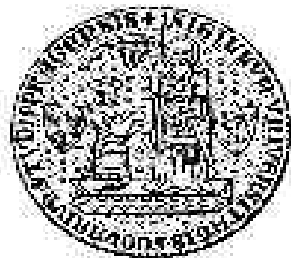


# Molekulární genetiky II

**zimní semestr**

**4. výukový týden (27.10. – 31.10.2008)**



Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN, Praha

# DNA diagnostika

- prenatální
- presymptomatická
- Potvrzení diagnózy
- Diagnostika heterozygotů (přenašečů)

**dělení podle cíle v genomu :**

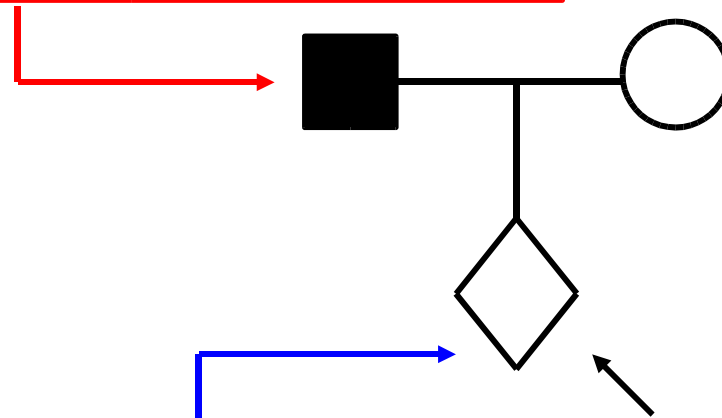
**Přímá diagnostika** — **Stanovení alely (mutace) způsobující onemocnění**

**Nepřímá diagnostika** — **Stanovení alely (markeru) v těsné vazbě s genem nesoucím neznámou mutaci způsobující onemocnění**

# Přímá DNA diagnostika

- hledáme alelu (variantu), která zodpovídá za daný fenotyp (onemocnění) v rodině
- Například – AD onemocnění, prenatální dg.:

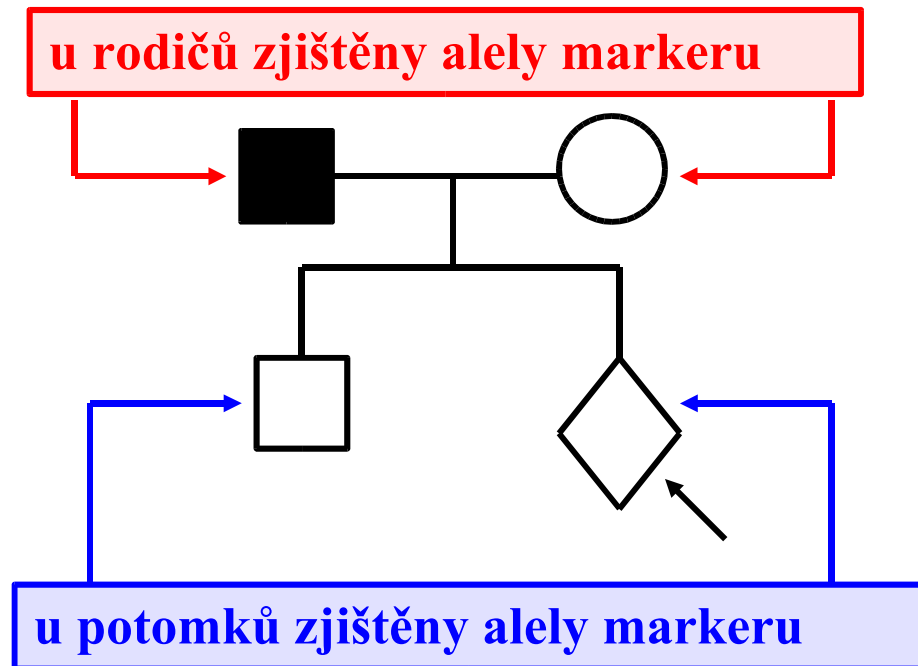
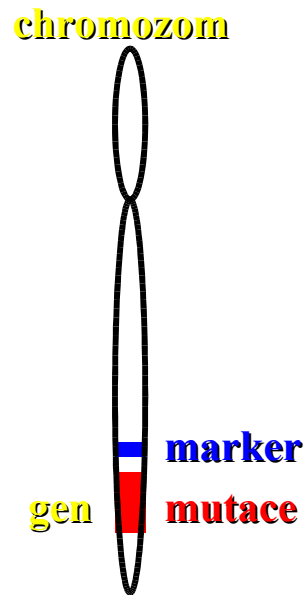
u rodiče zjištěna mutace v genu



u plodu hledána tato mutace

# Nepřímá DNA diagnostika

- Nemusíme vědět jaká mutace genu je zodpovědná za onemocnění v rodině, stačí víme-li o který gen se jedná
- při diagnostice je využita genetická vazba mezi známým **markerem**, který leží blízko genu a neznámou **mutací** uvnitř genu. Která alela markeru kosegreguje s onemocněním? Má tuto alelu vyšetřovaná osoba?



obvykle se sleduje více markerů

# Nepřímá diagnostika

- neznáme jaká mutace genu je zodpovědná za onemocnění v rodině, pouze víme o který gen se jedná
- při diagnostice je využita genetická vazba mezi známým **markerem**, který leží blízko genu a neznámou **mutací** uvnitř genu. Která alela markeru kosegreguje s onemocněním? Má jí vyšetřovaná osoba?

**HLAVNÍ ÚSKALÍ nepřímé diagnostiky: U různých jedinců jsou ve vazbě s mutovanou alelou (která způsobuje onemocnění) různé alely markeru.**

**Naopak stejná alela markeru může jednou být ve vazbě s mutovanou alelou genu, podruhé se standardní alelou genu.**

**Tedy vyšetření může být neinformativní nebo jen částečně informativní.**

**Vedlejší potíž: možnost rekombinace mezi markerem a genem. Její pravděpodobnost je malá a celkem přesně vyčíslitelná**

# Variabilita na úrovni DNA

- v populaci se určité místo sekvence DNA vyskytuje v různých formách - alely
- variabilní místo se může nalézat jak uvnitř genů (v exonech - tzv. kódující sekvence, v intronech - tzv. nekódující sekvence), tak mimo geny (vždy tzv. nekódující sekvence)

## dělení dle frekvence alel:

**polymorfismus** — frekvence „vzácnější“ alely je v populaci  $> 1\%$

„mutace“, „vzácná alela“ — frekvence v populaci  $< 1\%$

## dělení dle funkčního vlivu:

**funkční varianta** — alela je spojena se změnou fenotypu

**tichá varianta** — alela nemá funkční dopad a ve fenotypu se neprojeví

# Variabilita na úrovni DNA

dělení podle typu:

**SNP** — **Single nucleotide polymorphism = polymorfismus jednoho nukleotidu**

**tandemové repetic** — **mikrosatelity, také zvané např. STR = short tandem repeats, minisatelity**

**Strukturní polymorfizmy** — **Inzerce, delece, inverze (1 bp – chromozom)**

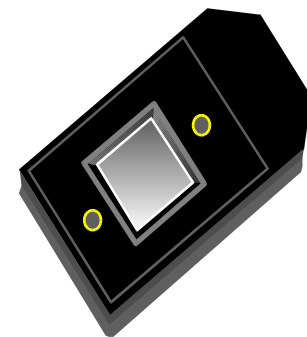
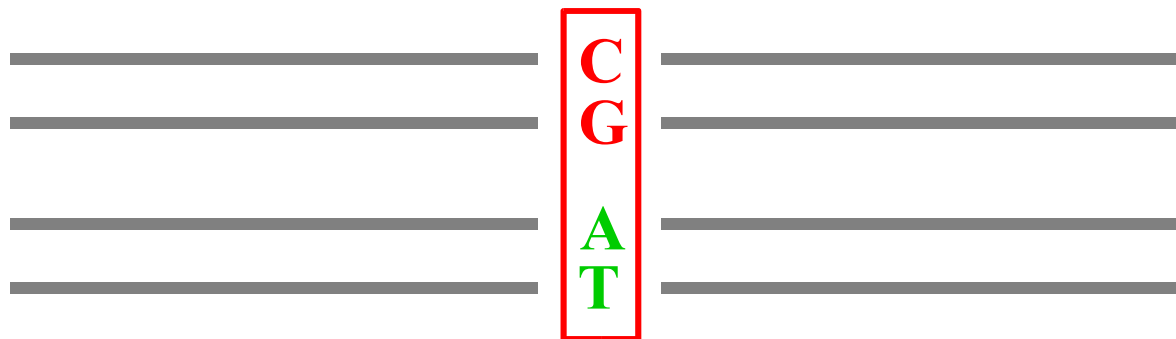
**Duplikace, „low copy repeats“** — **Vlastně druh tandemových repetic, ale značně odlišný co do techniky detekce a funkčního významu Např. *FCGR3B* a riziko glomerulonefritidy, *RhD* a *RhCE***

# SNP – single nucleotide polymorphisms

## Jednonukleotidové polymorfizmy

SNP  
┌  
└  
C / A

TAGCCATCGGTA N GTACTCAATGATCA



V 99.9% sekvence DNA se lidé od sebe vzájemně neliší. Ze zbývajících 0.1% rozdílu tvoří SNP přes 80%. Možnost typizace až miliónu SNP v jednom vzorku pomocí DNA čipů by měla usnadnit identifikaci alel, zodpovědných za řadu prevalentních onemocnění.



# Možnosti stanovení SNP:

Mikročipy (en masse), **RFLP** (po jednom; Southern blot, PCR-RFLP)

Mnoho ne-RFLP metod (SSCP, alelově specifické primery, .....)

