

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Iva Trsová

**Lidská onemocnění způsobená zárodečnými mutacemi Hedgehog
signální dráhy**

Human Diseases Caused by Germline Mutations of the Hedgehog Signaling
Pathway

Diplomová práce

Školitelka: MUDr. Anna Křepelová, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci „Lidská onemocnění způsobená zárodečnými mutacemi Hedgehog signální dráhy“ zpracovala samostatně pod vedením 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 8. 8. 2019

Podpis:

Poděkování:

Nejprve bych ráda poděkovala své školitelce MUDr. Anně Křepelové, CSc. za vedení mé diplomové práce, za cenné rady a v neposlední řadě za čas a úsilí, které práci věnovala.

Dále chci poděkovat celému kolektivu Ústavu biologie a lékařské genetiky Fakultní nemocnice v Motole za podporu a konzultace. Zejména děkuji Mgr. Janě Zarzycké za vstřícnost a ochotu během celého zpracovávání a Marcele Fialové, DiS za důkladné zaškolení při praktických úkonech v laboratoři.

Nakonec chci vyjádřit obrovské díky své rodině za neúnavnou podporu během celého studia, kdy ani jednou nepochybovali.

Tato práce byla podpořena z projektu institucionální podpory MZ ČR 00064202.

Abstrakt

Hedgehog signální dráha se účastní řízení diferenciacce embryonálních buněk, segregace těla, vývoje mozku, skeletu, svalstva, gastrointestinálního traktu, plic a udržování a regenerace tkání dospělého jedince. Dráha obsahuje více než 10 proteinů: receptorů, koreceptorů, ligandů, transkripčních efektorů a represorů zapojených do komplexních funkčních interakcí. Porucha hedgehog signalizace během embryonálního vývoje může vést k závažné vývojové vadě – holoprosencefalii. Mutace způsobující ztrátu funkce *PTCH1* vedou ke Gorlinovu syndromu – hereditární predispozici k basocelulárnímu karcinomu, asociované s anomáliemi mozku, lebky, obratlů a žebere. Bylo zjištěno, že holoprosencefalie i Gorlinův syndrom jsou geneticky heterogenní, mohou být způsobeny zárodečnými mutacemi různých genů Hedgehog signální dráhy.

V letech 2006–2016 byl v Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN v Motole pro diagnostické účely analyzován gen *PTCH1* u 70 nepříbuzných nemocných s podezřením na Gorlinův syndrom (MIM 109400). U 35 (50 %) z nich byla zjištěna patogenní varianta v genu *PTCH1*, u 10 nemocných, kteří splňovali diagnostická kritéria a 25 nemocných, kteří kritéria nesplňovali, nebyla příčina onemocnění zjištěna.

Předmětem této studie bylo rozšířit diagnostické možnosti u Gorlinova syndromu a u holoprosencefalie a ověřit, zda u dosud negativně testovaných nemocných s projevy Gorlinova syndromu není onemocnění způsobeno zatím neidentifikovanou patogenní variantou genu kódujícího protein *SUFU*, který se také účastní Hedgehog signální dráhy. Byla zavedena analýza genu *SUFU* metodou Sangerova sekvenování a metodou MLPA. Byla zavedena analýza genů *PTCH1* a *SUFU* pomocí NGS panelu genů. U dvaceti *PTCH1*-negativních nemocných byl vyšetřen gen *SUFU* Sangerovým sekvenováním, u jednoho z deseti nově zařazených pacientů byly geny *PTCH1* a *SUFU* vyšetřeny Sangerovým sekvenováním, u ostatních devíti pacientů byly oba geny vyšetřeny současně panelem NGS.

Ve vyšetřovaném souboru nebyla zjištěna patogenní varianta genu *SUFU* u žádného z vyšetřovaných pacientů. V genu *PTCH1* byly zjištěny dvě velmi pravděpodobně patogenní varianty u dvou pacientek, které splňovaly dvě majoritní a několik minoritních kritérií. Jedná se o varianty c.3037dupT p.(Tyr1013Leufs*132)

v exonu 18 a c.3306+1G>T p.(?) v sestřihovém místě exonu 19 (Ref. Seq. GenBank NM_000264.4).

Práce přinesla nové poznatky o molekulárně genetické podstatě Gorlina syndromu a přispěla ke zlepšení molekulárně genetické diagnostiky v České republice. Záradečné mutace genu *SUFU* jsou pravděpodobně jen velmi vzácně příčinou Gorlina syndromu v české populaci. Využití technik NGS je přínosem pro molekulárně genetickou diagnostiku Gorlina syndromu a holoprosencefalie, chorob s možnou poruchou Hedgehog signální dráhy.

Klíčová slova: Hedgehog signální dráha, Gorlinův syndrom, Holoprosencefalie, gen *PTCH1*, gen *SUFU*, mutační analýza, mutace

Abstract

The Hedgehog signalling pathway is involved in regulation of differentiation of embryonic cells, in body patterning, in development of brain, bone, muscle, gastrointestinal tract, lungs, and in maintenance and regeneration of adult tissues. The pathway includes more than 10 proteins: receptors, coreceptors, ligands, transcription effectors and repressors, linked in complex functional interactions. Disruption of the hedgehog signalling during embryogenesis can lead to a serious developmental disorder – to holoprosencephaly. Loss-of-function mutations of *PTCH1* lead to Gorlin syndrome – a hereditary predisposition to basal cell carcinoma associated with anomalies of brain, skull, vertebrae, and ribs. Both holoprosencephaly and Gorlin syndrome have been shown to be genetically heterogeneous, both can be caused by germline mutations of several genes of the Hedgehog signalling pathway.

From 2006 to 2016, the *PTCH1* gene was analysed for diagnostic purposes in 70 unrelated patients with suspicion of Gorlin syndrome (MIM 109400) referred to the Department of Biology and Medical Genetics, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague. A pathogenic variant of the *PTCH1* gene was detected in 35 (50%) of patients. No mutation was found in 35 patients, 10 of them fulfilled, and 25 of them did not fulfil diagnostic criteria.

The aim of this study was to expand diagnostic possibilities in Gorlin syndrome and in holoprosencephaly and to test the hypothesis that Gorlin syndrome in the *PTCH1*-negative patients might have been caused by a pathogenic variant of the *SUFU* gene, which is also involved in the Hedgehog signalling pathway. DNA analysis of the *SUFU* gene by Sanger sequencing and MLPA, and DNA analysis of the *PTCH1* gene and the *SUFU* gene by an NGS gene panel have been introduced for this purpose.

In a pilot study, the *SUFU* gene was tested in twenty *PTCH1*-negative patients by Sanger sequencing. In one patient, both *PTCH1* and *SUFU* genes were sequenced by Sanger sequencing, and in nine patients, both *PTCH1* and *SUFU* genes were tested by the NGS gene panel.

In the group of patients studied, no pathogenic variant was detected in the *SUFU* gene. Two novel, highly likely pathogenic variants were detected in the *PTCH1* gene

in two female patients who fulfilled two major and several minor criteria: heterozygous c.3037dupT p.(Tyr1013Leufs*132) in exon 18, and heterozygous c.3306+1G>T, p.(?) in a splice site of exon 19 (Ref.Seq. GenBank NM_000264.4).

The study has brought new data about the genetic basis of Gorlin syndrome and has helped improve and extend molecular genetic diagnostics in the Czech Republic. Germline mutations of the *SUFU* gene are probably a very rare cause of Gorlin syndrome in the Czech Republic. Implementation of NGS techniques has improved molecular genetic diagnostics of Gorlin syndrome and holoprosencephaly, disorders with possible disruption of the Hedgehog signalling pathway.

Key words: Hedgehog pathway, Gorlin syndrome, Holoprosencephaly, *PTCH1* gene, *SUFU* gene, mutation analysis, mutation

Obsah

1. ÚVOD	1
2. PŘEHLED PROBLEMATIKY – HEDGEHOG SIGNÁLNÍ DRÁHA A JEJÍ ONEMOCNĚNÍ.....	2
2.1. BUNĚČNÁ SIGNALIZACE A SIGNÁLNÍ DRÁHY	2
2.2. HEDGEHOG SIGNÁLNÍ DRÁHA	2
2.2.1. <i>Shh</i> protein a jeho transport.....	4
2.2.2. Komplex <i>SUFU</i> a <i>GLI</i>	5
2.2.3. Exprese genů <i>Hedgehog</i> signální dráhy.....	6
2.2.4. Další proteiny <i>Hedgehog</i> signální dráhy.....	6
2.3. GEN A PROTEIN <i>PTCH1</i>	7
2.4. GEN A PROTEIN <i>SUFU</i>	8
2.5. ONEMOCNĚNÍ S PORUCHOU HEDGEHOG SIGNÁLNÍ DRÁHY	9
2.5.1. Mutace v genu <i>PTCH1</i>	10
2.5.2. Mutace v genu <i>SUFU</i>	11
2.6. GORLINŮV SYNDROM	13
2.6.1. Klinická charakterizace <i>Gorlinova</i> syndromu.....	14
2.6.2. Diagnostika a prevence <i>Gorlinova</i> syndromu	17
2.6.3. Léčba <i>Gorlinova</i> syndromu	18
2.7. HOLOPROSENCEFALIE	18
2.7.1. Klinická charakterizace <i>holoprosencefalie</i>	19
2.7.2. Diagnostika a prevence <i>holoprosencefalie</i>	20
2.7.3. Léčba <i>holoprosencefalie</i>	20
2.8. GENETICKÉ PORADENSTVÍ	21
3. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE.....	23
4. MATERIÁL	24
4.1. SOUBOR PACIENTŮ	24
4.2. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	25
4.3. ROZTOKY.....	26
4.4. KOMERČNÍ PUFRY A ROZTOKY	26
4.5. KOMERČNÍ SOUPRAVY.....	27
4.6. STANDARDY MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ	28
4.7. POUŽITÉ PRIMERY (GENERI BIOTECH)	29
5. METODY.....	31
5.1. IZOLACE DNA	31
5.2. PCR AMPLIFIKACE GENU <i>SUFU</i> A <i>PTCH1</i>	33

5.2.1. Klasická polymerázová řetězová reakce	33
5.3. GELOVÁ ELEKTROFORÉZA.....	36
5.3.1. Příprava gelu pro elektroforézu (1,8% agaróza v 1xTBE pufri).....	36
5.3.2. Separace fragmentů	37
5.4. PURIFIKACE PCR PRODUKTU ROZTOKEM SURECLEAN PLUS (BIOLINE)	38
5.5. SEKVENACE DLE SANGERA	39
5.6. ETHANOLOVÁ PRECIPITACE (SRÁŽECÍ REAKCE).....	40
5.6.1. Vyhodnocení výsledků sekvenační analýzy.....	41
5.7. MLPA.....	42
5.7.1. Vyhodnocení výsledků MLPA metody.....	45
5.8. SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE (NGS)	45
5.8.1. Teoretický postup metody NGS	46
5.8.2. Vyhodnocení výsledků NGS metody.....	49
6. VÝSLEDKY	51
6.1. ZAVEDENÍ ANALÝZY JEDNOTLIVÝCH EXONŮ GENU <i>SUFU</i>	51
6.1.1. Navržení specifických primerů pro jednotlivé exony.....	51
6.1.2. Ověření PCR reakce.....	51
6.1.3. Výsledky PCR reakce	52
6.2. VÝSLEDKY ANALÝZY METODU MLPA.....	53
6.3. VÝSLEDKY SEKVENACE DNA	54
6.3.1. Výsledky molekulárně genetického vyšetření genu <i>SUFU</i>	54
6.3.2. Výsledky molekulárně genetického vyšetření genu <i>PTCH1</i>	55
6.3.3. Pacientka č. 1.....	56
6.3.4. Pacientka č. 2.....	58
7. DISKUZE.....	61
8. ZÁVĚR	63
9. LITERATURA.....	64
9.1. PUBLIKACE	64
9.2. INTERNETOVÉ ZDROJE	75

Seznam použitých zkratek

BCC	basal cell carcinoma	bazaliom
BCNS	basal cell nevus syndrome	syndrom basocelulárního névu, Gorlinův (Gorlinův Goltzův) syndrom
BOC	Brother of Cdo	
CDON	Cell adhesion molecule-related, downregulated by oncogenes	
Ci	Cubitus interruptus	
CK1	Casein kinase 1	kasein kináza 1
CNS	central nervous system	centrální nervová soustava
CNV	copy number variation	polymorfizmus počtu kopií segmentů DNA
Cos-2	kinesin-like protein Costal-2	kinezinu podobný protein Costal-2
DISP1	Dispatched 1	
DHH	Desert hedgehog	desert hedgehog, homolog hedgehog genu
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
FN		fakultní nemocnice
Fu	Fused	
GAS1	Growth Arrest-Specific Gene 1	
GLI	glioma-associated oncogene homolog	s gliomem asociovaný onkogenní homolog
GPC	Glypican	
GSK3	Glycogen synthase kinase 3	Glykogen syntáza kináza 3
HGMD	Human Gene Mutation Database	Databáze mutací lidských genů
HH	Hedgehog gene/protein	hedgehog gen/protein
HPE	holoprosencephaly	holoprosencefálie
IHH	Indian hedgehog	
Kif7	Kinesin family member 7	

LOH	loss of heterozygosity	ztráta heterozygosity
LRP2	Low density lipoprotein-related protein 2	Lipoproteinu s nízkou hustotou související protein 2
MIHF	middle interhemispheric holoprosencephaly form	střední interhemidférická holoprosencefalie
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification	
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Národní centrum pro biotechnologické informace
NBCCS	nevoid basal cell carcinoma syndrome	Gorlinův syndrom, syndrom basocelulárního névu
NCI	National Cancer Institute	Národní institut pro rakovinu
NGS	next generation sequencing	sekvenování nové generace
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PKA	Protein kinase A	proteinkináza A
PTCH1	protein Patched homolog 1	patched homologní protein 1
PTCH2	protein Patched homolog 2	patched homologní protein 2
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
Scube-2	signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 2	
SHH	sonic hedgehog	
SHHC	carboxy-terminal polypeptide SHH	C – koncová doména SHH
SHHN	amino-terminal polypeptide SHH	N – koncová doména SHH
SIX3	Sine oculis-related homeobox 6	
SMO	Smoothened protein	
SNP	single nucleotide polymorphisms	jednonukleotidový polymorfismus
SPOP	Speckle-type pox virus and zinc	

	finger protein	
Sry	Sex-determining region Y	oblast Y rozhodující o pohlaví
Su	Supresor of Fused	supresor proteinkinázy fused
SUFU	Supresor of fused gene	
TGIF1	Transforming growth-interacting factor	
ÚBLG		Ústav biologie a lékařské genetiky
ZIC2	Zinc fingers of the cerebellum	

1. Úvod

Hedgehog signální dráha patří mezi hlavní vývojové signální dráhy člověka a je důležitá hlavně při embryonálním vývoji. Účastní se řízení diferenciaci embryonálních buněk, segmentace těla, vývoje mozku, skeletu, svalstva, gastrointestinálního traktu, plic nebo udržování a regenerace tkání dospělého jedince. Dráha obsahuje více než 10 proteinů: receptorů, koreceptorů, ligandů, transkripčních efektorů a represorů zapojených do komplexních funkčních interakcí. Porucha hedgehog signalizace během embryonálního vývoje může vést k závažné vývojové vadě – holoprosencefalii. Mutace způsobující ztrátu funkce PTCH1 vedou ke Gorlinově syndromu – hereditární predispozici k basocelulárnímu karcinomu, asociovanému s anomáliemi mozku, lebky, obratlů a žeber. V posledních letech se ukazuje, že nesprávná signalizace Hedgehog signální dráhy je u 30 % lidských druhů rakoviny. Bylo zjištěno, že holoprosencefalie i Gorlinův syndrom jsou geneticky heterogenní, mohou být způsobeny zárodečnými mutacemi různých genů Hedgehog signální dráhy. Nelze přitom vyloučit, že obě onemocnění mohou být vzácně způsobena i mutacemi těch genů Hedgehog signální dráhy, u nichž tato příčinná souvislost dosud nebyla popsána. Naším cílem bylo s využitím klasických i moderních vysokokapacitních metod molekulární genetiky analyzovat u nemocných s Gorlinovým syndromem a s holoprosencefalií větší počet genů Hedgehog signální dráhy, získat nové poznatky o uvedených chorobách a zvýšit úspěšnost DNA diagnostiky.

2. Přehled problematiky – Hedgehog signální dráha a její onemocnění

2.1. Buněčná signalizace a signální dráhy

Buněčná signalizace koordinuje procesy v buňce. Tyto biochemické procesy popisují interakce buněk a následné uspořádání těchto interakcí do kaskád, které přenášejí a regulují informace z buněčných receptorů na buněčné efekторы (např. enzymy nebo transkripční faktory). Tyto kaskády tvoří signální dráhy buněk (Weng et al., 1999). Signální dráhy regulují buňku po celý její život – ovlivňují transport v buňce, činnost organel, imunitu buňky a podílí se i na smrti buňky apoptózou. Základním principem je přítomnost vnější nebo vnitřní události, která spustí lineární nebo rozvětvenou kaskádu. To vede k fosforylaci/defosforylaci specifických proteinů. V důsledku toho se vně nebo uvnitř buňky vytváří specifická odpověď na podnět, který celou kaskádu aktivoval (Brutkiewicz, 2016).

2.2. Hedgehog signální dráha

Hedgehog signální dráha (Obrázek 1) byla poprvé popsána v devadesátých letech (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980). Jedná se o klíčovou regulační dráhu zapojenou v embryonálním vývoji. Podílí se například na angiogenezi, morfogenezi srdce, osteogenezi, při vývoji svalů či nervové soustavy a mnoha dalších (Ingham et al., 2001). Pokud zůstane aktivní i v dospělosti, výsledná proliferace buněk se manifestuje jako rakovina (Villavicencio et al., 2000).

Primárním spouštěčem celé dráhy je protein Hedgehog (HH). U savců známe tři jeho homology – Desert hedgehog (DHH), Indian hedgehog (IHH) a Sonic hedgehog (SHH) (Echelard et al., 1993). DHH je exprimován v Sertoliho buňkách varlat a podporuje expresi Sry faktoru na chromozomu Y (Clark et al., 2000). Dále se podílí na tvorbě obalů periferního nervstva (Ingham et al., 2001). IHH je exprimován v endodermu embrya ve stádiu gastruly (Dyer et al., 2001) a uplatňuje se například při angiogenezi, hematopoéze nebo při tvorbě endochondrálního skeletu (Ingham et al., 2001). SHH je morfogen, který reguluje epiteliální a mezenchymální interakce. Při pokusech s myšimi modely bylo prokázáno, že deficiencie SHH je pro embryo buď letální nebo, v lepším případě, způsobí vývojové vady (Pola et al., 2001). Má nezastupitelnou

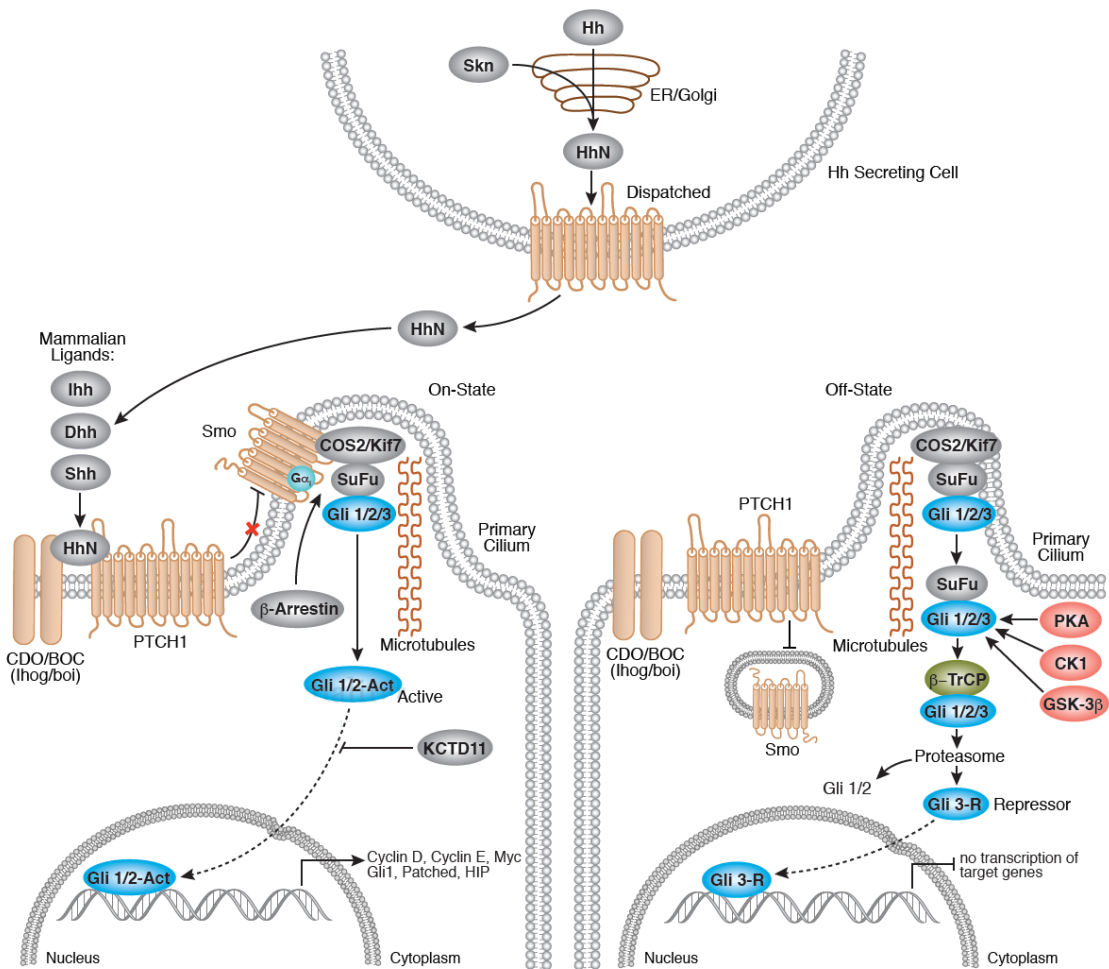
funkci při vývoji nervové soustavy a dorsoventrálního uspořádání nervové trubice, při anteroposteriorním rozmístění končetin nebo při vývoji svalových buněk. V neposlední řadě má vliv i na vnitřní orgány – například plíce, pankreas nebo srdce. Právě SHH je primárně popisován jako spouštěč Hedgehog signální dráhy (Ingham et al, 2001).

