

# Hodnocení polymorfizmů v počtu repetitivních sekvencí fragmentovou analýzou

**S. Pražáková**

**M. Vaňková, P. Lukášová, J. Vrbíková,**

**B. Bendlová**

Endokrinologický ústav, Praha

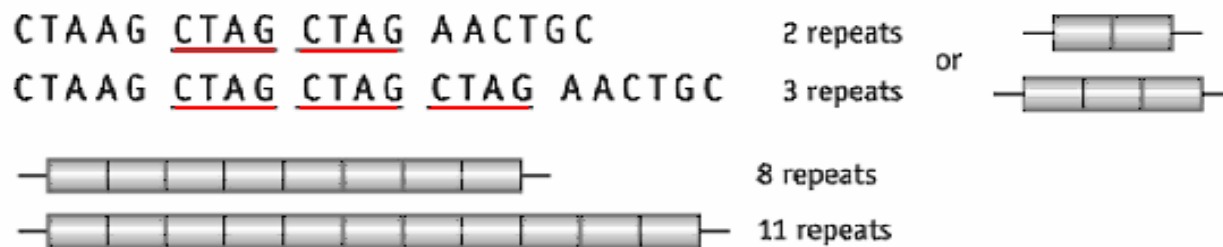


# Délkové polymorfizmy

- Inzerce několika kopií sekvence DNA
- LTR (long tandem repeats) 10 – 100bp
- STR (short tandem repeats) <10bp
  - 3 % lidského genomu
  - Většinou v nekódující oblasti

## Využití STR:

- forenzní genetika při identifikaci jedince
- studie genetické vazby
- lékařská genetika
  - přímá příčina onemocnění
  - nepřímý vliv - exprese genu



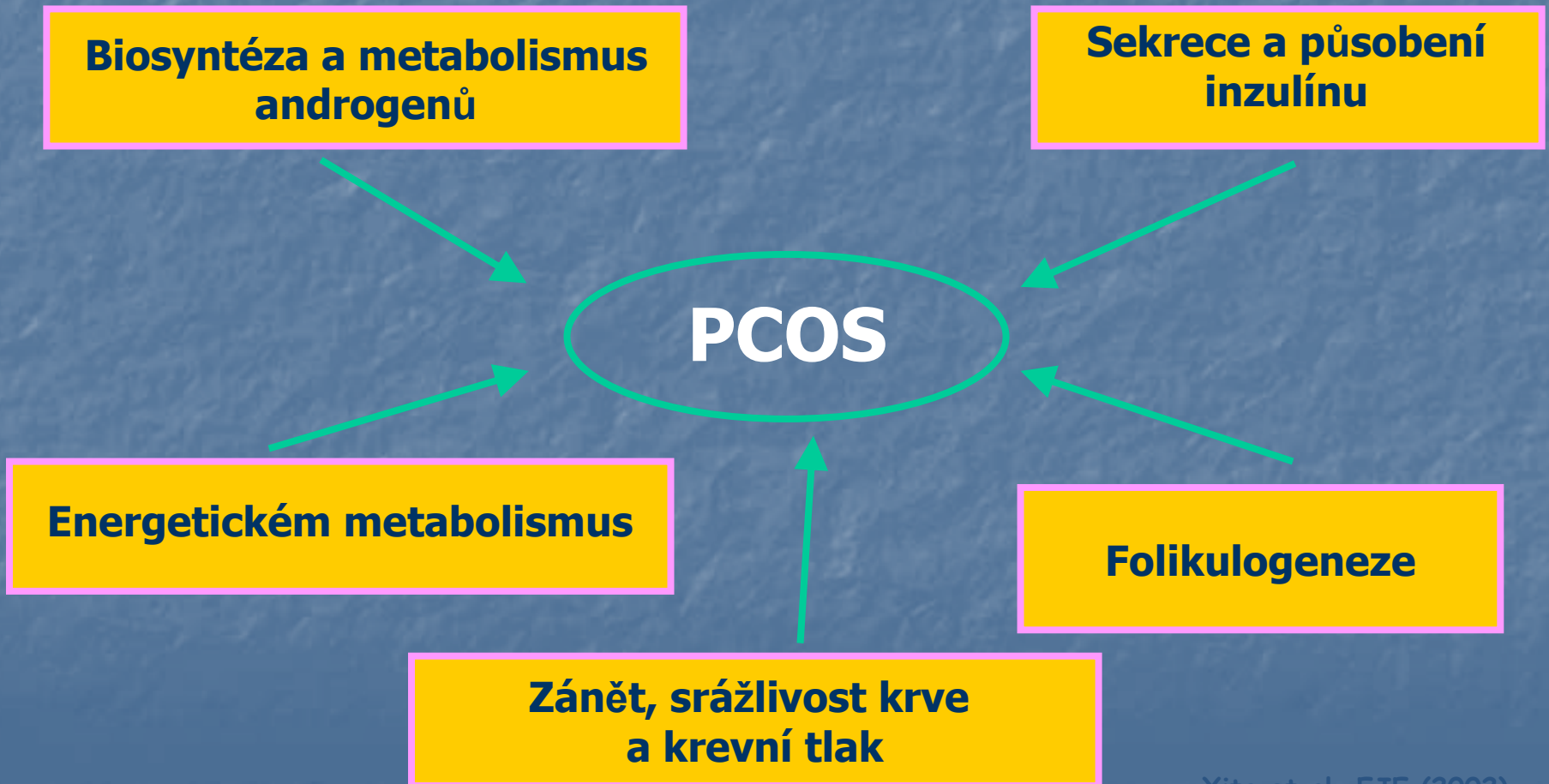
Variation in DNA sequences; mutation and alleles

