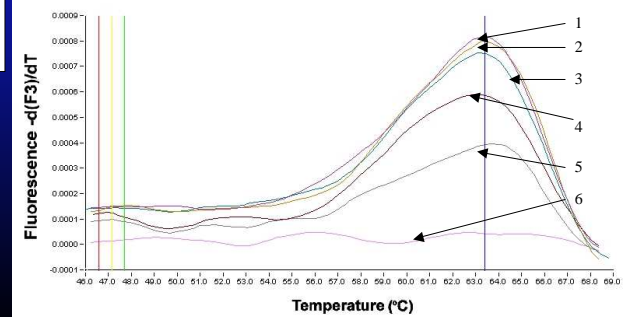
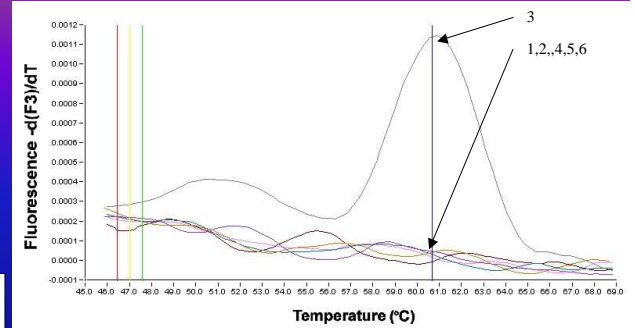
Alela bez delecce - wt



Alela s delecí - mt

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

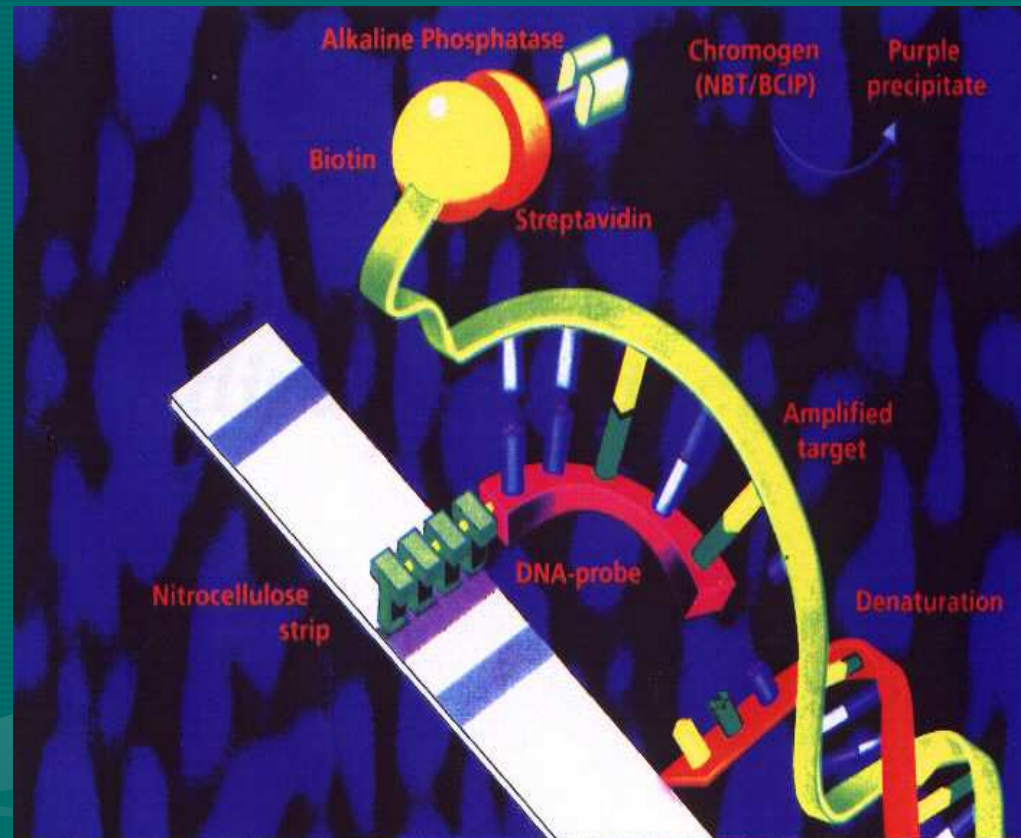
Fluorescenční analýza lokusu bez delecce



LightCycler



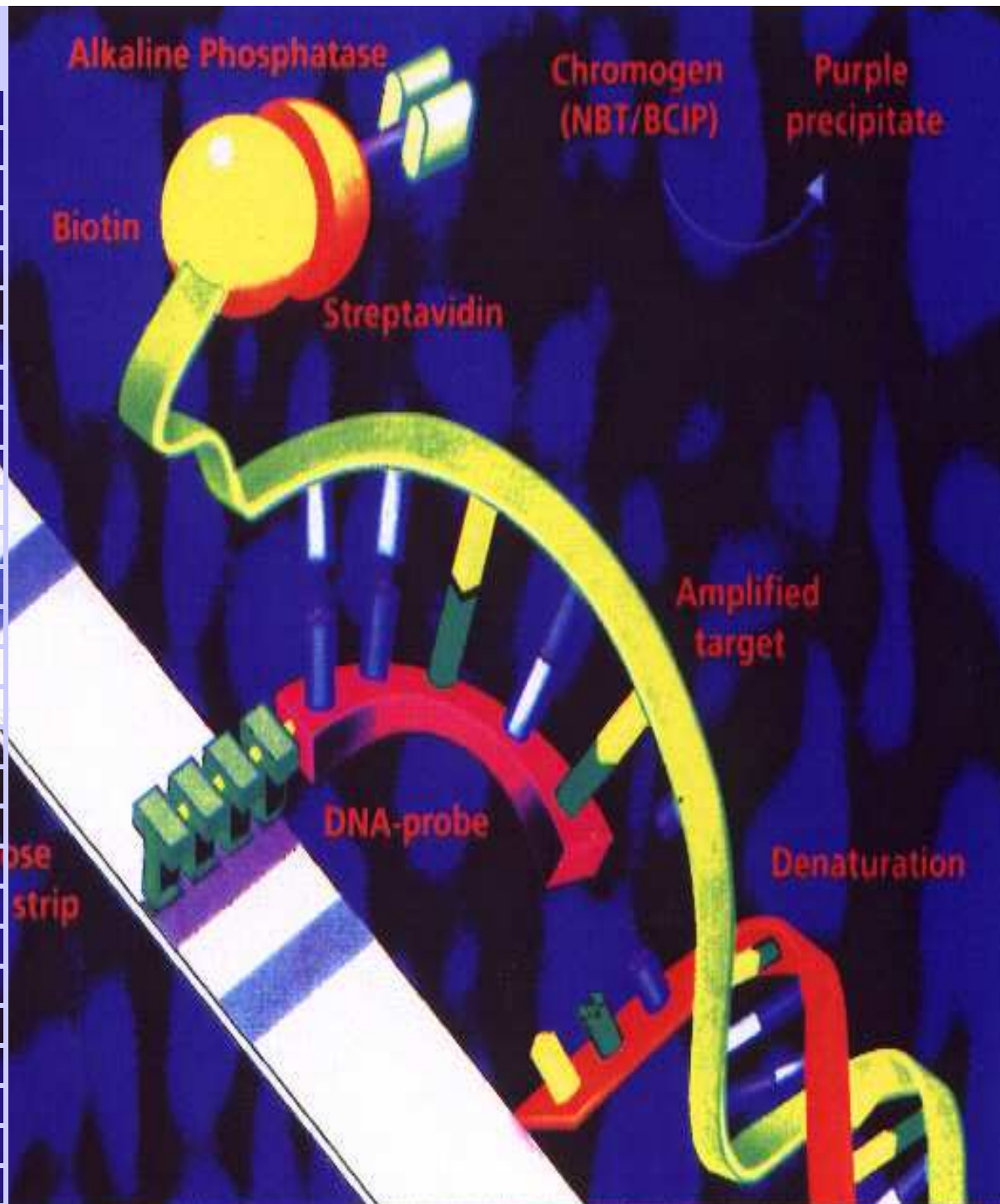
INNO-LiPA CFTR 19 INNO-LiPA CFTR 17 + T_n



Identifikuje

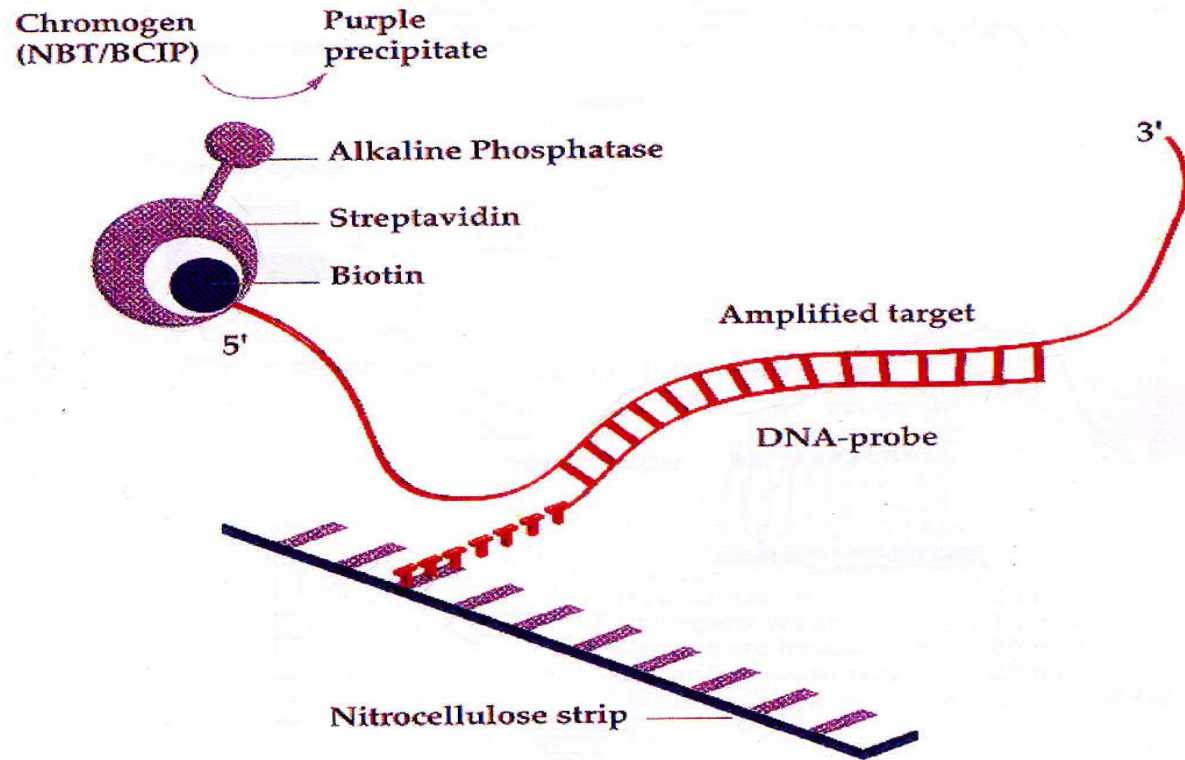
19 a 17 CF mutací
a jejich wild-type sekvence
polymorfní T_n místo (intron 8)
asociované s CBVAD

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



INNO-LiPA

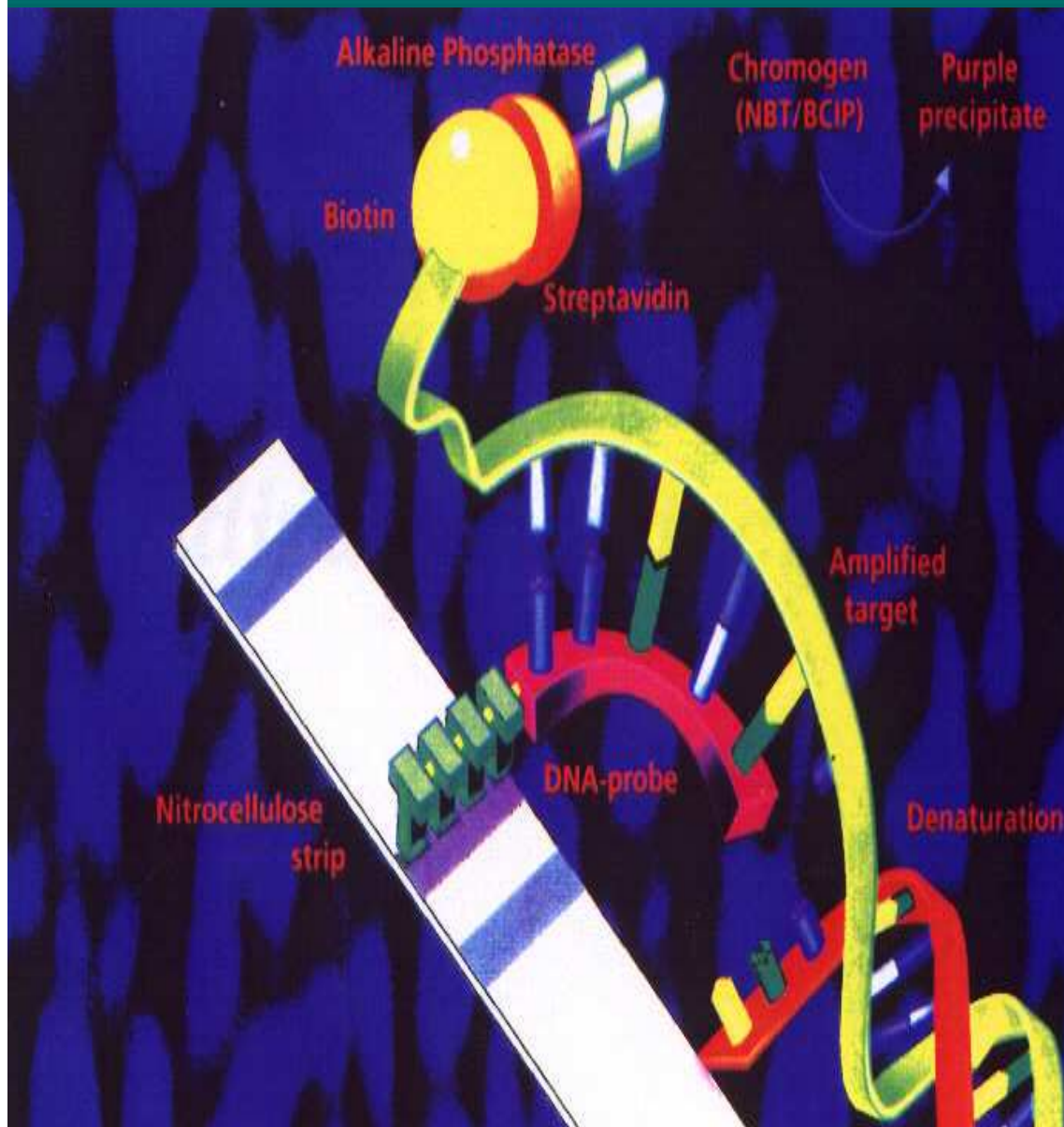
Reverse hybridization principle



Nitrocellulose
strip



INNO-LiPA CFTR 19 INNO-LiPA CFTR 17 + T_n



Jeden vzorek

Jedna amplifikace

Dva stripy

Výsledek multihybridizace do
3 hodin po amplifikaci

Elucigene CF-EU

Metoda fluorescenční multiplex ARMS (amplification refractory mutation system)

Mutations detected by CF-EU1

CFTRdele 2,3

E60X

P67L

G85E

R117H

621+1G>T

711+1G>T

1078delT

R334W

R347P

A455E

I507del

F508del

1717-1G>A

G542X

S549RT>G

G551D

R553X

R560T

1898+1G>A

2184delA

2789+5G>A

3120+1G>A

M1101K

D1152H

R1162X

3659delC

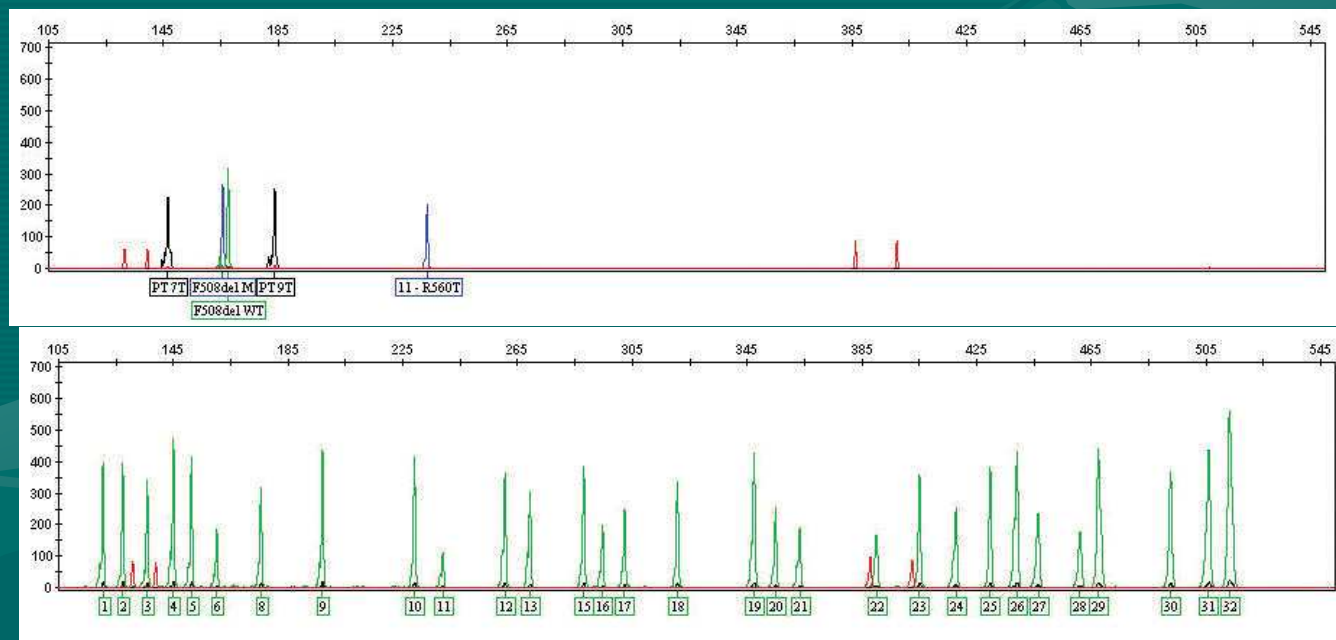
3849+10kbC>T

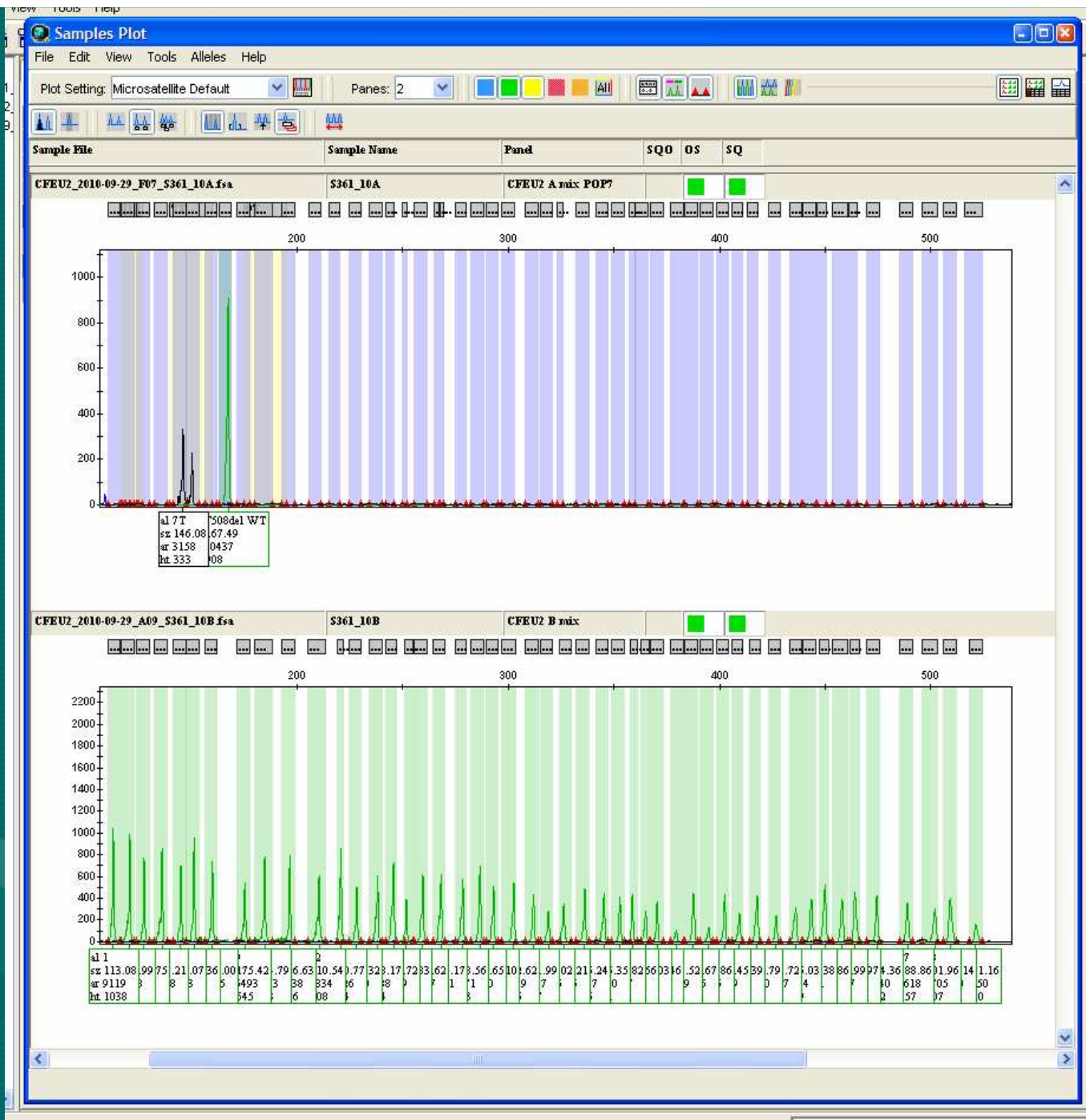
S1251N

3905insT

W1282X

N1303K





Samples Plot

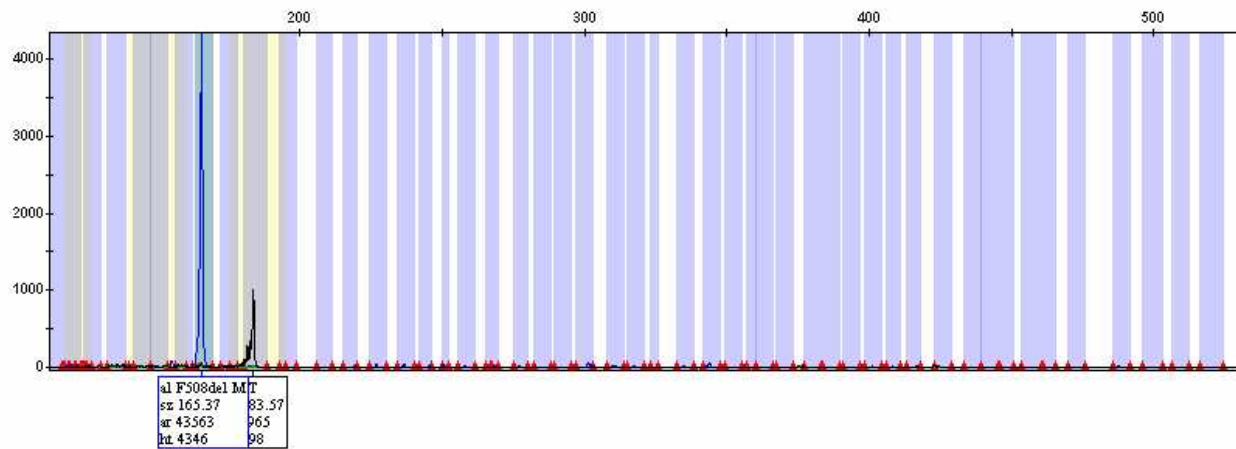
File Edit View Tools Alleles Help

Plot Setting: Microsatellite Default

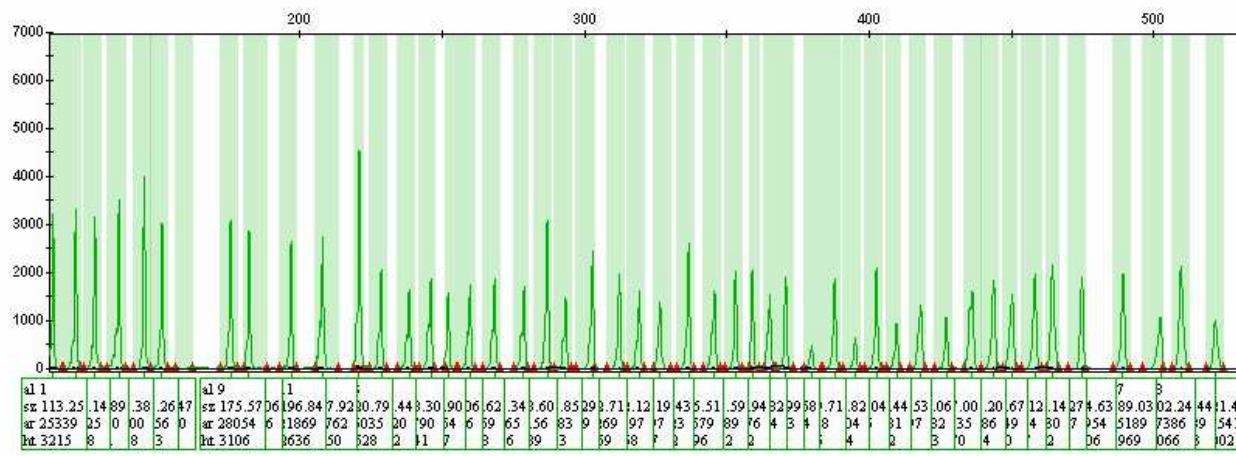
Panes: 2

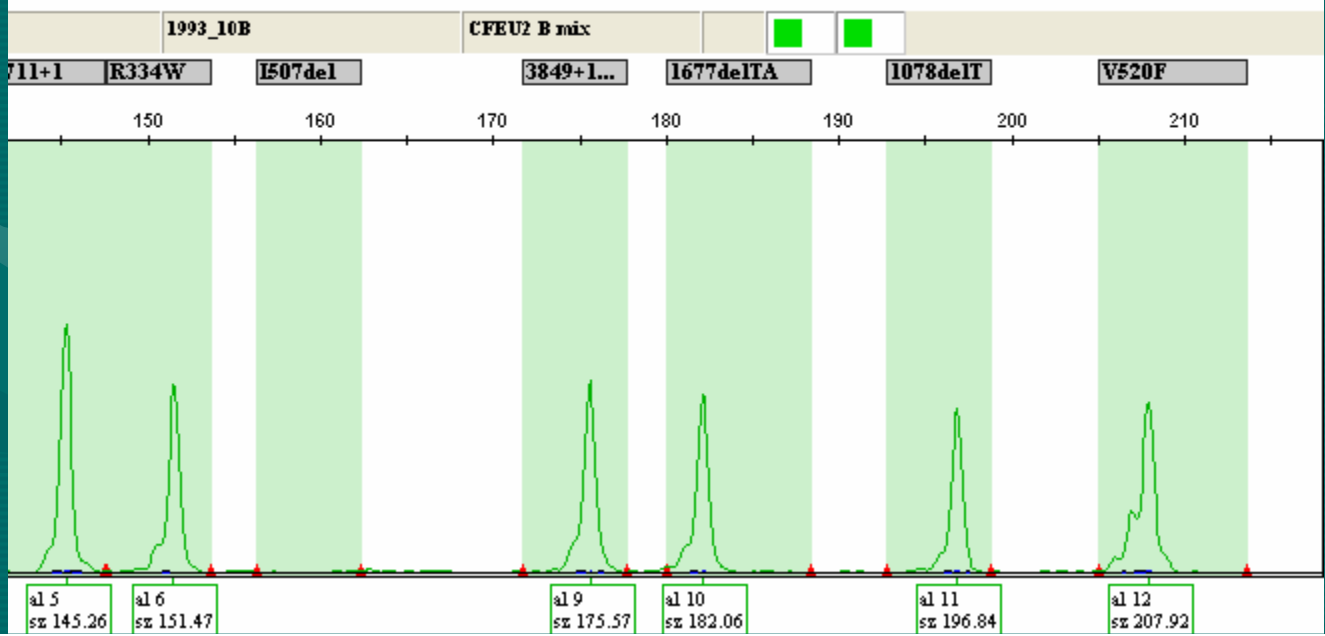
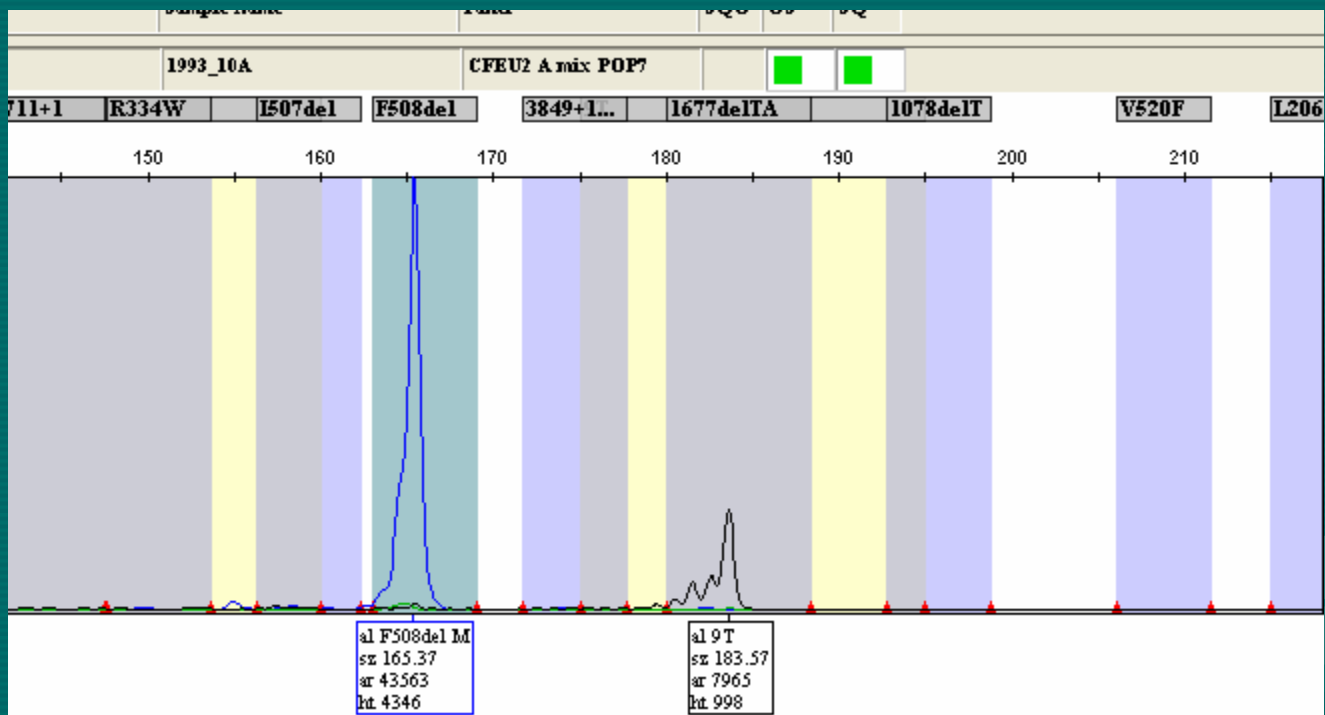
Sample File	Sample Name	Panel	SQO	OS	SQ
-------------	-------------	-------	-----	----	----

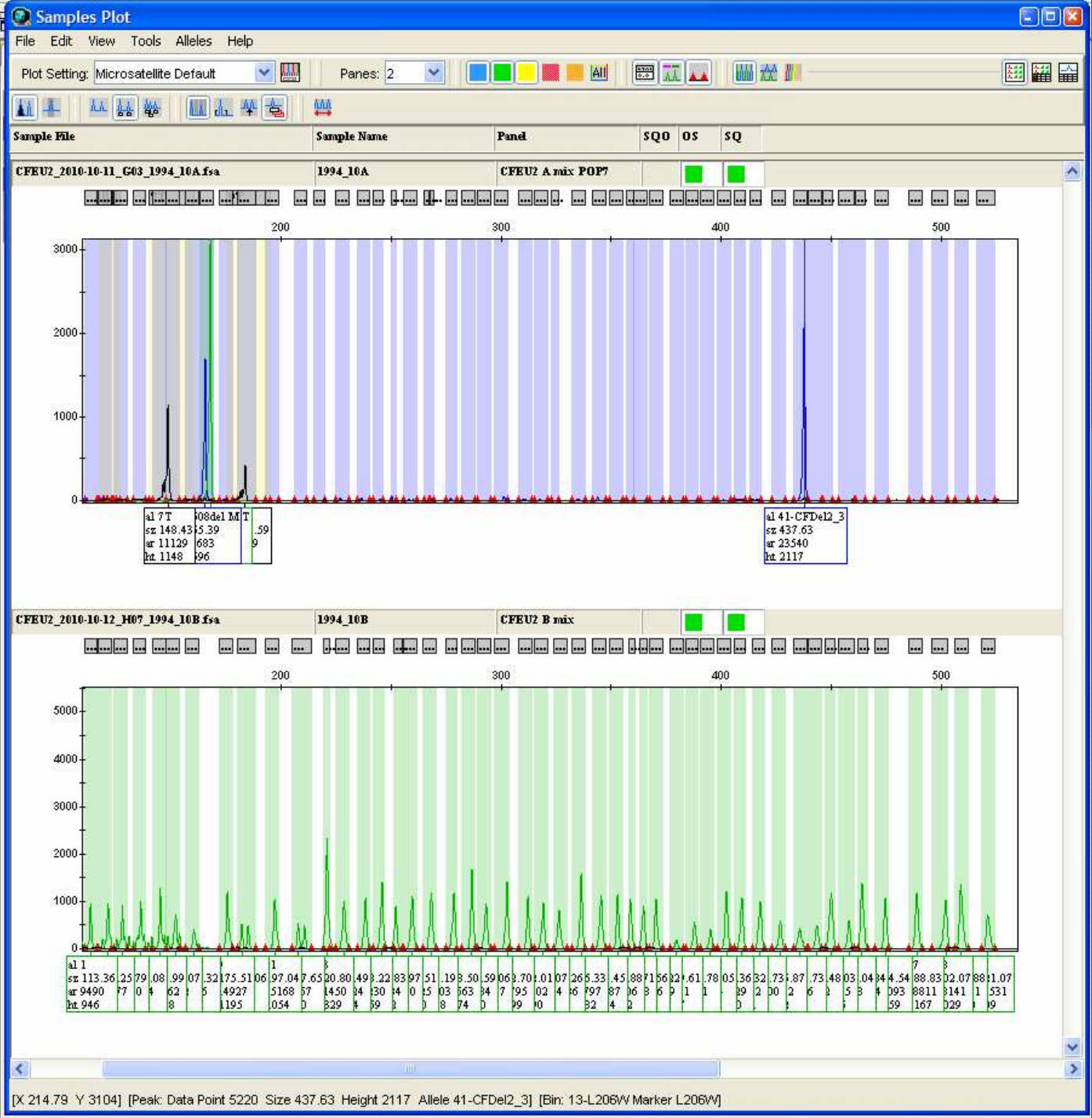
CFEU2_2010-10-11_F03_1993_10A.fsa	1993_10A	CFEU2 A mix POP?		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
-----------------------------------	----------	------------------	--	-------------------------------------	-------------------------------------