Hlavními složkami této signální dráhy jsou kromě SHH proteinu proteiny Patched1 (PTCH1), Smoothed (SMO), protein SUFU a transkripční regulátory GLI1/2/3. PTCH1 je protein, který se skládá z 12 transmembránových domén a SMO je protein, který se skládá ze 7 transmembránových domén (Sinha & Chen, 2006). Proteiny rodiny GLI mají 3 homology – GLI1, GLI2 a GLI3. GLI1 působí jako induktor a GLI3 jako represor. GLI2 může působit oběma směry v závislosti na posttranslačních a posttranskripčních procesech (McMillan et al., 2012). Protein PTCH1 má homologní protein PTCH2, který je z 57 % identický s PTCH1. Liší se od něj v hydrofilní oblasti mezi 6. a 7. transmembránovou doménou a navíc postrádá C-terminální doménu. Oba homologní proteiny mohou interagovat s proteiny HH signální dráhy a inhibovat SMO, ale je dokázáno, že v případě ztráty funkce PTCH1 nadměrná produkce PTCH2 nenahradí funkci PTCH1. Z toho lze vyvodit, že protein PTCH1 a PTCH2 mají odlišné funkce (Rahmana et al., 2004).

V inaktivované formě se PTCH1 nachází v buněčné membráně bez navázaného HH proteinu. V takovém případě inhibuje SMO, který leží v cytosolu většinou poblíž endozómu. SMO nacházející se mimo membránu umožňuje SUFU modulovat GLI na jeho represorovou formu, která se dostává do jádra, a zabraňuje expresi cílových genů. Při navázání HH proteinu na PTCH1 se dráha aktivuje. PTCH1 je inhibováno HH a už nemůže inhibovat SMO. Dochází k fosforylaci SMO a jeho přesunu do buněčné membrány. Tím je SMO potlačen a GLI protein je aktivován. Tyto indukované formy prochází jadernou membránou do jádra a vyvolají expresi cílových genů (McMillan et al., 2012).

Kromě výše popsané kanonické aktivace je možná i nekanonická aktivace SHH signální dráhy. Zatímco kanonická aktivace začíná, když se Sonic hedgehog protein naváže na transmembránový protein PTCH1, u nekanonické aktivace dojde k aktivaci GLI i bez zapojení PTCH1 a dalších komponent (Pietrobono et al., 2019). V posledních letech

se ukazuje, že nesprávná signalizace Hedgehog signální dráhy je u 30 % lidských druhů rakoviny (Gonnissen et al., 2015).



Obrázek 1. Hedgehog signální dráha. Všechny HH ligandy jsou syntetizovány

jako prekurzory, které podléhají autokatalýze a následné modifikaci. Modifikované HH ligandy jsou uvolněny z buněčného povrchu díky proteinu DISP a Scube2. Následně jsou transportovány prostřednictvím interakcí s LRP2 a GPC proteiny. HH proteiny iniciují signalizaci vazbou na receptor PTCH1 a na koreceptory GAS1, CDON a BOC. Vazba HH na PTCH1 vede k inhibici proteinu SMO díky jeho fosforylaci. SMO zprostředkovává přenos signálu přes GLI, Kif7 a SUFU proteiny. Aktivovaný protein GLI prochází jadernou membránou a spouští transkripci cílových genů (URL1).

2.2.1. Shh protein a jeho transport

Syntetizovaný protein SHH ~45kDa má na N-konci signální sekvenci, která je důležitá pro první krok sekrece – vstupu do endoplasmatického retikula buňky.

Jakmile je translokace do endoplasmatického retikula dokončena, signální doména je peptidázou odštěpena (Bumcrot et al., 1995). Následuje autoproteolýza SHH, kterou katalyzuje C–koncová doména SHH (SHHC ~25kDa). Dochází k oddělení samotné SHHC domény od N–koncové domény (SHHN ~20kDa) a zároveň dojde k přidání palmitátu na N–konec SHHN (Aikin et al., 2012). Následně dojde k navázání molekuly cholesterolu na C–konec SHHN. Cholesterol je důležitý pro transport SHH, díky němu se SHH může navázat na PTCH1 (McMahon, 2000). Při přiblížení jiné buňky s membránovým proteinem PTCH1 se SHH váže na jeho extracelulární domény, díky vazebnému místu SHH a helikální doméně PTCH1 citlivé na sterol (Kowatsch, 2019).

2.2.2. Komplex SUFU a GLI

SUFU se v Hedgehog signální dráze uplatňuje ve formě komplexu, který tvoří následující komponenty: serin-threonin kináza Fused (Fu), Supresor of Fused (Su), Cubitus interruptus (Ci) a GLI protein (Grimm et al., 2001). SUFU reguluje Ci protein. Ci protein tvoří kanál mezi cytoplasmou a jádrem buňky (Ågren et al., 2004). Zbylé dvě komponenty jsou kinezinu podobný protein Costal-2 (Cos-2) a GLI. Byly detekovány další dvě izoformy SUFU, ty ale ztratily schopnost interakce s GLI. Jejich funkce není specifikována, ale autoři se domnívají, že tyto izoformy by mohly mít funkci jiného regulačního mechanismu Hedgehog signální dráhy (Grimm et al., 2001).

Fu je proteinkináza, která v aktivní formě napomáhá při expresi HH genů v embryu a také má protinádorové účinky (Monnier *et al.*, 1998). Cos-2 je protein, který váže SMO a GLI k sobě. Pokud se na PTCH1 naváže HH, vyvolá to zvýšenou koncentraci komplexu SMO/Cos-2 a změnu jeho polohy (Kalderon, 2004). Geny *GLI1/2/3* se transkribují na proteiny, které všechny patří do jedné proteinové rodiny. Všechny kódují transkripční faktory, kdy každý z nich má pět zinkových prstů a mezi nimi konsenzuální sekvenci histidin-cystein. Ty jim umožní vázat se na nukleovou kyselinu a tím regulovat její transkripci. Protein GLI1 rozeznává stejně jako GLI3 konkrétní sekvenci v promotoru cílového genu (GACCACCCA). Zatímco GLI2 se váže na téměř identickou sekvenci (GAACCACCCA) (Villavicencio et al., 2000).

2.2.3. Exprese genů Hedgehog signální dráhy

Podle dostupných údajů o tkáňové expresi genů Hedgehog signální dráhy je *PTCH1* exprimován ve 26/27 studovaných tkáních lidského těla, a to zejména v endometriu a u mužů ve varlatech. Gen *SUFU* je exprimován ve všech 27 tkáních. Největší hladiny exprese *SUFU* jsou v kůži a u žen ve vaječnicích. Ostatní proteiny účastníci se Hedgehog signální dráhy se exprimují většinou v menším počtu tkání, a to: SHH ve 12 tkáních z toho nejvíce v žaludku, SMO ve 26 tkáních z toho nejvíce u žen v endometriu a u mužů v kůži, GLI1 v 17 tkáních z toho nejvíce v endometriu žen a varlatech mužů, GLI2 ve 21 tkáních z toho nejvíce v vaječnicích žen a mužům ve žlučníku, a nakonec GLI3 ve 24 tkáních z toho nejvíce v endometriu žen a u mužů v kůži (URL5).

2.2.4. Další proteiny Hedgehog signální dráhy

Během Hedgehog signální dráhy se uplatňují i další proteiny kromě výše zmíněných. Aby se protein SHH s navázaným cholesterolem mohl uvolnit z buněčné membrány a aktivovat PTCH1 v membráně jiné buňky, je nutný protein Dispatched 1 (DISP1). Jedná se o membránou dvanáctkrát procházející transmembránový protein, který je schopný zadržet nemodifikovaný SHH a naopak uvolnit SHH modifikovaný cholesterolem (Burke et al., 1999). K uvolnění a transportu modifikovaného SHH přes extracelulární matrix pomáhá i protein Scube2 (Johnson et al., 2012; Wang et al., 2007).

K navázání SHH na protein PTCH1 potřebuje SHH pomocný faktor, jedním z nich je protein LRP2 (Christ et al., 2016). Další pomocné faktory napomáhající vazbě SHH na PTCH1 jsou proteiny z rodiny GPC 1-6. Ty se nacházejí na membráně buňky a buď přímo interagují s PTCH1 nebo vazbě s SHH pomáhají nepřímo. Zároveň regulují množství SHH, které se může navázat na PTCH1 (Filmus & Capurro, 2014).

Kromě proteinu PTCH1 se SHH váže ještě na další proteiny v membráně, které jsou potřebné pro aktivaci Hedgehog signální dráhy. U obratlovců se jedná o proteiny GAS1, CDON a BOC. Tyto koreceptory působí spolu s PTCH1 ke správné aktivaci Hedgehog signální dráhy (Lee et al., 2016).

Dalším pomocným faktorem podporujícím regulaci Hedgehog signální dráhy je protein Kif7. Protein Kif7 je spolu s již zmíněným proteinem Cos-2 lokalizován na primárním ciliu, které slouží jako pomyslná anténa pro zachycení okolních signálů. Kif7 a Cos-2 společně ovlivňují protein SMO a tím se podílí na transportu GLI proteinů (Lee et al., 2016). Na spojení proteinu SMO a kanálu v jaderné membráně tvořené proteinem Ci se podílí vedle proteinů Cos-2, Kif7 a SUFU ještě serin/threonin kinázy – PKA, GSK3 a CK1 (Chen & Jiang, 2013).

Pomocný faktor, který způsobuje degradaci komplexu proteinů Ci a GLI a tím záporně reguluje Hedgehog signální dráhu, je protein SPOP (Zhang et al., 2009).

2.3. Gen a protein PTCH1

Gen *PTCH1*, který kóduje protein PTCH1, se nachází na chromozomu 9 v oblasti 9q22.3-31 (Obrázek 2) (Kimonis et al., 1997). Gen se skládá z 24 exonů a 23 intronů. Iničiační kodon leží v exonu 1 a terminační kodon v exonu 24 (URL5).

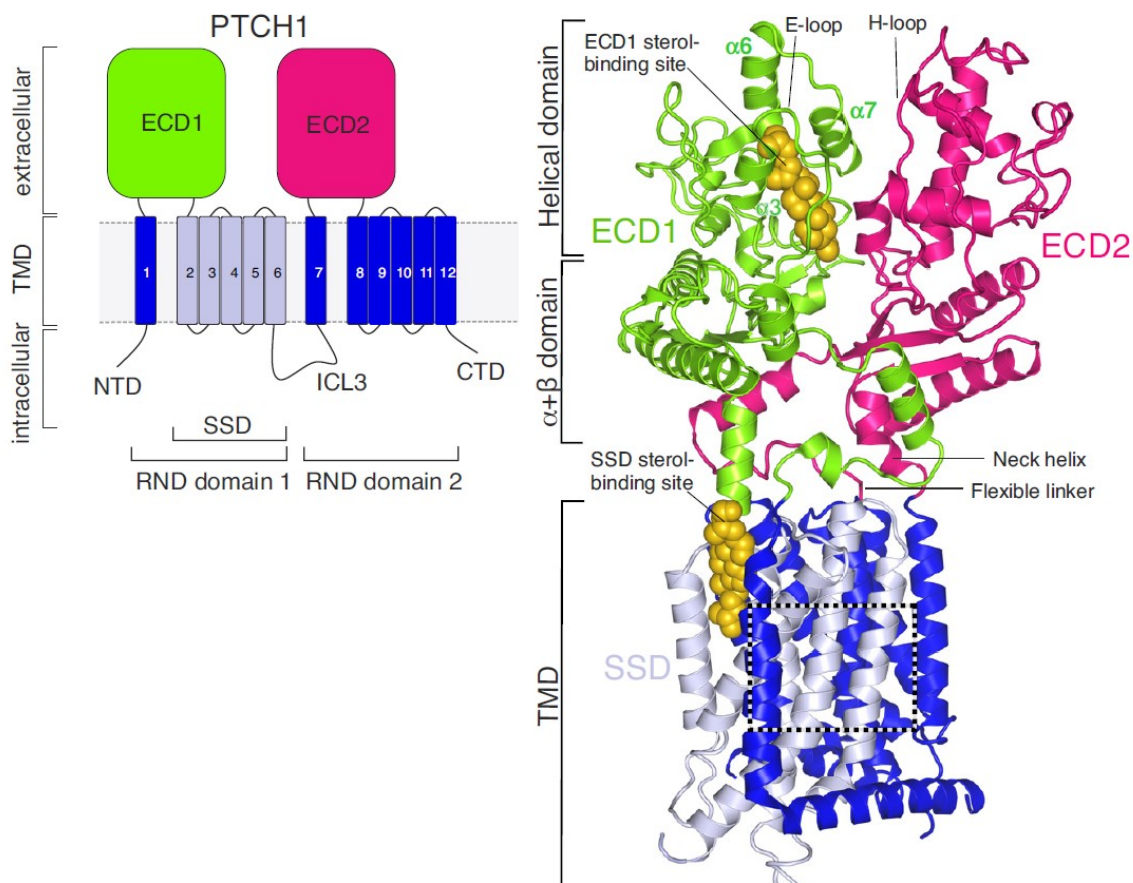


Obrázek 2. Schéma genu *PTCH1*. Gen se skládá z 24 exonů a 23 intronů. Červeně je vyznačen transkript NM_000264.4 (URL5).

Gen *PTCH1* je transkripčně regulován třemi promotory, které vytváří transkripty s alternativními prvními exony. Všechny tři výsledné proteiny dokáží interagovat s SMO, ale pouze jeden z nich dokáže SMO plně inhibovat (Kogerman et al., 2002).

Protein PTCH1 (Obrázek 3) je transmembránový protein, složený z 1447 aminokyselin. Skládá se z 12 transmembránových domén, dvou extracelulárních domén a dvou intracelulárních domén. První extracelulární doména leží mezi transmembránovými doménami 1 a 2 a druhá extracelulární doména mezi transmembránovými doménami 7 a 8. Distální části extracelulárních domén se vážou na protein SHH. C-konec i N-konec proteinu PTCH1 leží v intracelulárním prostoru (Kowatsch et al., 2019).

Protein PTCH1 funguje v Hedgehog signální dráze jako její negativní regulátor tak, že inhibuje protein SMO (Ågren et al., 2004). Funkce proteinu PTCH1 je podrobně popsána v kapitole kapitola 2.2 Hedgehog signální dráha.

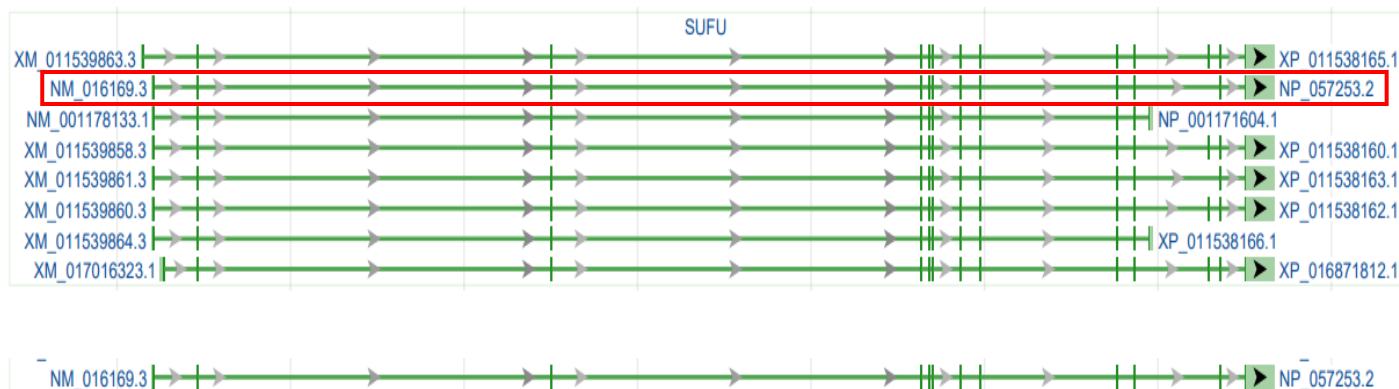


Obrázek 3. Protein PTCH1. ECD1 (zelená) a ECD2 (růžová) jsou extracelulární domény. NTD a CTD jsou intracelulární domény. Modře a světle modře jsou znázorněny transmembránové domény. Žlutě jsou znázorněny domény vážící sterol (Kowatsch et al., 2019)

2.4. Gen a protein SUFU

Gen *SUFU* je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 10 v oblasti 10q24.32 (Obrázek 4) (Tostar et al., 2006). Kóduje protein složený z 481 aminokyselin (Koch et al., 2004). Poprvé byl popsán u rodu *Drosophila* jako supresor serin/threonin kinázy a regulátor Hedgehog signální dráhy (Pham et al., 1995). Transkript (NM_016169.3) se skládá z 12 exonů a 11 intronů. Iničiační kodon se nachází v prvním exonu a terminační kodon ve dvanáctém exonu. Existuje ještě další transkript (NM_001178133.1),

jenž má navíc jeden exon, který se nachází za exonem 10 a kóduje jen jednu aminokyselinu (URL5).



Obrázek 4. Schéma genu *SUFU*. Gen se skládá z 12 exonů a 11 intronů. Červeně je vyznačen transkript NM_016169.3. Na obrázku je svislou čárkou vyznačeno 12 exonů. Některé z dalších transkriptů obsahují navíc jeden exon, který kóduje jen jednu aminokyselinu a nebyly v něm dosud popsány žádné patogenní varianty (URL5).

Protein SUFU (~53kDa) je supresor serin/threonin kinázy (Pham et al., 1995). SUFU je represor transkripčních faktorů GLI a Ci Hedgehog signální dráhy. Funguje tak, že se váže na tyto proteiny a brání jejich translokaci do jádra. C–terminální doména proteinu SUFU se váže na N–terminální doménu GLI/Ci, zatímco N–terminální doména proteinu SUFU se váže na C–terminální doménu GLI/Ci (Merchant et al., 2004).

2.5. Onemocnění s poruchou Hedgehog signální dráhy

Proteiny účastnící se Hedgehog signální dráhy jsou důležité signální proteiny, které jsou zahrnuty do mnoha vývojových procesů. Mutace v genech kódující proteiny Hedgehog signální dráhy může zavinit letální vrozenou vývojovou vadu plodu, dědičné onemocnění anebo způsobí vznik rakoviny u postiženého jedince. Mezi vady a onemocnění způsobená takovými mutacemi patří například Gorlinův syndrom, holoprosencefalie, medulloblastom nebo postaxiální polydaktylie (Goodrich et al., 1998; Wang et al., 2000).

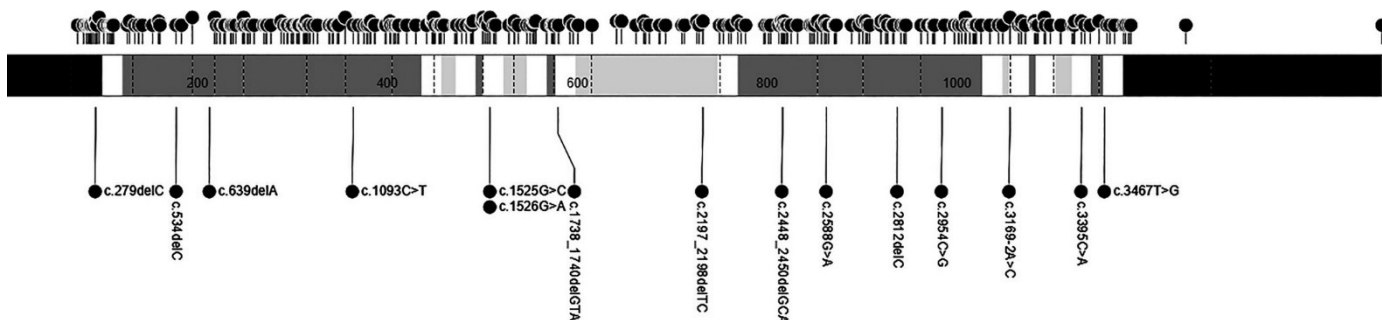
Mezi mutacemi zasažené geny z Hedgehog signální dráhy patří geny *SHH*, *PTCH1*, *SMO* a *GLI3*. Mutace v jednotlivých genech se mohou projevit různým onemocněním (Tabulka 1.) (Ming et al., 1998).

Tabulka 1. Mutované geny Hedgehog signální dráhy a onemocnění způsobená mutací těchto genů (převzato z Ming et al., 1998; doplněno z Ming et al., 2002 a Evans et al., 2017).

Gen Hedgehog signální dráhy	Způsobené onemocnění	Klinické projevy
<i>SHH</i>	holoprosencefalie	Nerovnoměrné oddělení hemisfér mozku, kyklopie
	nádor	BCC, meduloblastom, karcinom prsu
<i>PTCH1</i>	NBCCS	BCC, palmární/plantární jamky, keratocysty, skeletální anomálie
	nádor	BCC, meduloblastom, trichoepitheliom, karcinom prsu, meningeom, karcinom jícnu
	holoprosencefalie	absence <i>corpus calosum</i> , rozštěp rtu a patra, hypotelorismus
<i>SMO</i>	nádor	BCC
<i>SUFU</i>	NBCCS	BCC, meduloblastom, fibromy vaječníků
<i>GLI3</i>	Greigova cefalopolysyndaktylie	polydaktylie, syndaktylie, hypertelorismus
	Pallister-Hallův syndrom	Hamartom hypothalamu, polydaktylie, anální anomálie
	polydaktylie	postaxiální polydaktylie

2.5.1. Mutace v genu *PTCH1*

Heterozygotní zárodečné mutace v genu *PTCH1* mohou mít za následek onemocnění pacienta Gorlinovým syndromem nebo holoprosencefalií. Poprvé byly mutace v genu *PTCH1* popsány v roce 1996 dvěma studiemi (Hahn et al., 1996; Johnson et al., 1996). Od té doby bylo popsáno mnoho dalších mutací. Většina z nich způsobí frameshift, nebo se jedná o nonsense mutace, které ve výsledku zkracují výsledný protein (Boutet et al., 2003). Podle databáze HGMD bylo popsáno v genu *PTCH1* 91 missense/nonsense mutací, 27 sestřihových mutací, 107 delecí, 58 insercí, 10 mutací indel a 3 komplexní přestavby (URL6). Aktualizovaná data o dosud zjištěných mutacích genu *PTCH1* publikovali Reinders a Gianferante (Reinders et al., 2018; Gianferante et al., 2018). Mutace v genu *PTCH1* u holoprosencefalie popsal jako první Ming a spoluautoři (Ming et al., 2002). Přehled patogenních variant v genu *PTCH1* je zobrazen na obrázku č. 5.