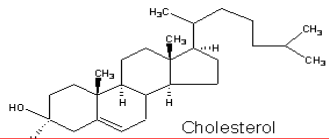
# Syndrom polycystických ovárií PCOS

- Nejčastější endokrinní onemocnění u žen ve fertilním věku (5 – 10 %)
- Častá příčina neplodnosti
- Komplexní onemocnění
- Běžné příznaky: nepravidelný menstruační cyklus, hyperandrogenismus (hirsutismus, alopecie, akne), inzulinová rezistence, obezita
- Genetické pozadí neznámé

# Kandidátní geny

Geny kontrolující metabolické a regulační mechanismy účastnící se na rozvoji PCOS

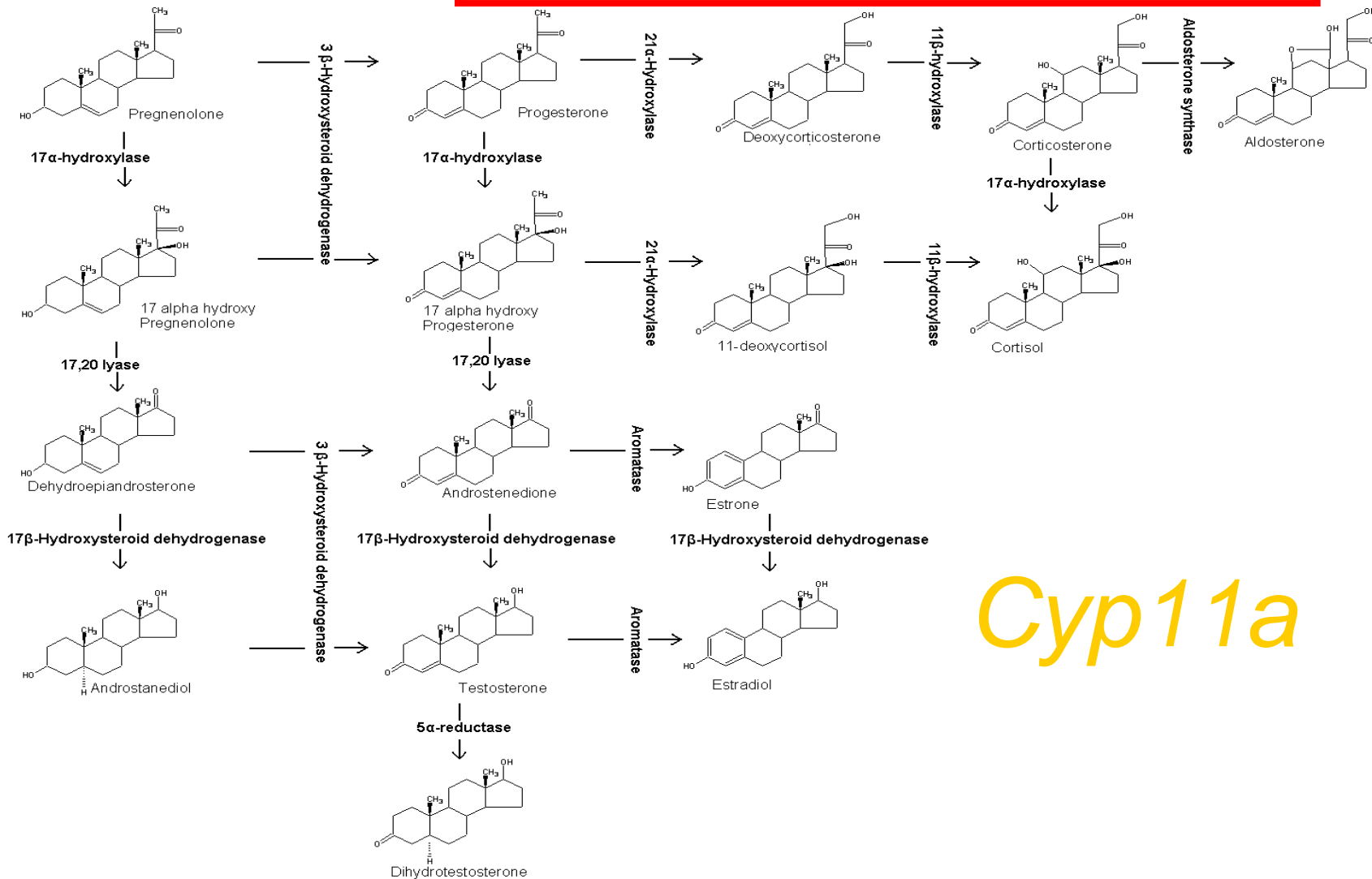




Cholesterol side-chain cleavage enzyme



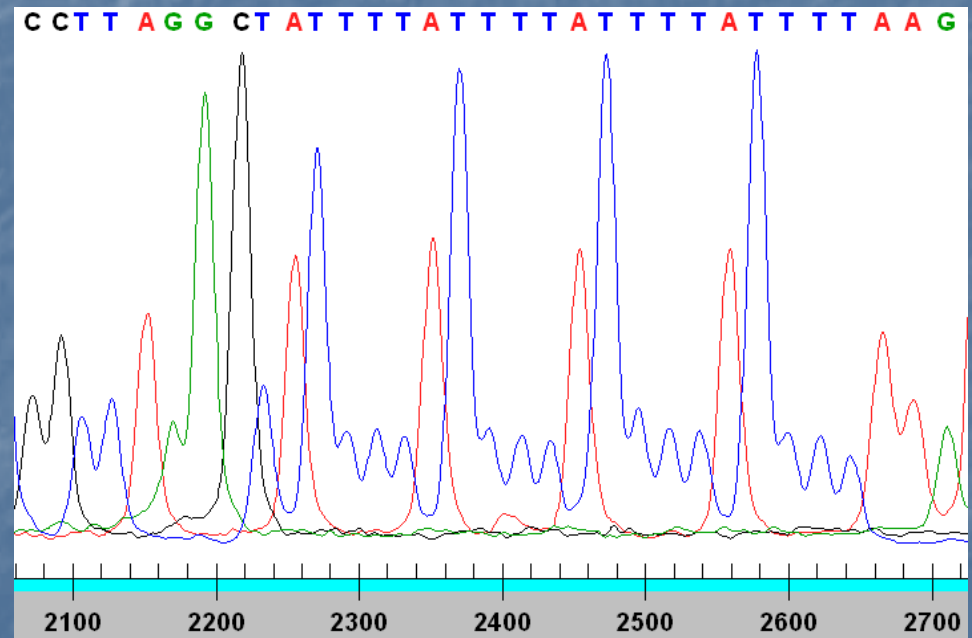
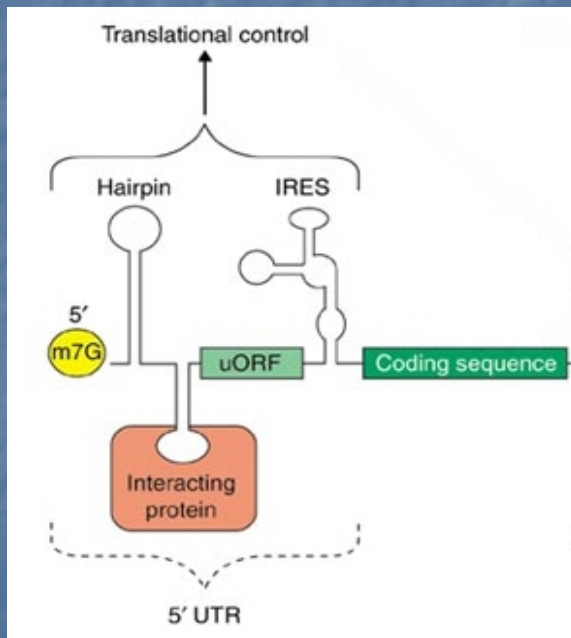
- Lokalizace: 15q23-24
- Gen pro enzym cytochrom P450 štěpící postranní řetězec cholesterolu
- Katalyzuje úvodní krok ve steroidogenní kaskádě



