

# Dědičné choroby

Narozené děti

5% vrozená choroba

0,5% chromozomální anomálie

1% monogenně dědičné choroby

Ostatní choroby jsou multifaktoriálně dědičné nebo způsobené vnějšími faktory.

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

Vrozené choroby jsou 5. nejčastější příčina úmrtí.

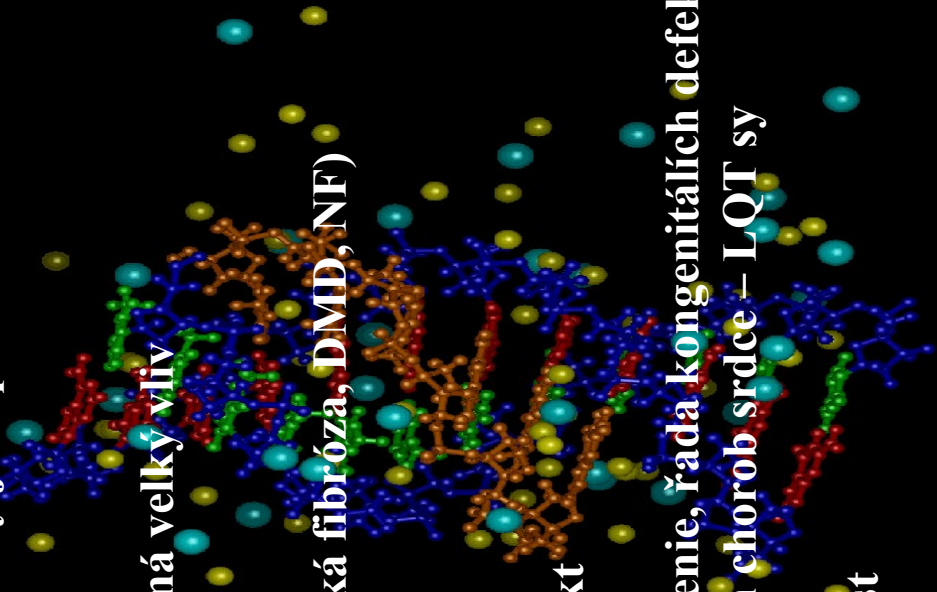
Většina úmrtí je způsobena

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

# Hlavní typy genetických chorob

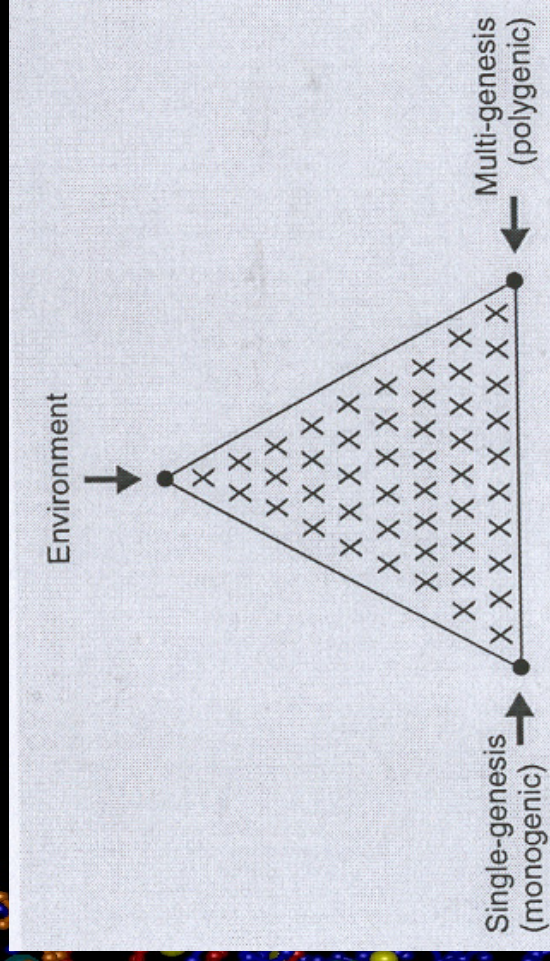
Geneticky determinované choroby jsou klasifikovány do 4 hlavních kategorií

- **Chromozomální choroby**
  - ✓ Jsou výsledkem adicí nebo delecí celých chromozomů nebo jejich částí
  - ✓ Většina je charakterizována růstovou retardací, mentální retardací a rozmanitými somatickými abnormalitami
  - ✓ Klinicky signifikantní chromozomální abnormality jsou příčinou 2,5% dětských úmrtí
- **Monogenní choroby**
  - ✓ Jsou způsobeny mutací v jednom genu, která má velký vliv na pacientovo zdraví
  - ✓ Mendelistská dědičnost
  - ✓ Známo 6 000 chorob (srpkovitá anemie, cystická fibróza, DMD, NF)
  - ✓ Příčina 5-10% dětských úmrtí
- **Polygenní choroby**
  - ✓ Vznikají interakcí multiplexu genů, každý z nich může mít relativně minoritní efekt
  - ✓ Příčina 25-30% dětských úmrtí
  - ✓ Příklad: diabetes melitus, hypertenze, schizofrenie, řada kongenitálních defektů jako rozštěp rtu a patra, většina kongenitálních chorob srdce – LQT sy
- **Genetické defekty somatických buněk**
  - ✓ Mutace v genech, které kontrolují buněčný růst



# Geny a choroby

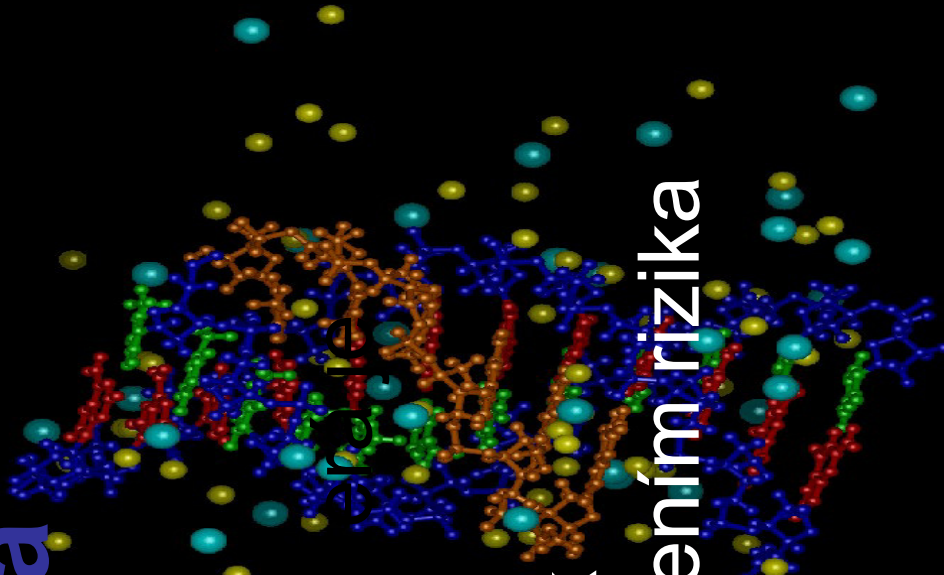
Scéma vztahu mezi monogenními, polygenními a multifaktoriálními chorobami



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

# DNA diagnostika

- **potvrdit diagnózu**  
podmíněna genovou mutací
- **zjistit genetické dispozice** k  
onemocnění v rodinách s určením rizika  
u potomků
- **přímá DNA diagnostika:** zjistí, zda analyzovaná DNA nese  
či nenes mutaci
- **nepřímá DNA diagnostika:** užitím vazebních markerů v  
rodiných studiích odhalí chromozom v asociaci s nemocí v rodině



# Přímá DNA diagnostika

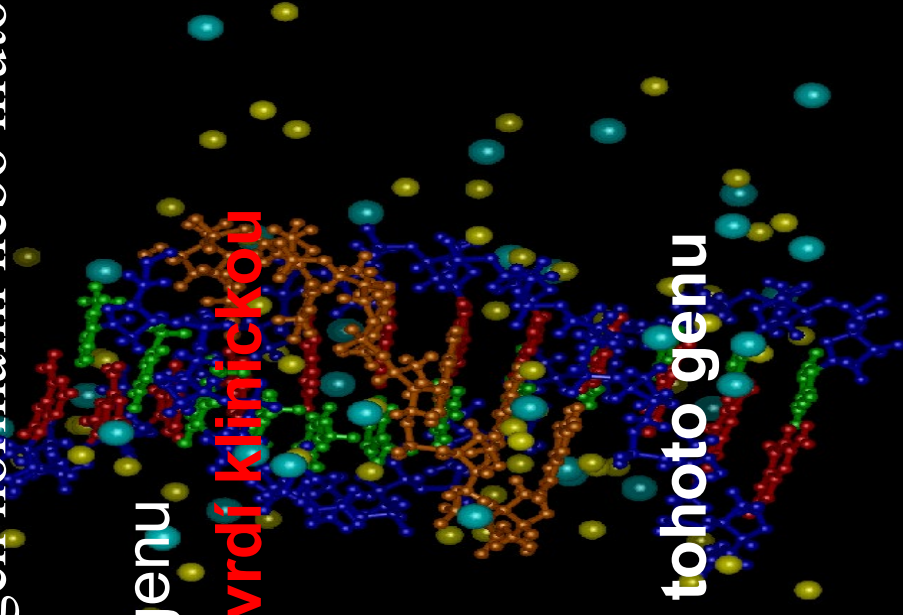
Zjistí, zda DNA testované osoby nese gen normální nebo mutovaný

- **Detekce mutací v odpovědném genu**

**vždy potvrdí klinickou  
diagnózu**

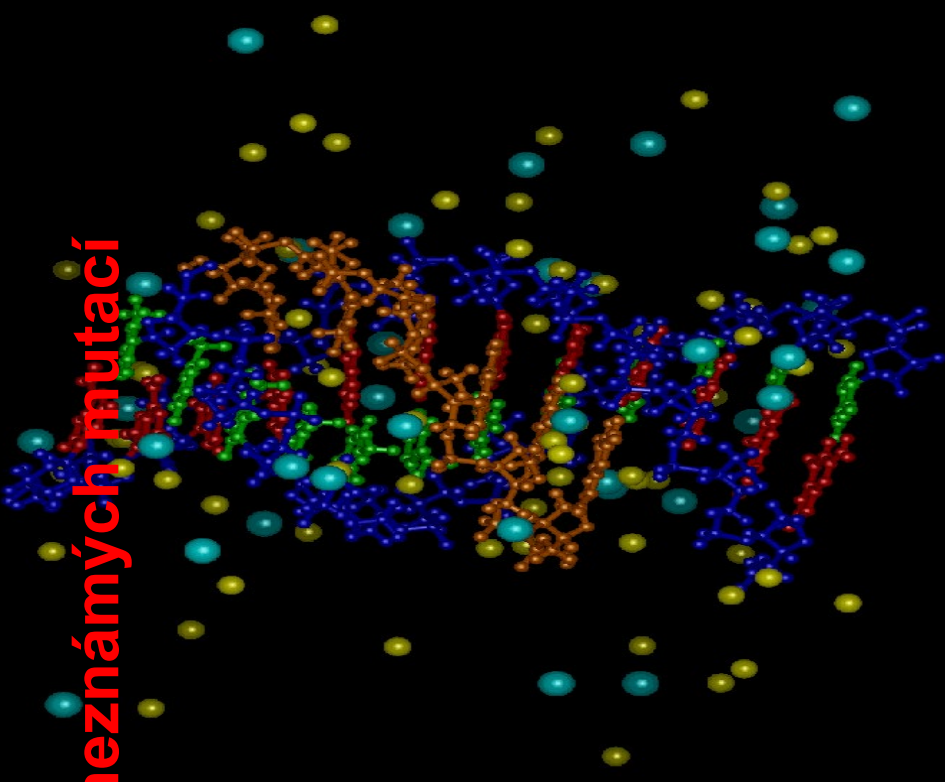
**musíme znát:**

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



# Přímá DNA diagnostika

- **Metoda přímé detekce již známých mutací**
- **Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (screenovací metody)**



# Metoda přímé detekce již známých mutací

Detekce známé sekvenční změny je možná u:

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



# Příklady chorob s vymezeným počtem mutací

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

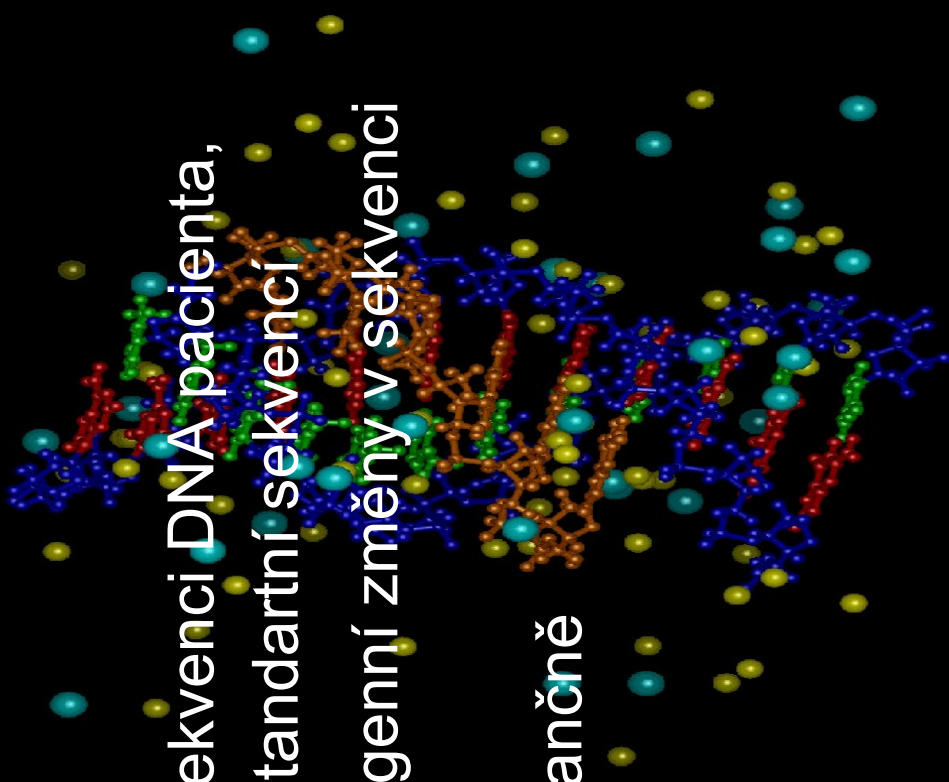
# Metody detekce známých mutací

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



# Přímá DNA diagnostika

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

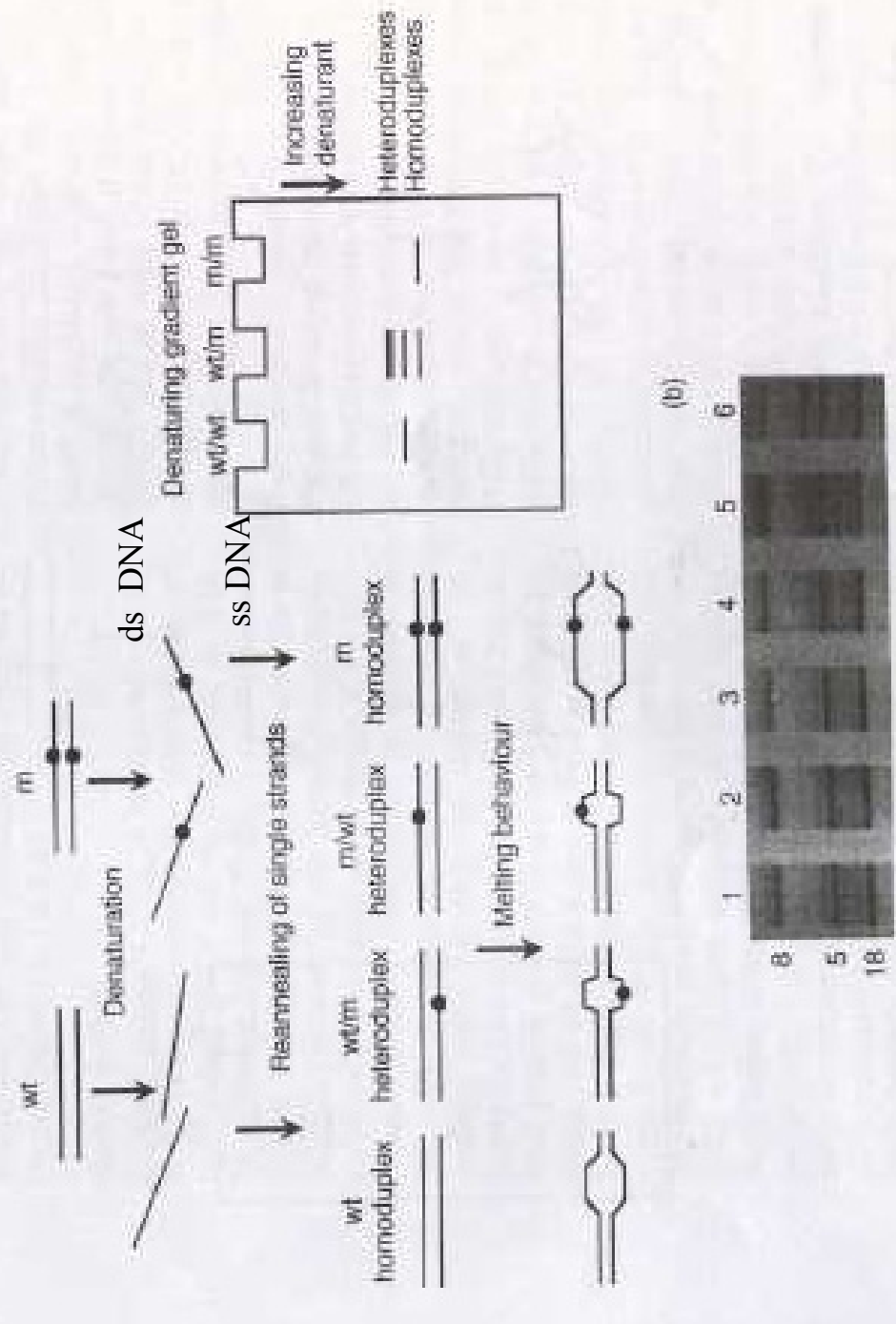


# Nejčastěji používané vyhledávací metody

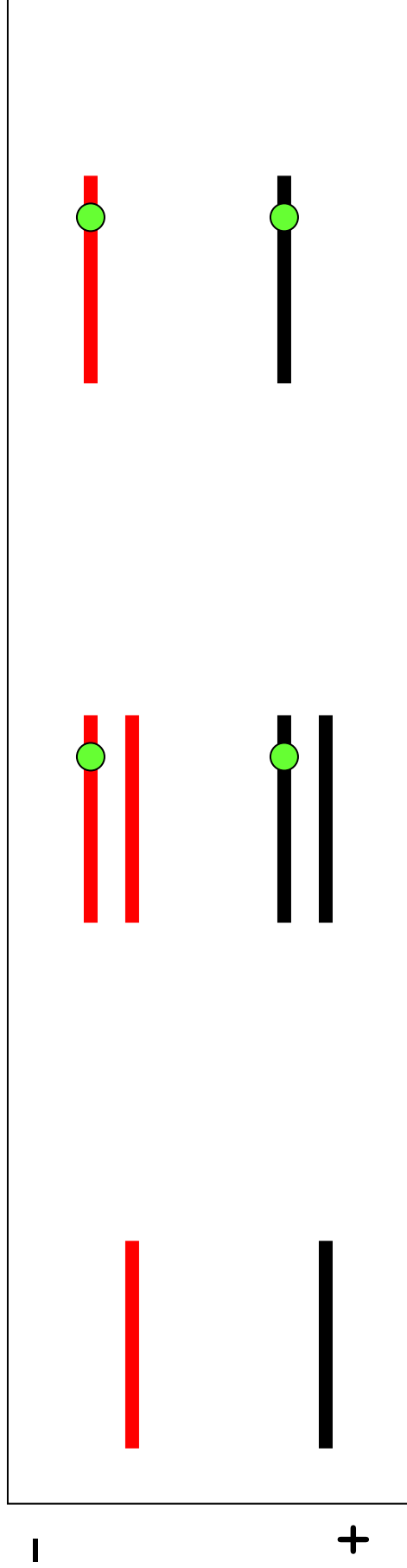
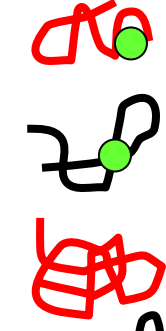
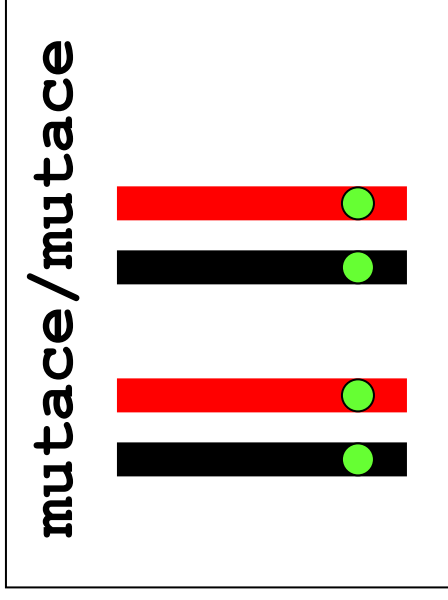
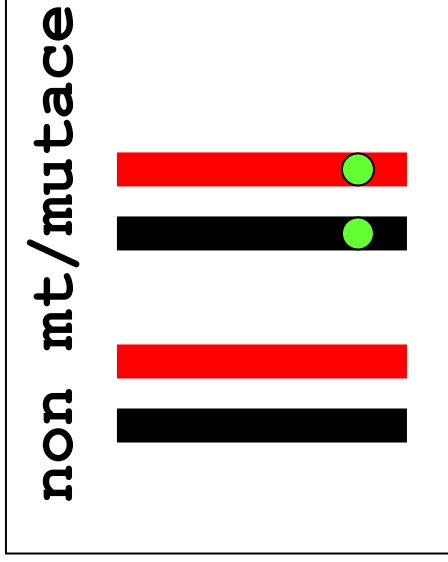
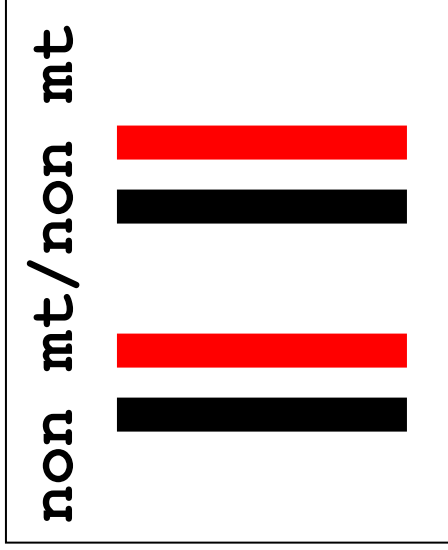
Jednotězcový konformační polymorfismus (SSCP)	jednoduchá metoda	doporučuje se pro krátké sekvence DNA neodhaluje pozici změny
Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	vysoká citlivost	primery s „GC-clampy“ neodhaluje pozici změny
Heteroduplexní analýza (HD)	velmi snadná	doporučuje se pro krátké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



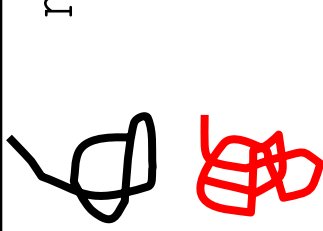
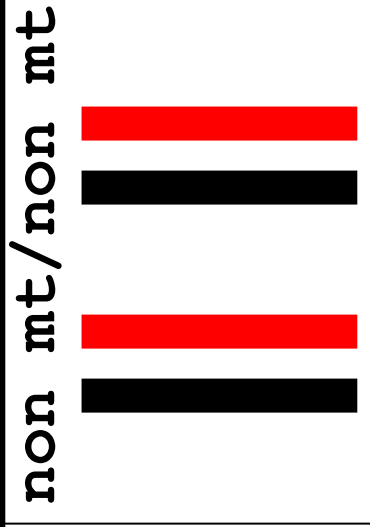
# Princip metody DGGE



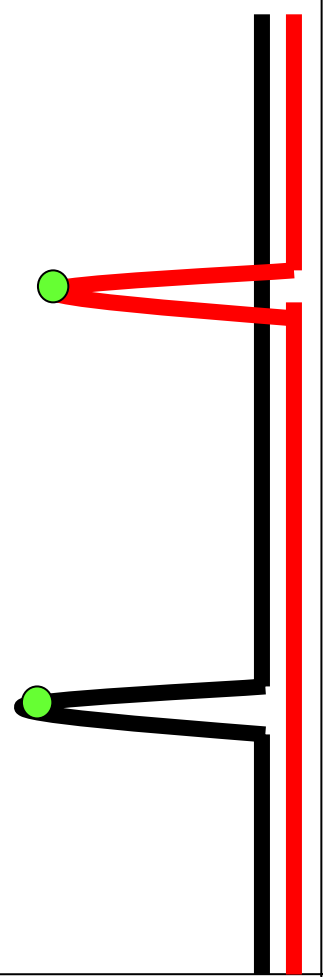
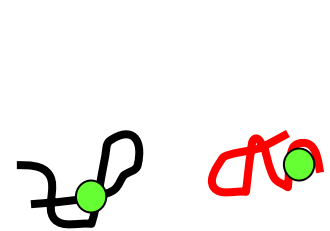
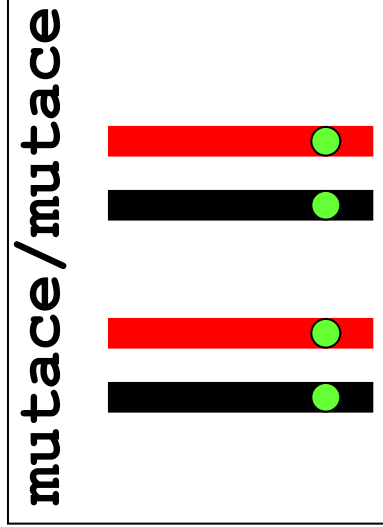
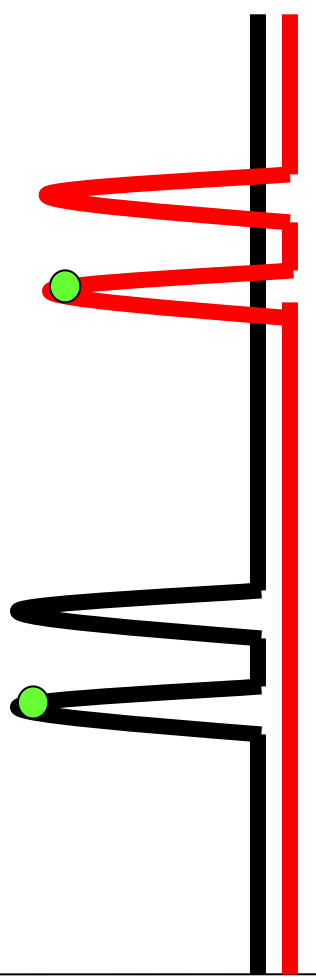
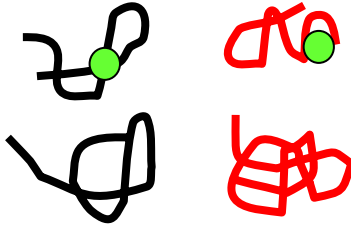
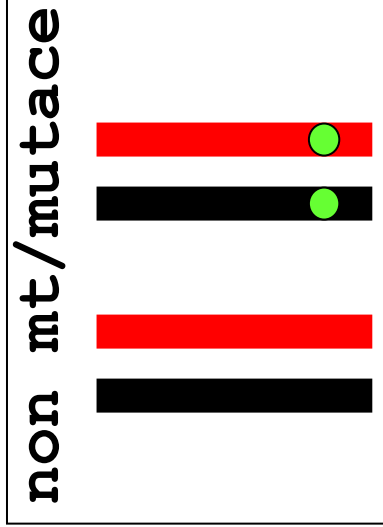
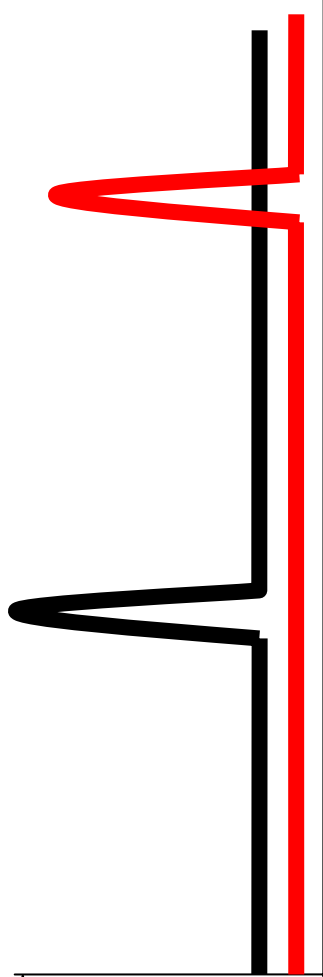
# SSCP na gelu



# SSCP v kapiláře

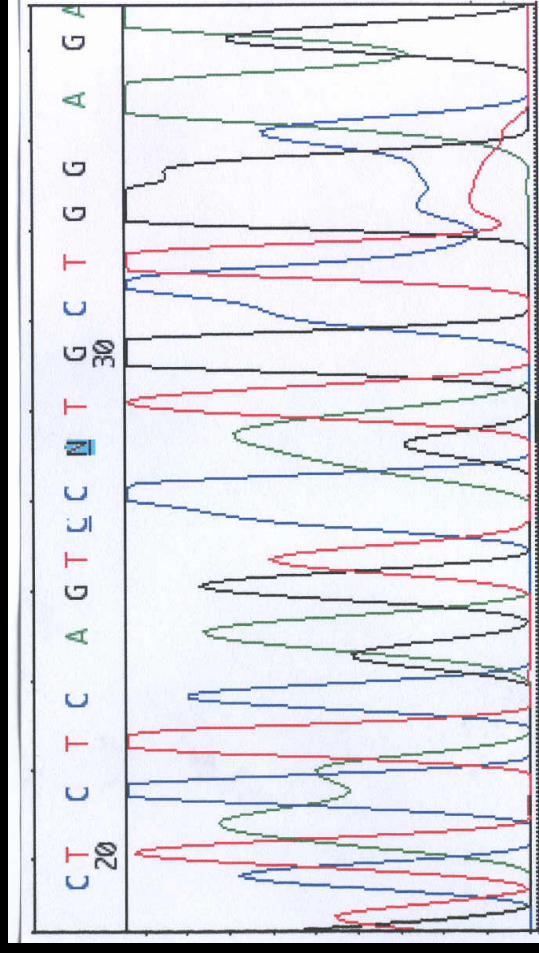
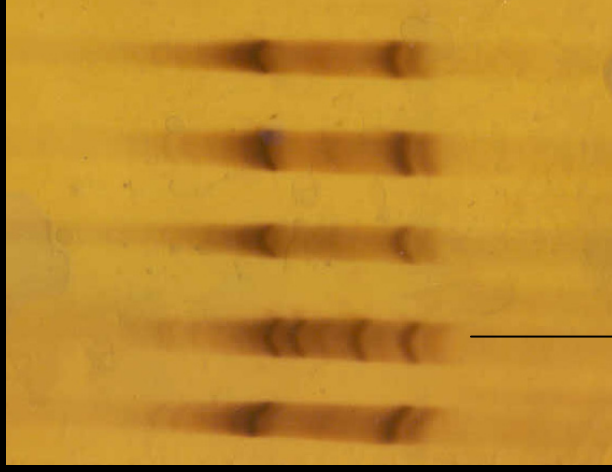


mV



čas

# SSCP na gelu



dráha: 1.-4. DNA pacientů  
5. wt



# Cystická fibróza

nejčastěji se vyskytující  
autozomálně recesivní dědičná  
metabolická porucha  
v zakavkazské populaci



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

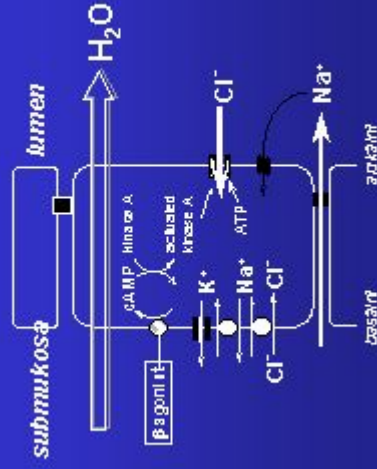
# Základní fyziologický defekt při onemocnění CF

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

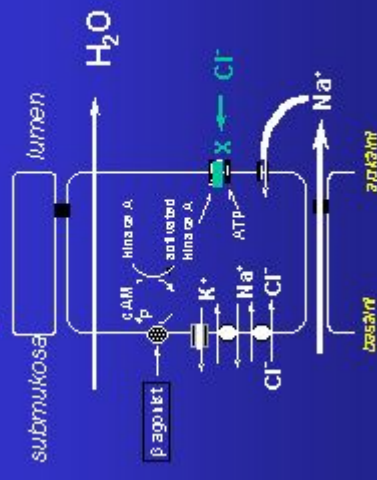
některé exokrinní žlázy produkují  
hustý, lepkavý hlen

tím zapříčiněny  
hlavní symptomy nemoci

## Normální stav



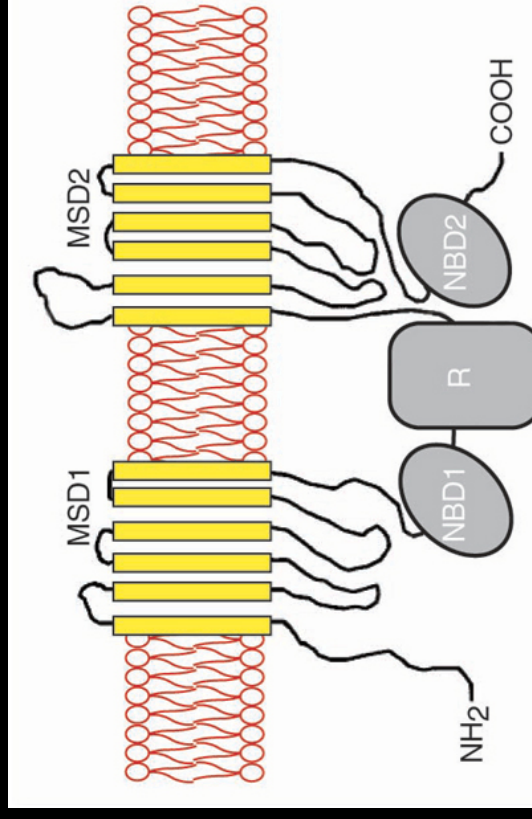
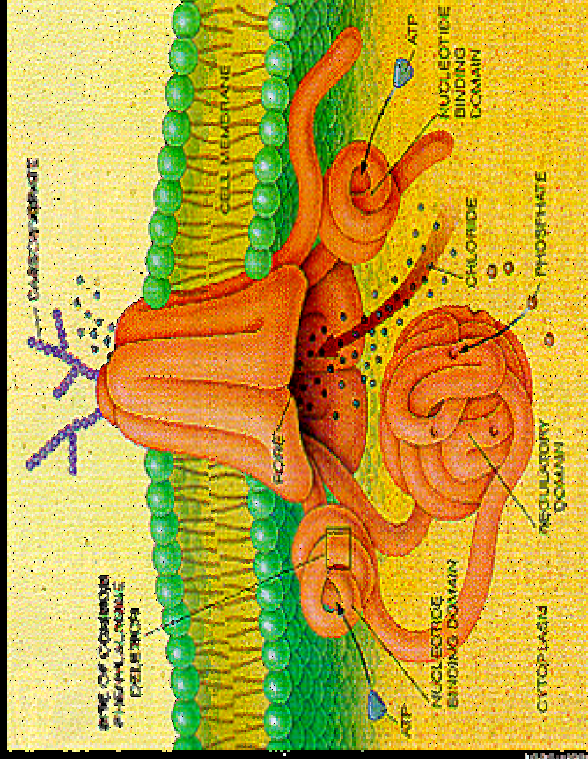
## Cystická fibróza



# Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein CFTR

chloridový kanál regulující transportů přes buněčnou membránu

- cyklický adenosin monofosfát
- lokalizovaný v apikální membráně epitelálních buněk

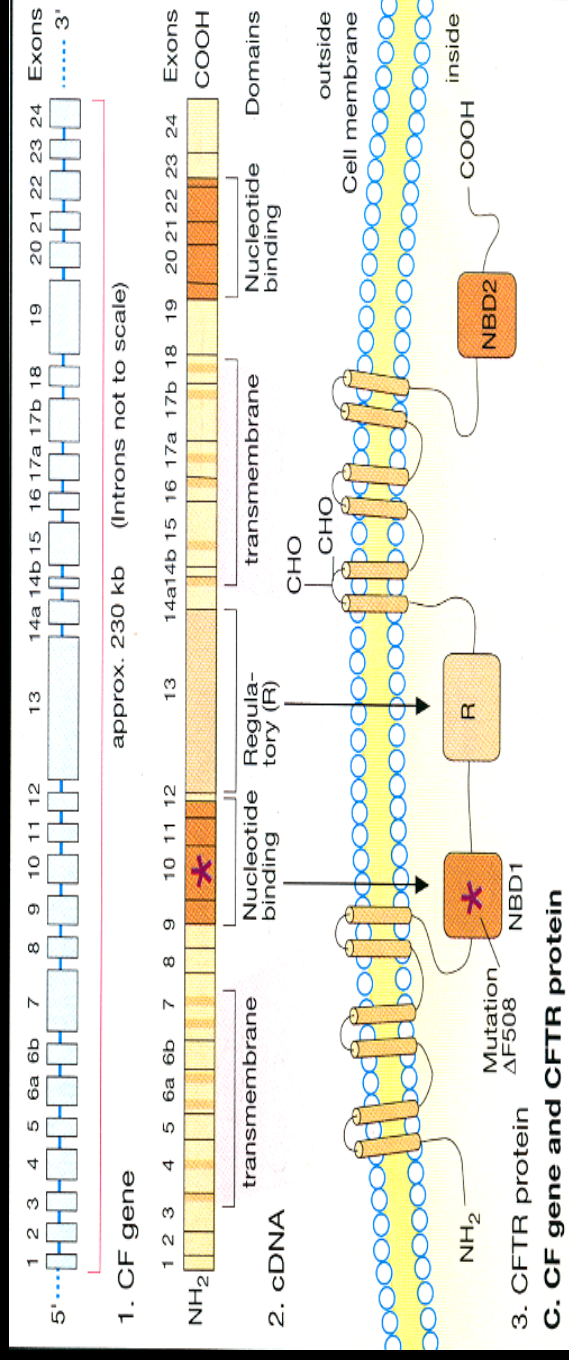


- Tvořen 5ti doménami:
  - 2 membrane spanning domains
  - 2 nucleotide binding domains
  - 1 regulatory domain

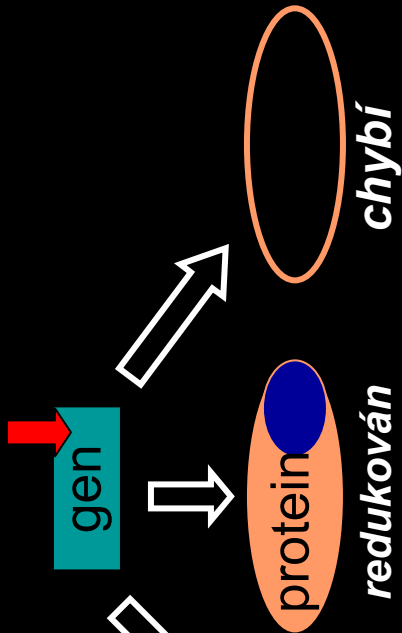
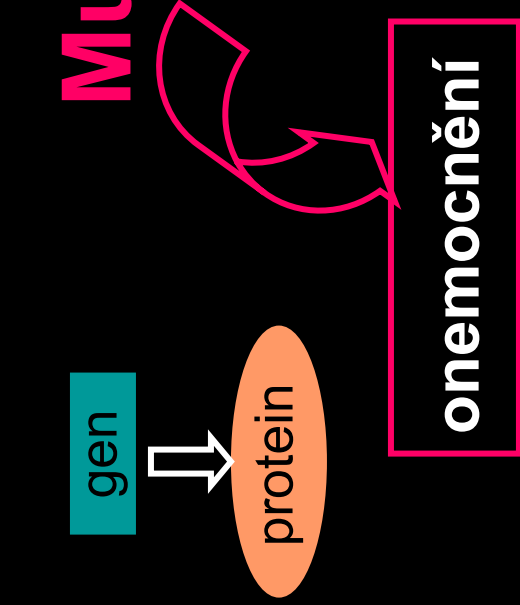
# CFTR gen

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

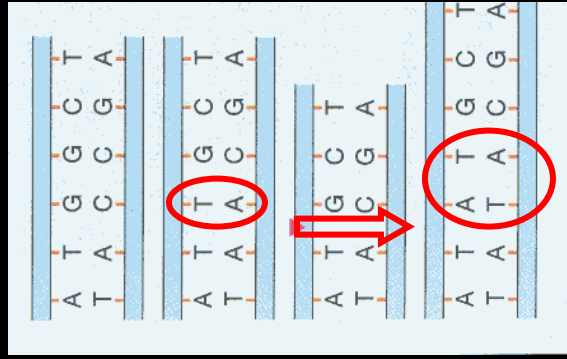
Mutace v tomto genu způsobují onemocnění CF



# Mutace:



## Typy mutací



wildtype

substitute

delece

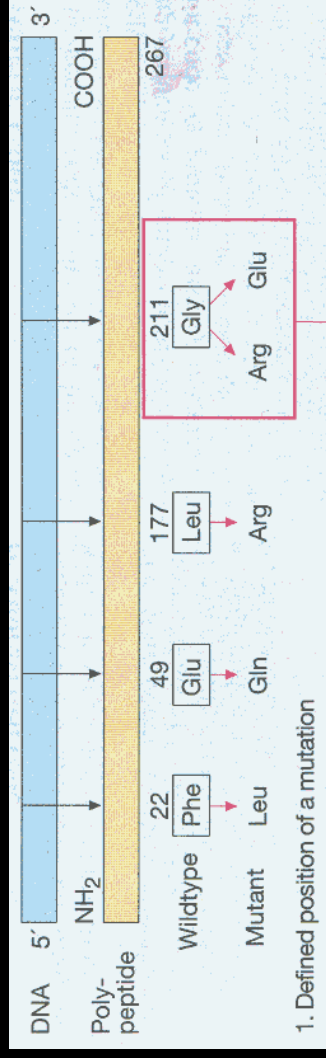
inzerce

nonsense → G542X

missense → N1303K

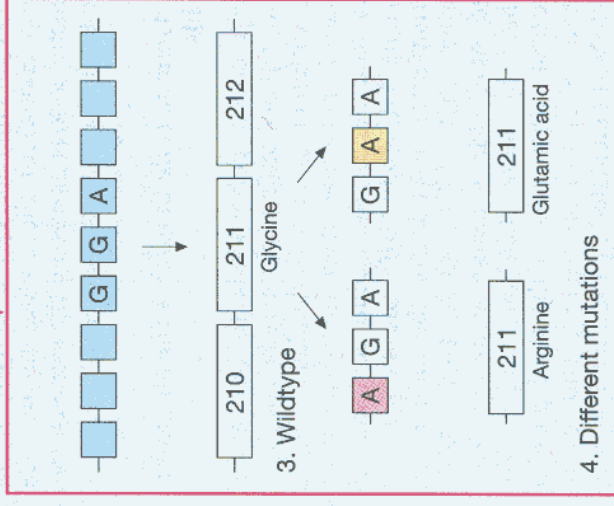
dF508

390insT



1. Defined position of a mutation

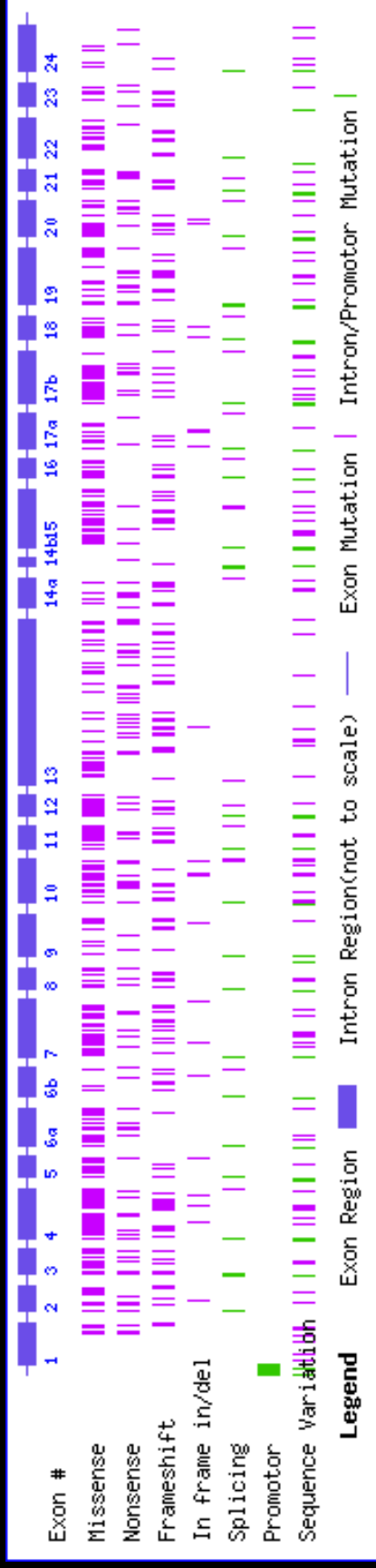
2. Different mutations of one codon



4. Different mutations

# CFTR mutace

- 1291 CFTR mutací bylo nalezeno v CFTR genu (CFTR Mutation Table; <http://www.genet.sickkids.on.ca./cftr-cgi-bin/FullTable>)
- Většina z nich je raritní, „privátní“ nebo jejich vztah k CF nebyl prokázán
- Z celkového počtu 30ti doposud u nás nalezených mutací (zahrnujících celkem 95% všech CF alel) se pouze 8 mutací vyskytuje na více než 1% CF patologických alel
- Je pozorováno široké rozpětí ve frekvenci jednotlivých mutací u různých populací
- **Nejčastější mutace dF508 je detekována u cca 70% CF pacientů**

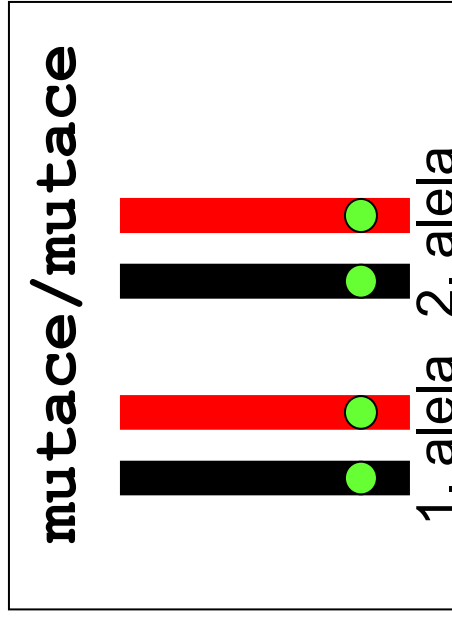
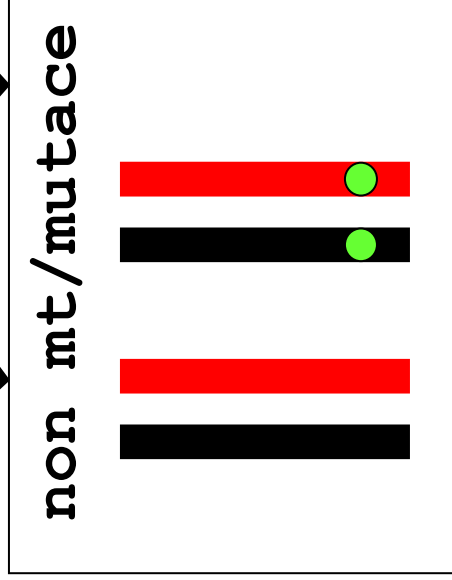
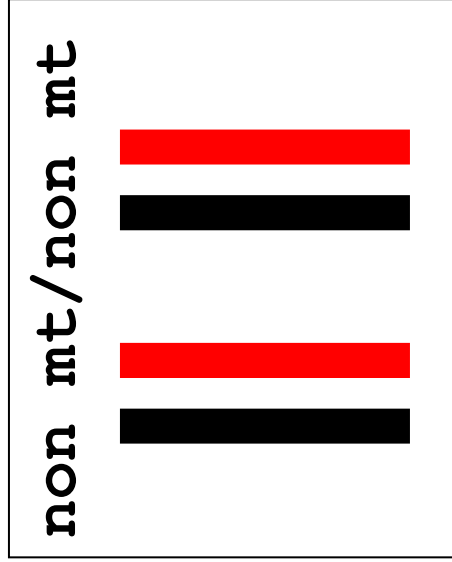
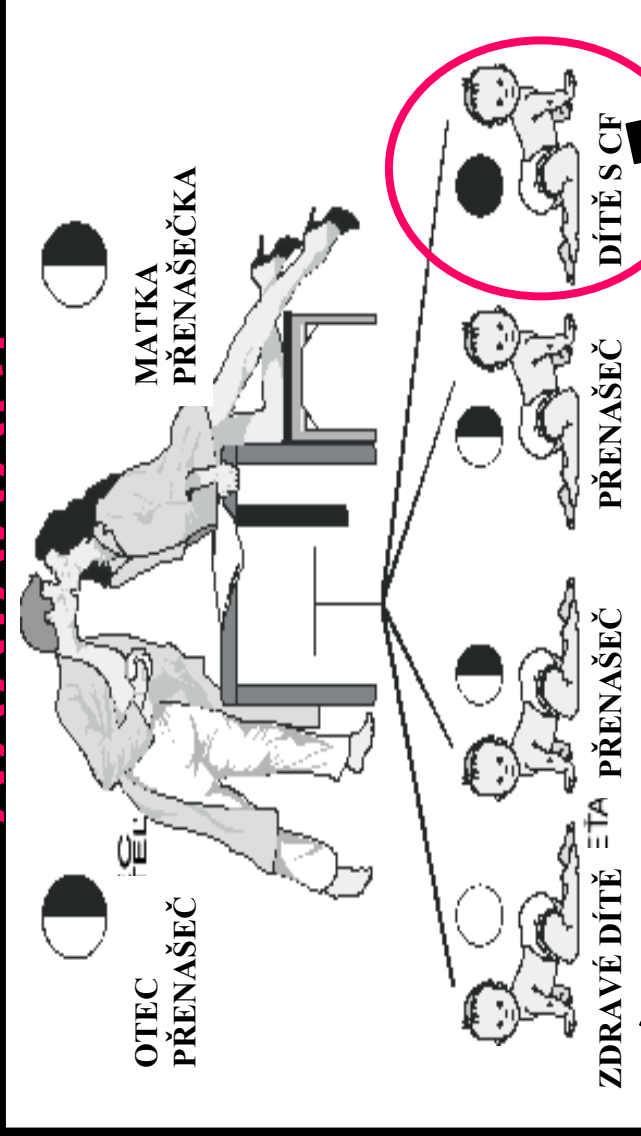


# Mutace v genu CFTR u českých CF pacientů

- **dF508** 71,57%
- dele2,3(21kb) 4,64%
- G551D 4,03%
- N1303K 3,02 %
- G542X 2,22%
- 1898+1GtoA 2,02%
- 2143delT 1,21%
- R347P 0,81%
- W1282X 0,60%
- 4374+1GtoA, 1717-1GtoA, R1162X, E92X, 2184insA, 3849+10kb  
každá 0,4%
- R334W, R553X, 621+1GtoT, .....  
každá 0,2%