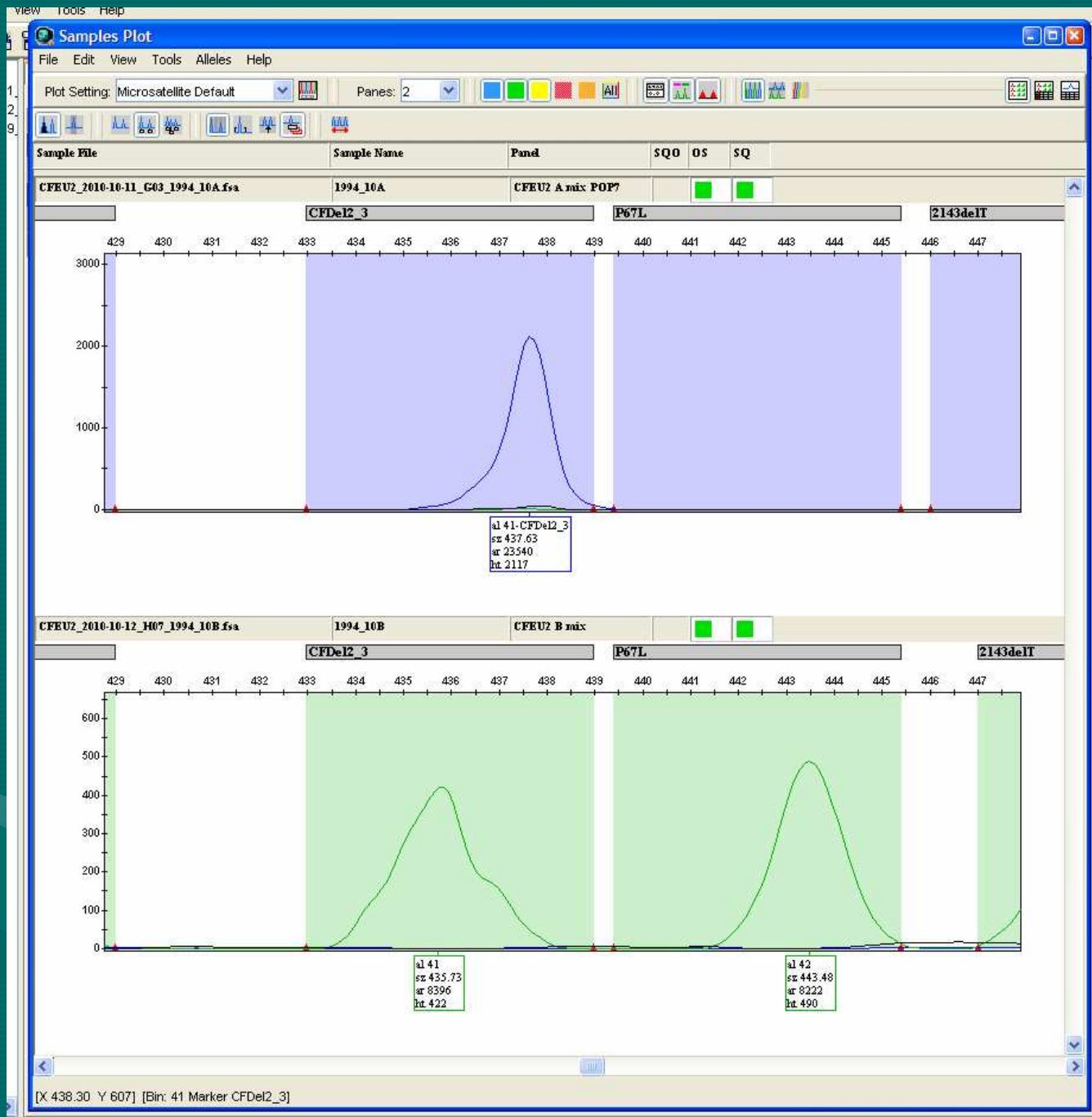


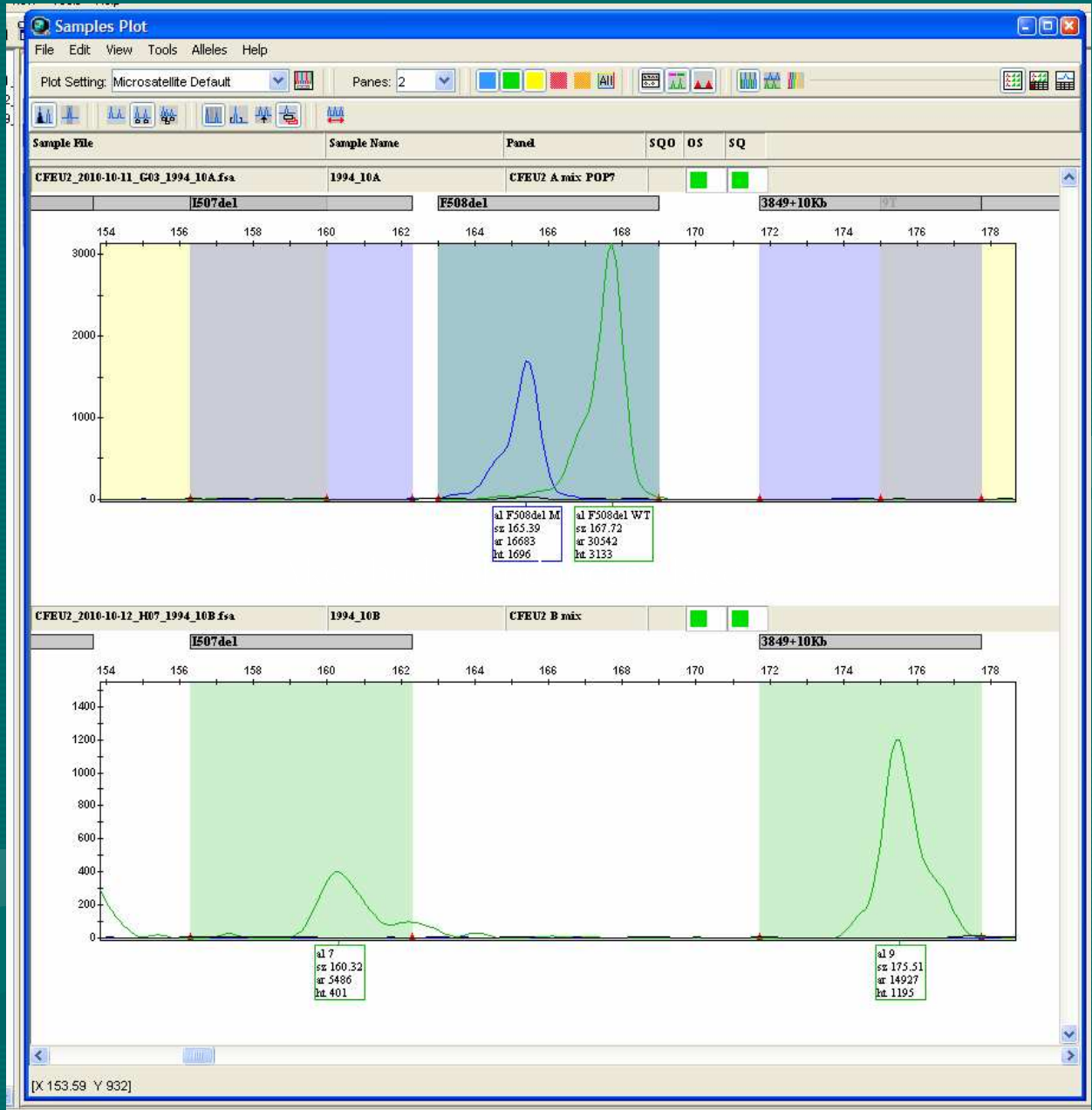
CFEU2_2010-10-12_G07_1993_10B.fsa	1993_10B	CFEU2 B mix		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
-----------------------------------	----------	-------------	--	-------------------------------------	-------------------------------------

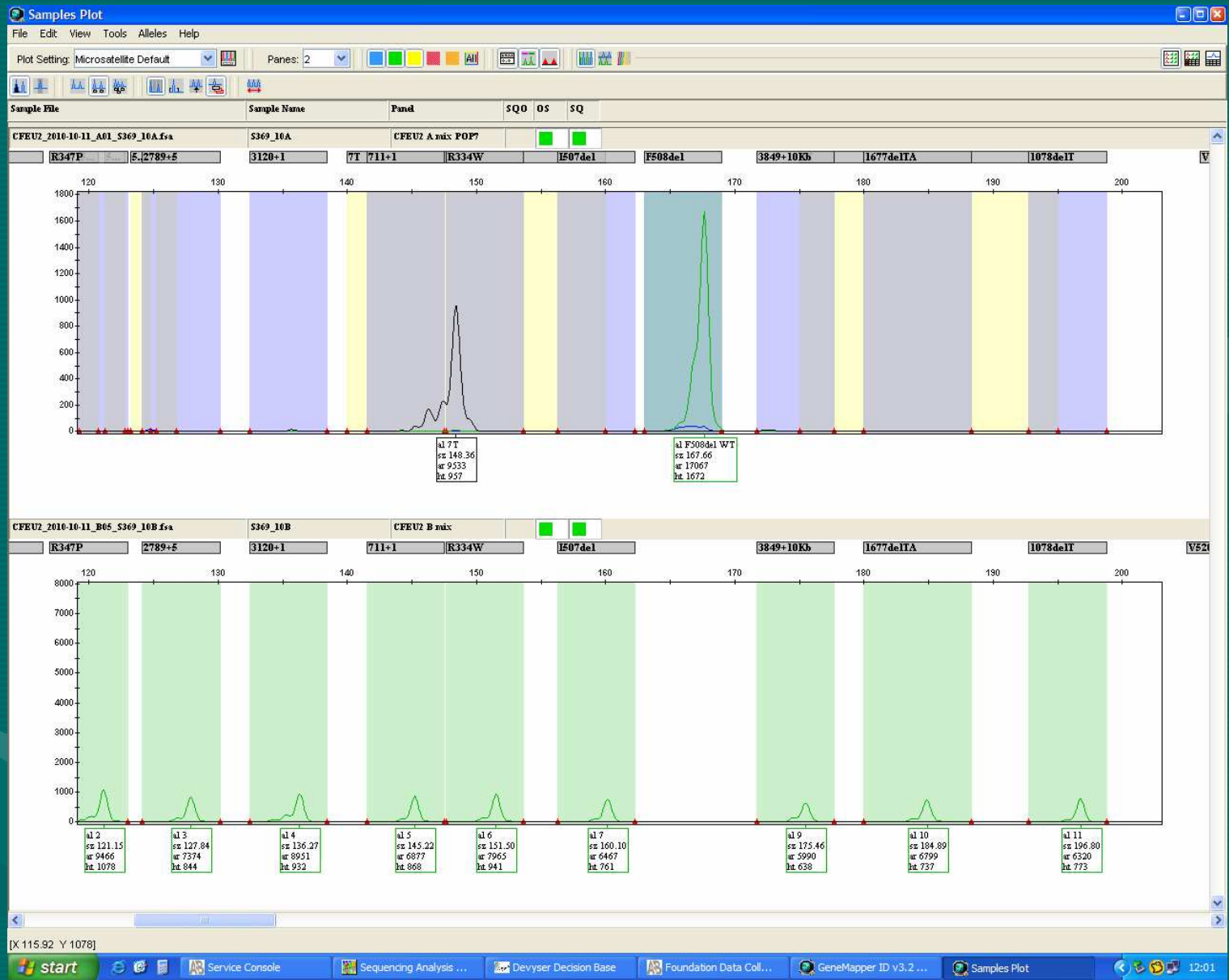


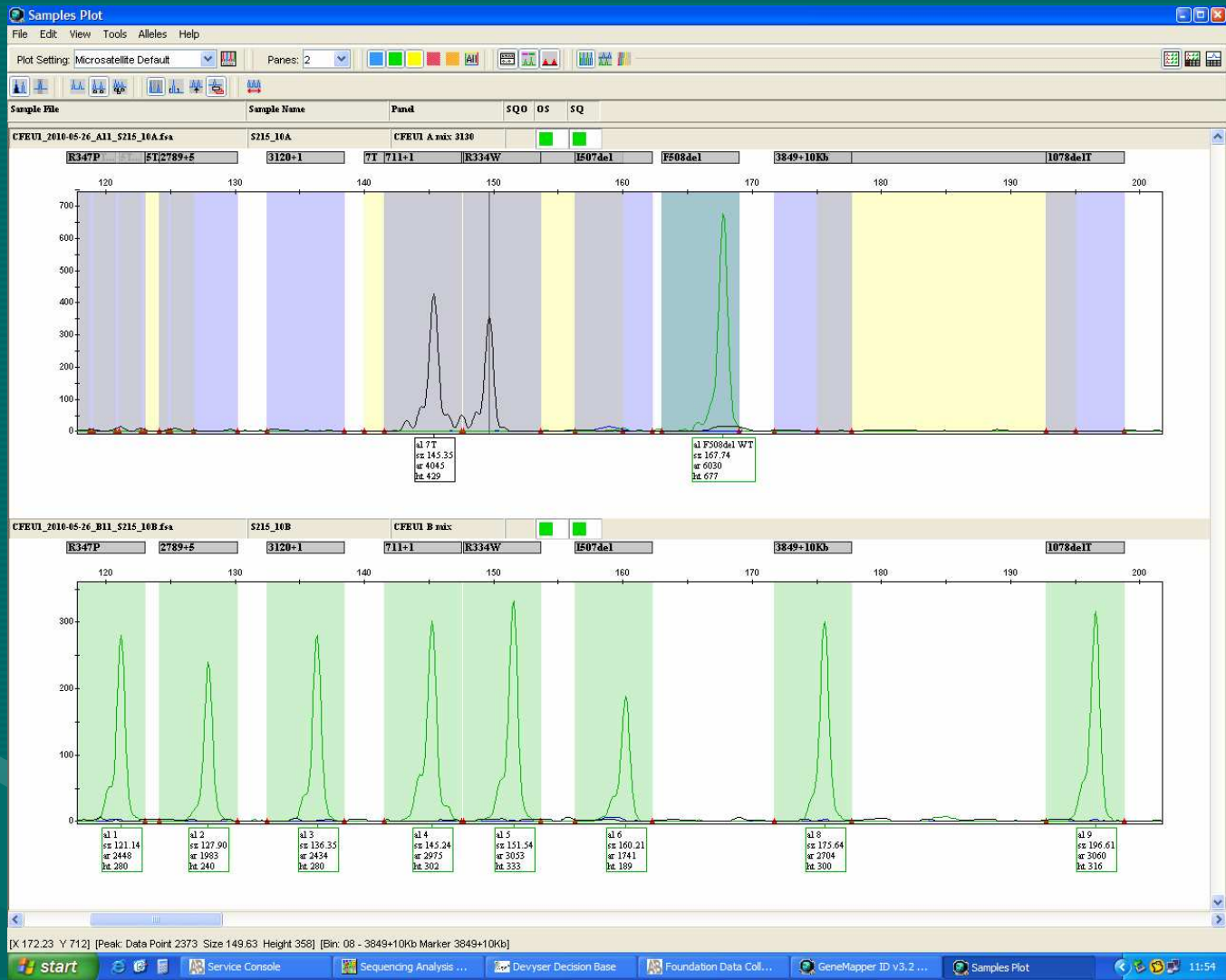


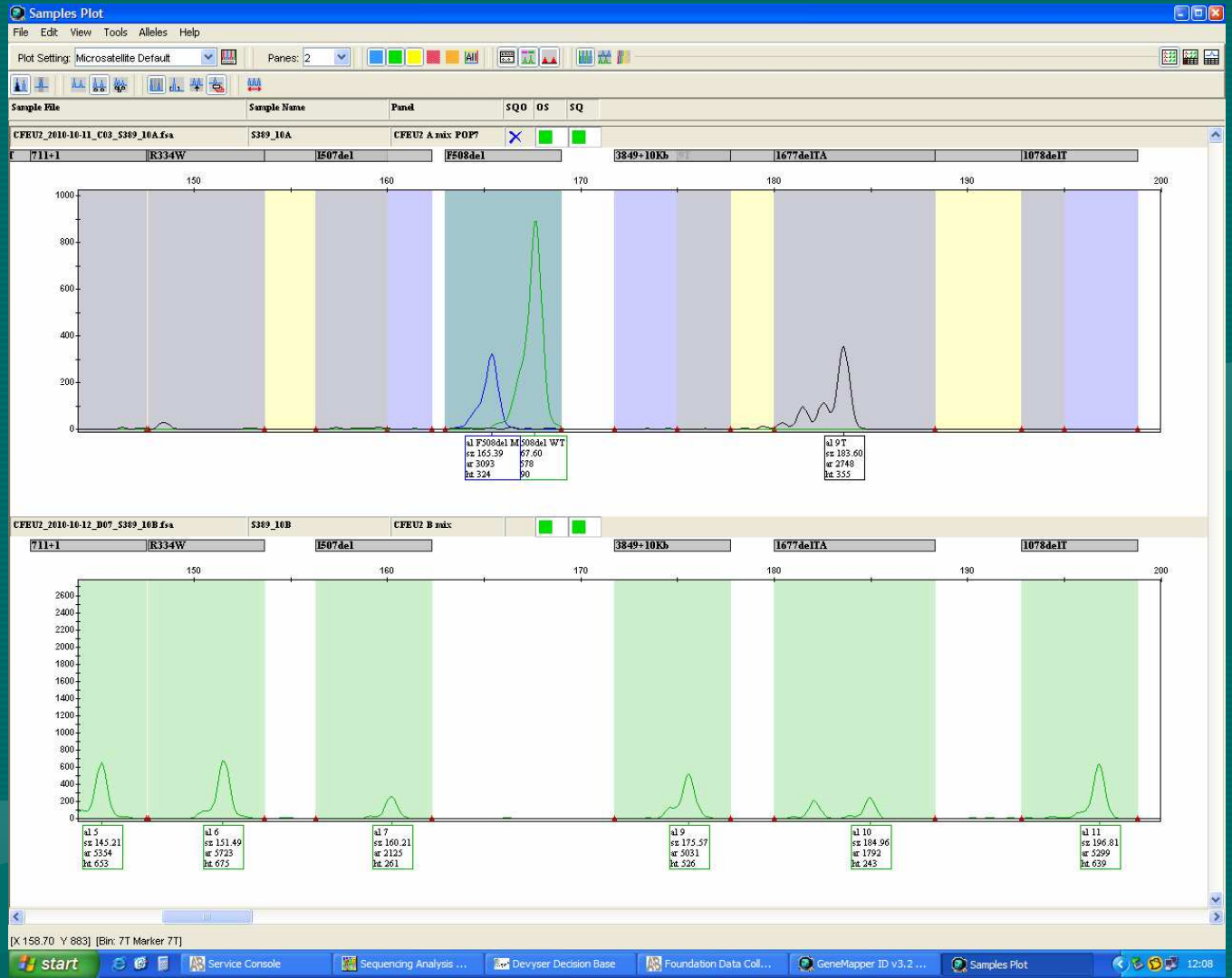


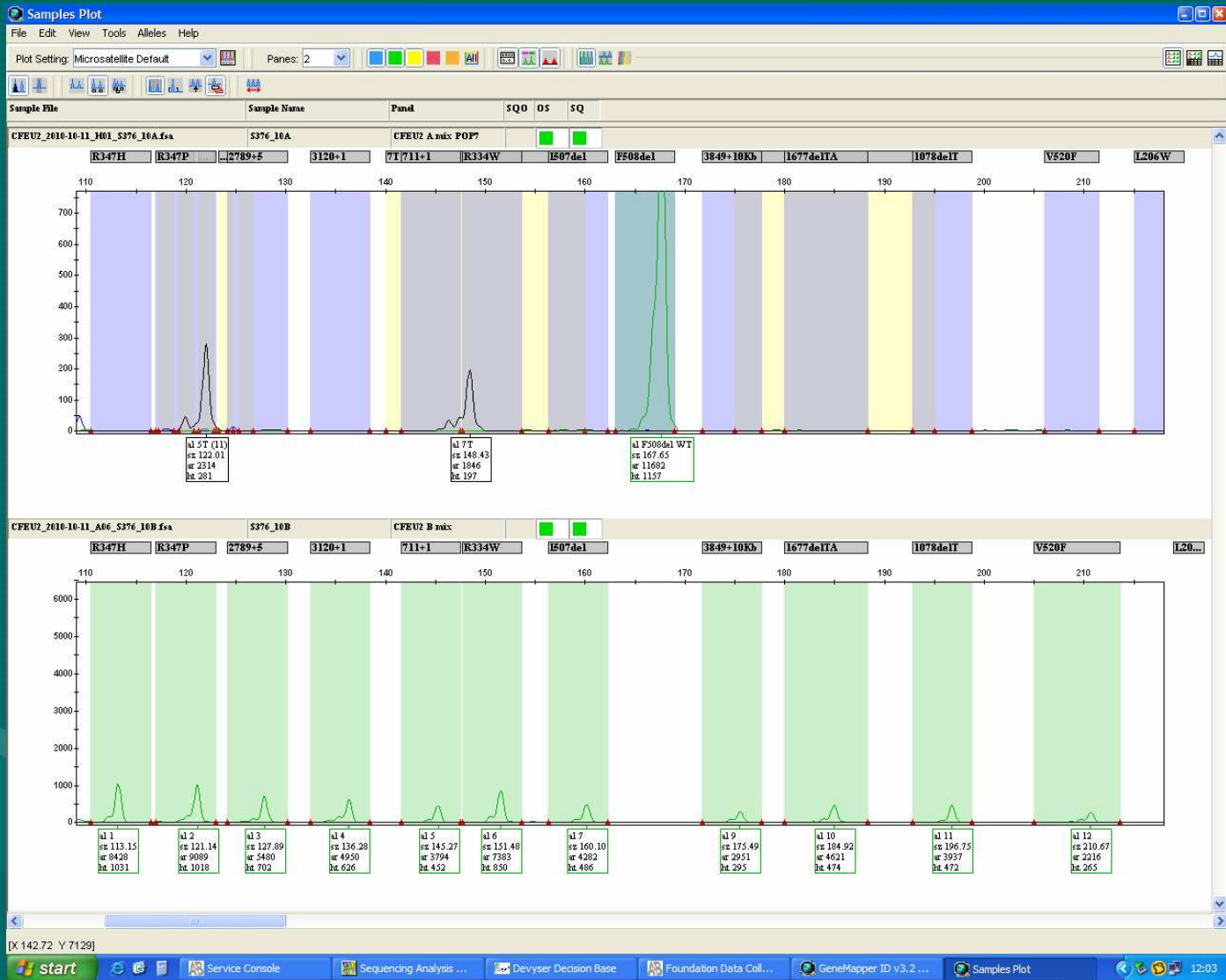


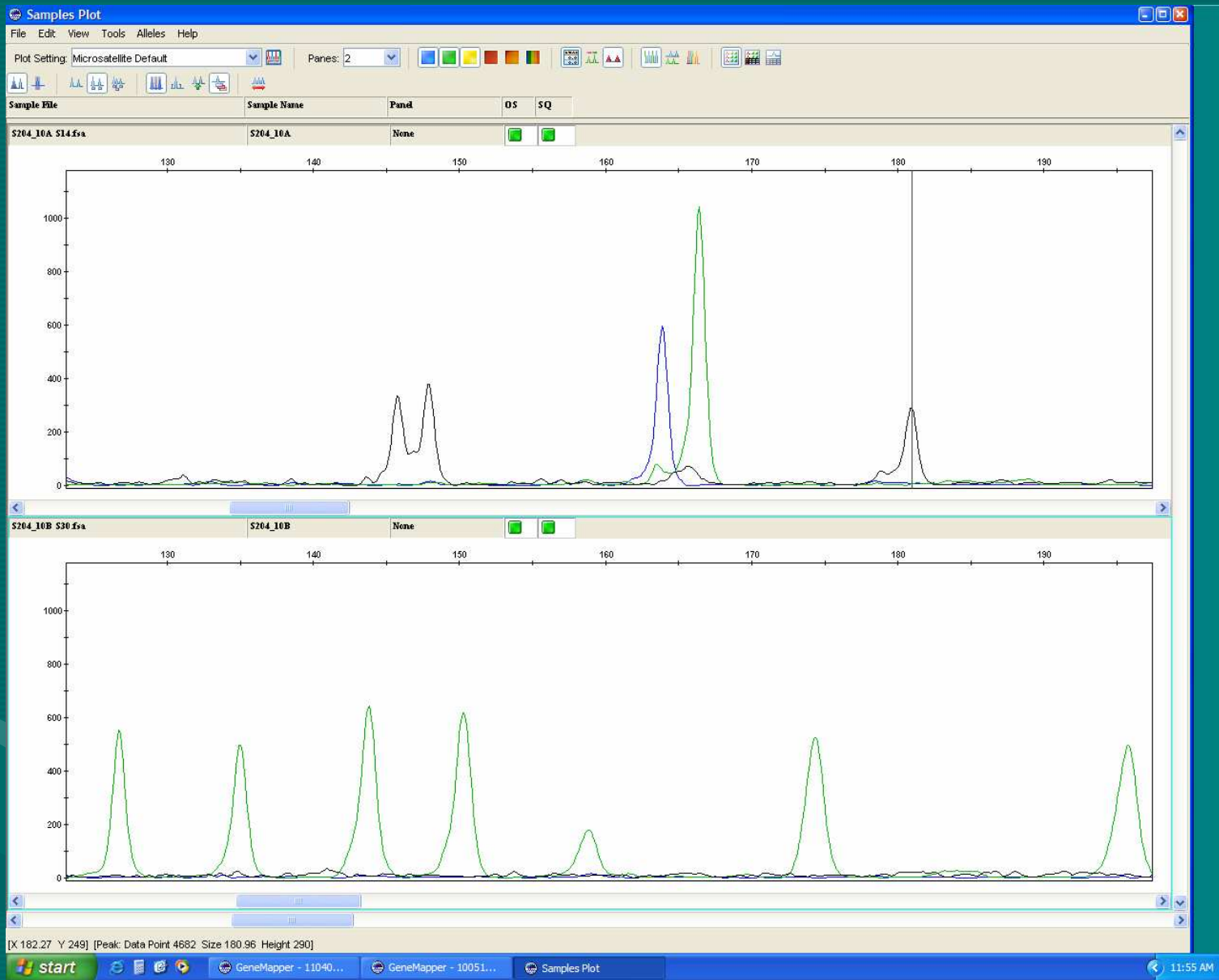








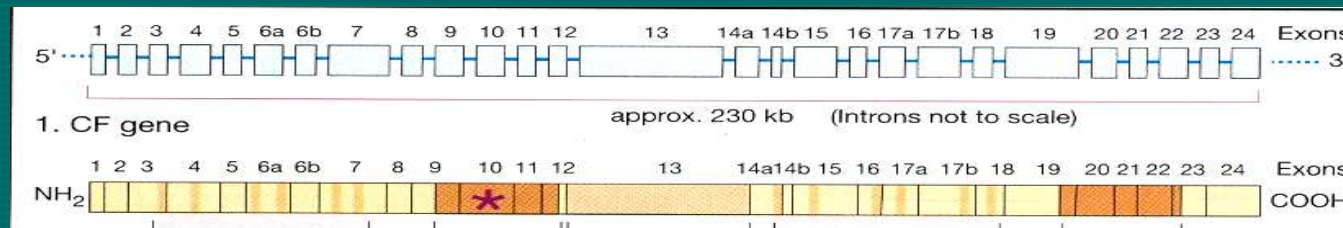




Scanning CFTR genu



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
- Sekvenace 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			

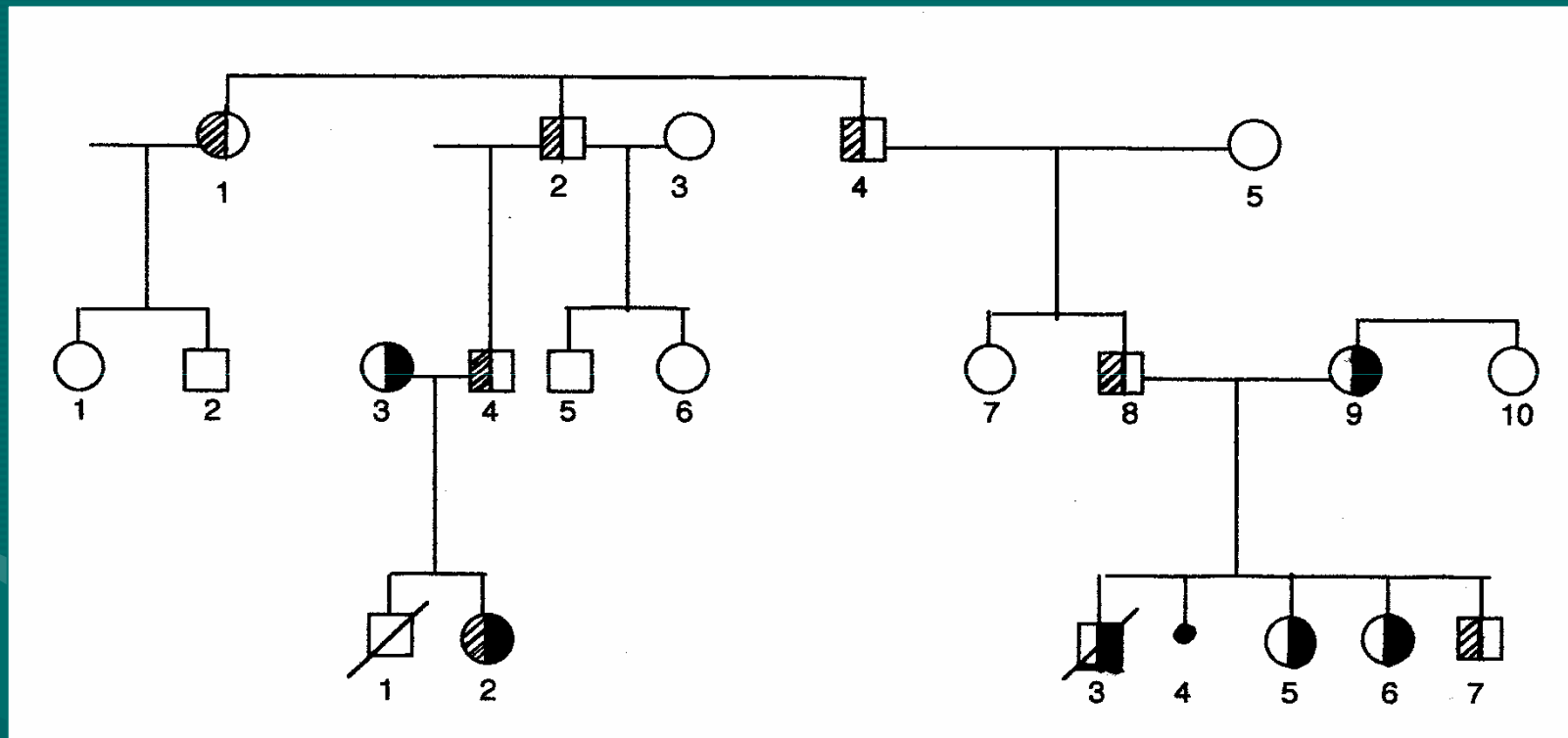
DGGE simplex systems

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





Rodokmen rodiny P.



 $\Delta F508$ / non

 CFTRdele2,3(21kb) / non

Pacient J.F.

Suspektní CF

Věk: 30 let !

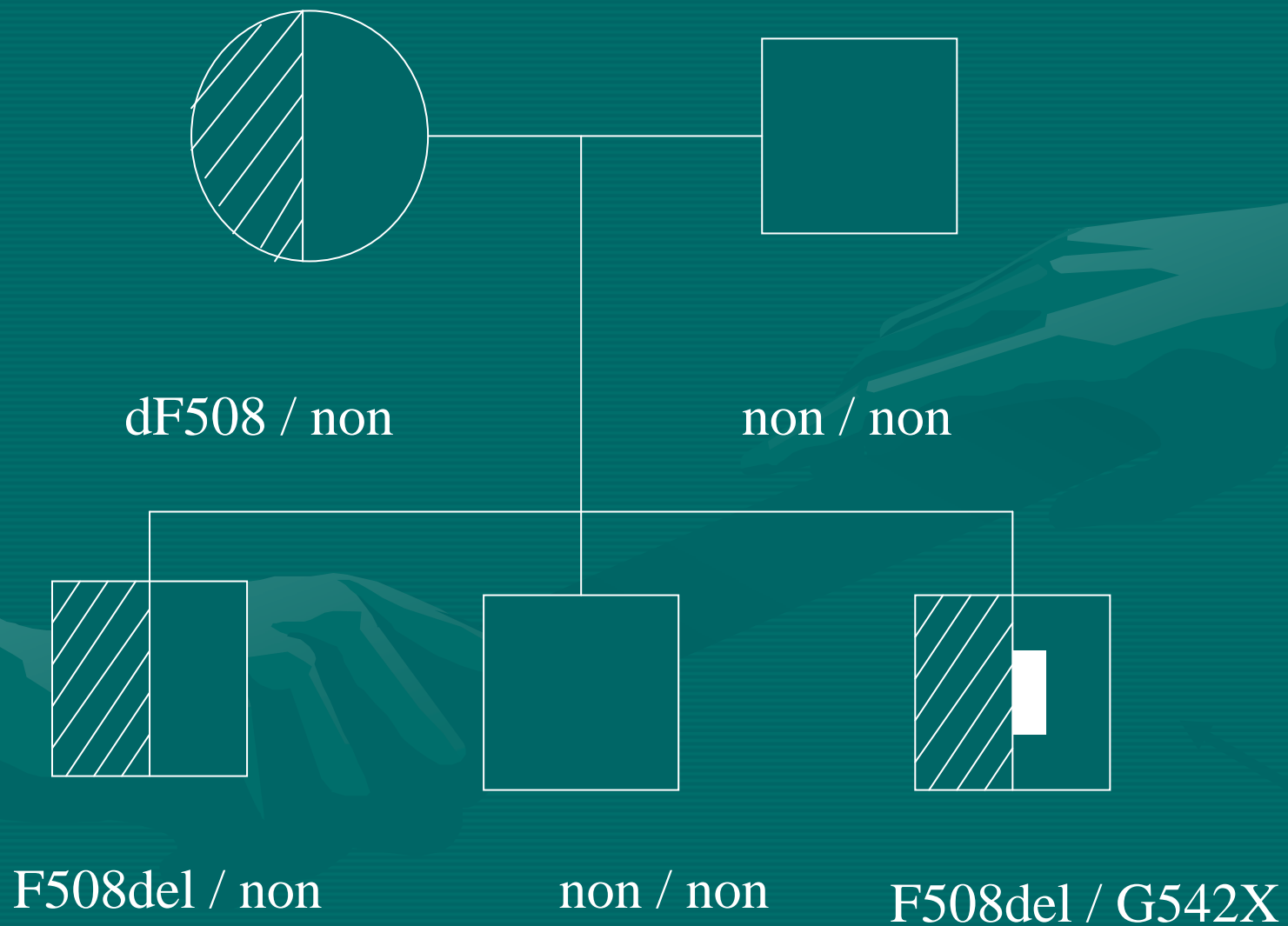
Detekována mutace $\Delta F508$ na obou alelách genu CFTR

genotyp $F508del / F508del$

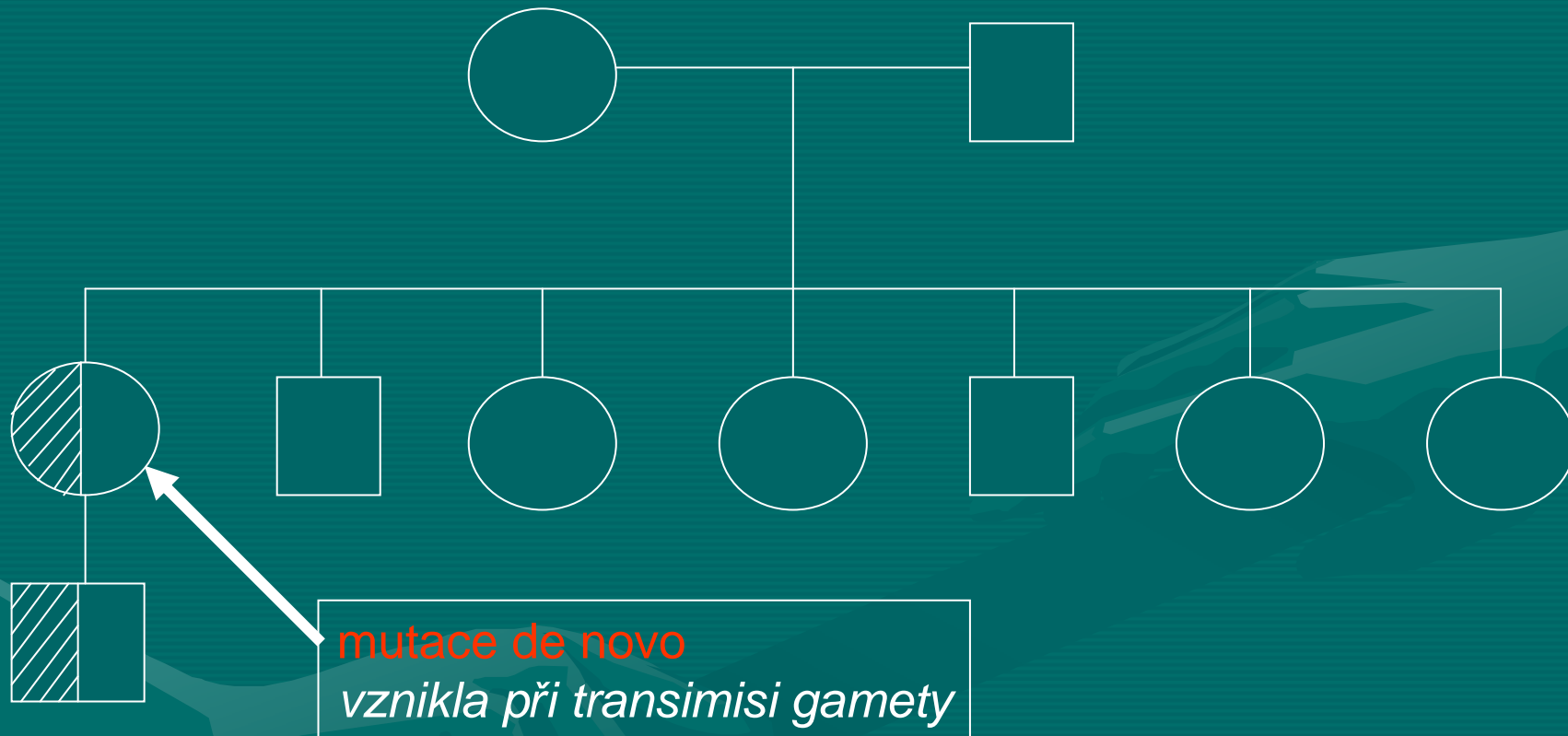
potvrzena dg. CF

diagnostikováno do 3 let života
diagnostikováno do 10 let života

Rodina M.



Rodina E.,K.



