

# Molekulárně genetická diagnostika:



**Iveta Valášková**

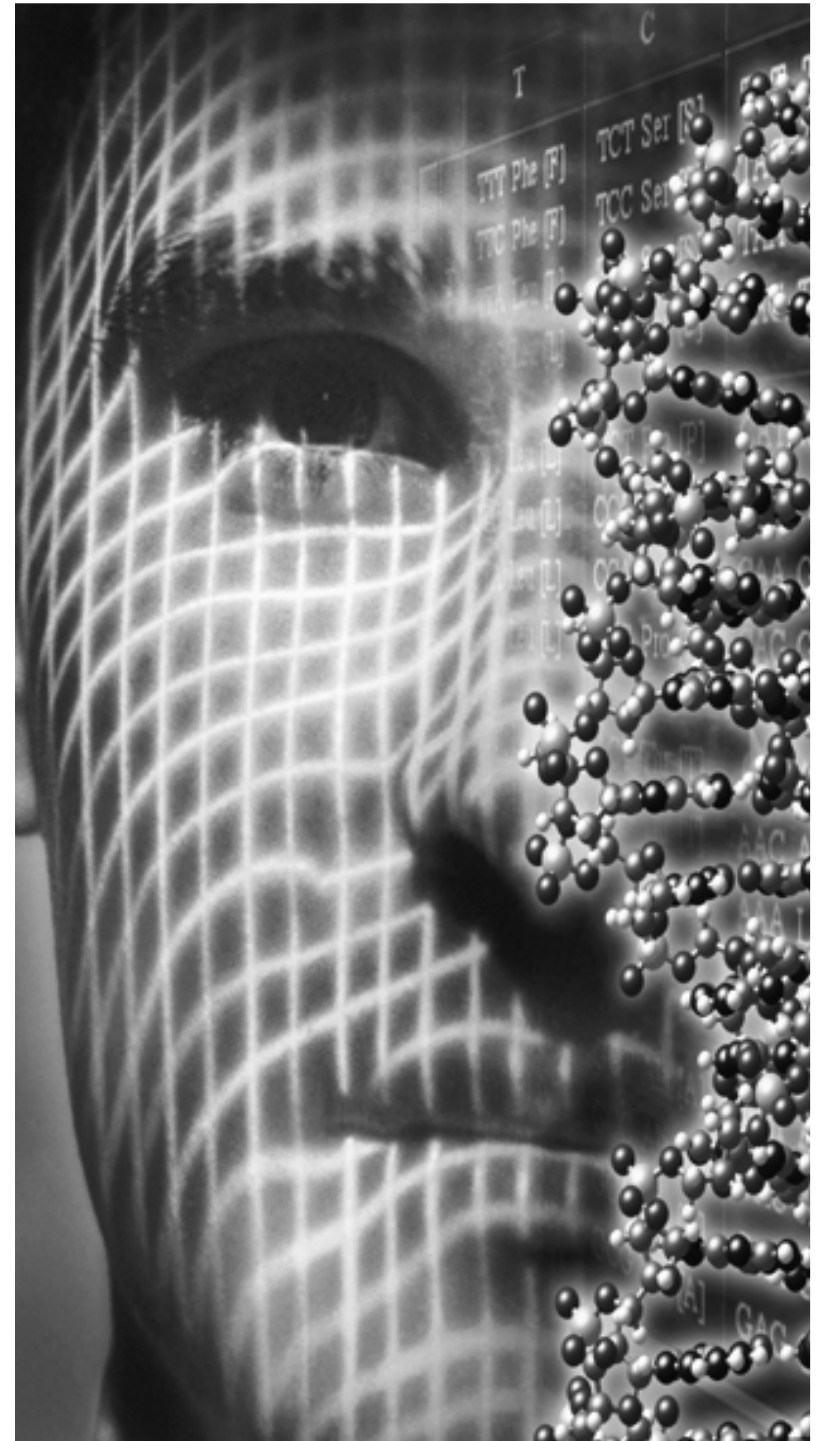
**Oddělení lékařské genetiky FN Brno**

**Lékařská fakulta MU**

# Budoucnost medicíny: tahounem bude genetika

**Prof. MUDr. Antonín Doležal, DrSc.**

30. prosince 2008, MF Dnes



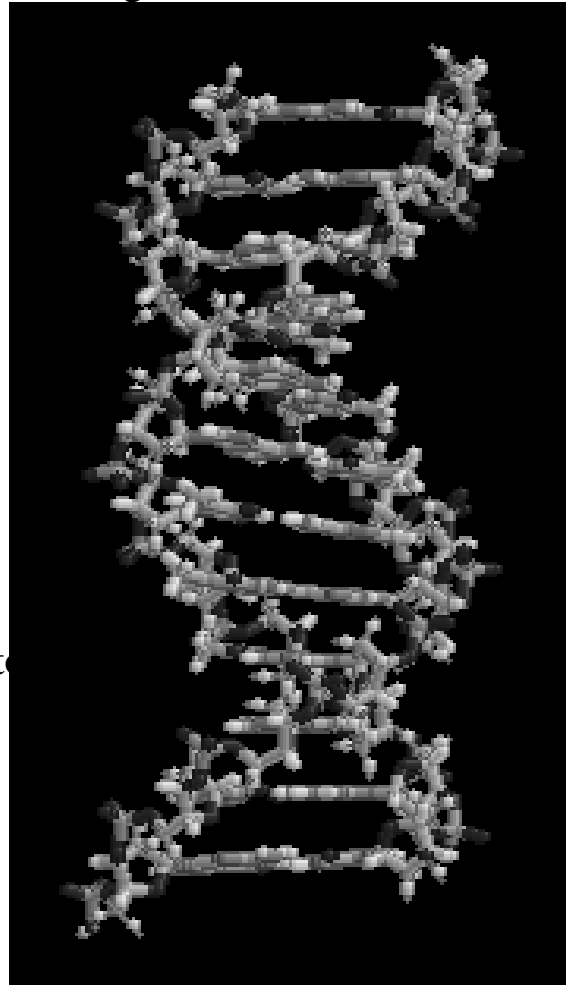
# DNA

## deoxyribonukleová kyselina

je nositelkou genetické informace všech organismů

je pro život nezbytnou látkou

je molekulární paměť  
disponující úžasnou kapacit



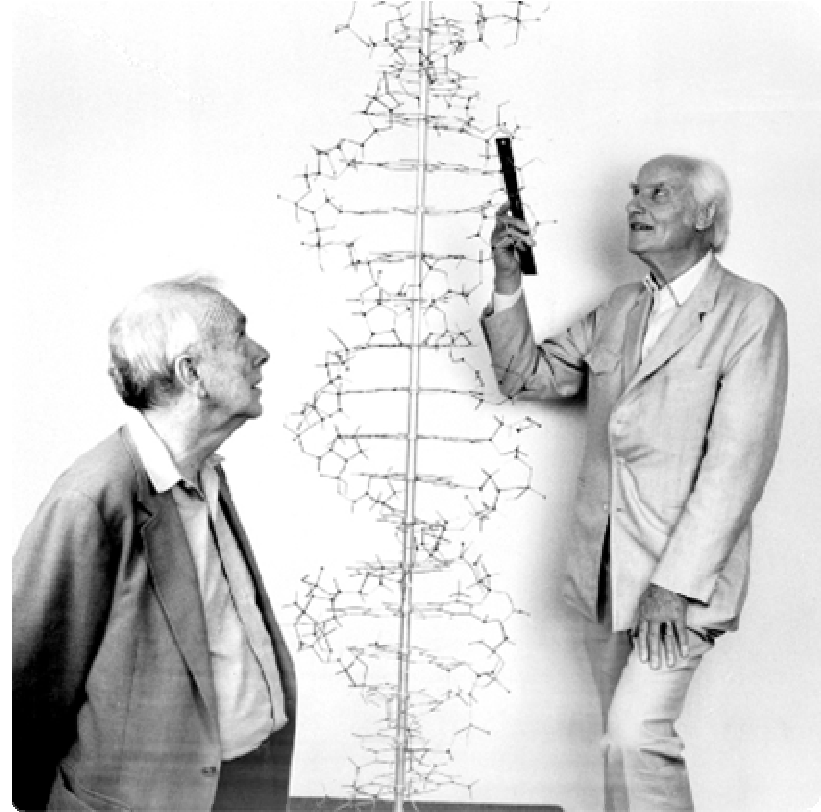
ve své struktuře kóduje a zadává  
buňkám jejich program  
a tím předurčuje vývoj  
a vlastnosti celého organismu





# James Watson    Francis Crick

„We have discovered the secret of life!“





Rosalind Franklin



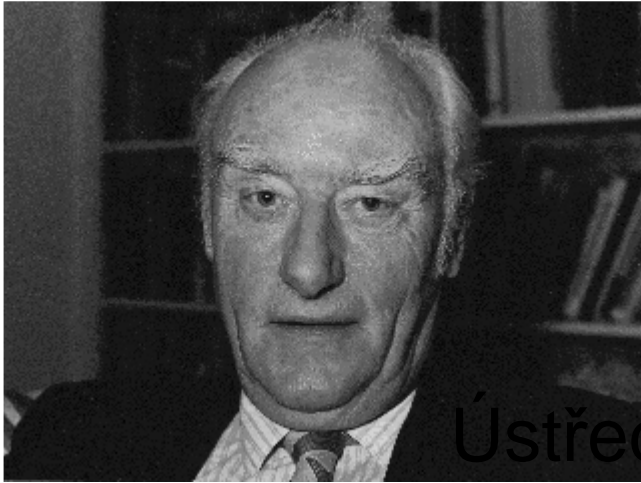
# Museum

Crick and Watson's  
sington, London SW7 2DD

**DNA molecular model, 1953.**

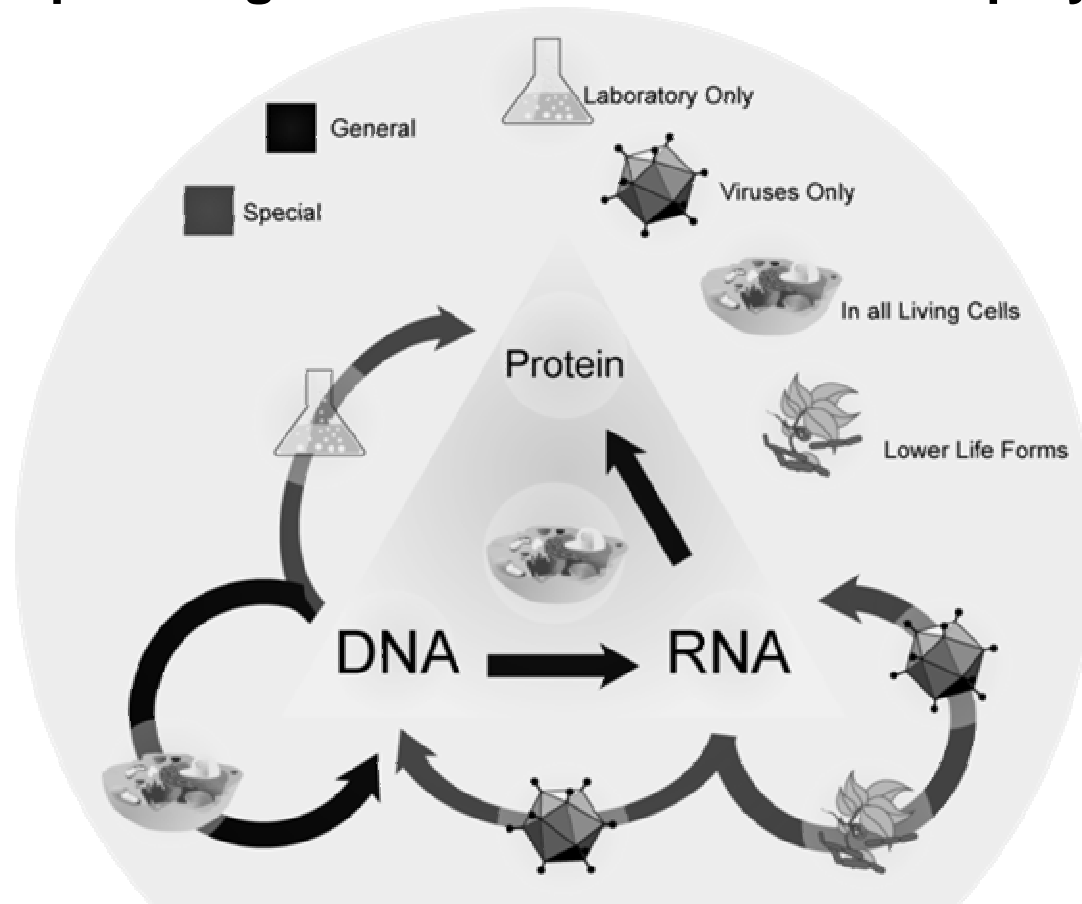
"Watson and Crick staring up at their model of the Double Helix is one of the most iconic pictures of the 20th Century. A replica of the model now gathers dust in a glass case in a dark corner of the top floor of the Science Museum. Here, a man glances at it as he walks past. Does he know the story?"

Dave Kinahan.



