

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra antropologie a genetiky člověka**

Biologie

Antropologie a genetika člověka



**Bc. Simona Janoušková**

**Spektrum mutací genu *FGFR3* u hypochondroplázie**

Spectrum of *FGFR3* gene mutations in hypochondroplasia

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Anna Křepelová, CSc.

Praha, 2015

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod odborným dohledem MUDr. Anny Křepelové, CSc. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 08. 2015

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala především své školitelce MUDr. Anně Křepelové, CSc. za věnovaný čas, cenné rady a odborné vedení diplomové práce. Celému kolektivu Ústavu biologie a lékařské genetiky Fakultní nemocnice v Motole za velkou podporu, a jmenovitě především Marcelle Fialové, DiS. za neúnavné vysvětlování a pomoc při řešení praktických problémů v laboratoři. Velké díky také patří pacientkám č. 1 a č. 2 a jejich ošetřujícím lékařkám MUDr. Marcelle Malíkové, MUDr. Věře Jüttnerové, CSc. a MUDr. Márii Šenkeříkové za spolupráci a za povolení zveřejnit v této práci bližší údaje a fotografie. Dále RNDr. Daniele Zemkové, CSc. za odborné konzultace, vstřícnost a ochotu. A v neposlední řadě své rodině a především mému manželovi za podporu při zpracování práce.

Tato práce byla podpořena z projektu institucionální podpory MZ ČR 00064203.

<b>1</b>	<b>Obsah</b>	
2	Úvod.....	9
3	Hypochondroplázie - přehled problematiky.....	10
3.1	Osteochondrodysplázie .....	10
3.1.1	Chondrodysplázie vázané na gen <i>FGFR3</i> .....	10
3.2	Lokalizace a struktura genu <i>FGFR3</i> .....	11
3.3	Stavba a funkce receptoru FGFR3 .....	12
3.3.1	Receptory FGFR a jejich mutace .....	16
3.4	Klinická a molekulární charakterizace FGFR3-vázaných osteochondrodysplázií.....	18
3.5	Podrobná klinická a molekulární charakterizace hypochondroplázie .....	21
3.5.1	Klinické projevy hypochondroplázie .....	22
3.5.1.1	Radiologické nálezy .....	23
3.5.2	Diagnostika hypochondroplázie.....	24
3.5.3	Léčba hypochondroplázie .....	25
3.5.4	Genotyp hypochondroplázie .....	26
3.5.5	Heterogenita onemocnění.....	29
4	Hypotéza .....	30
5	Cíle práce .....	30
6	Materiál .....	31
6.1	Soubor pacientů.....	31
6.2	Kontrolní soubor .....	32
6.3	Vzorky DNA .....	33
6.4	Použité chemikálie .....	33
6.5	Roztoky .....	33
6.6	Komerční pufry a roztoky .....	34
6.7	Komerční soupravy .....	34
6.8	Standardy molekulových hmotností.....	34
6.9	Oligonukleotidové primery (Generi Biotech) .....	35
7	Metody .....	37
7.1	Izolace genomové DNA.....	37
7.2	PCR amplifikace .....	39
7.2.1	Klasická polymerázová řetězová reakce .....	39
7.3	Gelová elektroforéza .....	42

7.3.1	Příprava agarózového gelu pro elektroforézu .....	42
7.3.2	Separace fragmentů DNA .....	43
7.4	Purifikace PCR produktu roztokem SureClean Plus (Bioline) .....	44
7.5	Sekvenace.....	45
7.6	Ethanolová precipitace (Srážecí reakce) .....	47
7.6.1	Vyhodnocování výsledků sekvenační analýzy.....	48
7.7	Bioinformační analýzy .....	49
7.7.1	Predikce patogenního charakteru mutace <i>in silico</i> .....	49
7.7.2	HardyWeinbergova metoda počítání alel.....	49
7.7.3	Z-test .....	49
8	Výsledky .....	50
8.1	Zavedení analýzy jednotlivých exonů genu <i>FGFR3</i> .....	50
8.1.1	Navrhování specifických primerů pro jednotlivé exony .....	50
8.1.2	Optimalizace PCR reakce .....	51
8.1.3	Ověření výsledků na kontrolním souboru pacientů.....	53
8.2	Vyšetřovaný soubor - vzácné mutace.....	54
8.2.1	Strategie molekulárně genetického vyšetření.....	54
8.2.2	Výsledky molekulárně genetického vyšetření.....	54
8.2.3	Pacient č. 1 - kazuistika.....	55
8.2.4	Pacient č. 2 - kazuistika.....	58
8.3	Zjištění variant (SNPs) ve vyšetřovaném souboru.....	61
8.4	Hodnocení úspěšnosti záchytu mutací .....	63
9	Diskuze.....	65
10	Závěr .....	69
11	Seznam použité literatury.....	70
11.1	Internetové zdroje.....	70
11.2	Publikace .....	71

## Seznam použitých zkratek:

<b>AKT</b>	protein kinase B	proteinkináza B
<b>BLAST</b>	basic local alignment search tool	
<b>BMI</b>	body mass index	index tělesné hmotnosti
<b>CATSHL</b>	camptodactyly, tall stature and hearing loss syndrome	syndrom spojený s kamptodaktylií, vysokou postavou a ztrátou sluchu
<b>CNS</b>	central nervous system	centrální nervová soustava
<b>CT</b>	computed tomography	počítačová tomografie
<b>DAG</b>	diacylglycerol	diacylglycerol
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxide	dimetylsulfoxid
<b>ERK</b>	extracellular signal-regulated kinases	extracelulárním signálem redukované proteinkinázy
<b>FASTA</b>	fast alignment	„rychlé spojení“
<b>FGFs</b>	fibroblast growth factors	fibroblastové růstové faktory
<b>FGFR1-4</b>	fibroblast growth factor receptor 1-4	receptor pro fibroblastové růstové faktory 1-4
<b>FN</b>		Fakultní nemocnice
<b>FRS</b>	fibroblast growth factor receptor substrate	substrát pro receptory pro fibroblastové růstové faktory
<b>GRB</b>	growth factor receptor-bound protein	vazebný protein pro receptor růstového faktoru
<b>HCH</b>	hypochondroplasia	hypochondroplázie
<b>HGMD</b>	The Human Gene Mutation Database	Databáze mutací lidského genomu
<b>Ig I-III</b>	immunoglobulin domain 1-3	imunoglobulinová doména 1-3
<b>IP3</b>	inositol triphosphate	inositol trifosfát
<b>JAK</b>	just another kinase	
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinases	mitogenem aktivované proteinkinázy

<b>MIM</b>	Mendelian inheritance in man	Databáze lidských genů a poruch
<b>MRI</b>	magnetic resonance imaging	magnetická rezonance
<b>NCBI</b>	The National Center for Biotechnology Information	Národní centrum biotechnologických informací
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
<b>PI3K</b>	phosphoinositide 3-kinase	fosfatidylinositol-3-kináza
<b>PIP2</b>	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
<b>PKC</b>	protein kinase C	proteinkináza C
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	phospholipase C isotype $\gamma$	fosfolipáza C $\gamma$
<b>RAS</b>	rat sarcoma protein	
<b>SADDAN</b>	severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans	těžká achondroplázie s vývojovým zpožděním a akantózou nigricans
<b>SD</b>	standard deviation	směrodatná odchylka
<b>SH3</b>	SRC homology 3 domain	
<b>SHC</b>	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein	
<b>SNP</b>	single nucleotide polymorfism	jednonukleotidový polymorfismus
<b>SOS</b>	son of sevenless	
<b>STAT1</b>	signal transducer and aktivátor of transcription 1	přenašeč signálu a aktivátor transkripce 1
<b>TK 1, TK 2</b>	tyrosine kinase domain 1, 2	tyrosin kinázová doména 1, 2
<b>TM</b>	transmembrane domain	transmembránová doména
<b>ÚBLG</b>		Ústav biologie a lékařské genetiky
<b>UV</b>	ultraviolet	ultrafialové

## Abstrakt

Hypochondroplázie (MIM 146000) je skeletální dysplázie, která se projevuje různě závažným disproporčním malým vzrůstem s rhizomelickým nebo mesomelickým zkrácením horních i dolních končetin. Pacienti mají také často makrocefalii s normálními obličejovými rysy. Hypochondroplázie je onemocnění s autozomálně dominantní dědičností. U části nemocných je příčinou onemocnění zárodečná mutace v genu *FGFR3*, u části nemocných však příčina onemocnění zůstává stále neznámá. Gen *FGFR3* kóduje tyrosin kinázový receptor, který negativně reguluje přeměnu chrupavky na kost. Mutace v genu *FGFR3*, které jsou příčinou hypochondroplázie, vedou ke konstitutivní aktivaci receptoru a tím inhibici růstu dlouhých kostí.

V této práci byly molekulárně genetickými metodami analyzovány vybrané oblasti genu *FGFR3* u 98 pacientů s disproporčním malým vzrůstem a klinickou diagnózou hypochondroplázie, z nich bylo 18 nemocných z 12 rodin s familiárním výskytem onemocnění a 80 bylo sporadických případů. U všech zařazených pacientů byla již dříve standardním molekulárně genetickým vyšetřením vyloučena přítomnost častých rekurentních zárodečných mutací v exonu 13 (v kodonu 540) a v exonu 15 (v kodonu 650). Genomová DNA pacientů byla izolována z leukocytů periferní krve, vyšetření bylo provedeno s informovaným souhlasem pacienta nebo jeho zákonného zástupce. Mutační analýzu jsme prováděli metodou přímého sekvenování jednotlivých exonů metodou dideoxy-sekvenování dle Sangera. Při validaci naší detekční metody jsme potvrdili přítomnost všech dříve detekovaných mutací genu *FGFR3* v kontrolních vzorcích DNA. U pacientů s familiárním výskytem onemocnění jsme analyzovali 17 exonů tj. všechny kódující exony genu *FGFR3*, u pacientů se sporadickým výskytem onemocnění jsme analyzovali pouze exony, v nichž byla mutace zodpovědná za hypochondroplázii publikována jinými autory (exony 3, 5, 7, 10, 13 a 15). U žádného pacienta s klinickou diagnózou hypochondroplázie jsme neprokázali mutaci typickou pro achondroplázii. Ve skupině nemocných s familiárním disproporčním malým vzrůstem jsme neprokázali přítomnost mutace genu *FGFR3* u žádného z vyšetřených nemocných. U dvou pacientek se sporadickým výskytem hypochondroplázie jsme zjistili vzácné pravděpodobně patogenní mutace v exonech 5 a 7 genu *FGFR3*, z nichž jedna nebyla dosud popsána.

**Klíčová slova:** gen *FGFR3*, hypochondroplázie, achondroplázie, mutace, mutační analýza, skeletální dysplázie,

**Abstract:**

Hypochondroplasia (MIM 146000) is a skeletal dysplasia characterized by disproportional dwarfism with rhizomelic or mesomelic shortening of the upper and lower extremities, with variable severity. Patients often have macrocephaly with normal facial features. Hypochondroplasia is a disease with autosomal dominant inheritance. In some patients it is caused by germline mutations in the *FGFR3* gene, in others the cause of the disease remains unknown. The *FGFR3* gene encodes a tyrosine kinase receptor. This receptor negatively regulates the conversion of cartilage to bone. *FGFR3* gene mutations that cause hypochondroplasia lead to constitutive activation of the receptor and inhibit the growth of long bones.

In this study, we analysed selected regions (exons) of the *FGFR3* gene in 98 patients with disproportional dwarfism and clinical diagnosis of hypochondroplasia. Eighteen patients from 12 families had familial and 80 patients had sporadic form of the disease. All patients were previously tested negative for frequent germline mutations in exon 13 (codon 540) and exon 15 (codon 650). Genomic DNA was isolated from patient's peripheral blood leukocytes. The examination was conducted with the informed consent of the patient or his legal representative. We performed mutational analysis by direct sequencing of individual exons using dideoxy sequencing method according to Sanger. During validation of our detection method we confirmed the presence of all previously detected mutations of the *FGFR3* gene in DNA control samples. We analyzed 17 exons, e.g. all coding exons of the *FGFR3* gene in patients with familial hypochondroplasia, and only selected exons, where mutations have been published previously by other authors (exons 3, 5, 7, 10, 13 and 15) were examined in patients with sporadic hypochondroplasia. We did not find the mutation typical for achondroplasia in patients with clinical diagnosis of hypochondroplasia. We did not find any *FGFR3* gene mutation in the group of patients with familial disproportional dwarfism. In two female patients with sporadic hypochondroplasia we found rare probably pathogenic mutations in exons 5 and 7 of the *FGFR3* gene. One of these mutations is novel, has not been described previously.

**Key words:** FGFR3 gene, hypochondroplasia, achondroplasia, mutation, mutation analysis

## 2 Úvod

Výška postavy je jedním z parametrů, který je sledován pediatrii jako indikátor zdravého vývoje dítěte. Nízká postava totiž často doprovází závažná onemocnění či syndromy. Výška postavy je podmíněna jak geneticky, tak i mnoha zevními faktory. V důsledku toho se liší populační norma pro jednotlivé populace.

Malý vzrůst je definován jako odchylka od populační normy (-2 SD) vztažená k věku a pohlaví pacienta (Wit et al. 2008). Mezi nejčastější příčiny malého vzrůstu se řadí familiárně malý vzrůst a konstituční opoždění růstu a puberty. Dále se na výšce postavy odráží chronická onemocnění, hormonální insuficience, chromozomální aberace, genetické syndromy a skeletální dysplázie, stresové faktory a další. Krátká postava je dále posuzována na základě proporcionality tělesných parametrů, u některých skeletálních dysplázií je snižena finální výška pacientů způsobena zejména zkrácením dolních končetin.

Tato práce se zabývá molekulárně genetickou podstatou hypochondroplázie (MIM 146000), která je jedním z monogenně podmíněných onemocnění s malým disproporčním vzrůstem.

### 3 Hypochondroplázie - přehled problematiky

#### 3.1 Osteochondrodysplázie

Osteochondrodysplázie je souhrnné označení pro skupinu poruch vývoje skeletu. Tato skupina onemocnění je způsobena strukturálními změnami v proteinech, chybnou regulací růstu v růstové chrupavce a poruchami metabolismu kostní tkáně. Tyto defekty ovlivňují enchondrální osifikaci a díky tomu vznikají malformace kostí.

Osteochondrodysplázie postihují růst celého skeletu a ovlivňují růst dlouhých kostí v oblastech epifýz a metafýz. Mezi osteochondrodysplázie se řadí množství poruch, které se dělí do několika skupin (Warman et al. 2011).

V roce 2010 byla publikována prozatím poslední verze klasifikace skeletálních dysplázií, která je podkladem pro sjednocení diagnostiky u pacientů se skeletálními dyspláziemi. V této klasifikaci jsou jednotlivá onemocnění rozdělena podle molekulárních a biochemických kritérií do 40 skupin. Rozdělení je založeno na fenotypové podobnosti onemocnění a na skutečnosti, že tato onemocnění jsou spřažená se stejnými signalizačními drahami. Naše práce z této doporučené klasifikace vychází (Warman et al. 2011).

##### 3.1.1 Chondrodysplázie vázané na gen *FGFR3*

Skupina chondrodysplázií vázaných na gen *FGFR3* tvoří první skupinu výše uvedené klasifikace osteochondrodysplázií, zařazená onemocnění jsou uvedena v tabulce č. 1. Všechny *FGFR3* vázané skeletální dysplázie jsou autozomálně dominantně dědičná alelická onemocnění. Příčinou těchto onemocnění jsou rekurentní bodové substituční mutace v určitých oblastech genu *FGFR3*.

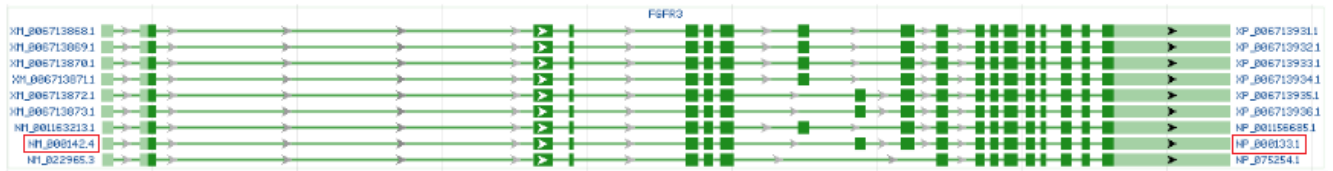
**Tabulka č. 1.** Klasifikace skeletálních poruch, tabulka FGFR3 vázaných chondrodysplázií (Warman et al. 2011).

Skupina/název onemocnění	Dědičnost	MIM	Lokus	Gen	Protein	Poznámka
<b>1. Skupina FGFR3 vázaných chondrodysplázií</b>						
Thanatoforická dysplázie typu 1 (TD1)	AD	187600	4p16.3	<i>FGFR3</i>	FGFR3	Zahrnuje typ San Diego
Thanatoforická dysplázie typu 2 (TD2)	AD	187601	4p16.3	<i>FGFR3</i>	FGFR3	
Závažná achondroplázie s vývojovým opožděním a akantózou nigricans (SADDAN)	AD	viz 187600	4p16.3	<i>FGFR3</i>	FGFR3	
Achondroplázie	AD	100800	4p16.3	<i>FGFR3</i>	FGFR3	
Hypochondroplázie	AD	146000	4p16.3	<i>FGFR3</i>	FGFR3	
Syndrom spojený s kamptodaktylií, vysokou postavou a ztrátou sluchu (CATSHL)	AD	187600	4p16.3	<i>FGFR3</i>	FGFR3	Inaktivační mutace
Hypochondroplázii podobné dysplázie	AD, SP		4p16.3	<i>FGFR3</i>	FGFR3	Podobné hypochondroplázii, ale nejsou spojené s FGFR3, pravděpodobně heterogenní; nejistá diagnostická kritéria

### 3.2 Lokalizace a struktura genu *FGFR3*

Gen *FGFR3* kóduje receptor pro fibroblastové růstové faktory 3. Gen je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 4 v lokusu 4p16.3 (Thompson et al. 1991).

Gen *FGFR3* byl objeven při hledání genu, který je zodpovědný za Huntingtonovu chorobu (Gusella et al. 1983; Thompson et al. 1991). Poprvé se jej u člověka podařilo izolovat v roce 1991 (Keegan et al. 1991; Thompson et al. 1991). Gen *FGFR3* obsahuje 19 exonů a 18 intronů, je asi 16,5 kB dlouhý a kóduje polypeptid dlouhý 806 aminokyselin. Iniciační kodon se nachází v exonu 2 a terminační kodon v exonu 19 (Perez-Castro et al. 1997), viz obrázek č. 1.



Číslování exonů:



**Obrázek č. 1. Schéma genu *FGFR3*.** Gen *FGFR3* se skládá z 18 intronů a 19 exonů, červeně je označena referenční sekvence RefSeq GenBank NC\_000004.1.2; číslování jednotlivých exonů, exon 8 v RefSeq Gen Bank NC\_000004.1.2 chybí (zdroj: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

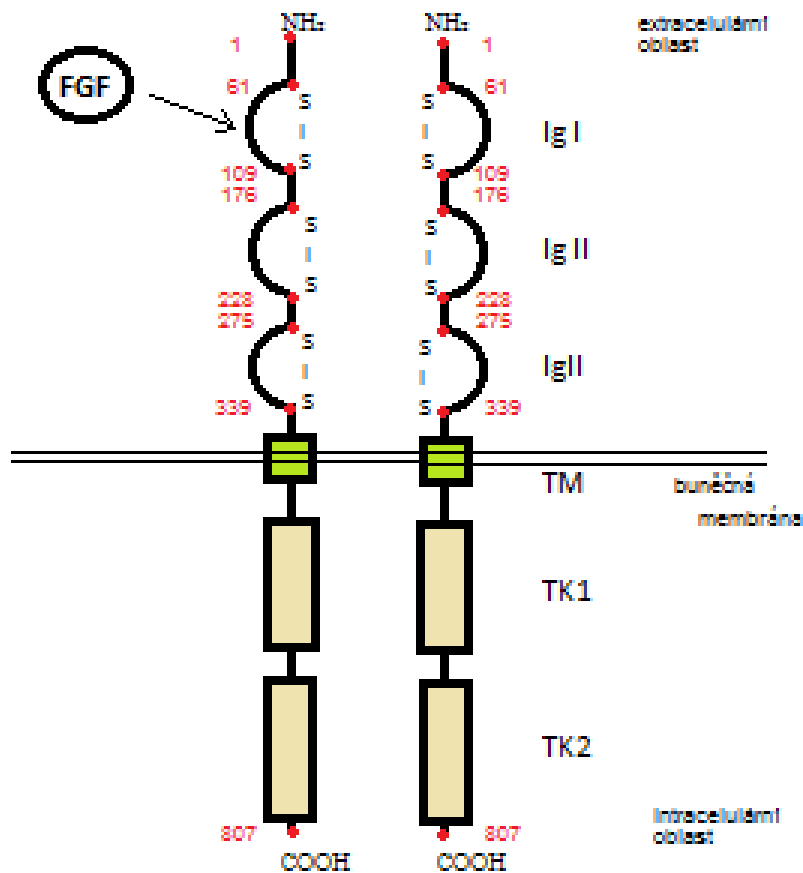
V lidském genomu jsou známy ještě další tři homologní geny *FGFR1*, *FGFR2* a *FGFR4*, které se nacházejí na různých chromozomech. Gen pro receptory fibroblastových růstových faktorů - 1 je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 8 v oblasti 8p11.2 (Wood et al. 1995). Gen pro receptory fibroblastových růstových faktorů - 2 je lokalizován v oblasti 10q26.13 na krátkém raménku chromozomu 10 (Mattei et al. 1991). Gen pro receptory fibroblastových růstových faktorů 4 se nachází na krátkém raménku chromozomu 5 v oblasti 5q33 (Armstrong et al. 1992).

### 3.3 Stavba a funkce receptoru *FGFR3*

Receptory *FGFR1-4* mají podobnou stavbu, jsou charakteristické třemi extracelulárními imunoglobulinovými doménami, transmembránovou doménou a vnitrobuněčnou tyrosin kinázovou doménou (Perez-Castro et al. 1997).

Stejně jako ostatní receptory *FGFR* se i *FGFR3* skládá se ze tří extracelulárních imunoglobulinových domén (IgI-III), jedné transmembránové domény (TM) a dvou intracelulárních cytoplazmatických domén s tyrosin kinázovou aktivitou (TK1 a TK2) (Keegan et al. 1991) viz obrázek č. 2.

Všechny tři imunoglobulinové domény receptoru mají začátek a konec kódovaný aminokyselinou cysteinem. Tyto aminokyseliny v imunoglobulinových doménách mezi sebou vytváří vazby pomocí disulfidických můstků a tím tvoří specifickou strukturu jednotlivých domén.



**Obrázek č. 2. Receptor FGFR3.** Struktura receptoru FGFR3 je tvořena třemi extracelulárními imunoglobulinovými doménami (Ig I-III), jednou transmembránovou doménou (TM) a dvěma intracelulárními tyrosin kinázovými doménami (TK1 a TK2), čísla označují pořadí aminokyselinových zbytků, FGF - fibroblastový růstový faktor.

Receptory FGFR1-4 patří mezi receptory s tyrosin kinázovou aktivitou. Buněčná odpověď těchto receptorů je vyvolána interakcí receptorů s růstovými fibroblastovými faktory a následnou dimerizací a autofosforylací tyrosin kinázové podjednotky receptoru. Tímto způsobem ovlivňují receptory FGFR1-4 mnoho různých typů buněk a také nejrůznější procesy v buňce. Řídí například buněčný cyklus, vznik a průběh mitózy, diferenciaci a migraci buněk, angiogenezi, hojení ran, vznik karcinomů a mají velký vliv na udržení homeostázy (Chellaiah et al. 1994).

