

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**ONEMOCNĚNÍ VÁZANÁ NA EXPANZI
TRINUKLEOTIDOVÝCH REPETIC**

Vedoucí bakalářské práce: prof. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Andrea Moravčíková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé práce prof. PharmDr. Martinu Beránkovi, Ph.D. za cenné připomínky, čas a nekonečnou trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat vedení a kolegům z laboratoře lékařské a reprodukční genetiky Repromeda za podporu při studiu, odborné rady a předání praktických zkušeností.

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 20.9.2023

Andrea Moravčíková

ABSTRAKT

Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor: Andrea Moravčíková

Vedoucí práce: prof. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D

Název bakalářské práce: Onemocnění vázaná na expanzi trinukleotidových repetice

Cíl práce:

Cílem této práce je shrnutí základních informací týkajících se onemocnění způsobených expanzemi trinukleotidových repetice. Hlavním cílem je popis diagnostických technik a metod, které slouží k jejich detekci.

Hlavní poznatky:

Literární rešerže zahrnuje charakterizaci monogenně dědičných onemocnění. Dále se zabývá rozdělením a popisem repetitivní DNA a popisem jednotlivých onemocnění, která jsou způsobena expanzí trinukleotidových repetice. V závěru jsou zmíněny diagnostické metody, které nám slouží k detekci těchto onemocnění.

Závěr:

Vzhledem k neustálému rozvoji uváděných molekulárně genetických metod, dochází ke zlepšení jejich ekonomické dostupnosti, časové náročnosti a detekci genetických onemocnění.

Klíčová slova: genetika, onemocnění, trinukleotidy, repetice

ABSTRACT

Charles University Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Study program: Laboratory diagnostics healthcare

Author: Andrea Moravčíková

Supervisor: prof. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Title of bachelor thesis: Disorders associated with trinucleotide repeat expansions

Background:

The aim of this work is to summarize basic information regarding disease caused by trinucleotide repeat expansions. The main goal is a description of diagnostic techniques and methods used for their detection.

Main findings:

The literature search includes the characterization of monogenically inherited diseases. It also deals with dividing and describing repetitive DNA and describing individual diseases that are caused by the expansion of trinucleotide repeats. At the end of the work are mentioned diagnostic methods that are used for detection of these diseases.

Conclusion:

Due to the continuous development of the mentioned molecular genetic methods, their economic availability, time consumingness and detection of genetic diseases are improving.

Key words: genetics, diseases, trinucleotides, repeats

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Monogenně podmíněné onemocnění	9
2.1 Autozomálně dominantní onemocnění.....	9
2.2 Autozomálně recesivní onemocnění.....	10
2.3 X vázaná onemocnění.....	11
3 Repetitivní sekvence	14
3.1 Rozptýlené repetice	14
3.1.1 DNA transpozony	14
3.1.2 Retrotranspozony	15
3.2 Tandemové repetice.....	15
3.2.1 Satelity	15
3.2.2 Minisatelity	16
3.2.3 Mikrosatelity	16
4 Laboratorní diagnostika.....	17
4.1 Cytogenetická diagnostika.....	17
4.1.2 Fluorescenční in situ hybridizace.....	17
4.2 Molekulárně genetická diagnostika	18
4.2.1 Polymerázová řetězová reakce.....	18
4.2.2 Triplet repeat primed PCR	21
4.2.3 Repeat-primed PCR	22
4.2.4 Methylačně specifická PCR.....	22
4.2.5 Southern blotting.....	23
4.2.6 Sekvenování	24
5 Onemocnění způsobené expanzí trinukleotidů	26
5.1. Huntingtonova chorea.....	30
5.1.1 Etiologie.....	30
5.1.2 Dědičnost	30
5.1.3 Klinický projev	31
5.1.4 Prevalence	32
5.2 Syndrom fragilního X.....	32
5.2.1 Etiologie.....	32
5.2.2 Dědičnost	33
5.2.3 Klinický projev	33

5.2.4 Prevalence	34
5.3 Syndrom fragilního X E	34
5.3.1 Etiologie	34
5.3.2 Dědičnost	35
5.3.3 Klinický projev	35
5.3.4 Prevalence	35
5.4 Friedreichova ataxie	35
5.4.1 Etiologie	36
5.4.2 Dědičnost	36
5.4.3 Klinický projev	36
5.4.4 Prevalence	36
5.5 Syndrom fragilního X asociované tremor/ataxie	37
5.5.1 Etiologie	37
5.5.2 Dědičnost	37
5.5.3 Klinický projev	37
5.5.4 Prevalence	37
5.6 Myotonická dystrofie typ 1	38
5.6.1 Etiologie	38
5.6.2 Dědičnost	38
5.6.3 Klinický projev	38
5.6.4 Prevalence	38
5.7 Spinocerebelární ataxie 1,2,3,6,7,8,17	39
5.7.1 Etiologie	39
5.7.2 Dědičnost	39
5.7.3 Klinický projev	39
5.7.4 Prevalence	40
6 Závěr	41
7 Seznam použitých zkratk	42
8 Seznam tabulek a obrázků	44
9 Seznam použité literatury	45

1 Úvod

Na počátku 90. let 20. století byla objevena dynamická mutace vedoucí k nejčastějším onemocněním založených na přítomnosti nestabilních a abnormálních expanzí trinukleotidových repetit. Repetitivní sekvence rozdělujeme na dva typy, a to na rozptýlené a tandemové. Rozptýlené repetitivní sekvence jsou rozptýleny po celém genomu a nemají skoro žádný význam. Zatímco tandemové repetitivní sekvence jsou úseky DNA opakující se za sebou s nepříznivým vlivem na lidský fenotyp. Vliv těchto tandemových repetit na projev fenotypu závisí na velikosti expanze. Tyto expanze jsou příčinou vzniku neurodegenerativních a neuromuskulárních poruch. Jejich problematikou a diagnostikou se budu v této práci zabývat. Tato mutace byla poprvé objevena jako příčina syndromu fragilního X. Následně byla popsána u spinální a bulbární muskulární atrofie a s postupem času také u mnoha chorob, které jsou způsobeny expanzemi těchto repetit. Patogeneze trinukleotidových onemocnění závisí na lokalizaci repetice v konkrétním genu. Rozlišujeme polyglutaminová a polyalaninová onemocnění. U polyglutaminových onemocnění se expandované repetice nachází v kódující oblasti. Tyto expanze způsobují vznik abnormálních proteinů, z nichž se tvoří inkluze obsahující polyglutamin a ty jsou pro buňku toxické. Zatímco expandované repetice nacházející se v nekódující oblasti potlačují expresi genů, nebo produkují mRNA se změněnými vlastnostmi, kterou v buňkách vycytávají RNA-vázající proteiny. To může vést k alternativnímu sestřihu transkriptů a ke vzniku ribonukleových inkluzí. Polyalaninová onemocnění vykazují expanzi tripletů kódující alanin, a to zejména v genech pro transkripční faktory. Nestabilní mutace se oproti stabilním mutacím mezigeneračním přenosem mění. Každé onemocnění vykazuje symptomatický polymorfismus, který se liší věkem nástupu, stupněm závažnosti a klinickém projevu. Příznaky nemoci se projeví, jakmile se u jedince nahromadí počet repetit přesahující normální rozsah. Tyto repetice mají tendenci se neustále prodlužovat. V současné době pomocí molekulárně genetických metod je možné určit přítomnost a počet expandovaných repetit.

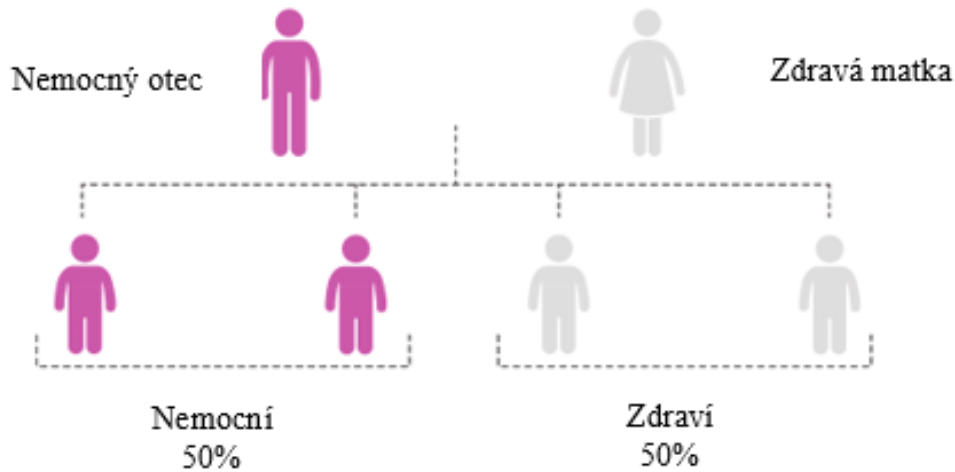
2 Monogenně podmíněné onemocnění

Monogenně dědičné onemocnění jsou způsobeny mutací v určitém genu. Mutace se dědí z generace na generaci a dělí se na autozomální a X vázané. Projev genotypu ve fenotyp potomka se rozděluje na dominantní (nemoc stejná u heterozygota i homozygota), recesivní (nemoc jen u homozygota), neúplně dominantní (heterozygot má mírnější projevy než homozygot) a kodominantní (nemoc jen u heterozygota). U postižených pacientů se některé příznaky onemocnění nemusí projevit. Tento jev označujeme termínem neúplná penetrance (Beránek, 2016; Otová *et al.*, 2020). Nelze tedy předpovědět časnost manifestace, intenzitu a postup vývoje onemocnění (Beránek, 2016). V databázi lidských genů a genetických chorob, která se průběžně aktualizuje, se uvádí kolem 22 tisíc monogenně podmíněných chorob. (Beránek, 2016).

2.1 Autozomálně dominantní onemocnění

Autozomální porucha vzniká mutací v genu na nepohlavním chromozomu. Autozomálně dominantní typ dědičnosti spočívá v tom, že pokud potomek zdědí abnormální gen (gen, který je dominantní) pouze od jednoho z rodičů a druhý gen zděděný od rodiče je normální, onemocní. Onemocnění může mít často jen jeden z rodičů. Toto onemocnění může u potomka vzniknout i *de novo*, což znamená, že se mutace nevyskytovala v předchozích generacích. U rodiče s autozomálně dominantním onemocněním se vyskytuje 50 % riziko pravděpodobnosti narození dítěte s tímto onemocněním (Obr. 1). Toto riziko platí pro každé vzniklé těhotenství (MedlinePlus, 2022a). Naopak v případě, kdy jsou oba rodiče heterozygoti se zvyšuje pravděpodobnost onemocnění u potomků na 75 % (Beránek, 2016). U potomků, kteří nezdědí abnormální gen, onemocnění nevnikne a ani se nepřenesou (MedlinePlus, 2022a).

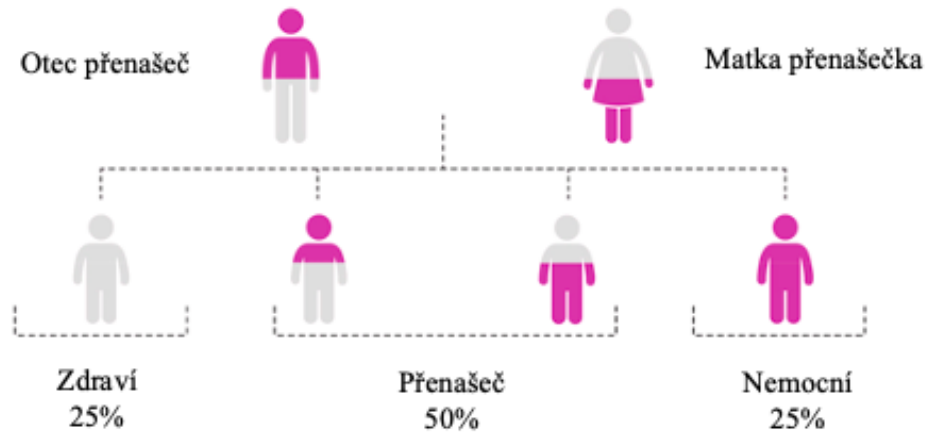
Obr. 1 Schéma dědičnosti autozomálně dominantního onemocnění (převzato a upraveno dle Medline, 2022a)



2.2 Autozomálně recesivní onemocnění

Jsou to méně častá onemocnění, která postihují jak muže, tak i ženy a zahrnují většinu dědičných metabolických poruch (Beránek, 2016). Autozomálně recesivní dědičnost je jeden ze způsobů, jak se onemocnění může přenášet. Geny, které dědíme se nachází v párech. Jeden je maternálního a jeden paternálního původu. Pro vznik recesivního onemocnění musí být přítomny dvě kopie abnormálního genu. Pokud lidé zdědí jen jeden abnormální gen z páru, jedinci nejsou postiženi, ale mohou se stát přenašeči a předat tak gen svým potomkům. V případě, že jsou oba rodiče nositeli jen jednoho abnormálního genu, je šance na narození zdravého potomka 25 % (Obr. 2). Pravděpodobnost, že se potomek narodí s jedním abnormálním genem je 50 % a zbylých 25 % náleží k situaci, že se potomek narodí s oběma abnormálními geny (MedlinePlus, 2022b).

