

Detekcia mutácií v ľudskom genóme

Vladimír Ferák

Katedra molekulárnej biológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského
Bratislava

Detekcia mutácií v ľudskom genóme

A. IDENTIFIKÁCIA NEZNÁMYCH MUTÁCIÍ

B. DETEKCIA ZNÁMYCH MUTÁCIÍ (diagnostické metódy)

A. IDENTIFIKÁCIA NEZNÁMYCH MUTÁCIÍ

I. Referenčná metóda: **sekvenovanie**

I. **Skríningové metódy**

založené na analýze:

1. homoduplexných NK:

- DGGE (TGGE)

- SSCP, REF

2. heteroduplexných NK:

- HA (elektroforéza)

- DHPLC

Detekcia mutácií v ľudskom genóme – pokr.

B. DIAGNOSTICKÉ METÓDY (cielená detekcia známych mutácií):

- RA: restričná analýza
- ACRS: amplifikáciou utvorené restričné miesto
- ASO (SSO): alelovo špecifické oligonukleotidy
- ARMS (ASA): alelovo špecifická amplifikácia
- TaqMan (Real-time PCR)
- PTT: „protein truncation test“

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

(Fischer a Lerman, 1979)

Teoretické východisko:

-väčšina DNA fragmentov sa skladá z 2 a viac denaturačných domén

-stringencia denat. podmienok je funkciou sekvencie

-pri elfo vo \uparrow koncentrácii denaturantu rýchlosť migrácie fragmentov pri určitej koncentrácii prudko \downarrow (*denaturácia 1. domény*).

Princíp:

separácia fragmentov na základe rozdielnych podmienok denaturácie

Metodické prevedenie:

1. Získavanie DNA fragmentov: *PCR, RŠ*

2. Elektroforéza

- gél: *PAGE*

- denaturant: *urea a formamid*

(100 % denaturant - 7 M urea a 40% formamid)

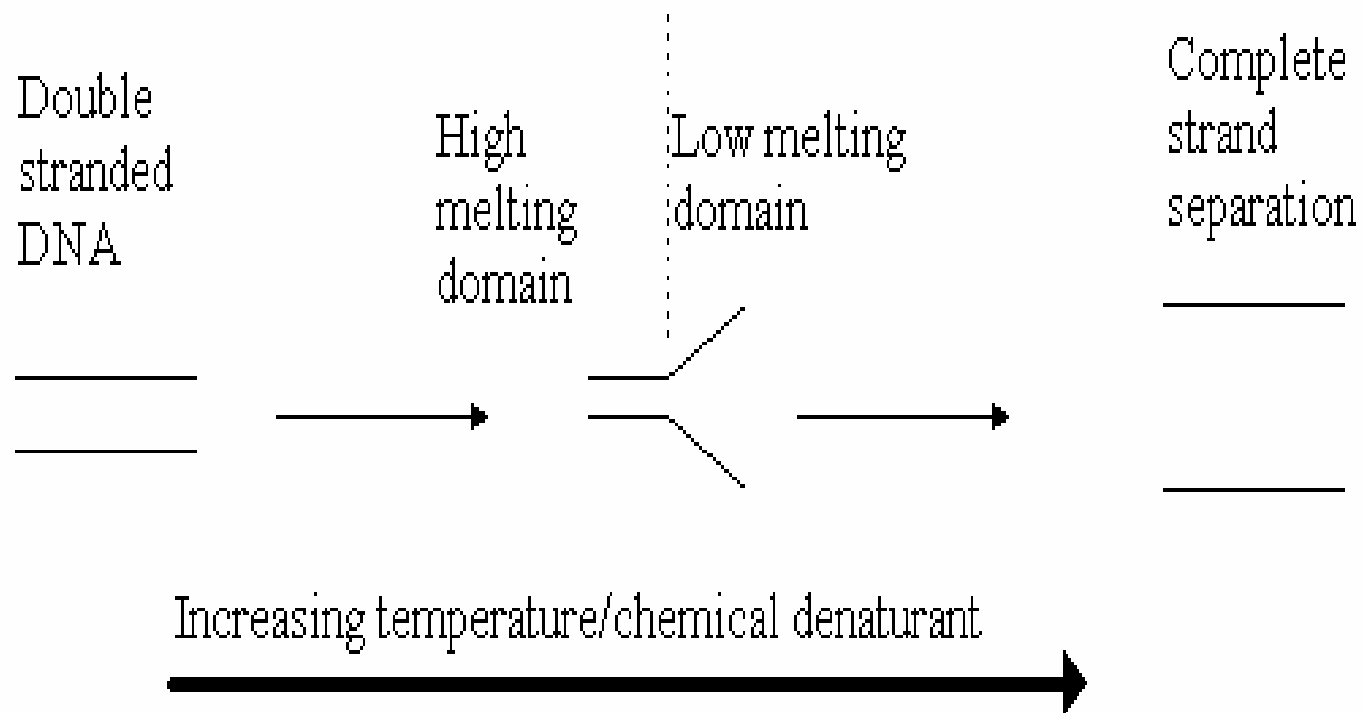
- detekcia: *farbenie striebrom, hybridizácia*

- typy gélov: - *kolmé (perpendicular)*

- *paralelné*

DGGE

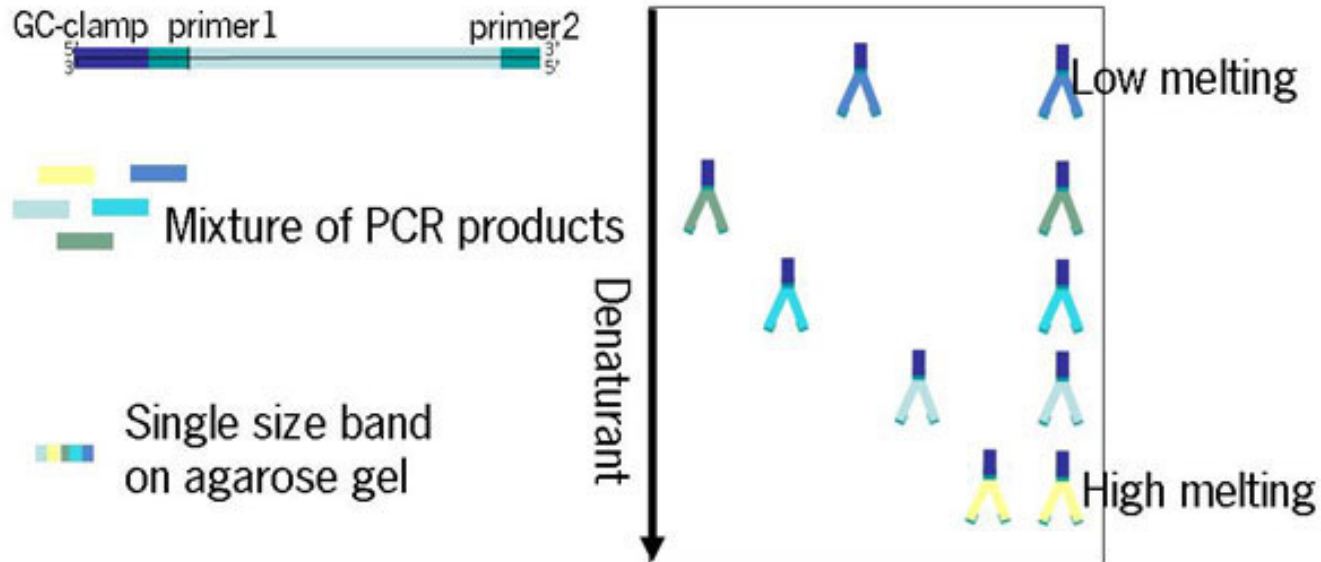
DNA MOLECULES ANNEAL IN DISCRETE DOMAINS



DGGE

Detection of single base polymorphisms

DGGE/TGGE



DGGE: charakteristika

Charakteristika

- **dĺžka fragmentov 100 - 1000 bp**
- **fragment musí obsahovať min. 2 denat. domény**
(neidentifikuje mutácie v doméne s najvyššou stringenciou denat.)
- **detekčná schopnosť je 50 - 70 %**
- **“GC-clamp” - umelo priradená doména s vysokou stringenciou na 5' - koniec fragmentu: *detekčná schopnosť cca 95%***
- **nedáva informáciu o lokalizácii mutácie**
- **TGGE - Temperature Gradient Gel Elpho**
 - **modifikácia DGGE** (zvýšenie stringencie denaturácie pomocou zvyšovania teploty)

