

DIAGNOSTIKA
PATOLOGICKÝCH
STAVOV NA ÚROVNI
DNA, RNA a
PROTEÍNOV

Genóm predstavuje súbor **celej genetickej informácie organizmu**.

- U prokaryotov je genóm tvorený:

bakteriálnym chromozómom

plazmidovou DNA.



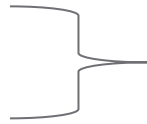
Mimojadrová
DNA

- U eukaryotov je genóm tvorený:

jadrovou DNA

mitochondriálnou DNA

plastidovou DNA.



Mimojadrová
DNA

Je dôležité povedať, že okrem génov, je genóm tvorený aj nekódujúcimi oblasťami DNA.

GENOMIKA

Je vedná disciplína zaoberajúca sa štúdiom funkcie a štruktúry celých genómov:

- objav nových génov
- identifikácia, lokalizácia génov
- funkčná a štrukturálna charakterizácia génov, im prislúchajúcich proteínov (a ich interakcií)

Hlavným cieľom **FUNKČNEJ GENOMIKY** je pochopenie vzťahu medzi **genotypom** a **fenotypom**.

Ako?

ANOTÁCIU GENÓMU.

- identifikácia nekódujúcich oblastí
- identifikácia génov a regulačných oblastí
- priradenie biologických informácii k týmto prvkom = **priradenie funkcie**

ŠTRUKTURÁLNA

Identifikácia genomických elementov

ORF a ich lokalizácia

Génová štruktúra

Kódujúce oblasti

Lokalizácia regulačných motívov

FUNKČNÁ

Priradenie biologickej funkcie

Zistenie biochemickej funkcie

Zistenie biologickej funkcie

PROGRAMY: GENSCAN, GRAILEXP

Prítomnosť **genetickej variability** je nevyhnutná pre proces evolúcie. Variabilita ľudského genómu predstavuje jeden z hlavných záujmov genomických štúdií. **Genetický polymorfizmus** je jedným zo zdrojov genetickej variability.

GENETICKÝ POLYMORFIZMUS

Predstavuje geneticky podmienený znak, ktorý sa v populácii vyskytuje **minimálne v dvoch diskontinuitných variantoch** (v dvoch odlišných formách), pričom vzácnejšia forma sa vyskytuje s frekvenciou aspoň 1%. Vzhľadom k variabilite genetického kódu sa nemusia polymorfizmy vždy prejaviť, najmä ak sa nachádzajú v nekódujúcich oblastiach (intrónoch). Môžu byť **patogénne** aj **nepatogénne**.

Mutácia – prítomná u menej ako 1% populácie (<1%)

Polymorfizmus – prítomný u viac ako 1% populácie (>1%)

TYPY GENETICKÝCH POLYMORFIZMOV

1. BODOVÝ POLYMORFIZMUS

- A. RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
- B. SNP – Single Nucleotide Polymorphism

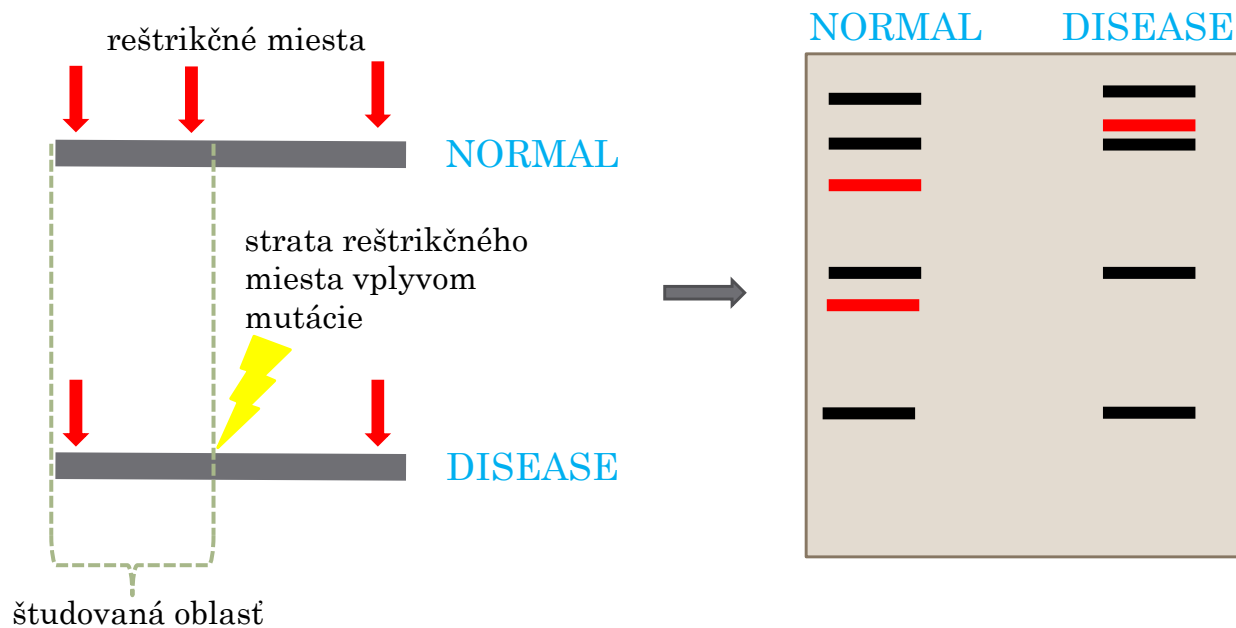
2. POLYMORFIZMUS V DĺŽKE TANDEMÓVÝCH OPAKOVANÍ

- C. Mikrosatelity – SSR (Short Sequence Repeats) a STR (Short Tandem Repeats)
- D. Minisatelity – VNTR (Variable Number Tandem Repeats)

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

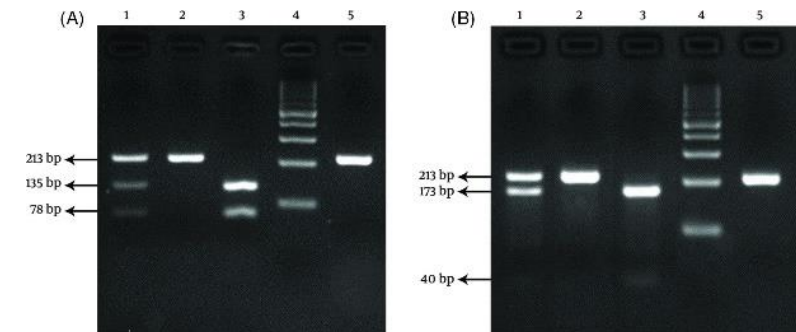
PRÍČINY

- bodová mutácia – vznik nového reštrikčného miesta alebo stratou existujúceho reštrikčného miesta
- Copy Number Variants (CNVs) – polymorfizmus počtu opakovaní – samotné reštrikčné miesto nie je zmenené, ale sekvencia medzi reštrikčnými miestami áno, ide o rôzne dĺžky opakujúcich sa báz (napr. CACACACACA)



PRINCÍP

RFLP je založené na využívaní reštrikčných endonukleáz, ktoré štiepia DNA na základe rozpoznania špecifického miesta v reťazci – reštrikčného miesta (4-6 nukleotidov). Pokiaľ dôjde vplyvom mutácie k pozmeneniu reštrikčného miesta, enzým nie je schopný DNA štiepiť a daný fragment bude mať rozdielnu dĺžku ako by mal za normálnych podmienok. Fragменты sú detegované pomocou elektroforézy na polyakrylamidovom géli s následným blottingom alebo PCR reakciou.



Zdroj: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcla.22440>

SNP

Single Nucleotide Polymorphism

Variácia v jednej konkrétnej pozícii v sekvencii DNA medzi dvoma odlišnými jedincami.



PRÍČINA

Vzniká v dôsledku bodových mutácií v DNA, zámennou jednotlivých nukleotidov za iný, v dôsledku čoho môže dôjsť ku zaradeniu inej AMK. Vysoká frekvencia SNP je v nekódujúcich oblastiach – intrónoch a nízka v kódujúcich – exónoch.

Predstavuje najčastejšie sa vyskytujúci typ polymorfizmu. Sekvenovanie a analýza súkromných osobných genómov ukázali, že každý jedinec sa od referenčnej osekvenovej sekvencie nášho genómu odlišuje priemerne **3,1 miliónmi SNP**.

Každý SNP je asociovaný s ďalšími SNP, ktoré boli prítomné na ancestrálnom chromozóme. Tesne viazané SNP majú tendenciu dediť sa spoločne a tvoria genetickú jednotku – **haplotyp**. Vzhľadom k ich početnosti a distribúcii v genóme sa SNP používajú ako **markery**.

Podobne ako iné polymorfizmy, nie každá SNP spôsobuje chorobu, avšak určité SNP sú asociované s určitými chorobami. Štúdium týchto asociácií umožňuje zhodnotiť **genetickú predispozíciu** pacienta k vyvinutiu choroby. Ak je známe, že určitá SNP je asociovaná s konkrétnym znakom, štúdiom oblastí DNA v jej blízkosti by mohlo vypomôcť k **identifikácii génu/génov** zodpovedný za daný znak.

DETEKCIA SNP

- reštrikčné štiepenie genomickej DNA s následným blottingom
- PCR amplifikácia s následným reštrikčným štiepením
- DNA array (čipy) analýza

GENOTYPOVANIE

SNP genotypovanie predstavuje detekciu (mapovanie) malých genetických rozdielov medzi členmi rovnakého druhu a medzi rôznymi druhmi. Používa sa na získanie poznatkov o tom, ako genetická variácia vedie k fenotypovým zmenám, či už ide o fyzické rozdiely medzi jednotlivcami alebo ktoré sa prejavujú ako ochorenie.

TECHNOLÓGIE GENOTYPOVANIA

RT-PCR, microarray, cielené genotypovanie sekvenovaním, fragmentová analýza kapilárnou elektroforézou

```
AATGTGAATGCTGATGCGCTAGT  
CCAATTTTCCGTGATAGACCCAT  
GCTGGCATGCTGACGTTAGCAGT  
TTGACCCCAATGGAAAGAGGTAT  
GCTCTCCCGTGATAGATAGAATG
```

```
AATATGAATGCTGATGCGCTAGT  
CCAATTTTCCGTGTTAGACCCAT  
GCTGGCATGCTGACGTTAGCACT  
TTGACCCCAATGGAAAGAGGTAT  
GCGCTCCCGTGATAGATAGAATG
```

STR

Short Tandem Repeats

Mikrosatelity

krátke tandemové repetície, ktorých motív sa opakuje 2 – 100 krát

základná repetícia má 2-7 bp

rovnomerne rozmiestnené v genóme

Počet opakovaní je kľúčový, pretože je u ľudí rozdielny a počet opakovaní je dedičný.

