

DIAGNOSTIKA

RNA

EXPRESE

SESTŘIH „SEKV. EXONŮ“

DNA

PŘÍMÁ

SCORING

- Restrikční analýza PCR produktu
- Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy
- detekce variant pomocí sond
- ARMS
- MLPA
- Triplet Primed PCR

SCANNING

- analýza teploty tání (SYBR Green)
- sekvenování

NEPŘÍMÁ

analýza mikrosatelitů

DIAGNOSTIKA

RNA

EXPRESE

SESTŘIH „SEKV. EXONŮ“

DNA

PŘÍMÁ

SCORING

- Restrikční analýza PCR produktu
- Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy
- detekce variant pomocí sond
- ARMS
- MLPA
- Triplet Primed PCR

SCANNING

- analýza teploty tání (SYBR Green)
- sekvenování

NEPŘÍMÁ

analýza mikrosatelitů

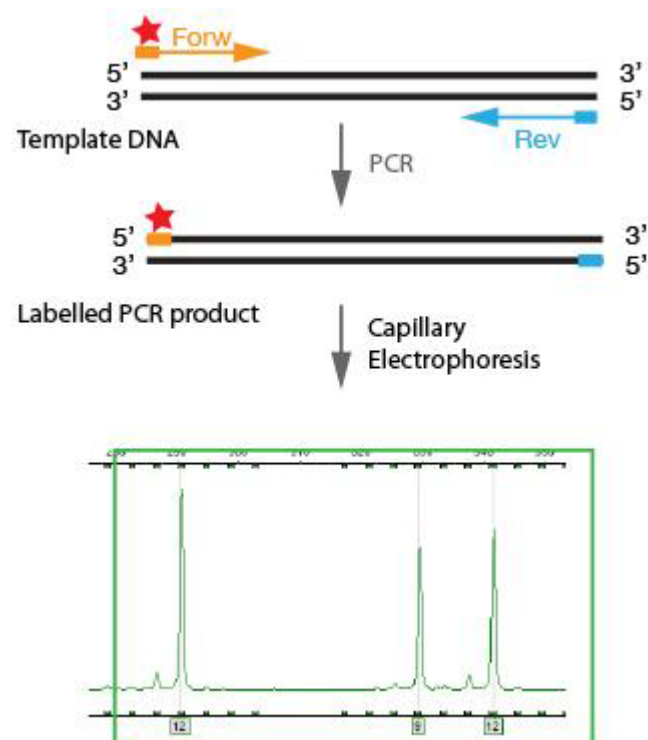
FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

velikostní separace molekul DNA

- princip – podobný klasické ELFO (místo gelu polymer + užití fluorescenčního značení)
- příprava fluor. značených fragmentů → kapilární ELFO (příprava fragmentů je nejvariabilnější částí)

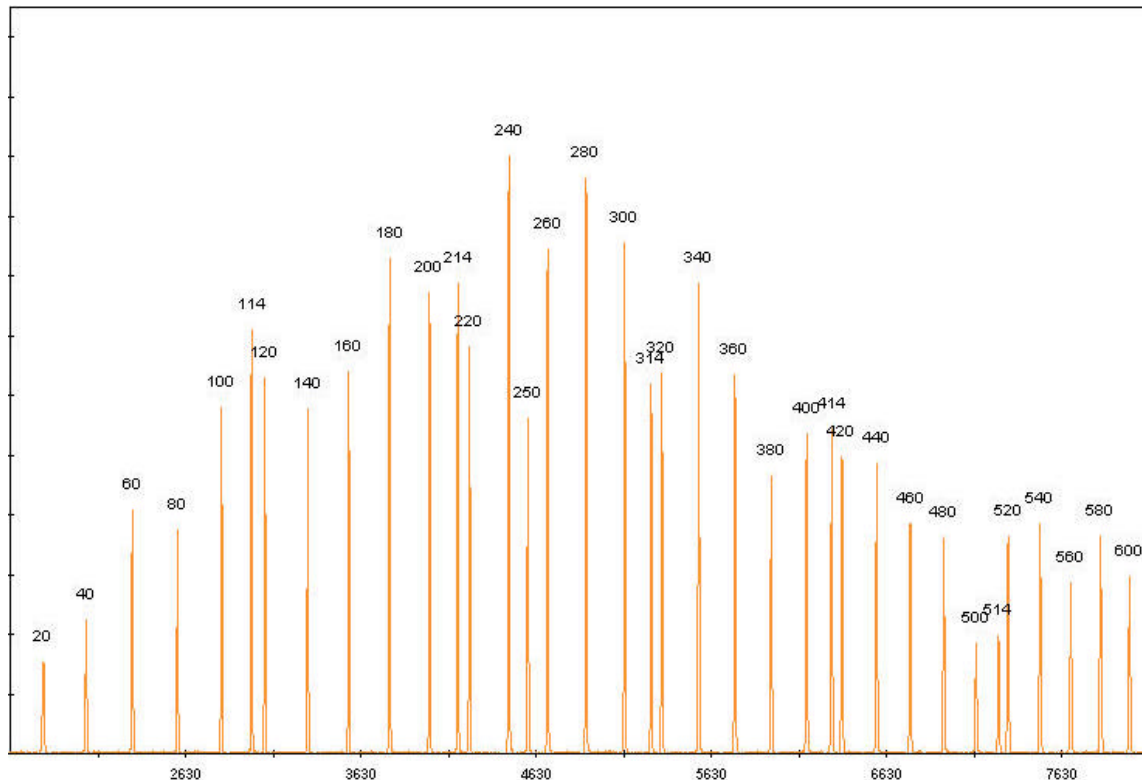
FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

- umožňuje analyzovat produkty předcházejících reakcí
- společně s produkty v kapiláře analyzován i hmotnostní standard → umožňuje určit velikost (počet bp)
- produkty i hm. standard musí být fluorescenčně značeny
- různé fluorescenční značky – nutné vybrat kombinace s nepřekrývajícími se spektry



HMOTNOSTNÍ STANDARD

- obsahuje fluorescenčně značené fragmenty o definované délce (bp)
Electropherogram of the GeneScan™ – 600 LIZ® Size Standard



FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

velikost fragmentů PCR produktů je určena vzhledem k fragmentům hm. standardu

→ zjištěná velikost je relativní

- odpovídá daným podmínkám analýzy

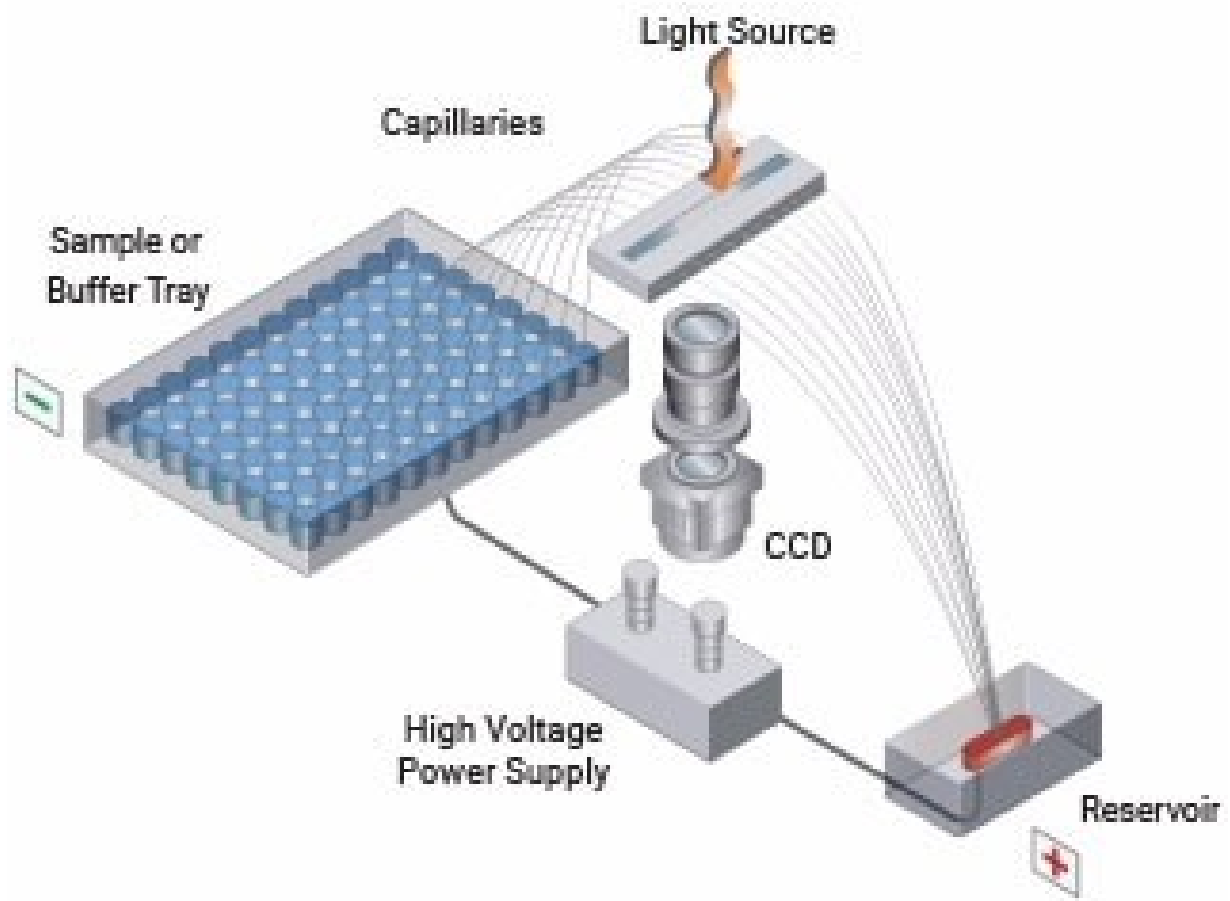
→ nelze srovnávat mezi sebou u různých strojů, podmínek

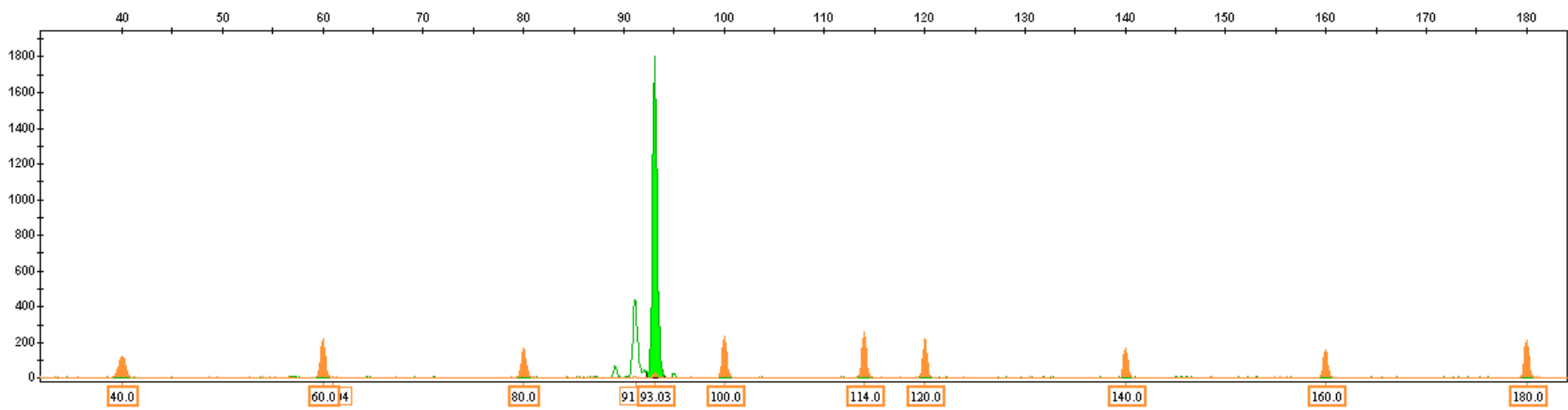
- pokud zachováme podmínky

– stroj, kapilára, standard aj. – výsledky by měly být srovnatelné

- plochu/výšku píků lze srovnávat pouze,

pokud jsou značeny stejnou značkou (intenzita značek se může lišit!)





