

14. přednáška z BIOLOGIE
pro Bakaláře studující fyzioterapii,
optometrii a pro nutriční terapeuty

Genová diagnostika.

4. 1. 2012

Pojem alela.

- Geny existují v různých formách a
- mohou realizovat různé formy znaku.
- Pro různé formy určitého genu u diploidních organismů
- nesoucí různé a při tom s životem „slučitelné“ formy znaku
- byl vytvořen pojem **alela**.
- (Původně se o alelním páru hovořilo
- u heterozygotního stavu - „A“ : „a“).

Ad genové polymorfismy

- Jednoduše vyjádřeno:
- Změny v sekvenci nukleotidů se označují jako mutace.
- Pokud jsou slučitelné se životem (a nemusí se vůbec v dané situaci projevit), a jsou dále předávány v dědičnosti, je o nich hovořeno jako o **genovém polymorfismu**.
- Jsou patrně příčinou variability odezvy v individuálních případech.
- Je tak např. vysvětlována individuální odolnost vůči alkoholu, způsobují individuální problémy při transplantacích, individuální citlivost k lékům, individuální náchylnost k chorobám...

DNA POLYMORFISMUS/GENOVÁ MUTACE

DNA POLYMORFISMUS =

rozdíl v sekvenci nukleotidů DNA mezi jedinci, skupinami nebo populacemi.

Zahrnuje bodové polymorfismy, repetitivní sekvence, inserce, delece, inverze. Jestliže rozdíl v sekvenci DNA souvisí s chorobou, je obvykle nazýván genová mutace. Změny v DNA způsobené vnějšími agens (mutageny) jsou také nazývány „mutace“ spíše než „polymorfismy“.

Terminologie není zcela jednotná.

GENOVÁ MUTACE:

Změna v sekvenci nukleotidů DNA molekuly. Genová mutace je typem DNA polymorfismu. Termín „mutace“ v protikladu k „polymorfismu“ je obecně užíván pro změny v sekvenci DNA, které nejsou přítomné u většiny jedinců daného druhu a buď souvisí s chorobou (nebo rizikem choroby) nebo jsou výsledkem poškození vnějšími vlivy (viry, záření, chemické mutageny.)

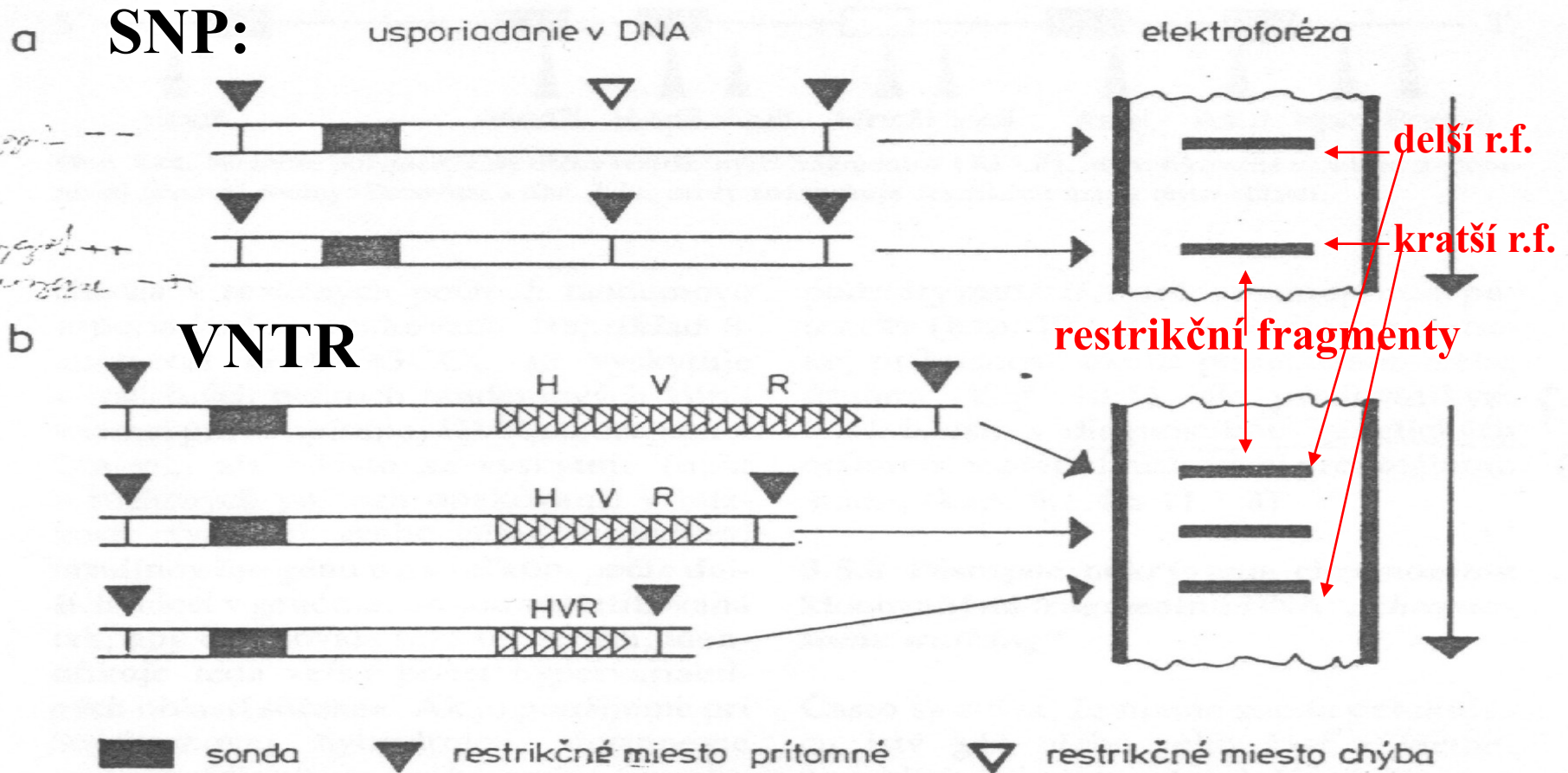
2 příklady DNA polymorfismů:

1. Bodový polymorfismus
= (*angl. Single Nucleotide Polymorphism,*
SNP - čti *SNIP*)
2. Variabilní počet repetitivních
sekvencí, které se tandemově
opakují = (*angl. Variable Number of
Tandem Repeats,* **VNTR**)

Bodové polymorfismy

- Tyto polymorfismy jsou roztroušeny po celém v genomu.
- Více než 90% všech lidských genů obsahuje alespoň 1 SNP.
- Vzhledem k jejich vysoké hustotě v genomu,
- jsou užitečnými markery např. při identifikaci mutovaných genů.

Dva typy polymorfismů délky restričních fragmentů, detegované pomocí účinku restriční endonukleasy na DNA pacienta, následované gelovou elektroforézou



Obr. 3.41. Dva typy polymorfizmu dĺžky restričných fragmentov DNA: *a* – bodový polymorfizmus, pri ktorom je variabilita dĺžky restričných fragmentov dôsledkom prítomnosti, resp. neprítomnosti špecifického restričného miesta, takže značkovaný fragment môže mať dve rozličné dĺžky; *b* – polymorfizmus hypervariabilných oblastí DNA (HVR), pri ktorom je variabilita dĺžky restričných fragmentov zapríčinená variabilitou v počte opakovaní určitej repetitívnej sekvencie medzi dvoma restričnými miestami, takže značkovaný fragment môže mať veľa rozličných dĺžok

Variabilita délky restričních fragmentů DNA:

- Kromě SNP, které jsme zdělili po předcích,
- máme také repetitivní sekvence, zvláště náchylné k novým mutacím.
- *Příklad:* CA opakování = sekvence ubiquitní v lidském genomu (CACACACACA.....).
- Sekvence, obsahující velké počty opakování CA mohou být replikovány chybně, protože často
- nastává „skluz“ („vznik vlásenky“) mezi templátem a nově syntetizovaným vláknem DNA.
- Počty opakování CA sekvencí se mohou proto velmi lišit z jedné generace na druhou.
- CA opakování jsou proto ideálním genetickým markerem v paternitním sporech, v soudním lékařství, v kriminalistice...