Do rodiny fibroblastových růstových faktorů patří asi 22 podobných signálních molekul, které prostřednictvím vazby ovlivňují aktivaci receptorů pro fibroblastové růstové faktory a jsou nezbytné pro vývoj dlouhých kostí (Martin 1998; Ornitz and Itoh 2001).

Fibroblastové růstové faktory se extracelulárně váží s receptory na povrchu buňky a regulují tím expresi genů v buňce. Každý z receptorů je ovlivněn fibroblastovými růstovými faktory odlišným způsobem.

Aktivita fibroblastových růstových faktorů může být regulována proteoglykanem heparan sulfátem. Tento oligosacharid vytváří komplexy s fibroblastovými růstovými faktory a poté i jejich receptory. Tímto způsobem dochází k regulaci aktivity receptorů FGFR (Rapraeger et al. 1991; Presta et al. 2005). Nejnovější poznatky shrnuje práce Ornitze a Itoha (2015).

### **Funkce receptoru FGFR3**

Enchondrální vývoj kosti začíná kondenzací volného mezenchymu, krátce po vzniku končetinového pupenu (Kosher et al. 1986). Během procesu ontogeneze se nejprve vytváří chrupavčitý základ kosti, chondrocyty se množí, postupně zrají a hypertrofují. Poté začíná probíhat apoptóza chondrocytů v distální části epifyzální růstové chrupavky. Do středu chrupavčitého základu vrůstají cévy a do dutiny uvnitř vnikají osteoblasty z perichondria, přeměňují se na osteocyty a vytváří se houbovitá kostní tkáň (Caplan and Pechak 1987 podle Ornitz and Marie 2002). Kost dále roste desmogenně apozicí z periostu do šířky a ze sekundárních růstových center do délky. V sekundárních růstových centrech, které se vyskytují v oblastech epifýz dlouhých kostí, zůstává chrupavčitá růstová ploténka. Na růstové ploténce jsou rozlišovány zóny, zárodečná, proliferační a hypertrofická, podle toho v jaké fázi se buňky nacházejí.

Receptor FGFR3 se uplatňuje během enchondrální osifikace kosti jako negativní i pozitivní regulátor (Deng et al. 1996; Pannier et al. 2010). Receptor FGFR3 ovlivňuje proliferaci chondrocytů a omezuje normální přeměnu chrupavky na kost.

Po navázání ligandu na receptor FGFR3 dochází k dimerizaci receptoru a autofosforylaci tyrosin kinázové podjednotky receptoru a následně k přenosu signálu prostřednictvím několika signálních drah, které mimo jiné regulují dělení a diferenciaci chondrocytů (Baujat et al. 2008).

Signalizačních drah spojených s receptorem FGFR3 je několik, viz obrázek č. 3. Mezi hlavní dráhy patří dráhy spojené s mitogenem aktivovanými proteinkinázami/ extracelulárním signálem redukovanými kinázami (MAPK/ERK), dráhy spojené s fosfatidylinositol-3-fosfát kinázami (PI3K-AKT), dráhy spojené s proteinkinázami C

(PKC) a dráhy spojené s přenosem signálu a aktivací transkripce (STAT1) (Jonquoy et al. 2012).

**(1) Dráhy spojené s mitogenem aktivovanými proteinkinázami/ extracelulárním signálem redukovánými kinázami (MAPK/ERK):** Receptor FGFR3 se váže prostřednictvím adaptorových proteinů s membránovým proteinem FRS2 (Substrát pro receptor pro fibroblastový růstový faktor 2). Jedním z hlavních adaptorových proteinů je GRB2 (Vazebný protein pro receptor růstového faktoru 2). GRB vytváří komplex s proteiny SHC a SOS. SOS je připojen do komplexu prostřednictvím SH3 domény. SOS aktivuje protein Ras. Ras protein interaguje s efektorovými proteiny a tím dochází k aktivaci MAP kinázové kaskády.

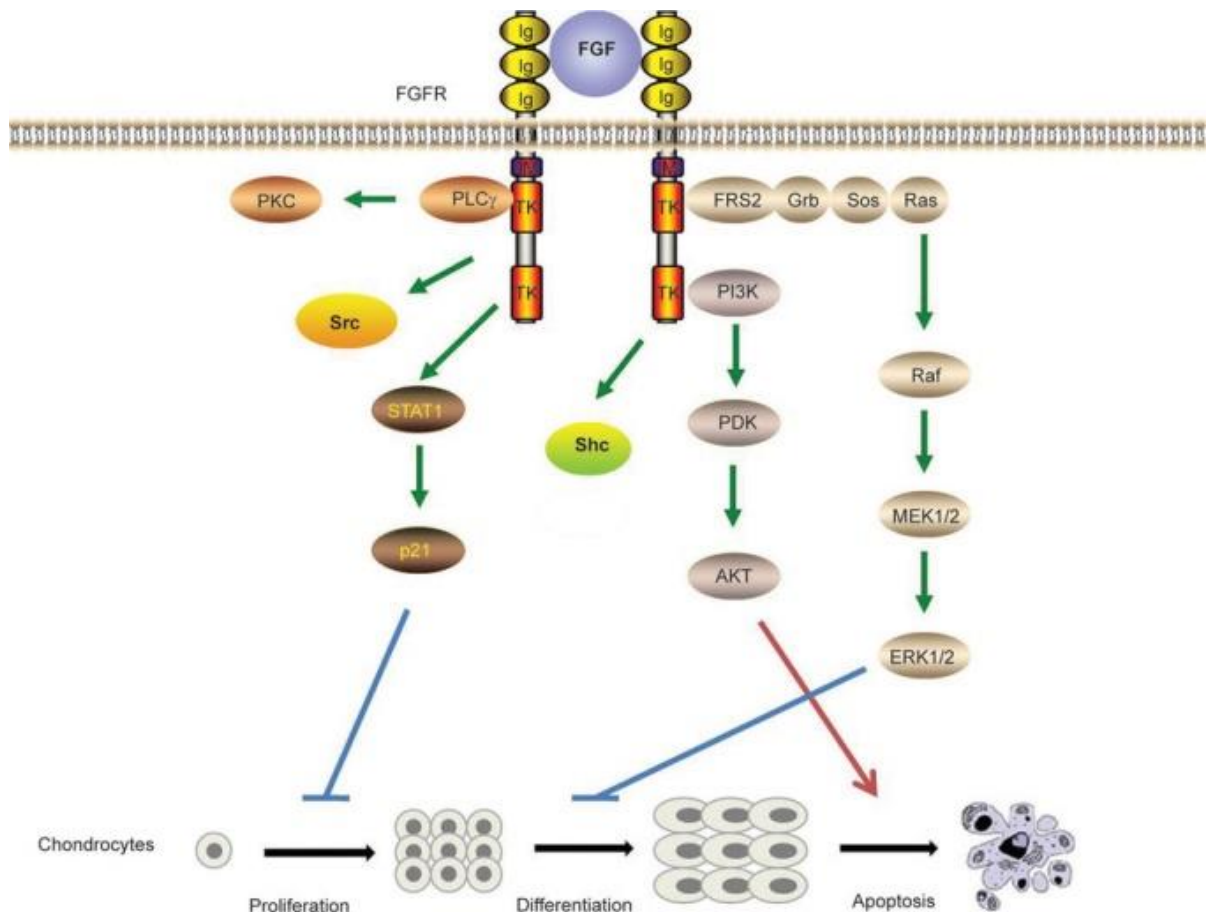
MAPK negativně ovlivňuje hypertrofii buněk a má vliv na negativní regulaci růstu. Dělení buněk probíhá beze změny (Murakami et al. 2004; Matsushita et al. 2009).

**(2) Dráhy spojené s fosfatidylinositol-3-fosfát kinázami (PI3K):** FGFR3 je autofosforylován po stimulaci ligandem. Dochází k aktivaci fosfatidylinositol-3 kinázami (PI3K) a dalších efektorových proteinů, mezi něž patří AKT protein. Tato signalizační dráha reguluje apoptózu (Ong et al. 2001).

**(3) Dráhy spojené s proteinkinázami C (PKC):** Dráha je zahájena navázáním FGF na FGFR3, dochází ke aktivaci cytosolické fosfolipázy C (PLC $\gamma$ ). PLC $\gamma$  hydrolyzuje PIP2 a vznikají druží poslové inositoltrifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG). IP3 aktivuje IP3 receptor a způsobuje zvýšení Ca<sup>2+</sup> iontů v cytoplazmě. DAG aktivuje PKC (Kim et al. 2003).

**(4) Dráhy spojené s přenosem signálu a aktivací transkripce (STAT1):** Po aktivaci receptoru dochází k aktivaci JAK („just another kinase“). JAK fosforyluje tyrosinové zbytky STAT1 proteinu a dochází k dimerizaci STAT1 monomerů prostřednictvím SH2 domén. STAT1 dimery regulují protoonkogen p21.

Pomocí této signalizační dráhy receptoru FGFR3 dochází k regulaci proliferace a byla pozorována i její role v karcinogenezi. STAT1 inhibuje proliferaci chondrocytů (Murakami et al. 2004).



**Obrázek č. 3. Čtyři hlavní signalizační dráhy receptoru FGFR.** Dráhy spojené s proteinkinázou C, s přenosem signálu a aktivací transkripce (STAT1), s fosfatidylinositol-3-fosfát kinázami (PI3K-AKT) a s MAP kinázami (MAPK) (Su et al. 2014).

### 3.3.1 Receptory FGFR a jejich mutace

Patogenní mutace v genu *FGFR3* i v homologních genech *FGFR1*, *FGFR2* a *FGFR4* mají za následek poruchu přenosu signálu prostřednictvím výše uvedených signalizačních drah a jsou následně příčinou poruch růstu a vývoje kosti. Tyto poruchy přitom nejsou nespecifické, ale určité mutace vedou zpravidla k typickým fenotypovým projevům, charakterizujícím konkrétní genetický syndrom.

Určité rekurentní patogenní mutace v genu *FGFR3* jsou tak zodpovědné za vznik achondroplázie, hypochondroplázie, thanatoforické dysplázie a dalších skeletálních dysplázií uvedených na straně 11 v tabulce č. 1. Další mutace: c.749C>G p.(Pro250Arg), c.749C>T p.(Pro250Leu), c.1000G>A p.(Ala334Thr) a c.1172C>A p.(Ala391Glu) v genu

*FGFR3* vedou ke kraniosynostóze, tedy poruše srůstu lebečních švů (Meyers et al. 1995; Bellus et al. 1996; Schindler et al. 2002; Barroso et al. 2011). Způsobují například Muenkeho syndrom (MIM 602849) nebo Crouzonův syndrom s akantózou nigricans (MIM 612247). Somatické mutace genu *FGFR3* a poruchy funkce receptoru FGFR3 byly také zkoumány v souvislosti se vznikem karcinomů močového měchýře a děložního čípku (Foth et al. 2014; Huang et al. 2015).

Dominantní mutace v genech *FGFR1* a *FGFR2* se podílejí na vzniku některých syndromových onemocnění spojených s kraniosynostózami. Způsobují například Pfeifferův syndrom (MIM101600, *FGFR1 a 2*), Jackson-Weissův syndrom (MIM123150, *FGFR1*), Antley-Bixlerův syndrom (MIM207410, *FGFR2*), Crouzonův syndrom (MIM123500, *FGFR2*), Apertův syndrom (MIM101200, *FGFR2*), Beare-Stevensonův syndrom (MIM123790, *FGFR2*) a další (Passos-Bueno et al. 1999).

Somatické mutace v genu *FGFR4* se uplatňují při karcinogenezi a podílí se především na vzniku leukemií a lymfomů (Partanen et al. 1991; Armstrong et al. 1992). Mutace v genu *FGFR4* byla popsána v souvislosti s rakovinou tlustého střeva a rakovinou plic (Bange et al. 2002).

Bylo zjištěno, že mutace v genu *FGFR3* způsobující FGFR3 vázané skeletální dysplázie jsou aktivačního charakteru. Konstitutivní aktivace receptoru, která je nezávislá na ligandu, má za následek inhibici proliferace chondrocytů v růstové ploténce a zastavení diferenciací osteocytů (Pannier et al. 2010). Naopak ztráta receptoru FGFR3 způsobuje zvýšenou proliferaci chondrocytů a prodlužování sloupců chrupavčitých buněk v epifýzách dlouhých kostí (Deng et al. 1996). Nejvíce postižené jsou nejaktivnější růstové chrupavky.

Na několika myších modelech bylo zjištěno, že jednotlivé substituce v genu *FGFR3* ovlivňují růstovou chrupavku s různou závažností. Receptory FGFR3 mohou být aktivovány bez přítomnosti ligandu nebo se mohou chovat hyperaktivně. Mutace způsobující thanatoforickou dysplázií ovlivňují aktivaci receptoru mnohem intenzivněji, než mutace způsobující achondroplázií, to také vysvětluje skutečnost, že thanatoforická dysplázie je onemocnění závažnější než achondroplázie (Naski et al. 1996).

### 3.4 Klinická a molekulární charakterizace FGFR3-vázaných osteochondrodysplázií

Mezi osteochondrodysplázie způsobené zárodečnou patogenní mutací genu FGFR3 patří achondroplázie, hypochondroplázie, thanatoforická dysplázie, SADDAN syndrom a CATSHL syndrom.

**Achondroplázie** (MIM100800) je onemocnění patřící mezi nejčastější kostní dysplázie. Název achondroplázie pochází z řečtiny: a (bez, od), khondros (chrupavka) a plasis (formování). Toto onemocnění je charakterizované disproporčním malým vzrůstem se zkrácením proximálních segmentů končetin. Finální výška pacientů se pohybuje okolo 125 cm u mužů a 120 cm u žen (Baujat et al. 2008). Charakteristické jsou projevy na lebce: pacienti mají makrocefalii, vypouklé čelo, hypoplázií střední části obličeje a sedlovitý kořen nosu. Na bederní páteři je výrazná bederní hyperlordóza kompenzovaná kyfózou hrudní páteře, břicho a hýždě výrazněji vyčnívají. Horní i dolní končetiny jsou zkrácené. Ruce pacientů s achondroplázií jsou krátké a široké a jsou připodobňované k trojzubci. Klouby jsou charakteristické vysokou laxitou. Mentální vývoj je normální (Baujat et al. 2008). Onemocnění je často doprovázeno dalšími komplikacemi, jako jsou neurologické poruchy, kardiorespirační onemocnění, ortopedické vady, obezita, zubní vady a další.

Achondroplázie je v cca 98 % případů způsobena bodovou mutací c.1138G>A, v 2 % případů mutací c.1138G>C, přičemž obě mutace vedou k záměně p.Gly380Arg v transmembránové doméně proteinu FGFR3 (Shiang et al. 1994; Bellus et al. 1995). Ojedinele byly popsány i další mutace vedoucí k fenotypu typickému pro achondroplázií jako například substituce Gly375Cys (Superti-Furga et al. 1995). Asi u 80 % pacientů onemocnění vzniklo v důsledku mutací *de novo*. Mutované nukleotidy u pacientů s achondroplázií patří mezi jedny z nejčastěji mutovaných nukleotidů v lidském genomu.

**Hypochondroplázie** (MIM 146000) je skeletální dysplázie, která se projevuje podobně jako achondroplázie, ale projevy jsou méně závažného charakteru. Název hypochondroplázie pochází z řeckých slov hypo (pod, méně než), khondros (chrupavka) a plasis (formování). Hypochondroplázie je porucha spojená s disproporčním malým vzrůstem s rhizomelickým (Grigelioniené et al. 2000) nebo mezomelickým (Beals 1969)

zkrácením dlouhých kostí horních i dolních končetin. Výška pacientů s hypochondroplázií se v dospělosti pohybuje u mužů mezi 138-165cm a u žen mezi 128-151cm (Song et al. 2012). Přibližně u poloviny pacientů s hypochondroplázií se vyskytuje makrocefalie, avšak obličejové rysy nejsou výrazně ovlivněny (Hall and Spranger 1979). Obličej pacientů nebývá postižen tak jako u achondroplázie. Horní i dolní končetiny jsou zkrácené, pacienti mají brachydaktylii.

Molekulární příčina hypochondroplázie není známá u všech nemocných. Diagnóza pacientů byla nejprve definována klinicky, po objevení molekulární podstaty byla příčina onemocnění nalezena pouze u určitého procenta nemocných. Podle některých studií u asi 60 % nemocných je hypochondroplázie způsobena rekurentními „missense“ mutacemi v genu *FGFR3*. Nejčastější jsou zárodečné mutace v kodonech 540 a 650 v tyrosin kinázových doménách genu *FGFR3* (Bellus et al. 1995, 2000), které se vyskytují u většiny pacientů, u kterých byla molekulární příčina hypochondroplázie popsána. Další mutace jsou vzácné a vyskytují se velmi ojediněle (Heuertz et al. 2006). U většiny pacientů hypochondroplázie vznikla v důsledku mutace *de novo*, menšina pacientů toto onemocnění zdědila od jednoho z rodičů.

**Thanatoforická dysplázie** je (z řec. thanatophorus – smrt přinášející, dys – špatné, plasis - formování) je označení pro letální poruchu spojenou s disproporcí malým vzrůstem. Díky současným diagnostickým možnostem je možné thanatoforickou dysplázií odhalit za pomoci ultrazvuku a takovéto těhotenství bývá často ukončeno v druhém trimestru těhotenství. Úmrtnost jedinců je nejvyšší v perinatálním období, ale byl popsán i případ, kdy se pacient dožil několika let (Baker et al. 1997). Lebka pacientů nebo plodů s thanatoforickou dysplázií je makrocefalická, může se vyskytovat kraniosynostóza. U thanatoforické dysplázie se popisuje tzv. cloverleaf scull, neboli lebka tvaru trojlístku (Partington et al. 1971). Těla obratlů jsou redukována a hrudník je zkrácený, žebra jsou zúžená. Končetiny jsou výrazně zkrácené. Často je toto onemocnění spojeno s poruchami CNS a kardiovaskulárními vadami (Pannier et al. 2009).

Thanatoforická dysplázie je rozdělena do dvou subtypů podle zakřivení femuru. **Typ I** (MIM 187600) je charakteristický zakřivenými a krátkými stehenními kostmi a širokými těly obratlů. Lebka tvaru trojlístku nemusí být přítomná. **Typ II** (MIM 187601) se projevuje relativně dlouhými a rovnými stehenními kostmi, těla obratlů jsou vyšší.

U tohoto subtypu se vyskytuje lebka tvaru trojlístku (Langer et al. 1987; Norman et al. 1992).

Onemocnění je způsobeno více mutacemi v genu *FGFR3*, typ I je způsoben několika mutacemi, z nichž nejčastější mají za následek substituce Arg248Cys, Gly370Cys, Ser371Cys, Tyr373Cys a Ser249Cys a nacházejí se v extracelulární oblasti genu *FGFR3* (Tavormina et al. 1995a; Rousseau et al. 1996a) a dále různými mutacemi terminačního kodonu, které vedou k prodloužení C-terminální části receptoru. Typ II je způsoben substitucí Lys650Glu v druhé tyrosin kinázové doméně TK2 (Tavormina et al. 1995a). Pro stanovení správné diagnózy thanatoforické dysplázie je důležité ultrazvukové vyšetření plodu, vyšetření pomocí MRI, popřípadě rentgenové vyšetření.

**SADDAN** - Těžká achondroplázie s vývojovým zpožděním a akantózou nigricans – (MIM 187600) je onemocnění, které se svou závažností podobá thanatoforické dysplázii typu I. Projevuje se disproporční krátkou postavou a kraniofaciálními defekty charakteristickými pro achondroplázii. U většiny nemocných se vyskytuje akantóza nigricans. U pacientů se často vyskytují malformace CNS a mentální retardace. Onemocnění je způsobeno substitucí Lys650Met v druhé tyrosin kinázové doméně (Tavormina et al. 1999; Zankl et al. 2008).

**CATSHL syndrom** (MIM 187600) je onemocnění spojené s kamptodaktylií, vysokou postavou a ztrátou sluchu. Tento syndrom byl objeven u dvou rodin. U části nemocných se vyskytovaly další poruchy, mezi které patří skolióza, neschopnost chůze, arachnodaktylie, mikrocefalie, vývojové opoždění a mentální poruchy.

Jako příčina tohoto autozomálně dominantního onemocnění byly označeny heterozygotní substituce Arg621His a Thr546Lys v genu *FGFR3* (Toydemir et al. 2006; Makrythanasis et al. 2014).

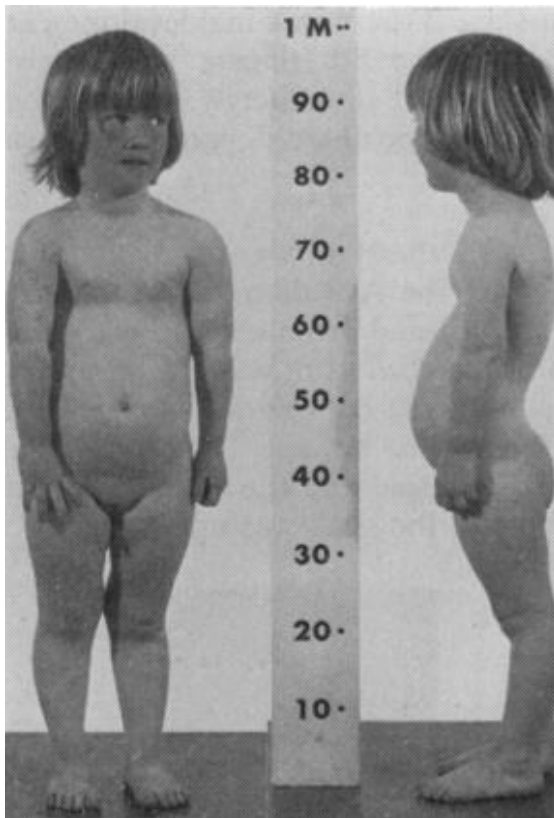
S mutacemi v genu *FGFR3* jsou kromě výše uvedených onemocnění spojená i další alelická onemocnění. Jedná se o Muenkeho kraniosynostózu a Crouzonův syndrom s akantózou nigricans. Je zajímavé, že u onemocnění, způsobených mutací v genu *FGFR3*, je velmi těsná korelace mezi genotypem a fenotypem. Jednotlivé substituce v proteinu způsobující různá onemocnění se nachází v těsné blízkosti nebo i na stejné pozici.

Tyto substituce mají za důsledek vznik rozdílného fenotypu.

### 3.5 Podrobná klinická a molekulární charakterizace hypochondroplázie

Hypochondroplázie je FGFR3-vázaná skeletální dysplázie, která byla poprvé popsána Bealsem v roce 1969. Termín hypochondroplázie poprvé navrhli v roce 1960 Lamy a Maroteaux (Bellus et al. 2000).

Beals popsal toto onemocnění na podkladě údajů o pěti dětských pacientech. Popsal hypochondroplázi jako diskrétní onemocnění charakterizované malým vzrůstem, podsaditou postavou, disproportionálními volnými končetinami a změnami na páteři. U pacientů se také vyskytovala brachydaktylie (Beals 1969; Prinster et al. 2001). U většiny pacientů byl obvod hlavy nad populační normou (Prinster et al. 2001). Pacientka s diagnózou hypochondroplázie je zobrazena na obrázku č. 4.