## SNP jako Polymorfismus délky restričních fragmentů

**RFLP...restriction fragment length polymorphism**

Restriční endonukleázy – bakteriální enzymy štěpící DNA v místě specifické sekvence, chrání bakterie před infekcí bakteriofágem (a nebo taky ne)

RsaI

5' TAGCCATCGGT**AC**GTACTCAATGATCA 3'  
3' ATCGGTAGCC**AT**G**CA**TGAGTTACTAGT 5'

5' TAGCCATCGGTAAGTACTCAATGATCA 3'  
3' ATCGGTAGCCATTCATGAGTTACTAGT 3'

# Názvosloví restričních endonukleáz (restriktáz)

***Eco RI***

Třípísmenná zkratka organismu  
„**Escherichia coli**“

Bližší rozlišovací označení původu  
**RI...enzym pocházející z kmene  
RY13, determinovaný R plazmidem**

<http://rebase.neb.com>



**REBASE®**  
The Restriction Enzyme Database  
<http://rebase.neb.com> - [Citing REBASE...](#)

Change search category and enter keyword:

author name sorted by time

Go

Clear

Origin directly to enzymes:

Go

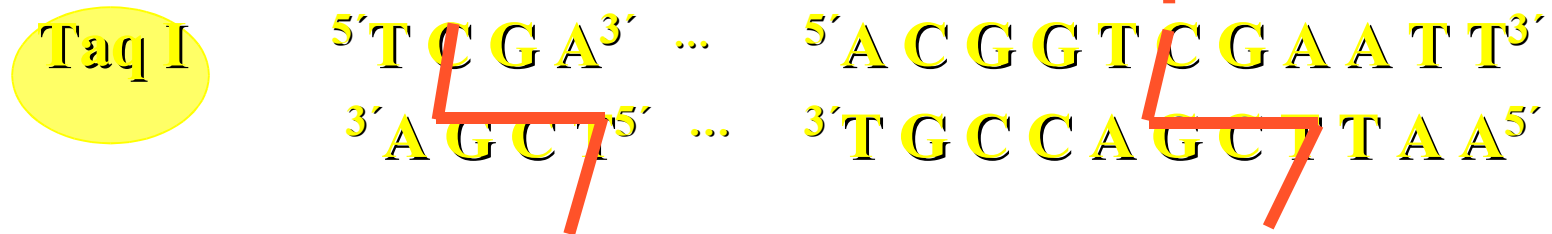
Clear

REBASE®  
Genomes

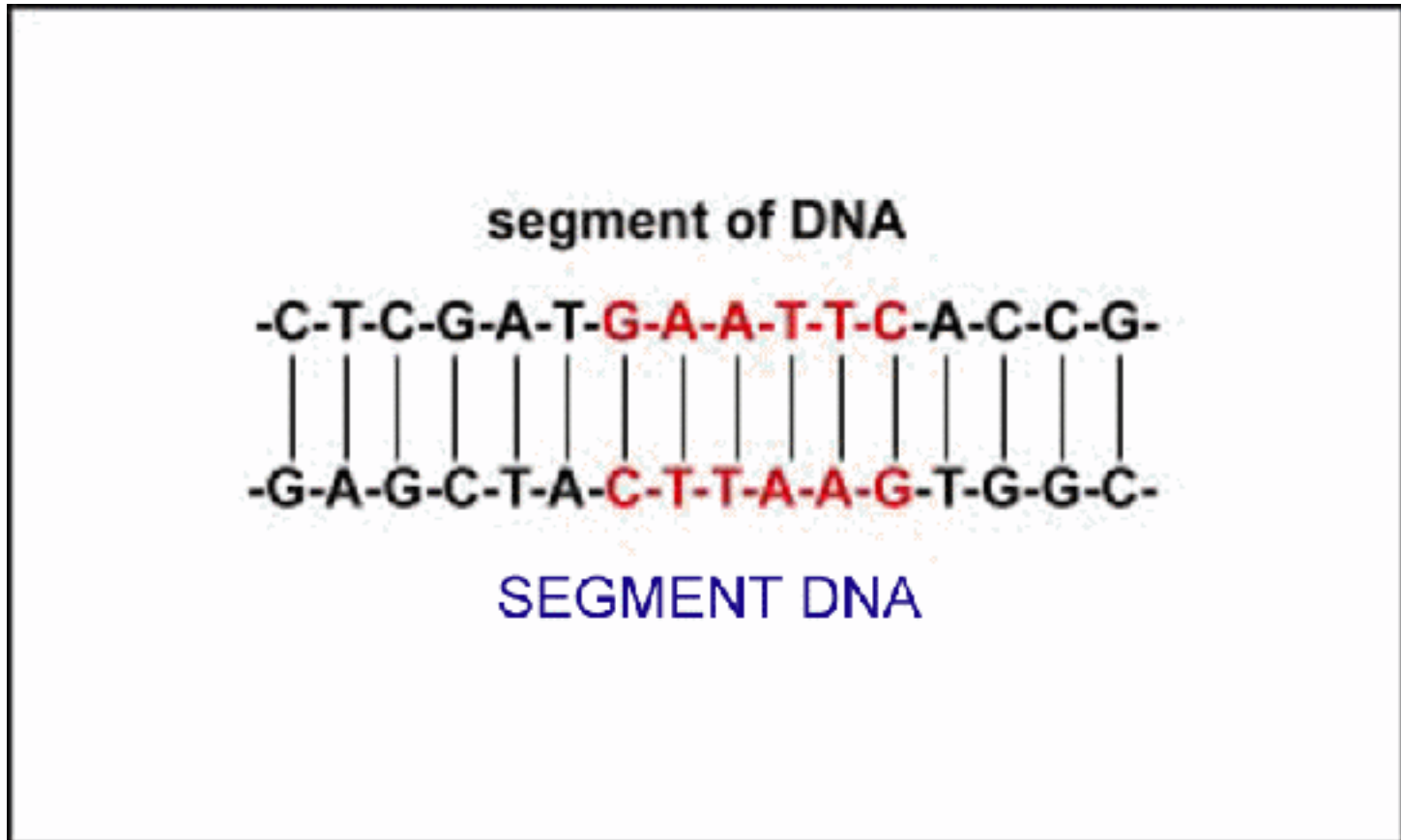
REBASE  
Crystal Data

Tools

# Každá restriktáza rozeznává specifickou sekvenci DNA, kterou štěpí – restriční místo



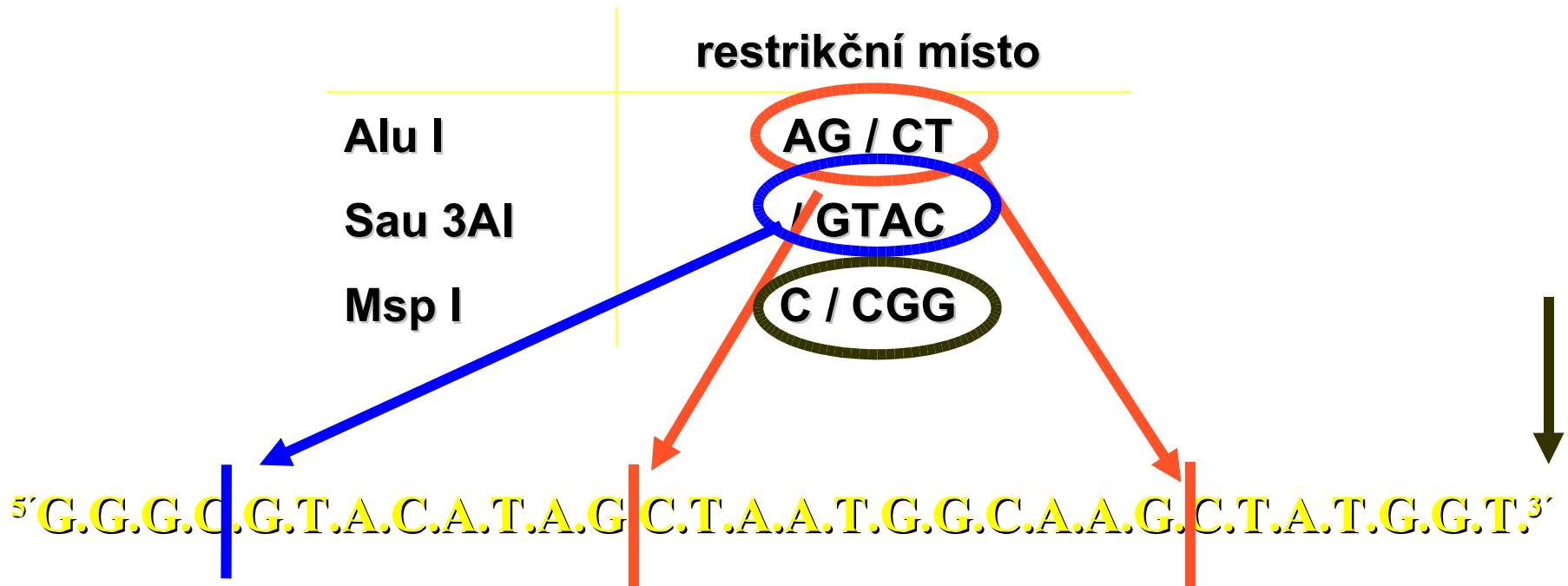
# Štěpení dsDNA restriční endonukleázou EcoRI



# Identifikace restrikčních míst

Úkol č. 1, str. 71

Najděte restrikční místa pro nabídnuté enzymy na uvedeném vlákně:



# Identifikace restričních míst

Úkol č. 1, str. 71

Najděte restriční místa pro nabídnuté enzymy na uvedeném vlákně:

	restriční místo	
Alu I	AG / CT	2x
Sau 3AI	/ GTAC	1x
Msp I	C / CGG	0

5'G.G.G.C.G.T.A.C.A.T.A.G.C.T.A.A.T.G.G.C.A.A.G.C.T.A.T.G.G.T.3'