SSCP: Single-Strand Conformational Polymorphism

(Orita a spol., 1989)

Teoretické východisko

- jednovláknová DNA za nenedenaturačných podmienok vytvára terciárnu štruktúru, stabilizovanú vnútrovláknovými interakciami
- mobilita ssDNA v nenedenaturačnom PAGE je funkciou terciárnej štruktúry
- zámena báz (mutácia) môže viesť k zmene terciálnej štruktúry s následnou zmenou mobility

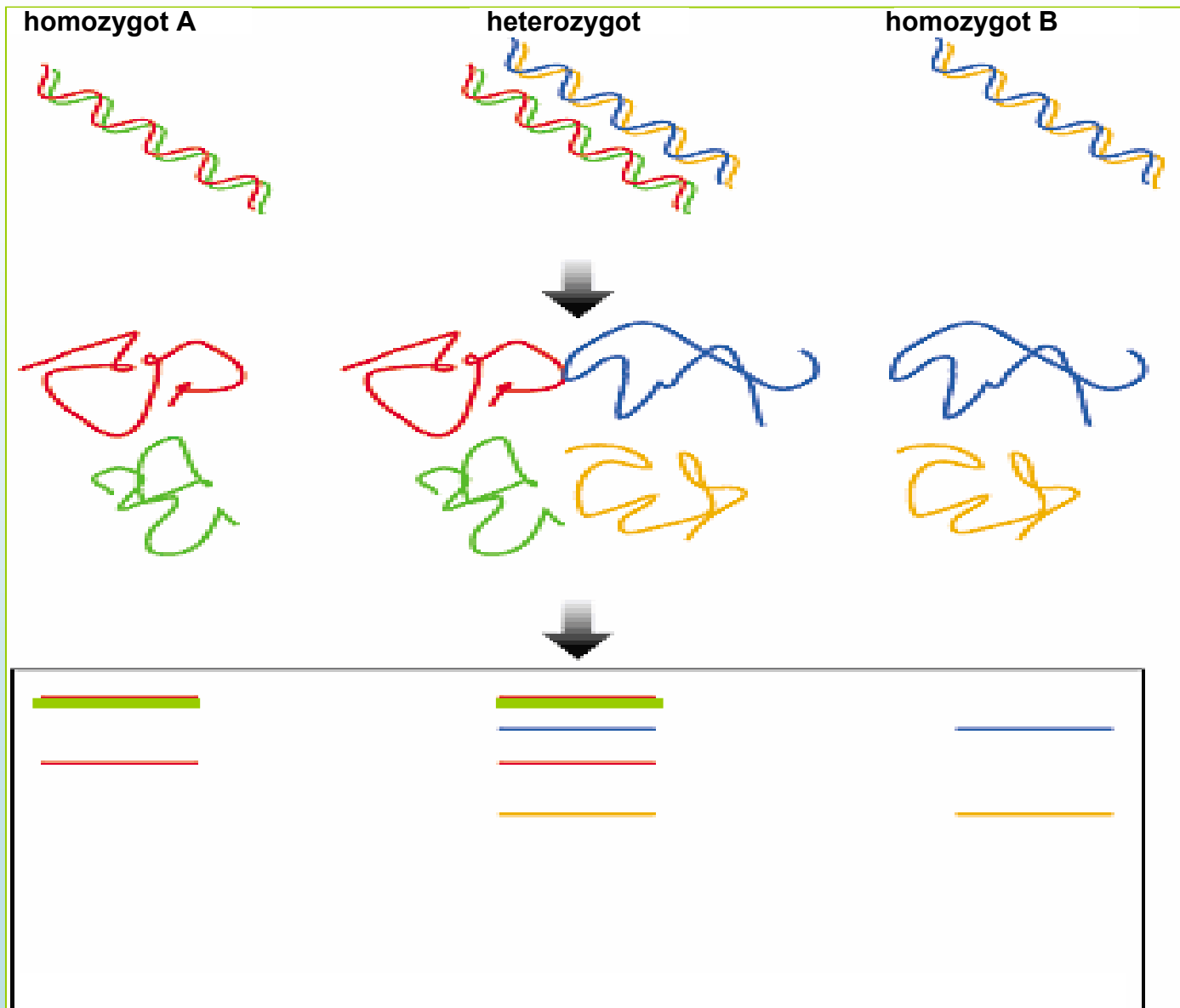
Princíp

- **separácia na základe rozdielnej terciálnej štruktúry ssDNA**

Metodické prevedenie

- Získavanie DNA fragmentov: PCR, RŠ
- Denaturácia fragmentov: teplota, formamid
- PAGE (nenedenaturačný gél)

SSCP



SSCP: Single-Strand Conformational Polymorphism

- Charakteristika:
 - Dĺžka analyzovaných fragmentov: do 400 bp
 - Detekčná schopnosť: <100%
 - Fragmenty 200 bp: cca 80%
 - Fragmenty 300 bp: cca 60%
 - Dlhšie fragmenty: štiepiť RE
 - Neinformuje o lokalizácii mutácie
 - Veľmi jednoduchá, široko využívaná metóda
 - Občas používaná aj pri diagnostike