# CF - autosomálně recesivní

## dědičnost





**CF**

# **polysystémové onemocnění**

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

## plíce

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

## játra

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

## slinivka břišní

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

## tenké střevo

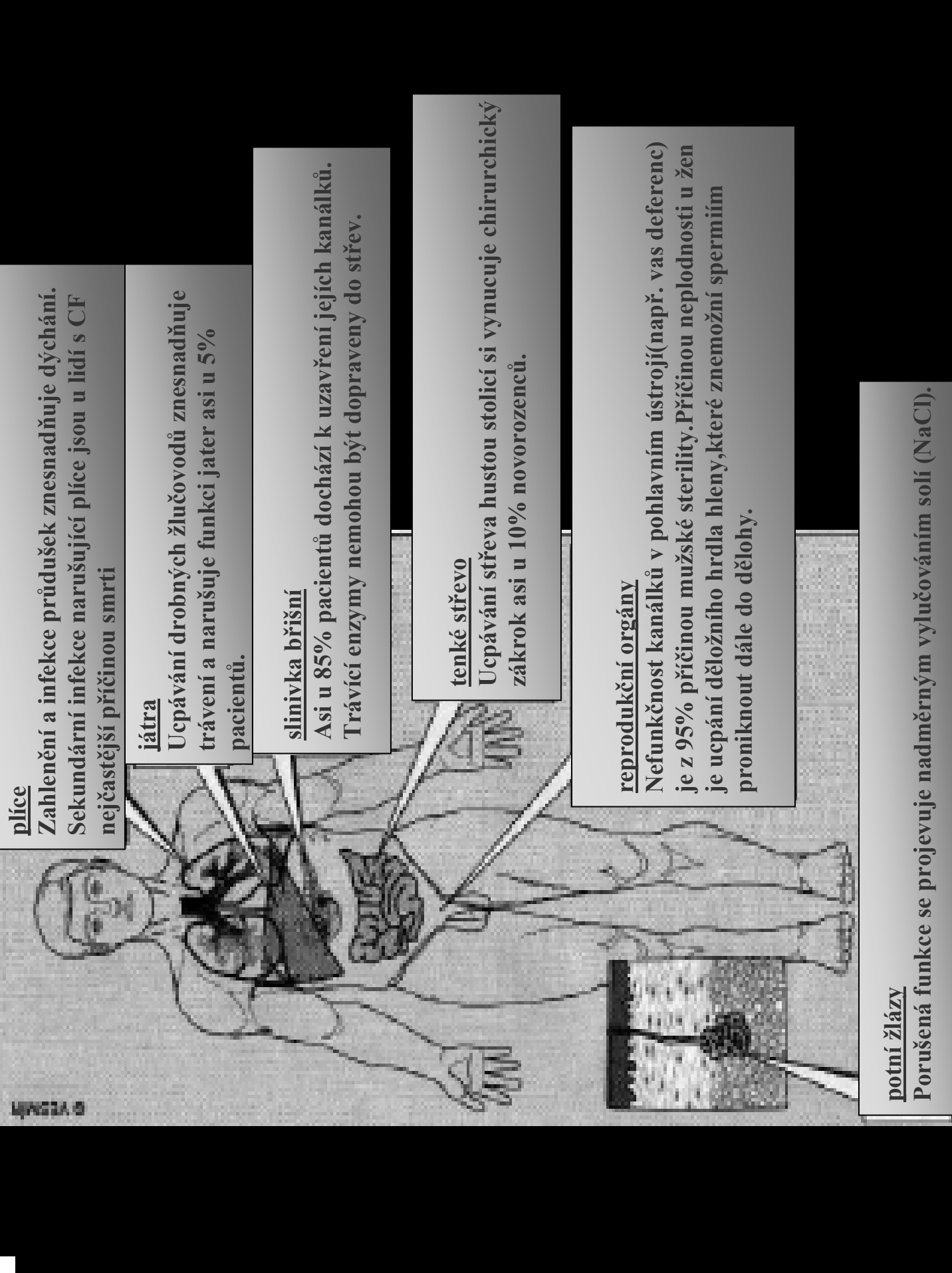
Ucpávání střeva hustou stolicí si vynucuje chirurgický zákrok asi u 10% novorozenců.

## reprodukční orgány

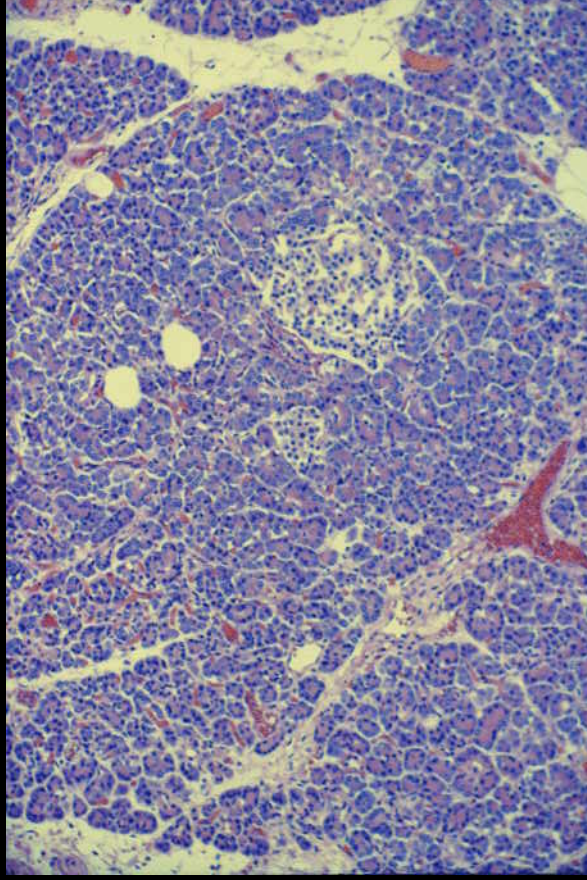
Nefunkčnost kanálků v pohlavním ústrojí (např. vas deferens) je z 95% příčinou mužské sterility. Příčinou neplodnosti u žen je ucpání děložního hrdla hlenu, které znemožní spermii proniknout dále do dělohy.

## potní žlázy

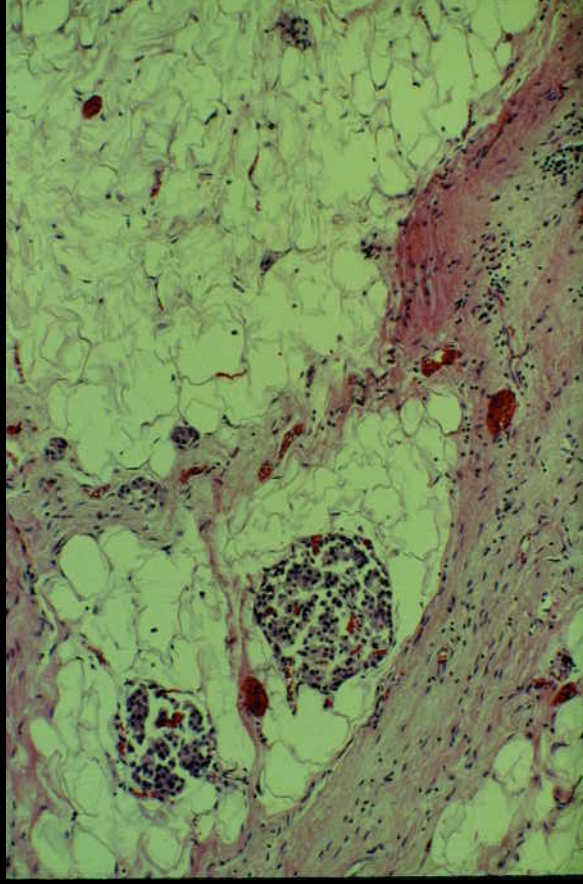
Porušená funkce se projevuje nadměrným vylučováním solí (NaCl).



# Pankreas

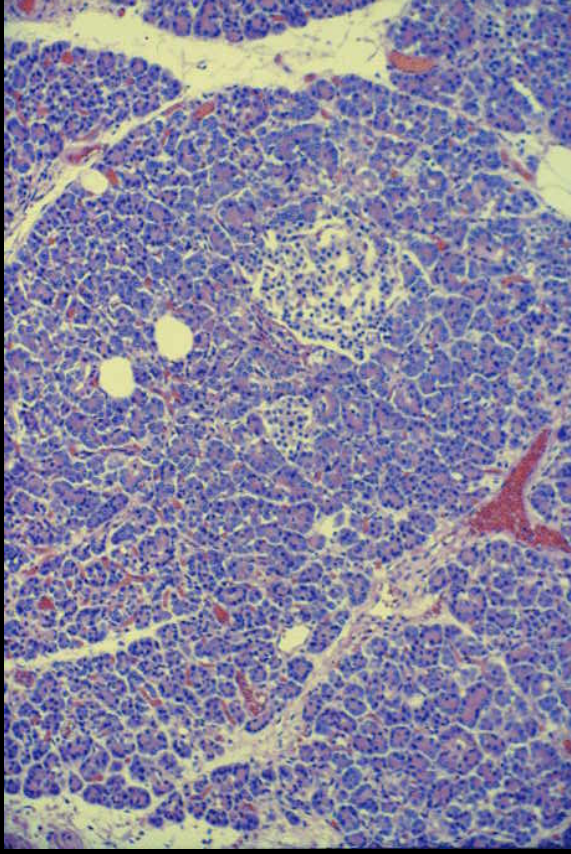


zdravý

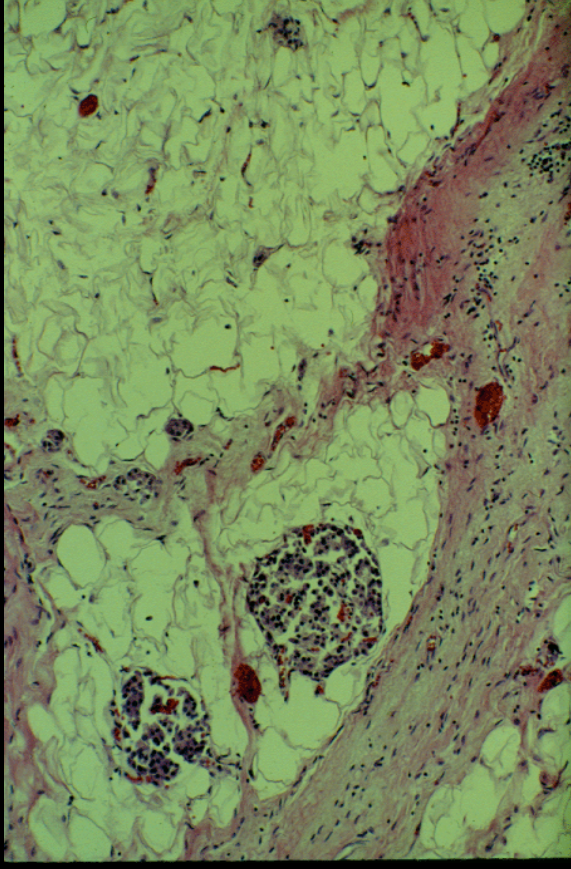


CF

# Pankreas



normální pankreas



pankreas z CF pacienta

# Plíce



normální plíce



plíce z CF pacienta

# Fertilita nemocných CF

## Muži

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

*Obstruktivní azoospermie může být zcela izolovaným příznakem*

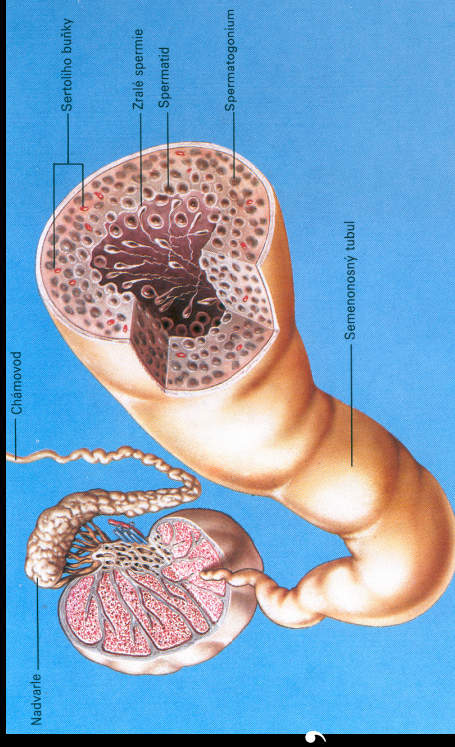
Nejčastější mutace asociované s CBVAD:

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



# Cílená mutační analýza CFTR genu je prováděna:

---

- **A, pro potvrzení diagnózy**
  1. u pacientů s dg. CF
  2. u členů rodin s výskytem CF
  3. prenatalně u plodů v riziku s pozitivní CF rodinnou anamnézou
  4. prenatalně u plodů s patologickým ultrazvukovým nálezem (abnormalita střevních klíček)
  5. u novorozenců s mekoniovým ileem
  6. u mužů s poruchami reprodukce
- **B, prevence**
  1. u příbuzenských párů
  2. u manželských párů zařazených do IVF programu
  3. u dárců gamet a embryí
  4. u partnerů (partnerek) heterozygotů

# „Kaskádovitá“ strategie rutinní molekulárně genetické diagnostiky CF

suspektní CF pacient nebo přenašeč



Scoring 5 nejčastějších CFTR mutací



jedna nebo obě alely neidentifikovány



Scoring 30 CFTR mutací

jedna nebo obě alely neidentifikovány



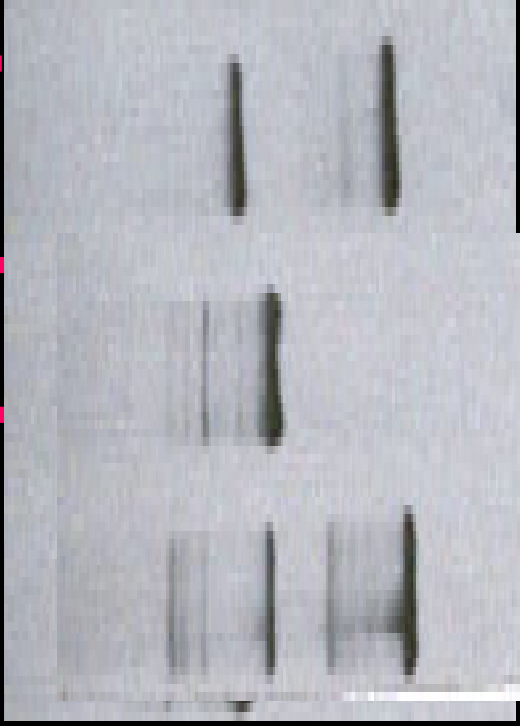
Scanning celé CFTR-codující sekvence

obě CF alely identifikovány

CF diagnóza potvrzena

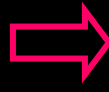


# Detekce 5ti nejčastějších CF mutací klasickými molekulárně genetickými



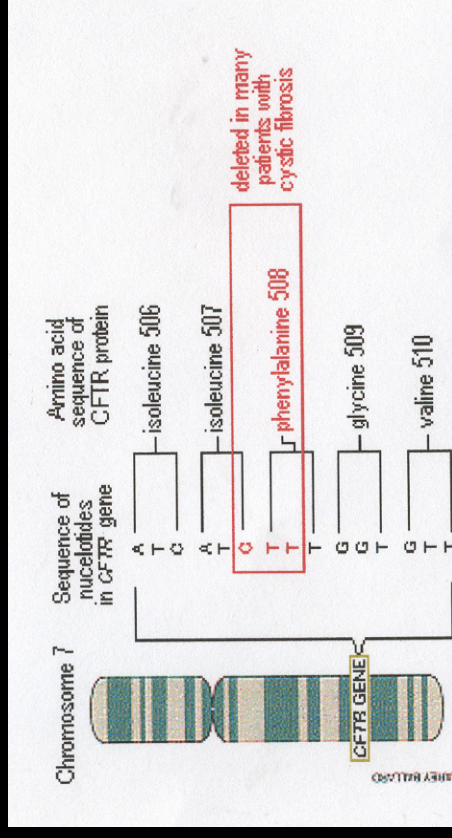
# Detekce mutace dF508

delece tří nukleotidů CTT v CF exonu 10



Ztráta jedné aminokyseliny – fenylalaninu  
v pozici 508 v CFTR proteinu

Polyacrylamidová  
gelová elektroforéza  
PCR produktů exonu 10

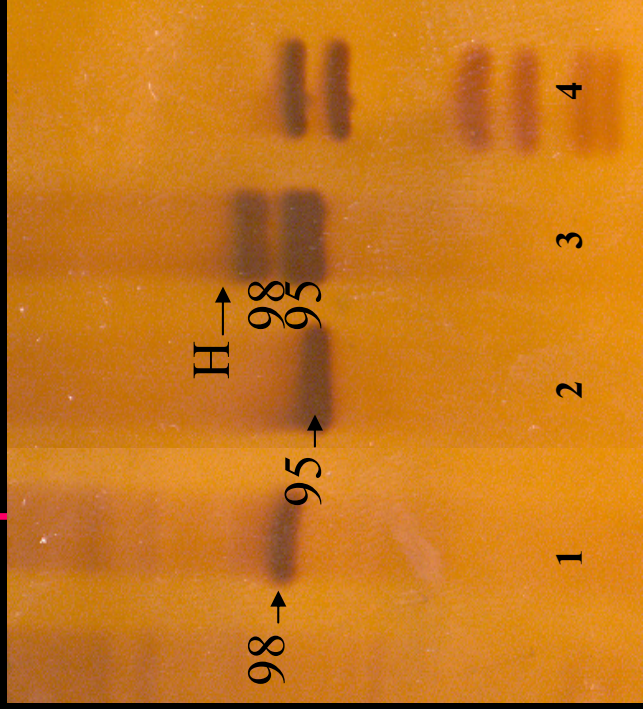


□ Bandy značené 95, 98

jsou 95- a 98-párů bází dlouhé PCR produkty

□ Band značené H jsou heteroduplexy

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



ELFO - 5% PAGE, 200 V, 20°C, 2hod

1. non dF508 / non dF508

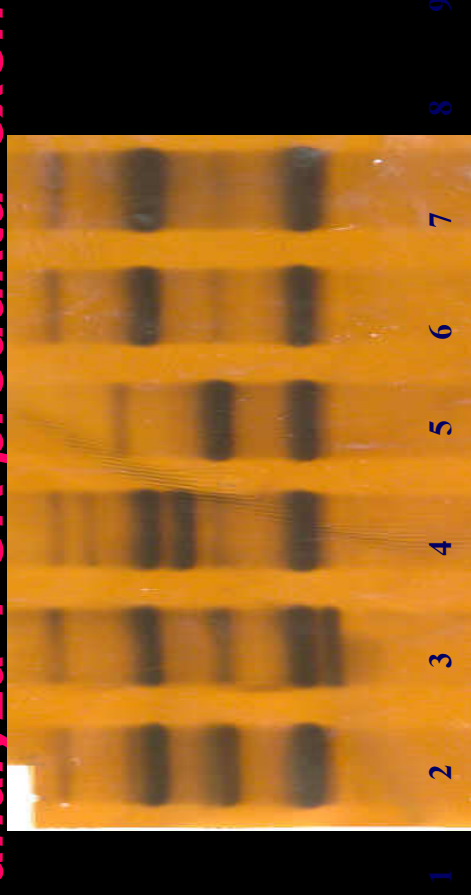
2. dF508 / dF508

3. dF508 / non dF508

4. marker pBR322/Alu1

# Detekce CF mutací G542X, G551D, R553X

*SSCP analýza PCR produktů exonu 11*



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

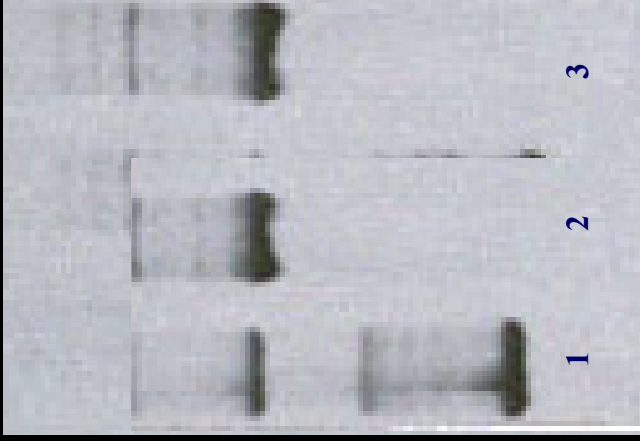
1. G542X / non mt exon 11
2. R553X / non mt exon 11
3. G551D/ non mt exon 11
4. G542X/G542X
- 5.-9. wt

