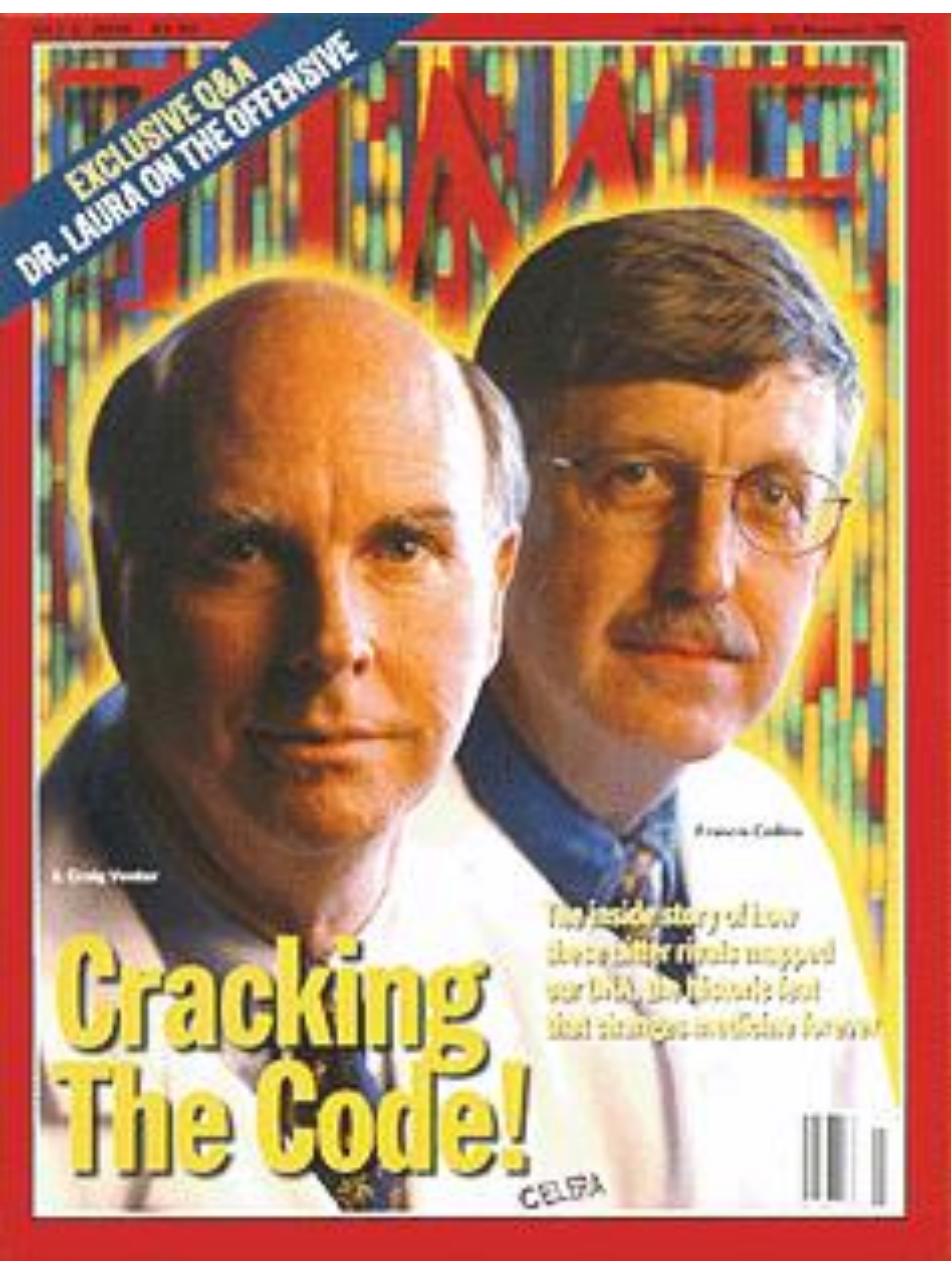




Molekulární diagnostika

Iveta Valášková





EXCLUSIVE Q&A
DR. LAURA ON THE OFFENSIVE

THE CODE

A. Eric Verrier

Francis Collins

Cracking The Code!

