



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



**Zpráva o řešení projektu reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16\_015/0002362 za období 022020 - 042020**

Autor: kolektiv autorů pod vedením prof. MUDr. Petra Zacha, CSc. z Ústavu Anatomie 3. LF UK

**Příloha 2**

# DNA PRAKTIKA – MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE 2020

## **ČÁST DRUHÁ**

# Pokračování analýzy mutací v genu pro hemochromatózu (HFE gen)

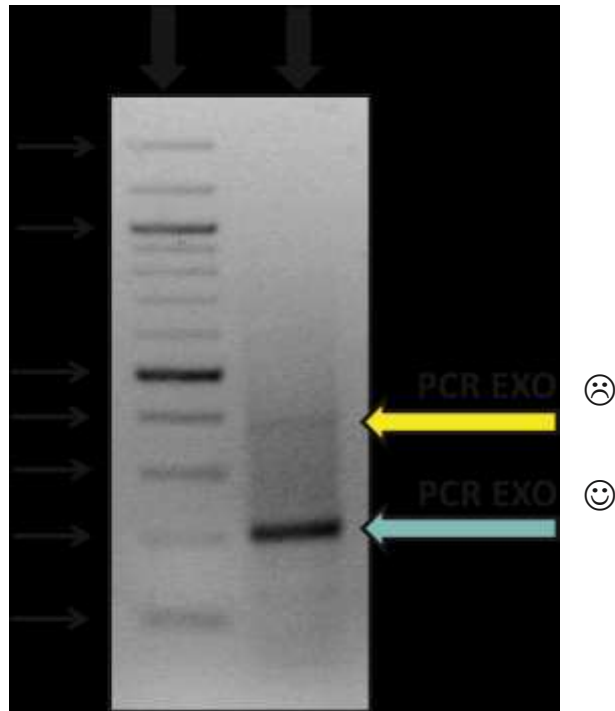
## Následná analýza PCR produktu STRUKTURA GENU HFE



# 1) Obecná PCR:

## Amplifikovaná DNA (2020)

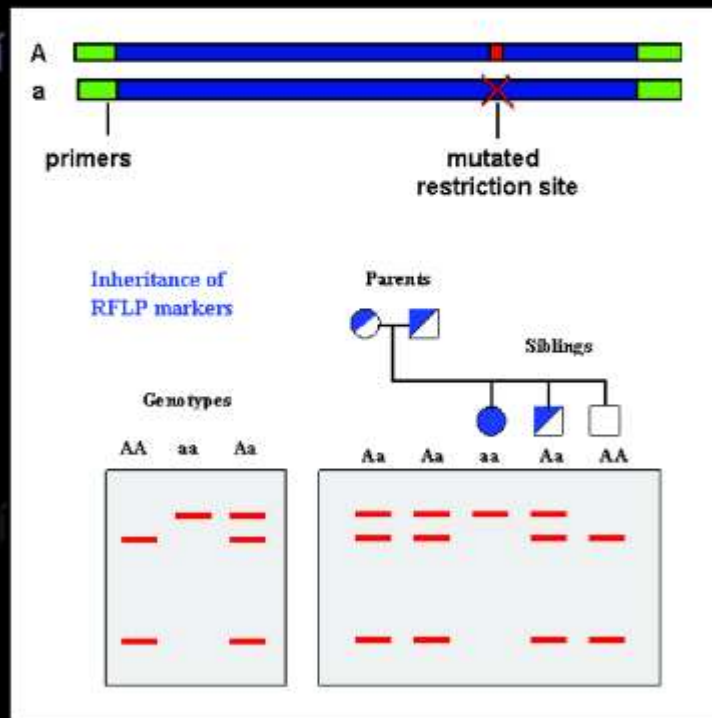
Verifikace PCR pomocí gelové elektroforézy  
(mutace H63D, C282Y)



## 2) RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů:

Restrikční analýza DNA pomocí jejího štěpení restrikčními endonukleázami (RE) ve specifických restrikčních místech

Pokud sekvenční diference (polymorfismus, mutace) vytváří nebo ruší specifické místo pro RE, vznikají po restrikci fragmenty odlišných velikostí



## Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

- **Restrikční endonukleázy (RE)**
  - známo asi 2100 bakteriálních RE
  - RE rozpoznávají různě krátké sekvence nukleotidů (4,6,8), ve kterých pak štěpí kovalentní fosfodiesterové vazby

## Princip analýzy

- výchozí DNA (genomická DNA, PCR produkt)
- štěpení restrikním enzymem na fragmenty různých velikostí
- elektroforetická separace fragmentů

## Sekvence amplifikované DNA pro analýzu mutace **C282Y**

místo štěpení mutací vzniká

Zdravá sekvence = bez štěpení

```
5' - TGGCAAGGGTAAACAGATCCcctccctccatctctctctctctctgcaagtgccctctctctctctctggaaggcgacacatcatgtgacctcca  
gtgacacactacgggtgctgggcttgaactactaccocagaaacacaccatgaagtgccctgaaggataaagcagcccaatggatgccaaaggatctggaac  
ctaaagacgtattgcccaatggggatgggacctaccagggctggataacctggcGTACccctgggggaagagccagagatataGTACcaggtgg  
agcaccagggctggatcagccctcattgtgatctggggtaigtgactgaltgagagccaggagctgagaaaatctattggGGTTGAGAGGAGTGC  
CTGAGaggtaeltatggcagtgagatgaggatctgctcttctttagggggctgggctgagggctggcaatcuaagggctttaaacttgcctttctglttaagccctca  
ccgtctggcaccctagtcattggagtcatacagtgga 3'
```