# Identifikace restričních míst

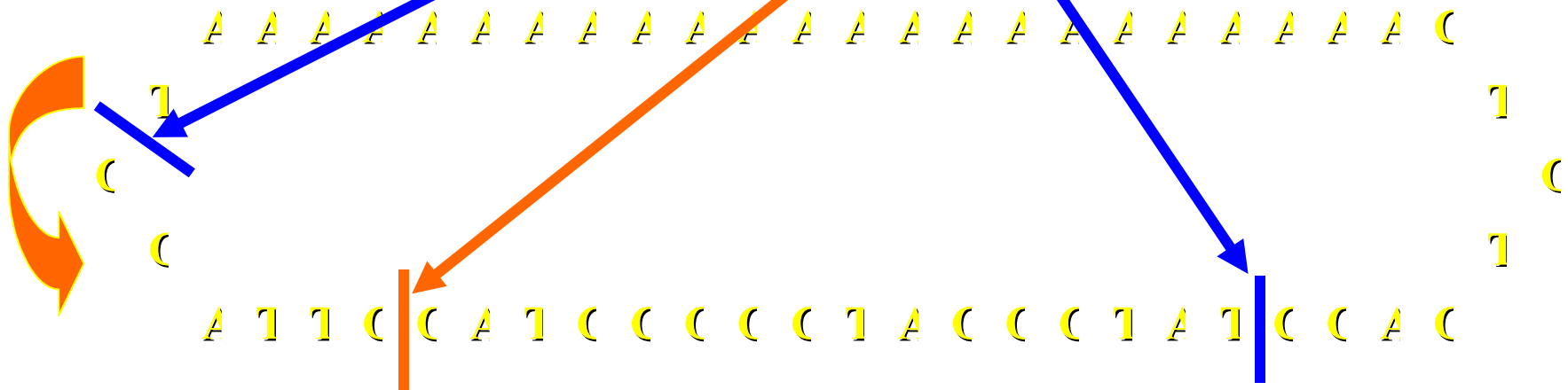
Úkol č. 2, str. 72

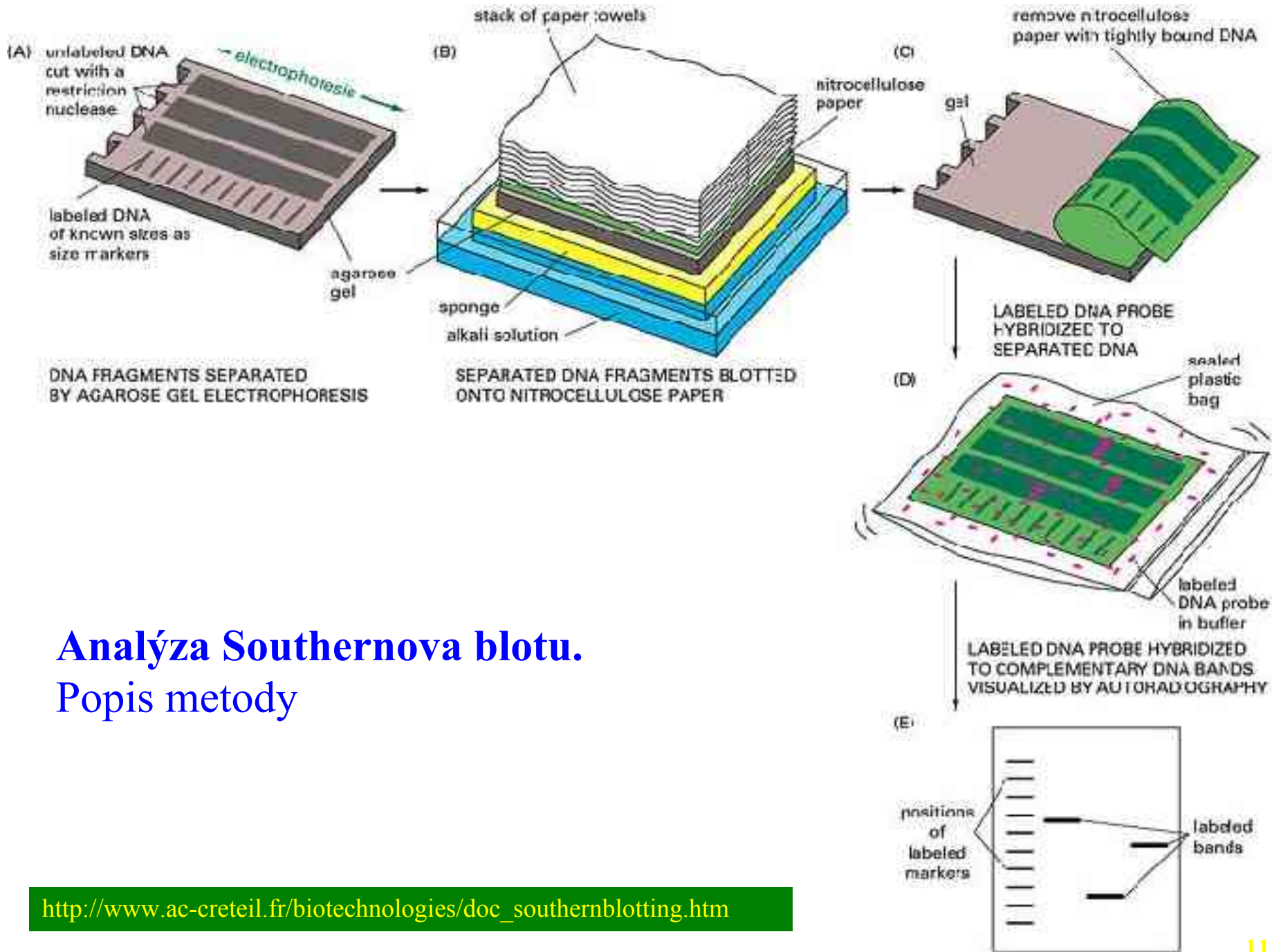
Kterou z nabízených restriktáz můžete použít :

a) pro linearizaci dané cirkulární struktury

b) pro vyštěpení takového úseku, aby obsahoval poly-A sekvenci.

	restriční místo	
Taq I	T / CCA	2 místa - vyštěpení
Pvu I	CGAT / CG	
Bam HI	G / GATCC	1 místo - linearizace





# Analýza Southernova blotu. Popis metody

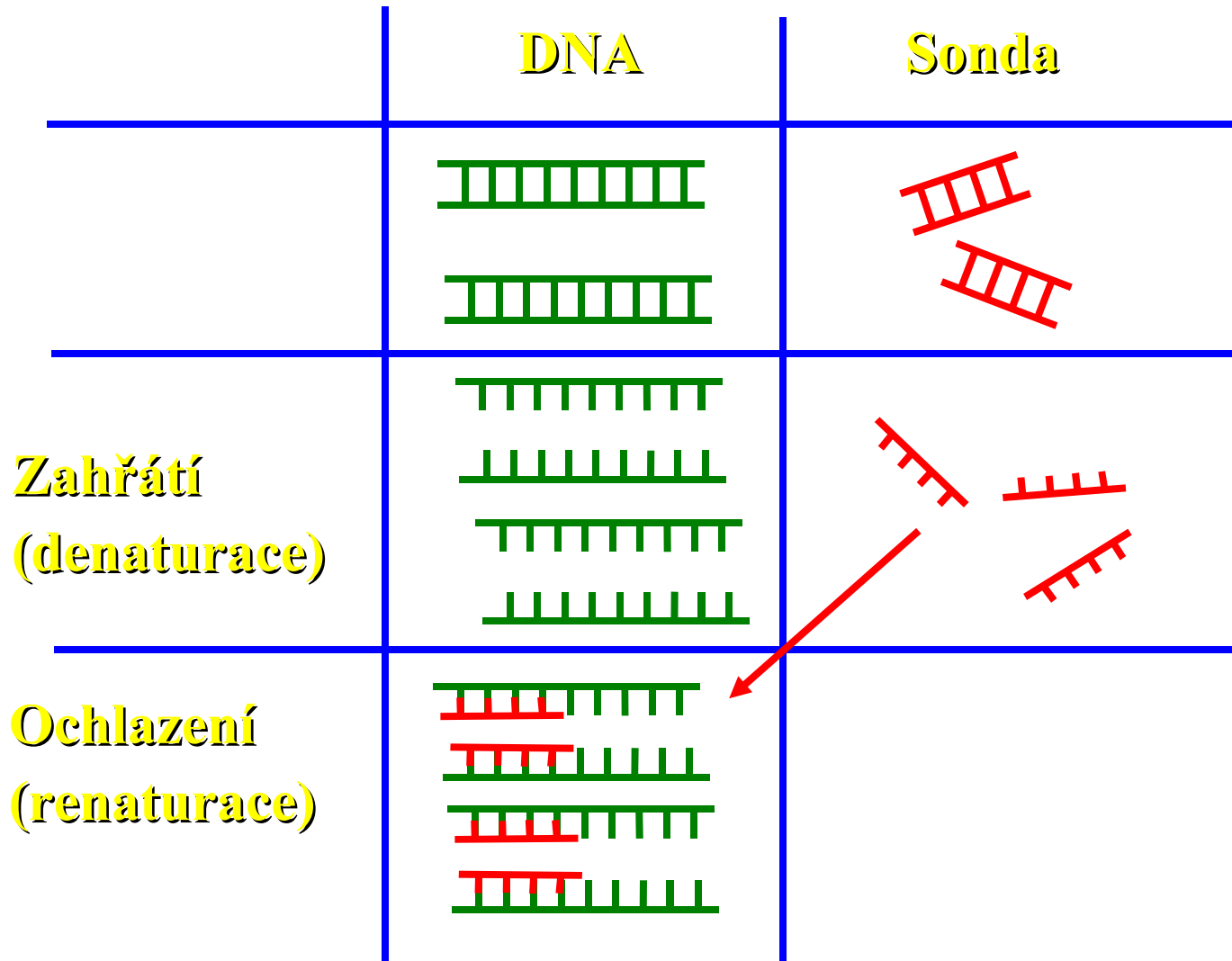
[http://www.ac-creteil.fr/biotechnologies/doc\\_southernblotting.htm](http://www.ac-creteil.fr/biotechnologies/doc_southernblotting.htm)



