

Molekuláris Biológiai Módszerek a Klinikai Kémiában

Szarka András

szarka@mail.bme.hu

463 3858

A molekuláris biológia centrális dogmája:



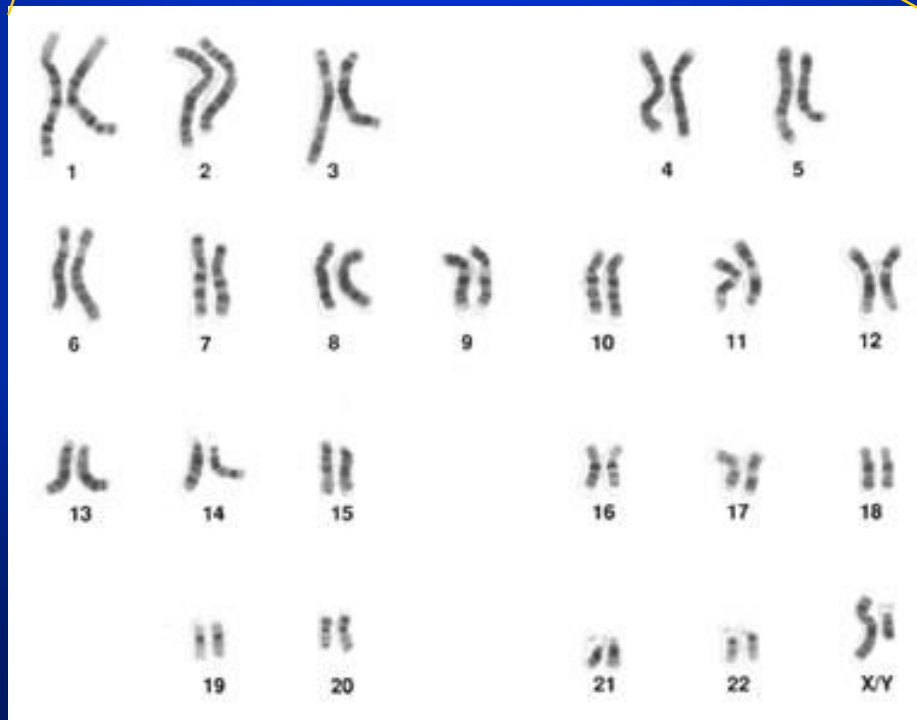
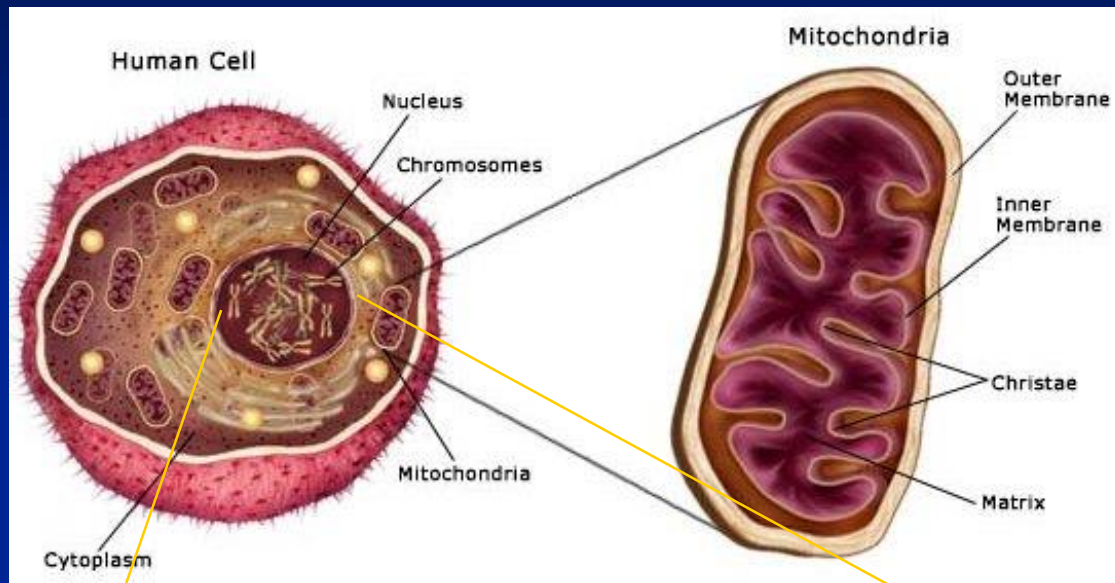
DNS által tárolt információ:

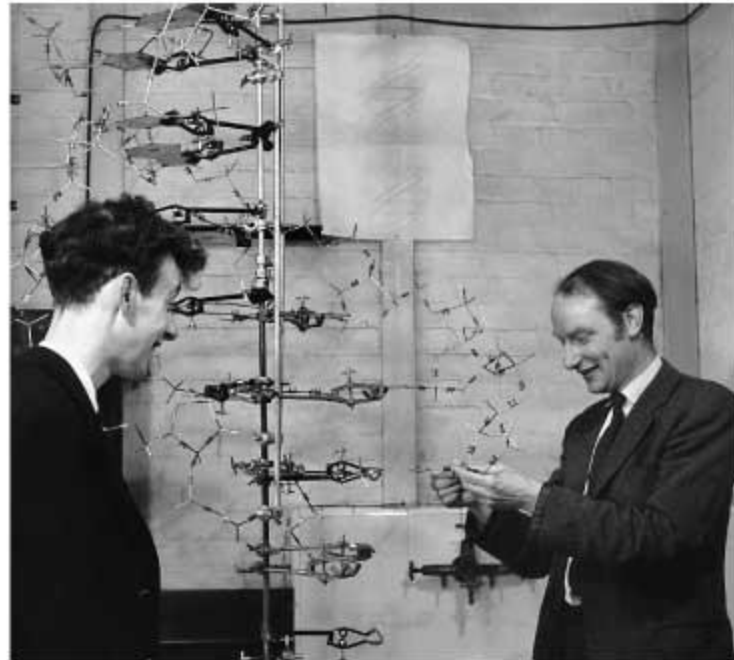
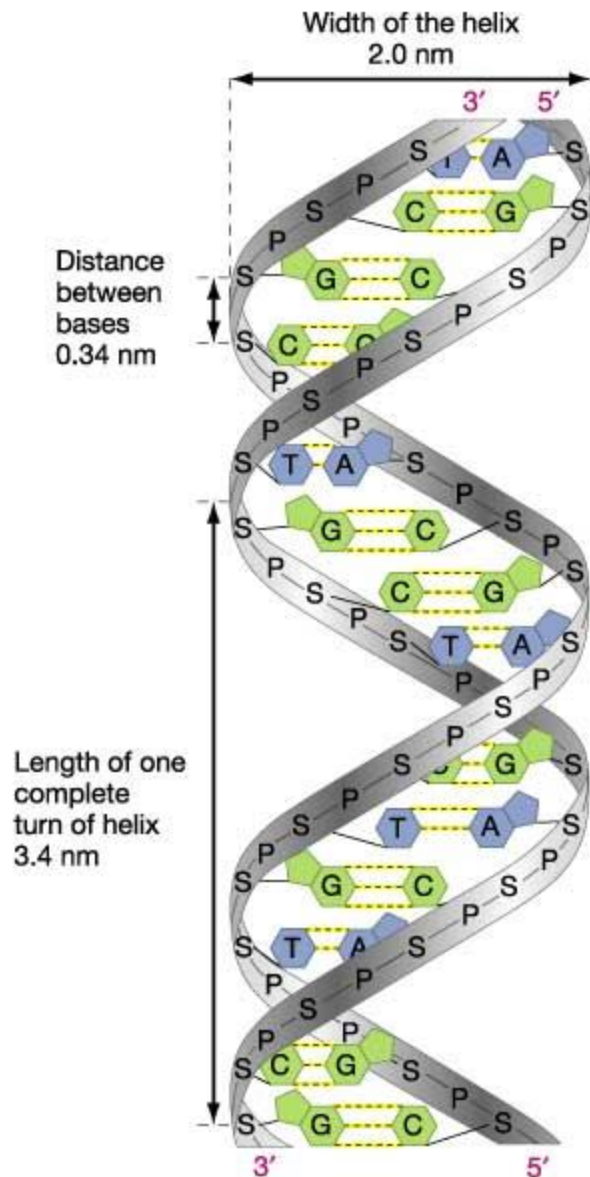
- fehérjék szerkezete
- fehérjeszintézis időbeli és mennyiségi meghatározása

Nukleinsavak: nukleotid egységekből felépülő polimerek.

RNS: adenin, guanin, citozin, uracil bázist tartalmazó ribonukleotidok

DNS: adenin, guanin, citozin, timin bázist tartalmazó dezoxi-ribonucleotidok

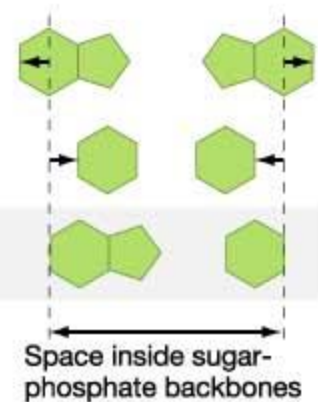


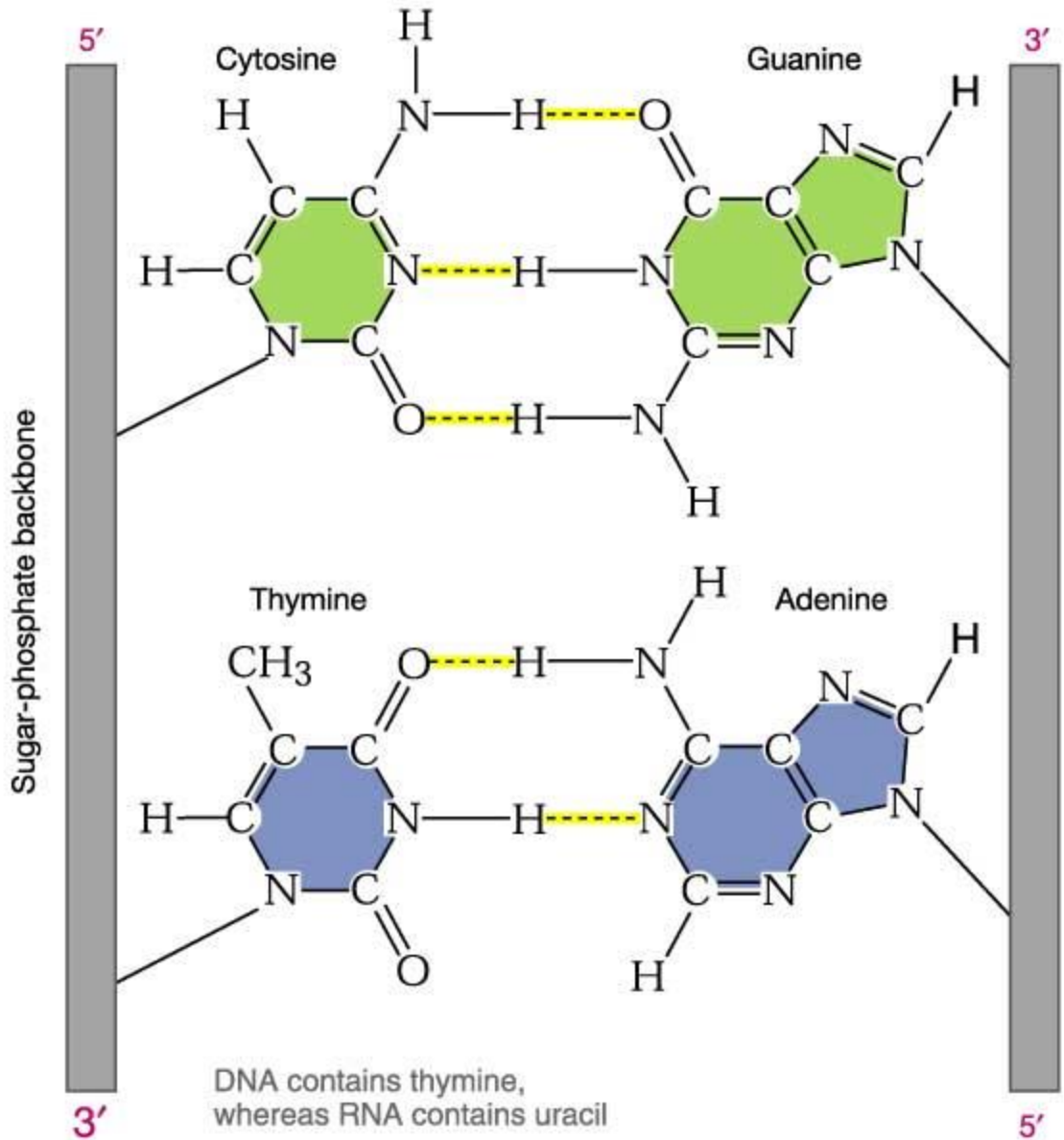


Purine-purine pair
TOO WIDE

Pyrimidine-pyrimidine pair
TOO NARROW

Purine-pyrimidine pair
JUST RIGHT





A DNS bázissorrendje egyedi: jellemző DNS részletek alapján tulajdonosa meghatározható

ATTCGGTAATCGATCGAAGGCATTCGTAGCTTAGGCATG
TAAGCCATTAGCTAGCTTCCGTAAGCATCGAATCCGTAC

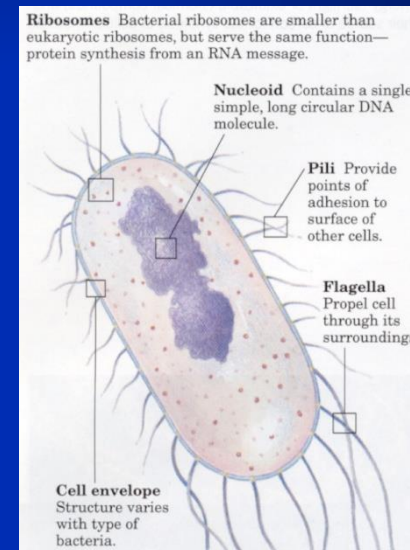
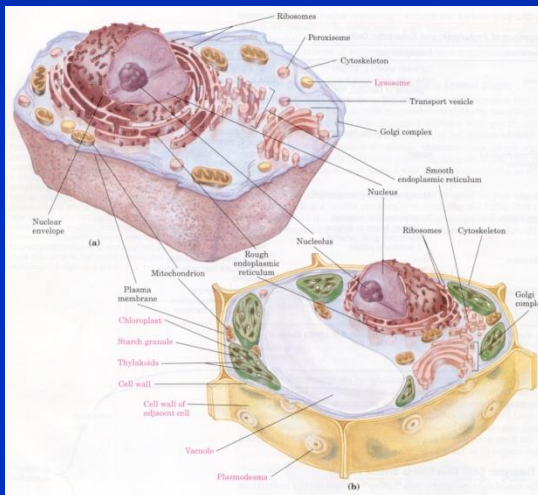
Ha ezt a DNS részletet ki tudjuk mutatni azzal meghatároztuk az adott élőlényt (vírust, baktériumot gombát, embert).