restrikní místo pro restrikní endonukleázu *RsaI*

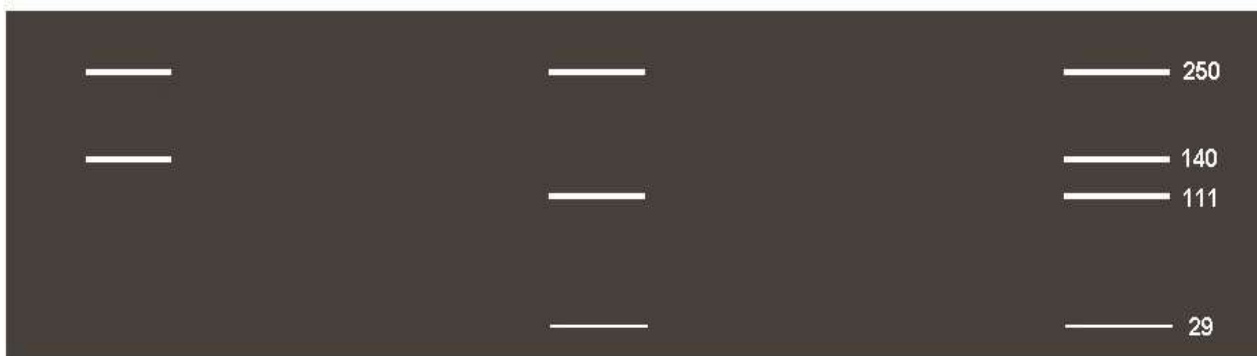
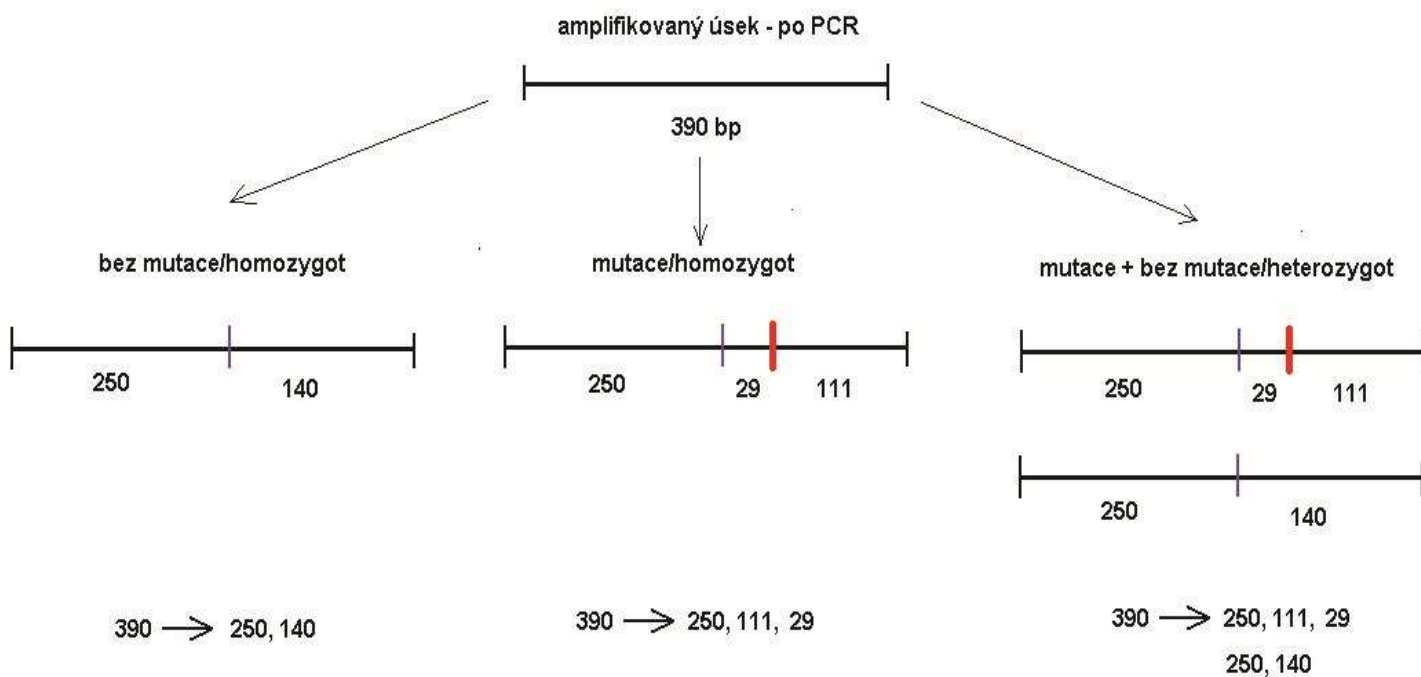
Mutovaná sekvence = štěpení

Zdravá sekvence

Mutovaná sekvence

5' - GTGC - 3'  
3' - CACG - 5'

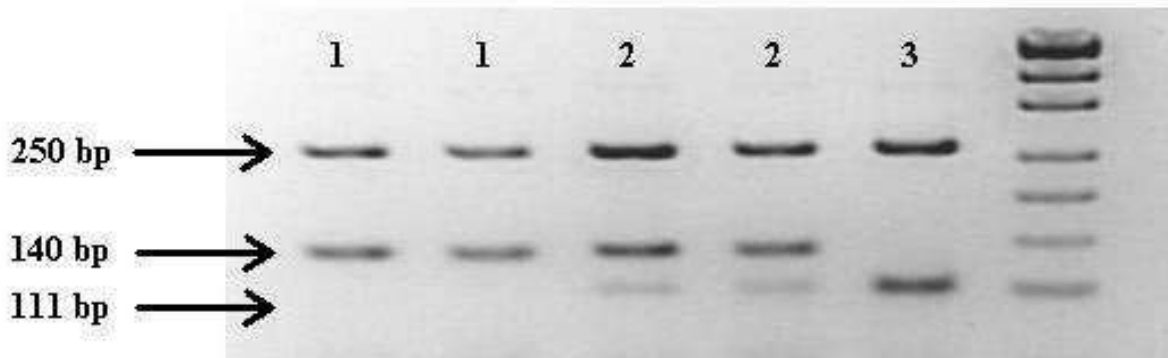
5' - GTAC - 3'  
3' - CATG - 5'



## Vyhodnocení gelové elektroforézy po restriční analýze

## Mutace C282Y (v bp)

Zdravý jedinec :	250	140	
Homozygotní stav :	250		111
Heterozygotní stav :	250	140	111



1 - bez mutace, 2 - heterozygot C282Y, 3 - homozygot C282Y





# Sekvence amplifikované DNA pro analýzu mutace H63D

místo štěpení mutací zaniká

Zdravá sekvence  
= štěpení

```
5' - ca g a c a t a g g c t g a l g g t a t g a g t t g a t g c a g g t g t g t g g a g o d t c a a c a l c o t g t d t o o c t o c t a c t a c ACATGGTTAAGGCCTGTTGC t d  
g t d c c a g g t t a c a c t d t d g c a c t a c o c t c t c a t g g g t g c c t c a g a g c o g g a c t t g g t c t t c t t g t t g a a g c t t t g g g c t a c g t g g a l g a c c a g e t g t c g t g t t c  
t t TGATCA g a g a g t g c c c g t g t g a g c o d e g a a c t c c a l g g g t t c c a g t a c AATTTCAAGCCAGATGTGGC t g c a p c t g a g t c a g a g t e g  
a a a g g g t g g s t c e a t g t t c a d t g t g a c t t c t g g a c t a t a t g g a u a t c a c a u c c a c u g c a a g g g 3'
```

Mutovaná sekvence  
= bez štěpení

restrikční místo pro restriktázu *BclI*

Zdravá sekvence

5' - **TGATCA** - 3'  
3' - **ACTAGT** - 5'

Mutovaná sekvence

5' - **TGATGA** - 3'  
3' - **ACTACT** - 5'