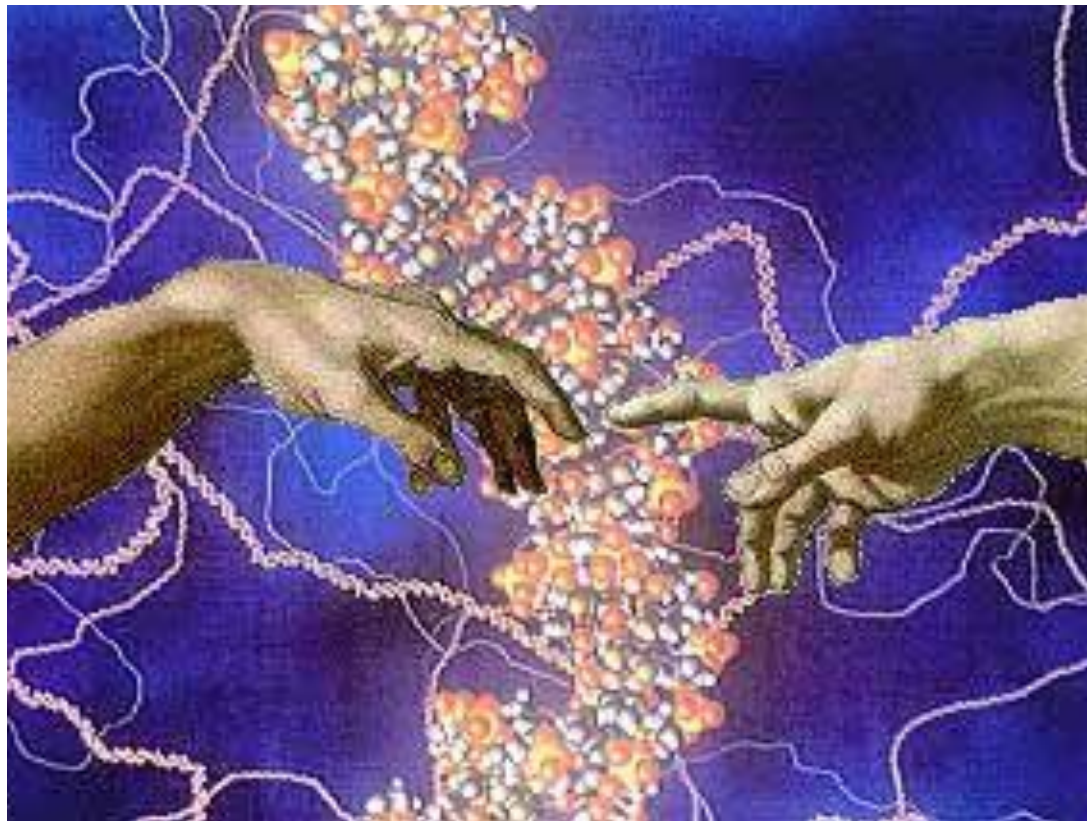
The inside story of how three bitter rivals mapped our DNA, the genome's best and darkest medicine forever