  CFTR~~2,3~~ / non

  non / non



Hemofile A

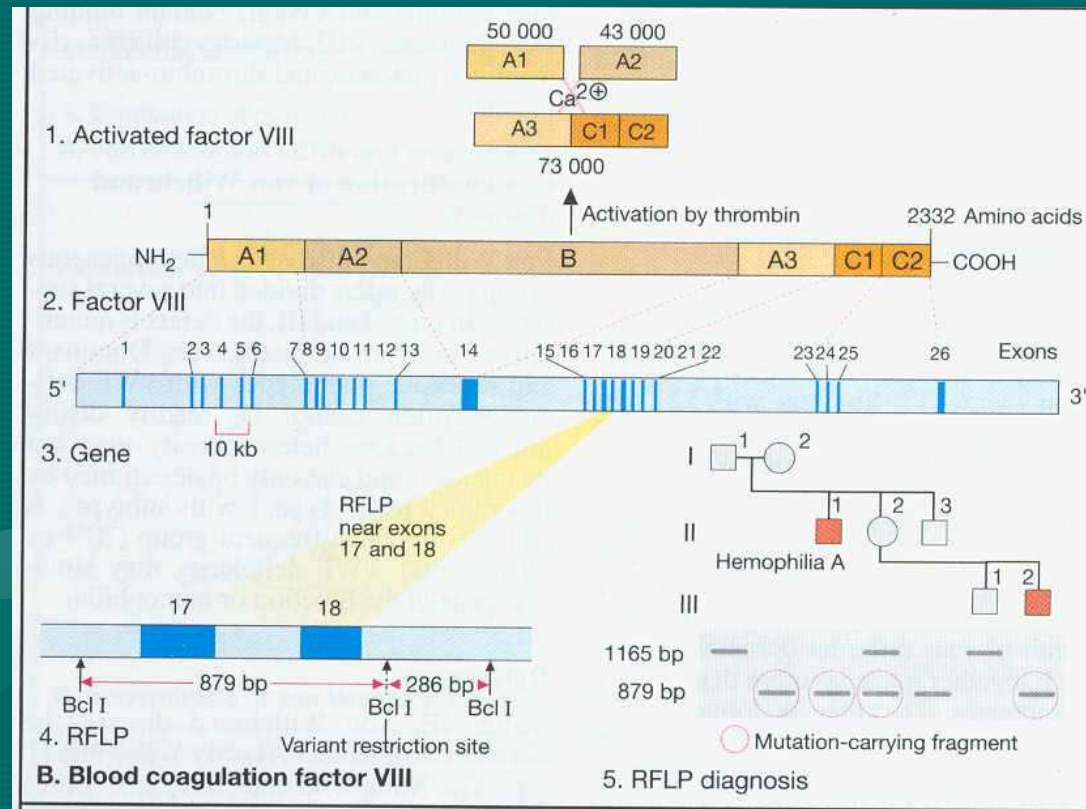
- incidence : 1/10.000 novorozených chlapců
- deficiencie koagulačního faktoru VIII
- X-vázaná choroba

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

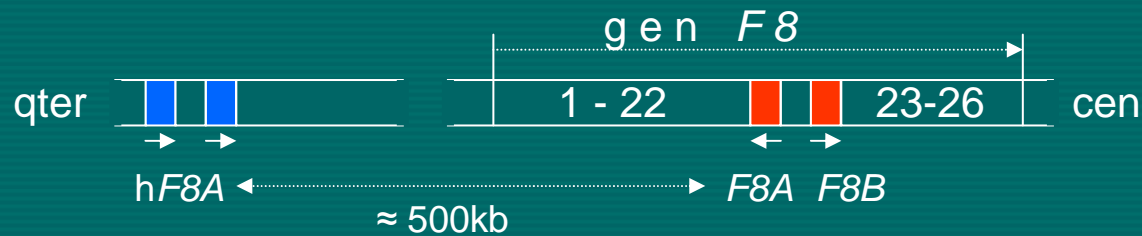
C. Severity of hemophilia A and factor VIII activity

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

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

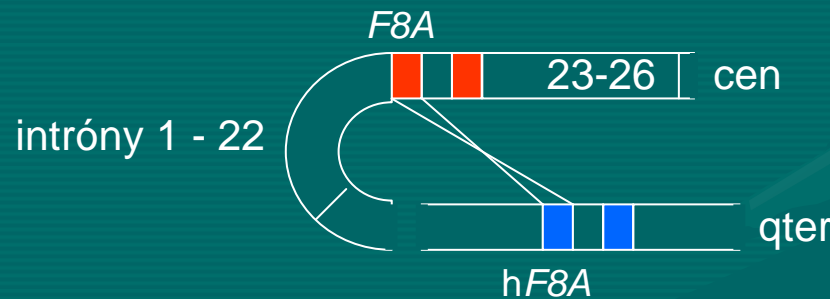


Inverze v genu *F8*: nejčastější příčina hemofilie A



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

→ ← orientace genů

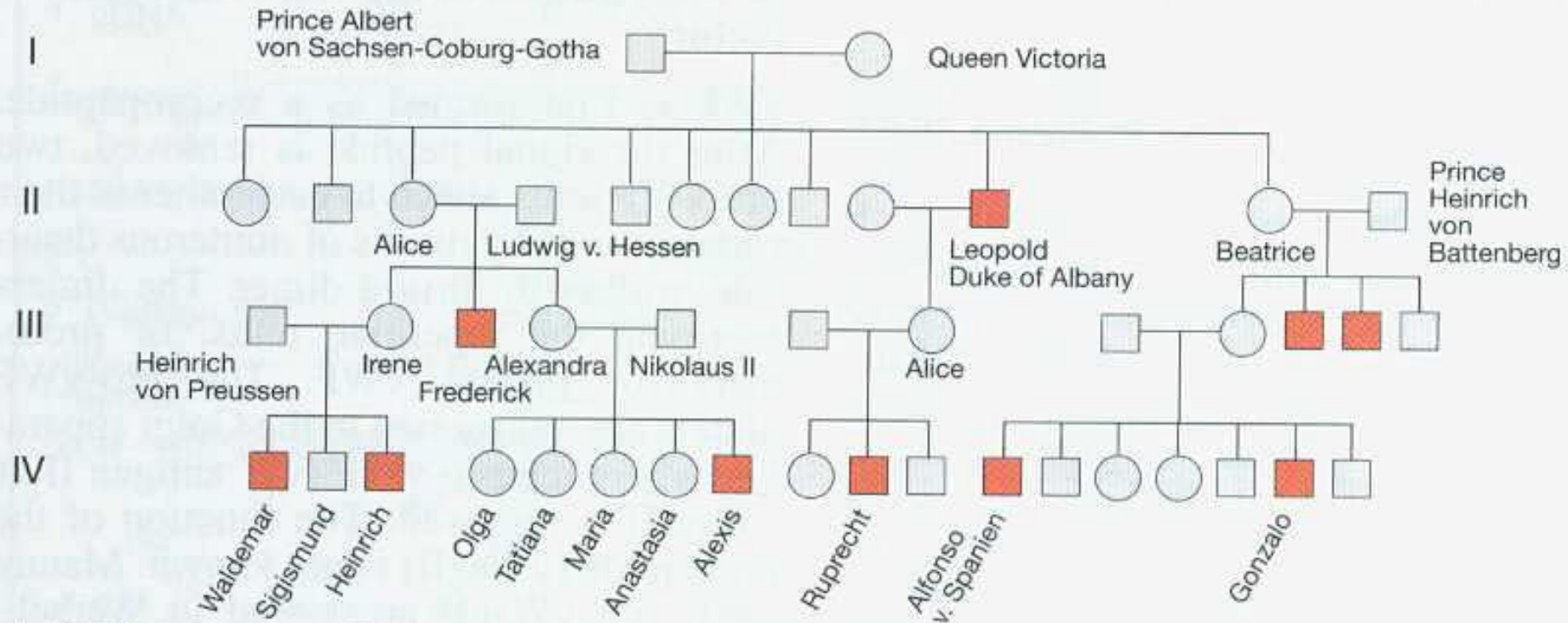


interchromatidová rekombinace mezi **F8A** a **hF8A**



inverze části *F8* genu

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



A. X-Chromosomal inheritance of hemophilia A

Komplexní diagnostika Duchennovy svalové dystrofie



Duchennova svalová dystrofie

Když jde do první třídy, už se velmi špatně hýbe, nemá rovnováhu a hodně padá.

Než vyjde z devítky, je trvale invalidní, připoutaný na vozíku.

A přijímaček na vysokou se nejspíš vůbec nedožije.

Tak to vypadá, když má chlapec Duchennovu svalovou dystrofii.



Šestiletý Daniel trpí svalovou dystrofií.

Je upoután na vozíku a jeho svalstvo postupně ochabuje.

Naděje, že se chlapec dožije dospělosti, je velmi malá.

Duchennova svalová dystrofie

- genetická choroba
- tělo nemocného při ní není schopné produkovat svalovou bílkovinu dystrofin
- důsledku toho začnou svaly postupně ochabovat: nejprve kosterní, pak dýchací a nakonec i srdce
- světově nejrozšířenější forma svalové dystrofie
- postihne jednoho ze tří tisíc narozených chlapců
- v Česku je evidováno asi pět stovek nemocných

Duchennova svalová dystrofie

poprvé posána



Guillaume Benjamin Amand Duchenne
narozen. 17. září 1806, Boulogne, Francie
zemřel 15. září 1875, Paříž, Francie

- francouzský neurolog
- popsal několik nervových a svalových poruch

- Aplikoval elektrody, za jejichž pomoci se zjišťoval průběh stahování svalových vláken.
- Vyšetřoval všechny hlavní povrchní svaly za použití elektrod
- Byl schopen rozlišit normální a nenormální svalovou reakci.

A handwritten signature in cursive script, likely reading 'Duchenne' followed by a flourish. The ink is dark and the background is a light, textured paper.

Beckerova svalová dystrofie

mírnější verze

- nápor nemoci se projeví obvykle později (propuká kolem desátého roku života)
- progrese je pomalejší
- prognózy hůře předvidatelné
- u chlapců s tímto typem nemoci sice tělo dokáže dystrofin vyrobit, ale pouze v malém množství a ve špatné kvalitě
- vyskytuje se u 1 chlapce z 18 000 narozených
- jako první popsal německý genetik Peter Emil Becker v roce 1955

Duchennova svalová dystrofie

průběh nemoci

- první příznaky se projeví mezi 3. – 6. rokem života

začnou později chodit

zvětšené lýtkové svaly - hypertrofie

jsou nemotorní

Často padají

nemohou pořádně běhat či chodit do schodů

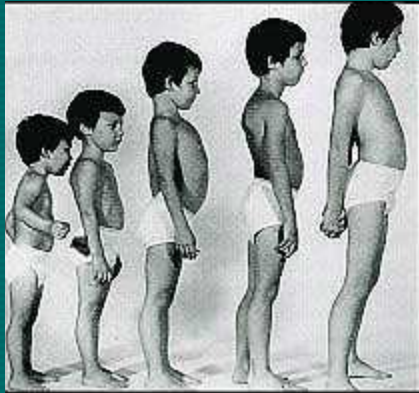
mají potíže při vstávání ze země



Duchennova svalová dystrofie

Průběh nemoci

- ve školním věku



většinou chodí po špičkách, protože mají drasticky zkrácené Achillovy šlachy

mění se i držení těla, záda se prohýbají, břicho se naopak vysunuje vpřed



Duchennova svalová dystrofie

Průběh nemoci

- do 13. let definitivně přestanou chodit a jsou odkázáni na invalidní vozík



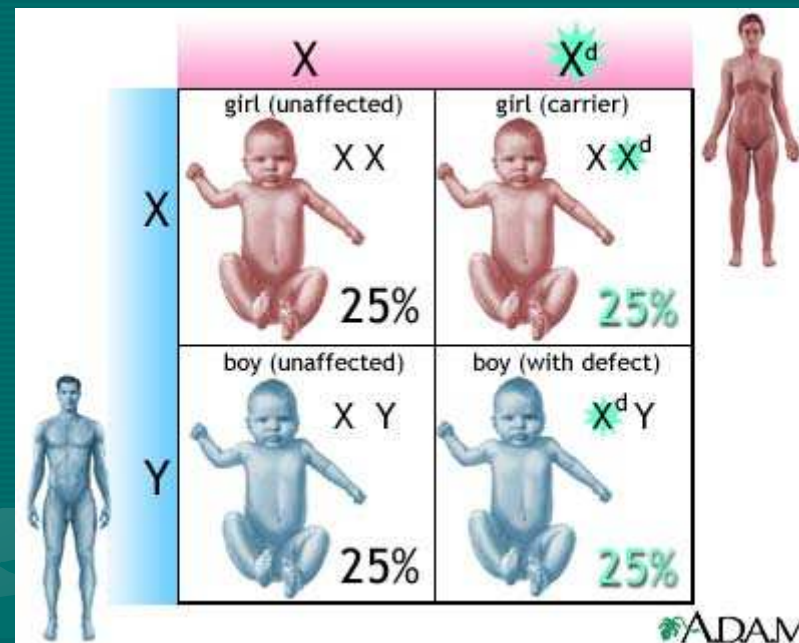
všechny aktivity, při kterých musí být zapojeny svaly rukou a nohou a trupu vyžadují pomoc

- 20. narozeniny už zpravidla neoslaví.

Duchennova svalová dystrofie

dědičnost X-recesivní

- DMD lokus Xp21



DMD v 99,9% postihuje výlučně chlapce (ve vzácných případech mohou onemocnět děvčata)

Duchennova svalová dystrofie

dystrofinový gen

Jeden z největších známých lidských genů 2,4 Mb

- 79 exonů
- 14 kb mRNA transkript

exprese ve skeletálním svalstvu a mozku

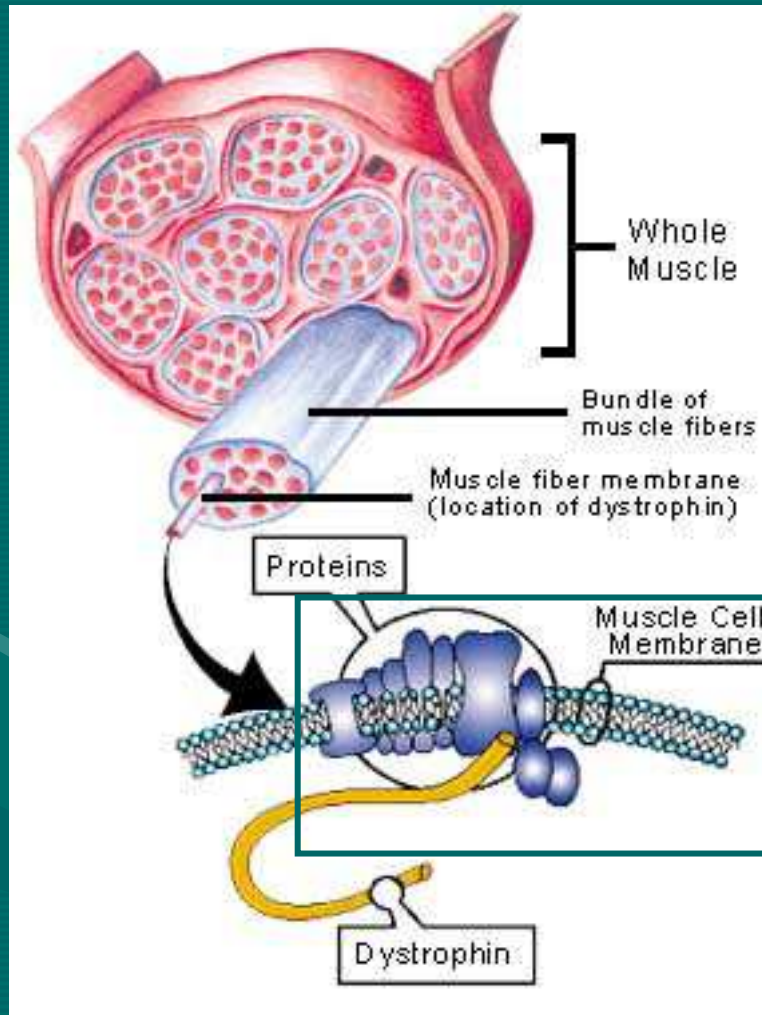
produkt – **dystrofin**

Mutace

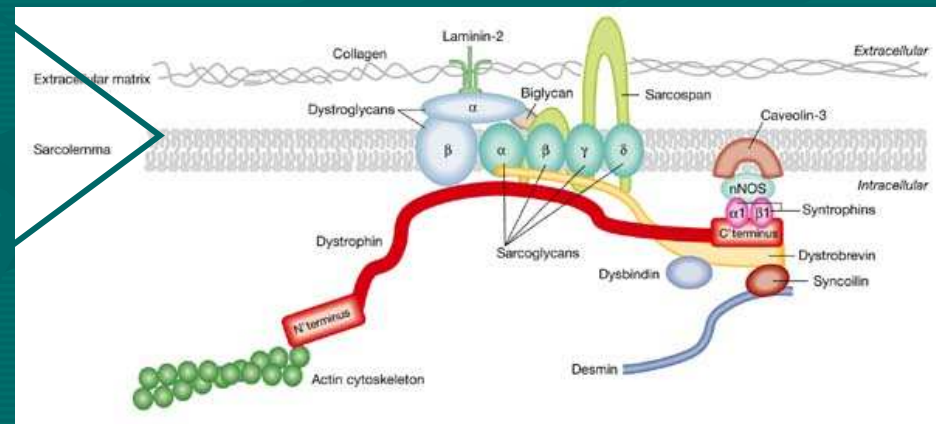
- 96% frameshift mutací
- 60-70% rozsáhlých delecí a duplikací
- 30% nových mutací
- 10-20% nových mutací jsou gonodální mozaiky

Duchennova svalová dystrofie

Dystrofin



- 427 kDa
 - sarkolemární protein
- společně s jinými proteiny zajišťuje spojení extracelulární matrix a cytoplasmatického cytoskeletu



dystrofin asociovaný proteinový komplex

Duchennova svalová dystrofie

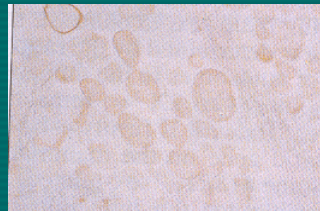
Dystrofin

DMD pacienti

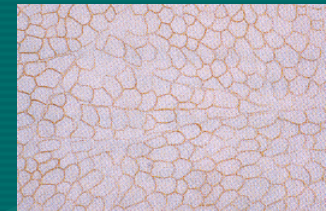
dystrofin fakticky chybí



normální dystrofin



dystrofin chybí



oblasti chybějícího dystrofinu u heterozygotů

BMD pacienti

- 10-40% normálního množství dystrofinu
- produkce částečně funkčního dystrofinu v alternativním množství

Determinace kvantity a distribuce dystrofinu imunohistochemickým barvením svalových biopsií

- může potvrdit přítomnost dystrofinopatie
- umožňuje diferenciaci mezi DMD a BMD
- výsledek nemusí být vždy přesný

Pouze identifikace patogenní DMD mutace dává absolutní diagnostickou jistotu

Duchennova svalová dystrofie

Algoritmus molekulárně genetického vyšetření

1. Detekce delecí DMD exonů v *hot spot* oblastech dystrofinového genu
2. MLPA
3. Sekvenování kódujících oblastí DMD genu
4. Nepřímá DNA dignostka

Duchennova svalová dystrofie

Detekce delecí DMD exonů

Základní molekulárně genetická diagnostika
založena

na detekci delecí DMD exonů v *hot spot* oblastech dystrofinového genu

DMD *hot spot* oblasti

DMD exony 1 – 22

DMD exony 44 - 54

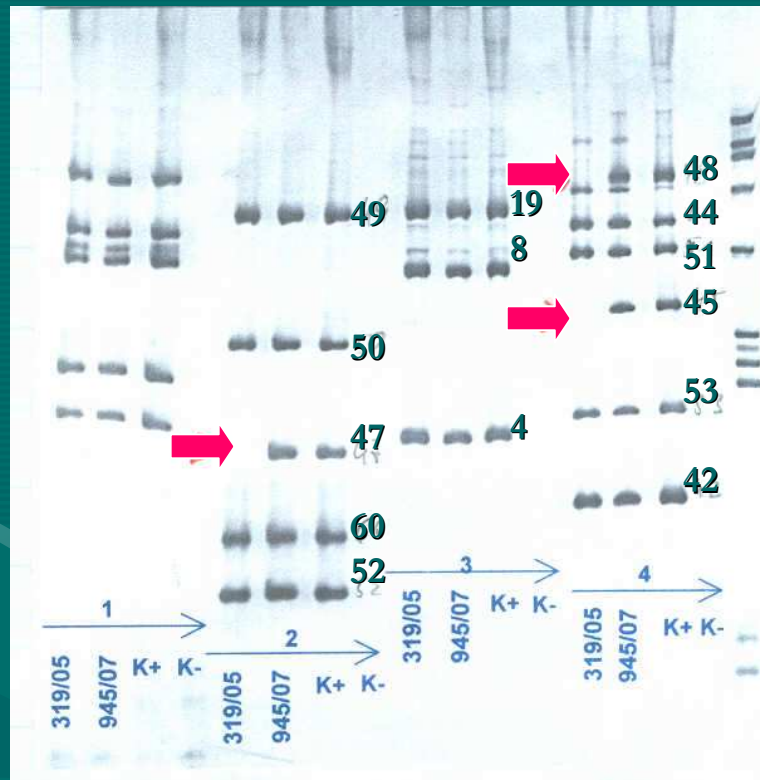
Prováděna multiplex PCR – amplifikace promotorové oblasti a 18 DMD exonů



Duchennova svalová dystrofie

Detekce delece DMD exonů

4 sety multiplex PCR



potvrzena DMD:
delece DMD exonů 45, 47, 48

Zkumavka 1

Pm 535 pb
exon 3 410 pb
exon 43 357 pb
exon 13 238 pb
exon 6 207 pb

Zkumavka 2

exon 49 439 pb
exon 50 271 pb
exon 47 181 pb
exon 60 139 pb
exon 52 113 pb

Zkumavka 3

exon 19 459 pb
exon 8 360 pb
exon 4 196 pb

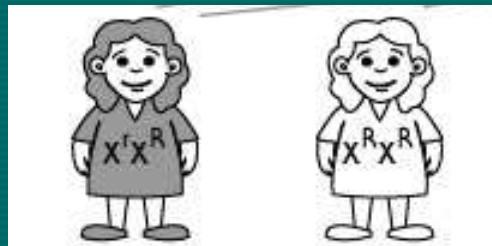
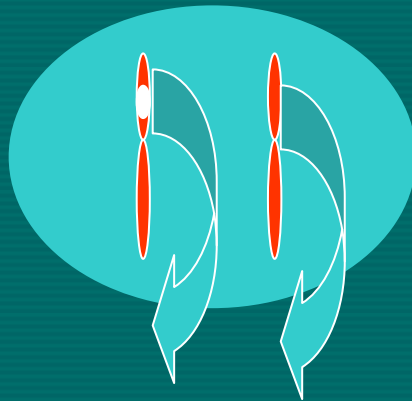
Zkumavka 4

exon 48 506 pb
exon 44 426 pb
exon 51 388 pb
exon 45 307 pb
exon 53 212 pb
exon 42 155 pb

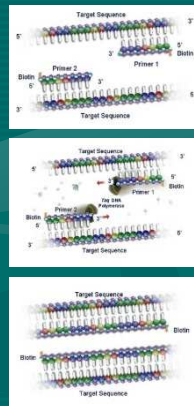
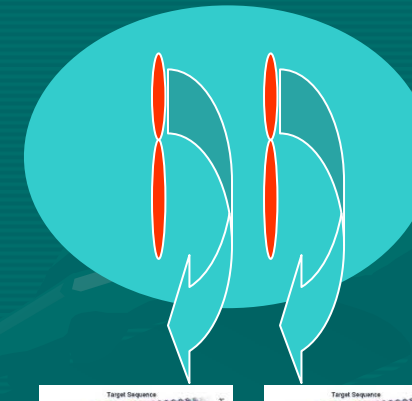
Duchennova svalová dystrofie

Detekce delece DMD exonů

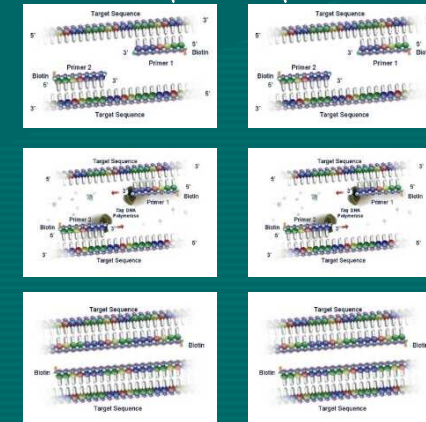
Multiplex PCR neodhalí ženu přenašečku



žena přenašečka žena nepřenašečka



vždy PCR produkt



Duchennova svalová dystrofie

MLPA

MRC-Holland b.v.



MLPA[®]

Multiplex Ligation Probe
Amplification

Duchennova svalová dystrofie

MLPA

“Multiplex gene dosage analysis made easy”

Poprvé popsána: Schouten JP et al. (2002)

-Relative quantification of 40 nucleic acid sequences
by multiplex ligation-dependent probe amplification.

Nucleic Acids Res. Jun 15;30(12):e57.

- detekce aberantních DNA sekvencí jednoduchým provedením na základě PCR reakce
- minimum pouze 20 ng DNA
- Lze analyzovat degradovanou DNA
 - extrahovanou z tkání v parafinových bločcích
 - extrahovanou z tkání ve formalínu
 - volnou fetální DNA získanou z maternální plasmy
- diskriminuje sekvence lišící se pouze v jednom nukleotidu
- determinuje metylační status promotrů
- detekce známých mutací a SNP

Duchennova svalová dystrofie

MLPA

Přístroje



termocykler



DNA analyzátor

Duchennova svalová dystrofie

MLPA

MLPA techniky

1. Denaturace
2. Hybridizace
3. Ligace
4. Amplifikace

Duchennova svalová dystrofie

MLPA

SALSA MLPA proby

Synthetic oligonucleotide
50-60 bp



M13-derived oligonucleotide
60-450 bp

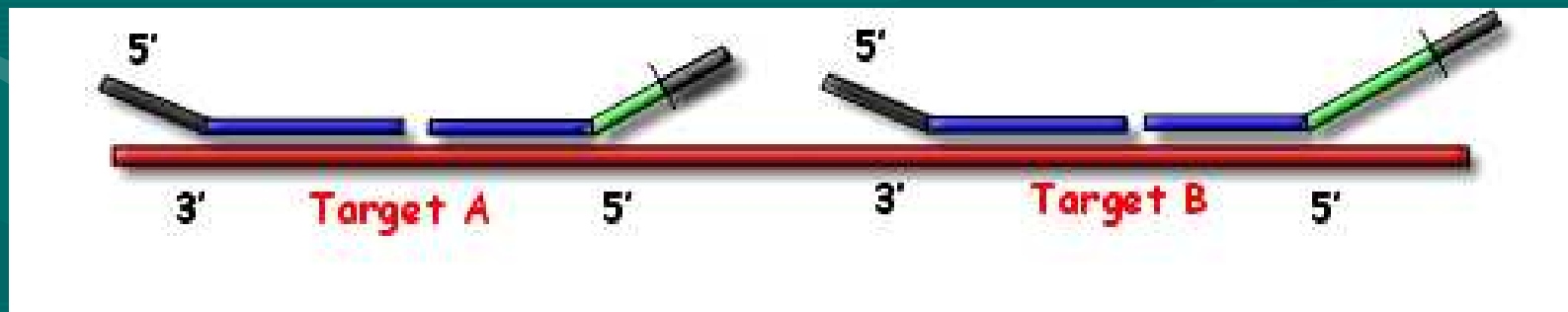


Duchennova svalová dystrofie

MLPA

Hybridizace

1. MLPA probemix je přidán k denaturované genomické DNA
2. Dvě části každé probe hybridizují k odpovídající sekvenci

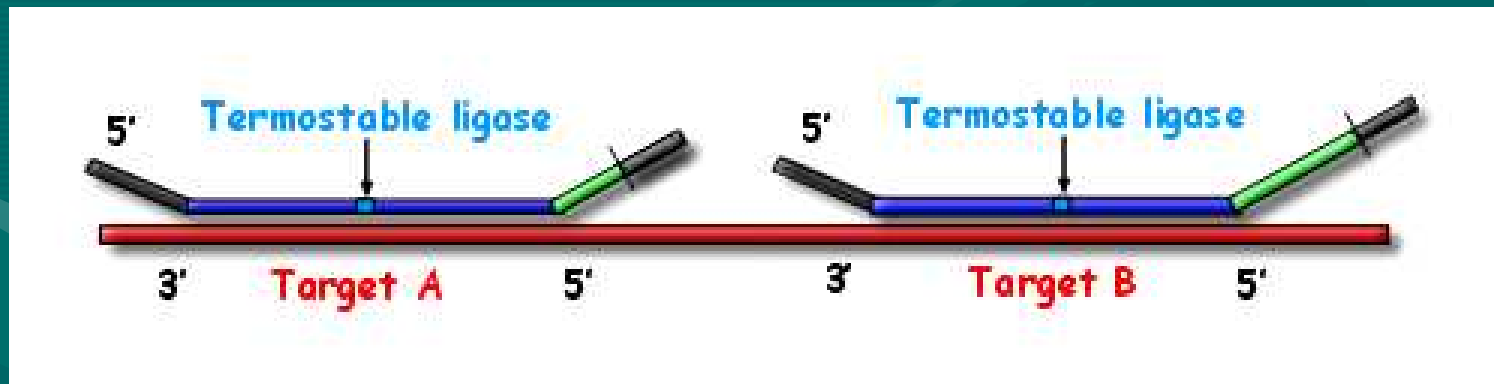


Duchennova svalová dystrofie

MLPA

Ligace

3. Proby jsou ligovány termostabilní ligásou

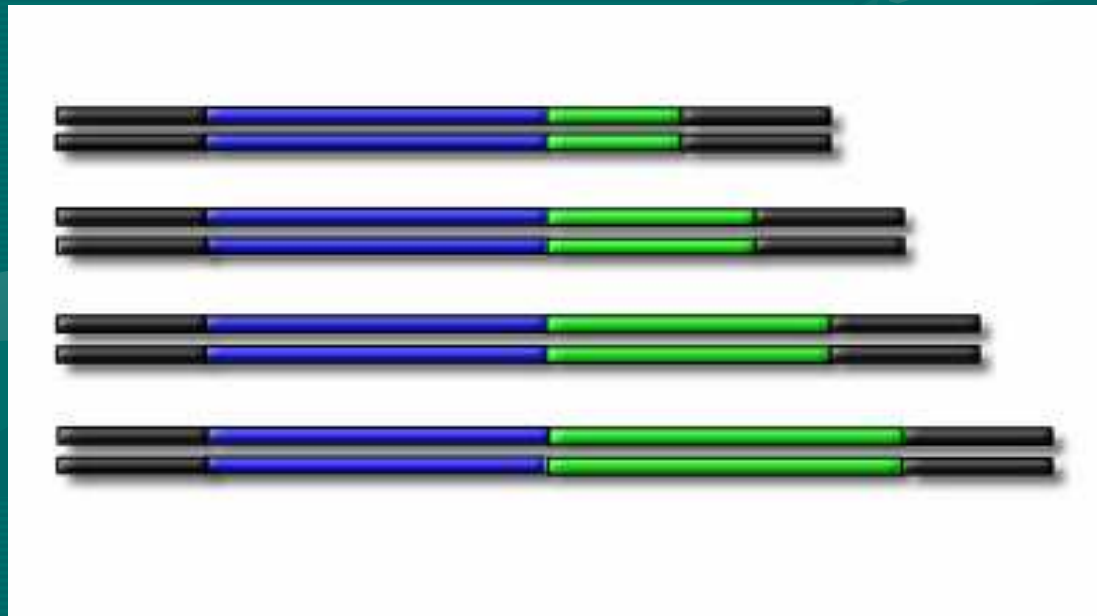


Duchennova svalová dystrofie

MLPA

Amplifikace

4. Pár univerzálních primerů je použit k amplifikaci všech ligovaných prób.
Amplifikační produkt každé próby má unikátní délku (130 –480 bp)



Duchennova svalová dystrofie

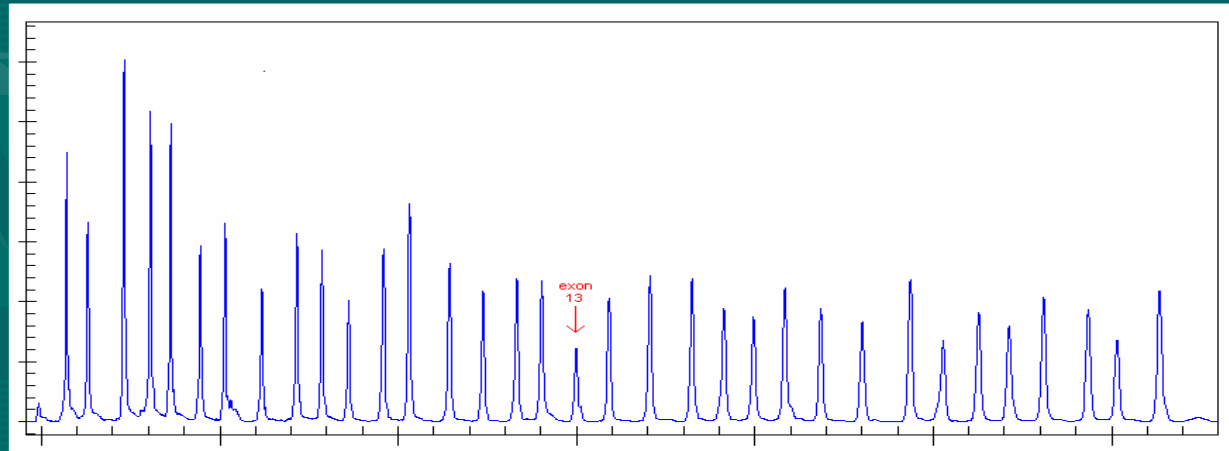
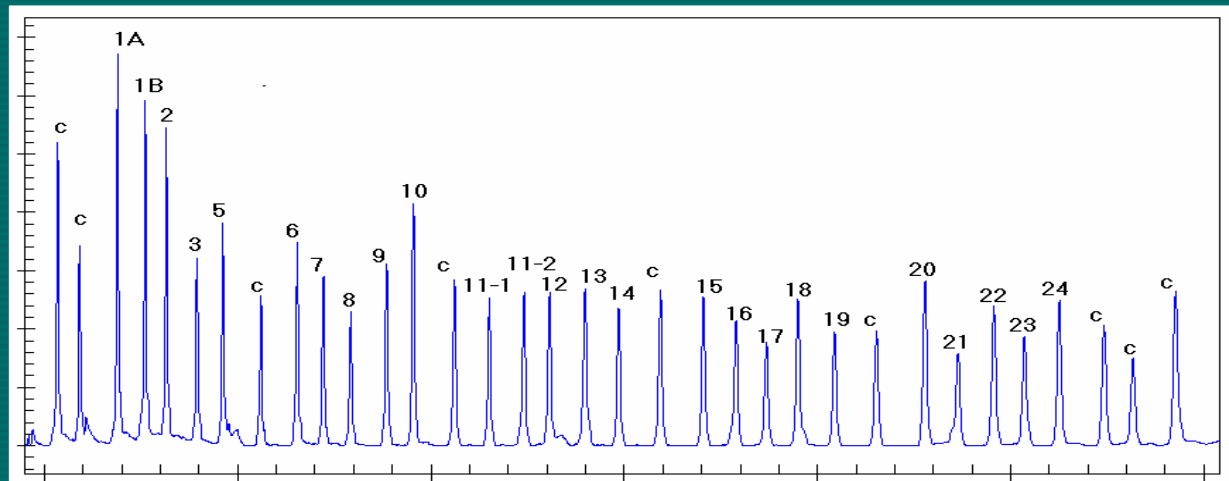
MLPA

Separace a kvantifikace kapilární elektroforézou

Každý pík je
amplifikační produkt
specifické probe

Vzorky jsou porovnávány
s kontrolním vzorkem

Rozdíl v relativní výšce
nebo ploše píku
v cílové sekvenci próby



Duchennova svalová dystrofie

MLPA

Salsa MLPA Kit P034/P035 DMD/Becker

Detekuje delece a duplikace všech exonů DMD genu

DMD muž

delece probě odpovídající sekvence se projevuje absencí amplifikačního produktu proby

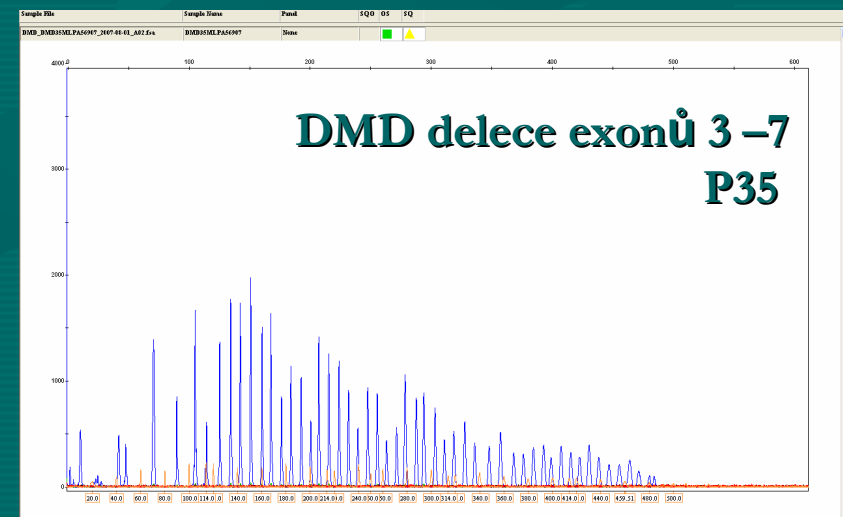
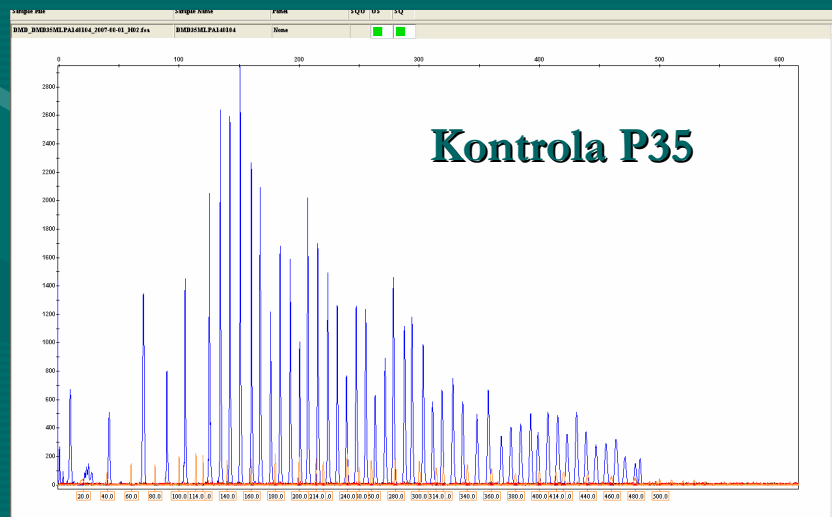
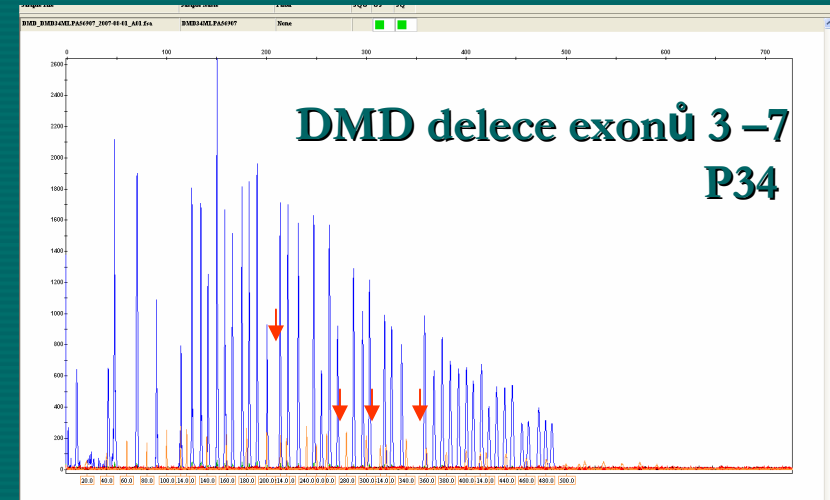
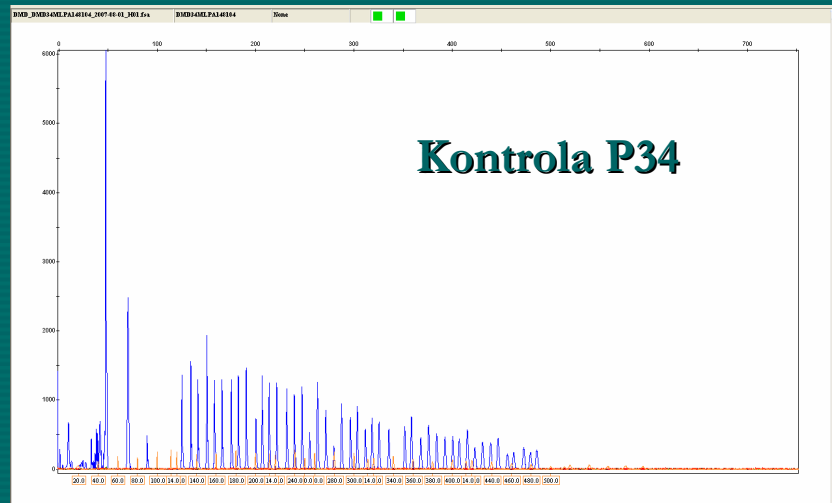
DMD žena přenašečka – heterozygot

30- 35% redukováná plocha píku amplifikačního produktu příslušné proby

Mutace/polymorfismy ležících v místech dosedání prob mohou také způsobit redukcii plochy píku – delecí jednoho exonu nutné ověřit jinou metodou