TG TG TG TG TG TG

VNTR

Variable Number of Tandem Repeat Polymorphism

Minisatelity

tandemové repetície, ktorých motív sa opakuje 10 – 100 (1000) krát

základná repetícia má > 6bp

výskyt preferenčne v telomérických oblastiach

Počet opakovaní je kľúčový, pretože je u ľudí rozdielny a počet opakovaní je dedičný.

ACGTGCTAGT ACGTGCTAGT

DETEKCIA

genotypizácia pomocou PCR reakcie s následnou elektroforetickou separáciou a detekciou jednotlivých alel

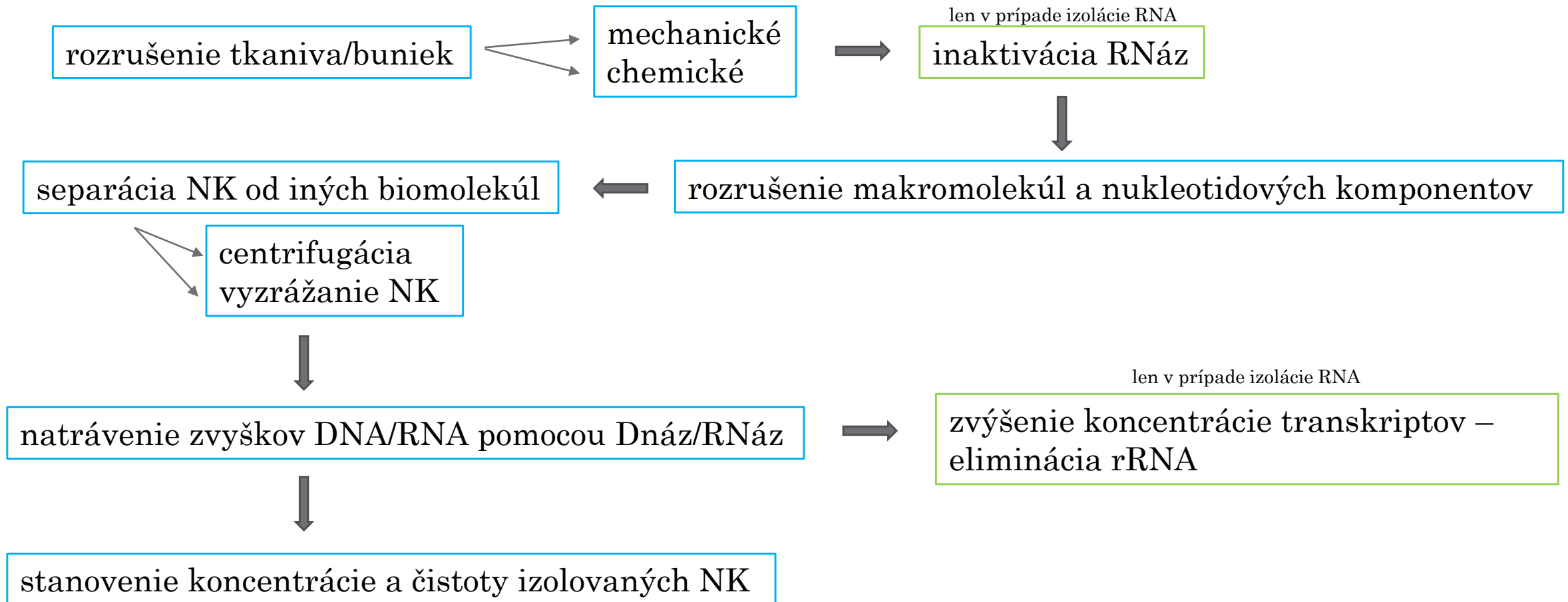
VYUŽITIE

Sekvencie mikrosatelitov a minisatelitov pomerne často podliehajú mutáciám, ktoré môžu viesť k zmene počtu opakujúcich sa jednotiek na lokuse mikrosatelitu/minisatelitu. Výsledkom je niekoľko alel líšiacich sa počtom opakovaní pre daný satelit, vďaka tomu sú aj široko využívané ako **genetické markery** na štúdium mutácií genetických ochorení, na výskum nádorov, genetické mapovanie, populačnú genetiku, parentálne štúdie, na väzbové a asociačné štúdie.

IZOLÁCIA NUKLEOVÝCH KYSELÍN

Pre prácu s nukleovými kyselinami (NK) je potrebná ich izolácia z jednotlivých buniek, tkanív, poprípade celých orgánov. NK sú izolované v natívnom stave, v dostatočnom množstve a čistote. Izolácia je dôležitá pre správne pôsobenie enzýmov využívaných pri analýze NK.

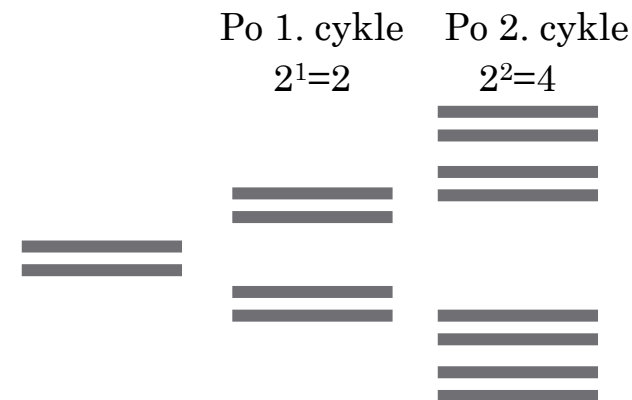
ZÁKLADNÝ POSTUP



PCR

Polymerase Chain Reaction

Polymerázová reťazová reakcia sa využíva na **amplifikáciu** molekúl DNA. Je to **exponenciálna reakcia**, počet novo syntetizovaných molekúl DNA rastie po každom cykle. K zmnoženiu dochádza pomocou DNA-polymerázy a synteticky pripravených oligonukleotidov a výsledkom reakcie je tzv. **PCR produkt** alebo **amplikón**.



KOMPONENTY REAKCIE

Primer Je krátky reťazec tvorený cca. 20 oligonukleotidmi, ktorý nasadá na DNA reťazec na základe komplementarity. Vďaka primeru je DNA-polymeráza schopná predlžovať reťazec DNA v smere 5'-3'.	dNTP Deoxynukleozidtrifosfáty – dATP, dGTP, dCTP, dTTP. Voľné dNTP musia byť v rovnakom pomere, aby sa zabránilo vzniku chýb pri replikácii. Sú to základné stavebné častice využívané DNA-polymerázou pri syntéze nového reťazca.
DNA-polymeráza DNA-polymeráza je enzým schopný syntézy nového DNA vlákna. Pre PCR je potrebná termostabilná polymeráza Taq polymeráza, ktorá odolá aj vysokým teplotám	Mg²⁺ Horečnaté kationy fungujú ako kofaktor DNA-polymerázy a preto sú potrebné v každej PCR reakcii na zabezpečenie bezchybného chodu polymerizácie.
Pufor Tlmivý roztok je spolu s horečnatými kationmi veľmi dôležitý pre optimálnu aktivitu a stabilitu DNA-polymerázy.	

Všetky komponenty reakcie je potrebné zriediť v sterilnej destilovanej vode, čím vzniká **MASTERMIX**. Počas prípravy mastermixu je potrebné pracovať v kompletne sterilných podmienkach, keďže PCR reakcia je citlivá na akúkoľvek kontamináciu. Kvôli tomu sa taktiež analyzovaná DNA (**templát**) do mastermixu nepridáva, tá sa samostatne pridá do reakčných mikroskúmaviek a až následne sa k nej pridáva mastermix.

PRIEBEH REAKCIE

Pripravená reakčná zmes sa vkladá do **termálneho cykléra**, ktorého názov je odvodený od faktu, že PCR **prebieha cyklicky**.

1. KROK – DENATURÁCIA

DNA sa pod vplyvom vysokej teploty ($>90^{\circ}\text{C}$) denaturuje, reťazec sa otvára a stáva sa tak prístupným pre DNA-polymerázu.

2. KROK – ANNEALING

Pokles teploty ($45\text{--}65^{\circ}\text{C}$) spôsobí hybridizáciu primerov s templátovou DNA na konkrétnych komplementárnych miestach.

3. KROK – POLYMERIZÁCIA

Teplota sa opäť zvýši na 72°C , čo spustí syntézu komplementárneho reťazca DNA-polymerázou pomocou voľných dNTP.

VÝSLEDOK: mnoho kópií fragmentu DNA ohraničeného použitými primermi.

4. KROK – ZÁVEREČNÁ POLYMERIZÁCIA

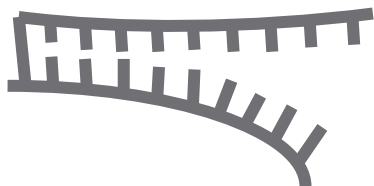
Tento krok nie je striktne povinný, prebieha počas reakcie len raz a to na konci programu za účelom ukončenia všetkých ešte prebiehajúcich polymerizačných reakcií.

Príklad priebehu cyklu.