Cyp11a

# TTTTA repeticice v *CYP11a*

- STR polymorfizmus (TTTTA)<sub>n</sub> v 5' nepřekládané oblasti, -528 bp
- Nejběžnější jsou 4 opakování



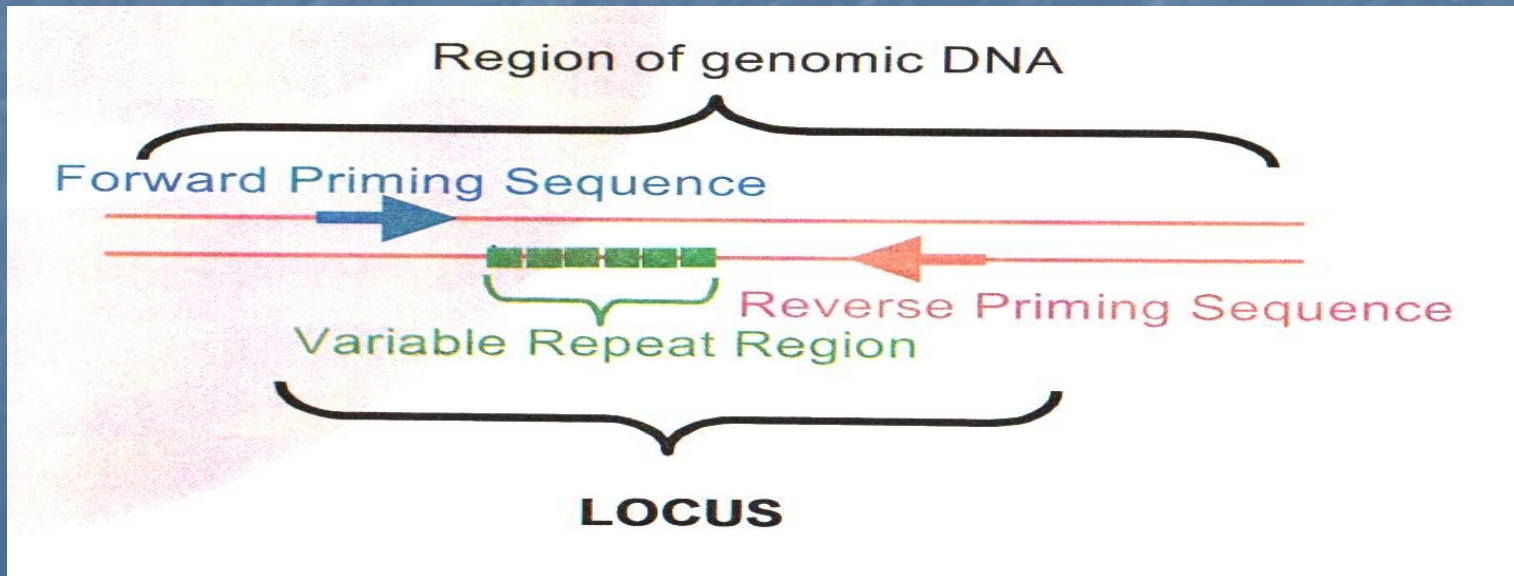
# Cíle studie

V souboru 264 pacientek s PCOS (kritéria ESHRE/ASRM 2003) a 124 zdravých žen (bez PCOS, DM2, GDM; neužívá HA; rodina bez zátěže DM2) zjistit:

- 1) zastoupení alelové a genotypové frekvence (TTTTA)<sub>n</sub> v genu *CYP11a*
- 2) asociaci s PCOS
- 3) asociaci mezi počtem repetic a biochemickými parametry (steroidní hormony, lipidové spektrum a parametry glukózového metabolismu)

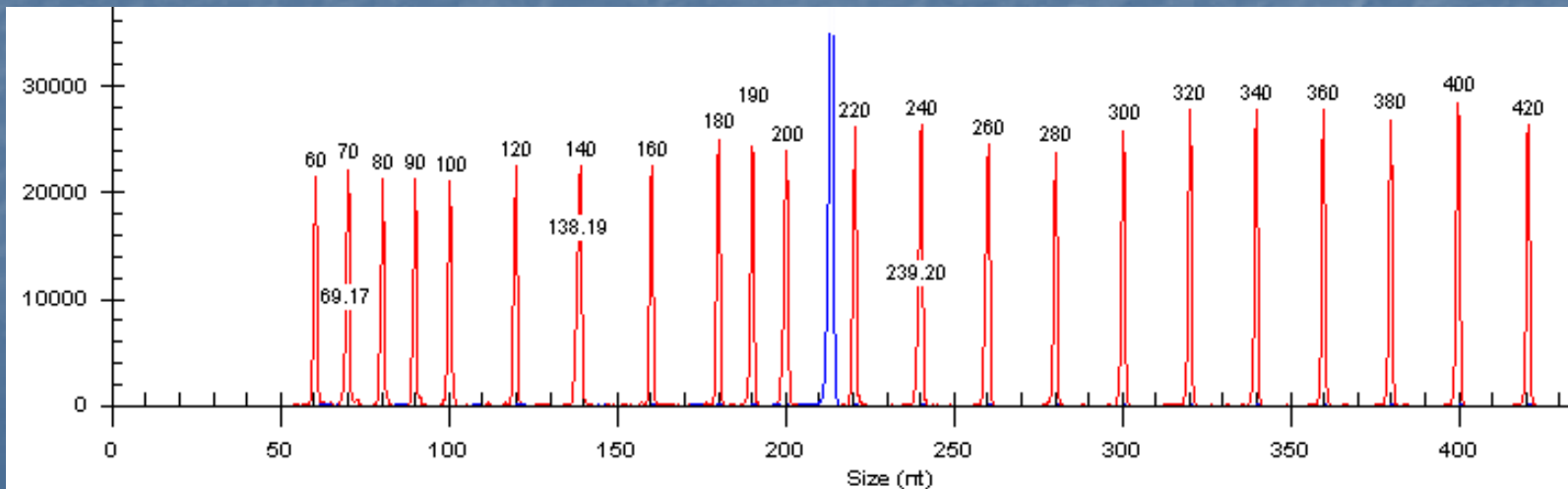
# Fragmentová analýza STR

- Izolace DNA z periferní krve
- PCR amplifikace s fluorescenčně značeným forward primerem (modrá CY5)