- Jak lze SNP nebo VNTR využít ?
- SNP i VNTR mění délku restričních fragmentů DNA.
- Toho lze využít jako markeru např. při nepřímé DNA diagnostice.

(viz např. skripta Kopecká, Gabriel et al. Lékařská biologie Část druhá - Genetika, Brno 2001, str. 52)

DNA diagnostika přímá:

přímá identifikace mutace v lidském genomu např.

- sekvenováním DNA,
- pomocí oligonukleotidových sond (tzv. ASO) a Southernovy hybridizace,
- pomocí PCR...

DNA diagnostika nepřímá:

mutaci nelze identifikovat přímo; proto je snaha identifikovat mutovanou alelu nepřímo

např. využitím polymorfismu DNA v těsné blízkosti mutované alely, což může vést k odlišné délce restričního fragmentu DNA=RFLP) s detekcí např. Southernovou hybridizací.

Možnost využití genového polymorfismu:

- **Důsledkem předávání genu během generací (repetitivní úseky, změny v počtu intronů atd.) je u jednotlivců různá délka konkrétního úseku DNA (genu). Proto je možná detekce konkrétní jediné alely a jeho donora.**
- **Má-li otec chorobu vázanou na jednom z chromosomů 14 , pak lze porovnáním délky fragmentů příslušného genu stanovit**
- **zda potomek získal právě tento chromosom s mutovanou alelou,**
- **nebo naopak druhý se standardní alelou.**

Restriktázový genový polymorfismus.

- **Délka alel daného genu (a počet nukleotidů) nesoucí identické vlohy bývá u různých jedinců různě dlouhým úsekem molekuly DNA.**
- **To se projevuje různou vzdáleností cílových sekvencí pro restriční enzymy, které tak u jednotlivců „vystřihnou“ tentýž gen o různé délce polynukleotidových úseků - a tím jej individuálně identifikují.**
- **Je-li v takovém úseku genetická porucha, dá se identifikovat u potomka.**

- Restrikční endonukleázy (jako např. EcoR1 : G↓AATTC) štěpí alelu ve stejných cílových místech – sekvencích nukleotidů.
- V důsledku nestejného množství repetitivních sekvencí (např. 20 až 1 500x) apod. jsou cílová místa restriktáz homologních alel u různých jedinců různě vzdálena (polymorfie)
- a stejná endonukleáza „rozstříhá“ DNA na různě dlouhé fragmenty (tzv. restrikční fragmenty).
- Srovnáním jejich délek lze stanovit (pomocí Southern blotting), které alely (která alela) rodičů byly dítěti předány – „zdravá=standarní“ nebo „chorobná=mutovaná“
- **RFLP** - Restriction Fragment Lenth Polymorphism
-- Polymorfismus délky restrikčních fragmentů.

DNA diagnostika.

- 1. Nepřímá DNA diagnostika.**
- 2. Přímá DNA diagnostika.**
- 3. Presymptomatické testy.**
 - a) Preimplantační diagnostika.**
 - b) Prenatální diagnostika.**
 - c) Postnatální diagnostika.**

Nepřímá DNA diagnostika

Nepřímá DNA diagnostika

- **Využívá polymorfismů DNA jako markerů pro sledování přenosu vloh v rodině. Sleduje se délka restričních fragmentů – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), podmíněná SNP (Single Nucleotide Polymorphism=bodový polymorfismus)**
- **nebo různou délkou tandemově se opakujících repetitivních sekvencí – VNTR (Variable Number of Tandem Repeats).**
- **Není třeba znát vlastní strukturu genu; je však nutné vyšetřit více členů rodiny (> 5, včetně postižených i nepostižených)(rodiny informativní/neinformativní).**

Př. :

mutace

- „normální“ genový exon: agtcagtcagtcagtcagtc
- „patologický“ -„- : agtcagtcctgaagtcagtc
- otec dostal tento gen ve formě od dědečka (A) a od babičky (B) (exony (**zeleně**) + introny (černě) + repetitivní sekvence (černě) atp.):
- (červené čára = relativní délka úseku DNA **stejného genu – stejných alel** po aplikaci restriktázy)
- A)
aaaaaaaaaagtcagtcctttttttctgaggggggggagtcagtcaaaaaaaaa
- B)
aaaaaaaaaagtcagtccttagtcgggagtcagtccttttttt

• Pro jednoduchost předpokládejme že matka (manželka) má v genomu po svých rodičích alely C, D bez mutace:

• C) (po svém otci)

• aaagtcagtcagtcagtcagtccttttt

• D) (po své matce)

• aaaaaaaaagtcagtcagtcagtcagtccttttttttttttttttttttttttt

A)

aaaaaaaaaagtcagtcctttttttctgagggggggggagtcagtcaaaaaaaaa

B)

aaaaaaaaaagtcagtcctttagtcgggagtcagtcctttttttt

A+B = otcovy alely pro srovnání, všude exon 5 x agtc (ev cgta mutace)

- Najdeme-li při vyšetření RFLP u jejich dítěte alely shodné délky se zdravými=standardními alelami po babičce z otcovy strany (B) a dědečkovi z matčiny strany (C), můžeme chorobu u dítěte vyloučit (chorobná alela by pocházela od dědečka (A) a tu podle délky fragmentu dítě nemá):