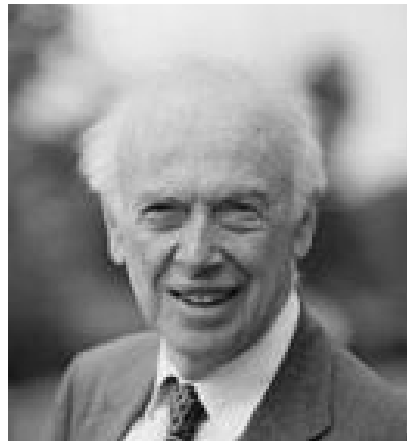
# Francis Crick

Ústřední dogma molekulární biologie  
přenos genetické informace mezi biopolymery

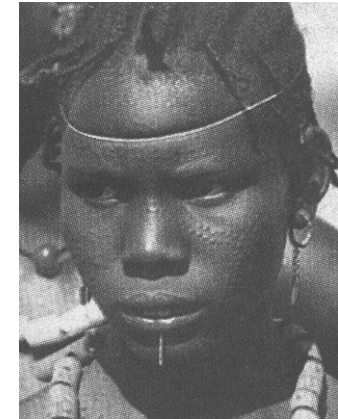
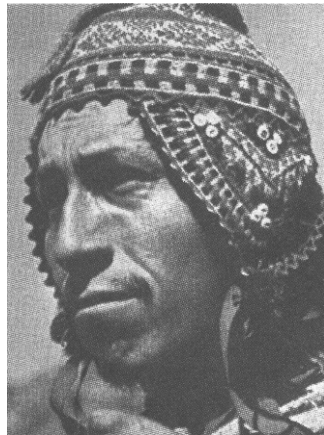
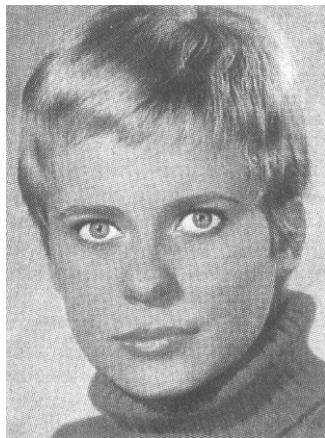
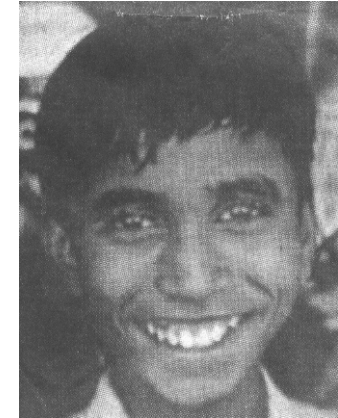
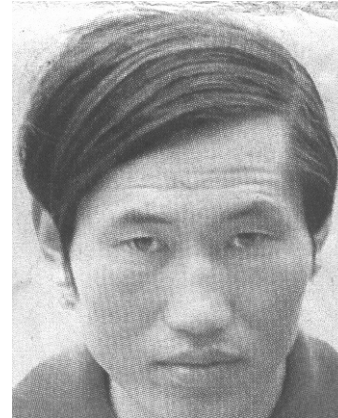
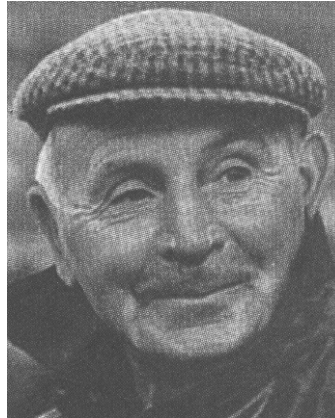
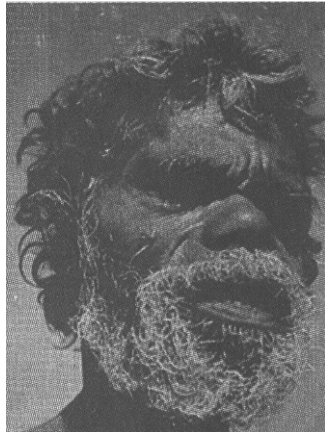
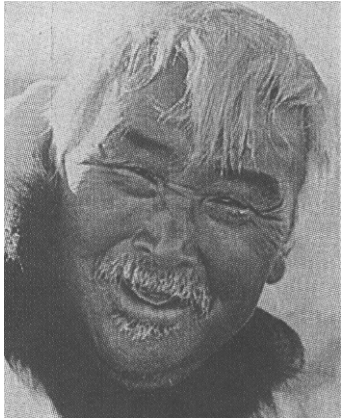


# James Watson

- *”Mysleli jsme si, že náš osud je zapsán ve hvězdách.*
- *”Nyní víme, že z velké části je zapsán v našich genech“*



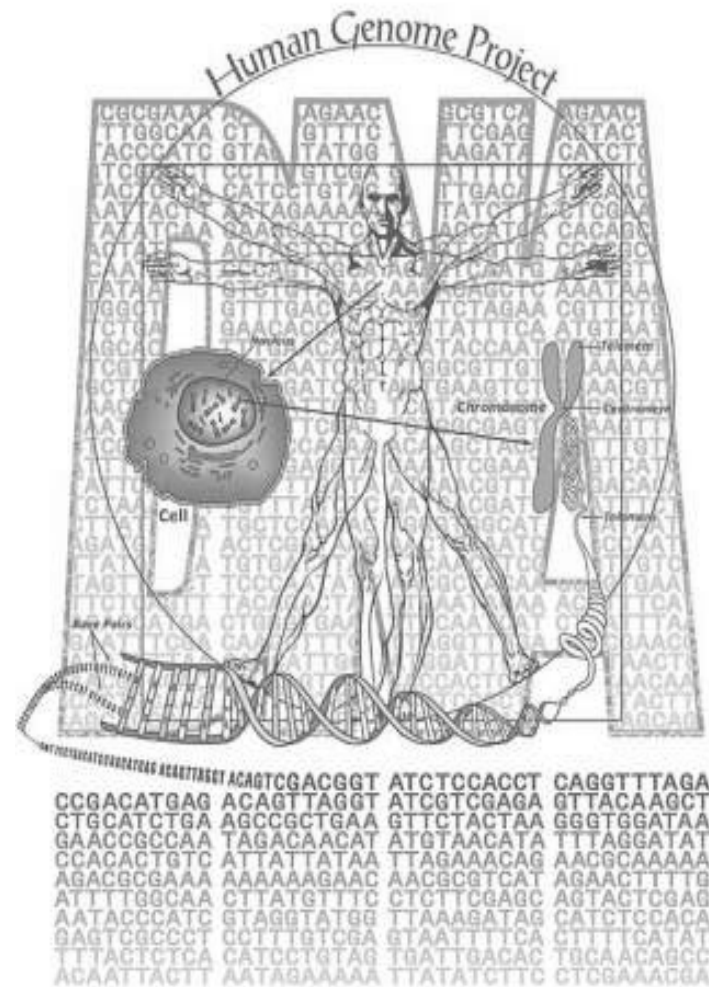
**Genom u jedinců stejného druhu je stejný**



**Genotypy jedinců stejného druhu mohou být rozdílné**

# Human Genome Project

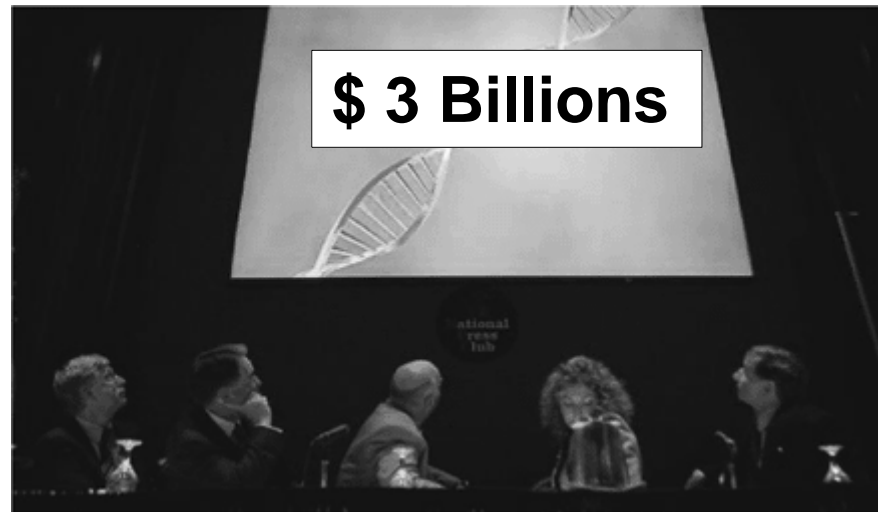
## Projekt lidský genom



# Human Genome Project

## Projekt lidský genom

- 1986: Santa Fe
- James Watson:
  - „vstoupit na cestu od dvojišroubovice
  - k 3 miliardám schodů lidského genomu“
- 1988: Kongres USA schválil 15 letý projekt a dotaci 3 mld USD



- 1990: začátek projektu
- 2005: předpokladané ukončení

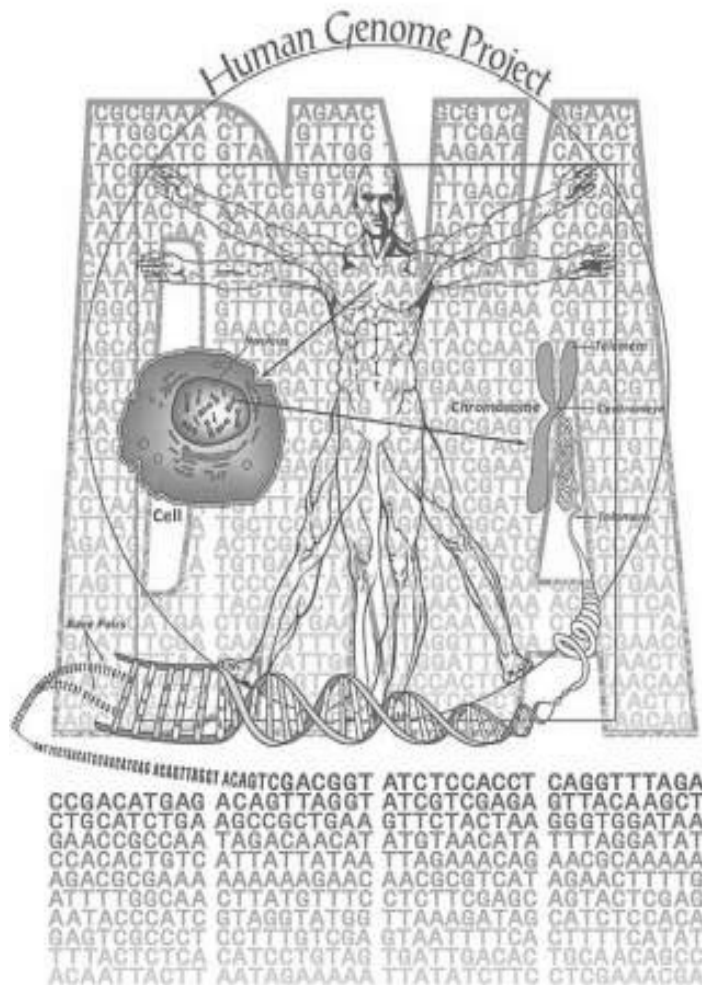


- Walter Gilbert: „až budeme mít v ruce úplnou sekvenci lidského genomu, budeme vědět, co dělá člověka člověkem.“...



# Human Genome Project

## Projekt lidský genom



### Cíle

- Určit úplnou sekvenci genomu (3,2 Gb)
- Identifikovat a mapovat geny, určit jejich strukturu a funkci v zdraví i v patologii
- Identifikovat důležité mimogenové sekvence
- Všechny data uložit v veřejně přístupných databázích
- Sekvenovat genomy modelových organizmů (drozofila, myš, *C. elegans*, *A. thaliana* a i.)
- Zkoumat etické, právní a sociální aspekty

The Genome International Sequencing Consortium:  
Initial sequencing and analysis of the human genome.  
Nature 409,860-621,2001

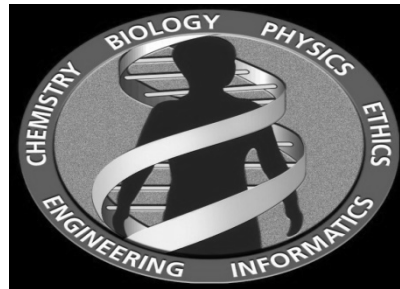




Venter, J.C. et al.:  
The sequence of the human  
genome. *Science* 291:1304-1351, 2001

# Human Genome Project

## Projekt lidský genom



**V roce 2003 vědci popsali  
DNA sekvenci 3 miliard párů bazí  
tvořících lidský genom**

# Human Genome Project

## Projekt lidský genom



Frank Collins  
Konsorcium HUGO



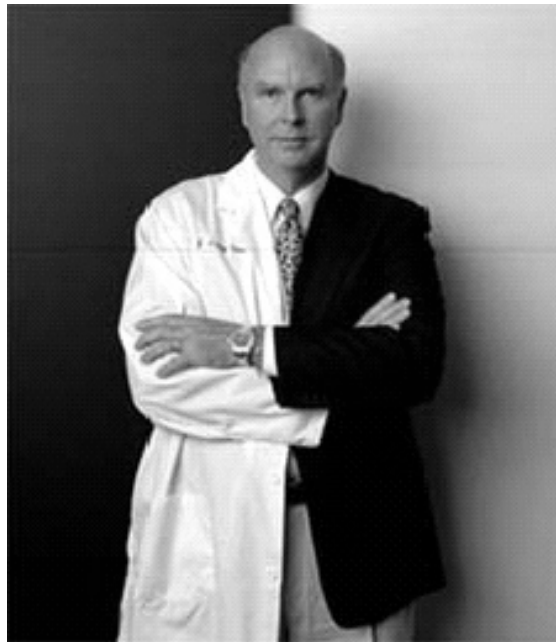
Craig Venter  
Celera Genomics

# Frank Collins



„Molekulární genetici jsou povinni využít poznatky o lidských genech v boji s chorobami.“