CELEBA

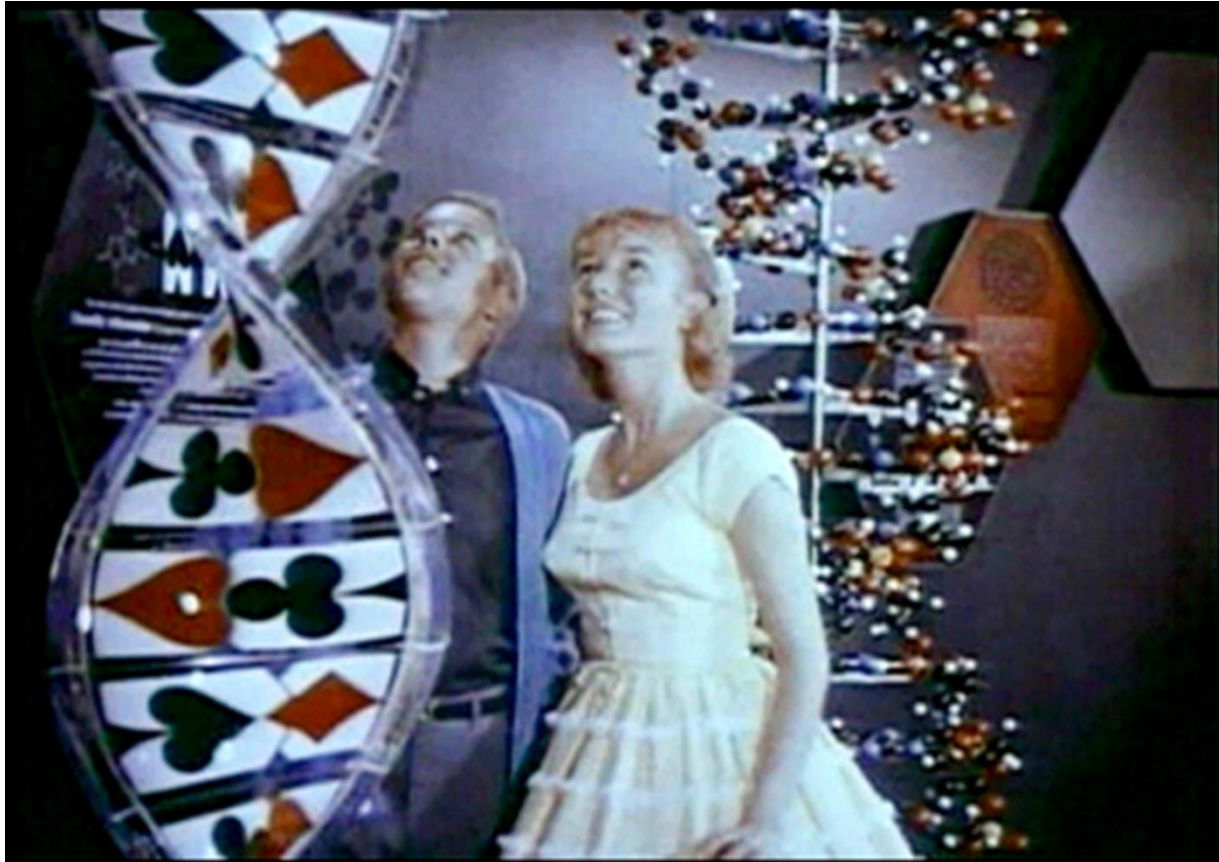


We now know how God wrote the book of life

Bill Clinton



But do we know
how to read the book ?



Molekulární diagnostika

- Diagnostika infekčních onemocnění
- Genetická identifikace
- Diagnostika genetických chorob

Diagnostika infekčních onemocnění

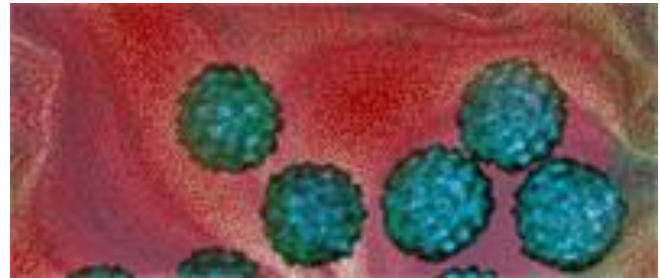
HPV

Chlamydia

Hepatitis

HIV

Toxoplasmosis



Genetická identifikace

- **Paternitní testy**
- **Forenzní testy**

Jsem biodetektiv, jmenuji se DNA a usvědčím každého!

- Řešení trestních činů – shoda mezi podezřelým a stopou místa činu
- Oběti neštěstí – havárie letadla, zemětřesení....
- Vojáci ve válce – kdo je „neznámý“ voják....
- Paternitní testování – kdo je otcem....
- Příbuzenské vztahy – nárok na dědictví.....
- Hledání pohřešovaných osob – nález těla a identifikace
- Vytváření databáze usvědčených zločinců

Ve všech případech se určují DNA profily pomocí STR markerů a následně je hledána shoda s referenčním vzorkem

Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)

délka základní repetice 2 – 6 bp

počet opakování repetice 2 – 100 bp

Rozptýlené rovnoměrně v lidské genomu

Vyskytují se běžně v populaci

Nejsou přepisovány do proteinu

leží v intronech

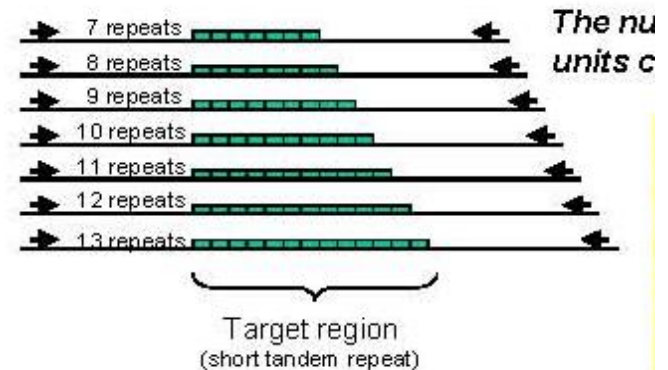
Nejsou příčinou choroby

Tvoří vzorce bez vztahu s fenotypem

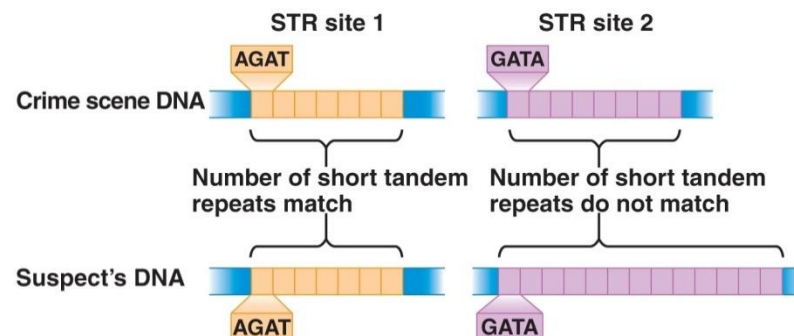
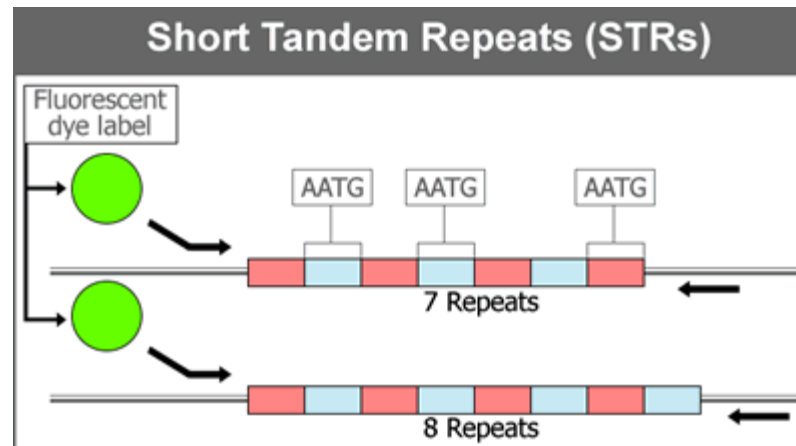
Mezi jednotlivci se velmi liší

Odlišují jednoho člověka od druhého

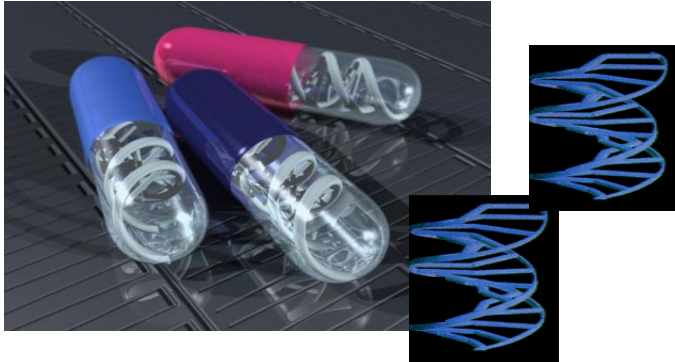
```
TCCCAAGCTCTTCCCTAGATCAATACAGACAGAAGACA  
GGTGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
TAGATAGATATCATTGAAAGACAAAACAGAGATGGATGATAGAT  
ACATGCTTACAGATGCACAC
```