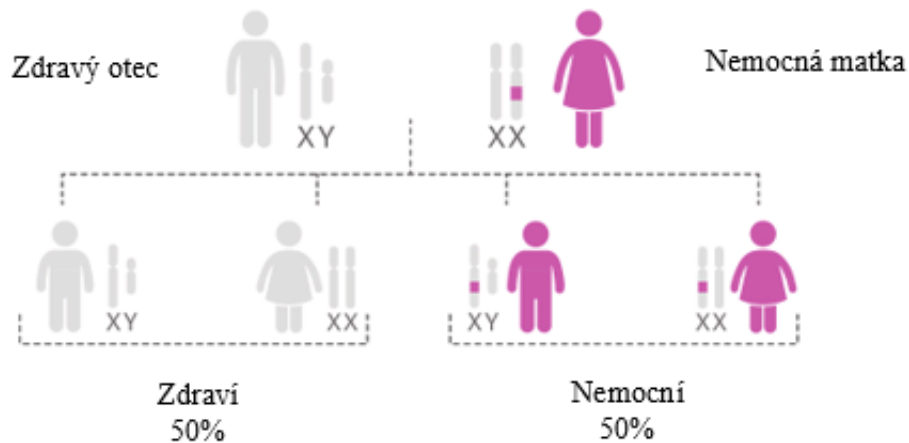
Obr. 2 Schéma dědičnosti autozomálně recesivního onemocnění (převzato a upraveno dle Medline, 2022b)



2.3 X vázaná onemocnění

Tyto onemocnění jsou vyvolané mutacemi v genech, které jsou lokalizovány na pohlavních chromozomech, mezi které patří chromozom X a Y. Jak již bylo zmíněno, dominantní onemocnění se dědí, i když potomek zdědí jen jeden abnormální gen od jednoho z rodičů. Pokud je u onemocnění vázaných na pohlavní chromozom X nositelem otec, tak toto onemocnění nezdědí žádný z jeho synů, ale všechny jeho dcery ano. Hlavním důvodem je to, že dcery dědí od svého otce chromozom X. V případě, že tento abnormální gen nese matka, pravděpodobnost postižení u potomků je 50 % (Obr. 3). Některá dominantní onemocnění, která se vážou na chromozom X, mohou být u mužů natolik vážná, že jedincům s touto poruchou hrozí úmrtí již před narozením (MedlinePlus, 2022c).

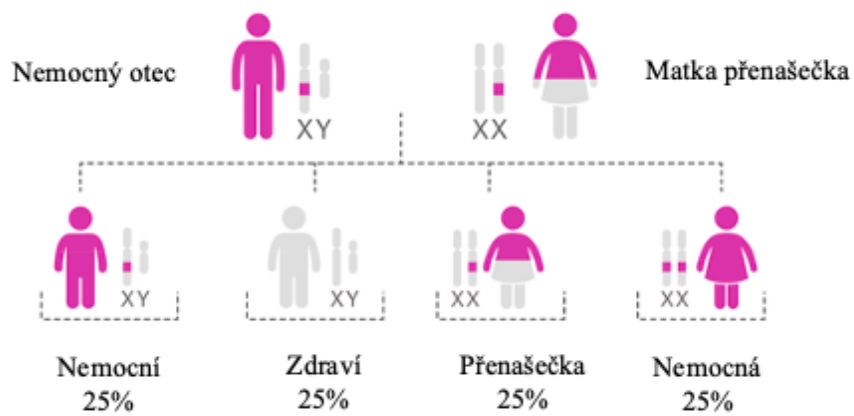
Obr. 3 Schéma dědičnosti X vázaného dominantního onemocnění (převzato a upraveno dle Medline, 2022c)



Zatímco pro recesivní typ dědičnosti je charakteristické, že k projevu onemocnění je zapotřebí zdědit dva abnormální geny od obou rodičů. V případě zdědění jednoho abnormálního genu se potomek stává přenašečem. X vázaná recesivní onemocnění nejčastěji postihují muže, u kterých se i nemoc projeví. Zatímco u žen je výskyt poruchy vzácný. Muži mají jen jeden chromozom X, a tak jim stačí zdědit jen jeden abnormální gen (Otová *et al.*, 2020). Druhým chromozomem u muže je chromozom Y a onemocnění vázané na tento chromozom postihují výhradně muže. Na pohlavním chromozomu Y nebyla kromě mužské neplodnosti detekována žádná dědičná choroba (Beránek, 2016).

V případě, kdy je otec zdravý a matka je přenašečkou onemocnění, pravděpodobnost narození jejich zdravé dcery je 25 %, tak jako u zdravého syna, nemocného syna a dcery přenašečky. V případě, že je nemocný otec a matka není ani přenašečkou, vzniká 50 % šance, že se narodí zdravý syn a 50 % šance, že dcera bude přenašečka. V případě, že by se u potomků nevyskytovaly žádné příznaky nemoci, se onemocnění mohou přenést do další generace. V každém těhotenství, kdy je matka přenašečkou a otec je nemocný, nastává 25 % šance narození zdravého syna, stejně jako narození syna s onemocněním. Šance na narození nemocné dcery je taktéž 25 %, stejně jako při narození dcery přenašečky (Obr. 4). Při onemocnění obou rodičů je šance na narození nemocných dětí téměř 100 % (MedlinePlus, 2022d).

Obr. 4 Schéma dědičnosti X vázaného recesivního onemocnění (převzato a upraveno dle MedlinePlus, 2022d)



3 Repetitivní sekvence

Repetitivní sekvence neboli opakující se sekvence se nachází v genomu v četném množství kopií (Otová *et al.*, 2020). Velká část těchto sekvencí nekóduje žádný peptidový řetězec (Beránek, 2016). Repetitivní sekvence popisujeme podle toho, jak jsou v genomu uspořádány, jakou mají délku a funkci (Otová *et al.*, 2020). Rozdělujeme je na rozptýlené a tandemově uspořádané repetice. Pokud jsou jednotlivé kopie rozptýlené v genomu, jedná se o rozptýlené repetice. Pokud kopie těchto repetitivních sekvencí vytváří bloky, mluvíme o tandemových repeticích. V genomu můžeme nacházet repetice přímé, které jsou v nukleotidových vláknech uspořádány jedna za druhou, takzvaně od hlavy k ocasu, nebo repetice obrácené, což jsou sekvence uspořádané v opačném směru na obou vzájemně komplementárních řetězcích a ty označujeme jako hlava-hlava. Díky tomu mohou tvořit sekundární struktury typu vlásenek. Pokud se tyto hlavy nachází v těsné blízkosti, vytváří palindrom (Beránek, 2016). Repetitivní sekvence mají význam ve stavbě chromozomů a v expresi genů. Vyskytují se v oblasti telomer, centromer a heterochromatinu chromozomů. Jsou polymorfní a mají různou délku. Se změnou délky těchto repetic souvisí klinické příznaky onemocnění (Otová *et al.*, 2020).

3.1 Rozptýlené repetice

Mezi nejznámější rozptýlené repetice patří Alu sekvence, jejichž počet jednotek v genomu je půl milionu a L1 elementy, kterých je v genomu celkem sto tisíc. Alu repetice je štěpena restriční endonukleázou Alu II. Tyto rozptýlené repetice se řadí mezi transpozony, což jsou sekvence DNA, které vznikají „skákáním“ na jiná místa v genomu. Rizikem je jejich náhodné vložení se do kódujících sekvencí nebo regulačních oblastí, přesun exonů na jiný chromozom nebo poruchy crossing-overu během tvorby pohlavních buněk (Beránek, 2016; Šedá *et al.*, 2005-2006). Transpozony neboli pohyblivé sekvence, dělíme na dvě skupiny. První skupinu tvoří DNA transpozony a druhou tvoří retrotranspozony. Retrotranspozony se dále dělí na autonomní a neautonomní retrotranspozony (Otová *et al.*, 2020).

3.1.1 DNA transpozony

V genomu se nachází v inaktivní podobě. Za pomoci metod genového inženýrství mohou být tyto DNA transpozony aktivovány. Transpozice vzniká vystřížením sekvence transpononu a jeho následné přemístění do jiného místa v genomu. Mechanismus transpononu je tedy vyjmout-vložit (Otová *et al.*, 2020).

3.1.2 Retrotranspozony

Retrotranspozony jsou na rozdíl od DNA transpozonů aktivní a tvoří až polovinu lidského genomu se schopností se přemísťovat. Kromě toho kódují proteiny, které jsou potřebné k jejich přenosu. Tyto elementy se rozšiřují mechanismem zdvojení, tedy kopírovat-vložit. Retrotranspozony dále rozdělujeme na SINE (krátké rozptýlené jaderné elementy) a LINE (dlouhé rozptýlené jaderné elementy) (Otová *et al.*, 2020).

SINE

Jedná se o velmi krátké sekvence, a to v rozmezí 100-400 bp (pár bazí). Tyto sekvence nemají žádný kódující potenciál a ke své transpozici využívají proteiny, které jsou kódované LINE (Otová *et al.*, 2020).

LINE

Jsou sekvence, jejichž délka je v rozmezí 5-7 kb (tisíc párů bazí). Za pomoci enzymu RNA polymerázy (enzym katalyzující ribonukleovou kyselinu) dochází procesem transkripce k přepsání DNA sekvence do sekvence RNA. Díky tomuto enzymu jsou retrotranspozony přepsány do RNA, kdežto původní kopie zůstávají na svém místě. RNA kopie se opět přepisují reverzní transkripcí do DNA, která je vložena do genomu na nové místo (Otová *et al.*, 2020).

3.2 Tandemové repetice

Dosahují délek až několika Mb (milion párů bazí). Jak již bylo zmíněno, tandemové repetice jsou tvořeny identickými, nebo podobnými kopiemi vytvářející shluky. Mezi tyto repetice řadíme geny pro bílkoviny histonů a geny, které kódují rRNA (ribosomální ribonukleová kyselina) a tRNA (transferová ribonukleová kyselina). Podle velikosti repetitivních jednotek rozdělujeme repetice na mikrosatelity, minisatelity a satelity (Beránek, 2016).

3.2.1 Satelity

Satelity se řadí mezi největší tandemové repetice, které jsou složeny z dlouhých jednotek, řádově stovek bp a většinou přesahují 1 Mb (Otová *et al.*, 2020). Satelity jsou složeny z primárních jednotek, které jsou mnohdy rozdílné a zdegenerované. Na základě mutace primárních jednotek vznikají sekundární jednotky (Obr. 5). Sekvence těchto sekundární jednotek jsou zmnoženy a periodicky se opakují (Šedá a kol., 2005-2006). Vyskytují se

v oblasti centromer všech chromozomů (Otová *et al.*, 2020). Z velké části satelitů, které se nacházejí v oblasti centromer, jsou známy alfa satelity, které během buněčného dělení (meiózy a mitózy) obstarávají správnou segregaci chromozomů. U ostatních satelitů nebyla zaznamenána žádná funkce, a proto se označují termínem „odpadní“ DNA (Otová *et al.*, 2020; Šedá *et al.*, 2005-2006).

Obr. 5 Vznik sekundárních jednotek (převzato a upraveno dle Šedá *et al.*, 2005-2006)



3.2.2 Minisatelity

Minisatelity jsou také označovány jako VNTR (variabilní počet tandemových repetice), s délkou 10-20 bp, které vytvářejí bloky. Minisatelity bývají v celkové délce od 100 do 20 tisíc bp. Lze je detekovat pomocí metody Southern blotting (Beránek, 2016).

3.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou STR lokusy (krátké tandemové repetice), jejichž délka bývá mezi 50-300 bp. Patří mezi nejčastěji opakující se sekvence DNA s opakováním jednoho stejného nukleotidu, dinukleotidu, trinukleotidu a tetranukleotidu. STR se můžou vyskytovat na všech místech chromozomů. Většina mikrosatelitů se však nachází mimo kódující sekvence, a to nejčastěji v oblasti telomer a jejich subtelomerických oblastech. Pro tyto místa jsou typické hexanukleotidové repetice. Tetranukleotidy se nejčastěji vyskytují v oblasti centromer, dinukleotidy v intronech strukturních genů a pro exony určitých genů jsou charakteristické trinukleotidy a hexanukleotidy. Repetitivní sekvence lze detekovat pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce) (Beránek, 2016).

4 Laboratorní diagnostika

Laboratorní diagnostika spočívá v kombinaci cytogenetických a molekulárních metod k detekci a analýze opakujících se trinukleotidových sekvencí. Nejčastěji používanou cytogenetickou metodou je metoda FISH (fluorescenční in situ hybridizace), která pomocí značených sond zkoumá struktury, počty, zlomy a přestavby chromozomů. Molekulární metody slouží k analýze DNA. Mezi tyto metody se řadí zejména PCR, která slouží k amplifikaci trinukleotidů, což umožňuje jejich následnou analýzu pomocí dalších metod (Otová *et al.*, 2020).