Vyhodnocení gelové elektroforézy po restriktční analýze

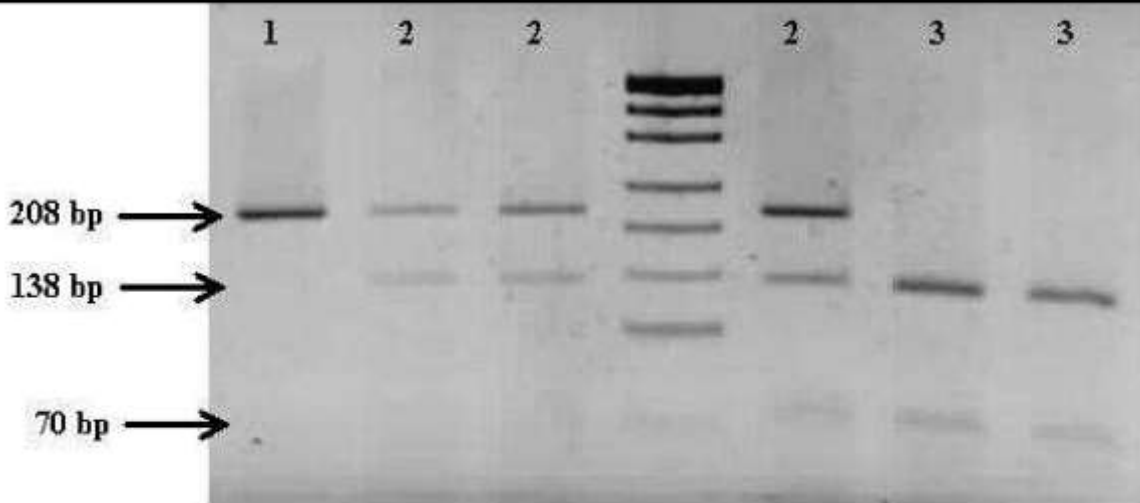
## Mutace H63D (v bp)