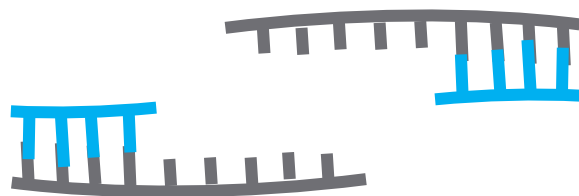
95°C	1 minúta	35x
60°C	1 minúta	35x
72°C	1 minúta	35x
72°C	5 minút	1x

20 – 40-krát

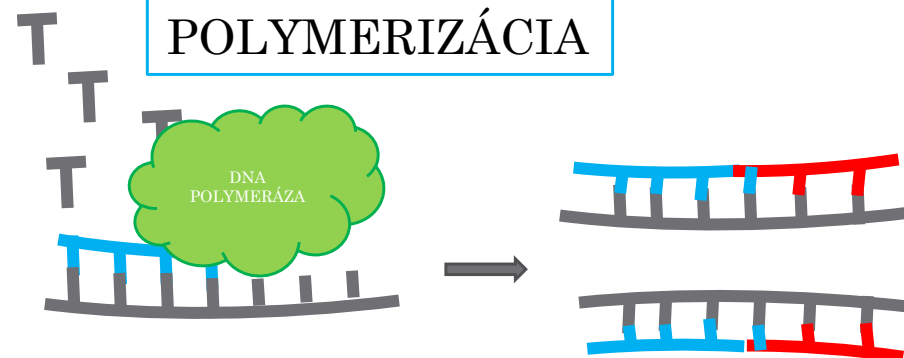
DENATURÁCIA



ANNEALING PRIMEROV



POLYMERIZÁCIA



Real-time

REAL-TIME PCR (RT-qPCR)

Predstavuje kvantitatívna PCR, určenú na zistenie presného množstva analyzovanej DNA vo vzorke. Poprípade sa môže využiť aj na porovnanie množstva DNA v dvoch odlišných vzorkách. Je charakteristická tým, že do reakčnej zmesi sa pridáva fluorescenčné farbivo, ktoré umožní po každom cykle merať množstvo DNA na základe fluorescencie.

Reverse transcriptase

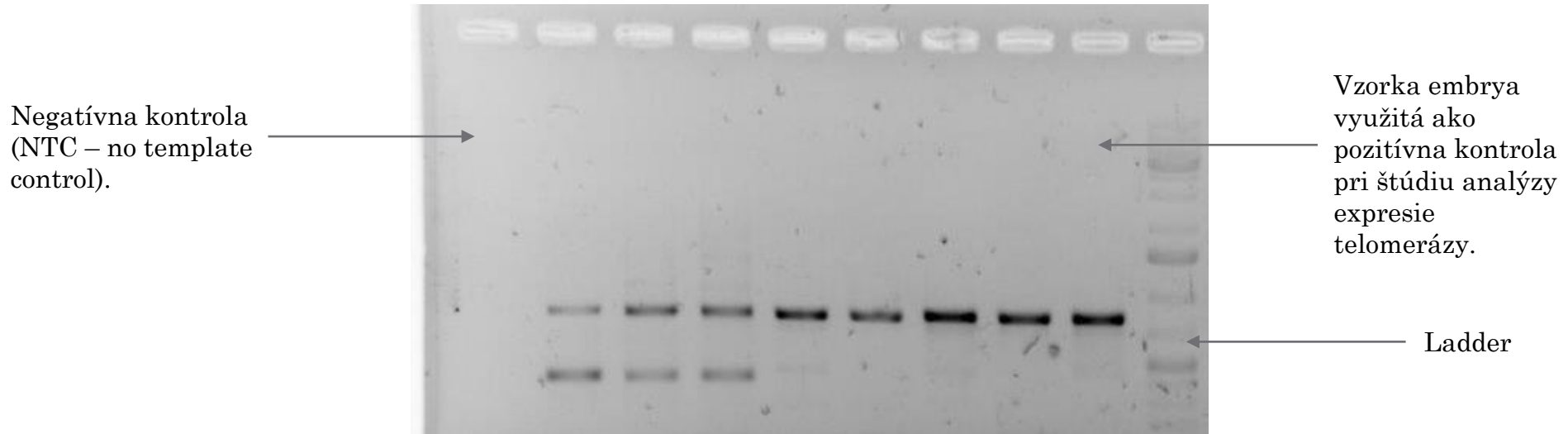
RT-PCR

Predstavuje variáciu PCR spojenú s reverznou transkripciou. PCR produkt je amplifikovaný z izolovanej mRNA, ktorá sa na začiatku reakcie prepíše reverznou transkriptázou do jednovláknovej komplementárnej DNA (cDNA). Po prepise nasleduje amplifikácia cDNA. RT-PCR sa využíva na detekciu génovej expresie.

POZITÍVNA VS NEGATÍVNA KONTROLA

Pri práci s neznámou zmesou nukleových kyselín sa pri identifikácii prítomnosti analyzovaného templátu využíva **pozitívna kontrola**. Predstavuje polymerázovú reakciu, v ktorej sa ako templát využíva známa DNA, na ktorej s **určitostou prebehne amplifikácia** rovnakého produktu, ktorý chceme dokázať aj v neznámych vzorkách.

Negatívna kontrola sa využíva na detekciu prípadnej **kontaminácie vzorky**. Predstavuje ukazovateľa prítomnosti DNA v niektorej zo zložiek reakcie alebo nesterilného pipetovania počas prípravy mastermixu.



VYUŽITIE PCR

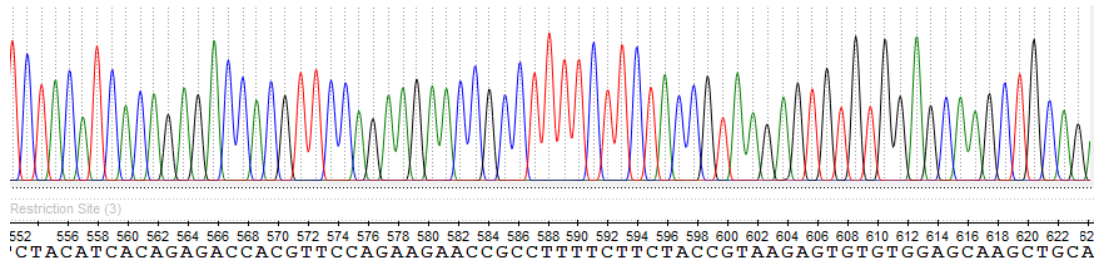
Sledovanie onkologických markerov nádorových ochorení.

Detekcia mutácií spôsobujúcich ochorenia.

Dôkaz prítomnosti patogénnych alebo nekultivovateľných mikroorganizmov a vírusov.

SEKVENOVANIE DNA

Určenie primárnej štruktúry DNA - poradia nukleových báz v sekvencii DNA.



Analýzou sekvencie je možné zistiť, či sa v danom úseku DNA nachádzajú gény, regulačné oblasti a čo je v molekulárnej diagnostike najdôležitejšie – ZMENY v génoch spôsobujúce **ochorenia**.

Maxam-Gilbertova metóda (Chemická metóda)

Molekula DNA sa na 5'konci rádioaktívne označí a chemicky modifikuje. Modifikácia je pre jednotlivé bázy špecifická. V modifikovaných miestach sa za špecifických podmienok molekula DNA štiepi práve v jednom mieste. Vznikajú dva rôzne dlhé fragmenty a keďže len jeden z nich je rádioaktívne značený, iba ten bude po autorádiografickej vizualizácii viditeľný a analyzovaný. Štiepené molekuly DNA sa od seba odseparujú elektroforeticky na polyakrylamidovom géli a vizualizujú autorádiograficky.

Zdroj: (Maxam a kol., 1977)

Sangerova metóda (Enzymatická metóda)

Novo syntetizovaný komplementárny reťazec vzniká vďaka využitiu rádioaktívne značeného primera. Reakcia prebieha v štyroch oddelených skúmavkách, v každej sa okrem dNTP nachádza aj malé množstvo dideoxynukleotidov – ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP. Množstvo dNTP a ddNTP v skúmavkách je odlišné. DNA-polymeráza využíva na syntézu primárne dNTP, avšak ak dôjde k začleneniu ddNTP, syntéza sa ukončí. V každej skúmavke sa tak nachádzajú fragmenty DNA s rôznou veľkosťou zakončené konkrétnou ddNTP. Fragmenty sú od seba odseparované elektroforeticky na polyakrylamidovom géli a vyhodnocujú sa ako v prípade chemickej metódy.

Zdroj: (Sanger a kol., 1975)

MAXAM-GILBERTOVA METÓDA

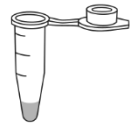
DNA fragmenty s rovnakým
definovaným koncom



koncové rádioaktívne značenie
DNA fragmentov



A+G



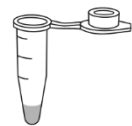
+dimetylsulfát
+kys. mravčia
+piperidín

G



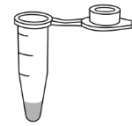
+dimetylsulfát
+piperidín

C+T

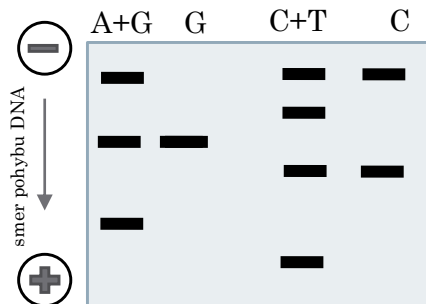


+hydrazín
+NaCl
+piperidín

C



+hydrazín
+1,5 M NaCl
+piperidín



SANGEROVA METÓDA

DNA



pridanie značeného primera



A



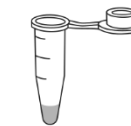
+DNA-pol.
+dNTP
+ddATP

G



+DNA-pol.
+dNTP
+ddGTP

T

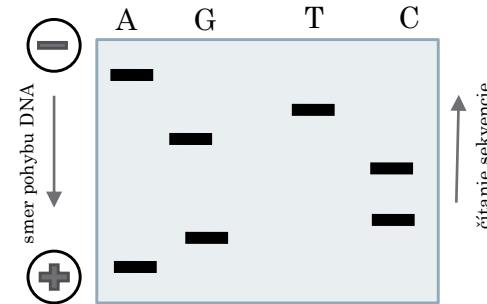


+DNA-pol.
+dNTP
+ddTTP

C



+DNA-pol.
+dNTP
+ddCTP



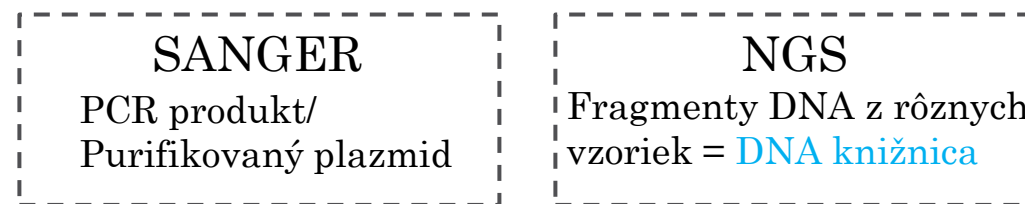
SEKVENOVANIE NOVEJ GENERÁCIE (NGS)

Moderné mikro- a nanotechnológie umožňujú sekvenovať DNA **lacnejšie** a **rýchlejšie**.