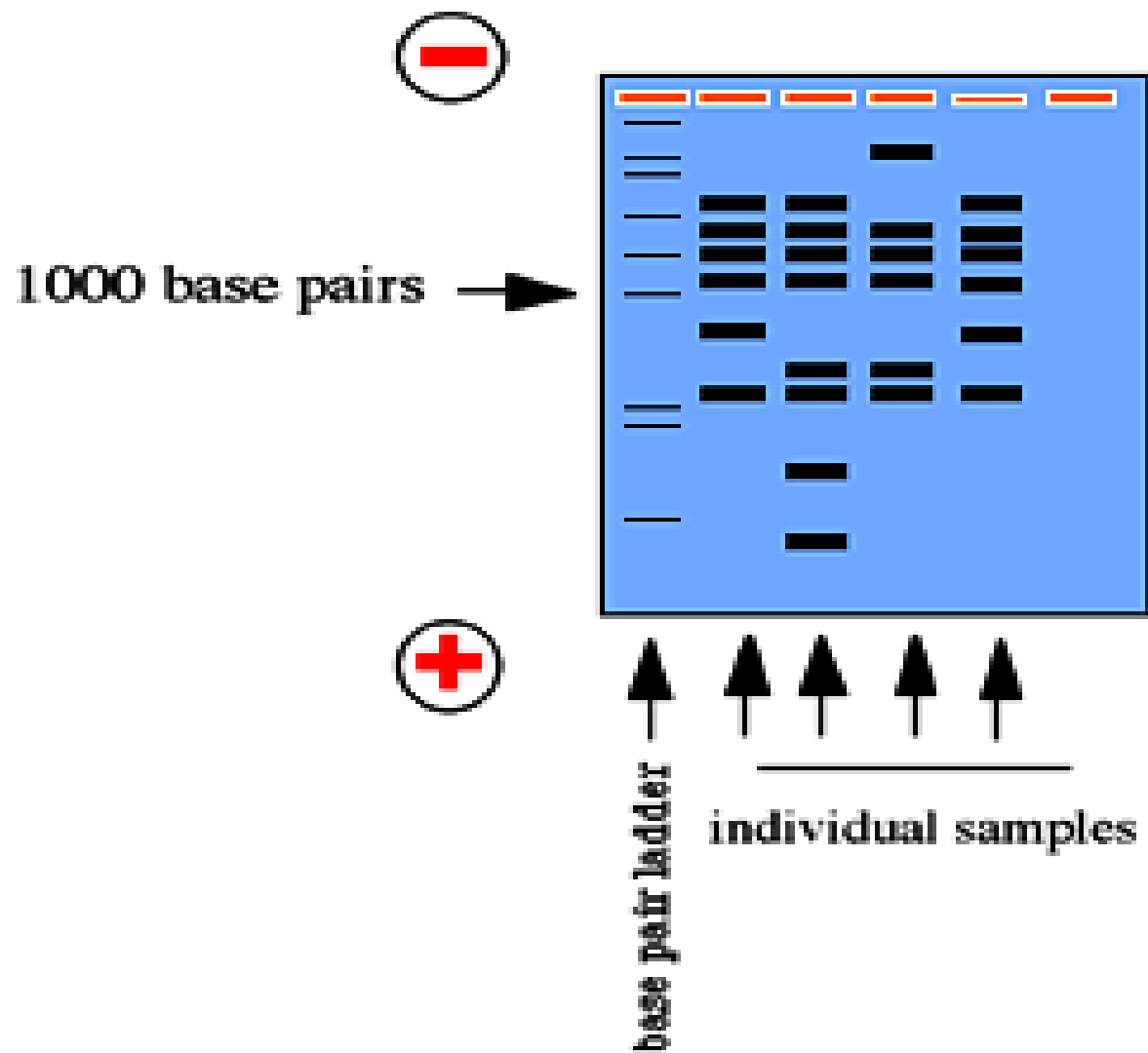
- B)

- aaaaaaaaaagtcagtccttagtcgggagtcagtcctttttt

- C)

- aaagtcagtcagtcagtcagtcctttt

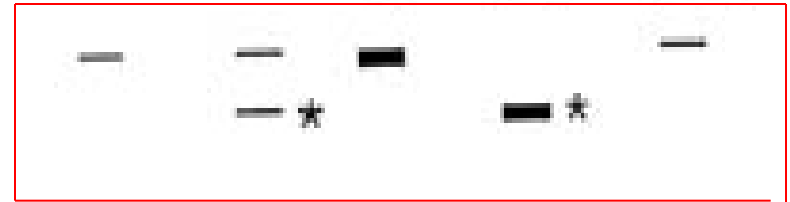
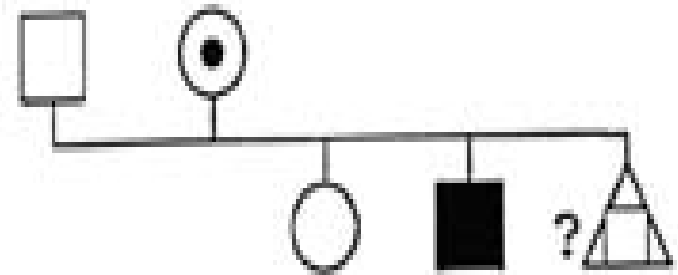
Restriction Fragment Length Polymorphism



Příklad nepřímé DNA metody v praxi – recesivně podmíněná gonosomální choroba

Zdraví rodiče očekávají třetí dítě. První dítě - dcera - zdráva, druhé – syn - postižen. RFLP detekovala u matky jednu mutovanou alelu X^* , kterou předala synovi. Třetí dítě bude také chlapec, ale RFLP prokázala, že dostal od matky normální X . Jeho genotyp bude XY , bude zdrav.

XR, Punktmutation
(entstandene Restriktionsschnittstelle)



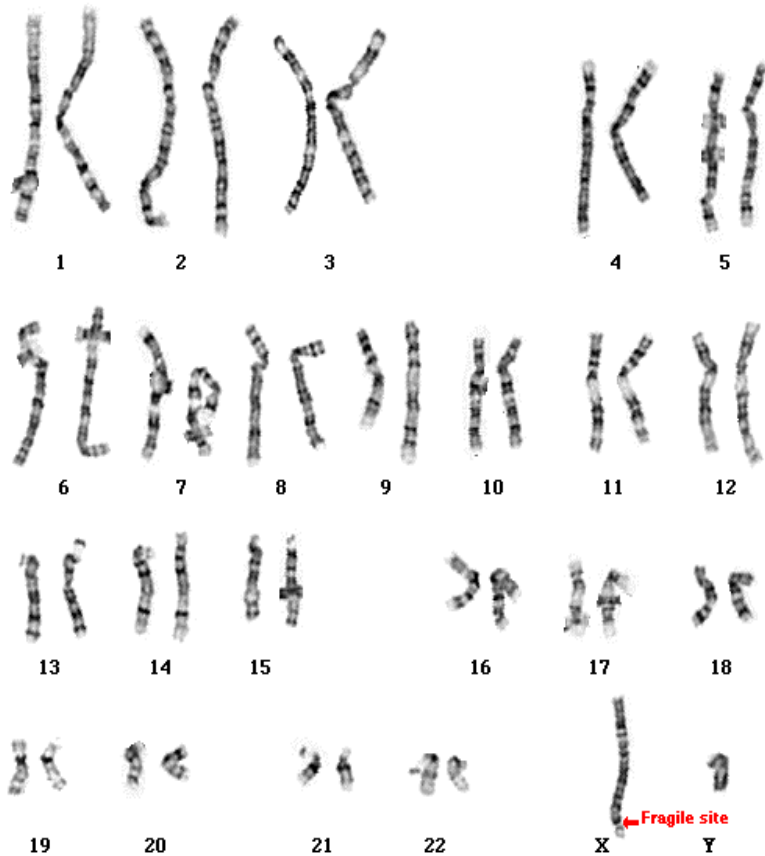
Přímá DNA diagnostika

Přímá DNA diagnostika

- Používá **přímou detekci mutace genu** tam, kde je známa sekvence nukleotidů daného genu.
Možnosti:
 - **sekvenováním DNA,**
 - pomocí **DNA sondy**, např. značené pomocí fluorochromu (FISH). Vyšetřuje se pouze proband,
 - **pomocí restriční endonukleázy** lze odhalit mutaci genu, pokud postihuje cílové místo pro RE.
- Nejčastěji vyšetřované choroby: Cystická fibróza, Duchennova muskulární dystrofie, Huntingtonova chorea, hemofilie typ A a B, achondroplazie, kostní dysplazie, Fra X aj.