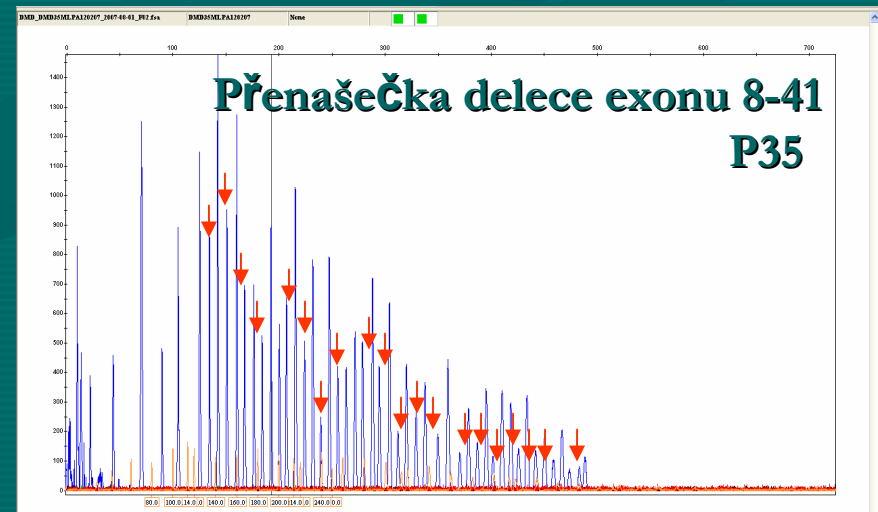
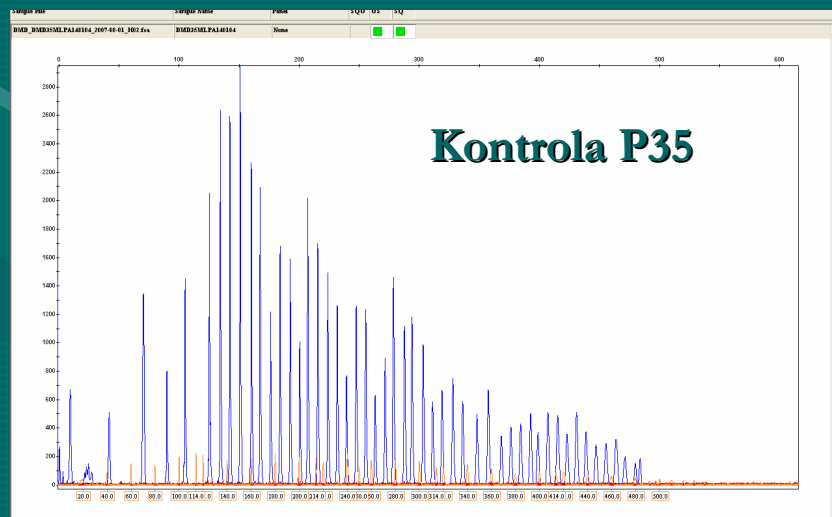
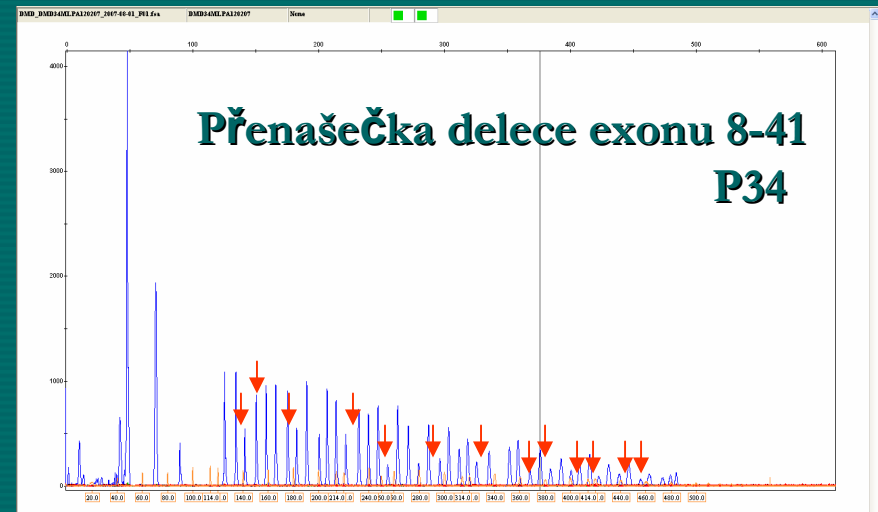
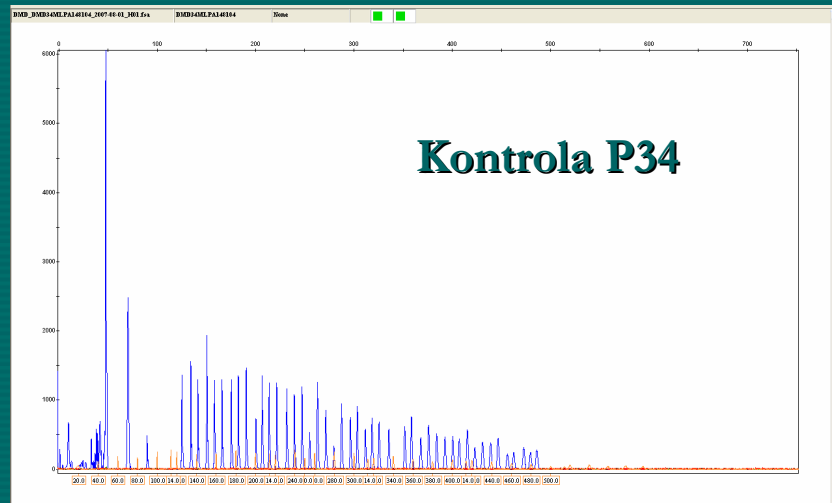
Duchennova svalová dystrofie

MLPA



Duchennova svalová dystrofie

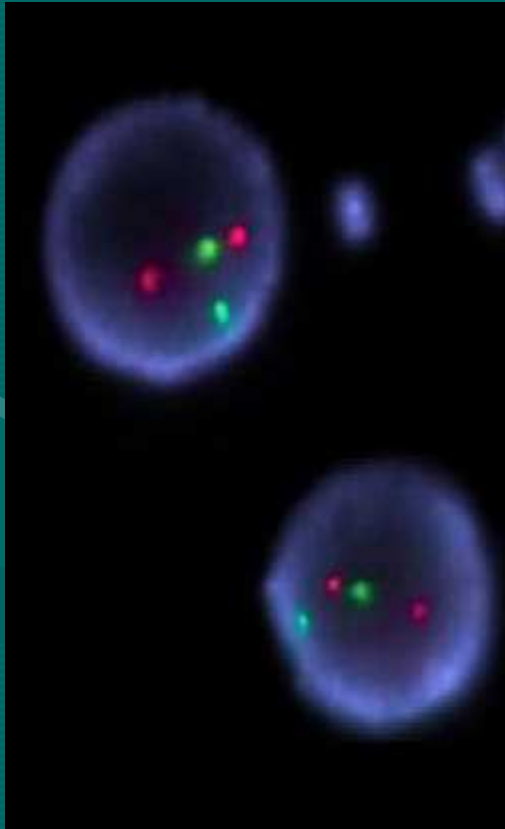
MLPA



Duchennova svalová dystrofie

FISH

Metodou fluorescenční *in situ* hybridizace lze lokalizovat cílové nukleotidové sekvence přímo v buňkách (*in situ*).



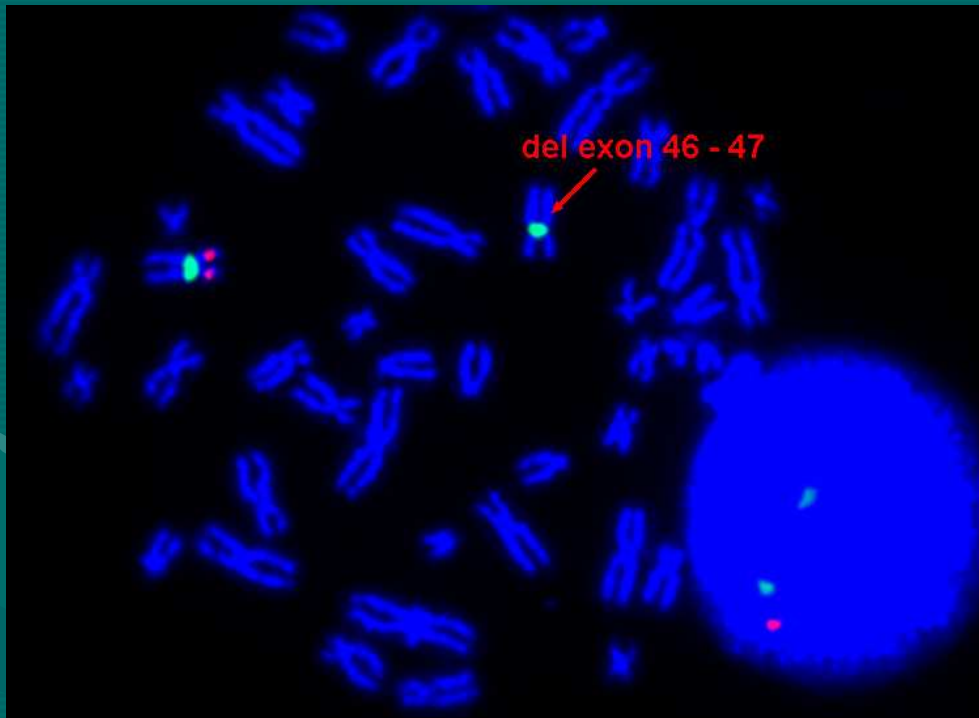
Metoda FISH

je

založena na schopnosti jednořetězcové DNA sondy vázat komplementární úsek cílové DNA fixované na mikroskopickém skle.

Duchennova svalová dystrofie

FISH



Přenašečka delece exonu 46-47
v genu pro dystrofin na chr.X

Lymfocyty periferní krve

Kuglík, Slámová
Laboratoř molekulární cytogenetiky,
OLG, FN Brno

Duchennova svalová dystrofie

Život s dystrofií se podobá temnému tunelu, kde je lepší nevidět konec.
Světýlek naděje na léčbu v něm bliká málo.
Ale nyní se z temnoty tunelu ozývá veselý psí štěkot.



Na žádnou z podob svalové dystrofie nebyl zatím nalezen účinný lék.....ale!!!

Duchennova svalová dystrofie

Léčba

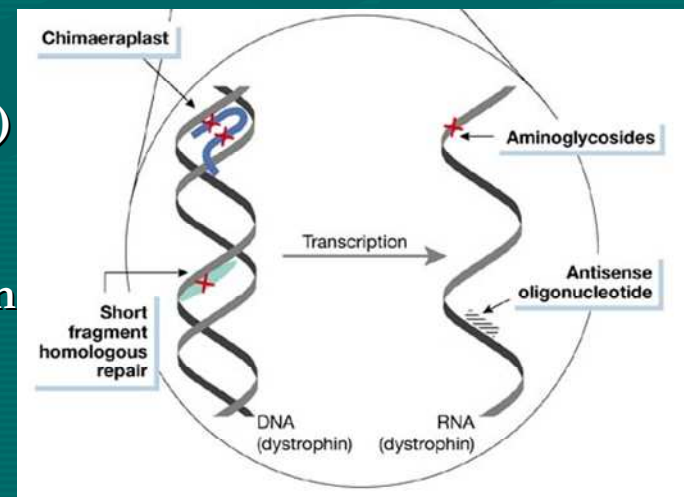
Mesengioblasty

- kmenové buňky získané ze stěn cév krevního oběhu
- schopné diferenciaci na svalová vlákna a produkce dystrofinu
- čtyři z pěti psů se postavili na nohy
- transplantované buňky pronikly do svalů v různých částech těla, zapojily se do nich a pomohly k nápravě
- v některých svalech až 70% vláken dárcovského původu

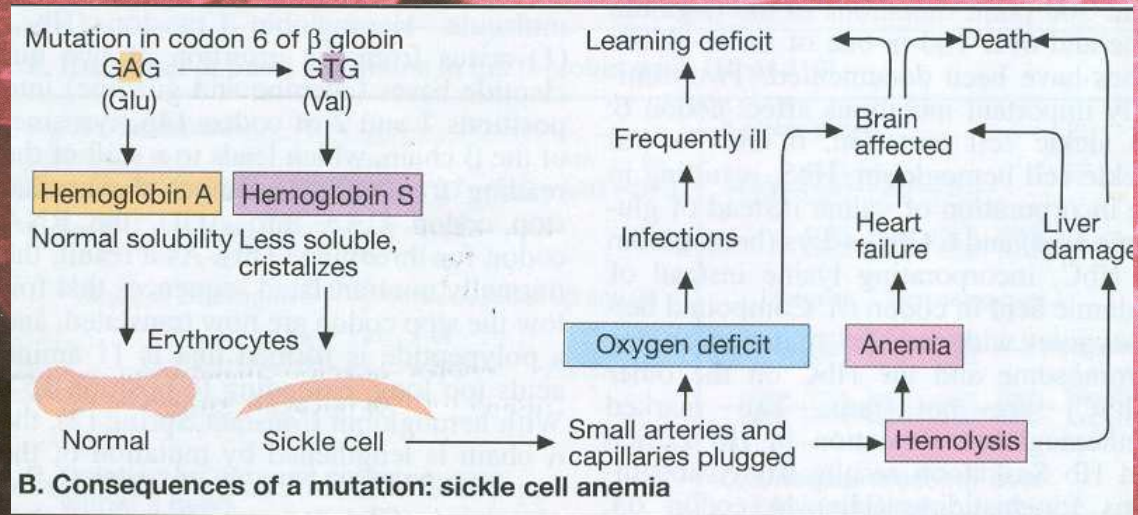
Giulio Cossa, Nature, listopad 2006

Exon skipping

- AON (antisense oligonukleotid)
- zabraňuje transkripci poškozených exonů
- vzniká zkrácený funkční protein



Srpkovitá anemie



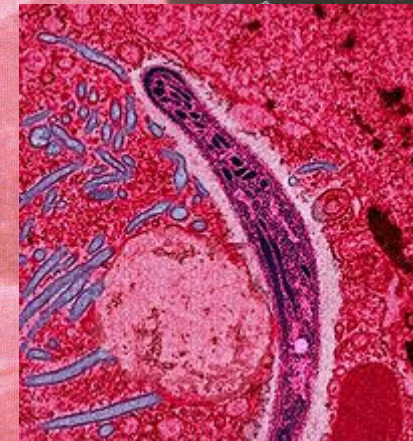
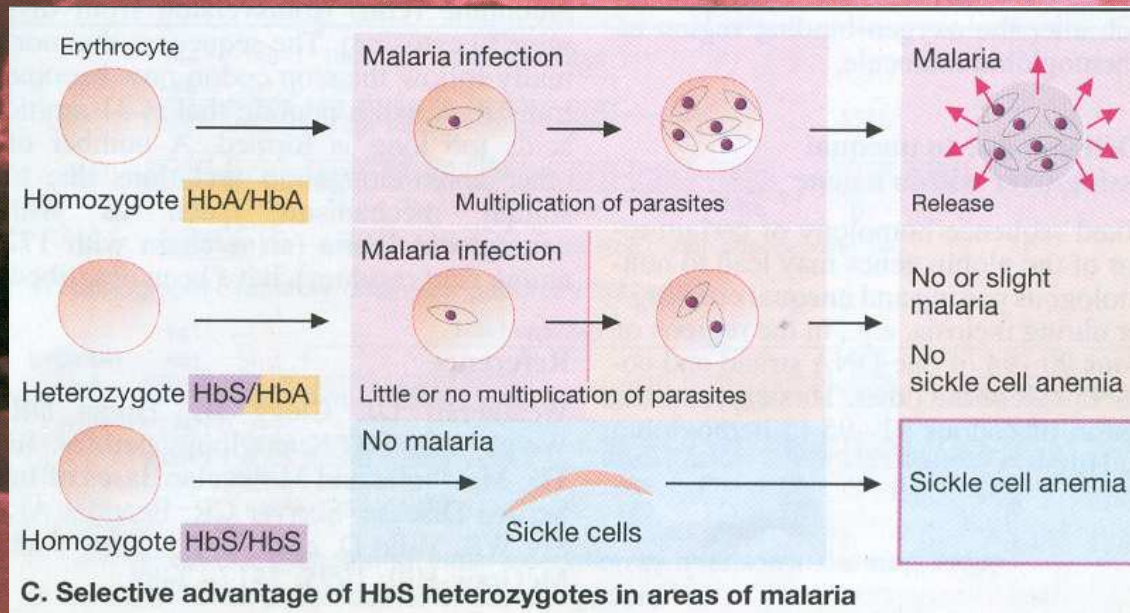
•frekventovaná v Africe a černé populaci severní Ameriky



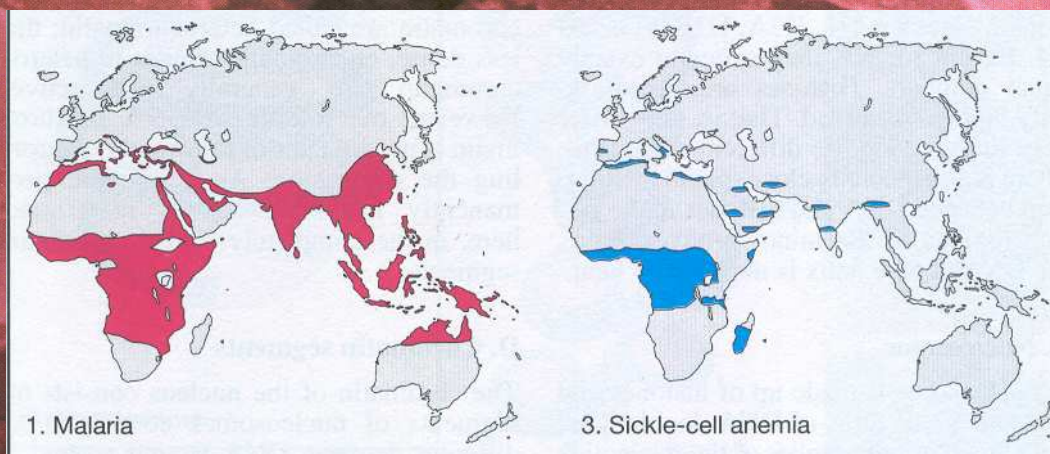
1: 500

•autozomálně recesivní dědičnost

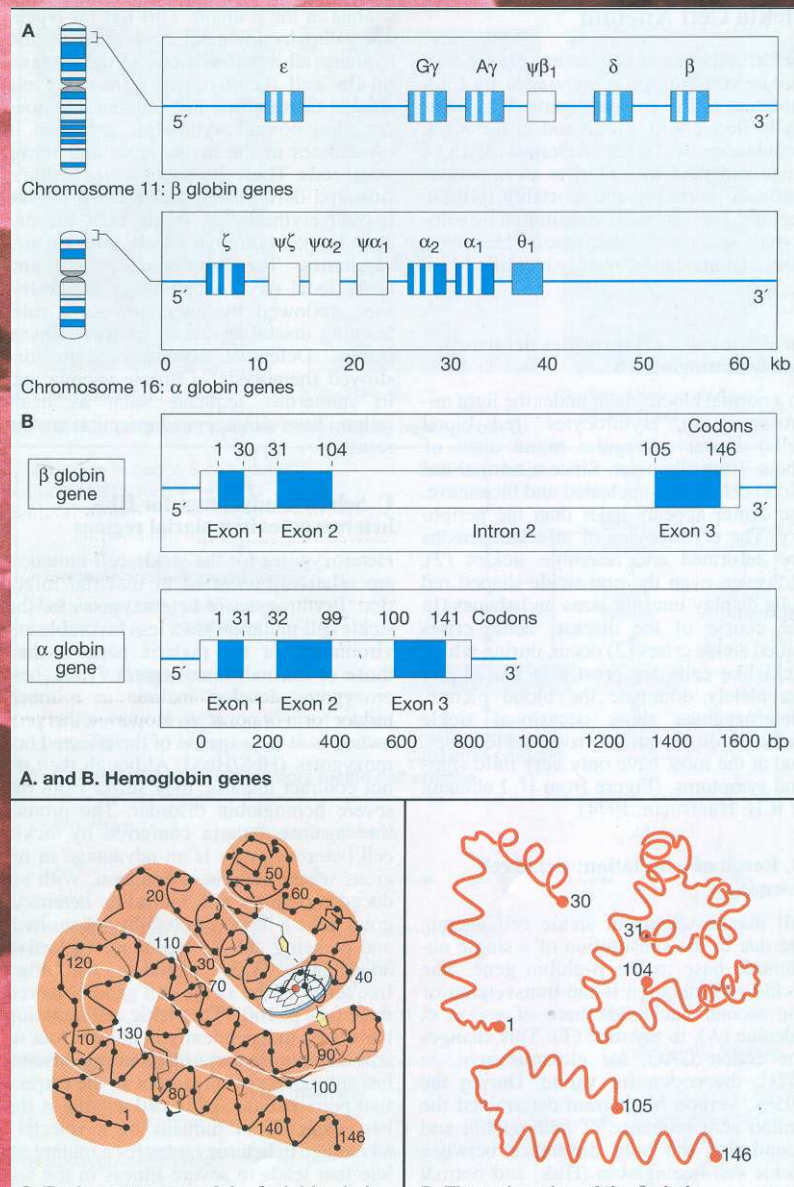
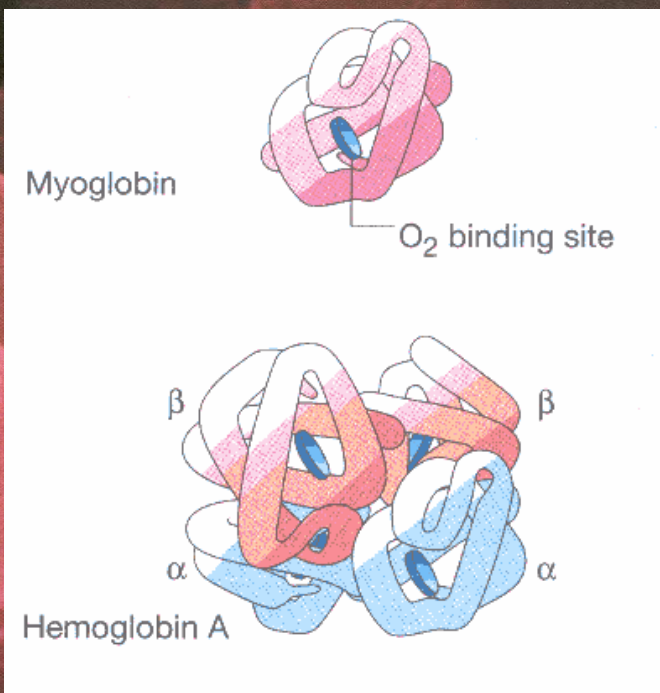
Srpkovitá anemie



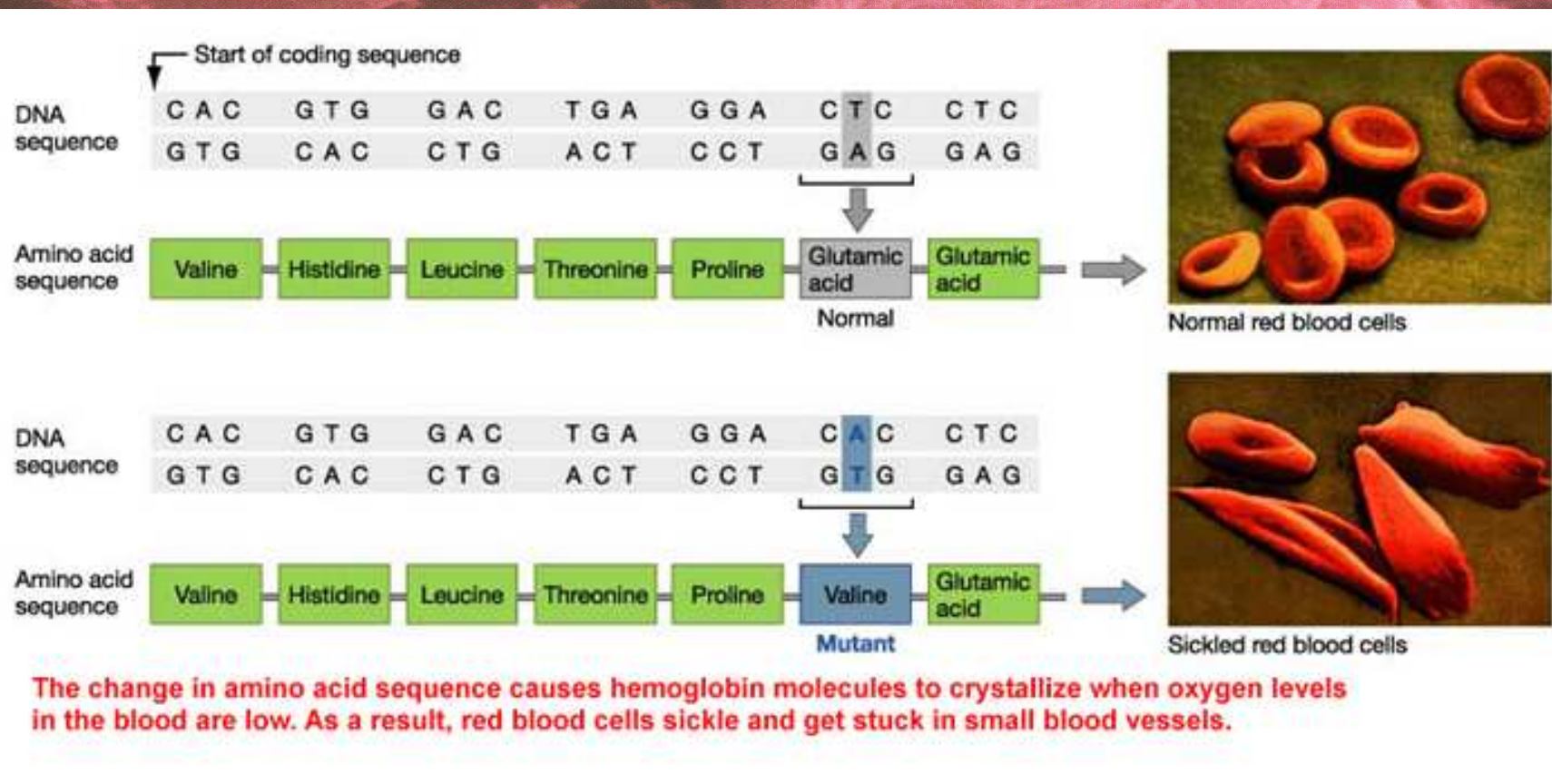
Doména: [Eukaryota](#)
 Říše: [Chromalveolata](#)
 Nadkmen: [Alveolata](#)
 Kmen: [Apicomplexa](#) (Apicomplexa)
 Třída: [Haematozoa](#) (Haematozoa)
 Řád: [Haemosporida](#)
 Čeleď: [Plasmodiidae](#)
 Rod: [Plasmodium](#)



Hemoglobin



Srpkovitá anemie



Expanze trinukleotidových repetic

The background is a solid teal color. In the lower half, there is a faint, semi-transparent image of two hands shaking, symbolizing agreement or partnership. The text is centered in the upper half.

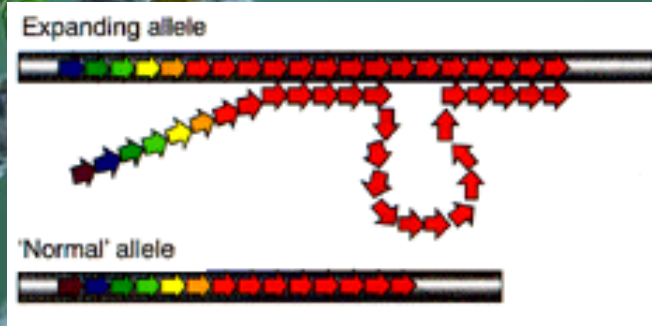
TR
*trinucleotide
repeat*

mutace

TREs
*trinucleotide
repeat expansion*

TRED
*trinucleotide
repeat expansion
diseases*

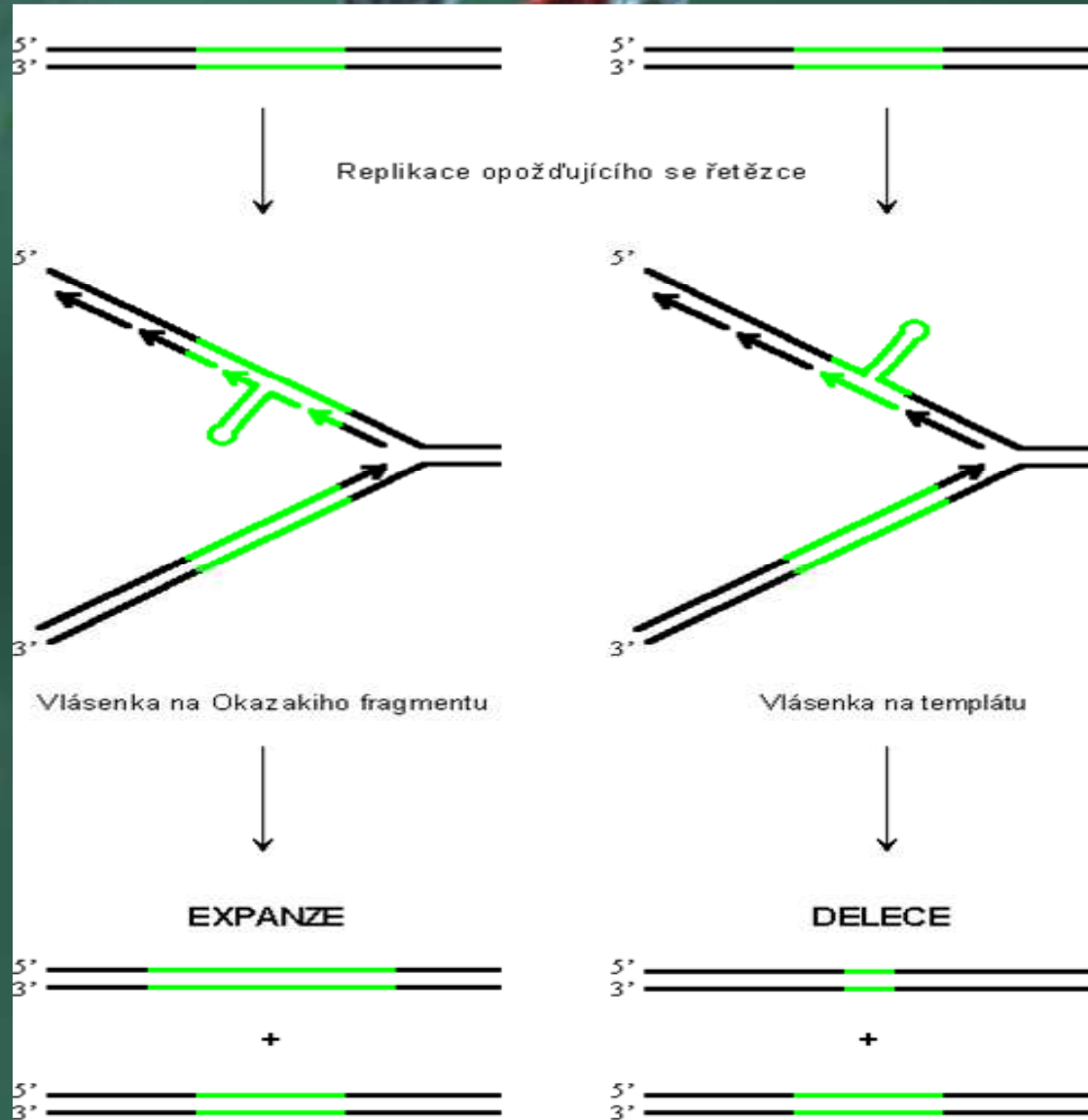
expanze
nový typ mutace, popsán 1991



TR - trinukleotidové repetice

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

Expanze a delece trinukleotidů při replikaci



Rozdělení chorob zapříčiněných expanzí trinukleotidových repetitiv 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

Choroba	Dědičnost	Frekvence	Popis	Lokus	Gen	Protein	Pozice expanze	Sekvence trinukleotidu	Počet opakování		Původ nestability
									normální	patologické	
Fragilní X (FRAX-A)	XD	1/2500	mentální retardace	Xq27.3	FMR-1 (FRAXA)	RNA binding	5'UTR	CGG	5 až 54	200 až 4000	M
Hungtigtonova chorea	AD	1/5000 až 15000	demence	4p16.3	IT15	huntigtin	ORF	CAG	11 až 34	35 až 121	P
Myotonická dystrofie 1	AD	1/8000	svalová slabost	14q13.3	DMPK	proteinkináza	3'UTR	CTG	5 až 35	50 až 2000	M
Kenedyho choroba	XR	1/50 000	atrofie svalů	Xq11	AR	androgen. receptor	ORF	CAG	12 až 34	40 až 62	P
Spinicelebrální ataxie 1	AD		postižení míšních provazců a mozečku	6p22	SCA1	ataxin 1	ORF	CAG	6 až 39	40 až 80	P

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



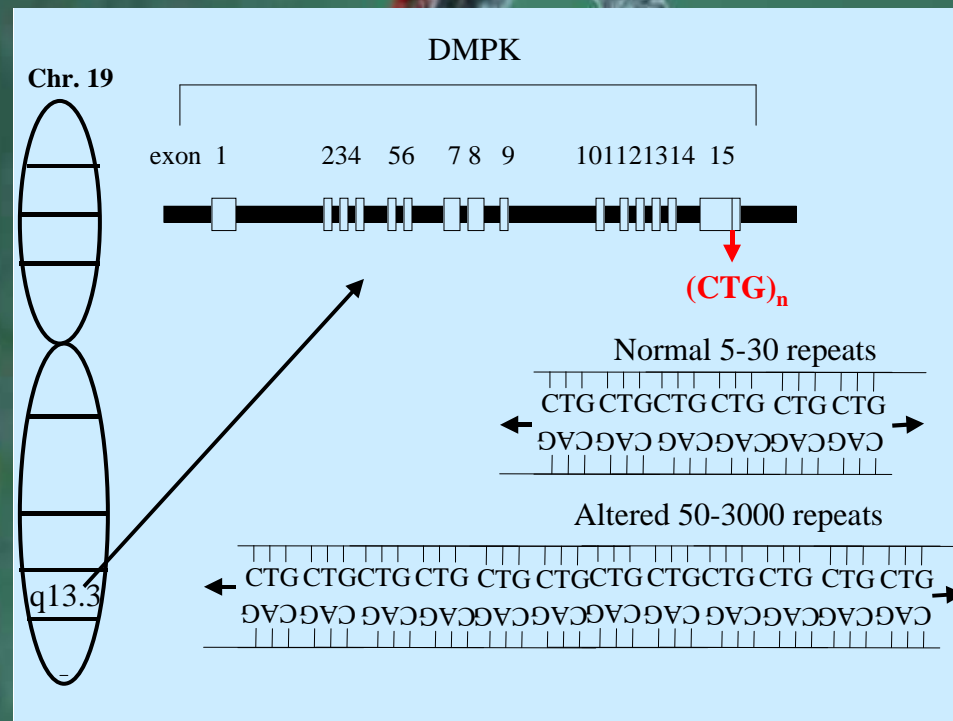
expandované trinukleotidové repetice (TREs)

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

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 → porucha exprese genů lokalizovaných v okolí genu DMPK*
- *vysycení DNA vazebných proteinů → narušení funkce genů v okolí genu DMPK*

Alely genu DMPK



Normální alela

5 - 35 CTG repetice

→ 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 vyjímečně 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 myotonie
katarakta



rozvíjí 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

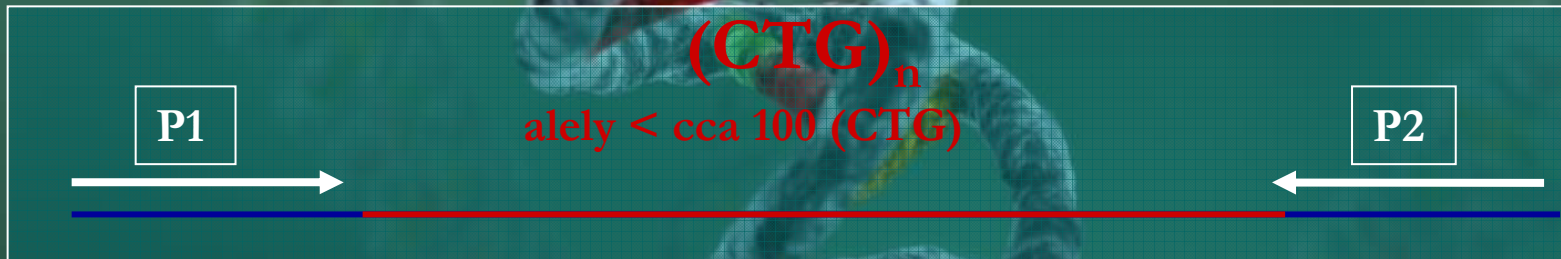
- amniocentéza (14.-19.tg)
- biopsie choriových klků (10.-12.tg)

- testování přítomnosti expandované alely DMPK

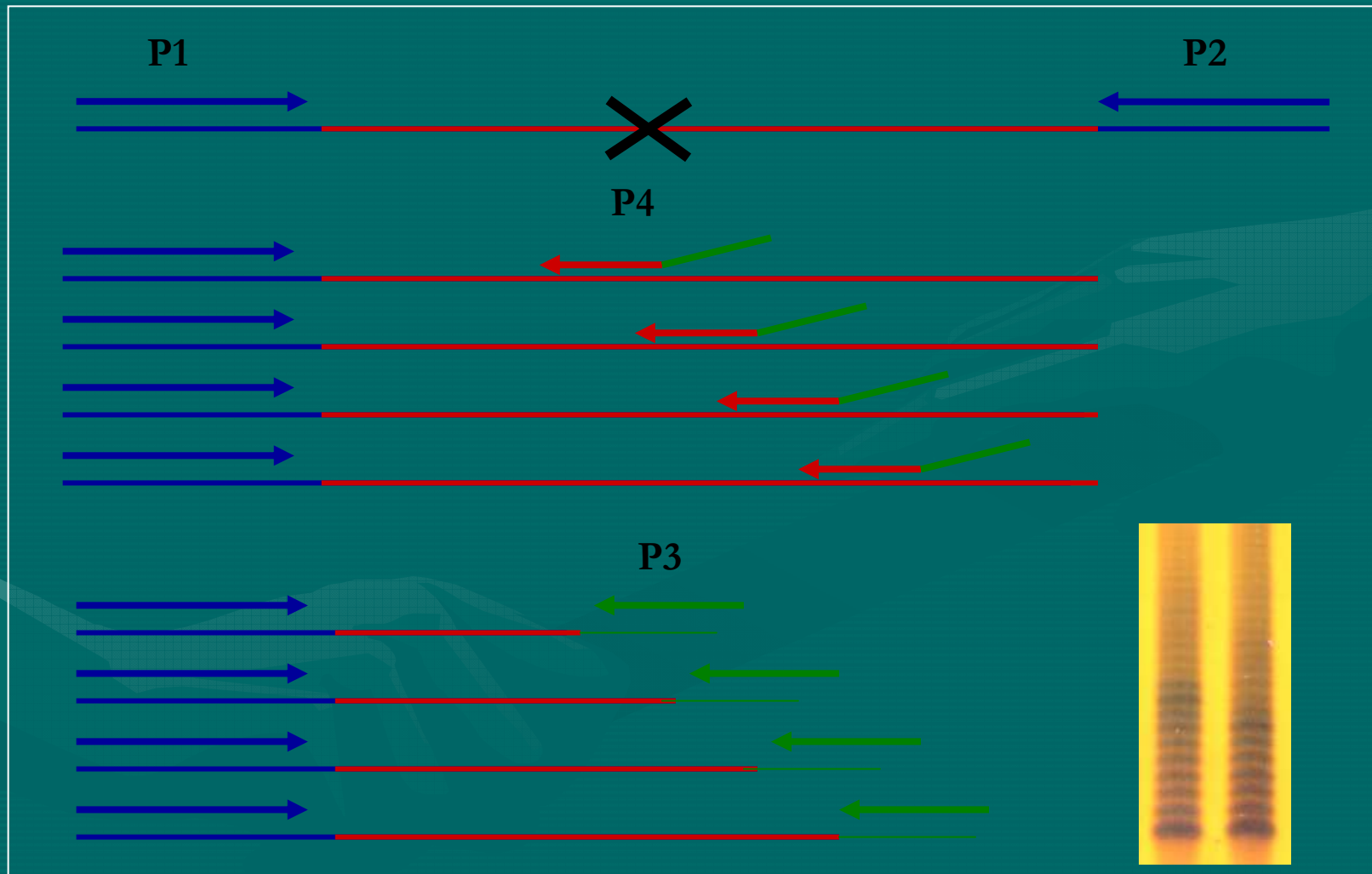
jednoduchý PCR systém zahrnující 2 PCR reakce