Hogyan tudjuk ezt a gyakorlatban megvalósítani?

DNS izolálás

1. **A sejt feltárása:** hipotóniás sokk, sejtfal emésztése lizozimmal, sejtfeltárás mechanikus feltátokkal (french press, BeadBeater, potter), ismételt fagyasztással-olvasztással

Membránok
megbontása
detergenssekkel,
enzimekkel
(Proteináz K)



2. **A sejt saját nukleázainak inaktiválása:** EDTA tartalmú pufferek használata (Ca^{2+} , Mg^{2+} ionok megkötése)

3. Szennyező alkotók eltávolítása: oldószeres extrakcióval (fenol/kloroform/izoamil-alkohol), szelektív kicsapással (fehérjék eltávolítása NH_4OAc , NaCl kicsapással)

4. A DNS szelektív kinyerése

A DNS kicsapása alkohollal (2-propanol, etanol)

Kromatográfiás módszerekkel

Az izolálás során nyert genomi DNS hosszú különböző mértékben fragmentálódott darabokból áll.

Nehezen kezelhető ebben a formában.

Hogyan tudjuk az általunk keresett gént kimutatni?

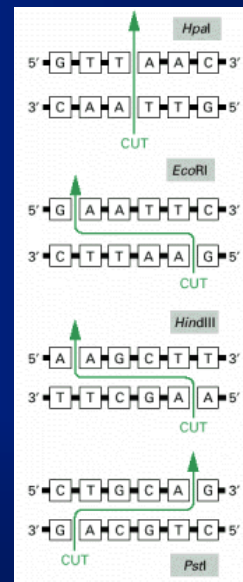


Restriktációs endonukleázok:

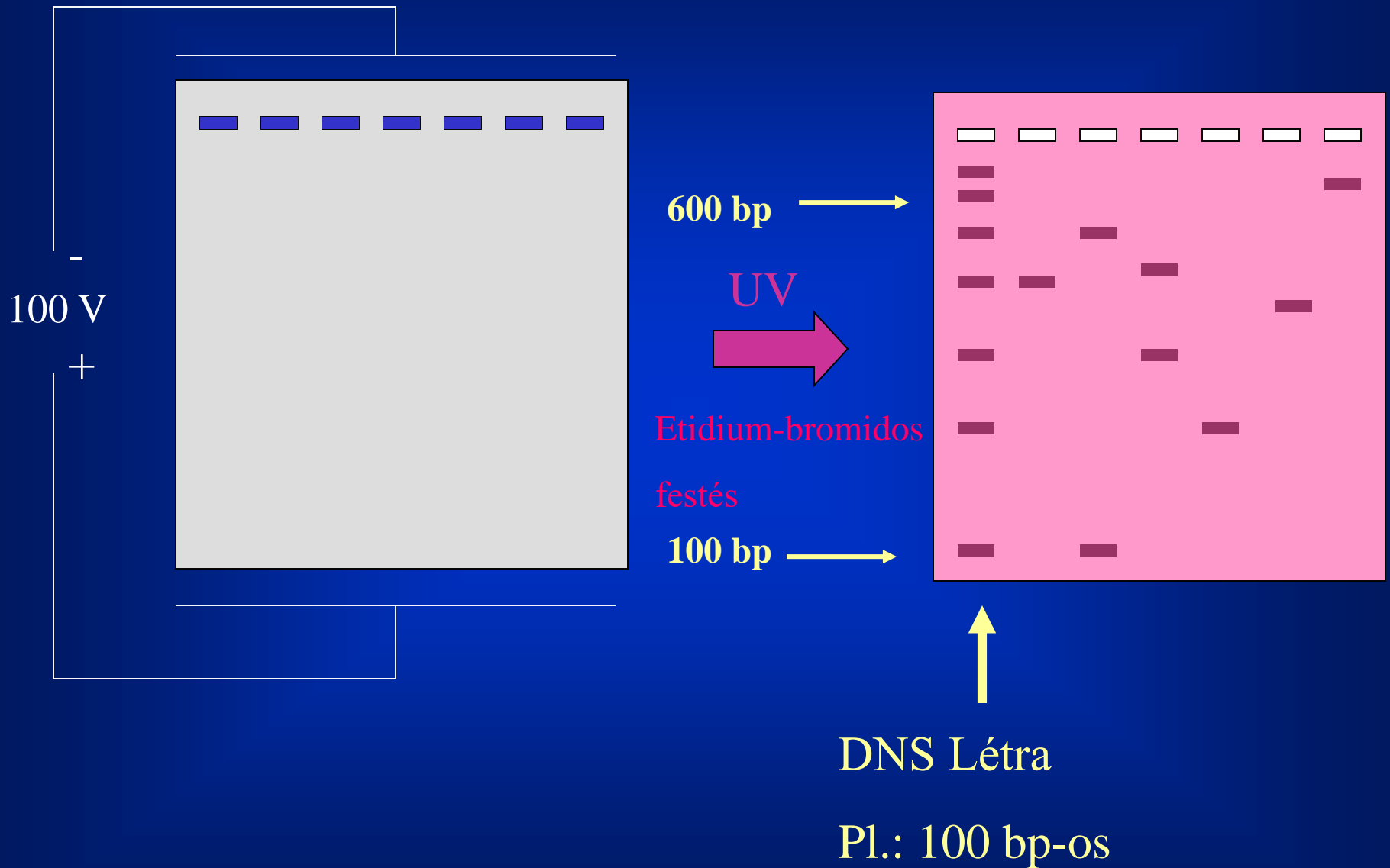
Jól meghatározott nukleotidszekvenciánál hasítják a kettősszalú DNS láncot

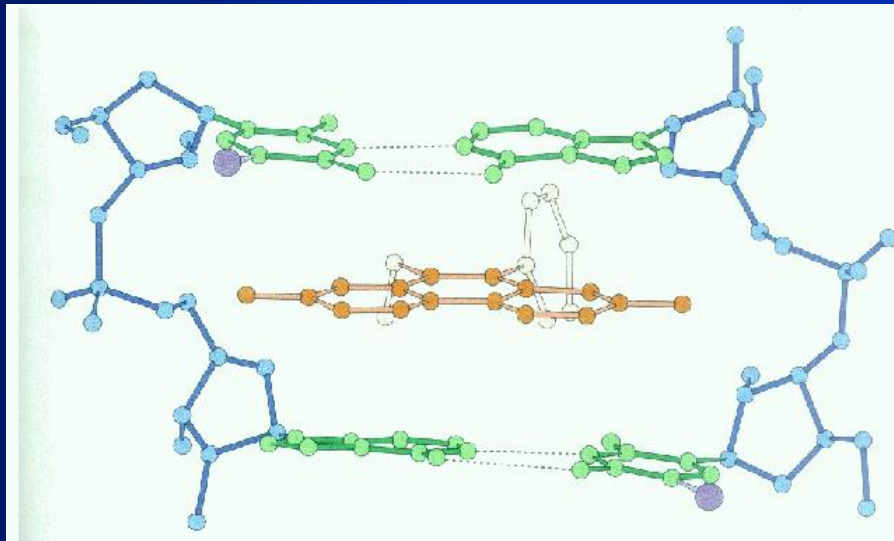
A keletkezett DNS fragmentumok hossza meghatározható

Elérhető, hogy egy adott gén bizonyos szakaszon belül legyen

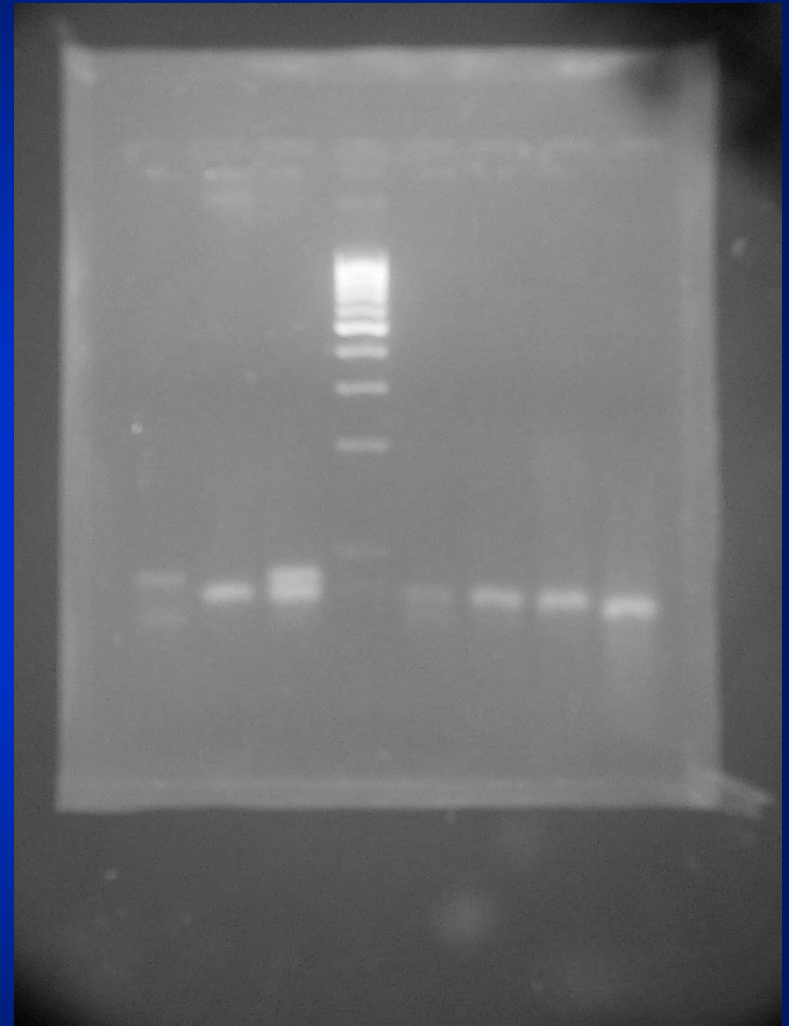


Gélelektroforézis: A DNS láncok méret szerinti elválasztása





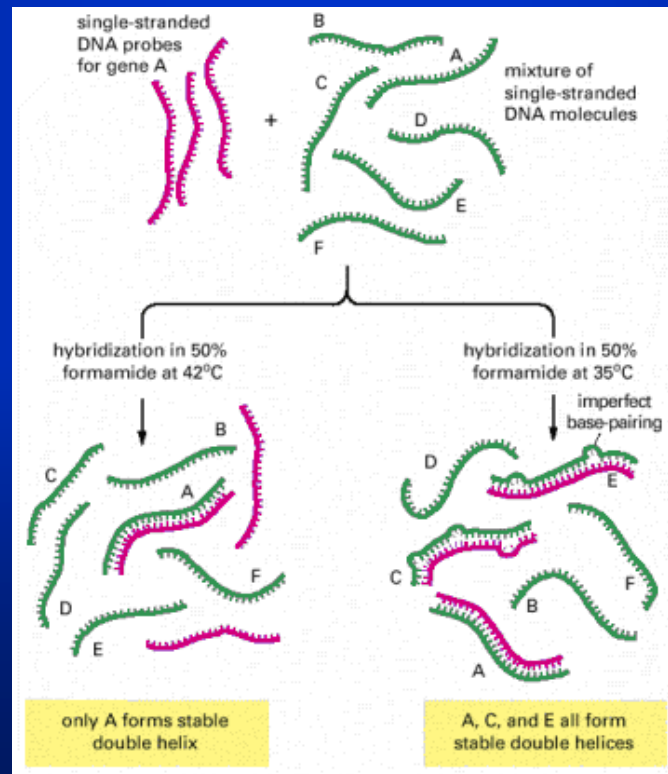
Az etidium-bromid a DNS bázisai
közé épül be: **veszélyes mutagén**



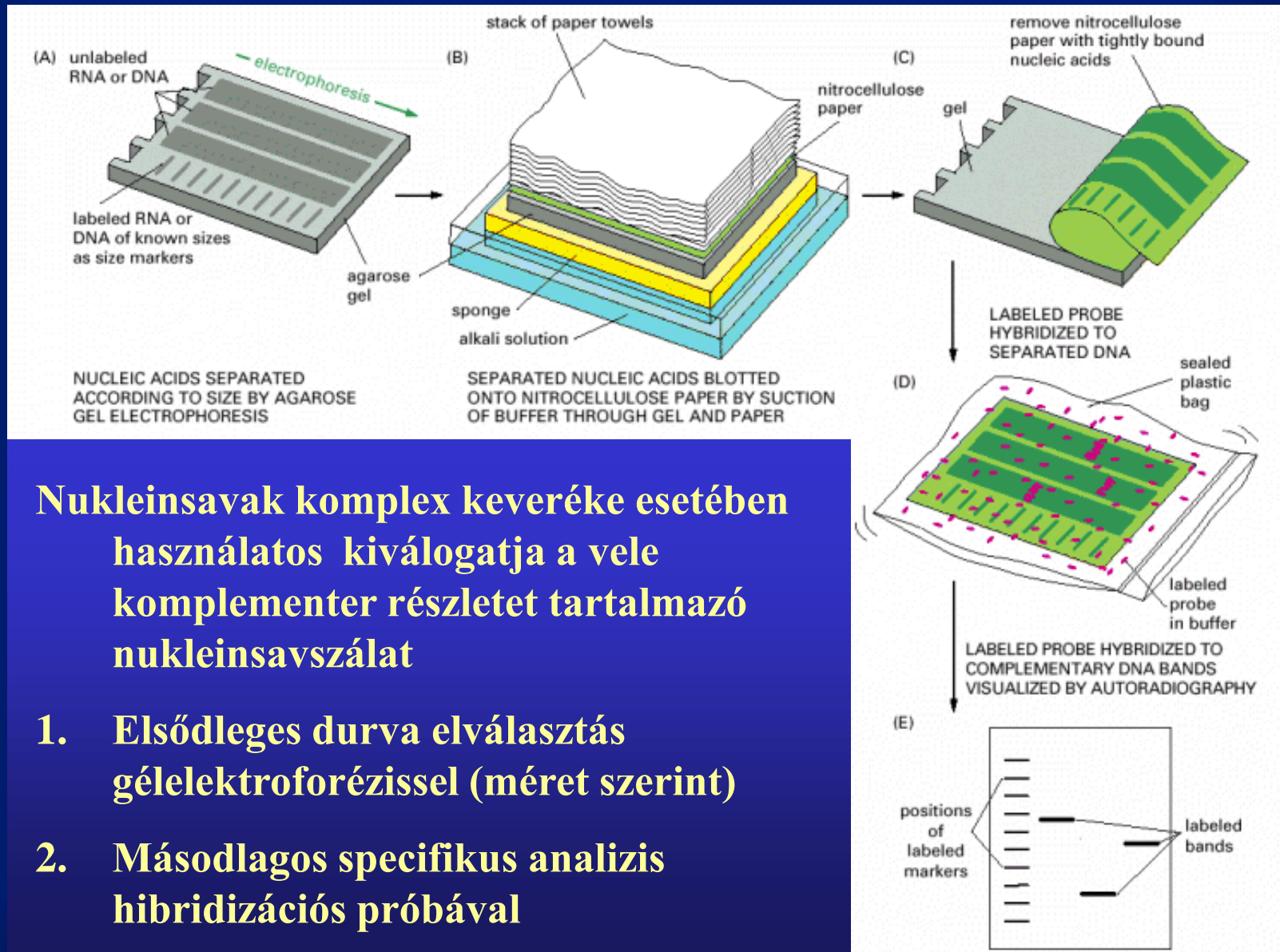
Nukleinsav hibridizáció

A DNS vizes oldatban 100°C -on, vagy lúgos pH-n szétbomlik szimpla szálakra. Ha huzamosabb ideig 65°C -on tartjuk újra kettősszálú szerkezetet vesz fel: hibridizál (renaturálódik).