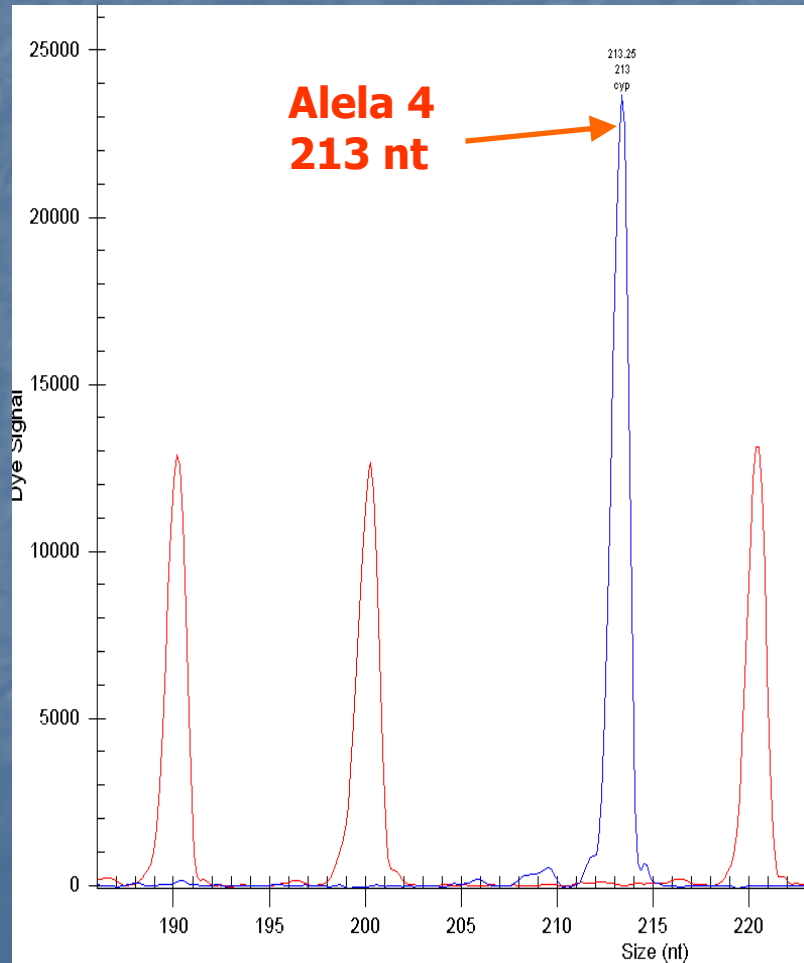
# Fragmentová analýza STR

- Analýza fragmentů (CEQ 8000 analyzátor, Beckman Coulter)
- Kapilární elektroforéza a detekce fragmentů
  - vzorek po PCR
  - přidání velikostního standardu

