

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Iva Matějčková**

**VYUŽITÍ SEKVENAČNÍCH METOD NOVÉ GENERACE PRO OBJASNĚNÍ FENOTYPU  
PODOBNÉHO CF U PACIENTŮ S NEJASNOU MOLEKULÁRNÍ PODSTATOU  
ONEMOCNĚNÍ**

**UTILIZATION OF NEW GENERATION SEQUENCING METHODS TO ELUCIDATE  
CYSTIC FIBROSIS-LIKE PHENOTYPE AT PATIENTS WITH UNCLEAR ILLNESS OF  
MOLECULAR TYPE**

Diplomová práce  
Školitel: prof. MUDr. Milan Macek, DrSc.  
Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně 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, 1. 5. 2017

Iva Matějčková

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Milanu Mackovi, DrSc. za odborné vedení mé diplomové práce. Velké poděkování patří Mgr. Malgorzatě Dorotě Libik, Ph.D. a Mgr. Lence Dvořákové za pomoc při řešení praktických i teoretických problémů, odborné konzultace a trpělivost, se kterou se mi věnovaly. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Nikole Ptákové za odborné zaučení v laboratoři a za trpělivost, se kterou mi vše vysvětlovala. Děkuji i všem zaměstnancům ÚBLG ve Fakultní Nemocnici Motol za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, přátelům a kolegům za podporu, trpělivost a pomoc nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

## **Abstrakt:**

Cystická fibróza (CF) je geneticky podmíněné, autozomálně recesivní onemocnění, které se vyskytuje s prevalencí v evropské populaci přibližně 1:2500 – 1:1800. U tohoto onemocnění dochází k mutaci v *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) genu s následnou poruchou chloridových kanálů. U takto postižených jedinců pozorujeme zejména chronické dýchací obtíže, pankreatickou insuficienci, vysokou koncentraci chloridových iontů v potu a obstruktivní azospermii. Genetické vyšetření *CFTR* genu je indikováno u jedinců, kteří splňují klinický obraz CF a mají pozitivní potní test (zvýšená koncentrace chloridů v potu). Genetické vyšetření *CFTR* genu se většinou provádí pomocí komerčních kitů detekujících nejčastější mutace *CFTR* genu na území České republiky. Při negativním nálezu je dále prováděna metoda MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), která zachycuje rozsáhlejší delece a duplikace v genu. V případě negativního nálezu se provádí sekvenace všech exonů *CFTR* genu. I přes velmi dobře zavedený algoritmus vyšetření zůstávají někteří pacienti trpící projevy CF bez objasnění příčiny jejich onemocnění na genetické úrovni. Díky rozvoji sekvenování nové generace je možné diagnostiku CF zefektivnit a odhalit varianty, které nebyly zachyceny předešlými metodami.

## **Klíčová slova:**

Cystická fibróza, *CFTR*, molekulárně genetická diagnostika, sekvenování nové generace – Illumina

## **Abstract:**

Cystic fibrosis (CF) is genetically conditioned, autosomal recessive disease that occurs in the European population with a prevalence of about 1:2500 – 1:1800. In this disease we observe a mutation of the *CFTR* gene with subsequent fault in chloride channels. Such afflicted individuals usually suffer from chronic respiratory problems, pancreatic insufficiency, high concentration of chloride ions in sweat and obstructive azoospermia. Genetic testing of *CFTR* gene is indicated in individuals who meet the CF clinical picture and a positive sweat test (increased concentration of chlorides in the sweat). Genetic testing of the *CFTR* gene is usually done by using commercial kits detecting the most common mutations of the *CFTR* gene in the Czech Republic. If the testing results are negative, it is further performed an MLPA method that captures the larger deletions and duplications of gene, eventually a sequencing of all exons is. Despite the well-established algorithm of the testing, some patients suffering from symptoms of CF are left without genetic findings. Thanks to development of next generation sequencing, it is possible to make the diagnosis of CF more effective and uncover the variants that were not captured by previous methods.