Próba: 15 - néhány ezer bázispár hosszú jelölt (radioaktív, vagy fluoreszcens) nuleotidszakasz. Igen érzékeny és szelektív.



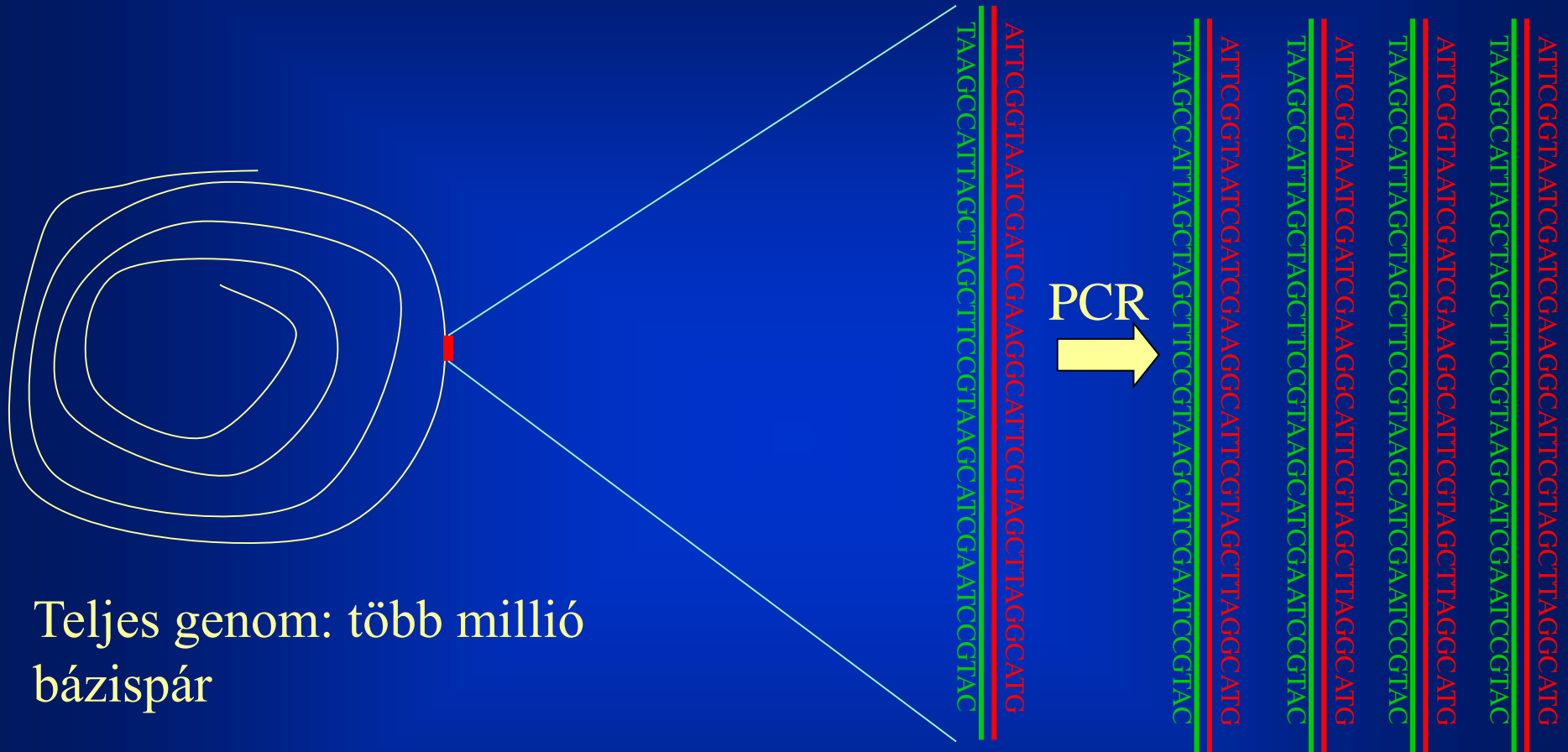
Northern és Southern blot



Nukleinsavak komplex keveréke esetében használatos kiválogatja a vele komplementer részletet tartalmazó nukleinsavszálat

- 1. Elsődleges durva elválasztás gélelektroforézissel (méret szerint)**
- 2. Másodlagos specifikus analízis hibridizációs próbával**

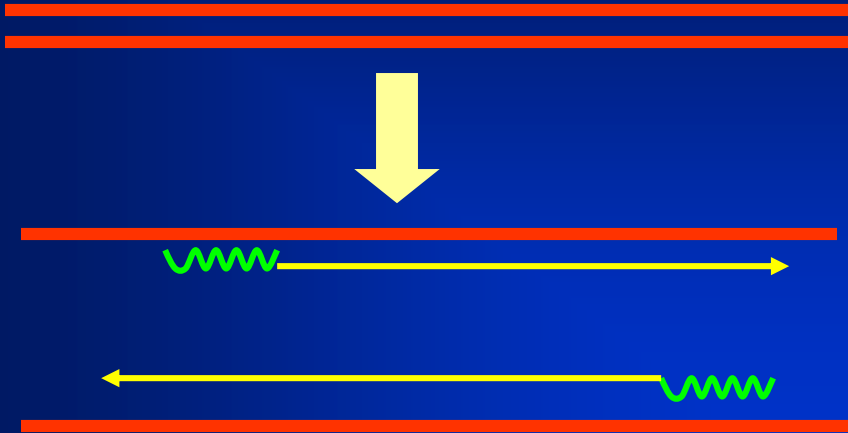
Polimerase Chain Reaction:PCR



Teljes genom: több millió
bázispár

PCR: általunk kiválasztott DNS részlet
mesterséges megsokszorozása

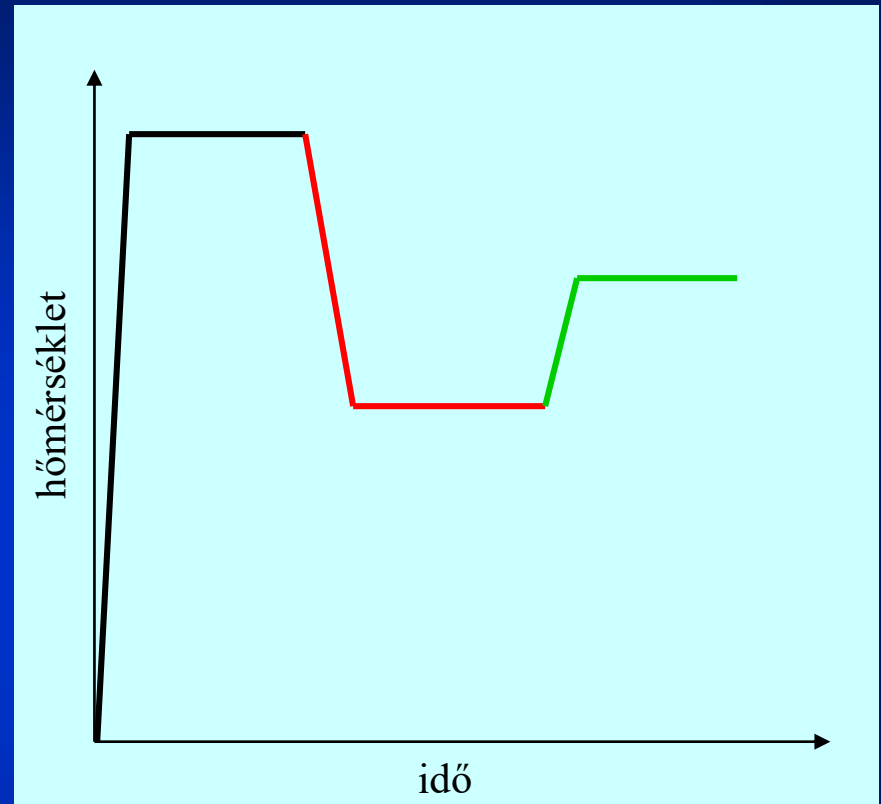
PCR hőciklus



1. Denaturáció: 95°C

2. Primerek betapadása 40-60°C

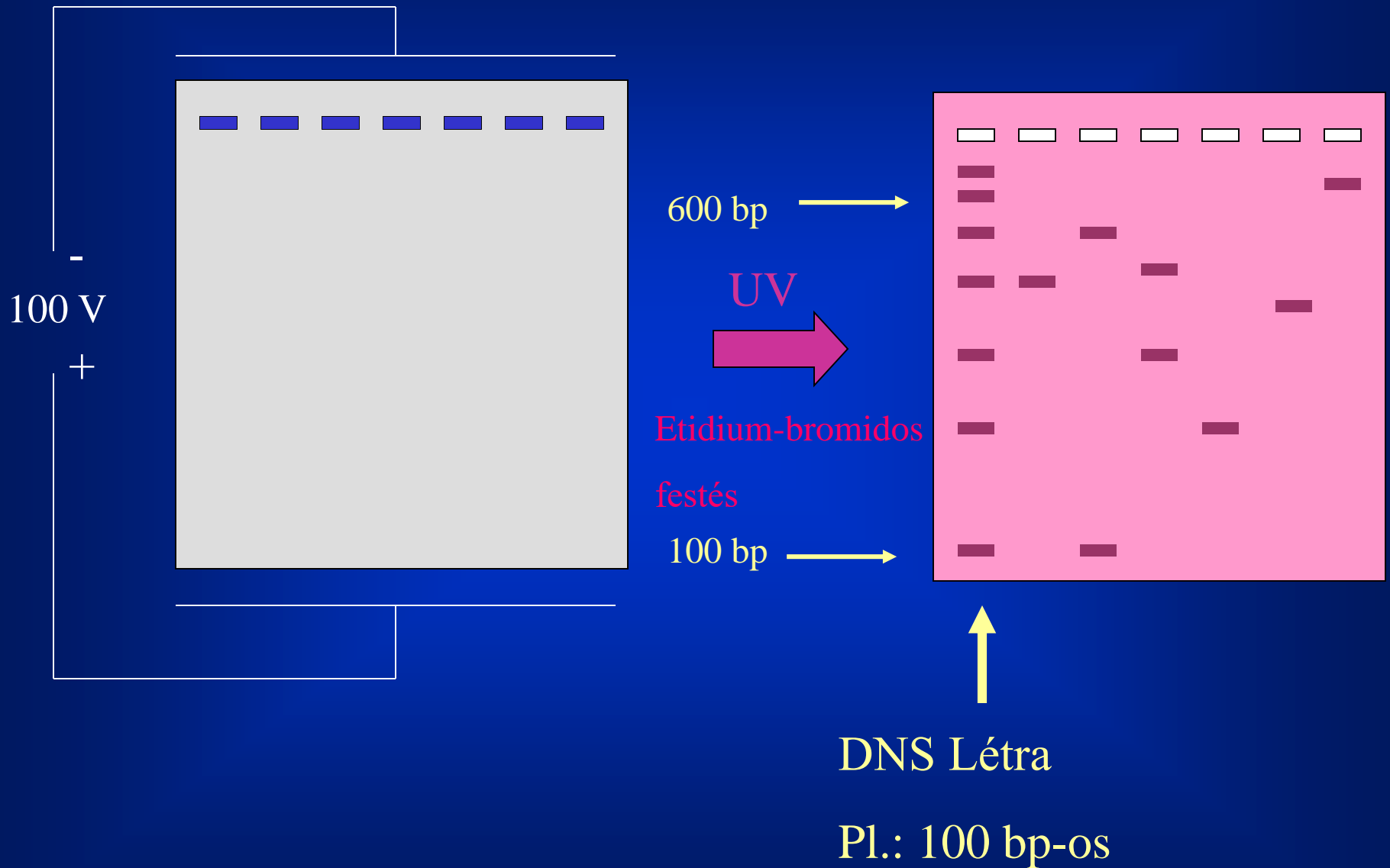
3. Polimerizáció 72°C



hozzávalók

- Templát DNS
- PCR puffer
- Primerek
- dNTP Mg^{2+}
- Taq polimeráz

Gélelektroforézis: A DNS láncok méret szerinti elválasztása



A PCR technika klinikai diagnosztikai alkalmazásai

Monogénes öröklésmenet

letális/kezelhető betegségek

prenatális diagnosztika

Rizikófaktorok

poligénes öröklésmenet pl.: NIDDM

DNS minta eredete

- invazív mintavétel:

- vércsepp

- CVS (korionboholy)

- nem invazív mintavétel:

- Bucca sejtek

- haj

- köröm

Idegen genom azonosítása

baktérium, vírus, gomba

Kimutatásuk: specifikus primerrel: van-e PCR termék?

DNS ujjlenyomat

- apasági perek
- kriminológia

1. Hosszúságpolimorfizmus vizsgálata PCR-rel

- deléciók
- duplikációk
- ismétlődési polimorfizmusok

Huntington-chorea

Nukleotid triplet ismétlődések az egészséges ember genomjában is megtalálható.