Syndrom fragilního X

(buněčná diagnostika stanovením karyotypu)

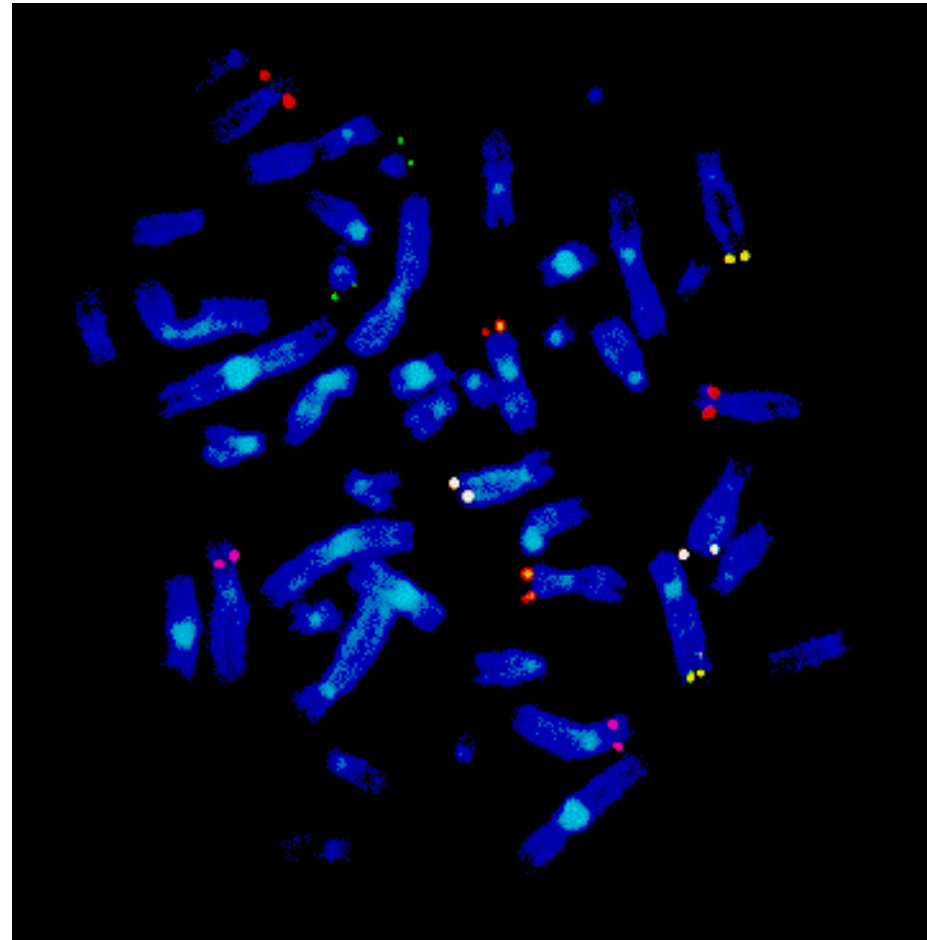


- normal structure
- broad forehead
- elongated face
- large prominent ears
- strabismus (crossed eyes)
- highly arched palate
- hyperextensible joints
- hand calluses (from self-abuse)
- pectus excavatum (indentation of chest)
- mitral valve prolapse (benign heart condition)
- enlarged testicles
- hypotonia (low muscle tone)
- soft, fleshy skin
- flat feet
- seizures (in about 10 percent)



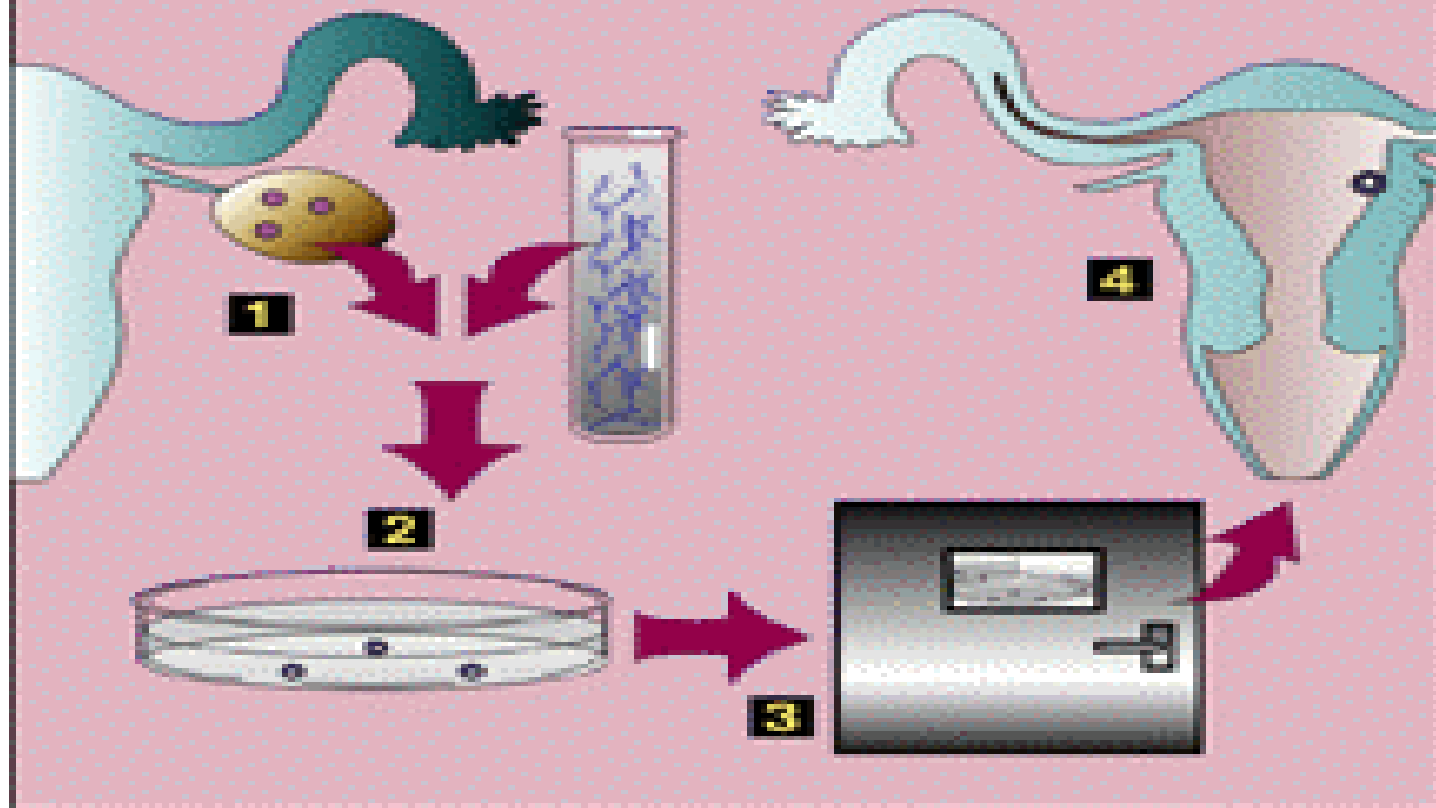
FISH (Fluorescenční in situ hybridizace)

- **Moderní dg. metoda umožňující detekci poruch chromosomů a genů (patologických) na in situ chromosomech (např. jedné blastomery při asistované reprodukci).**
- **....jednovláknové, různými fluorochromy značené sondy jsou aplikovány na celé buňky, kde byly chromosomy denaturovány. K určení chromosomu slouží specificky barvené centromerické oblasti (světle modře).**