**Obrázek č. 4. Pacientka s hypochondroplázií.** Typické projevy jsou výrazná bederní lordóza, zkrácené končetiny, relativně delší trup, normální obličejové rysy (Glasgow et al. 1978).

### 3.5.1 Klinické projevy hypochondroplázie

Klinická kritéria pro diagnostiku hypochondroplázie nejsou jednoznačná. Znaky charakterizující toto onemocnění nejsou jedinečné pouze pro hypochondroplázi a nevyskytují se u všech pacientů s hypochondroplázií.

Mezi nejčastější projevy hypochondroplázie patří malá a zavalitá postava. U dospělých pacientů byla popsána výška pohybující se mezi 128-165 cm v závislosti na pohlaví (Appan et al. 1990). U pacientů se může vyskytovat výrazná bederní lordóza páteře a s tím spojená prominence břicha (Glasgow et al. 1978). Krátká postava, která je pro toto onemocnění typická, je způsobena převážně zkrácením dolních končetin. Horní i dolní končetiny jsou rhizomelicky (Grigelioniené et al. 2000) nebo mezomelicky (Beals 1969) zkrácené. Dále je u nemocných často popisována brachydaktylie (Beals 1969). U pacientů se dále může vyskytovat zakřivení postižených kostí horních i dolních končetin. Glasgow a kol. si ve své práci (1978) povšimli u tří pacientů větší hlavy, s opožděným uzavřením lebečních fontanel, ale bez výrazných obličejových rysů typických pro achondroplázi. Studie Hallové a Sprangera popsala výskyt makrocefalie s relativně normálními obličejovými rysy u přibližně 50 % pacientů s hypochondroplázií (Hall and Spranger 1979).

V práci Oberklaida a kol. (1979) diskutují možnost, že hypochondroplázie a achondroplázie jsou jedno různě závažně se manifestující onemocnění a popisuje značný přesah mezi achondroplázií a hypochondroplázií, ale dochází k závěru, že se pravděpodobně jedná o dvě odlišná onemocnění. Také pacienti s hypochondroplázií nemají většinou děti s achondroplázií a naopak. Tato práce se však vzhledem k době svého vzniku neopírá o molekulárně genetická data, tudíž není jistý genotyp pacientů.

U pacientů s hypochondroplázií se mohou vzácně vyskytovat další přidružené projevy tohoto onemocnění. U malé části pacientů byl pozorován lehký mentální deficit spojený s problémy s učením (Beals 1969). Další vzácnou komplikací, která doprovází hypochondroplázií jsou mozkové malformace. Byly popsány případy dvou pacientů s hypochondroplázií, u kterých se vyskytovala dysgeneze mediálního spánkového laloku (Kannu et al. 2005). U této komplikace byl zároveň popsán také výskyt epilepsie (Grosso et al. 2003). Výskyt mozkových malformací byl popsán i u dalších diagnóz jako je například thanatoforická dysplázie (Ho et al. 1984).

Závažnější fenotyp s vzácnými komplikacemi se vyskytuje častěji u pacientů,

kteří zdědili od jednoho z rodičů mutaci způsobující achondroplázií a od druhého rodiče mutaci způsobující hypochondroplázií. McKusick a kol. (1973), poprvé poukázali na případ tříleté pacientky, jejíž otec trpěl achondroplázií a matka měla diagnostikovanou hypochondroplázií. Dítě mělo smíšený fenotyp achondroplázie/hypochondroplázie a jeho fenotyp byl ovlivněn mnohem výrazněji. Ve 14 letech pacientka trpěla silnou mentální retardací, nebyla schopná chůze, téměř nemluvila a měla závažné neurologické problémy (Sommer et al. 1987). Byly popsány i další podobné případy pacientů s genotypem achondroplázie/hypochondroplázie. V těchto studiích měli rodiče mutace Gly380Arg a Asn540Lys a děti získali smíšený fenotyp, který měl výrazně závažnější projevy. Pacienti měli respirační problémy, metabolické poruchy jako je hypoglykémie (Bober et al. 2012), srdeční poruchy a hydrocefalus (Huggins et al. 1999; Chitayat et al. 1999).

Vzácně byly popsány i případy dvojité heterozygosity. Dochází k tomu díky skutečnosti, že pacienti s malou postavou spolu častěji uzavírají partnerské svazky a mají potomky. Dochází pak k situacím, kdy potomek zdědí od jednoho rodiče mutaci v genu *FGFR3* a od druhého mutaci způsobující podobné onemocnění na jiném lokusu mimo oblast genu *FGFR3*. Pacienti jsou dvojití heterozygoti pro mutaci v genu *FGFR3* a v jiném lokusu. Studie Flynn a Pauliho (2003) popisuje případ dizygotních dvojčat, kteří se narodili matce se substitucí Gly380Arg vedoucí k achondroplázií a otci s fenotypickými znaky typickými pro hypochondroplázií. Otec byl testován na běžné mutace v genu *FGFR3*, ale molekulární podstata onemocnění nebyla identifikována. Děti měly závažnější projevy než jejich rodiče, především dýchací potíže, postižení CNS, opakující se záchvaty, motorické opoždění a další poruchy. Práce popisuje možnost, že se mutace u otce vyskytuje mimo gen *FGFR3* a závažnost fenotypu u probandů – dvojčat je sekundárně způsobena právě díky dvojité heterozygositě.

### **3.5.1.1 Radiologické nálezy**

Na základě rentgenových snímků může být podpořena diagnóza hypochondroplázie. Změny lze pozorovat především na páteři, horních i dolních končetinách a lebce. Lebka pacientů s hypochondroplázií může být abnormálně velká, ale stlačení hlavových a páteřních nervů nebylo u hypochondroplázie popsáno (Glasgow et al. 1978). Páteřní kanál je kaudálně zúžený a kloubní spojení mezi kostí křížovou a kyčelní kostí bývá nízko položené a je viditelná výrazná bederní lordóza. Bederní obratle

mají konkávní tvar. Pedikly oblouků bederních obratlů jsou anterio-posteriorně zkrácené (Beals 1969; Glasgow et al. 1978). Zásadním se zdá být výskyt zúžení meziobratlových vzdáleností mezi bederními obratly L1-L5 (Prinster et al. 2001). Končetiny u hypochondroplázie jsou postiženy nejvíce. Dlouhé kosti jsou krátké a široké a mají rozšířenou metafýzu. Horní končetiny jsou charakterizované zkrácením distální části kosti loketní, styloidní výběžek kosti loketní je prodloužený (Newman and Dunbar 1975), metakarpy a distálními články prstů jsou zkrácené (Glasgow et al. 1978). Dolní končetiny vykazují následující znaky: pánev je krátká a má čtvercovitý tvar, je níže položená a vertikálně zkrácená; kosti kyčelní a stýdká jsou menší, než je norma (Matsui et al. 1998; Prinster et al. 2001; Deutz-Terlow et al. 1998). Byla pozorována deformita kyčle coxa vara (Prinster et al. 2001). Krčky stehenních kostí jsou krátké a široké (Glasgow et al. 1978). Kost lýtková je disproporčně delší než kost holenní u 80 % pacientů a krček kosti stehenní je krátký a široký u 70 %. Postižení kostí ruky vede k brachydaktylii. U pacientů se může vyskytovat prominence svalových úponů dlouhých kostí (Bober et al. 1999). Radiologické výsledky mezi pacienty s jednotlivými bodovými mutacemi v genu *FGFR3* a mutací N540K v genu *FGFR3* se výrazněji neliší od pacientů bez této mutace (Prinster et al. 2001).

### 3.5.2 Diagnostika hypochondroplázie

Klinická diagnostika hypochondroplázie je často nejistá. Pro přesnou diagnózu jsou potřeba nejen klinická data, ale i další vyšetření. Dříve se klinická diagnostika opírala o rentgenologický nálezn, v současné době je pro stanovení správné diagnózy také klíčové molekulárně genetické vyšetření. Diagnóza může být stanovena na základě antropologického vyšetření, které zahrnuje měření celkové výšky, výšky vsedě, obvodu hlavy, poměru končetin a další. Také může být provedeno vyšetření pomocí zobrazovacích metod, jako je CT, MRI, rentgen nebo ultrazvukové vyšetření v těhotenství. Studie Prinstera a kol. (2001) také poukazuje na skutečnost, že by se radiologové při diagnostice hypochondroplázie měli zaměřovat na rentgen bederní páteře a dolních končetin spíše než na pánev a horní končetiny, které vždy nevykazují znaky typické pro hypochondroplázi.

Fenotypová a genotypová heterogenita hypochondroplázie ztěžuje klinickou diagnostiku. Pacienti často nemusí být diagnostikováni, protože jejich fenotypové projevy jsou málo výrazné nebo v případě závažné hypochondroplázie může být jejich diagnóza

zaměňovaná za achondroplázii, protože tato onemocnění mají velmi podobné projevy. Závažné formy hypochondroplázie je obvykle jednodušší rozlišit než mírné formy (Brook and de Vries 1998).

Určit správnou diagnózu na základě klinických příznaků je obtížné především v kojeneckém věku a raném dětství (Beals 1969). Někteří novorozenci s hypochondroplázií mohou mít po porodu normální fenotyp a charakteristické znaky pro hypochondroplázií se manifestují až později, obvykle během druhého nebo třetího roku života.

Diagnóza může být stanovena na základě molekulárně genetických metod průkazem mutace v genu *FGFR3* typické pro hypochondroplázií. Avšak nezjištění mutace způsobující hypochondroplázií nevyvrací diagnózu stanovenou na základě klinických nebo radiologických dat. Standardně se v diagnostických laboratořích při podezření na hypochondroplázií nevyšetřuje oblast celého genu *FGFR3*, ale analyzují se pouze oblasti s vyšším výskytem mutací (Bober et al. 1999). U hypochondroplázie se jedná o exony 13 a 15, u achondroplázie o exon 10 a u thanatoforické dysplázie exony 7, 10, 15 a 19. Dále existuje část nemocných s hypochondroplázií, u kterých příčina onemocnění nebyla dosud odhalena a předpokládá se, že onemocnění u nich není vázáno na gen *FGFR3* (Rousseau et al. 1996b).

Včasná diagnostika je důležitá především pro zmírnění úzkosti rodičů, protože prognóza finální výšky je příznivější než u achondroplázie. Dále je podstatná především pro stanovení rizika přenosu onemocnění na potomstvo. V případě výskytu mutace u jednoho rodiče je riziko přenosu na potomka 50 %. Pacientům s diagnózou hypochondroplázie by měla být poskytnuta genetická konzultace.

### **3.5.3 Léčba hypochondroplázie**

Léčba hypochondroplázie a achondroplázie je dosud prováděna zejména ortopedickými korekcemi, především prodloužením dlouhých kostí u pacientů s očekávanou významně nízkou finální výškou.

Další terapeutickou možností, ověřovanou v několika klinických studiích je léčba růstovým hormonem. V souvislosti s touto léčbou byl studován růst pacientů s hypochondroplázií, který je charakteristický sníženou růstovou rychlostí. Appan a kol.(1990) ve své studii sledovali růst u 84 pacientů s hypochondroplázií, jejichž růst se před pubertou zdál být relativně normální a výrazné poruchy růstu u nich nastaly

až v průběhu puberty. Nástup puberty u těchto dětí byl normální, avšak nedošlo ke standartnímu růstovému spurtu, což mělo za následek výslednou podprůměrnou výšku, která činila u chlapců v průměru 145-165cm a u dívek 133-151 cm. Poté vybrali dvacet dětí trpících hypochondroplázií, léčili je růstovým hormonem a sledovali jejich růst. U dětí bylo pozorováno zrychlení růstu, obnovení pubertálního růstového spurtu a snížení skóre směrodatné odchylky v porovnání s chronologickým věkem pacientů (Appan et al. 1990). Bylo zjištěno, že efekt substituční léčby růstovým hormonem u achondroplázie i hypochondroplázie je velmi individuální (Appan et al. 1990; Ramaswami et al. 1999).

Studie Rothenbuhlera a kol. popsala šest pacientů se záměnou Asn540Lys a závažným fenotypem hypochondroplázie, kteří byli léčeni rekombinantním růstovým hormonem. Na pacientech bylo pozorováno zlepšení růstu a snížení disproporčnosti. Tato studie stále probíhá a konečné výsledky budou známy až po dosažení finální výšky pacientů a to přibližně mezi roky 2018 a 2020 (Rothenbuhler et al. 2012).

#### **3.5.4 Genotyp hypochondroplázie**

Hypochondroplázie je autozomálně dominantně dědičné onemocnění (Beals 1969). V roce 1995 ve své práci Bellus a kol. publikovali zjištění, že příčinou hypochondroplázie jsou rekurentní mutace v genu *FGFR3* (Bellus et al. 1995).

Hypochondroplázie může být způsobena jednou z několika různých mutací v genu *FGFR3* (viz tabulka č. 2 a obrázek č. 5). Přibližně v 60 % potvrzených případech je způsobena jednonukleotidovou substitucí C na A na pozici 1620, c.1620C>A, která vede k záměně p.Asn540Lys v oblasti tyrosin kinázové domény 1 receptoru FGFR3 (Bellus et al. 1995). Pacienti se substitucí Asn540Lys v exonu 13 mají makrocefalii, prodlouženou lýtkovou kost oproti kosti holenní a malý vzrůst (Prinster et al. 1998). Byla objevena další heterozygotní mutace také na pozici 1620 v genu *FGFR3*, jednalo se o záměnu C na G, c.1620C>G p.(Asn540Lys) (Rousseau et al. 1996b). Rozdíl mezi pacienty s mutací c.1620C>A, způsobující substituci Asn540Lys, a bez této mutace popsal ve své práci Ramaswami a kol. (1998). Autoři došli k závěru, že u pacientů se substitucí Asn540Lys se porucha prezentuje ve věku mezi 5 a 6 lety a u pacientů bez této mutace ve věku okolo 10,5 roku. Fenotyp pacientů s hypochondroplázií se dle této práce rozpozná kolem 3,5 roku. Zároveň pacienti se substitucí Asn540Lys měli závažnější fenotyp, byli výrazněji zkráceni a jejich fenotyp se výrazněji podobal achondroplázii oproti pacientům bez této

mutace.

V roce 1998 byly popsány další mutace. U jedné holandské rodiny byla objevena záměna c.1619A>C p.(Asn540Thr) v tyrosin kinázové doméně (Deutz-Terlow et al. 1998), u švédské rodiny byla popsána mutace c.1651A>G vedoucí k aminokyselinové substituci Ile538Val. V případě mutace c.1651A>G p.(Ile538Val) byl fenotypový projev onemocnění mírnější, podle autorů studie ovlivňuje závažnost onemocnění konzervativnost substituce aminokyselin (Grigelioniené et al. 1998).

Winterpacht a kol. (2000) byl popsal mutaci v imunoglobulinové doméně III vedoucí k substituci Asn328Ile. Autoři předpokládají, že mutace ve třetí imunoglobulinové doméně má vliv na N-glykosylační místo na této pozici. Aminokyselinová záměna pravděpodobně nemá vliv na trojrozměrnou strukturu domény receptoru FGFR3 a patologický dopad má spíše změna v glykosylaci proteinu (Winterpacht et al. 2000).

Další z mutací, která byla u hypochondroplázie objevena, je mutace c.1620A>G, která zapříčiňuje záměnu Asn540Ser. Tento objev vedl k poznatku o důležitosti pozice Asn540 v tyrosin kinázové doméně 1 a jejím vlivu na patogenezi onemocnění. Proto bylo doporučeno provádět vyšetření celé TK1 domény genu *FGFR3* (Mortier et al. 2000; Thauvin-Robinet et al. 2003). Aspargin na pozici 540 se nachází ve vysoce konzervované oblasti tyrosin kinázové domény a je zásadní pro správnou funkci FGFR3 receptoru. Patogenní mutace na pozici 540 se nachází v hydrofobní oblasti  $\alpha$ -helixu a ovlivňuje jeho strukturu (Worley et al. 1995 dle Deutz-Terlow et al. 1998).

Heuerzová a kol. (2006) provedli výzkum 18 hlavních exonů genu *FGFR3* u 74 pacientů s hypochondroplázií a jednoho pacienta s achondroplázií. U 48 pacientů zjistili substituce Asn540Lys, Lys650Gln nebo Gly380Arg. Studie odhalila 7 nových substitučních bodových mutací v transmembránové doméně a v extracelulárních doménách. U 6 pacientů s hypochondroplázií se jednalo o „missense“ mutace, které se projeví substitucemi Tyr278Cys (fenotyp pacienta byl achondroplázie/hypochondroplázie), Gly268Cys, Arg200Cys, Asn262His, Ser84Leu a Val381Glu v exonech: 3, 5, 7 a 10, a u pacienta s achondroplázií byla objevena mutace Ser279Cys v exonu 7. U 19 nemocných žádnou mutaci v genu *FGFR3* nenalezli. U čtyř z těchto mutací dochází k záměně původní aminokyseliny za cystein. Fenotyp u pacientů s tímto typem záměny byl vážnějšího rázu (Heuertz et al. 2006).

**Tabulka č. 2.** Seznam dosud publikovaných mutací v genu *FGFR3* způsobujících hypochondroplázií (www.hgmd.org).

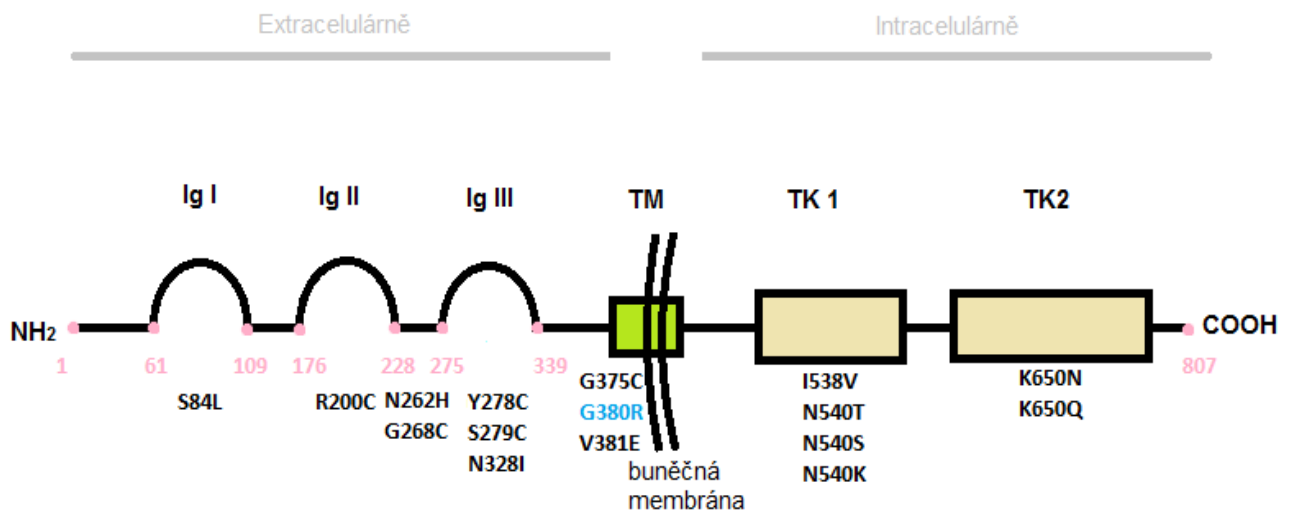
<b>Hypochondroplázie:</b>				
Kodonová změna	Aminokyselinová změna	Číslo kodonu:	Mutace:	Substituce:
TCG>TTG	Ser-Leu	84	c.251C>T	p.Ser84Leu
CGC>TGC	Arg-Cys	200	c.598C>T	p.Arg200Cys
AAC>CAC	Asn-His	262	c.784A>C	p.Asn262His
GGC>TGC	Gly-Cys	268	c.802G>T	p.Gly268Cys
TAC>TGC	Tyr-Cys	278	c.833A>G	p.Tyr278Cys
GGC>TGC	Gly-Cys	295	c.883G>T	p.Gly295Cys
AAC>ATC	Asn-Ile	328	c.983A>T	p.Asn328Ile
TCT>TGT	Ser-Cys	351	c.1052C>G	p.Ser351Cys
GAG>AAG	Glu-Lys	360	c.1078G>A	p.Glu360Lys
GTG>GAG	Val-Glu	381	c.1142T>A	p.Val381Glu
CAG>CGG	Gln-Arg	485	c.1454A>G	p.Gln485Arg
ATC>GTC	Ile-Val	538	c.1612A>G	p.Ile538Val
AAC>AAA	Asn-Lys	540	c.1620C>A	p.Asn540Lys
AAC>AAG	Asn-Lys	540	c.1620C>G	p.Asn540Lys
AAC>ACC	Asn-Thr	540	c.1619A>C	p.Asn540Thr
AAC>AGC	Asn-Ser	540	c.1619A>G	p.Asn540Ser
AAG>AAC	Lys-Asn	650	c.1950G>C	p.Lys650Asn
AAG>AAT	Lys-Asn	650	c.1950G>T	p.Lys650Asn
AAG>CAG	Lys-Gln	650	c.1948A>C	p.Lys650Gln

Leroy a kol. (2007) popisují případ pacientky, která byla sledována pro mírnější osteochondrodysplázií, pravděpodobně hypochondroplázií. Ve věku 8 let se u pacientky objevilo kožní onemocnění akantóza nigricans. Pacientce byla diagnostikována substituční mutace c.1948A>C, která vedla k záměně Lys650Gln v genu *FGFR3*.

De Rosa a kol. (2014) popsali případ pacienta s hypochondroplázií a homozygotní substitucí Asn540Lys. Pacient zdědil od obou rodičů, kteří nebyli v příbuzenském vztahu, stejnou substituci Asn540Lys. Fenotyp pacienta byl vážnějšího charakteru než fenotyp rodičů a podobal se složenému heterozygotovi s fenotypem hypochondroplázie/achondroplázie (McKusick et al. 1973; Langer et al. 1987; Chitayat et al. 1999; Huggins

et al. 1999), u pacienta se projevilo vývojové opoždění hrubé motoriky a kognitivních funkcí, dále abnormality spánkového laloku a u pacienta se v dětství vyskytla také hypotonie (De Rosa et al. 2014).

Vyšší paternální věk byl popsán jako faktor podmiňující vznik *de novo* mutací u mnoha onemocnění. Ovlivňuje například i vznik achondroplázie (Orioli et al. 2005). U hypochondroplázie však role pokročilého věku otce na vznik onemocnění nebyla prokázána (Wynne-Davies et al. 1981).



**Obrázek č. 5. Schéma receptoru FGFR3 a dosud zjištěných mutací způsobujících hypochondroplázií a achondroplázií. Mutace způsobující hypochondroplázií jsou znázorněny černě, majoritní mutace způsobující achondroplázií je zakreslena modře.**

### 3.5.5 Heterogenita onemocnění

Hypochondroplázie je jen u části nemocných způsobena mutací genu *FGFR3*, ani analýza celého genu *FGFR3* neodhalila příčinu hypochondroplázie u všech pacientů.

Byly také provedeny vazebné studie, které ukázaly, že u některých pacientů není hypochondroplázie vázána na oblast genu *FGFR3* (Stoilov et al. 1995). V roce 1996 bylo u 6 familiárních případů pacientů s hypochondroplázií z 16 vyloučena vazba na lokus 4p16, a postižení měli mírnější fenotypový projev (Rousseau et al. 1996b). Dosud však žádný další kandidátní gen zodpovědný za hypochondroplázií nebyl identifikován.