Bizonyos ismétlődési szám felett  betegségek kialakulása

Három fő csoportra osztható

1. CGG triplet jelentős expanziója: jellegzetes példa a fragilis X-szindróma; a CGG megsokszorozódás nem kódoló régióban történik, a kromoszóma törékenységet eredményez
2. CAG triplet viszonylag kis számú ismétlődése: jellegzetes példa a Huntington betegség. Az ismétlődés kódoló szakaszban található: poli glutamin részletek \longrightarrow késői megjelenésű neurodegeneratív elváltozások
3. CTG triplet igen nagyszámú ismétlődése, nem kódoló régióban

A Huntington betegség patogenezeise

Az agykéreg, a nucleus caudatus kiterjedt atrophiaja jellemzi.

Oka: a fehérjékben lévő poliglutamin részek egymással H-hidakat alakítanak ki \longrightarrow a proteázok nem tudják lebontani őket
 \longrightarrow felhalmozódnak a sejtekben

Tünetek:

Rendszerint lassan kezdődik, arc, végtagok szabálytalan, rövid tartamú mozgása (GABA jelentős csökkenése → dopamin felszabadulás nem gátolt)

Később: ujjak nyughatatlansága, beszéd, nyelés nehezített

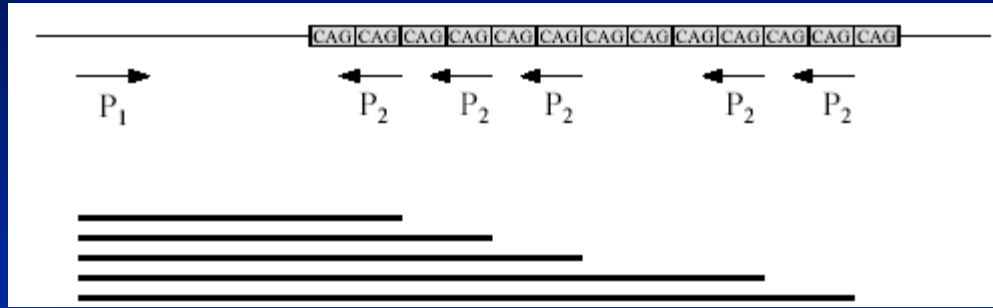
Még később: személyiségváltozás, demencia, majd halál

Lefolyás időtartama: 9-17 év.

Diagnosztika: az ismétlődések számának meghatározása

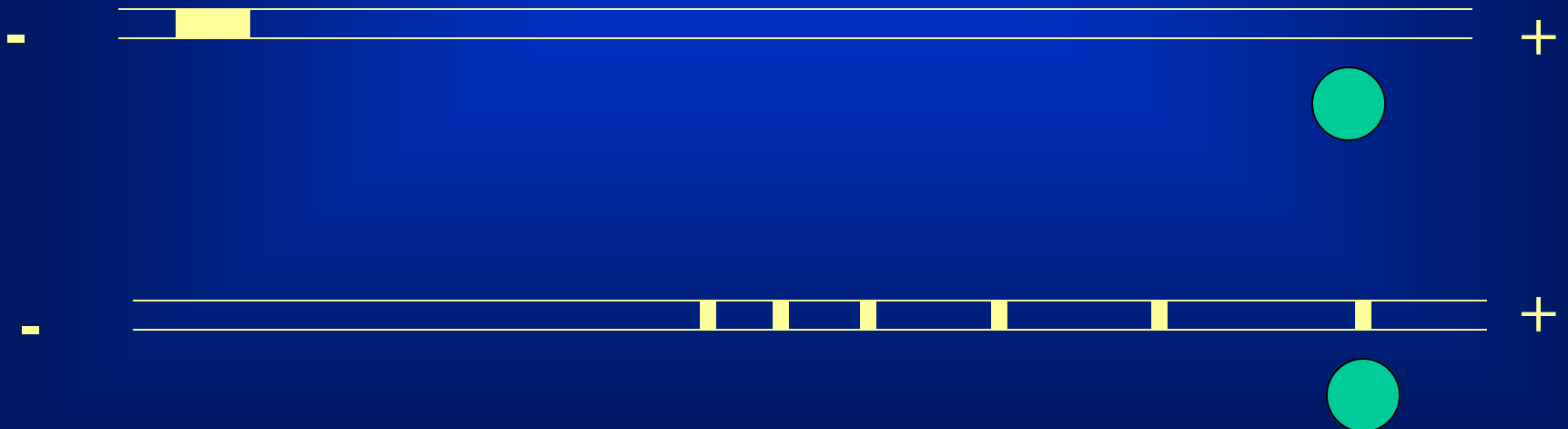
Két primer segítségével

1. Ismétlő részen kívül
 2. Ismétlődő részhez
- } kapcsolódik



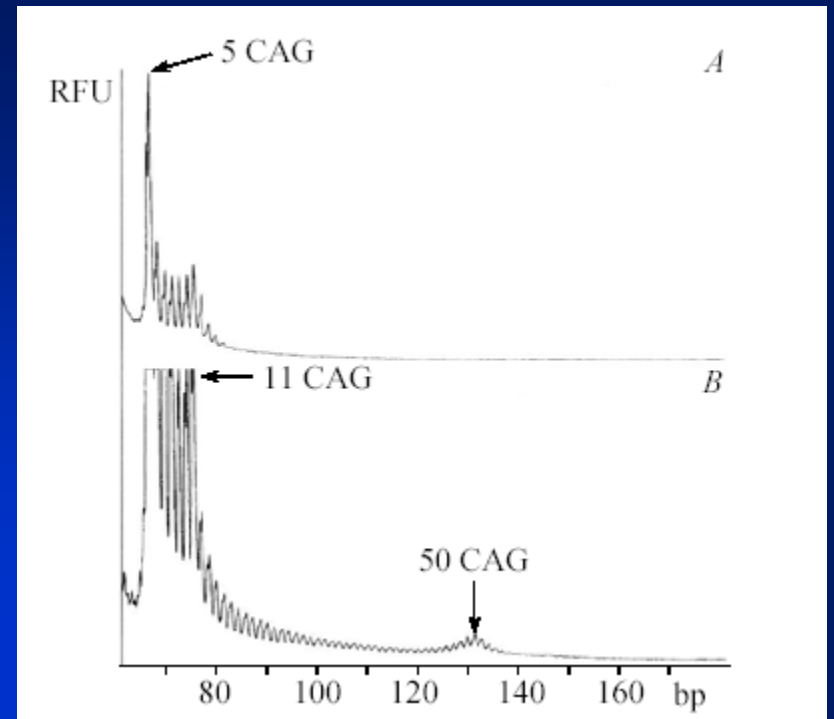
Egyetlen PCR terméket kapunk ← A hosszúsága utal az ismétlődések számára

A termékek között kis méretbeli különbség → kapilláris elfo



Eredmény: elektroforetogram

Ki a beteg?



STR lókuszok, DNS ujjlenyomat

STR: short tandem repeat. Nem kóros ismétlődő szekvenciák

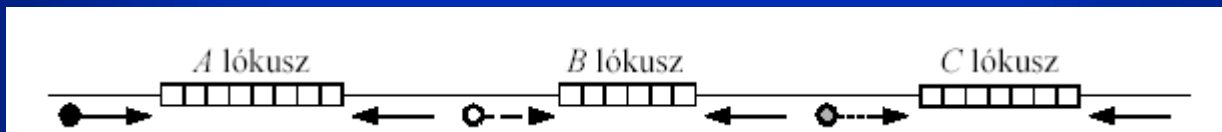
Átlagosan 2-7 bp hosszúak Nem kódoló részen található

Egyedi ismétlődési mintázat



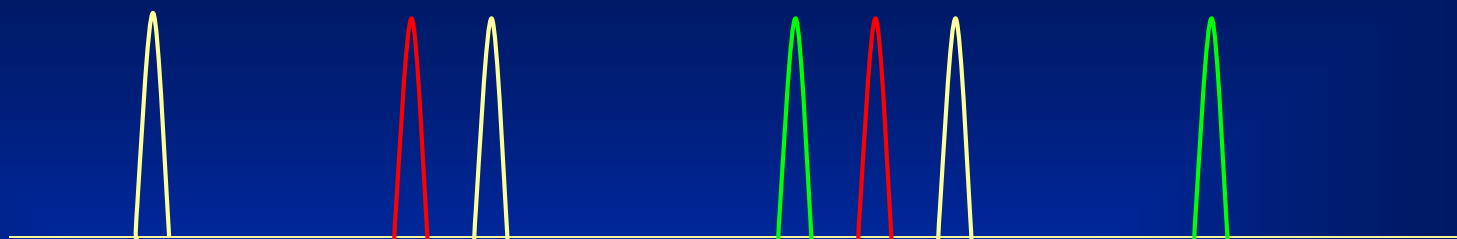
Személyazonosításra felhasználható → DNS ujjlenyomat

A vizsgálat az STR lókuszok hosszúságpolimorfizmusán alapszik

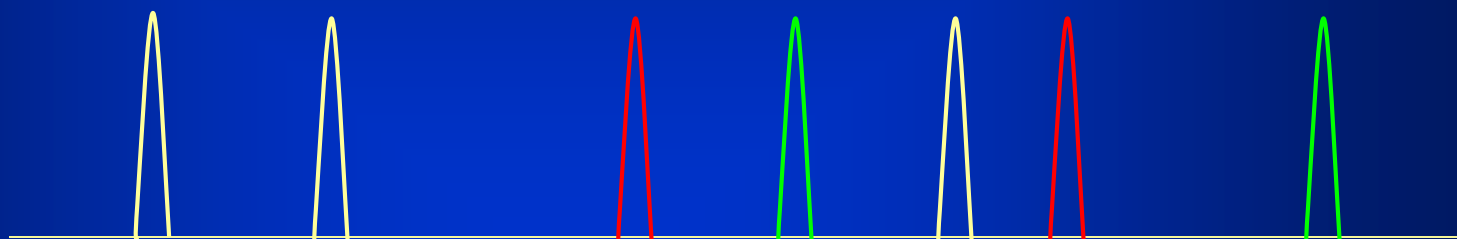


A PCR termékeket kapilláris elektroforézissel választják el.