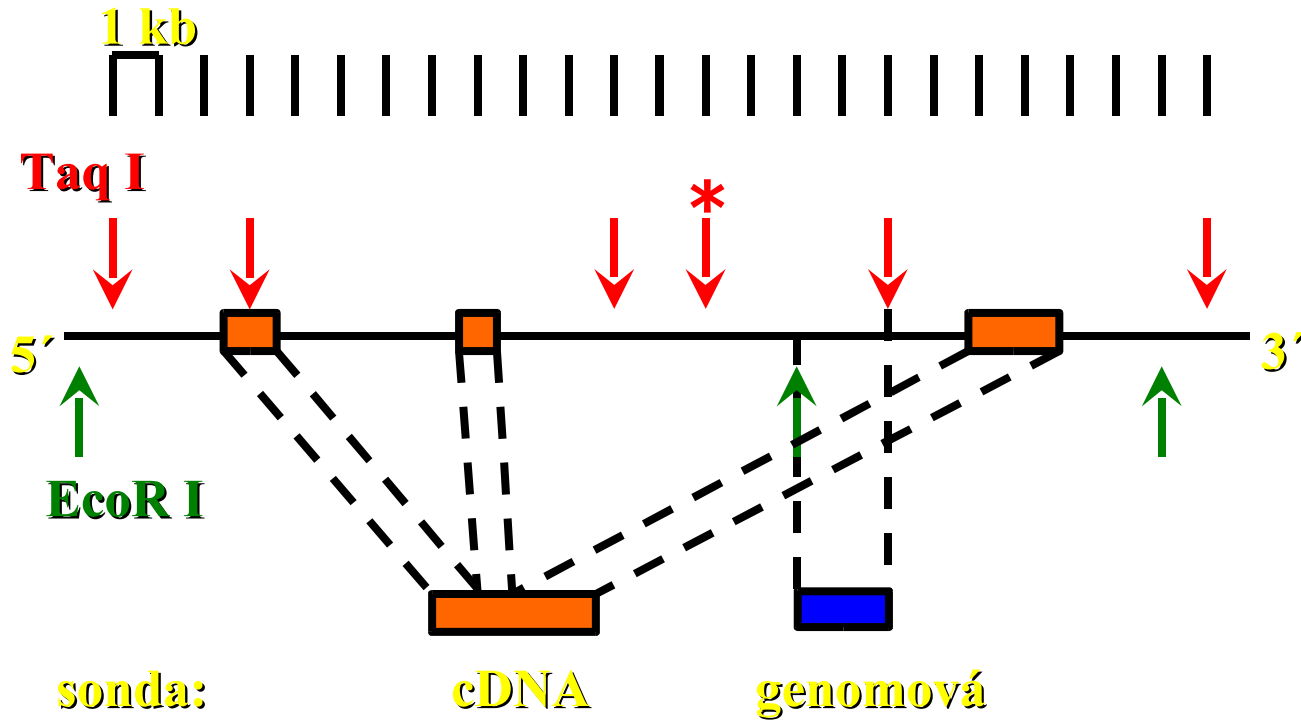
# **Southern blot – animace externí soubor**

<http://www.ac-creteil.fr/biotechnologies/main-biomol.htm>

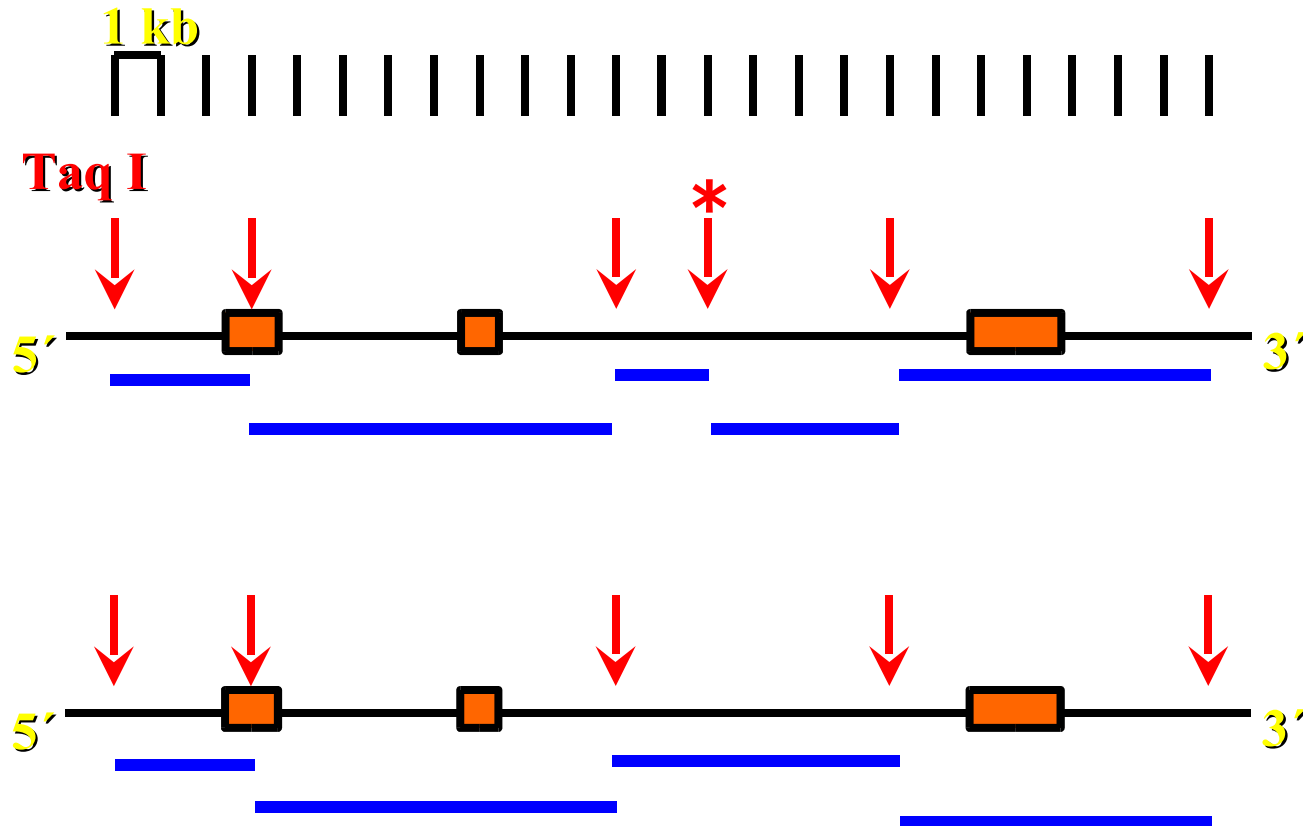
# Southern blot – hybridizace sondy



Úkol č. 4, str. 74 Gen G



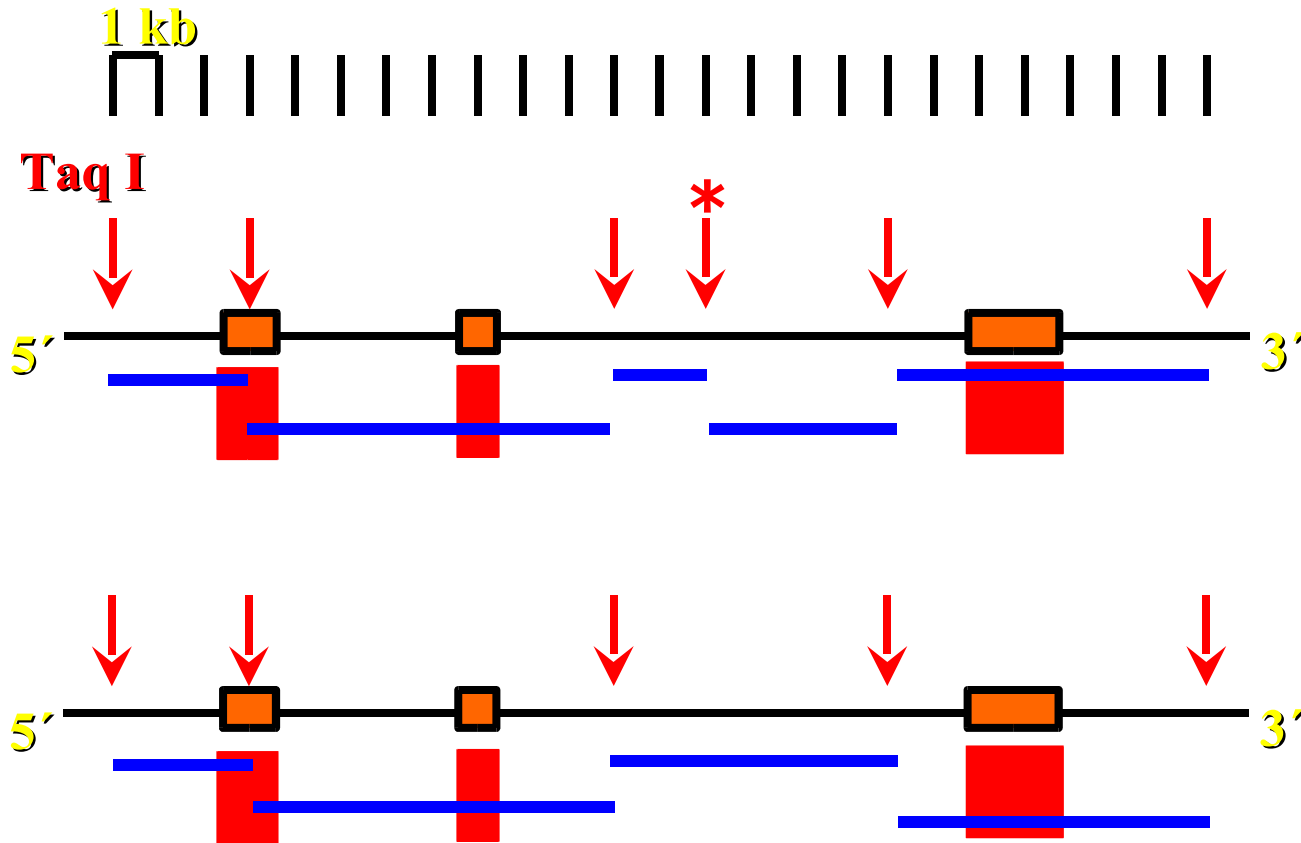
# Úkol č. 4a, str. 74 Gen G – prosté štěpení