4.1 Cytogenetická diagnostika

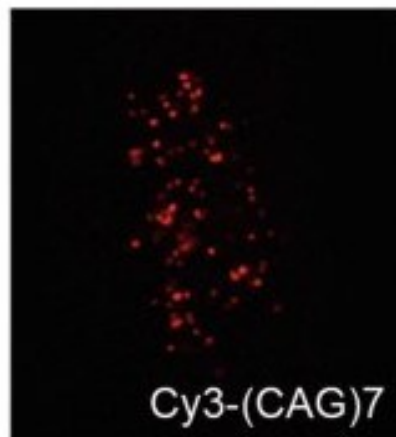
K chromozomální analýze se využívají buňky z jakýkoliv dělících se buněk, nejčastěji lymfocyty z periferní krve. Po krátkodobé kultivaci v kultivačním médiu prochází buňka cykly buněčného dělení. Toto dělení je následně zastaveno, dochází k rozrušení mikrotubulů dělicího vřeténka a ve vzorku se ve stádiu metafáze hromadí buňky. Po hypotonizaci a fixaci vzorku získáme zpracováním buněčnou suspenzi, která se nakape na podložní skla. Skla jsou poté obarvena podle cytogenetických technik, z nichž nejčastěji používanou metodou je G-pruhování. Takto připravené preparáty jsou připraveny pro konkrétní vyšetření (Otová *et al.*, 2020).

4.1.2 Fluorescenční in situ hybridizace

Molekulárně cytogenetická technika, jejímž principem je hybridizace denaturované DNA s denaturovanou DNA sondou. Tato fluorescenčně značená sonda obsahuje sekvenci, která je komplementární k sekvenci v cílové oblasti DNA na metafázním chromozomu, nebo interfázním jádře, kterou detekujeme (Obr. 6).

Určité sondy používáme, jak na interfázní jádra, tak i na chromozomy v metafázi. Postup FISH se skládá z přípravy vzorku, denaturace sondy a vzorku, hybridizace fluorescenčně značené sondy se vzorkem, posthybridizačního promývání a detekce pomocí fluorescenčního mikroskopu. Rozeznáváme sondy, které se liší podle toho, na jakou oblast se navazují (sondy satelitní, lokus specifické a celochromozomové). Sondy satelitní hybridizují s oblastmi satelitní sekvence, sondy lokus specifické hybridizují s jedinečnými sekvencemi a sondy malovací hybridizují s celým konkrétním chromozomem. M-FISH je obdoba zmíněné metody. Jedná se o vícebarevnou FISH, kdy se obarví všechny chromozomy jinou barvou (Otová *et al.*, 2020).

Obr. 6 Vizualizace mutovaného transkriptu DMPK s použitím FISH techniky (CAG7 sonda, červená) (převzato dle Klein *et al.*, 2020)



4.2 Molekulárně genetická diagnostika

Diagnostické metody založené na analýze DNA detekují, zda je jedinec nositelem mutace, premutace či nikoliv. K vyšetření se používá izolovaná DNA, kterou získáme odběrem periferní krve. Molekulárně genetické metody se dělí na přímou a nepřímou DNA diagnostiku. Přímá DNA diagnostika umožňuje zachytit a identifikovat mutaci, která je zodpovědná za vznik onemocnění. Podmínkou je však znalost lokalizace genu a znalost jeho sekvence. U nepřímé DNA diagnostiky známe lokalizaci genu, ale neznáme jeho přesnou sekvenci. Otová *et al.*, 2020).

4.2.1 Polymerázová řetězová reakce

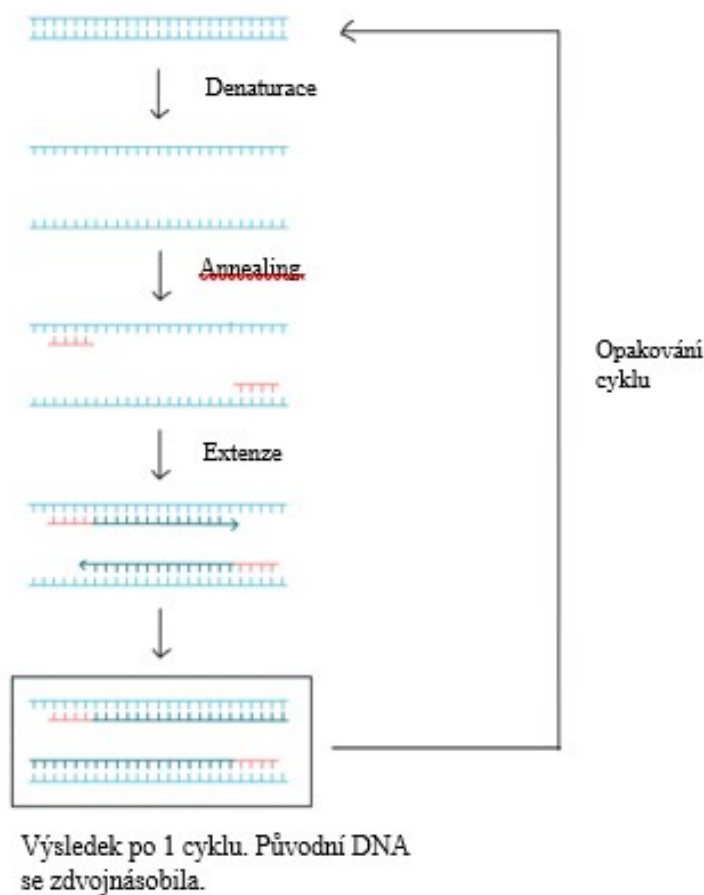
PCR je enzymatická metoda založená na principu komplementárního párování bazí dvou primerů, které se vážou na specifickou sekvenci DNA. Následně po navázání primerů, dochází k jejich prodloužení Taq polymerázou a oblast mezi primery se zkopíruje (Khan Academy, 2023b). Cílem je vytvořit dostatek kopií sekvence DNA, které slouží pro jejich následnou analýzu. Tyto kopie mohou být využity pro vizualizaci gelovou elektroforézou, klonování nebo sekvenování (Otová *et al.*, 2020). Podmínkou PCR je znalost pořadí dusíkatých bází na začátku a na konci sekvence DNA. Podle těchto úseků jsou sestaveny primery (krátké oligonukleotidové úseky jednořetězcové DNA) (Otová *et al.*, 2020). Master mix PCR obsahuje DNA templát, primery, dNTP (deoxyribonukleotidtrifosfáty), Taq DNA polymerázu, reakční pufr, MgCl₂, demineralizovanou vodu, soli s monovalentními kationty, látky snižující adsorpci nukleových kyselin, látky snižující riziko kontaminace a minerální olej (Beránek, 2016). Tento

mix ve zkumavce prochází několika cykly PCR. (denaturace, annealing a extenze) (Khan Academy, 2023b).

V prvním kroku, je vzorek DNA zahřátý na teplotu 95 °C. Tato teplota způsobí denaturaci, kdy dochází k přerušení vodíkových vazeb mezi komplementárními páry DNA řetězců a vytvoření jednořetězcové šablony potřebné pro další krok. Ve druhém kroku se teplota pohybuje mezi 30-65 °C. Dochází k ochlazení denaturované DNA, aby se primery mohly vázat na jednořetězcové templátové DNA. Tato teplota tedy způsobí obnovení vodíkových vazeb. V posledním kroku se teplota zvýší na 72 °C (Khan Academy, 2023b). Díky vysoké teplotě Taq polymeráza prodlouží primery a začne syntetizovat nové řetězce DNA. Po prvním cyklu se původní DNA zdvojnásobí (jeden řetězec je původní a druhý nově nasyntetizovaný).

Celý proces tří kroků PCR je opakován obvykle v 30-40 cyklech (Obr. 7) (Otová *et al.*, 2020; Khehra *et al.*, 2023). To vede k tomu, že opakovanými cykly se ve zkumavce hromadí mnoho kopií vybraného úseku DNA. Počet cyklů je stanoven na základě omezené schopnosti činidel a dalších faktorů, jako je například hromadění pyrofosfátu a přítomnost inhibitorů ve vzorku. Mezi nejčastější inhibitory patří proteináza K, EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) a fenol. Proteináza K má sklony k rozkladu Taq polymerázy. Dalšími látkami, které mohou negativně ovlivňovat PCR testy jsou heparin, hemoglobin a iontové detergenty. Tyto problémy můžeme odstranit tím, že se templáty DNA vyčistí použitím chloroformu, nebo za pomoci dialýzy a následné precipitace ethanolem (Khehra *et al.*, 2023). Polymerázová řetězová reakce je automatizovaný proces, který probíhá v přístroji zvaném termocyklér. Ten je naprogramovaný tak, aby dodržel čas a tepelné podmínky ve všech třech krocích (Otová *et al.*, 2020).

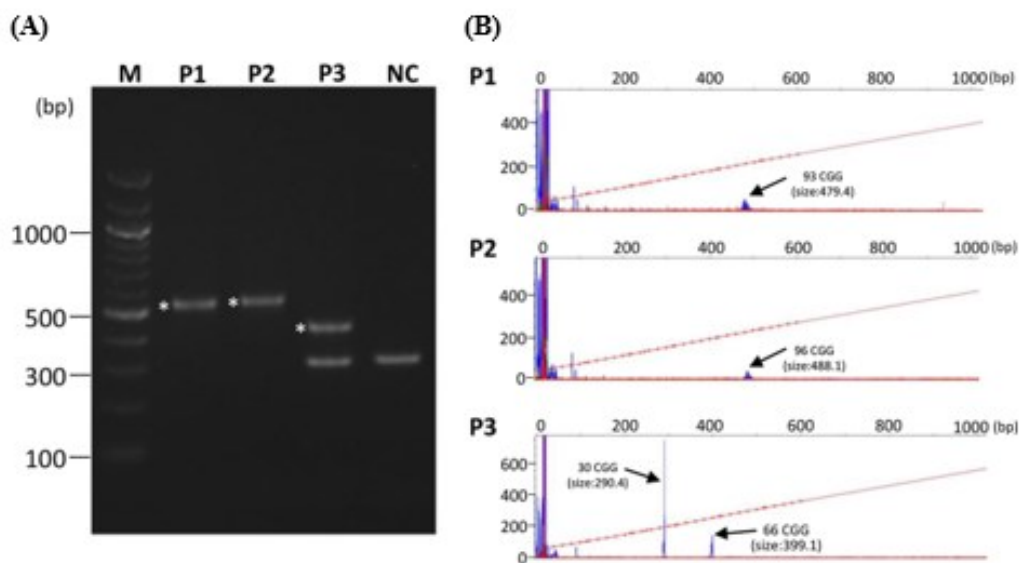
Obr. 7 Princip PCR (převzato a upraveno dle Khan Academy, 2023a)



Po uvedených krocích je DNA vizualizována elektroforézou na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Elektroforéza využívá elektrického pole k pohybu nabitých částic v gelu a tím dochází k separaci fragmentů podle jejich velikosti. Rychlost pohybu těchto fragmentů závisí na velikosti a konformaci DNA (Beránek, 2016). Malé fragmenty se pohybují v elektrickém poli rychleji (Thompson *et al.*, 2004). Fragmenty o stejné délce vytváří na gelu proužek (Khan Academy, 2023b). Tento proužek je vizualizován po obarvení gelu interkalačním barvivem, jako je ethidium bromid nebo SYBR Green (Beránek, 2016; Khan Academy, 2023b). Toto barvivo se vmezeří do DNA a po osvětlení UV světlem způsobí záření fluorescenčních molekul vázaných na DNA. Výsledek velikosti a polohy proužku se porovnává oproti standardu/žebříčku velikostí, což umožňuje stanovit velikost amplifikovaného produktu (Obr. 8). Agarózová elektroforéza je vhodná pro oddělení delších fragmentů, má snazší přípravu a rychlejší průběh separace. Polyakrylamidová dokáže rozlišit i fragmenty, které se

liší jediným nukleotidem v délce. Citlivost pro zachycení fragmentu v gelu závisí na množství DNA. Plně automatizovaný proces rozdělení nabízí kapilární elektroforéza (Beránek, 2016) PCR metoda zaručuje vysokou citlivost a je méně nákladná a náročná na množství i kvalitu vzorků než jiné používané metody (Thompson *et al.*, 2004).

Obr. 8 Elektroforéza v agarózovém gelu a elektroferogramy produktů PCR (převzato a upraveno dle Higuchi *et al.*, 2022)



(A) Výsledky elektroforézy fragmentů PCR získaných z CGG opakované oblasti fyziologické mužské kontroly (NC) a pacientů P1, P2 a P3. Dráhy P1 a P2 vykazovaly pruh kolem 550 bp, což odpovídá velikosti premutační alely (**hvězdičky**). Dráha P3 vykazovala dva pásy, normální velikost alely a velikost premutační alely (**hvězdičky**). (B) Elektroferogramy ukazují velikosti opakujících se CGG u každého pacienta. Píky představují fragmenty repetice CGG, které jsou označeny šipkami. Osa X, velikost fragmentů v bp; osa Y, jednotky relativní fluorescence; **červená čára přes elektroferogramy**, práh sklonu pro začátek/konec vrcholu; NC, fyziologická mužská kontrola; M, žebříček DNA.