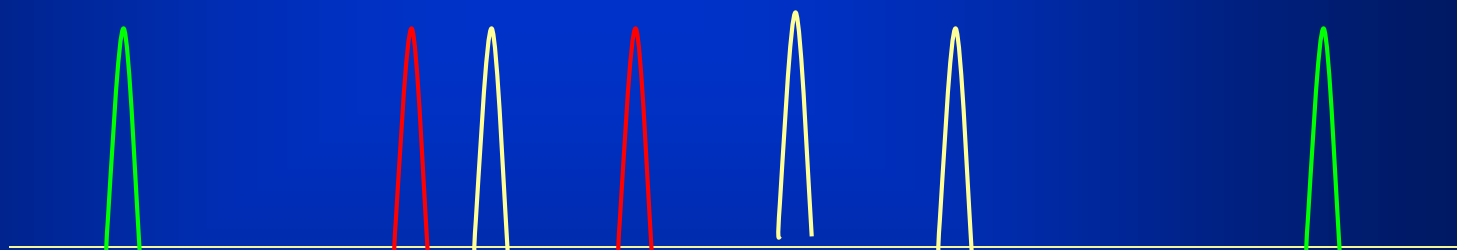
Anya



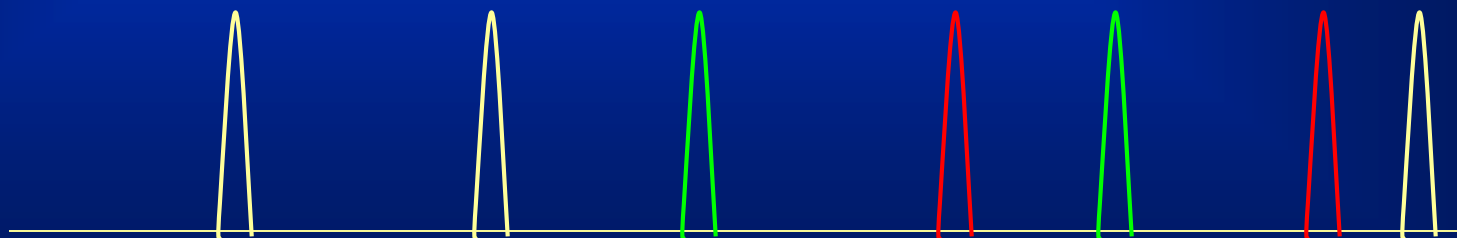
Gyerek



Férfi 1



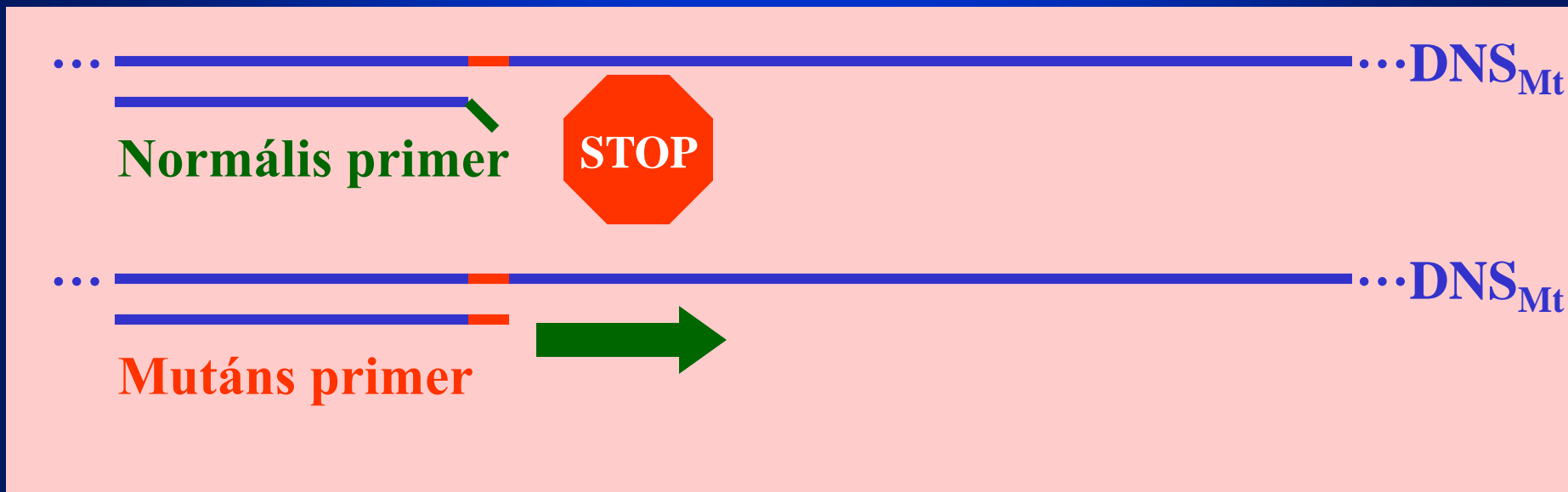
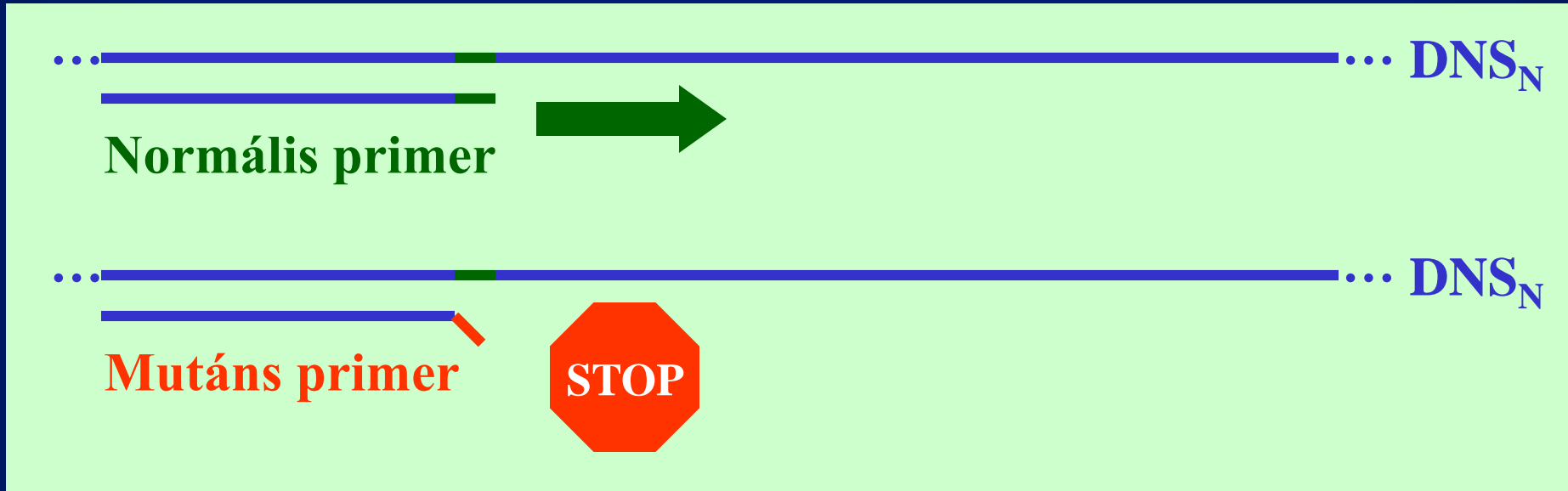
Férfi 2



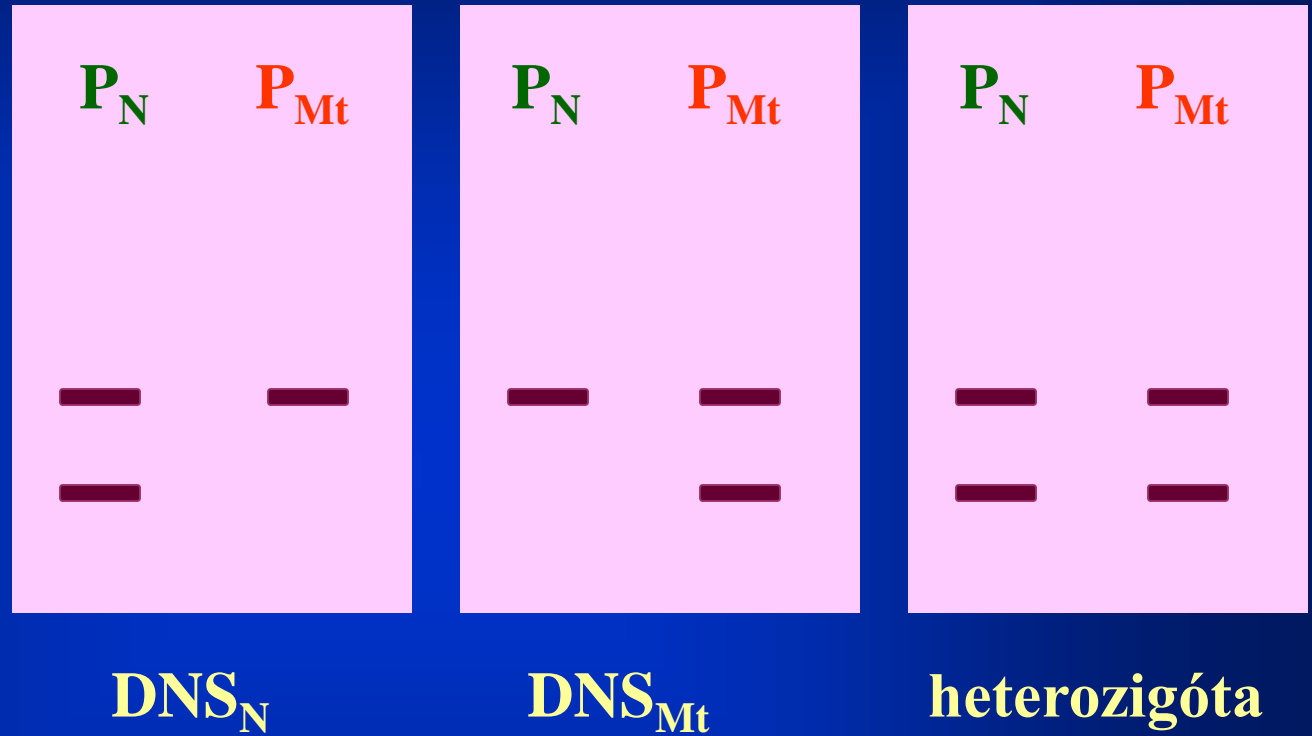
bp



Pontmutációk kimutatása: Allél Specifikus Amplifikáció (ASA)



Genotípus meghatározása ASA-val



Sarlósejtes anémia

Hemoglobin: 4 polipeptidlánc + 4x1 hem

Hb A (adult): 2 db α lánc (16-os kromoszóma)
2 db β lánc (11-es kromoszóma)

Sarlósejtes anémia: pontmutáció okozza

GAG \longrightarrow **GTG** csere, ami **Glu** \longrightarrow **Val** eredményez



Hb S: belefekszik a szomszédos Hb β -lánc hidrofób részébe: hosszú füzéreket képez, oldhatósága csökken, a vvt.-eket sarló alakúra deformálja

Autoszomális domináns öröklésmenet

A tünetek háttere: a Hb S-t tartalmazó rugalmatlan, deform vvt-ek elzárják a kapillárisokat.

Homozigóta: csecsemőkori halál, növekedési fejlődési rendellenesség

Heterozigóta: általában csak hipoxiás körülmények között manifesztálódó tünetek

- **gyerekekben lépkárosodás \longrightarrow fokozott szepszishajlam**
- **végtagfájdalmak a csontok hipoxiája miatt**
- **pneumonia**
- **nehezen gyógyuló fekélyek**
- **elhalások vesében, agyban, hasnyálmirigyben, májban**

Kezelés: tünetek enyhítése pl.: antibiotikus tüdőgyulladás terápia, súlyos esetben transzfúzió

Aktivált protein C rezisztencia – Leiden mutáció

Protein C: az ér pályán belüli véralvadás elkerülését biztosítja

Véralvadás, trombin



trombomodulin-
trombin

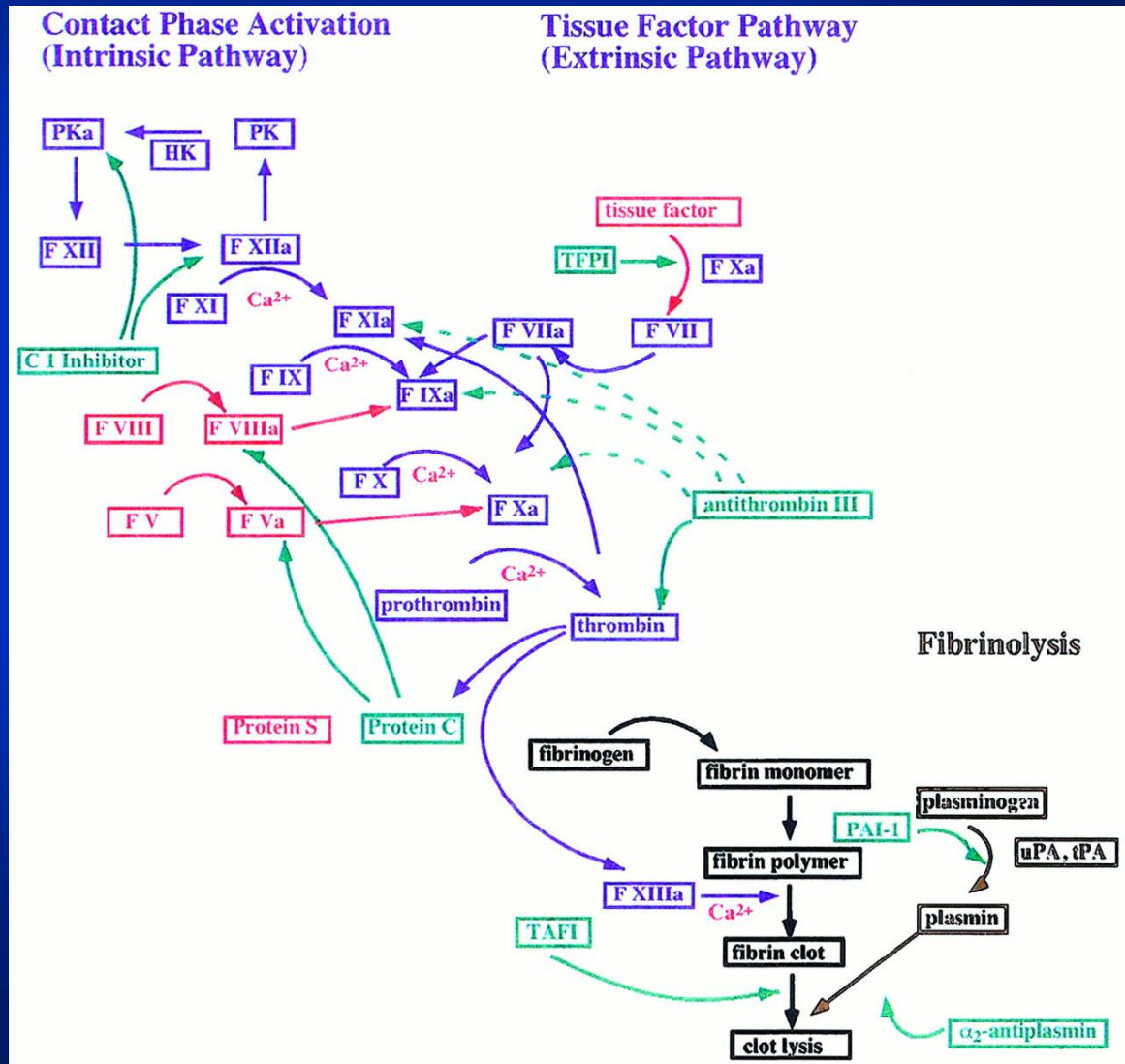


protein C aktiváció

Foszfolipid membrán
Protein S
Ca²⁺



Inaktíválja az aktív
V és VIII faktort



Leiden-mutáció: V. véralvadási faktor génjében létrejövő pontmutáció

Következmény: 506. aminosavban Arg → Glu csere



Az aktívált protein C hasítási helye: nem fogja az aktív V faktort hasítani → hiperkoagulációs állapot

A vénás trombózis kockázata

Heterozigótákban: 5-10-szeres

Homozigótákban: 50-100-szoros

Diagnosztika: APC hatására normát vérben megnyúló, Leiden mutációt hordozó vérben nem változó PTI

Genotípus meghatározása: allél specifikus amplifikáció

Cysticus Fibrosis

A fehérbőrű népesség leggyakoribb életet veszélyeztető genetikai megbetegedése (1/2500)

Oka: egy membrántranszport fehérje defektusa

Több, mint 700 mutáció ismert (mind a 7. kromoszóma hosszú karján egyetlen lókuszon fordul elő)

CF gén: 250 Kb hosszú 1480 aminosavból álló fehérjét a cyticus fibrosis transmembrane conductane regulator (CFTR) kódolja

A betegség háttere 80-90%-ban ugyanaz a 30 mutáció

Ezek közül kiemelkedik a 10. exon egy CTT tripletjének deléciója (esetek 60-70%-ban megtalálható) —————> egy Phe kiesése

A mutáns fehérje elméletileg működőképes azonban az ER minőségkontrollján megbukik és lebontásra kerül.