VÝHODY NGS

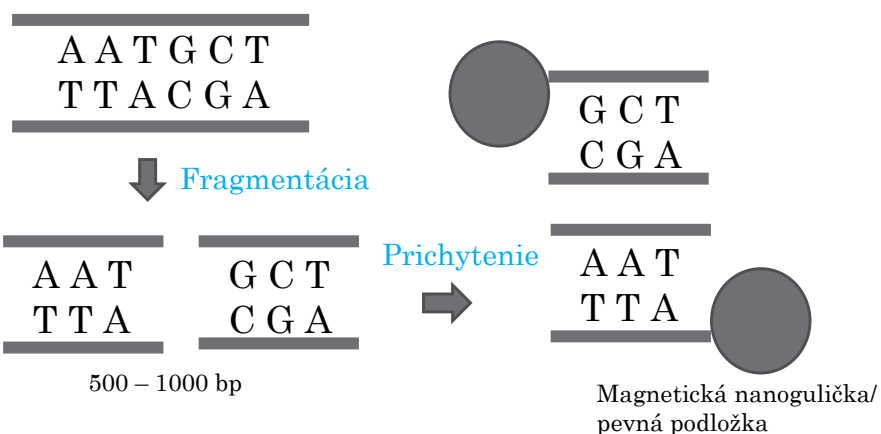
- redukcia potrebného množstva **templátu**
- redukcia potrebného množstva **komponentov reakcie**
- možnosť **súčasného** sekvenovania veľkého množstva odlišných DNA sekvencií

TEMPLÁT



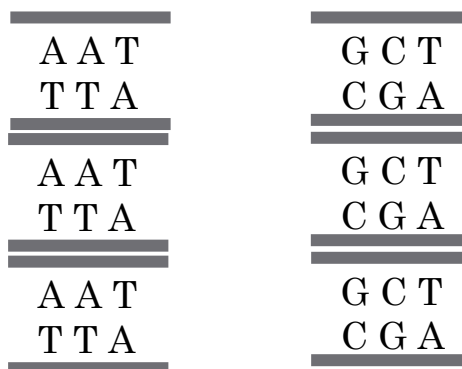
ZÁKLADNÝ POSTUP

Príprava DNA knižnice



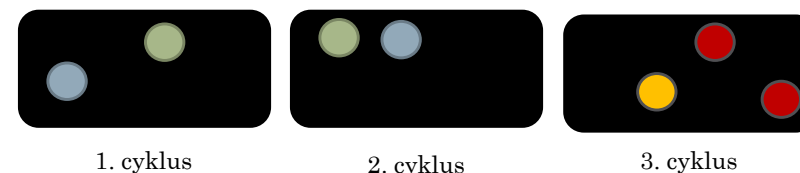
Amplifikácia DNA knižnice

Zvýšenie detekčného signálu



Sekvenovanie

Po začlenení fluorescenčne značeného nukleotidu, dôjde k zaznamenaniu signálu z každého klastra/nanoguličky. Toto sa cyklicky opakuje, až kým nie je osekvenovaná celá knižnica.



NOVÉ SEKVENAČNÉ METÓDY VO VÝVOJI

SMRT sekvenovanie

Zdroj: <https://www.pacb.com/smrt-science/smrt-sequencing/>

SMRT sekvenovanie umožňuje sledovanie DNA-polymerázy kopírujúcej molekulu DNA v reálnom čase za pomoci kamery a mikroskopu. Proces prebieha vo veľmi malej mikroskúmvke, kde sa nachádza iba 1 molekula DNA a 1 molekula DNA polymerázy. Pri každom začlenení fluorescenčne značenej bázy dochádza k vydaniu intenzívneho záblesku, ktorý je zaznamenaný detektormi a následne vyhodnotený.

Sekvenovanie s nanopórmí

Skúmaný reťazec DNA prechádza cez nanopóry v membráne. Bázy sú čítané jednotlivo počas prechodu nanopórom. Identifikácia báz prebieha na základe merania ich individuálneho efektu na ióny a elektrický prúd prebiehajúci cez nanopór. Výhodou tejto metódy je možnosť opätovného využitia skúmaného reťazca DNA.

Zdroj: <https://nanoporetech.com/applications/dna-nanopore-sequencing>

454 sekvenovanie (Pyrosekvenovanie)

Sekvenovanie prebieha v pikotitračných platniach (1x3 cm veľké), ktorých jamky sú veľkostne prispôbené na udržanie jednej nanoguličky. Sekvencie sú po vložení do prístroja čítané pyrosekvenovaním, pri ktorom nie je potrebné fluorescenčne značiť začleňované nukleotidy. Ich rozpoznanie je založené na postupnom pridávaní len jednotlivých nukleotidov do každého cyklu polymerizácie. Aktivita polymerázy je analyzovaná pomocou enzýmov, chemikálií a bioluminiscencie.

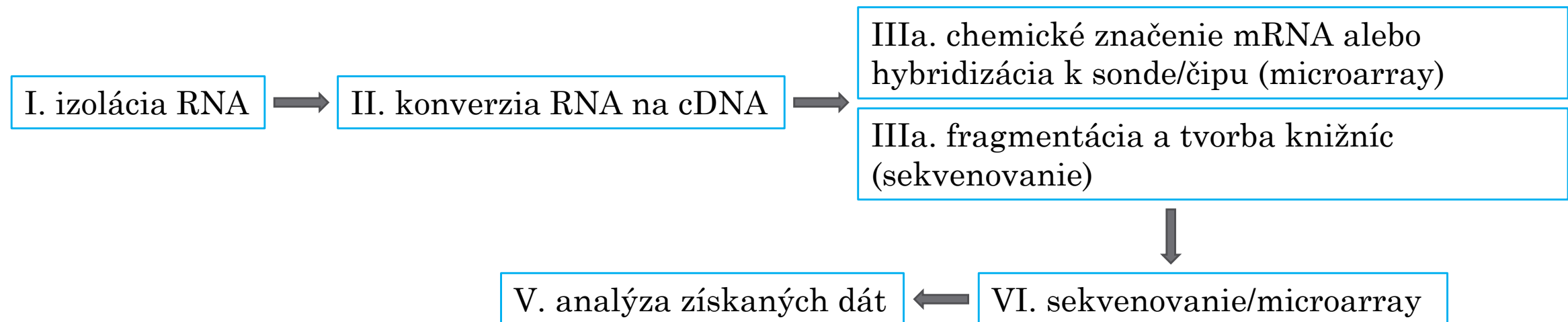
Zdroj: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-the-454-method-of-dna-sequencing>

TRANSKRIPTOMIKA = vedná disciplína zaoberajúca sa sledovaním expresie génov a zisťovaním rozdielov génovej expresie v závislosti od vnútorných podmienok organizmu, štádia jeho vývinu a vplyvu vonkajšieho prostredia

TRANSKRIPTÓM = absolútny obsah RNA transkriptov v určitom tkanive/bunke

KLINICKÁ APLIKÁCIA = diagnostický skríning determinantov rôznych ochorení. V praxi to znamená porovnávanie transkriptómu chorého a zdravého jedinca. Markerom ochorenia môže byť výrazne zvýšená expresia určitého génu.

ZÁKLADNÝ PROTOKOL pre získanie transkriptomických dát

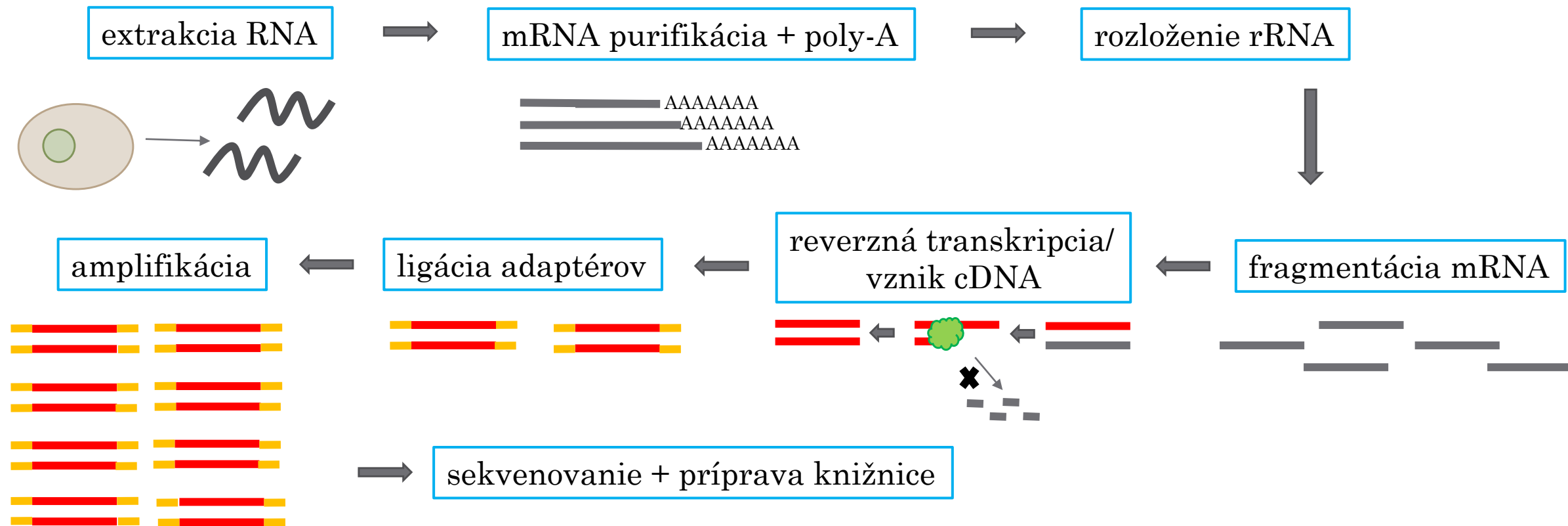


SEKVENOVANIE RNA

Určenie primárnej štruktúry RNA - poradie nukleových báz v sekvencii RNA.

Sekvenovanie RNA umožňuje kvantifikovať expresiu analyzovaných génov a objaviť **nové** alternatívne zostrihané varianty transkriptov (izoformy a génové fúzie). RNA sekvenovaním je možné identifikovať nové gény, analyzovať fúzované gény, SNP asociované s chorobami alebo posttranskripčné modifikácie.