## **Key words:**

Cystic fibrosis, *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), molecular genetic diagnostics, next generation sequencing – Illumina

# Obsah

Seznam zkratk	7
1 Úvod	8
2 Přehled literatury	9
2. 1 Cystická fibróza	9
2. 2 <i>CFTR</i> (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)	9
2. 3 Mutace <i>CFTR</i> genu	10
2. 3. 1 Třída I. – Porucha syntézy proteinu	12
2. 3. 2 Třída II. – Porucha transportu a vyzrání proteinu	12
2. 3. 3 Třída III. – Porucha regulace	12
2. 3. 4 Třída IV. – Snížení vodivosti	12
2. 3. 5 Třída V. – Snížená funkce syntézy	12
2. 4 Diagnostika cystické fibrózy	13
2. 4. 1 Potní test	14
2. 4. 2 Molekulárně genetické vyšetření <i>CFTR</i> genu	14
2. 4. 3 Transepitheliální rozdíl potenciálů	15
2. 5 Algoritmus vyšetření	15
2. 6 Historie sekvenování	16
2. 7 Sekvenování nové generace	16
2. 7. 1 Illumina	17
3 Cíle práce	20
4 Materiál a metody	21
4. 1 Vzorky DNA	21
4. 2 Molekulárně genetické vyšetření <i>CFTR</i> genu pomocí kitu ELUCIGENE CF- EU2v1	21
4. 2. 1 Reagencie	22
4. 2. 2 Postup	22
4. 3 Molekulárně genetické vyšetření mutací <i>CFTR</i> genu metodou MLPA	26
4. 3. 1 Reagencie	27
4. 3. 2 Postup	27
4. 4 Molekulární genetické vyšetření mutací <i>CFTR</i> genu metodou sekvenování dle Sangera	29
4. 4. 1 Reagencie	29

4. 4. 2 Postup.....	29
4. 5 Molekulárně genetické vyšetření <i>CFTR</i> genu pomocí NGS kitu CFTR MASTR Dx (Multiplicom).....	32
4. 5. 1 Reagencie .....	32
4. 5. 2 Postup.....	33
5 Výsledky .....	43
5. 2 Výsledky molekulárně genetického vyšetření <i>CFTR</i> genu u vybraného souboru pacientů pomocí kitu ELUCIGENE CF-EU2 .....	43
5. 3 Sekvenování celého genu <i>CFTR</i> pomocí NGS s následným ověřením .....	44
5. 3 Kompletace výsledků .....	53
5. 4 Validace metody .....	54
6 Diskuse .....	56
6. 1 Kauzální mutace .....	56
6. 2 Tiché a polymorfní mutace.....	58
6. 3 Chybovost NGS technologie .....	58
6. 4 Porovnání klasického sekvenování s platformou NGS.....	59
6. 5 Návrh dalšího algoritmu vyšetření .....	60
7 Souhrn.....	62
8 Seznam použité literatury .....	63



## Seznam zkratek

<b>AR</b>	autozomálně recesivní
<b>ARMS</b>	amplifikační refrakční mutační systém (z ang. Amplification Refractory Mutation System)
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>bp</b>	páry bází (z ang. base pair)
<b>CBAVD</b>	kongenitální oboustranná aplázie chámovodů (z ang. congenital bilateral absence of vas deferens)
<b>CF</b>	cystická fibróza
<b>CFTR</b>	gen pro regulaci transportu iontů přes buněčnou membránu (z ang. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)
<b>dNTP</b>	deoxynukleosidtrifosfát
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina (z ang. deoxyribonucleic acid)
<b>ENaC</b>	epiteliální sodíkový kanál (z ang. epithelial sodium channel)
<b>HGMD</b>	databáze lidských genových mutací (z ang. Human Gene Mutation Database)
<b>HT1</b>	hybridizační primer
<b>I</b>	index primer mix
<b>IRT</b>	imunoreaktivní trypsin
<b>kb</b>	kilobáze (tisíc párů bází)
<b>m-RNA</b>	mediátorová ribonukleová kyselina (z ang. Messenger ribonucleic acid)
<b>MLPA</b>	multiplexní amplifikace legačně závislých sond (z ang. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)
<b>MSD 1</b>	membránová doména 1 (z ang. Membrane – Spanning Domain)
<b>MSD 2</b>	membránová doména 2 (z ang. Membrane – Spanning Domain)
<b>NBD 1</b>	nukleotidy vázající doména 1 (z ang. Nucleotid Binding Domain)
<b>NBD 2</b>	nukleotidy vázající doména 2 (z ang. Nucleotid Binding Domain)
<b>NGS</b>	sekvenační metody nové generace (z ang. Next Generation Sequencing)
<b>ORCC</b>	Outwardly Rectified Chloride Channels
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce (z ang. Polymerase Chain Reaction)
<b>R</b>	regulátorová oblast
<b>R (1/2)</b>	Read Primer mix (1/2)
<b>ÚBLG</b>	Ústav biologie a lékařské genetiky