# Craig Venter



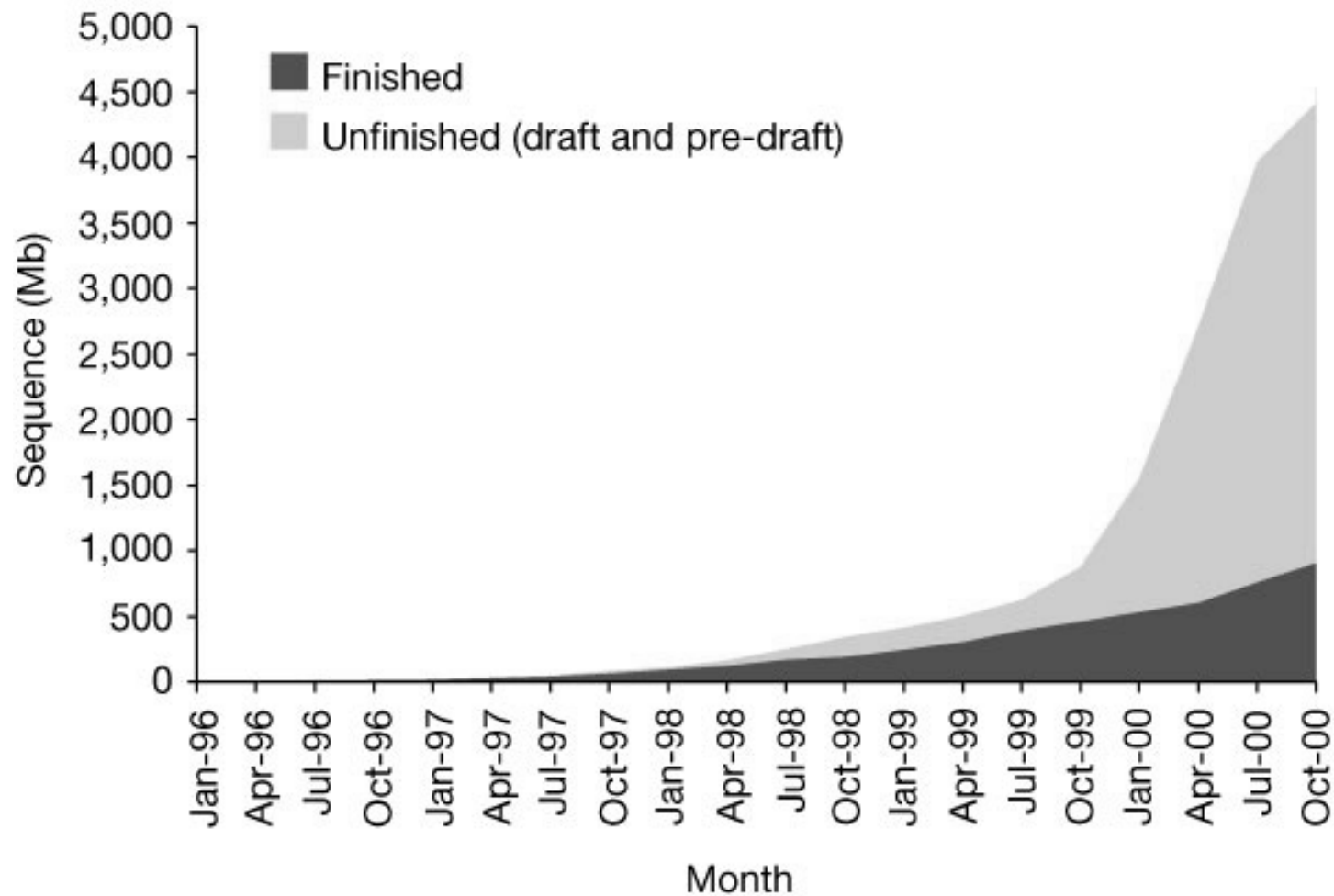
**Člověk, který dal ke zkoumání svoji DNA**

**„Myslím, že největší překvapení je, že se jeden od druhého lišíme více,  
než jsme čekali.“**

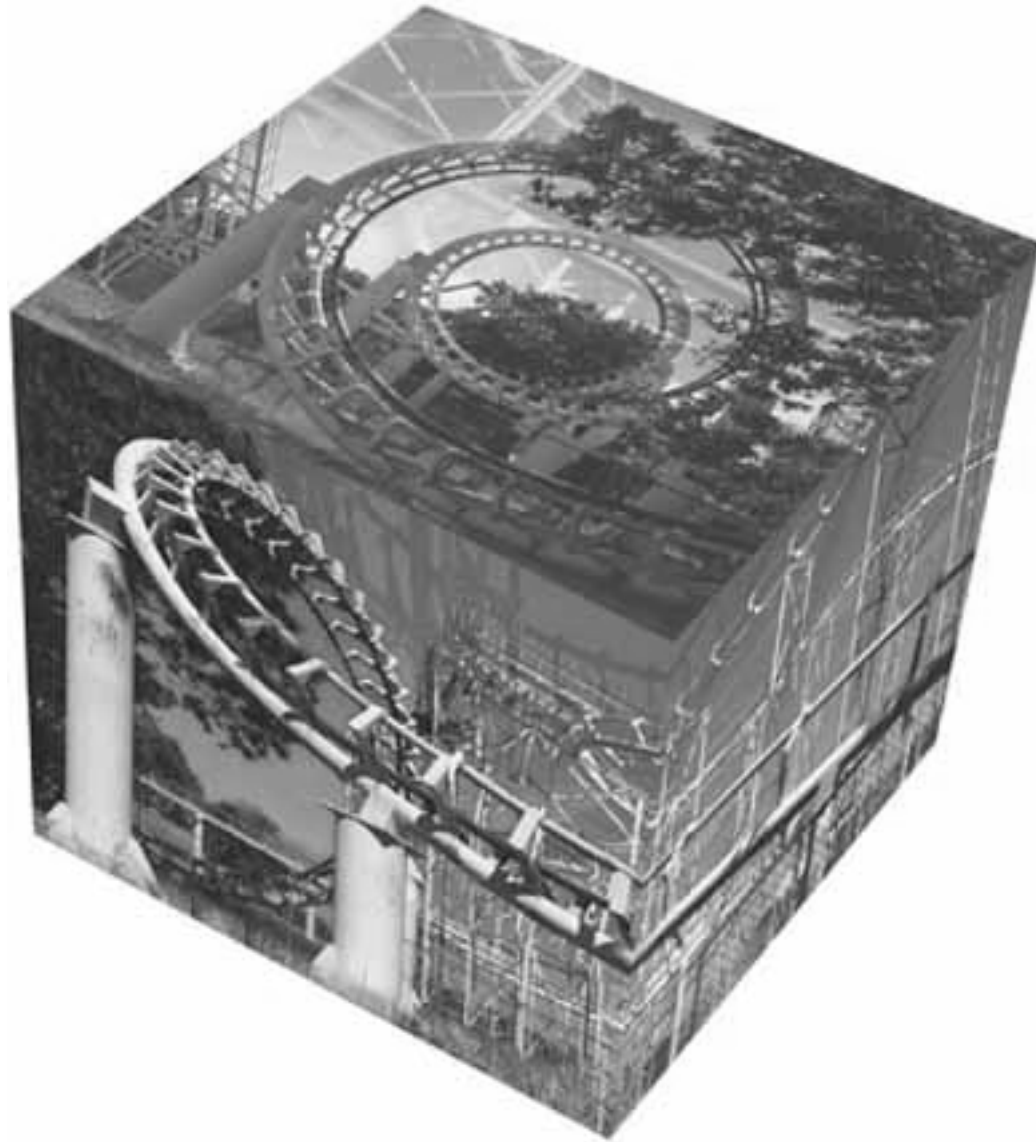




# Nárůst údajů o sekvenci DNA



Faster and faster we go, so hang on!





# Projekt lidského genomu

- 3-5% z ročního rozpočtu jde na ELSI (=Ethical, Legal, Social Issues), etické, právní, sociální otázky
- Vznikl tak největší etický projekt v historii planety
- Právo na genetické soukromí – před pojišťovny a zaměstnavateli
- Opačný problém: zruinování pojišťoven díky tomu, že klient zná svůj genom a volí optimální pojišťovací strategii

# Etické otázky HGP

- je identifikováno čím dál tím víc lidských genů
- pokud budou objeveny geny, které indikují náchylnost ke kriminalitě, inteligenci nebo homosexualitě, jak by na to měla společnost reagovat?
- genetika versus kriminalita: když u zločinců manipulujeme prostředí vězením, nemohli bychom též manipulovat jejich genomem?

# Etické otázky plynoucí z HGP

- Kdo bude mít přístup k osobním informacím o složení genomu jedince a jak budou tyto informace využívány?
- Kdo je majitelem informace o genomu jedince?
- Jak ovlivní informace o složení genomu jedince sebechápání daného člověka a jak tato informace ovlivní přijetí tohoto jedince společností?
- Jak informace o genomech jedinců ovlivní přijetí minoritních skupin společností?
- Jak připravíme lékaře na nástup „nové genetiky“ a jak připravíme na nástup nové genetiky veřejnost?
- Jak připravíme veřejnost, aby byla schopna uvážlivě a kvalifikovaně provést informovanou volbu?

# Etické otázky plynoucí z HGP

- Jak společnost vyváží nutná vědecká omezení a sociální risk s dlouhodobým prospěchem?
- Mělo by se provádět genetické testování, pokud neexistuje terapie?
- Měli by mít rodiče právo nechat testovat děti na nemoc, která propukne až v dospělosti?
- Jsou genetické testy spolehlivé a interpretovatelné lékařskou komunitou?
- Způsobují geny, že se lidé chovají určitým způsobem?
- Mohou lidé vždy kontrolovat své chování?
- Kde se nachází linie mezi léčbou a vylepšením?
- Kdo vlastní geny a další sekvence lidské DNA?
- Bude patentování sekvencí DNA omezující pro jejich nedostupnost a zbrzdí se tím vývoj užitečných produktů?



# Etické otázky plynoucí z HGP

- 1. Vzrůstající informovanost a genetické konstituci jedince a celých populací vede k otázce, kdo by měl kontrolovat získávání těchto informací a kde by tyto informace měly být přístupné. Do této otázky spadají otázky týkající se presymptomatického testování, screening přenašečů, genetický screening prováděný zaměstnavatelem za účelem zjištění vhodnosti uchazeče k dané práci atd.
- 2. V nedaleké budoucnosti budu zcela jistě možné manipulovat genom embryí za účelem změny genotypu i fenotypu
- 3. Vzrůstající informovanost obhledně genetického základu behaviorálních projevů zřejmě změní naše sebepochopení a ovlivní sociální instituce.[1]

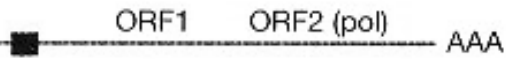
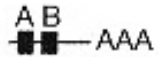
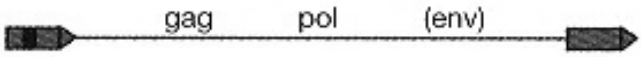
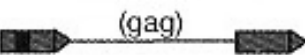
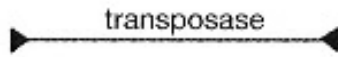

[1] Murray, T.H., (1991) Ethical issues in human genome research  
*FASEB Journal* 5,55-60

# Lidský genom

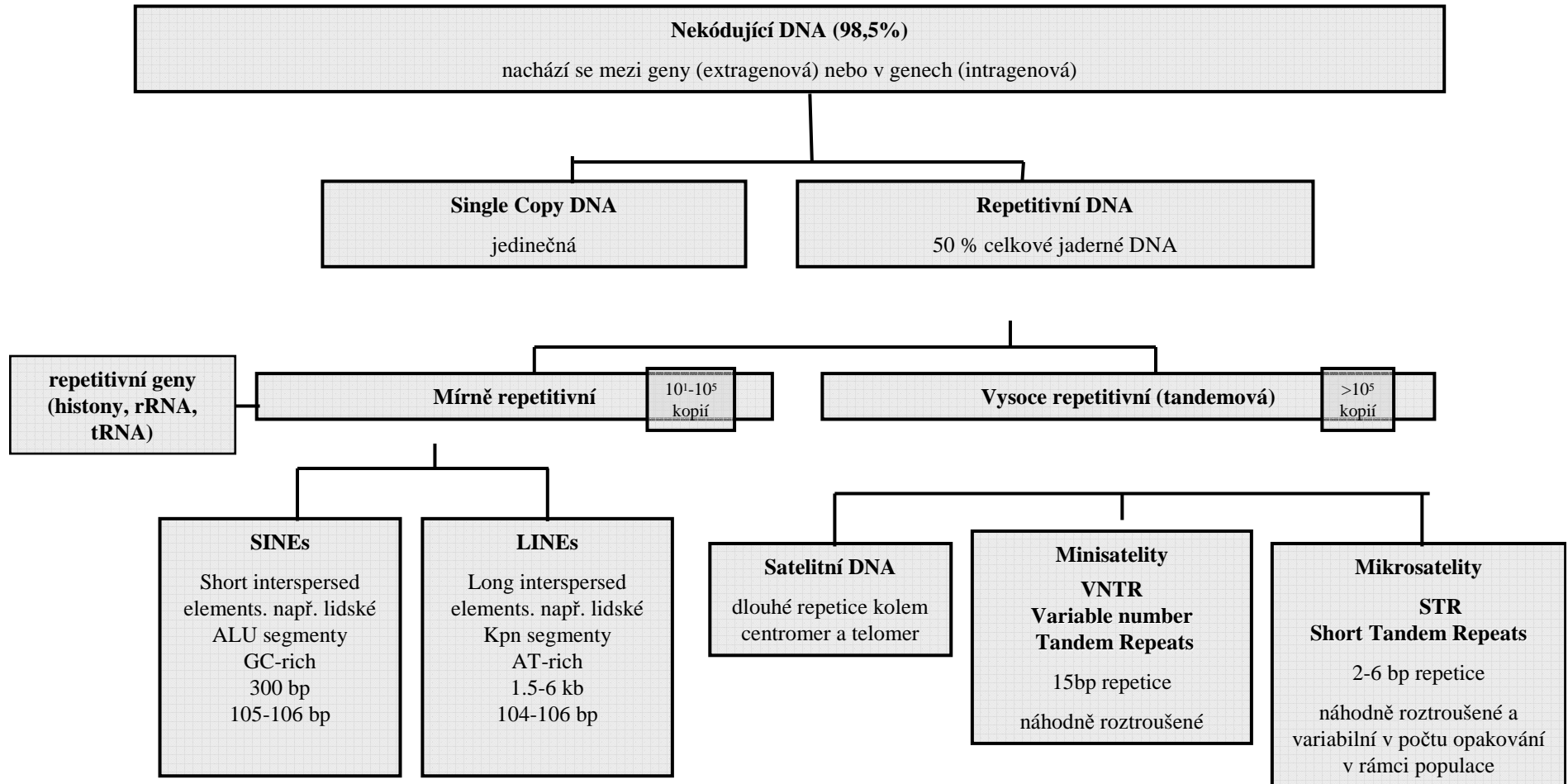
- má přibližnou velikost 3,2 Gb (haploidní stav)
- z nichž je 2,95 Gb tvořeno euchromatinem.
- 28% sekvencí je transkribováno do RNA a z těchto 28% je pouhých 5% přepisováno do proteinů; což je 1,1% - 1,4% absolutní velikosti celého genomu člověka.
- Přes 50% genomu je tvořeno repetitivními sekvencemi:
- 45% genomu je tvořeno jedním ze čtyř typů parazitických DNA elementů,
- 3% genomu tvoří repetice jen několika bází
- 5% genomu je tvořeno recentními duplikacemi velkých segmentů DNA. .
- Lidský genom tak z určitého úhlu pohledu připomíná moře repetitivních sekvencí s malou příměsí genů.