ZÁKLADNÝ POSTUP



ANALÝZA DÁT

PRIMÁRNA

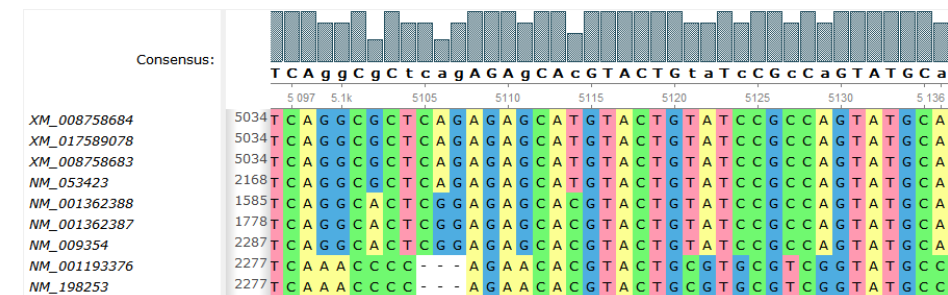
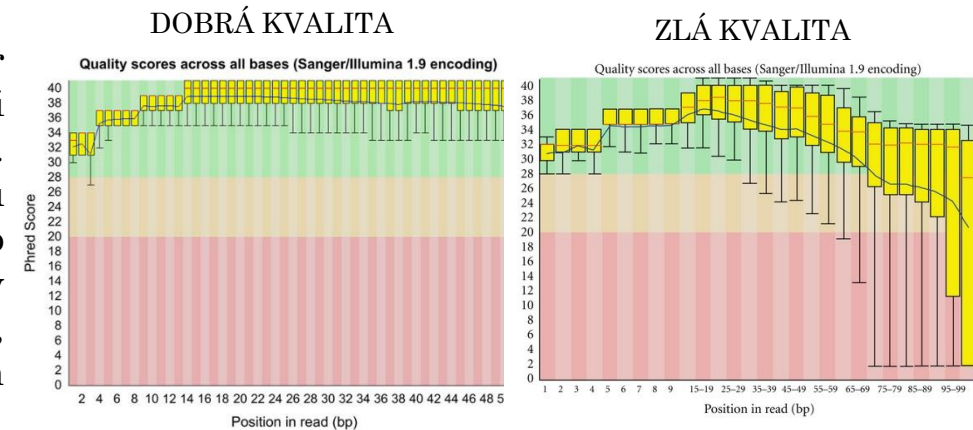
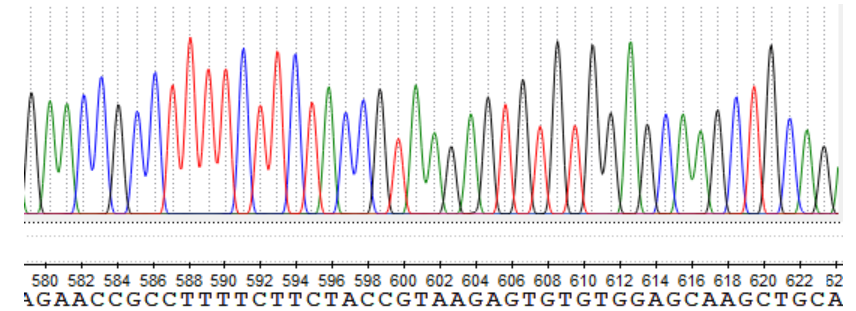
Detegované signály analyzuje a spracuje počítač zabudovaný do sekvenátora, ktorý konvertuje obrazové dáta do sekvencie (ATGC kód). Samotné čítanie je automatické, my môžeme sledovať obrazové dáta a pokiaľ nastane chyba, je možné dáta ručne spätne skontrolovať a problém vyhodnotiť.

SEKUNDÁRNA

Uskutočňujeme ju my, vedci, na základe kvality. Výsledkom sekvenovania je súbor FASTQ a obsahuje informácie nielen o samotnej sekvencii, ale aj kvalite, akou boli bázy čítané. FRET skóre predstavuje odhad presnosti čítania jednotlivých báz. Nekvalitne osekvenované oblasti reťazca je možné odstrániť orezaním. Súčasťou sekundárnej analýzy je aj zarovnanie – **ASSEMBLY** alebo **ALIGNMENT**, čo predstavuje zarovnanie sledovanej sekvencie vzhľadom k referenčnému genómu, ktorý máme k dispozícii. Ak pracujeme s organizmom, ktorý ešte referenčný genóm nemá, hovoríme o **ASSEMBLY DE NOVO**. Na asembláž sa využíva najčastejšie program **TRINITY**.

TERCIÁRNA

Po zostavení transkriptómu je možné vyhodnotiť expresiu génov, vizualizovať dáta a anotovať. V prípade transkriptómu sa hovorí o **FUNKČNEJ ANOTÁCII**. Zostavené sekvencie sa porovnávajú s proteínovou databázou za účelom zistenia, do akých proteínov sa budú transkripty prekladať. Počas terciárnej analýzy sa využívajú programy ako **BLAST X**.



VYUŽITIE SEKVENOVANIA DNA A RNA

Tvorba geneticky modifikovaných plodín.

Včasné zistenie náchylnosti k určitému ochoreniu

Diagnostika chorôb.

Štúdium evolučného vývoja organizmov.

Vývin nových liečiv.

Skúmanie ako sa génová expresia od seba odlišuje v rôznych tkanivách a ako je génová regulácia dôležitá v liečbe ochorení.

Dáta získané sekvenovaním napomáhajú identifikovať konkrétny typ nádoru, čo umožňuje individuálny prístup k jeho liečbe.

Skríning novorodencov pre náchylnosť k chorobám.

Kriminalistika.

Sekvenovanie napomáha štúdiu vývinu monogénnych, komplexných a dedičných ochorení.

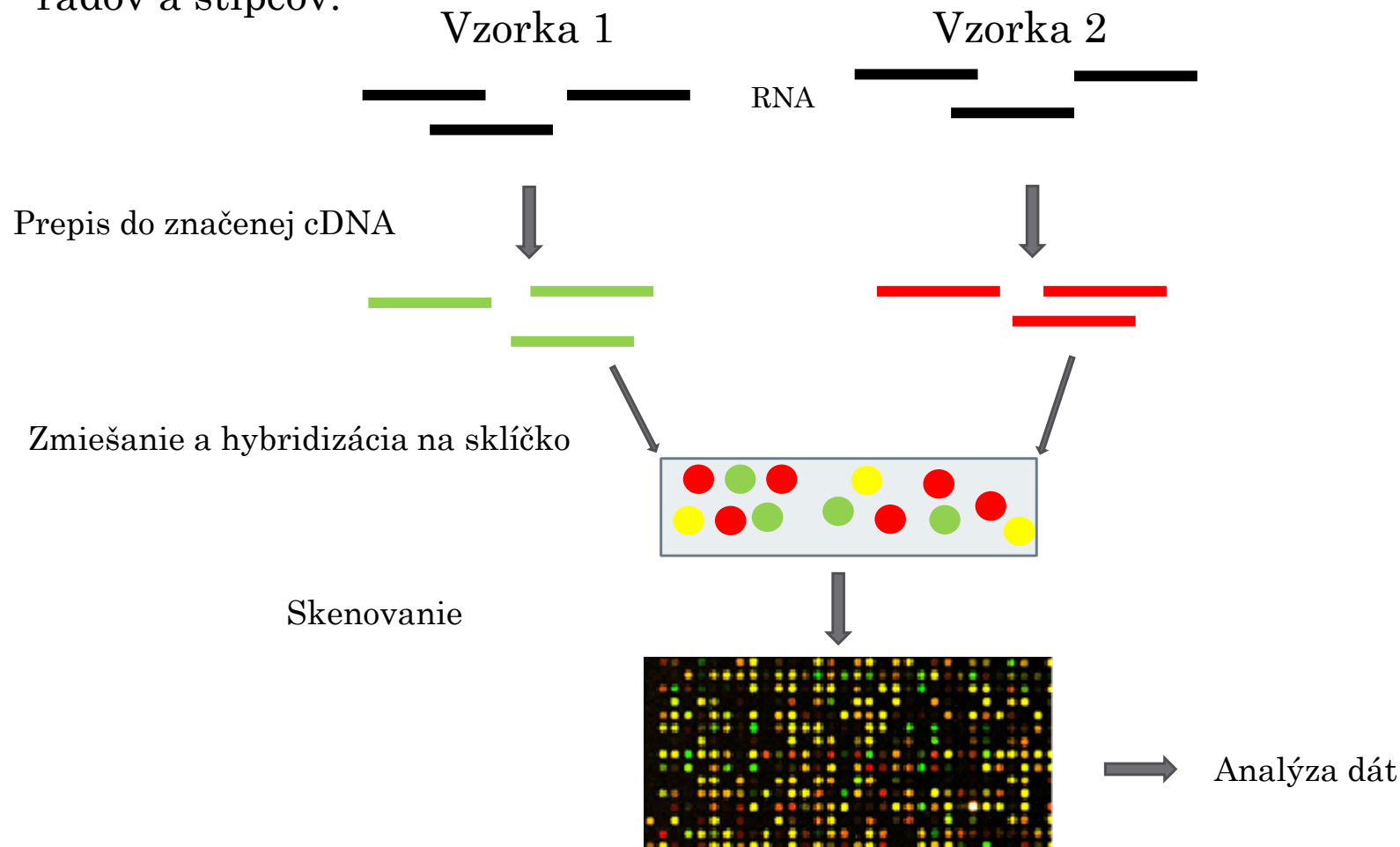
Určovanie otcovstva.

Génová terapia.

RNA MICROARRAY

Microarray = mikročipy = krátke oligonukleotidové reťazce (sondy) so známou sekvenciou, ktoré sú naviazané na podložku.

Microarray je vhodná technika na určenie množstva expresie sledovaného génu. Množstvo transkriptu je určené podľa hybridizácie fluorescenčne značených transkriptov k sondám. Biologické vzorky sú dvojrozmerné zoradené a nachádzajú sa po tisíckach v jednotlivých jamkách, ktoré sú organizované do radov a stĺpcov.



Microarray techniky sú vhodné na porovnanie dvoch skupín za účelom určenia, či sú dané mutácie alebo zmeny v expresii RNA asociované s konkrétnym fenotypom.