Obrázek 5. Přehled mutací v genu *PTCH1* podle NCI a HGMD databází.

Mutace nad genem jsou z databáze HGMD; mutace pod genem jsou z NCI. Jedná se o transkript NM_000264.3. Tečkovaná čára znázorňuje hranice exonů, odstíny šedé a bílé představují *PTCH1* proteinové domény (Gianferante et al., 2018).

2.5.2. Mutace v genu *SUFU*

Heterozygotní zárodečné mutace genu *SUFU* (Tabulka 2.) jsou vzácnější příčinou Gorlinova syndromu (Kijima et al., 2012; Smith et al., 2014). Mutace v genu *SUFU* jsou spojeny s vysokým rizikem meduloblastomu. Ve francouzské studii bylo popsáno osm nových mutací, které způsobují meduloblastom u dětí do 3 let. Jednalo se o sedm bodových mutací a jednu rozsáhlou duplikaci v exonu 3 (Brugières et al., 2012).

V poslední publikované studii, která zároveň poskytuje i přehled dosud publikovaných patogenních mutací v genu *SUFU*, bylo prokázáno, že tyto mutace jsou predispoziční pro meduloblastom v prvních letech života pacienta (riziko až 30 %). Časný vznik meduloblastomu (medián 2 roky) u nosičů zárodečné mutace genu *SUFU* potvrdila i rozsáhlá mezinárodní multicentrická studie genetických predispozic k meduloblastomu (Waszak et al., 2018).

Tabulka 2. Seznam patogenních germinálních mutací v genu *SUFU* (Guerrini-Rousseau et al., 2018).

Označení mutace	Typ mutace	Proteinový zápis	Klinické projevy	Citace
c.182+3A>T	sestřihová	p.(?)	kožní névy, makrocefalie, syndaktýlie, meduloblastom	(Brugières et al., 2012)
c.71del	frameshift	p.Pro24Argfs*72	keratocysty, zubní ageneze, palmární/plantární jamky,	(Brugières et al., 2009)

			makrocefalie, meduloblastom	
c.1297-1G>C	sestřihová	p.(?)	kožní névy, makrocefalie, meduloblastom	(Brugières et al., 2012)
c.294_295dup	frameshift	p-Tyr99Serfs*23	kalcifikace <i>falx cerebri</i> , BCC, kožní névy, makrocefalie, meduloblastom	(Brugières et al., 2012)
c.318-10del	frameshift	p.(?)	keratocysta/y, makrocefalie, hypertelorismus, meduloblastom	(Brugières et al., 2012)
c.318-?_454+?dup	duplikace exonu 3	p.(?)	makrocefalie, meduloblastom	(Brugières et al., 2012)
c.567_571delinsT	frameshift	p.Gln189Hisfs*5	makrocefalie, meduloblastom	(Guerrini-Rousseau et al., 2018)
c.1149_1150dup	frameshift	p.Cys384Serfs*3	Makrocefalie, meduloblastom	(Brugières et al., 2012)
c.422T>G	missense	p.Met141Arg	makrocefalie, hypertelorismus, meduloblastom	(Brugières et al., 2012)
c.1023-?_1455+?del	delece exonu 9-12	p.(?)	kalcifikace <i>falx cerebri</i> , makrocefalie, hypertelorismus, meduloblastom	(Guerrini-Rousseau et al., 2018)
c.71dup	frameshift	p.Ala25Glyfs*23	kalcifikace <i>falx cerebri</i> , kožní névy, makrocefalie, meduloblastom	(Brugières et al., 2009)
c.1096_1117delinsG AA	frameshift	p.Leu366Glufs*14	makrocefalie, meduloblastom	(Guerrini-Rousseau et al., 2018)
c.1123C>T	nonsense	p.Gln375*	kalcifikace <i>falx cerebri</i> , zubní ageneze, meduloblastom	(Brugières et al., 2012)
c.1022+1G>A	sestřihová	p.(?)	makrocefalie, meduloblastom	(Pastorino et al., 2009)
c.318-?_1455+?del	rozsáhlá delece	p.(?)	makrocefalie, meduloblastom	(Smith et al., 2014)

delece exonů 3-12				
c.1022+1G>A	sestřihová	p.(?)	meduloblastom, hypertelorismus, vystupující čelo	(Taylor et al., 2002)
c.143dupA	frameshift	p.Pro49Alafs*24)	meduloblastom, meningiom	(Taylor et al., 2002)
c.183-1A>T	sestřihová	p.(?)	meduloblastom	(Taylor et al., 2002)
c.846dupC	frameshift	p.(Glu283Argfs*3)	meduloblastom	(Slade et al., 2010)
c.544G>T	missense	p.(Asp182Tyr)	kalcifikace <i>falx cerebri</i> , meduloblastom, BCC, meningeom	(Smith et al., 2014)
c.550C>T	nonsense	p.(Gln184*)	kalcifikace <i>falx cerebri</i> , meduloblastom, BCC	(Smith et al., 2014)

2.6. Gorlinův syndrom

Gorlinův syndrom (MIM 109400), také uváděný pod zkratkami NBCCS (Nevoid basal cell carcinoma syndrome), a BCNS (Basal cell nevus syndrome) nebo i pod méně častým názvem Gorlin-Goltzův syndrom, je geneticky podmíněné onemocnění spojené s nádorovou predispozicí a anatomickými odchylkami. Poprvé byl popsán v roce 1960 Robertem J. Gorlinem a Robertem W. Goltzem (Gorlin & Goltz, 1960). Znamky Gorlinova syndromu byly nalezeny i na mumiích starých 1000 let před naším letopočtem, z dob starého Egypta (Muzio, 2008). Gorlinův syndrom je autosomálně dominantní multisystémová porucha s téměř úplnou penetrancí a variabilní expresivitou. U každého pacienta se onemocnění manifestuje různými projevy (Evans et al., 1993).

Výskyt Gorlinova syndromu v populaci je pro každou zemi jiný, například ve Velké Británii je uváděno jako 1:19 000 (Evans et al., 2010), oproti tomu v Itálii jako 1:256 000 (Acocella et al., 2009). Obecně se tedy uvádí prevalence 1:50 000 – 100 000 a u pacientů s bazocelulárními karcinomy 1:200 (Plevová et al., 2009).

NBCCS je způsoben mutacemi v genech *PTCH1* a *SUFU*. Oba geny jsou součástí Hedgehog signální dráhy (Foulkes et al., 2017). 85 % všech mutací způsobujících onemocnění se nachází v genu *PTCH1* (Huq et al., 2018). U pacientů, kteří mají mutaci v genu *SUFU* je prokázáno vyšší riziko medulloblastomu, a to až 33 %. Oproti tomu

pacienti s mutací v genu *PTCH1* mají riziko meduloblastomu jen 2 %. Rozdíl v klinickém projevu způsobeným typem mutace je i to, že u pacientů s mutací genu *SUFU* nebyl dodnes zaznamenán případ, u kterého by byla diagnostikována odontogenní keratocysta, zatímco pacienti s mutací v genu *PTCH1* mají odontogenní keratocystu v 90 % případů (Evans et al., 2017; Smith et al., 2014).

V posledních letech se objevují publikace prokazující, že Gorlinův syndrom může být zapříčiněn i mutací v genu *PTCH2*. Mutace v genu *PTCH2* způsobující Gorlinův syndrom nejsou zatím příliš prostudovány. Dosud byly publikovány jen dvě různé mutace v genu *PTCH2*: c.1172_1173delCT p.(Ser391*) a c.2156G>A p.(Arg719Gln). Pacientka s mutací c.1172_1173delCT p.(Ser391*) trpí mnohočetnými keratocystami a anomáliemi žeber. Tato mutace podle dostupných zdrojů nebyla nalezena u jiného pacienta. Pacienti s mutací c.2156G>A p.(Arg719Gln), která byla nalezena u 6 pacientů z jedné rodiny, mají všichni palmární jamky, jeden má navíc mnohočetné BCC, jeden má navíc mnohočetné odontogenní keratocysty a jeden bifidní žebra. Autoři se domnívají, že mutace *PTCH2* způsobují lehčí fenotypové projevy než mutace *PTCH1* (Smyth et al., 1999, Fan et al., 2008; Fujii et al., 2013).

2.6.1. Klinická charakterizace Gorlinova syndromu

Gorlinův syndrom se projevuje několika fenotypovými projevy. Mezi nejčastější patří mnohočetné bazaliomy (BCC), odontogenní keratocysty, palmární a plantární jamky, lamelární kalcifikace *falx cerebri*, anomálie žeber a obratlů, fibromy vaječníků, makrocefalie nebo meduloblastomy (Evans et al., 1993; Kimonis et al., 2013).

Klinické příznaky jsou od roku 1993 děleny do dvou skupin – majoritní a minoritní (Tabulka 3.) (Evans et al., 1993). Pro klinickou diagnózu Gorlinova syndromu musí pacient splňovat dvě majoritní anebo jedno majoritní a dvě minoritní kritéria. Mezi majoritní kritéria patří příbuzný prvního stupně postižený Gorlinovým syndromem, mnohočetné BCC, odontogenní keratocysty, palmární a plantární jamky, lamelární kalcifikace *falx cerebri*, skeletární anomálie žeber a meduloblastomy. Frekvence majoritních kritérií u různých populací viz. Tabulka 4. Minoritní kritéria zahrnují obratlové anomálie, *brachymetacarpia* alespoň na jedné ruce, hypertelorismus, fibromy vaječníků a *telecanthus* (Evans et al., 1993; Kimonis et al., 1997; Muzio, 2008). BCC se u pacientů

s Gorlinovým syndromem vyskytují ve větším počtu a v nižším věku než sporadické BCC (Klein et al., 2005).

Studie popisující klinické příznaky Gorlina syndromu na nejpočetnějším souboru publikovala Kimonis (Kimonis et al., 1997). Studie zahrnovala 105 pacientů různých věkových skupin i etnických příslušností. U 79 % pacientů byl diagnostikován alespoň jeden BCC do 22 let. Odontogenní keratocysty se objevily u 74 % pacientů, přičemž první z nich se v 80 % objevila do 20 let věku. Palmární nebo plantární jamky byly pozorovány u 87 % pacientů a nádory vaječníků u 17 %. Meduloblastomem trpěli 4 pacienti v průměrném věku 2,3 roku. K tomu se další 3 pacienti narodili s rozštěpem rtu nebo patra. Mezi nálezy na těle pacientů patřily obličejové deformace (54 %), makrocefalie (50 %), hypertelorismus (42 %), vystouplé čelo (27 %), deformita hrudníku (13 %) nebo Sprengelova deformita lopatky (11 %). Dále byly zařazeny i radiologické nálezy jako kalcifikace *falx cerebri* (65 %), kalcifikace *tentorium cerebelli* (20 %), přemostění *sella turcica* (68 %) nebo bifidní žebra (26 %) (Kimonis et al., 1997).

Radiologickými nálezy se zabývala i další studie. Ta pracovala s menším souborem pacientů, konkrétně s 82 pacienty. Kalcifikace *falx cerebri* se objevila u 65 % pacientů, kde se frekvence této kalcifikace lišila v závislosti na věku pacienta. Nejvíce se tento příznak objevoval u pacientů mezi 20-40 lety (77 %) a u pacientů starších 40 let (79 %). Bifidní žebra byla pozorována u 26 % pacientů. Nejčastěji postižená žebra byla třetí, čtvrtá a pátá. Pozorované byly i změny páteře – bifidní rozštěp *processus spinosus* krční páteře (94 %) nebo anomálie kostí dolní a horní končetiny (Kimonis et al., 2004).

Tabulka 3. Přehled základních majoritních a minoritních kritérií pro diagnostiku Gorlina syndromu (Evans et al., 1993; Kimonis et al., 1997; Muzio, 2008).

Majoritní kritéria	postižený příbuzný prvního stupně
	mnohočetné BCC nebo jeden BCC do věku 20 let
	odontogenní keratocysty
	3 a více palmárních/plantárních jamek
	lamelární kalcifikace <i>falx cerebri</i>
	skeletální anomálie žeber
Minoritní kritéria	makrocefalie adjustovaná na výšku
	vrozená malformace: rozštěp rtu nebo patra, fronální bossing, hypertelorismus
	ostatní skeletální abnormality: Sprengelova deformita, deformita hrudníku, syndaktylie
	radiologické abnormality: přemostění <i>sella turcica</i> , vertebrální anomálie
	fibromy vaječníků
	Meduloblastom

Tabulka 4. Nejčastější majoritní klinická kritéria Gorlina syndromu a srovnání jejich frekvence u postižených pacientů podle různých studií (Muzio, 2008).

Klinické kritérium	Studie z Velké Británie (%) (Evans et al., 1993)	Studie z Austrálie (%) (Shanley et al., 1994)	Studie z USA (%) (Kimonis et al., 1997)	Studie z Itálie (%) (Muzio et al., 1999)	Studie z Koreje (%) (Ahn et al., 2004)	Studie z Francie (%) (Pruvost-Balland et al., 2006)
Počet pacientů ve studii	84 os	118 os	105 os	37 os	33 os	22 os
BCC	47	76	80	30	15	100
ve věku pod 20	73	85	91	17	-	-
ve věku pod 40	90	95	97	75	-	-
Odontogenní keratocysty	66	75	74	92	90,9	62
Palmární/plantární jamky	71	80	87	35	66,7	45
Kalcifikace <i>falx cerebri</i>	neuveдено	92	65	70	21,2	66

2.6.2. Diagnostika a prevence Gorlinova syndromu

Pacienti s podezřením na Gorlinův syndrom jsou diagnostikováni na základě klinických nálezů (viz kapitola 2.6.1 Klinická charakterizace Gorlinova syndromu). Prokázání správnosti diagnózy probíhá molekulárně genetickými metodami. Tyto metody se také využívají při plánování těhotenství u pacientky s podezřením na Gorlinův syndrom nebo při prenatální a preimplantační diagnostice (John & Schwartz, 2015).

V rodinách s diagnózou BCNC by lékař měl vyšetřovat novorozence na prognatismus mandibuly, rozštěp rtu nebo patra, abnormality žeber, makrocefálii, abnormality prstů, např. polydaktylii, kalcifikaci *falx cerebri* a na medulloblastomy. I když se jedná o nespecifické příznaky, jejich přítomnost je podnětem pro genetické vyšetření novorozence (John & Schwartz, 2016).

Podle aktuálních doporučení by vzhledem k vysokému riziku medulloblastomu děti s mutací genu *SUFU* měly podstoupit magnetickou rezonanci mozku každé 4 měsíce do věku 3 let, poté každých 6 měsíců do věku 5 let. Děti s mutací genu *PTCH1* mají riziko medulloblastomu výrazně nižší, přibližně 2 %, a jejich časté vyšetřování magnetickou rezonancí je pokládáno za neopodstatněné. Naopak rentgen čelistí kvůli odontogenním cystám je doporučen u dětí s mutací *PTCH1* genu od 8 let každých 12-18 měsíců, ale není nutný u dětí s mutací genu *SUFU*. Dále se doporučuje u obou skupin dětí častější dermatologické vyšetření kvůli BCC od 10 let (John & Schwartz, 2016; Foulkes et al., 2017; Evans et al., 2018).

Pro správnou péči o nemocného s Gorlinovým syndromem je důležité včasné zachycení Gorlinova syndromu. Pacienti by se měli preventivně chránit před UV zářením. Měli by se vyhýbat slunečnímu záření a používat účinné opalovací krémy. Oblast očí je nejvíce náchylná pro tvorbu bazaliomů, proto jsou doporučeny ochranné brýle (Muzio, 2008). Důležitá je i ochrana proti rentgenovému záření. Pacient by se mu s výjimkou preventivních prohlídek neměl vůbec vystavovat (Klein et al., 2005). Pacientovi a jeho příbuzným by měla být poskytnuta genetická konzultace. U těhotných žen s rizikem Gorlinova syndromu u plodu je možné provést prenatální vyšetření plodu, je-li známa kauzální mutace v rodině (John & Schwartz, 2015).

2.6.3. Léčba Gorlinova syndromu

Doposud neexistuje komplexní léčba Gorlinova syndromu. Konkrétní příznaky pacientů jsou léčeny jednotlivě. Odontogenní keratocysty a BCC jsou chirurgicky odstraněny (Muzio, 2008).

V posledních deseti letech se k léčbě BCC používají inhibitory proteinu SMO. Od roku 2009 se používá inhibitor GDC0449, který vykazuje 55% míru odpovědi (Von Hoff *et al.*, 2009). Podává se pacientům orálně a ukázalo se, že dokonce ulevuje pacientům s meduloblastomem. Dalším používaným inhibitorem Smo, vyvinutým v roce 2011, je LDE225. Pacientům je podáván ve formě krému a má 92% úspěšnost (Skvara *et al.*, 2011). Dalším způsobem, jak léčit BCC, je za použití δ -aminolevulové kyseliny a následným ozářením modrým světlem (417 nm). Při této léčbě dochází u 89 % pacientů k úplné klinické odpovědi. Její velkou výhodou je to, že nezanechává na kůži pacienta na první pohled patrné jizvy (Itkin *et al.*, 2004).

U některých případů lze použít laserovou nebo fotodynamickou terapii či lokální chemoterapii. U fotodynamické léčby je prokázáno, že funguje jako dočasná léčba BCC. Recidiva nastala u pozorovaných pacientů až po 2 letech (Mougel *et al.*, 2009; Pauwels *et al.*, 2010; Wolfe *et al.*, 2013). U BCC v oblasti krku, trupu nebo končetin se v praxi přistupuje k elektrodesikaci s následnou kyretáží. Ta slibuje 92-93% šanci na úplné zotavení (Muzio, 2008).

Meduloblastom lze léčit pouze chemoterapií, radioterapií nebo radikální resekcí. Radioterapie ale způsobuje u pacientů BCC nebo intrakraniální tumory. Měla by být uvážena, a to zejména u pacientů, u kterých dochází k relapsům bazaliomů (Muzio, 2008).

2.7. Holoprosencefalie

Holoprosencefalie (HPE; MIM 236100, MIM 157170, MIM 142945, MIM 142946, MIM 610829 aj.), je vývojová vada charakterizovaná neúplným rozštěpením předního mozku na pravou a levou hemisféru během embryogeneze, způsobená genetickou mutací v Hedgehog signální dráze (Bale, 2002; Dubourg *et al.*, 2007). Existují tři základní popsané formy tohoto onemocnění – první je lobární HPE, kdy jsou hemisféry rozděleny, ale s mírnou kontinuitou v čelním kortexu; druhá je semilobární HPE s částečným

oddělením hemisfér a třetí a nejzávažnější forma je alobární HPE, kdy má pacient pouze jednu mozkovou komoru. Jako další mírnější formy holoprosencefalie jsou popsány formy MIHF – střední interhemisférická holoprosencefalie (*middle interhemispheric holoprosencephaly form*) (Dubourg et al., 2007) a septooptická HPE, kdy hemisféry nejsou rozděleny jen v septálních a preoptických oblastech mozku (Hahn et al., 2010).

Prevalence onemocnění je 1:10 000 (Summers et al., 2018). Onemocnění je ve většině případů způsobeno teratogeny, jako například cukrovka matky (Barr et al., 1983; Pallangyo et al., 2016; Hamza & Higgins, 2017) nebo alkohol (Cohen, 2006; Hong & Krauss, 2017). V literatuře lze najít i zmínky o holoprosencefalii u dítěte matky s hypocholesterolemií (Edison & Muenke, 2003). Pouze 15–20 % případů nesyndromových HPE je zapříčiněno geneticky. Známe tři způsoby dědičnosti HPE – autozomálně dominantní s neúplnou penetrancí, autozomálně recesivní a X-vázanou. Mezi geny, jejichž mutace způsobující HPE a jsou součástí Hedghog signální dráhy, patří například geny *SHH*, *PTCH1* a *GLI2* (Cohen, 2006). Nejčastěji se jedná o mutaci v genu *SHH*. Vzácně je ale HPE spojována i s dalšími geny – *DISP1*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF1* (Solomon et al., 2013).

2.7.1. Klinická charakterizace holoprosencefalie

Defektem CNS, doprovázejícím holoprosencefalii, může být jen jedna laterální mozková komora namísto dvou, nepřítomnost *corpus callosum*, absence nebo hypoplázie hypofýzy, čichového a optického traktu nebo mikrocefalie (Bale, 2002; Solomon et al., 2013). Vady CNS patrně vznikají kvůli neúplnému rozdělení neurální ploténky během vývoje plodu (Goodrich et al., 1998). Většina postižených plodů nepřežije, těžce postižené děti umírají během prvních měsíců života, ale jedinci s mírnými projevy a bez mozkových anomálií přežívají a jsou diagnostikováni s „mikroformou“ HPE (Solomon et al., 2013).

Malformace předního mozku jsou obecně spojovány s kraniofaciálními malformacemi. Pacient může trpět kyklopií, hypotelorismem nebo rozštěpem patra či rtu (Dubourg et al., 2007) nebo mít jediný maxilární řezák (Solomon et al., 2013). Objevují se také malformace nosu, které zahrnují úplnou absenci nosní chrupavky nebo plochý nos s jednou nosní dírkou (Hennekam et al., 1991).

Klinické příznaky spojované s konkrétní formou HPE jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5. Klinické příznaky doprovázející tři základní formy HPE (Solomon et al., 2013).