4.2.2 Triplet repeat primed PCR

Tato metoda je modifikací PCR, je navržena pro lepší amplifikaci trinukleotidových opakování a využívá se zejména u nejasných výsledků klasickou PCR. Triplet repeat primed PCR využívá tři primerů a poskytuje rychlou identifikaci velkých repetic. Zatímco při klasické

PCR se používají pouze dva lokus specifické primery. K přesnému odhadu se však stále využívá metoda Southern blotting. Specifický lemující fluorescenčně značený primer 1, je v souladu s primerem 3 a 4. Primer 4 na svém 3'konci obsahuje konkrétní repetici podle toho, které vlákno bude amplifikováno. Na jeho druhé straně, tedy na 5' konci se vyskytují sekvence, které jsou komplementární k sekvenci primeru 3. Specificky navržený primer 4 se váže na místa, kde je přítomna trinukleotidové repetice, čímž umožní amplifikaci různě dlouhých sekvencí DNA. Vlákna jsou fluorescenčně značena za pomoci primeru 1. V raných cyklech amplifikace repetice dochází k vyčerpání primeru 4. Místo něj se na jeho místo váže primer 3, se kterým má komplementární sekvenci, a dochází k amplifikaci různě dlouhých vláken. Po amplifikaci se produkty rozdělí pomocí kapilární elektroforézy (Warner *et al.*, 1996).

4.2.3 Repeat-primed PCR

Metoda repeat-primed PCR je užitečná metoda pro identifikaci a analýzu opakování v DNA. Po denuraci vzorku, repeat-primed PCR využívá sondy, které jsou navrženy tak, aby se vázaly těsně na oblasti, které obsahují opakující se sekvence DNA a došlo k jejich amplifikaci. Protože je vysoce opakující se oblast amplifikována a poté fragmentována, chyby „zadrhávání“ ztěžují přesné stanovení délky rozšířeného opakování. Ve velkých opakováních s vysokým obsahem GC může být obtížné provést PCR test. Amplifikovaný produkt je detekován pomocí kapilární elektroforézy (Obr. 8) (Chintalaphani *et al.*, 2021).

4.2.4 Methylačně specifická PCR

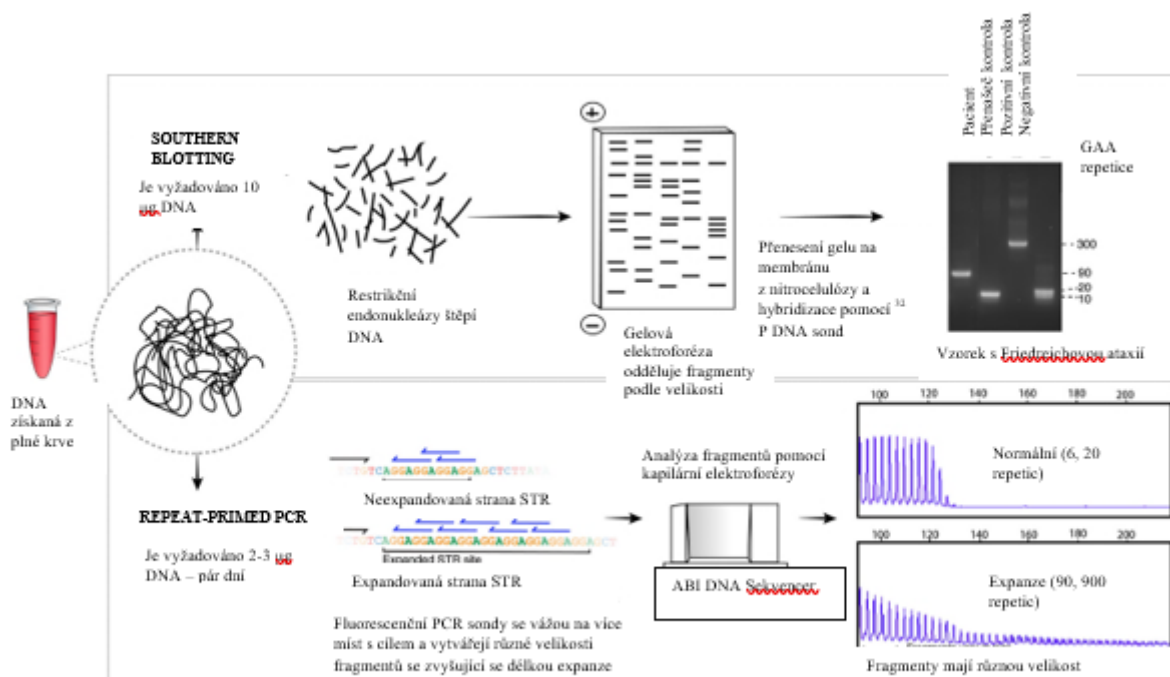
Metoda, která se využívá k detekci a analýze DNA, kdy se na nukleotidy, nejčastěji v GpC ostrůvcích genu, váže methylová skupina. Získaná izolovaná DNA je ošetřena hydrogensířičitanem sodným, který mění nemethylované cytosinované báze na uracilové báze, kdežto methylované cytosinové sekvence ponechává v nezměněném stavu. Při PCR je na nemethylovaných místech nově vytvořených vlákních, přítomen adenin. Za to u methylovaných cytosinů je v nově vytvořených vlákních přítomen guanin. Tím vzniknou mezi methylovanými a nemethylovanými sekvencemi rozdíly. Pomocí dvou typů primerů, kdy jeden je specifický pro methylovanou DNA a druhý je specifický pro nemethylovanou DNA, je provedena PCR reakce. Podle srovnání velikosti amplifikace se dvěma typy primerů zjistíme, zda je specifická oblast methylována (Beránek, 2016).

4.2.5 Southern blotting

Southern blotting se využívá k detekci velkých opakovaných expanzí sekvence DNA (Chintalaphani *et al.*, 2021). Postup Southern blotting spočívá v rozštěpení komplexní DNA za pomoci vybraného restriktivního enzymu, kdy dochází k získání fragmentů DNA. Během denaturace jsou fragmenty DNA přeneseny z gelu na hybridizační membránu z nitrocelulózy nebo nylonovou membránu, což umožňuje jejich fixaci a detekci hybridizačními sondami (Otová *et al.*, 2020). Hybridizační sondy jsou radioaktivně značené sondy, obsahující krátké sekvence DNA, které jsou komplementární k fragmentu, s nímž je ve vazbě vyšetřovaný gen. Opláchnutím nenavázaných sond a vystavením membrány rentgenovému filmu, vidíme pouze radioaktivně značené fragmenty, které hybridizovaly se značenou sondou. Výsledkem jsou tmavé proužky, udávající pozici sekvencí DNA, které se sondou hybridizovaly (Obr. 8) (Khan Academy, 2023c; Otová *et al.*, 2020).

Tato metoda je nákladná, hůře interpretovatelná, časově náročná a pro jednu analýzu vyžaduje velké množství kvalitní DNA. Při určitých expanzích byla tato metoda nahrazena repeat-primed PCR, která je levnější a efektivnější (Chintalaphani *et al.*, 2021).

Obr. 8 Současné molekulární diagnostické metody (převzato a upraveno Chintalaphani *et al.*, 2021)



Vývojový diagram ukazuje příklad dvou současných diagnostických metod pro diagnostiku expanzí STR: Southern blotting a repeat-primed PCR. Vzorky pro analýzu uvedených dvou diagnostických metod, byly odebrány od pacienta s Friedrichovou ataxií s heterozygotní „GAA“ expanzí v genu FXN (přibližně 90 a 900 opakování). Graf repeat-primed PCR ukazuje charakteristický vzor zadržování expandovaných alel, který je způsobený repetitivními repeat-primed sond navazujícími se na více míst v rámci expanze STR. Pro stanovení velikosti se provede Southern blotting. Větší alelu „GAA“ s 900 opakováními nelze vidět pomocí žebříčku velikosti uvedeného výše.

4.2.6 Sekvenování

Sekvenování DNA je proces vedoucí k určení pořadí nukleotidových bází v příslušné DNA (Otová *et al.*, 2020).

Sangerovo sekvenování

Na konci 20. století byla vyvinuta první metoda zvaná Sangerovo sekvenování, která se využívá k sekvenování oblasti DNA do délky 900 bp. Sangerova sekvenační reakce je založená na principu PCR. Obsahuje vzorek DNA, primer, dNTP, DNA polymerázu a ddNTP (dideoxyribonukleotidtrifosfáty) (Khan Academy, 2023c). Templát DNA, který má být sekvenován, je smíchán ve zkumavce s primerem, dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), DNA polymerázou a barvivem značenými ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) (Khan Academy, 2023c). Oproti PCR, která probíhá v jedné zkumavce, Sangerova reakce probíhá ve čtyřech zkumavkách (Otová a kol., 2020). Směs je zahřátá na vysokou teplotu, aby došlo k denuraci templátové DNA. Následně je tato směs ochlazená a dochází k navázání primeru na jednořetězcové DNA. V posledním kroku se teplota znovu zvýší, což umožní DNA polymeráze syntetizovat nové řetězce DNA. Tento enzym přidává do řetězce jeden nukleotid za druhým, dokud nepřidá dideoxyribonukleotid (Khan Academy, 2023c).

Po zabudování ddNTP se již nemůže zabudovat jiný nukleotid a syntéza vlákna DNA je ukončena. Tento proces se cyklicky opakuje.

Výsledkem Sangerova sekvenování jsou fragmenty různých délek (Otová *et al.*, 2020). Délka těchto fragmentů se stanovuje kapilární elektroforézou. Dlouhé fragmenty na rozdíl od krátkých prochází tenkou, dlouhou kapilárou obsahující gelovou matici pomaleji. Na konci podléhá fragment osvětlení laseru, což umožní detektoru detekovat konkrétní připojené barvivo na konečném nukleotidu. Z barev barviva získaných postupným procházením fragmentů kapilárou se sestaví sekvence původního úseku DNA po jednom nukleotidu. Výsledky

detektoru se skládají ze série píků intenzity fluorescence znázorněných na chromatogramu. Z těchto píků se následně odečte sekvence DNA (Khan Academy, 2023c).

V současné době se tento typ sekvenování stále používá k sekvenování jednotlivých částí DNA, jako jsou fragmenty získané z PCR, nebo fragmenty používané při klonování DNA (Khan Academy, 2023c).

Sekvenování nové generace

Na trhu se vyskytuje řada výrobců NGS technologií (sekvenování nové generace), jejichž princip sekvenování a způsob amplifikace sekvenovaných fragmentů DNA se vzájemně liší. Jedním z mnoha způsobů vyšetření mutací genů je použití sekvenátoru firmy Illumina. Jeho princip sekvenování je založený na syntéze ve spojení s klonální amplifikací prostřednictvím „můstkové“ PCR. (Beránek, 2016). NGS je na rozdíl od Sangerova sekvenování rychlejší, levnější a vysoce paralelní, což umožní sekvenovat velký počet fragmentů DNA, velký počet genů nebo celý genom. Velkým přínosem této metody je však možnost sekvenace většího počtu jedinců (Otová *et al.*, 2020). Z obecného hlediska NGS umožňuje spustit velký počet Sangerových reakcí paralelně (Khan Academy, 2023c).

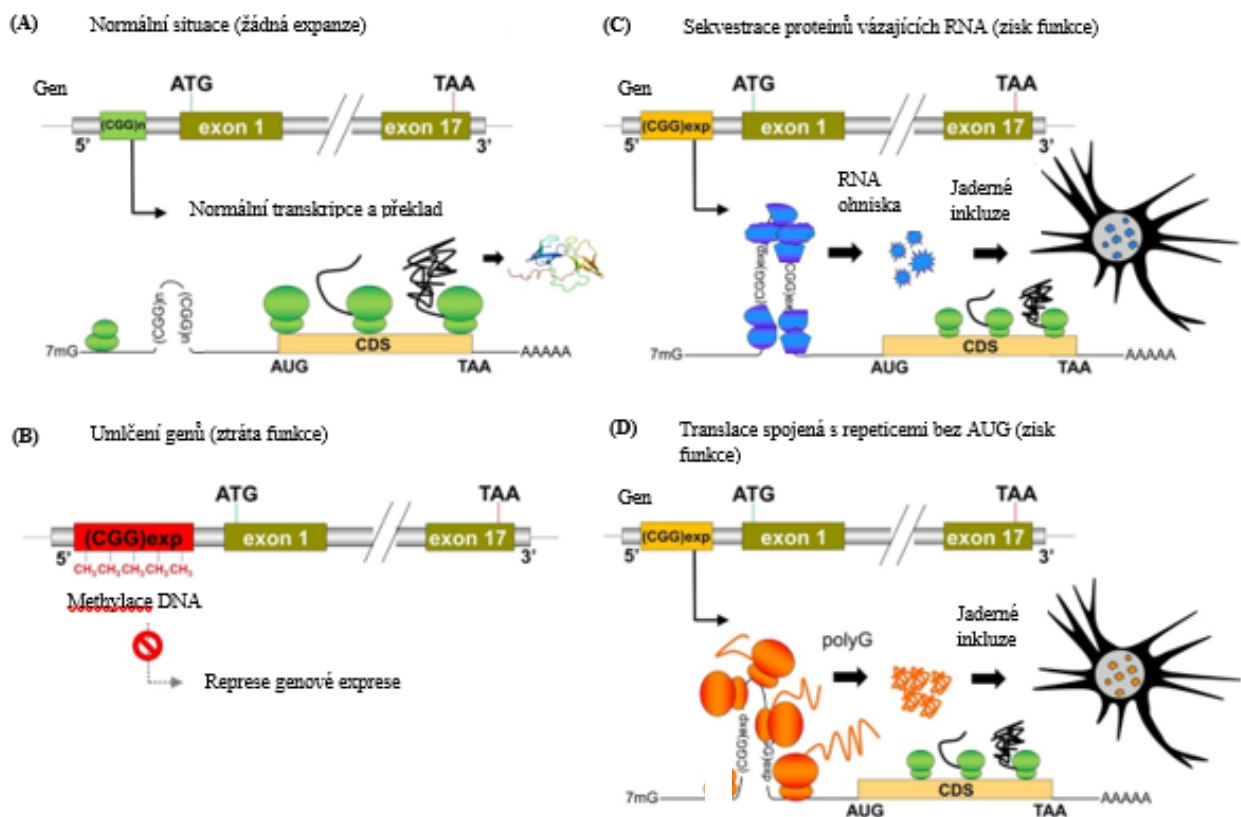
5 Onemocnění způsobené expanzí trinukleotidů

Expanze nestabilních tandemových repetitivních sekvencí představují trvalé změny ve specifické sekvenci DNA a ty jsou důsledkem vzniku neurodegenerativních a neuromuskulárních genetických onemocnění. Velikosti těchto změn se pohybují v rozmezí jednotek, stovek až tisíců nukleotidů. Expanze trinukleotidů se řadí mezi nejčastěji se vyskytující expanze. Opakování těchto trinukleotidových repetitivních sekvencí se mezigeneračním přenosem zvyšuje a tím dochází k větší pravděpodobnosti jejich opakování a k ranějšímu nástupu onemocnění (Thompson *et al.*, 2004). To znamená, že rodiče mohou být nositelé premutace, kdy se expanze v genu vyskytuje, ale nemanifestuje se klinicky. Expanze mohou být maternálního, ale i paternálního původu. Mezi jednotlivými poruchami existují podstatné rozdíly, které jeví dominantní nebo recesivní typ dědičnosti. Geny, které jsou spjaty s těmito chorobami jsou polymorfní, s variabilním počtem tandemových jednotek (Gatchel and Zoghbi, 2005; Thompson *et al.*, 2004).