# PARAZITICKÁ DNA

Classes of interspersed repeat in the human genome

			Length	Copy number	Fraction of genome
LINEs	Autonomous		6–8 kb	850,000	21%
	Non-autonomous		100–300 bp		
Retrovirus-like elements	Autonomous		6–11 kb	450,000	8%
	Non-autonomous		1.5–3 kb		
DNA transposon fossils	Autonomous		2–3 kb	300,000	3%
	Non-autonomous		80–3,000 bp		

# REPETITIVNÍ SEKVENCE EUKARYOTICKÉHO GENOMU



# Lidský genom

- 22 287 genů kódujících proteiny

méně genů než se očekávalo: předpovídalo se 150,000 (před sekvenací), 30-40,000 (2001)

- Průměrně 9 genů na 1Mb
- Celkem 232 000 exonů (průměrně 10,4 exonu / gen)
- Identifikovaných asi 20 000 pseudogenů

# Gen

Solitární gen:

- **v celém genomu v jediné kopii (asi polovina genů)**

Genová rodina:

- **skupina genů evolučně pocházející z jediného genu, v evoluci postupná diverzifikace sekvence a funkce**

Pseudogen:

- **gen který zmutoval natolik že nemůže být přepisován (v celém genomu > 20 000)**

Zpracovaný (“processed”) pseudogen:

- **pseudogen vzniklý zpětným přepisem mRNA a integrací do genomu**

# Struktura genu

Structural elements of a gene:

Exons: Protein-coding DNA sequences of a gene

Introns: Non-coding DNA sequence of a gene located inbetween exons

5' Untranslated Region (UTR): Non-coding DNA sequence upstream of the translation start site

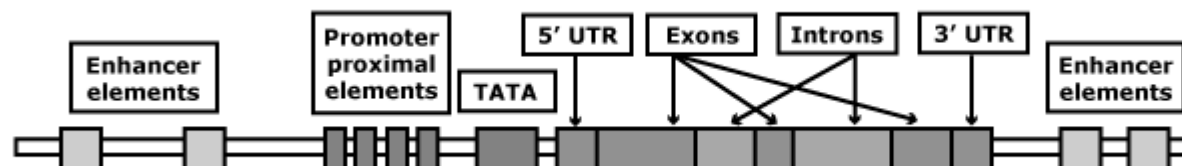
3' Untranslated Region (UTR): Non-coding DNA sequence downstream of the translation stop site

Transcription control regions of a gene:

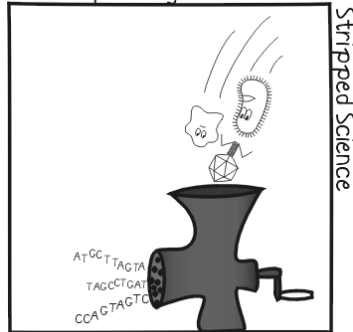
TATA Box/Promoter Region: Binding site for transcription factors and RNA polymerase.

Promoter Proximal Elements: Transcription control regions that are located 100-200 base pairs upstream of the transcription start site.

Enhancer Elements: Transcription control regions that are located further away (sometimes thousands of base pairs from the start site). These elements may occur upstream or downstream of the start site, or they may even occur within an intron of the gene.



Mass sequencing



by Viktor S. Poór

organismus	Velikost (Mbp)	počet genů
<b>člověk</b> ( <i>Homo sapiens</i> )	3 200	22 000
<b>lidská mitochondriální DNA</b>	0.016	37
<b>laboratorní myš</b> ( <i>M. musculus</i> )	2 600	± 25.000
<b>rýže</b> ( <i>Oryza sativa</i> )	430	± 60.000
<b>huseníček</b> ( <i>A. thaliana</i> )	125	25.498
<b>kukuřice</b> ( <i>Zea mays</i> )	2 500	± 40-60.000
<b>pšenice</b> ( <i>Triticum aestivum</i> )	15 000	± 40-60.000
<b>hlíst</b> ( <i>C. elegans</i> )	97	± 19.000
<b>octomilka</b> ( <i>D. melanogaster</i> )	137	13.472
<b>kvasinka</b> ( <i>S. cerevisiae</i> )	12.1	5.770
<b>bakterie</b> ( <i>E. coli</i> )	4.6	4.377
<b>virus</b> (HIV)	0.009	9



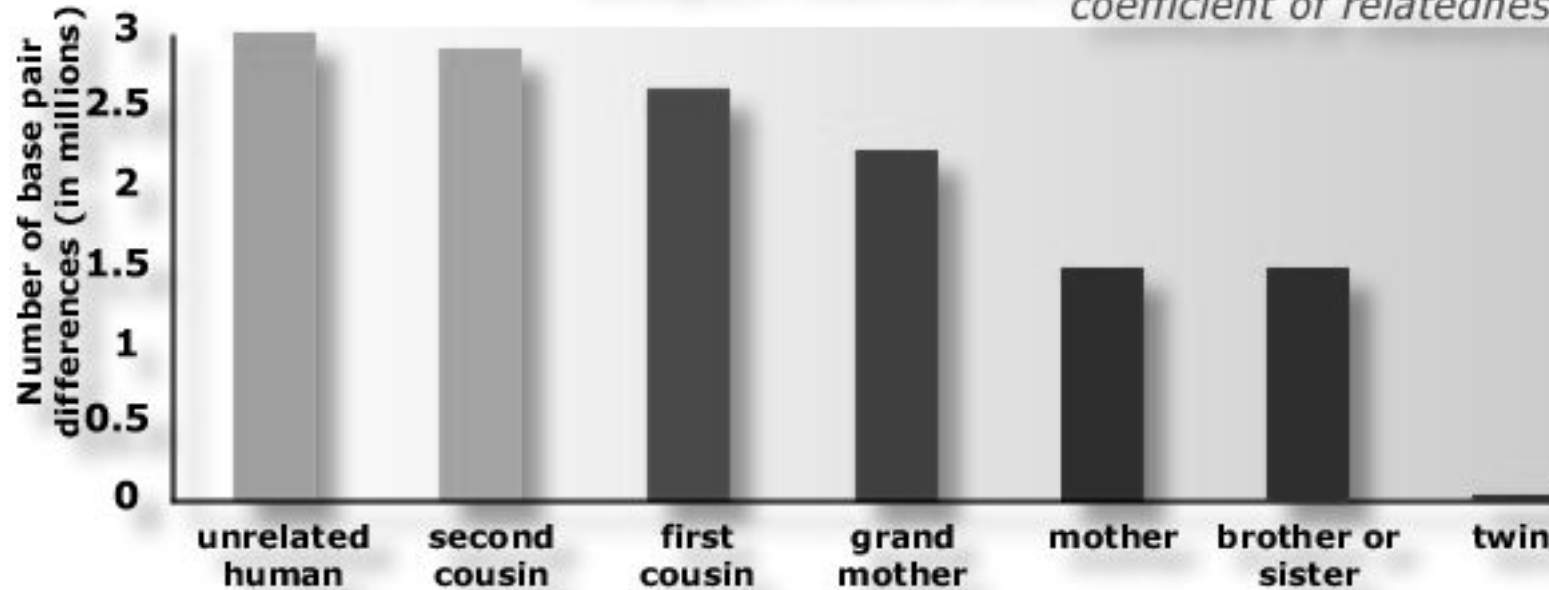
# Lidský genom

odlišnosti uvnitř druhu *Homo sapiens* v rámci celého genomu 0.1 – 0,5%  
(většina je v nekódujících sekvencích)

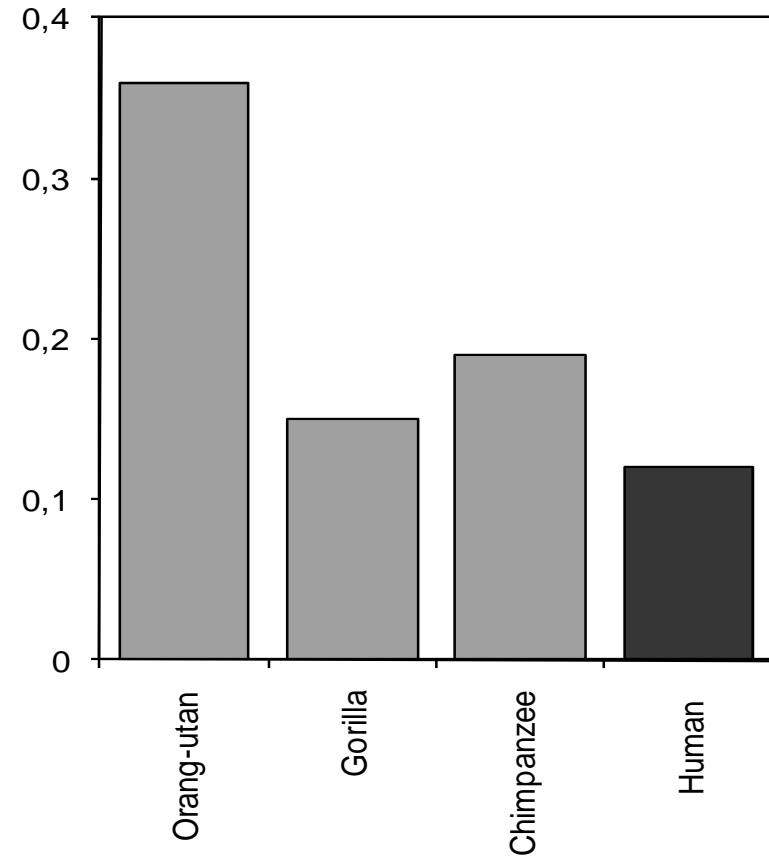
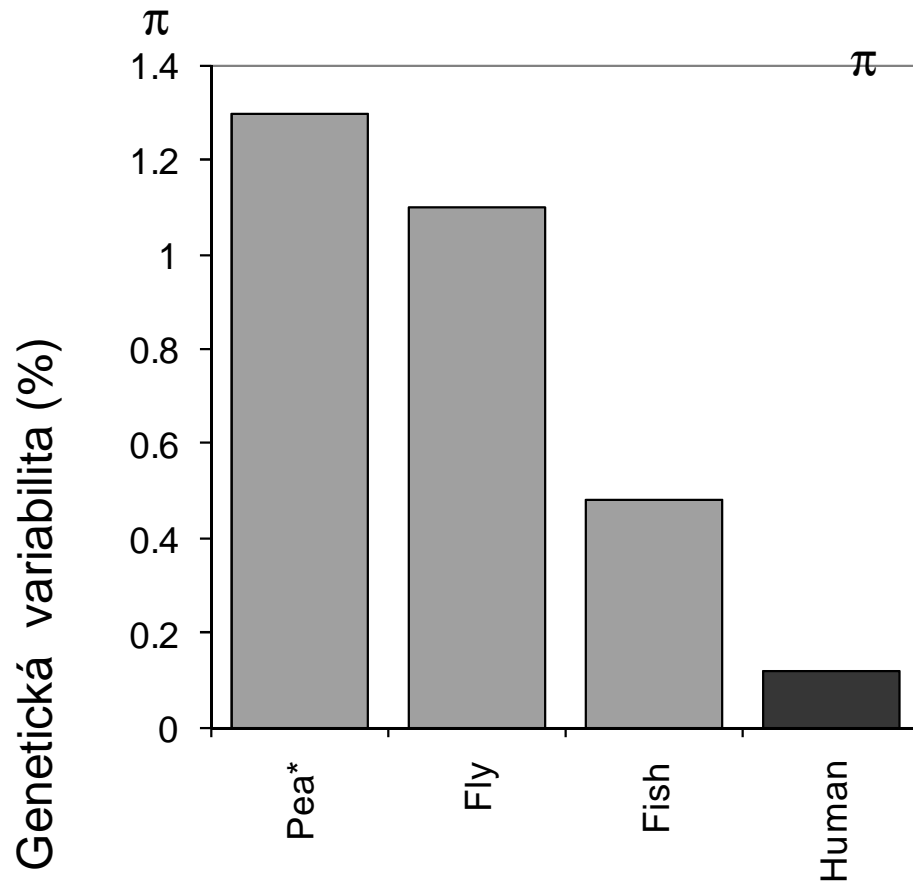
- 1,5 milionu pb - rozdíl mezi matkou a dítětem
- 2,25 milionů pb - rozdíl mezi babičkou a vnučkou
- 3 miliony pb - rozdíl mezi dvěma náhodnými lidmi na Zemi

# Všichni lidé si jsou nápadně podobni

*The number of base pair differences between biological relatives decreases as a function of their coefficient of relatedness.*