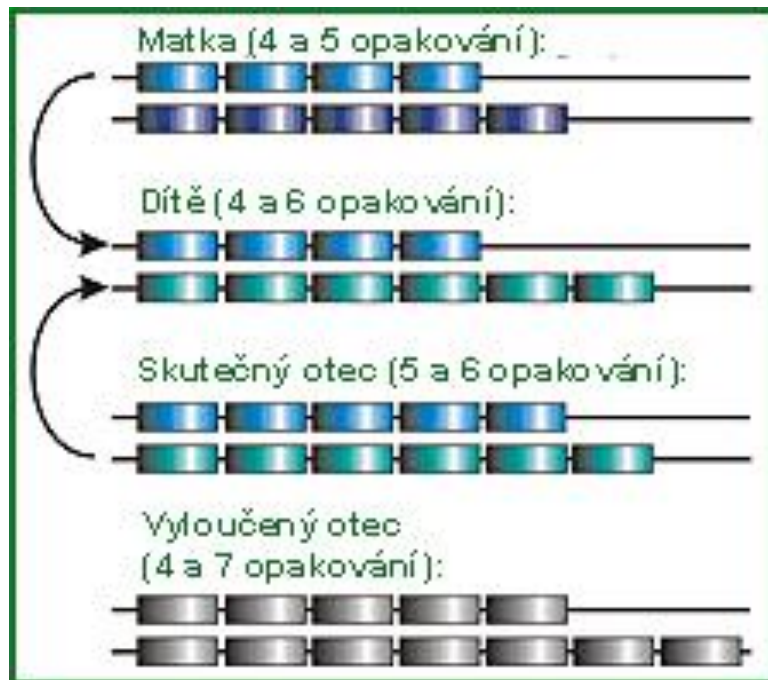
Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)



Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)