PCR P1/P2



Triplet Primed PCR



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

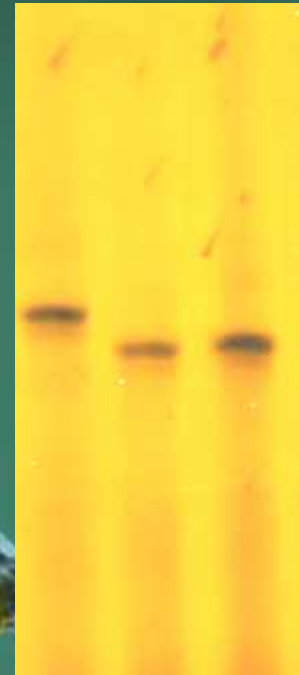
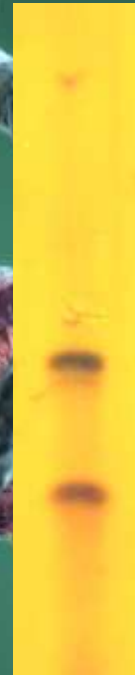
potvrzení diagnózy

TP PCR

PCR (P1/P2)



* *



Stanovení dg. MD1 při prenatálním vyšetření

asymptomatický

[13]+[expanze]

[5]+[13]

symptomy MD

[13]+ [expanze]

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

[5-13]+[13-21] - genotyp (CTG)_n
velikost repetic 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 repetit
velmi pravděpodobná asociace s CMD
- ultrazvukové vyšetření ve 2. a 3. trimestru může odhalit CMD:
 - zmenšený fetální pohyb
 - polyhydroamnion

RNA v diagnostice

- **přímá RNA diagnostika** - skrínování celé kódující oblasti příslušného genu
- **gene - expresní analýza:**
 - **diferenční diagnostika některých typů nádorů (NB)**
 - **detekce cirkulujících nádorových buněk v krvi, kostní dřeni pacienta**
 - **monitorování průběhu léčby a detekce reziduální choroby**
 - **kontrola štěpu před autologní transplantací**
 - **differential display, PTT test, funkční testy....**

RNA

savčí buňka:

- 10 - 30 pg celkové RNA
 - rRNA (28S, 18S, 5S) 80-85%
 - tRNA, snRNA 15-20%
 - mRNA 1-5%

360 000 mRNA molekul/buňku ,
tj. 12 000 rozdílných transkriptů
typická délka 1 transkriptu cca 2kb

Nestabilita RNA

- přítomnost ribonukleáz (RNázy) v buňce
- RNázy
 - velmi stabilní
 - nevyžadují kofaktory
 - účinné v nízkých koncentracích
 - obtížná inaktivace
 - kontaminace RNázami : lidská pokožka
prachové částice (bakterie, plísně)
- izolace a analýza RNA : speciální přístup i techniky

Stabilizace RNA a uložení

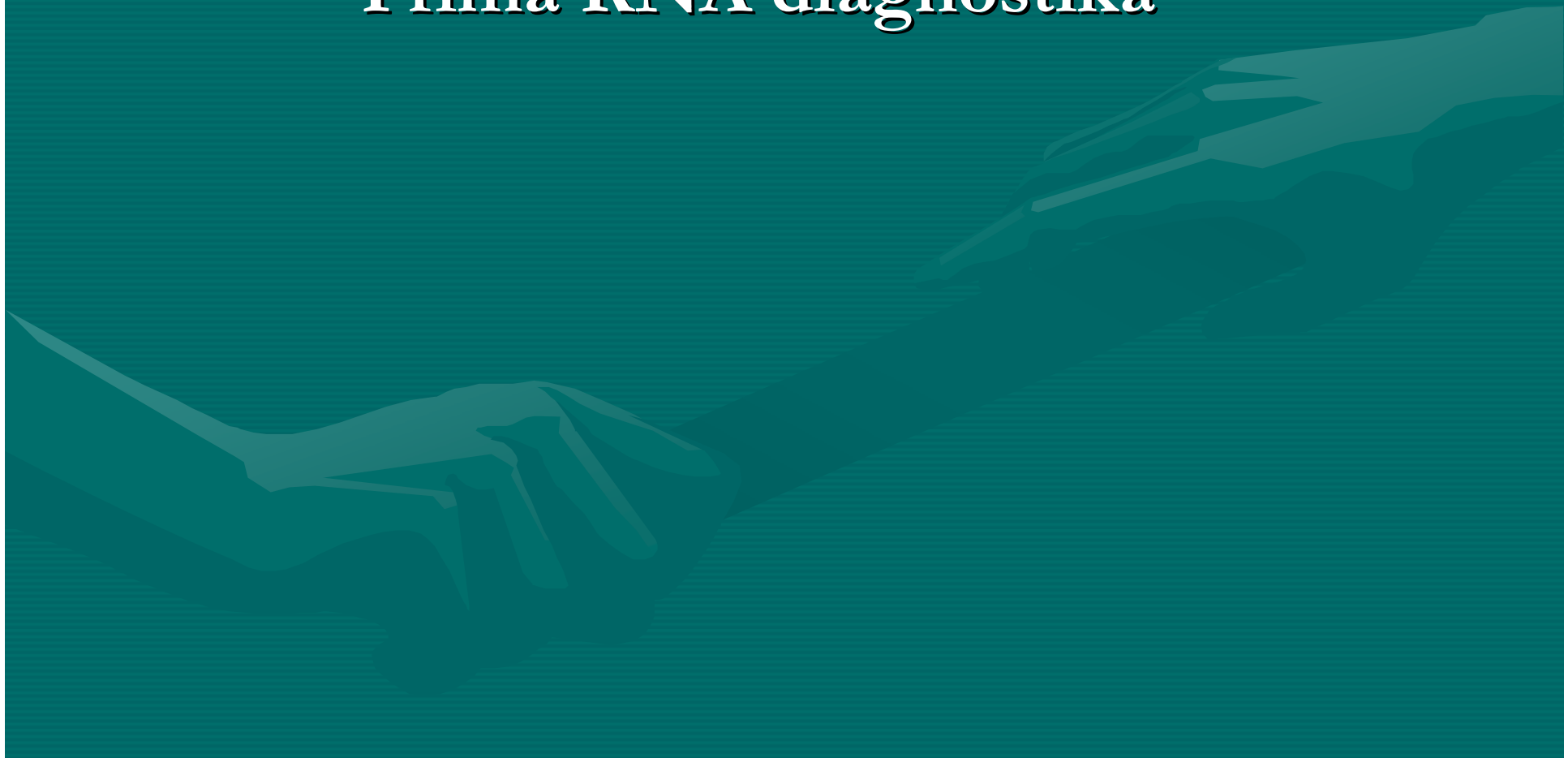
gene-expressní analýza: analyzovaná RNA musí reprezentovat *in vivo* expresi vzorku

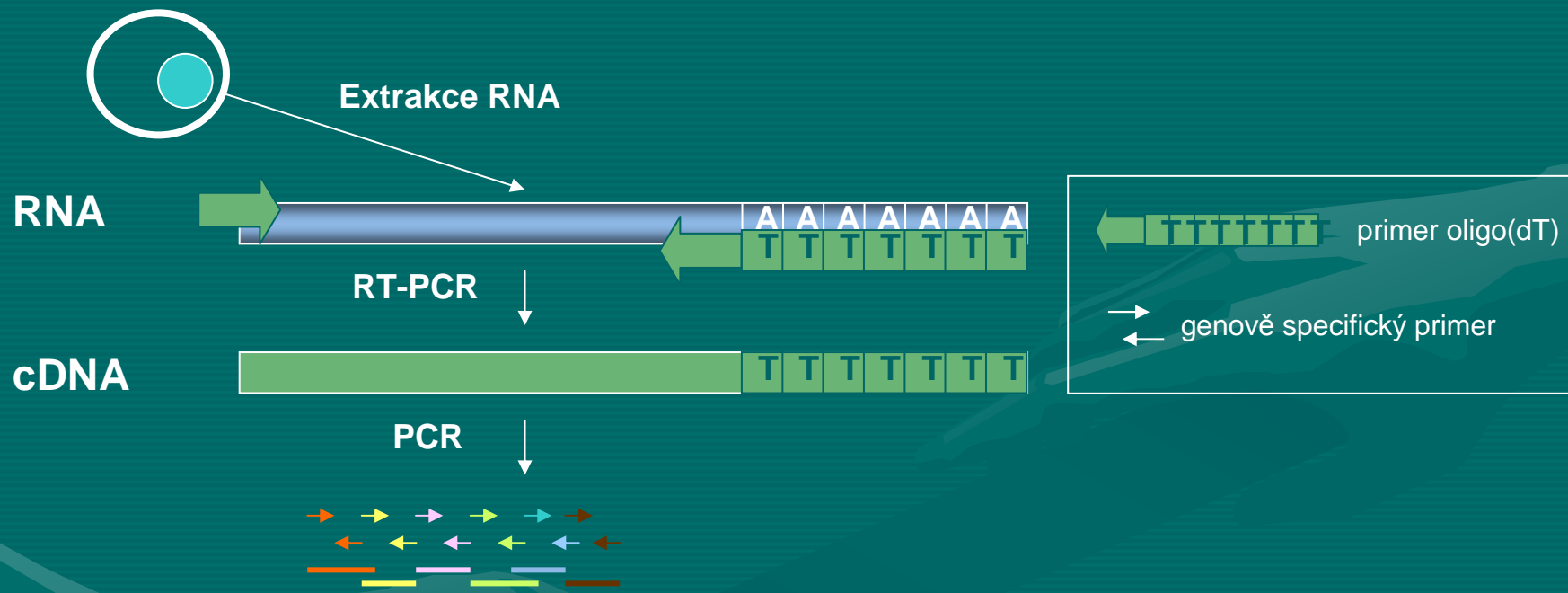
- komplikace během odběru a zpracování biologického vzorku:
 - v okamžiku odběru RNA se stává **extrémě nestabilní**
 - dva hlavní typy artefaktů:
 - 1) **redukce** specifických i nespecifických druhů mRNA (downregulace genů a enzymatická degradace RNA)
 - 2) **indukce** exprese určitých genů
- **stabilizace RNA** ve vzorku při odběru :
 - okamžité zmrazení v tekutém dusíku a uložit při -80°C
 - stabilizační roztoky: RNAlater (tkáně), RNAProtect (bakterie), PAXgene (krev, kostní dřeň)
- **kontaminace DNA**
 - PCR primery překrývající hranici intron/exon
 - štěpení DNázami
 - cílená izolace mRNA
- **izolovaná RNA** může být uložena při -20 nebo -70°C (bez degradace RNA po 1 roce uložení)

RNA v diagnostice

- **přímá RNA diagnostika** - skrínování celé kódující oblasti příslušného genu
- gene - expresní analýza:
 - diferenciační diagnostika některých typů nádorů (NB)
 - detekce cirkulujících nádorových buněk v krvi, kostní dřeni pacienta
 - monitorování průběhu léčby a detekce reziduální choroby
 - kontrola štěpu před autologní transplantací
 - differential display, PTT test, funkční testy....

Přímá RNA diagnostika





RNA diagnostika NF1 genu

Struktura NF1 genu

- 350 kb

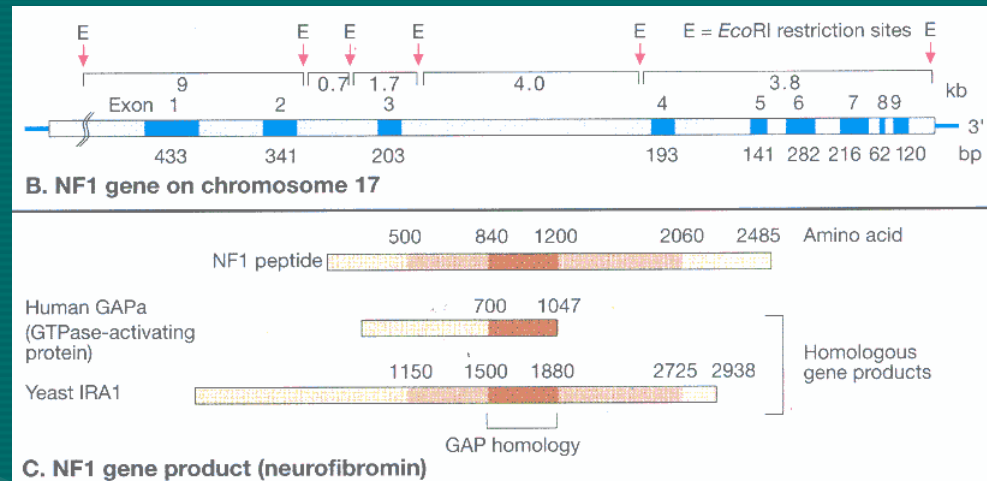
- 60 exonů

- 11 - 13 kb mRNA

- protein neurofibromin

- 2818 aminokyselin

- zřejmě tumor supresor



Neurofibromatoza typu 1

von Recklinhausen disease

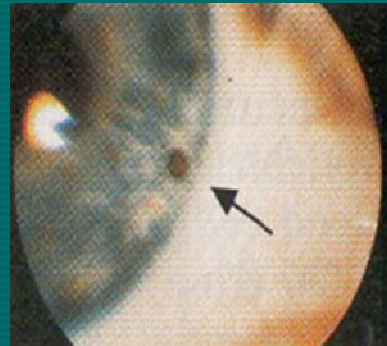
Autosomálně dominantní

Frekvence 1:3000

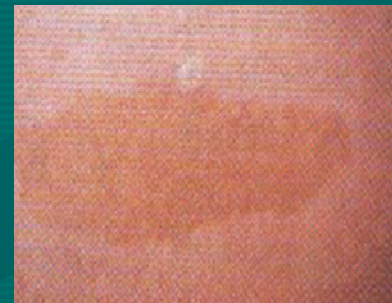
Lokus 17q

50% mutací de novo

Predispozice k tumorům
nervového systému



Lisch nodule



Café-au- lait spots



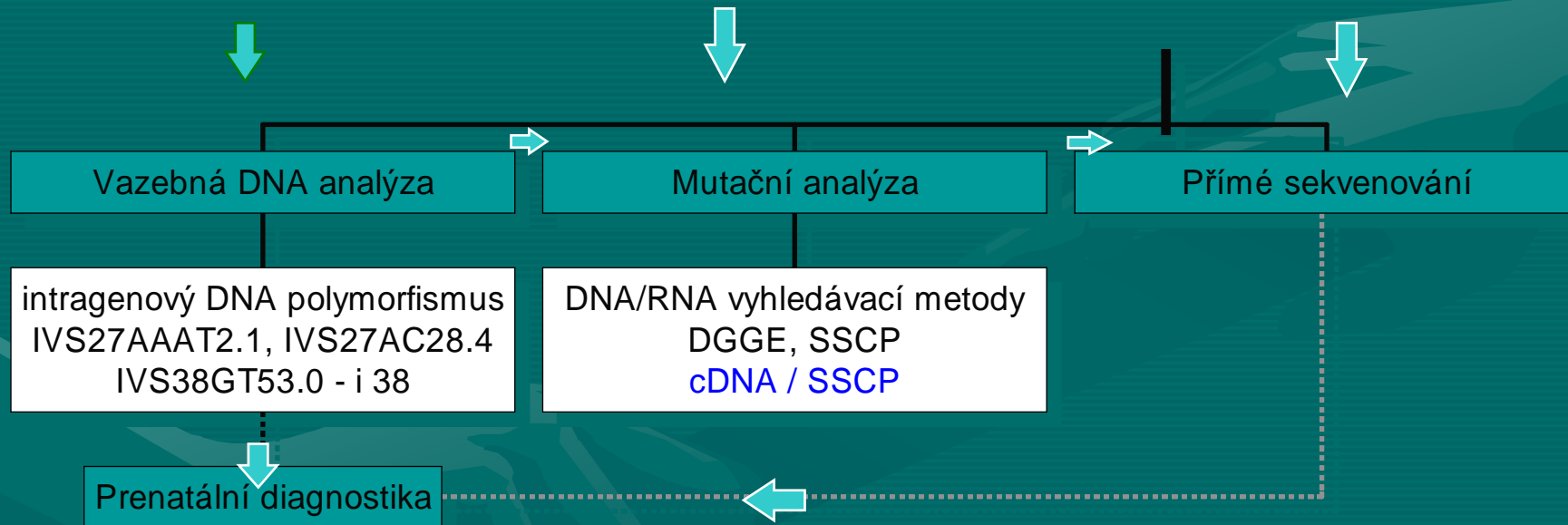
Neurofibromy

Komplikace při molekulární diagnostice NF1

- problematická klinická diagnostika
- až **50 % případů** *de novo*
- vysoká mutační rychlost
- **velikost genu** (350 kb, 60 exonů)
- **absence hot spot oblastí** - nutnost vyhledávání v celém genu
- nejasná korelace mezi typem mutace a formou postižení
- neurofibromin - známa funkce pouze jeho centrální domény
- různé klinické projevy i u pacientů nesoucích stejnou mutaci

Strategie molekulárně-genetického testování NF1 pacientů

DNA / RNA NF1 pacienta



cDNA - SSCP analýza

celková RNA



cDNA

RT ↓



PCR ↓

NF1 cDNA (60

exonů)



P1

P3

P5

P7

P9

P2

P4

P6

P8

P10

SSCP ↓ (~ 1000 - 1200bp)

Sekvenační analýza

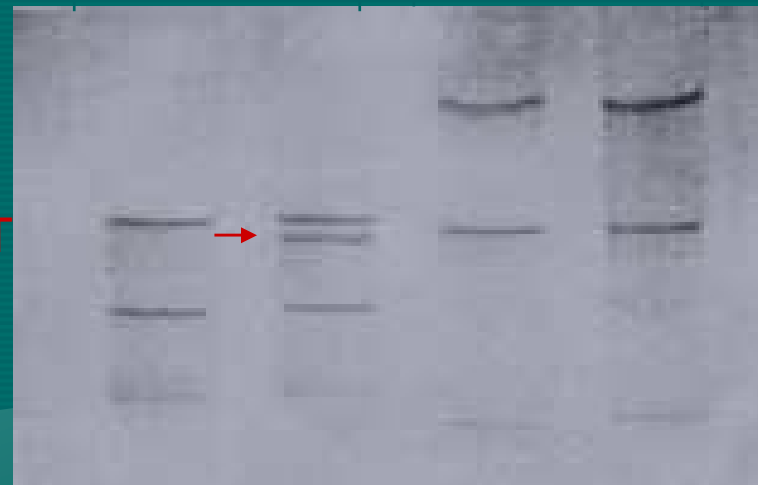
cDNA SSCP

semi-nested PCR cDNA (**segment P7**)

P7 A (560bp)

P7 B (614 bp)

mt C5242T



wt

C62

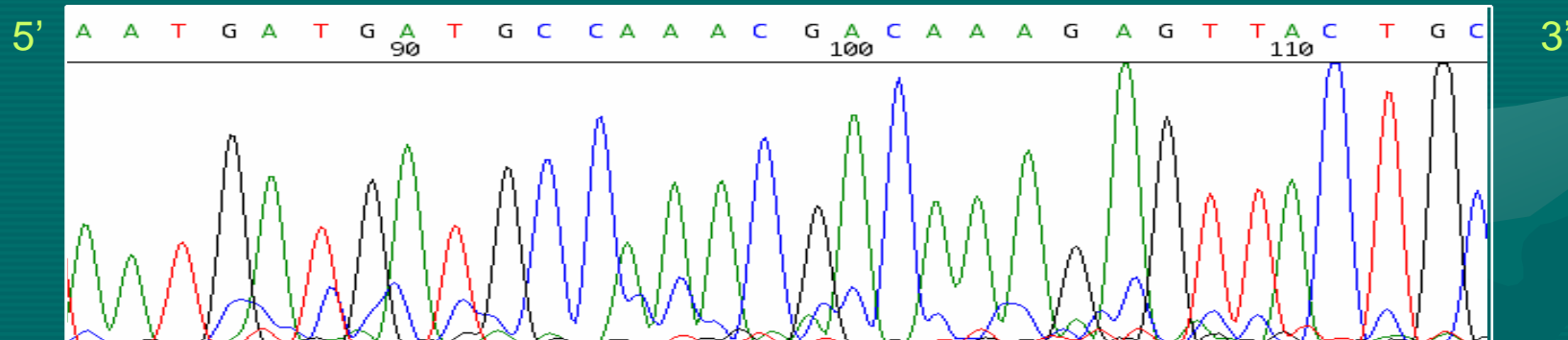
wt

C62

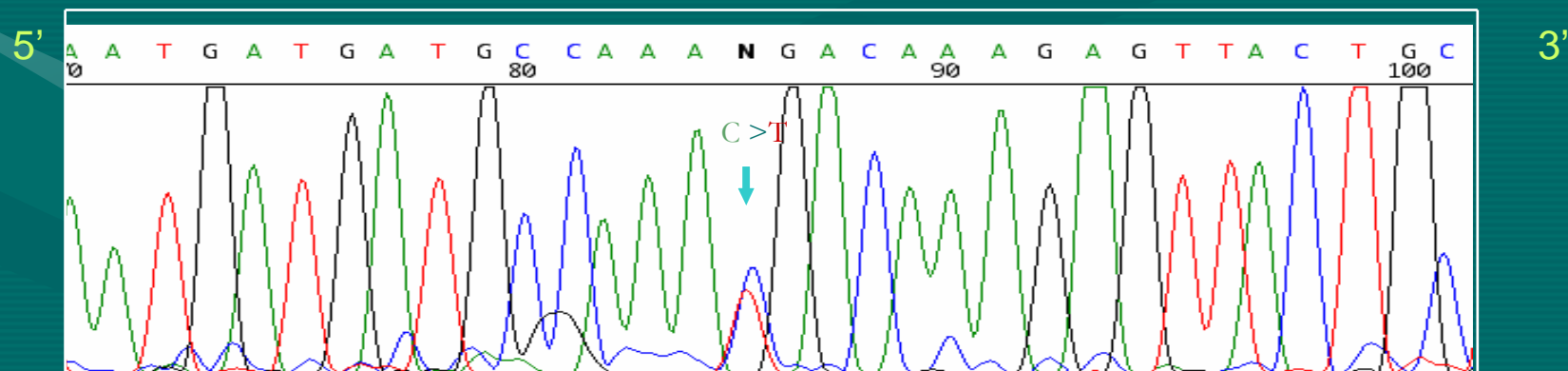
podmínky elektroforetické separace : 12% PAGE (60:1) / 150V / 16 hod. / r.t.

Sekvenace cDNA segmentu P7 NF1 genu (exony 28-32/33)

standardní cDNA



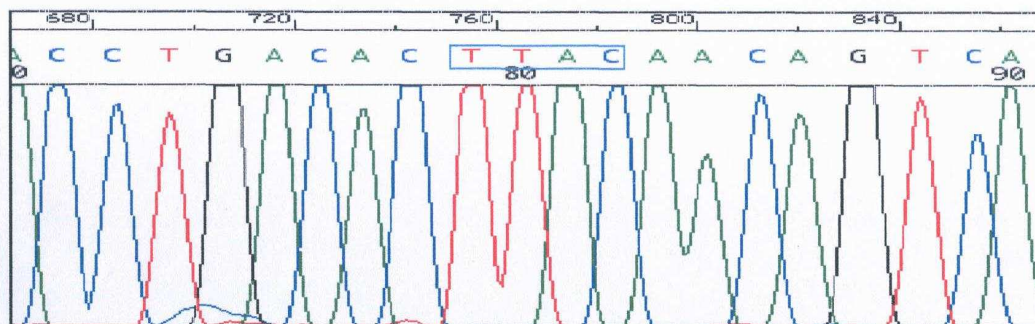
cDNA NF1 pacienta, mt



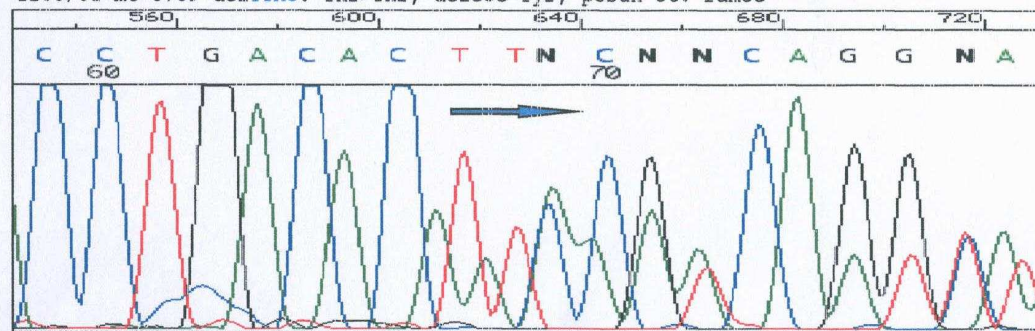
Sekvenace vzorku DNA s odlišnou elektroforetickou mobilitou

GEN NF1 - exon 37

standard DNA



1200/01 mt 6789 delTTAC: Thr>Thr, delece Tyr, posun ct. ramce



Výhody a nevýhody RNA diagnostiky genů

- jednodušší a rychlejší skríníng multiexonického genu (10 segmentů cDNA místo 60 exonů), mRNA je bez intronů
- záchyt sestřihových mutací v intronech
- záchyt delece celého exonu na jedné alele genu
- nižší ekonomické náklady
- složitější odběr krve pro izolaci RNA
- nižší stabilita RNA
- dlouhé úseky genu obtížnější elektroforetická separace a sekvenace
- nejasný efekt mutace na fenotypové úrovni (stejně u DNA diagnostiky!)

Molekulární analýza Rb1 genu u dětí s retinoblastomem

Retinoblastom

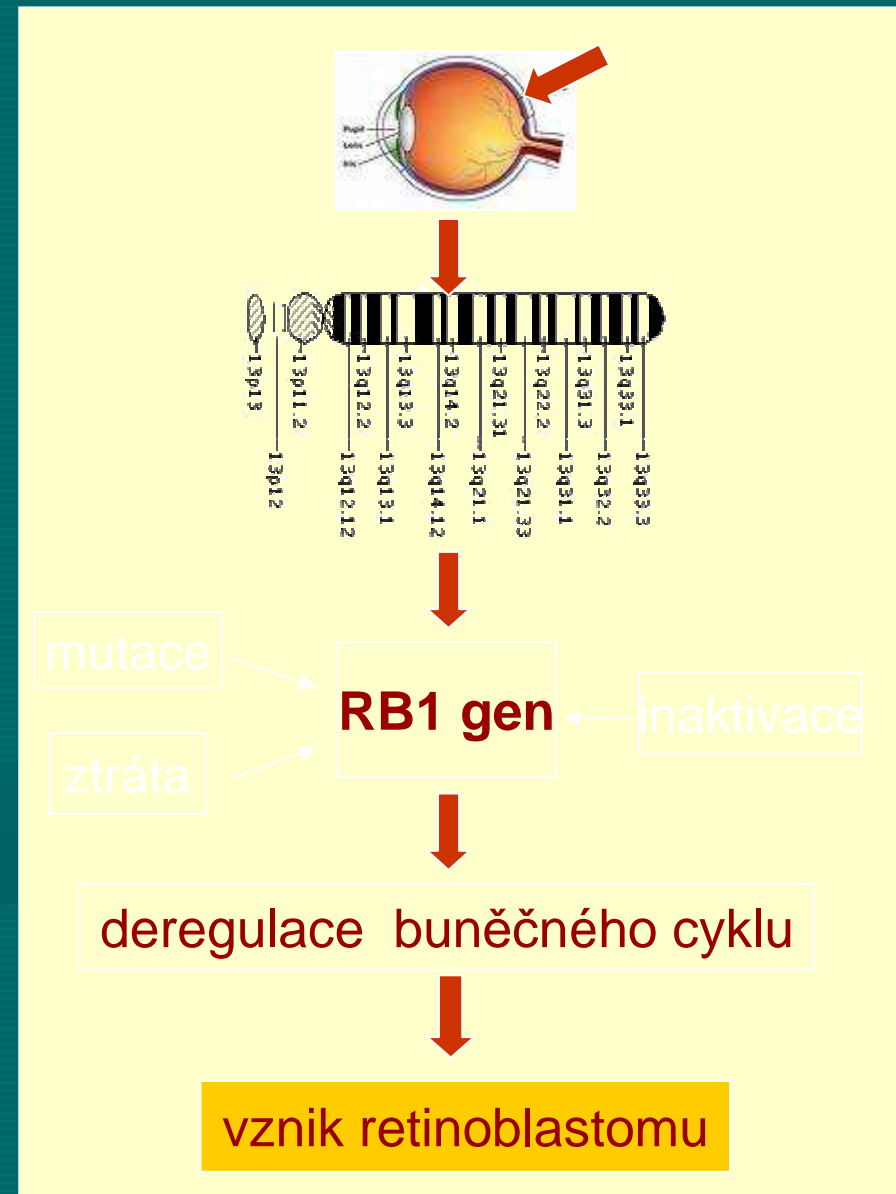
- zhoubný nádor oka, pocházející z primitivních buněk sítnice
- incidence 1/5 000 až 1/20 000 živě narozených dětí
- manifestace do 5-ti let věku
- projevy: ztráta zrakové ostrosti, strabismus, leukokorie, slepota, zvětšování oka, zarudnutí, otok



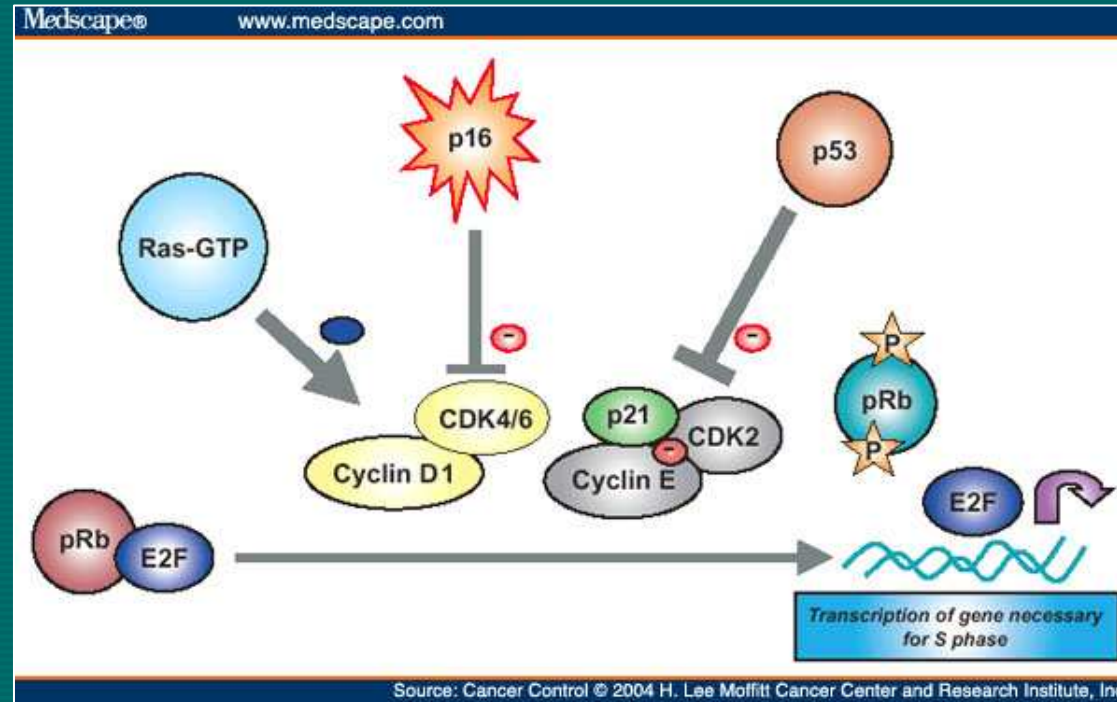
- postižení: oko, mozek, mícha (může se šířit do CNS přes opticus)
- léčba: chemoterapie, lokální terapie (kryoterapie, nitrooční podání cytostatik), enukleace oka (oko je už většinou slepé, jde o život zachraňující výkon)
- úspěšnost léčby při zahájení: nádor uvnitř oka – 95%
mimo oblast oka – 10%

Gen RB1

- jediný známý gen asociovaný se vznikem retinoblastomu (RBL)
- lokalizace - 13q14.1-14.2
- 27 exonů,
>180kb genomické DNA
- kóduje retinoblastomový tumor-supresorový protein, (pRb, 928 aa), významný negativní regulátor buněčného cyklu
- tumor-supresorová aktivita



Funkce retinoblastomového proteinu (pRb)



• „brzda“ buněčného cyklu – kontrolní bod přestupu z G1 do S fáze:

- pRb v aktivní formě váže transkripční faktor E2F
- CyklinD- a CyklinE-dependentní kinázy fosforylují - a tím inaktivují - pRb
- inaktivovaný pRb uvolňuje E2F transkripční faktory, které stimulují expresi cyklinů a dalších genů potřebných pro syntézu DNA a vstup do S fáze

Formy retinoblastomu

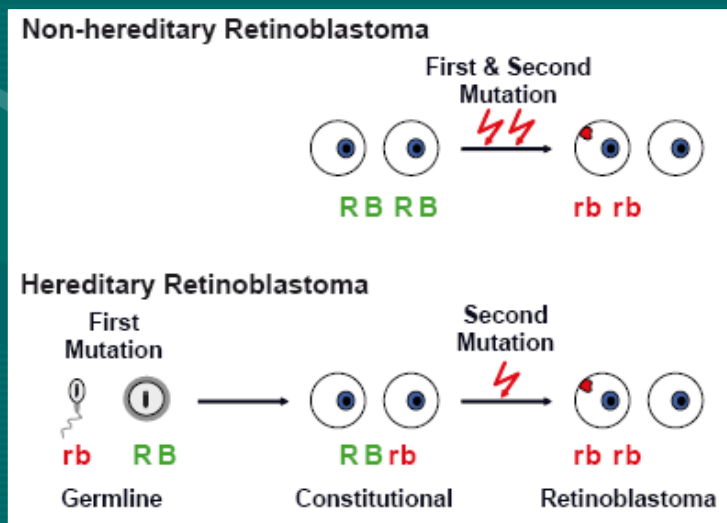
- vznik RBL vysvětluje Knudsonova teorie dvou zásahů:



Alfred G.
Knudson

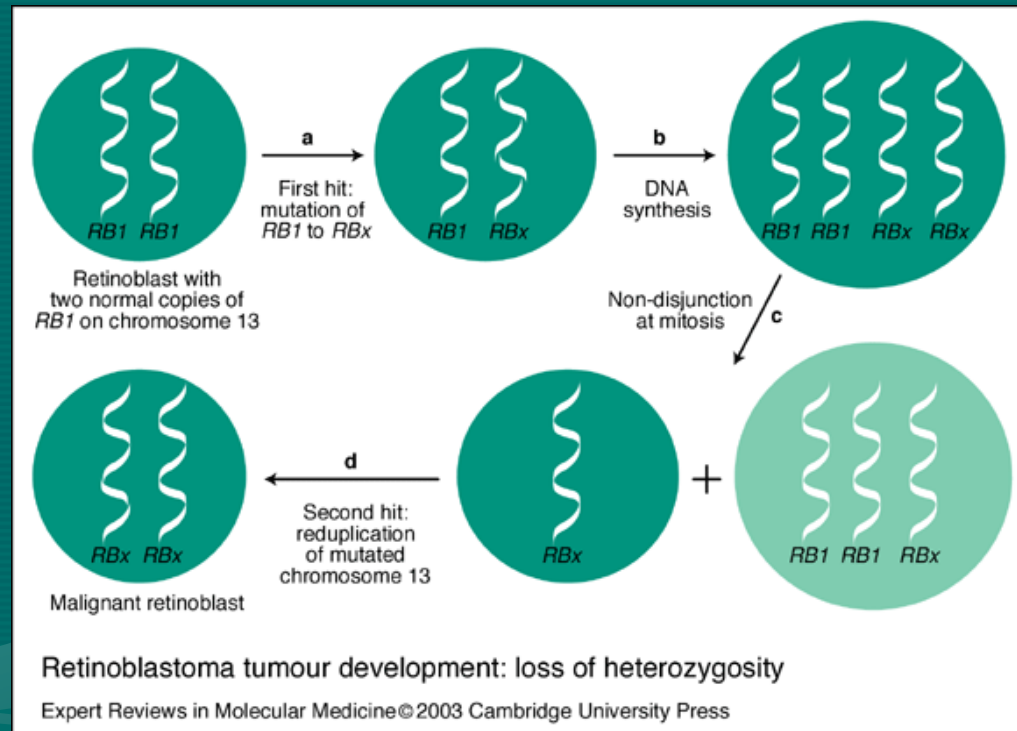
Knudson's
hypothesis

- sporadický retinoblastom
 - 60% pacientů
 - dvě somatické mutace
 - pozdější rozvoj RBL (24.měsíc věku)
 - unilaterální forma retinoblastomu
- hereditární retinoblastom
 - 40% pacientů
 - první mutace germinální
 - „druhý zásah“ - mutace somatická
 - časnější rozvoj RBL (8.měsíc)
 - bilaterální/multifokální forma
 - vyšší riziko vzniku dalších nádorů (osteosarkom, sarkomy měkkých tkání,...)