Expandované repetice se nachází v kódující, nebo nekódující oblasti (Gatchel and Zoghbi, 2005). Expanze v kódující oblasti (exony) naruší primární konformaci proteinu a tím způsobí změnu jeho funkce. Dochází k tvorbě agregátů, které obsahují polyglutamin a tím toxicky poškozují neurony, což vede k neurodegeneraci. Tyto expanze způsobují poly-G onemocnění (polyglutaminová onemocnění) (Matěj and Rusina, 2019). Expanze nacházející se v nekódující oblasti (intronu, promotoru, nepřekládané oblasti) mají za následek ztrátu funkce proteinu, nebo na úrovni mRNA (mediátorová RNA) tvoří inkluze, které poškozují buňky. Mutovanou RNA vylučují specifické proteiny (Gatchel and Zoghbi, 2005; Swinnen *et al.*, 2019). Expanze tripletů kódující alanin, zejména v genech pro transkripční faktory, způsobují řadu lidských poly-A onemocnění (polyalaninová onemocnění), včetně okulofaryngeální muskulární atrofie. Expandovaný úsek způsobí změnu funkce, nebo získání abnormální funkce. Rozdíl mezi poly-A a poly-G onemocněním spočívá v tom, že u poly-A onemocnění dochází k toxickým účinkům ve svalech, a ne v neuronech. Dalším rozdílem mezi těmito onemocněními je, že poly-A onemocnění nejsou polymorfní. Poly-G onemocnění jsou v somatických a zárodečných buňkách nestabilní, ačkoli rozšířené poly-A onemocnění ano (Brown and Brown, 2004). U každého onemocnění je postižen jiný gen. Produkt postiženého genu, který nese patologickou expanzi, je součástí řady různých buněčných funkcí, do kterých spadá regulace energetického metabolismu buňky a regulace genové exprese, včetně methylace histon. (Matěj and Rusina, 2019).

Onemocnění můžeme rozdělit podle patogenního mechanismu do čtyř skupin. První skupina onemocnění je způsobená ztrátou funkce proteinu- FXS/FRAXA, FRAXE, FRDA (syndrom fragilního X, syndrom fragilního X E, Friedreichova ataxie), druhá skupina onemocnění je charakterizována patogenním mechanismem toxické RNA- DM1, FXTAS (myotonická dystrofie, syndrom fragilního X asociované tremor/ataxie), třetí skupina působí toxickým proteinem- HD, SCA1,2,3,6,7,17, DRPLA, OPMD, SBMA (Huntingtonova chorea, spinocerebelární ataxie, dentatorubrání pallidolyzická atrofie, okulofaryngeální muskulární dystrofie, spinální a bulbární muskulární atrofie) a poslední skupina zahrnuje onemocnění, jejíž mechanismus neznáme- SCA8, 12, HDL2 (Huntingtonova nemoc) (Obr. 9) (Tabulka 1) (Person *et al.*, 1997).

Obr. 9 Patogenní mechanismy spojené s expanzí repetitivních sekvencí bohatých na GC (převzato a upraveno dle Schröder *et al.*, 2022)

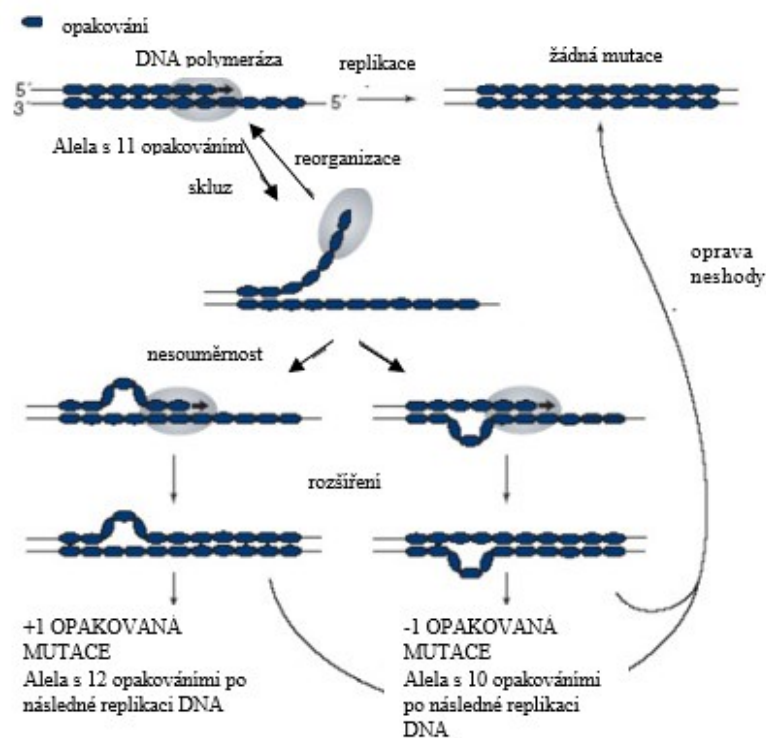


(A) Nepatogenní situace spojená s normální transkripcí a translací. (B) Umlčování genů. Expanze bohaté na GC v promotorech genů a/nebo 5' UTR (např. >200 repetitivních sekvencí CGG v 5' UTR FMR1 způsobující FXS) jsou spojeny s methylací DNA v místech GpC ostrůvků.

Expandované methylované alely jsou uzamčeny v chromatinové konfiguraci, která brání transkripci genu a expresi proteinu. **(C)** Sekvestrace faktorů sestřihu vázaných na RNA. Expanze CGG (55-200 opakování) způsobující FXTAS mohou vytvářet stabilní sekundární struktury RNA, které vážou specifické RNA vazebné proteiny s vysokou afinitou. Tyto molekuly RNA se hromadí, vytváří inkluze v jádře a sekvestrují navázané proteiny vázající RNA. **(D)** Translace spojená s repetičemi bez AUG je proces syntézy proteinů, při kterém je syntéza peptidu zahájena v místě rozšířených repetič při absenci kodonu AUG. V případě FXTAS vede translace repetič bez AUG k syntéze toxických polyglycinových peptidů, které se hromadí a tvoří proteinové agregáty. Mechanismy zisku funkce popsané v bodech (C a D) se vzájemně vylučují a mohou se vyskytovat současně.

Mezi mechanismy, které jsou zodpovědné za vznik expanzí tandemových repetič spadá nerovnoměrný crossing-over, který je charakteristický pro delší repetice a mechanismus „klouzání“ polymerázy, který je typický pro krátké repetice. Příčinou nerovnoměrného crossing-overu je špatné spojení nehomologních chromozomů a tím dochází k duplikaci sekvence DNA. Za to u „klouzání“ DNA polymerázy při replikaci dochází k chybné reasociaci templátového a syntetizovaného řetězce a ke vzniku smyčky (Obr. 10). Tento mechanismus se udává jako nejpravděpodobnější mechanismus vzniku mutací (Šeda *et al.*, 2005-2006).

Obr. 10 Schéma „klouzání“ DNA polymerázy (převzato a upraveno dle Fan and Chu, 2007)



Syndrom	Triplet	Protein-Gen	Lokus	Funkce proteinu	Pozice	Zdravost	Mutace	Dědičnost
Huntingtonova chorea	CAG	Huntingtin (HHT)- HHT	4p16.3	Od regulace genové exprese, po regulaci proteosyntézy	CR	6-35	36-121	AD
Bulbospinální svalová atrofie	CAG	Androgenový receptor (AR)-AR	Xq12	Receptor pro testosteron	CR	9-36	38-62	XLR
Okulofaryngeální muskulární dystrofie	GCG	Poly A vazebný protein1 (PABPN1)-PABNP1	14q11.2	Stabilizace RNA	CR	10	12-17	AD
Spinocerebelární ataxie typ 1	CAG	Ataxin1 (ATXN1)- SCA1	6p22.3	Regulace transkripce	CR	6-44	39-82	AD
Spinocerebelární ataxie typ 2	CAG	Ataxin2 (ATXN2)-SCA2	12q24.12	Metabolismus RNA	CR	14-31	34-62	AD
Spinocerebelární ataxie typ 3	CAG	Ataxin3 (ATXN3)-SCA3	14q32.12	Deubikvitinační enzym	CR	12-43	>60	AD
Spinocerebelární ataxie typ 6	CAG	1aA-podjednotka vápníkového kanálu závislá na napětí (CACNA1A)- CACNA1A	19p13.13	Podjednotka řízeného kalciového kanálu	CR	5-18	20-33	AD
Spinocerebelární ataxie typ 7	CAG	Ataxin7 (ATXN7)- SCA7	3p14.1	Regulace genové exprese	CR	7-34	<37	AD
Spinocerebelární ataxie typ 17	CAG	Tata-box vazebný protein (TBP)- SCA17	6q27	Regulace transkripce	CR	25-44	45-66	AD
Dentatorubralní pallidolýzická atrofie	CAG	Atrophin1 (ATN1)- DRPLA	12p13.31	Regulace transkripce	CR	7-25	49-88	AD
Syndrom fragilního X	CGG	Fragile X messenger ribonucleoprotein 1 (FMRP1)-FMR1(FRAXA)	Xq27.3	Poruchy methylace	5'UTR	5-55	< 200	XLD
Fragilní XE syndrom	CGG	Fragile X messenger ribonucleoprotein 2 (FMRP2)- FMR2(FRAXE)	Xq28	Poruchy methylace	5'UTR	6-60	< 200	XLR
Friedreichova ataxie	GAA	Frataxin (FXN)- FXN	9q21.11	Homeostáza mitochondriálního železa, poruchy transkripce	INTRON 1	6-33	200-1700	AR
Spinocerebelární ataxie typ 8	CTG	Ataxin8 (ATXN8)- SCA8	13q21	Poruchy metabolismu RNA	3'UTR	16-34	>100	AD
Spinocerebelární ataxie typ 12	CAG	Protein phosphatase 2 regulatory subunit B (PPP2R2B)- SCA12	5q32	Regulace transkripce	5'UTR	<32	51-78	AD
Huntingtonova nemoc typ 2	CTG	Junctophilin 3 (JPH3)- JPH3	16q24.2	Součást junkčního komplexu	CR/3'UTR	6-27	41-58	AD
Myotonické dystrofie typ 1	CTG	Proteinkináza myotonické dystrofie(DMPK)- DM1	19q13	Poruchy metabolismu RNA	3'UTR	5-37	50-3000	AD
Syndrom fragilního X asociované tremor/ataxie	CGG	Fragile X messenger ribonucleoprotein 1 (FMRP1)- FMR1	Xq27.3	Abnormální zvýšení exprese	5'UTR	5-54	55-200	XLD

Tabulka 1 Přehled onemocnění spojených s trinukleotidovými repetitivy.

CR - kódující oblast, UTR - nepřekládaná oblast, AD - autozomálně dominantní, AR - autozomálně recesivní, XLD - X dominantně vázaná, XLR - X recesivně vázaná (převzato a upraveno dle Gatchel and Zoghbi, 2005; Matěj and Rusina, 2019; Orphanet, 2023)

5.1. Huntingtonova chorea

Huntingtonova chorea se stala čtvrtou popsanou chorobou způsobenou expanzí trinukleotidů. V roce 1872 ji popsal lékař George Huntington (Thompson *et al.*, 2004). Její chromozomová lokalizace je 4.p16.3 (Orphanet, 2023).