## 4 Hypotéza

- Hypochondroplázie je osteochondrodysplázie, jejíž známou molekulární příčinou jsou určité zárodečné mutace genu *FGFR3*, které vedou ke konstitutivní aktivaci receptoru FGFR3. Při rutinním vyšetření genu *FGFR3* u hypochondroplázie byly dosud analyzovány jen vybrané úseky genu (exony 13 a 15) a detekovány mutace v kodonech 540 a 650, tj. v tyrosin kinázových doménách receptoru. Domníváme se, že mutace vedoucí ke konstitutivní aktivaci receptoru mírného stupně, které by vedly k mírným fenotypovým projevům typu hypochondroplázie, se mohou vyskytovat i v jiných úsecích genu *FGFR3* a analýza celého genu *FGFR3* u nemocných s klinickou diagnózou hypochondroplázie by mohla odhalit příčinu onemocnění u dalších pacientů.

## 5 Cíle práce

Na základě výše uvedené hypotézy jsme určili cíle této diplomové práce následovně:

- Zavést a ověřit metodu sekvenace genu *FGFR3* metodou sekvenace DNA dle Sangera.
- Za pomoci mutační analýzy prověřit kódující exony genu *FGFR3* u pacientů s disproporčním malým vzrůstem a klinickou diagnózou achondroplázie/ hypochondroplázie, a určit, zda se příčina tohoto onemocnění nachází v oblasti kódující DNA genu *FGFR3*.
- Charakterizovat zjištěné varianty *in silico* PolyPhen-2. Identifikované mutace porovnat s publikovanými nálezy mutací v genu *FGFR3*. Interpretovat případný vliv mutace v genu *FGFR3* na strukturu a funkci receptoru FGFR3.

## 6 Materiál

### 6.1 Soubor pacientů

Do studie byli zařazeni pacienti, kteří byli doporučeni v letech 2002-2014 k molekulárně genetickému vyšetření hypochondroplázie do Ústavu biologie a lékařské genetiky ve Fakultní nemocnici v Motole pro disproporční malý vzrůst a podezření na hypochondroplázi. Pacienti poskytli informovaný souhlas k molekulárně genetickému vyšetření hypochondroplázie.

Výše uvedený soubor zahrnoval **193** pacientů s klinickou diagnózou hypochondroplázie. U těchto pacientů byla provedena molekulárně genetická analýza exonů 13 a 15 mezi lety 2002 až 2014. U **37** pacientů byla v těchto letech odhalena molekulární příčina onemocnění. Mutace byla nalezena u **10** pacientů se sporadickým výskytem a u **12** rodin (**27** pacientů) s familiárním výskytem onemocnění. U zbylých **156** pacientů nebyly mutace v této oblasti odhaleny.

Primárně zvolený soubor pacientů s diagnostikovaným disproporčním malým vzrůstem a s podezřením na hypochondroplázi tedy čítal 156 probandů. Z toho bylo 58 pacientů vyřazeno pro nedostatek materiálu.

Sekundární soubor činil **101** probandů z České republiky. Z tohoto souboru byli vyřazeni další 3 pacienti, u kterých byla během provádění této studie odhalena jiná příčina malého vzrůstu. Výsledný soubor tedy čítal **98** pacientů, z toho bylo 47 mužů a 50 žen. Výskyt onemocnění byl u **18** pacientů z **12** nepříbuzných rodin familiárního charakteru a u **80** pacientů byl výskyt sporadický.

Věk pacientů v našem souboru se pohyboval v rozmezí 0 (diagnostikovaný v den narození) - 48 let.

Do souboru familiárních pacientů byli zařazeni pacienti, u kterých byli alespoň 2 členové rodiny posláni na molekulární vyšetření genu *FGFR3*. U těchto pacientů s potvrzeným familiárním výskytem hypochondroplázie byly sekvenační analýze podrobeny exony 2-19 a u sporadických případů byly vyšetřeny pouze exony 3,5, 7, 10, 13 a 15. Vyšetřované exony byly vybrány na podle studie Heuertz a kol. (2006), a to na základě četnosti výskytu jednotlivých mutací.

Poté co byla u pacienta č. 1 (viz kapitola Výsledky) objevena vzácná mutace v exonu 7 a závažný fenotyp pacientky č. 1 připomínal achondroplázi, byl dodatečně vyšetřen

druhý soubor 17 nemocných s klinickou diagnózou achondroplázie se sporadickým výskytem onemocnění a bez mutace Gly380Arg, neboť jsme se domnívali, že se tato mutace může vyskytovat u pacientů se závažnějším fenotypem, a diagnózou achondroplázie nebo achondroplázie/hypochondroplázie. U těchto pacientů byl cíleně sekvenován pouze exon 7. Tento soubor nebyl zahrnut do statistického hodnocení.

## 6.2 Kontrolní soubor

Pro validaci metody byl vybrán soubor 32 pozitivních kontrol s mutacemi v exonech 7, 10, 13, 15 a 19 způsobující achondroplázi, hypochondroplázi nebo thanatoforickou dysplázi. Kontrolní soubor je přehledně zobrazen v tabulce č. 3.

**Tabulka č. 3.** Seznam pozitivních kontrol využitých pro validaci PCR reakce.

Počet pacientů	exon 7	exon 10	exon 13	exon 15	exon 19	onemocnění
5	c.749C>G p.(Pro250Arg)					kraniosynostóza
3	c.742C>T p.(Arg248Cys)					thanatoforická dysplázie I
3	c.746C>G p.(Ser249Cys)					thanatoforická dysplázie I
2		c.1138G>A p.(Gly380Arg)				achondroplázie
2		c.1138p.G>C p.(Gly380Arg)				achondroplázie
2		c.1118A>G p.(Tyr373Cys)				thanatoforická dysplázie I
11			c.1620C>A p.(Asn540Lys)			hypochondroplázie
3				c.1948A>G p.(Lys650Glu)		thanatoforická dysplázie II
1					c.2420G>C p.(Term807Ser)	thanatoforická dysplázie II

V exonu 7 bylo vybráno 11 pozitivních kontrol s mutacemi c.749C>G p.(Pro250Arg), p.742C>T p.(Arg248Cys) a c.746C>G p.(Ser249Cys). V exonu 10 bylo zvoleno 6 pacientů s mutacemi c.1138G>A p.(Gly380Arg), c.1138p.G>C p.(Gly380Arg) a c.1118A>G p.(Tyr373Cys). Pro exon 13 bylo zvoleno 11 pozitivních kontrol s mutací c.1620C>A p.(Asn540Lys) vedoucí k fenotypu hypochondroplázie. V exonu 15 byly vybrány 3 pozitivní kontroly s mutací c.1948A>G p.(Lys650Glu). Pro exon 19 připadala v úvahu pouze jedna pozitivní kontrola s mutací c.2420g>C p.(Term807Ser). Výsledky sekvenační

analýzy kontrolního souboru jsou zobrazeny na obrázku č. 11 na straně 53 a na obrázku č. 12 na straně 54.

### **6.3 Vzorky DNA**

K analýze při zpracování praktické části diplomové práce byla použita DNA izolovaná z periferní krve pacientů, která byla vyizolovaná mezi lety 2002-2014 ve FN v Motole, ale také v dalších zdravotnických zařízeních České republiky.

### **6.4 Použité chemikálie**

Agaróza - Agarose SFR<sup>TM</sup> (Amresco)

Dimethylsulfoxid puriss.p.a. ACS reagent 99% (lékárna FN Motol)

Destilovaná voda pro laboratorní účely (lékárna FN Motol)

Ethanol 70% [v/v] (lékárna FN Motol)

Ethanol 95% [v/v] (lékárna FN Motol)

Ethidiumbromid (1% [w/v] roztok ve vodě) pro elektroforézu (Merck)

Hi-Di<sup>TM</sup> Formamid (Applied Biosystems)

Isopropylalkohol p.a. (lékárna FN Motol)

Octan sodný bezvodý, p.a.: 3 mol/l, ph 5,2 (lékárna FN Motol)

Orange G (Sigma)

Sacharóza pro mol. biol.

Voda pro injekční účely - Aqua pro injectione (Braun)

### **6.5 Roztoky**

„kyselý ethanol“ (1, 8ml 3M octan sodný bezvodý, p.a., pH=5,2; 37,5ml 95% ethanolu [v/v], 8,7 ml injekční vody)

TBE pufr 10x koncentrovaný (na 1litr: 54g Tris, 27,5 g kyseliny borité, 20 ml 0,5M EDTA s pH 8,0; AMRESCO)

1x TBE pufr (89 mM Tris, 89 mM kyseliny borité, 2mM EDTA); (100ml TBE pufru 10x koncentrovaného a 900ml destilované vody)

## 6.6 Komerční pufry a roztoky

dNTPs Set (100mM dATP, 100mM dCTP, 100mM dGTP, 100mM dTTP; Promega)

Gel loading buffer (Sigma-Aldrich)

PCR Master Mix (Fermentas): TaqDNA polymeráza 1U/ $\mu$ l

10x reakční pufr s KCl – 100 mM Tris-HCl (pH 8,8

při 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (V/V) Nonidet P40

25mM roztok MgCl<sub>2</sub>

SureClean Plus 5 ml (Bioline)

## 6.7 Komerční soupravy

BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit Ready Reaction, 100rxn (Applied Biosystems)

Genra Puregene Blood Kit (Quiagene): Red Blood Cell Lysis Solution,

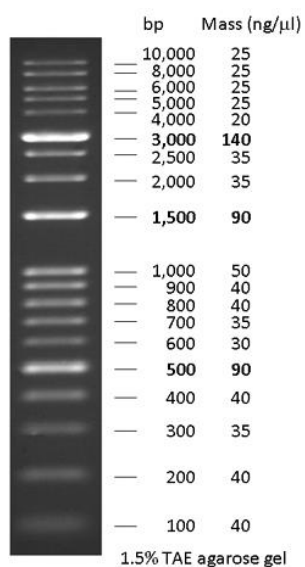
Cell Blood Lysis Solution,

Protein Precipitation Solution

DNA Hydration solution

## 6.8 Standardy molekulových hmotností

1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogene)



Obrázek č. 6. 1 Kb Plus DNA ladder (převzato z [www.nacalaiusa.com](http://www.nacalaiusa.com)).

## 6.9 Oligonukleotidové primery (Generi Biotech)

**Tabulka č. 4. Primery pro PCR amplifikaci jednotlivých exonů genu FGFR3.** Seznam primerů pro jednotlivé exony; u primerů značených „op“ byly primery opraveny, původní navržené primery, které nebyly dostatečně specifické, v tabulce nejsou uvedeny; primer značený „i“ („inner“) je vnitřní primer, který bylo nutné pro tento exon navrhnout.

Název primeru	Exon	Sekvence primeru 5' → 3'
FGFR3e2F	Exon 2 forward primer	AGCTGCCTTCCTCCTCCTG
FGFR3e2R	Exon 2 reverse primer	CAGCGGAATCCGGGCTCT
FGFR3e3F	Exon 3 forward primer	TCAGAGCCTTCCTCACTCAG
FGFR3e3R	Exon 3 reverse primer	CCACCAATGACCAGAGAGAC
FGFR3e4F	Exon 4 forward primer	GTCTCTCTGGTCATTGGTGG
FGFR3e4R	Exon 4 reverse primer	GCCTTAGTCCCTCAGCTGC
FGFR3e5F	Exon 5 forward primer	CTCTGCTCCCACTCGGGTC
FGFR3e5R	Exon 5 reverse primer	TGCCAGGCCAGAGCCAC
FGFR3e6Fop	Exon 6 forward primer opravený	TCCGCTTCCGCTGCCAG
FGFR3e6R	Exon 6 reverse primer	ACACCTTGCAGTGGA ACTCC
FGFR3e7F	Exon 7 forward primer	CAGCTGCGGCATCAGCAGT
FGFR3e7R	Exon 7 reverse primer	CTCTGCAGACACGGAAACG
FGFR3e9F	Exon 9 forward primer	CTGCCGTGTGGACTCTGTG
FGFR3e9R	Exon 9 reverse primer	CTGGCAGCTTTGGCGTGTC
FGFR3e10F	Exon 10 forward primer	TTACTGACTGCGAGACCCTC
FGFR3e10R	Exon 10 reverse primer	AGTACCCTAGGCTCTACATG
FGFRE10Fi	Exon 10 vnitřní forward primer	ATGTCTTTGCAGCCGAGGAG
FGFR3e11F	Exon 11 forward primer	AATCTTCATTCAATGCTGGTG
FGFR3e11R	Exon 11 reverse primer	ACGAAGAGTGTCAACCACAG
FGFR3e12F	Exon 12 forward primer	CTGTGGGTGACACTCTTCGT
FGFR3e12R	Exon 12 reverse primer	CGATCATCTTCATCATCTCC
FGFR3e13Fop	Exon 13 forward primer opravený	GATGCTGAAAGGTGAGGAGG
FGFR3e13Rop	Exon 13 reverse primer opravený	GTTACCCTTGCCGCGTAC
FGFR3e14F	Exon 14 forward primer	GGAGATGATGAAGATGATCG
FGFR3e14R	Exon 14 reverse primer	CCTACTCCACCCACACCTG
FGFR3E15F	Exon 15 forward primer	CAGGTGTGGGTGGAGTAGG
FGFR3E15R	Exon 15 reverse primer	TAGACTCGGTCAAACAAGGC

FGFR3E16F	Exon 16 forward primer	GTGATGAAGATCGCAGACTT
FGFR3E16R	Exon 16 reverse primer	AATAGGCCAGGGCTGCGC
FGFR3E17Fop	Exon 17 forward primer opravený	CGCAGCCCTGGACTATTC
FGFR3E17Rop	Exon 17 reverse primer opravený	CTGAGGACCCAGTGGAGG
FGFR3E18Fop	Exon 18 forward primer opravený	TGGCAGCCCTTCAGGCTG
FGFR3E18Rop	Exon 18 reverse primer opravený	AGGCCAGAGCCAGCACTC
FGFR3E19F	Exon 19 forward primer	CACAGCCTGGGCACAGAG
FGFR3E19R	Exon 19 reverse primer	TGTCTCTCCATCTGCACT

## 7 Metody

Metody použité při zpracovávání této diplomové práce vycházejí z protokolů ÚBLG FN v Motole. DNA, byla získána izolovaná z nesrážlivé žilní krve. Jednotlivé exony genu *FGFR3* jsme amplifikovali pomocí polymerázové řetězové reakce.

Amplifikovanou DNA jsme zbavili jednotlivých složek pomocí roztoku SureClean Plus. Poté jsme provedli sekvenační reakci metodou dle Sangera. Po proběhnutí sekvenační reakce jsme produkt sekvenační reakce očistili alkoholovým srážením. Po vysrážení a rozpuštění v Hi-Di Formamidu jsme produkt sekvenační reakce analyzovali na genetickém sekvenátoru 3130xL Applied Biosystems. Prostřednictvím programu Chromas Lite MFC Application jsme analyzovali jednotlivé sekvence a hledali jsme heterozygotní mutace a polymorfismy. Pomocí programu BLAST jsme porovnali jednotlivé sekvence ve formátu FASTA s referenční sekvencí dané oblasti. Tímto způsobem jsme ověřili, zda se v daném úseku nevyskytují homozygotní mutace nebo SNP.

Charakter zjištěných variant SNP jsme vyhodnocovali porovnáním s databází NCBI. V případě, že jsme našli nepopsanou variantu, ověřili jsme patogenitu *in silico* programem PolyPhen-2, MutationTaster a SIFT.

### 7.1 Izolace genomové DNA

DNA jsme izolovali z 1-5 ml nesrážlivé periferní krve pacientů, odebrané do zkumavek s K<sub>3</sub>EDTA. Odběr i zpracování proběhlo s informovaným souhlasem pacientů nebo zákonných zástupců dětských pacientů. Nejprve byly lyzovány nejaderné a poté i jaderné buňky. Následně byly odstraněny proteiny a lipidy a DNA byla získána vysrážením za pomoci isopropylalkoholu.

#### Použité přístroje:

laminární box (ThermoScientific)

termostat

třepačka MS2 Minishaker IKA

centrifuga - Centrifuge 5804 R (Eppendorf)

**Použité chemikálie:**

Biologický materiál: krevní vzorek (ve zkumavkách s K<sub>3</sub>EDTA)

Gentra Puregene Blood Kit (Quiagene): Red Blood Cell Lysis Solution

Cell Lysis Solution

Protein Precipitation Solution

DNA Hydration Solution

Isopropylalkohol p.a. (lékárna FN Motol)

Ethanol 70% [v/v] (lékárna FN Motol)

**Postup:**

1. Práci jsme prováděli v laminárním boxu s použitím latexových rukavic. Zkumavky jsme řádně označili, aby nedošlo k záměně vzorků.
2. Vzorek krve o objemu 1-5 ml, který byl odebrán k izolaci DNA, jsme smíchali v 50ml zkumavce s roztokem Red Blood Cell Lysis Solution v poměru 1:3 (na 3ml izolované krve 9ml roztoku).
3. Směs ve zkumavce jsme převraceli, obsah tím promíchali a nechali inkubovat při laboratorní teplotě 10 minut.
4. V průběhu inkubace jsme několikrát směs promíchali.
5. Směs jsme zcentrifugovali v laboratorní teplotě 10 minut při 5000 otáčkách za minutu (3214 rcf).
6. Ze zkumavky jsme odlili většinu supernatantu do odpadní lahve, ponechali jsme asi 100-200µl supernatantu, pelet jsme resuspendovali.
7. K resuspendovaným buňkám jsme přidali roztok Cell Lysis Solution v poměru k izolované krvi 1:1 ( 3ml izolované krve na 3ml roztoku Cell Lysis Solution).
8. Roztok jsme několikrát promíchali, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění částí směsi a roztok nezačal být homogenní.
9. Do směsi jsme přidali roztok Protein Precipitation Solution v poměru 1:3 k izolované krvi ( 3ml izolované krve na 1ml roztoku Cell Lysis Solution). Směs jsme zamíchali na třepačce po dobu 20 sekund, aby došlo k promísení roztoků. Došlo k vysrážení proteinu.
10. Vzorek jsme vložili do centrifugy a centrifugovali v laboratorní teplotě 10 minut při 5000otáčkách za minutu (3214 rcf).

11. Vysrážené proteiny vytvořily pevný pelet. Supernatant s rozpuštěnou DNA jsme slili do čisté 50ml zkumavky.
12. Do směsi jsme přidali 100% izopropylalkohol v poměru 1:1 s izolovanou krví (na 3ml izolované krve, 3ml izopropylalkoholu).
13. Zkumavku se směsí jsme pomalým krouživým pohybem promíchali, dokud nebyla DNA okem viditelná jako jemná, mléčně zakalená sraženina.
14. DNA jsme pipetou přenesli do nové označené mikrozkušavky. Poté jsme DNA propláchli 200 $\mu$ l 70% ethanolem.
15. Ethanol jsme opatrně odsáli automatickou pipetou tak, abychom neodsáli vyizolovanou DNA a nechali zkumavku s DNA schnout asi 5-10 minut.
16. DNA jsme rozpouštěli v DNA Hydration Solution (podle velikosti peletu jsme přidali 10-500 $\mu$ l roztoku) přes noc při laboratorní teplotě.
17. Vzorek jsme uchovávali dlouhodobě při 4 °C.

## **7.2 PCR amplifikace**

### **7.2.1 Klasická polymerázová řetězová reakce**

Polymerázová řetězová reakce je metoda, pomocí níž dochází k namnožení konkrétního úseku DNA pomocí oligonukleotidových primerů, které jsou komplementární k oběma koncům DNA, termostabilní DNA polymerázy a směsi dinukleotidů. Velmi zásadní je volba specifických oligonukleotidů, správného složení reakční směsi, množství hořčíku a volba ideální teploty pro průběh reakce.

#### **Použité přístroje:**

Termocycler 2720 Thermal cycler, Applied Biosystems

#### **Použité chemikálie:**

genomová DNA pacienta

Příslušné oligonukleotidové primery naředěné na koncentraci 100pmol/ $\mu$ l (forward a reverse, které odpovídají amplifikovanému úseku, viz tabulka č. 4. na straně 35-36)

Voda pro injekční účely - Aqua pro injectione (Braun)

PCR Master Mix (Fermentas): TaqDNA polymeráza 1U/ $\mu$ l

10x reakční pufr s KCl – 100 mM Tris-HCl (pH 8,8  
při 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (V/V) Nonidet P40  
25mM roztok MgCl<sub>2</sub>

dNTPs Set (100mM dATP, 100mM dCTP, 100mM dGTP, 100mM dTTP; Promega)

Dimethylsulfoxid puriss.p.a. ACS reagent 99% (lékárna FN Motol); dále DMSO

### Postup:

1. Nejprve jsme si připravili směs dinukleotidů. Do 920 $\mu$ l injekční vody jsme pipetou přidali 20 $\mu$ l od každého nukleotidu. Tedy 20 $\mu$ l dATP, 20 $\mu$ l dCTP, 20 $\mu$ l dGTP a 20 $\mu$ l dTTP do koncentrace 100mM (výsledná koncentrace 2mM).
2. Poté jsme si do 1,5ml zkumavek připravili reakční směs dle tabulek č. 5-7 viz níže.

**Tabulka č. 5.** Reakční směs pro PCR reakci s 1mM Mg<sup>2+</sup>

Složky směsi	Objem ("1ml")
H <sub>2</sub> O	710 $\mu$ l
10x reakční pufr s KCl (Fermentas)	100 $\mu$ l
dNTP mix, 2mM každý	100 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	40 $\mu$ l
Forward primer 100 pmol/ $\mu$ l	5 $\mu$ l
Reverse primer 100 pmol/ $\mu$ l	5 $\mu$ l

**Tabulka č. 6.** Reakční směs pro PCR reakci s 1,5 mM Mg<sup>2+</sup>

Složky směsi	Objem ("1ml")
H <sub>2</sub> O	690 $\mu$ l
10x reakční pufr s KCl ( Fermentas)	100 $\mu$ l
dNTP mix, 2mM každý	100 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	60 $\mu$ l
Forward primer 100 pmol/ $\mu$ l	5 $\mu$ l
Reverse primer 100 pmol/ $\mu$ l	5 $\mu$ l

**Tabulka č. 7.** Reakční směs pro PCR reakci s DMSO a 2mM Mg<sup>2+</sup>

Složky směsi	Objem ("1ml")
H <sub>2</sub> O	570 µl
10x reakční pufr s KCl (Fermentas)	100 µl
dNTP mix, 2mM každý	100 µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	80 µl
DMSO	100 µl
Forward primer 100 pmol/µl	5 µl
Reverse primer 100 pmol/µl	5 µl

3. Do popsaných 0,2 ml mikrozkušavek jsme napipetovali 30 µl reakční směsi a 1 µl vyšetřované DNA.
4. Poté jsme přidali 1 µl Taq DNA polymerázy (1U/µl). Polymeráza byla umístěna na ledu, aby bylo zabráněno degradaci. Zkušavky jsme uzavřeli.
5. Zkušavky s reakční směsí jsme vložili do přístroje (2720 Thermal Cycler). Reakce probíhala za následujících podmínek:

Pro vzorek s reakční směsí z tabulek č. 5 a 6:

- 1. krok: prePCR 1 min, 94 °C
  - 2. krok: denaturace 1 min, 94 °C
  - 3. krok: anelace 1 min, 58 °C
  - 4. krok: syntéza 2 min, 72 °C
2. - 4. krok 2-4 se opakuje 32×
- 5. krok: ukončení 7 min, 72°C

Pro vzorek s reakční směsí z tabulky č. 7:

- 1. krok: prePCR 3 min, 94°C
  - 2. krok: denaturace 45s, 94 °C
  - 3. krok: anelace 1 min, 58 °C
  - 4. krok: syntéza 7 min, 72 °C
2. - 4. krok 2-4 se opakuje 35×
- 5. krok: ukončení 0s, 72 °C

6. Po ukončení programu jsme PCR produkty vyjmuli z přístroje a uchovávali je

při teplotě 4 °C do dalšího zpracování.