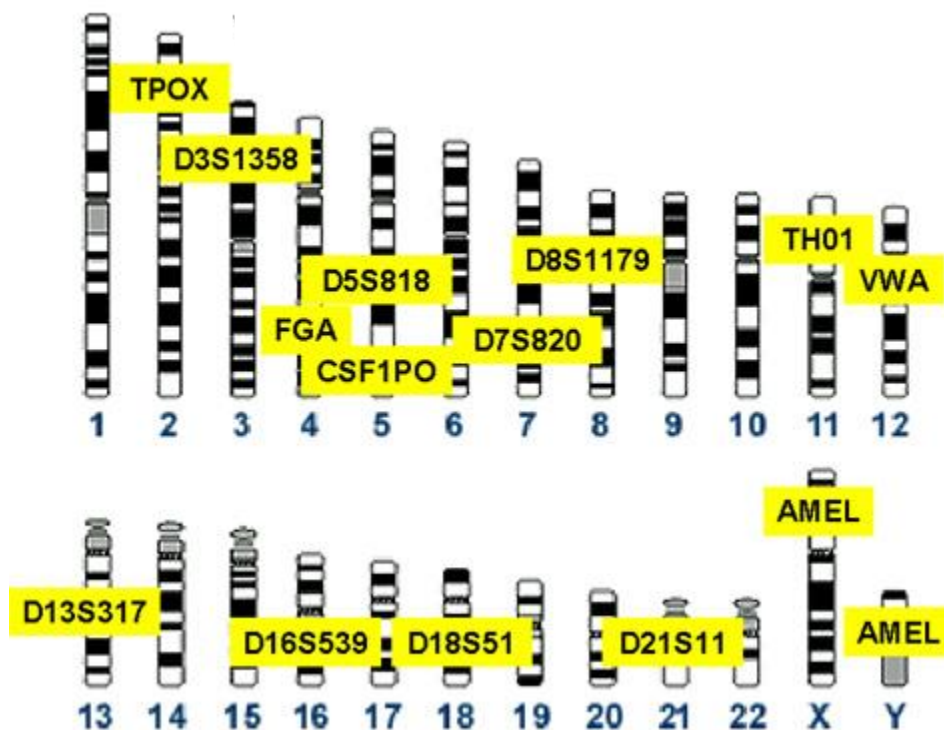
STR - určení otcovství

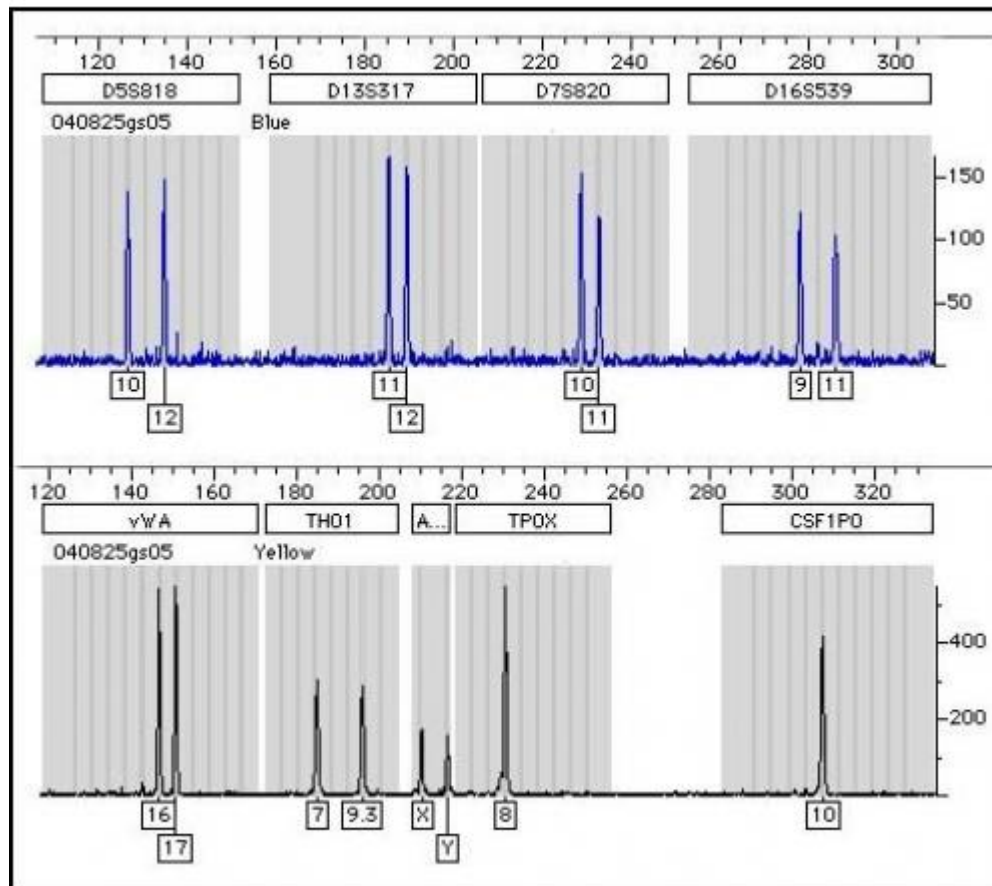


CODIS loci

CODIS loci jsou DNA oblasti / znaky, které používá FBI a další světové agentury jako dohodnutý standard pro ukládání genetických profilů osob.

Ve vyhodnocení paternitních testů se v současné době používá 16 oblastí DNA.





Dnešní genetika ovšem během posledních let nabízí možnosti, o jakých se dřív ani nesnilo.

Nejistý otec si bez problémů ověří,
jestli vychovává svoje dítě
a nejistá matka zjistí, který z tatínek je ten pravý, biologický.