- Transkripty exprimované u zdravého jedinca
- Transkripty exprimované u chorého jedinca
- Transkripty exprimované u oboch jedincov

VYUŽITIE TRANSKRIPTOMICKÝCH STRATÉGIÍ

DIAGNOSTIKA A ZÍSKAVANIE PROFILOV GÉNOV ASOCIOVANÝCH S OCHORENIAMI

- identifikácia SNP asociovaných s ochoreniami
- odhalenie používania alternatívnych promótorov a alternatívnych miest splicingu (zostrihu) – nevyhnutné pre interpretáciu štúdií expresie asociovanej s ochorením
- získanie informácií o transkripcii endogénnych retrotranspozónov, čo môže ovplyvniť transkripciu okolitých génov rôznymi epigenetickými mechanizmami vedúcimi k ochoreniu

SEKVENOVANIE ĽUDSKÉHO A CUDZORODÉHO TRANSKRIPTÓMU

RNA-Seq u patogénov človeka:

- kvantifikácia zmeny génovej expresie
- identifikácia nových faktorov virulencie
- predikcia antibiotickej rezistencie
- objasnenie imunitnej reakcie patogén-hostiteľ

PROTEOMIKA = vedná disciplína zaoberajúca sa štúdiom interakcií medzi proteínmi, modifikácií proteínov, funkcií génov a lokalizácie proteínov

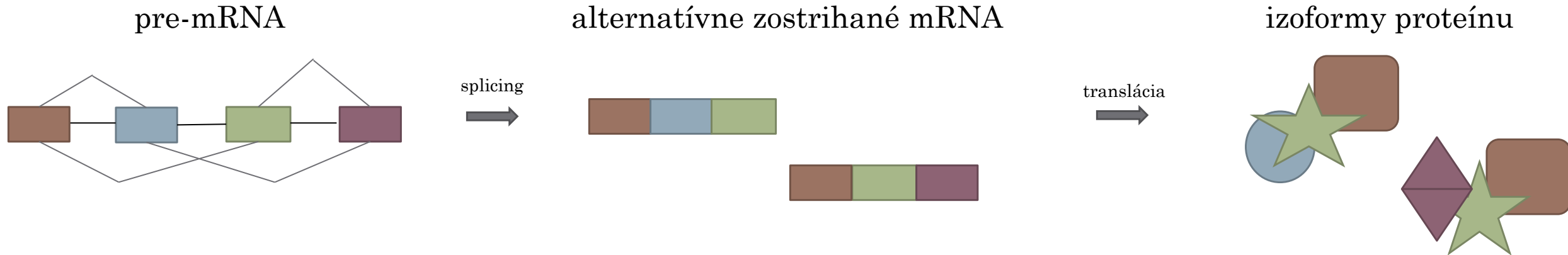
PROTEÓM = súhrn všetkých proteínov ako komplementárny súbor proteínov k súboru génov, ktoré sú kódované a exprimované v bunke spolu s ich interakciami a funkčnými vzťahmi

GENÓM
informácia je tvorená len kombináciou ATGC
konštantný

vs

PROTEÓM
reťazec tvorený kombináciou 20 AMK
dynamický

Informácia zakódovaná v DNA sa nemení. Koncentrácia proteínov sa mení v závislosti od aktuálnej potreby organizmu. Jeden gén môže zároveň kódovať viacero proteínov vďaka **ALTERNATÍVNEMU SPLICINGU**.



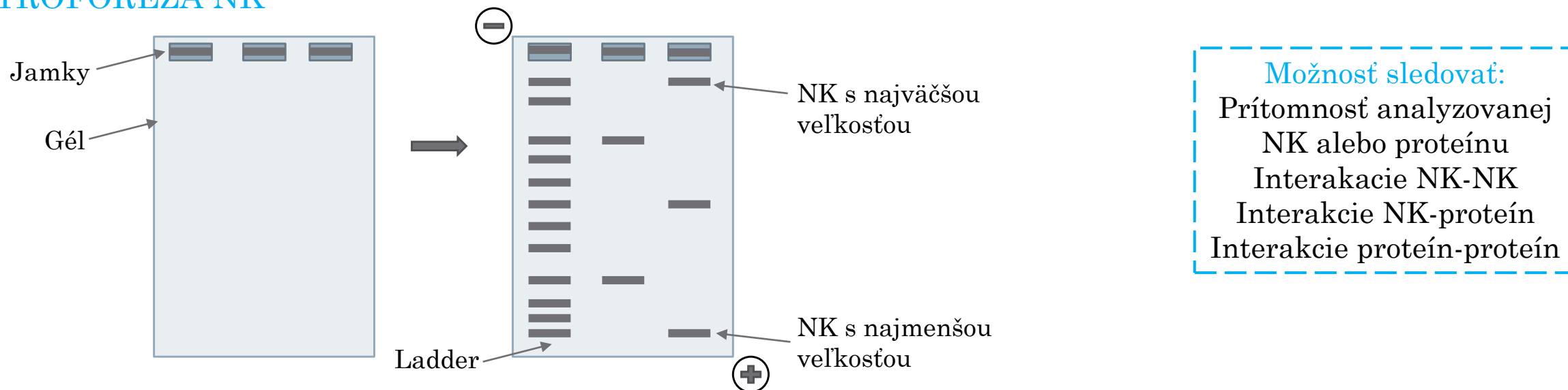
GÉLOVÁ ELEKTROFORÉZA

Počas gélovej elektroforézy dochádza k separácii proteínov alebo NK v gélovom matrice na základe molekulovej hmotnosti/ izoelektrického bodu. Nabité molekuly sa pohybujú v elektrickom poli. NK sa vďaka svojim záporne nabitým fosfátovým skupinám pohybujú smerom ku kladne nabitej anóde. Proteíny spadajú medzi amfolyty – môžu mať kladný alebo záporný náboj v závislosti od pH pufru. Vizualizácia pohybu molekúl v géli sa uskutočňuje vďaka farbivám, ktoré je možné pridať buď do samotného gélu alebo do analyzovanej zmesi. V prípade bielkovín výsledok sa elektroforézy fixuje a následne farbí organickými farbivami.

KLINICKÉ VYUŽITIE:

Elektroforézou bielkovín v sére je možné bližšie analyzovať patologické zmeny v koncentrácii a kvalite špecifických proteínov (dysproteinémia) alebo prítomnosť atypických proteínov v sére (paraproteinémia).

ELEKTROFORÉZA NK

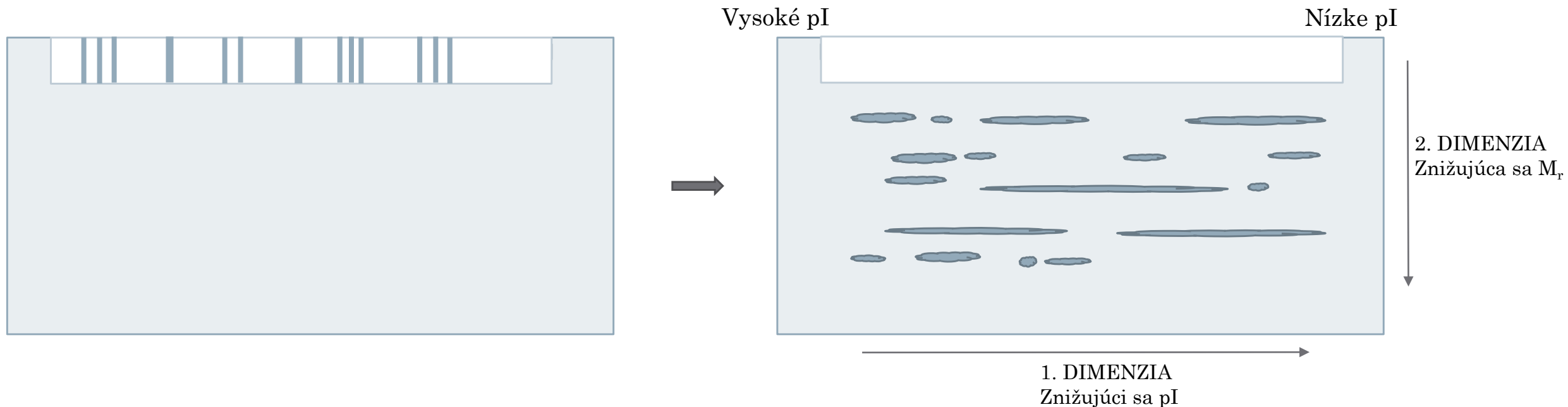


1D GÉLOVÁ ELEKTROFORÉZA BIELKOVÍN

Proteíny sa separujú na základe molekulovej hmotnosti. Pridanie sódiumdodecylsulfátu (SDS) dodáva proteínom v zmesi negatívny náboj. Negatívne nabité proteíny migrujú ku kladne nabitej anóde a separujú sa na základe svojej hmotnosti v polyakrylamidovom géli podobne ako pri elektroforéze NK.

2D GÉLOVÁ ELEKTROFORÉZA BIELKOVÍN

1. DIMENZIA – Proteíny sa separujú na základe ich izoelektrického bodu (pI) na gélovom prúžku s imobilizovaným pH gradientom.
2. DIMENZIA – Proteíny sa separujú na základe ich molekulovej hmotnosti. Proteíny sú vizualizované ako prúžky na géli.



WESTERN BLOT

Základná technika využívaná na analýzu proteínov s cieľom detegovať prítomnosť špecifického proteínu v celkovom proteínovom extrakte.

ANTIGÉN predstavuje látku schopnú vyvolať tvorbu protilátok aj imunitnú odpoveď. Je to častica rozpoznávaná protilátkou.

PROTILÁTKA je proteín produkovaný B-lymfocytmi. Jej úlohou je identifikácia, opsonizácia a neutralizácia cudzích častíc v tele. Protilátka rozpoznáva lineárne sekvencie aminokyselín vo vnútri analyzovaného proteínu.

ANTIGÉN sa viaže s **PROTILÁTKOU** vďaka špecifickej väzbe medzi **EPITOPOM** (špecifická oblasť antigénu) a **PARATOPOM** (špecifická oblasť na protilátke).

Možnosť merať:
interakcie proteín-proteín
posttranslačné modifikácie
bunková lokalizácia

WESTERN BLOT pozostáva z 3 základných krokov:

I. Separácia proteínového extraktu elektroforézou v polyakrylamidovom géli.

II. Prenos separovaných proteínov na pevný nosič – membránu.

III. Imunodetekcia – detekcia prítomnosti určitého proteínu pomocou špecifických protilátok.

ZÁKLADNÝ POSTUP

I. Separácia proteínového extraktu elektroforézou v polyakrylamidovom géli.

Tento krok môže prebiehať aj pri denaturačných aj natívnych podmienkach. Najčastejšie sa však proteíny separujú za denaturačných podmienok. Hoci je polyakrylamidový gél dostatočný na separáciu proteínov, nie je vhodný na ich ďalšiu analýzu. Separované proteíny je preto nutné preniesť z gélu na pevný nosič – membránu.