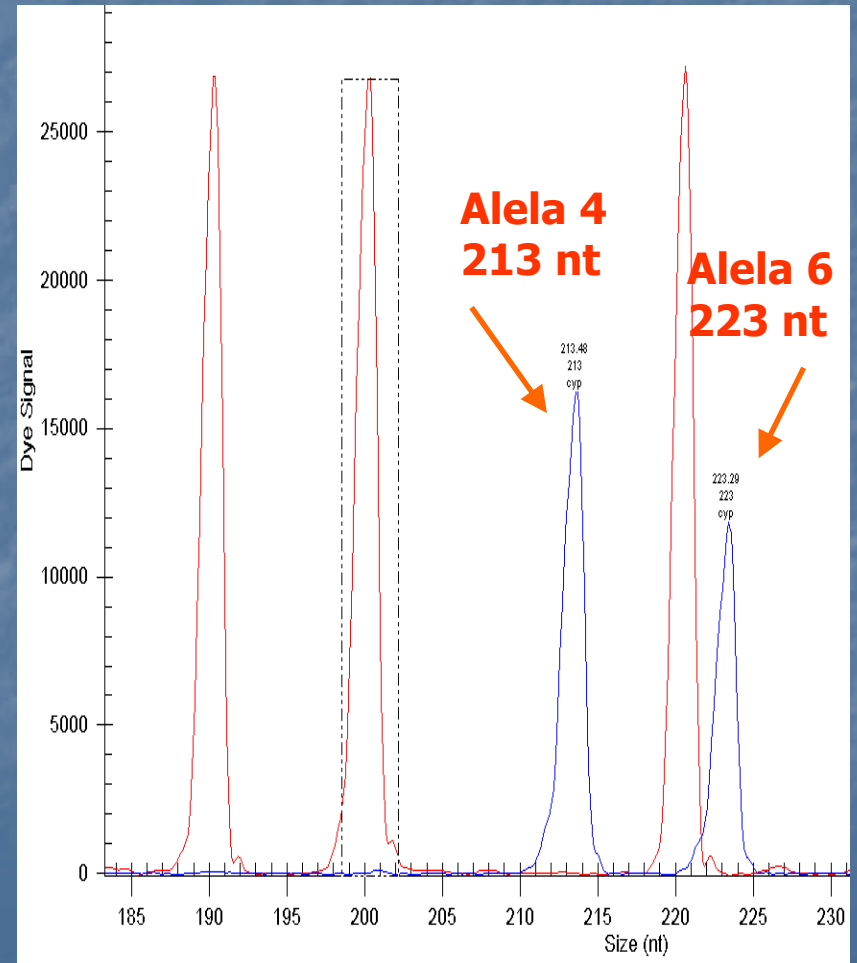


# Analýza

Homozygot 4/4



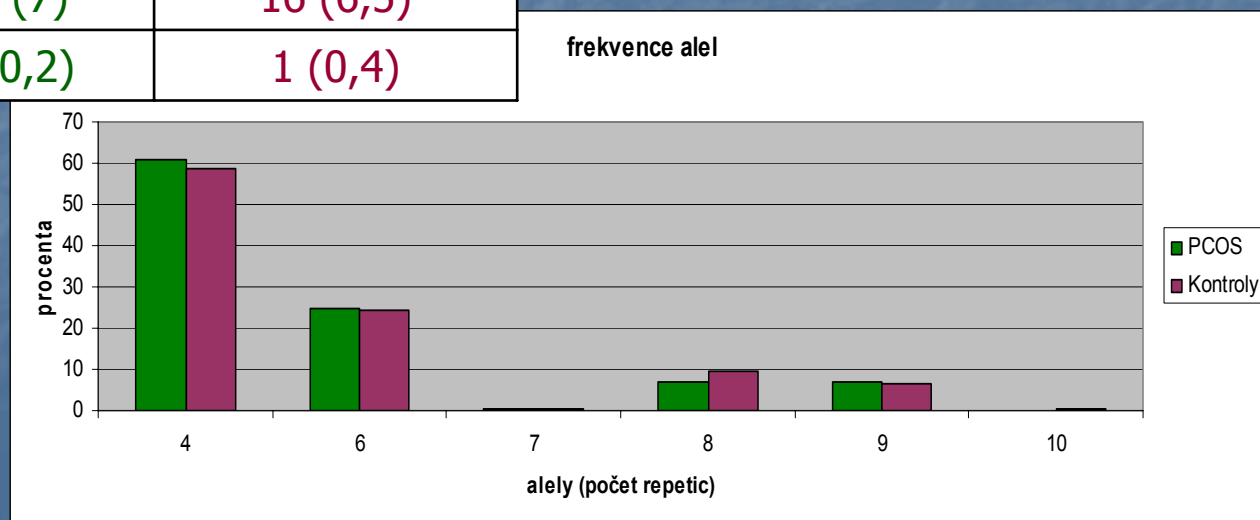
Heterozygot 4/6



# Výsledky č.1

Nenalezli jsme signifikantní rozdíl v distribuci alel mezi PCOS a kontrolami

<b>Alely (počet repetic)</b>	<b>PCOS (%)</b>	<b>Kontroly (%)</b>
Alela 4	322 (61)	146 (58,9)
Alela 6	130 (24,6)	60 (24,2)
Alela 7	2 (0,4)	1 (0,4)
Alela 8	36 (6,8)	24 (9,7)
Alela 9	37 (7)	16 (6,5)
Alela 10	1 (0,2)	1 (0,4)



# Výsledky č.2

## Dominantní model

### NE asociace CYP11a

- androgenní hormony
- inzulínová rezistence
- funkce beta buněk

### ANO asociace CYP11a

- krátkými alelami a zvýšenými hodnotami CH a LDL a nižšími hodnotami HDL u PCOS

Genotyp	PCOS (%)	Kontroly (%)
Genotypy s krátkými alelami		
4/4	109 (41,3)	45 (36,3)
4/6	70 (26,5)	35 (28,2)
6/6	20 (7,6)	10 (8,1)
<b>celkově</b>	<b>199 (75,4)</b>	<b>90 (72,6)</b>
Genotypy s nejméně jednou dlouhou alelou		
4/8	19 (7,2)	11 (8,9)
4/9	15 (5,7)	9 (7,3)
4/10	0	1 (0,8)
6/8	7 (2,7)	2 (1,6)
6/9	12 (4,6)	3 (2,4)
6/10	1 (0,4)	0
7/7	1 (0,4)	0
8/8	2 (0,8)	4 (3,2)
8/9	6 (2,3)	2 (1,6)
9/9	2 (0,8)	1 (0,8)
<b>celkově</b>	<b>65 (24,6)</b>	<b>34 (27,4)</b>