SSCP Gel

→ Het

↗ Het

↻ Homo

↻ Homo

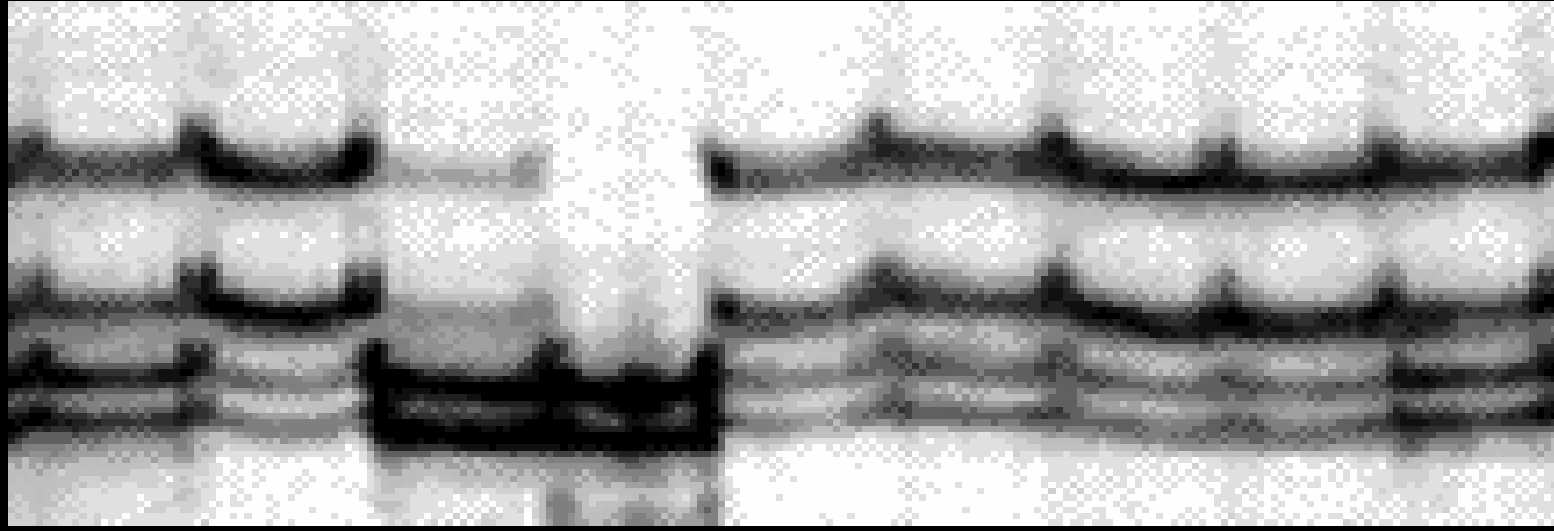
↖ Het

↖ Het

↘ Het

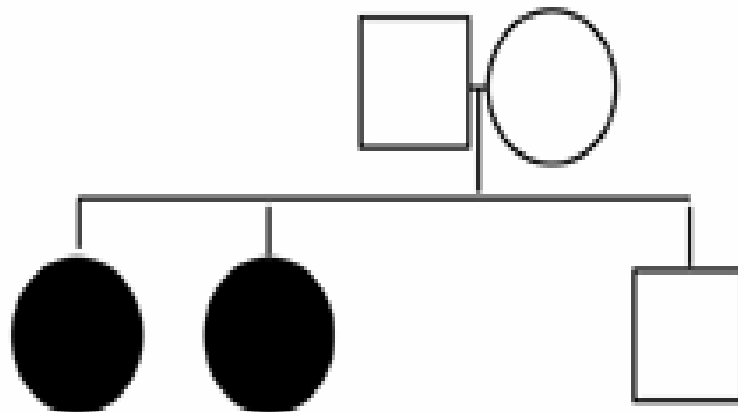
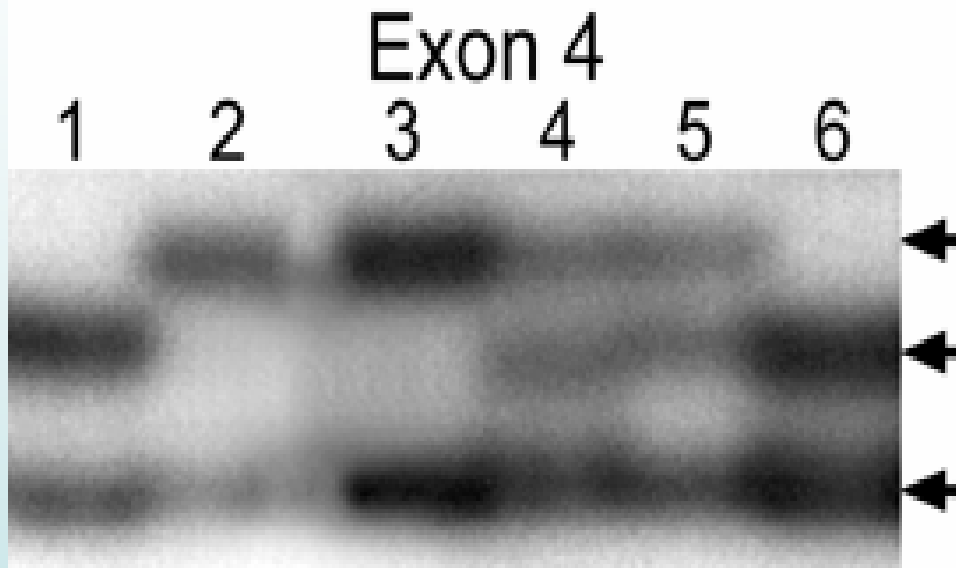
↻ Het

↘ Het

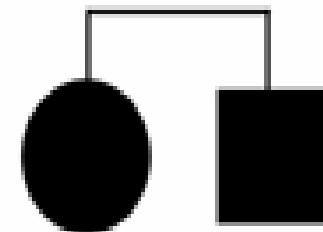
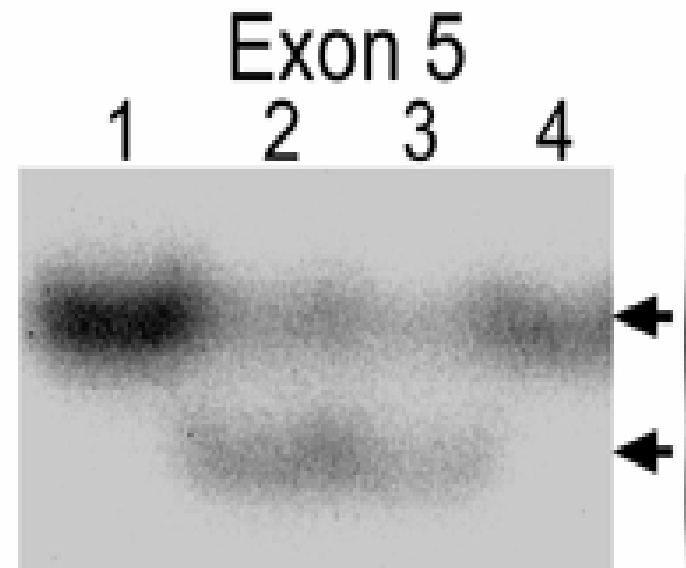