5.1.1 Etiologie

Toto onemocnění způsobují expanze obsahující sekvenci CAG, které kódují polyglutamin v kódující oblasti prvního exonu genu HHT (Huntingtin). Zmnožením glutaminu dochází ke změně struktury a konformace Huntingtinu. Produktem mutace je tedy aberantní protein HHT (Matěj and Rusina, 2019). Opakováním trinukleotidu dochází k tvorbě dlouhého HHT, který je následně rozdělen na menší fragmenty. Ty se hromadí v neuronech a tím působí pro buňku toxicky. Následkem je odumírání neuronů v mozku a narušení jeho normálního fungování (Obr. 10) (MedlinePlus, 2020a). Bylo zjištěno, že u zdravého člověka se vyskytuje 10-26 opakování tripletu nukleotidů. V případě, že se nalezne expanze v rozsahu 27-35 opakování, je pro vznik onemocnění potřebná další expanze. Riziko vzniku HD se vyskytuje v rozmezí 36-41 opakování. Jedinci s takovou expanzí se však nemusí během života setkat s žádnými příznaky. Výskyt nemoci se nejčastěji manifestuje kolem 40. roku života v rozsahu 45-55 opakování. V počtu více než 60 tripletů opakování se onemocnění projevuje již v dětském věku (Otová *et al.*, 2020; Thompson *et al.*, 2004).

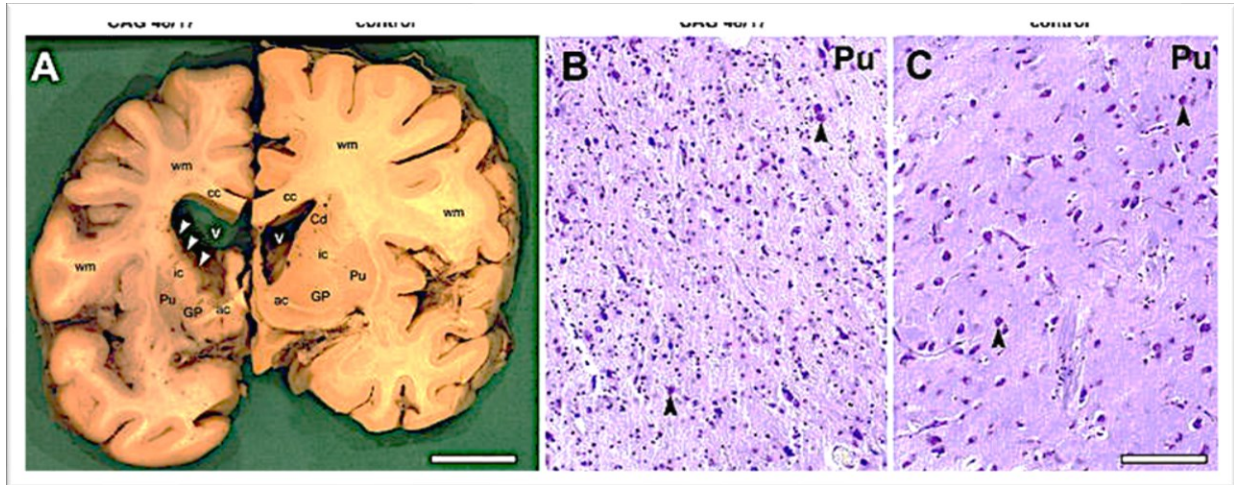
5.1.2 Dědičnost

Ke vzniku onemocnění stačí jeden pozměněný gen. Onemocnění se může zřídka vyskytovat i u potomka, který má oba rodiče zdravé (MedlinePlus, 2020a). Potomek jedince, který je postižen, má 50 % šanci na zdědění tohoto onemocnění (Matěj and Rusina, 2019). Vzácně se mohou objevovat formy juvenilní, jejichž počátek vzniku je do 20 let života a formy pozdní, které se vyskytují po 60. roce (Matěj and Rusina, 2019). Bylo prokázáno, že časná forma nástupu onemocnění se dědí častěji od otce nežli od matky (Lutz, 2007). Postižení jedinci, kteří mají juvenilní formu HD se obvykle dožívají 10-15 let od objevení příznaků (MedlinePlus, 2020a). Tuto chorobu zdědí osoba jako autozomálně dědičný znak od postiženého rodiče, nejčastěji otce. Častěji jsou postiženi heterozygoti než homozygoti (Gatchel and Zoghbi, 2005; Thompson *et al.*, 2004). Věk nástupu choroby je variabilní. Čím větší expanze, tím dříve nastup onemocnění (Otová *et al.*, 2020; Thompson *et al.*, 2004).

5.1.3 Klinický projev

Příznaky nemoci se mohou vyskytovat u všech věkových kategorií (Thompson *et al.*, 2004). Aberantní protein HHT má sklon k agregaci, kdy dochází k tvorbě inkluzí a ty se kumulují v cytoplasmě a z velké části v jádrech neuronů (Obr. 11). Zásadní změnou nastávající v raném stádiu nemoci je postižení středně velkých neuronů. Progredující nemocí dochází k úbytku neuronových struktur a v pozdních stádiích nastává celková atrofie mozku (Matěj and Rusina, 2019). Pro toto onemocnění jsou typické neurologické symptomy, které mají podobu progresivní demence, mimovolných pohybů různých částí těla a záškubů, které se nedají potlačit vůlí. Obtíže nastávají v udržení rovnováhy, chůzi, mluvení a polykání (Otová *et al.*, 2020; Thompson *et al.*, 2004). Zaznamenávají se i psychiatrické projevy, mezi které patří pocit viny, úzkost, apatie a nízké sebevědomí. Tyto projevy zahrnují psychózu se změnou osobnosti. V konečném stádiu nastává porucha spánku, dochází ke ztrátě tělesné hmotnosti a vyskytuje se inkontinence. Pacienti jsou odkázáni na péči a pomoc okolí. Nejčastější příčinou smrti je zápal plic nebo sebevražda (Orphanet, 2023; Otová *et al.*, 2020; Thompson *et al.*, 2004).

Obr. 11 Porovnání degenerace mozku (převzato a upraveno dle Parwez *et al.*, 2022)



(A) Frontální řez mozkiem HD v pokročilém stadiu degenerace a kontrolní mozek na srovnatelné úrovni striata s přední komisurou (**ac**). Atrofie caudatus nucleus (**Cd**) přiléhajícího k vnitřnímu pouzdru (**ic**) vede k přímému obrysu (**bílé šipky**) ohraničujícímu zvětšenou laterální komoru (**V**), která nebyla pozorována v striatálních oblastech kontrolního mozku. Putamen (**Pu**) a globus pallidus (**GP**) rovněž vykazují těžkou atrofii. Dochází k úbytku bílé hmoty (**wm**) a corpus callosum (**cc**) v HD mozku. (B) Parafinový řez HD putamenu barvený kresylovou violetí vykazuje ztrátu většiny středně velkých striatálních neuronů s některými těly

neuronových buněk vlevo (**černé šipky**) a výraznou gliózu, jak bylo zjištěno hojnými jádry malých buněk. (C) Řez kontrolního mozku ukazuje normální distribuci středně velkých striatálních neuronů (**černé šipky**).

5.1.4 Prevalence

V Evropě a ve Spojených státech amerických se řadí mezi nejčtenější onemocnění (Orphanet, 2023). V jiných oblastech světa se onemocnění vyskytuje zřídka. Prevalence tohoto onemocnění se v Evropě udává 3-7 lidí na 100 000 obyvatel (MedlinePlus, 2020a).

5.2 Syndrom fragilního X

Toto onemocnění se řadí mezi první popsané onemocnění, u kterého se prokázalo, že je způsobeno expanzí trinukleotidů. Onemocnění se také označuje jako syndrom Martin-Bellové. Název byl odvozen podle dvojice, která tento syndrom poprvé popsala v roce 1943. FXS je X-vázané multisystémové genetické onemocnění, které se hned po Downově syndromu řadí mezi jednu z nejčastějších příčin mentálního postižení. FXS je spojen s fragilním místem Xq27.3., které se nachází na chromozomu X a označuje se jako FRAXA. Toto místo bylo pozorováno jako nebarvící se mezera, nebo zlom (Obr. 12) (Ciaccio *et al.*, 2017).

5.2.1 Etiologie

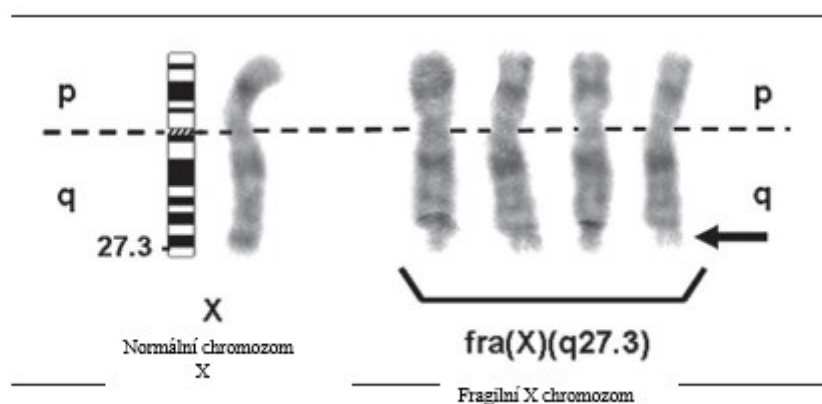
Toto onemocnění je způsobené expanzí CGG repetice lokalizované v 5' UTR (nepřekládaná oblast) genu FMR1. Následkem expanze je nadměrná methylace cytosinů v promotoru a umlčení transkripce genu. Dochází ke snížení nebo ke ztrátě funkce proteinu FMRP1 (fragilní X messenger ribonukleoprotein). Tento protein je produkt FMR1 genu, který se podílí na vývoji dendritů a axonů a regulaci posttranskripčního metabolismu RNA. Za zbylé procento změn FMR1 jsou zodpovědné delece genu, intragenové duplikace/delece a jednonukleotidové varianty. Normální počet repetic zdravého jedince je v rozsahu 5-44. Rozmezí počtu repetic od 45-54 je považováno za šedou zónu. Rozmezí od 55-200 opakovaných tripletových repetic označujeme jako premutaci. Tento počet repetic je zodpovědný za patologické stavy, které se liší od syndromu fragilního X. Mezi tyto stavy se řadí FXTAS, vyskytující se více u mužů, než u žen a FXPOI (fragilní X asociované primární ovariální insuficience) u žen. Kromě velikosti opakování repetice CGG, může také ovlivňovat stabilitu genu přítomnost tripletů AGG, které jsou rozptýlené v oblasti FMR1. V populaci se většinou vyskytuje jedno nebo dvě přerušení repeticemi AGG v 5' UTR. Pokud

alely FXS obsahují dlouhé úseky nepřerušovaných CGG v 3' UTR, dochází obvykle k tomu, že nevykazují žádné AGG v 5' UTR. Alely bez AGG mají největší riziko pro expanzi plné mutace. Přítomnost jediného AGG, toto riziko snižuje. Naopak snížení počtu opakování je možné, ale vzácné (Ciaccio *et al.*, 2017).

5.2.2 Dědičnost

FXS je nejčastější X-vázané onemocnění, vznikající z premutačních alel s kopiemi od matky, nikoliv od otce. Premutace se často při paternální transmisi zkracují. Ve většině případů se závažnější příznaky projevují u mužů nežli u žen. Při přenosu premutace z matky na potomka může dojít k rozšíření expanze a jejímu potomkovi hrozí, že se narodí s FXS. Zatímco u mužů se mezigeneračním přenosem premutace nerozšiřuje, předává ji pouze svým dcerám. Synům premutaci předat nemůže, jelikož od otce dědí chromozom Y (Ciaccio *et al.*, 2017).

Obr. 12 Porovnání normálního X chromozomu s X chromozomem syndromu fragilního X (převzato a upraveno dle Floriani *et al.*, 2016)



Pásky po trypsinu a barvení roztokem Giemsa. p: krátké raménko, q: dlouhé raménko

5.2.3 Klinický projev

Toto onemocnění postihuje převážně centrální nervový systém. Velká variabilita tohoto onemocnění se manifestuje v raném dětství. Většina těchto postižených jedinců má opožděný vývoj řeči, úzkostné stavy, hyperaktivní chování nebo poruchu pozornosti. U zlomku postižených dětí se projevují potíže s usínáním a s brzkým ranním a nočním probouzením. FXS je důsledkem mentální retardace a autismu. Postižené ženy mohou vykazovat znaky spojené s

deficitem intelektu a jejich fenotyp nemoci je spojen s inaktivací X. U mužů je toto onemocnění spojeno s charakteristickými rysy, jako jsou ploché nohy, dlouhý a úzký obličej s velkýma odstávajícíma ušima, protáhlou bradou, vysokým čelem a u dospívajících postižených mužů se vyskytuje makroorchidismus (Obr. 13). Délka života závisí na závažnosti příznaků (Ciaccio *et al.*, 2017).

Obr. 13 Čtyři bratři s typickými znaky FXS (převzato dle Protic *et al.*, 2022)



Všichni čtyři chlapci mají výrazné vysoké čelo, vysoké patro, hypermobilitu kloubů, a zvláště výrazné ušní boltce.

5.2.4 Prevalence

Onemocnění se vyskytuje v Austrálii, USA, Finsku a Holandsku (Thompson *et al.*, 2004). Udávaná frekvence výskytu u žen je 1:4000-6000 a u mužů 1:5000-7000 (Ciaccio *et al.*, 2017).

5.3 Syndrom fragilního X E

FRAXE je onemocnění, jehož chromozomová lokalizace je Xq28 (Orphanet, 2023).