Nenaštěpená DNA: 208

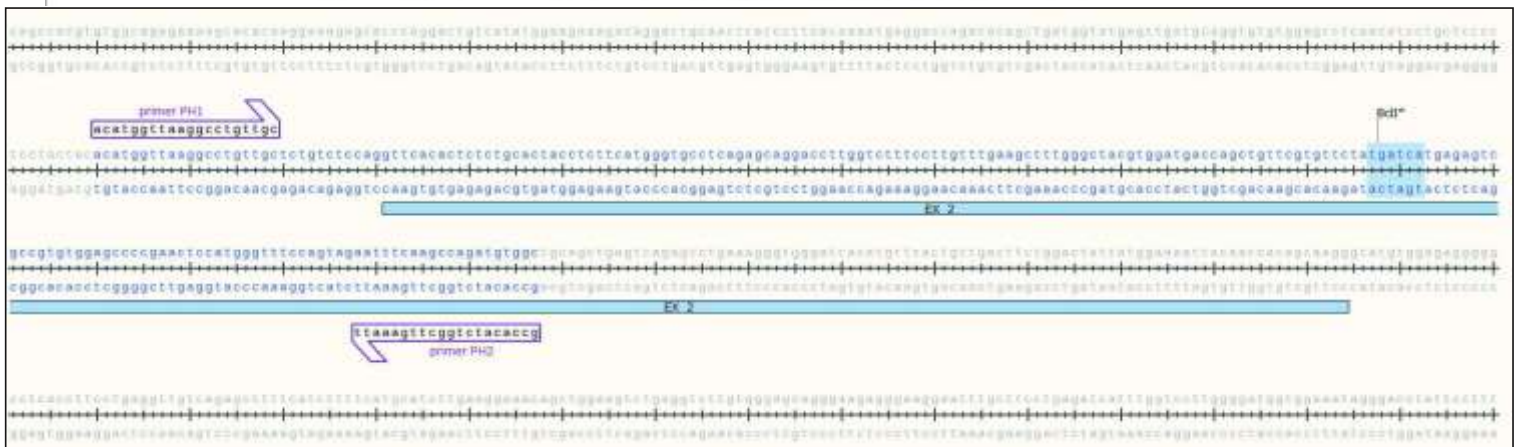
Zdravý jedinec: 138 70

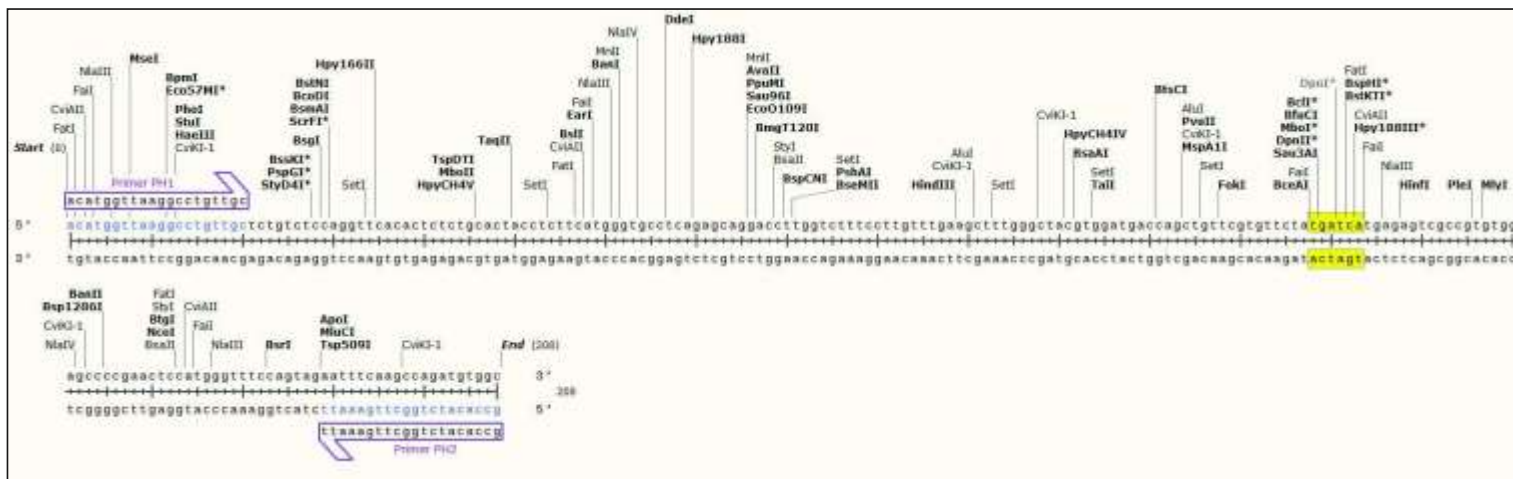
Homozygotní stav: 208

Heterozygotní stav: 208 138 70

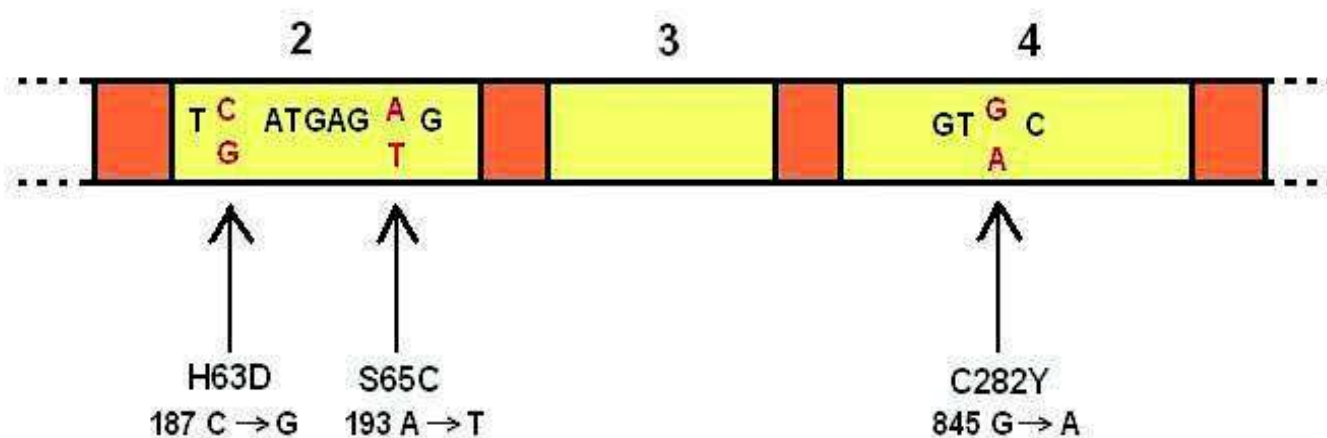


1 - homozygot H63D, 2 - heterozygot H63D, 3 - bez mutace





# Mutate HFE genu



**ANALÝZA PCR PRODUKTU HFE GENU – METODA RFLP**  
 Detekce mutace v PCR produktu HFE genu pomocí analýzy Polymorfismus délky restrikčních fragmentů.

Restrikční mix – na 1 vzorek

**Žlutá zkumavka (C282Y):**

voda	12.0 μl
pufr	1.4 μl
<b>žlutý</b> PCR produkt	7.0 μl
RE ( <i>RsaI</i> )	0.7 μl

**Modrá zkumavka (H63D):**

voda	12.0 μl
pufr	1.4 μl
<b>modrý</b> PCR produkt	7.0 μl
RE ( <i>BclI</i> )	0.7 μl

RE: restrikční endonukleáza

# CFTR gen: mutace delta F508

= delece fenylalaninu (508. AA v proteinovém řetězci)

## Normální DNA

DNA	5' ... AAT ATC ATC	<b>CTT</b>	GGT GTT ... 3'
Protein	Asn Ile Ile	<b>Phe</b>	Gly Val
Pozice	505 506 507	<b>508</b>	509 510

## Mutovaná DNA

DNA	5' ... AAT ATC	<b>AT - - - T</b>	GGT GTT ... 3'
DNA	5' ... AAT ATC	<b>ATT</b>	- GGT GTT ... 3'
Protein	Asn Ile Ile	-	Gly Val
Pozice	505 506 507	-	509 510

# Analýza mutace delta F508 v CFTR genu

## Alelově specifická PCR:

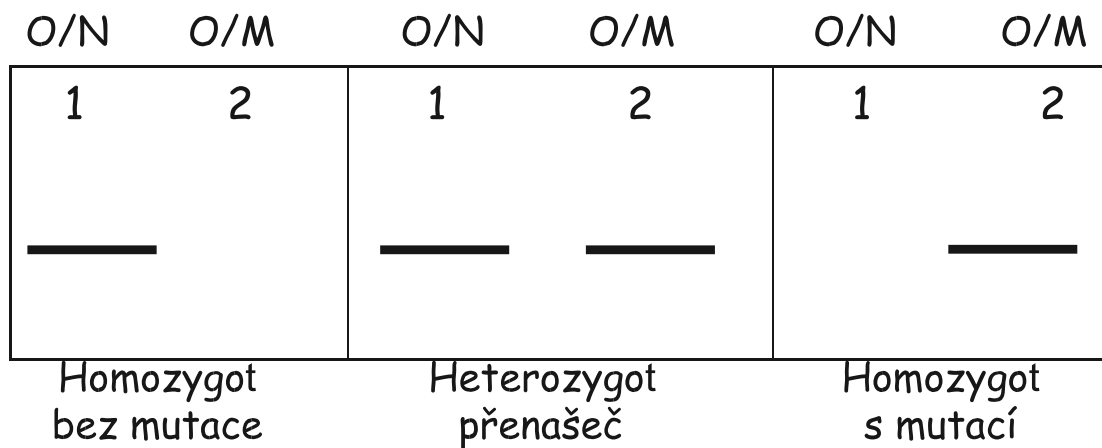
- Obecný primer (O)
- Specifický primer bez mutace (N)
- Specifický primer nesoucí mutaci (M)



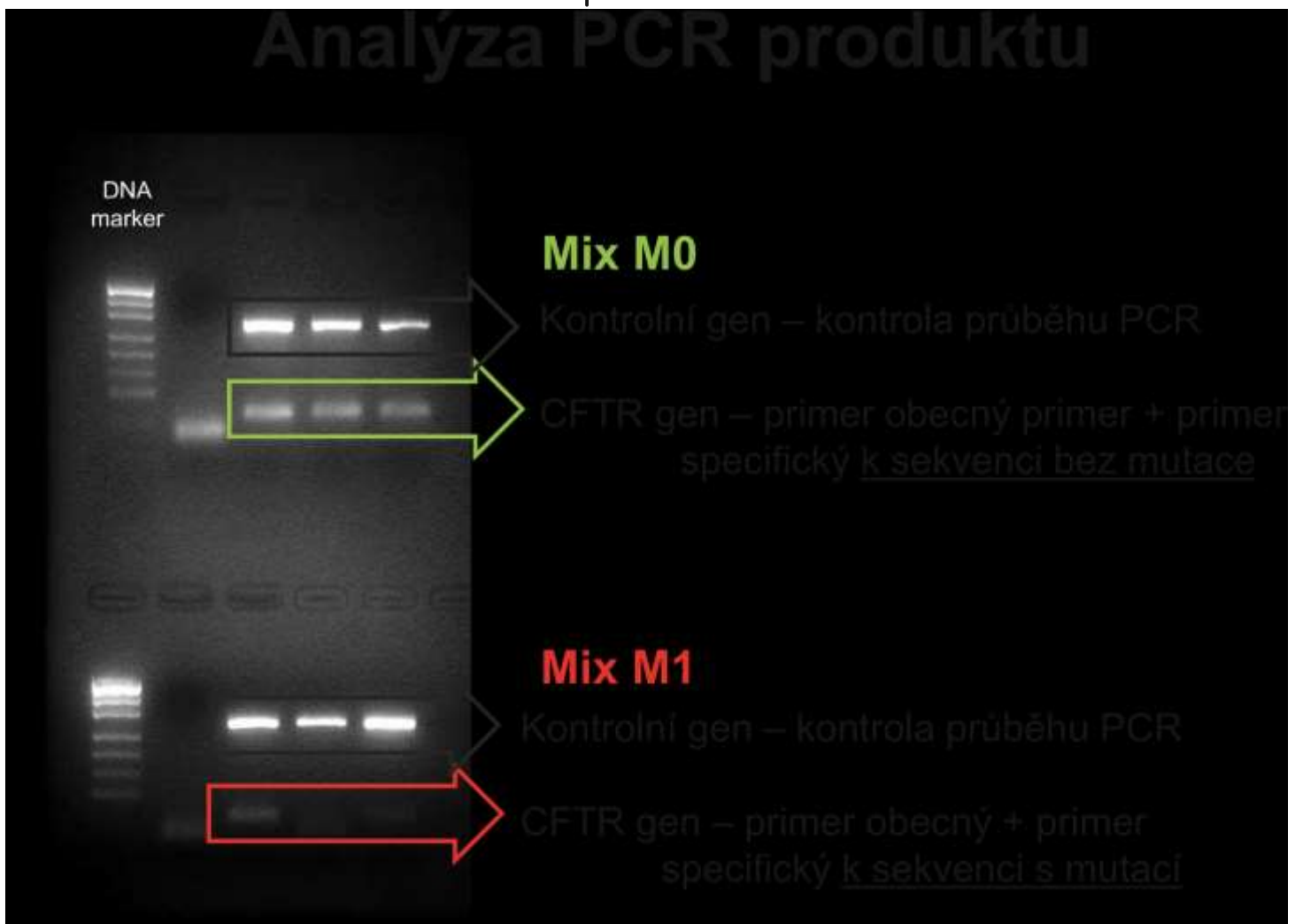
PCR reakce probíhá ve dvou zkumavkách:

PCR Mix 0 obsahuje primer obecný a „normální“ (N)

PCR Mix 1 obsahuje primer obecný a „mutovaný“ (M)



## Analyza PCR produktu





## Vyhodnocení výsledků analýzy CFTR genu

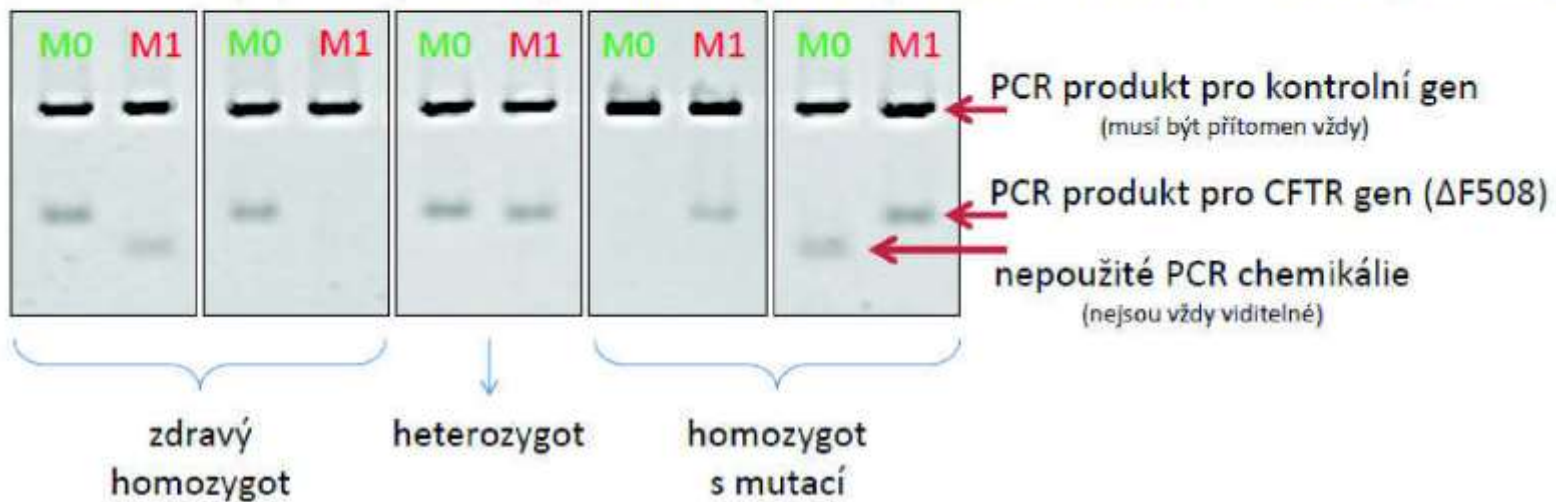
Analýza: Alelově specifická PCR + gelová elektroforéza

primery v PCR reakci se váží přímo na sekvenci, kterou hledáme (místo možné mutace)

**M0** – PCR reakce detekuje alelu bez mutace

**M1** – PCR reakce detekuje mutovanou alelu

- Výsledek (PCR produkt) pro CFTR gen pouze v **M0** = zdravý homozygot
- Výsledek (PCR produkt) pro CFTR gen v **M0 + M1** = heterozygot
- Výsledek (PCR produkt) pro CFTR gen pouze v **M1** = obecně homozygot s mutací, nicméně ve vašem případě se jedná o chybu vzniklou v průběhu práce (víme, že nikdo z vás není homozygot s mutací)





# Polymerázová řetězová reakce (PCR) – MUTACE $\Delta F508$ (CYSTICKÁ FIBRÓZA)

PCR MIX – na 1 vzorek

## PCR mix 0 (bez mutace):

voda	8.5 $\mu$ l
pufr	2.0 $\mu$ l
dNTP mix	4.0 $\mu$ l
Mg <sup>2+</sup>	2.0 $\mu$ l
primery <b>M0</b>	1.2 $\mu$ l
DNA	2.0 $\mu$ l