SSCP v diagnostike

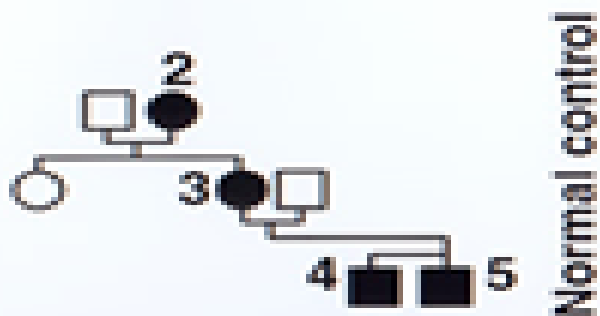
A. Family 1002



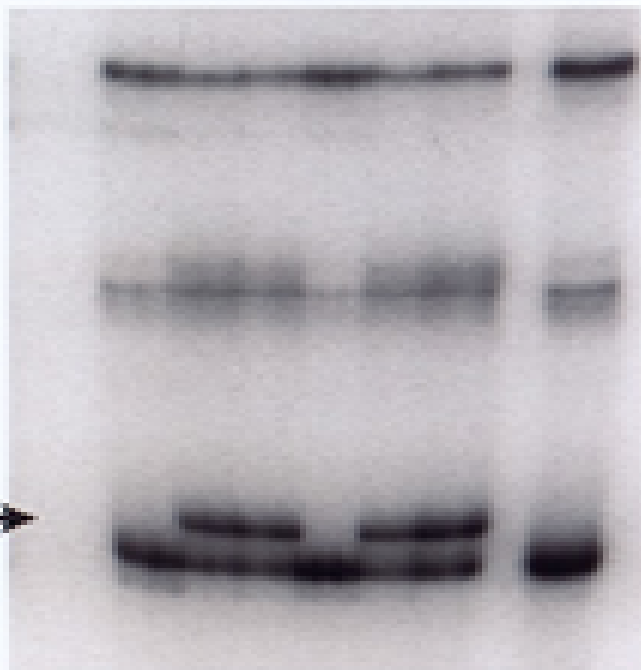
B. Family 1006



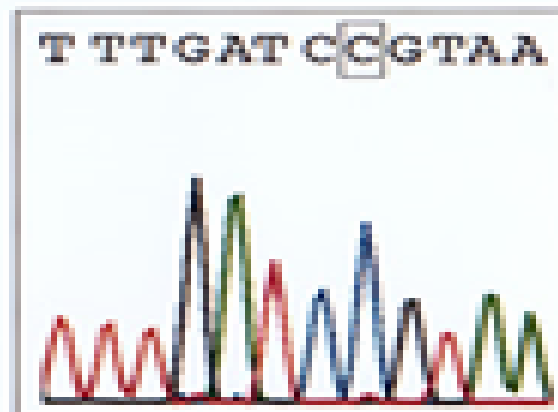
SSCP v diagnostike



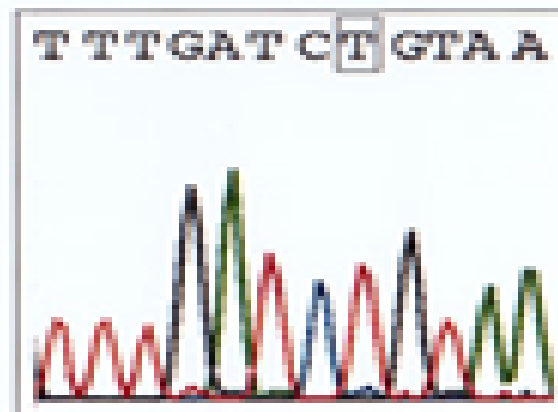
Normal control



Normal



P121L Mutation

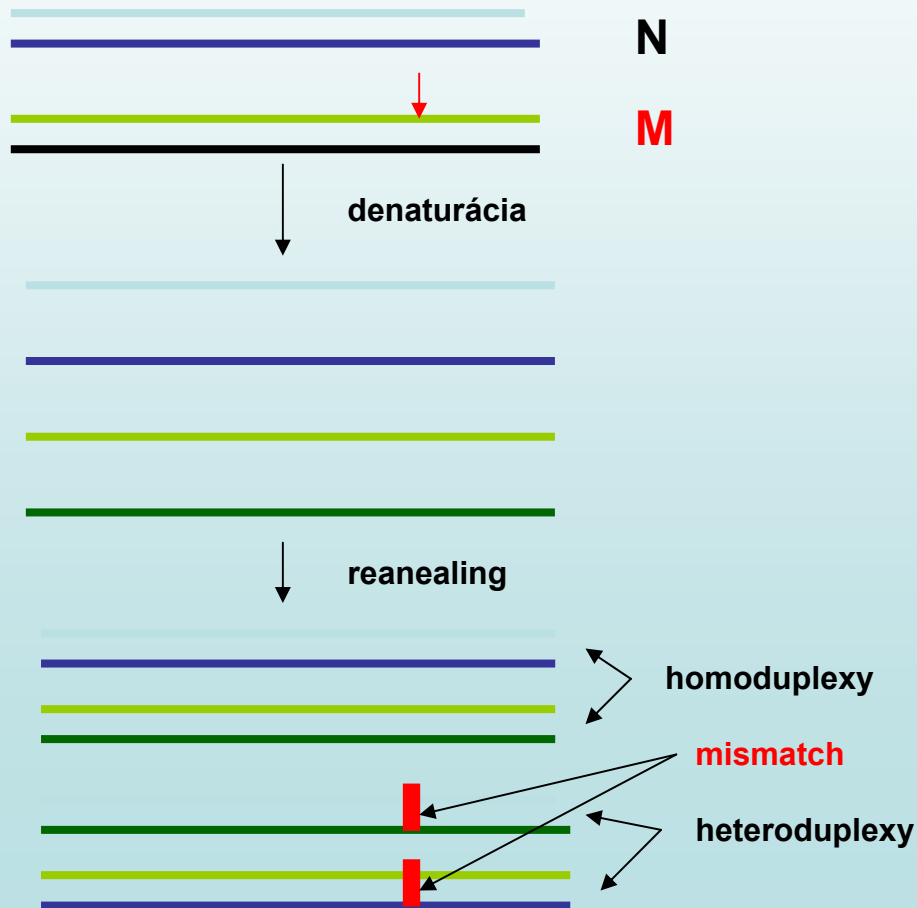


REF: Restriction Endonuclease Fingerprinting

- Teoretické východisko:
 - ide o modifikáciu SSCP
 - analyzovaný fragment sa separátne štiepi 5-6 RE (získa sa 10-12 dsDNA obsahujúcich mutáciu)
 - zmenená mobilita môže byť výsledkom:
 - zmenou sekundárnej štruktúry (SSCP komponent)
 - zmenou RM (RFLP komponent)
- Metodické prevedenie:
 - PCR generujeme fragment
 - fragment separátne štiepime RE
 - zmiešame štiepne produkty
 - SSCP elfo (nedenat. PAGE gél)
 - detekčná schopnosť: veľmi vysoká; potrebujeme referenčnú vzorku (bez mutácie)

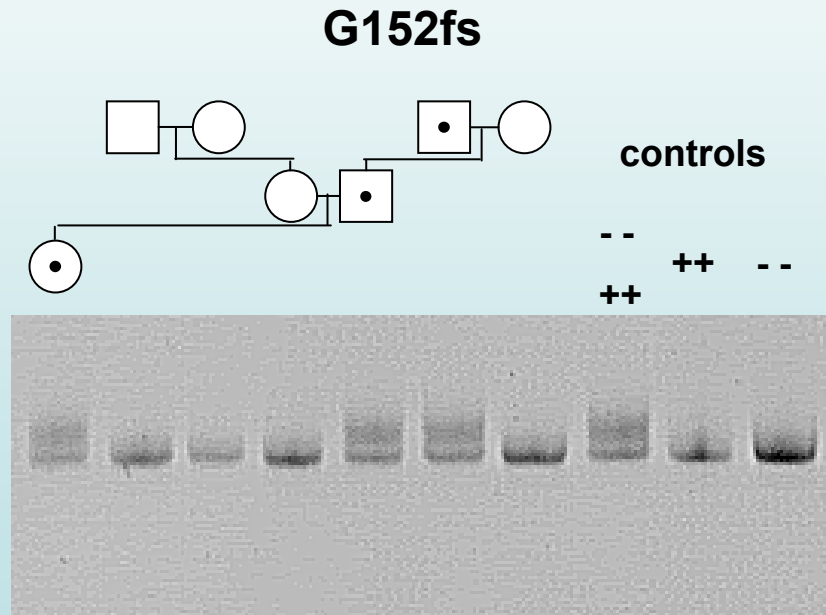
Metódy založené na analýze heteroduplexných NK

heteroduplex – dvojvláknová NK, ktorá nevykazuje úplnú komplementaritu báz



Heteroduplexová analýza

- heteroduplexy majú zníženú pohyblivosť v nenedenaturačných géloch
- HA analýza mutácie G152fs v HGO géne



DHPLC: Denaturing High-Performance Liquid Chromatography

Oefnar a Underhill 1998

Princíp: *detekcia prítomnosti heteroduplexov na základe ich kratšej retencie na chromatografickom nosiči za čiastočne denaturačných podmienok*

- nosič je pozitívne nabitý; DNA negatívne
- retencia dsDNA je funkciou elektrostatickej interakcie (retencia je závislá na dĺžke fragmentu)
- interakcia heteroduplexov je menej stabilná ako homoduplexov
- parciálna denaturácia heteroduplexov spôsobuje významný posun v ich retencii na nosiči

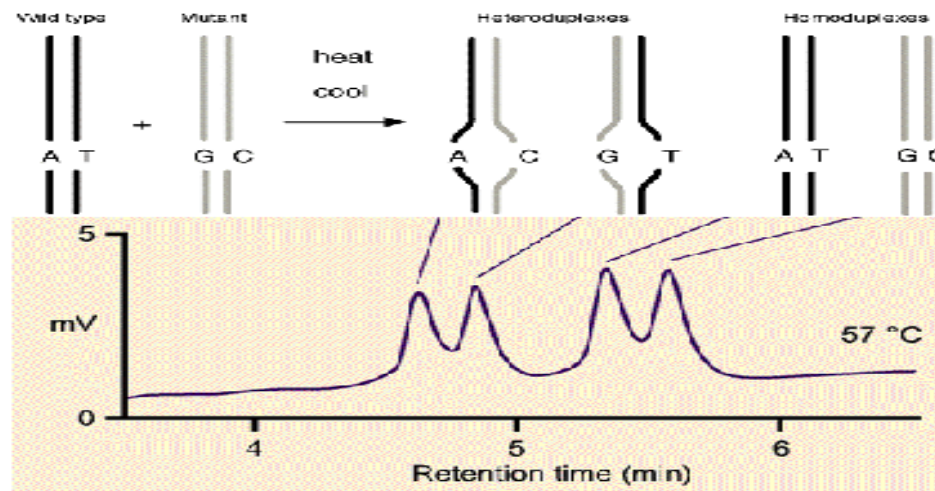
DHPLC – pokr.