Ztráta vrozené heterozygotnosti

- „druhým zásahem“ vedoucím ke vzniku retinoblastomu bývá často ztráta vrozené heterozygotnosti (LOH – loss of heterozygosity)



- mechanismy LOH:

- delece

- nondisjunkce a reduplikace

- mitotická rekombinace

- uniparentální disomie

Molekulárně genetická analýza genu RB1

- v genu RB1 bylo popsáno více než 500 mutací
- rozmístěny po celé kódující oblasti genu a zahrnují všechny typy změn
- dále byla u retinoblastomu popsána hypermetylace cytosinu v CpG dinukleotidech promotoru



- **různé formy inaktivace Rb1 genu vedou k rozdílné penetranci a expresivitě genu, a tudíž rozdílným klinickým projevům onemocnění**
- rozlišení hereditární a nehereditární formy onemocnění

Hlavní typy mutací zapříčiňující vznik RBL

Typ mutace	výskyt	metoda detekce
cytogenetické aberace (delece a přestavby 13q14)	8% bilaterálních RBL 1-5% sporadických RBL (+ mozaiky)	FISH testy heterozygosity
velké delece a přestavby	10% familiárních RBL	MLPA kvantitativní multiplex PCR
jednonukleotidové substituce	40-50% RBL	sekvenční analýza
small length mutations	25-30% RBL	sekvenční analýza
hypermetylace promotorové oblasti RB1	10% RBL	metylační analýza

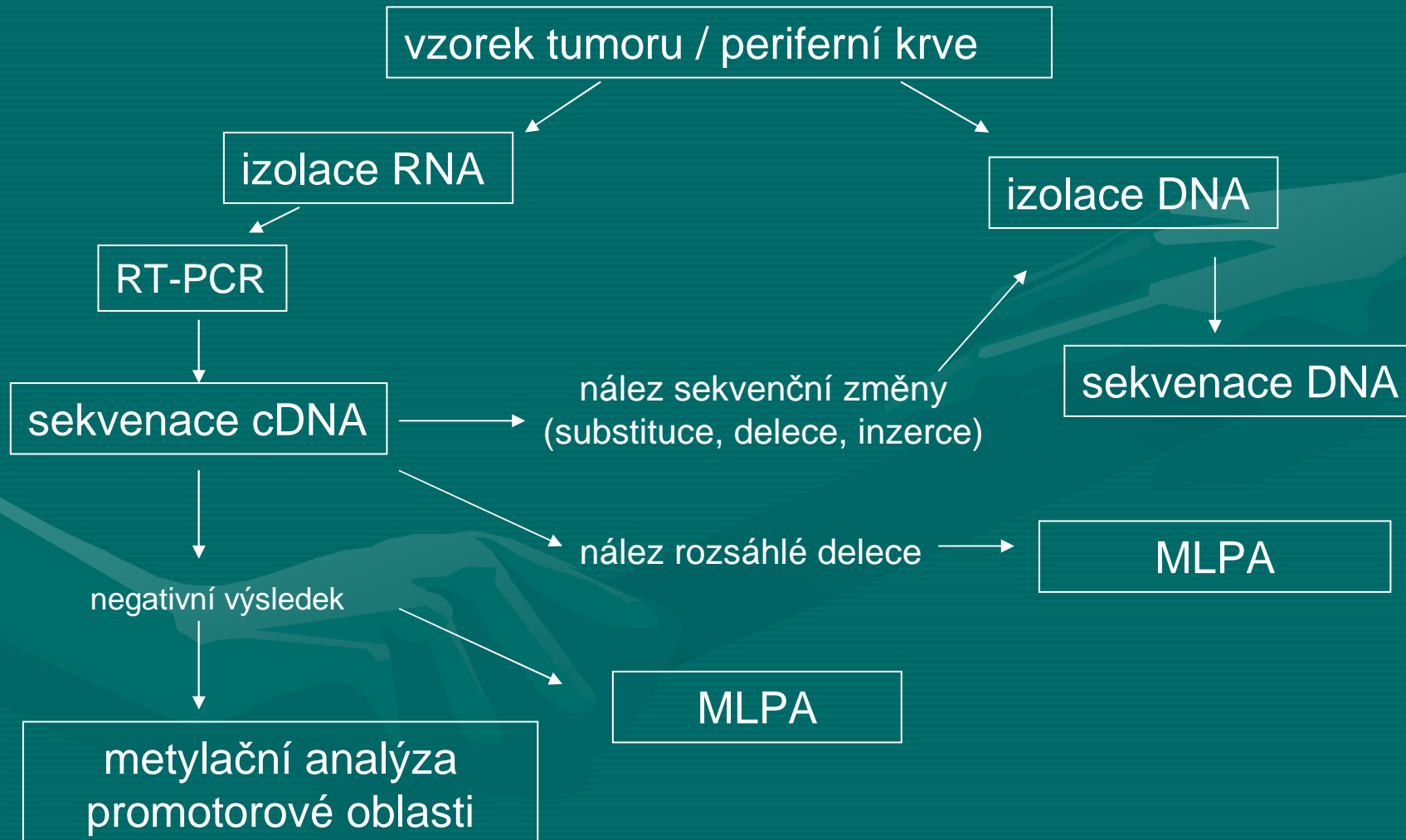
Materiál

- periferní krev, tkáň RBL
- DNA, RNA
- pacienti s RBL a rodinní příslušníci

Metody

- sekvenace cDNA
- sekvenace DNA
- MLPA
- metylační analýza promotoru

Strategie molekulární analýzy genu RB1



Sekvenace cDNA a DNA

Sekvenace cDNA



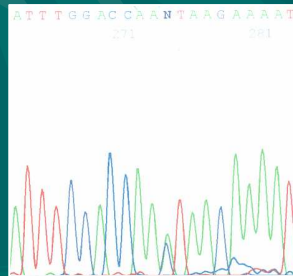
izolace RNA
z tkáně / lymfocytů periferní krve

↓
RT-PCR
(reverzní transkripce do cDNA)

↓
PCR amplifikace 6-ti
překrývajících se úseků

↓
sekvenační PCR

↓
sekvenační analýza
(ABI 310, ABI 3130)



Sekvenace DNA

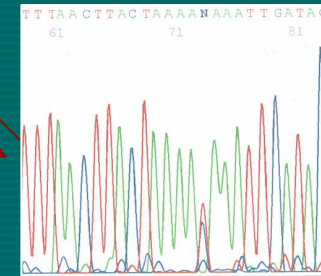


izolace DNA
z tkáně / lymfocytů periferní krve

↓
PCR amplifikace příslušných
exonů (1-27) a přilehlých
intronových oblastí

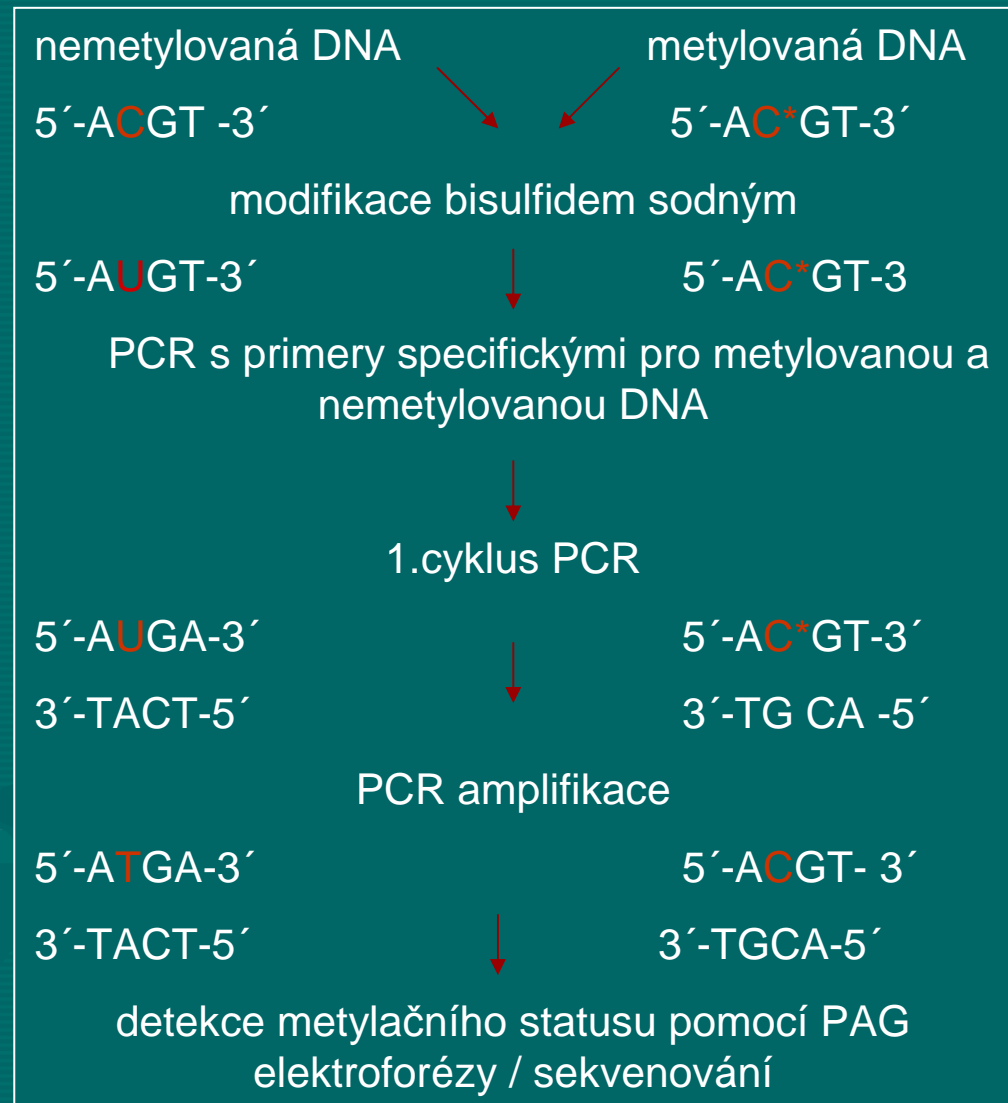
↓
sekvenační PCR

↓
sekvenační analýza
(ABI 310, ABI 3130)

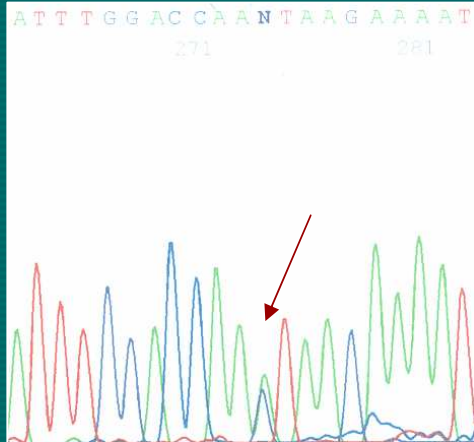


Metylační analýza promotoru

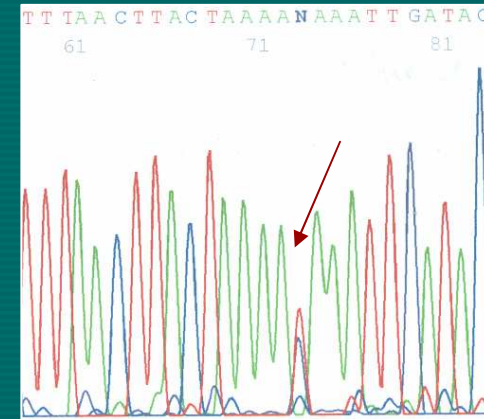
- hypermetylace CpG ostrůvků promotorové oblasti vede k represi transkripce - umlčování genu
- u TSG (RB1, BRCA1, p15, p16..) představuje hypermetylace promotorů jeden z mechanismů onkogeneze
- hypermetylace promotorové oblasti popsána u sporadických i hereditárních retinoblastomů



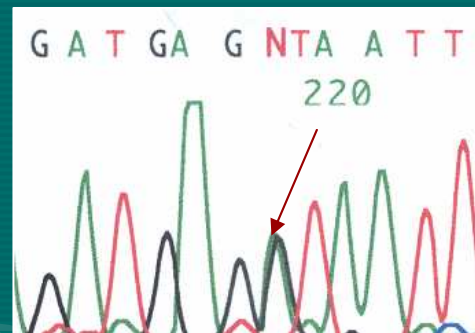
Detekované mutace



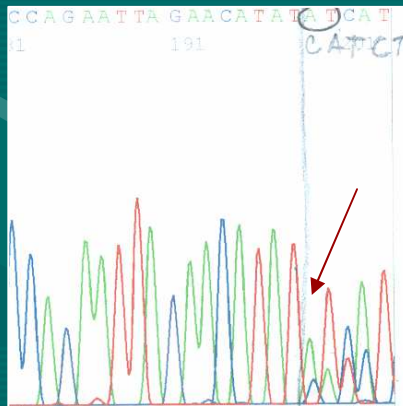
g.45798G>A/non



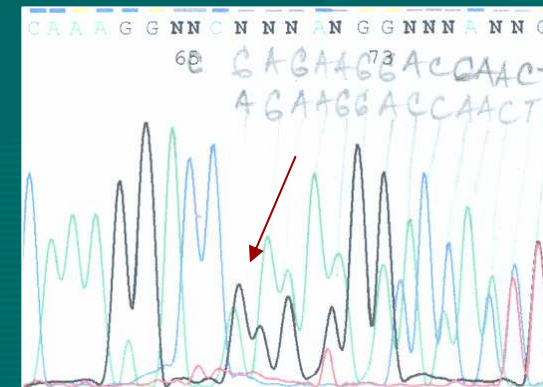
g.41954G>T (E137X)/non



g.59749G>A/non



g.156768-156769insAT/non



g.150038delG/non

RNA v diagnostice

- přímá RNA diagnostika - skrínování celé kódující oblasti příslušného genu
- **gene - expresní analýza:**
 - diferenciační diagnostika některých typů nádorů (NB)
 - detekce cirkulujících nádorových buněk v krvi, kostní dřeni pacienta
 - monitorování průběhu léčby a detekce reziduální choroby
 - kontrola štěpu před autologní transplantací
 - differential display, PTT test, funkční testy....

Expresní analýza

The background is a solid teal color. In the lower half, there is a faint, semi-transparent illustration of two hands shaking, symbolizing agreement or partnership. The hands are rendered in a lighter shade of teal, creating a subtle watermark effect.

Metoda Real-time PCR

- Spolehlivá
 - Přesná
 - Rychlá
 - Univerzální
-
- Variabilita použitých sond
 - Možnost detekce více mutací během jedné analýzy

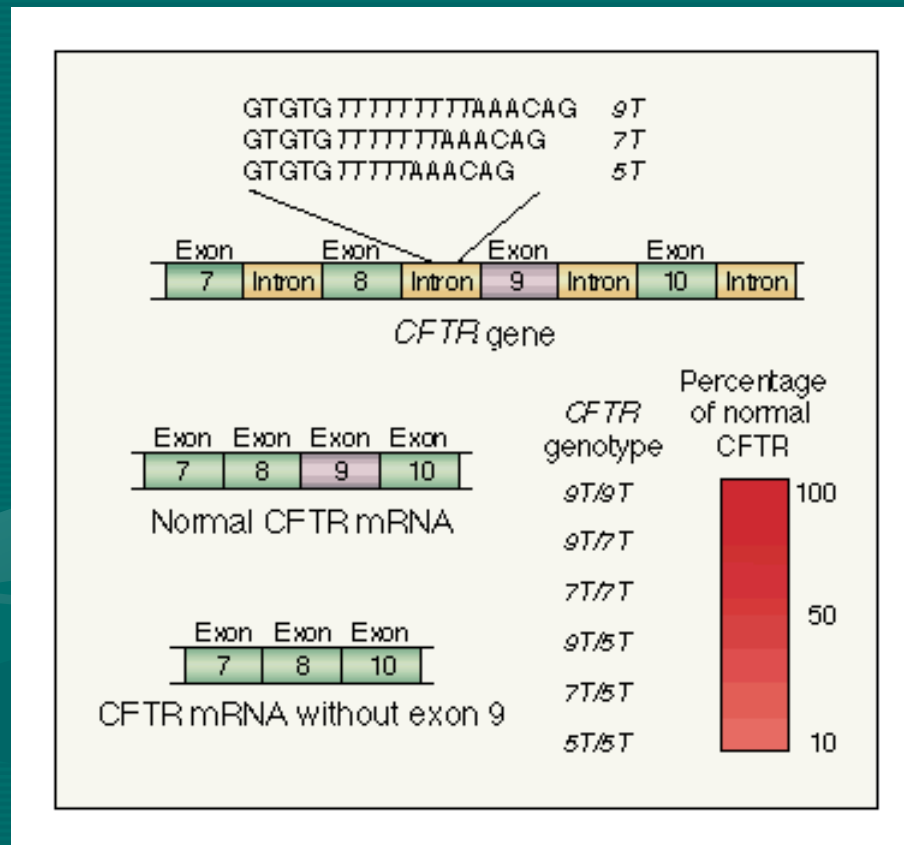
Real-time PCR

- KVALITATIVNÍ ANALÝZA
detekce snp
- KVANTITATIVNÍ ANALÝZA
detekce množství amplikonu

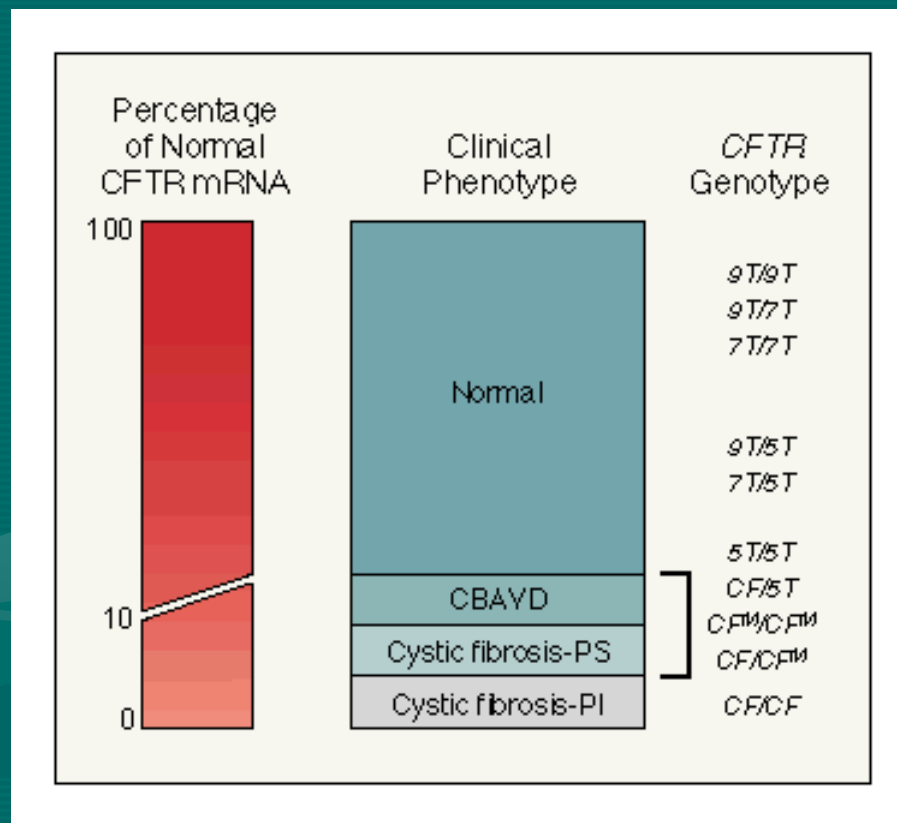
Metody detekce

- Pro detekci produktu v průběhu PCR existují následující metody:
 - Na DNA se vázající interkalační barviva
 - SYBR green I
 - Na menší žlábek dsDNA se vázající barviva
 - BEBO
 - Technologie využívající fluorescenční výměny
 - dvakrát fluorescenčně značené sondy vázající se na střední část amplifikovaného produktu
 - TaqMan
 - Molekulární majáky
 - QZyme
 - jedenkrát fluorescenčně značené sondy nebo primery
 - **FRET**
 - LUX
 - PNA
 - dvakrát fluorescenčně značené primery
 - AmpliFluor
 - Scorpions

Polytymidinové varianty v intronu 8 genu CFTR

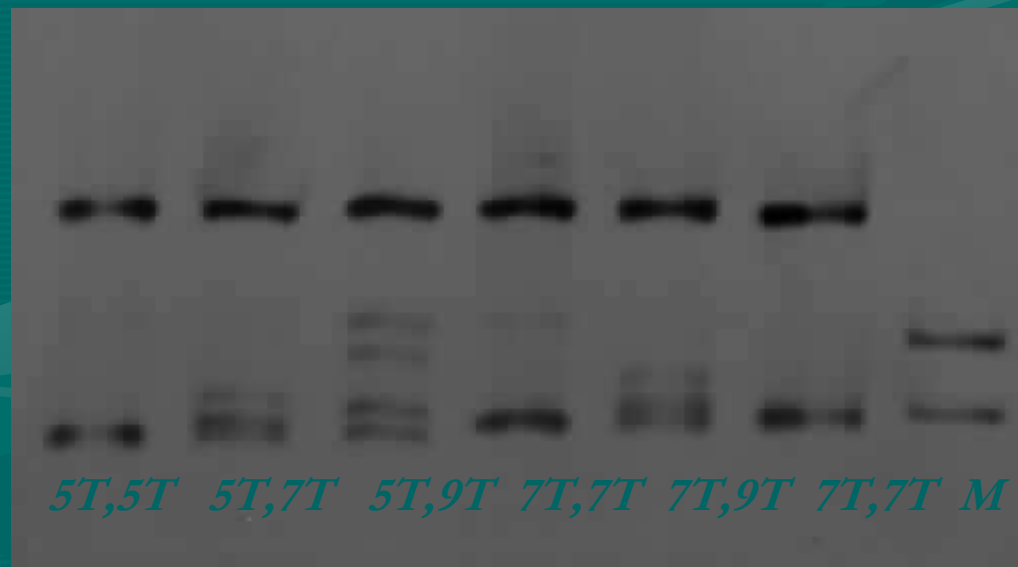


Porovnání podílu normální *CFTR* mRNA, klinických fenotypů a *CFTR* genotypů.



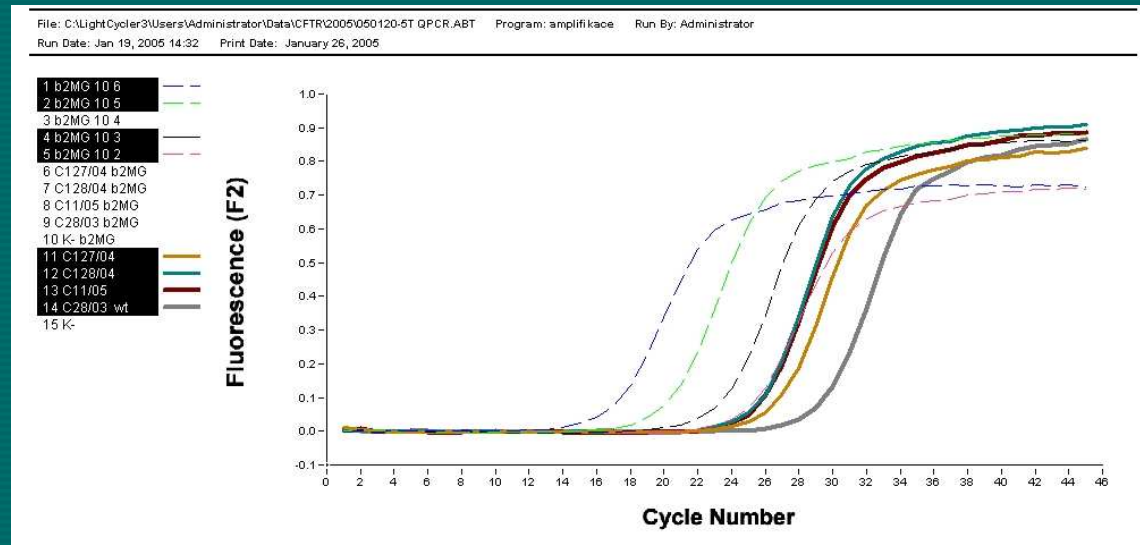
PCR analýza alel polyT sekvencí v intronu 8 *CFTR* genu

- nested PCR
- restrikční štěpení
- ELFO



Kvantifikace cDNA PCR produktu CFTR exon 9 na LightCycler

Transcripty byly izolovány z leukocytů periferní krve.



Reakce monitorována pomocí SYBR Green I.

Koncentrace vybraných transkriptů exonu 3 je vyjádřena v relaci ke koncentraci referenčního (housekeeping) genu.

— 1. Case (patient C127/04)

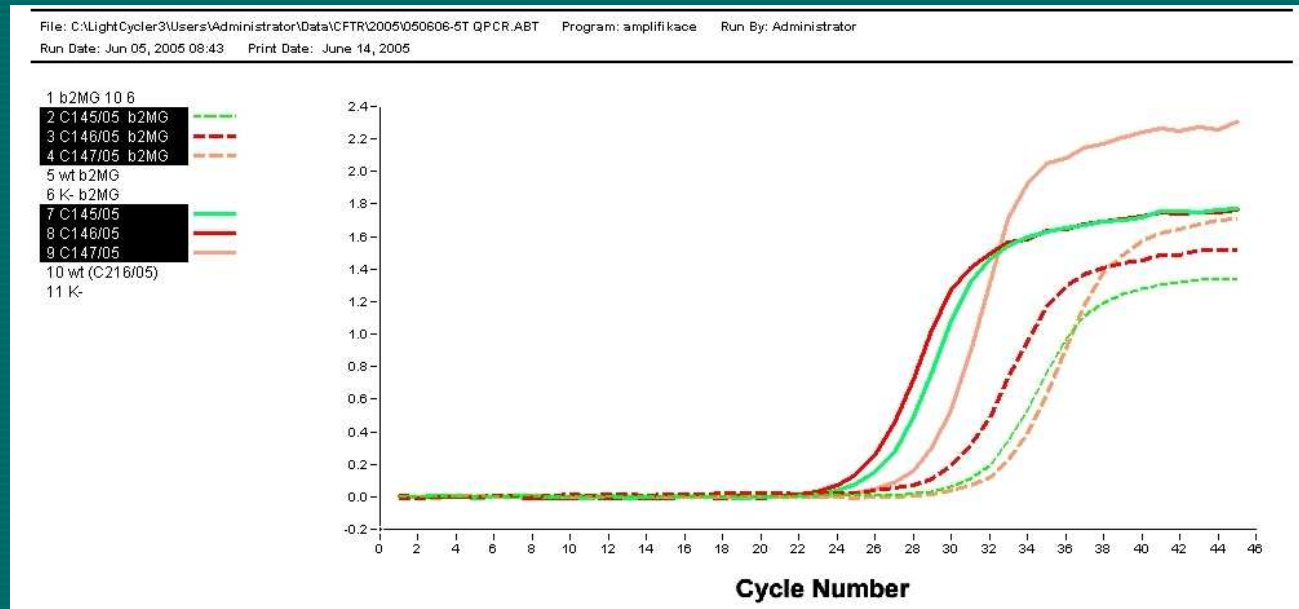
— 2. Case (patient C128/04)

— 3. Case (patient C 11/05)

— wt (C28/03)

Kvantifikace cDNA PCR produktu CFTR exon 9 na LightCycler

Transcripty byly izolovány z buněk bukové sliznice



Reakce monitorována pomocí SYBR Green I.

Koncentrace vybraných transkriptů exonu 3 je vyjádřena v relaci ke koncentraci referenčního (housekeeping) genu.

— 1. Case (patient C145/05)

— 2. Case (patient C146/05)

— 3. Case (patient C147/05)



Expresní analýza v onkologii

Nádorové buňky se od normálních zdravých buněk liší na molekulární úrovni svým expresním profilem



nádorová buňka exprimuje jiné geny ze své výbavy



projeví se změnou množství a spektra exprimované mRNA

využití metody real-time RT-PCR - studium genové exprese,

hledaným znakem epiteliálních nádorových buněk je mRNA.

Onkomarkery

Nádorové markery jsou látky produkované maligními buňkami, nebo organismem jako odpověď na nádorové bujení.

Od látek produkováných normálními buňkami se liší kvalitativně – normální buňky je neprodukují, či kvantitativně – produkované i normálními buňkami.

Jaký mají onkomarkery klinický význam

Klinický význam jednotlivých markerů je i u samotných odborníků, zabývajících se problematikou onkomarkerů značně diskutovaným problémem. I jejich stanoviska se postupem času měnila. Od původního přeceňování až k úplnému ztracení a novému uznání. Verifikace významu onkologických markerů a jejich využití v ambulantní praxi neustále probíhá.

Statistické pojmy pro klinické hodnocení

1. Cut off – referenční hladina

je definována jako hladina markeru, pod kterou leží většina hodnot zdravé populace, či pacientů s benigním onemocněním, nebo hladina pod kterou leží většina hodnot pacientů v kompletní remisi

2. Senzitivita markeru

Udává procento správně pozitivních výsledků z daného souboru

3. Specificita markeru

Udává procento správně negativních výsledků z daného souboru

4. PV+

pozitivní prediktivní hodnota – udává v procentech s jakou pravděpodobností bude mít pacient hledanou chorobu, bude-li test pozitivní

5. PV -

negativní prediktivní hodnota - udává v procentech s jakou pravděpodobností nebude mít pacient hledanou chorobu, bude-li test negativní

Kritéria ideálního onkomarkeru

- je produkován pouze u maligních onemocnění
- je orgánově specifický
- vyskytuje se ve vysokých koncentracích v biologických tekutinách
- hladina koreluje s velikostí nádoru
- hladina koreluje se stádiem onemocnění
- hladina koreluje s prognózou
- hladina koreluje s efektem léčby
- umožňuje průkaz zbytkové nádorové tkáně

Rozdělení onkomarkerů podle chemické struktury, nebo biologické funkce

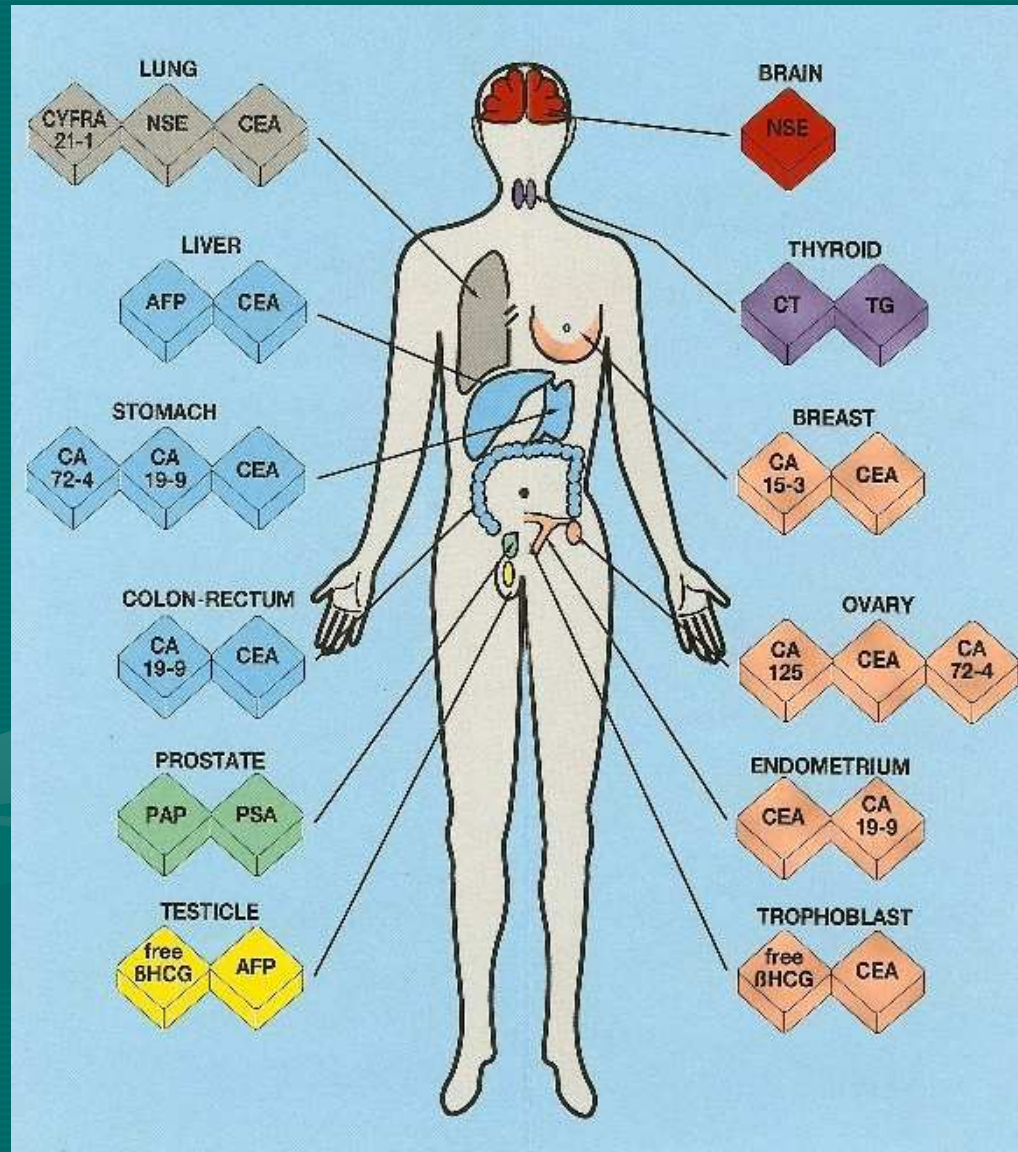
- onkofetální antigeny
- enzymy
- hormony
- intracelulární onkomarkery
- ostatní blíže nespecifikovatelné látky

Indikace a interpretace laboratorního vyšetření

Indikace a interpretace laboratorního vyšetření má svá pravidla a též určitá úskalí. Pro jejich využití v diagnostickém postupu je třeba mít na paměti následující pravidla.

- volba vyšetření
- preanalytická fáze
- analytická fáze
- fáze klinického zhodnocení (vyloučení falešné positivity)

Onkomarkery: indikace podle orgánů



Zvýšení některých onkomarkerů za fyziologických, nebo nemaligních podmínek

<u>Podmínka</u>	<u>Fyziologicky zvýšené onkomarkery</u>
gravidita	AFP, hCG, Ca125, TPS, TG
menstruační cyklus	Ca125
kouření	CEA, TPS, TG
ethylismus	CEA, TPS
katetrizace moč. měch.	PAP, PSA

<u>Podmínka</u>	<u>zvýšení onkomarkerů u jiných chorob</u>
Chron. onemocnění jater	CEA, TPS, Ca 15-3, Ca 19-9, Ca 125
Endometrióza	Ca 125
Pankreatitida	Ca 19-9, Ca 125
Hypertrofie prostaty	PAP, PSA
cukrovka	Ca 19-9

Co z toho plyne

Nádorové onkomarkery by se měly stanovovat jednou metodou v jediné laboratoři. Hodnoty onkomarkerů mohou být ovlivněny celou řadou procesů.

Pro kvalitní zhodnocení je nutná úzká spolupráce laboratoře a klinického pracoviště.

ALE...

... diagnostický práh onkomarkerů umožňuje v příznivých případech odhalit nádor o hmotnosti 1 mg, tedy asi 10^6 maligních buněk, zatímco klinická diagnóza bývá určena většinou až u nádoru, který obsahuje nejméně 10^9 buněk, tedy nádor v průměru 1 cm.

Aplikace a využití v onkologické praxi

Screening
Primární diagnostika
Staging
Sledování účinnosti terapie

Sledování průběhu choroby
Prognóza
Predikce

Analýza exprese molekulárních onkomarkerů

Biologický materiál (tkáň tumoru, kostní dřeň, periferní krev)



Izolace RNA



RT-PCR (cDNA)



Relativní kvantifikace exprese k housekeeping genu (LightCycler)

- Pozitivní exprese markeru (např. TH, TrKC, c-myc...) může *upřesnit diagnózu* nebo poukáže na *remisi/ progresi* či na *odpovídavost na léčbu*.
- Odběry chodí opakovaně → umožní sledovat minimální reziduální nemoc v čase.