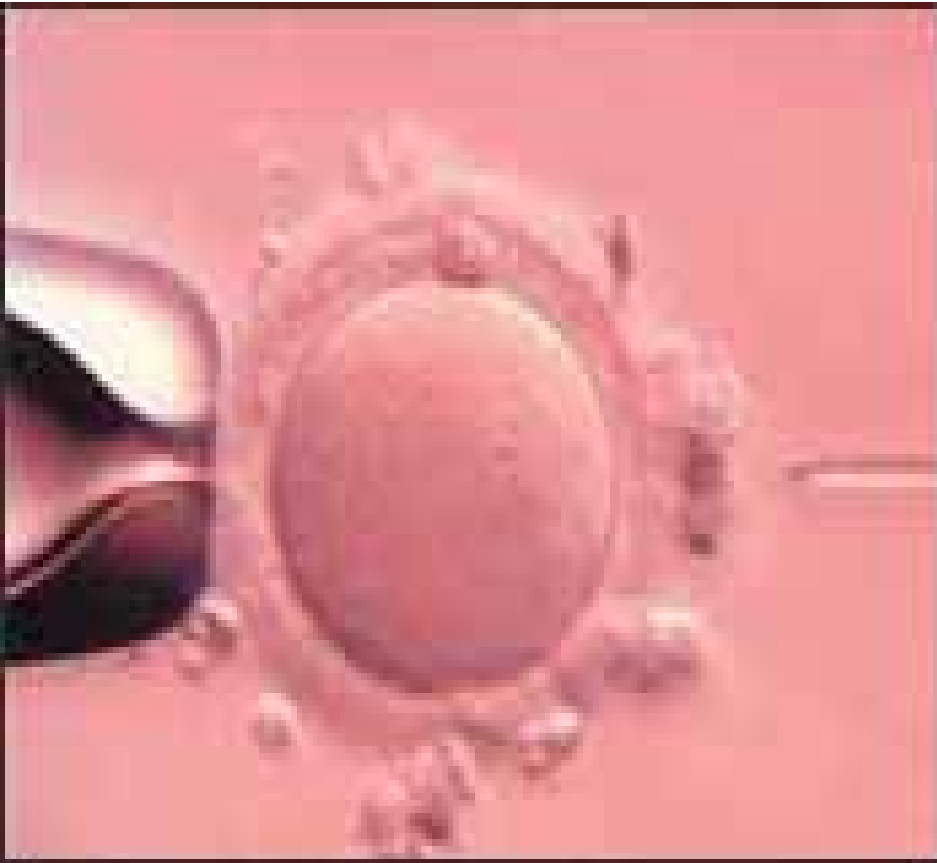
Presymptomatické testy

In Vitro Fertilization



Preimplantační diagnostika

(bude ukázána na videu)



Preimplantační diagnostika.

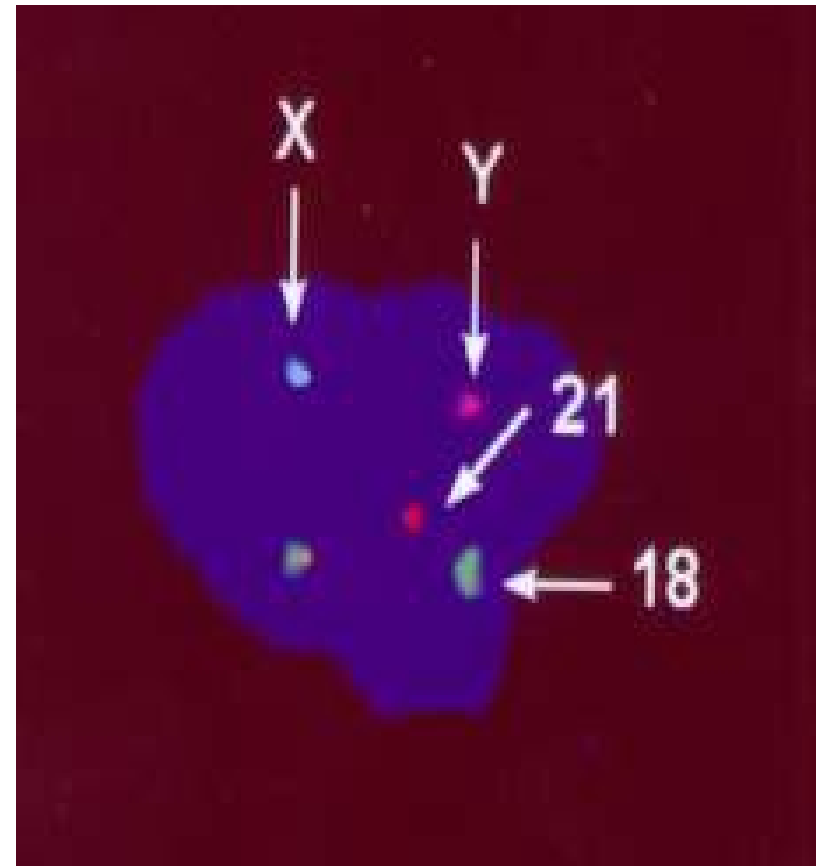
Při in vitro fertilizaci se odebere blastomera k získání DNA a vyšetření budoucího plodu.

- **Indikace preimplantační dg.:**
- 1. Vrozená chromosomální aberace nebo genová mutace u některého z rodičů.
- 2. Vyšší věk ženy, nebo obou rodičů.
- 3. Porod dítěte s vrozenou vývojovou vadou v rodině.
- 4. Opakované spontánní potraty nejasné etiologie.
- 5. Opakovaná zástava vývoje embryí při prodloužené in vitro kultivaci.

Vyšetřením můžeme u plodu vyloučit nebo potvrdit přítomnost mutace, a nejčastější atypie počtu některých určených chromozomů. Tímto vyšetřením nelze vyloučit jakoukoliv změnu a nelze zachytit chromosomální mozaiky, tj. situaci, kdy se u jedince – embrya vyskytuje více linií buněk s různou genetickou chromosomální výbavou.

- **Diagnostika nejčastějších numerických chromosomálních aberací využitím fluorescenční in situ hybridizace (FISH):**
- **Trisomie chromozomu 13.**
- **Trisomie chromozomu 18.**
- **Trisomie chromozomu 21.**
- **Stanovení gonozomů X,Y z genetických důvodů.**
- **Diagnostiku dalších chorob nutno konzultovat s genetikem.**