Charakteristika DHPLC

- dĺžka fragmentov do 1,5 kb
- senzibilita a špecifita > **95 %**
- detegovateľné mutácie: **substitúcie, inzercie a delécie**
- rýchlosť: 3 – 5 min. na jeden fragment
- získanie fragmentov: **bežná PCR reakcia**
- odhalí prítomnosť mismatchu > samotnú mutáciu treba určiť sekvenovaním

DHPLC – pokr.

- parciálna denaturácia sa dá dosiahnúť teplotou (táto teplota sa dá stanoviť výpočtom na základe sekvencie fragmentu alebo empiricky)
- typickým obrazom DHPLC sú 4 píky (2 pre homoduplexy a 2 pre heteroduplexy)



DHPLC ... čo potrebujeme:



ale nemáme ...

Diagnostické metódy

RA: Restriction Analysis

- Teoretické východisko:
 - RE sú vysoko špecifické
 - mutácia: a) vytvorí nové RM
b) eliminuje existujúce RM
 - CpG dinukleotidy: mutačný „hot spot“ (prednostne využívame RE s CpG v cieľovej sekvencii)
- Metodický prístup:
 - Southernova hybridizácia
 - PCR
- Charakteristika:
 - dĺžka fragmentov: pri SH neobmedzná, pri PCR limitovaná PCR
 - detekčná schopnosť pod 50%
 - používa sa aj ako diagnostická metóda (bežná, historicky prvá)

ACRS: Amplification Created Restriction Site

Rozširuje RA na prípady, keď mutácia nevytvorí ani neeliminuje RM

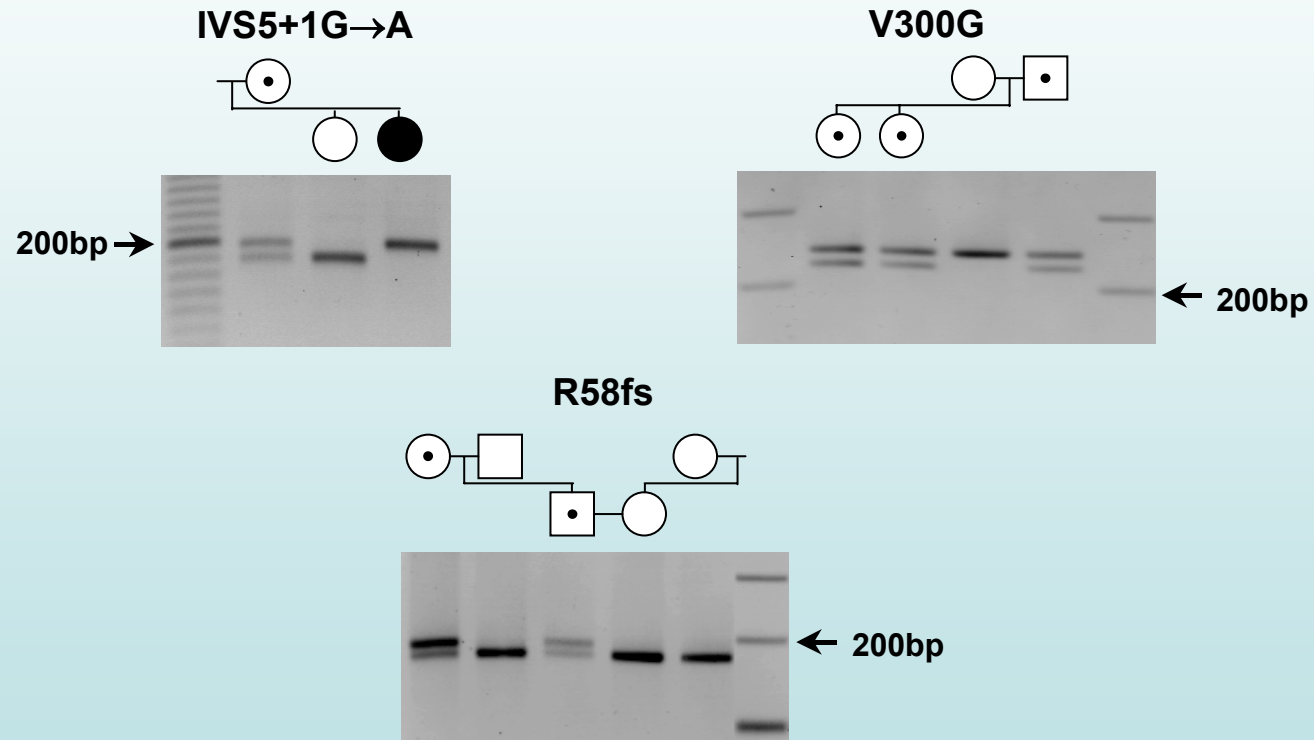
- Princíp:

pomocou PCR zavedieme do nemutovanej alely RM, ktoré je prípadnou mutáciou eliminované

- Metodický postup:

- PCR s jedným upraveným primerom
- restričné štiepenie
- elektroforéza
- vizualizácia

ACRS: detekcia mutácií v géne HGO



ASO: Allele Specific Oligonucleotides

SSO: Sequence Specific Oligonucleotides

Princíp: pre každý oligonukleotid sa dajú určiť podmienky denaturácie, pri ktorých len úplná komplementarita zabezpečuje stabilitu dvojvláknovej štruktúry.

Metodický postup:

- PCR testovaného úseku
- dot/slot blot hybridizácia na membráne
 - analýza jednej mutácie – zakotvenie testovaného fragmentu
 - analýza viac mutácií – zakotvenie panelu oligonukleotidov

ARMS: Amplification Refractory Mutation System

ASA: Allele Specific Amplification

- *Princíp:* mismatch PCR primeru na 3'konci znemožňuje PCR

- **Metodické prevedenie:**

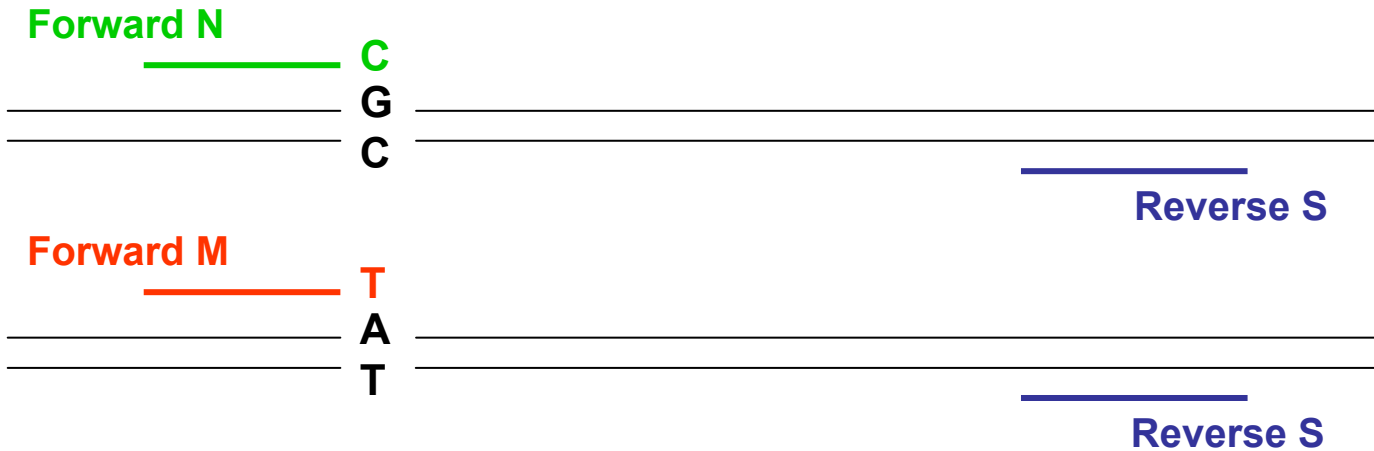
- 3 primery:

- 1 špec. pre normálnu alelu (N) – forward primer
 - 1 špec. pre mutovanú alelu (M) – forward primer
 - 1 spoločný (S) - reverse primer
 - plus pár primerov pre kontrolnú PCR reakciu

- 2 PCR reakcie:

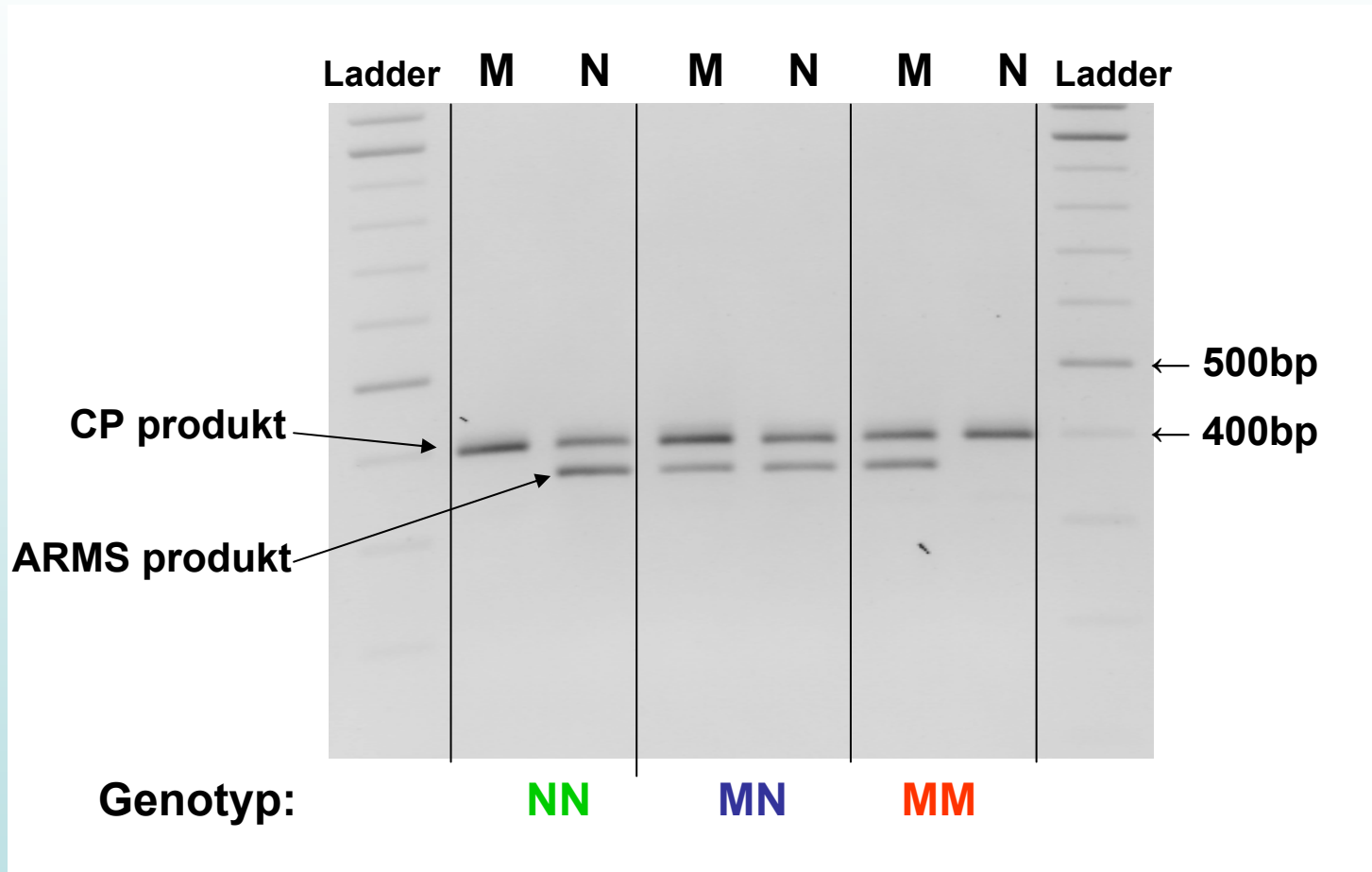
- | | N N | N M | M M |
|--------------|------------|------------|------------|
| • 1. PCR S-N | + | + | - |
| • 2. PCR S-M | - | + | + |