METODA MLPA

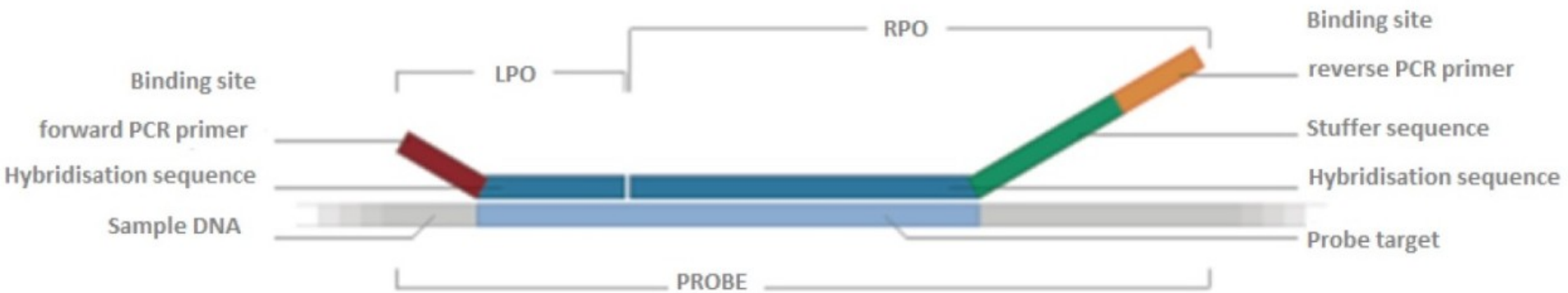
MLPA = Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

- založena na kvantitativní multiplexní PCR
- princip – amplifikace sond závislá na ligaci
- účel – detekce relativního počtu kopií specifických sekvencí (nejčastěji v porovnání se standardním kontrolním vzorkem)
→ identifikace genomických změn, především rozsáhlejších delecí/duplikací v rámci genů nebo chromozomů
- další aplikace – stanovení SNP, metylace v promotorové oblasti

METODA MLPA



MLPA SONDY



1. DENATURACE/HYBRIDIZACE

- pravá a levá část sondy se váží na cílovou sekvenci DNA



2. LIGACE

nahybridizované části sondy jsou spojeny ligázou

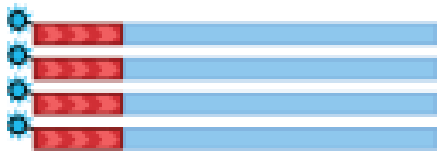


3. AMPLIFIKACE

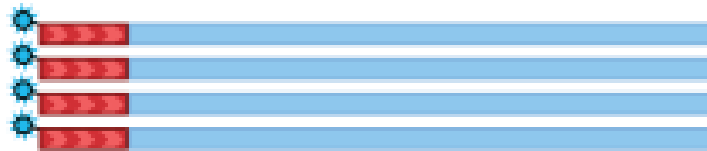
- ligované sondy jsou amplifikovány pomocí univerzálního páru primerů
!amplifikují se sondy, ne zkoumaná DNA!

 Reverse PCR primer  Forward PCR primer (fluorescently labeled)

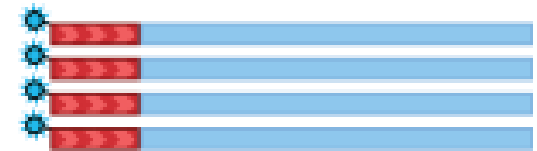
Probe A (170 nt)



Probe B (299 nt)

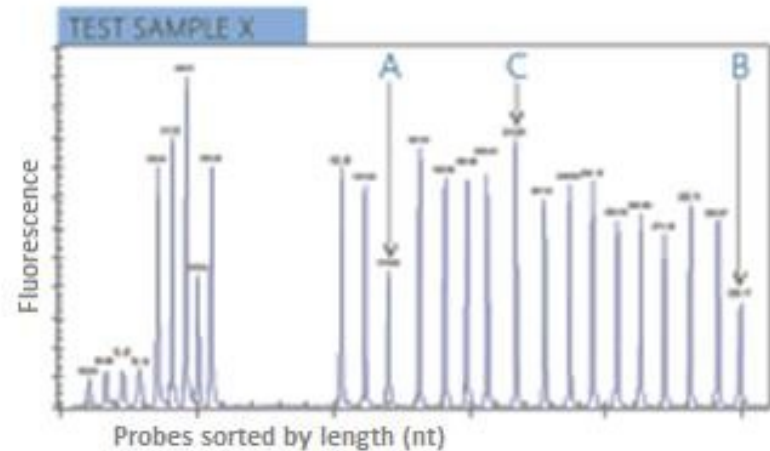
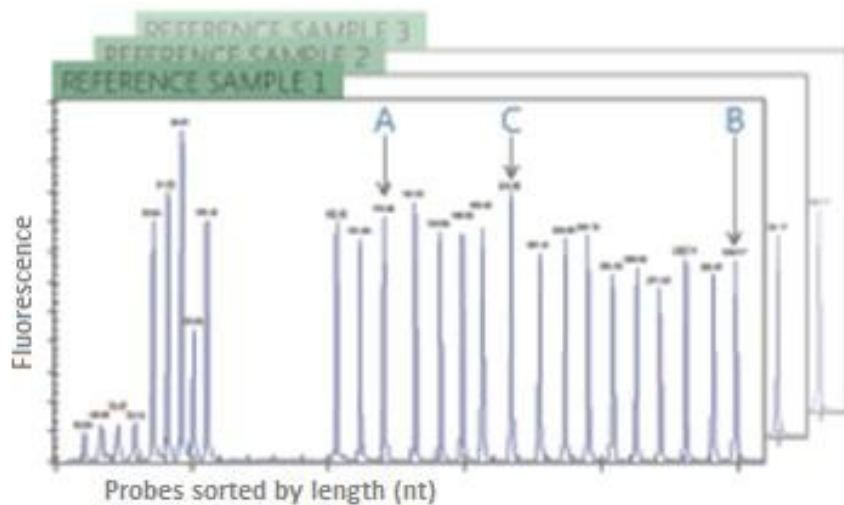


Probe C (216 nt)

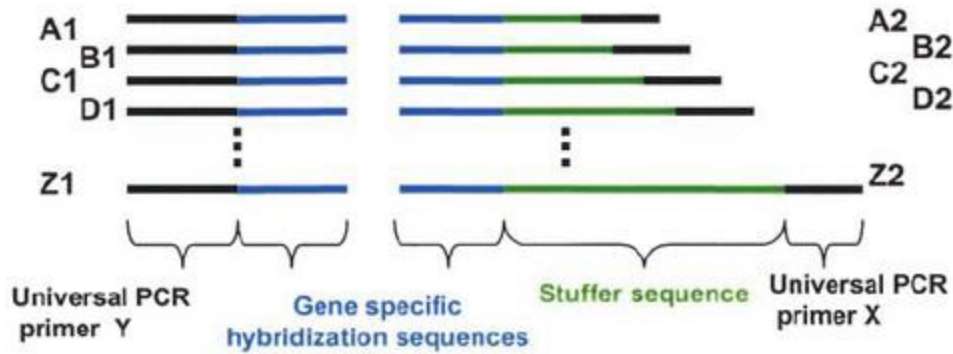


4. FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

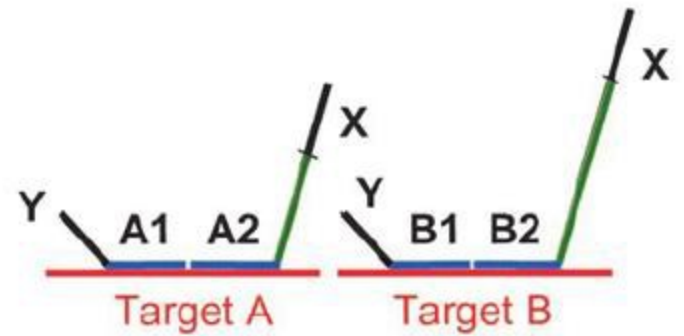
- fluorescenčně značené produkty jsou separovány kapilární elektroforézou dle své délky (počtu nt)



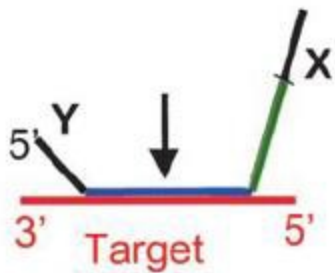
Probe Design



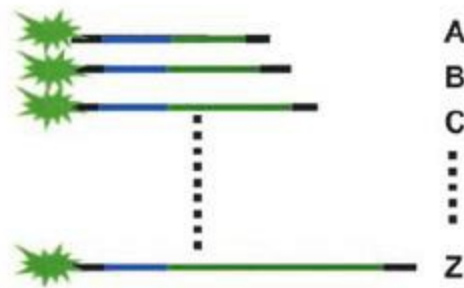
Multiplex Hybridization



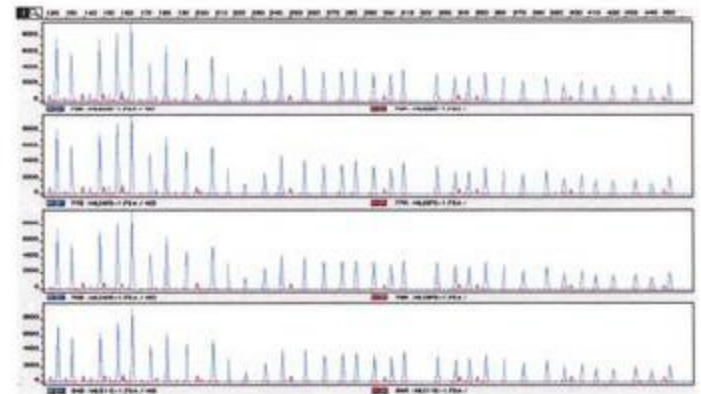
Ligation



PCR Amplification

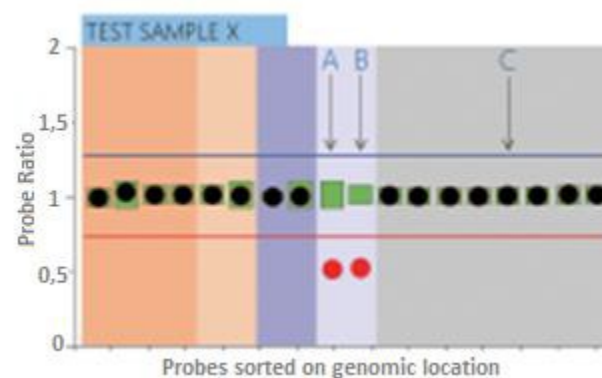
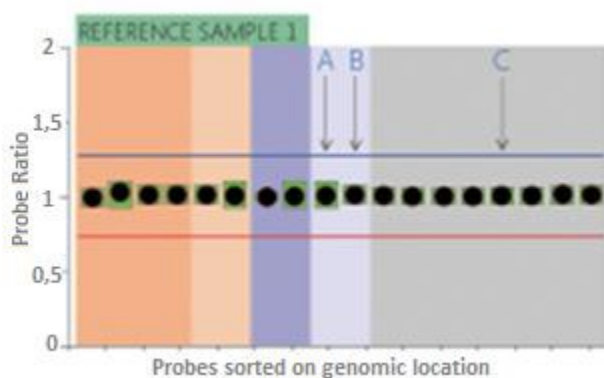