## PCR mix 1 (s mutací):

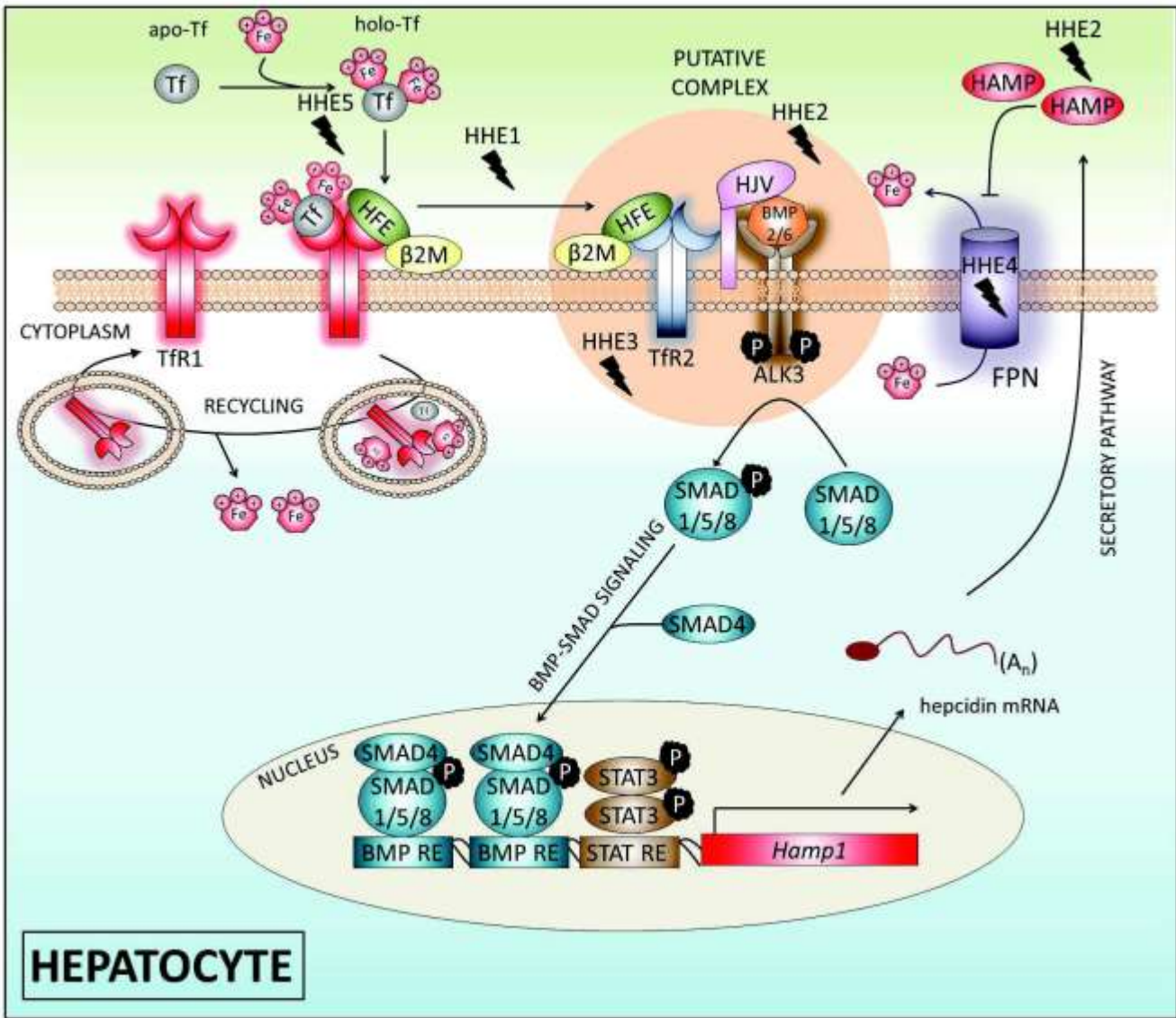
voda	8.5 $\mu$ l
pufr	2.0 $\mu$ l
dNTP mix	4.0 $\mu$ l
Mg <sup>2+</sup>	2.0 $\mu$ l
primery <b>M1</b>	1.2 $\mu$ l
DNA	2.0 $\mu$ l

*Taq polymeráza 0.4  $\mu$ l*  
*(na ledu)*

*Taq polymeráza 0.4  $\mu$ l*  
*(na ledu)*

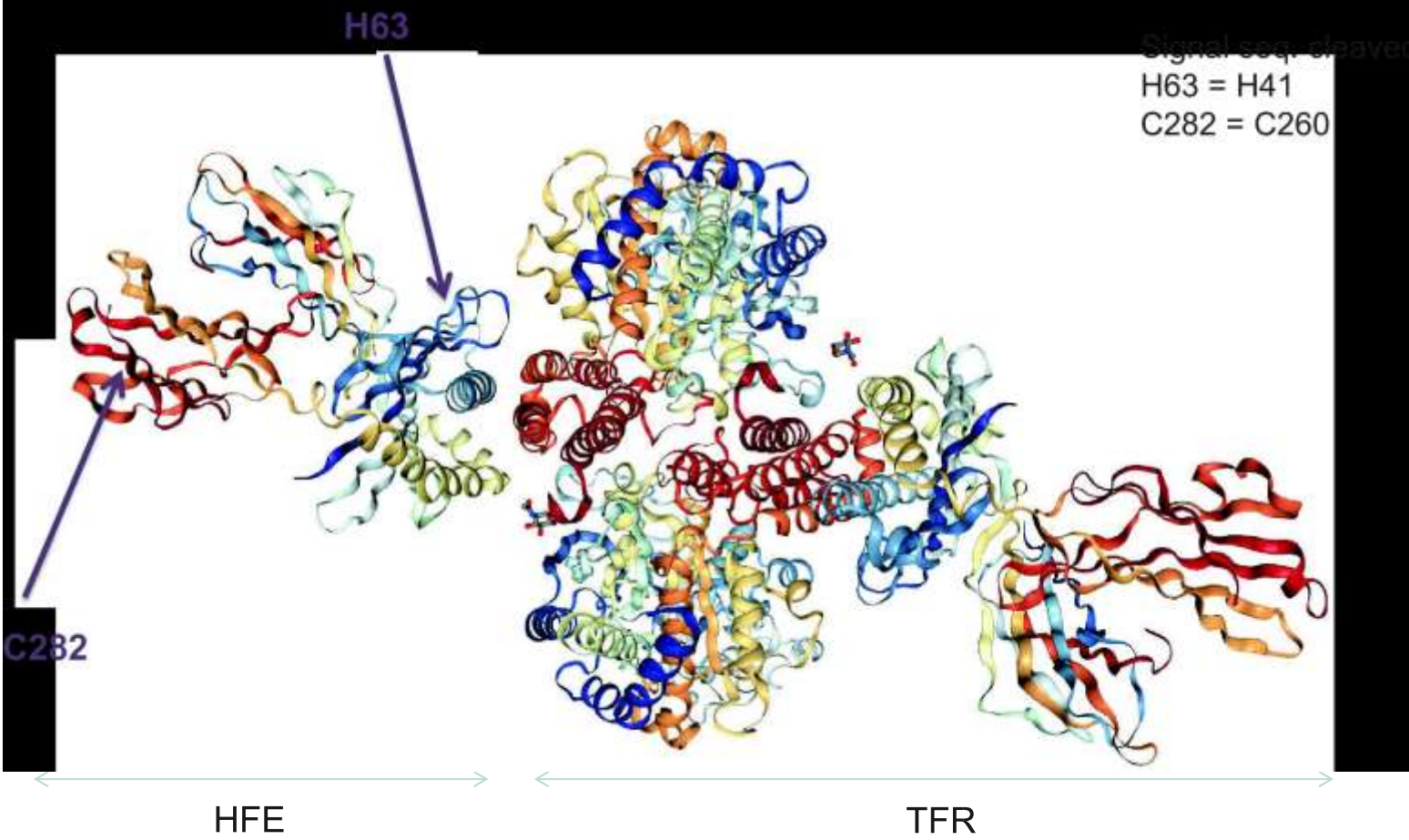
# HEMOCHROMATÓZA

- hereditární hemochromatóza - relativně časté dědičné onemocnění charakterizované vstřebáváním nadbytku železa, jeho ukládáním v orgánech a z toho pak rezultujícím poškozením organismu
- hepatopatie, diabetes mellitus, arthropatie, impotence, amenorhea, kardiomyopatie, endokrinní poruchy
- sérové železo, saturace transferinu, sérový ferritin, jaterní biopsie
- venepunkční terapie, desferrioxamin