# Detekce mutace CFTRdele2,3(21kb)

Polyacrylamidová gelová elektroforéza  
duplex PCR produktu:

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

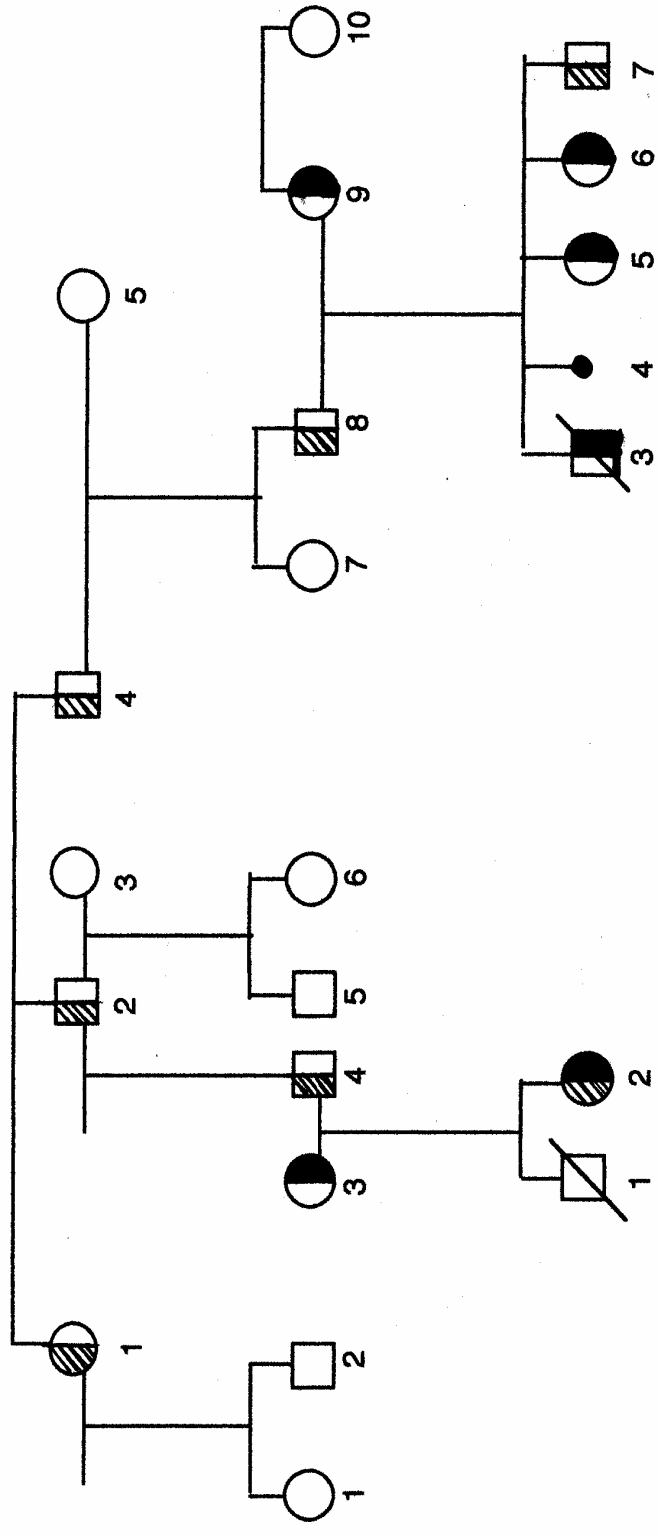


ELFO: 5% PAGE,  
200 V, 20°C, 2hours

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

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

# Rodokmen rodiny P.



I.

II.

III.

$\Delta F508$  / non    
  CFTRdele2,3(21kb) / non

# Pacient J.F.

Suspektní CF

Věk: 30 let !

Detekována mutace dF508 na obou alelách genu CFTR

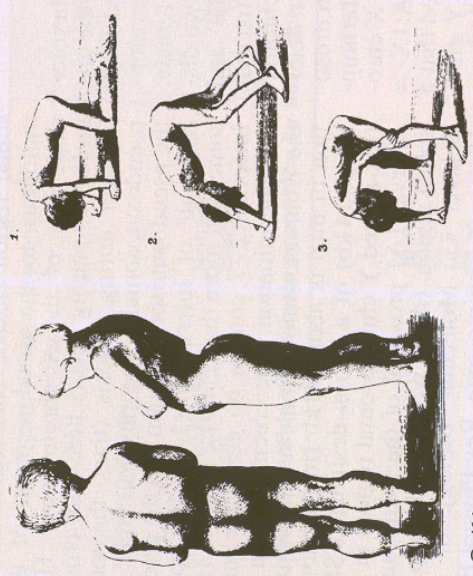
genotyp dF508 / dF508

potvrzena dg. CF

- 50% CF pacientů diagnostikováno do 3 let života
- 90% CF pacientů diagnostikováno do 10 let života

# Duchennova muskulární dystrofie

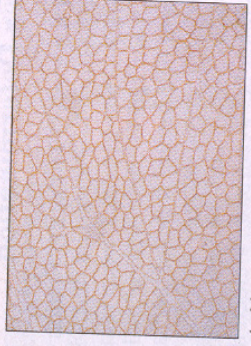
- těžká X-recesivní monogenně dědičná choroba
- primární příčina: mutace v dystrofinovém genu (Xp21)
- incidence choroby 1:3500 novorozených chlapců
- destrukce svalových vláken
- fenotyp:
  - 1) špatné držení těla, potíže při zvedání se ze země
  - 2) narůstající svalová slabost
  - 3) pseudohypertrofie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



1. Calf hypertrophy and lordosis

2. Difficulty in rising (Gower's sign)

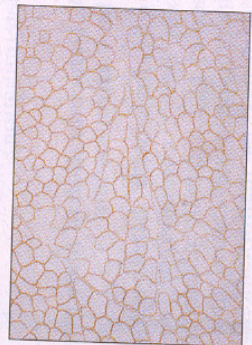
**A. Clinical signs of Duchenne muscular dystrophy**



1. Normal dystrophin

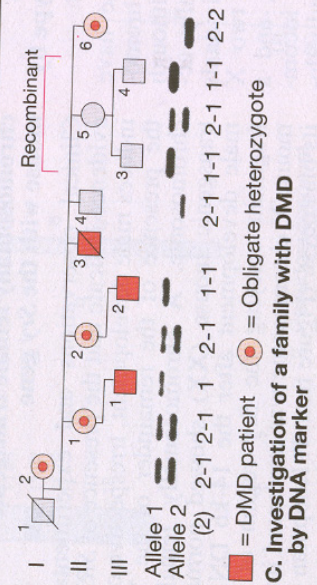


2. Dystrophin absent



3. Areas lacking dystrophin in heterozygotes

**B. Dystrophin analysis in muscle cells**

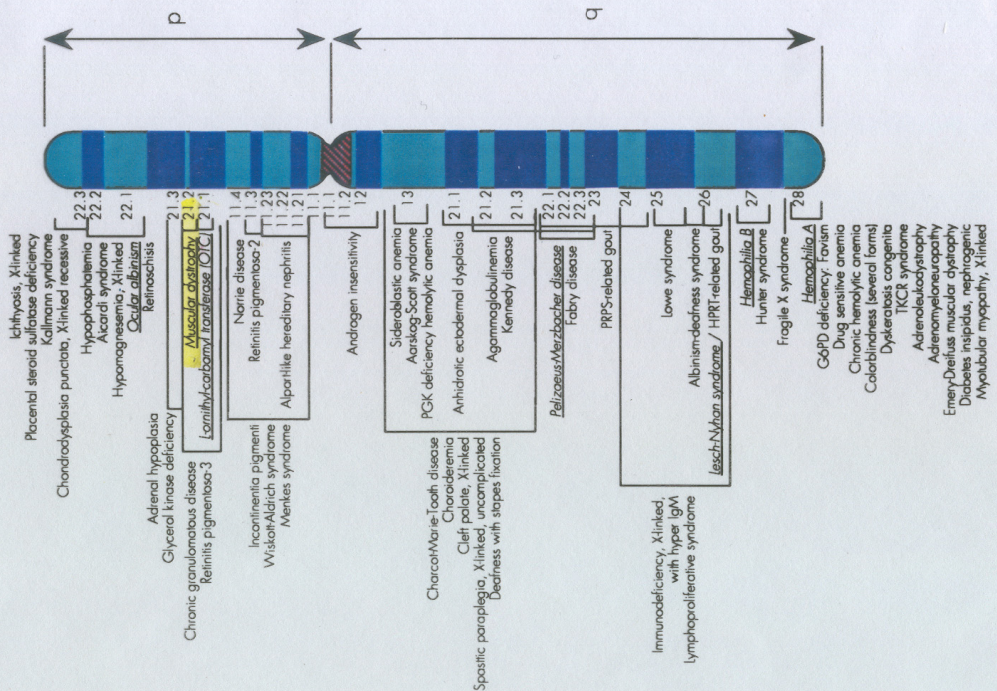


Disease	Chromosomal location	McKusick Nr.
<b>X-chromosomal:</b>		
Muscular dystrophy Duchenne	Xp21.2	310200
Muscular dystrophy Becker (allelic with DMD)	Xp21.2	310200
Muscular dystrophy Emery-Dreifuss	Xq28	310300
<b>Autosomal dominant:</b>		
Myotonic dystrophy	19q13	160900
Facioscapulo-humeral dystrophy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

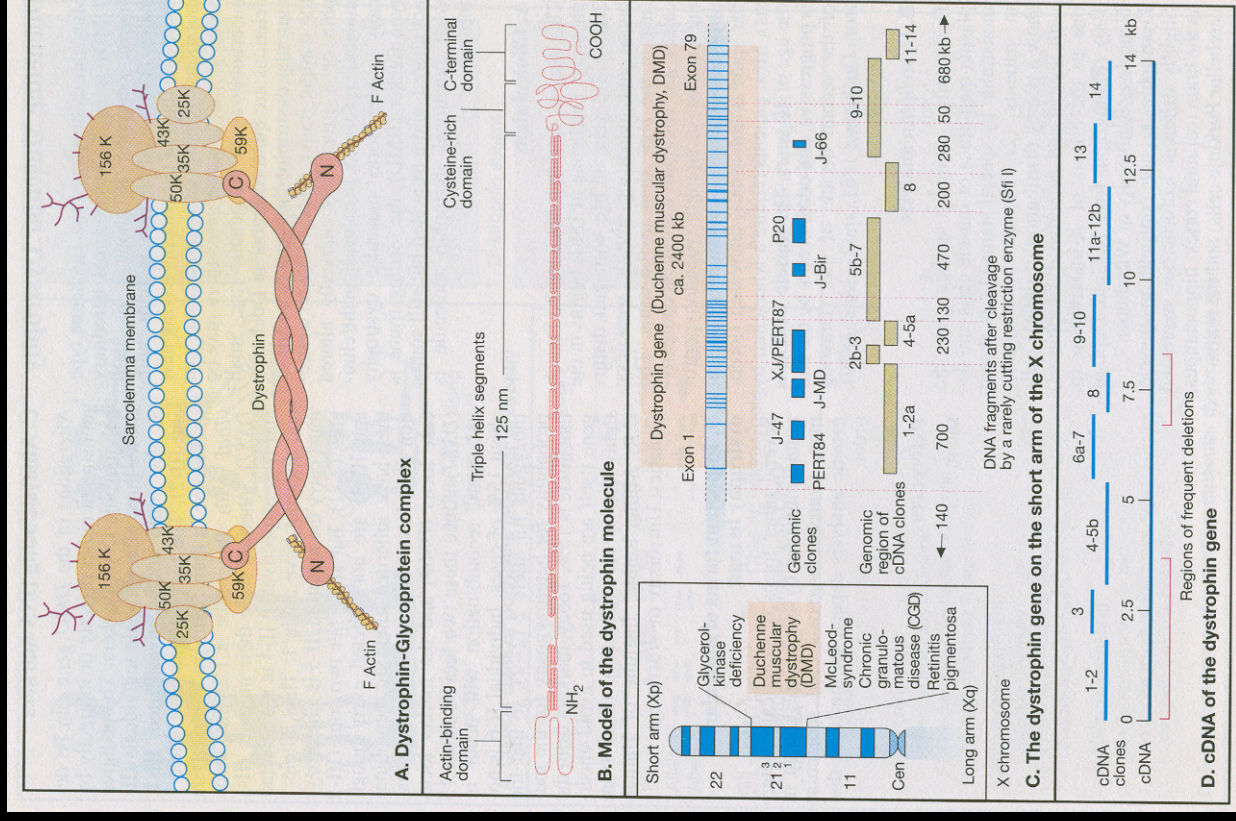
**D. Important forms of hereditary muscular dystrophy in man**

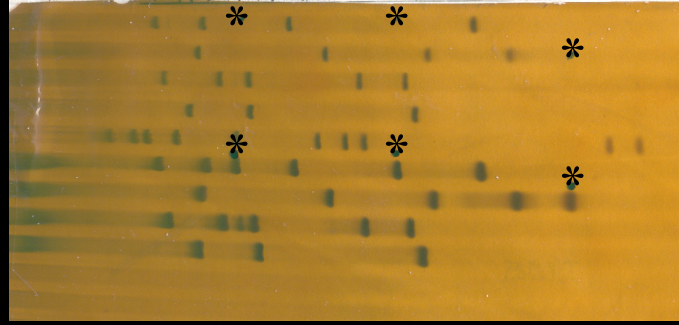


# CHROMOSOME X LINKED DISEASES



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





ex51

ex53

ex52

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

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

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

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

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

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

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

5 - marker pBR322/AluI

# Hemofilia A

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

	Factor VIII activity		
Hemophilia A	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

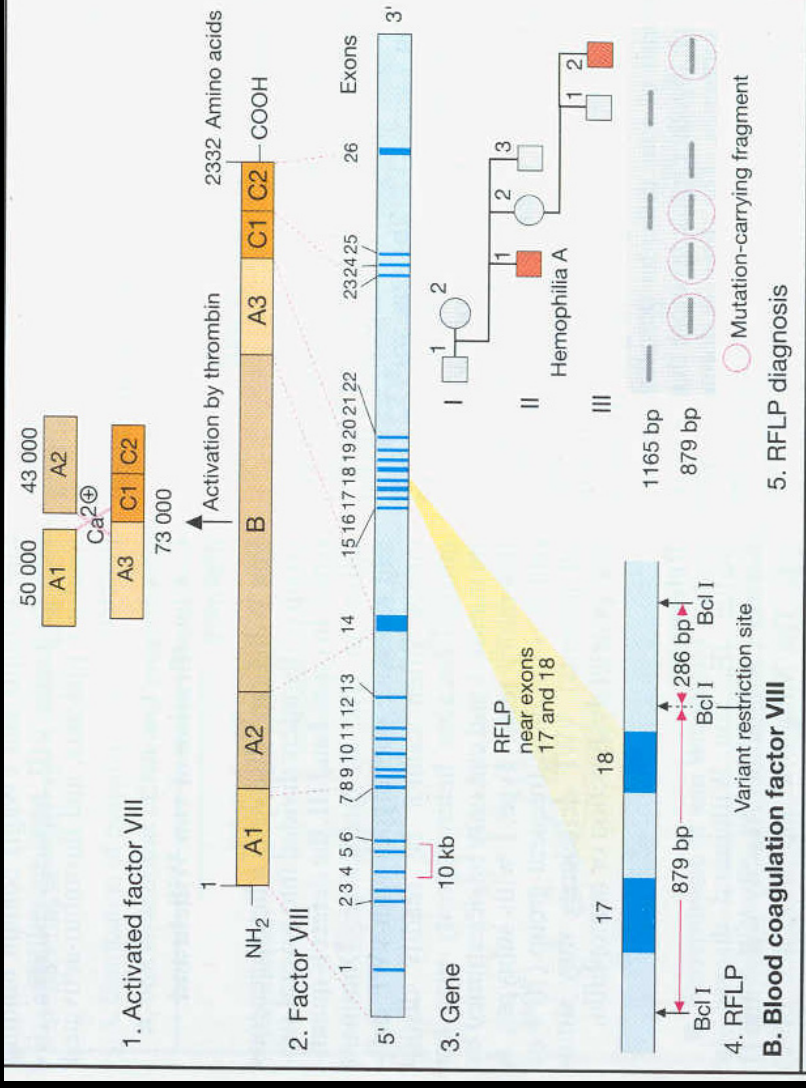
–186 kb (0,1 % celého X chromozomu)