Alobární holoprosencefalie	Kyklopie
	Etmocefalie – oči blízko u sebe
	Anoftalmie nebo mikroftalmie – chybějící nebo zmenšené oči
	Rozštěp rtu
Semilobární holoprosencefalie	Etmocefalie
	Anoftalmie nebo mikroftalmie
	Chybějící nosní přepážka nebo plochá špička nosu
	Rozštěp rtu nebo patra
Lobární holoprosencefalie	Rozštěp rtu
	Etmocefalie

2.7.2. Diagnostika a prevence holoprosencefalie

Většina závažných forem holoprosencefalie je detekována ultrazvukem a magnetickou rezonancí během těhotenství. Pokud se jedná o vážnou malformaci, je takové těhotenství většinou předčasně ukončeno. Mírnější formy HPE nelze výše zmíněnými metodami detekovat. V takovém případě je u novorozence třeba zjistit, zda se jedná o izolovanou HPE nebo o jeden z projevů nějakého jiného onemocnění (Dubourg et al., 2007).

U pacientů trpících HPE je doporučováno předcházet sekundárním komplikacím. Například před plánovanou operací a u dětí, které navíc trpí diabetem, by měla proběhnout konzultace s odborníkem ohledně kontroly hladin elektrolytů a řízení příjmu tekutin. Lékař by měl zároveň sledovat výšku, hmotnost a obvod hlavy pacienta a léčit poruchy endokrinního systému postiženého jedince (Solomon et al., 2013).

2.7.3. Léčba holoprosencefalie

Léčba HPE se liší podle mozkových malformací a souvisejících anomálií (viz Tabulka 5.) (Levey et al., 2010). Pacientům s poruchou hypofýzy je předepsána hormonální léčba. Pokud pacient trpí záchvaty, jejich frekvenci lze snížit antiepileptiky. Pro dítě s HPE je důležitá i kvalita potravy, která mu může být podávána uměle, když má

pacient problém s přijímáním potravy. S tím souvisí i rozštěpy patra či rtu, které jsou operovány hned po narození, což také přispívá k usnadnění krmení dítěte (Solomon et al., 2013).

Všechny kraniofaciální malformace, včetně výše zmíněného rozštěpu rtu či patra, lze odstranit plastickou operací. Ovšem pouze za předpokladu, že operace nijak neohrozí život pacienta. Cílem operace je usnadnit příjem potravy a integraci pacienta do společnosti (Hendi et al., 2004).

2.8. Genetické poradenství

U NBCCS je 50% šance, že rodič přenesse stejné postižení na své dítě. Je vhodné, aby nejbližší příbuzní pacienta podstoupili genetické vyšetření (Gianferante et al., 2018). Pacientkám s rizikem NBCCS u plodu je vhodné nabídnout genetické poradenství před otěhotněním, aby byly seznámeny s případnými riziky (Evans et al., 2002). Zhruba 75 % pacientů má příbuzného se stejným postižením. U zbylých 25 % se pravděpodobně jde o *de novo* mutace (Foulkes et al., 2017). Jedná se o onemocnění, u kterého nebyla prokázána závislost na pohlaví (Muzio, 2008).

Genetické vyšetření samotného pacienta je ideální provádět v dětském věku kvůli riziku meduloblastomu. Vyšetření se doporučuje i rodičům a nejbližším příbuzným pacienta s mutací *de novo*. Zahrnuje důkladné vyšetření kůže, rentgen lebky, hrudníku a páteře (Evans et al., 2018).

U HPE genetické poradenství a hodnocení rizik záleží na stanovení konkrétní příčiny HPE. U postižených dětí by měla být provedena cytogenetická a molekulárně genetická vyšetření. U pacientů s podezřením na HPE by měly být vyšetřeny všechny geny, které s ní souvisí, zvláště pokud se HPE v minulosti objevila v rodinné anamnéze (Solomon et al., 2013). Pokud je nalezena patogenní varianta, je nutné vyloučit, případně potvrdit syndromy, které jsou charakterizovány právě HPE (Mercier et al., 2010).

Riziko sourozence pacienta s HPE závisí na genotypu rodičů. Pokud jeden z rodičů má patogenní variantu (s klinickými projevy nebo bez nich), riziko postižení sourozence pacienta je až 50 %. Pokud jsou rodiče zdraví, je velká pravděpodobnost, že postižený sourozenec má variantu *de novo* (Solomon et al., 2013).

Vážně postižení pacienti nejsou schopni reprodukce. Ostatní formy ale patogenní variantu mohou předávat dalším generacím, a proto je i zde vhodné seznámení s riziky před plánováním rodičovství (Solomon et al., 2013). V případě neplánovaného těhotenství, kde existuje možnost postižení plodu HPE, lze vážnější formy rozpoznat zobrazovacími metodami. Ty jsou méně nákladné a rychlejší, proto mají stále přednost před genetickým vyšetřením (Dubourg et al., 2007).

3. Hypotéza a cíle práce

Gorlinův syndrom je onemocnění, které je způsobeno nejčastěji mutacemi v genu *PTCHI*. Podle novějších poznatků může ale být vyvoláno i mutacemi v genu *SUFU*. Gen *SUFU* nebyl do r. 2016 ve FN Motol u nemocných s Gorlinovým syndromem vyšetřován. V letech 2006–2016 bylo ve FN Motol analyzováno 70 pacientů s podezřením na Gorlinův syndrom. U 35 z nich byla prokázána mutace v genu *PTCHI*. U zbylé poloviny se mutace v tomto genu nenašla. Domnívali jsme se, že u nemocných, u nichž nebyla zjištěna patogenní varianta v genu *PTCHI*, by mohl být Gorlinův syndrom způsoben patogenní variantou genu *SUFU*.

Jiným onemocněním, jehož příčinou mohou být mutace některých proteinů Hedgehog signální dráhy, je holoprosencefalie. Jedním z genů, dosud v České republice u holoprosencefalie nevyšetřovaným rutinně, je gen *PTCHI*. Důvodem je náročnost vyšetření a zpravidla nedostatečné množství genomové DNA při vyšetření plodu. Domnívali jsme se, že zavedení technik NGS by umožnilo vyšetřovat i v malém množství DNA více genů zodpovědných za holoprosencefalii.

Na základě stanovené hypotézy jsme si stanovili následující cíle diplomové práce:

- Implementovat a ověřit analýzu genu *SUFU* pomocí Sangerova sekvenování a metodou MLPA.
- Výše zmíněnými metodami analyzovat gen *SUFU* u pacientů s podezřením na Gorlinův syndrom, u kterých nebyla nalezena mutace v genu *PTCHI*, a tím zpřesnit diferenciální diagnostiku a zlepšit záchyt tohoto onemocnění.
- Nové pacienty od roku 2016 zanalyzovat pomocí panelu NGS, tím zpřesnit a zrychlit olekulárně genetickou analýzu genů *PTCHI* a *SUFU*.
- Identifikovat nové patogenní varianty v genech *PTCHI* a *SUFU*.
- Interpretovat nalezené varianty *in silico*.

4. Materiál

4.1. Soubor pacientů

Primárně vybraný soubor se skládal z 49 pacientů, kteří splňovali alespoň jedno majoritní diagnostické kritérium pro Gorlinův syndrom a v letech 2006-206 u nich nebyla nalezena patogenní varianta v genu *PTCHI*. Z tohoto souboru bylo 29 osob vyřazeno kvůli nedostatku materiálu nebo nedostatku údajů. U 20 zbylých pacientů byl analyzován gen *SUFU* pomocí Sangerovy metody a metody MLPA. Dále bylo zařazeno deset nově indikovaných pacientů. U jednoho nově indikovaného pacienta byly geny *PTCHI* a *SUFU* vyšetřeny Sangerovým sekvenováním. U dalších devíti pacientů, indikovaných k vyšetření pro Gorlinův syndrom, byly vyšetřeny geny *PTCHI* a *SUFU* současně pomocí NGS panelu.

Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas k molekulárně genetickému vyšetření Gorlina syndromu.

Finální soubor tedy obsahoval 30 pacientů z celé České republiky (Tabulka 6.). Věk pacientů se pohyboval v rozmezí 9 – 71 let. U jednoho pacienta při sekvenaci došel materiál a k úplnosti výsledku chybí exon 9 genu *SUFU*. V databázi FN Motol byla i jeho stejně postižená sestra a pro další analýzy (*SUFU* exon 9, MLPA) byl použit vzorek sestry.

Jako materiál byla použita genomová DNA pacientů, izolovaná z periferní krve v letech 2012 – 2019.

Informace o souboru vyšetřovaných pacientů jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6. Přehled pacientů zařazených do studie včetně jejich klinických příznaků.

Pacient	Věk v době indikace (roky)	Pohlaví	Příznaky
1	-	žena	vícečetné bazaliomy
2	-	muž	makrocefalie, četné névy
3	2	žena	makrocefalie, meduloblastom mozečku
4	10	muž	makrocefalie, dysplastické névy
5	14	žena	odontogenní keratocysty, makrocefalie
6	14	žena	mnohočetné bazaliomy, odontogenní keratocysty

7	17	muž	odontogenní keratocysty
8	20	žena	mnohočetné bazaliomy, odontogenní keratocysty
9	21	muž	odontogenní keratocysty, bazaliomy, hypertelorismus
10	26	žena	odontogenní keratocysty, makrocefalie, Sprengelova deformita, dysmorfické rysy hlavy a obličeje
11	27	žena	makrocefalie, kalcifikace <i>falx cerebri</i> , Sprengelova deformita, přesuny pigmentu
12	32	žena	mnohočetné bazaliomy
13	32	žena	bazaliom v 15 letech
14	33	žena	mnohočetné bazaliomy, skoliosa, anomálie žebor, vysoké čelo, hypertelorismus, mentální retardace
15	33	žena	mnohočetné bazaliomy
16	36	muž	neuvedeny
17	39	žena	mnohočetné bazaliomy
18	40	žena	2 bazaliomy ve věku 39
19	41	žena	mnohočetné bazaliomy
20	43	žena	mnohočetné bazaliomy
21	45	žena	mnohočetné bazaliomy
22	46	žena	bazaliomy, kalcifikace <i>falx cerebri</i> , skoliosa, makrocefalie
23	52	žena	mnohočetné bazaliomy
24	53	muž	mnohočetné bazaliomy
25	56	žena	mnohočetné bazaliomy, makrocefalie
26	56	žena	mnohočetné bazaliomy
27	61	muž	mnohočetné bazaliomy, makrocefalie
28	68	žena	mnohočetné bazaliomy, cysty v dolní čelisti, meningeom, makrocefalie, anomálie řebor
29	68	žena	mnohočetné bazaliomy
30	69	žena	mnohočetné bazaliomy

4.2. Použité chemikálie

1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogene)

Agaróza – Agarose SFRTM (Amresco)

Betaine (Sigma)

Deaza-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate lithium salt 10mM v H₂O (Sigma)

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

Destilovaná voda pro laboratorní účely (FN Motol)

Ethanol 70% [v/v] (lékárna FN Motol)

Ethanol 95% [v/v] (lékárna FN Motol)
Ethidium bromid (1% [w/v] roztok ve vodě) pro elektroforézu (Merck)
Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems)
Injekční voda – Fresenius KABI
Isopropylalkohol p.a (lékárna FN Motol)
Octan sodný 3M, pH 5,2 (lékárna FN Motol)
Orange G (Sigma)
Sacharóza pro molekulární biologii (Sigma)

4.3. Roztoky

1x TBE pufr (89mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2mM EDTA); (ředění: 100 ml TBE pufru 10x koncentrovaného a 900ml destilované vody)
TBE pufr 10x koncentrovaný (10xTBE; příprava na 1000ml: 54 g Tris-base, 27,5 g kyseliny borité, 40 ml 0,5M EDTA s pH 8,0; AMRESCO, H₂O des. do 100ml)
„kyselý ethanol“ (1,8 ml 3M octanu sodného p.a. pH=5,2; 37,5 ml 95% ethanolu [v/v], 8,7 ml injekční vody)

4.4. Komerční pufr a roztoky

Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies)
Agilent High Sensitivity DNA Reagents (Agilent Technologies)
Custom Solution by Sophia Genetics – Unicorn (Sophia Genetics SA):

Box 1: 10X Wash Buffer I
10X Wash Buffer II
10X Wash Buffer III
10X Stringent Wash Buffer
10X Bead Wash Buffer
Human Cot DNA
Blocking oligos xGen Universal Blockers - TS Mix
Indexy
Hybridization Buffer Enhancer
2X Hybridization Buffer
Unicorn xGen® Lockdown® Probes
Box 2: IDTE

dH₂O

Agencourt AMPure XP beads

Streptavidin Beads

DNA Library Prep Kit (48) by Sophia Genetics (Qiagen)

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

Ethanol absolutní (Penta s.r.o.)

FlexiGene DNA kit (Qiagen)

Gel loading buffer (Sigma-Aldrich)

GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems)

KAPA Library Amplification kit (Kapa Biosystems)

MiniSeq High Output Kit (300 cycles) (Illumina)

MiSeq Reagent Kit, v2 (500 cycles) (Illumina)

PCR Master Mix (Fermentas): TaqDNA polymeráza 1U/μl

10x reakční pufr s KCl – 100 mM

Tris-HCl (pH 8,8 při 25°C), 500 nM KCl,

0,8% (V/V) Nonidet P40

25mM MgCl₂

PhiX Control v3 (Illumina)

POP-7™ Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies)

Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies)

Sodium hydroxide solution (Sigma-Aldrich)

Sodium hypochlorite solution (Sigma-Aldrich)

Sterilní injekční voda (Aqua pro injectione) (Biotika a.s.)

SureClean Plus 5 ml (Bioline)

Tris-EDTA buffer solution (Sigma-Aldrich)

TWEEN® 20 (Sigma-Aldrich)

4.5. 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

SALSA MLPA P472 SUFU probemix: SALSA MLPA Probe P472-A1 SUFU

SALSA MLPA Buffer

SALSA Ligase-65

Ligase Buffer A

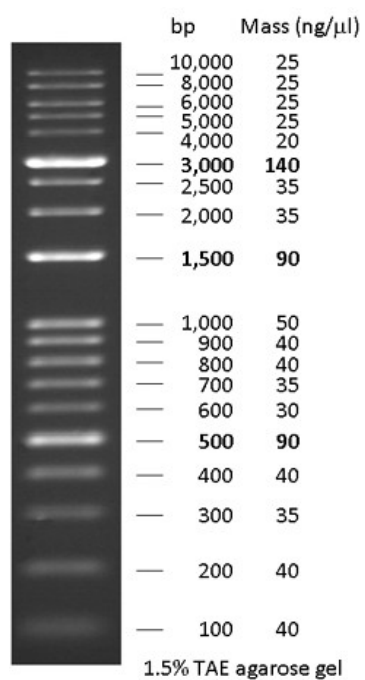
Ligase Buffer B

SALSA PCR Primer Mix

SALSA Polymerase

4.6. Standardy molekulových hmotností

1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogene) viz. Obrázek 7.



Obrázek 7. Kb Plus DNA Ladder (URL4)

4.7. Použité primery (Generi Biotech)

Tabulka 7. Seznam použitých primerů (forward i reverse) pro PCR reakce jednotlivých exonů v genu *SUFU*. Mezi exony 5 a 6 leží intron dlouhý 270bp, a proto jsme je spojili do jednoho amplikonu.

Primer	Exon	5' → 3'	Anelační teplota (°C)	Délka úseku (bp)
SUFU_1_Fw	Exon 1 forward primer	uniF-AGTCTCACCCACCGAGTCC	60,1	424
SUFU_1_Rev	Exon 1 reverse primer	uniR-TAACTCCTTCCCTCGCAGC	60,5	
SUFU_2_Fw	Exon 2 forward primer	uniF-AGCCTTAGCTGTCCATC	50,7	454
SUFU_2_Rev	Exon 2 reverse primer	uniR-GGCATGAGTAGATATAGTCAG	49,1	
SUFU_3_Fw	Exon 3 forward primer	uniF-GAATGGAGGATTTGGATA	50,4	493
SUFU_3_Rev	Exon 3 reverse primer	uniR-GCACAACATAACACAGAAC	49,3	
SUFU_4_Fw	Exon 4 forward primer	uniF-TGGAAATATCCACAACTCT	52,2	479
SUFU_4_Rev	Exon 4 reverse primer	uniR-CAGACCATCTGAATCTACCT	51,6	
SUFU_56_Fw	Exon 56 forward primer	uniF-CTAAGGGAATCATCCAAT	49,6	660
SUFU_56_Rev	Exon 56 reverse primer	uniR-GATGAAAGCCAGTGTTATT	50,0	
SUFU_7_Fw	Exon 7 forward primer	uniF-CAGAACAAGGTCAGAGATC	50,1	459
SUFU_7_Rev	Exon 7 reverse primer	uniR-GGAAGACTTCACTTGCTG	51,4	
SUFU_8_Fw	Exon 8 forward primer	uniF-GAATGGTACTCTTCCAACC	51,8	461

SUFU_8_Rev	Exon 8 reverse primer	uniR-CCTTAAGCCTAGAGATCCT	50,4	
SUFU_9_Fw	Exon 9 forward primer	uniF-CAGTCAGTGAGAAGTGCTT	51,0	562
SUFU_9_Rev	Exon 9 reverse primer	uniR-CCATGTGGAGTAGCTCTC	51,1	
SUFU_10_Fw	Exon 10 forward primer	uniF-CTCTTTGAAGGTGTTGAA	49,0	526
SUFU_10_Rev	Exon 10 reverse primer	uniR-AGTGCTCCTAAGCTGCT	50,8	
SUFU_11_Fw	Exon 11 forward primer	uniF-CTTGAACAGATCACAGTGA	49,6	317
SUFU_11_Rev	Exon 11 reverse primer	uniR-ATACATGCAAGCACACA	49,0	
SUFU_12_Fw	Exon 12 forward primer	uniF-GCATTTGAGAATGAAGC	49,4	343
SUFU_12_Rev	Exon 12 reverse primer	uniR-CTTCCTCACACTTGTCTCT	50,4	

uni* – na 5' konec každého forward a reverse primeru byla přidána unikátní sekvence o 18 bp (5'– TGTAACGACGGCCAGT u forward primerů; 5'– CAGGAAACACCTATGACC u reverse primerů), které umožňují provedení sekvenční reakce u všech amplikonů stejnými sekvenčními primery, odpovídajícími uni-sekvenci.

5. Metody

Při této práci byly použity metody v souladu s pokyny výrobců reagensů a kitů a s operačními protokoly ÚBLG FN Motol v Praze. Genomová DNA byla izolována dle níže uvedeného postupu (viz kapitola 5.1. Izolace DNA) a uchovávána v mrazáku při -18°C. Analyzované exony všech pacientů jsme naamplifikovali pomocí PCR. Produkt polymerázové reakce jsme zbavili zbývajících dNTP, primerů, polymerázy a pufru pomocí komerčního roztoku SureClean Plus. Pročištěnou DNA jsme použili pro Sangerovu sekvenční metodu. Po jejím skončení jsme produkt vysráželi pomocí ethanolu a rozpustili v Hi-Di Formamidu. Následně jsme produkt analyzovali pomocí ABI Prism 3130xL Genetic analyzer. Pro výslednou analýzu jsme použili volně dostupný program Chromas, ve kterém jsme v sekvencích hledali patogenní a nepatogenní varianty. Všechny nalezené polymorfismy či mutace jsme porovnali s databází NCBI.

5.1. Izolace DNA

Izolace DNA je proces získání DNA ze vzorku periferní krve pacientů. Metoda je založena na principu lýzy buněk a odstranění všech nežádoucích složek (proteiny, lipidy, soli). Ve výsledku získáme alkoholem vysráženou DNA, kterou rozpustíme v příslušném pufru. Takto zpracovanou DNA lze skladovat v mrazáku i několik let.

Pracovali jsme s 5 ml krve pacienta, odebrané do zkumavek K₃EDTA. K odběru i ke zpracování musel pacient nebo jeho zákonný zástupce podepsat informovaný souhlas.

Použité přístroje:

Centrifuge 5804 R (Eppendorf)

laminární box

MS2 Minishaker IKA

termostat

Použité chemikálie:

Ethanol 70% [v/v] (lékárna FN Motol)

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

DNA Hydration Solution

Isopropylalkohol p.a (lékárna FN Motol)

krevní vzorek (ve zkumavce s K₃EDTA)

Postup:

1. Izolaci DNA jsme prováděli v laminárním boxu. Zkumavky jsme označili, aby nedošlo k záměně vzorků.
2. 5 ml krve jsme smíchali v 50ml zkumavce s 15 ml Red Blood Cell Lysis Solution. (Poměr je 1:3, poměry mohou být upraveny podle množství krve.)
3. Směs jsme důkladně promíchali převrácením a krouživými pohyby a nechali jsme ji inkubovat při laboratorní teplotě 10 minut.
4. Po uplynutí inkubační doby jsme zkumavku zcentrifugovali při 20°C na 5000 otáček po dobu 5 minut.
5. Supernatant jsme odlili do připravené odpadní 50ml zkumavky. Ponechali jsme jen cca 100 µl supernatantu a resuspendovali jsme pelet.
6. K resuspendovaným buňkám jsme přidali 5 ml Cell Lysis Solution (poměr 1:1).
7. Směs jsme promíchali až do úplného rozpuštění shluků.
8. Přidali jsme 1,7 ml Protein Precipitation Solution (poměr 1:3). Směs jsme promísili na minishakeru po dobu 20 vteřin.
9. Následně jsme zkumavku nechali 5 minut centrifugovat na 5000 otáček (3214 ref) při 20°C.
10. Vysrážené proteiny vytvořily pelet na dně zkumavky. Supernatant jsme přelili do čisté 50ml zkumavky.
11. K supernatantu jsme přidali 5 ml isopropylalkoholu (poměr 1:1).
12. Směs jsme pomalými krouživými pohyby promísili, dokud nebyla DNA okem viditelná jako mléčná sraženina.
13. DNA jsme pipetou přenesli do připravené mikrozkušavky a přidali jsme k ní 200 µl 70% ethanolu.
14. Ethanol jsme opatrně odsáli a zkumavku nechali otevřenou cca 5 minut, dokud se zbylý alkohol neodpařil.