# Humans show little genetic variation compared with other species



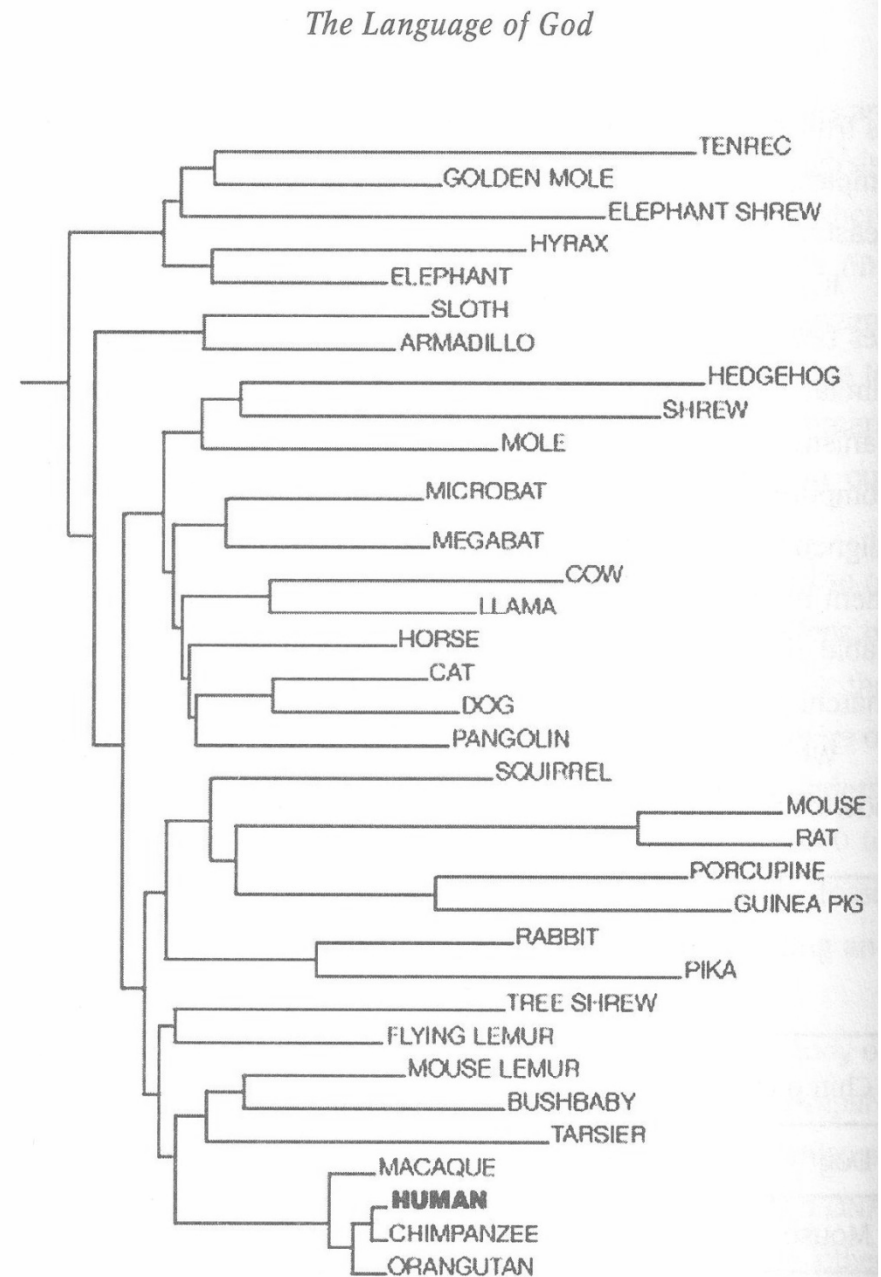
# Lidský genom

- lidé sdílí překvapivé množství genetického materiálu
  - s ostatními organismy
    - 99% homologie s ostatními primáty (v genech), 96% (celkem)

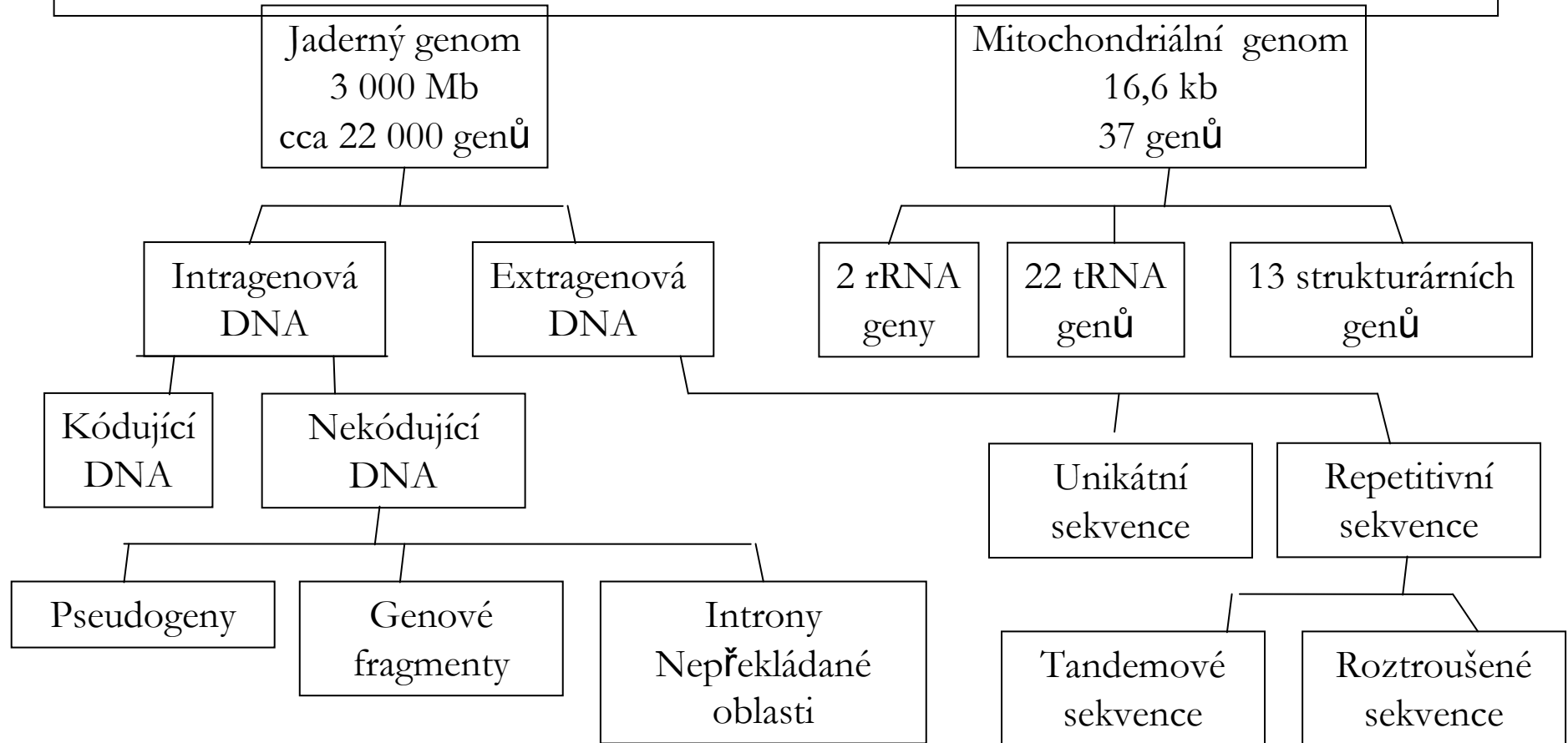
# Kreacionismus je mrtvý

Tento „strom života“ vznikl  
POUZE na základě  
podobností sekvence DNA,  
nebylo přihlíženo ke  
stávajícím zoologickým  
systémům či vnější podobě  
organismů

Collins, F., (2006) *The Language of God*. Free Press, New York, p. 128)



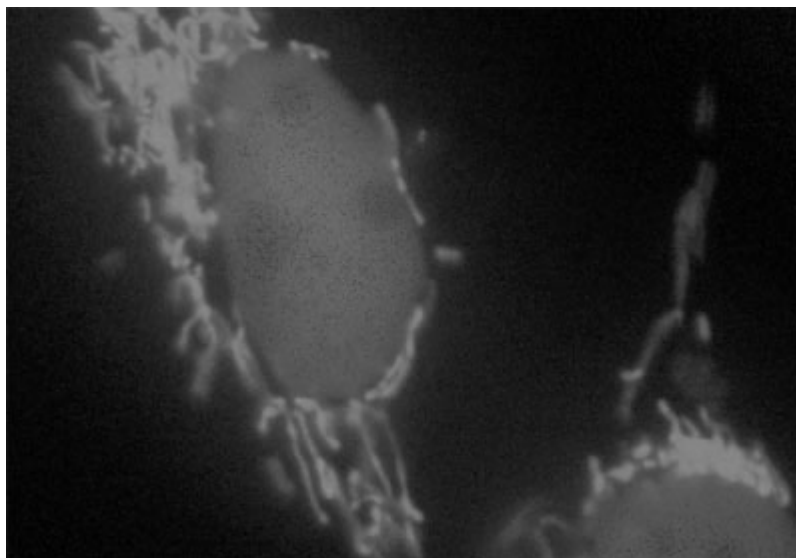
# Lidský genom



1% DNA kóduje nějaké znaky

# Lidský genom

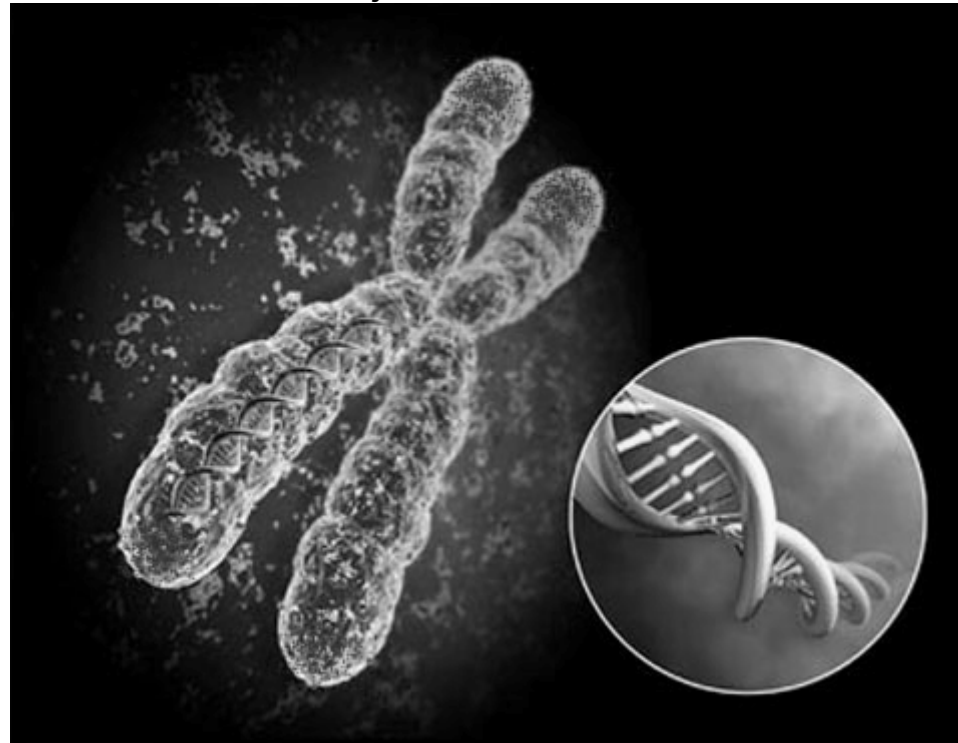
- jaderný
- mitochondrialní



Buněčné jádro obklopené mitochondriemi

# Jaderný genom

Každá DNA molekula je sbalena do chromosomu

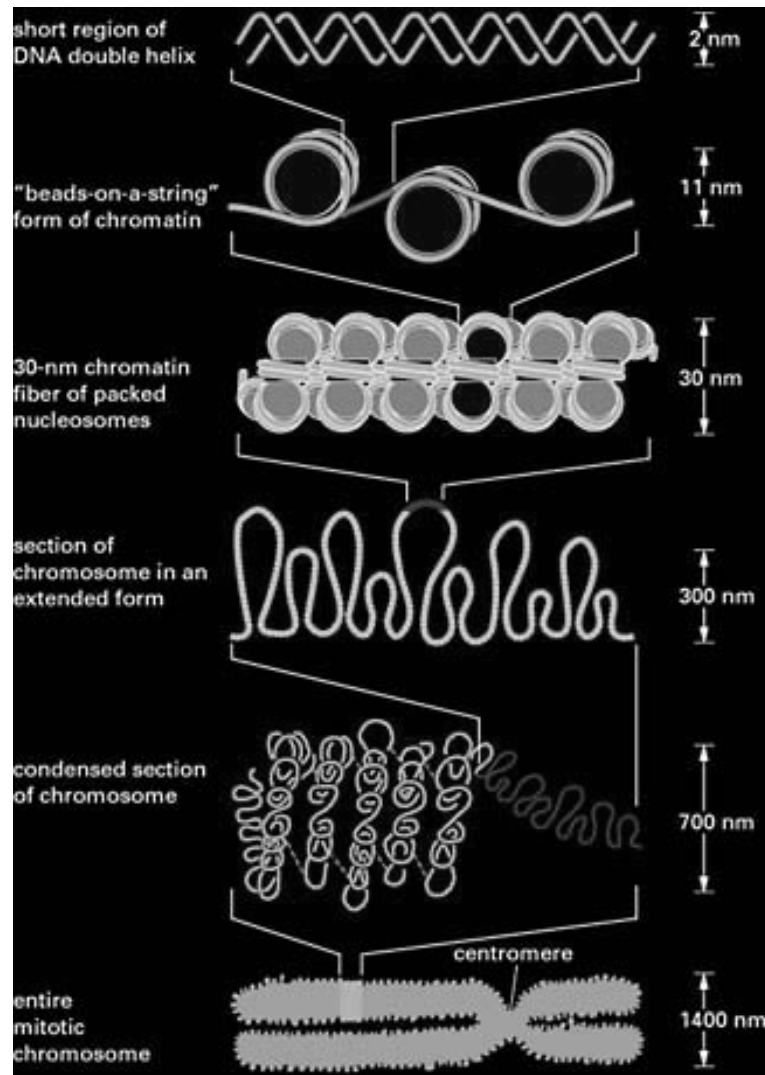


Každý ze 46 chromosomů člověka je tvořeno jednou molekulou dvoušroubovicové



## Chromosomes are tightly coiled microscopic structure

an elaborate system of coiling, which also seem to be involved in the control of gene expression is present in mammalian cells