Fragment Analysis



ANALÝZA VÝSLEDKŮ

- výška výsledného vrcholu daného amplikonu odpovídá relativnímu počtu kopií cílové sekvence
 - výsledky je možné hodnotit okometricky nebo pomocí SW Coffalyser.Net
 - dávány do poměru sondy reference a testovaného vzorku
- 1 = standardní počet kopií
0,5 = heterozygotní delece
1,5 = heterozygotní duplikace (u genů na autozomech)



VÝHODY MLPA

multiplex – detekuje změny počtu kopii až 50 specifických sekvencí v jedné PCR reakci

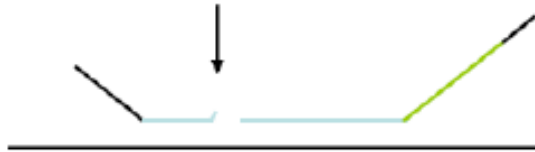
- dokáže odlišit sekvence lišící se v jediném nukleotidu
- vyžaduje minimum DNA (20 ng (3000 buněk))
- identický protokol pro různé aplikace
- všechny potřebné reagenty jsou součástí kitu
- nezbytné vybavení bývá běžnou součástí všech molekulárně biologických laboratoří

NEVÝHODY MLPA

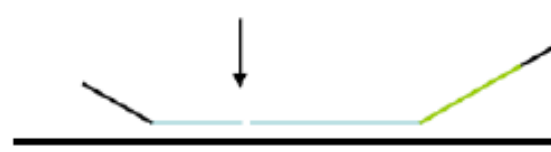
detekuje jenom změny v relativním množství – neodliší například diploidní a triploidní buňky

- vysoká citlivost na kontaminaci reakce
- nutnost mít minimálně 50% buněk nesoucích danou přestavbu
- časově náročná a obtížná výroba vlastních sond (komerčně však dostupná řada sond)
- SNP v místě ligace mohou vést k falešným výsledkům (výsledek ověřit jinou metodou nebo pomocí sekvenace vyloučit přítomnost SNP)

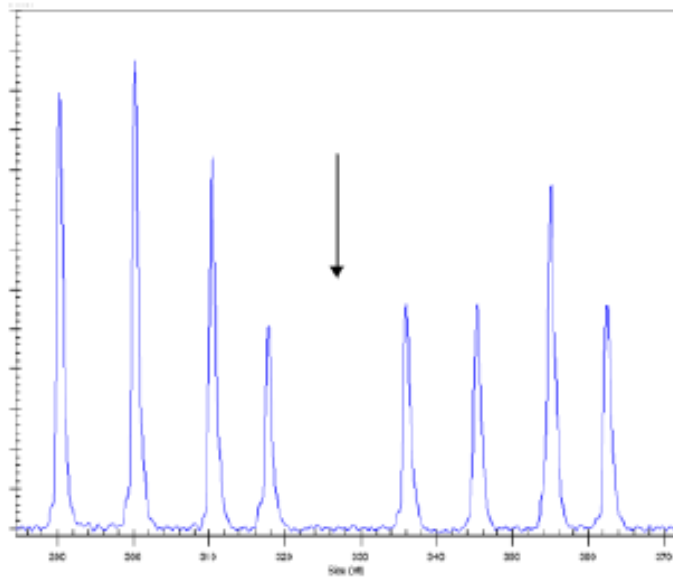
Mismatch



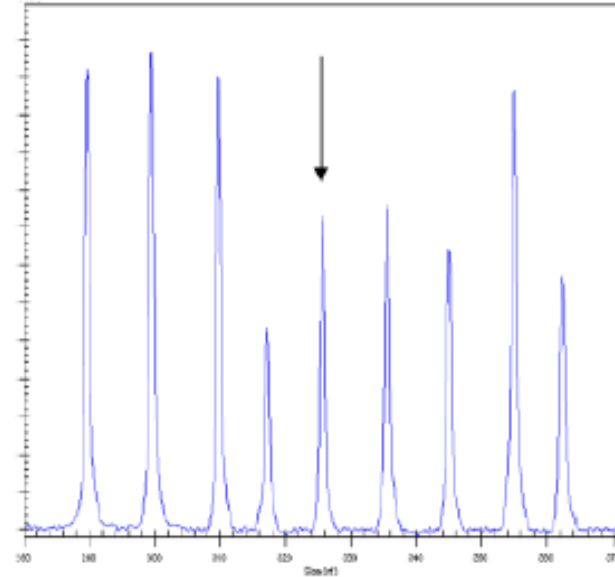
Perfect match



Mismatch at the probe ligation site →
No ligation, no amplification product



Ligation of the two probe oligonucleotides
→ Amplification product

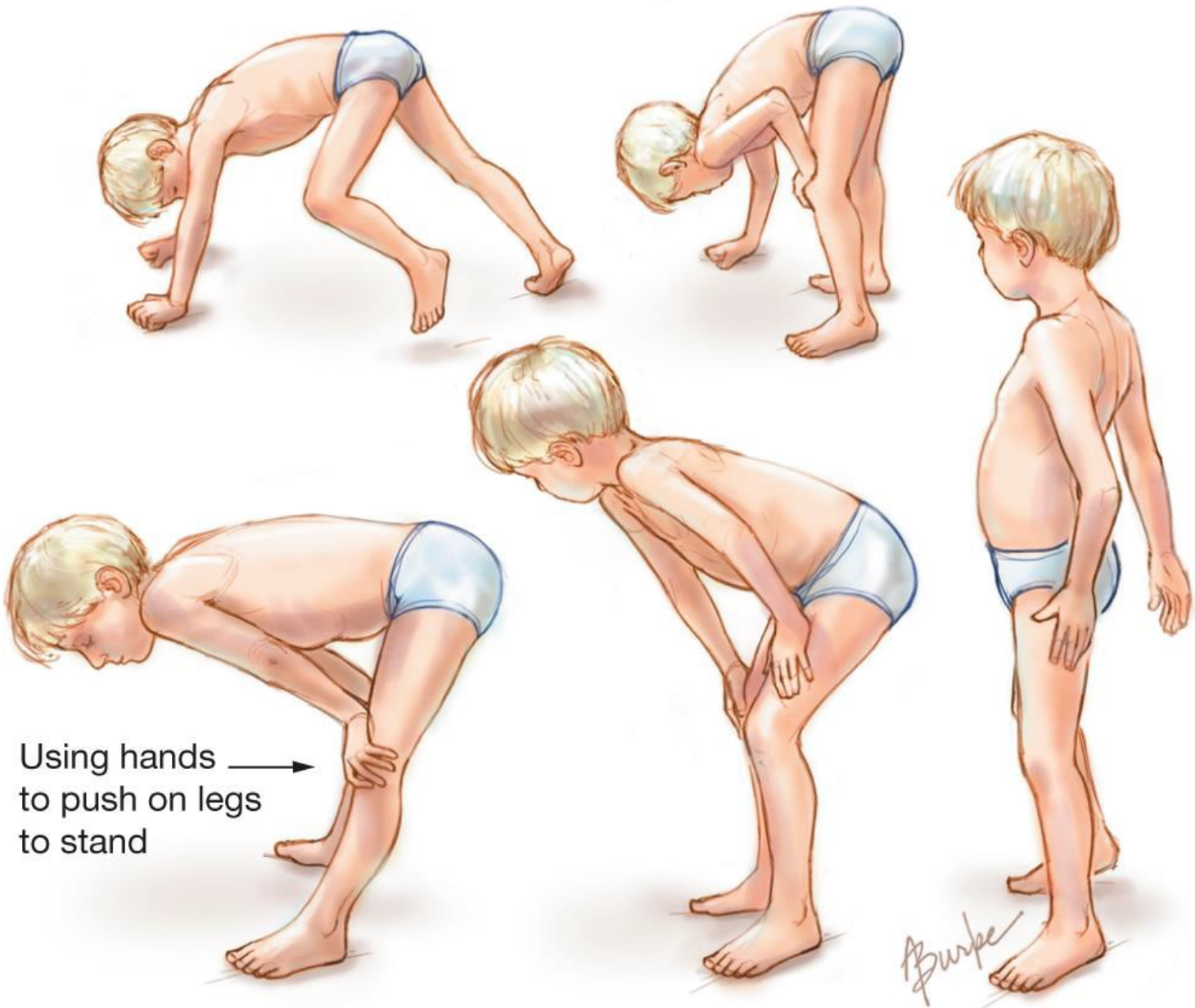


DUCHENNOVA SVALOVÁ DYSTROFIE (DMD)

progredující svalová slabost – kosterní– srdeční a dýchací svaly

- vyskytuje se s frekvencí 1:3000 narozených chlapců
- klinický obraz
- zpočátku bezpříznakové onemocnění – vývoj probíhá několik měsíců standardně
- kolem 2.-6. roku – nástup příznaků (problémy s chůzí, vstáváním aj.)
- postupný rozvoj myopatie dolních končetin (pozorujeme tzv. Gowersovo znamení; „kachní chůze“)
- kolem 12. roku – upoutání na invalidní vozík
- postižení dalších skupin kosterního svalstva
- postižení svalu srdečního (→ srdeční selhání), postižení plicních svalů (→ umělá plicní ventilace)
- kolem 30. roku – smrt

Gowers Sign



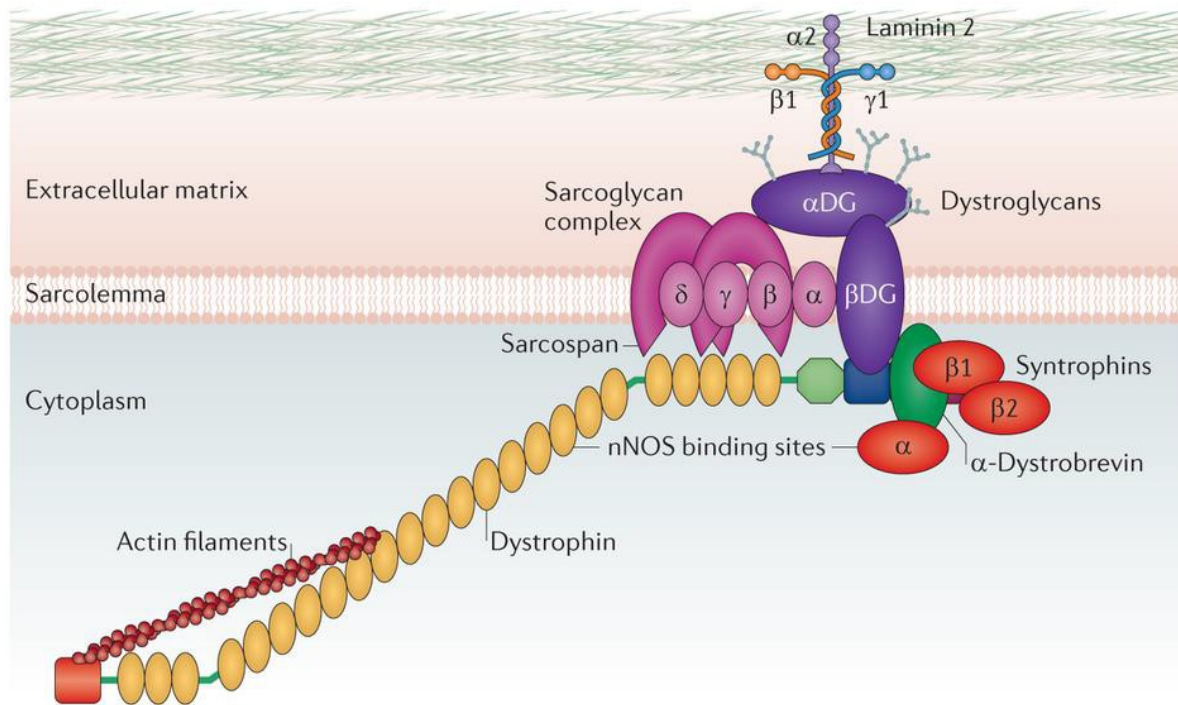
Using hands →
to push on legs
to stand

Burke

DUCHENNOVA SVALOVÁ DYSTROFIE (DMD)

příčina – defekty v genu pro svalový protein dystrofin (gen DMD)