15. K DNA jsme přidali 500 μ l DNA Hydration Solution (množství záleží na odhadovaném výtěžku získané DNA – používá se 100-500 μ l) a nechali jsme směs rozpouštět v termostatu při 37°C.
16. Po úplném rozpouštění získané DNA jsme změřili její koncentraci a čistotu pomocí spektrofotometru NanoDrop a naměřené hodnoty jsme zanesli do databáze.
17. Připravenou DNA jsme uchovávali v mrazáku při -18°C až do dalšího zpracování.

5.2. PCR amplifikace genu *SUFU* a *PTCH1*

5.2.1. Klasická polymerázová řetězová reakce

Při polymerázové řetězové reakci dochází k rychlému namnožení požadovaného úseku DNA. Pro úspěšnou amplifikaci je potřeba templátová DNA, termostabilní DNA polymeráza, primery komplementární k oběma směrům DNA vlákna, směs volných nukleotidů a reakční pufr. Nukleotidy jsou namíchány ve směsi spolu s primery, hořčíkem, pufrům a vodou. Koncentrace hořčíku je pro správný výsledek velice důležitá.

Klasická PCR reakce se skládá ze tří fází – denaturační, anelační a elongační. Každá reakce probíhá při jiné teplotě a jinak dlouho. Zároveň každý primer nasedá při jiné teplotě, která závisí na sekvenci primeru a jeho délce. Přesně jsme vhodnou anelační teplotu každého primeru zjistili na serveru In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). PCR probíhá v termocykleru, kde se všechny teplotní podmínky dají nastavit do jednoho programu pro rychlejší provedení reakce.

Použité přístroje:

Termocykler 2720 Thermal cycler, Applied Biosystems

Použité chemikálie:

Betaine (Sigma)

Deaza-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate lithium salt 10mM v H₂O (Sigma) – 7-deaza d-GTP

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich)

DNA pacienta

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

Injekční voda – Fresenius KABI

PCR Master mix (Thermo scientific): TaqDNA polymeráza 1U/μl
10x reakční pufr s KCl – 100 mM Tris-
HCl (pH 8,8 při 25°C), 500 nM KCl,
0,8% (V/V) Notidet P40
25mM MgCl₂

Primery (viz Tabulka 3.)

Postup:

1. Do zkumavky jsme připravili mastermixy pro PCR podle tabulek 8 a 9.
Všechny složky jsme promíchali pomocí vortexu.

Složky	Objem (μl)
H ₂ O	710
10x pufr s KCl (Thermo scientific)	100
Roztok dNTP, 2mM každý	100
25mM MgCl ₂	40
Forward primer, 100pmol/μl	5
Reverse primer, 100pmol/μl	5

Tabulka 8. Směs pro PCR exonů 2-12 genu *SUFU* s 1mM MgCl₂.

Složky	Objem (μl)
H ₂ O	200
10x pufr s KCl (Thermo scientific)	100
Roztok dNTP, 2mM každý	100
25mM MgCl ₂	80
DMSO	50
Betaine 5M	400
7-deaza d-GTP 10mM	5
Forward primer, 100pmol/μl	10
Reverse primer, 100pmol/μl	10

Tabulka 9. Směs pro PCR exonu 1 genu *SUFU* s Betainem.

2. Do popsaných 0,2 ml mikrozkušavek jsme napipetovali 30 μ l mastermixu a 1 μ l pacientovy DNA o koncentraci 100-200 ng/ μ l.
3. Následně jsme přidali 1 μ l TaqDNA polymerázy (1U/ μ l) a reakční směs promíchali. Taq DNA polymeráza byla během práce umístěna na ledu, aby se zabránilo její degradaci.
4. Uzavřené zkumavky jsme umístili do termocykleru (2720 Thermal Cycler) a spustili jsme zvolený program.

Podmínky pro jednotlivé reakce byly nastaveny následovně:

Pro exony 2-12:

- 1.krok: prePCR 1 min při 94°C
 - 2. krok: denaturace 1 min při 94°C
 - 3. krok: anelace 1 min při 52°C
 - 4. krok: elongace 2 min při 72°C
- Kroky 2-4 se opakovaly 32x.
- 5. krok: ukončování 7 min při 72°C

Pro exon 1:

- 1. krok: prePCR 1 min při 94°C
 - 2. krok: denaturace 1 min při 94°C
 - 3. krok: anelace 1 min při 58°C
 - 4. krok: elongace 2 min při 72°C
- Kroky 2-4 se opakovaly 35x.
- 5. krok: ukončování 7 min při 72°C

5. Po skončení programu jsme produkty uchovávali v lednici při teplotě 4°C do dalšího kroku.
6. Přítomnost PCR produktu jsme ověřili u prvních dvou pacientů pomocí gelové elektroforézy.

5.3. Gelová elektroforéza

Jedná se o metodu, při které dochází k separaci fragmentů DNA na základě velikosti a molekulové hmotnosti. Principem je, že se vzorky nanesou na pórovitý gel, který se přenesou do elektroforetické vany naplněné elektroforetickým pufrem. Poté se spustí zdroj stejnosměrného elektrického proudu. Malé fragmenty prochází gelem rychleji a po vypnutí zdroje napětí jsou blíž k anodě než větší fragmenty.

5.3.1. Příprava gelu pro elektroforézu (1,8% agaróza v 1xTBE pufru)

Použité přístroje:

Digitální váha Denver PK-352

Mikrovlnná trouba

Použité chemikálie:

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

Agarosa SFR (Amresco)

Destilovaná voda pro laboratorní účely (lékárna FN Motol)

Ethidium bromid 1% [w/v], pracovní ředění 0,5 ‰ [w/v] (MERCK)

Postup přípravy:

1. Připravili jsme si nalévací vanu a vyvážíli jsme ji pomocí vodováhy. Do vany jsme umístili potřebný počet hřebenů, které vytvoří v gelu jamky pro vzorky.
2. Do kádinky jsme odvážíli 3,6g agarózy.
3. Do kádinky s agarózou jsme přidali 200 ml 1x TBE pufru.
4. Následně jsme do kádinky nalili 15 ml vody a kádinku překryli plastovou fólií.
5. Kádinku s připravenou směsí jsme vložili do mikrovlnné trouby a zahřívali, dokud se agaróza nerozpustila.
6. Kádinku jsme po rozpuštění agarózy vyndali z trouby a krouživými pohyby jsme obsah promíchali.
7. Směs jsme nechali zchladnout na 60°C a následně přidali 200 μ l 0,5‰ ethidium bromidu.

8. Opět jsme směs krouživými pohyby promíchali a nalili jsme ji do připravené nalévací vany.
9. Vzduchové bubliny jsme vytlačili pomocí špičky pipety a nechali jsme gel ztuhnout.
10. Po ztuhnutí jsme vyjmuli hřebeny.

5.3.2. Separace fragmentů

Použité přístroje:

Transluminátor MultiImage Light Cabinet Filter Positions (Alpha Innotech)
zdroj stejnosměrného elektrického proudu (Bio Rad)

Použité chemikálie:

1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogene)

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

Agarózový gel (viz kapitola 6.3.1)

Injekční voda – Fresenius KABI

Orange G (Sigma)

Sacharóza pro molekulární biologii

Postup:

1. Namíchali jsme Gel loading buffer:
 - a. Smíchali jsme 4g sacharózy s injekční vodou do celkového objemu 10 ml. Tím jsme získali 40% roztok sacharózy.
 - b. Na špičku skalpelu jsme nabrali Orange G a rozpustili jsme ji v sacharózovém roztoku.
2. Připravili jsme 1 Kb Plus DNA ladder smísením 10 μ l 1 Kb DNA ladder a 90 μ l Gel Loading buffer.
3. Do aparatury pro gelovou elektroforézu jsme přendali připravený gel orientovaný jamkami ke katodě.
4. Gel jsme zalili 1x TBE puforem tak, aby byl celý ponořený. Špičkou pipety jsme odstranili vzduchové bublinky.

5. V 96 jamkové destičce jsme smíchali 3 μ l příslušného PCR produktu a 3 μ l Gel loading buffer.
6. Do první jamky na gelu jsme napipetovali 3 μ l 1 Kb Plus ladder a do dalších jamek vždy 3 μ l obarveného PCR produktu. Do jamek jsme PCR produkty dávali postupně, aby nedošlo k záměně vzorku.
7. Aparaturu jsme uzavřeli a spustili zdroj elektrického proudu (400mA) o napětí 99 V.
8. Po uběhnutí 20 minut jsme přístroj odpojili od zdroje. Vyjmuli jsme gel a umístili ho do transluminátoru pod UV zářivku (302 nm).
9. Gel s viditelným produktem jsme vyfotografovali.

5.4. Purifikace PCR produktu roztokem SureClean Plus (Bioline)

Metoda se používá pro očištění PCR produktů, předtím než provedeme sekvenaci vzorků. Dojde k odstranění všech nežádoucích komponent jako jsou dNTP, primery, polymeráza a pufr. Pročištěné vzorky se rozpustí ve vodě a poté jsou připraveny pro sekvenační reakci.

Použité přístroje:

Centrifuga 5415 R (Eppendorf)

MS2 Minishaker IKA

Ruční vakuová odsávačka (P-lab)

Použité chemikálie:

Ethanol 70% [v/v] (lékárna FN Motol)

Injekční voda – Fresenius KABI

PCR produkt

SureClean Plus (Bioline)

Postup:

1. Do připravených a označených mikrozkušavek jsme napipetovali 30 μ l roztoku SureClean Plus pomocí dávkovací pipety.
2. Následně jsme do zkušavek přidali 30 μ l příslušného vzorku.
3. Směs jsme vortexovali 10 vteřin.

4. Zkumavky jsme vložili do centrifugy a nechali jsme stáčet 15 minut při 18°C na 13,200 rpm (16100 rcf).
5. Po centrifugaci jsme vzorky ihned opatrně vyndali a pomocí odsávačky jsme odsáli veškerou tekutinu.
6. Dávkovací pipetou jsme k peletu přidali 200 µl 70% ethanolu.
7. Opět jsme směs vortexovali 10 vteřin.
8. Zkumavky jsme přendali zpět do centrifugy a při stejných podmínkách opět vzorky stočili – 15 minut při 18°C na 13,200 rpm (16100 rcf).
9. Po centrifugaci jsme vzorky opatrně vyndali a pumpou odsáli veškerou tekutinu.
10. Zkumavky jsme nechali 1 minutu otevřené vyschnout.
11. Do každé mikrozukumavky jsme napipetovali 30 µl injekční vody a nechali jsme pelet 15 minut rozpouštět.

5.5. Sekvence dle Sangera

Pomocí sekvenační metody jsme schopni určit pořadí nukleotidových bází v úseku DNA. Nejprve je potřeba analyzovaný úsek amplifikovat pomocí PCR *in vitro*. Výsledný purifikovaný produkt je poté použit jako templát pro sekvenaci.

Použité přístroje:

Centrifuge 5804 R (Eppendorf)

MS2 Minishaker IKA

Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems

Použité chemikálie:

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

PCR produkt

Primery (viz kapitola 4.7 Použité primery (Generi Biotech))

Postup:

1. Připravili a označili jsme si 96 jamkovou sekvenační destičku. Zároveň jsme z mrazáku vyndali BDT kit a uniprimery, aby rozmrzly.

2. Do každé jamky jsme napipetovali 2,1 μl BDT kitu dávkovací pipetou.
3. Následně jsme přidali 3,5 μl PCR produktu (1 PCR produktu odpovídají 2 jamky).
4. Ke každému vzorku jsme přidali jeden z "uniprimerů". Do první jamky 1 μl forward a do druhé 1 μl reverse o koncentraci 2,5 pmol/ μl .
5. Destičku jsme důkladně přelepili folií BIOplastic Opti-SealTM Optical Disposable Adhesive a opatrně na vortexu promíchali přibližně 10 vteřin.
6. Destičku jsme umístili do centrifugy. K vyvážení jsme použili závaží a destičku centrifugovali 1 minutu na 3700 otáček při 18°C.
7. Destičku jsme přendali do cycleru. Reakce probíhala následovně:
 - 1. krok 10 s při 96°C
 - 2. krok 5 s při 50°C
 - 3. krok 4 min při 60°CKroky 2 a 3 se opakovaly 25x.
 - 4. krok ∞ při 4°C

Po skončení reakce jsme pokračovali srážením vzorků.

5.6. Ethanolová precipitace (Srážecí reakce)

Srážecí reakcí dojde k očištění produktu sekvenace od volných dideoxynukleotidů a úspěšným provedením se docílí lepší čitelnosti výsledného chromatogramu. Srážení následuje co nejdříve po sekvenaci. Prodleva nesmí být delší než 24 hodin.

Použité přístroje:

ABI Prism 3130xL Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

HITACHI

Centrifuge 5804 R (Eppendorf)

třepačka MS2 Minishaker IKA

Použité chemikálie:

Ethanol 70% [v/v] (FN Motol)

Hi-DiTM Formamid (Applied Biosystems)

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

Postup:

1. Po sekvenaci jsme do jamek se sekvenační reakcí napipetovali po 42 µl kyselého ethanolu dávkovací pipetou.
2. Destičku jsme zalepili těsnící fólií (BIOplastic), promíchali na třepačce a v centrifuze jsme destičku centrifugovali 40 minut na 3700 rcf při 18°C.
3. Po stočení jsme z destičky lehce vyklepali tekutinu do buničité vaty.
4. Přenesli jsme destičku na další buničitou vatu a dnem vzhůru jsme ji i s buničitou vatou centrifugovali na 400 rcf při 18°C 2 minuty.
5. Do každé jamky jsme napipetovali 100 µl 70% ethanolu.
6. Destičku jsme opět zalepili těsnící fólií (BIOplastic) a v centrifuze jsme destičku centrifugovali 40 minut na 3700 rcf při 18°C.
7. Poté jsme tekutinu znovu lehce vyklepali do buničité vaty.
8. Následně jsme destičku přendali na další buničitou vatu a dnem vzhůru jsme ji i s buničitou vatou centrifugovali na 400 rcf při 18°C 2 minuty.
9. Ke všem vzorkům jsme přidali 24 µl Hi-Di Formamidu, přelepili jsme destičku fólií a krátce (1 min) jsme ji centrifugovali na 3700 rcf.
10. Odstranili jsme fólii a destičku utěsnili gumovou zátkou (septum) a přendali do držáku (tray) pro sekvenační analýzu.
11. Destičku v držáku jsme nechali v chladničce, dokud nebyl pelet rozpuštěn (30-60 min).
12. Poté jsme destičku umístili do sekvenátoru a spustili kapilární elektroforézu na genetickém analyzátoru ABI Prism 3130xL Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) HITACHI, s použitím kapiláry dlouhé 36 cm, polymeru POP-7TM Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) a 1xTBE pufru (Applied Biosystems).

5.6.1. Vyhodnocení výsledků sekvenační analýzy

Po ukončení programu kapilární elektroforézy jsme data analyzovali na genetickém analyzátoru ABI Prism 3130xL Genetic analyzer (Applied Biosystems) pomocí aplikace

3130xl Genetic Analyzer Data Collection Software 4 (Applied Biosystems) a následně jsme výsledky vyhodnocovali v programu Chromas Lite MFC Application.

Postupně jsme kontrolovali jednotlivé sekvence a hledali jsme přítomné varianty. Pokud se jedno z vláken DNA (např. forward) nedalo vyhodnotit, použili jsme vlákno opačné (reverse). V případě, že nebylo možné vyhodnotit ani jedno z vláken, sekvenaci daného exonu jsme provedli znovu. Vlastnosti nalezených variant jsme vyhodnotili pomocí databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information) nebo pomocí softwaru Alamut® Visual 2.7.

5.7. MLPA

MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) je metoda založena na principu PCR, která ale umožňuje amplifikaci více úseků DNA jen s jedním párem primerů. Může sloužit k identifikaci genomických změn, zejména pro detekci delecí/duplikací genů či chromozómů. Metoda využívá tzv. MLPA sondy, které jsou složeny ze dvou oligonukleotidů. Tato dvojice je navrhována pro specifickou sekvenci tak, že oligonukleotidy hybridizují vedle sebe na stejném vlákně DNA. Oba oligonukleotidy obsahují krátkou sekvenci, specifickou pro cílovou sekvenci DNA vzorku, a univerzální forward a reverse PCR primery. Postup se skládá z pěti kroků – denaturace vyšetřované DNA, hybridizace MLPA sond, ligace, PCR reakce, separace kapilární elektroforézou a vizualizace. Velikost výsledného amplifikačního produktu se pohybuje v intervalu 130– 480 nt a lze jej analyzovat kapilární elektroforézou. Velikost výsledného píku se porovnává s velikostí referenčního píku pro danou sondu. Po porovnání můžeme říci, zda některý exon konkrétního genu vykazuje aberantní počet kopií (URL2).

Použité přístroje:

ABI Prism 3130xL Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

HITACHI

Centrifuga Spectrafuge Mini C1301 (Labnet)

MS2 Minishaker IKA

Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems

Použité chemikálie:

DNA pacienta (o koncentraci okolo 100 ng/μl)

GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems)

Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems)

Injekční voda – Fresenius KABI

SALSA MLPA P472 SUFU probemix: SALSA MLPA Probe P472-A1 SUFU

SALSA MLPA Buffer

SALSA Ligase-65

Ligase Buffer A

Ligase Buffer B

SALSA PCR Primer Mix

SALSA Polymerase

Postup:

1. Před začátkem samotné MLPA metody jsme si naředili DNA na správnou koncentraci (50 – 100 ng DNA/μl roztoku s injekční vodou podle doporučení výrobce).
2. Do popsaných mikrozkušavek jsme napipetovali 5 μl naředěné DNA o správné koncentraci. Přidali jsme ještě jeden vzorek jako interní negativní kontrolní DNA pacienta, který je pro danou MLPA analýzu negativní.
3. Zkušavky jsme umístili do termocykleru a spustili denaturační program (5 minut při 98°C).
4. Během průběhu denaturace jsme si připravili hybridizační směs smícháním 1,5 μl sondy a 1,5 μl pufru pro každý vzorek.
5. Po skončení denaturace a ochlazení vzorků na 25°C jsme připravenou hybridizační směs zvortexovali a následně do každého vzorku napipetovali 3 μl.
6. Každý vzorek jsme po přidání hybridizační směsi řádně promíchali pomocí pipety.
7. Na termocykleru jsme zapnuli hybridizační program (1 minutu při 95°C a 16-20 hodin při 60°C).
8. Pět minut před skončením hybridizační reakce jsme si v připravené nádobě s ledem připravili ligační směs smícháním 25 μl vody, 3 μl ligačního pufru A, 3 μl ligačního pufru B a 1 μl enzymu ligáza/ na pacienta (enzymovou

- aktivitu výrobce neuvádí). Všechny složky kromě ligázy jsme před použitím řádně zvortexovali.
9. Hotový ligační mix jsme krátce promíchali a vrátili na led.
 10. Ukončili jsme hybridizační program a spustili ligační program. Když se termocykler nahřál na 54°C, program jsme zastavili.
 11. Do mikrozkušavek jsme přidali po 32 µl ligační směsi do každé a pipetou jsme obsah promíchali.
 12. Opět jsme termocykler spustili a nechali jsme proběhnout ligační reakci (15 minut při 54°C a 5 minut při 98°C). Po ukončení jsme nechali vzorky zchladnout na 25°C.
 13. Před koncem ligační reakce jsme si připravili PCR směs smícháním 7,5 µl vody, 2 µl primerů a 0,5 µl polymerázy/ na pacienta. Všechny složky kromě polymerázy jsme před použitím zvortexovali. Připravenou směs jsme umístili na led.
 14. Program ligace se zastavil při 25°C. Otevřeli jsme termocykler a do každé mikrozkušavky jsme co nejrychleji, aby se nesnížila teplota, přidali 10 µl PCR směsi. Opět jsme pipetou důkladně promíchali.
 15. Spustili jsme PCR program, který běžel za následujících podmínek:
 - 1. krok 30 s při 95°C
 - 2. krok 30 s při 60°C
 - 3. krok 21 min při 72°CKroky 2 a 3 se opakovaly 35x.
 - 4. krok ∞ při 4°C
 16. Před skončením PCR reakce jsme v 1,5ml zkumavce připravili směs 10 µl Hi-Di formamidu a 0,25 µl žebříčku GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard/na vzorek. Směs jsme zvortexovali.
 17. Připravili jsme si 96 jamkovou destičku a do příslušných jamek jsme podle protokolu napipetovali 10 µl Hi-Di směsi dávkovací pipetou.
 18. Po skončení PCR reakce jsme vzorky vyndali z termocykleru a do každé jamky s Hi-Di roztokem jsme napipetovali po 1 µl příslušného produktu PCR reakce.
 19. Destičku jsme přelepili těsnící fólií a krátce zcentrifugovali (1 min) na 3700 rcf při 18°C.

20. Odstranili jsme fólii a destičku utěsnili gumovou zátkou (septum) a přendali do držáku (tray) pro následnou analýzu.

21. Poté jsme destičku umístili do sekvenátoru a spustili kapilární elektroforézu.

5.7.1. Vyhodnocení výsledků MLPA metody

Po ukončení kapilární elektroforézy jsme výsledky analyzovali na genetickém analyzátoru ABI Prism 3130xL Genetic analyzer (Applied Biosystems) za pomoci aplikace Gene Mapper Software 5 (Applied Biosystems). V této aplikaci jsme sledovali velikost jednotlivých píků, přičemž každý pík znázorňoval konkrétní exon či referenční sekvenci. Každý elektrogram jsme porovnali s elektrogramem negativní kontroly.

Pro výsledné vyhodnocování jsme použili program Coffalyser.Net v.01. V tomto programu jsme vyhodnocovali, zda je ve vzorku přítomna delece či duplikace jedné z alel. Pokud by se pík některého exonu výrazně odchýlil od výsledků kontroly, byla by prokázána jedna ze strukturních mutací genu.