## 1 Úvod

Cystická fibróza je závažné autozomálně recesivní onemocnění, které je vyvoláno mutacemi v genu *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), který je zodpovědný za transport chloridových iontů na buněčné membráně. Takto postižení jedinci trpí převážně dýchacími obtížemi, pankreatickou insuficiencí, vysokou koncentrací elektrolytů v potu, neprospíváním a obstruktivní azospermií u mužů. Statistické studie uvádějí, že v evropské populaci je incidence tohoto onemocnění přibližně 1:2500 – 1:1800. Konkrétně v České republice byla prevalence odhadována na 1:3000, zavedením novorozeneckého screeningu roku 2009 byla prevalence onemocnění snížena na 1:6330.

V dnešní době je známo okolo 2017 mutací *CFTR* genu, z nichž 82 % je spojováno s klasickým průběhem onemocnění. Populačně významných je však pouze asi 20 mutací, které se vyskytují s více než 0,1% frekvencí, ostatní mutace se nevyskytují příliš často. Celosvětově nejrozšířenější je mutace F508del, jejíž prevalence ve světě je 66 %. Genetické vyšetření je indikováno u pacientů, kteří vykazují fenotyp cystické fibrózy a mají pozitivní potní test, což znamená, že mají zvýšenou koncentraci chloridů v potu (vyšší než 60 mmol/l). Běžný postup molekulárně – genetické diagnostiky CF začíná vyloučením 50 nejčastějších mutací *CFTR* genu v ČR, většinou komerčním diagnostickým kitem, např. Elucigene CF – EU2v1. V případě, že touto metodou není mutace detekována, využívá se metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), která detekuje rozsáhlejší delece či duplikace a dále pak sekvenování všech exonů v *CFTR* genu metodou sekvenování dle Sangera. I přesto, že algoritmus vyšetření je velmi dobře zpracovaný, stále se vyskytují jedinci, trpící projevy CF bez diagnostického genetického nálezu. Velkým přínosem pro současnou diagnostiku nejen CF je sekvenování nové generace (next generation sequencing). Pomocí NGS (next generation sequencing), konkrétně kitu *CFTR* MASTR Dx (Multiplicom), je možné identifikovat všechny exony, některé přilehlé intronové oblasti a některé promotorové oblasti *CFTR* genu, což může vést k zefektivnění diagnostiky pro cystickou fibrózu.

Předpokládám, že tato metoda sekvenování nové generace platformou Illumina, kitu *CFTR* MASTR Dx (Multiplicom), přispěje k zefektivnění molekulárně genetické diagnostiky pacientů s cystickou fibrózou a bude účinným nástrojem pro diagnostiku kauzálních mutací u vybraného souboru pacientů.

## 2 Přehled literatury

### 2. 1 Cystická fibróza

Cystická fibróza je poměrně časté autozomálně recesivní onemocnění. V případě, že jsou oba rodiče heterozygoti nesoucí mutovanou alelu je 25% pravděpodobnost, že jejich potomci budou trpět cystickou fibrózou, 50% pravděpodobnost, že potomci budou zdravými přenašeči mutace, a 25% pravděpodobnost, že potomci budou zdraví a nebudou přenašeči dané mutace v *CFTR* genu. (Vávrová et al. 2006).