7. Úspěšnost PCR reakce jsme ověřili elektroforézou v agarózovém gelu za zvolených podmínek. Složení směsi jsme upravili na základě výsledků elektroforézy, tak aby byl vzorek na genetickém analyzátoru čitelný.
8. Pokud nebyl PCR produkt, zobrazený pomocí elektroforeogramu, dostatečně kvalitní, optimalizovali jsme reakci změnou koncentrace  $Mg^{2+}$ , popřípadě jsme přidali roztok DMSO. V případě, že byl použit roztok DMSO, bylo nutné změnit teplotní profil reakce. Byl-li i tak výsledek nevyhovující, navrhli jsme primery jiné.

### 7.3 Gelová elektroforéza

Pomocí této metody dochází k separaci fragmentů DNA (produkty PCR amplifikační reakce) podle pohyblivosti v agarózovém gelu ve stejnosměrném elektrickém poli.

Pohyblivost závisí na velikosti náboje molekuly a její molekulové hmotnosti.

#### 7.3.1 Příprava agarózového gelu pro elektroforézu

##### Použité přístroje:

mikrovlnná trouba

digitální váha Denver PK-352

##### Použité chemikálie:

Agaróza - Agarose SFR<sup>TM</sup> (Amresco)

1x TBE pufr (89 mM Tris, 89 mM kyseliny borité, 2mM EDTA)

Destilovaná voda pro laboratorní účely (lékárna FN Motol)

Ethidiumbromid 1% [w/v], pracovní ředění 0,5‰ [w/v] (Merck)

##### Postup:

1. Připravili jsme si soupravu pro přípravu gelu. Nalévací vaničku jsme vložili do nalévacího stolku a vyvážili jsme ji. Do vany jsme vložili hřebeny, které vytvoří jamky v gelu.
2. Do kádinky jsme odvážili 3,6g agarózy.

3. Do kádinky s agarózou jsme nalili 200 ml pufru 1x TBE pufru.
4. Kádinku jsme zakryli folií.
5. Kádinku se směsí pufru a agarózy jsme vložili do mikrovlnné trouby a gel jsme zahřívali po dobu deseti minut.
6. Kádinku se směsí jsme pomocí gumové chňapky vyndali z trouby.
7. Po ochlazení na 60 °C jsme do kádinky se směsí přidali 200 µl 0,5% ethidium bromidu.
8. Směs jsme krouživým pohybem kádinky zamíchali a co nejrychleji jsme gel nalili do připravené aparatury. Malé bublinky jsme odstranili špičkou pipety.
9. Gel jsme nechali zatuhnout a po ztuhnutí jsme odstranili hřebeny.

### 7.3.2 Separace fragmentů DNA

#### **Použité přístroje:**

zdroj stejnosměrného elektrického proudu (Bio Rad)

transluminátor MultiImage Light Cabinet Filter Positions (Alpha Innotech)

#### **Použité chemikálie:**

Agarózový gel (připravený v kapitole 7.3.1 na straně 42)

1x TBE pufr (89 mM Tris, 89 mM kyseliny borité, 2mM EDTA)

PCR produkt

1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogene)

Sacharóza pro mol. biol.

Voda pro injekční účely - Aqua pro injectione (Braun)

Orange G (Sigma)

#### **Postup:**

1. Nejprve jsme si namíchali Gel loading buffer.
  - a. Připravili jsme 40% roztok sacharózy smícháním 4g sacharózy a injekční vody (celkový objem 10 ml).
  - b. Na špičku skalpelu jsme nabrali barvu orange G a rozpustili jsme ji v roztoku 40% sacharózy.

2. Připravili jsme si výsledný 1 Kb Plus DNA ladder, smícháním 10  $\mu$ l 1Kb+ DNA ladder a 90  $\mu$ l Gel Loading buffer.
3. Do soupravy pro gelovou elektroforézu jsme vložili agarózový gel tak, aby byl orientovaný jamkami ke katodě.
4. Gel jsme zalili 1xTBE pufrem, tak aby byl gel ponořený několik milimetrů pod hladinou. Pomocí pipety jsme odstranili vzduchové bubliny v jamkách.
5. V 96 jamkové titrační destičce jsme si smíchali 3  $\mu$ l Gel loading bufferu s 3  $\mu$ l PCR produktu, který jsme chtěli zobrazit.
6. Do první jamky v gelu jsme nanесли 3  $\mu$ l 1 Kb Plus DNA ladder, do dalších jamek jsme napipetovali 3  $\mu$ l obarveného PCR produktu (viz krok 5).
7. Aparaturu pro elektroforézu jsme uzavřeli a připojili jsme ji ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu a nastavili jsme přístroj na 99V.
8. Po proběhnutí elektroforetické separace (cca 20 min), jsme přístroj odpojili od zdroje, agarózový gel jsme opatrně vyjmuli a vložili jsme jej do transluminátoru pod UV záření (302 nm).
9. Gel jsme vyfotili a výsledek vyhodnotili pomocí programu AlphaDigiDoc RT.

#### **7.4 Purifikace PCR produktu roztokem SureClean Plus (Bioline)**

Metoda probíhající po PCR reakci, která má za účel očištění DNA od jednotlivých složek reakční směsi, které nepříznivě ovlivňují sekvenační reakci. Touto metodou dojde k odstranění dNTP, primerů, polymerázy a pufru, očištěný PCR produkt je rozpuštěn ve vodě.

##### **Použité přístroje:**

centrifuga - Centrifuge 5415 R (Eppendorf)

třepačka MS2 Minishaker IKA

ruční vakuová odsávačka (P-lab)

##### **Použité chemikálie:**

SureClean Plus (Bioline)

PCR produkt

Ethanol 70% [v/v] (lékárna FN Motol)

Voda pro injekční účely - Aqua pro injectione (Braun)

### **Postup:**

1. Do označených mikrozkušavek jsme si napipetovali dávkovací pipetou 30 $\mu$ l roztoku SureClean Plus.
2. Do každé zkumavky jsme přidali 30 $\mu$ l PCR produktu.
3. Zkumavky jsme zavřeli, zamíchali na třepačce asi 15s.
4. Zkumavky jsme vložili do centrifugy a nechali jsme centrifugovat 15 minut, při 18 °C na 13,200 rpm (16100 rcf).
5. Po 15 minutách jsme zkumavky opatrně vyjmuli, pečlivě odsáli tekutinu ruční vakuovou odsávačkou.
6. Pelet, který vznikl na dně zkumavky, jsme doplnili 200 $\mu$ l 70% ethanolu.
7. Zkumavky jsme zavřeli, zamíchali na třepačce asi 15s.
8. Poté jsme zkumavky znovu vložili do centrifugy a nechali jsme centrifugovat 15 minut, při 18 °C na 13,200 rpm (16100 rcf).
9. Poté jsme zkumavky opatrně vyjmuli, pečlivě odsáli tekutinu ruční vakuovou odsávačkou.
10. Otevřené a odsáté zkumavky jsme nechali asi 1 minutu uschnout.
11. Pelet na dně zkumavky jsme doplnili 30 $\mu$ l injekční vody.
12. Takto očištěný PCR produkt jsme skladovali v ledničce, respektive jsme pokračovali sekvenační reakcí.

## **7.5 Sekvenace**

Metoda, stanovující pořadí nukleotidů v úseku DNA, který je analyzován. Úsek DNA je nejprve pomocí metody PCR amplifikace zmnožen *in vitro*, tato namnožená DNA je v následující sekvenační reakci využívající specifické terminátory použita jako templát.

### **Použité přístroje:**

Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems

třepačka MS2 Minishaker IKA

centrifuga - Centrifuge 5804 R (Eppendorf)  
třepačka pro destičky IKA MTS 2/4digital

### **Použité chemikálie:**

BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit Ready Reaction, 100rxn (Applied Biosystems); dále jen BDT

přečištěný PCR produkt

příslušný sekvenační primer 100 pmol/μl (oligonukleotidový primer zředěný vodou 1:40 na koncentraci 2,5 pmol/μl)

### **Postup:**

1. Připravili jsme si označenou 96 jamkovou destičku a rozmrazili jsme přečištěné PCR produkty, sekvenační primery a BDT.
2. Do každé z jamek destičky jsme napipetovali 2μl BDT.
3. Přidali jsme 3,5μl přečištěného PCR produktu (1 PCR produktu odpovídají 2 jamky).
4. Do jamek jsme ke každému PCR produktu napipetovali příslušný primer.
5. Destičku přelepili jsme ji folií BIOplastic Opti-Seal™ Optical Disposable Adhesive a promíchali jsme ji na MS2 Minishakeru IKA asi 15 sekund.
6. Poté jsme destičku vložili do centrifugy (Centrifuge 5804 R) a centrifugovali s vyvážením cca 1 minutu na 3700 otáček za minutu (2250 rcf) při 18°C.
7. Destičku jsme vyjmuli a nechali ji třepat 1 minutu na třepače pro destičky IKA MTS 2/4digital s frekvencí 600/min.
8. Destičku jsme vložili do přístroje 2720 Thermal Cycler. Reakce probíhala za následujících podmínek:
  - 1. krok: 10s, 96 °C
  - 2. krok: 5s, 50 °C
  - 3. krok: 4 min, 60 °C
  - 2. a 3. krok opakovat 25×
  - 4. krok: ∞, 4 °C

Poté co proběhla sekvenační reakce jsme pokračovali ve srážecí reakci.

## 7.6 Ethanolová precipitace (Srážecí reakce)

Produkt sekvenační reakce jsme očistili od volných dideoxynukleotidů. Díky tomu jsme zabránili vzniku nežádoucího pozadí na chromatogramu. Tato metoda navazuje bezprostředně po sekvenační reakci, prodleva mezi sekvenací PCR produktu a ethanolovou precipitací by neměla přesahovat jeden den.

### Použité přístroje:

třepačka MS2 Minishaker, IKA

centrifuga - Centrifuge 5804 R (Eppendorf)

třepačka pro destičky IKA MTS 2/4digital

### Použité chemikálie:

„kyselý ethanol“ (1, 8ml 3M octanu sodného p.a.; pH=5,2; 37,5ml 95% ethanolu [v/v], 8,7 ml vody pro injekční účely - Aqua pro injectione (Braun)

Ethanol 70% [v/v] (lékárna FN Motol)

Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems)

### Postup:

1. Po sekvenační reakci jsme do jednotlivých jamek napipetovali 50 $\mu$ l kyselého ethanolu.
2. Destičku jsme přelepili adhezivní folií, protřepali na třepačce asi 30s a vložili do centrifugy. Centrifugovali jsme s vyvážením 40 minut při 18 °C na 3700 otáček za minutu (2250 rcf).
3. Destičku jsme vyndali, odlepili folii, destičku jsme otočili a nechali volně vytéct obsah na buničinu.
4. Poté jsme destičku centrifugovali dnem vzhůru na nové buničině při 400 otáčkách za minutu (26 rcf) asi 1 minutu při 18 °C.
5. Do každé z jamek jsme poté napipetovali 100 $\mu$ l 70% ethanolu.
6. Destičku jsme přelepili folií a protřepali na třepačce asi 30s.
7. Centrifugovali jsme destičku při 3700 otáčkách za minutu (2250 rcf) a 18 °C 40 minut.
8. Destičku jsme vyndali, odlepili folii, destičku jsme otočili a nechali volně vytéct

obsah na buničinu.

9. Poté jsme destičku centrifugovali dnem vzhůru na nové buničině při 400 otáčkách za minutu (26 rcf) asi 2 minuty při 18 °C.
10. Do každé z jamek jsme napipetovali 25µl Hi-Di Formamidu.
11. Destičku jsme přelepili folií a centrifugovali jsme ji při 3700 otáčkách za minutu (2250 rcf) a 18 °C asi 1 minutu.
12. Odlepili jsme folii, destičku jsme zakryli „gumovou zátkou“ (septum) a přendali ji do držáku (tray) pro sekvenační analýzu.
13. Držák se sekvenační destičkou jsme nechali třepat na třepačce pro destičky s frekvencí 600/min asi 30 minut až 1 hodinu, dokud se nerozpustil pelet.
14. Poté jsme provedli kapilární elektroforézu na genetickém analyzátoru ABI Prism 3130xL Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) HITACHI.

#### **7.6.1 Vyhodnocování výsledků sekvenační analýzy**

Destička se vzorky byla po ethanolovém vysrážení analyzována kapilární elektroforézou. Analýza probíhala na genetickém analyzátoru ABI Prism 3130xL Genetic analyzer (Applied Biosystems) za pomoci aplikace 3130xl Genetic Analyzer Data Collection Software v3.0 (Applied Biosystems).

Po genetické analýze byla data vyhodnocována za pomoci aplikace Sequencing Analysis Software v5.3 (Applied Biosystems) a také pomocí programu Chromas Lite MFC Application. Procházeli jsme jednotlivé sekvence a sledovali výskyt malých jednonukleotidových polymorfismů a heterozygotních mutací. Charakter polymorfismu jsme vyhodnocovali pomocí NCBI databáze („National Center for Biotechnology Information“) a v případě výskytu nové varianty jsme patogenitu ověřili pomocí programu PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2).

Dále jsme pomocí programu BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“), porovnávali jednotlivé výsledné sekvence (ve FASTA formátu) s referenční sekvencí a kontrolovali tak homozygotní mutace a jednonukleotidové polymorfismy.

## 7.7 Bioinformační analýzy

### 7.7.1 Predikce patogenního charakteru mutací *in silico*

Predikce patogenity jednotlivých variant byla provedena programy:

- PolyPhen-2
- SIFT
- MutationTaster

### 7.7.2 HardyWeinbergova metoda počítání alel

Frekvence genotypů byly vypočítány na podkladě alelických frekvencí podle vzorce:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$p, q =$  relativní zastoupení alel

$$p + q = 1$$

### 7.7.3 Z-test

Statistický Z-test jsme použili pro určení statistické podobnosti dat testovaného souboru s již popsaným souborem. Statistika byla provedena pomocí programu SigmaStat (Systat Software, Inc.).

## 8 Výsledky

### 8.1 Zavedení analýzy jednotlivých exonů genu *FGFR3*

Gen *FGFR3* se skládá z 19 exonů, avšak referenční sekvence GenBank NC\_0000041.2, ležící na lidském chromozomu 4, má exonů pouze 18. Sekvenci genu *FGFR3* (viz obrázek č. 1 na straně 12) jsme zjistili přes databázi NCBI a ujasnili si číslování jednotlivých exonů.

Pro kontrolu jsme ověřili značení přes databázi 1000 Genomes Browser. Pro sjednocení s obecně uznávanou normou jsme jednotlivé exony číslovali podle Heuertzové a kol. (2006).

Tímto způsobem jsme ověřili, že referenční sekvence GenBank NC\_0000041.2 genu *FGFR3* sestává z 18 exonů a 17 intronů přičemž mezi exonem 7 a 9 se nachází alternativní sestřihové místo a exon 8 vyskytující se v jiných transkriptech, se v této referenční sekvenci nevyskytuje. Exon 1 a část exonu 2 a 19 nepatří do kódující DNA mezi translatované části genu *FGFR3*.

#### 8.1.1 Navrhování specifických primerů pro jednotlivé exony

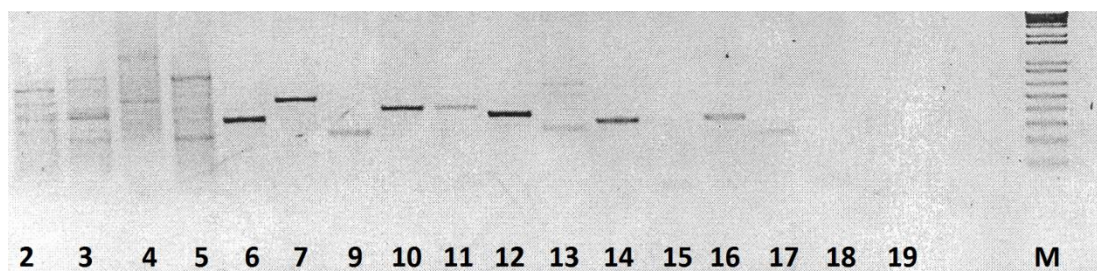
K navržení primerů jsme použili genetickou databázi GenBank na základě referenční sekvence (cDNA) NM\_000142.4 a genomové sekvence NC\_000004.12 (1793299..1808872). Primery jsme navrhovali do intronových oblastí co nejbližší příslušného exonu tak, abychom se vyhnuli malým jednonukleotidovým polymorfismům SNPs. Gen *FGFR3* je na tyto oblasti velmi bohatý. Jedním z faktorů, které bylo nutné vzít v úvahu, byla anelační teplota potřebná pro PCR anelaci. Tomu jsme přizpůsobili zastoupení jednotlivých nukleotidů v navrhovaných primerech. Anelační teplota se pohybovala mezi 53-59 °C a délka oligonukleotidů byla různá, jednalo se o 18 až 21-mery. Při výběru jednotlivých primerů jsme se snažili vyhnout repetícím 4 a více nukleotidů. Primery jsme designovali tak, aby se na 3'konci, pro lepší nasednutí DNA polymerázy, nacházely báze cytosin nebo guanin. Dále jsme uvažovali nad strukturou samotného oligonukleotidu. Snažili jsme se vyhnout vzniku sekundárních motivů (vlásenky a smyčky).

Primery byly syntetizovány u firmy Generi Biotech.

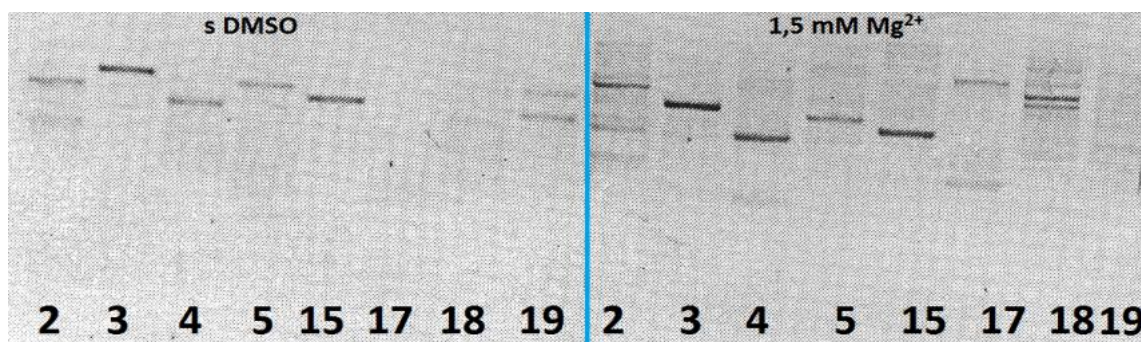
### 8.1.2 Optimalizace PCR reakce

Optimální složení reakční směsi jsme otestovali na jednom vzorku takto: Pro každý exon byly vytvořeny 3 reakční směsi, s 1 mM Mg<sup>2+</sup>, s 1,5 mM Mg<sup>2+</sup> a s DMSO. Po proběhnutí PCR reakce jsme vzorky testovali agarózovou elektroforézou. Vybrali jsme podmínky, při kterých na výsledném elektroforeogramu vznikal silný a čistý produkt.

Pro exony 6-12,14, 16 a 19 se jevilo optimální složení s 1 mM Mg<sup>2+</sup>, pro exony 3-5 a 15 jsme zvolili složení s 1,5 mM Mg<sup>2+</sup> a pro exon 2 jsme vybrali reakční směs s DMSO a 2 mM Mg<sup>2+</sup> (viz obrázek č. 7 a 8).



Obrázek č. 7. Elektroforeogram – reakční směs 1mM Mg<sup>2+</sup>. Pro exony 2-5, 13, 18, 19 nutná optimalizace reakce, došlo k amplifikaci nescifického produktu (2-5) nebo produkt nebyl amplifikován; M – označuje marker, v našem případě 1Kb+.



Obrázek č. 8. Elektroforeogram – reakční směsi s DMSO (vlevo) s 1,5mM Mg<sup>2+</sup> (vpravo). U exonů 2, 17, 18 a 19 nedošlo k amplifikaci produktu nebo byl amplifikován nescifický produkt.

Primery pro Exony 6, 13,17,18 bylo nutné znovu navrhnout, neboť nebyly dost specifické. Nové primery pro exony 6, 13, 17 a 18 byly navrhovány stejným způsobem jako primery předchozí (viz obrázek č. 9). Navíc jsme specifitu oligonukleotidu ověřili

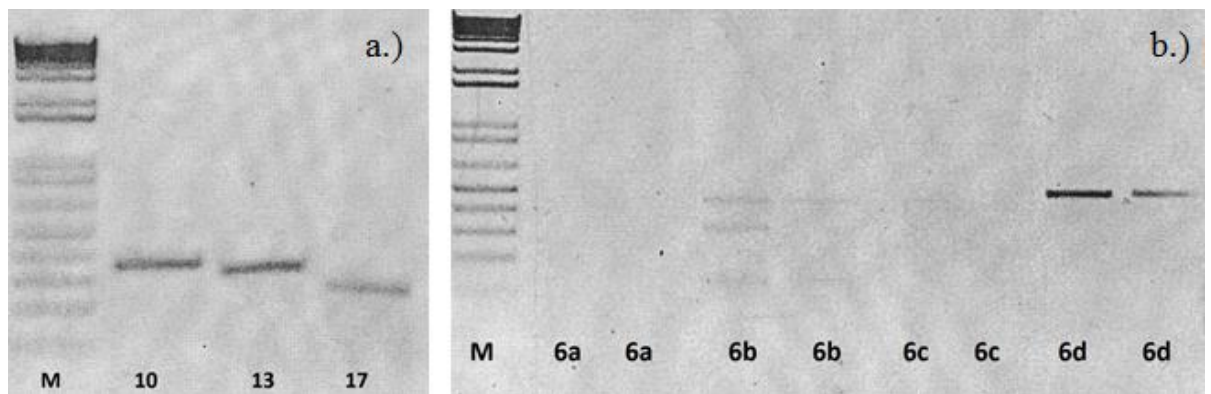
prostřednictvím programu BLAST.

Primery pro exon 18 nám i po opakované korekci a optimalizaci nenasyntetizoval PCR produkt. Proto jsme tento exon amplifikovali pomocí forward primeru pro exon 17 a reverse primeru pro exon 19.

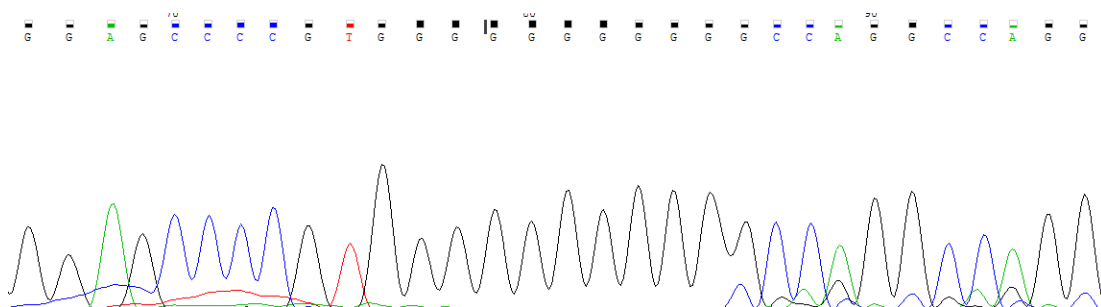
Seznam všech optimalizovaných primerů uveden na straně 35 a 36 v tabulce č. 4.