–9kb mRNA

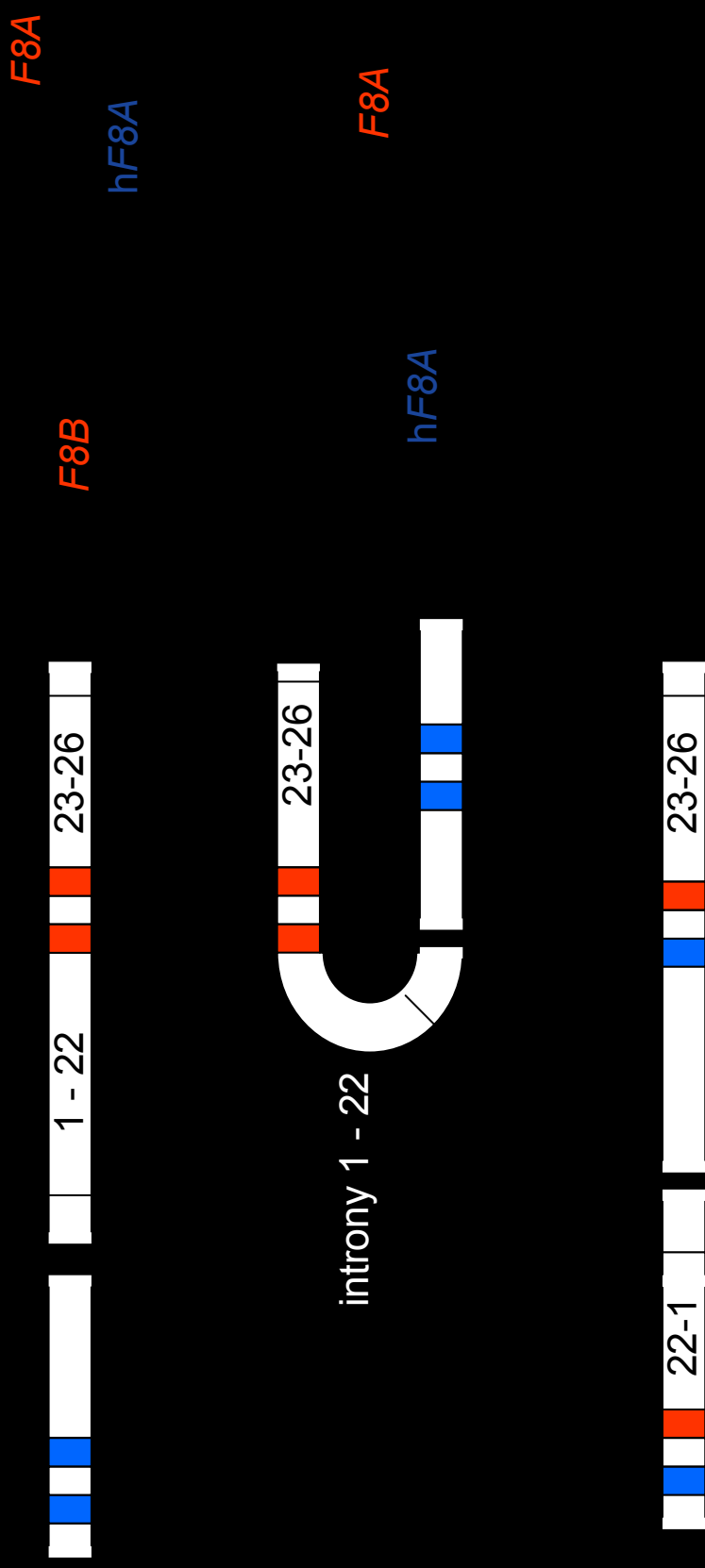
mutace v genu pro f VIII:

substituce, inzerce, delece, duplikace

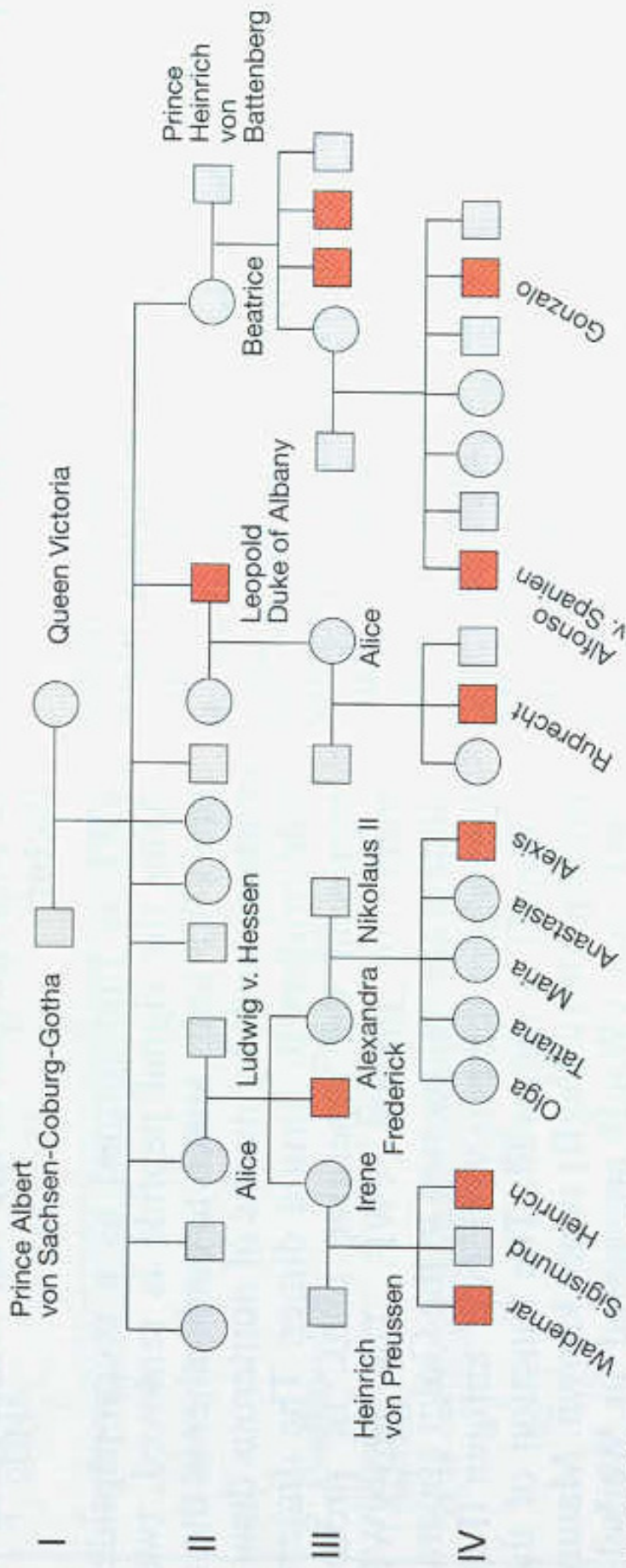
30% de novo



# Inverze v genu F8: nejčastější příčina hemofílie A



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



**A. X-Chromosomal inheritance of hemophilia A**

# Myotonická dystrofie typu 1 (MD1)

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

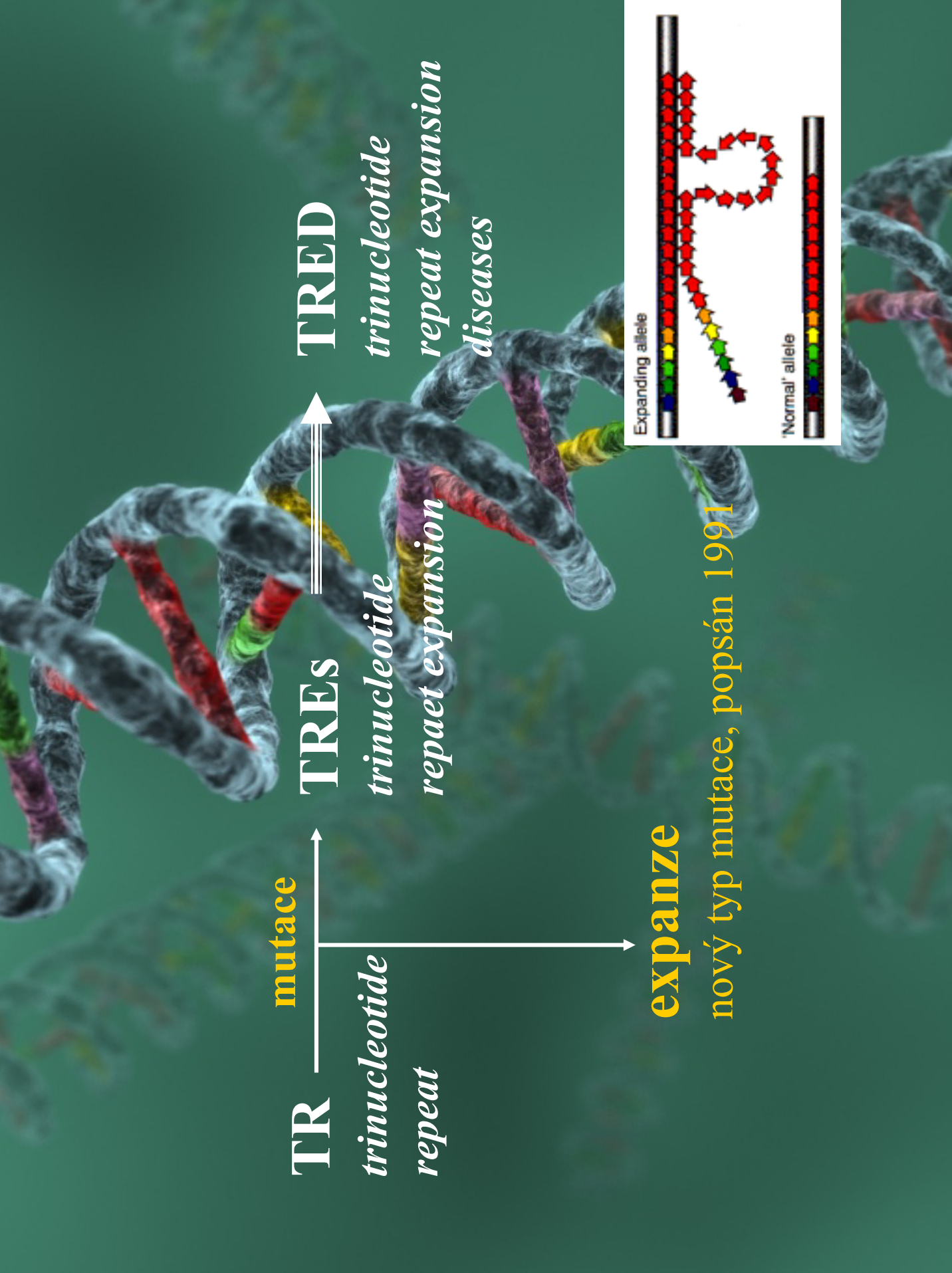
patří mezi onemocnění TREDs

příčina



expandované trinukleotidové repetice (TREs)





**mutace**

**TR**

*trinucleotide*

*repeat*

**TRES**

*trinucleotide*

*repeat expansion*

**TRED**

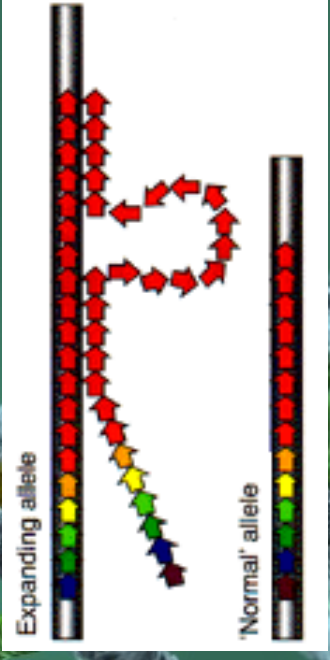
*trinucleotide*

*repeat expansion*

*diseases*

**expanze**

nový typ mutace, popsán 1991

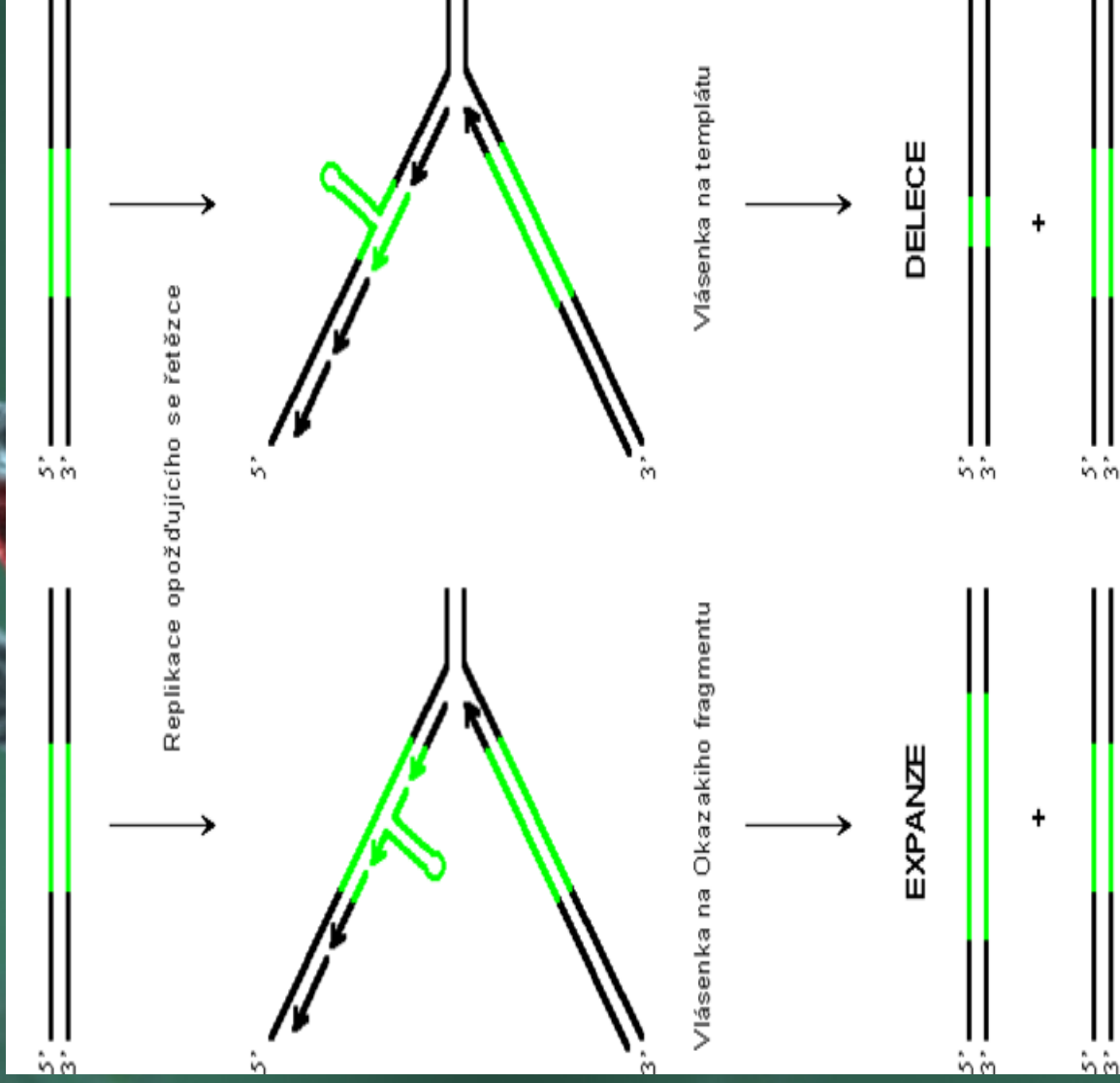


# TR - trinukleotidové repetice



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

# Expanze a delece trinukleotidů při replikaci



# Rozdělení chorob zapříčiněných expází trinukleotidových repetitic podle

## lokalizace TREs

1 TR lokalizovány uvnitř ORF

→ expází narušená struktura proteinů  
(Huntingtonova chorea)