Výsledky:

a) na 4 nebo 5 fragmentů: 3kb, 8kb, 6kb/2kb+4kb, 7kb

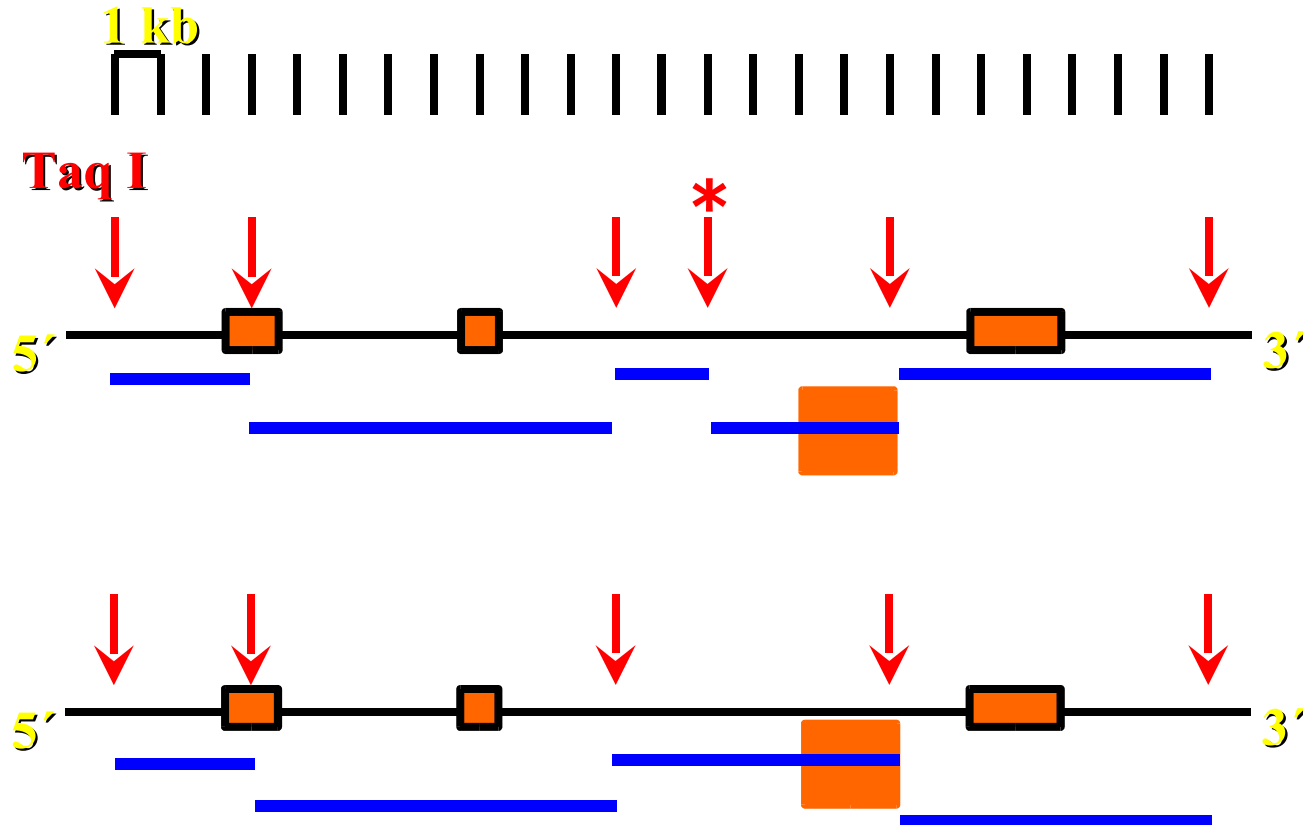
# Úkol č. 4b, c, str. 74 Gen G – Southern blot s cDNA sondou



Výsledky:      b) 3 fragmenty: 3kb, 8kb, 7kb      c) ne

Úkol č. 4d, str. 74 Gen G – Southern blot s genomickou sondou

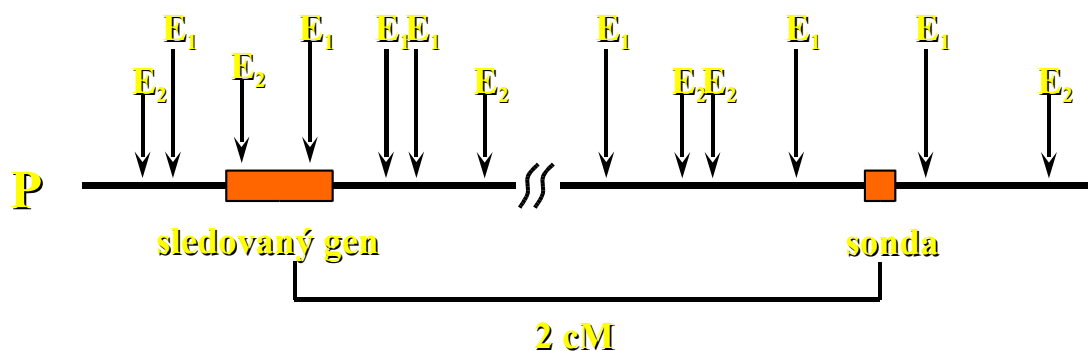
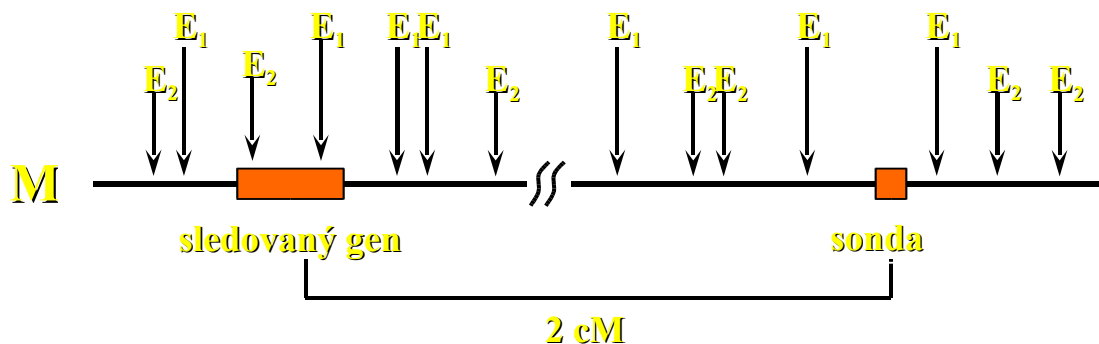
sondou



Výsledky:

d) Ano 4kb (alela +) 6kb (alela -)