5.8. Sekvenování nové generace (NGS)

Technologie masivního paralelního sekvenování umožňuje přípravu a analýzu více vzorků v jednom běhu přístroje MiSeq nebo MiniSeq (Illumina), a to i pro větší množství genů zároveň. Souprava obsahuje sondy pro analýzu panelu (v našem případě panelu Unicorn), připraveného na míru dle specifických požadavků laboratoře ÚBLG FN Motol společností Sophia Genetics, SA. Panel Unicorn obsahuje 43 genů viz. Tabulka 10. U pacientů s Gorlinovým syndromem jsou hodnoceny geny *PTCH1* a *SUFU*. U pacientů s holoprosencefalií jsou hodnoceny geny *PTCH1* (HPE7), *SHH* (HPE3), *SIX3* (HPE2), *ZIC2* (HPE5), *TGIF1* (HPE4), *GLI2* (HPE9), *GLI3*, *CDON* (HPE11) a *SUFU*. Výsledkem NGS je rychlá detekce jednonukleotodových záměn, krátkých insercí či delecí a rozsáhlých genomických delecí v DNA izolované z plné krve pacienta.

Tabulka 10. Seznam genů zahrnutých v panelu Unicorn pro NGS.

Gen	Referenční sekvence	Gen	Referenční sekvence	Gen	Referenční sekvence
NF1	NM_000267.3	NF2	NM_00268.3	SPRED1	NM_152594.2
CLCN1	NM_000083.2	SCN4A	NM_000334.4	FMR1	NM_002024.5
CACNA1A	NM_000068.3	SPG7	NM_003119.3	PTPN11	NM_002834.3
<i>SOS1</i>	NM_005633.3	<i>SOS2</i>	NM_006939.2	<i>RAF1</i>	NM_002880.3
<i>RIT1</i>	NM_006912.5	<i>BRAF</i>	NM_004333.4	<i>KRAS</i>	NM_004985.3
<i>MAP2K1</i>	NM_002755.3	<i>MAP2K2</i>	NM_030662.3	<i>HRAS</i>	NM_005343.2
<i>SHOC2</i>	NM_007373.3	<i>NRAS</i>	NM_002524.4	<i>CBL</i>	NM_005188.3
<i>RRAS</i>	NM_006270.4	<i>LZTR1</i>	NM_006767.3	<i>RASA2</i>	NM_006506.3
<i>KRIT1</i>	NM_194456.1	<i>CCM2</i>	NM_031443.3	<i>PDCD10</i>	NM_145860.1
<i>CHD7</i>	NM_017780.2	<i>SCN1A</i>	NM_001165963.1	<i>DMD</i>	NM_004006.2
<i>VPSI3B</i>	NM_017890.3	<i>PTCH1</i>	NM_000264.3	<i>SHH</i>	NM_000193.3
<i>SIX3</i>	NM_005413.3	<i>ZIC2</i>	NM_007129.3	<i>TGIF1</i>	NM_173208.2, NM_170695.3
<i>GLI2</i>	NM_005270.4	<i>GLI3</i>	NM_000168.5	<i>CDON</i>	NM_016952.4
<i>SUFU</i>	NM_016169.3	<i>TCOF1</i>	NM_001135243.1	<i>POLRIC</i>	NM_203290.3
<i>POLRID</i>	NM_015972.3				

5.8.1. Teoretický postup metody NGS

Celá metoda se skládá z preanalytické, analytické (sekvenace přístrojem MiSeq) a postanalytické části (zpracování výsledků). Preanalytická část, tzn. příprava knihovny určené k sekvenaci, trvá 2–3 dny, přičemž třetí den je finální knihovna denaturována pomocí roztoku NaOH, poté naředěna na vyhovující koncentraci a následně analyzována na přístroji MiSeq.

Nejprve je genomová DNA, která je u všech vzorků naředěna na koncentraci 7ng/μl, enzymaticky rozštěpena směsí endonukleáz na různě dlouhé fragmenty. Konce dvouřetězcových fragmentů jsou následně upraveny tak, aby žádné vlákno nepřesahovalo, a na 3' konec každého vlákna je přidán adenin, na který ligují adaptéry přidané v dalším kroku.

V dalším kroku jsou k fragmentům ligázou připojeny adaptéry, které mimo jiné obsahují unikátní kombinaci indexů (8bp), sekvenci vázající univerzální primer pro PCR reakci a oligonukleotidy vážící se ke stěně flowcell v sekvenátoru.

Následně je produkt ligace přečištěn na magnetických kuličkách a poté jsou pomocí dalších magnetických kuliček vyselektovány fragmenty DNA o délce v rozmezí 300–700bp.

Fragmenty s ideální délkou se použijí pro další krok – klasická PCR reakce. Po PCR reakci jsou fragmenty znovu očištěny od zbývajících reagensů magnetickými kuličkami a následně smíchány po 8 vzorcích do zkumavek spolu s oligonukleotidy, blokujícími konce adaptérů.

Druhý den probíhá hybridizace sond při teplotě 65°C, následně jsou na nahybridizované sondy připojeny streptavidinové kuličky pomocí vazby streptavidin/biotin a poté jsou vyselektovány pouze úseky DNA, na které jsou připojené tyto sondy. Získané fragmenty jsou amplifikovány PCR reakcí, probíhající přímo na streptavidinových kuličkách, a přečištěny.

Nakonec jsou všechny vzorky přečištěny pomocí magnetických kuliček a je zkontrolována kvalita knihovny. Délka fragmentů je kontrolován s pomocí Bioanalyzer Agilent 2100 a koncentrace pomocí fluorometru Qubit 2.0. Po kontrole kvality jsou vzorky smíchány do finální knihovny na základě jejich koncentrace a délky fragmentů tak, aby bylo rozložení vzorků v běhu ideální, tj. aby každý pacient měl přibližně stejné množství dat.

Takto modifikované vzorky jsou připraveny k sekvenaci na analyzátoru MiSeq, kde je metodou masivního paralelního sekvenování přečtena sekvence nukleotidů amplifikovaných fragmentů. Fragmenty se v přístroji váží ke stěně flowcell. Flowcella je sklíčko, na které jsou nanášeny oligonukleotidy kompatibilní s adaptéry. Do specifického místa na flowcelle se vážou specifické sekvence, v důsledku čehož se v tomto místě amplifikuje jen jeden klastr. Indexy na adaptérech mají unikátní sekvenci a pomohou rozlišit data jednotlivých pacientů. Adaptéry jsou dodávány spolu se soupravou Custom Bundle Solution firmou Sophia Genetics.

Díky specifickým indexům jsou získaná data přiřazena ke konkrétním pacientům a mohou být vyhodnocována v aplikaci Sophia DDM.

Metodu NGS jsem jako jedinou nemohla provádět samostatně, a to z provozních a ekonomických důvodů. S celým laboratorním postupem jsem ale byla důkladně seznámena a při zpracování vzorků DNA pacientů, kteří jsou zařazeni do této studie, jsem byla přítomna. Pacienty, kterým byly analyzovány geny *PTCH1* a *SUFU*, zařadila do jednotlivých běhů Mgr. Jana Zarzycká. Vyhodnocování výsledků panelu NGS jsem prováděla samostatně pod jejím dohledem.

Použité přístroje:

Agile Vortex Mixer (Infinigen Biotechnology Inc.)
Benchmixer vortex (Benchmark Scientific)
Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies)
Centrifuga Hermle Z383 (Labortechnik GmbH)
Fluorometr Qubit 2.0 (Invitrogen)
IKA MS3 Vortexer
MyFuge minicentrifuga (Benchmark Scientific)
ND-2000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies)
Sekvenátor MiSeq (Illumina)
Stojánek DYNAMAG - 2 each (Invitrogen)
Stojánek DynaMag™-96 Side Magnet (Invitrogen)
Termocykler Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems)
Termoblok AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet International, Inc.)
Vakuová odparka IR Micro-Cenvac (N-Biotek)

Použité chemikálie:

Agencourt® AMPure® XP beads
Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies)
Agilent High Sensitivity DNA Reagents (Agilent Technologies)
Custom Solution by Sophia Genetics - Unicorn (Sophia Genetics SA):

Box 1: 10X Wash Buffer I
10X Wash Buffer II
10X Wash Buffer III

10X Stringent Wash Buffer
10X Bead Wash Buffer
Human Cot DNA
Blocking oligos xGen Universal Blockers - TS Mix
Indexy
Hybridization Buffer Enhancer
2X Hybridization Buffer
Unicorn xGen® Lockdown® Probes
Box 2: IDTE
dH₂O
Agencourt AMPure XP beads
Streptavidin Beads

DNA Library Prep Kit (48) by Sophia Genetics (Qiagen)
Ethanol 80% (Lékárna FN Motol)
Ethanol absolutní (Penta s.r.o.)
FlexiGene DNA kit (Qiagen)
KAPA Library Amplification kit (Kapa Biosystems):
 Library Amplification Primer Mix (10x)
 KAPA HiFi HotStart Ready Mix (2x)*
MiSeq Reagent Kit, v2 (500 cycles) (Illumina)
MiniSeq High Output Kit (300 cycles) (Illumina)
PhiX Control v3 (Illumina)
Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies)
Sodium hydroxide solution (Sigma-Aldrich)
Sodium hypochlorite solution (Sigma-Aldrich)
Sterilní injekční voda (Aqua pro injectione) (Biotika a.s.)
Tris-EDTA buffer solution (Sigma-Aldrich)
TWEEN® 20 (Sigma-Aldrich)

5.8.2. Vyhodnocení výsledků NGS metody

Po dokončení analýzy přístrojem MiSeq jsme si data z něj překopírovali na externí úložiště ve formátu FASTQ. Následně jsme data nahráli do programu Sophia DDM®,

což je software od firmy Sophia Genetics, Inc. Po zpracování jsme si v softwaru Sophia DDM otevřeli u pacientů s Gorlinovým syndromem výsledky analýz genů *PTCH1* a *SUFU*. U těch jsme si prošli všechny nalezené SNP a CNV. Z výsledků zpracovaných firmou Sophia Genetics, Inc. je patrné, zda se jedná o patogenní nebo nepatogenní varianty. Varianty, které jsou vyhodnoceny jako patogenní, se ověřují – SNP sekvenací dle Sangera a CNV metodou MLPA.

6. Výsledky

6.1. Zavedení analýzy jednotlivých exonů genu *SUFU*

Gen *SUFU* má několik známých transkriptů. Transkript NM_016169.3 má 12 exonů, transkript NM_001178133.1 má 13 exonů. Transkripty se liší v exonu 11. V této práci jsme v souladu s jinými autory (Smith et al., 2014) používali transkript NM_016169.3.

Díky softwaru Alamut jsme si ověřili počty exonů a intronů v genu *SUFU*, které jsme získali z databáze NCBI.

6.1.1. Navržení specifických primerů pro jednotlivé exony

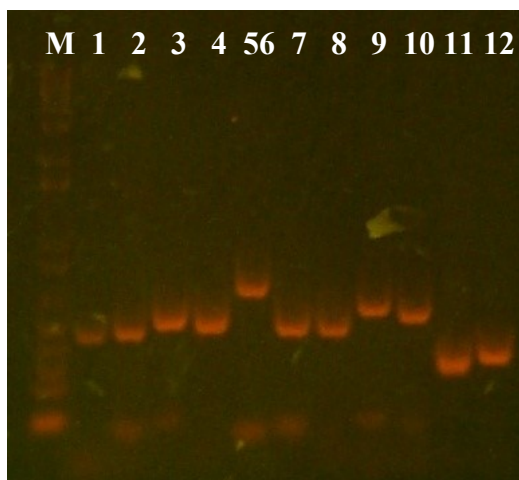
K navržení primerů jsme použili sekvence jednotlivých exonů a intronů odpovídajících sekvenci GenBank NM_016169.3. Primery jsme navrhovali do intronové oblasti alespoň 60–100 bp před začátkem exonu. Snažili jsme se, aby co nejvíc primerů mělo stejnou anelační teplotu v závislosti na sekvenci. Anelační teplotu může ovlivnit právě délka samotného primeru nebo počet bází cytosin a guanin, díky kterým je vyšší. Minimální délka primeru (forward i reverse) je 18 – 20 bází. Zároveň jsme se snažili vyhnout malým jednonukleotidovým polymorfismům SNPs, které jsou časté v evropské populaci. Ty by mohly negativně ovlivnit vazbu primeru na templátovou DNA. Dávali jsme pozor i na repetice v oblasti mezi forward a reverse primerem, které by znemožnily amplifikaci, nebo na samotnou strukturu oligonukleotidu, aby nedošlo ke vzniku sekundárních motivů (vlásky a smyčky).

Anelační teploty námi navržených primerů se pohybují v rozmezí od 49,0°C do 52,2°C. Pouze introny před a za exonem 1 byly bohaté na báze cytosin a guanin, proto introny v nich mají vyšší anelační teplotu (60,1°C a 60,5 °C). Exony 5 a 6 jsou v genu blízko u sebe a proto jsme rozhodli, že je budeme amplifikovat společně. Primery byly syntetizovány u firmy Generi Biotech.

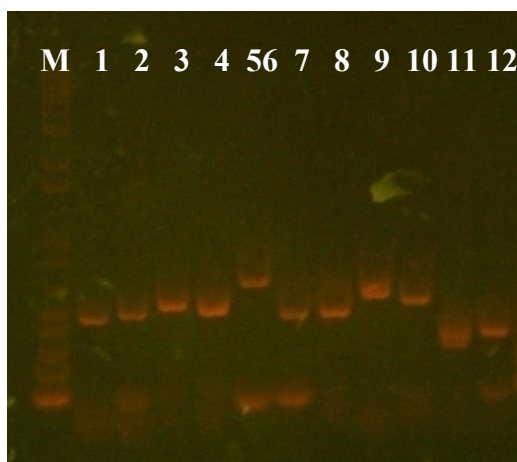
6.1.2. Ověření PCR reakce

Pro PCR reakci každého exonu jsme namíchali reakční směs s 1mM Mg²⁺. Pouze pro exon 1 jsme do reakční směsi museli přidat Betaine, DMSO a 7-deaza d-GTP, protože

obsahoval velké procento bází cytosin a guanin. Směs Betainu pomáhá vytvořit ideální podmínky pro sekvenaci exonů, které jsou bohaté na CG oblasti (Musso et al., 2006). Přítomnost PCR produktu jsme ověřili pomocí elektroforézy u 2 pacientů (Obr. 8 a 9).



Obrázek 8. Elektroforeogram PCR produktu genu *SUFU* (1. – 12. exon) s reakční směsí 1 mM Mg²⁺ u pacienta 8299.



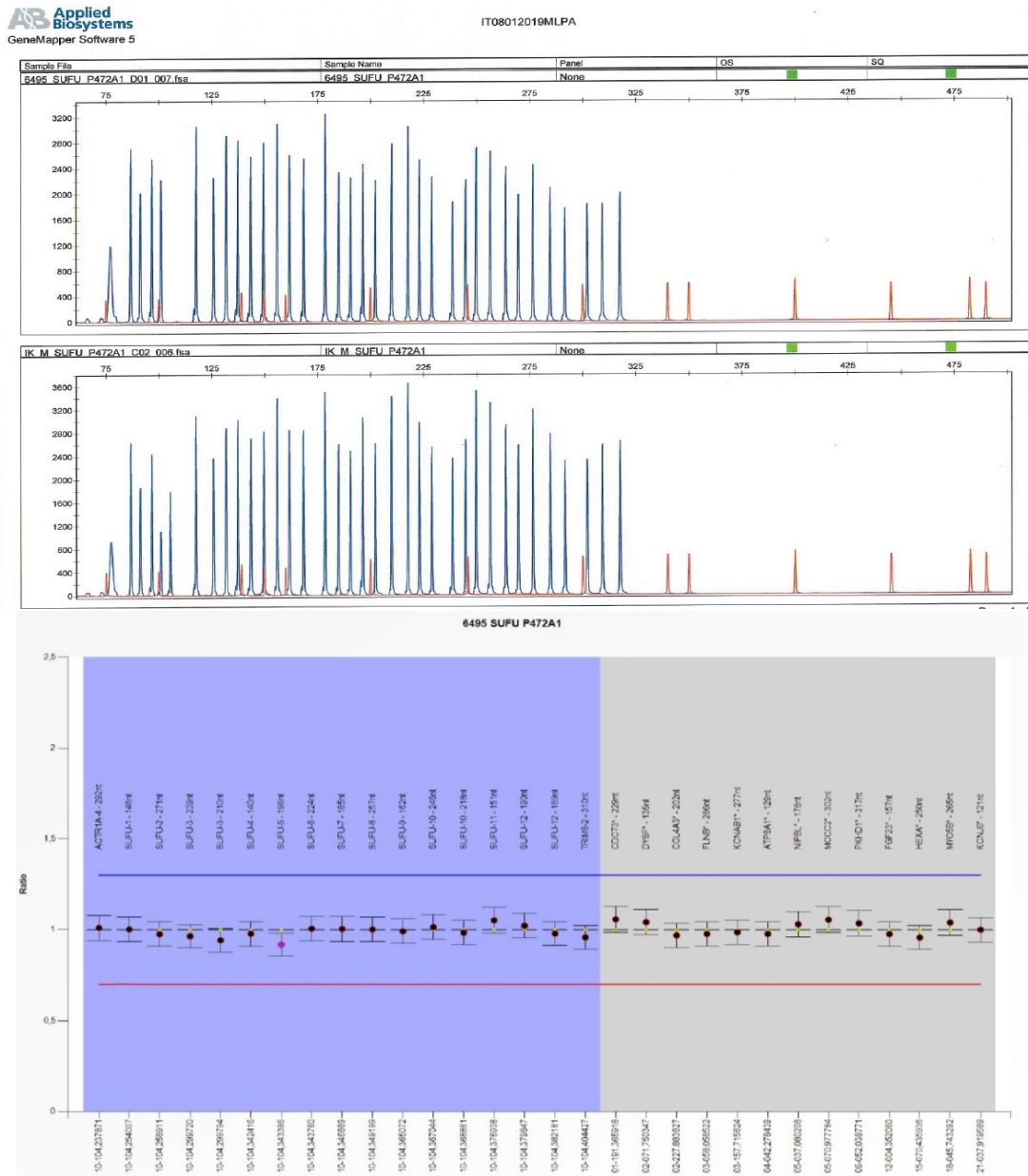
Obrázek 9. Elektroforeogram PCR produktu genu *SUFU* (1. – 12. exon) s reakční směsí 1 mM Mg²⁺ u pacienta 8671; M – značí marker, v našem případě 1Kb+.

6.1.3. Výsledky PCR reakce

Ověřili jsme, že navržené primery a příslušné protokoly PCR reakcí umožňují úspěšnou PCR amplifikaci všech exonů genu *SUFU* u všech vyšetřovaných nemocných v kvalitě potřebné pro Sangerovo sekvenování.

6.2. Výsledky analýzy metodu MLPA

Metodou MLPA jsme u 20 pacientů hledali změny počtu kopií (CNV) v genu *SUFU*. Ani u jednoho pacienta jsme neprokázali delecii nebo duplikace genu *SUFU*. Výsledky všech pacientů měly velmi dobrou reprodukovatelnost (Obr. 10).



Obrázek 10. Analýza genu *SUFU* metodou MLPA u pacienta 6495. Horní obrázek ukazuje výsledek metody v programu GeneMapper, přičemž každý pík představuje jednu sondu pro referenční úsek nebo pro exon. Horní řádek píků představuje vzorek pacienta a dolní řádek píků referenční kontrolu. Spodní obrázek ukazuje výsledek v programu

Coffalyser, kde tentokrát sondy znázorňují tečky. Modrá a červená linka představují hranici, která pokud je překročena, je v konkrétním exonu přítomná delece (červená linka) nebo duplikace (modrá linka).

6.3. Výsledky sekvenace DNA

6.3.1. Výsledky molekulárně genetického vyšetření genu *SUFU*

Gen *SUFU* jsme analyzovali u 30 nemocných. U 21 nemocných jsme analýzu provedli metodou Sangerova sekvenování jednotlivých exonů a metodou MLPA, u devíti nemocných byly varianty genu *SUFU* včetně CNV, analyzovány panelem NGS. U žádného z vyšetřovaných pacientů jsme neprokázali přítomnost patogenní varianty ani delece nebo duplikace genu *SUFU* jako možnou příčinu onemocnění. V genu *SUFU* jsme našli pouze již známé nepatogenní varianty. Přehled nepatogenních variant v genu *SUFU* zjištěných Sangerovým sekvenováním je uveden v Tabulce 11.

Tabulka 11. Přehled nepatogenních variant nalezených v genu *SUFU* u dvaceti studovaných pacientů.

SNP	Oblast genu	Genotyp			Alely		Frekvence heterozygotů (%)	
		Počet jedinců (N=20)			(%)		pozorovaná	očekávaná
c.182+16C>T	intron 2	CC	CT	TT	C	T	50,0	49,5
		6	10	4	22 (55)	18 (45)		
c.183-67_183-66delinsA	intron 2	AG	AGGCG	GCG	AG	GCG	35,0	34,9
		1	7	12	9 (22,5)	31 (77,5)		
c.183-49G>C	intron 2	GG	GC	CC	G	C	45,0	39,9
		10	9	1	29 (72,5)	11 (27,5)		
c.1022+49T>C	intron 9	TT	TC	CC	T	C	30,0	25,5
		14	6	0	34 (85)	6 (15)		

c.1157+99G>A	intron 10	GG GA AA	G	A	40,0	48
		8 8 4	24 (60)	16 (40)		
C.1365+19T>C	intron 12	TT TC CC	T	C	45,0	39,9
		1 9 10	11 (27,5)	29 (72,5)		
C.1299T>C	exon 11	TT TC CC	T	C	30,0	25,5
		14 6 0	34 (85)	6 (15)		

6.3.2. Výsledky molekulárně genetického vyšetření genu *PTCH1*

Gen *PTCH1* jsme analyzovali u deseti nově indikovaných nemocných (Tabulka 12). U jednoho pacienta/pacientky byla analýza provedena Sangerovým sekvenováním jednotlivých exonů. Vzhledem k nálezů patogenní varianty nebyla u pacienta/pacientky doplněna analýza delecí genu *PTCH1* metodou MLPA. U devíti nemocných byly varianty genu *PTCH1*, včetně CNV, analyzovány panelem NGS. V souboru deseti pacientů jsme našli 2 nové, dosud nepopsané, velmi pravděpodobně patogenní varianty v genu *PTCH1*, které jsou dále popsány.