Preimplantační dg. + FISH



Prenatální diagnostika

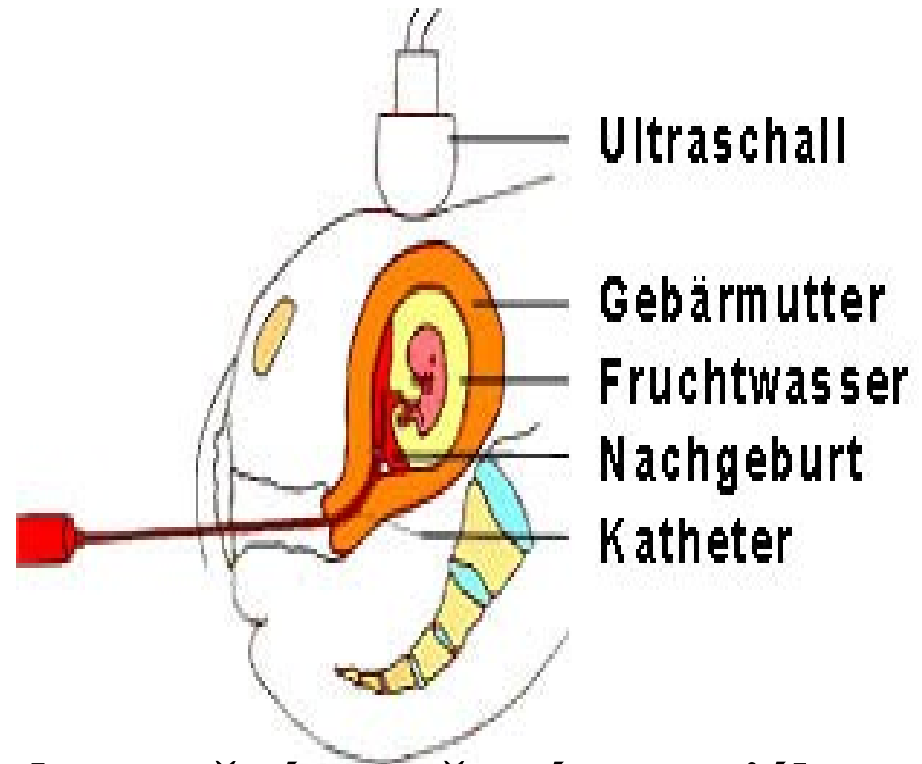
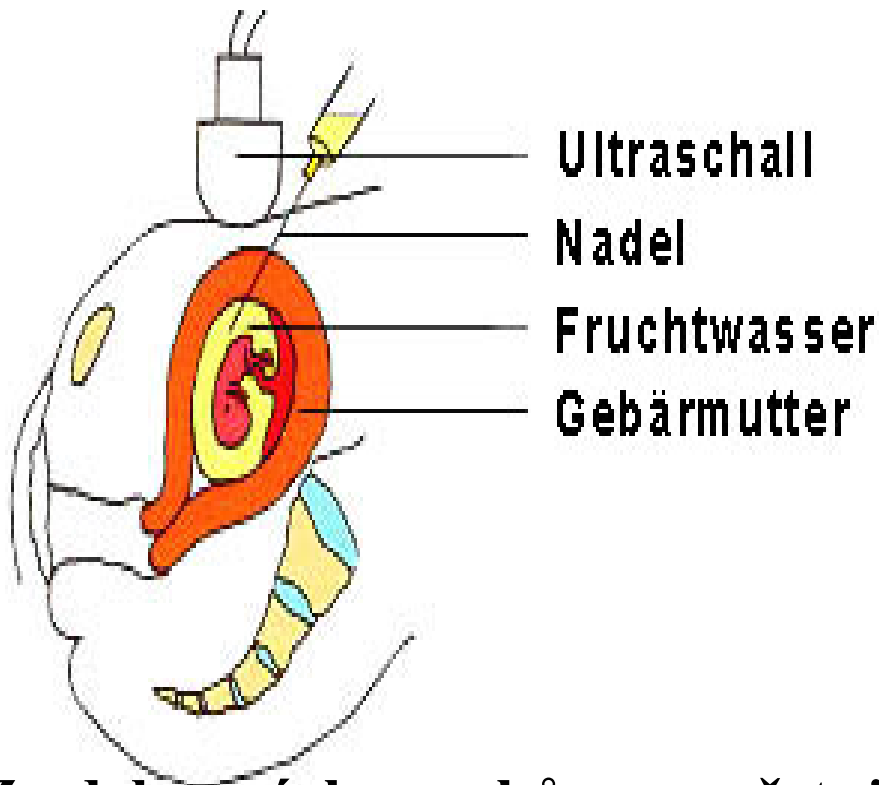
Prenatální diagnostika

Poloha plodu se vyšetří ultrazvukem.



Prenatální diagnostika

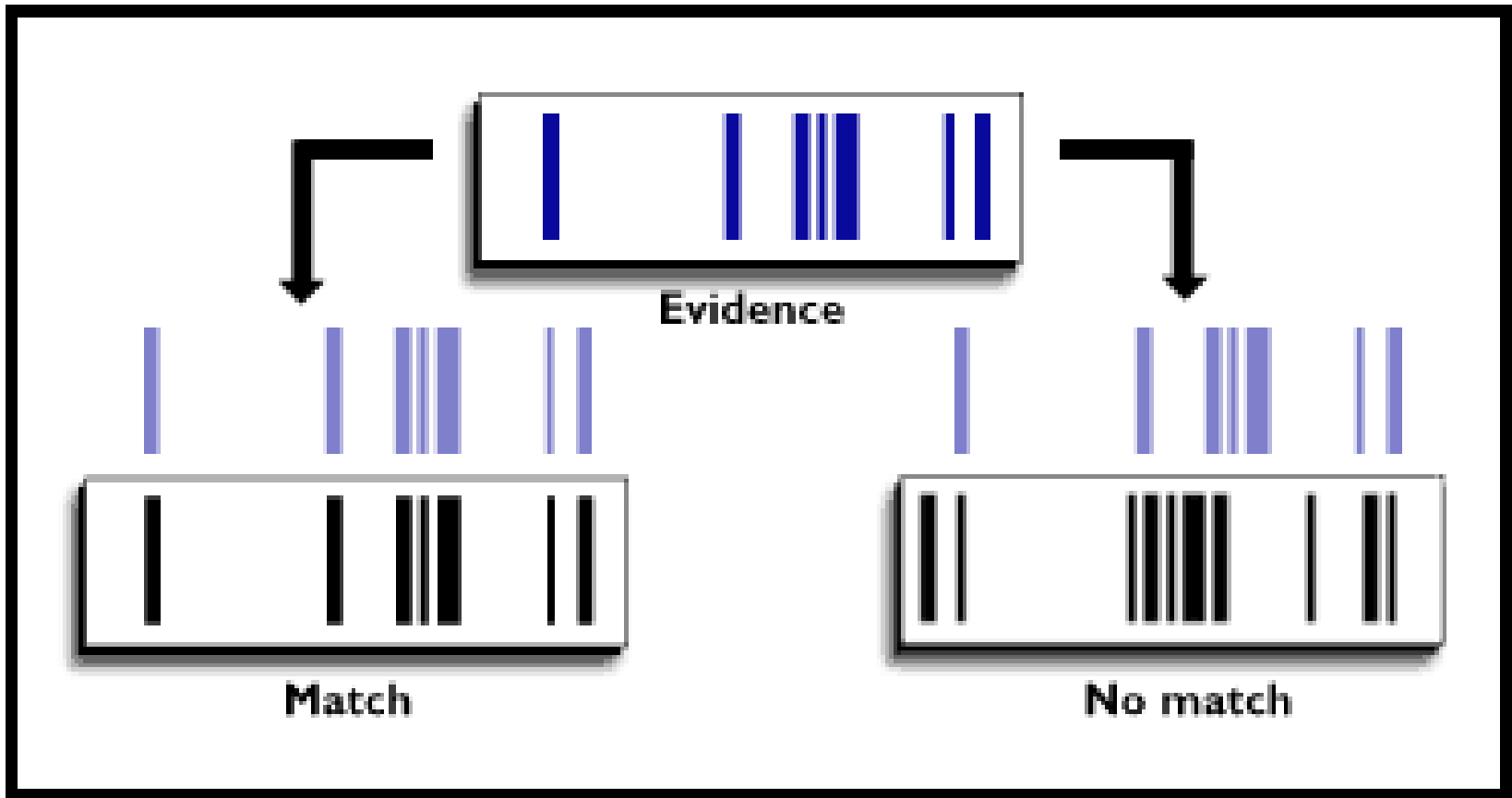
Pod kontrolou ultrazvukem se odebere buď plodová vod – **amniocentéza (vlevo)**, nebo vzorek z choriových klků – **choriobiopsie (vpravo)**.



Z odebraných vzorků se napěstuje dostatečné množství materiálu pro další zpracování DNA diagnostickými metodami (event. PCR).