- dystrofin = strukturní svalový protein – zprostředkovává interakci mezi buněčným cytoskeletem (aktinem) a ECM



GEN DMD

rozsáhlý gen – 79 exonů

- lokalizace Xp21 → X-vázaná recesivní choroba
 - většina defektů DMD genu = copy number variation
 - frekvence delecí/duplikací v DMD genu u DMD/BMD pacientů je odhadována 60-70 % pro delece a 5-10 % pro duplikace → prvním krokem ve vyšetřovacím algoritmu molekulárně genetické diagnostiky je metoda MLPA
 - delece/duplikace exonů mohou být out of frame nebo in frame
 - DMD – delece/ duplikace mění čtecí rámec, nonsense mutace
 - BMD – delece/duplikace zachovávají čtecí rámec
- ☐Beckerova svalová dystrofie (BMD) – mírnější forma

Geny na chromozomu X



ŽENA

2 kopie → stejné jako u autozomů

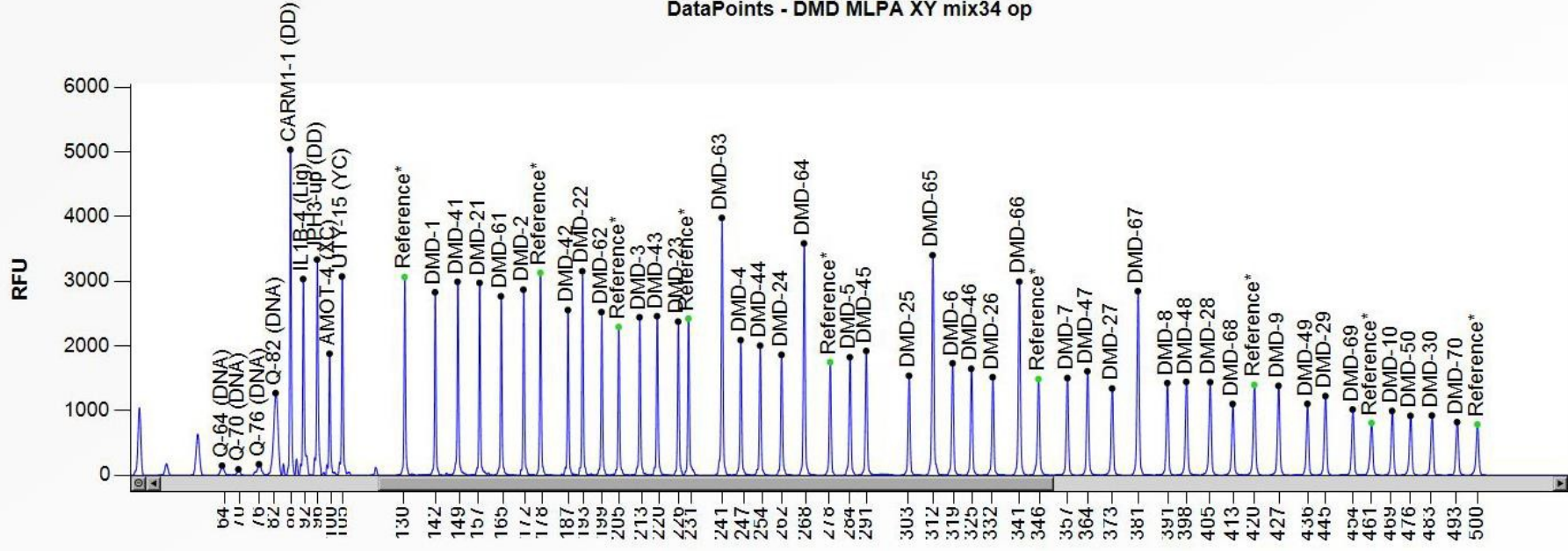
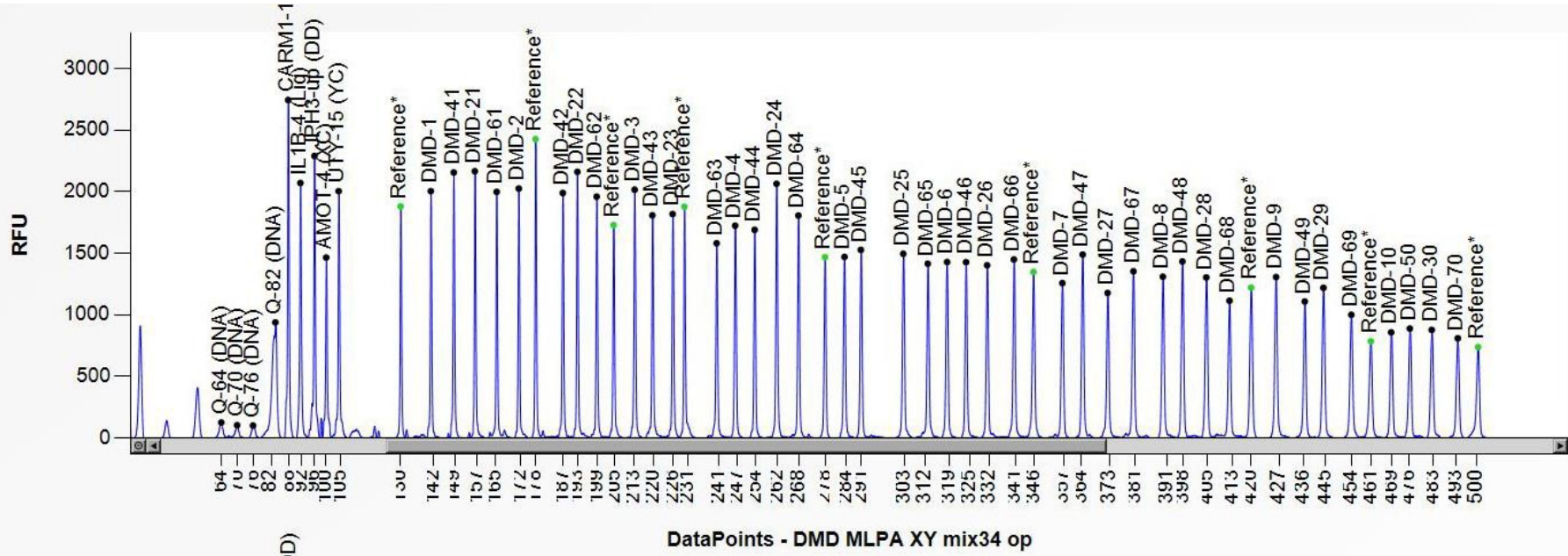
MUŽ = HEMIZYGOT

1 kopie → poměry se mění

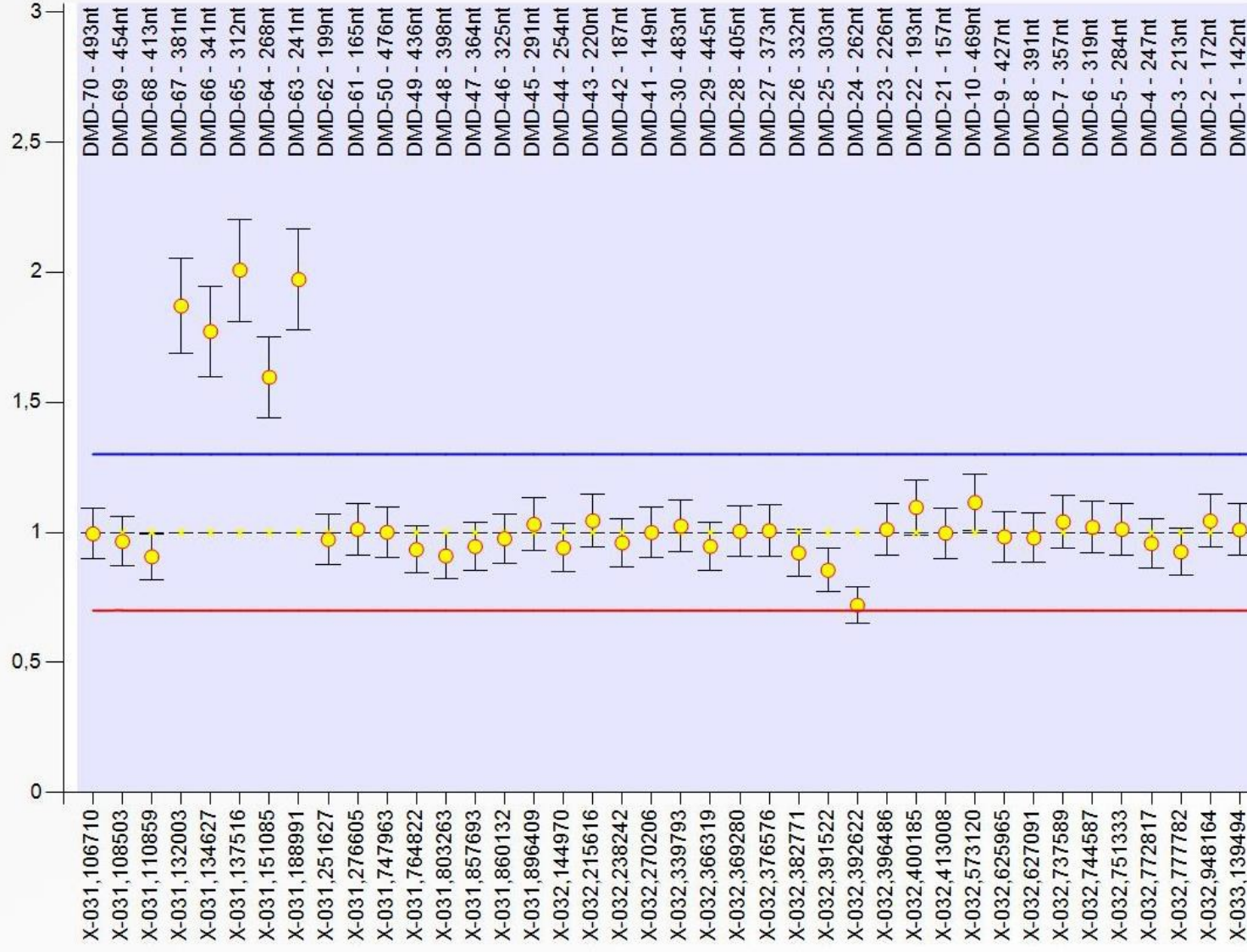
1 = standardní počet kopií

0 = delece

2= duplikace



Ratio



DMD-70 - 493nt
DMD-69 - 454nt
DMD-68 - 413nt
DMD-67 - 381nt
DMD-66 - 341nt
DMD-65 - 312nt
DMD-64 - 268nt
DMD-63 - 241nt
DMD-62 - 199nt
DMD-61 - 165nt
DMD-50 - 476nt
DMD-49 - 436nt
DMD-48 - 398nt
DMD-47 - 364nt
DMD-46 - 325nt
DMD-45 - 291nt
DMD-44 - 254nt
DMD-43 - 220nt
DMD-42 - 187nt
DMD-41 - 149nt
DMD-30 - 483nt
DMD-29 - 445nt
DMD-28 - 405nt
DMD-27 - 373nt
DMD-26 - 332nt
DMD-25 - 303nt
DMD-24 - 262nt
DMD-23 - 226nt
DMD-22 - 193nt
DMD-21 - 157nt
DMD-10 - 469nt
DMD-9 - 427nt
DMD-8 - 391nt
DMD-7 - 357nt
DMD-6 - 319nt
DMD-5 - 284nt
DMD-4 - 247nt
DMD-3 - 213nt
DMD-2 - 172nt
DMD-1 - 142nt