# Mimogenová sonda



E<sub>1</sub> – restriční endonukleáza 1

E<sub>2</sub> – restriční endonukleáza 2

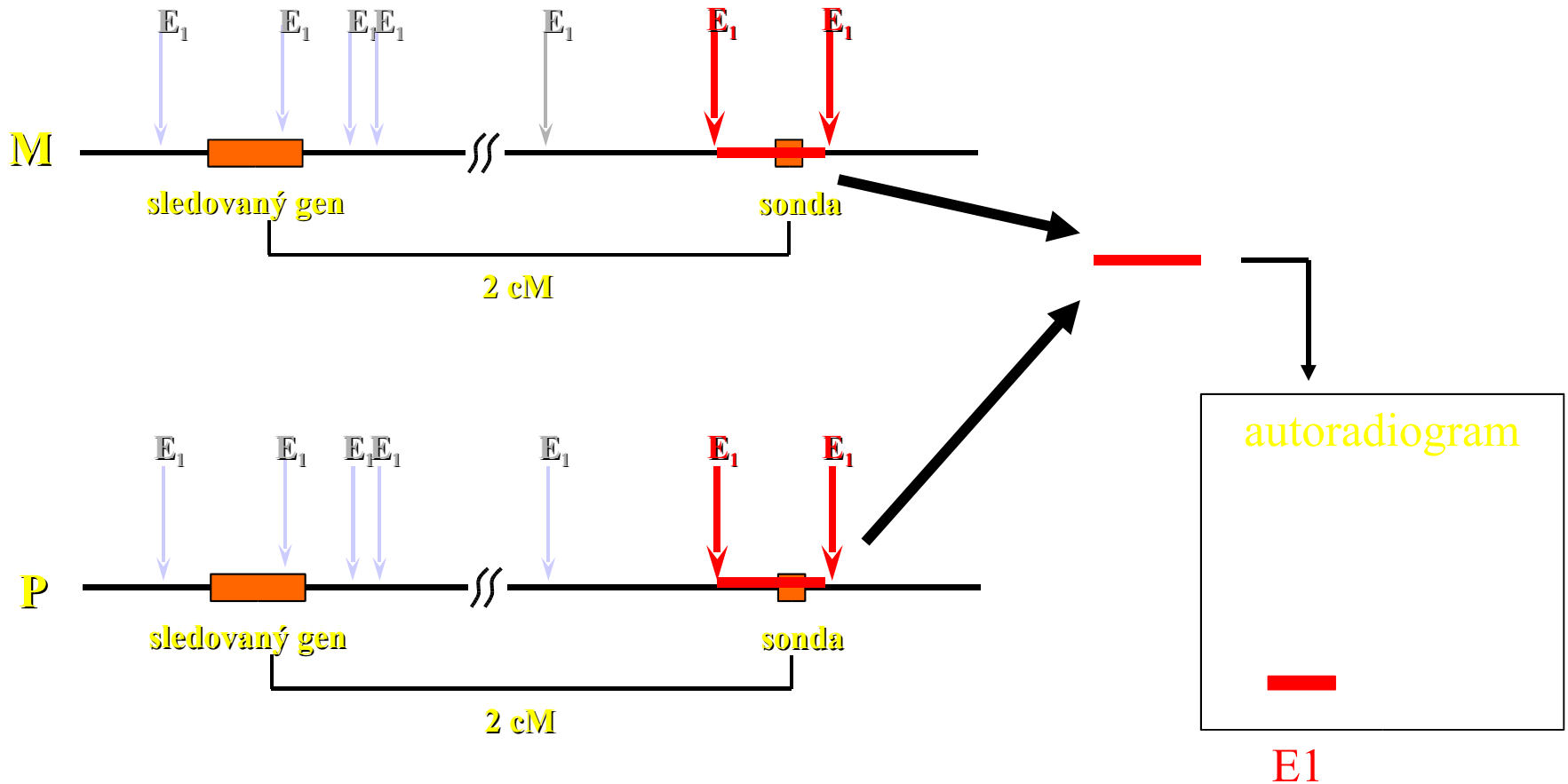
M – fragment maternálního chromosomu

P – fragment paternálního chromosomu

↓ - místa štěpení restriktázami (cílové sekvence)

2cM – vzdálenost sledovaným genem a místem, kde hybridizuje sonda, resp. místem restrikce

# Mimogenová sonda – štěpení restriktázou E1

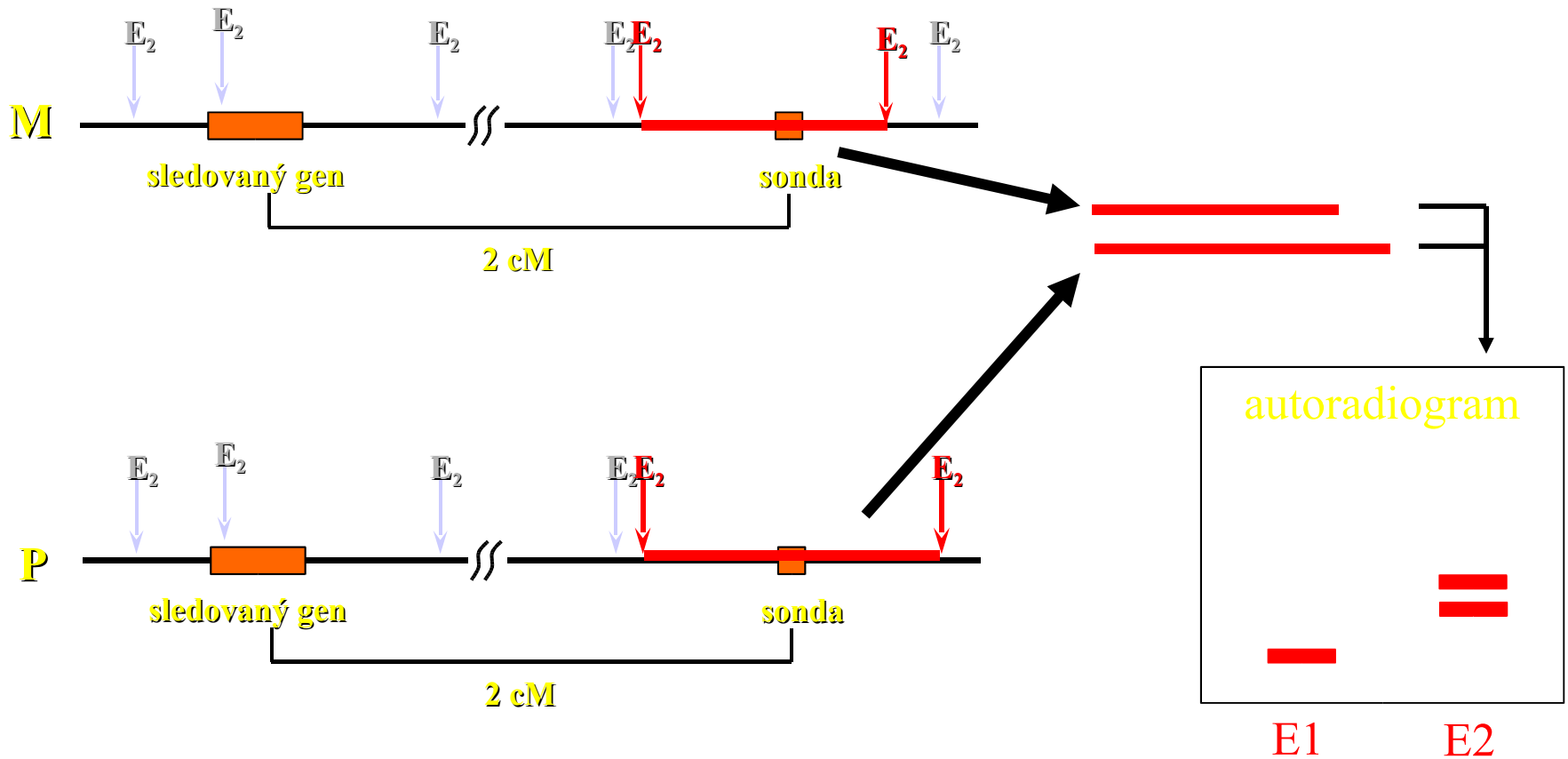


Ačkoli restriktáza E1 bude štěpit DNA ve všech restričních místech, na autoradiogramu detekujeme jenom fragmenty, na které hybridizovala sonda, a ty jsou u obou chromozómů stejně dlouhé –

jedinec je **homozygot** v délce restričních fragmentů.

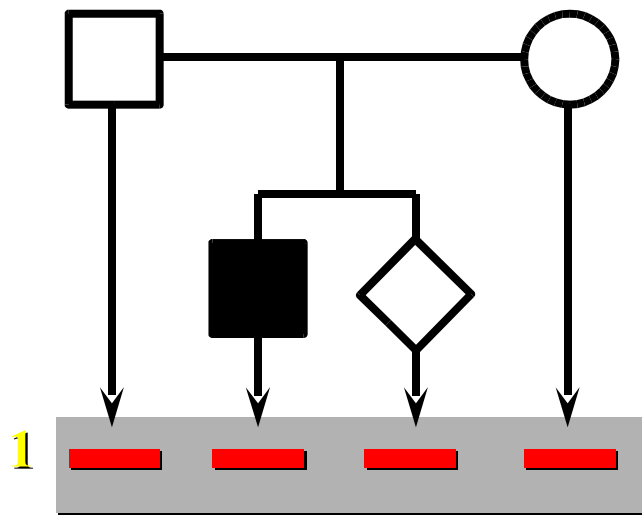


# Mimogenová sonda – štěpení restriktázou E2

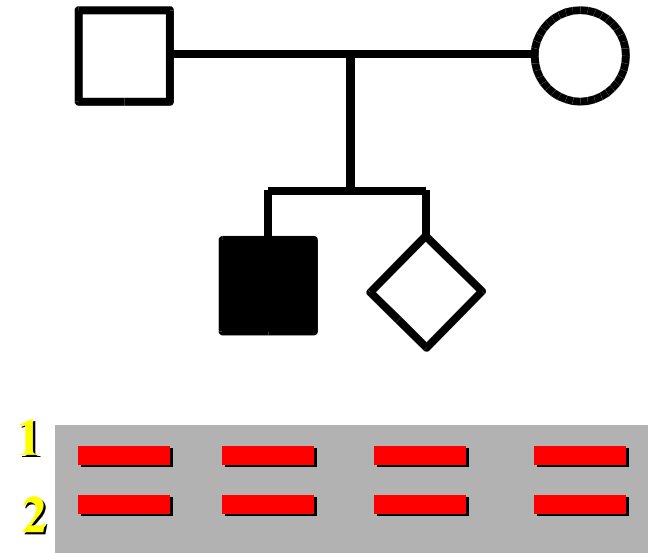


Ačkoli restriktáza E2 bude štěpit DNA ve všech restričních místech, na autoradiogramu detekujeme jenom fragmenty, na které hybridizovala sonda, a fragment vyštěpený z maternálního chromozómu je kratší –

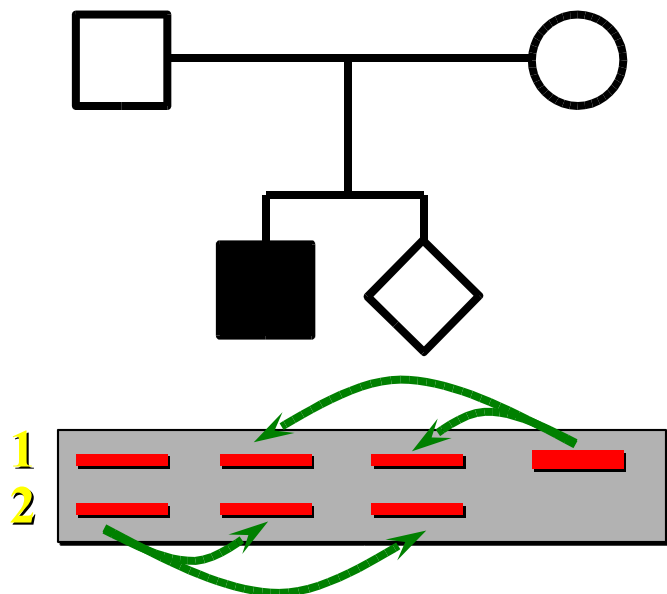
jedinec je **heterozygot** v délce restričních fragmentů.