2 TR lokalizovány vně ORF - v 3'UTR nebo

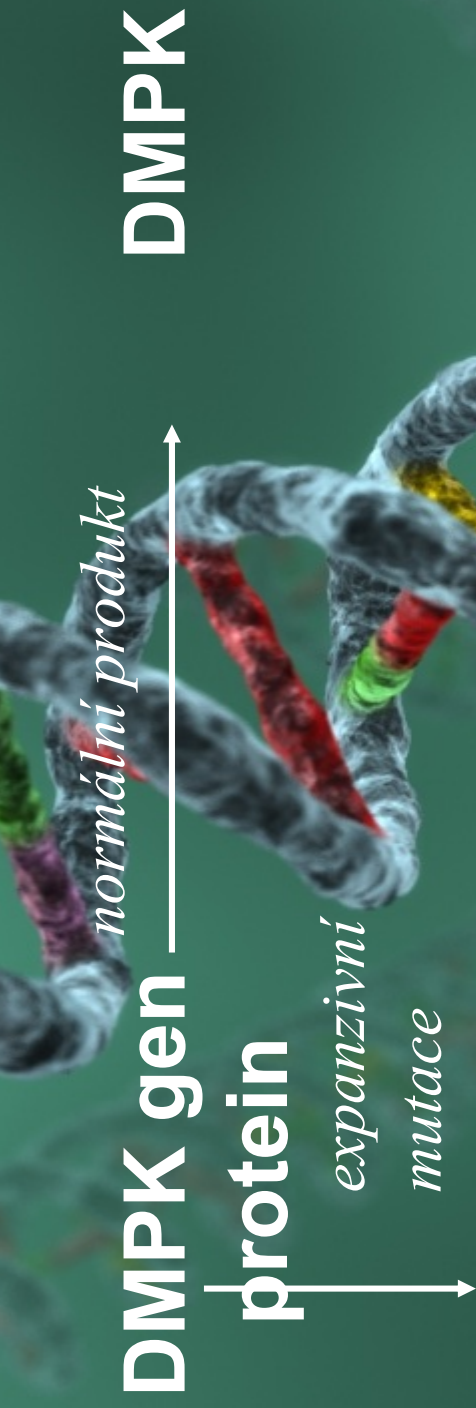
5'UTR

→ patrně inaktivují nebo ovlivňují **expřížení**  
(Myotonická dystrofie)

# Přehled a základní charakteristika některých chorob asociovaných s expanzí trinukleotidů

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





## 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**
- **vsycení DNA vazebných proteinů**

# Alely genu DMPK



## Normální alela

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

## Premutantní alela

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

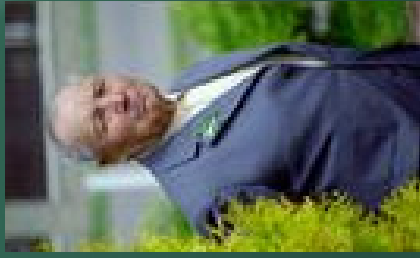
## Mutantní alela

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



# Klinická anticipace

spojená s expanzivním prodlužováním  
trinukleotidových repetic



asymptomatický prarodič

(MD1 : 5 - 50 CTG repetic)

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

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



# Korelace genotypu a fenotypu u MD1

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

# 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



rozvíví se později

# Kongenitální MD (CMD)

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

matka MD1



**dítě CMD**  
**riziko 40%**

rodič MD1

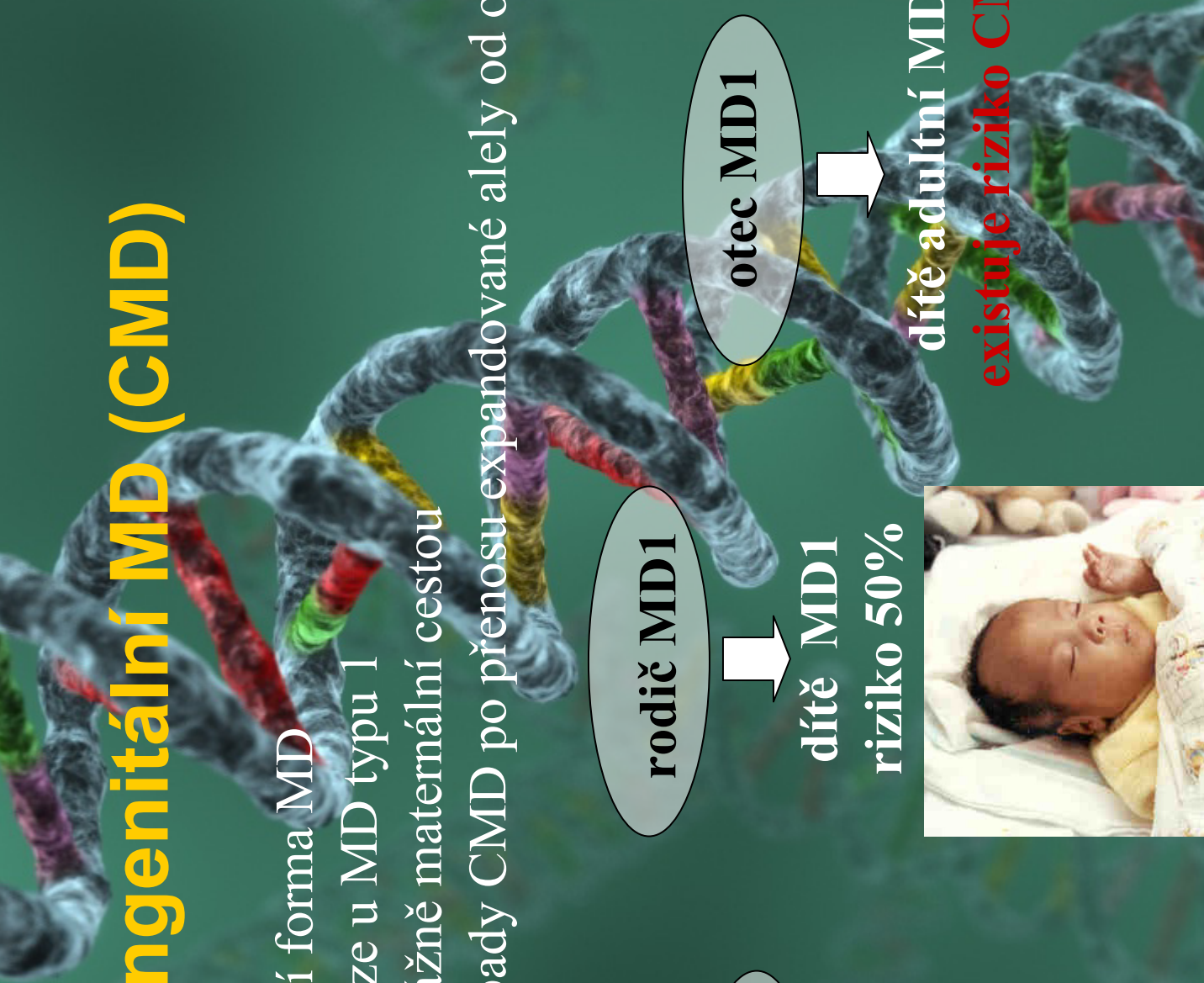


**dítě MD1**  
**riziko 50%**

otec MD1



**dítě adultní MD1**  
**existuje riziko CMD**



# 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
- maternálnídědičnost abnormalit mitochondriální DNA, která interaguje s produktem genu DMPK
- maternální imprinting
- transplacentární faktory

# Diagnostika MD1

**Klinické vyšetření**  
neurologické vyšetření  
EMG, EEG  
kardiologické vyšetření

**Histologické vyšetření**  
postižených svalů  
histochemie  
elektron. mikroskopie

**Molekulárně  
genetické  
vyšetření**  
PCR, TP PCR

jednoznačně  
vyvrátí  
nebo  
potvrdí diagnózu

# Diagnostika MD1



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

↓  
získané

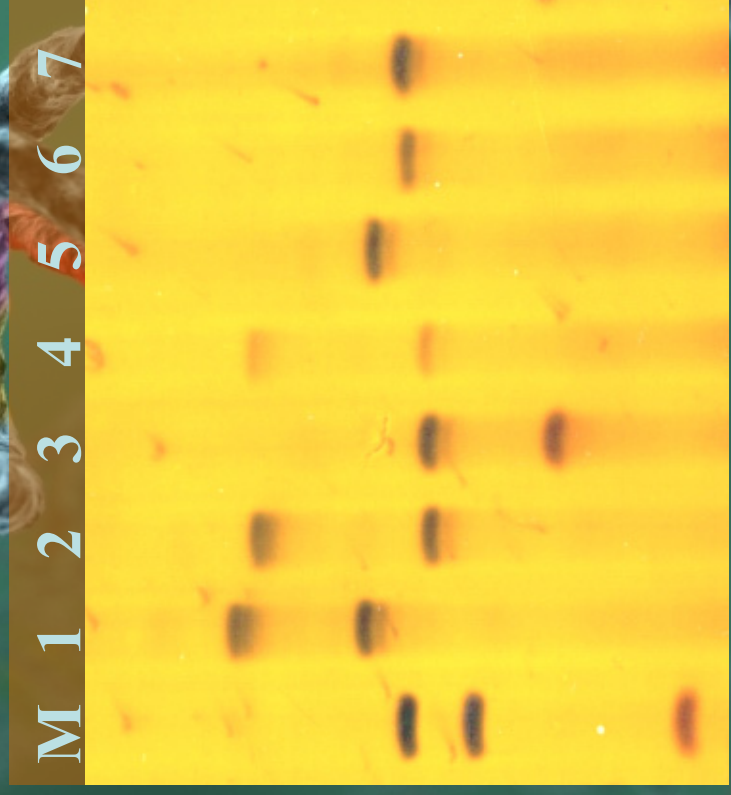
- amniocentéza (14.-19.tg)
- biopsie choriových klků (10.-12.tg)

- testování přítomnosti expandované alely DMPK



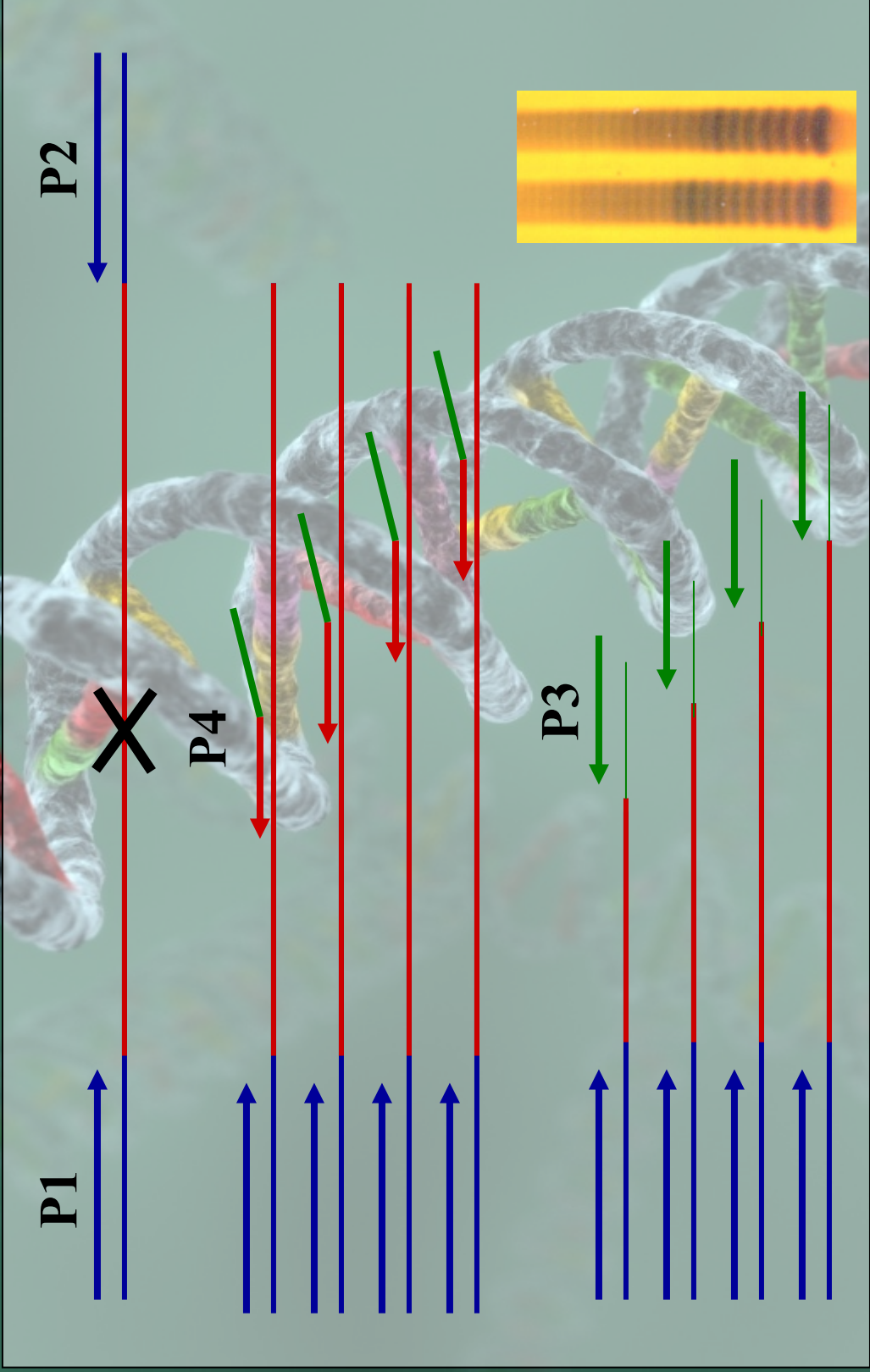
jednoduchý PCR systém zahrnující 2 PCR reakce

# PCR P1/P2





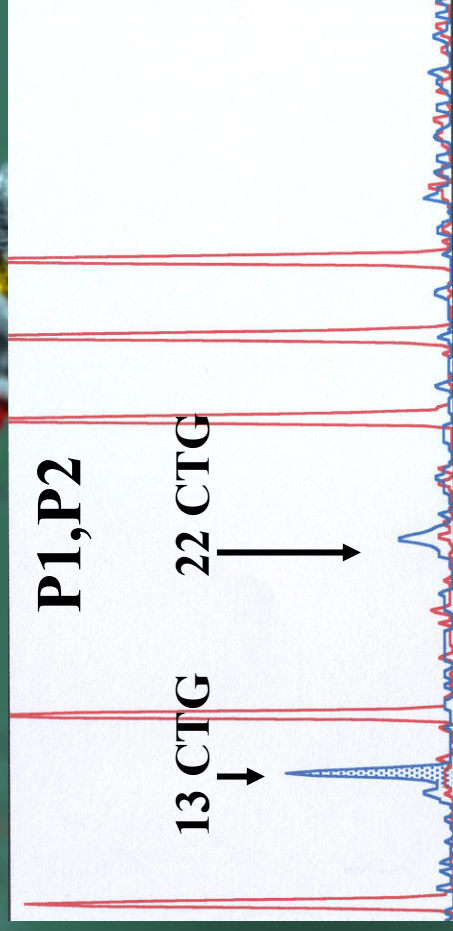
# Triplet Primed PCR



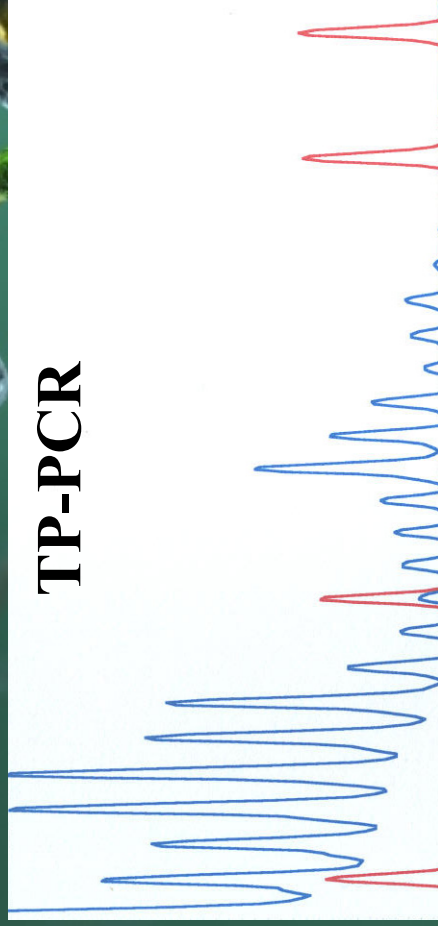
# Preimplantační genetická diagnostika MD1

naše první zkušenosti

Fluorescenční PCR



TP-PCR



# Strategie molekulárně genetického vyšetření MD1

DNA pacienta ( susp. MD1)