DNA fingerprinting,
jednoznačně průkazní metoda

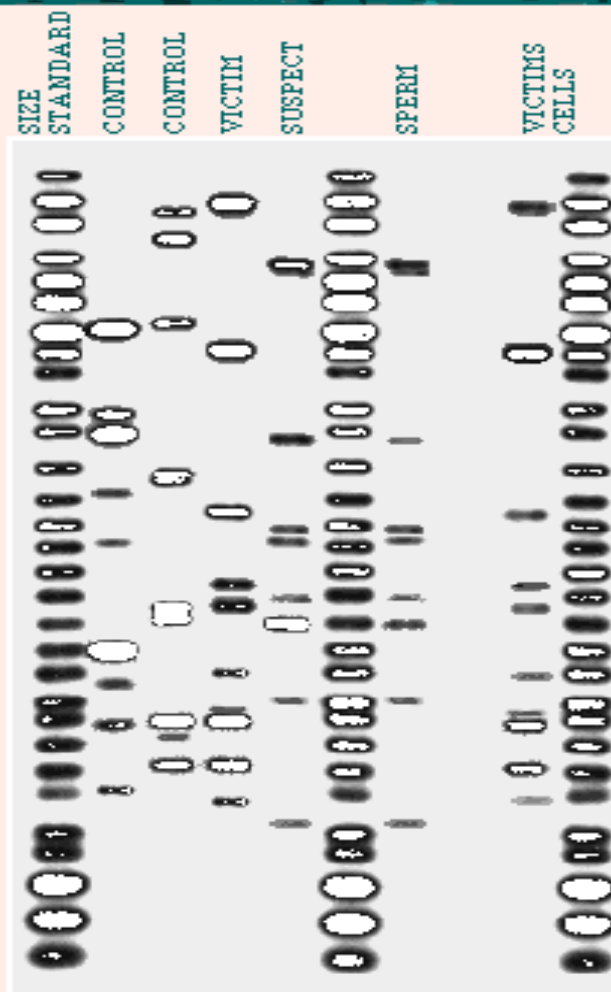
DNA fingerprinting – srovnání nálezu odpovídajícího (match) a neodpovídajícího (no match) vzorku s nálezem (evidence).



Ukázka srovnání fingerprintingu oběti (victim) a podezřelého (suspect).

Making a DNA Fingerprint

In this rape case, a series of five probes was used to create the DNA fingerprints of the evidence, victim, and suspect.

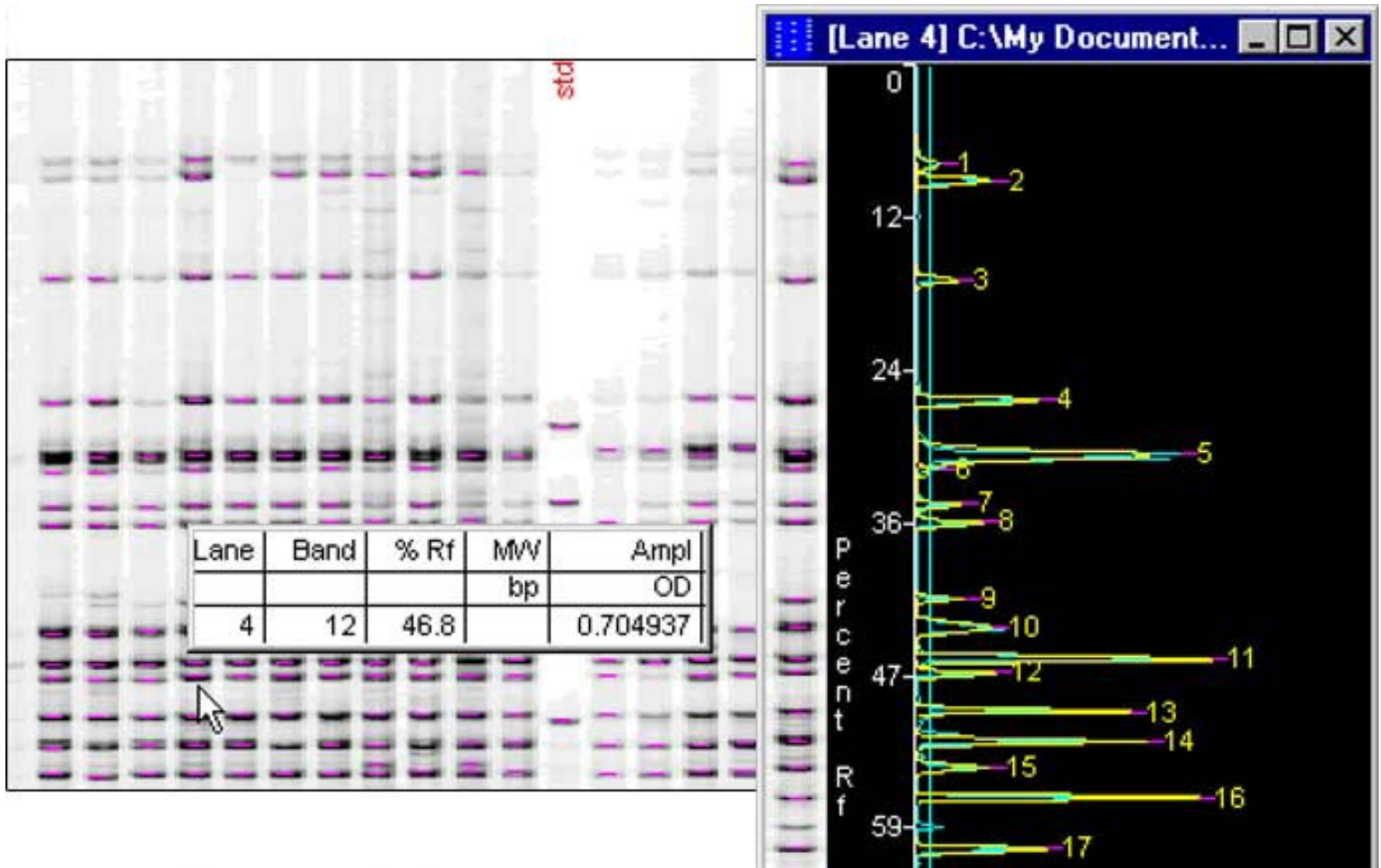


Probes 1-5

GO BACK

CONTINUE

Ukázka reálného diagramu fingerprintingu

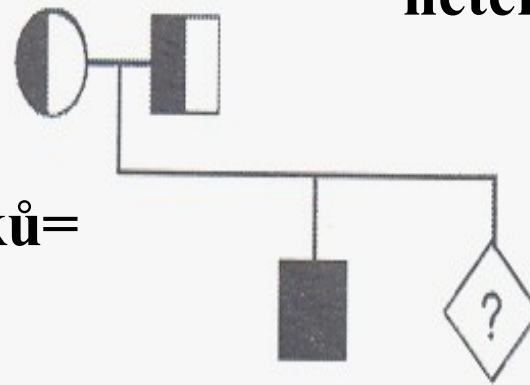


Přímá DNA diagnostika cystické fibrosy (na videu):

- Přímá DNA diagnostika cystické fibrosy pomocí PCR:
- Vyšetření matky ukázalo přítomnost mutace **delta F 508** = delece tří nukleotidů kodonu pro fenylalanin v posici 508
- Deleční mutace se diagnostikuje po odběru DNA plodu z jedné blastomery hybridizací s primery a amplifikací úseku DNA pomocí PCR
- Diagnostika: po gelové elektroforéze produktu PCR reakce je mutovaná DNA o 3 nukleotidy kratší než standardní DNA
- Má-li pacient kratší i delší úsek DNA, je heterozygot
- má-li jen delší DNA, je zdravý dominantní homozygot,
- Má-li jen kratší úsek DNA, je recesivní homozygot a byl by postižen cystickou fibrózou
- → indikace k přerušení těhotenství

Prenatální diagnosa cystické fibrosy pomocí PCR a gelové elektroforesy. 1-normální homozygot, 2-heterozygot, 3-homozygot s delecí, 4,5-rodiče= heterozygotní nosiči delece,

6-postižené dítě= homozygot s delecí, 7,8-dg z choriových klků= dítě bude nepostižený heterozygot= bude zdravé