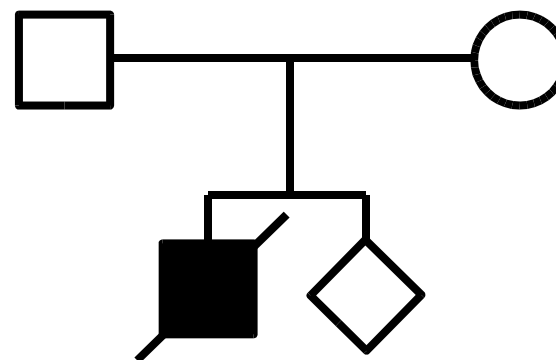
Rodina je tzv. **neinformativní**. Všichni jsou homozygoti v délce restričních fragmentů. (Rodiče heterozygoti ve sledovaném genu). Nevíme však, který fragment 1 předali, zda s mutovanou nebo zdravou alelou.



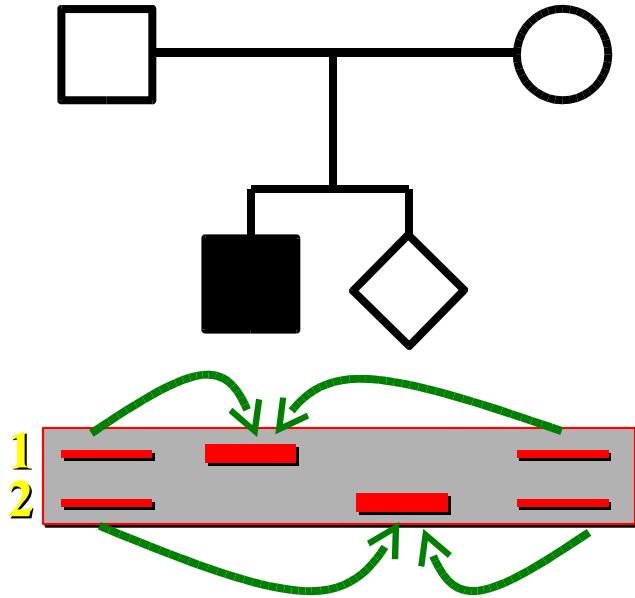
Rodina je jen částečně informativní, protože nelze rozhodnout, se kterým fragmentem je ve vazbě mutovaná alela u otce a matky. Nicméně, druhý potomek je homozygot AA nebo aa.



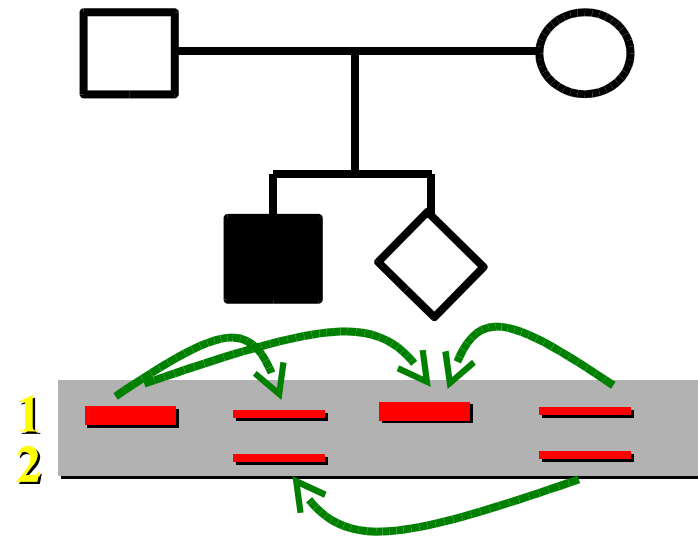
Z otcovy strany fragment 2 ve vazbě s mutovanou alelou, protože postižený syn má fragment 2 od otce. Matka je totiž homozygot (1,1) a tudíž předává potomkům pouze fragmenty 1. Nelze ale rozhodnout, zda druhému dítěti předala fragment se zdravou nebo mutovanou alelou. Druhé dítě bude buď v 50% postiženo nebo v 50% přenašeč.



Zde nebude analýza úspěšná, chybí-li DNA zemřelého syna. Riziko 25%. Rodiče jsou heterozygoti – měli postižené dítě AR chorobou

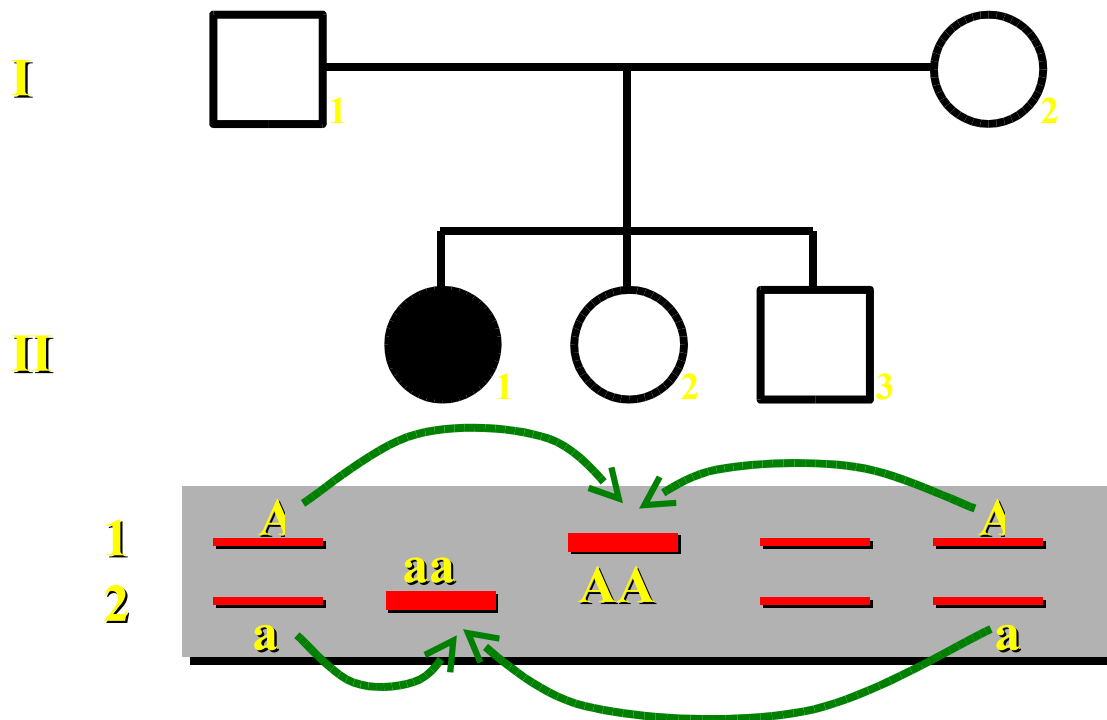


Postižený syn je homozygot v délce restrikčních fragmentů (1,1). Z toho plyne, že fragmenty 1 jsou u obou rodičů ve vazbě s mutovanou alelou. Jestliže druhé dítě je homozygot (2,2), znamená to, že bude zdravý homozygot ve sledovaném genu.



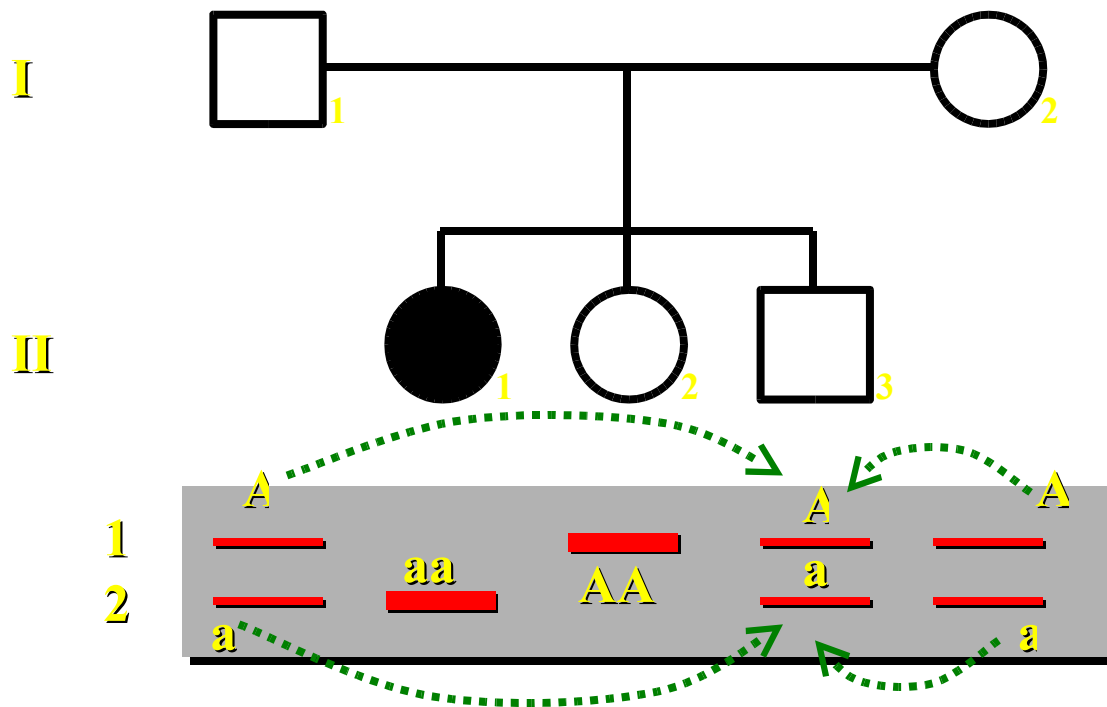
Otec (1,1), matka (1,2), postižený syn (1,2) musí mít fragment 1 od otce a od matky fragment 2, který je ve vazbě s mutovanou alelou. Druhé dítě (1,1) má od matky fragment 1, který nese zdravou alelu a od otce také fragment 1, ale nevíme, zda s mutovanou nebo zdravou alelou. Prognóza: 50% heterozygot, 50% zdravý homozygot ve sledovaném genu - fenotypově zdravé.