PCR P1/P2

detekce 2 alel genu DMPK

vyloučení diagnózy

detekce 1 alely genu DMPK

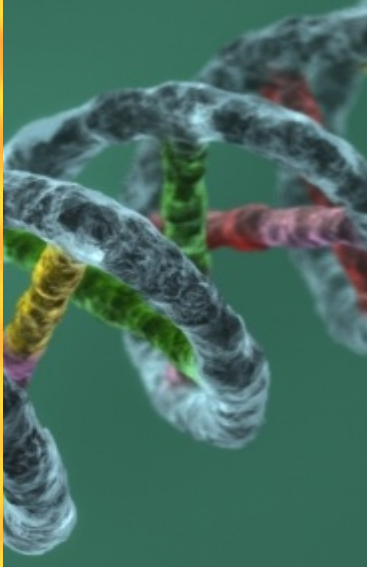
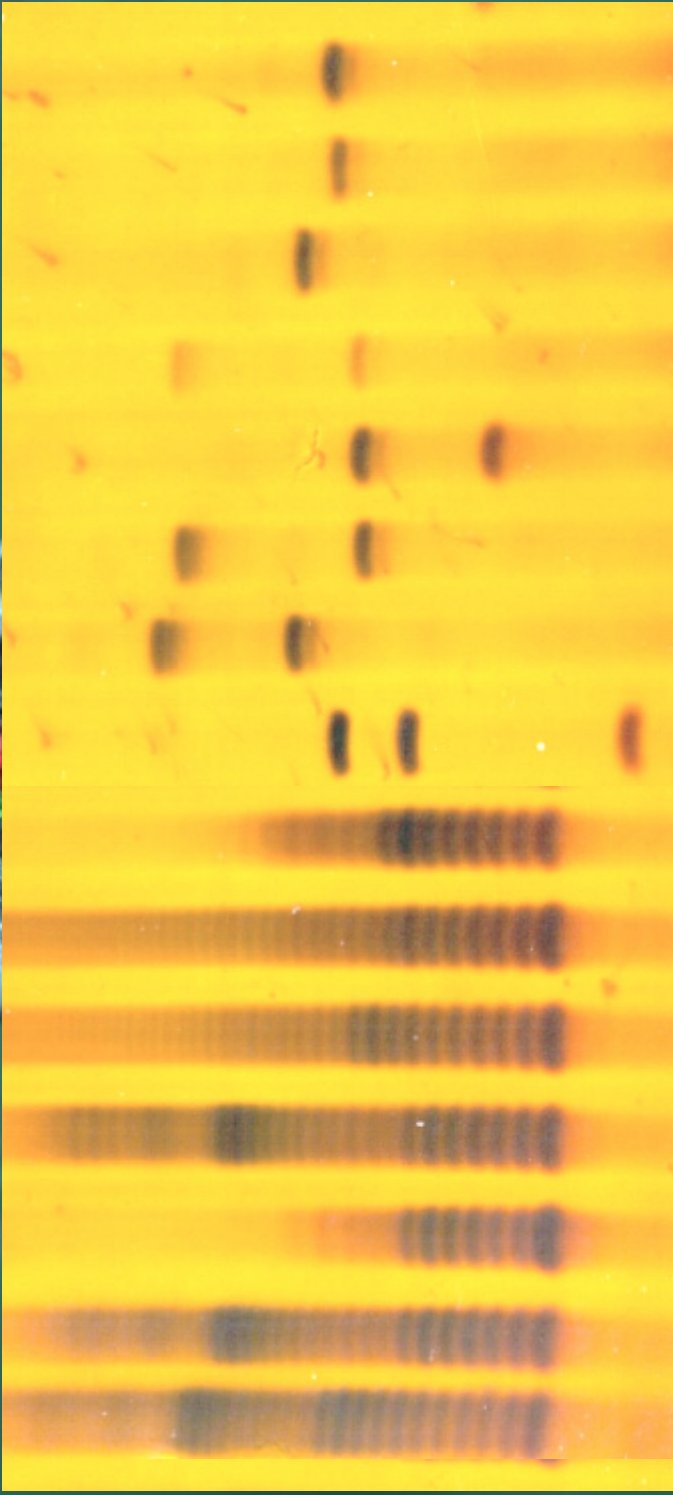
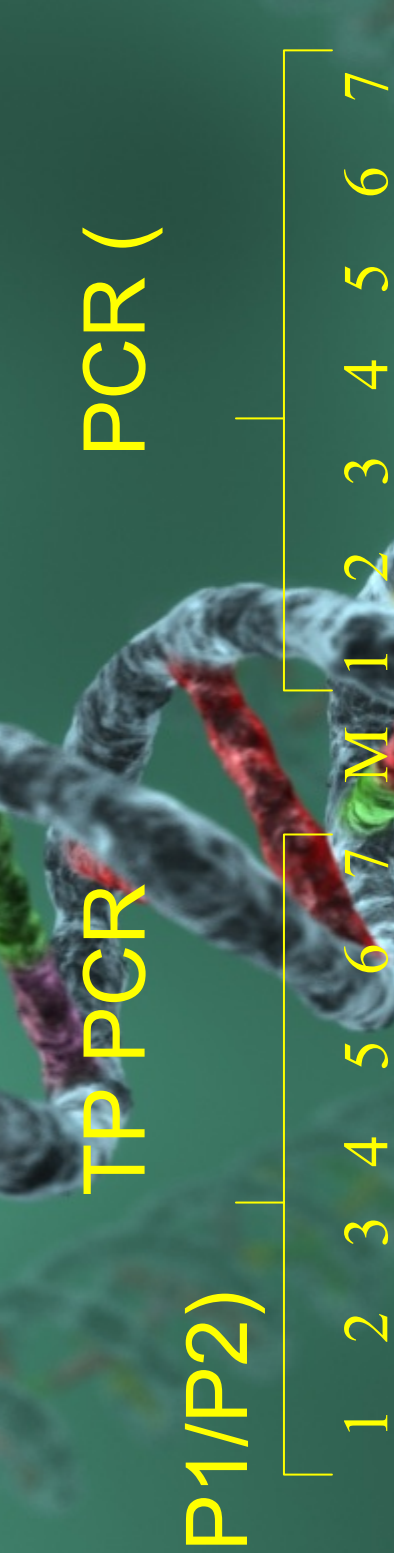
TP PCR

zdravý homozygot

vyloučení diagnózy

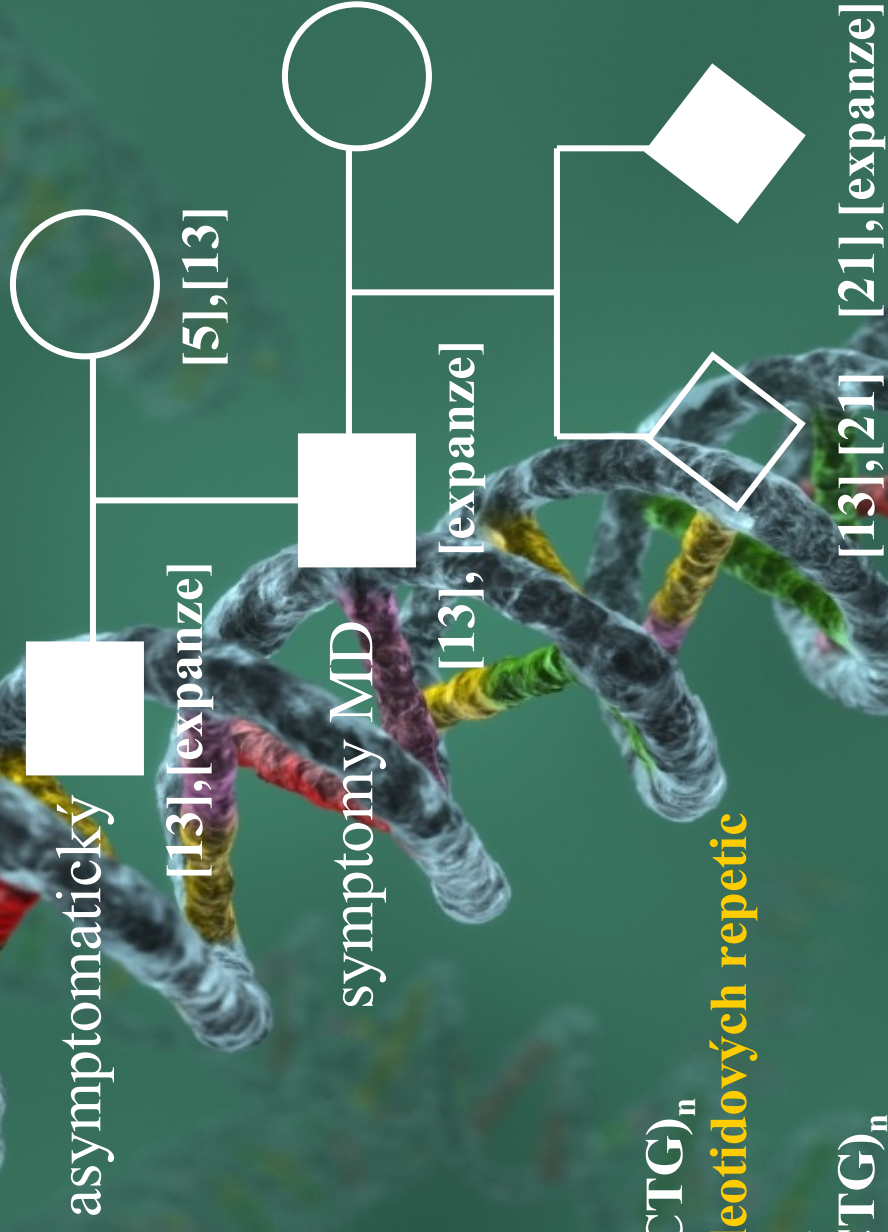
heterozygot  
s expandující alelou

potvrzení diagnózy



\* \*

# Stanovení dg. MD1 při prenatalním vyšetření



[13],[expanze] - genotyp (CTG)<sub>n</sub>  
prokázána expanze trinukleotidových repetit  
na jedné alele genu DMPK  
[5-13],[13-21] - genotyp (CTG)<sub>n</sub>  
velikost repetit je na obou alelách  
ve fyziologickém rozhraní

↓  
**prokázána MD1**

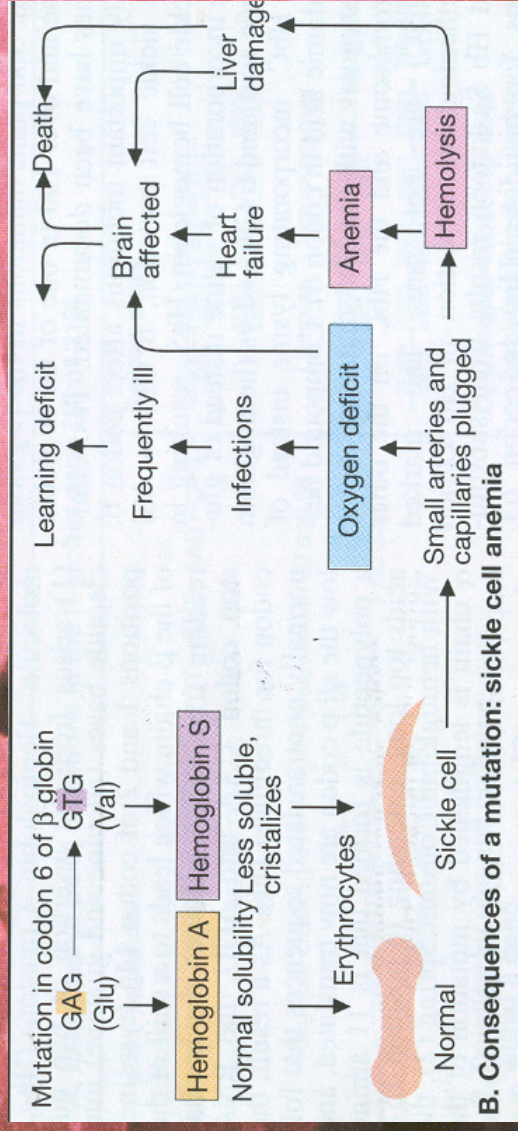
# Průkaz expanze CTG repetice v genu DMPK metodou TP-PCR

- 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 repetice  
velmi pravděpodobná asociace s CMD
- ultrazvukové vyšetření ve 2. a 3. trimestru může odhalit CMD:
  - zmenšený fetální pohyb
  - polyhydroamnion

# Srpkovitá anemie

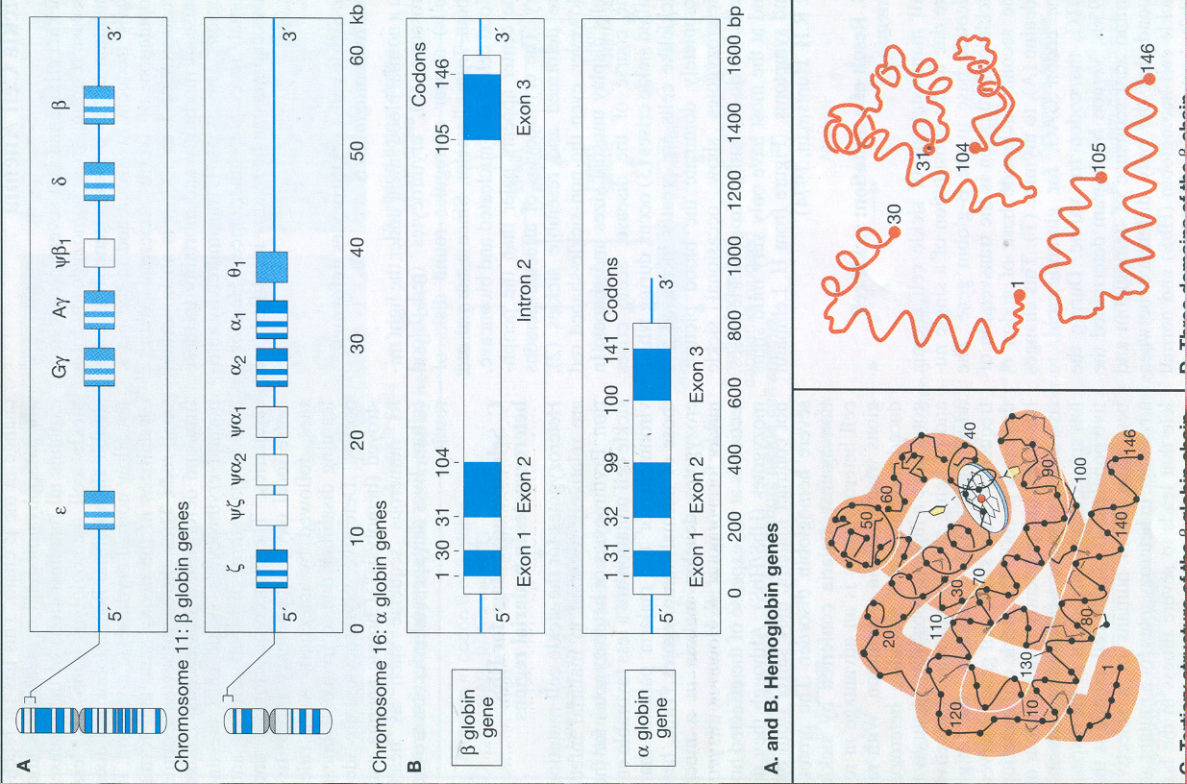
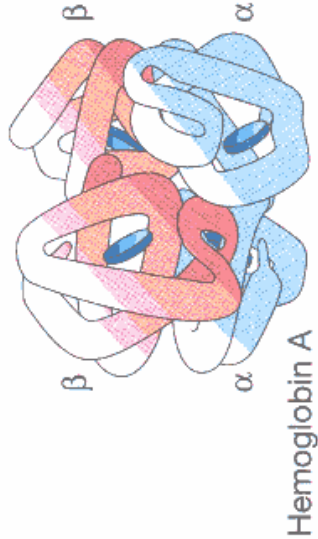
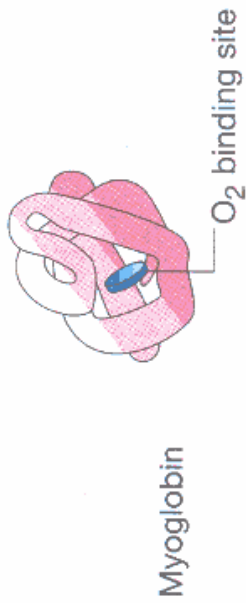


•frekventovaná v Africe a černé populaci severní Ameriky

1: 500

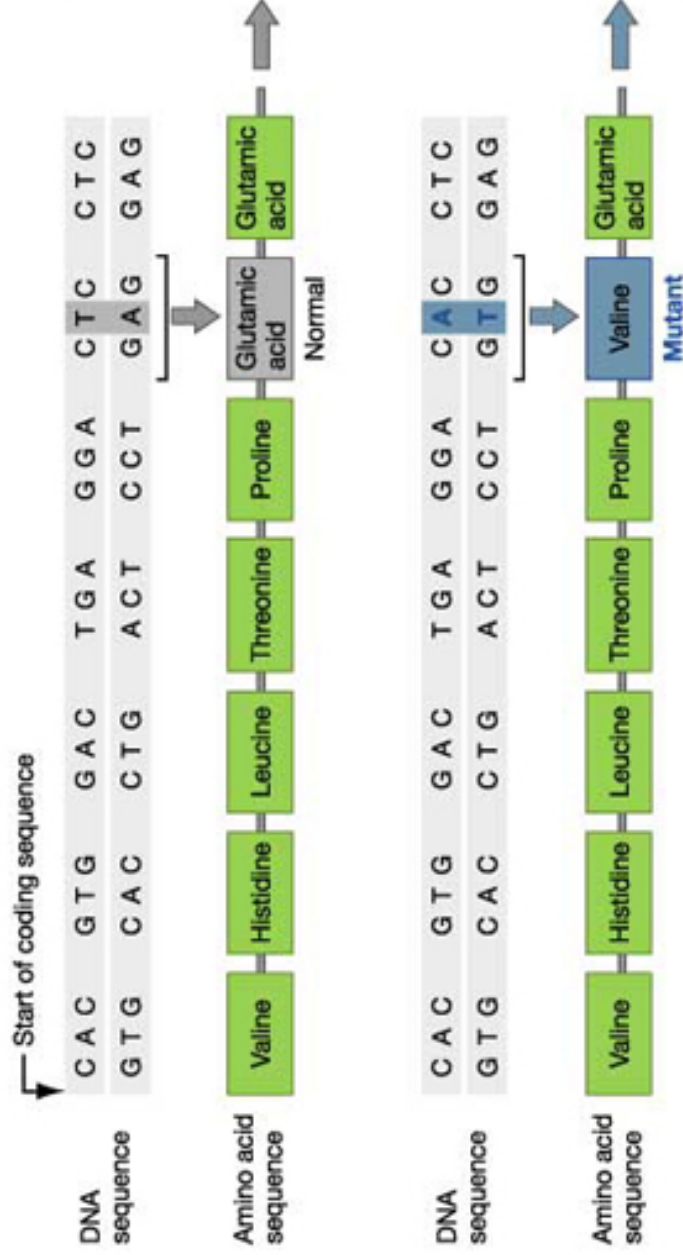
•autozomálně recesivní dědičnost

# Hemoglobin





# Srpkovitá anemie



Normal red blood cells



Sickled red blood cells

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

# Srpkovitá anemie