CFTR feladata: ioncsatorna Cl^- és víz halad keresztül rajta

Mutáció

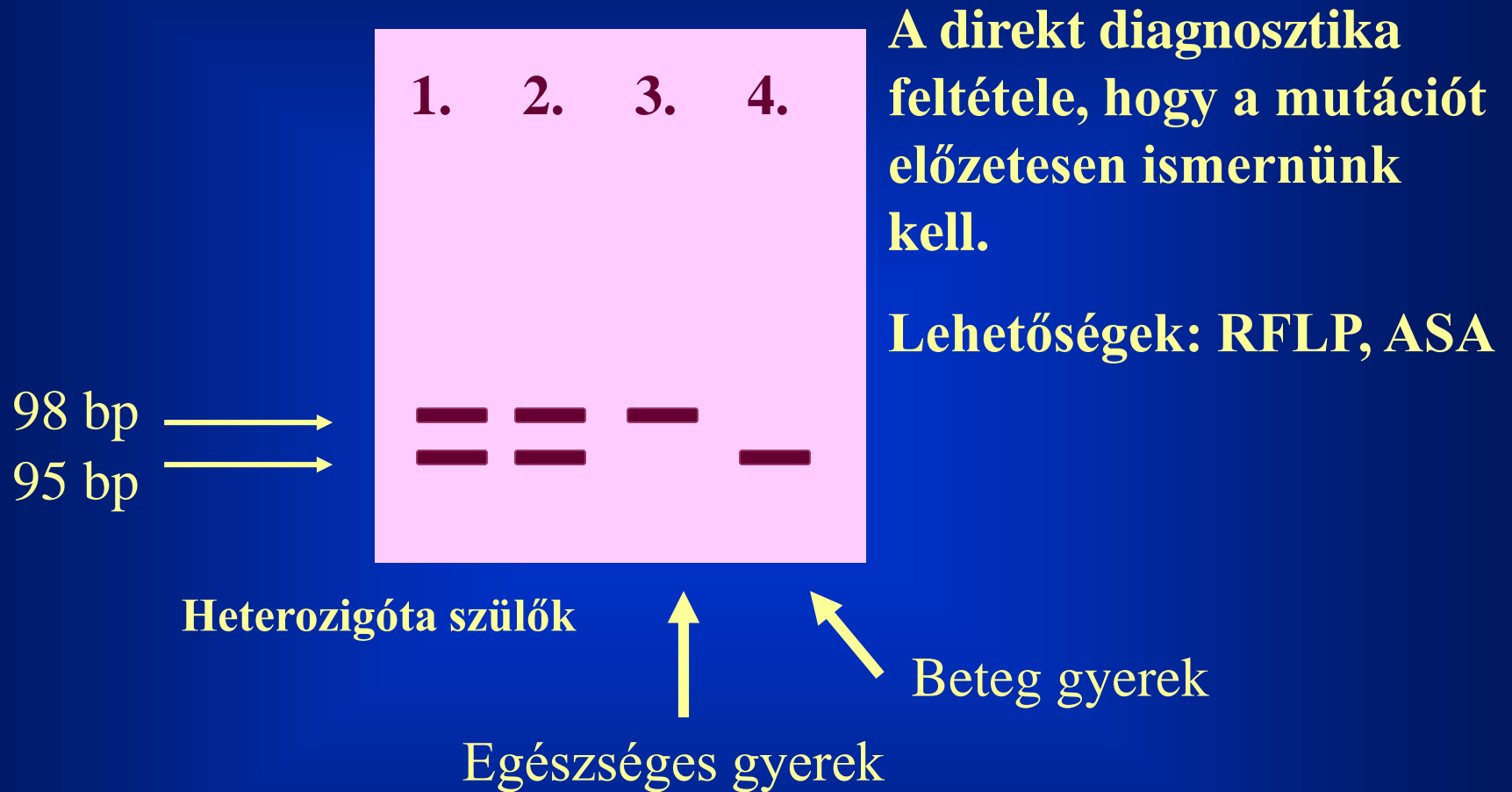
Cl^- transzport teljes kiesése

Felborul a Na^+ és Cl^- közötti egyensúly: a nyálkahártyák nedvesítése helyett sűrű nyák képződik → váladékpangás a külső elválasztású mirigyekbe

Ciszták képződnek → fibrozis

A tüdő 90%-ban érintett, gyakori tüdőgyulladás, a béltartalom elzárhatja az ileumot, a hasnyálmirigy érintettsége emésztési problémákat okoz. A verejtékmirigyek érintettségének következménye a nagyon erősen sós ízű bőr.

A cysticus fibrosis direkt diagnosztikája



A direkt diagnosztika feltétele, hogy a mutációt előzetesen ismernünk kell.

Lehetőségek: RFLP, ASA

Prenatális diagnosztika:

Génhordozók gyakorisága: $1/25$, minden 625 házasság heterozgóták között jön létre, gyerekek: 25% egészséges, 25% homozigóta beteg, 50% heterozigóta hordozó

Terápia: tünetek kezelése

Génterápia: 2 féle vektor



integrálódik a gazdagenomba
(retrovírusok)

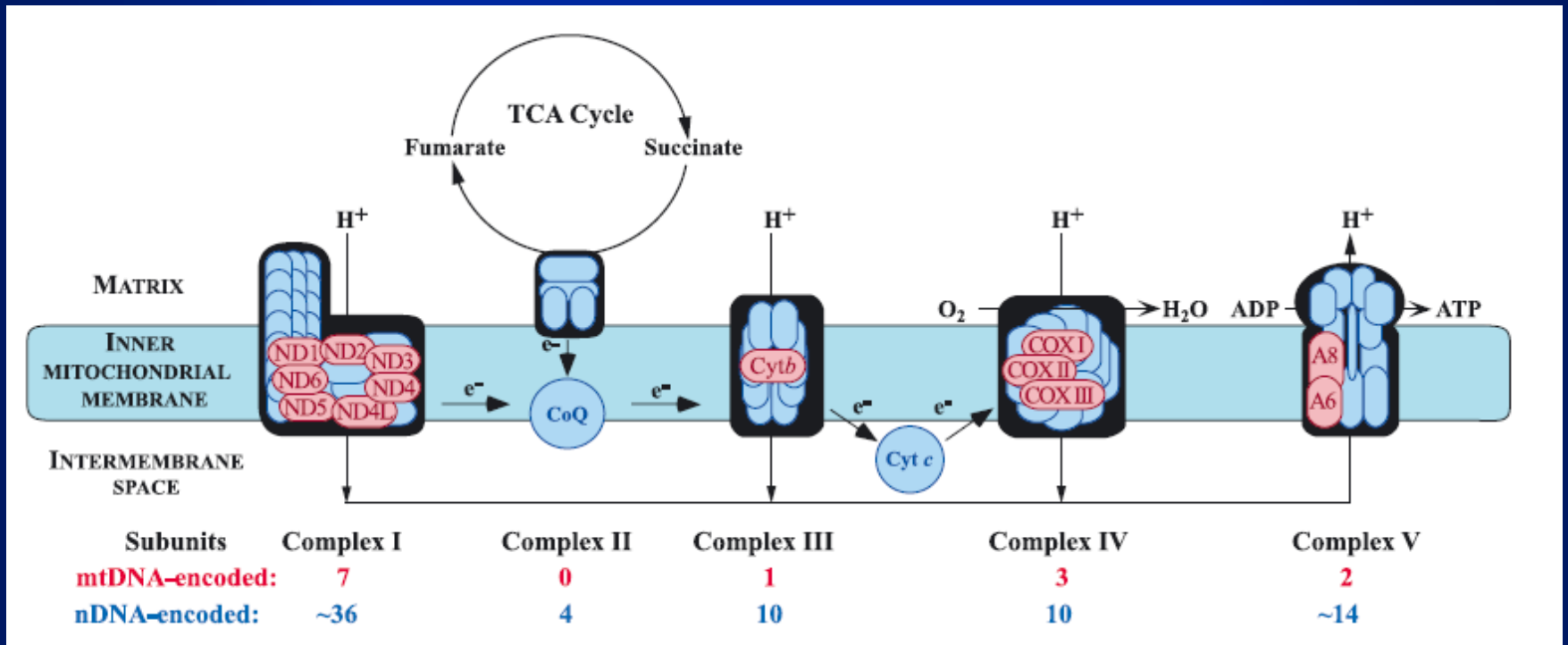
Előny: állandó expresszió

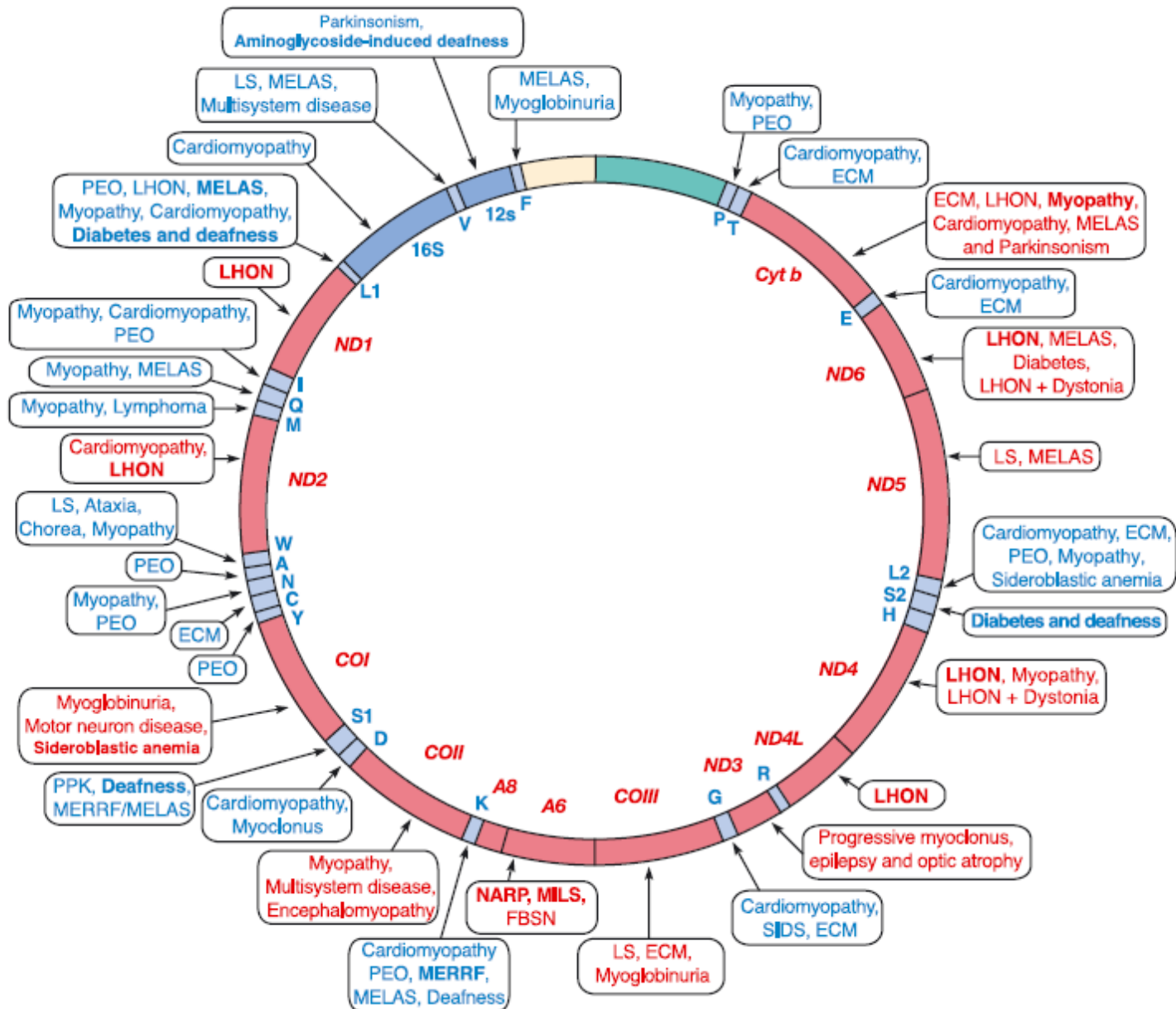
Hátránya: könnyen elfajul

nem integrálódik a gazdagenomba:

Állandóan utána kell fertőzni
(adenovírus kedvelt vektor)

Mitokondriális betegségek





A PCR felhasználhatósága

Fontos korlát: a nem élő sejtek DNS-t is megsokszorozza

Lehetséges megoldás: RT-PCR



Kimutatási határ E. coli O157:H7 esetében

PCR	10 ² -10 ⁵ CFU/ml
Multiplex PCR	1-2 CFU/ml
RT-PCR	10 ⁷ CFU/ml

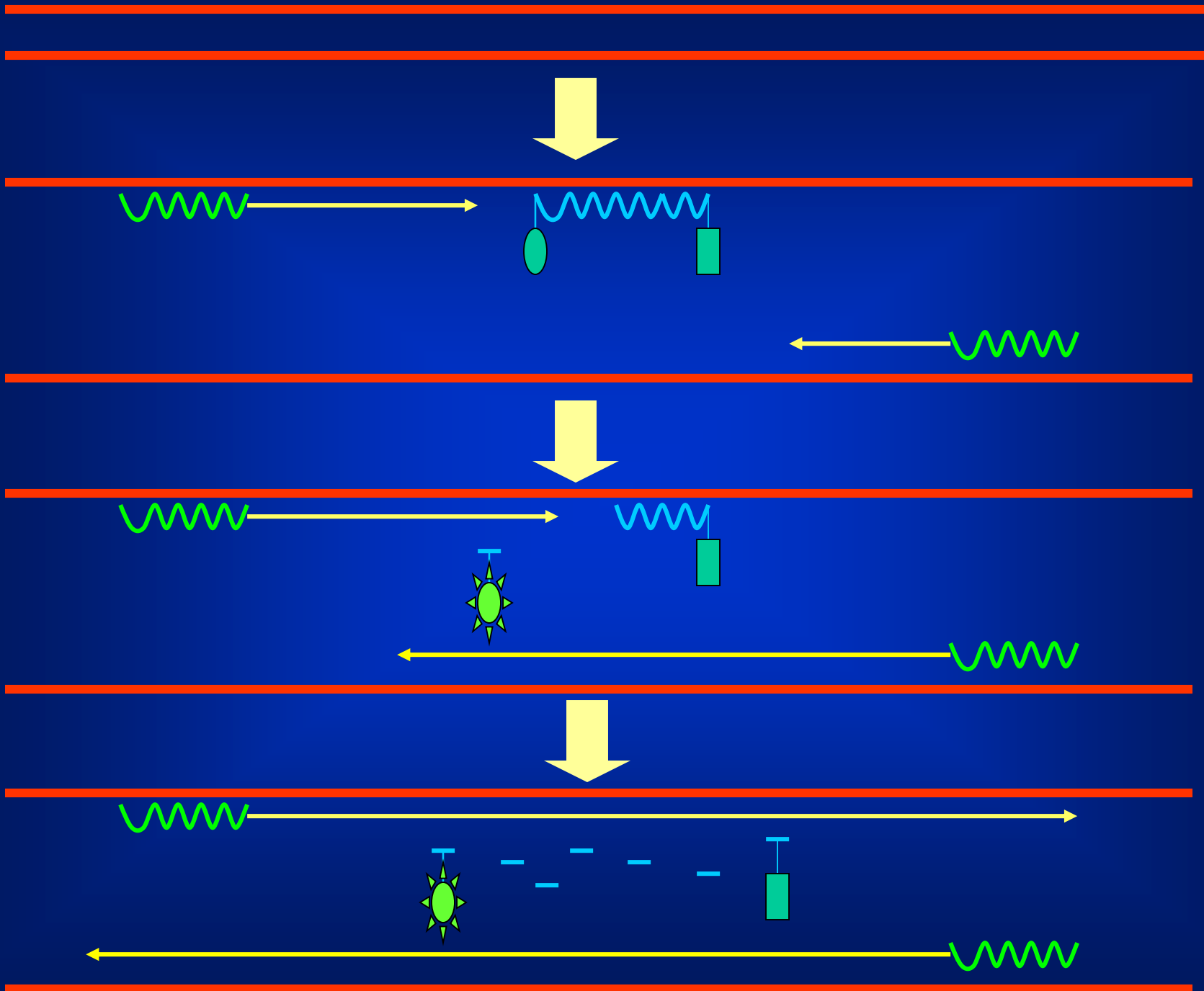
Mennyiségi DNS analízis igénye

A PCR és az azt követő gélelektroforézis nem alkalmas mennyiségi DNS meghatározásra.