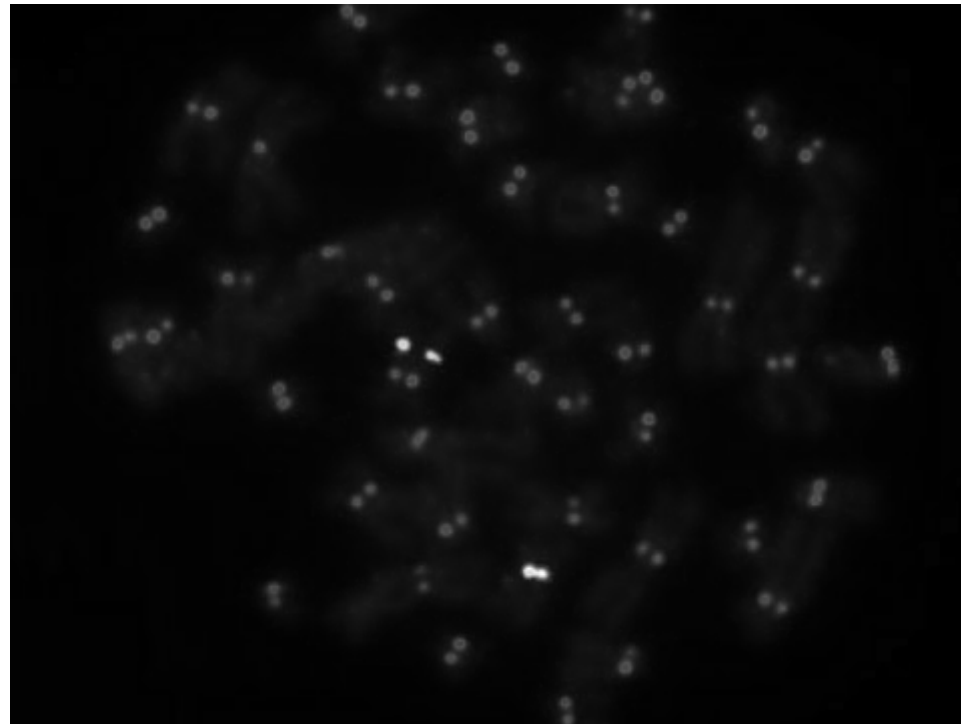
basic proteins called histones provide a core around which DNA is wound in a double loop  
composing approximately 146bp of DNA - NUCLEOSOME

if stretched out, the DNA from a single cell would extend approximately 2 meters in length

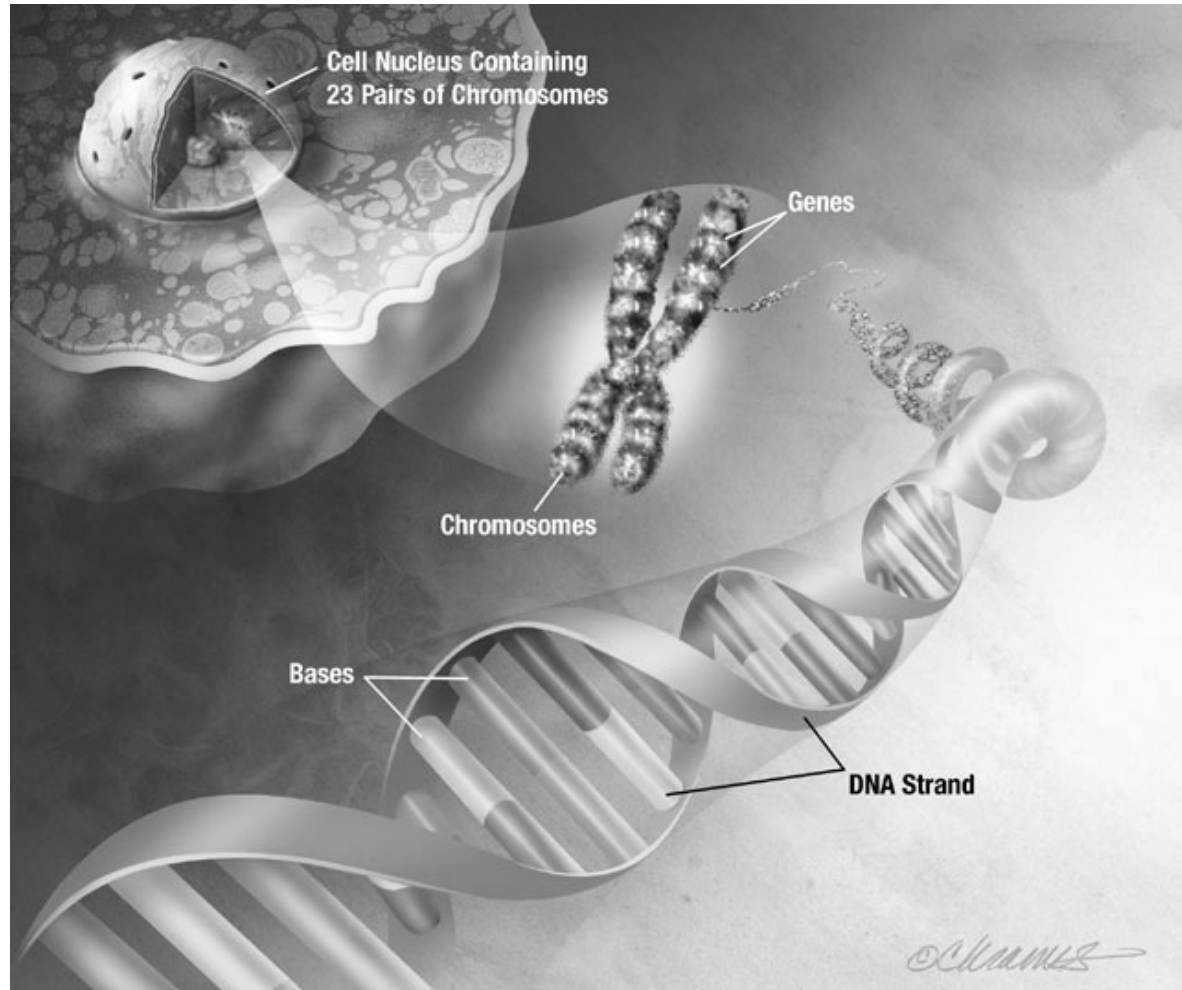
mitotic chromosome is 50 000 times shorter than its extended length

# Nuclear genome

Uvnitř buněčného jádra je genetická informace soustředěna do molekul  
DNA,  
"zabalených" do chromozómů.



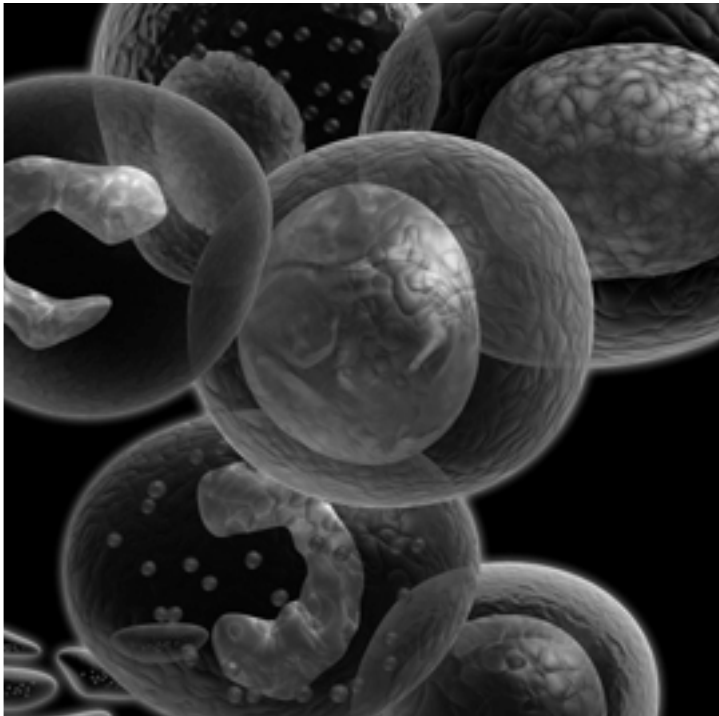
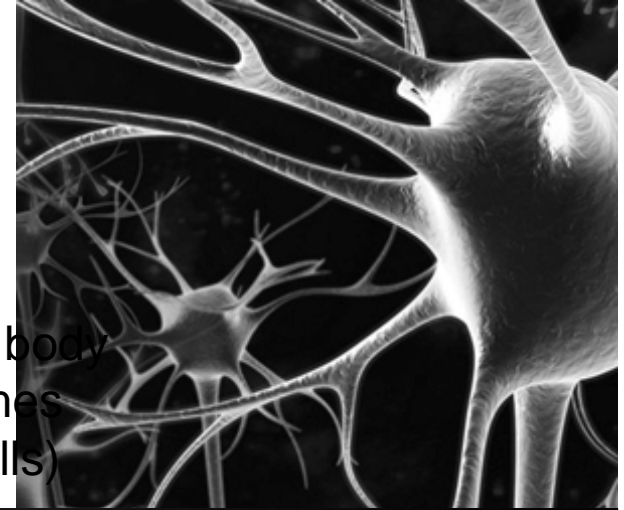
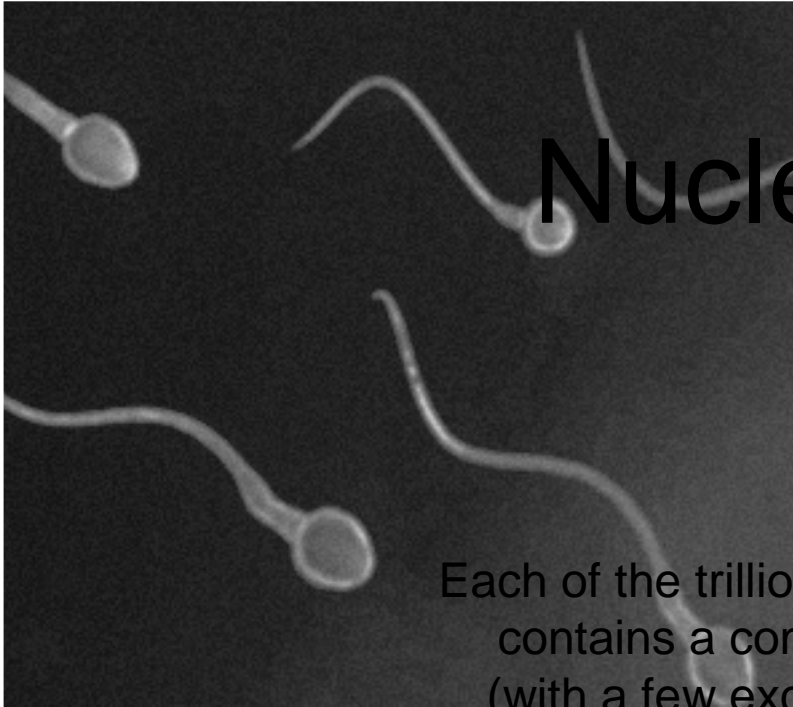
# Jaderný genom



The four bases are repeated millions of times to form each chromosome  
Lidský chromosom je délky od 50 milionů do 263 milionů bazí

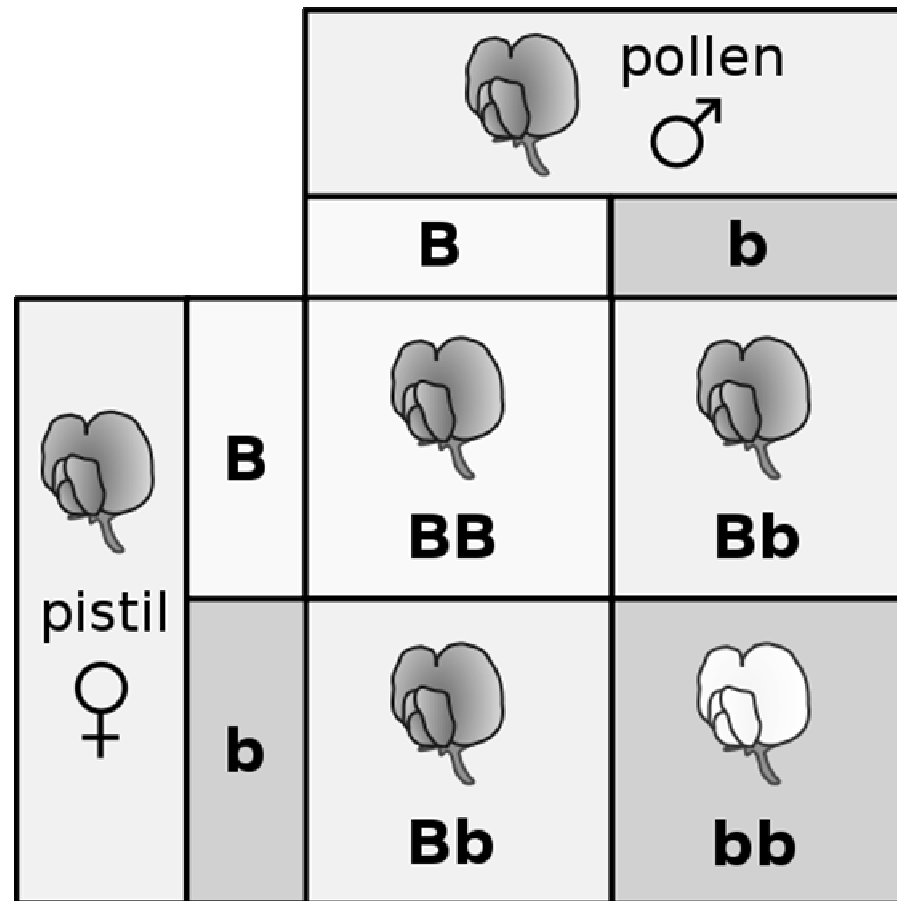
# Nuclear genome

Each of the trillions of cells in the human body contains a complete set of chromosomes (with a few exceptions e.g. red blood cells)