Detekce minimální reziudiální choroby

Detekujeme přítomnost izolovaných nádorových buněk v krvi, kostní dřeni a lymfatickém systému - možné prekurzory metastáz

Detekce MRD (minimal residual disease) - detekce znaků epiteliálních buněk v kompartmentech mesenchymálního původu

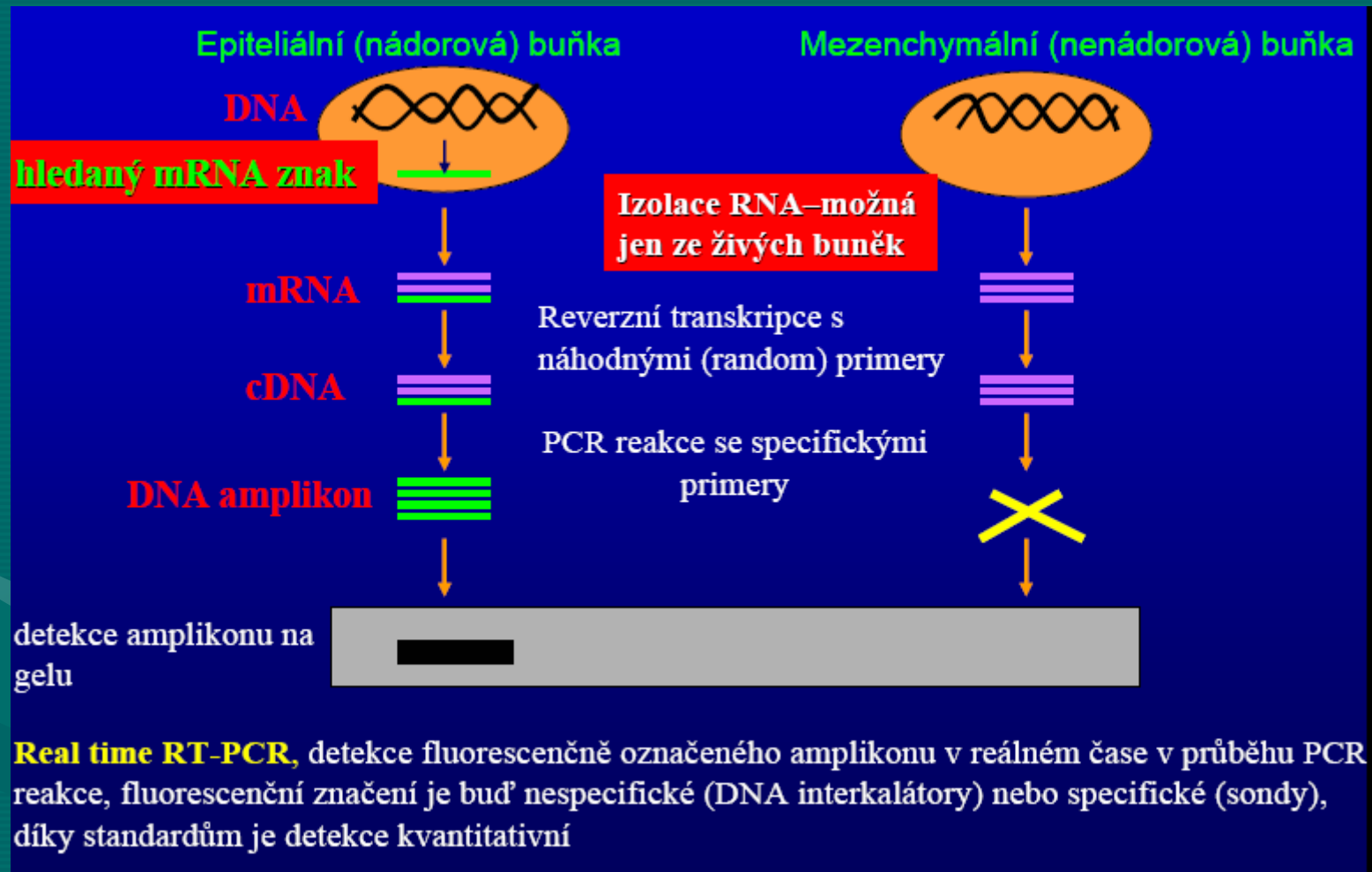
Imunohistochemie - citlivost 1 : 10 000

Průtoková cytometrie - citlivost 1 : 100 000

PCR - citlivost 1 : 1 000 000

Real- time PCR - citlivost až 1 : 10 000 000

Princip detekce minimální reziduální choroby metodou RT-PCR - studium genové exprese



Využití detekce minimální reziduální choroby v klinické onkologii

Detekce MRD a rozhodnutí o adjuvantní léčbě

- Monitoring MRD v čase - relaps vs. remise
- Včasný záchyt recidivy
- Hodnocení léčebné odpovědi
- Diferenciální diagnostika
- Autologní transplantace při HD chemoterapii

Analysis

- Fit Points
- Second Derivative Maximum

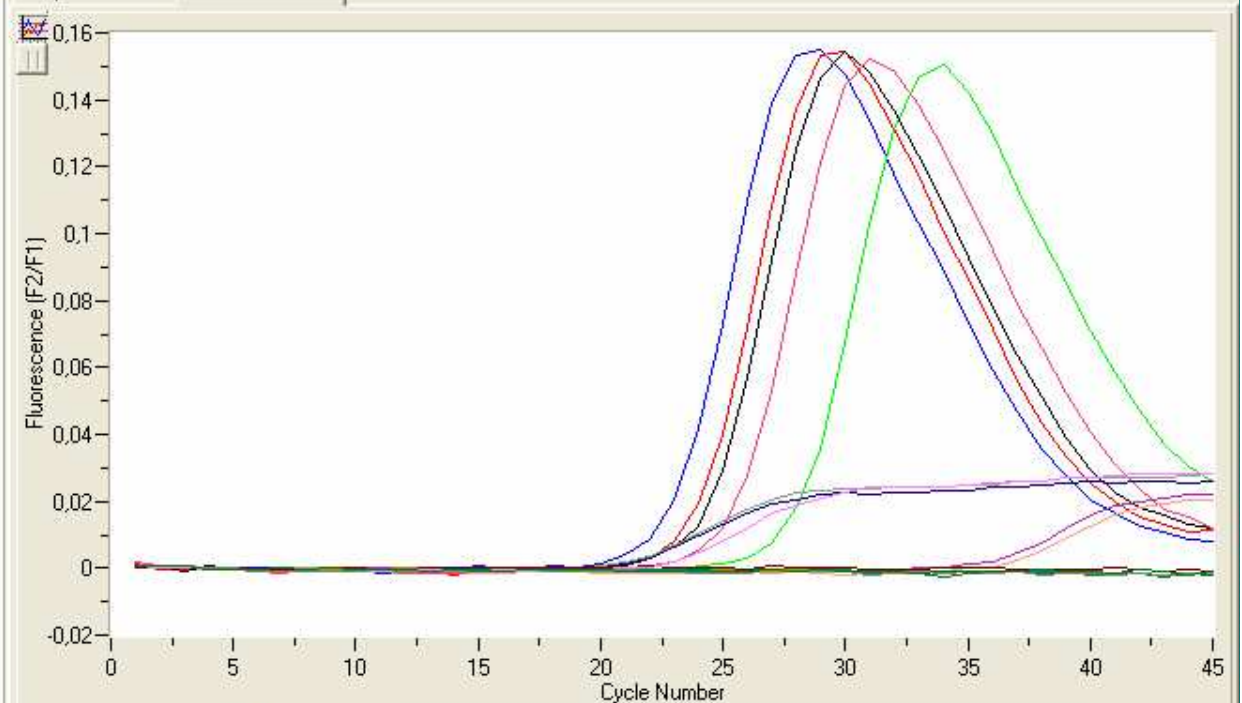
Baseline Adjustment

- None
- Arithmetic
- Proportional
- Normalized

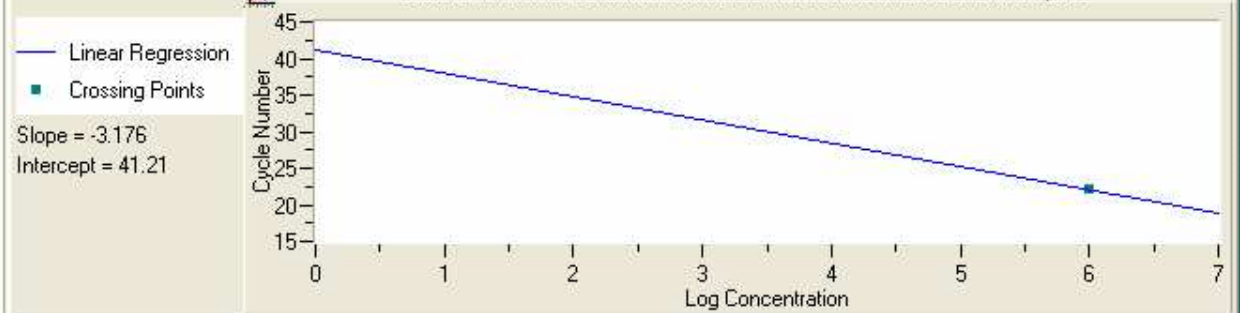
Analysis Notes

P...	Name	Standard	Calculat...	Cro...
1	h-G6PDH 10 6	1.000E+06	1.000E+06	22.15
2	C31/07 h-G6PDH		2.445E+04	27.27
3	C232/07 h-G6PDH		4.777E+05	23.17
4	C233/07 h-G6PDH		3.315E+05	23.67
5	C234/07 h-G6PDH		1.533E+05	24.74
6	K- h-G6PDH			
7	C231/07 TH tkán	2.190E+06		21.07
8	C231/07 TH tkán	2.193E+06		21.07
9	C232/07 TH KD-L	4.415E+01		35.98
10	C232/07 TH KD-L	5.808E+01		35.60
11	C233/07 TH KD-P			
12	C233/07 TH KD-P			
13	C234/07 TH krev			
14	C234/07 TH krev			
15	K+ TH		7.100E+05	22.62
16	K- TH			

Step 1: Baseline Step 2: Analysis



USING EXTERNAL STANDARD: F2-F1-2nd-040427 TH G6PDH transcriptor



Analysis

- Fit Points
- Second Derivative Maximum

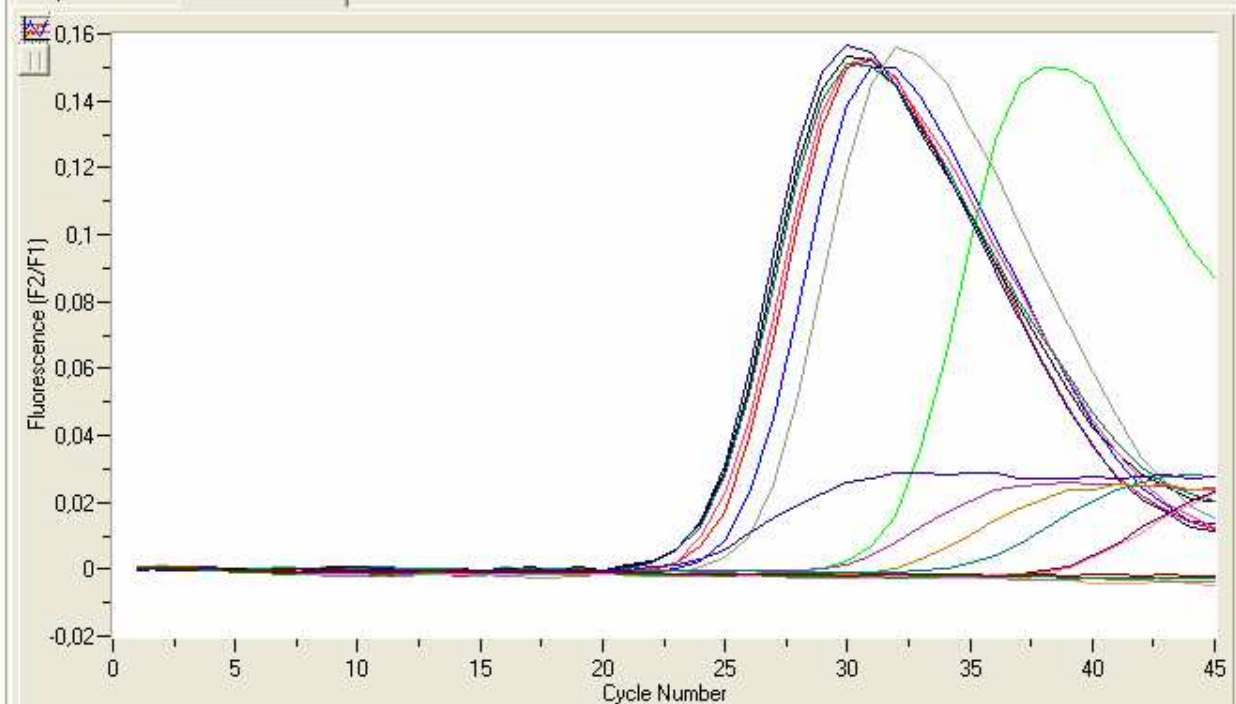
Baseline Adjustment

- None
- Arithmetic
- Proportional
- Normalized

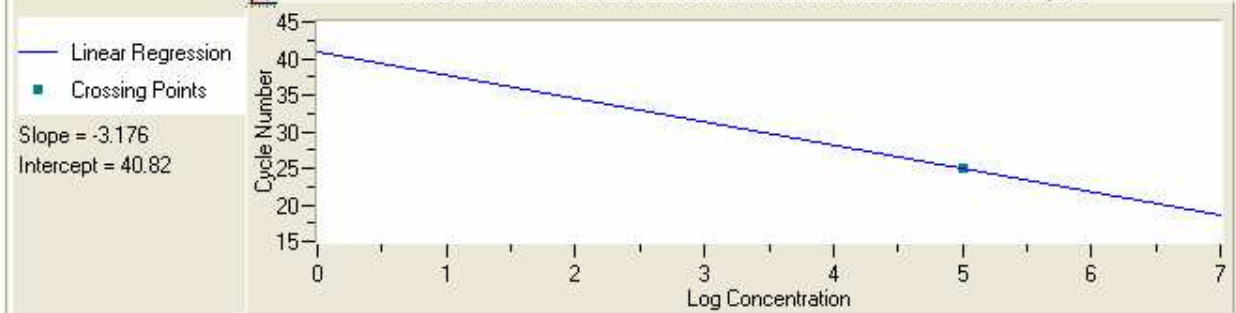
Analysis Notes

P...	Name	Standard	Calculat...	Cro...
1	h-G6PDH 10 5	1.000E+05	1.000E+05	24.94
2	50% NB h-G6PDH		9.144E+02	31.41
3	10% NB h-G6PDH		1.706E+05	24.20
4	1% NB h-G6PDH		2.421E+05	23.72
5	0.1% NB h-G6PDH		1.965E+05	24.01
6	0.01% NB h-G6PDH		2.379E+05	23.74
7	0.001% NB h-G6PDH		2.591E+05	23.62
8	0.0001% NB h-G6PDH		5.373E+04	25.79
9	K- h-G6PDH			
10	50% NB TH		3.059E+03	29.75
11	10% NB TH		6.409E+02	31.90
12	1% NB TH		6.823E+01	34.99
13	0.1% NB TH		5.189E+00	38.55
14	0.01% NB TH			
15	0.001% NB TH		3.959E+00	38.92
16	0.0001% NB TH			
17	K+ TH		2.960E+05	23.44
18	K- TH			

Step 1: Baseline Step 2: Analysis



USING EXTERNAL STANDARD: F2-F1-2nd-040427 TH G6PDH transcriptor



Z průběžných výsledků vyplývá detekce **molekulárního relapsu** onemocnění s **měsíčním předstihem** od klinicky diagnostikovaného relapsu

Kazuistika R.E. s dg. neuroblastom IV. stadia

datum odběru BM	exprese TH genu	FISH	klinický stav
1. 3. 07	KD pozitivní PK pozitivní	Nmyc - 1p36 -	KD, metastázy v obratlech bederní páteře 1.blok CHT
30.4.07	PK KD(PS,LS, sternum) slabě pozitivní	0	před 2. Blokem CHT
26.6.07	KD (LS,PS slabě pozitivní)	0	plánovaná separace PBSC
17.10.07	PK, KD negativní	lok. amp. N-myc gain17q -	před 2. PBSC (1-4.11.01) VGPR
5.11.07	0	N-myc -	
16.11.07	0	N-myc -	
22.11.07	ABCD štěpy negativní KD,PK negativní	0	
25.1.08	PK negativní	0	před vysoce dávkovanou CHT s transplantací PBSC
27.2.08	PK negativní	0	kontrola po transplantaci
29.3.08	KD-LS negativní KD-PS pozitivní		molekulární relaps
26.4.08			klinický relaps

Onkomarkery

Vyšetřování onkomarkerů je obrovským pokrokem při diagnóze a sledování efektu léčby nádorových onemocnění, jejichž počet se nejen v České republice, ale i v celé Evropě každoročně výrazně zvyšuje. Vzhledem k výše uvedeným podmínkám, pravidlům použití a značné finanční nákladnosti patří jejich využití v klinické praxi spíše do ordinací odborných lékařů než do ordinací praktických lékařů. Výjimku mohou tvořit skupiny s vysokým rizikem vzniku nádorového onemocnění, obecně skupiny s profesním rizikem vzniku karcinomu, nebo případy familiárních výskytů nádorových onemocnění, tedy skupiny kontrolované praktickými lékaři.

Molekulárně genetická diagnostika strategie

Přímá DNA diagnostika:

- zjistí, zda analyzovaná DNA nese či nenesí mutaci
- detekce mutací v genech asociovaných s chorobou



Nepřímá DNA diagnostika

- užitím vazebních markerů v rodinných studiích odhalí alelu genu v asociaci s nemocí v rodině
- využití polymorfních míst lidského genomu



Nepřímá molekulárně genetická diagnostika

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

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

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

Nepřímá molekulárně genetická diagnostika

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

Marker, jehož segregace v rodokmenu se sleduje, se dědí totiž společně s genem, protože je v genomu v jeho těsné blízkosti, sám ale s chorobou nemá žádnou příčinnou souvislost.

Ve zkoumaném rodokmenu se porovnává segregace markeru se segregací choroby

Jako markery se používají DNA polymorfismy .

DNA polymorfismy

Sekvence DNA se liší mezi jednotlivci.

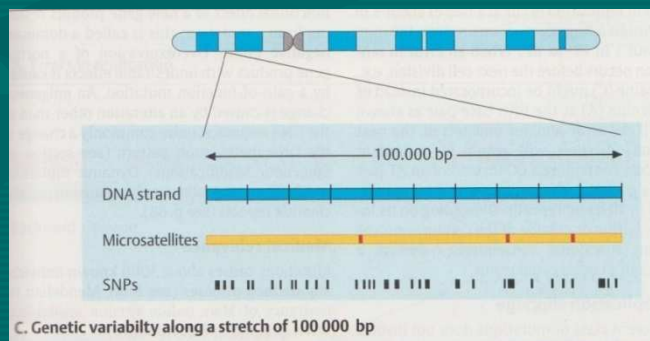
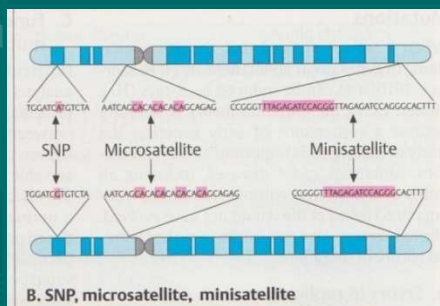
Přítomnost několika alel v určitém místě.

tjako místo v sekvenci DNA, v němž jsou jedinci rozdílní.

- **jednობodový polymorfismus**
(*single nucleotide polymorphism – SNP*)

- **minisatelitové polymorfismy**
VNTR - variable number tandem repeats

- **mikrosatelitové polymorfismy** (*STR - short tandem repeats,*)



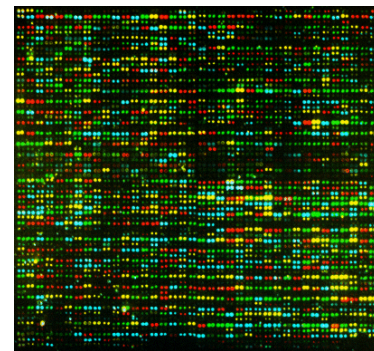
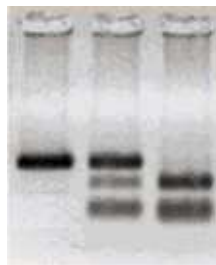
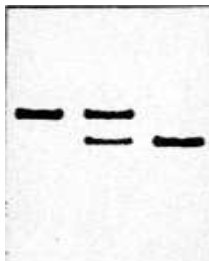
Jednobodový polymorfismus (*single nucleotide polymorphism – SNP*)

- rozdíly v jednom nukleotidu v určitém místě
- vyskytuje se asi jedenkrát na 1000 párů bazí.
- celý lidský genom obsahuje více než 1,5 milionu SNPs
 - vyskytují se v intronech, v extragenových oblastech
 - jen asi 50 000 SNP v kódujících sekvencích genů
- přítomnost/nepřítomnost restrikč. místa,
vznik RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Jednobodový polymorfismus (*single nucleotide polymorphism – SNP*)

Detekce

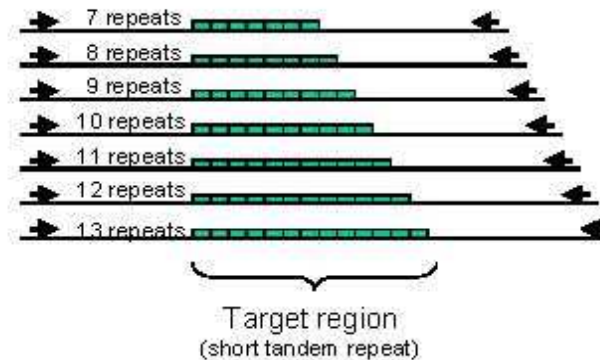
- RFLP (restriction fragment length polymorphism)
restrikční štěpení genomické DNA s následným Southern blottingem
- PCR amplifikace s následným restrikčním štěpením
- PCR amplifikace s následnou sekvenací
- DNA array (čipy) analýza až 100 tisíc SNP v jedné analýze



Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)

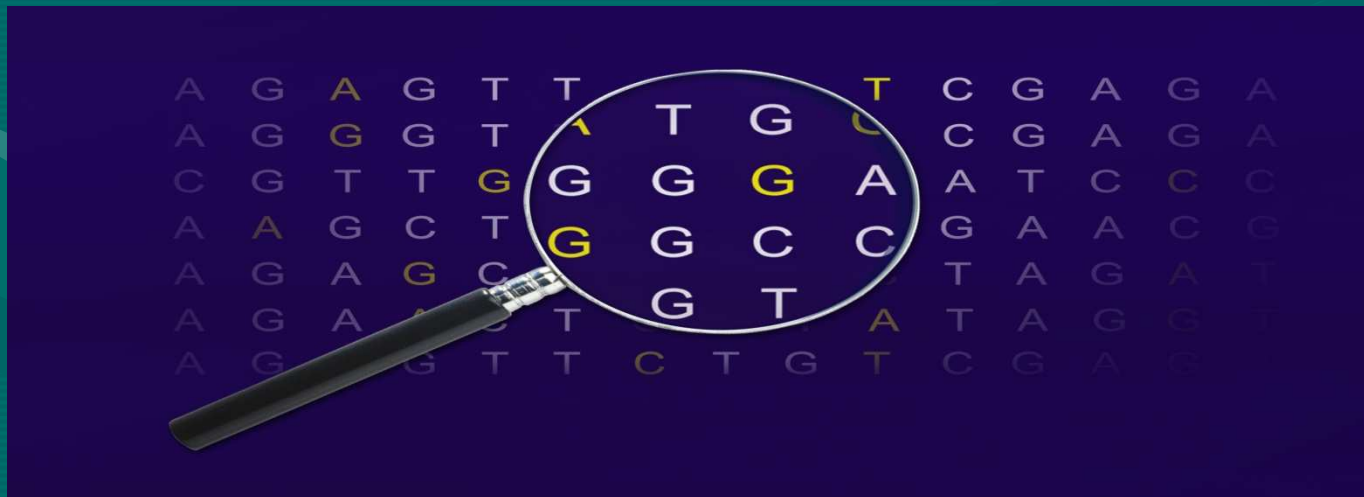
- délka základní repetice 2 – 6 bp
- počet opakování repetice 2 – 100 bp
- Rozptýlené rovnoměrně v lidské genomu
- Vyskytují se běžně v populaci
- Nejsou přepisovány do proteinu
leží v intronech
- Nejsou příčinou choroby
- Tvoří vzorce bez vztahu s fenotypem
- Mezi jednotlivci se velmi liší
- Odlišují jednoho člověka od druhého

```
TCCCAAGCTCTTCCTCTTCCCTAGATCAATACAGACAGAAGACA  
GGTGGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
TAGATAGATATCATTGAAAGACAAAACAGAGATGGATGATAGAT  
ACATGCTTACAGATGCACAC
```

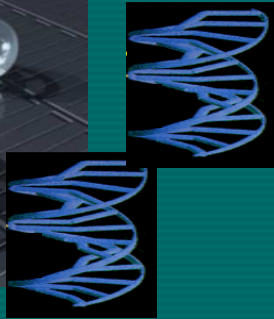
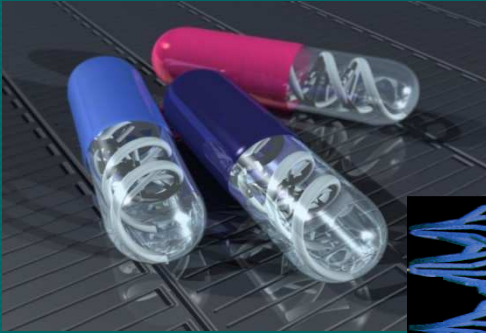


Využití polymorfních míst lidského genomu

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



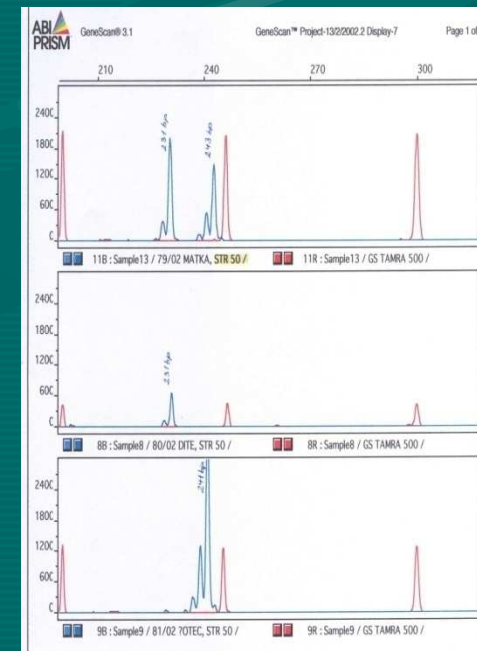
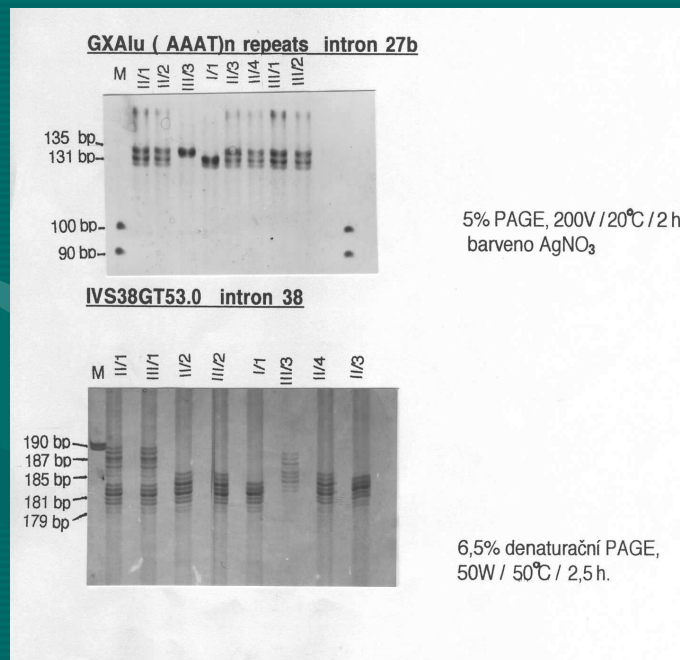
Nepřímá diagnostika



Nepřímá diagnostika

gelová elektroforéza

kapilární elektroforéza



Nepřímá diagnostika

Vazebná analýza je umožněna:

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

Základní principy nepřímé DNA diagnostiky

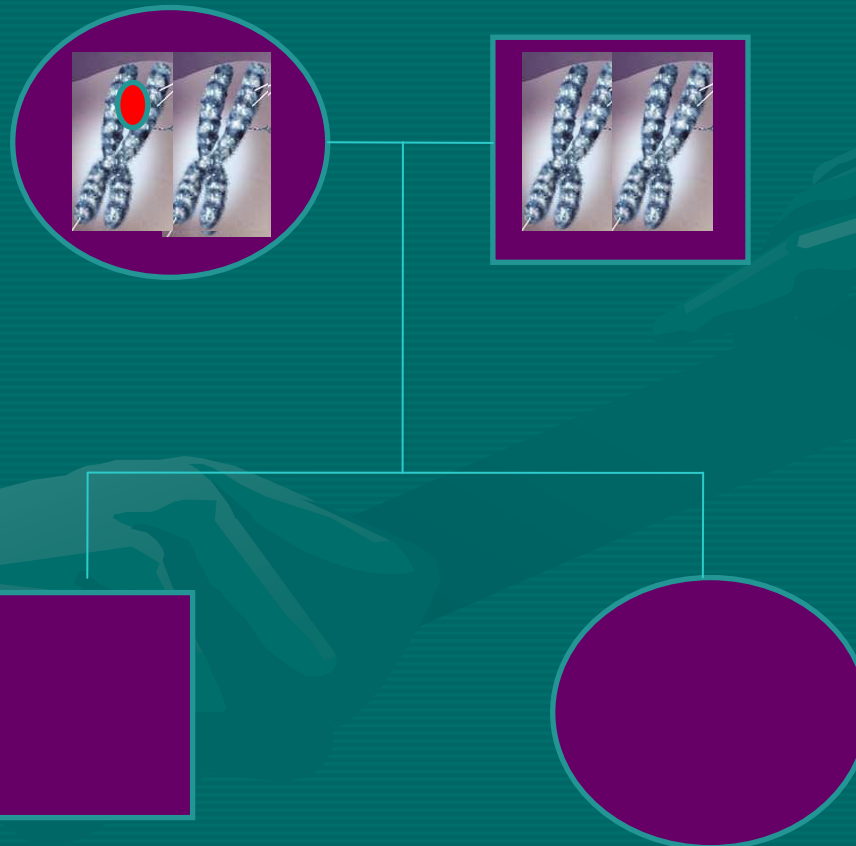
- 1) odlišení dvou chromozomů rodičů (heterozygota markerů)
- 2) určení fáze (určení haplotypu - souboru alel polymorfních míst ve vazbě)
- 3) určení haplotypu (chromozomu) asociovaného s patologií v rodině

Přísná rodinná specifita
Nikdy nepotvrzuje diagnózu

Rodokmen rodiny TP

Nepřímá diagnostika

užitím vazebních markerů v rodiných studiích
odhalí chromozom v asociaci s nemocí v rodině

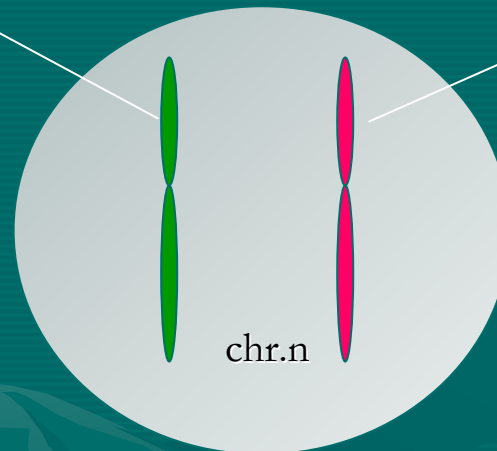


Nepřímá diagnostika

GTATCACACACATTCGG

od otce

od matky



alela A1:

-----GTATCACATTCGG-----

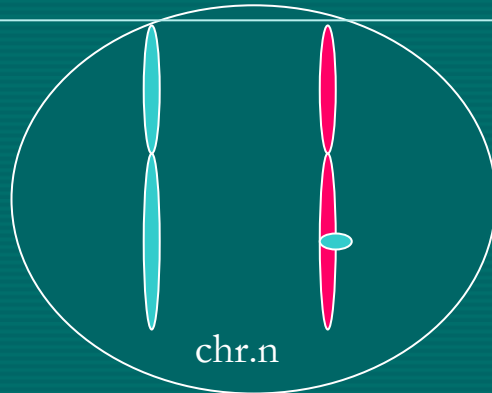
délka alely m bp

alela A2:

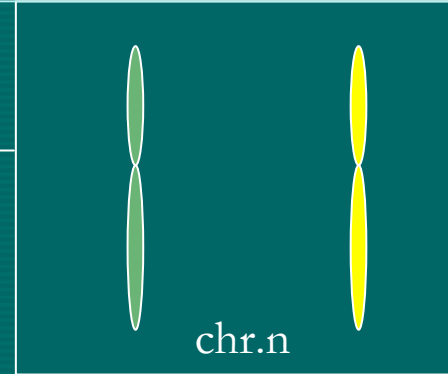
-----GTATCACACACATTCGG---

délka alely m+4 bp

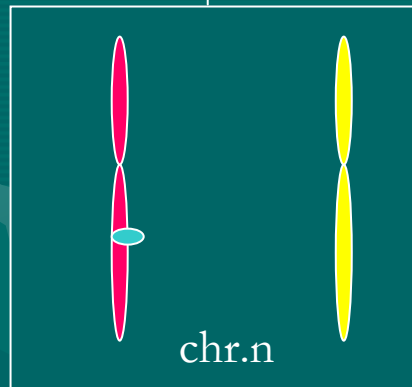
Nepřímá diagnostika



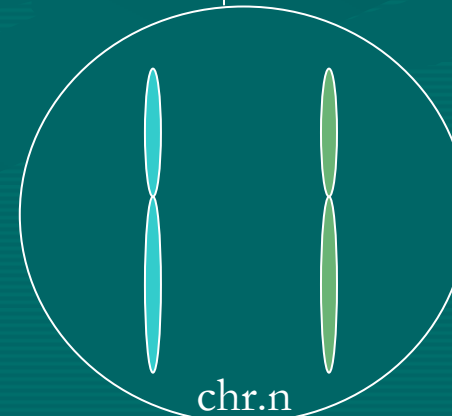
[mt]+[=]
[A1]+[A3]



[?]+[=]
[A1]+[A2]

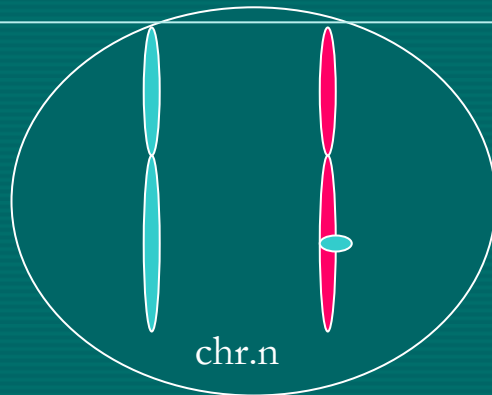


[mt]+[?]
[A1]+[A2]

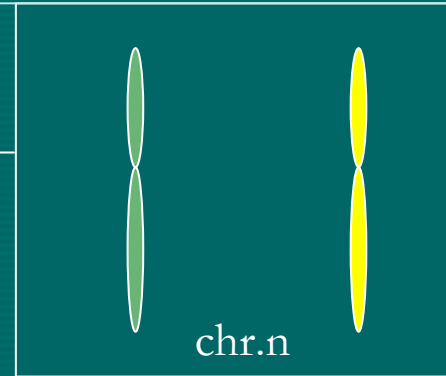


[=]+[=]
[A1]+[A3] informativní

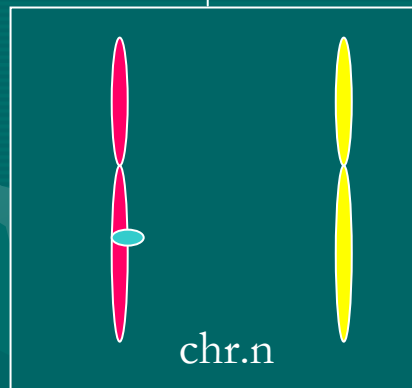
Nepřímá diagnostika



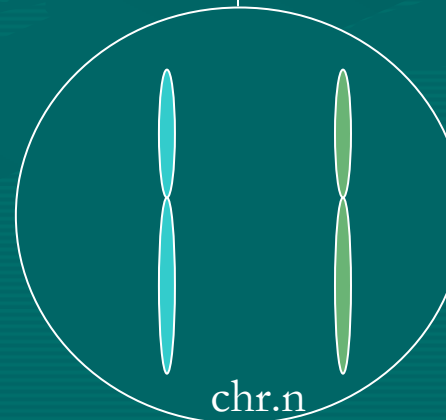
[mt]+[=]
[A1]+[A3]



[?]+[=]
[A1]+[A1]



[mt]+[?]
[A1]+[A1]

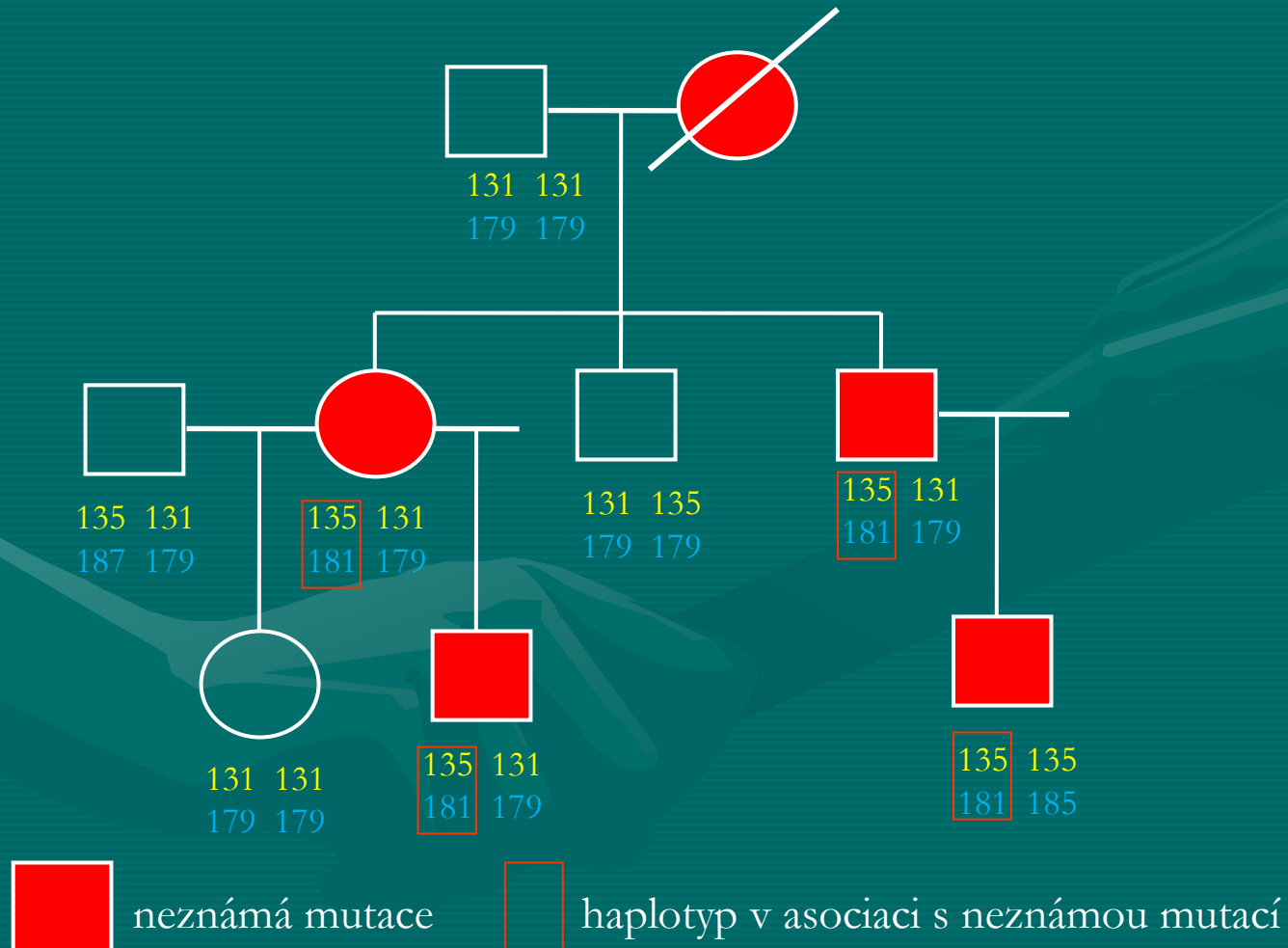


[=]+[=]
[A1]+[A3]

neinformativní

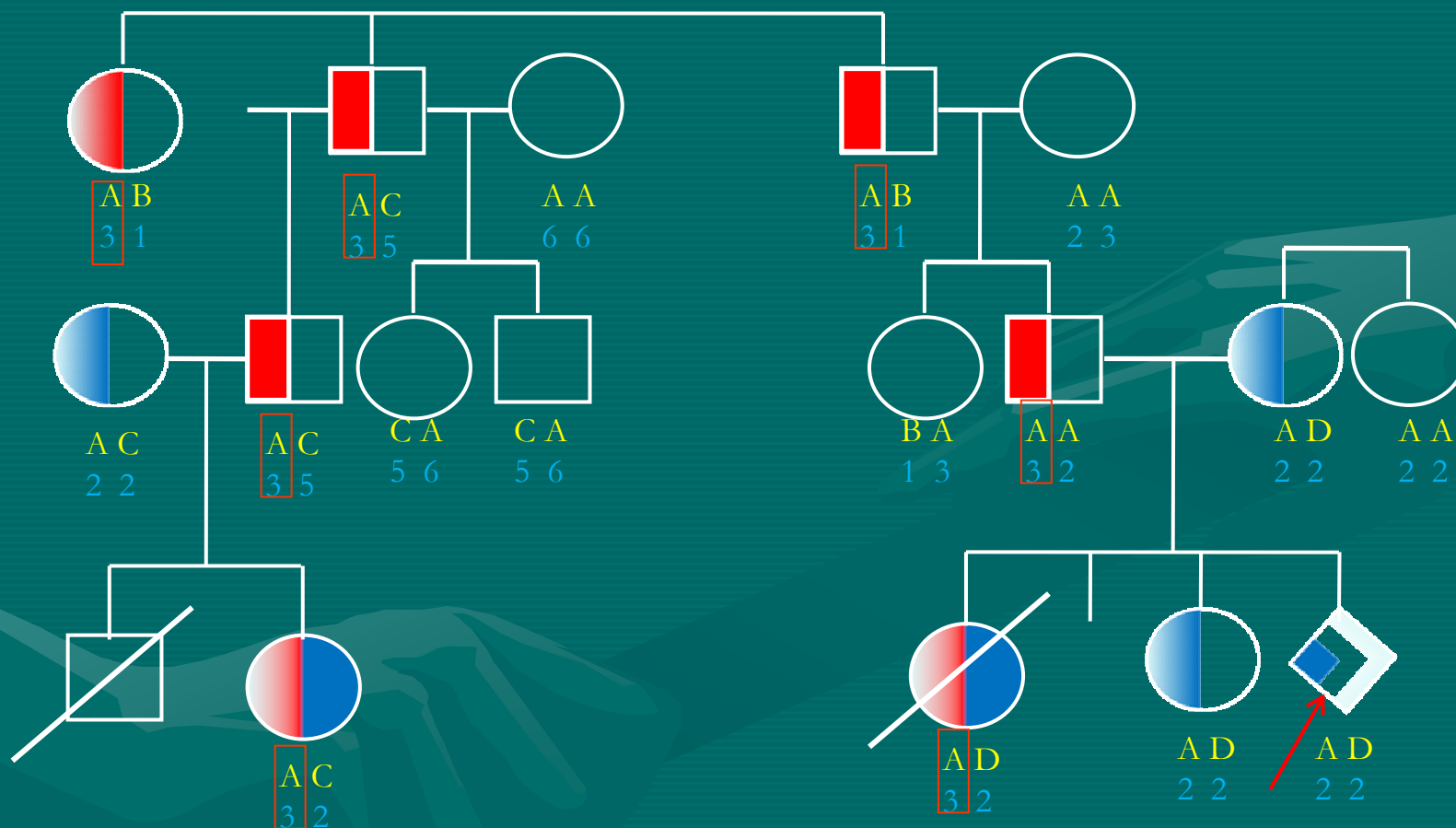
Nepřímá diagnostika Neurofibromatóza typu 1