Reference* - 205nt
Reference* - 231nt
Reference* - 130nt
Reference* - 178nt
Reference* - 346nt
Reference* - 278nt
Reference* - 500nt
Reference* - 420nt
Reference* - 461nt

ARMS

ARMS = amplification refractory mutation system

- PCR s alelově specifickými primery
 - princip – Mismatch PCR primeru na 3' konci znemožňuje PCR
- pokud primer nehybridizuje na svém 3' konci dokonale – nedochází k amplifikaci

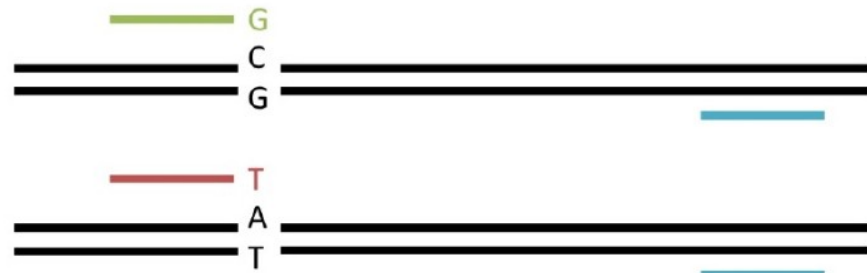
PRINCIP ARMS

PODSTATA METODY – 3 PRIMERY

- 2 specifické – forward primery
 - pro standardní alelu (**F-WT**)
 - pro mutantní alelu (**F-MT**)
- 1 společný – reverse primer (**R**)

→ rozděleno do 2 PCR

1. **F-WT**+**R**
2. **F-MT**+**R**



HODNOCENÍ ARMS

- hodnotí se přítomnost/nepřítomnost produktu v obou reakcích → určení genotypu

genotyp	WT/WT	WT/MT	MT/MT
PCR (F-WT+R)	+	+	-
PCR (F-MT+R)	-	+	+

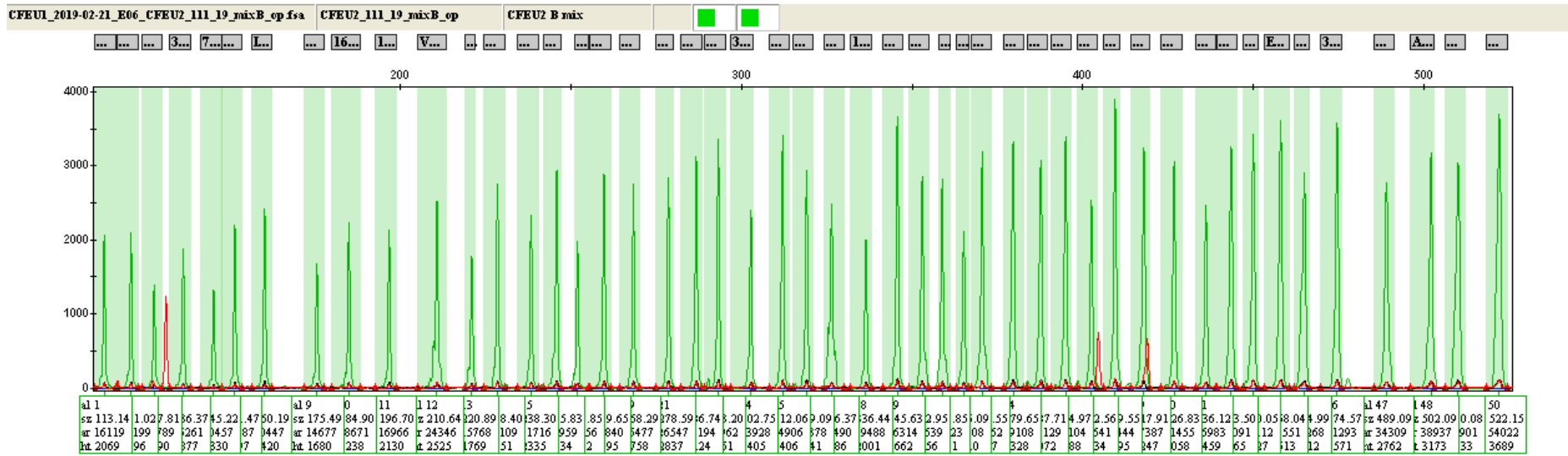
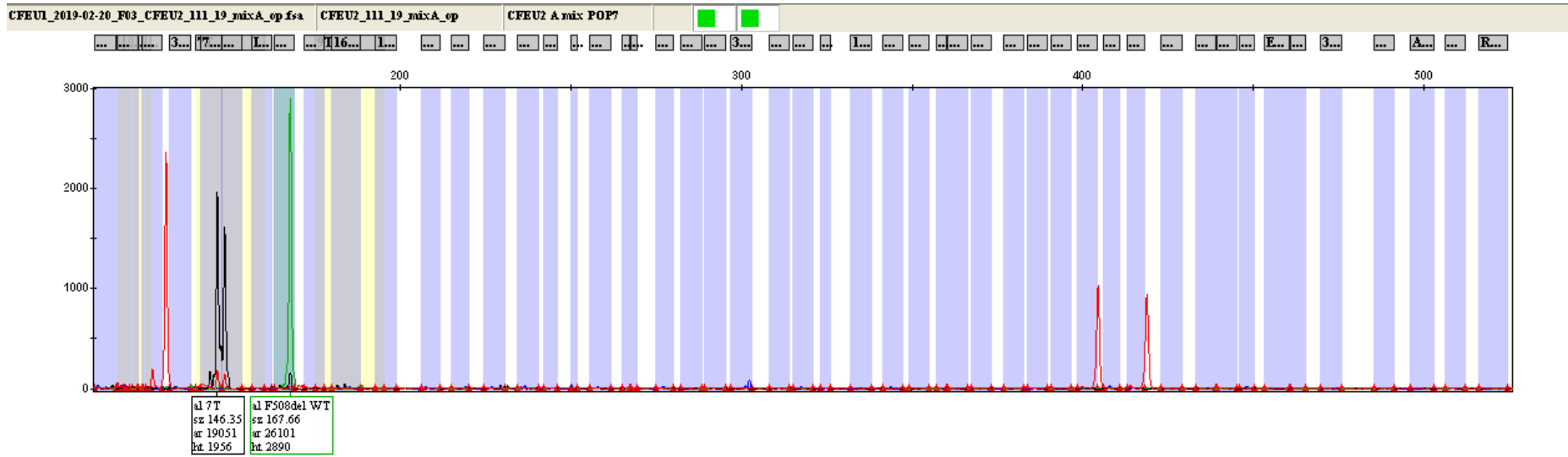
- * možnost provádět i multiplexní reakce (obsahují více trojic primerů)

CYSTICKÁ FIBRÓZA – Elucigene® CF-EU 2v1

komerčně vyráběný kit

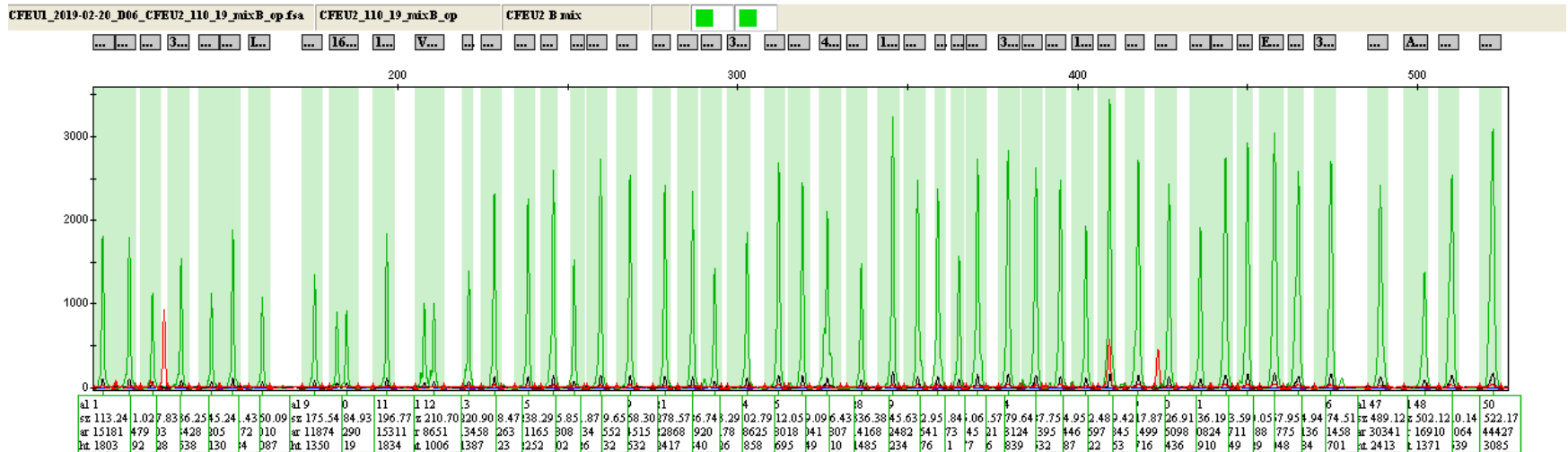
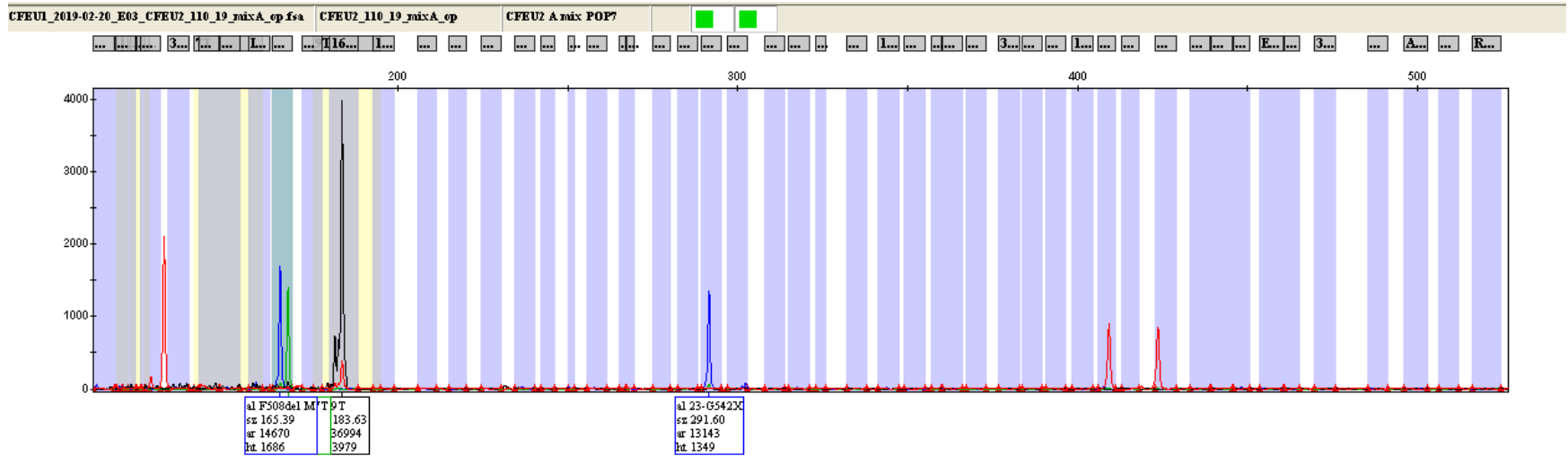
- detekuje 50 nejčastějších mutací v CFTR genu
- multiplexní alelově specifická PCR následovaná fragmentační analýzou
- 2 mixy
- mixA – MT + WT primery pro F508del
(→ kontrola úspěšnosti PCR v případě přítomnosti MT produktů)
- mixB – WT (bez F508del)
- oba mixy obsahují 2 páry primerů pro STR markery → kontrola kontaminace cizí DNA