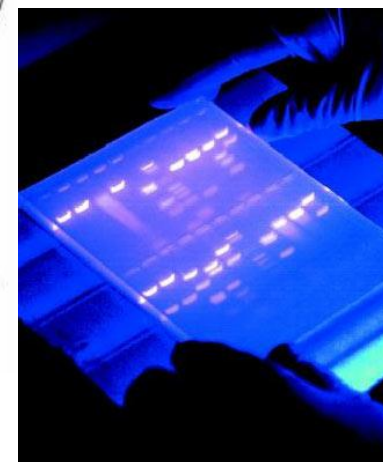
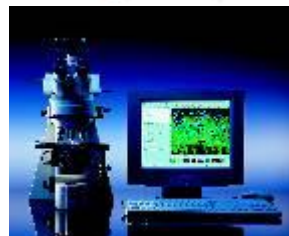
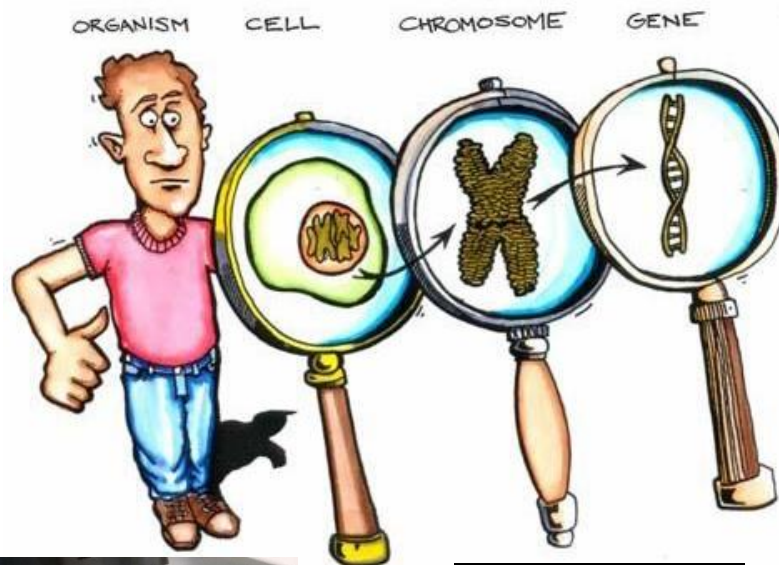
DNA je natolik variabilní, že každý člověk je de facto unikát
a otcovství se tak dá potvrdit
nebo vyvrátit s téměř stoprocentní pravděpodobností.



Nakolik je celá tahle revoluce ve finále přínosná pro děti, je ovšem téma k další diskuzi.



Diagnostika genetických onemocnění



Cytogenetika
Molekulární cytogenetika

Molekulární diagnostika

Molekulární diagnostika genetických chorob

- **Genetické rizikové faktory**
- **Farmakogenetika**
- **Patologické varianty u monogenních chorob**

Genetické rizikové faktory

Monogenní choroby jsou způsobeny patologickou variantou v jednom genu:

Chorobu způsobující (kauzální) varianty

Multifaktoriální choroby jsou způsobeny kombinací variant několika genů:

Genetické rizikové faktory

Genetické rizikové faktory

Thrombosis

Kardiovaskulární choroby

Alzheimerova choroba

Osteoporosis

Genetické rizikové faktory

Většina jednotlivých rizikových faktorů
nemá žádný klinický význam
u jednotlivých pacientů

Genetické rizikové faktory

Thrombosis

Factor V

Factor II

MTHFR

Molekulární diagnostika genetických chorob

- Genetické rizikové faktory

- **Farmakogenetika**

- Patologické varianty u monogenních chorob

Farmakogenetické testy

- **Léková specificita**
- **Léková účinnost /toxicita**

Léková specifická

Herceptin : HER2

Tyrosine kinase inhibitors

BCR / ABL

KIT

PDGFR A/B

EGFR

Léková účinnost/toxicita

Cytochromy

CYP2D6

CYP2C9

CYP2C19

Molekulární diagnostika genetických chorob

- Genetické rizikové faktory
- Farmacogenetika
- **Patologické varianty u monogenních chorob**

Diagnostické hrdlo láhve

- . **Počet chorob**
- . **Závažnost varianty**
- . **Technologie**
- . **Cena**
- . **Počet vzorků**
- . **Organizace**

Monogenní choroby

> 6.500 monogenních chorob

Diagnostické hrdlo láhve

- Počet chorob
- **Závažnost varianty**
- Technologie
- Cena
- Počet vzorků
- Organizace