Controls

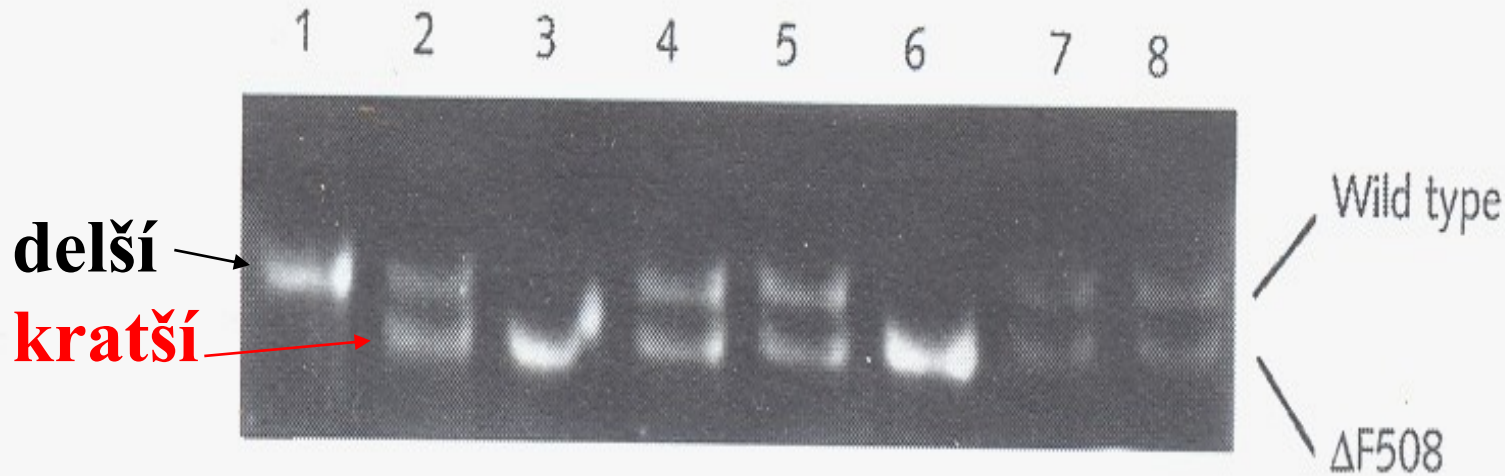


Fig. 6.9 Prenatal diagnosis for cystic fibrosis. Detection of the common mutation $\Delta F508$ in a family with one affected child

- Přednáška byla doplněna promítnutím 12 min. videoklipu o rodině, v níž se narodilo dítě s **cystickou fibrosou**.
- Byl ukázán pacient, postižený cystickou fibrosou a jeho zdraví rodiče – heterozygoti.
- Byla ukázána technika fertilizace *in vitro*.
- Byla ukázána preimplantační genetická diagnostika s odběrem jedné z osmi blastomer.
- Byla demonstrována PCR reakce k diagnostice přítomnosti mutované alely pro cystickou fibrosu s mutací delta F 508.
- Byla uvedena implantace dvou embryí bez mutace do dělohy matky.



Děkuji za pozornost.

Přednášku připravil

Doc. MUDr. M. Gabriel, CSc.

Pro bakaláře doplnila, upravila a přednesla

4. 1. 2012

prof. MUDr. Marie Kopecká, CSc.

Náměty a připomínky:

e-mail: mkopecka@med.muni.cz

<http://www.med.muni.cz/~mkopecka/>

Biologický ústav LF MU Kamenice 5, A7,

62500 Brno, tel. 54949 4778

- Informace o zkouškách z biologie
pro bakaláře
ve škol. r. 2011-2012
(opakovaná informace)

- **Zkoušky bakalářů studujících fyzioterapii, optometrii a nutriční terapii ve školním roce 2011/2012:**

Zkoušky se konají v místnosti pro praktická cvičení Biologického ústavu lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Kamenice 5, budova A7, II. nadzemí, místnost č. 205b.

- Příchod hlavním „červeným“ vchodem do kampusu, pak vpravo do II. nadzemí, pavilon A7.
- Studenti se přihlásí na zkoušku pomocí Informačního systému MU. Na každý zkušební termín je 20 volných míst. Pokud se přihlášený student rozhodne ze zkoušky odhlásit, je to možné nejpozději však 3 dny před termínem zkoušky. Pokud se přihlášený student na zkoušku nedostaví, do IS MU bude zaznamenána neúčast na zkoušce jako -. Pokud student onemocní a nemůže se dostavit ke zkoušce, musí na studijní odd. děkanátu LF MU dodat lékařský doklad o onemocnění, aby byl ze zkoušky omluven. Studenti mají možnost jednoho opravného termínu zkoušky, na který se opět přihlásí pomocí IS MU.

- V průběhu zkoušky formou písemného testu není dovoleno používání mobilního telefonu ani kalkulačky ani není povolena žádná jiná forma komunikace mezi sebou.
- Během testu studenti potřebují pouze vědomosti a tužku k vyplnění testu.
- Studenti se dostaví ke zkoušce 10 min. před začátkem zkoušky. Předpokládaná doba zkouškového testu je 60 min. Po opravě testu, která se provádí ihned po skončení testu
- (trvá podle počtu studentů asi 30-60 min), si studenti mohou počkat na výsledek zkoušky a na zapsání známky do indexu. Ostatní studenti se mohou po úspěšném vykonání zkoušky dostavit k zapsání v kterémkoli dalším vypsáném termínu zkoušky, a to asi 90 min. od začátku zkoušky, a vyčkají na chodbě před místností pro praktická cvičení 205b na pokyny učitele, který bude testy opravovat. Výsledky zkoušky budou zaznamenány do IS do 24 hod. od vykonání zkoušky.

Změna zkoušebních termínů bakalářů ve školním roce 2011 – 2012 (které jsou v IS MU od 6.10.2011)

16.2.2012 se nezkouší- termín vydeletován, místo toho byl přidán další termín na 15.2. ve 12.00 hod.

Zkouškové období: 9. 1. 2012-17. 2. 2012 (4. 6. 2012-13. 7. 2012; 27.8.-7.9. 2012)

- **Pondělí 9. 1. 2012 8.00 hod.....20 studentů.....12.00 hod.....20 studentů**
- **Úterý 10. 1. 2012 8.00 hod.....20 studentů**
- **Středa 11. 1. 2012 8.00 hod.....20 studentů.....12.00 hod..... 20 studentů**
- **Čtvrtek 12. 1. 2012 8.00 hod.....20 studentů.....12.00 hod.....20 studentů**
- **Pátek 13. 1. 2012 8.00 hod.....20 studentů.....12.00 hod.....20 studentů**
- **Pondělí 16. 1. 2012 8.00 hod.....20 studentů.....12.00 hod.....20 studentů**
- **Úterý 17. 1. 2012 8.00 hod.....20 studentů.....12.00 hod.....20 studentů**
- **Středa 18. 1. 2012 8.00 hod.....20 studentů.....12.00 hod.....20 studentů**
- **Čtvrtek 19. 1. 2012 8.00 hod.....20 studentů.....12.00 hod.....20 studentů**
- **Pátek 20. 1. 2012 12.00 hod.....20 studentů**
- **Středa 25. 1. 2012 8.00 hod.....20 studentů**
- **Středa 1. 2. 2012 8.00 hod.....20 studentů**
- **Středa 8. 2. 2012 8.00 hod.....20 studentů**
- **Středa 15. 2. 2012 8.00 hod.....20 studentů....12.00 hod..20 studentů - termín přidán**
- **Čtvrtek 16. 2. 2012 8.00 hod.....20 studentů-termín zrušen, vydeletován z IS**

Kontaktní adresa učitele, který zajišťuje přednášky pro bakaláře studující fyzioterapii, optometrii a pro nutriční terapeutky, a zkouškové testy:

- **prof. MUDr. Marie Kopecká, CSc., tel 54949 4778,**
- **e-mail: mkopecka@med.muni.cz**
- **telefon sekretářky ústavu : Debora Ledahudcová, tel. 54949 4588**
- **telefon manažerky ústavu: Mgr. Martina Vráblíková, tel. 54949 3334**