Na začátku exonu 10 se nachází jedenácti nukleotidová repetice, díky které je obtížné vyhodnocení sekvenční analýzy. Proto jsme navrhli vnitřní forward primer do oblasti začátku exonu 10 těsně za tuto repetici (viz obrázek č. 10).

Následná optimalizace ukázala, že pro primery pro exon 13, 17 a 18 a vnitřní primer exonu 10 je ideální reakční směs 1mM Mg<sup>2+</sup>.



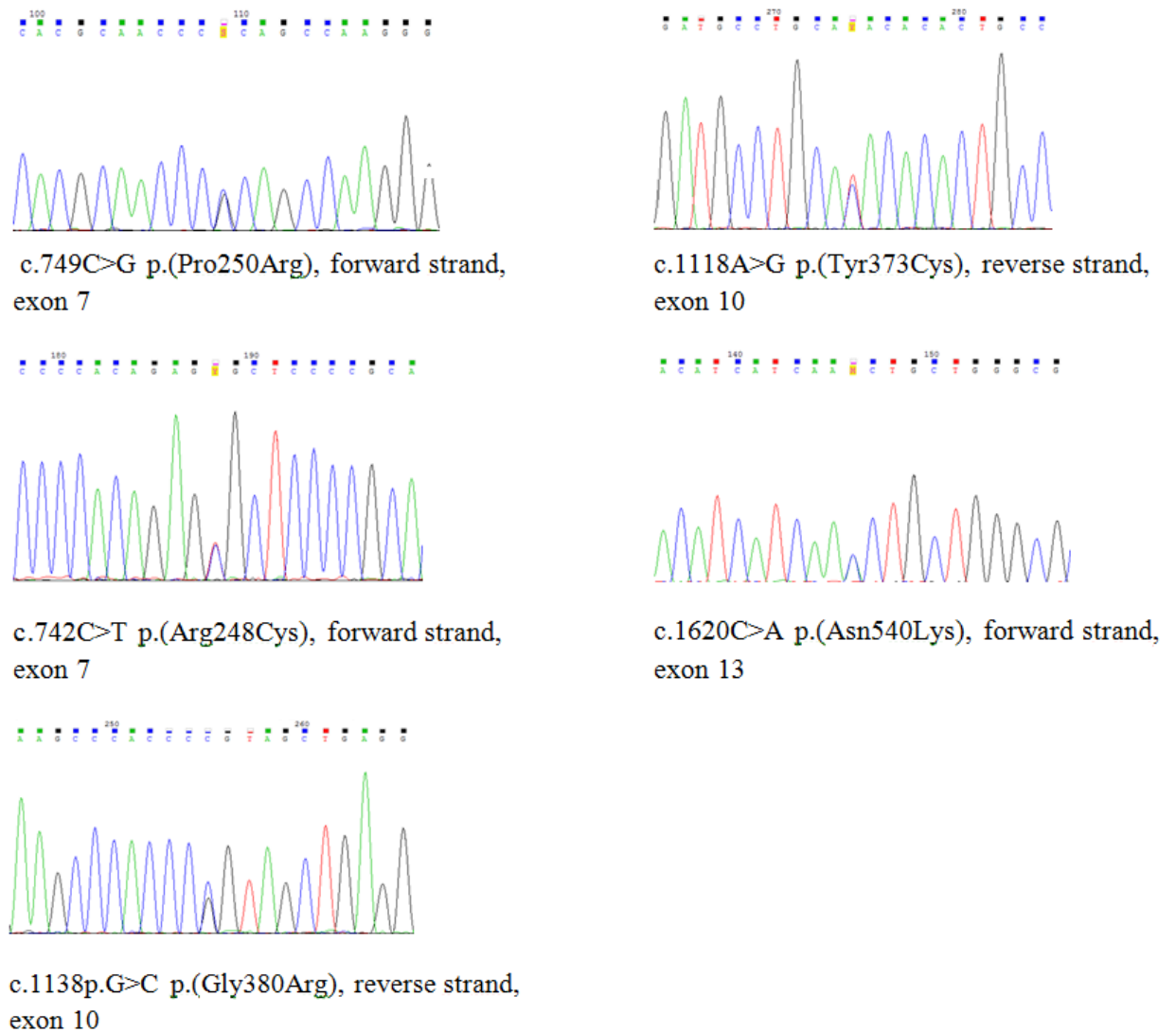
**Obrázek č. 9. Výsledné elektroforeogramy.** a) pro exony 10i, 13, 17 a 18; M - označuje marker, v našem případě 1Kb+; b) pro exon 6 - 6a a 6c obsahuje reakční směs s 1mM Mg<sup>2+</sup>, 6b a 6d obsahuje reakční směs s 1,5mM Mg<sup>2+</sup>. Reakční směs použitá u 6a a 6b obsahovala primery nové, reakční směs u 6c a 6d obsahovala forward primer nový a reverse primer starý; M - označuje marker, v našem případě 1Kb+ .



**Obrázek č. 10. Sekvence exonu 10.** Repetice v exonu 10 ve směru 5'→3'; dochází k rozmazání a nečitelnosti výsledné sekvence.

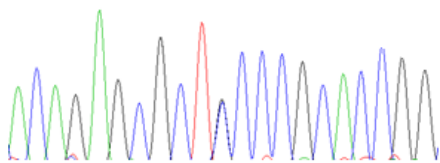
### 8.1.3 Ověření výsledků na kontrolním souboru pacientů

Účinnost metody detekce jsme ověřili analýzou kontrolních vzorků se známým genotypem. Ověření bylo možné provést jen u určitých exonů, pro něž byly ve Fakultní nemocnici v Motole k dispozici vzorky s již dříve prokázanou mutací způsobující achondroplázií, hypochondroplázií a thanatophorickou dysplázií. Jednalo se o exony 7, 10, 13, 15 a 19 (viz obrázek č. 11 a 12).



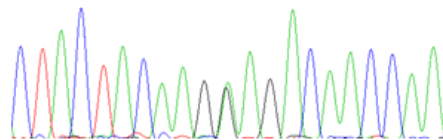
**Obrázek. č. 11. Výsledky sekvenační analýzy známých mutací.** Na obrázku jsou uvedeny mutace c.749C>G p.(Pro250Arg), c.1118A>G p.(Tyr373Cys), c.742C>T p.(Arg248Cys), c.1620C>A p.(Asn540Lys) a c.1138p.G>C p.(Gly380Arg) ověřované při validaci metody.

190 200  
A C A G A G C C C T C C C G C A C C G G



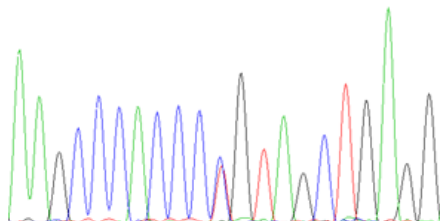
c.746C>G p.(Ser249Cys), forward strand,  
exon7

170 180  
C T A C T A C A A G A G A C A A C A A



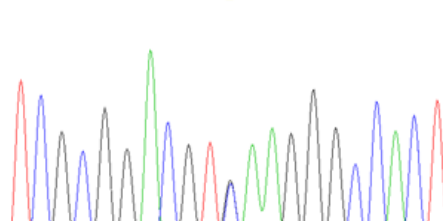
c.1948A>G p.(Lys650Glu), forward strand,  
exon 15

250 260  
A A G C C C A C C C G T A G C T G A G G



c.1138G>A p.(Gly380Arg), reverse strand,  
exon 10

180 190 200  
T C G C G G A C G T A A G G G C A C T



c.2420G>C p.(Term807Ser), forward strand,  
exon 19

**Obrázek č. 12. Výsledky sekvenační analýzy známých mutací.** Na obrázku jsou uvedeny mutace c.746C>G p.(Ser249Cys), c.1138G>A p.(Gly380Arg), c.1948A>G p.(Lys650Glu), c.2420G>C p.(Term807Ser) ověřované při validaci metody.

## 8.2 Vyšetřovaný soubor - vzácné mutace

### 8.2.1 Strategie molekulárně genetického vyšetření

Soubor všech 108 pacientů byl vyšetřen metodou přímého sekvenování dle Sangera následovně: Pacientům s familiárním výskytem hypochondroplázie byly vyšetřeny všechny kódující exony genu *FGFR3* (referenční sekvence Gen Bank NM\_000142.4). U pacientů se sporadickým výskytem onemocnění byly analyzovány kódující exony 3, 5, 7, 10, 13 a 15.

### 8.2.2 Výsledky molekulárně genetického vyšetření

V souboru pacientů s familiárním výskytem hypochondroplázie jsme nenalezli žádnou mutaci.

V souboru 87 sporadických pacientů jsme našli 2 vzácné mutace se sporadickým

výskytem hypochondroplázie. Záchyt mutací v celém souboru činil necelá 2 %.

Statistické porovnání záchytu mutací v souboru familiárních (0/18) a sporadických (2/80) pacientů nebylo statisticky významné při použití Z-testu ( $z=0,508$ ;  $P=0,612$ ).

### **8.2.3 Pacient č. 1 - kazuistika**

Pacientka číslo 1 je žena narozená roku 1968. Byla sledována od dětství pro podezření na kostní dysplázii s disproporční malou postavou. Byla indikována k vyšetření MUDr. Marcelou Malíkovou z FN v Motole v roce 2014.

Pacientka se narodila v 39. týdnu po první fyziologické graviditě. Porodní váha a délka pacientky nejsou k dispozici. Matka pacientky poté prodělala 3 spontánní aborty, dva v prvním trimestru a jeden v druhém.

Fenotyp pacientky č. 1 byl klinicky hodnocen jako achondroplázie. Pacientka má nízkou postavu a disproporční malý vzrůst a makrocefalii (viz obrázek č. 13). Pacientce byla také diagnostikována neurofibromatóza, po celém těle má nápadné četné kožní fibrolipomy, které jí deformují horní končetinu.

V dospělosti pacientka měří 135,8 cm (-5 SD). Její finální výška je zkrácena prolongací bérců dle Illizarova o cca 9cm. Výška pacientky bez prolongace by činila 126,8 cm (-6,4 SD). Hmotnost pacientky činí 51,5 kg (-1,1 SD). BMI pacientky je 27,9, což značí nadváhu. Postava je disproporční, trup je relativně prodloužen. Výška vsedě činí 84,1 cm (-1,3 SD), u pacientky je přítomné výrazné rhizomelické zkrácení horních končetin (-6,1 SD) a dolních končetin (-5,5 SD). Obvod hlavy pacientky je 59 cm (2,5 SD), a bez výrazných obličejových rysů typických pro achondroplázii. Nástup puberty u pacientky odpovídal populační normě. Antropologická měření provedla RNDr. Daniela Zemková, CSc. z FN v Motole.

Rentgenologická a ortopedická vyšetření dále odhalila skoliózu hrudní páteře, zkrácení krčků dlouhých kostí a coxa vara.

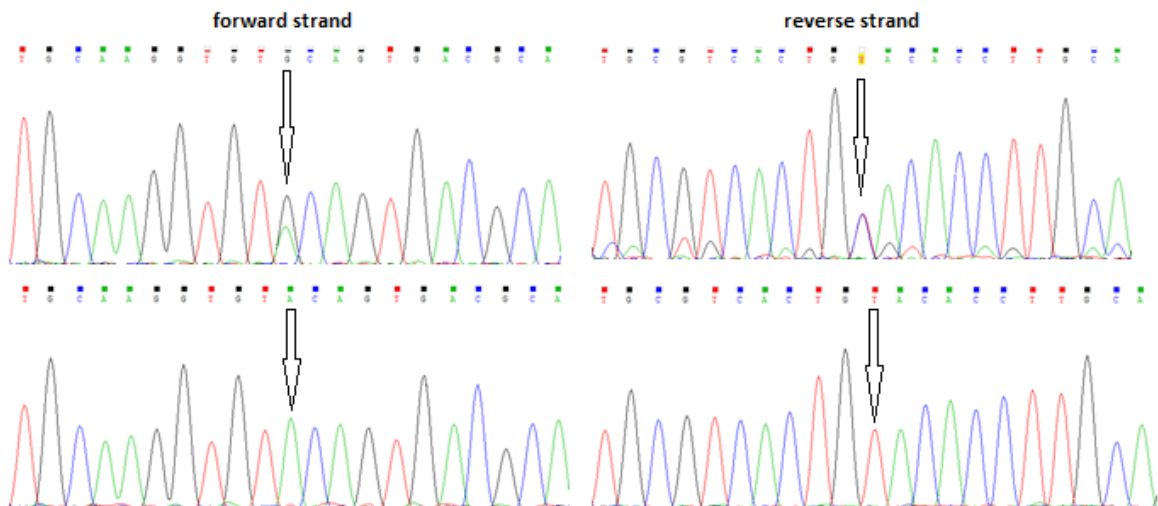
Pacientka zároveň trpí strabismem. Rodinná anamnéza pacientky nenaznačuje výskyt disproporčního malého vzrůstu v rodině. Matka (1940) měří 164 cm a otec (1939) měří 192 cm. Bratr pacientky (1971) je rovněž bez příznaků onemocnění, měří 178cm. Žádný člen rodiny netrpí neurofibromatózou.



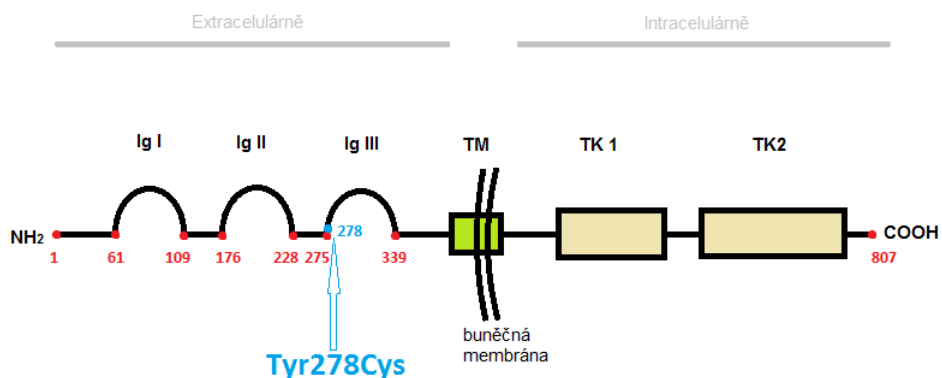
**Obrázek č. 13. Pacientka č. 1.** Na obrázku je zřetelně vidět disproportion končetin vůči trupu, především zkrácení proximálních segmentů končetin. Dále jsou na těle výrazné neurofibromy. Fotodokumentaci pacientky laskavě poskytla MUDr. Marcela Malíková.

Sekvenční analýza genu *FGFR3* u pacientky odhalila *de novo* heterozygotní jednonukleotidovou mutaci c.833A>G, vedoucí k záměně TAC>TGC v exonu 7. Na pozici 278 dochází k záměně tyrosinu za cystein (p.Tyr278Cys) (viz obrázky č. 14 a 15).

Charakter substituce Tyr278Cys byl interpretován *in silico* v programu PolyPhen-2. Oblast, kde se bodová mutace vyskytuje je vysoce konzervativní oblast imunoglobulinové domény III. receptoru *FGFR3*. Změna aminokyseliny na této pozici, kde se vyskytuje evolučně ustálená aminokyselina tyrosin, je s největší pravděpodobností patogenního charakteru (viz obrázek č. 16).



**Obrázek č. 14. Výsledek sekvenační analýzy pacientky č. 1. (horní řádek) a zdravé kontroly bez této mutace (dolní řádek).** Levý sloupec nám ukazuje forward úsek DNA a pravý sloupec stejnou oblast v reverzním směru. Na obrázku je v horním řádku vidět heterozygotní mutace NM000142.4:c.833A>G p.(Tyr278Cys) označená šipkou.



**Obrázek č. 15. Mutace c.833A>G p.(Tyr278Cys) u pacientky č. 1.** Pozice mutace NM000142.4:c.833A>G p.(Tyr278Cys) na začátku imunoglobulinové domény II. receptoru FGFR3.



**Obrázek č. 16. Interpretace patogenity substituce Tyr278Cys v programu PolyPhen-2.**  
Dle tohoto programu je mutace s vysokou pravděpodobností patogenní.

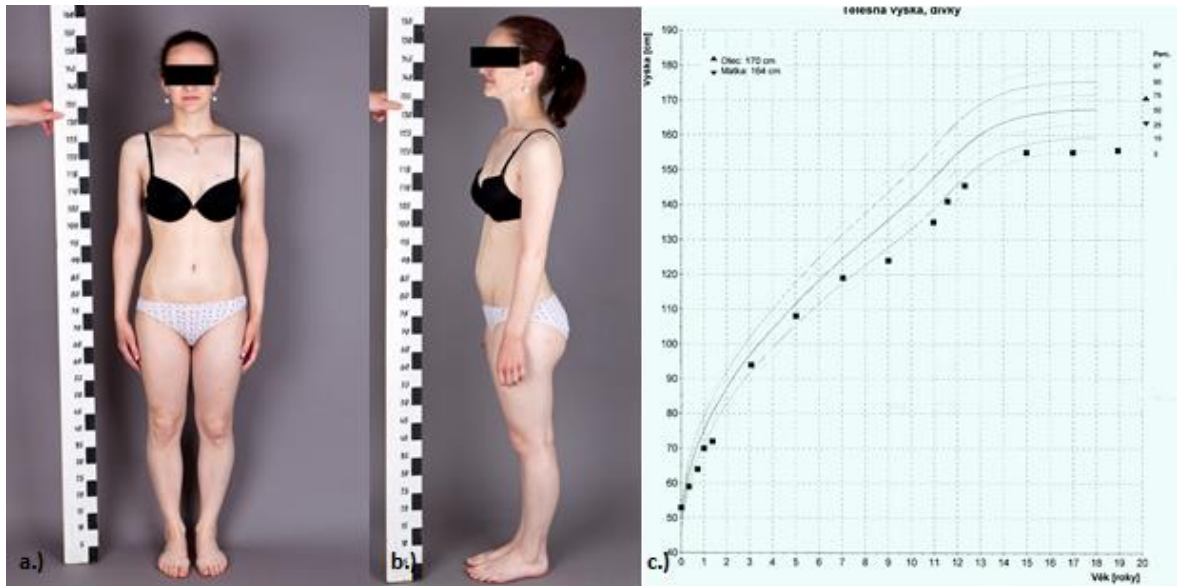
Substituci Tyr278Cys jsme nenašli u žádného ze 17 nemocných s achondroplázií, u nichž se nenašla mutace vedoucí k substituci Gly380Arg.

#### 8.2.4 Pacient č. 2 - kazuistika

Pacientem číslo 2 je dívka narozená v roce 1996. Pacientka byla sledována pro podezření na hypochondroplázií MUDr. Věrou Jüttnerovou a později MUDr. Márií Šenkeříkovou z Oddělení lékařské genetiky ve FN v Hradci Králové.

Pacientka se narodila ve 41. týdnu ze třetí fyziologické gravidity matky. Porodní váha byla 3900g a porodní délka 53 cm. Později byla pacientka sledována praktickou lékařkou pro makrocefalii. Pacientka do 7 let rostla v pásmu průměru, ve věku 9 let bylo pozorováno výrazné zpomalení růstu (viz obrázek č. 17). Růst pacientky se začal pohybovat v oblasti třetího percentilu růstové křivky. Její tělesná výška činila v devíti letech 124 cm (-1,87 SD), váha byla 29,5 kg (-0,03 SD). V 19 letech pacientka měří 156 cm (-1,79 SD) a váží 51 kg (-1,15 SD). BMI pacientky je v normě, jeho hodnota je 20,69. Postava pacientky je mírně disproporční, trup je relativně prodloužený. Dolní končetiny pacientky jsou zkrácené. Rozpětí paží pacientky je 169 cm. Na páteři pacientky je hrudní skolióza. Obvod hlavy pacientky činí 60 cm (3,18 SD). Hlava je mezocefalická a makrocefalická. Čelo je bez prominence. Pacientka má mírnou hypoplázií střední části

obličej a mírnou prominencí záhlaví. Projevy puberty u pacientky odpovídaly populačním standardům.

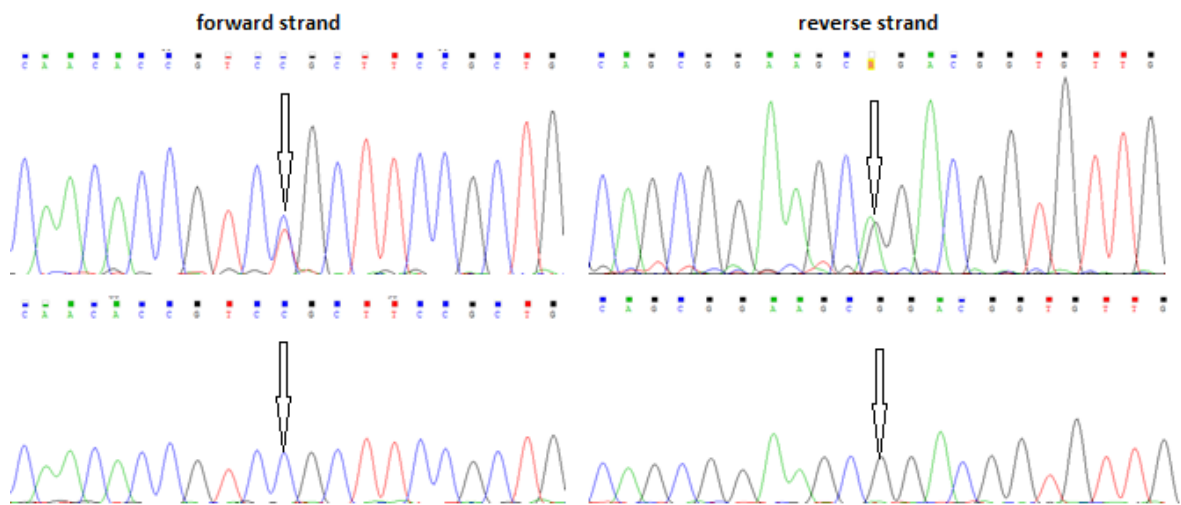


**Obrázek č. 17. Pacientka č. 2.** a) pohled zepředu b.) pohled z boku; c.) růstový graf pacientky č. 2 – od devátého roku trvale pod 3 percentilem. Materiál laskavě poskytla MUDr. Mária Šenkeříková.

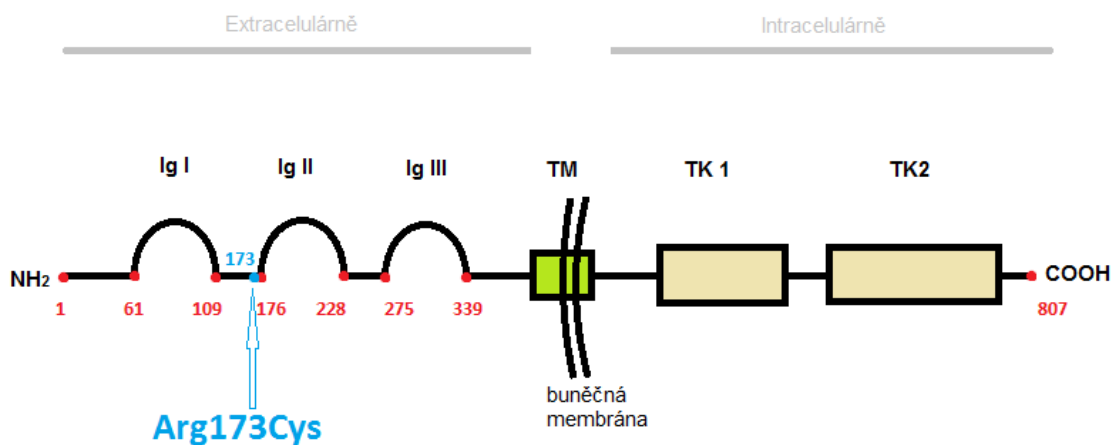
V rodinné anamnéze nebylo dosud vysloveno podezření na skeletální dysplázii. Otec pacientky měří 170 cm a matka je nižší postavy 159,5 cm. Bratr (1993) měří 175 cm a sestra (1995) měří 165 cm.