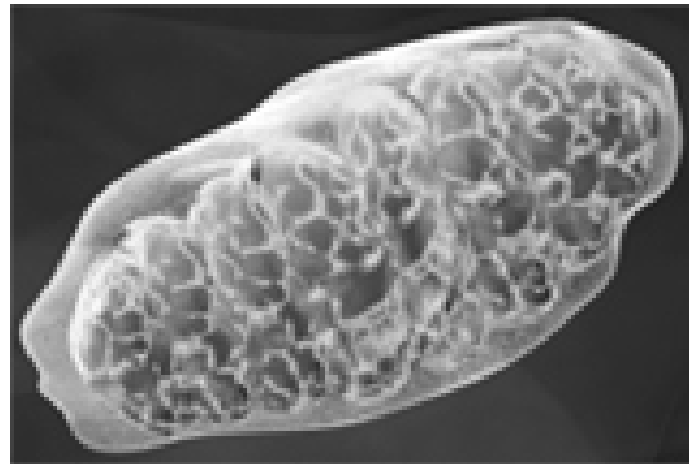


# Nuclear genome

Mendelian inheritance

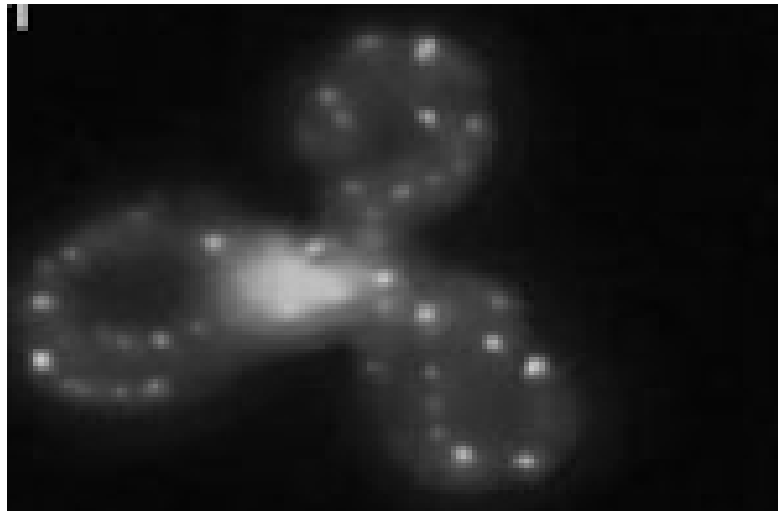
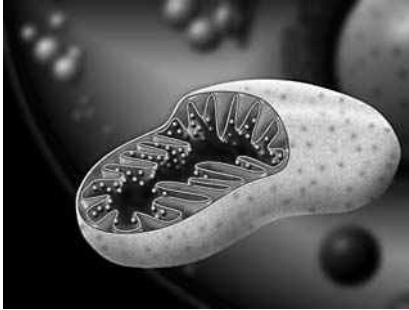


# Mitochondrial genome



Many mitochondria are found in each cell, all containing mtDNA

# Mitochondrial genome



**Mitochondriální dvoušroubovicová DNA tvoří jednu kruhovou molekulu**

Mitochondria have their own DNA, a relic from the distant past when they were free-living organisms.  
•Evidence of this is the slightly different genetic codes found in nonplant mitochondria. For example:

Organism	Code	Amino Acid (standard)
All nonplant species	UGA	Tryptophan (stop)
Mollusks	AGA	Serine (Arginine)
Yeast	CUU	Threonine (Leucine)

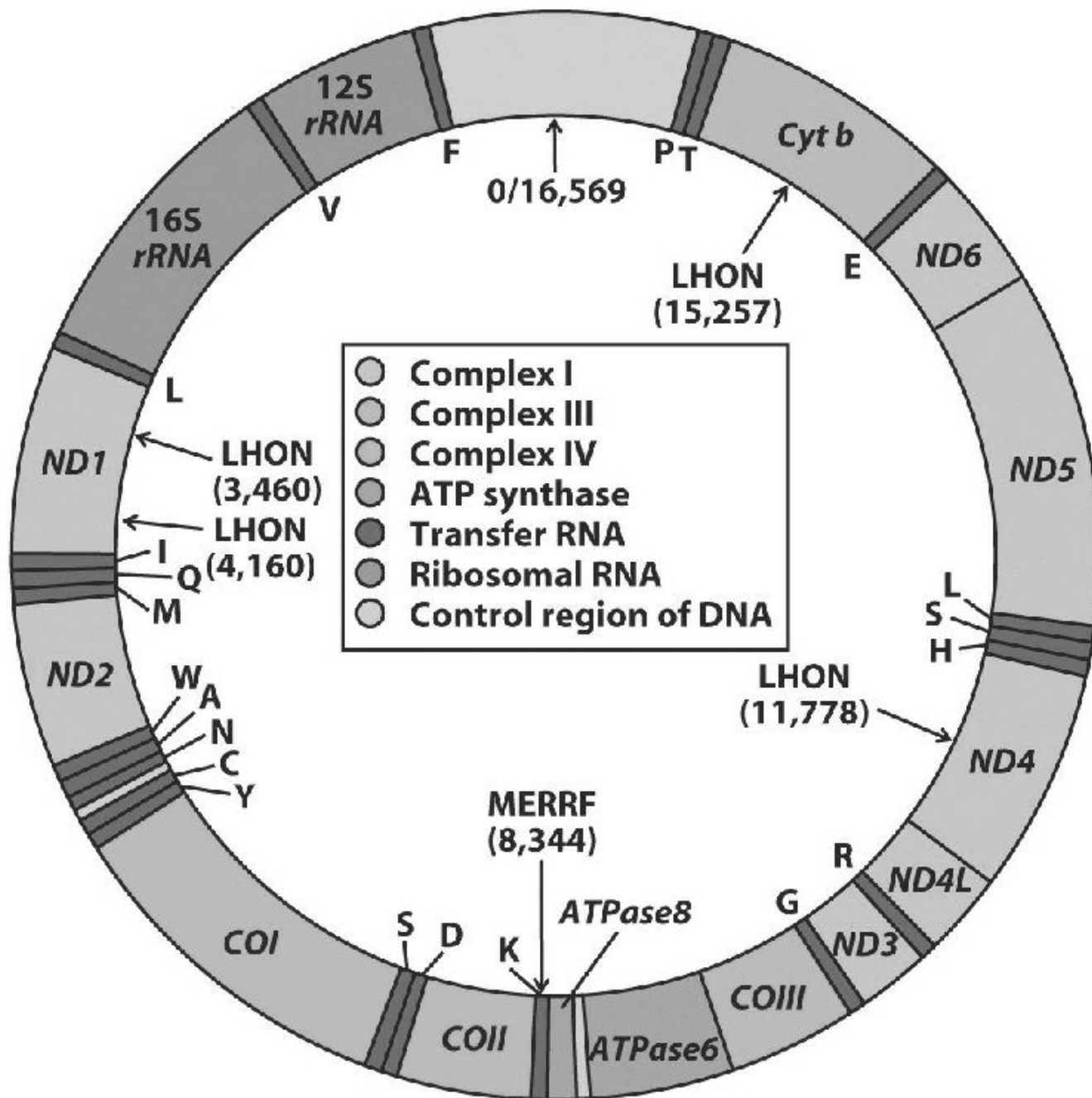


# Mitochondrial genome

Exclusively maternal inheritance



The male mtDNA within the sperm's tail is lost as it enters the egg



# mtDNA vs. choroby

- cyclic vomiting syndrome –přestavby rozáhlých segmentů mtDNA
- Leber hereditary optic neuropathy - mutace v genech *MT-ND1*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, and *MT-ND6*
- mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes - mutace v genech *MT-ND1*, *MT-ND5*, *MT-TH*, *MT-TL1*, and *MT-TV*
- myoclonic epilepsy with ragged-red fibers - mutace v genech *MT-TK*, *MT-TL1*, *MT-TH*, and *MT-TS1*
- neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa - mutace v genu *MT-ATP6*
- nonsyndromic deafness - mutace v genech *MT-RNR1* a *MT-TS1*
- cancer, including breast, colon, stomach, liver, and kidney tumors, cancer of blood-forming tissue (leukemia) and cancer of immune system cells (lymphoma) – somatické mutace
- age-related disorders: heart disease, Alzheimer disease, and Parkinson disease - somatické mutace

# The human nuclear and mitochondrial genomes

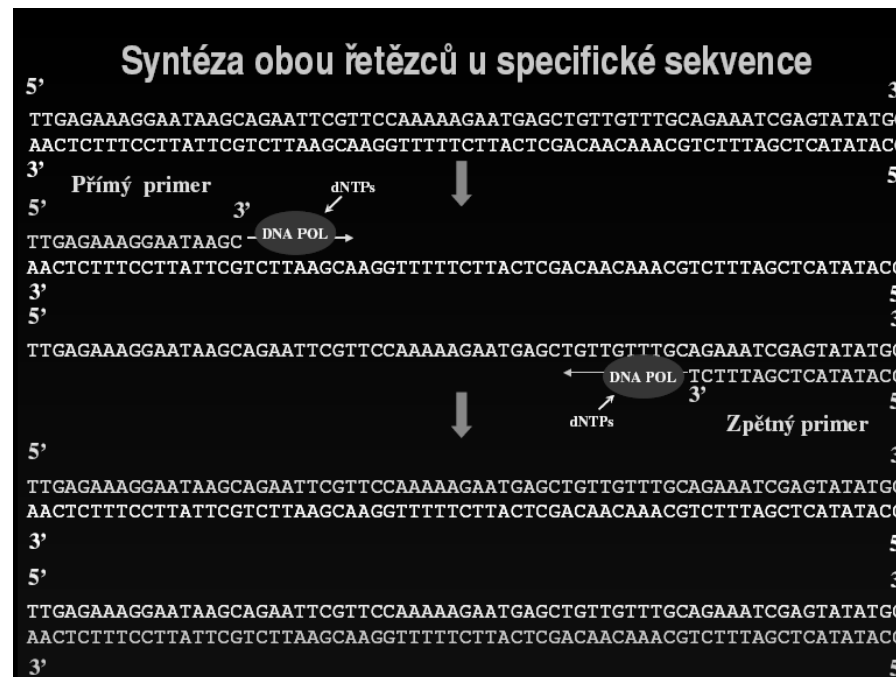
differ in many aspects of their organisation and expression

	Nuclear genome	Mitochondrial genome
Size	3000 Mb	16.6 kb
No. of different DNA molecules	23 (in XX) or 24 (in XY) cells, all linear	One circular DNA molecule
Total no. of DNA molecules per cell	23 in haploid cells; 46 in diploid cells	Several $\times 10^3$
Associated protein	Several classes of histone and nonhistone protein	Largely free of protein
No. of genes	<b>22 000</b>	37
Gene density	~1/40 kb	1/0.45 kb
Repetitive DNA	Large fraction, see <i>Figure 7.1</i> .	Very little
Transcription	The great bulk of genes are transcribed individually	Continuous transcription of multiple genes
Introns	Found in most genes	Absent
% of coding DNA	<b>1 – 2 %</b>	~93%
Codon usage	See <i>Figure 1.22</i>	See <i>Figure 1.22</i>
Recombination	At least once for each pair of homologs at meiosis	None
Inheritance	Mendelian for sequences on X and autosomes; paternal for sequences on Y	Exclusively maternal

# Polymerázová řetězová reakce PCR

Genetici potřebují pro své analýzy  
značné množství studovaného úseku DNA

PCR zmnoží zvolený úsek DNA  
Rychle a spolehlivě



# Polymerázová řetězová reakce PCR

## Kery Mullis

V roce 1983 PCR metodu  
vynalezl  
a postaral se o jednu z  
největších revolucí  
v molekulární genetice



Když v r. 1993 Kary Mullis z rukou švédského krále přijímal Nobelovu cenu za objevení realizaci PCR, sám skromně charakterizoval svůj obdivuhodný nápad a deset let práce na jeho uskutečnění jako souběh náhod, vědecké naivity a série šťastných omylů.

# Molekulárně - genetická diagnostika

- **Diagnostika infekcí**

diagnostiky detekujících virová, bakteriální, mykotické a parazitální patogeny v různých tělních tekutinách

- **Diagnostika geneticky podmíněných chorob**

postnatální, prenatální, preimplantační diagnostika, populační screening

- **Diagnostika nádorových onemocnění**

analýza tumorsupresorových genů a onkogenů, diagnostická vyšetření zaměřená na detekci kauzálních markerů a prognostických faktorů ve vztahu k onkologickým onemocněním, monitorování terapie rakoviny, zjišťování minimální reziduální choroby.

- **Farmakogenetika**

stanovení tolerance k farmakům

- **DNA typizace osob (soudní lékařství, transplantologie)**

# Molekulárně - genetická diagnostika

- **Diagnostika infekcí**

diagnostiky detekujících virová, bakteriální, mykotické a parazitální patogeny v různých tělních tekutinách

Cílem je detekovat infikované buňky  
na pozadí mnohonásobně početnějších neinfikovaných buněk  
Provádí se za použití PCR na DNA nebo cDNA cizírodých organismů

Konvenční diagnostické metody

-vypěstování organismu v kultuře

-detekce přítomnosti organismů za použití protilátek

Časově náročné

Někdy málo citlivé



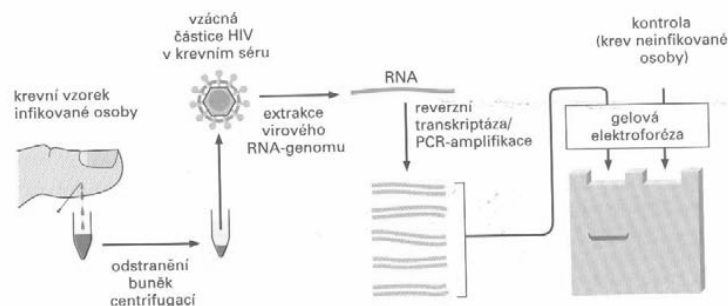
# Molekulárně - genetická diagnostika

- Diagnostika infekcí

## HIV

Přítomnost virová RNA naznačuje aktivní infekci

Lze prokázat provedením PCR za použití cDNA jako templátu vytvořených pomocí RT z RNA infikovaných buněk