MT + WT pro F508del (+STR)



WT - F508del (+STR)

MT + WT pro F508del (+STR)



WT - F508del (+STR)

DIAGNOSTIKA

RNA

EXPRESE

SESTŘIH „SEKV. EXONŮ“

DNA

PŘÍMÁ

SCORING

- Restrikční analýza PCR produktu
- Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy
- detekce variant pomocí sond
- ARMS
- MLPA
- Triplet Primed PCR

SCANNING

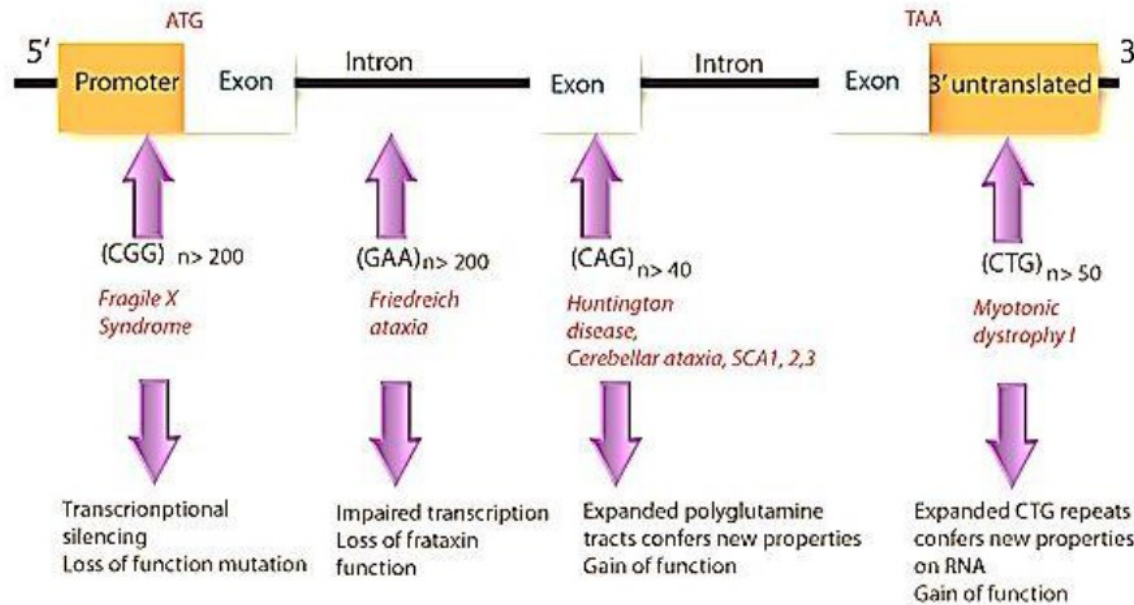
- analýza teploty tání (SYBR Green)
- sekvenování

NEPŘÍMÁ

analýza mikrosatelitů

Expanze trinukleotidových repetetic

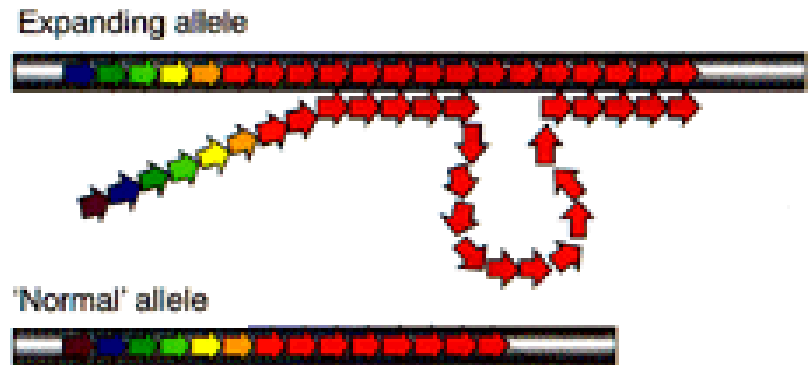
- v genomu – překládané i nepřekládané oblasti
- **nestabilita závisí na délce repetic a typu sekvence**
- lokalizovány **uvnitř ORF** → expanzí narušená struktura proteinů (Huntingtonova chorea)
- lokalizovány **vně ORF (v 3'UTR nebo 5'UTR)** → inaktivují nebo ovlivňují expresi genu (Syndrom fragilního X)



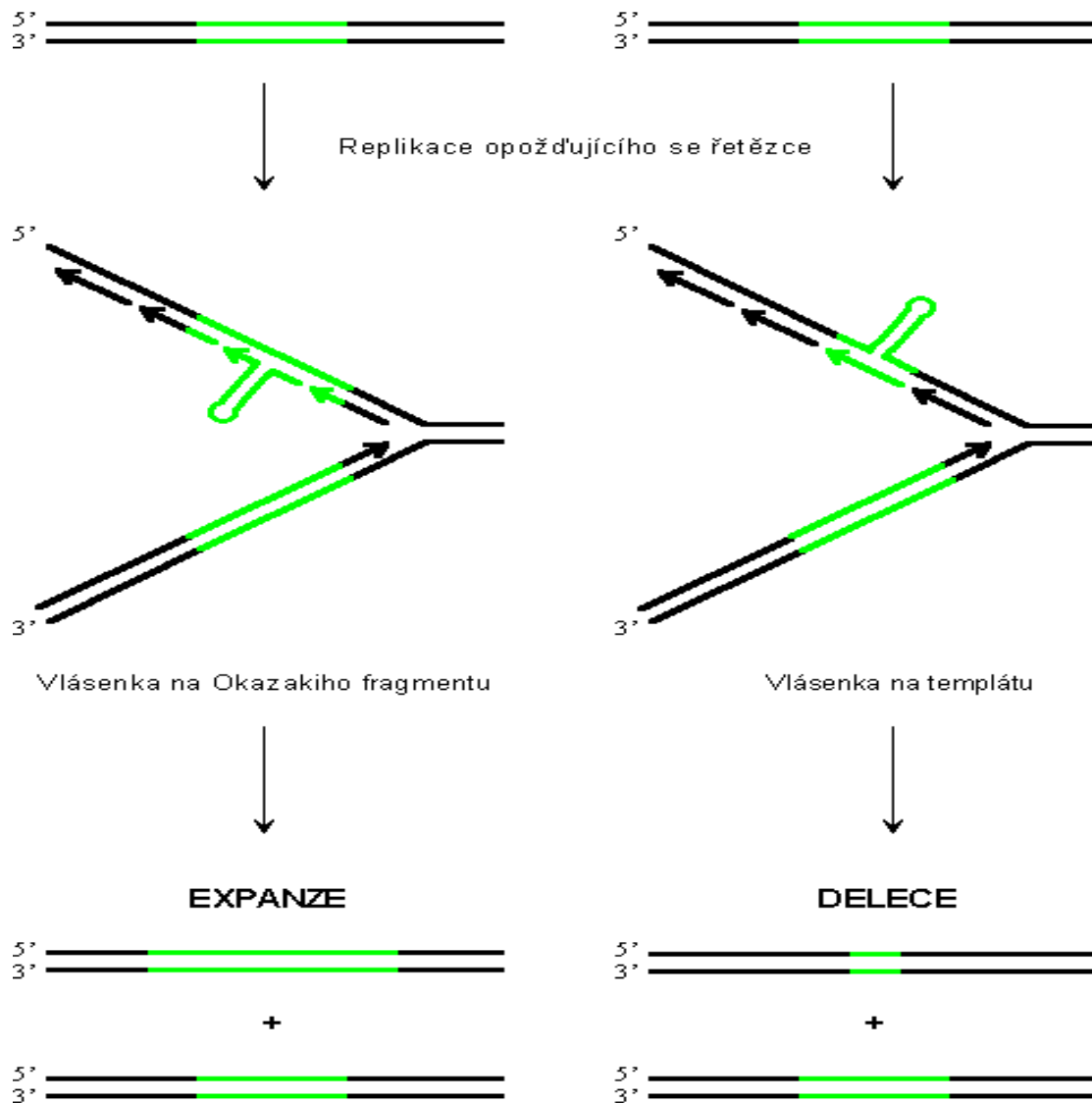


expanze

nový typ mutace, popsán 1991



Expanze a delece trinukleotidů při replikaci



PREMUTACE „ČASOVANÁ BOMBA V GENOMU“

repetice – nestabilní v meióze → počet může narůstat

- k velkým expanzím dochází pouze při maternálním /paternálním přenosu

- mechanismus vzniku – „sklouznutí“ polymerázy →

repetice mohou vytvářet sekundární struktury (např. vlásenka) →

poté reparační systém vlásenku odstraní →

oblast repetice se rozšíří →

v dalším kole replikace polymeráza přisyntetizuje podle prodlouženého templátu další repetici

Klinická anticipace

spojená s expanzivním prodlužováním
trinukleotidových repetit



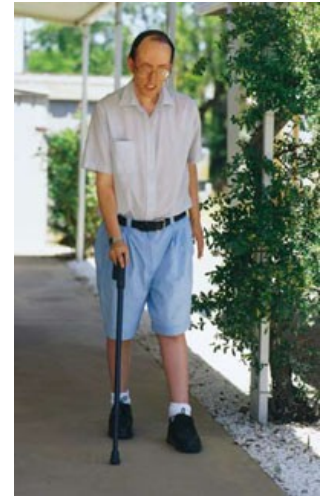
asymptomatický prarodič
(MD1 : 5 - 50 CTG repetit)



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



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



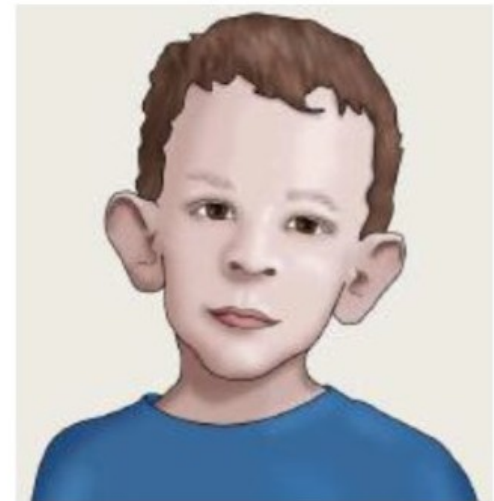
Přehled a základní charakteristika některých chorob asociovaných s expanzí trinukleotidů

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

SYNDROM FRAGILNÍHO X

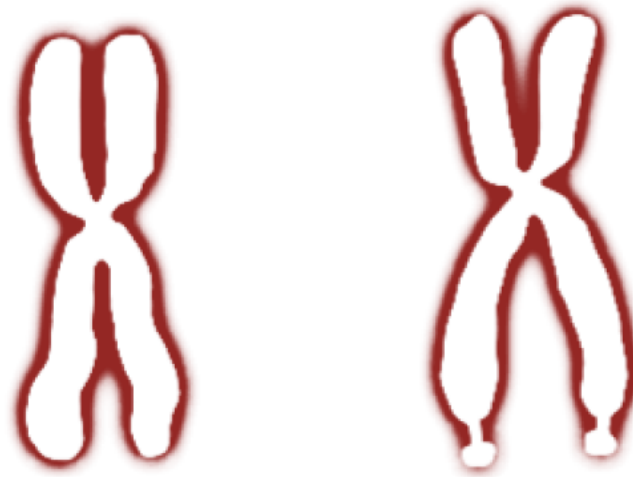
- Fragile X Syndrome = **FXS** = syndrom fragilního X
- druhá nejčastější forma **mentální retardace** u člověka
- **četnost: 1 na 4000 mužů, 1 na 7000 žen**
- **XD, neúplná penetrance** (asi 20 % hemizygotních mužů, 30 % heterozygotních žen bez příznaků)