HFE-TFR interaction model

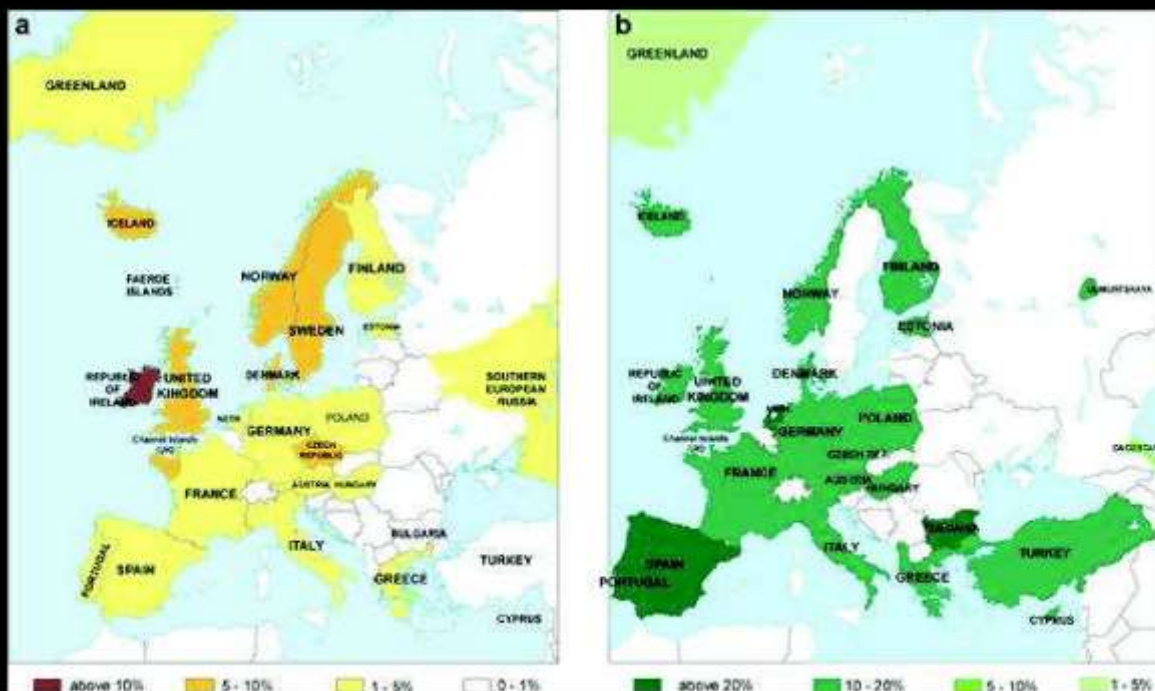
<http://www.rcsb.org/3d/view/1DE4/1>



# Výskyt HFE H63D, C282Y

C282Y – keltská, vikingská mutace  
Severní Evropa, ČR (8%  
heterozygoté)  
Mladší než H63D

H63D – starší mutace, v Evropě  
Holandsko, Bulharsko, Španělsko  
(Baskové!!), Portugalsko  
ČR – 2% homozygoté, 27%  
heterozygoté



DOI: 10.1007/s00439-004-1152-4



# Heterochromatóza u zvířat

*Diceros bicornis (nosorožec černý, africký)*

- Jediný druh nosorožce s SBT, projevy heterochromatózy v ZOO
- Opatrně krmít (jiné nosorožce krmít můžete)



*Tukaní, tapíři, jelen evropský...*



# Cystická fibrosa

- dědičné-autosomálně recesivní (AR) onemocnění
- závažná a chronicky progredující choroba
- střední délka života 36,8 let

## Multiorgánové postižení:

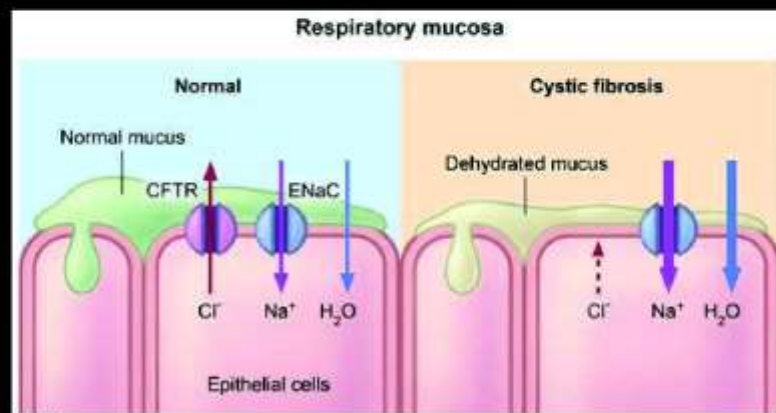
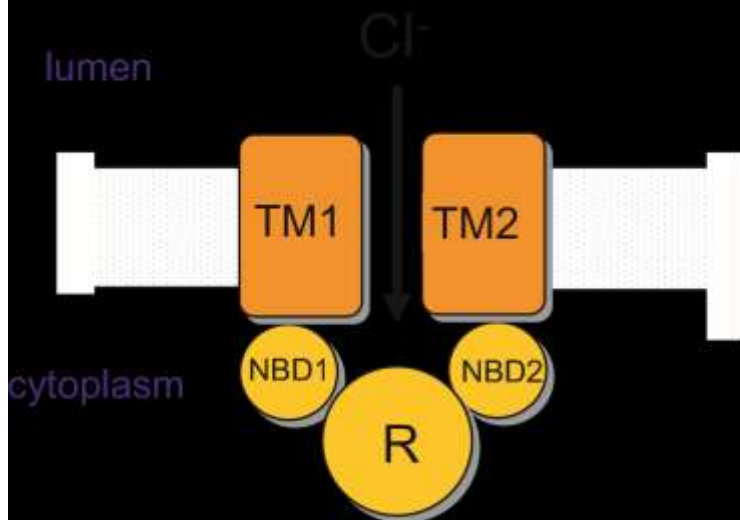
- Dýchací cesty: hustý hlen vede k obstrukci dýchacích cest, infekce a sekundární zánětlivý proces, progresivní destrukce plic.
- Pankreas: pankreatická insuficience, tuková a proteinová malabsorpce
- Játra: jaterní léze, fokální biliární cirhóza
- Intestinum: obstrukce střeva, *Meconiový illeus* (15-20% dětí)
- Reprodukční trakt: absence *vas deferens*, infertilita (95% mužů)
- Kůže: malfunkce potních žláz, zvýšený obsah soli v potu

# Příčina cystické fibrosy

- mutace v genu CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)

- CFTR kóduje chloridový kanál (1480 AA, 168kDa): transport  $\text{Cl}^-$  přes plasmatickou membránu epitelálních buněk výstelky dýchacích cest a jiných žláz

- cAMP regulovaný chloridový kanál



R-regulační doména (cAMP dep.)