Patologické varianty

Jednoduché testy běžné patologické varianty

Náročné testy: Privátní patologické varianty

Patologické varianty

Jediná patologická varianta

Fragile X

Srpkovitá anemie

Běžné patologické varianty

Nesyndromová ztráta sluchu

Hemochromatóza

Panel patologických variant

Cystická Fibroza

Privátní patologická varianta

Rakovina prsu

LQT syndrom

Jednoduché testy

Disease	Gene	Mutation
Fragile X	FMR1	Repeat
FRAXE	FMR2	Repeat
Friedreich ataxia	FRDA	Repeat
Haw River	DRPLA	Repeat
Huntington type 1	HD	Repeat
Kennedy	AR	Repeat
Myotonic dystrophy type 1	DMPK	Repeat
Spinocerebellar ataxia	SCA1,2, 3, 6, 7, 8,10, 12,17	Repeat
Alpha 1 antitrypsin	PI	2 common mutations
Charcot-Marie-Tooth Type 1A	PMP22	1 common mutation
Cystic fibrosis	CFTR	Common mutations
Deafness	GJB2	1 common mutation
Hemochromatosis type1	HFE	2 common mutations
Hereditary neuropathy (HNPP)	PMP22	1 common mutation
Sickle cell anemia	HBB	1 common mutation
Spinal muscular atrophy	SMN1	1 common mutation
Beta thalassemia	HBB	1 exon

Náročné testy

Disease	Gene	Mutation
Breast cancer	BRCA1	Private
	BRCA2	Private
Colon cancer	MLH1	Private
	MSH2	Private
	MSH6	Private

Diagnostické hrdlo láhve

- **Počet chorob**
- **Závažnost varianty**
- **Technologie**
- **Cena**
- **Počet vzorků**
- **Organizace**

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

Detekce variant - scoring

Amplifikace úseku s předpokládanou delecí	detekce delecí
Restrikční analýza PCR produktu	mutací vzniká nebo zaniká specifické místo v DNA, rozlišované restrikčním 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 repetací v DNA
Multiplex Ligation Probe Amplification MLPA	detekce rozsáhlých delecí a duplikací, vhodná pro stanovení SNP genotypů a testování metylací v promotorové oblasti genů

Detekce variant - 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

Diagnostické hrdlo láhve

- **Počet chorob**
- **Závažnost varianty**
- **Technologie**
- **Cena**
- **Počet vzorků**
- **Organizace**

Cena

Jedna patologická varianta : levné

Prevalující patologická varianta : levné

Panel patologických variant : mírné

Privátní patologická varianta: drahé (1000 E)

Cena

- Socioekonomická situace
- Sociální aspekty
- Hrazení pojišťovnou

Diagnostické hrdlo láhve

- **Počet chorob**
- **Závažnost varianty**
- **Technologie**
- **Cena**
- **Počet vzorků**
- **Organizace**

Běžné genetické choroby

Disease	Frequency	Mutation	Genes	Mutations	Conclusion
Hemochromatosis	1 / 600	1 / 400	HFE	3 common mutations	Easy / cheap
Breast Cancer	1 / 20	1 / 500	BRCA1 BRCA2	Mutations in 23 exons Mutations in 28 exons	Complicated / expensive
Hypercholesterolemia	1 / 500	1 / 750	LDLR	Mutations in 16 exons	Complicated / expensive
Colorectal Cancer	1 / 25	1 / 1.000	MLH1 MSH2 MSH6 APC MUTYH	Mutations in 19 exons Mutations in 16 exons Mutations in 10 exons Mutations in 15 exons Mutations in 16 exons	Complicated / expensive
Cystic fibrosis	1 / 6.500	1 / 2.500	CFTR	Common mutations	Easy / cheap
Prelingual deafness	1 / 1.500	1 / 4.000	GJB2	1 common mutation	Easy / cheap
Fragile X syndrome	1 / 5.000	1 / 5.000	FMR1	Only 1 mutation	Easy / cheap
SMA	1 / 10.000	1 / 10.000	SMN1	Only 1 mutation	Easy / cheap
Beta Thalassemia	variable	variable	HBB	Only 1 exon	Easy / cheap

Frekventované DNA testy

- **Thalassemia**
- **Cystic fibrosis**
- **Breast cancer**
- **Colorectal cancer**
- **FRAXA**
- **F5 Leiden**

Diagnostické hrdlo láhve

- **Počet chorob**
- **Závažnost varianty**
- **Technologie**
- **Cena**
- **Počet vzorků**
- **Organizace**

Organizace

- **Malé lokální laboratoře: malé portfolio (< 50 tests)**
- **Velké komerční laboratoře: běžné + jednoduché testy**
- **Akademické laboratoře: výzkum -diagnostika**

Pohled do budoucnosti



Next generation sequencing

Sekvenční síla

Cena

Celoexomové/celogenomové sekvenování

Sekvenování všech pacientů