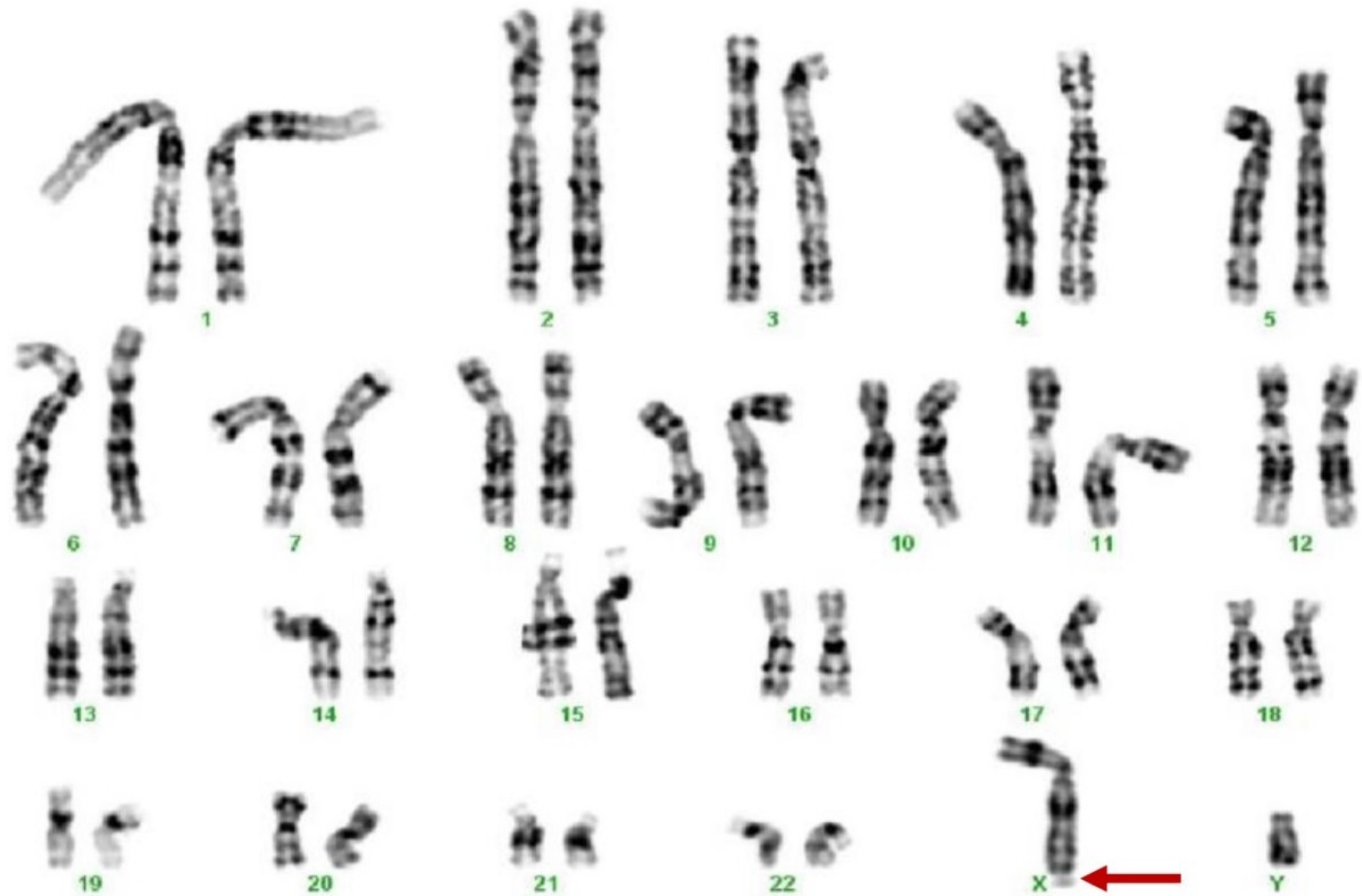
- psychosociální projevy – **snížené IQ**, hyperaktivita, zpoždění vývoje
 - 30 % pacientů jsou autisté (2-5 % autistických dětí má FXS)
 - 25 % pacientů trpí epilepsií
- morfologické projevy FXS – **protáhlý obličej s prominující bradou a velkýma odstávajícíma ušima**
 - u mužů makroorchidismus (= abnormální zvětšení varlat)



PŘÍČINA FXS

- **název dle vzhledu chr. X v mikroskopu** – zúžené místo v distální části
→ tvořené **expanzí trinukleotidových repetitivních sekvencí**, které naruší strukturu chromatinu





MNOŽSTVÍ CGG REPETIC → FENOTYP

5-54 – standardní množství

55-200 – premutace → FXPOI, FXTAS

> 200 – plná mutace → **zametylování CpG ostrovů**

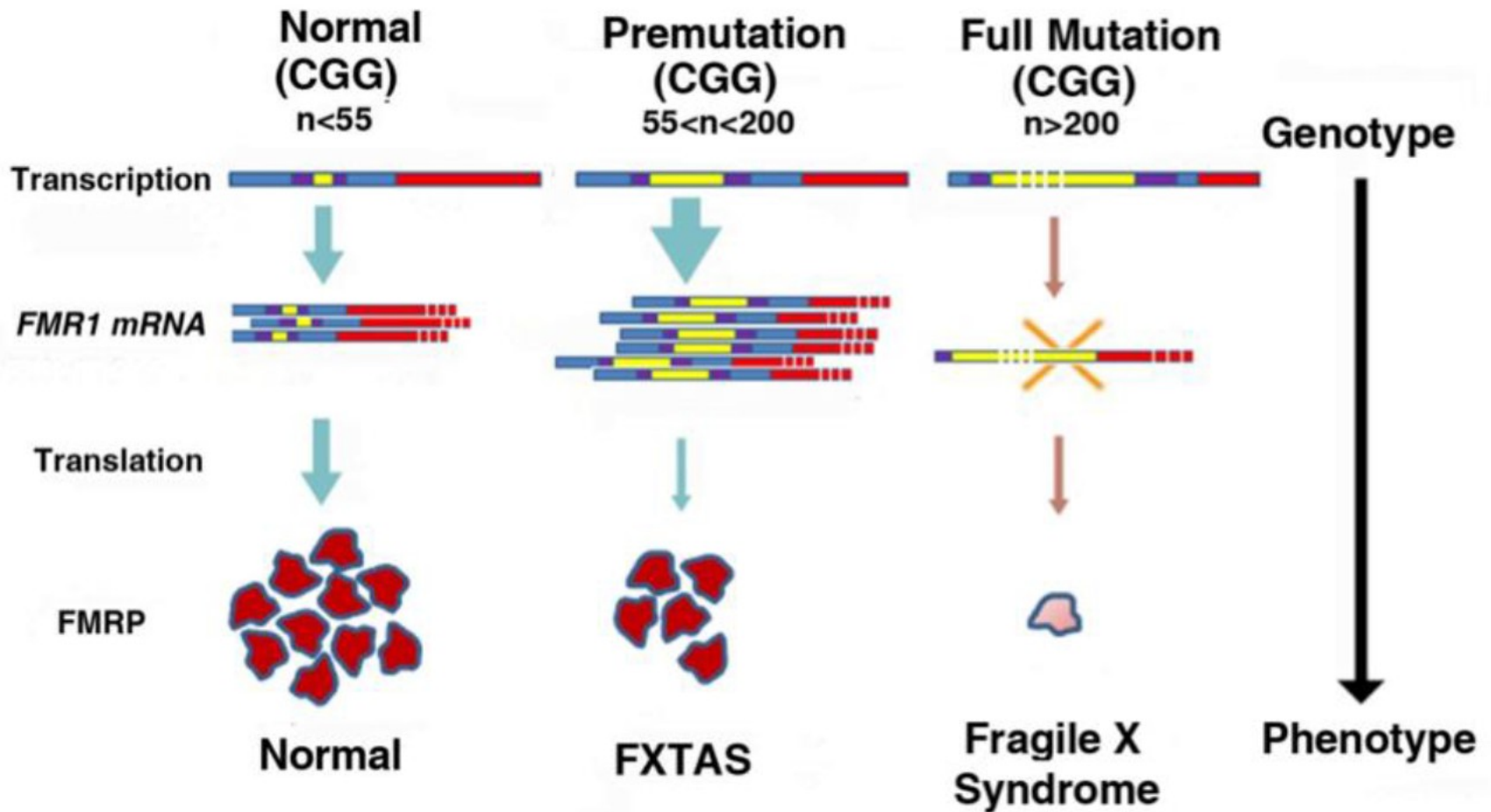
→ potlačení exprese genu FMR1 → **FXS**

- u premutace – korelace počtu repetic a míry postižení
- u plné mutace – nezáleží na počtu repetic (větší počet již nezhorší projevy)

- **FXTAS** (častěji ♂ než ♀) = fragile X-associated tremor/ataxia syndrome
 - projevy obvykle v páté dekádě života
 - nejvýznamnější projev – nekontrolovatelný třes (příznaky podobné parkinsonismu)
- **FXPOI** (♀) = fragile X-associated primary ovarian insufficiency
 - ne u všech žen s premutací
 - může způsobit nepravidelný menstruační cyklus, časnou menopauzu, neplodnost



gen *FMR1*



FMR1 Identification Kit

- určen pro screening premutace a plné mutace (neumožňuje stanovit přesný počet opakování)
- metoda – přímá tripled-primed PCR (dTP-PCR)
- repetice CGG v 5' UTR amplifikována z genomové DNA, produkty reakce → **analýza křivek tání**
- využívá interkalační barvivo **SYBR[®] Green**
- **T_m** – **úměrná velikosti amplikonu** (expandované alely mají vyšší T_m)
- cut off – využití kontrolních vzorků o známém počtu opakování (př. 54 opakování)



Triplet Primed PCR (TP-PCR)

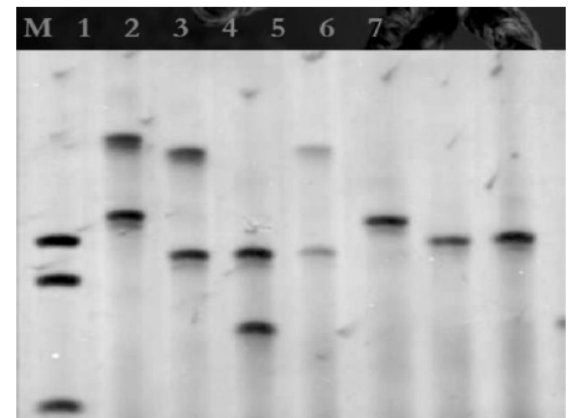
Příklad – Vyšetření u Myotonické dystrofie

1) PCR P1/P2

- P1, P2 – primery ohraničující úsek, kde se dané opakování mají nacházet primery leží na hranici této oblasti



- PCR produkty hodnoceny na gelu
 - „nejnižší band“ – 5 opakování
 - přítomnost 1 bandu na elfo může znamenat
 - a) homozygotnost
 - b) příliš mnoho CTG opakování
(→ PCR reakce tak neproběhne, protože úsek je příliš velký)