A megoldás: real-time PCR

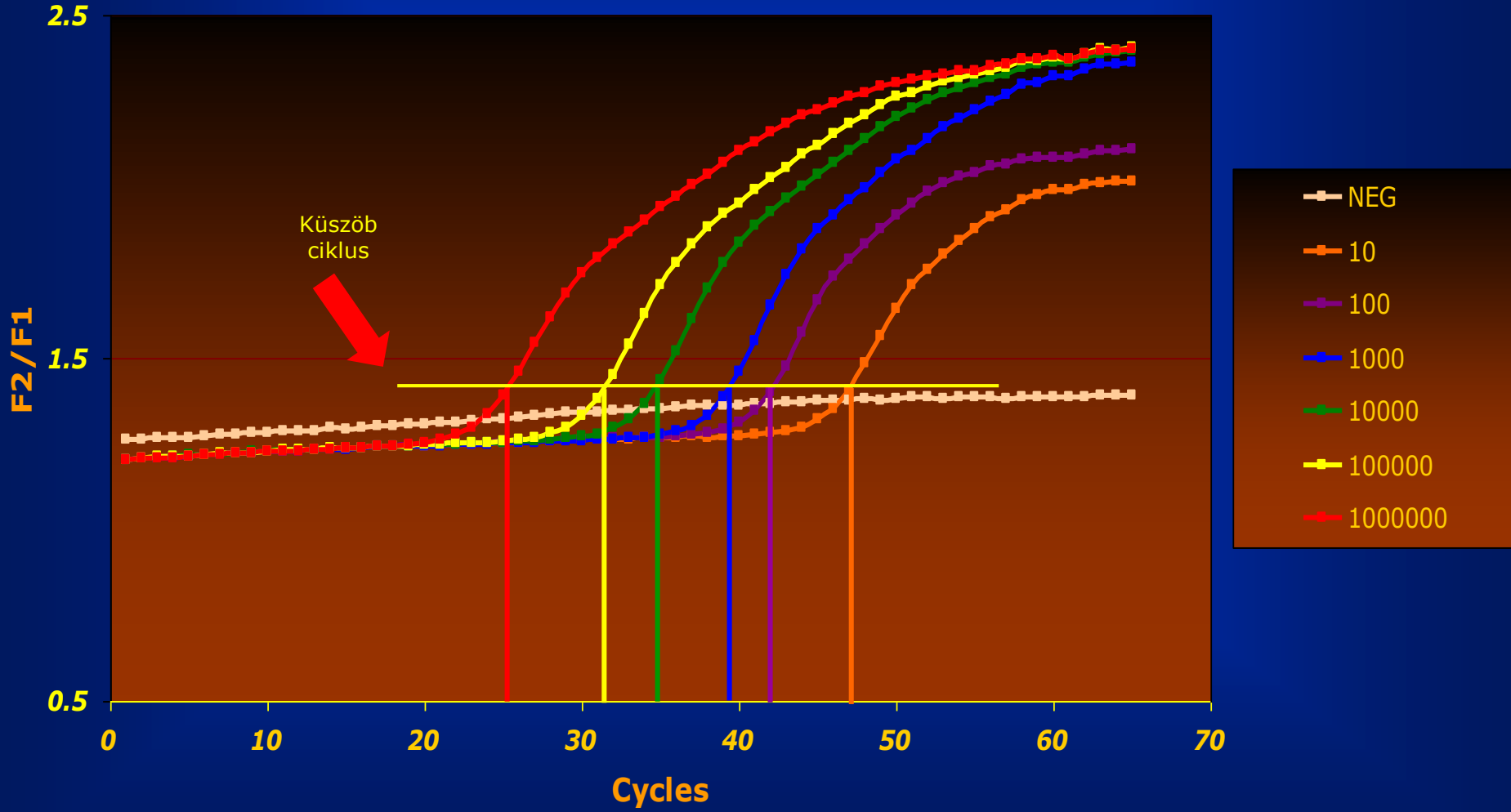
A DNS aktuális mennyisége nyomon követhető:

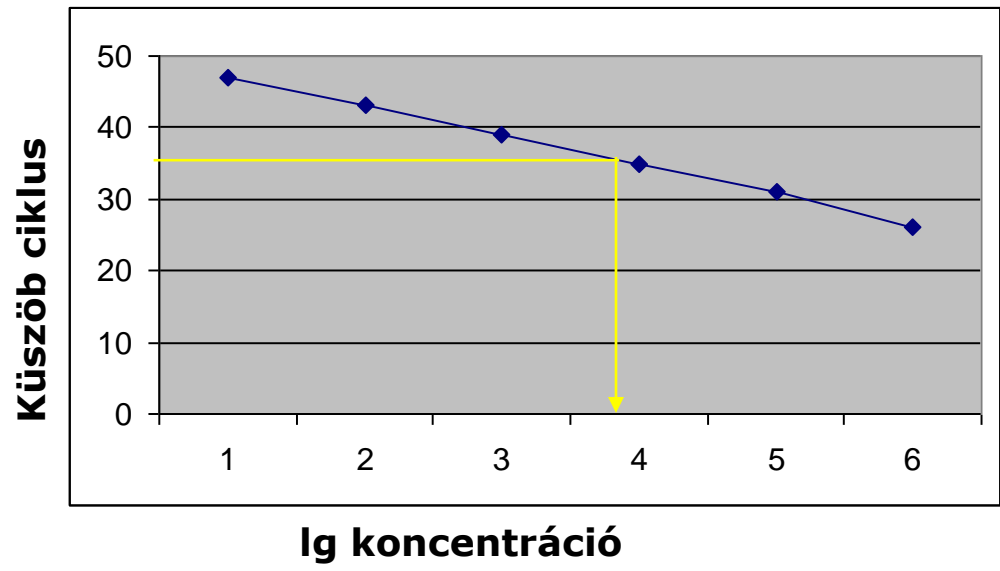
1. fluoreszcens festék
2. fluoreszcensen jelölt hibridizációs próba (TaqMan próba segítségével)



real-time
real-time
real-time
real-time
PCR quantitation

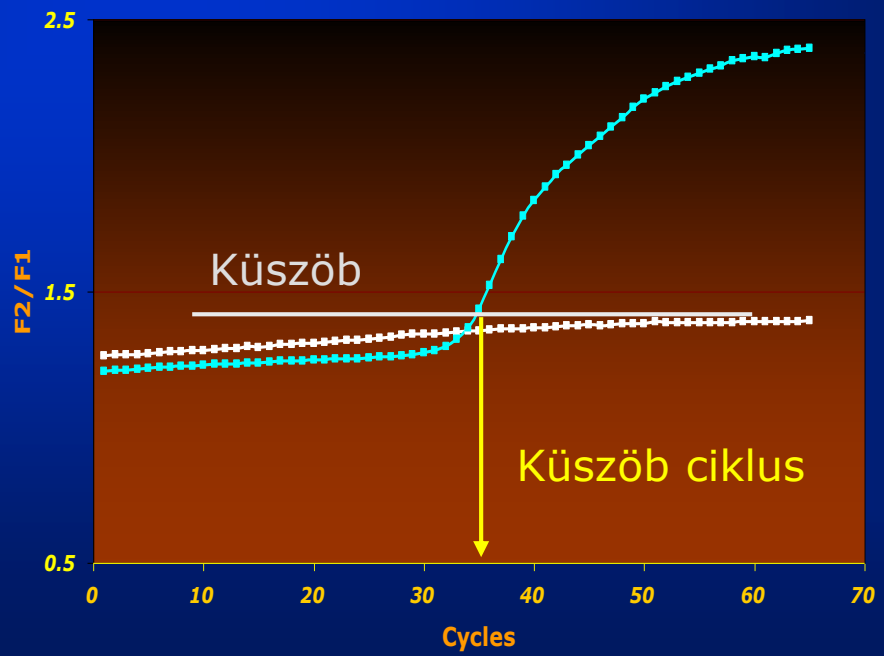
Microbial Load Testing





Küszöb ciklus = 35
 Felvitel = $10^{3.8}$ kópia/ml

Teszt Minta



A REAL-TIME PCR hátrányai

- A jelenlegi technológiai szint multiplex PCR esetében, csak 2 célszekvencia egyidejű detektálását teszi lehetővé
- A protokollok kifejlesztése magas szintű technikai ismereteket követelnek meg (magas szintű K+F igény)
- Drága berendezések reagensek (10 000 000 Ft felett).

REAL-TIME PCR előnyei

- ✓ Gyors (1 óra)
- ✓ Magas minta kapacitás (~200 minta/nap)
- ✓ Alacsony szennyezési kockázat (zárt, lefóliázott reakció)
- ✓ Nagyon érzékeny (3pg vagy 1 genom ekvivalens DNS)
- ✓ Széles dinamikai tartomány ($10 - 10^{10}$ kópia)
- ✓ Reprodukálható (CV < 2.0 %)
- ✓ Mennyiségi analízis lehetősége
- ✓ Szoftver vezérelt folyamat
- ✓ Elterjedésével várhatóan csökkenő árak

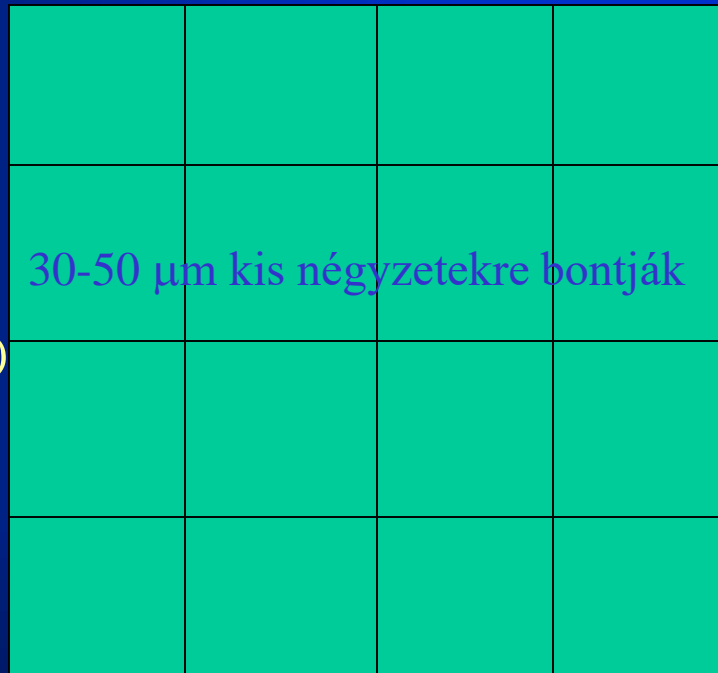
DNS chip

Az eljárás a hibridizációs technikán alapszik.

Újdonság: egyszerre több százezer oligonukleotidot hibridizáltathatunk a mintával