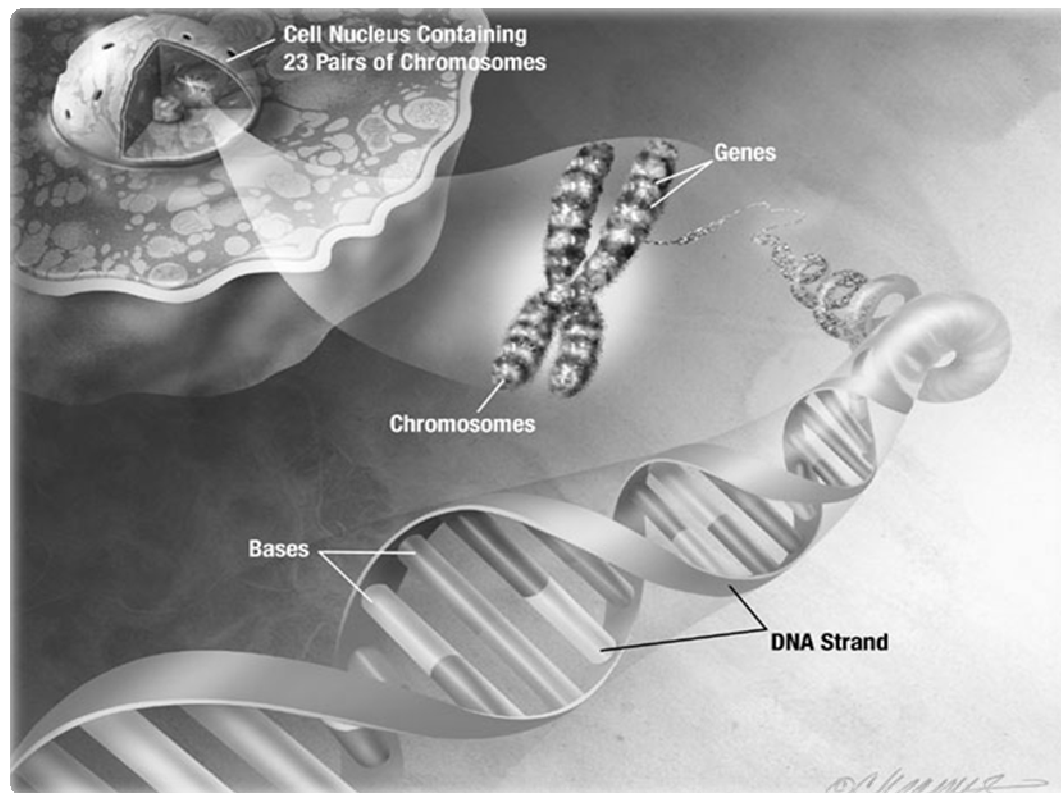
## Tuberkulóza

Pomocí PCR prokazován některý z vysoce konzervativních genů mykobakterií pomocí primerů připraveným k těmto sekvencím

Amplifikovaný fragment je hybridizován se sondami vysoce specifickými pro daný kmen

Lze detekovat je 10 bacilů na 10000000 eukaryotických buněk

# Molekulární diagnostika geneticky podmíněných chorob



# Genetické choroby



## a) Somatické

- vznikají v somatických buňkách
- mutantní změnu obsahují pouze části tkání,  
které vznikly dělením původní mutantní buňky

## b) Gametické

- předávány v zárodečné linii
  1. rodič je nositelem mutace
  2. mutace vzniká při tvorbě gamety
  3. mutace vzniká v gametogoniu,  
vzniká gonodální mozaika
- všechny buňky jedince,  
který vznikl z příslušné zygoty, obsahují mutantní změnu



# Genetické choroby

- 1) Genomové
  - dojde ke změně celého genomu (polyploidie, aneuploidie)
- 2) Chromozomové
  - mutační změna postihla strukturu chromozomu (chromozomové aberace)
- 3) Genové
  - mutační změna v genu

# Genové choroby

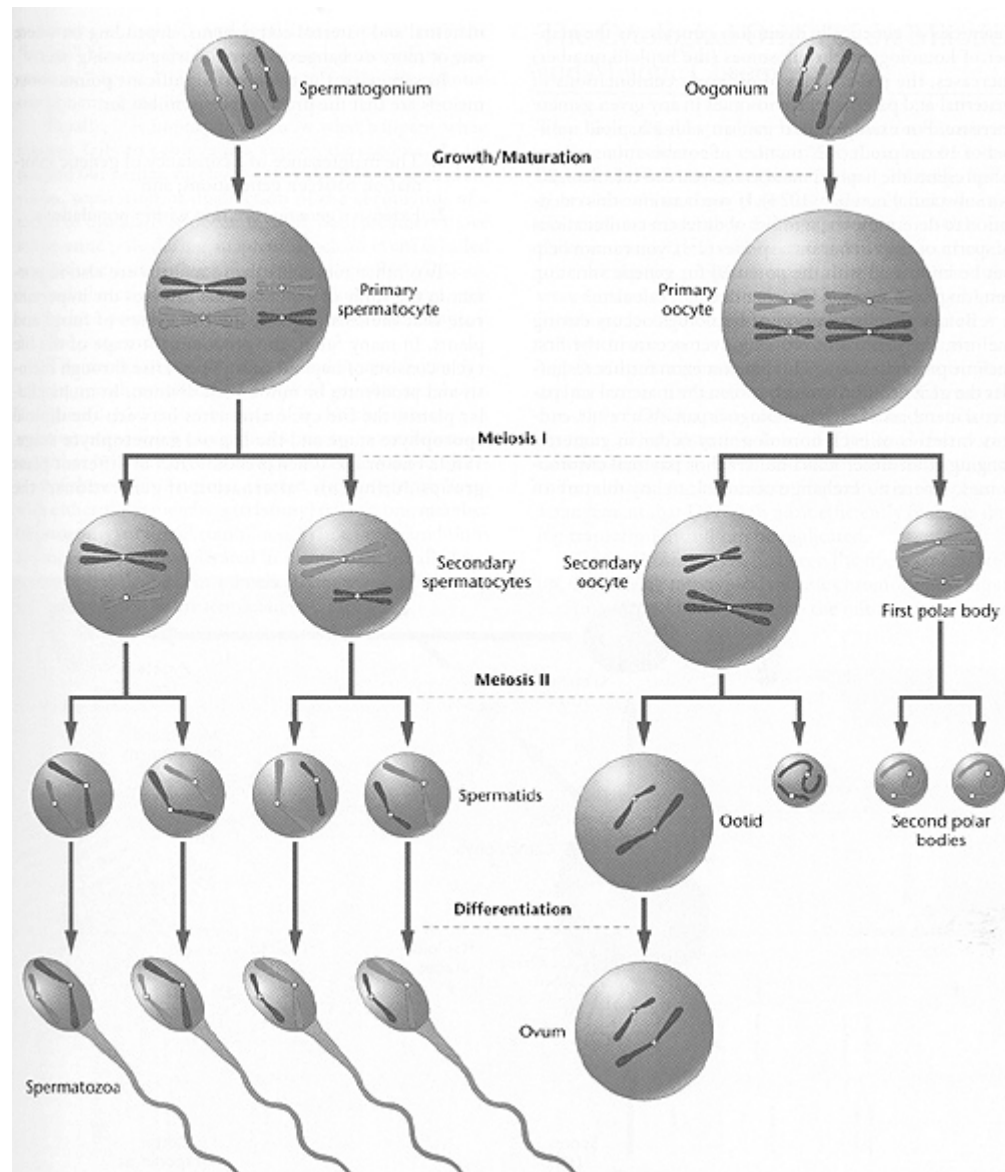


## A) POLYGENNÍ nemendelovská dědičnost

- pravděpodobnost choroby závislá na variantách více genů + obvykle výrazně ovlivněna vlivem prostředí
- riziko stanovováno empiricky/statisticky na základě populačních studií  
(diabetes, vrozené srdeční vady, schizofrenie, astma.....)

## B) MONOGENNÍ mendelistická dědičnost

- vlastnosti (choroby) se dědí v závislosti na jediném genu (lokusu DNA), obvykle změněném mutací
- pravděpodobnost výskytu znaku/choroby u potomků  
– Mendelovy zákony





## Princip molekulárně genetické diagnostiky

Rozpoznání a identifikace mutací v genech,  
které jsou v asociaci s danou chorobou.

Jakmile je identifikována genetická příčina  
onemocnění na úrovni DNA,  
může se vyvinout specifický test  
k analýze relevantních genetických charakteristik pacienta

Není zatím možné vyšetřit,  
zda proband bude trpět jakoukoliv dědičnou chorobou,  
vždy se vyšetřuje možnost poškození určitého konkrétního genu.

Existují i vyšetření, které nezapadají do této definice,  
z těch běžných např. molekulárně genetická detekce aneuploidií  
(tato oblast byla donedávna zcela vyhrazena cytogenetice).



Molekulárně genetické vyšetření se provádí

prenatálně



postnatálně





# Postnatální vyšetření

Pokud je prováděno u žijících osob, pak je cílem

- potvrdit nebo upřesnit klinickou diagnózu
- identifikovat přenašeče genetických onemocnění
- stanovit presymptomatickou diagnózu,

identifikaci onemocnění před jeho manifestací

tj. odhalit, jestli v genomu probanda je taková molekulární změna na určitém genu, která způsobí, že v průběhu svého života onemocní příslušnou chorobou.



# Prenatální a preimplantační vyšetření

odhalují závažná onemocnění před narozením dítěte  
má jasně preventivní úlohu

Jeho cílem je zabránit nebo se připravit  
na narození postiženého dítěte.

Historie prenatální molekulárně genetické diagnostiky  
se datuje od roku 1981,  
kdy bylo poprvé u plodu diagnostikováno,  
jestli bude postižen srpkovitou anémií,  
pro kterou byla jeho matka přenašečkou.





V molekulárně genetické diagnostice jsou dva základní a navzájem zcela odlišné metodické přístupy vyšetření:

- nepřímé (*gene tracing*)
- přímé (*direct testing*).



## **Přímá molekulárně genetická diagnostika**

- **Detekce kauzálních mutací v odpovědném genu  
vždy potvrdí klinickou diagnózu**

**musíme znát:**

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



## **Přímá molekulárně genetická diagnostika**

### **Metody detekce známých mutací (scoring)**

- v genu asociovaném s danou chorobou

- **Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)**  
v genu asociovaném s danou chorobou



### **Metody detekce známých mutací (scoring)**

detekce určité kauzální mutace pro danou chorobu specifickou metodou

#### **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, kdy jedna nebo vícemutací se vyskytují s prevaluující četností (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 nepatogeního polymorfismu)



## Příklady chorob s vymezeným počtem mutací

Srpkovitá anemie	mutace E6V v HBB genu
Cystická fibróza	mutace F508del v CFTR genu
Huntingtonova chorea, Myotonická dystrofie, Fragilní X	nestabilní expanze trinukletidových repeticí
Hemofilie A	velká inverze v genu pro faktor 8
Duchennova muskulární dystrofie	60-70% mutací tvoří velké delece
Tay-Sachsova choroba	inzerce 4pb v exonu 11 genu HEXA
Lebrova optická atrofie	mitochondriální mutace nukleotidu v pozici 3460, 11778, 14484



### **Metody detekce známých mutací (scoring)**

detekce určité kauzální mutace pro danou chorobu specifickou metodou

Amplifikace úseku s předpokládanou delecí	detekce delecí
Restrikční analýza PCR produktu	mutací vzniká nebo zaniká specifické místo v DNA, rozlišované restikčním enzymem
Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy	detekce bodových mutací
PCR s alelově specifickými primery (ARMS test)	detekce bodových mutací
PCR s primery ohraničujícími předpokládané delece v DNA	úspěšná amplifikace odhalí přítomnost specifické přestavby v DNA
Analýza teploty tání PCR produktu pomocí real-time PCR	změna teploty tání v porovnání s pozitivní a standartní kontrolou odhalí specifickou sekvenční změnu
Triplet Primed PCR	detekce expanze trinukleotidových repeticí v DNA
Multiplex Ligation Probe Amplification MLPA	detekce rozsáhlých delecí a duplikací, vhodná pro stanovení SNP genotypů a testování metylací v promotorové oblasti genů



# Přímá DNA diagnostika

- **Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning) postupné nebo multiplexní screenování úseků genu asociovaného s danou chorobou pomocí vyhledávacích metod**

odhalí jakékoliv odchylky v analyzované sekvenci DNA pacienta ve srovnání se standardní sekvencí

neodliší patogenní a nepatogenní změny v sekvenci DNA

jsou náročnější časově i finančně

# Přímá DNA diagnostika

## Metody přímého vyhledávání neznámých mutací (scanning)

Jednořetězcový konformační polymorfismus (SSCP)	jednoduchá metoda	doporučuje se pro krátké sekvence DNA neodhaluje pozici změny
Denaturační gradientová elektroforéza (DGGE)	vysoká citlivost	nutné primery s GC-clampy neodhaluje pozici změny
Heteroduplexní analýza (HD)	jednoduchá metoda	doporučuje se pro krátké sekvence DNA omezená citlivost neodhaluje pozici změny
Detekce zkráceného proteinu (PTT)	vysoká citlivost pro terminační mutace	pouze pro terminační mutace odhaluje pozici změny
Analýza teploty tání na real-time PCR, HRM	vysoká citlivost	doporučuje se pro sekvence cca 250 bp neodhalí pozici změny
Sekvenování	detekce veškerých změn v DNA	nadbytek informací plně charakterizuje mutace

# Přímá DNA diagnostika

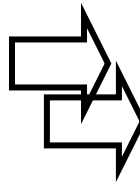
Scoring RYR1 kauzálních mutací

Restrikční analýza

ARMS

Hybridizace

Analýza teploty tání (Real-time PCR)



Scanning RYR1 genu

Vyhledávací metody

(SSCP, DGGE, DHPLC)

Přímé sekvenování



Identifikace dosud nepopsané mutace

???

# Přímá DNA diagnostika

neznámá mutace – kauzální mutace???

Aby mohla být sekvenční varianta detekována k prediktivnímu genetickému testování  
potřeba nezávislého důkazu, že je patogenní

- genetická charakterizace - aspekty evoluční konzervace
  - kosegregace mutace s chorobou v nejméně 2 rodinách
  - absence u 100 zdravých kontrol (<1%)
- funkční charakterizace
  - rekombinantní *in vitro* exprese na definovaném genetickém pozadí
  - zkouška funkce proteinu s charakterizovanou mutací v *ex vivo* tkáních

# Vyšetřované genové choroby

## **Databáze DNA laboratoří v ČR**

<http://www.uhkt.cz/nrl/db>

## **Mezinárodní databáze**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>

<http://www.eurogentest.org/web/>

<http://www.genetests.org/>

<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>