Sekvenční analýza genu *FGFR3* u pacientky odhalila vzácnou heterozygotní bodovou mutaci c.517 C>T v exonu 5 genu *FGFR3*, která pravděpodobně vede k substituci Arg173Cys. Tato mutace dosud nebyla v mezinárodních databázích a odborné literatuře popsána (viz obrázky č. 18 a 19).

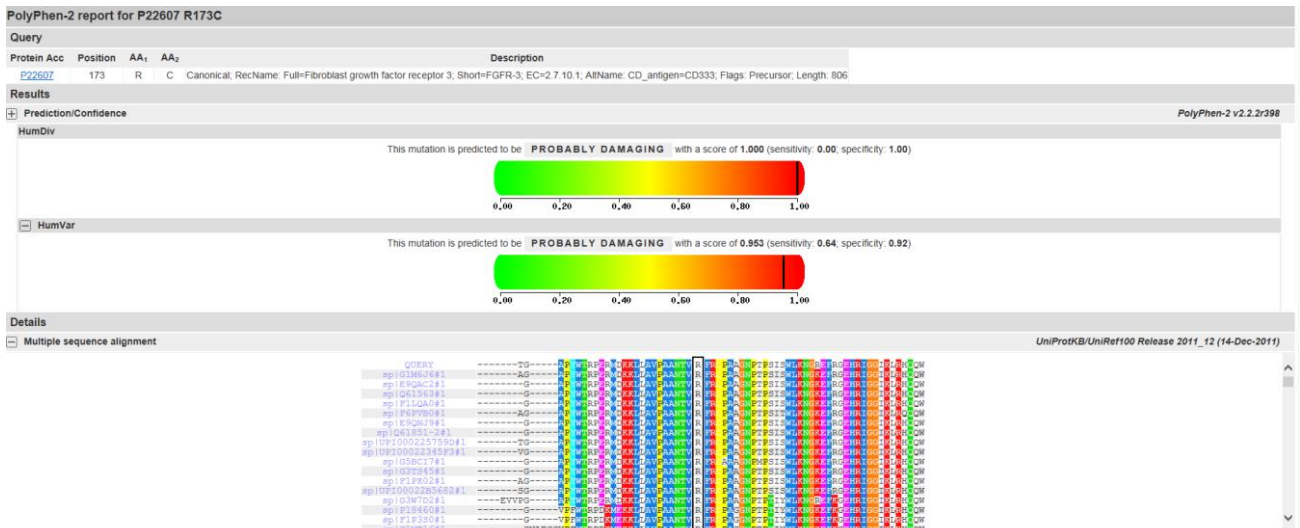
Podle výsledků z predikčních programů PolyPhen-2, MutationTaster a SIFT se s vysokou pravděpodobností jedná o mutaci patogenního charakteru (viz obrázek č. 20). Na této pozici je evolučně ustálená aminokyselina arginin a záměna za cystein v této vysoce konzervované oblasti imunoglobulinové domény II. receptoru *FGFR3* vede ke vzniku patologie. Kombinace klinického obrazu pacientky a nálezu substituce Arg173Cys v genu *FGFR3* s velkou pravděpodobností potvrzuje diagnózu hypochondroplázie.



**Obrázek č. 18.** Výsledek sekvenační analýzy pacientky č. 2. (horní řádek) a zdravé kontroly bez této mutace (dolní řádek). Levý sloupec nám ukazuje forward úsek DNA a pravý sloupec stejnou oblast v reverzním směru. Na obrázku je vidět heterozygotní mutace NM000142.4:c. 517C>T p.(Arg173Cys), nachází se v horním řádku a je označena šípkou.



**Obrázek č. 19.** Mutace c.517C>T p.(Arg173Cys) u pacientky č. 2. Pozice mutace NM000142.4:c.517C>T p.(Arg173Cys) na začátku imunoglobulinové domény II. receptoru FGFR3.



**Obrázek č. 20. Interpretace patogenity substituce Arg173Cys *in silico* v programu PolyPhen-2.** Výsledná interpretace poukazuje na vysokou pravděpodobnost patogenity u této mutace.

Poté co byla u pacientky zjištěna záměna Arg173Cys byla k molekulární analýze odeslána i matka pacientky. Molekulárně genetické vyšetření odhalilo u matky stejnou mutaci NM000142.4:c.517C>T p.(Arg173Cys) jako u pacientky č. 2. Matka pacientky měří 159,5 cm (-1,23 SD), její obvod hlavy činí 57,5 cm (1,58 SD) a rozpětí paží matky pacientky je 159,5 cm, což odpovídá normě.

### 8.3 Zjištění variant (SNPs) ve vyšetřovaném souboru

Kromě nalezených mutací byly nalezeny i další nepatogenní varianty, které již byly popsány a jsou katalogizovány v databázi NCBI. Tyto varianty lze použít pro průkaz paternálního nebo maternálního původu alely na které se varianta nachází. Frekvence alel byla vypočítána pomocí Hardy-Weinbergova zákona a poté byla porovnána s frekvencí zjištěnou v evropských populacích prostřednictvím databáze 1000 Genomes Browser. Souhrnné informace poskytují tabulky č. 8 a 9 na straně 62.

**Tabulka č. 8.** Tabulka zjištěných nepatogenních variant genu *FGFR3* ve vyšetřovaném souboru.

SNP	exon	Genotyp	Alely		Frekvence heterozygotů	
		Počet jedinců	Alela 1	Alela 2	pozorovaná	očekávaná
RS2234909	7	N=92 CC CT TT	C	T		
		0 26 66	26 (14 %)	158 (86 %)	28 %	24 %
RS2305184	7	GG CG CC	G	C		
		0 3 89	3 (1,6 %)	181 (98,4 %)	3,2 %	3 %
RS121913115	7	GG GA AA	G	A		
		0 1 91	1 (0,5 %)	183 (99,5 %)	1,1 %	1 %
RS17881656	10	CC TC TT	C	T		
		0 2 90	2 (1 %)	182 (99 %)	2,1 %	2 %

**Tabulka č. 9.** SNP v genu *FGFR3*. Porovnání frekvencí alel jednotlivých SNP testovaného souboru s frekvencí výskytu ve finské, britské, iberské a toskánské populaci (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>).

SNP	testovaný soubor	finská populace	britská populace	iberská populace	toskánská populace
RS2234909	T=0,8587 C=0,1413	T=0,8687 C=0,1313	T=0,8462 C=0,1538	T=0,7944 C=0,2056	T=0,6667 C=0,3333
RS2305184	C=0,9837 G=0,0163	C=0,8687 G=0,1313	C=0,8462 G=0,1538	C=0,7944 G=0,2056	C=0,8131 G=0,1869
RS121913115	G=0,0054 A=0,9946	G=1,0000 A=0,0000	G=1,0000 A=0,0000	G=1,0000 A=0,0000	G=1,0000 A=0,0000
RS17881656	T=0,9891 C=0,0109	T=1,0000 C=0,0000	T=0,9945 C=0,0055	T=1,0000 C=0,0000	T=0,9907 C=0,0093

## 8.4 Hodnocení úspěšnosti záchytu mutací

Nálezem dvou pravděpodobně patogenních mutací v genu *FGFR3* ve vyšetřovaném souboru, jsme potvrdili správnost naší pracovní hypotézy.

Náš testovaný soubor pacientů jsme porovnali se studií Heuertzové a kol. (2006). Studie Heuertzové a kol. (2006) popisují dosud nejrozsáhlejší soubor pacientů, kteří měli otestován molekulárně genetickou analýzou celý gen *FGFR3* a u kterých byly nalezeny vzácné mutace. Pro srovnání úspěšnosti detekce mutací genu *FGFR3* u pacientů s hypochondroplázií v naší práci s prací Heuertzové a kol. (2006) jsme do výpočtu zahrnuli i pacienty s dříve zjištěnými mutacemi ve FN v Motole v letech 2002-2014 (viz tabulka č. 10).

**Tabulka č. 10.** Porovnání mutací v genu *FGFR3* v našem testovaného souboru (2015) se souborem Heuertzové a kol. (2006).

Studie:	Heuertz et al. (2006)	Náš testovaný soubor (2015)
Počet pacientů s diagnózou HCH	74	114
Počet nalezených mutací celkem	55	28
Familiárních	10 (14 %)	24 (21 %)
Sporadických	64 (86 %)	90 (79 %)
Asn540Lys	47 (63,5 %)	c.1620C>A: 9 (7,9 %) } c.1620C>G: 8 (7 %) } 17 (14,9 %)
Lys650Gln c.1948A>C	1 (1,5 %)	2 (1,8 %)
Asn540Thr c.1619A>C	0	2 (1,8 %)
Asn540Ser c.1619A>G	0	1 (0,9 %)
Nová mutace	7 (9,5 %)	2 (1,8 %)
Mutace nenalezena	19 (25,5 %)	90 (79 %)

Za pomoci statistického programu SigmaStat jsme zjišťovali rozdíl v zachytu mutací mezi těmito dvěma testovanými soubory, naším a souborem Heuertzové a kol. (2006). Ke statistickému vyhodnocení jsme zvolili metodu Z-testu.

Porovnali jsme úspěšnost zachytu všech mutací v genu *FGFR3* v souboru pacientů s hypochondroplázi. V našem souboru jsme našli 28 mutací u 114 vyšetřovaných, v souboru Heuertzové a kol. (2006) bylo zachyceno 55 mutací u 74 vyšetřovaných. Zachyt mutací v našem souboru byl statisticky významně nižší v porovnání s celkovým počtem pacientů než v souboru Heuertzové a kol (2006). Mezi soubory byl signifikantní rozdíl ( $P < 0,000001$ ).

Dále jsme porovnali poměr vzácných mutací v testovaných souborech s celkovým zachytem mutací u obou studií. V našem souboru byly nalezeny 2 vzácné mutace z 28, v souboru Heuertzové a kol. (2006) bylo nalezeno 7 vzácných mutací z celkových 55 mutací. Mezi naším souborem a souborem Heuertzové a kol. (2006) nebyl nalezen signifikantní rozdíl v zachytu vzácných mutací ( $P = 0,827274$ ), což odpovídalo našemu očekávání. Oba soubory jsou porovnané mezi sebou v tabulce č. 11.

**Tabulka č. 11.** Porovnání našich testovaných dat s daty ze studie Heuertzové a kol. (2006). Byl použit statistický Z- test v programu SigmaStat.

	Zachyceno mutací celkem:	Počet pacientů v souboru		Z-test
Náš testovaný soubor	24 ( $p=0,21$ )	114		$z=7,045271$ $P < 0,000001$
Studie Heuertz et al. (2006)	55 ( $p=0,74$ )	74		
	Vzácné mutace	Běžné mutace	Mutací celkem	Z-test
Náš testovaný soubor	2 ( $p=0,083$ )	22	24	$z=0,218199$ $P=0,827274$
Studie Heuertz et al. (2006)	7 ( $p=0,13$ )	48	55	

## 9 Diskuze

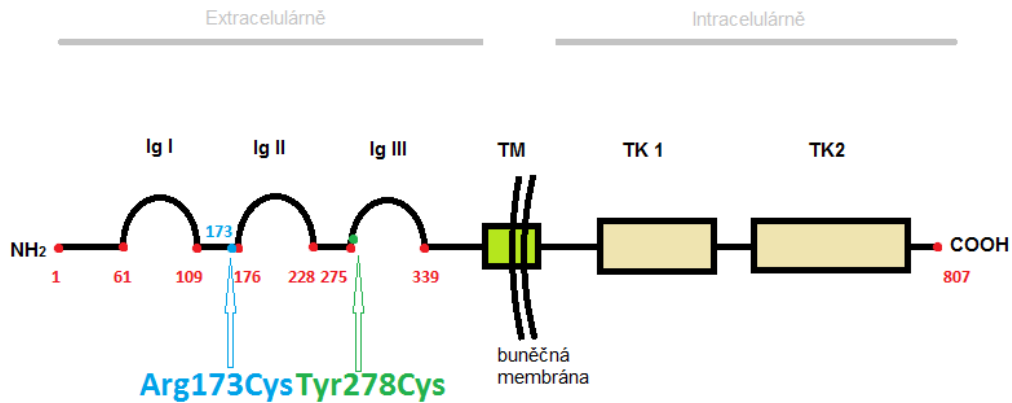
V této práci uvádíme výsledky rozšířeného molekulárně genetického vyšetření genu *FGFR3* u souboru pacientů s klinickou diagnózou hypochondroplázie, kteří byli v letech 2002-2014 indikováni k základnímu molekulárně genetickému vyšetření hypochondroplázie do ÚBLG FN v Motole a u nichž nebyla předchozím vyšetřením zjištěna mutace v kodonu 540 nebo 650. Analýzu jsme provedli v souboru 98 pacientů z populace České republiky, z nich bylo 80 nemocných indikováno pro sporadický výskyt onemocnění v rodině a 18 nemocných z 12 rodin bylo indikováno pro familiární výskyt malého vzrůstu. Jde o soubor větší, než všechny dosud publikované soubory nemocných s touto diagnózou. Očekávali jsme, že podobně, tak jako je tomu u jiných geneticky podmíněných onemocnění, bude záchyt mutací u pacientů s familiárním výskytem malého vzrůstu větší, než u případů sporadických, mezi nimiž lze očekávat určité procento fenokopii. Z ekonomických důvodů jsme proto vyšetřovali celý gen *FGFR3* jen u 18 pacientů s familiárním výskytem onemocnění (12 nepříbuzných rodin), u 80 pacientů indikovaných jako sporadické případy onemocnění v rodině byly analyzovány exony, u kterých byl v minulosti popsán výskyt mutací genu *FGFR3* t.j. exony 3, 5, 7, 10, 13 a 15 genu *FGFR3* (Heuertz et al. 2006; Baujat et al. 2008; Bellus et al. 2000).

Nejprve jsme zavedli analýzu jednotlivých exonů genu *FGFR3* metodou sekvenování dle Sangera s použitím vlastních oligonukleotidových primerů. Primery byly navrhovány s přihlédnutím k dosud známým variantám genu *FGFR3* uvedeným v databázi 1000 Genomes Browser tak, aby eventuální přítomnost varianty nemohla zabránit správnému nasednutí (anealing) oligonukleotidu. Systém jsme validovali vyšetřením vzorků DNA s již známou mutací, zjištěnou dosud používanými primery. Všechny známé mutace byly spolehlivě detekovány, což svědčí pro dobrou detekční schopnost nového diagnostického postupu.

Přesto, že se v odborné literatuře uvádí, že mezi achondroplázií a hypochondroplázií může být fenotypový překryv, u žádného z nemocných s klinickou diagnózou hypochondroplázie jsme nenašli mutaci typickou pro achondroplázií, která vede k záměně Gly380Arg. V našich podmínkách je tedy pravděpodobně achondroplázie klinickými lékaři spolehlivě rozpoznána od hypochondroplázie.

V celém vyšetřovaném souboru jsme odhalili dvě vzácné pravděpodobně patogenní

mutace u pacientů indikovaných k vyšetření pro sporadický malý vzrůst. Jde o mutace c.517C>T p.(Arg173Cys) v exonu 5 a c.833A>G p.(Tyr278Cys) v exonu 7 genu *FGFR3* (viz obrázek č. 21). Tímto nálezem jsme potvrdili naši pracovní hypotézu.



**Obrázek č. 21. Mutace c.833A>G p.(Tyr278Cys) u pacientky č. 1 a mutace c.517C>T p.(Arg173Cys) u pacientky č. 2. Pozice nalezených mutací c.517C>T p.(Arg173Cys) a c.833A>G p.(Tyr278Cys) v oblastech imunoglobulinových domén II a III extracelulární oblasti receptoru *FGFR3*.**

Mutace c.833A>G p.(Tyr278Cys) v genu *FGFR3* zjištěná u pacientky č. 1 byla dosud popsána u tří pacientů se závažným fenotypem hypochondroplázie. Poprvé ji popsala Heuertzová a kol. (2006), druhý a třetí případ publikovali Song a kol. (2012) a Chen a kol. (2013). Také naše pacientka trpí závažnou formou hypochondroplázie, výška po prolongaci dolních končetin je 135,8 cm (-5 SD) to znamená, že pacientka by bez prolongace bérců dosáhla finální výšky asi 126,8 cm (-6,4 SD). Vzhledem k jejímu závažnému fenotypu se dříve uvažovalo i o klinické diagnóze achondroplázie. Pacientka č. 1 ale zároveň trpí neurofibromatózou. U pacientů s tímto onemocněním je tělesná výška také snížena (Virdis et al. 2003), do určité míry se na výsledné výšce pacientky může podílet právě i toto onemocnění. Mutace c.833A>G p.(Tyr278Cys) v genu *FGFR3* vede ke vzniku nového cysteinového zbytku ve třetí imunoglobulinové doméně receptoru a může vést pravděpodobně ke konstitutivní aktivaci receptoru *FGFR3* podobně jako jiné mutace vedoucí k zařazení nového cysteinového zbytku, jako je tomu u thanatoforické dysplázie (Tavormina et al. 1995b; Rousseau et al. 1996a). Skutečnost, že mutace již byla pozorována u čtyř nezávislých případů těžké hypochondroplázie také svědčí pro to, že jde

o skutečnou molekulární příčinu hypochondroplázie u naší pacientky. Neměli jsme možnost vyšetřit rodiče pacientky, abychom prokázali, že mutace u ní vznikla *de novo*.

Mutace c.517C>T p.(Arg173Cys) v genu *FGFR3* zjištěná u pacientky č. 2 dosud nebyla podle nám dostupných informací v odborné literatuře popsána, není uvedena ani v databázi 1000 Genomes Browser. Onemocnění naší pacientky s touto mutací je podle klinického obrazu hodnoceno jako hypochondroplázie, její fenotyp lze popsat jako lehkou formu hypochondroplázie. Mutace c.517C>T p.(Arg173Cys) v genu *FGFR3* vede ke vzniku nového cysteinového zbytku mezi první a druhou imunoglobulinovou doménou receptoru. Domníváme se, že i tato mutace může vést pravděpodobně ke konstitutivní aktivaci receptoru *FGFR3* podobně jako jiné mutace vedoucí k zařazení nového cysteinového zbytku, byť mírnějšího stupně. Cíleným vyšetřením matky probandky jsme zjistili, že i matka probandky nese stejnou heterozygotní mutaci. Doplněné klinické vyšetření matky zjistilo, že matka je rovněž nižší postavy (-1,23 SD) a má větší obvod hlavy (1,58 SD), což také svědčí pro to, že jde o skutečnou molekulární příčinu hypochondroplázie u naší pacientky. Vzhledem k tomu, že mutace c.517C>T p.(Arg173Cys) v genu *FGFR3* dosud nebyla popsána, bylo by vhodné dále ověřit její patogenitu některou výzkumnou metodou, funkční analýzou proteinu *in vitro*, nebo na zvířecím modelu. Případ této pacientky č. 2 dobře dokumentuje obtížnost klinické diagnostiky hypochondroplázie resp. diagnostického zařazení disproporčního malého vzrůstu mírného stupně, kdy pacientka byla původně zařazena jako sporadický případ v rodině a její matka jako osoba s normálním vzrůstem.

U 96 pacientů nebyla popsáním postupem metodou přímého sekvenování dle Sangera žádná patogenní mutace genu *FGFR3* zjištěna. Tato skutečnost je v souladu s výsledky jiných autorů. Příčiny malého vzrůstu u pacientů bez zjištěné mutace mohou být různé, může jít o malý vzrůst způsobený zevními vlivy, bez genetické příčiny, nebo malý vzrůst vázaný na jiný genetický lokus, než *FGFR3*, nebo i o malý vzrůst jako komplexní chorobu, podmíněnou souhrou více genetických, epigenetických a environmentálních faktorů. Pro tuto možnost svědčí i dosud malá úspěšnost vysokokapacitního sekvenování při identifikaci nových kauzálních genů.

Záchyt mutací v našem souboru nemocných jsme po zahrnutí nemocných s mutacemi v kodonech 540 a 650 statisticky porovnali se souborem Heuertzové a kol. (2006),

největším dosud publikovaným souborem nemocných s hypochondroplázií. Výběr pacientů ve studii Heuerzové a kol. (2006) vycházel z klinických a radiologických dat jednotlivých pacientů, na rozdíl od naší studie, do které byli vybráni pacienti s disproporcí malou postavou a podezřením na hypochondroplázií na základě doporučení lékaře specialisty. Zjistili jsme statisticky vysoce významný rozdíl v úspěšnosti detekce mutací, v našem souboru byla úspěšnost nižší. Tento rozdíl by mohl být způsoben jak přesností výběru zařazených pacientů, tak menší citlivostí naší detekční metody. Domníváme se, že příčinou jsou zejména méně striktní diagnostická kritéria u našeho souboru. Naproti tomu jsme nezjistili statisticky významný rozdíl v zachytu vzácných mutací, naše úspěšnost vztahovaná na počet zjištěných mutací v kodonech 540 a 650 byla srovnatelná s úspěšností Huertzové. Z toho usuzujeme, že námi používaná metoda molekulárně genetické analýzy je spolehlivá a může být používána při DNA analýze FGFR3-vázaných skeletálních dysplázií.

## 10 Závěr

Hypochondroplázie, porucha projevující se disproporčním malým vzrůstem, patří mezi jednu z častých vrozených vad. Projevy hypochondroplázie mohou být různě závažné, což ztěžuje klinickou diagnostiku. Včasná diagnostika přitom může hrát v medicíně zásadní roli, například při rozhodnutí o možné terapii nebo pro další reprodukční rozhodnutí v rodině. V současné době je zásadní pro včasnou diagnózu hypochondroplázie především molekulárně genetická analýza genu *FGFR3*, který je u části pacientů za vznik hypochondroplázie zodpovědný.

Předložená práce přispěla ke zpřesnění molekulárně genetické diagnostiky u nemocných s hypochondroplázií a přinesla nové poznatky o pacientech s hypochondroplázií v České republice. Zavedli jsme nově DNA diagnostiku celého genu *FGFR3*, identifikovali jsme u dvou pacientek vzácné pravděpodobně patogenní mutace genu *FGFR3*. Na základě těchto výsledků bude modifikován diagnostický protokol u nemocných s hypochondroplázií. Přesná molekulárně genetická diagnostika je důležitá pro stanovení přesné genetické prognózy pacienta a jeho rodiny.