Polyvinylidénfluoridová
Po detekcii proteínov je možné ju premyť a opakovane použiť na ďalšie analýzy.

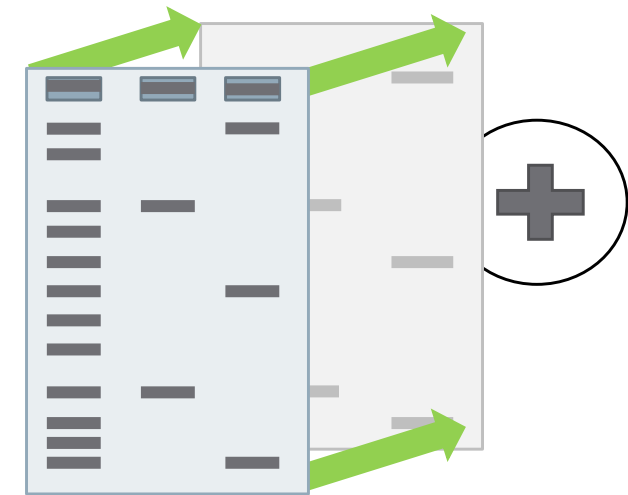
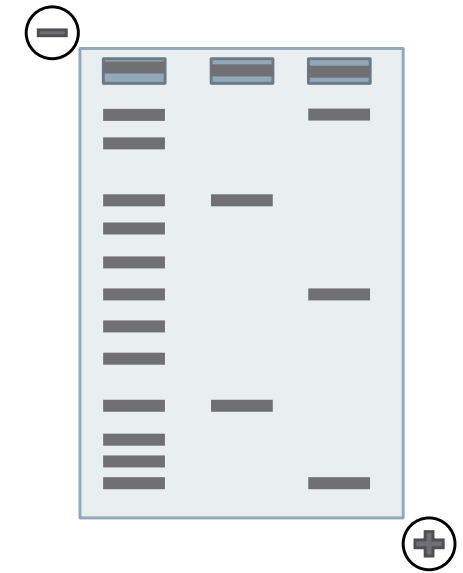
Nitrocelulózová
Krehká, opakované použitie je problematické až nemožné.

II. Prenos separovaných proteínov na pevný nosič – membránu.

Prenos na membránu prebieha v elektrickom poli. Membrána je umiestnená medzi gél a pozitívnu elektródu, čo umožňuje aby negatívne nabité proteíny migrovali z gélu na membránu.

Pri suchých podmienkach – 1 hodina.

Pri mokrých podmienkach – cez noc.



III. Imunodetekcia – detekcia prítomnosti určitého proteínu pomocou špecifických protilátok.

A) BLOKOVANIE

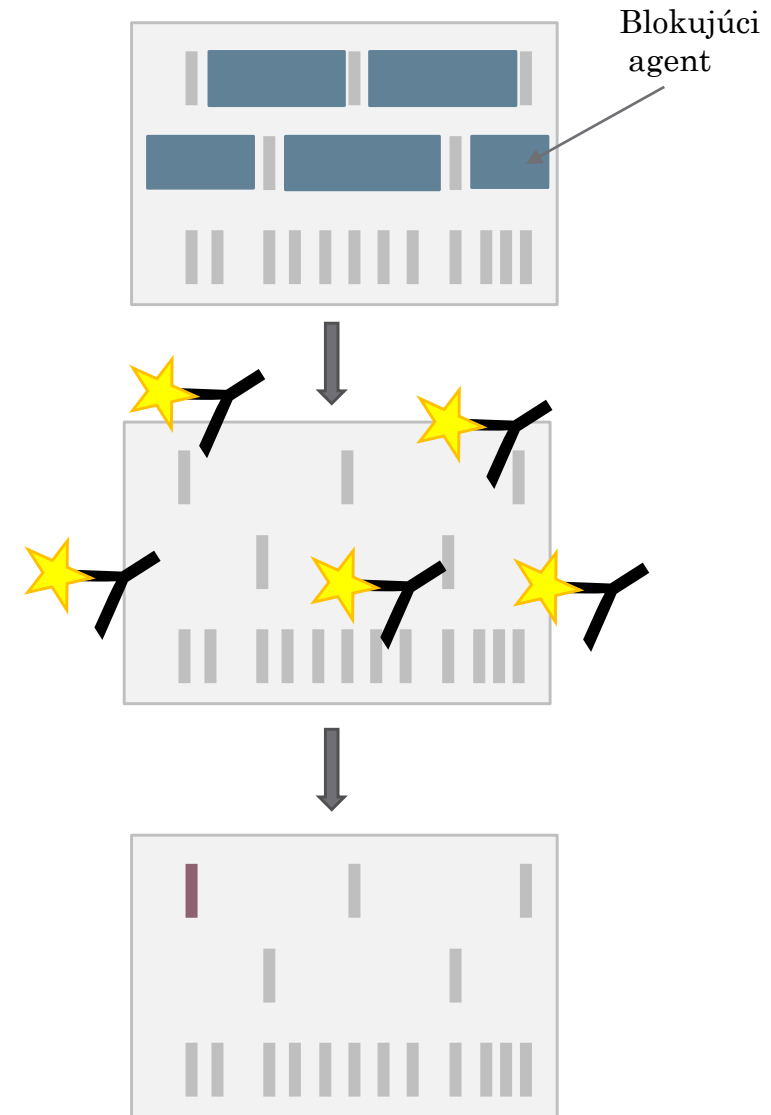
Pri tomto kroku je ako prvé potrebné blokovanie miest na membráne, na ktoré by sa mohli nešpecificky viazať protilátky. Na blokovanie sa najčastejšie používa odtučnené sušené mlieko BLOTTO (rozpustené v príslušnom tlmivom roztoku), želatína alebo albumín.

B) INKUBÁCIA

Po blokovaní a premytí nastáva inkubácia membrány so značenou protilátkou. Naviazanie protilátky môže prebehnúť priamo (primárna protilátka) alebo nepriamo (primárna a sekundárna protilátka). Protilátka sa viaže na špecifický proteín a tento komplex je následne detegovaný. V niektorých prípadoch je možné detegovať prítomnosť antigénu priamo a to bez prítomnosti substrátu (fluorescenčne značené protilátky). Častejšie sa ale využívajú sekundárne protilátky značené chrenovou peroxidázou (HRP), ktorá reaguje s prítomným substrátom.

C) VIZUALIZÁCIA SIGNÁLU

Vizualizácia prebieha pomocou kolorimetrického (farebná reakcia v mieste naviazania enzýmu so substrátom) alebo chemiluminiscentného (zvýšená emitácia svetla v mieste naviazania protilátky na blote) substrátu. Kolorimetrickú reakciu je možné sledovať bez špeciálnych prístrojov. V prípade chemiluminiscentnej reakcie sa emitácia svetla vizualizuje ako tmavý pásik po expozícii blotu na rádiografickom filme alebo pomocou CCD kamery.



ELISA

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ELISA predstavuje vysoko senzitivnu kvalitatívnu techniku, ktorá sa využíva na detekciu prítomnosti antigénu a protilátok a na stanovenie ich koncentrácie. Vďaka tejto technike je však možné určiť len prítomnosť antigénu, nie iné biochemické vlastnosti (napr. molekulovú hmotnosť).

Detekcia **ANTIGÉNU**, ktorý je rozoznávaný protilátkami alebo
detekcia **PROTILÁTKY**, ktorá je rozpoznávaná antigénom.

Možnosť merať:
Proteíny
Nukleové kyseliny
Hormóny
Sekundárne metabolity
Protilátky asociované
s chorobami

ZÁKLADNÝ POSTUP

Imobilizácia antigénu/protilátky na jamku mikrotitračnej platničky.

Blokovanie miest, na ktoré by sa mohli nešpecificky naviazať antigény/protilátky.

Aplikácia primárnych protilátok.

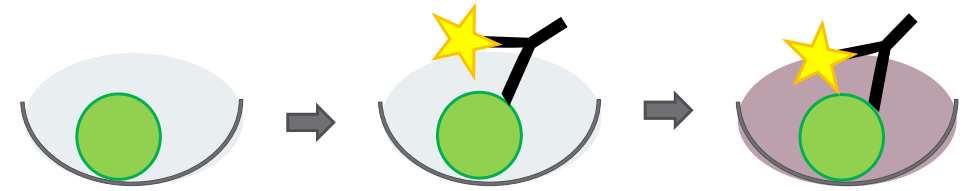
Aplikácia sekundárnych protilátok.

Pridanie substrátu – kolorimetrická reakcia.

Meranie absorbancie.

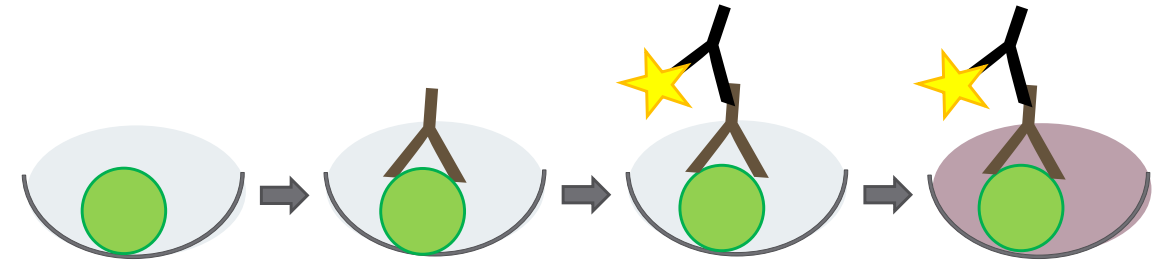
PRIAMA ELISA

ANTIGÉN je imobilizovaný na pevný povrch jamky. Reaguje s **PROTILÁTKOU** označenou enzýmom, ktorý následne reaguje so substrátom – výsledkom je **farebná zmena**.