Tabulka 12. Výsledky vyšetření genu *PTCH1* u deseti analyzovaných pacientů.

Číslo pacienta (viz Tabulka 6.)	Pohlaví	Splnění diagnostických kritérií	Nalezení mutace
4	muž	NE	NE
5	žena	NE	NE
9	muž	ANO	NE
10	žena	ANO	ANO
17	žena	NE	NE
21	žena	NE	NE
24	muž	NE	NE
26	žena	NE	NE
28	žena	ANO	ANO
29	žena	NE	NE

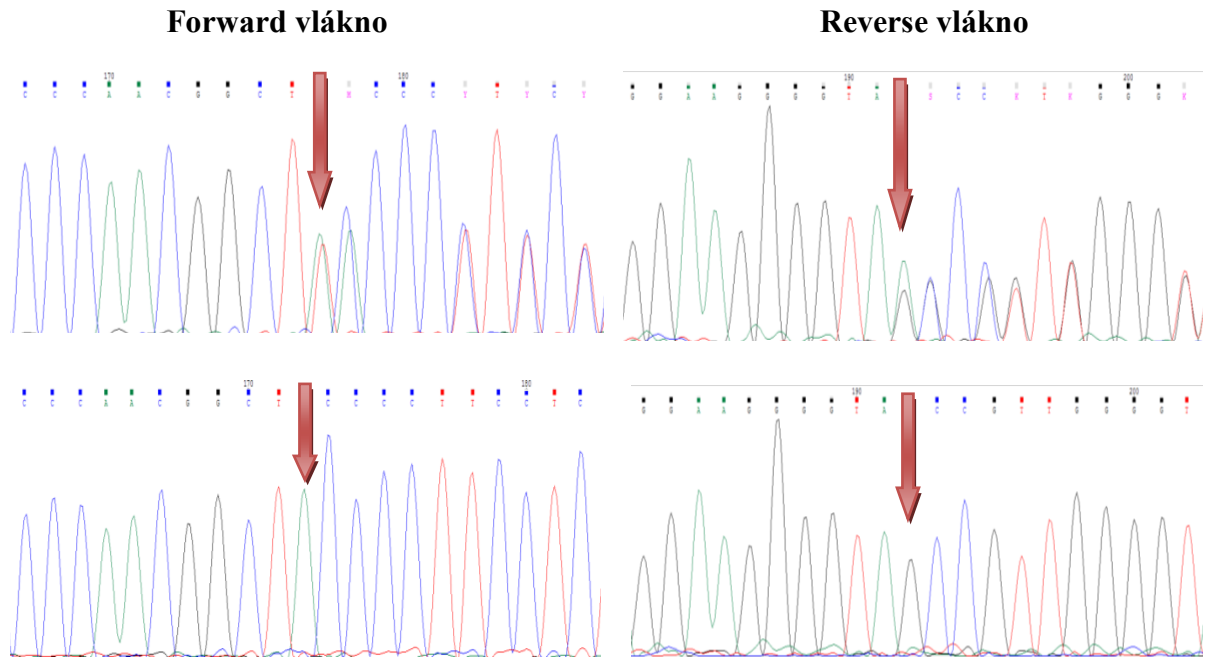
6.3.3. Pacientka č. 1

Pacientka č.1 (č. 28 v Tabulce 6) je žena narozená v roce 1950. Indikována byla k vyšetření v OLG FN Hradec Králové.

Pacientka trpí mnohočetnými bazaliomy od svých 25 let. Dále se v minulosti léčila s cystami v dolní čelisti a meningeomem. Antropometrické měření prokázalo makrocefalii a rentgenové vyšetření odhalilo abnormality žeber. V rodinné anamnéze se vyskytly bazaliomy u otce pacientky. Pacientka tedy splňuje tři majoritní kritéria a jedno minoritní pro stanovení klinické diagnózy Gorlinova syndromu.

Při sekvenační analýze genu *PTCH1* jsme u pacientky odhalili variantu c.3037dupT v heterozygotním stavu (Obr.11). V důsledku duplikace jednoho nukleotidu dochází k posunu čtecího rámce a ke vzniku předčasného terminačního kodonu p.(Tyr1013Leufs*132). To pravděpodobně vede k syntéze zkráceného a nefunkčního proteinu PTCH1. Podle současných znalostí se jedná o velmi pravděpodobně patogenní variantu, která je velmi pravděpodobně příčinou Gorlinova syndromu u probandky.

Charakter nalezené varianty jsme ověřili *in silico* v programu Mutation Taster, který ji hodnotil jako patogenní (Obr.12). Nalezená patogenní varianta nebyla zatím v literatuře popsána. Patogenitu nalezené varianty odvozujeme z faktu, že se jedná o frameshift mutaci, která je s velkou pravděpodobností patogenní, neboť pravděpodobně vede k syntéze abnormálního zkráceného polypeptidového řetězce na C–konci proteinu o délce 132 aminokyselinových zbytků a ke vzniku předčasného terminačního kodonu.



Obrázek 11. Výsledek sekvenční analýzy pacientky č.1 (horní 2 obrázky) a referenční sekvenky bez mutace (dolní 2 obrázky). V levém sloupci jsou forward vlákna a v pravém sloupci reverse vlákna. Šipkou je znázorněna patogenní varianta c.3037dupT p.(Tyr1013Leufs*132) v genu *PTCH1*.



mutation t@sting

Prediction disease causing

Model: *complex_aae*, prob: 1 (classification due to NMD, [real probability](#) is shown anyway) [\(explain\)](#)

Summary

- NMD
- amino acid sequence changed
- frameshift
- protein features (might be) affected
- splice site changes

[hyperlink](#)

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr9:98220425_98220426insA
HGNC symbol	PTCH1
Ensembl transcript ID	ENST00000331920
Genbank transcript ID	NM_000264
UniProt peptide	Q13635
alteration type	insertion
alteration region	CDS
DNA changes	c.3037_3038insT cDNA 3337_3338insT g.58914_58915insT
AA changes	Y1013Lfs*132
position(s) of altered AA	1013 (frameshift or PTC - further changes downstream)
if AA alteration in CDS	yes
frameshift	yes

Obrázek 12. Interpretace patogenity varianty c.3037dupT *in silico* v programu Mutation Taster (URL3).

6.3.4. Pacientka č. 2

Pacientka č.2 (č. 10 v Tabulce 6) je žena narozená v roce 1992. Indikována byla k vyšetření v OLG FN Olomouc.

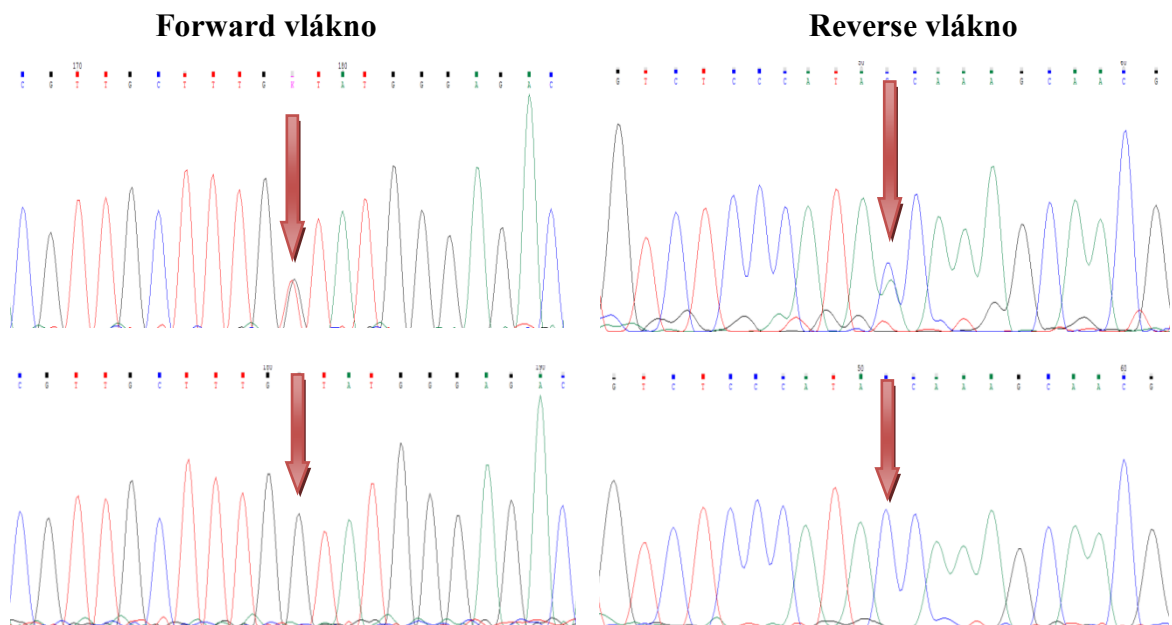
Pacientka trpí mnohočetnými odontogenními keratocystami, jež první měla v 17 letech. Antropometrické měření odhalilo makrocefálii, Sprengelovu deformitu lopatky a naznačené dysmorfické rysy obličeje (široký kořen nosu, plochou malární oblast, prognacii a níže posazené ušní boltce). Pacientka splňuje jedno majoritní a alespoň dvě minoritní kritéria pro stanovení klinické diagnózy Gorlinova syndromu.

Panel NGS odhalil v genomové DNA této pacientky heterozygotní variantu v exonu 19 v genu *PTCHI* (Obr. 13). Jednalo se o variantu c.3306+1G>T, p.(?) v sestřihovém místě exonu 19. Ani tato varianta nebyla dosud u nemocných s Gorlinovým syndromem popsána. Tato varianta ruší kanonické místo střihu a je podle současných znalostí velmi pravděpodobně patogenní a je velmi pravděpodobně příčinou Gorlinova syndromu. Ověření nálezu jsme provedli pomocí Sangerovy sekvenační metody (Obr.14). Ztrátu sestřihového místa jsme ověřili *in silico* pomocí programu Alamut (Obr.15), který umožňuje porovnat pět predikčních programů. Tři z těchto programů předpověděly ztrátu sestřihového místa jako důsledek zjištěné varianty. Ztráta sestřihového místa může vést k různým poruchám sestřihu mRNA, např. vystřižení jednoho nebo několika exonů, nebo k použití kryptického sestřihového místa, pokud takové v okolní sekvenci DNA existuje. K přesnému stanovení důsledků zjištěné varianty by bylo nutné analyzovat u pacientky sestřih na úrovni RNA.

SNVs/INDELS (retained)

Gene Transcript	Exon	c.DNA Protein alteration	Variant Fraction Coverage (ref / alt)	Coding conseq.	Pathogenicity	ClinVar	ACMG
<i>PTCH1</i> NM_000264	19	c.3306 + 1G>T p.?	48.42 % (521 / 489)	splice_donor_+ 1	Prediction B Potentially Pathogenic		V
<i>PTCH1</i> NM_000264	23	c.3944C>T p.Pro1315Leu	49.24 % (504 / 489)	missense	Flagged Pathogenicity 1 Benign	Benign rs357564	I
<i>PTCH1</i> NM_000264	12	c.1665T>C p.= (p.Asn555Asn)	52.56 % (535 / 595)	synonymous	Prediction D Likely Benign	Benign/Likely benign rs1805155	I

Obrázek 13. Výsledná zpráva z panelu NGS pacientky č.2. V genu *PTCH1* byly nalezeny tři varianty z toho dvě benigní a jedna patogenní.



Obrázek 14. Výsledek sekvenační analýzy pacientky č.2 (horní 2 obrázky) a referenční sekvence bez mutace (dolní 2 obrázky). V levém sloupci jsou forward vlákna a v pravém sloupci reverse vlákna. Šipkou je znázorněna patogenní varianta c.3306+1G>T, p.(?).



Obrázek 15. Ověření pozice sestřihového místa za exonem 19 genu *PTCH1*.

Horní řádek znázorňuje referenční sekvenci a nad ní jsou naznačeny místa sestřihu podle pěti různých predikčních programů (modře napsané). Červeně je vyznačena pozice, ve které jsme našli patogenní variantu. Tři z pěti prediktivních programů označily toto místo za sestřihové. V dolním řádku je mutovaná sekvence, ve které již sestřihové místo chybí.

7. Diskuze

Cílem práce bylo zavést analýzu genů *PTCHI* a *SUFU* s pomocí nových metod a analyzovat pomocí těchto metod geny *PTCHI* a *SUFU* u vybraného souboru nemocných.

Primery pro amplifikaci jednotlivých exonů genu *SUFU* jsme navrhli s ohledem na, v současnosti známé varianty typu SNP nebo CNV v intronech, které by mohly vést k chybnému nasedání primerů a amplifikaci pouze jedné z vyšetřovaných kopií genu, jak se často dělo v minulosti. Tento postup snížil riziko falešné negativy vyšetření. Pro spolehlivost metody svědčí i nevýznamné rozdíly mezi pozorovanou a očekávanou frekvencí heterozygotů pro jednotlivé analyzované nepatogenní varianty. Můžeme tedy předpokládat, že naše metoda Sangerova sekvenování je schopna zachytit přítomnou mutaci s vysokou pravděpodobností, přestože jsme žádnou patogenní variantu v genu *SUFU* neprokázali, a že jsme tedy nosičství patogenní varianty genu *SUFU* u vyšetřených pacientů s vysokou pravděpodobností vyloučili. Tato skutečnost je významná pro stanovení prognózy, zejména pro stanovení rizika meduloblastomu u vyšetřovaných osob a jejich příbuzných.

Nízký, resp. nulový záchyt mutací genu *SUFU* ve vyšetřovaném souboru odpovídá výsledkům zahraničních studií (Smith et al., 2014). Lze jej vysvětlit tím, že jen u jednoho z třiceti vyšetřených pacientů našeho souboru se v osobní nebo rodinné anamnéze vyskytl meduloblastom. Šlo o dvouletou dívku s makrocefalií a meduloblastomem mozečku a s negativní rodinnou anamnézou. Onemocnění u ní mohlo být způsobeno zárodečnou mutací jiného genu. Nelze ale vyloučit, že mutace v genu *SUFU* u ní nebyla použitou metodou prokázána. Trvá-li podezření na nosičství mutace genu *SUFU* a je-li to významné např. pro rozhodnutí o léčbě a dalším sledování pacientky, mohou být využity další alternativní vyšetřovací metody (Waszak et al, 2018). To, že v našem souboru žádná patogenní varianta nalezena nebyla, lze také vysvětlit menším výskytem těchto variant v české populaci.

U deseti nemocných s podezřením na Gorlinův syndrom jsme vyšetřili gen *PTCHI*. Patogenní variantu genu *PTCHI* jsme prokázali u dvou pacientek. Jen tři z deseti vyšetřovaných osob splnili klinická kritéria pro Gorlinův syndrom. U dvou z těchto pacientů (2 ze 3, 67%) byla patogenní varianta nalezena. Soubor je zatím příliš malý,

účinnost metody NGS panelu bude vyhodnocena po vyšetření většího počtu pacientů. Předpokládáme, že účinnost nebude nižší než u donedávna používané metody sekvenování dle Sangera, která byla ve FN v Motole 50%. Metoda NGS je přitom schopna detegovat i CNV v jednom kroku, což významně zjednodušuje a zkracuje diagnostický proces.

Analýza genu *PTCH1* metodou NGS je nyní dostupná jako součást panelu genů i u nemocných s holoprosencefalií. Přínos metody pro molekulárně genetickou diagnostiku holoprosencefalie bude moci být vyhodnocen až po vyšetření většího souboru nemocných.

8. Závěr

Klinická diagnostika Gorlinova syndromu není snadná. Gorlinův syndrom se projevuje různými příznaky, z nichž některé se vyvinou teprve s přibývajícím věkem pacienta a podezření na tento syndrom může potvrdit nebo vyvrátit jen molekulárně genetické vyšetření genů *PTCH1* a *SUFU*.

Výsledkem této diplomové práce je identifikace dvou dosud nepopsaných patogenních variant genu *PTCH1* u nemocných s Gorlinovým syndromem.

Nosičství mutace genu *SUFU* jsme s vysokou pravděpodobností vyloučili u třiceti nemocných s podezřením na Gorlinův syndrom. Toto zjištění je významné pro upřesnění prognózy, zejména upřesnění rizika výskytu meduloblastomu u těchto nemocných a jejich příbuzných.

Práce dále přispěla k rozšíření molekulárně genetického vyšetření u pacientů s podezřením na Gorlinův syndrom ve FN Motol. Úspěšně jsme zavedli analýzu genu *SUFU*, která se zde do roku 2016 vůbec neprováděla. Zavedli jsme a ověřili vyšetření genů *SUFU* a *PTCH1* pomocí NGS panelu. Vyšetření genu *PTCH1* pomocí NGS panelu bude využito i pro rozšíření diagnostiky holoprosencefalie.

Budoucí pacienti s podezřením na Gorlinův syndrom budou vyšetřeni panelem NGS, což významným způsobem urychlí molekulárně genetickou diagnostiku u těchto nemocných. Námi zavedené metody Sangerova sekvenování genu *SUFU* a detekce CNV genu *SUFU* metodou MLPA se budou dále v praxi používat k ověření nálezů v genu *SUFU* po pozitivním nálezu v NGS.

Diplomová práce splnila stanovené cíle. Zavedené metody budou dále využívány v molekulárně genetické diagnostice Gorlinova syndromu a holoprosencefalie. Výsledky vyšetření byly nebo budou využity v klinické praxi, jako podklad pro stanovení genetické prognózy a další péče o vyšetřené pacienty a jejich příbuzné.

9. Literatura

9.1. Publikace

- Acocella, A., Sacco, R., Bertolai, R., & Sacco, N. (2009). Genetic and clinicopathologic aspects of Gorlin-Goltz syndrome (NBCCS): presentation of two case reports and literature review. *Minerva stomatol*, 58(1–2), 43–53.
- Ågren, M., Kogerman, P., Kleman, M. I., Wessling, M., & Toftga, R. (2004). Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene*, 330, 101–114.
- Ahn, S., Lim, Y., Kim, D., Kim, S., Lee, S., & Yoon, J. (2004). Nevroid basal cell carcinoma syndrome: a retrospective analysis of 33 affected Korean individuals. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 33(5), 458–462.
- Aikin, R., Cervantes, A., D'Angelo, G., Ruel, L., Lacas-Gervais, S., Schaub, S., & Théron, P. (2012). A genome-wide RNAi screen identifies regulators of cholesterol-modified hedgehog secretion in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 7(3), e33665.
- Bale, A. E. (2002). Hedgehog signaling and human disease. *Annual review of genomics & Human genetics*, 3(1), 47–65.
- Barr, M., Hanson, J. W., Currey, K., Sharp, S., Toriello, H., & Schmickel, R. D. (1983). Holoprosencephaly in infants of diabetic mothers. *The journal of pediatrics*, 102(4), 565–568.
- Boutet, N., Bignon, Y. J., Drouin-Garraud, V., Sarda, P., Longy, M., Lacombe, D., & Gorry, P. (2003). Spectrum of PTCH1 mutations in French patients with Gorlin syndrome. *Journal of investigative dermatology*, 121(3), 478–481.
- Brugières, L., Pierron, G., Chompret, A., Bressac-de Paillerets, B., Di Rocco, F., Varlet, P., Pierre-Kahn, A., Caron, O., Grill, J., & Delattre, O. (2009). Incomplete penetrance of the predisposition to medulloblastoma associated with germ-line SUFU mutations. *Journal of medical genetics*, 47(2), 142–144.
- Brugières, L., Remenieras, A., Pierron, G., Varlet, P., Forget, S., Byrde, V., Bombled, J.,

- Puget, S., Caron, O., Dufour, C., Delattre, O., Bressac- de Paillerets, B., & Grill, J. (2012). High frequency of germline SUFU mutations in children with desmoplastic/nodular medulloblastoma younger than 3 years of age. *Journal of clinical oncology*, *30*(17), 2087–2093.
- Brutkiewicz, R. R. (2016). Cell signaling pathways that regulate antigen presentation. *The journal of immunology*, *197*(8), 2971–2979.
- Bumcrot, D. A., Takada, R., & McMahon, A. P. (1995). Proteolytic processing yields two secreted forms of Sonic hedgehog. *Molecular and cellular biology*, *15*(4), 2294–2303.
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K. A., Dickson, B. J., & Basler, K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified Hedgehog from signaling cells. *Cell*, *99*(7), 803–815.
- Chen, Y., & Jiang, J. (2013). Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. *Cell research*, *23*(2), 186–200.
- Christ, A., Herzog, K., & Willnow, T. E. (2016). LRP2, an auxiliary receptor that controls Sonic Hedgehog signaling in development and disease. *Developmental dynamics*, *245*(5), 569–579.
- Clark, A. M., Garland, K. K., & Russell, L. D. (2000). Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biology of reproduction*, *63*(6), 1825–1838.
- Cohen, M. M. (2006). Holoprosencephaly : Clinical, anatomic, and molecular dimensions. *Birth defects research Part A: Clinical and molecular teratology*, *76*(9), 658–673.
- Dubourg, C., Bendavid, C., Pasquier, L., Henry, C., Odent, S., & David, V. (2007). Holoprosencephaly. *Orphanet journal of rare diseases*, *2*(1), 8.
- Dyer, M. A., Farrington, S. M., Mohn, D., Munday, J. R., & Baron, M. H. (2001). Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development*, *128*(10), 1717–1730.

- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, *75*(7), 1417–1430.
- Edison, R., & Muenke, M. (2003). The interplay of genetic and environmental factors in craniofacial morphogenesis: holoprosencephaly and the role of cholesterol. *Congenital anomalies*, *43*(1), 1–21.
- Evans, D. G., Howard, E., Giblin, C., Clancy, T., Spencer, H., Huson, S. M., & Laloo, F. (2010). Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: Estimates from a UK family genetic register service. *American journal of medical genetics, Part A*, *152*(2), 327–332.
- Evans, D. Gareth, & Farndon, P. A. (2002). Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome. *GeneReviews, University of Washington, Seattle, WA, (Updated 29 March 2018)*.
- Evans, D G, Ladusans, E. J., Rimmer, S., Burnell, L. D., Thakker, N., & Farndon, P. A. (1993). Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *Journal of medical genetics*, *30*(6), 460–464.
- Evans, D. G., Oudit, D., Smith, M. J., Rutkowski, D., Allan, E., Newman, W. G., & Lear, J. T. (2017). First evidence of genotype – phenotype correlations in Gorlin syndrome. *Journal of medical genetics*, *54*(8), 530–536.
- Fan, Z., Li, J., Du, J., Zhang, H., Shen, Y., Wang, C. Y., & Wang, S. (2008). A missense mutation in PTCH2 underlies dominantly inherited NBCCS in a Chinese family. *Journal of medical genetics*, *45*(5), 303–308.
- Filmus, J., & Capurro, M. (2014). The role of glypicans in Hedgehog signaling. *Matrix biology*, *35*, 248–252.
- Foulkes, W. D., Kamihara, J., Evans, D. G. R., Brugières, L., Bourdeaut, F., Molenaar, J. J., Walsch, M. F., Brodeur, G. M., & Diller, L. (2017). Cancer surveillance in Gorlin syndrome and rhabdoid tumor predisposition syndrome. *Clinical cancer research*, *23*(12), e62–e67.

- Fujii, K., Ohashi, H., Suzuki, M., Hatsuse, H., Shiohama, T., Uchikawa, H., & Miyashita, T. (2013). Frameshift mutation in the PTCH2 gene can cause nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Familial cancer, 12*(4), 611–614.
- Gianferante, D. M., Rotunno, M., Dean, M., Zhou, W., Hicks, B. D., Wyatt, K., Jones, K., Wang, M., Zhu, B., Goldstein, A. M., & Mirabello, L. (2018). Whole exome sequencing of nevoid basal cell carcinoma syndrome families and review of human gene mutation database PTCH1 mutation data. *Molecular genetics & genomic medicine, 6*(6), 1168–1180.
- Gonnissen, A., Isebaert, S., & Haustermans, K. (2015). Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. *Oncotarget, 6*(16), 13089–13913.
- Goodrich, L. V., & Scott, M. P. (1998). Hedgehog and Patched in neural development and disease. *Neuron, 21*(6), 1243–1257.
- Gorlin, R. J., & Goltz, R. W. (1960). Multiple Nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. *Journal of medicine, 262*(18), 908–912.
- Grimm, T., Teglund, S., Tackels, D., Sangiorgi, E., Gurrieri, F., Schwartz, C., & Toftgård, R. (2001). Genomic organization and embryonic expression of Suppressor of Fused, a candidate gene for the split-hand/split-foot malformation type 3. *FEBS letters, 505*(1), 13–17.
- Guerrini-Rousseau, L., Dufour, C., Varlet, P., Masliah-Planchon, J., Bourdeaut, F., Guillaud-Bataille, M., Abbas, R., Bertozzi, A., Fouyssac, F., Huybrechts, S., Puget, S., Bressac-De Paillerets, B., Caron, O., Sevenet, N., Dimaria, M., Villebasse, S., Delattre, O., Valteau-Couanet, D., Grill, J., & Brugières, L. (2018). Germline SUFU mutation carriers and medulloblastoma: clinical characteristics, cancer risk, and prognosis. *Neuro-oncology, 20*(8), 1122–1132.
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Unden, A. B., Gillies, S., Negus, K., Smyth, I., Pressman, C., Leffell, D. J., Gerrard, B., Goldstein, A. M., Dean, M., Tofgard, R., Chenevix-Trench, G., Wainwright, B., & Bale, A. E. (1996). Mutations of the human

- homolog of drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85(6), 841–851.
- Hahn, J. S., Barnes, P. D., Clegg, N. J., & Stashinko, E. E. (2010). Septopreoptic holoprosencephaly: A mild subtype associated with midline craniofacial anomalies. *American journal of neuroradiology*, 31(9), 1596–1601.
- Hamza, A., & Higgins, J. M. (2017). Holoprosencephaly. *Autopsy and case reports*, 7(4), 22–25.
- Hendi, J. M., Nemerofsky, R., Stolman, C., & Granick, M. S. (2004). Plastic surgery considerations for holoprosencephaly Patients. *Journal of craniofacial surgery*, 15(4), 675–677.
- Hennekam, R. C. M., Van Noort, G., de la Fuente, F. A., & Norbruis, O. F. (1991). Agenesis of the nasal septal cartilage: another sign in autosomal dominant holoprosencephaly. *American journal of medical genetics*, 39(1), 121–122.
- Hong, M., & Krauss, R. S. (2017). Ethanol itself is a holoprosencephaly-inducing teratogen. *PLoS ONE*, 12(4), e0176440.
- Huq, A. J., Walsh, M., Rajagopalan, B., Finlay, M., Trainer, A. H., Bonnet, F., Sevenet, N., & Winship, I. M. (2018). Mutations in SUFU and PTCH1 genes may cause different cutaneous cancer predisposition syndromes: similar, but not the same. *Familial cancer*, 17(4), 601–606.
- Ingham, P. W., & McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*, 15(23), 3059–3087.
- Itkin, A., & Gilchrest, B. A. (2004). d -Aminolevulinic acid and blue light photodynamic therapy for treatment of multiple Basal cell carcinomas in two patients with Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatologic surgery*, 30(7), 1054–1061.
- John, A. M., & Schwartz, R. A. (2016). Basal cell naevus syndrome: an update on genetics and treatment. *British journal of dermatology*, 174(1), 68–76.

- Johnson, J. F. A., Hall, T. E., Dyson, J. M., Sonntag, C., Ayers, K., Berger, S., Gautier, P., Mitchell, C., Hollway, G. E., Currie, P. D. (2012). Scube activity is necessary for Hedgehog signal transduction in vivo. *Developmental biology*, 368(2), 193–202.
- Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V, Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H., & Scott, M. P. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the Basal cell nevus syndrome. *Science*, 272(5268), 1668–1671.
- Kalderon, D. (2004). Hedgehog signaling: Costal-2 bridges the transduction gap. *Current biology*, 14(2), 67–69.
- Kijima, C., Miyashita, T., Suzuki, M., Oka, H., & Fujii, K. (2012). Two cases of nevoid basal cell carcinoma syndrome associated with meningioma caused by a PTCH1 or SUFU germline mutation. *Familial cancer*, 11(4), 565–570.
- Kimonis, V. E., Goldstein, A. M., Pastakia, B., Yang, M. L., Kase, R., Digiovanna, J. J., Bale, A. E., Bale, S. J. (1997). Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *American journal of medical genetics*, 69(3), 299–308.
- Kimonis, V. E., Mehta, S. G., Digiovanna, J. J., & Bale, S. J. (2004). Radiological features in 82 patients with nevoid basal cell carcinoma (NBCC or Gorlin) syndrome. *Genetics in medicine*, 6(6), 495–502.
- Kimonis, V. E., Singh, K. E., Zhong, R., Pastakia, B., DiGiovanna, J. J., & Bale, S. J. (2013). Clinical and radiological features in young individuals with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Genetics in medicine*, 15(1), 79–83.
- Klein, R. D., Dykas, D. J., & Bale, A. E. (2005). Clinical testing for the nevoid basal cell carcinoma syndrome in a DNA diagnostic laboratory. *Genetics in medicine*, 7(9), 611–619.
- Koch, A., Waha, A., Hartmann, W., Milde, U., Goodyer, C. G., Sörensen, N., Berhold, F., Digon-Söntgerarh, B., Kratzschman, J., Wiestler, O. D., & Pietsch, T. (2004). No evidence for mutations or altered expression of the Suppressor of Fused gene (SUFU)

- in primitive neuroectodermal tumours. *Neuropathology and applied neurobiology*, *30*(5), 532–539.
- Kogerman, P., Krause, D., Rahnema, F., Kogerman, L., Undén, A. B., Zaphiropoulos, P. G., & Toftgård, R. (2002). Alternative first exons of PTCH1 are differentially regulated in vivo and may confer different functions to the PTCH1 protein. *Oncogene*, *21*(39), 6007–6016.
- Kowatsch, C., Woolley, R. E., Kinnebrew, M., Rohatgi, R., & Siebold, C. (2019). Structures of vertebrate Patched and Smoothed reveal intimate links between cholesterol and Hedgehog signalling. *Current opinion in structural biology*, *57*, 204–214.
- Lee, R. T. H., Zhao, Z., & Ingham, P. W. (2016). Hedgehog signalling. *Development*, *143*(3), 367–372.
- Levey, E. B., Stashinko, E., Clegg, N. J., & Delgado, M. R. (2010). Management of children with holoprosencephaly. *Journal of medical genetics Part C: Seminars in medical genetics*, *154*(1), 183–190.
- McMahon, A. P. (2000). More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell*, *100*(2), 185–188.
- McMillan, R., & Matsui, W. (2012). Molecular Pathways: The Hedgehog signaling pathway in cancer. *Clinical cancer research*, *18*(18), 4883–4889.
- Merchant, M., Vajdos, F. F., Ultsch, M., Maun, H. R., Wendt, U., Cannon, J., Desmarais, W., Lazarus, R. A., de Vos, A. M., & de Sauvage, F. J. (2004). Suppressor of Fused regulates Gli activity through a dual binding mechanism. *Molecular and cellular biology*, *24*(19), 8627–8641.
- Mercier, S., Dubourg, C., Belleguic, M., Pasquier, L., Loget, P., Lucas, J., Bendavid, C., Odent, S. (2010). Genetic counseling and “molecular” prenatal diagnosis of holoprosencephaly (HPE). *American journal of medical genetics, Part C: Seminars in medical genetics*, *154*(1), 191–196.

- Ming, J. E., Kaupas, M. E., Roessler, E., Brunner, H. G., Golabi, M., Tekin, M., Stratton, R. F., Sujansky, E., Bale, S. J., & Muenke, M. (2002). Mutations in Patched-1 , the receptor for Sonic hedgehog, are associated with holoprosencephaly. *Human genetics*, *110*(4), 297–301.
- Ming, J. E., Roessler, E., & Muenke, M. (1998). Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Molecular medicine today*, *4*(8), 343–349.
- Monnier, V., Dussillol, F., Alves, G., Lamour-Isnard, C., & Plessis, A. (1998). Suppressor of fused links Fused and Cubitus interruptus on the Hedgehog signalling pathway. *Current biology*, *8*(10), 583–586.
- Mougel, F., Debarbieux, S., Ronger-Savlé, S., Dalle, S., & Thomas, L. (2009). Methylaminolaevulinate photodynamic therapy in patients with multiple basal cell carcinomas in the setting of Gorlin-goltz syndrome or after radiotherapy. *Dermatology*, *219*(2), 138–142.
- Musso, M., Bocciardi, R., Parodi, S., Ravazzolo, R., & Ceccherini, I. (2006). Betaine, Dimethyl Sulfoxide, and 7-Deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *The journal of molecular diagnostics*, *8*(5), 544–550.
- Muzio, L. L. (2008). Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet journal of rare diseases*, *3*(1), 32.
- Muzio, L. L., Nocini, P. F., Savoia, A., Consolo, U., Procaccini, M., Zelante, L., Pannone, G., Bucci, P., Dolci, M., Bambini, F., Solda, P., & Favia, G. (1999). Nevoid basal cell carcinoma syndrome. Clinical findings in 37 Italian affected individuals. *Clinical genetics*, *55*(1), 34–40.
- Nüsslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, *287*(5785), 795–801.
- Pallangyo, P., Lyimo, F., Nicholaus, P., Makungu, H., Mtolera, M., & Mawenya, I. (2016). Semilobar holoprosencephaly in a 12 month-old baby boy born to a primigravida patient with type 1 diabetes mellitus: a case report. *Journal of medical case reports*, *10*(1), 358.

- Pastorino, L., Ghiorzo, P., Nasti, S., Battistuzzi, L., Cusano, R., Marzocchi, C., Garré, M. L., Clementi, M., & Bianchi Scarrá, G. (2009). Identification of a SUFU germline mutation in a family with Gorlin syndrome. *American journal of medical genetics, Part A*, *149*(7), 1539–1543.
- Pauwels, C., Mazereeuw-Hautier, J., Basset-Seguin, N., Livideanu, C., Viraben, R., Paul, C., & Meyer, N. (2010). Topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy for management of basal cell carcinomas in patients with basal cell nevus syndrome improves patient's satisfaction and reduces the need for surgical procedures. *Journal of the European academy of dermatology and venereology*, *25*(7), 861–864.
- Pham, A., Therond, P., Alves, G., Tournier, F. B., Busson, D., Lamour-Isnard, C., Limbourg Bouchon, B., Pr at, T., & Tricoire, H. (1995). The suppressor of fused gene encodes a novel PEST protein involved in Drosophila segment polarity establishment. *Genetics*, *140*(2), 587–598.
- Petrobono, S., Gagliardi, S., & Stecca, B. (2019). Non-canonical Hedgehog signaling pathway in cancer: Activation of GLI transcription factors beyond Smoothed. *Frontiers in genetics*, *10*, 556.
- Plevova, P., Krutilkova, V., Puchmajerova, A., & Foretova, L. (2009). Gorlin syndrome. *Klinicka onkologie*, *22*, 34–35.
- Pola, R., Ling, L. E., Silver, M., Corbley, M. J., Kearney, M., Blake Pepinsky, R., Shapiro, R., Taylor, F. R., Baker, D. P., Asahara, T., & Isner, J. M. (2001). The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nature medicine*, *7*(6), 706–711.
- Pruvost-Balland, C., Gorry, P., Boutet, N., Magnaldo, T., Mamelle, G., Margulis, A., Kolb, F., Duvillard, P., Spatz, A., Brugi eres, L., Chompret, A., & Avril, M. F. (2006). Clinical and genetic study in 22 patients with basal cell nevus syndrome. *Annales de dermatologie et de v n r ologie*, *133*(2), 117–123.
- Rahmana, F., Toftgard, R., & Zaphiropoulos, P. G. (2004). Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochemical journal*, *334*(2), 325–334.

- Reinders, M. G., van Hout, A. F., Cosgun, B., Paulussen, A. D., Leter, E. M., Steijlen, P. M., Mosterd, K., van Geel, M., & Gille, J. J. (2018). New mutations and an updated database for the patched-1 (PTCH1) gene. *Molecular genetics & genomic medicine*, 6(3), 409–415.
- Shanley, S., Ratcliffe, J., Hockey, A., Haan, E., Oley, C., Ravine, D., Martin, N., Wicking, C., & Chenevix-Trench, G. (1994). Nevoid basal cell carcinoma syndrome: Review of 118 affected individuals. *American journal of medical genetics*, 50(3), 282–290.
- Sinha, S., & Chen, J. K. (2006). Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened. *Nature chemical biology*, 2(1), 29–30.
- Skvara, H., Kalthoff, F., Meingassner, J. G., Wolff-Winiski, B., Aschauer, H., Kelleher, J. F., Wu, X., Pan, S., Mickel, L., Schuster, C., Stary, G., Jalili, A., David, O. J., Emotte, C., Costa Antunes, A. M., Rose, K., Decker, J., Carlson, I., Gardner, H., Stuetz, A., Bertolino, A. P., Stingl, G., & De Rie, M. A. (2011). Topical treatment of Basal cell carcinomas in Nevoid basal cell carcinoma syndrome with a smoothened inhibitor. *Journal of investigative dermatology*, 131(8), 1735–1744.
- Slade, I., Murray, A., Hanks, S., Kumar, A., Walker, L., Hargrave, D., Douglas, J., Stiller, C., Izatt, L., & Rahman, N. (2010). Heterogeneity of familial medulloblastoma and contribution of germline PTCH1 and SUFU mutations to sporadic medulloblastoma. *Familial cancer*, 10(2), 337–342.
- Smith, M. J., Beetz, C., Williams, S. G., Bhaskar, S. S., O’Sullivan, J., Anderson, B., Daly, S. B., Urquhart, J. E., Bholah, Z., Oudit, D., Cheesman, E., Kelsey, A., McCabe, M. G., Newnam, W. G., & Evans, D. G. R. (2014). Germline mutations in SUFU cause Gorlin syndrome-associated childhood medulloblastoma and redefine the risk associated with PTCH1 mutations. *Journal of clinical oncology*, 32(36), 4155–4161.
- Smyth, I., Narang, M. A., Evans, T., Heimann, C., Nakamura, Y., & Wainwright, B. J. (1999). Isolation and characterization of human Patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Human molecular genetics*, 8(2), 291–297.

- Solomon, B. D., Gropman, A., & Muenke, M. (2013). Holoprosencephaly Overview. *GeneReviews, University of Washington, Seattle, WA, (Updated 29 August 2013)*.
- Summers, A. D., Reefhuis, J., Taliano, J., & Rasmussen, S. A. (2018). Nongenetic risk factors for holoprosencephaly: An updated review of the epidemiologic literature. *American journal of medical genetics, Part C: Seminars in medical genetics, 178(2)*, 151–164.
- Taylor, M. D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C. chung, Mainprize, T. G., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., Hao, A., Goldstein, A. M., Stavrou, T., Scherer, S. W., Dura, W. T., Wainwright, B., Squire, J. A., Rutka, J. T., & Hogg, D. (2002). Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nature genetics, 31(3)*, 306–310.
- Tostar, U., Malm, C. J., Meis-Kindblom, J. M., Kindblom, L. G., Toftgård, R., & Undén, A. B. (2006). Deregulation of the hedgehog signalling pathway: A possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *Journal of pathology, 208(1)*, 17–25.
- Villavicencio, E. H., Walterhouse, D. O., & Iannaccone, P. M. (2000). The Sonic hedgehogpatched- Gli pathway in human development and disease. *American journal of human genetics, 67(5)*, 1047–1054.
- Von Hoff, D. D., LoRusso, P. M., Rudin, C. M., Reddy, J. C., Yauch, R. L., Tibes, R., Weiss, G. J., Borad, M. J., Hann, C. L., Brahmer, J. R., Mackey, H. M., Lum, B. L., Darbonne, W. C., Marsters, J. C., de Sauvage, F. J., & Low, J. A. (2009). Inhibition of the Hedgehog pathway in advanced Basal-cell carcinoma. *New england journal of medicine, 361(12)*, 1164–1172.
- Wang, L. C., Liu, Z.-Y., Gambardella, L., Delacour, A., Shapiro, R., Yang, J., Sizing, I., Rayhorn, P., Garber, E. A., Benjamin, C. D., Williams, K. P., Taylor, F. R., Barrandon, Y., Ling, L., & Burkly, L. C. (2000). Conditional disruption of Hedgehog signaling pathway defines its critical role in hair development and regeneration. *Journal of investigative dermatology, 114(5)*, 901–908.
- Wang, Y., McMahon, A. P., & Allen, B. L. (2007). Shifting paradigms in Hedgehog

signaling. *Current option in biology*, 19(2), 159–165.

Waszak, S. M., Northcott, P. A., Buchhalter, I., Robinson, G. W., Sutter, C., Groebner, S., Grund, K. B., Brugières, L., Jones, D. T. W., Pajtler, K. W., Morrissy, A. S., Kool, M., Sturm, D., Chavez, L., Ernst, A., Brabetz, S., Hain, M., Zichner, T., Segura-Wang, M., Weischenfeldt, J., Rausch, T., Mardin, B. R., Zhou, X., Baciu, C., Lawerenz, C., Chan, J. A., Varlet, P., Guerrini-Rousseau, L., Fults, D. W., Grajkowska, W., Ng, H-K., Perry, A., Macdonald, T. J., Driever, P. H., Bendel, A. E., Bowers, D. C., McCowage, G., Chintagumpala, M. M., Cohn, R., Hassal, T., Fleischhack, G., Eggen, T., Wesenberg, F., Feychting, M., Lannering, B., Schüz, J., Johansen, C., Andersen, T. V., Rösli, M., Kuehni, C. E., Grotzer, M., Kjaerheim, K., Monoranu, C. M., Archer, T. C., Duke, E., Pomeroy, S. L., Shelagh, R., Frank, S., Sumerauer, D., Scheurlen, W., Ryzhova, M. V., Milde, T., Kratz, C. P., Samuel, D., Zhang, J., Solomon, D. A., Marra, M., Eils, R., Bartram, C. R., von Hoff, K., Rutkowski, S., Ramaswamy, V., Gilbertson, R. J., Korshunov, A., Taylor, M. D., Lichter, P., Malkin, D., Gajjar, A., Korbel, J. O., & Pfister, S. M. (2018). Spectrum and prevalence of genetic predisposition in medulloblastoma: a retrospective genetic study and prospective validation in a clinical trial cohort. *Lancet oncology*, 19(6), 785–798.

Weng, G., Upinder, S. B., & Ravi, I. (1999). Complexity in biological signaling systems. *Science*, 284(5411), 92–96.

Wolfe, C. M., Green, W. H., Cognetta, A. B. J., & Hatfield, H. K. (2013). A possible chemopreventive role for photodynamic therapy in Gorlin syndrome: a report of basal cell carcinoma reduction and review of literature. *Australasian journal of dermatology*, 54(1), 64–68.

Zhang, Q., Shi, Q., Chen, Y., Yue, T., Li, S., Wang, B., & Jiang, J. (2009). Multiple Ser/Thr-rich degrons mediate the degradation of Ci/Gli by the Cul3-HIB/SPOP E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(50), 21191–21196.

9.2. Internetové zdroje

URL1: CST. Cell Signaling Technology. [online] 2019. [cit. 17. 7. 2019]

<https://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-stem-cell-markers/hedgehog-signaling-pathway/pathways-hedgehog>

URL2: MRC-Holland. [online] 2019. [cit. 10. 7. 2019]

https://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_w12zCji-rCGANQgZPuTixsEyIW1MscfzuKj2NDFYc-g.

URL3: Mutation Taster. [online] 2019. [cit. 12. 5. 2019]

<http://www.mutationtaster.org>

URL4: Nacalai USA, Inc. [online] 2019. [cit. 3. 12. 2018]

<http://www.nacalaiusa.com/products/view/214/dna-ladder>

URL5: NCBI. National Center for Biotechnology Information. [online] 2019. [cit. 2019]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

URL6: HGMD. The Human Gene Mutation Database. [online] 2017. [cit. 16. 2. 2019]

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=PTCH1>