## 11 Seznam použité literatury

### 11.1 Internetové zdroje

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM<sup>TM</sup>. McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md), 2000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

The Human Gene Mutation Database, HGMD<sup>®</sup>. Institute of Medical Genetics in Cardiff, Cardiff University, Great Britain, 2015. Available at: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>

National Center for Biotechnology Information, NCBI. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA, 2015. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

1000 Genomes Browser, National Center for Biotechnology Information, NCBI. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA, 2015. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>

Basic Local Alignment Search Tool, BLAST<sup>®</sup>. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA, 2015. Available at: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Polymorphism Phenotyping v2, PolyPhen-2 : Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7 (2010) (4) 248-249. Hosted: Developed by the Sunyaev lab at Harvard Medical School. Available at: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

Sorting intolerant from tolerant, SIFT, Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073-81, J.Craig Venter<sup>TM</sup> institute Available at: <http://sift.jcvi.org/>

Mutation Taster, Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M a Seelow D (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods* 11(4):361-2 Available at: <http://www.mutationtaster.org/>

## 11.2 Publikace

Appan, S., Laurent, S., Chapman M., Hindmarsh, P. C. and Brook C. G. D. (1990) Growth and growth hormone therapy in hypochondroplasia. *Acta Pædiatrica* 79(8-9): 796–803

Armstrong, E., Partanen, J., Cannizzaro, L., Huebner, K. and Alitalo, K. (1992) Localization of the fibroblast growth factor receptor-4 gene to chromosome region 5q33-4ter. *Genes Chromosomes & Cancer* 4(1): 94–98.

Baker, K. M., Olson, D. S., Harding, C. O. and Pauli, R. M. (1997) Long-term survival in typical thanatophoric dysplasia type 1. *American Journal of Medical Genetics* 70(4): 427–436

Bange, J., Pechtl, D., Cheburkin, Y., Specht, K., Harbeck, N., Schmitt, M., Knyazeva, T. a Müller, S., Gärtner, S., Sures, I., Wang, H., Imyanitov, E., Häring, H. U., Knyazev, P., Iacobelli, S., Höfler, H. and Ullrich, A. (2002) Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg 388 allele. *Cancer Research* 62(3): 840–847.

Barroso, E., Pérez-Carrizosa, V., García-Recuero, I., Glucksman, M. J., Wilkie, A. O., García-Minaur, S. and Heath, K. E. (2011) Mild isolated craniosynostosis due to a novel FGFR3 mutation, p.Ala334Thr. *American Journal of Medical Genetics, Part A* 155(12): 3050–3053

Baujat, G., Legai-Mallet, L., Finidori, G., Cormier-Daire, V. and Le Merrer, M. (2008) Achondroplasia. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 22(1): 3–18.

Beals, R. K. (1969) Hypochondroplasia. A report of five kindreds. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 51(4): 728–736

Bellus, G. A., Spector, E. B., Speiser, P. W., Weaver, Ch. A., Garber, A. T., Bryke, Ch. R., Israel, J., Rosengren, S. S., Webster, M.K., Donoghue, D. J. and Francomano, C. A. (2000) Distinct missense mutations of the FGFR3 lys650 codon modulate receptor kinase activation and the severity of the skeletal dysplasia phenotype. *The American Journal of Human Genetics* 67(6): 1411–1421

Bellus, G. A., Gaudenz, K., Zackai, E. H., Clarke, L. A., Szabo, J., Francomano, C. A. and Muenke, M. (1996) Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nature genetics* 14(2): 174–176

Bellus, G. A., McIntosh, I., Smith, E. A., Aylsworth, A. S., Kaitila, I., Horton, W. A. A Greenhaw, G. A., Hecht, J. T. and Francomano, C. A. (1995) A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nature genetics* 10(3): 357–359

Bober, M. B., Bellus, G. A., Nikkel, S. M. and Tiller, G. E. (1999) Hypochondroplasia. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1477/>)

- Bober, M. B., Taylor, M., Heinle, R. and Mackenzie, W. (2012) Achondroplasia-hypochondroplasia complex and abnormal pulmonary anatomy. *American Journal of Medical Genetics Part A* 158(9): 2336–2341
- Brook, C. G. D. and De Vries, B. B. A. (1998) Skeletal dysplasias. *Archives of disease in childhood* 79(3): 285–289
- Caplan, A.I. and Pechak, D.G. (1987) The cellular and molecular embryology of bone formation. In Bone and mineral research (ed. W.A. Peck), pp. 117–183. *Elsevier*, New York. podle Ornitz, D. M. a Marie, P. J. (2002): FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & development* 16(12): 1446-1465.
- De Rosa, M., Fano, V., Araoz, H. V., Chertkoff, L. and Obregon, M. G. (2014) Homozygous N540K hypochondroplasia-First report: Radiological and clinical features. *American Journal of Medical Genetics, Part A* 164(7): 1784–1788
- Deng, Ch., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A. and Leder, P. (1996) Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84(6): 911–921
- Deutz-Terlow, P. P., Losekoot, M., Aalfs, C. M., Hennekam, R. and Bakker, E. (1998) Asn540Thr substitution in the fibroblast growth factor receptor 3 tyrosin kinase domain causing hypochondroplasia. *Human Mutation* 11(S1): S62–S65.
- Flynn, M. A. and Pauli, R. M. (2003) Double heterozygosity in bone growth disorders: Four new observations and review 121(3): 193–208
- Foth, M., Ahmad, I., van Rhijn, B. W., van der Kwast, T., Bergman, A. M., King, L., Ridgway, R., Leung, H. Y., Fraser, S., Sansom, O. J. and Iwata, T. (2014) Fibroblast growth factor receptor 3 activation plays a causative role in urothelial cancer pathogenesis in cooperation with Pten loss in mice. *Journal of Pathology* 233(2): 148–158
- Glasgow, J. F., Nevin, N. C. and Thomas, P. S. (1978) Hypochondroplasia. *Archives of disease in childhood* 53(11): 868–872.
- Grigelionienė, G., Eklöf, O., Laurencikas, E., Ollars, B., Hertel, N. T., Dumanski, J.P. and Hagenäs, L. (2000) Asn540Lys mutation in fibroblast growth factor receptor 3 and phenotype in hypochondroplasia. *Acta paediatrica* 89(9): 1072–1076
- Grigelionienė, G., Hagenäs, L., Eklöf, O., Neumeyer, L., Haereid, P. E. and Anvret, M. (1998) A novel missense mutation Ile538Val in the fibroblast growth factor receptor 3 in hypochondroplasia. *Human Mutation* 11(4): 333
- Grosso, S., Farnetani, M. A., Berardi, R., Bartalini, G., Carpentieri, M., Galluzzi, P., Mostardini, R., Morgese, G. and Balestri, P. (2003) Medial temporal lobe dysgenesis in Muenke syndrome and hypochondroplasia. *American Journal of Medical Genetics Part A* 120(1): 88–91

- Gusella, J. F., Wexler, N.S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., Watkins, P. C., Ottina, K., Wallace, M.R., Sakaguchi, A. Y., Young, A. B., Shoulson, I., Bonilla, E. and Martin, J. B. (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306: 234–238.
- Hall, B. D. and Spranger, J. (1979) Hypochondroplasia: Clinical and radiological aspects in 39 cases. *Radiology* 133(1): 95-100
- Heuertz, S., Le Merrer, M., Zabel, B., Wright, M., Gibbs, L., Bonaventure, J. and Legeai-Mallet, L. (2006) Novel FGFR3 mutations creating cysteine residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia 14(12): 1240–1247
- Ho, K. L., Chang, C. H., Yang, S. S. and Chason, J. L. (1984) Neuropathologic findings in thanatophoric dysplasia. *Acta neuropathologica* 63(3): 218–228.
- Huang, H., Sun, M., Li, X. and Jin, J. (2015) Urothelial carcinoma of the bladder in patients aged 30 years or younger: clinicopathological analysis and expression of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) of 45 cases. *Medical Oncology* 32(5): 1–6
- Huggins, M., Smith, J. R., Chun, K., Ray, P. N., Shah, J. K. and Whelan, D. T. (1999) Achondroplasia-hypochondroplasia complex in a newborn infant. *American Journal of Medical Genetics* 84(5): 396–400.
- Chellaiah, A. T., McEwen, D. G., Werner, S., Xu, J. and Ornitz, D. M. (1994) Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *Journal of Biological Chemistry* 269(15): 11620–11627.
- Chen, C. P., Su, Y. N., Lin, T. H., Chang, T. Y., Su, J. W. and Wang, W. (2013) Detection of a de novo Y278C mutation in FGFR3 in a pregnancy with severe fetal hypochondroplasia: Prenatal diagnosis and literature review. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 52(4): 580–585
- Chitayat, D., Fernandez, B., Gardner, A., Moore, L., Glance, P., Dunn, M., Chun, K., Sgro, M., Ray, P. and Allingham-Hawkins, D. (1999) Compound heterozygosity for the achondroplasia-hypochondroplasia FGFR3 mutations: Prenatal diagnosis and postnatal outcome. *American Journal of Medical Genetics* 84(5): 401–405.
- Jonquoy, A., Mugniery, E., Benoist-Lassel, C., Kaci, N., Le Corre, L., Barbault, F., Girard, A. L., Le Merrer, Y., Busca, P., Schibler, L., Munnich, A. and Legeai-Mallet, L. (2012) A novel tyrosine kinase inhibitor restores chondrocyte differentiation and promotes bone growth in a gain-of-function FGFR3 mouse model. *Human Molecular Genetics* 21(4): 841–851
- Kannu, P., Hayes, I. M., Mandelstam, S., Donnan, L. and Savarirayan, R. (2005) Medial temporal lobe dysgenesis in hypochondroplasia. *American Journal of Medical Genetics Part A* 138(4): 389–391

- Keegan, K., Johnson, D. E., Williams, L. T. and Hayman, M. J. (1991) Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 88(4): 1095–1099
- Kim, H. J., Kim, J. H., Bae, S. C., Choi, J. Y. and Ryoo, H. M. (2003) The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2. *Journal of Biological Chemistry* 278(1): 319–326
- Kosher, R. A., Gay, S. W., Kamanitz, J. R., Kulyk, W. M., Rodgers, B. J., Sai, S., Tanaka, T. and Tanzer, M. L. (1986) Cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb cartilage differentiation. *Developmental biology* 118(1): 112-117.
- Langer, L. O., Yang, S. S., Hall, J. G., Sommer, A., Kottamasu, S. R., Golabi, M., Krassikoff, N., Opitz, J. M. and Bernstein, J. (1987) Thanatophoric dysplasia and cloverleaf skull. *American Journal of Medical Genetics* 28(S3): 167-179.
- Leroy, J. G., Nuytinck, L., Lambert, J., Naeyaert, J. M. and Mortier, G. R. (2007) Acanthosis nigricans in a child with mild osteochondrodysplasia and K650Q mutation in the FGFR3 gene. *American Journal of Medical Genetics Part A* 143(24): 3144-3149
- Makrythanasis, P., Temtamy, S., Aglan, M. S., Otaify, G. A., Hamamy, H. and Antonarakis, S. E. (2014) A Novel Homozygous Mutation in FGFR3 Causes Tall Stature, Severe Lateral Tibial Deviation, Scoliosis, Hearing Impairment, Camptodactyly, and Arachnodactyly. *Human mutation* 35(8): 959-963.
- Martin, G. R. (1998) The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes & Development* 12(11): 1571-1586.
- Matsui, Y., Kawabata, H., Yasui, N., Kimura, T., Tsumaki, N. and Ochi, T. (1998) Genotype phenotype correlation in achondroplasia and hypochondroplasia. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 80(6): 1052-1056.
- Matsushita, T., Wilcox, W. R., Chan, Y. Y., Kawanami, A., Bükülmez, H., Balmes, G., Krejci, P., Mekikian, P. B., Otani, K., Yamaura, I., Warman, M. L., Givol, D. and Murakami, S. (2009) FGFR3 promotes synchondrosis closure and fusion of ossification centers through the MAPK pathway. *Human molecular genetics* 18(2): 227-240.
- Mattei, M. G., Moreau, A., Gesnel, M. C., Houssaint, E. and Breathnach, R. (1991) Assignment by in situ hybridization of a fibroblast growth factor receptor gene to human chromosome band 10q26. *Human genetics* 87(1): 84-86.
- McKusick, V. A., Kelly, T. E. and Dorst, J. P. (1973) Observations suggesting allelism of the achondroplasia and hypochondroplasia genes. *Journal of medical genetics* 10(1): 11-16.
- Meyers, G. A., Orlow, S. J., Munro, I. R., Przylepa, K. A. and Jabs, E. W. (1995) Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nature genetics* 11(4): 462-464.

- Mortier, G., Nuytinck, L., Craen, M., Renard, J. P., Leroy, J. G. and De Paepe, A. (2000) Clinical and radiographic features of a family with hypochondroplasia owing to a novel Asn540Ser mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *Journal of medical genetics* 37(3): 220-224.
- Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D. and de Crombrughe, B. (2004) Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes & development* 18(3): 290-305.
- Naski, M. C., Wang, Q., Xu, J. and Ornitz, D. M. (1996) Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nature genetics* 13(2): 233-237.
- Newman, D. E. and Dunbar, J. C. (1975) Hypochondroplasia. *Journal of the Canadian Association of Radiologists* 26(2): 95-103.
- Norman, A. M., Rimmer, S., Landy, S. and Donnai, D. (1992) Thanatophoric dysplasia of the straight-bone type (type 2). *Clinical dysmorphology* 1(2): 115-120.
- Oberklaid, F., Danks, D. M., Jensen, F., Stace, L. and Rosshandler, S. (1979) Achondroplasia and hypochondroplasia. Comments on frequency, mutation rate, and radiological features in skull and spine. *Journal of medical genetics* 16(2): 140-146.
- Ong, S. H., Hadari, Y. R., Gotoh, N., Guy, G. R., Schlessinger, J. and Lax, I. (2001) Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(11): 6074-6079.
- Orioli, I. M., Castilla, E. E., Scarano, G. and Mastroiacovo, P. (1995) Effect of paternal age in achondroplasia, thanatophoric dysplasia, and osteogenesis imperfecta. *American journal of medical genetics* 59(2): 209-217.
- Ornitz, D. M. and Itoh, N. (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2(3): 1-12.
- Ornitz, D. M. and Itoh, N. (2015) The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4(3): 215-266.
- Ornitz, D. M. and Marie, P. J. (2002) FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & development* 16(12): 1446-1465.
- Pannier, S., Martinovic, J., Heuertz, S., Delezoide, A. L., Munnich, A., Schibler, L., Serre, V. and Legeai-Mallet, L. (2009) Thanatophoric dysplasia caused by double missense FGFR3 mutations. *American Journal of Medical Genetics Part A* 149(6): 1296-1301.

- Pannier, S., Mugniery, E., Jonquoy, A., Benoist-Lasselín, C., Odent, T., Jais, J. P., Munnich, A. and Legeai-Mallet, L. (2010) Delayed bone age due to a dual effect of FGFR3 mutation in Achondroplasia. *Bone* 47(5): 905-915.
- Partanen, J., Mäkelä, T. P., Eerola, E., Korhonen, J., Hirvonen, H., Claesson-Welsh, L. and Alitalo, K. (1991) FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *The EMBO journal* 10(6): 1347.
- Partington, M. W., Gonzales-Crussi, F., Khakee, S. G. and Wollin, D. G. (1971) Cloverleaf skull and thanatophoric dwarfism: Report of four cases, two in the same sibship. *Archives of Disease in Childhood* 46(249): 656-664.
- Passos-Bueno, M. R., Wilcox, W. R., Jabs, E. W., Sertie, A. L., Alonso, L. G. and Kitch, H. (1999) Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Human mutation* 14(2): 115-125.
- Perez-Castro, A. V., Wilson, J. and Altherr, M. R. (1997) Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene and comparative sequence analysis with the mouse Fgfr3 gene. *Genomics* 41(1): 10-16.
- Presta, M., Oreste, P., Zoppetti, G., Belleri, M., Tanghetti, E., Leali, D., Urbinati, Ch., Bugatti, A., Ronca, R., Nicoli, S., Moroni, E., Stabile, H., Camozzi, M., Hernandez, G. A., Mitola, S., Dell' Era, P., Rusnati, M. and Ribatti, D. (2005) Antiangiogenic activity of semisynthetic biotechnological heparins low-molecular-weight-sulfated Escherichia coli K5 polysaccharide derivatives as Fibroblast growth factor antagonists. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25(1): 71-76.
- Prinster, C., Carrera, P., Maschio, M. D., Weber, G., Maghnie, M., Vigone, M. C., Mora, S., Tonini, G., Rigon, F., Beluffi, G., Severi, F., Chiumello, G. and Ferrari, M. (1998) Comparison of clinical-radiological and molecular findings in hypochondroplasia. *American journal of medical genetics* 75(1): 109-112.
- Prinster, C., Del Maschio, M., Beluffi, G., Maghnie, M., Weber, G., Del Maschio, Chiumello, G. and Mora, S. (2001) Diagnosis of hypochondroplasia: The role of radiological interpretation. *Pediatric radiology* 31(3): 203-208.
- Ramaswami, U., Hindmarsh, P. C. and Brook, C. G. D. (1999) Growth hormone therapy in hypochondroplasia. *Acta Paediatrica* 88(s428): 116-117.
- Ramaswami, U., Rumsby, G., Hindmarsh, P. C. and Brook, C. G. D. (1998) Genotype and phenotype in hypochondroplasia. *The Journal of pediatrics* 133(1): 99-102.
- Rapraeger, A. C., Krufka, A. and Olwin, B. B. (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252(5013): 1705-1708.
- Rothenbuhler, A., Linglart, A., Piquard, C. and Bougnères, P. (2012) A Pilot Study of Discontinuous, Insulin-Like Growth Factor 1–Dosing Growth Hormone Treatment in

Young Children with FGFR3 N540K-Mutated Hypochondroplasia. *The Journal of pediatrics* 160(5): 849-853.

Rousseau, F., El Ghouzzi, V., Delezoide, A. L., Legeai-Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A. and Bonaventure, J. (1996a) Missense FGFR3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1). *Human molecular genetics* 5(4): 509-512.

Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., Schmidt, H., Weissenbach, J., Maroteaux, P., Munnich, A. and Le Merrer, M. (1996b) Clinical and genetic heterogeneity of hypochondroplasia. *Journal of medical genetics* 33(9): 749-752.

Shiang, R., Thompson, L. M., Zhu, Y. Z., Church, D. M., Fielder, T. J., Bocian, M., Winokur, S. T. and Wasmuth, J. J. (1994) Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 78(2): 335-342.

Schindler, S., Friedrich, M., Wagener, H., Lorenz, B. and Preising, M. N. (2002) Heterozygous P250L mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in a case of isolated craniosynostosis. *Journal of medical genetics* 39(10): 764-766.

Sommer, A., Young-Wee, T., Frye, T. and Reynolds, J. F. (1987) Achondroplasia-hypochondroplasia complex. *American journal of medical genetics* 26(4): 949-957.

Song, S. H., Balce, G. C. E., Agashe, M. V., Lee, H., Hong, S. J., Park, Y. E. Kin, S. G. and Song, H. R. (2012) New proposed clinico-radiologic and molecular criteria in hypochondroplasia: FGFR 3 gene mutations are not the only cause of hypochondroplasia. *American Journal of Medical Genetics Part A* 158(10): 2456-2462.

Stoilov, I., Kilpatrick, M. W. and Tsipouras, P. (1995) A common FGFR3 gene mutation is present in achondroplasia but not in hypochondroplasia. *American journal of medical genetics* 55(1): 127-133.

Su, N., Jin, M. and Chen, L. (2014) Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. *Bone Research* 2: 1-24

Superti-Furga, A., Steinmann, B., Gitzelmann, R., Eich, G., Giedion, A., Bucher, H. U. and Wissler, J. (1995) A glycine 375-to-cysteine substitution in the transmembrane domain of the fibroblast growth factor receptor-3 in a newborn with achondroplasia. *European journal of pediatrics* 154(3): 215-219.

Tavormina, P. L., Bellus, G. A., Webster, M. K., Bamshad, M. J., Fraley, A. E., McIntosh, I., Szabo, J., Jiang, W., Jabs, E. W., Wilcox, W. R., Wasmuth, J. J., Donoghue, D. J., Thompson, L. M. and Francomano, C. A. (1999) A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *The American Journal of Human Genetics* 64(3): 722-731.

- Tavormina, P. L., Shiang, R., Thompson, L. M., Zhu, Y. Z., Wilkin, D. J., Lachman, R. S., Wilcox, W. R., Rimoin, D. L., Cohn, D. H. and Wasmuth, J. J. (1995a) Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nature genetics* 9(3): 321-328.
- Tavormina, P. L., Rimoin, D. L., Cohn, D. H., Zhu, Y. Z., Shiang, R. and Wasmuth, J. J. (1995b) Another mutation that results in the substitution of an unpaired cysteine residue in the extracellular domain of FGFR3 in thanatophoric dysplasia type I. *Human molecular genetics* 4(11): 2175-2177.
- Thauvin-Robinet, C., Faivre, L., Lewin, P., Monléon, D., François, C., Huet, F., Couailler, J. F., Campos-Xavier, A. B., Bonaventure, J. and Le Merrer, M. (2003) Hypochondroplasia and stature within normal limits: another family with an Asn540Ser mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *American Journal of Medical Genetics Part A* 119(1): 81-84.
- Thompson, L. M., Plummer, S., Schalling, M., Altherr, M. R., Gusella, J. F., Housman, D. E. and Wasmuth, J. J. (1991) A gene encoding a fibroblast growth factor receptor isolated from the Huntington disease gene region of human chromosome 4. *Genomics* 11(4): 1133-1142.
- Toydemir, R. M., Brassington, A. E., Bayrak-Toydemir, P., Krakowiak, P. A., Jorde, L. B., Whitby, F. G., Longo, N., Viskochil, D. H., Carey, J. C. and Bamshad, M. J. (2006) A novel mutation in FGFR3 causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 79(5): 935-941.
- Viridis, R., Street, M. E., Bandello, M. A., Tripodi, C., Donadio, A., Villani, A. R., Cagozzi, L. and Bernasconi, S. (2003) Growth and pubertal disorders in neurofibromatosis type 1. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism* 16: 289-292.
- Warman, M. L., Cormier-Daire, V., Hall, C., Krakow, D., Lachman, R., LeMerrer, M., Mortier, G., Mundlos, S., Nishimura, G., Rimoin, D. L., Robertson, S., Savarirayan, R., Silences, D., Spranger, J., Unger, S., Zabel, B. and Superti-Furga, A. (2011) Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *American journal of medical genetics Part A* 155(5): 943-968.
- Winterpacht, A., Hilbert, K., Stelzer, C., Schweikardt, T., Decker, H., Segerer, H., Spranger, J. and Zabel, B. (2000) A novel mutation in FGFR-3 disrupts a putative N-glycosylation site and results in hypochondroplasia. *Physiological genomics* 2(1): 9-12.
- Wit, J. M., Clayton, P. E., Rogol, A. D., Savage, M. O., Saenger, P. H. and Cohen, P. (2008) Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Hormone & IGF Research* 18(2): 89-110.

Wood, S., Schertzer, M. a Yaremko, M. L. (1995) Sequence identity locates CEBPD and FGFR1 to mapped human loci within proximal 8p. *Cytogenetic and Genome Research* 70(3-4): 188-191.

Worley, K. C., Wiese, B. A. a Smith, R. F. (1995) BEAUTY: an enhanced BLAST-based search tool that integrates multiple biological information resources into sequence similarity search results. *Genome research* 5(2): 173-184.

Wynne-Davies, R., Walsh, W. K. a Gormley, J. E. S. S. (1981) Achondroplasia and hypochondroplasia. Clinical variation and spinal stenosis. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 63(4): 508-515.

Zankl, A., Elakis, G., Susman, R. D., Inglis, G., Gardener, G., Buckley, M. F. a Roscioli, T. (2008) Prenatal and postnatal presentation of severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans (SADDAN) due to the FGFR3 Lys650Met mutation. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146(2): 212-218.