ARMS-PCR: princíp

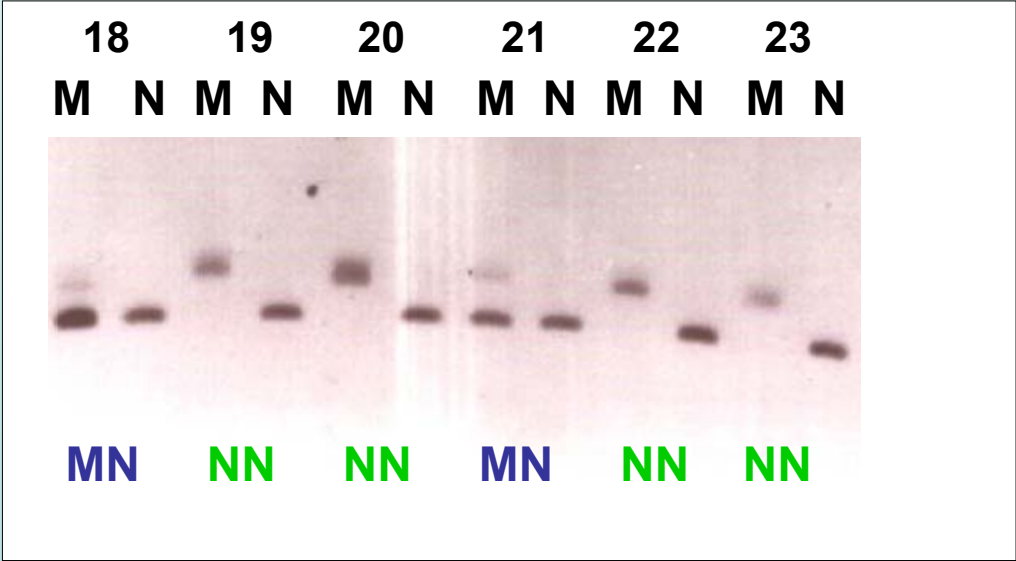
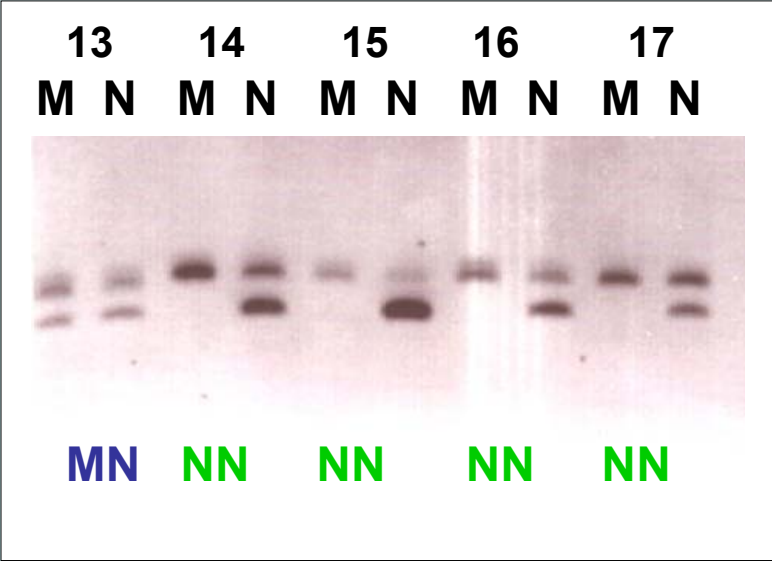
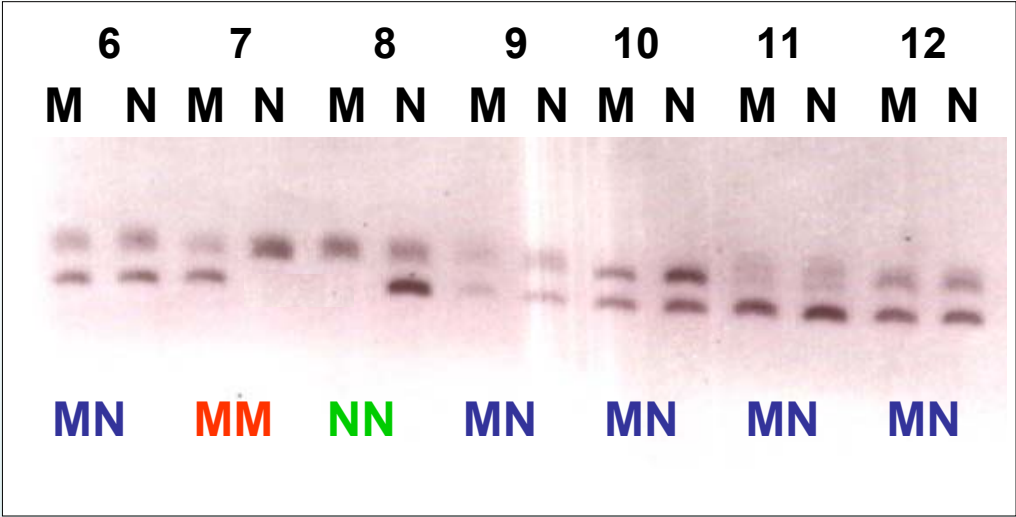
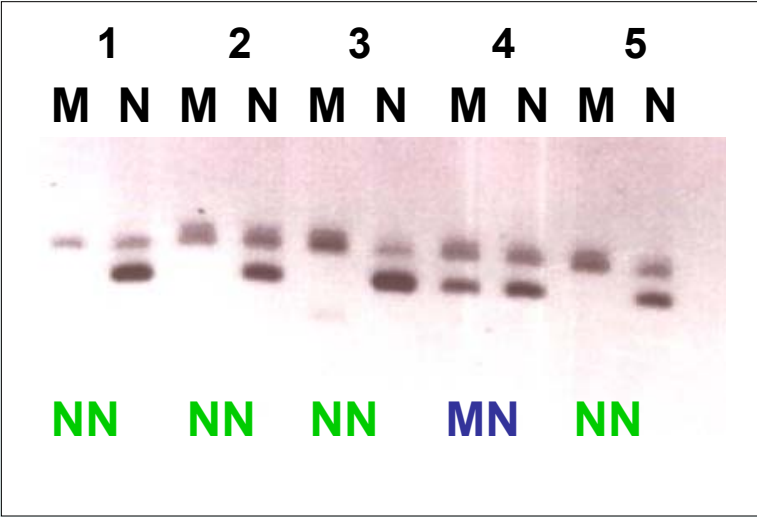


ARMS primery	M + S	N + S
PCR produkty: MM	+	-
PCR produkty: MN	+	+
PCR produkty: NN	-	+

Vyšetrenie 2. exónu génu *GJB2* na mutáciu R127H pomocou ARMS-PCR



ARMS: populačná štúdia



TaqMan (Real-time PCR)

TaqMan špecifická sonda: „reporter“ a „quencher“
DNA polymeráza pri PCR sondu odbúrava: reportér svieti