# Závěr

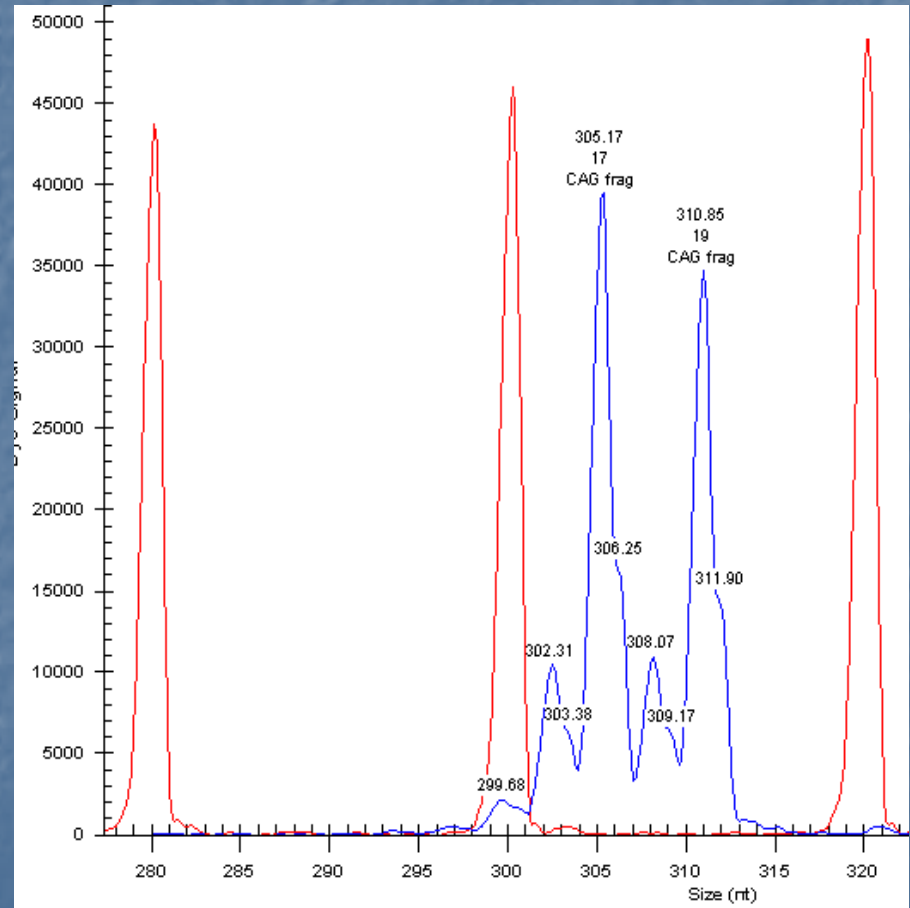
- Fragmentová analýza prováděná na přístroji CEQ 8000 je spolehlivou metodou při hodnocení délkových polymorfizmů
  - 100% shoda počtu TTTTA repetice se sekvenačními výsledky
- Asociace repetice TTTTA v genu CYP11a s PCOS nebyla prokázána
- Vyšší počet repetice neovlivňuje hyperandrogenémii ani další sledované parametry.
- Naše výsledky odpovídají rozsáhlé studii u finské a britské populace (Gaasenbeek *et al.* 2004)

# Další kandidátní gen PCOS

## Androgenní receptor

- Xq11-q12
- Repetice trinukleotidových sekvencí (CAG)<sub>n</sub> v exonu 1
- Počet repetic CAG má nepřímý vztah k aktivitě receptoru

**Inaktivace X chromozomu!!!!**



**Děkuji za pozornost**