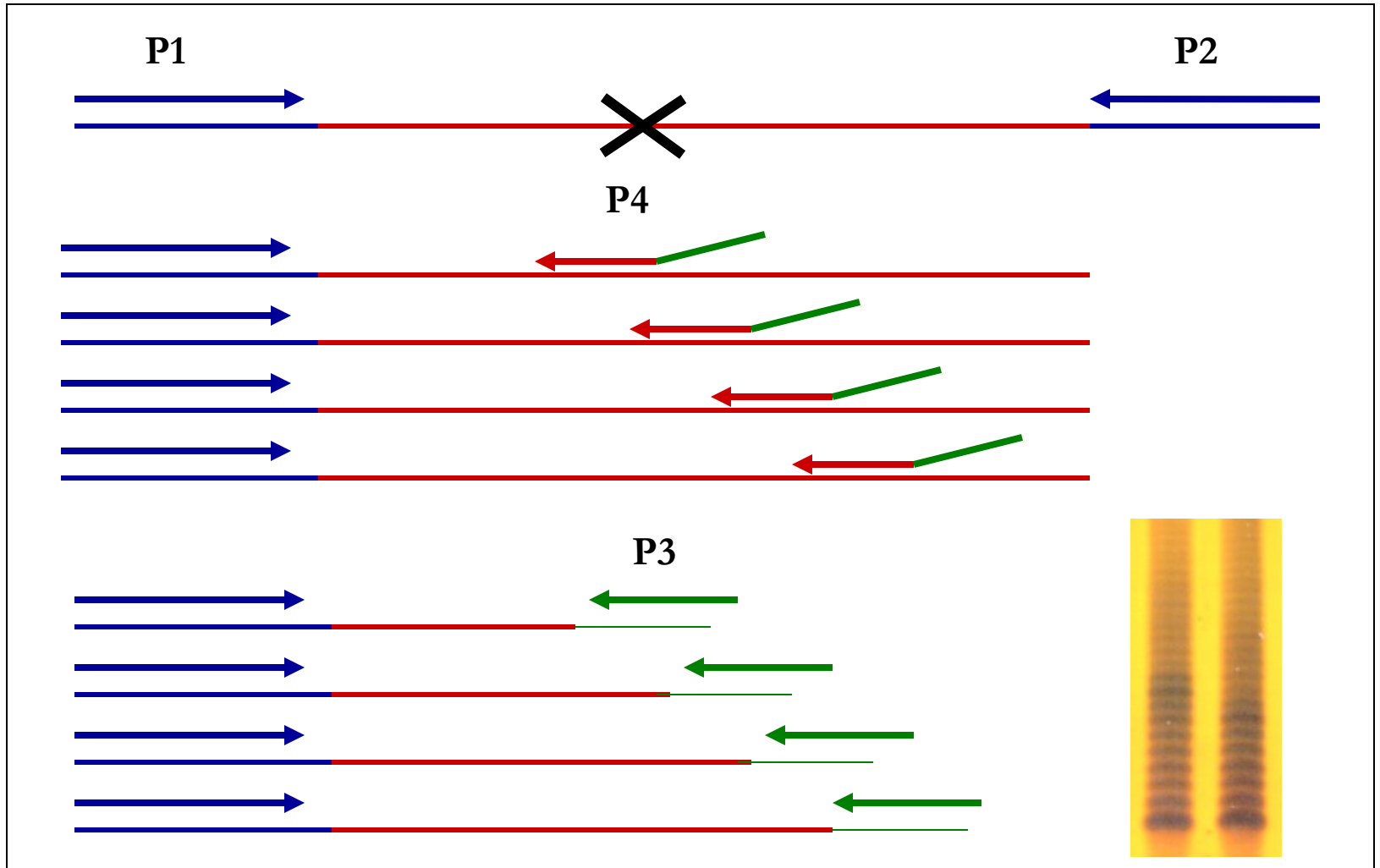
Triplet Primed PCR (TP-PCR)

→ 2) TP-PCR

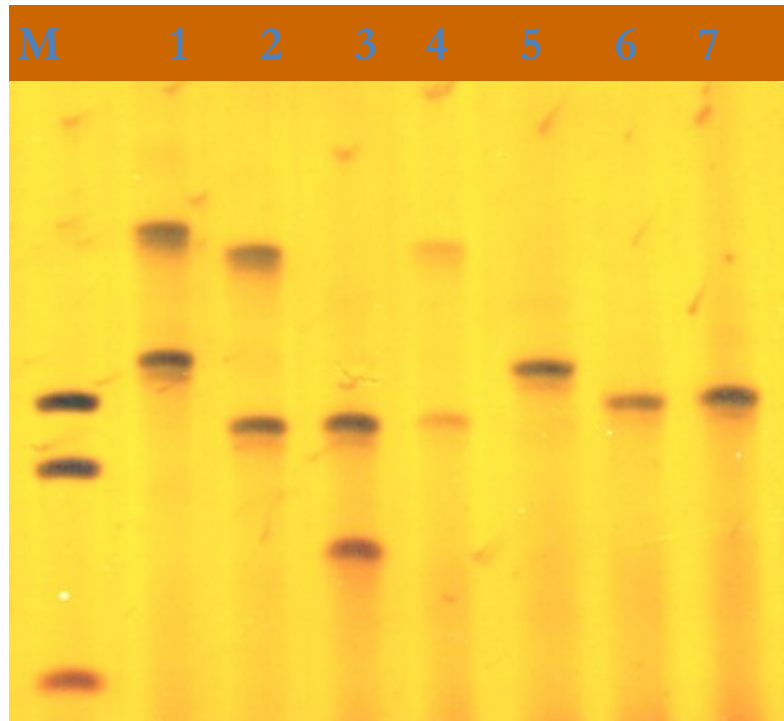
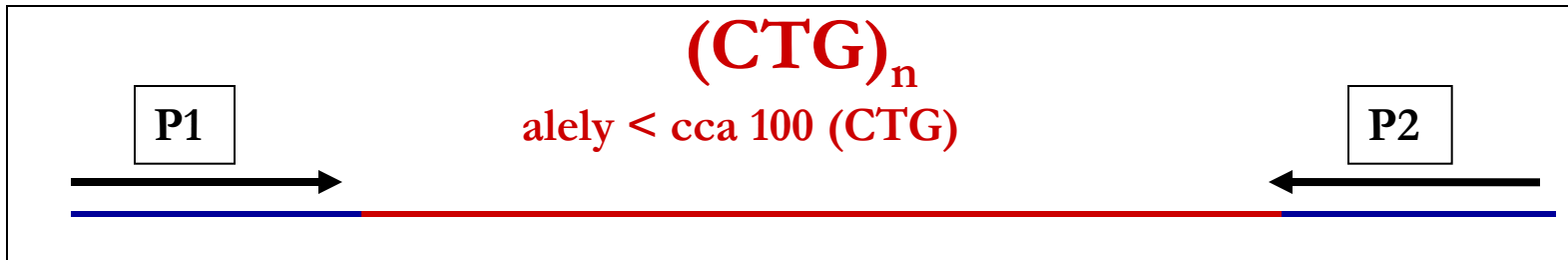
- první primer nasedá na hranici oblasti opakování (P1)
- druhý primer nasedá na samotná opakování (má sekvenci několika CAG) – P4
 - primery s nekomplementárním koncem
 - po prvním přepisu se k tomuto konci vážou nové primery (P3)
- P3 s P1 – množí to, co naaplikuje P4 (P3 je tam vzhledem k P4 přebytek)
- amplifikační úseky jsou různě dlouhé → na gelu je „žebříček“ (fragmenty od sebe vzdálené 3bp – o jednotku opakování)
- **TP-PCR umožní zjistit přítomnost amplifikované alely, ale ne její délku!**



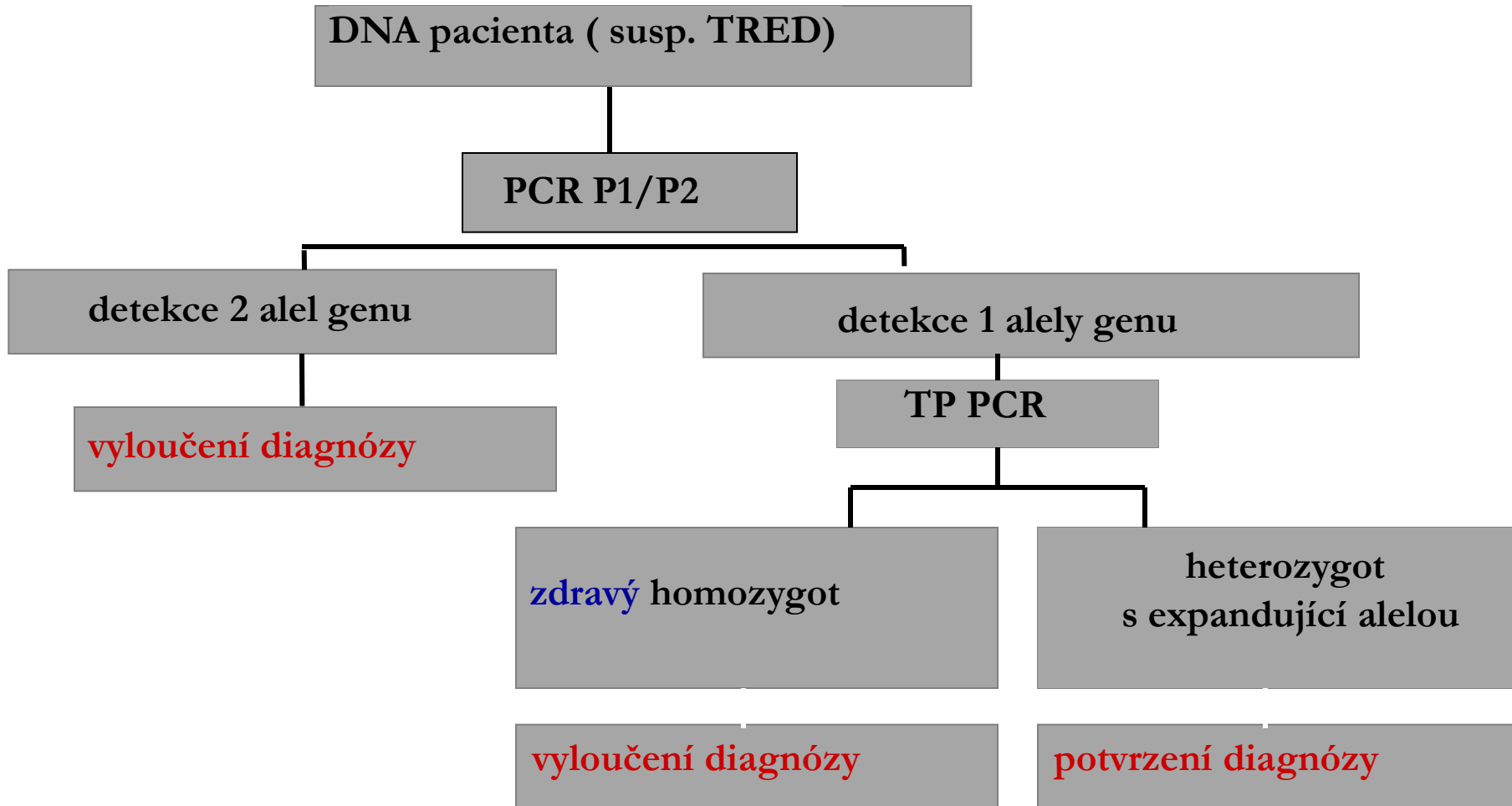
Triplet Primed PCR



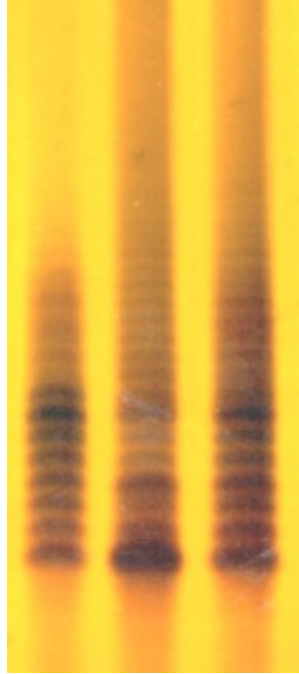
PCR P1/P2



Strategie molekulárně genetického vyšetření TRED



TP PCR



* *

PCR (P1/P2)