TaqMan sonda



denaturácia



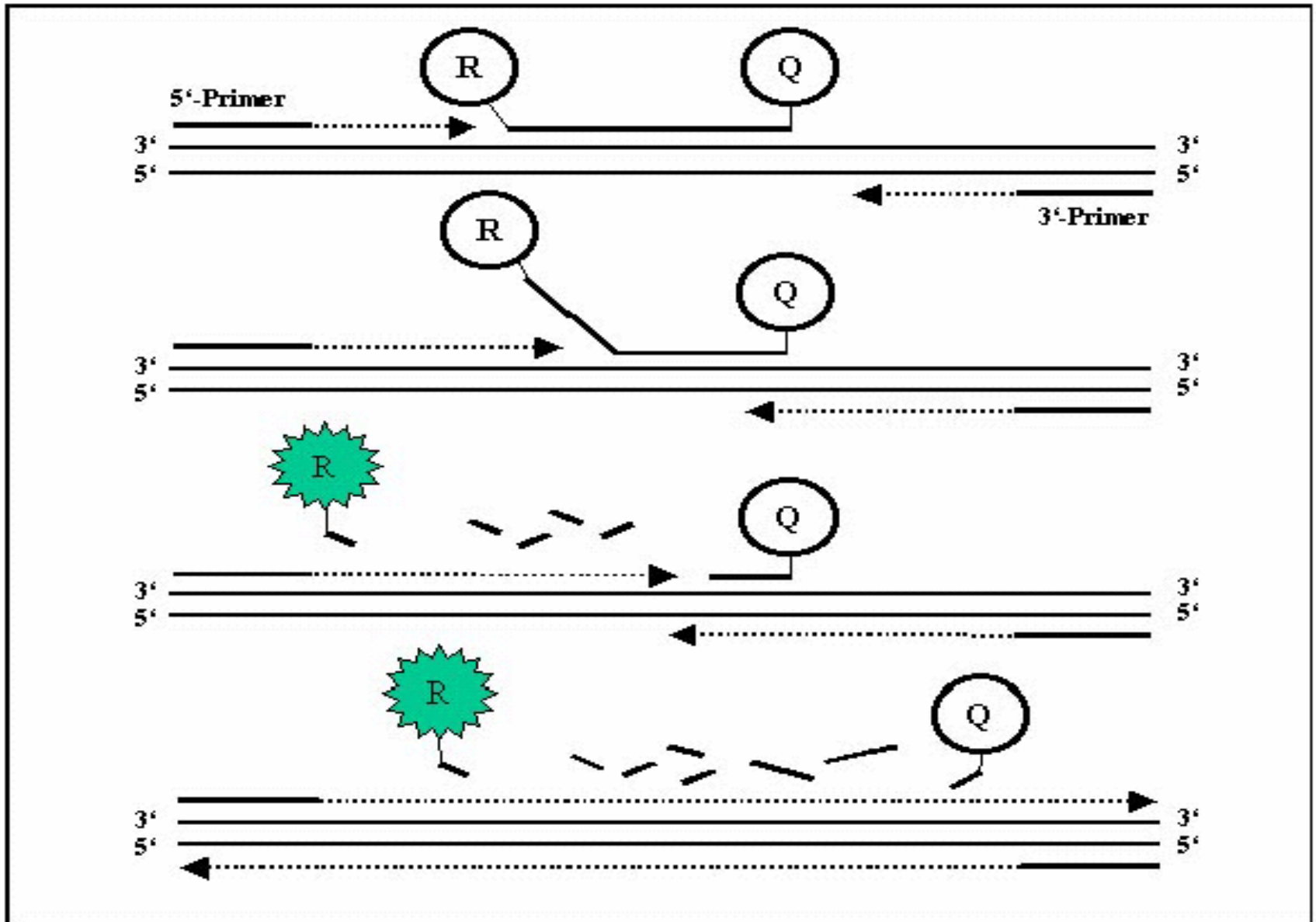
annealing



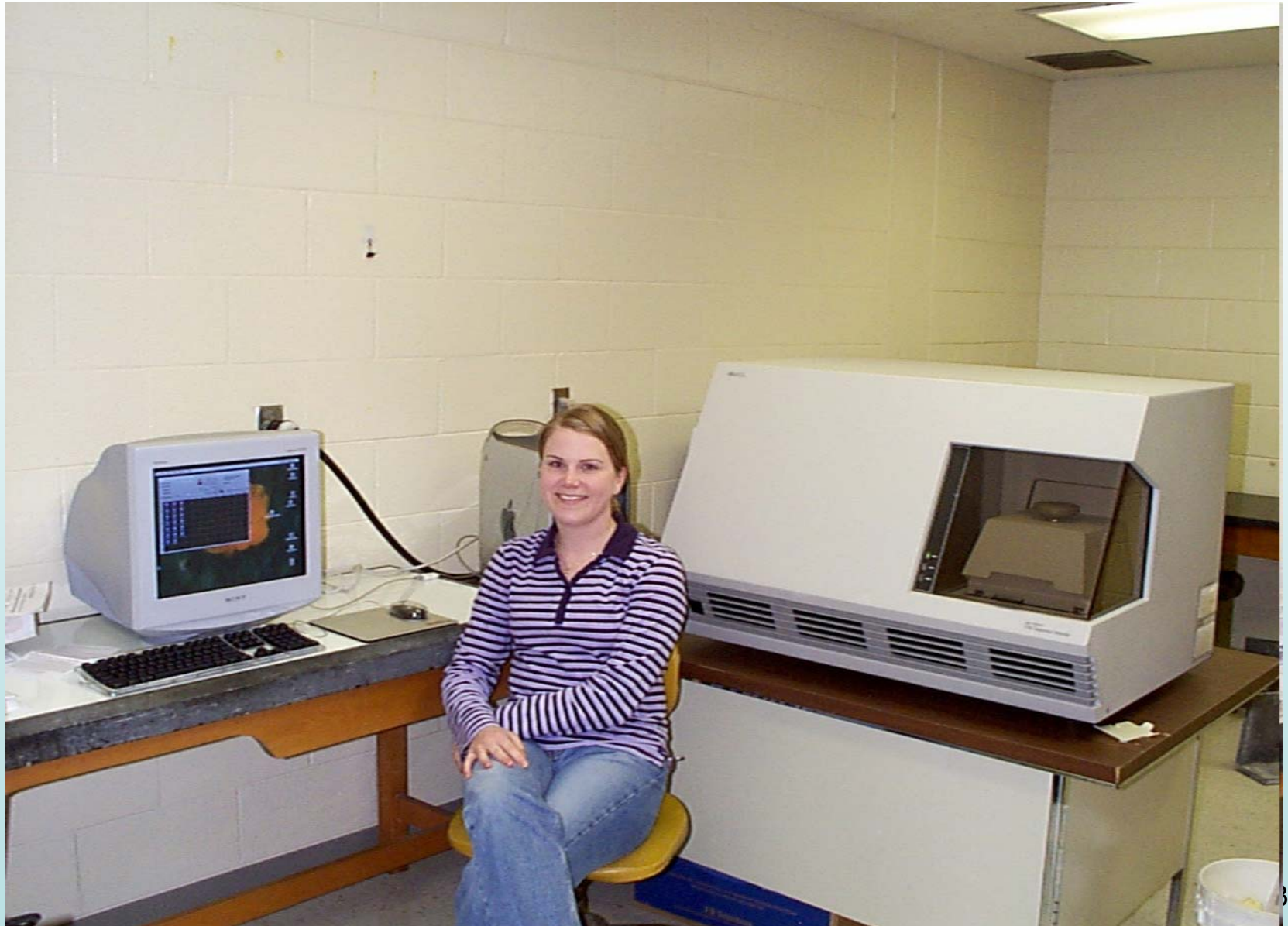
polymerizácia



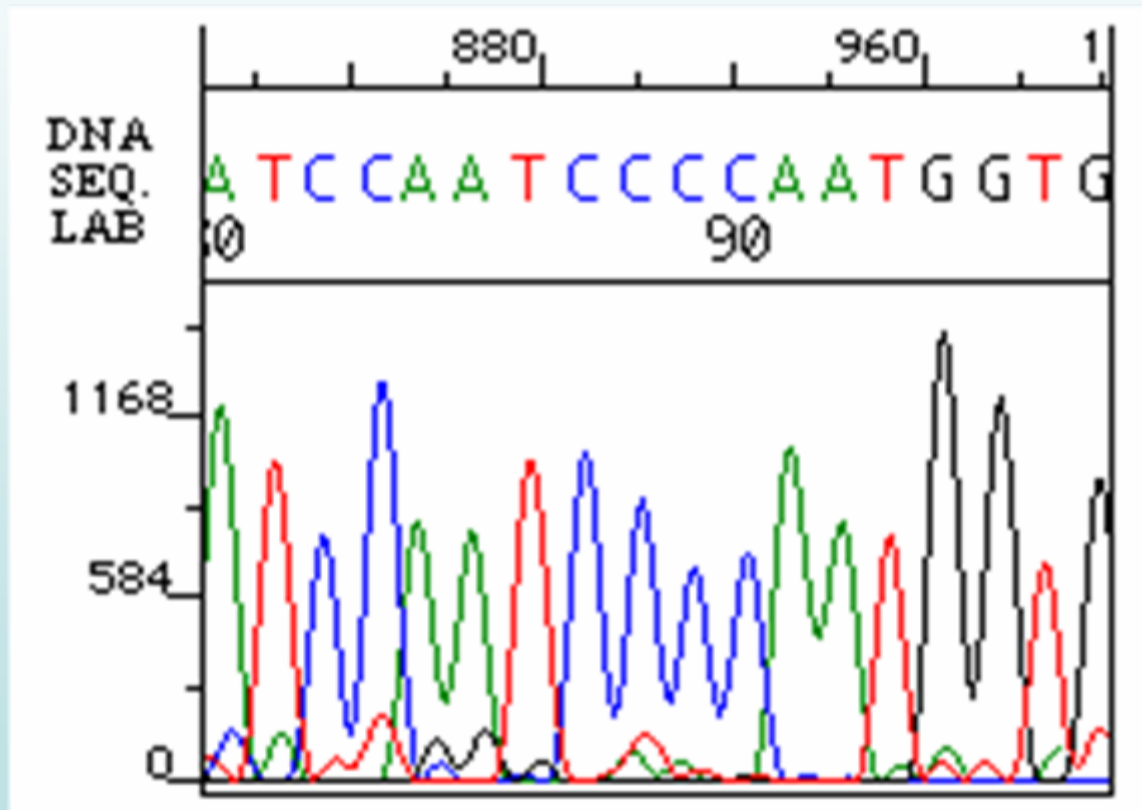
TaqMan: priebeh



TaqMan 7700



Perspektíva: sekvenovanie – aj ako diagnostická, aj ako skriningová metóda



Celera's sequencing center in Rockville, MD.



PTT – Protein Truncation Test

Metóda na identifikáciu mutácií skracujúcich príslušný polypeptid (non-sense mutácie, splicingové mutácie, frame shift, ..)

Metodický postup:

- PCR generácia templátu
 - súčasne sa pridáva promótorová sekvencia T7 bakteriofága a eukaryotický iniciačný signál translácie
- simultánna *in vitro* transkripcia a translácia
 - v systéme lyzátu králičích retikulocytov s použitím značených aminokyselín
- elfo v SDS-PAGE
- autorádiografia
 - mutácia sa prejaví ako prítomnosť skráteného polypeptidu
- **výhoda:** detekcia viac mutácií v príslušnom géne (napr. mutácie zapríčiňujúce familiárnu adenomatóznu polypózu, FAP)