## Úkol č. 1a, str. 80



Jsou jedinci II/2 a II/3 heterozygoti pro mutovanou alelu sledovaného AR onemocnění? (vazba úplná)

## Úkol č. 1a, str. 80

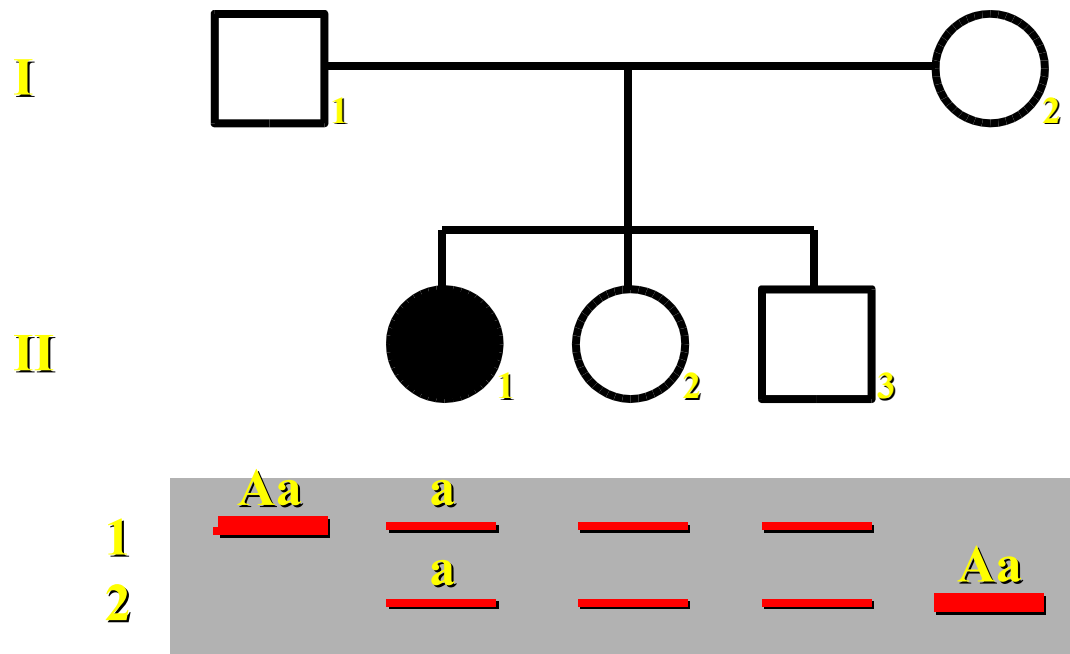


Jsou jedinci II/2 a II/3 heterozygoti pro mutovanou alelu sledovaného AR onemocnění? (vazba úplná)

II/2 ne

II/3 ano

## Úkol č. 1b, str. 81



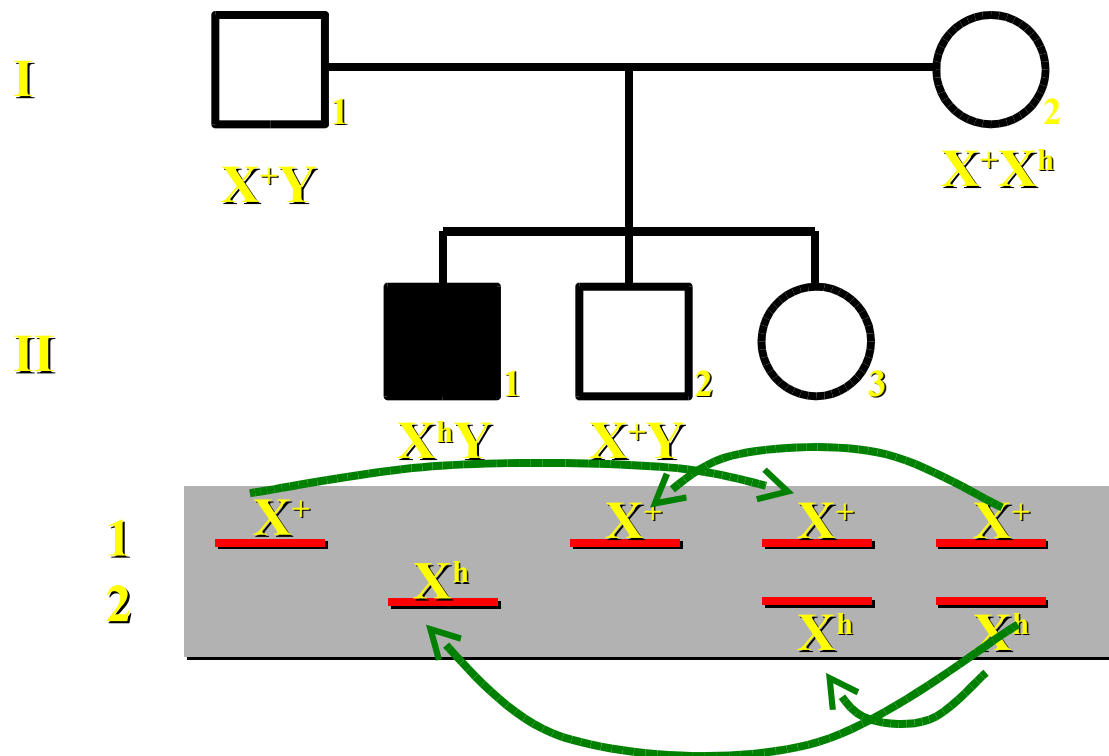
Jsou jedinci II/2 a II/3 heterozygoti pro mutovanou alelu sledovaného AR onemocnění? (vazba úplná)

II/2 AA nebo Aa

II/3 AA nebo Aa

Vyšetření je neúspěšné (neinformativní z hlediska určení heterozygocie jedinců II/2 a II/3).

## Úkol č. 1c, str. 81

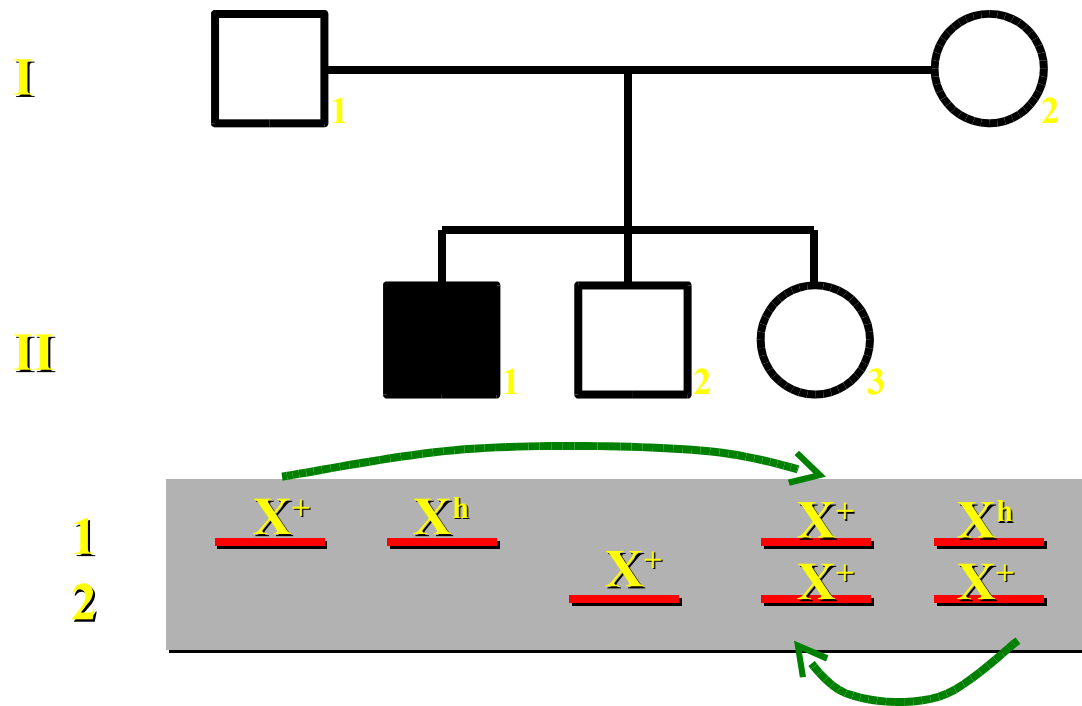


Je dcera II/3 přenašečkou (heterozygot) pro mutovanou alelu sledovaného GR onemocnění? (vazba úplná)

II/3 ano



# Úkol č. 1d, str. 81



Je dcera II/3 přenašečkou (heterozygot) pro mutovanou alelu sledovaného GR onemocnění? (vazba úplná)

II/3 ne