Autozomálně dominantní dědičnosť



Nepřímá diagnostika Cystická fibróza

Autozomálně recesivní dědičnost



F508del

neznámá mutace

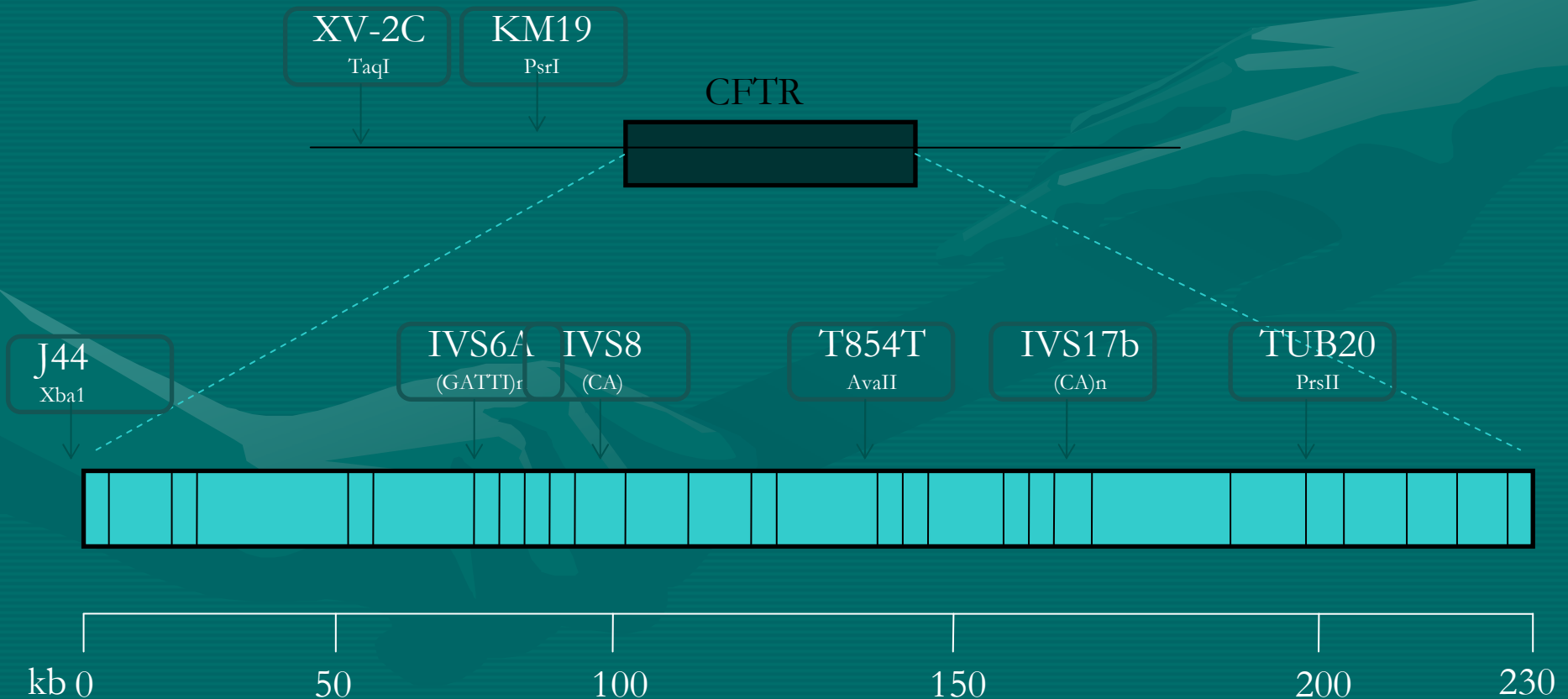
Polymorfní systémy IVS17BTA alely 1 -6
IVS8BTA alely A - D

haplotyp v asociaci s neznámou mutací

Cystická fibróza

Nepřímá diagnostika

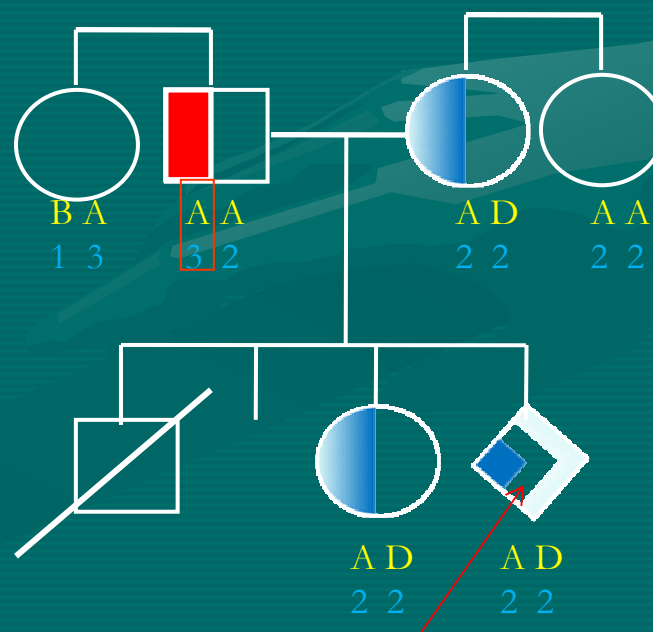
Lokalizace extra a intragenních polymorfních míst genu CFTR



Cystická fibróza

Nepřímá diagnostika

K určení patologického haplotypu slouží genotyp zdravé sestry zemřelého probanda



A C
3 2



F508del



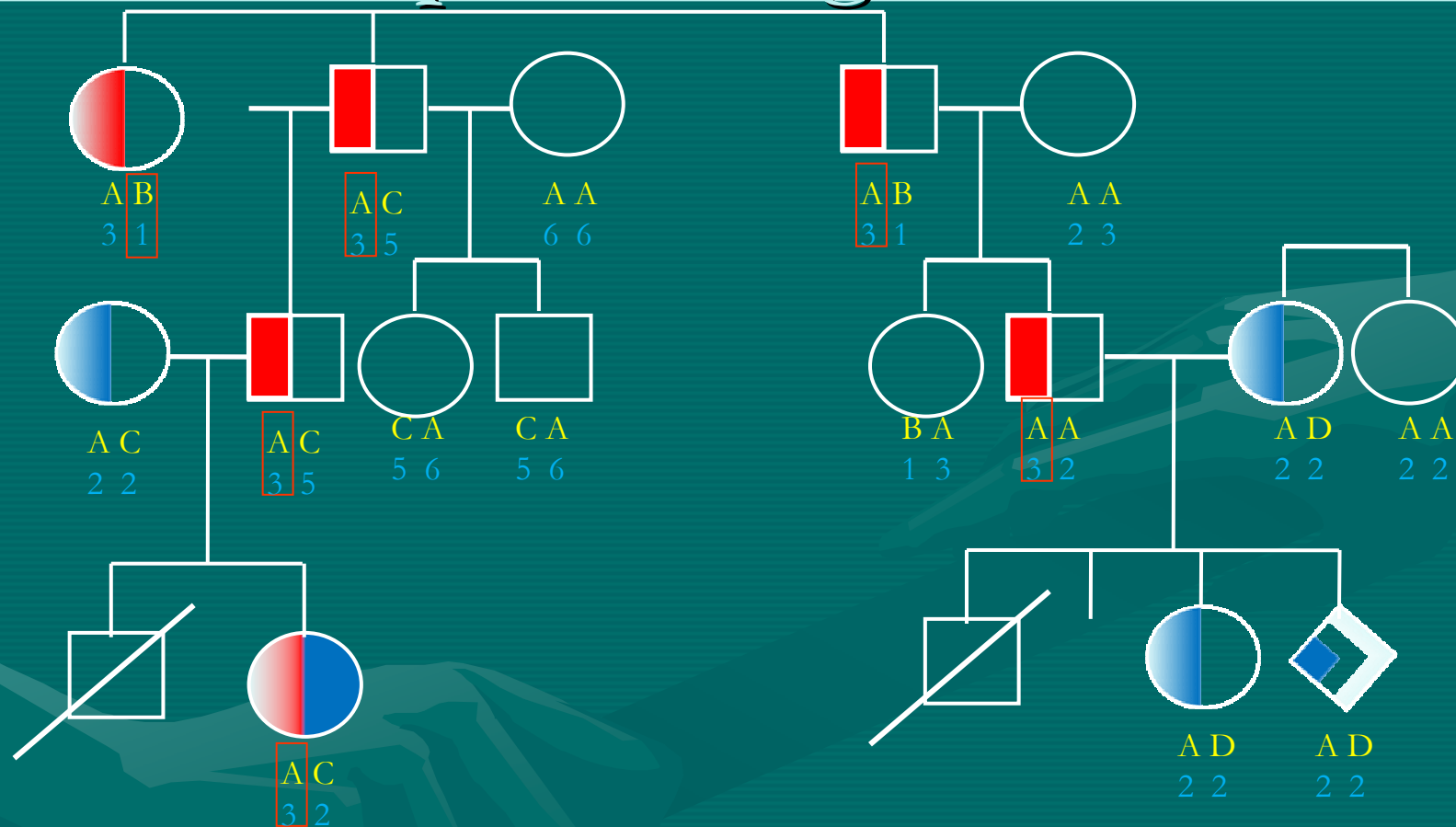
neznámá mutace

Polymorfní systémy IVS17BTA alely 1 -6
IVS8BTA alely A - D

haplotyp v asociaci s neznámou mutací

Cystická fibróza

Nepřímá diagnostika

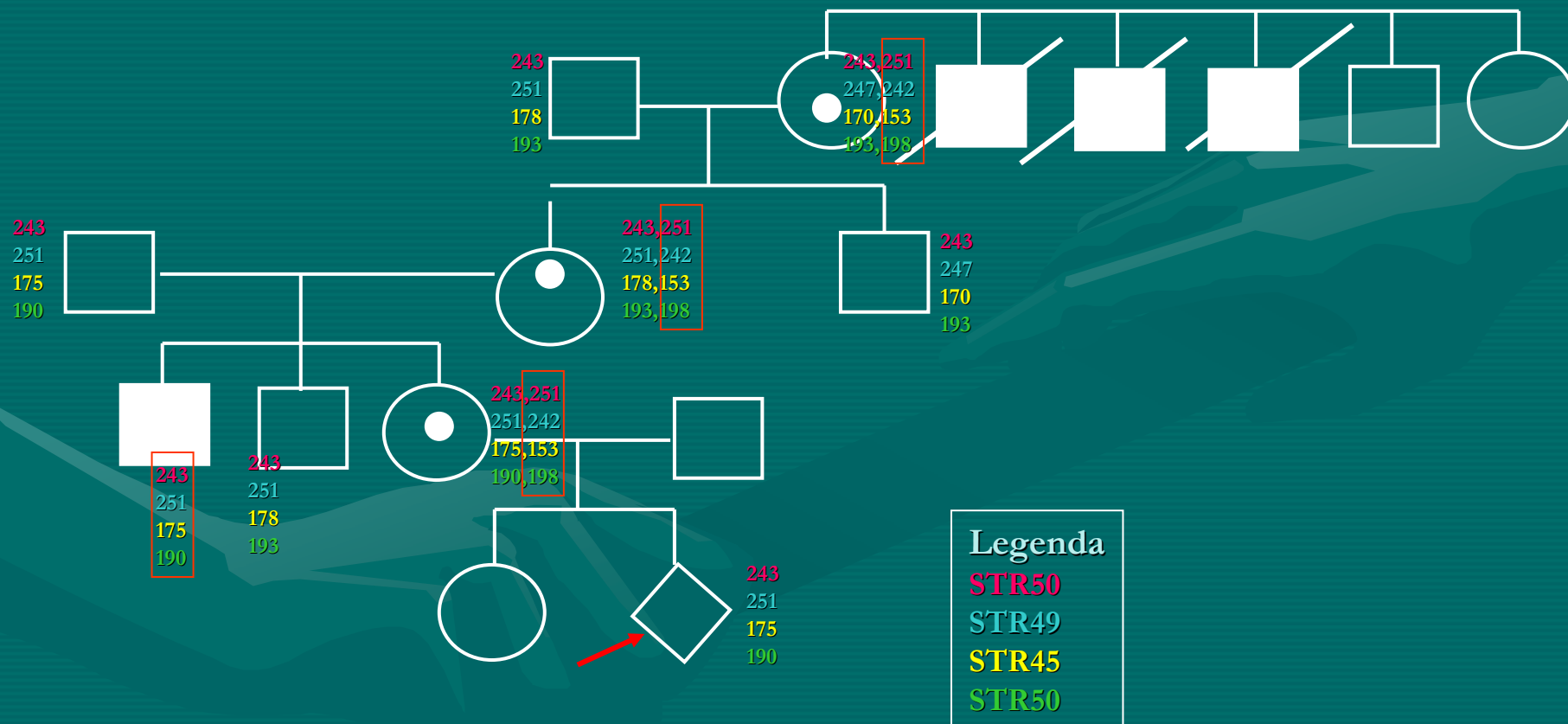


Polymorfní systémy **IVS17BTA** alely 1 -6
IVS8BTA alely A - D

haplotyp v asociaci s neznámou mutací

Nepřímá diagnostika Duchennova svalová dystrofie

X vázaná dědičnost



neznámá mutace



haplotyp v asociaci s neznámou mutací

Legenda

STR50

STR49

STR45

STR50

Duchennova svalová dystrofie

Nepřímá diagnostika

Polymorfní místa v dystrofinovém genu

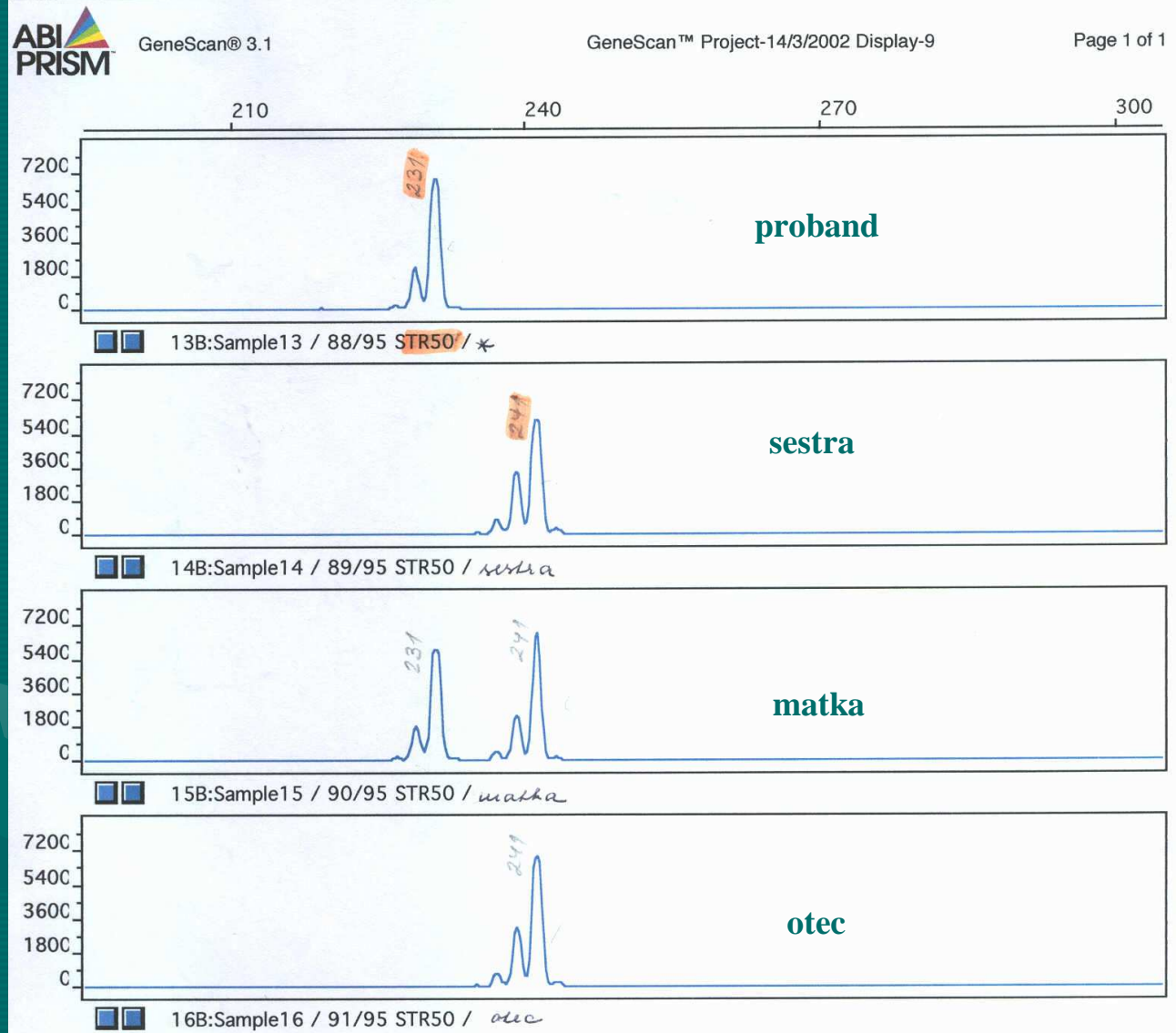


Legenda

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

Duchennova svalová dystrofie

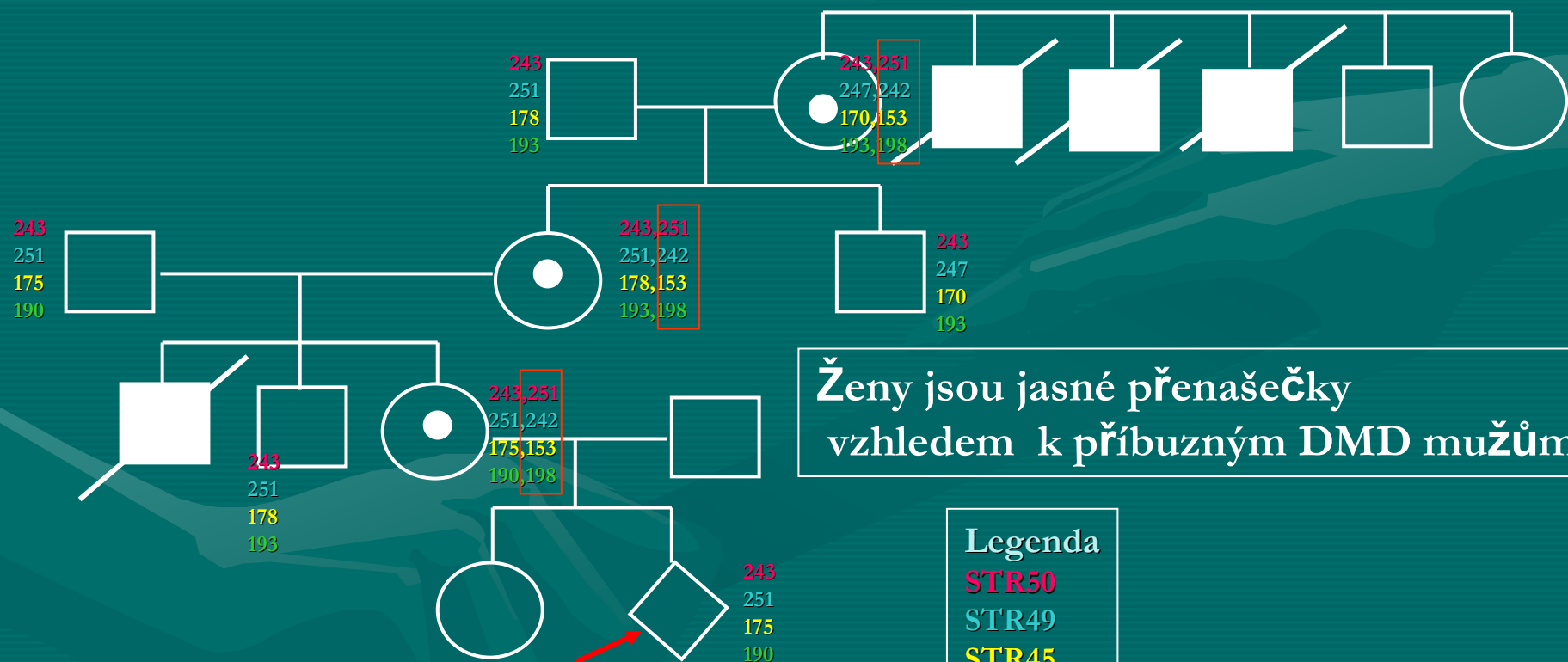
Nepřímá diagnostika



Duchennova svalová dystrofie

Nepřímá diagnostika

K určení patologického haplotypu slouží genotyp zdravého bratra zemřelého probanda



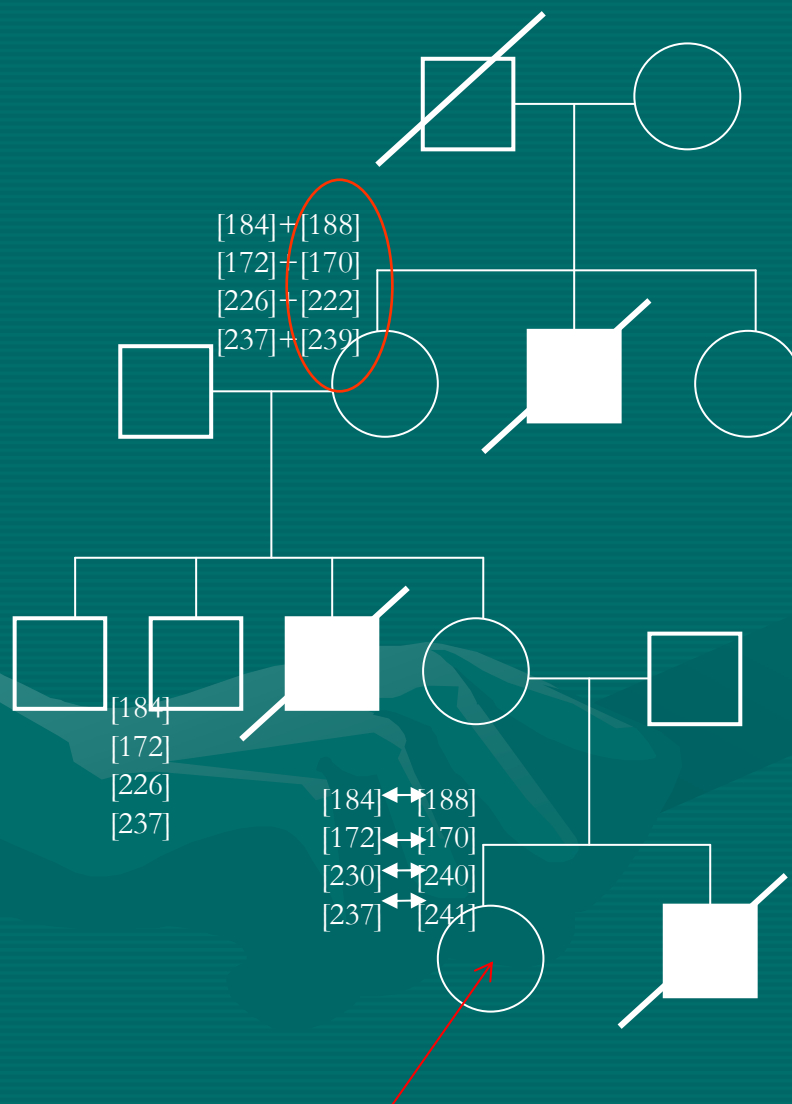
Ženy jsou jasné přenašečky
vzhledem k příbuzným DMD mužům

- Legenda
- STR50
 - STR49
 - STR45
 - STR50

□ neznámá mutace □ haplotyp v asociaci s neznámou mutací

Duchennova svalová dystrofie

Nepřímá diagnostika



Nelze určit haplotyp probandky
vzhledem neznalosti genotypu
otce a matky

Probandka není DMD přenašečka

haplotypy polymorfních markerů

[xxx] STR44
[xxx] STR45
[xxx] STR49
[xxx] STR50

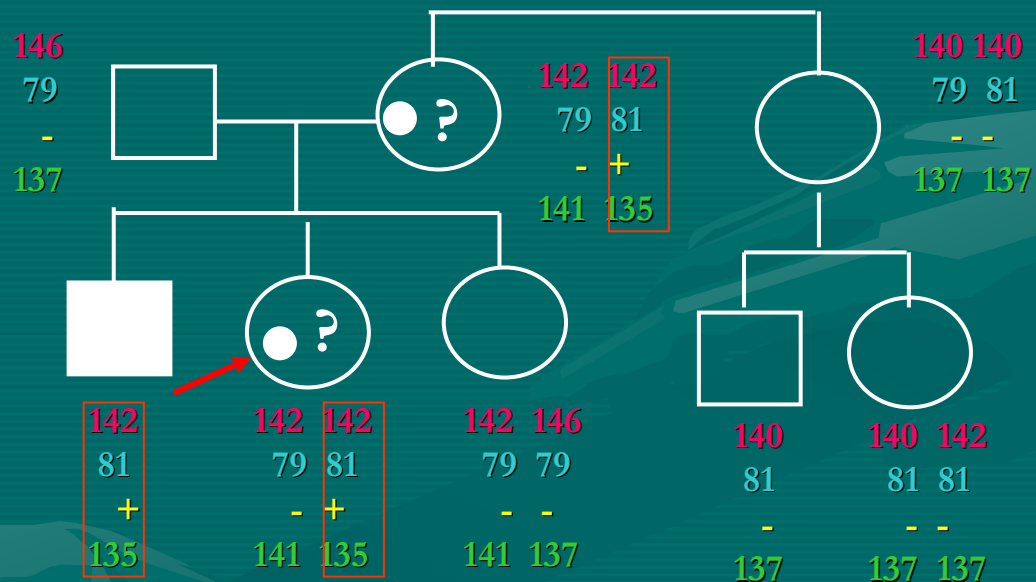
haplotyp polymorfních markerů
ve vazbě s patologií

[xxx]
[xxx]
[xxx]
[xxx]

Hemofilie A

Nepřímá diagnostika

?
mutace mohla
vzniknout de novo při
transmisi gamety



neznámá mutace



haplotyp v asociaci s neznámou mutací

Legenda

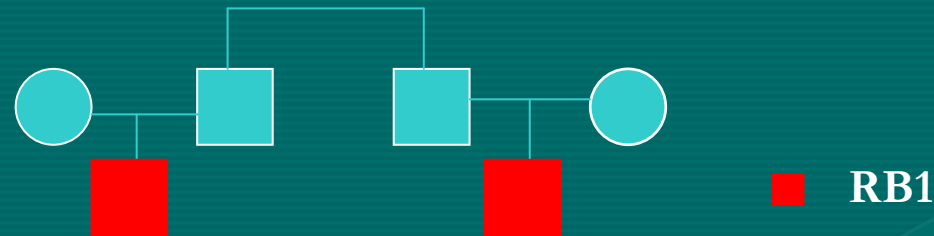
STR13

STR22

RFLP18

STR24

Retinoblastom



Provedena mutační analýza genu Rb1

- sekvenace kódující oblasti
- sekvenace promotorové oblasti
- MLPA pro detekci velkých delecí a duplikcí
- metylační analýza



Nebyla detekována patologie v genu Rb1

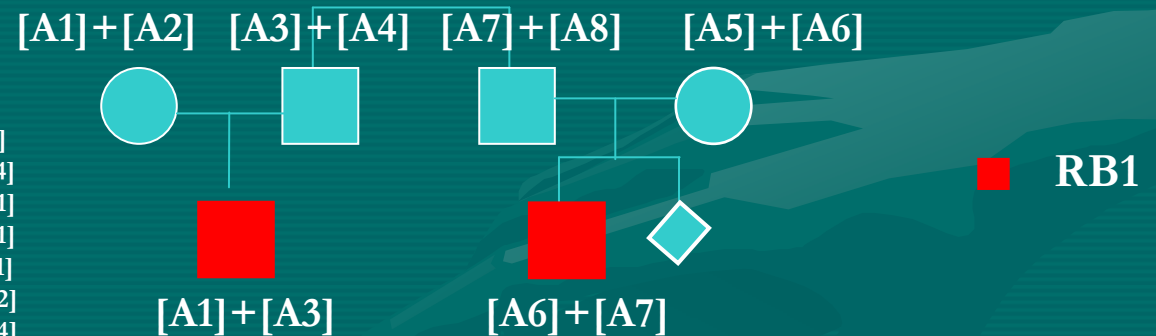
Retinoblastom

Nepřímá diagnostika

Používány polymorfní místa

- extragenová (DS13S 1307, DS13S 272, DS13S 164)
- intragenová (Rb1.20B)

A1: DS 13S 1307 [141] DS 13S 272 [133] DS13S 164 [179] Rb1.20B [3]
A2: DS 13S 1307 [151] DS 13S 272 [133] DS13S 164 [188] Rb1.20B [4]
A3: DS 13S 1307 [139] DS 13S 272 [127] DS13S 164 [179] Rb1.20B [1]
A4: DS 13S 1307 [139] DS 13S 272 [133] DS13S 164 [186] Rb1.20B [1]
A5: DS 13S 1307 [139] DS 13S 272 [131] DS13S 164 [188] Rb1.20B [1]
A6: DS 13S 1307 [126] DS 13S 272 [133] DS13S 164 [188] Rb1.20B [2]
A7: DS 13S 1307 [126] DS 13S 272 [129] DS13S 164 [188] Rb1.20B [4]
A8: DS 13S 1307 [139] DS 13S 272 [127] DS13S 164 [178] Rb1.20B [5]



Nelze určit haplotyp v asociaci s patologií v RB1 genu

Vysvětlení:

- výskyt mutace v jiném systému regulace buněčného dělení a růstu (např. dráha p14)
- nehereditární forma retinoblastomu u obou bratraců

Preimplantační genetická diagnostika monogenně dědičných chorob

Selekce embryí pro in vitro fertilizaci (IVF)
pro páry s rizikem přenosu dědičné choroby na potomky

Pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

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



Monogenní choroby - metoda PCR

Komplikace : ADO (alelic drop out)

amplifikace jedné alely pod úrovní detekovatelnosti

Minimalizace ADO

protokol monitorující výskyt ADO:

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

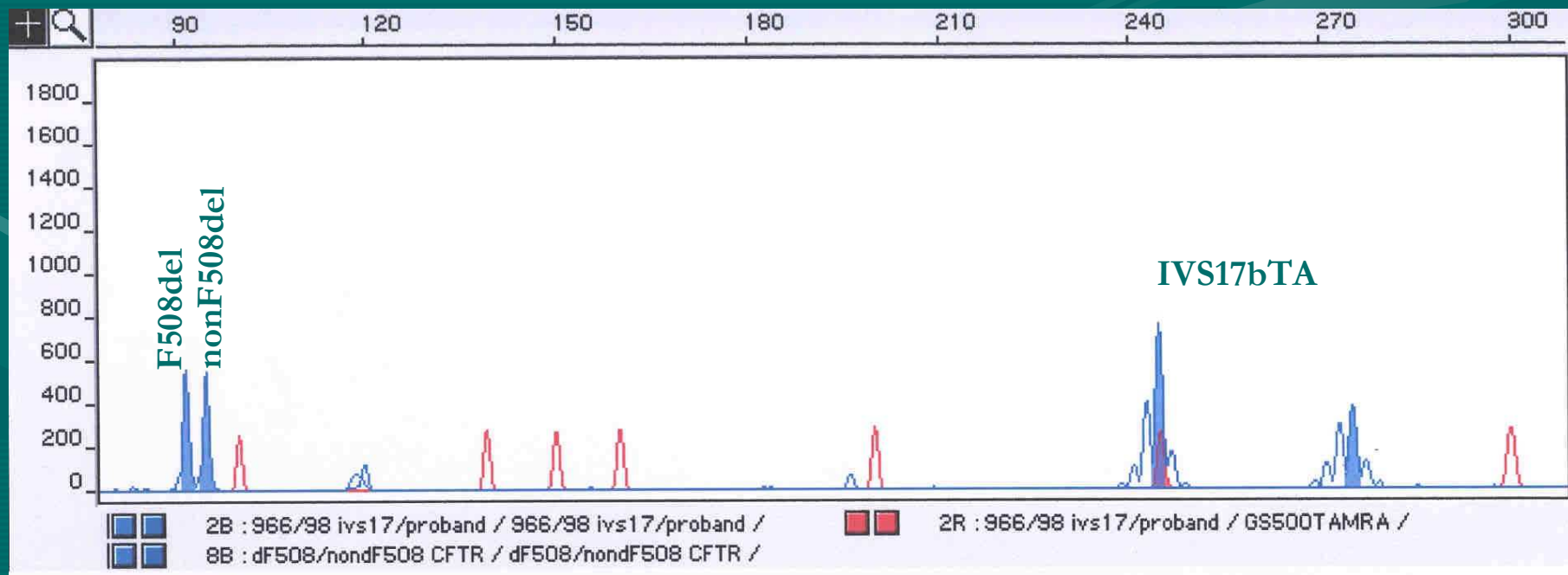
Preimplantační genetická diagnostika

Nepřímá diagnostika

Detekce mutace F508del v genu CFTR

Multiplex PCR – koamplifikace lokusu mutace F508del s intragenním mikrosatelitem IVS17bTA

Kapilární elektroforéza



Genotyp blastomery: [F508del]+[=]

Faktory, které ovlivňují spolehlivost nepřímého molekulárně genetického vyšetření

1. Spolehlivost klinické diagnózy

Klinická diagnóza onemocnění musí být naprosto přesná.

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

Výsledek molekulárního vyšetření je v tom případě nesmyslný a zavádějící.

2. Možnost rekombinace mezi markerem a genem

Mateřská a otcovská chromozomální DNA se v průběhu crossing-overu "promíchá" v rámci homologních chromozomů. Pohlavní buňka pak nese nově "smíchanou" DNA - takto se vedle sebe mohou v gametě dostat informace, které spolu původně nesousedily

Např. varianta markeru původně ležící v nebo v sousedství mutované alely na otcovské DNA se tímto "smícháním" octne v nebo v sousedství "zdravé" alely pocházející z mateřské DNA, neboť mezi ním a markerem došlo k rekombinaci.

Pravděpodobnost rekombinace roste se vzdáleností mezi sledovaným markerem a genem.

3. Spolehlivost biologických vztahů v rodokmenu

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

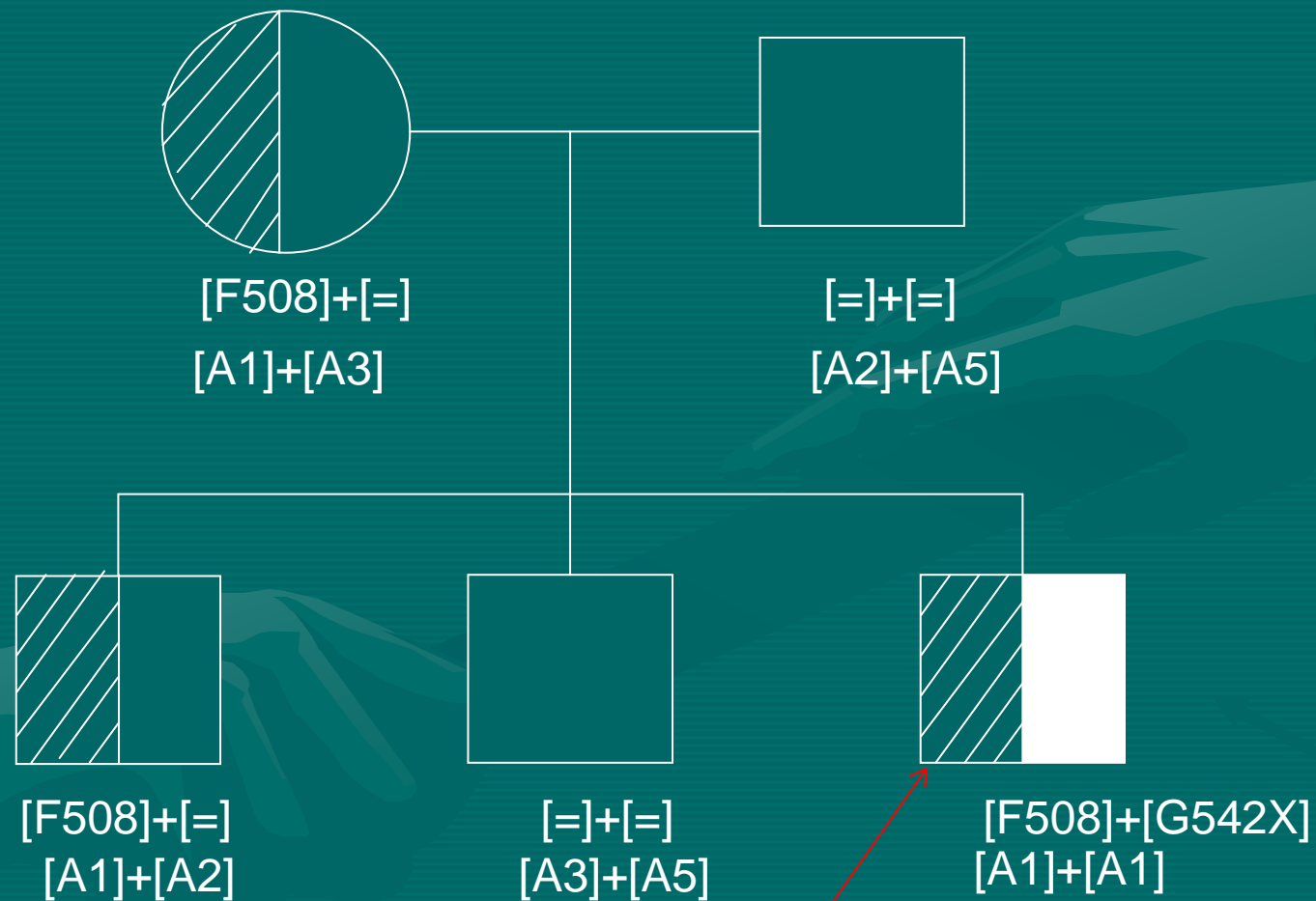
Je-li zapotřebí vyšetřit široký rodokmen, proband nemívá o těchto citlivých údajích týkajících se rodičů, prarodičů nebo vzdálenějších příbuzných znalost.

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

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

Cystická fibróza

Nepřímá diagnostika



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

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

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

Molekulárně genetická diagnostika představuje zásadní zlepšení lékařské péče



ALE



Molekulárně genetická diagnostika

Problémy

Vysoké náklady na molekulárně genetické vyšetření,
velmi drahé používané chemikálie a přístrojová technika

Při pozitivním nálezu znamená bolestnou zdravotní prognózu
bez možnosti nápravy.

Pacienta může eticky, sociálně i ekonomicky poškodit
prozrazení jeho genetických údajů.