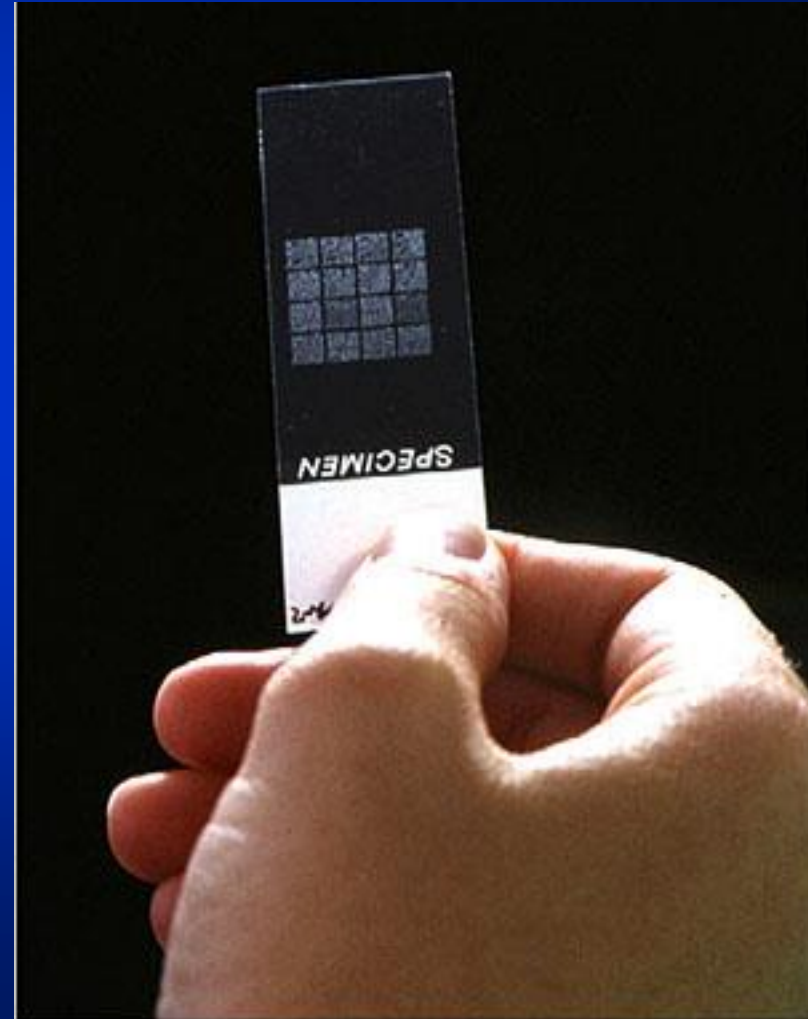
Vizsgálati idő: néhány perc

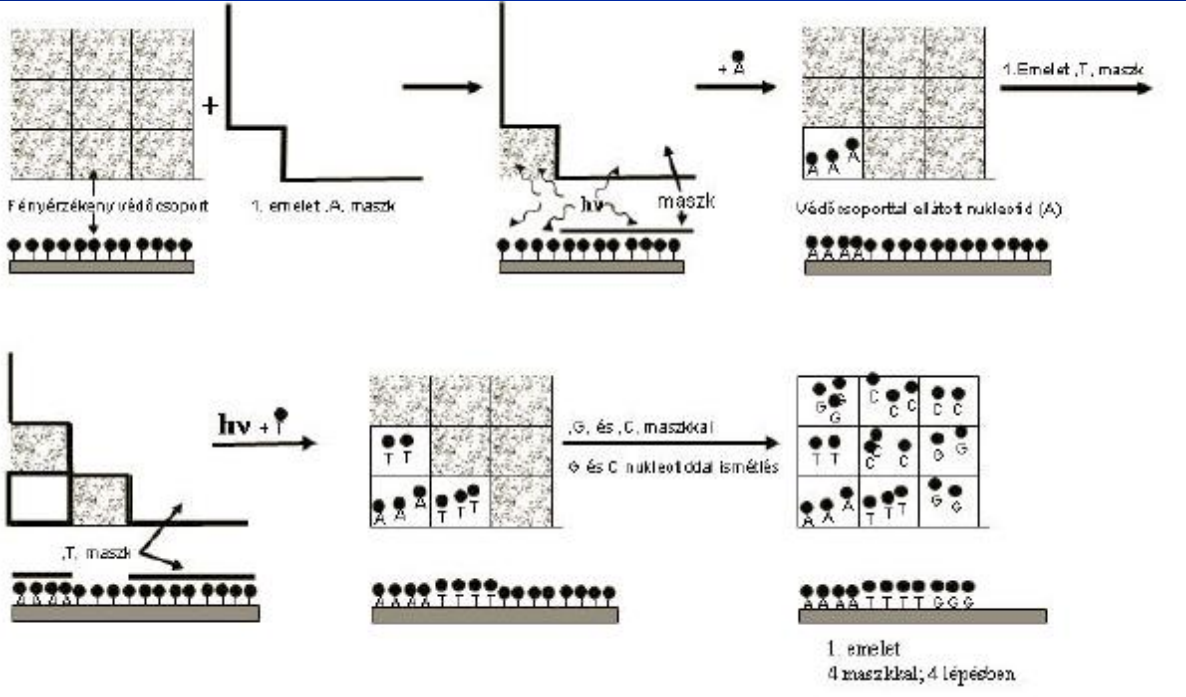
DNS chip: 0,8-1,5 cm négyzet



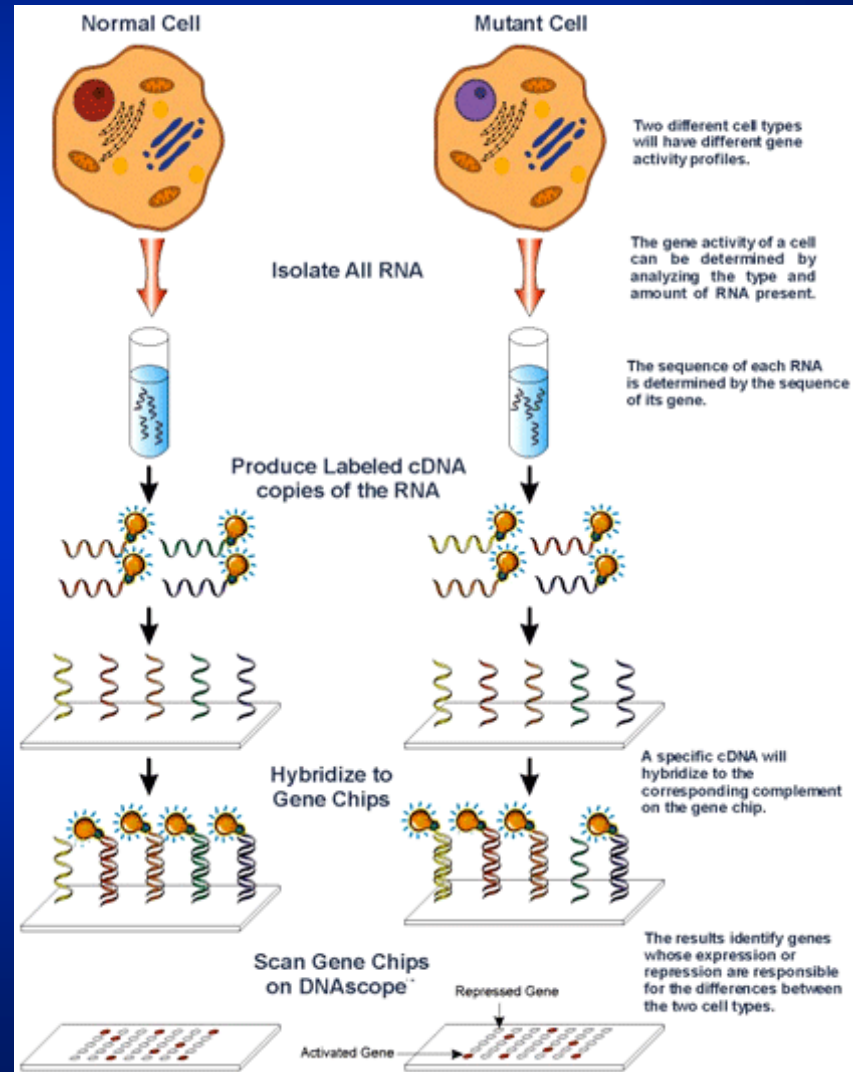
30-50 μm kis négyzetekre bontják

40 000 kis
(50x50 μm -es)
négyzetecske





1. Az adott DNS szakasz feldúsítása PCR segítségével
2. A DNS fluoreszkáló festékekkel történő megjelölése (fluoreszcein, phycoerithrin)
3. A DNS szálak denaturálása
4. A denaturált DNS szálakat a chip-en található oligonukleotidokkal hibridizáltatják
5. A felesleges DNS szálak kimosása
6. A fluoreszcencia vizsgálata

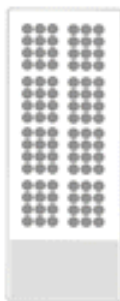
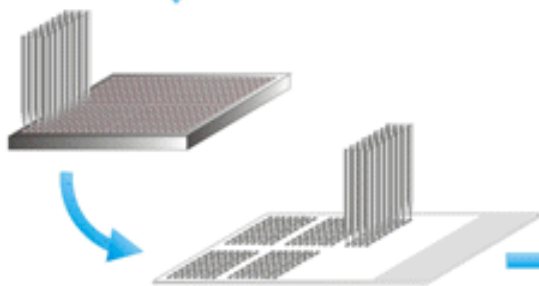


MICROARRAY MANUFACTURING

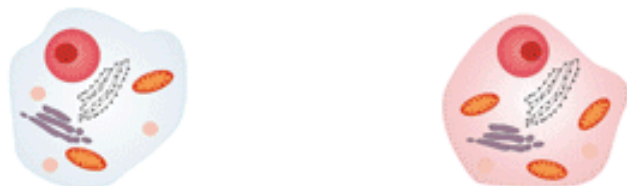


PCR AMPLIFICATION
PCR PRODUCT VERIFICATION

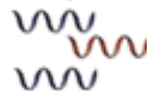
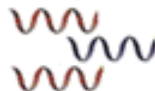
TRANSFER DNA TO 384 WELL PLATES FOR PRINTING



RNA PREPARATION AND LABELING

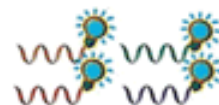
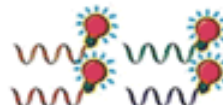


EXTRACT TOTAL RNA

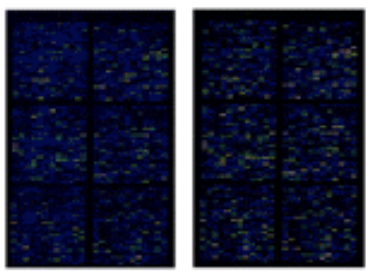


A) OPTIONAL STEP:
RNA AMPLIFICATION

B) REVERSE TRANSCRIBE THE RNA
IN THE PRESENCE OF
FLUORESCENT DYE TO
PRODUCE LABELED
CDNA



HYBRIDIZE THE LABELED
TARGET TO THE SLIDE



CHANNEL 1 CHANNEL 2

SCAN THE SLIDE

FILTER, NORMALISE,
AND COMBINE DATA

DATA PREPARATION



CHANNELS
1 + 2

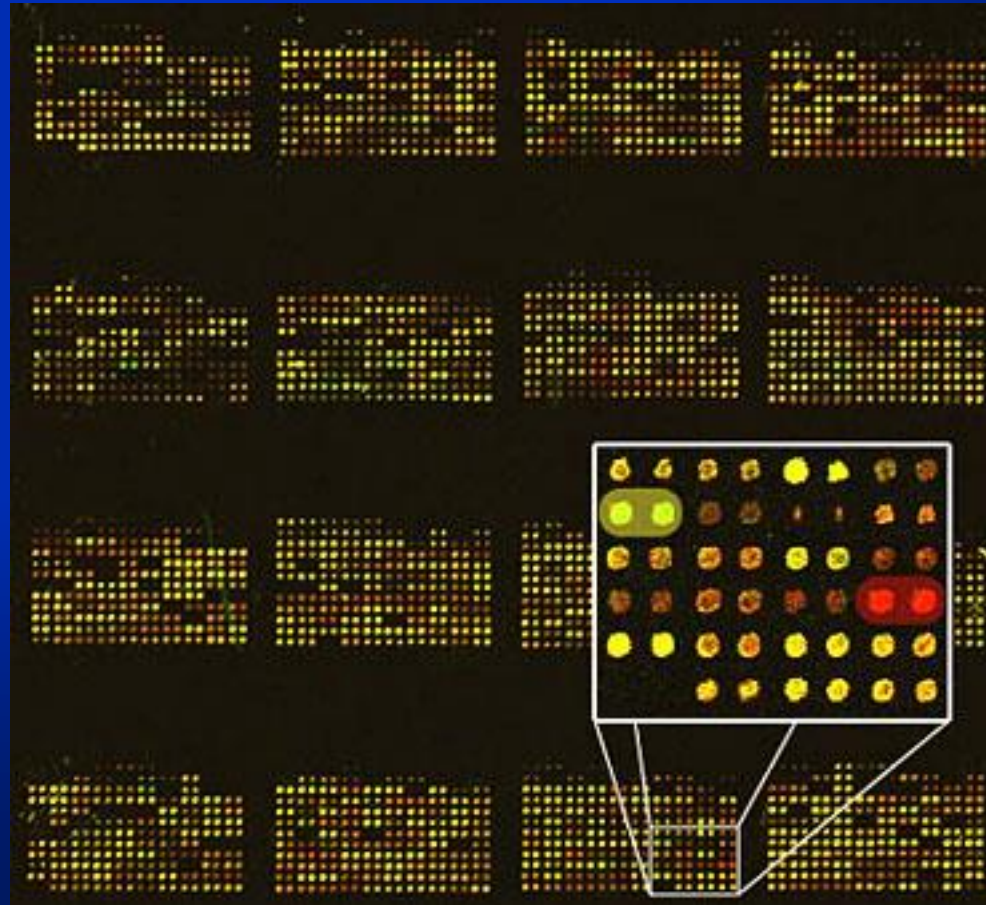


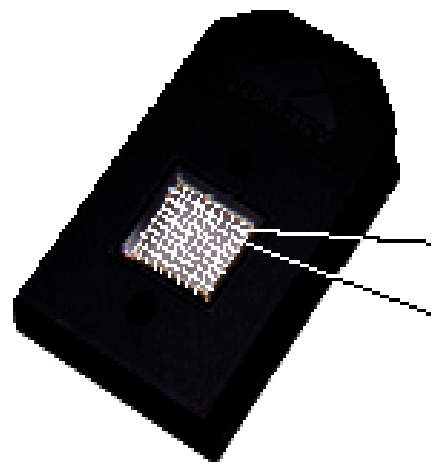
COMPUTER-ASSISTED
DATA ANALYSIS AND
DATA MINING

A DNS chip kiértékelése

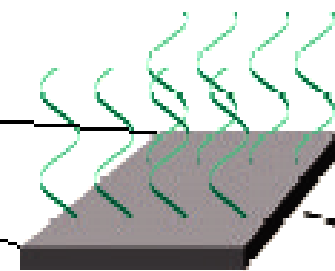
Az adott cella oligonukleotid sorrendje ismert

Ahol fluoreszkál (fluoreszcein – zöld, phycoerithrin – piros) a cella ott a két DNS hibridizált, tehát egymással komplementerek.



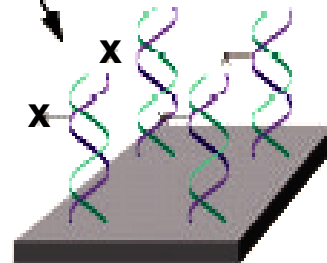
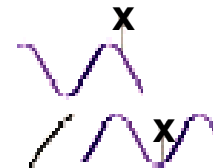


Genechip Array

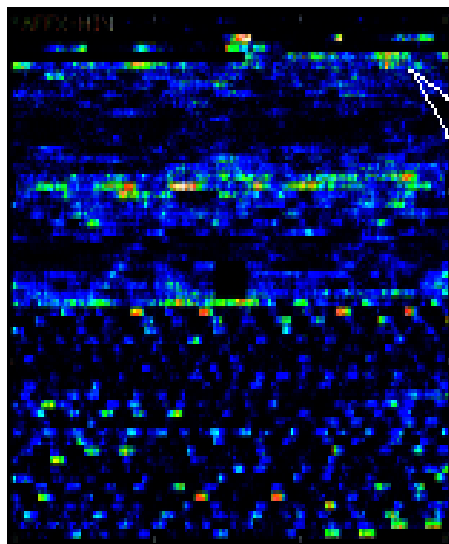
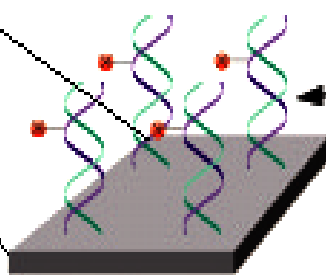
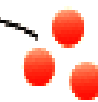


Immobilizált probák

Jelölt DNS minták



Konjugált fluorofor



A kész chip

Újabb és újabb baktériumtörzsek jelennek meg, poligénes betegségek vizsgálatának igénye



Igény gyors és széles spektrumú tesztekre

DNS chip:

gyors – néhány perces hibridizációs idő

Széles spektrumú – a több 10 000 DNS oligonukleotidból kifolyólag

Hátrányai:

Magas szintű technikai követelmény (a chip tervezés hosszú, magas szellemi kapacitást igénylő folyamat)

Magas ár