5.3.1 Etiologie

Onemocnění vzniká na základě expanze CCG repetice v 5' UTR genu FMR2, a to při překročení 200 opakování (Orphanet, 2023). Rozšířená oblast je nestabilní a označuje se jako

fragilní místo FRAXE. Gen FMR2 kóduje protein FMRP2, jehož funkci neznáme. V důsledku výskytu expanze dochází k hypermethylaci a transkripčnímu umlčování. FMR2 gen je tedy vypnutý a protein se netvoří. V současnosti není známo, jak velký nedostatek tohoto proteinu vede u FRAXE k mentálnímu postižení (MedlinePlus, 2014).

5.3.2 Dědičnost

FRAXE se dědí v X linii a je tedy považován za X vázané recesivní onemocnění (Orphanet, 2023). U mužů stačí k projevu nemoci jedna změněná kopie, kdežto u žen může jedna změněná kopie vést k méně závažným příznakům, nebo se nemusí projevit vůbec. (MedlinePlus, 2014).

5.3.3 Klinický projev

Onemocnění je charakterizováno proměnlivým klinickým profilem, zahrnující lehké až středně těžké intelektuální postižení. Nastávají potíže s učením, problémy s chováním a komunikací. U některých jedinců byly také zaznamenány poruchy osobnosti a autistické chování, které se s přibývajícím věkem oproti jiným formám mentálního postižení nezhoršuje. Projevující se příznaky jsou velmi mírné a postižení jedinci žijí bez komplikací (MedlinePlus, 2014).

5.3.4 Prevalence

Odhad výskytu syndromu fragilní X E je u mužů 1:25000-100 000. U žen se toto onemocnění detekuje zřídka (MedlinePlus, 2014).

5.4 Friedreichova ataxie

Toto onemocnění se řadí mezi nejčastější onemocnění ze skupiny autozomálně recesivních cerebelárních onemocnění. U autozomálně dominantních spinocerebelárních ataxií nedochází k tak nápadnému postižení mozečku (Matěj and Rusina, 2019). Řadí se mezi nejčastější dědičné ataxie (Lutz, 2007). Mnohdy bývá spjata s hypertrofickou kardiovaskulární chorobou a s diabetes mellitus. Onemocnění je lokalizováno na chromozomu 9q21.11 (Orphanet, 2023).

5.4.1 Etiologie

Onemocnění se manifestuje v důsledku expanze tripletu GAA nacházející se v prvním intronu genu FXN (frataxin), který kóduje protein frataxin (Gatchel and Zoghbi, 2005). Tento protein se účastní metabolismu železa. Kvůli nedostatku proteinu dochází k progresivnímu poškození centrálního a periferního nervového systému (Matěj and Rusina, 2019; Orphanet, 2023). Vzácné bodové mutace v genu jsou zodpovědné za zbylých 2-6 % případů Friedreichovy ataxie. U zdravého člověka se vyskytuje méně jak 34 opakování trinukleotidových repetit. Za premutaci je považováno 36-1000 opakování. Onemocnění vzniká při více jak 1000 opakování repetit. Pro vznik nemoci je nutná ztráta exprese obou alel. Onemocnění se manifestuje již před adolescencí (Thompson *et al.*, 2004). Délka expanze koreluje s věkem nástupu a závažností projevů onemocnění. Věk nástupu je nižší než u autozomálně dominantních ataxií. Vyskytuje se mezi 5.-25. rokem života (Matěj and Rusina, 2019).

5.4.2 Dědičnost

Onemocnění se dědí autozomálně recesivně. Přenáší se v heterozygotním stavu a postihuje obě pohlaví stejně (Matěj and Rusina, 2019).

5.4.3 Klinický projev

Subjektivní a objektivní příznaky Friedreichovy ataxie jsou variabilní. Friedreichova ataxie je stav, u kterého dominuje atrofie hrudní míchy, mozečku a hypertrofie myokardu. (Matěj and Rusina, 2019). Projevuje se ztíženou řečí, nekoordinovanými pohyby končetin, chybějícími šlachovými reflexy, skoliózou, deformacemi nohou, kardiomyopatií, diabetem, ztrátou zraku a poruchou sluchu (Orphanet, 2023). Onemocnění se většinou projeví před dospíváním a pacienti často přestávají chodit již ve středním věku života (Lutz, 2007). Doba od nástupu choroby do závislosti na invalidním vozíku je 15 let. Ke smrti dochází v důsledku onemocnění srdce a bronchopneumonií (Orphanet, 2023).

5.4.4 Prevalence

FRDA je řazena mezi nejčastější typ dědičné ataxie v Evropě a Severní Americe (Matěj and Rusina, 2019). Prevalence nemoci je 1:10 0000 (Orphanet, 2023).

5.5 Syndrom fragilního X asociované tremor/ataxie

FXTAS je onemocnění, jehož chromozomová lokalizace je Xq27.3 (Orphanet, 2023).

5.5.1 Etiologie

Příčinou FXTAS je expanze tripletů CGG v genu FMR1. Za premutaci tohoto onemocnění se považuje opakování v rozmezí 60-200 CGG repetit. Následkem expanze trinukleotidů dochází ke zvýšené produkci abnormální mRNA, jejíž vysoké hladiny jsou příčinou tohoto onemocnění (Gatchel and Zoghbi, 2005; MedlinePlus, 2020b). Expanze repetit ztěžuje tvorbu FMRP a tím může docházet k mírným projevům FXS (MedlinePlus, 2020b).

5.5.2 Dědičnost

Jedná se o vzácnou X vázanou dominantní chorobu. Ke zvýšenému riziku vzniku nemoci stačí jen jedna kopie změněného genu. Onemocnění se nemusí u každého jedince projevit. U postižených žen dominantním onemocněním vázaným na X chromozom, se vyskytují méně závažné klinické projevy než u mužů (MedlinePlus, 2020b). Onemocnění se vyskytuje častěji u starších mužů, kolem 60 let života (Gatchel and Zoghbi, 2005). U žen se onemocnění vyskytuje méně, a to z důvodu inaktivace chromozomu X (MedlinePlus, 2020b).

5.5.3 Klinický projev

Charakteristickým znakem FXTAS je přítomnost inkluzí v neuronech a astrocytů po celém mozku (Gatchel and Zoghbi, 2005). Syndrom fragilního X asociované tremor/ataxie je neurodegenerativní porucha, která se projevuje nekontrolovatelným progresivním třesem, problémy s rovnováhou, poškozením periferních nervů a poruchou autonomního nervového systému způsobující inkontinenci. Mezi další příznaky patří mírný parkinsonismus s psychiatrickými projevy jako je úzkost nebo deprese, s možností progresu demence (Orphanet, 2023). Je také spojován s problémem pohybu a myšlení (MedlinePlus, 2020b). Prognóza závisí na rychlosti progresu, která je variabilní (Orphanet, 2023).

5.5.4 Prevalence

Frekvence výskytu postižení se odhaduje 1:3000 u mužů. U žen je frekvence výskytu 1:200, z nichž se pouze u 16 % případů toto onemocnění projeví (MedlinePlus, 2020b).

5.6 Myotonická dystrofie typ 1

MD 1 se stala třetí popsanou chorobou z expanze trinukleotidových repetit (Thompson *et al.*, 2004). Jedná se o multisystémovou, neuromuskulární poruchu, jejíž chromozomová lokalizace onemocnění je 19q13.3 (Lutz, 2007; Orphanet, 2023).

5.6.1 Etiologie

Příčinou onemocnění je expanze CTG tripletu v 3' UTR oblasti genu DMPK (proteinkináza pro myotonickou dystrofii) (Khehra *et al.*, 2023). Zdravý jedinec má méně jak 30 repetit. V počtu od 50-80 opakování se obvykle projevuje mírné postižení a v rozmezí 80-2000 repetit jsou osoby postiženy (Thompson *et al.*, 2004).

5.6.2 Dědičnost

Myotonická dystrofie 1 je choroba známá tím, že se onemocnění nemusí projevit ve všech případech. Expandovanou repetici můžou přenášet oba rodiče. Každé postižené dítě tímto onemocněním je potomkem postižené matky. Matka může mít mírnou expresi onemocnění na takové úrovni, že nemusí ani vědět, že je postižena. Muži mohou přenášet expanzi do 1000 repetit, avšak k masivní expanzi dochází pouze maternálním přenosem (Thompson *et al.*, 2004).

5.6.3 Klinický projev

Onemocnění je charakteristické množstvím svalových a systémových projevů, které se liší v závislosti na věku nástupu, které je variabilní. Mezi projevy MD 1 spadají potíže s dýcháním, příjmem potravy, spánkem, porucha intelektu a porucha autistického spektra. Dochází ke svalové slabosti, opakujícím se infekcím a psychiatrickým poruchám, mezi které patří úzkost, deprese a hyperaktivita (Orphanet, 2023). Dále se může vyskytovat multiorgánové onemocnění. Jedná se o nejčastější svalovou dystrofii dospělých. U takto postižených pacientů se udává vyšší předpoklad rizika rakoviny. Některé případy onemocnění jsou natolik závažné, že mají dopad na délku života, zejména ty s časným nástupem expanze. Příčinou smrti bývají kardiovaskulární onemocnění, arytmie a respirační selhávání (Orphanet, 2023).

5.6.4 Prevalence

Onemocnění se vyskytuje v některých částech Severní Ameriky (Thompson *et al.*, 2004). Prevalence výskytu je 1:2 000 (Orphanet, 2023).

5.7 Spinocerebelární ataxie 1,2,3,6,7,8,17

Z genetického hlediska jsou SCA rozsáhlou skupinou onemocnění v rozmezí SCA1- SCA 48 (Matěj and Rusina, 2019). Jsou řazeny do skupiny chronických progresivních ataxií (Lutz, 2007).

5.7.1 Etiologie

Rozlišujeme tři skupiny SCA. První skupinou jsou SCA, které jsou způsobeny expanzí CAG repetice kódující polyglutamin. Druhou skupinou jsou SCA způsobené mutacemi, které oproti první skupině spinocerebelárních ataxií začínají později a progredují rychleji. A třetí skupinou jsou SCA, u kterých dochází k expanzi jiných tripletů (Matěj and Rusina, 2019). SCA 1,2,3,6,7,17 jsou způsobeny expanzí CAG. SCA 8 je podtyp cereberální ataxie typu 1 a je způsobena expanzí CTG v 3' UTR, která produkuje expanzi v genu pro ataxin (Gatchel and Zoghbi, 2005; Orphanet, 2023). SCA 12 je velmi vzácným podtypem ataxie typu 1 (Orphanet, 2023). U této choroby dochází k expanzi CAG repetice v 5' netranslatované oblasti PPP2R2B (proteinové fosfatázy 2, regulační podjednotky B), přesněji v promotoru (Gatchel and Zoghbi, 2005). SCA postihují všechny věkové kategorie. Prognóza je relativně pozitivní. Nemoc většinou postupuje pomalu během desetiletí (Orphanet, 2023).

5.7.2 Dědičnost

Jde o autozomálně dominantní a degenerativní onemocnění (Thompson *et al.*, 2004). Šance přenosu SCA první skupiny na potomky, bez rozdílu na pohlaví, je 50 %. Expandovaný úsek se generacemi často prodlužuje. Tím dochází k časnějšímu nástupu nemoci s větší závažností a rychlejší progresí (Matěj and Rusina, 2019).

5.7.3 Klinický projev

Spinocerebelární ataxie se projevují mezi 20.-40. rokem života. Nicméně s neustálým nárůstem počtu pacientů se posunuje i věkové rozmezí manifestace onemocnění. Klinický obraz SCA je velmi variabilní. Mezi charakteristické rysy pro SCA 1 se řadí bulbární syndrom s dysartrií, dysfagií a choreou. U SCA 2 dochází ke vzniku parkinsonismu, prudkých záškubů svalů a polyneuropatického syndromu. U SCA3 při pokročilé atrofii mozečku, dochází také k atrofii mozkového kmene, vyskytuje se nápadná spasticita, polyneuropatie a parkinsonismus. Zatímco u SCA6 a SCA7 převažuje atrofie kůry mozečku. U SCA6 se vyskytuje cereberální syndrom a SCA7 je charakteristická pigmentovou retinopatií s poruchou sluchu (Matěj and

Rusina, 2019). Pro SCA 8 je typická přítomnost třesu s relativně mírnou cerebelární ataxií a s příznaky demence (Orphanet, 2023). U SCA 17 se přijevují příznaky v omezení hybnosti a v držení těla. Mezi další příznaky se řadí chorea vedoucí až k Huntigtonskému fenotypu, demence, dysfagie a dystonie. Většina onemocnění se také projevuje i jinými příznaky, jako je postižení dalších struktur centrálního, nebo periferního nervového systému. Postupná atrofie mozečku je často kombinovaná s kmenovou a míšní atrofií. Průběh atrofie u subtypů SCA způsobených polyglutaminovými expanzemi je rychlejší nežli u podtypů SCA, které jsou způsobeny bodovými mutacemi (Matěj and Rusina, 2019).

5.7.4 Prevalence

U nás se SCA nejčastěji vyskytují v pořadí SCA 2, 1, 17, 6, 7, 3. Výskyt SCA 3 neboli Machadova-Josephova nemoc je u nás v porovnání s jinými evropskými státy vzácná (Matěj and Rusina, 2019). Prevalence diagnostikovaných jedinců je v evropské populaci 3:100 000. V České republice je prevalence 1:100 000 (Matěj and Rusina, 2019).