TM – transmembránové domény

NBD-nukleotid-vázající domény (ATP)

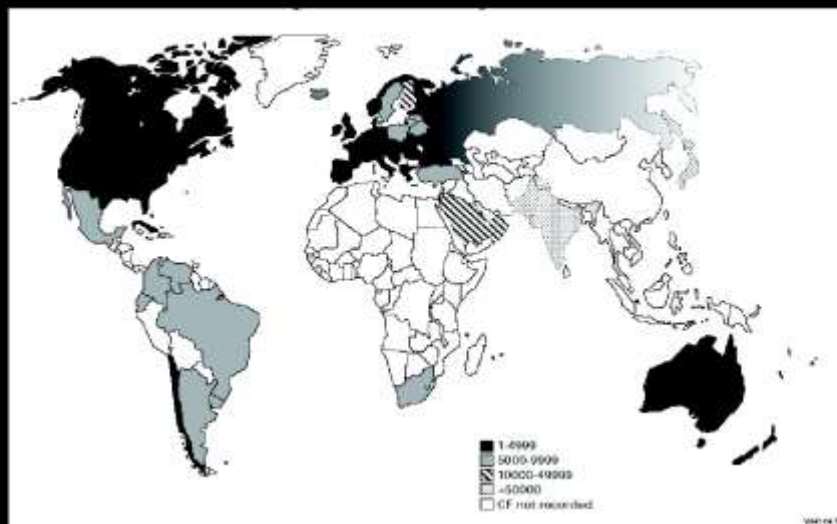


# Cystická fibróza (CF)

Normal	I	II	III	IV	V	VI
<p>Mature functional CFTR</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Absent functional CFTR</p> <p>Absent nascent CFTR</p> <p>Unstable truncated RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Absent functional CFTR</p> <p>Protease destruction of misfolded CFTR</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Defective channel regulation</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Defective CFTR channel</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Scarce functional CFTR</p> <p>Scarce nascent CFTR</p> <p>Correct RNA / Incorrect RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Decreased CFTR membrane stability</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>CFTR DNA</p>
CFTR defect	No functional CFTR protein	CFTR trafficking defect	Defective channel regulation	Decreased channel conductance	Reduced synthesis of CFTR	Decreased CFTR stability
Type of mutations	Nonsense; frameshift; canonical splice	Missense; aminoacid deletion	Missense; aminoacid change	Missense; aminoacid change	Splicing defect; missense	Missense; aminoacid change
Specific mutation examples	Gly542X Trp1282X Arg553X 621+1G→T	Phe508del Asn1303Cys Ile507del Arg560Thr	Gly551Asp Gly478Arg Gly551Ser Ser549Asn	Arg117His Arg347Pro Arg117Cys Arg334Trp	3849+10kbC→T 2789+5G→A 3120+1G→A 5T	4326delTC Gln1412X 4279insA

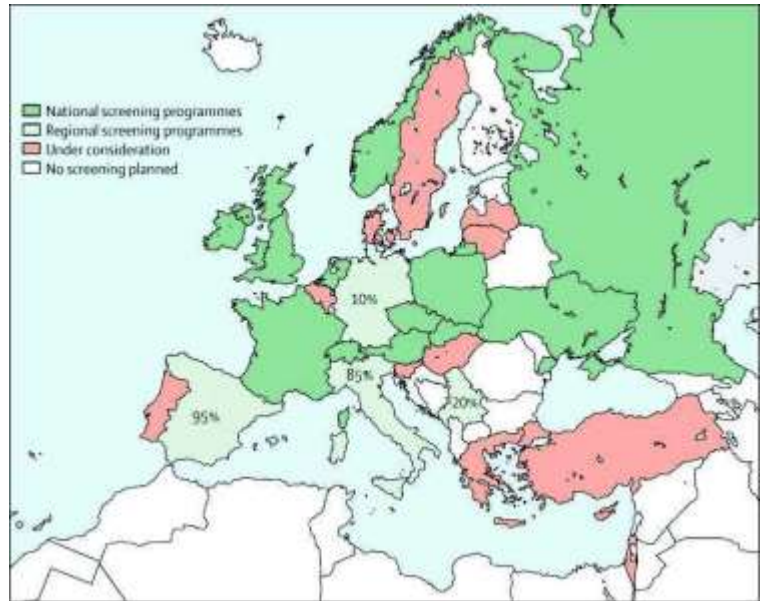
# Mutace CFTR genu

- mutace jsou germinální (ve všech buňkách jedince)
- somatické nebyly dosud popsány
- ancestrální povaha mutací přenášená z generace na generaci
- mutace de novo – velmi vzácně
- distribuce mutací je populačně specifická



- CFTR gen - 1900 popsaných mutací (v ČR 36)
- Některé mutace způsobují CF (viz. tab.)
- F508del – nejčastější (výskyt 1/3000-4000, přenašeč 1/27)
- G551D – keltská mutace

Mutation group	Examples
A. CF-causing	F508del, R553X, R1162X, R1158X, 2184delA, 2184insA, 3120+1G>A, I507del, I677delTA, G542X, G551D, W1282X, N1303K, 621+1G>T, 1717-1G>A, A455E, R560T, G85E, R334W, R347P, 711+1G>T, 711+3A>G, <sup>®</sup> 1898+1G>A, S549N, 3849+10kbC>T, E822X, I078delT, 2789+5G>A, 3659delC, R117H-T5, <sup>®</sup> R117H-T7, <sup>®</sup> D1152H, <sup>®</sup> L206W, <sup>®</sup> TG13-T5 <sup>®</sup>
B. Associated with CFTR-related disorders	R117H-T7, <sup>®</sup> TG12-T5, <sup>®</sup> R117H-T5, <sup>®</sup> D1152H, <sup>®</sup> TG13-T5, <sup>®</sup> S997F, R297Q, <sup>®</sup> L997F, M952I, D565G, <sup>®</sup> G576A, <sup>®</sup> TG11-T5, <sup>®</sup> R668C-G576A-D443Y, R74W-D1270N
C. No clinical consequences	I148T, R75Q, 875+40A/G, M470V, E528E, T854T, P1290P, 2752-15G/C, I807M, I521F, F508C, I506V, TG11-T5 <sup>®</sup>
D. Unknown or uncertain clinical relevance	Mainly missense mutations <sup>®</sup>



## G551D v Evropě – keltská mutace

- 5% mutací CFTR
- Kalydeco (Ivacaftor) – 10 milionů Kč/rok



# Protokol - zápočet

Protokol (spíše otázky k praktikům) je k dispozici na výuce v různých formátech (word/pdf)

Protokol stáhněte a vyplňte (ručně/na PC)

Vyplněný protokol (foto ručně vyplněného protokolu, nebo soubor) pošlete na email [petr.daniel@lf3.cuni.cz](mailto:petr.daniel@lf3.cuni.cz)

Protokol lze vyplnit i na fakultě (po domluvě)

Můžete pracovat **ve skupině max. 3 studentů** (stejný/různý kruh)

Pokud pracujete ve skupině, prosím abyste odeslaný e-mail zároveň v kopii odeslali i kolegům, kteří s Vámi protokol vyplnili

**Odeslané protokoly již nelze upravovat – např. zpětně připisovat jména spolužáků**

Protokol zašlete teprve po proběhnutí oficiální výuky 2. části praktik (pro daný kruh)

**Zápočty budou udělovány nejdříve v den oficiální výuky 2. části praktik pro daný studijní kruh!**