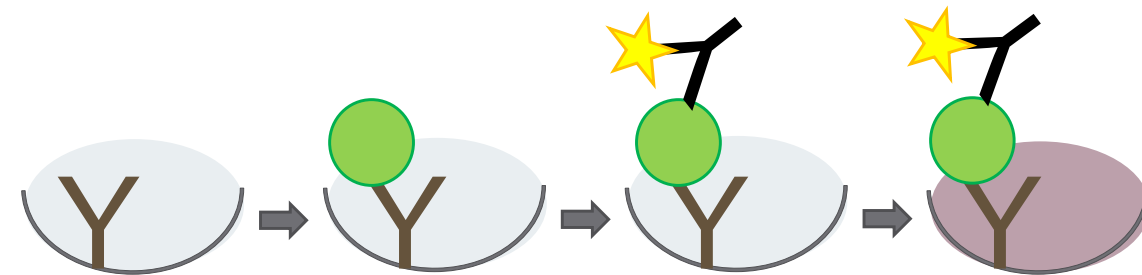
NEPRIAMA ELISA

ANTIGÉN je imobilizovaný na povrch jamky. Reaguje s primárnou **PROTILÁTKOU** a až tá reaguje so sekundárnou protilátkou označenou enzýmom, ktorý reaguje so substrátom – výsledkom je **farebná zmena**.



SENDVIČOVÁ ELISA

Jedna **PROTILÁTKA** je imobilizovaná na povrchu jamky a reaguje s **ANTIGÉNOM** zo vzoriek. Druhá protilátka je značená enzýmom a taktiež reaguje s antigénom. Každá protilátka sa viaže na odlišný **EPITOP** jedného antigénu.



VYUŽITIE PROTEOMICKÝCH STRATÉGIÍ

PROTEOMIKA OCHORENÍ

- Možnosť zachytiť chorobu vo včasnom štádiu
- Presné informácie o príčine a vývoji ochorenia (napr. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, nádorové ochorenia)
- Informácie o zmene bunkových signalizačných dráh

DIAGNOSTIKA OCHORENÍ

- Možnosť využívať proteíny ako diagnostické markery ochorení - zvýšená koncentrácia určitých proteínov pri niektorých ochoreniach

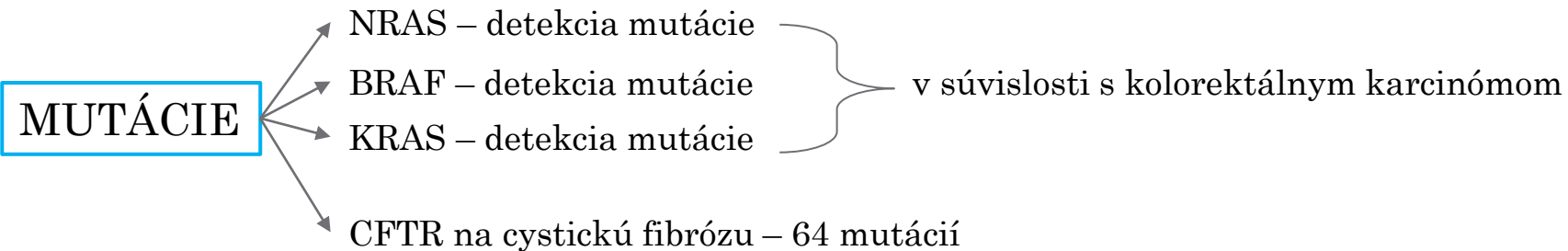
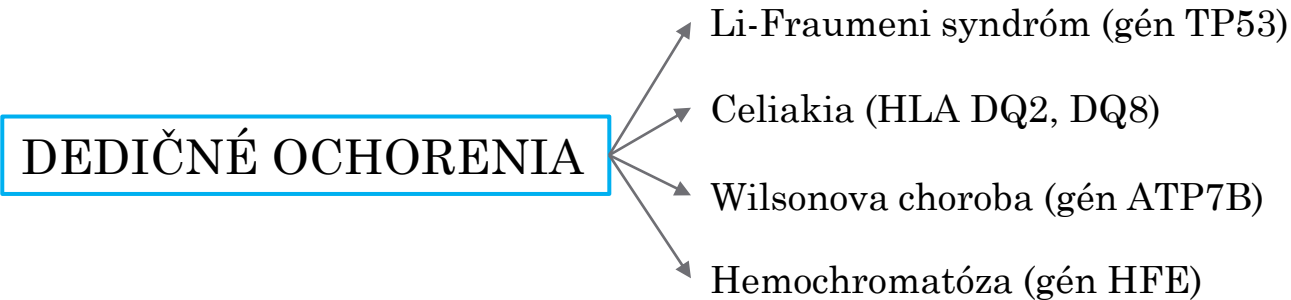
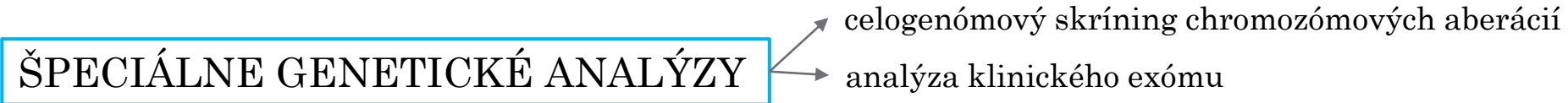
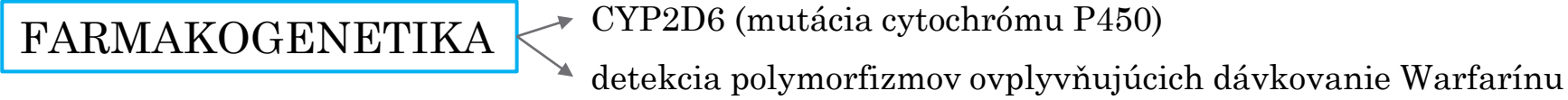
FARMAKOLÓGIA A TOXIKOLÓGIA

- Špecifické zmeny v proteóme pacienta pri rôznych ochoreniach môžu mať vplyv na výber vhodnej terapie

MIKROBIOLÓGIA A VÝVOJ NOVÝCH ANTIBIOTÍK

- Možnosť sledovania interakcie organizmu a sledovaného patogénu
- Vývoj imunogénnych proteínov – vývoj vakcín

V praxi sa laboratória molekulárnej diagnostiky zaoberajú najmä týmito oblasťami:



KARDIOVASKULÁRNE RIZIKO

testovanie genetických variácií prispievajúcich k riziku kardiovaskulárnych ochorení

ApoB

ApoE

PRENATÁLNA DIAGNOSTIKA

TRISOMY test XY

Vyšetrenie aneuploídií chromozómov 13, 15, 16, 18, 21, 22 a X a Y

Vyšetrenie aneuploídií chromozómov 13, 18, 21 a X a Y

MLPA analýza – vyšetrenie mikrolečných syndrómov

ONKKOGENETIKA

nádory prsníka < gény BRCA1 a BRCA2
gén HER2/neu

nádory gastrointestinálneho traktu < gén BRAF
gén KRAS

lymfómy a leukémie < translokácia t(14;18) (IgH/BCL2)
translokácia zahrňujúca gén C-MYC, vrátane t(8;14)

nádory urogenitálneho traktu < HPV
gén TFE3

nádory kože < gén CDKN2A
gén CDK4

Štúdium genetiky a molekulárnej biológie neznamená len určovanie otcovstva a zostavovanie rodokmeňov.

Identifikácia komunikácie medzi hypericínom a transportným proteínom BCRP.

Genetická transformácia endofytických húb izolovaných z *Hypericum* spp.

Charakterizácia expresie telomerázy v mieche potkana a príprava hybridizačnej sondy pre in situ hybridizáciu.

Účinky imunomodulačnej látky biologického pôvodu Transfer faktora na bunkovú imunitnú odpoveď v krvi morčiat.

Štúdium faktorov vplývajúcich na šírenie tolerancie voči antibiotikám za prítomnosti kovov v prostredí.

Klasická a molekulárna cytogenetika zoonotickeho druhu pásomnic *Dibothriocephalus latus*.

Bakteriálny biofilm z pohľadu molekulárnej biológie.

Fylogeografia síru oxidujúcich baktérií na Slovensku.

Alternatívne prístupy v liečbe ulceróznej kolitídy.

Terapeutický účinok fekálnej mikrobiálnej transplantácie na nešpecifické zápalové ochorenia čriev.

Analýza populácií astrocytov v mieche potkana počas skorého postnatálneho obdobia.

Hypoxia a hypericín ako faktory ovplyvňujúce zastúpenie bočnej populácie buniek.

Vplyv mutovaných foriem transportného proteínu BCRP na výslednú akumuláciu hypericínu a cytotoxicitu fotodynamickej terapie s hypericínom.

POUŽITÁ LITERATÚRA

CLARK, M. F., R. M. LISTER AND M. BAR-JOSEPH. ELISA techniques. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1986, vol. 118, p. 742-766.

DONG, Z. AND Y. CHEN Transcriptomics: advances and approaches. *Sci China Life Sci*, Oct 2013, 56(10), 960-967.

FEDOROČKO, P., KLEBAN, J., KROPÁČOVÁ, K., MIKEŠ, J., MIŠÚROVÁ, E., SÁČKOVÁ, V., SOLÁR, P. Úvod do experimentálnej techniky v biológii. 2007. s. 66, 92, 93. ISBN 978-80-7097-670-8

ISMAIL, S. AND M. ESSAWI Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics*, 2012, 1(2), 57-63.

MAHMOOD, T. AND P. C. YANG Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, Sep 2012, 4(9), 429-434.

MAXAM, A. M. AND W. GILBERT A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Feb 1977, 74(2), 560-564.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, May 25 1975, 250(10), 4007-4021.

OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R. Základy biologie a genetiky člověka. Karolinum, 2013. s. 125. ISBN 9788024621098

PEVSNER, J. Bioinformatics and Functional Genomics. 2009. s. 3,4,172-183,425,666-668. ISBN 9780470451496

PIERCE, J. D., M. FAKHARI, K. V. WORKS, J. T. PIERCE, et al. Understanding proteomics. *Nurs Health Sci*, Mar 2007, 9(1), 54-60.

RICHARD, G. F., A. KERREST AND B. DUJON Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, Dec 2008, 72(4), 686-727.

SANGER, F. AND A. R. COULSON A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, May 25 1975, 94(3), 441-448.

WANG, J., D. C. DEAN, F. J. HORNICEK, H. SHI, et al. RNA sequencing (RNA-Seq) and its application in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, Jan 2019, 152(1), 194-201.