6 Závěr

Tato práce představuje přehled zaměřující se na problematiku expanzí trinukleotidových repetit, které jsou příčinou vzniku geneticky podmíněných onemocnění. Přispívá k porozumění jejich mechanismu vzniku a způsobu, jak tyto onemocnění diagnostikovat. Ve své práci popisují zejména ty onemocnění, které se vyskytují nejčastěji: Huntingtonova chorea, syndrom fragilního X, syndrom fragilního X E, syndrom fragilního X asociované tremor/ataxie, Friedreichova ataxie, myotonická dystrofie 1 a spinocerebelární ataxie. Tyto choroby mají významný dopad na kvalitu života postižených jedinců a jejich rodin. V rámci celosvětového průzkumu byla provedena analýza pacientů s těmito mutacemi. To umožnilo zhodnotit klinickou a genetickou charakteristiku těchto chorob.

K detekci expanzí trinukleotidových repetit se používá fluorescenční in situ hybridizace, konvenční PCR, triplet repeat primed PCR, repeat-primed PCR, methylačně specifická PCR, Sangerovo sekvenování, techniky sekvenování nové generace a další. Neustálý vývoj diagnostických metod a postupů umožňuje rychlou a přesnou detekci expanzí trinukleotidů, což je rozhodující pro správný záchyt chorob, zlepšení kvality a diagnostiky, poskytnutí vhodné léčby a péče. Kombinace těchto zmíněných diagnostických metod se osvědčila jako efektivní způsob pro lepší detekci a analýzu expanzí trinukleotidových repetit.

7 Seznam použitých zkratek

Bp	base pairs - pár bazí
DNA	deoxyribonucleic acid - deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynucleotide triphosphates - deoxyribonukleotidtrifosfáty
ddNTP	dideoxyribonukleotidtrifosfáty
DM	myotonic dystrophy - myotonická dystrofie
DMPK	myotonic dystrophy protein kinase - proteinkináza pro myotonickou dystrofii
DRPLA	dentatorubral-pallidoluysian atrophy - dentatorubralní pallidolyzická atrofie
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid - kyselina ethylendiamintetraoctová
FISH	fluorescence in situ hybridization - fluorescenční in situ hybridizace
FMR	fragile X messenger ribonucleorprotein - fragilní X messenger ribonukleoprotein
FMRP	fragile X mental retardation protein - protein mentální retardace spojený s fragilním X
FRAXA	fragile X syndrome - syndrom fragilního chromozomu X
FRAXE	fragile X E syndrome- syndrom fragilního X E
FRDA	Friedreich ataxia - Friedreichova ataxie
FXN	frataxine - frataxin
FXS	fragile X syndrome - syndrom fragilního chromozomu X
FXTAS	fragile X associated tremor/ataxia syndrom - syndrom fragilního X asociované tremor/ataxie
FXPOI	fragile X associated primary ovarian insufficiency - fragilní X asociované primární ovariální insuficience
HD	Huntingtonova chorea - Huntingtonova chrooba
HDL	Huntington disease - like - Huntingtonova nemoc
HHT	Huntingtin
kb	kilo base pairs - tisíc párů bazí
LINE	long interspersed nuclear elements - dlouhé rozptýlené jaderné elementy
mRNA	messenger ribonucleic acid - mediátorová ribonukleová kyselina
Mb	megabase pair - milion párů bazí
NGS	next generation sequencing- sekvenování nové generace
PCR	polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce
OPMD	dentatorubral - pallidoluysian atrophy - dentatorubralní pallidolyzická atrofie
polyA	polyalanine - polyalanin

polyQ	polyglutamine - polyglutamin
PPP2R2B	protein phosphatase 2 regulatory subunit B - regulační podjednotka B proteinfosfatázy 2
rRNA	ribosomal ribonucleic acid - ribozomální ribonukleová kyselina
RNA	ribonucleic acid - ribonukleová kyselina
SBMA	spinal and bulbar muscular atrophy - bulbospinální svalová atrofie
SCA	spinocerebellar ataxia - spinocerebelární ataxie
SINE	short interspersed nuclear elements - krátké rozptýlené jaderné elementy
STR	short tandem repeat - krátké tandemová repetice
tRNA	transfer ribonucleic acid - transferová ribonukleová kyselina
UTR	untranslated region - nepřekládaná oblast
UV	ultraviolet light - ultrafialové záření
VNTR	variable number of tandem repeats polymorphism - variabilní množství tandemových repetice

8 Seznam tabulek a obrázků

Seznam tabulek

Tabulka 1 Přehled onemocnění spojených s trinukleotidovými repeticemi.....	29
--	----

Seznam obrázků

Obr. 1 Schéma dědičnosti autozomálně dominantního onemocnění	10
Obr. 2 Schéma dědičnosti autozomálně recesivního onemocnění	11
Obr. 3 Schéma dědičnosti X vázaného dominantního onemocnění.....	12
Obr. 4 Schéma dědičnosti X vázaného recesivního onemocnění.....	13
Obr. 5 Vznik sekundárních jednotek.....	16
Obr. 6 Vizualizace mutovaného transkriptu DMPK s použitím FISH techniky (CAG7 sonda, červená).	18
Obr. 7 Princip PCR.....	20
Obr. 8 Elektroforéza v agarózovém gelu a elektroferogramy produktů PCR.....	21
Obr. 9 Patogenní mechanismy spojené s expanzemi repetice bohatými na GC	27
Obr. 10 Schéma „klouzáni“ DNA polymerázy	28
Obr. 11 Porovnání degenerace mozku	31
Obr. 12 Porovnání normálního X chromozomu s X chromozomem syndromu fragilního X..	33
Obr. 13 Čtyři bratři s typickými znaky FXS	34

9 Seznam použité literatury

- Beránek M.**, 2016. Molekulární genetiky pro bioanalytiky. 1. vydání. Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-3224-7.
- Brown L.Y.** and Brown S.A., 2004. Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. *Trends in Genetics*. 20 (1). DOI: [10.1016/j.tig.2003.11.002](https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.11.002).
- Ciaccio C.**, Fontana, L., Milani D., Tabano S., Miozzo M., Esposito S., 2017. Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. *Italian Journal of Pediatrics*. 43(1). DOI: [10.1186/s13052-017-0355-y](https://doi.org/10.1186/s13052-017-0355-y).
- Fan H.**, Chu J., 2007. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 5(1). DOI: [10.1016/S1672-0229\(07\)60009-6](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(07)60009-6).
- Floriani. M.A**, Vilas Boas M. R., Rosa R.F.M., Trevisan P., Dorfman L. E., Rosa R.C.M., Zen T.D., Zen P.R.G., 2016. Report of a patient with fragile X syndrome unexpectedly identified by karyotype analysis. *Brasilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine*. 53(2). DOI: [10.5935/1676-2444.20170017](https://doi.org/10.5935/1676-2444.20170017).
- Gatchel J.R.** and Zoghbi H.Y., 2005. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nature Reviews Genetics*. 6(10). DOI: [10.1038/nrg1691](https://doi.org/10.1038/nrg1691).
- Higuchi Y.**, Ando M., Yoshimura A., Hakotani S., Koba Y., Sakiyama Y., Hiramatsu Y., Tahiro Y., Maki Y., Haschiguchi A., Yuan J., Okamoto Y., Matsuura E., Takashima H., 2022. Prevalence of Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome in Patients with Cerebellar Ataxia in Japan. *The Cerebellum*. 21. DOI: [10.1007/s12311-021-01323-x](https://doi.org/10.1007/s12311-021-01323-x).
- Chintalaphani S.R.**, Pineda S.S., Deveson I.W., Kumar K.R., 2021. An update on the neurological short tandem repeat expansion disorders and the emergence of long-read sequencing diagnostics. *Acta Neuropathologica Communications*. 39(1). DOI: [10.1186/s40478-021-01201-x](https://doi.org/10.1186/s40478-021-01201-x).
- Klein A.F.**, Arandel L., Marie J., Furling D., 2020. FISH protocol for Myotonic Dystrophy type 1 cells. *Methods in molecular biology*. 2056. DOI: [10.1007/978-1-4939-9784-8_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9784-8_13).
- Lutz R.E.**, 2007. Trinucleotide Repeat Disorders. *Seminars in Pediatric Neurology*. 14 (1). DOI: [10.1016/j.spn.2006.11.006](https://doi.org/10.1016/j.spn.2006.11.006).
- Matěj R.** and Rusina R., 2019. Neurodegenerativní onemocnění. 2. vydání. Praha: Mladá fronta, ISBN 978-80-204-5123-1.
- Otová B.**, Mihalová R., Bobková K., 2020. Základy biologie a genetiky člověka. 2. vydání. Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-4565-0.

- Parwez E.P.**, Habbes H. W., Schumacher M. L., Parwez C. R., Saft C., Hein S. M., 2022. From Pathophysiology to Treatment of Huntington's Disease. London: Intech open, ISBN: 978-1-80355-427-3
- Pearson C.E.**, Ewel A., Acharya S., Fishel R.A., Sinden R.R., 1997. Human MSH2 binds to trinucleotide repeat DNA structures associated with neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics*. 6(7). DOI: [10.1093/hmg/6.7.1117](https://doi.org/10.1093/hmg/6.7.1117).
- Protic D.D.**, Aishworiya R., Salcedo-Arellano M.J., Tang S.J. Milisavljevic J., Mitrovic., Hagerman R.J., Budimirovic D.B., 2022. Fragile X syndrome: From Molecular Aspect to Clinical Treatment. *International journal of molecular sciences*. 23 (4). DOI: [10.3390/ijms23041935](https://doi.org/10.3390/ijms23041935).
- Schröder C.**, Horsthemke B., Depienne C., 2022. GC-rich repeat expansion: associated disorders and mechanisms. *De Gruyter*. 33 (4). DOI: [10.1515/medgen-2021-2099](https://doi.org/10.1515/medgen-2021-2099).
- Swinnen B.**, Robberecht W., Bosch L. V. D., 2019. RNA toxicity in non-coding repeat expansion disorders. *The embo journal*. 39(1). DOI: [10.15252/embj.2018101112](https://doi.org/10.15252/embj.2018101112).
- Thompson J.S.**, Thompson M.W., Nussbaum R.L., Willard H.F., McInnes R.R. 2004. *Klinická genetika*. 6. vydání. Praha: Triton, ISBN 80-7254-475-6.
- Warner J.P.**, Barrow L.H., Goudie D., Kelly K., Dow D., Fitzpatrick D.R., Brock D.J.H., 1996. A general method for detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *Journal of Medical Genetics*. 33(12). DOI: [10.1136/jmg.33.12.1022](https://doi.org/10.1136/jmg.33.12.1022).

Internetové zdroje

- Khan Academy**, 2023a. DNA sequencing. In: [khanacademy.org](https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/dna-sequencing) [online]. [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/dna-sequencing>
- Khan Academy**, 2023b. Polymerase chain reaction (PCR). In: [khanacademy.org](https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr) [online]. [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- Khan Academy**, 2023c. Southern blot. In: [khanacademy.org](https://www.khanacademy.org/science/what-are-living-things-made-of/xf9343b6caff766ff:the-molecular-basis-of-inheritance/xf9343b6caff766ff:human-genome-project-and-dna-fingerprinting/v/southern-blot) [online]. [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/what-are-living-things-made-of/xf9343b6caff766ff:the-molecular-basis-of-inheritance/xf9343b6caff766ff:human-genome-project-and-dna-fingerprinting/v/southern-blot>

- Khehra N., Padda I.S., Swift C.J., 2023.** Polymerase Chain Reaction (PCR) [online]. Florida: StatPearls Publishing. 6.3, [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- MedlinePlus, 2022a.** Autosomal dominant. In: medlineplus.gov [online]. Rockville Pike: Bethesda. 1.6 [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/ency/article/002049.htm>
- MedlinePlus, 2022b.** Autosomal recessive. In: medlineplus.gov [online]. Rockville Pike: Bethesda. 1.6 [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/ency/article/002052.htm>
- MedlinePlus, 2020a.** Huntington disease. In: medlineplus.gov [online]. Rockville Pike: Bethesda. 1.6 [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/huntington-disease/>
- MedlinePlus, 2020b.** Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. In: medlineplus.gov [online]. Rockville Pike: Bethesda. 1.4 [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/fragile-x-associated-tremor-ataxia-syndrome/>
- MedlinePlus, 2014.** Fragile XE syndrome. In: medlineplus.gov [online]. Rockville Pike: Bethesda. 1.1 [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/fragile-xe-syndrome/>
- MedlinePlus, 2022c.** Sex-linked dominant. In: medlineplus.gov [online]. Rockville Pike: Bethesda. 1.6 [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/ency/article/002050.htm>
- MedlinePlus, 2022d.** Sex-linked recessive. In: medlineplus.gov [online]. Rockville Pike: Bethesda. 1.6 [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/ency/article/002051.htm>
- Orphanet, 2023.** Orphanet. [online]. 16.8 [cit. 15.08.2023]. Dostupné z: <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>
- Šeda O., Liška F., Šedová L., 2005-2006.** Repetitivní DNA. Aktuální genetika. [online]. [15.08.2023]. Dostupné z: https://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/repetitivni_dna.htm