Toto monogenní, nevyléčitelné onemocnění je způsobeno mutací *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) genu objeveného v roce 1989 (Riordan et al. 1989). Nejčastěji se projevuje onemocněním dýchacích cest, pankreatickou insuficiencí, zvýšenou koncentrací chloridů v potu a mužskou neplodností (Welsh & Smith 1993).

Cystická fibróza je jedno z nejčastějších AR onemocnění v kavkazské populaci (evropská, severoamerická a australská populace). Prevalence v evropské populaci je přibližně 1:2500 – 1:1800 (Farrell 2008). V české populaci se incidence výskytu cystické fibrózy odhadovala na 1:3000 na narozené dítě (Vávrová et al. 2006). Současná prevalence je stanovena na 1:6330 a vychází z novorozeneckého screeningu za období 2009 – 2012 (Krulišová et al. 2012, Votava et al. 2014). Zhruba každý 27. jedinec v české populaci je tedy nosičem *CFTR* mutace (Skalická 2014). V případě, že se zohlední prenatální a preimplantační diagnostika, je prevalence CF na území ČR 1:4500 (Votava et al. 2014). Dle českého registru cystické fibrózy je na území České republiky ke dni 1. 5. 2017 diagnostikováno 801 pacientů trpících cystickou fibrózou ([www.cfregistr.cz](http://www.cfregistr.cz)).

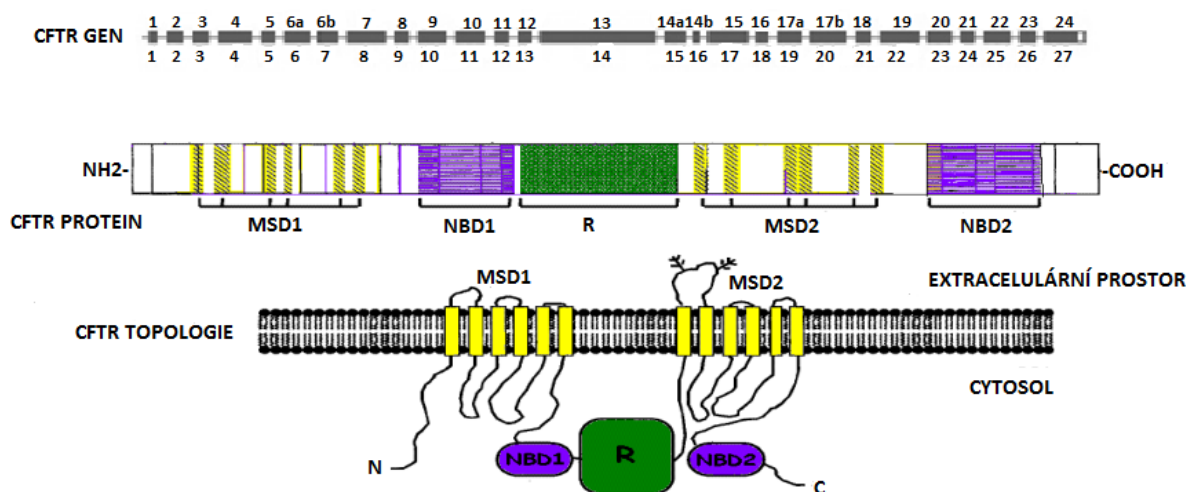
### 2. 2 *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)

Gen *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), jehož mutace jsou zodpovědné za cystickou fibrózu, byl identifikován roku 1989 pomocí reverzního klonování (Riordan et al. 1989, Bobadilla et al 2002). Je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 7, skládá se z 27 exonů (dle nové nomenklatury), rozprostírá se přibližně v oblasti dlouhé 250 kb a mRNA je dlouhá 6,5 kb (Bush et al. 2006).

CFTR protein, kódovaný stejnojmenným genem, se skládá z 1480 aminokyselin a řadí se do skupiny tzv. ATP – binding cassette transmembránových transportních proteinů (Vávrová et al. 2006). Hlavní funkcí CFTR proteinu je regulace chloridových kanálů v apikální membráně epitelálních buněk (Zielenski et al. 2000). Podílí se však i na regulaci

dalších chloridových kanálů - ORCC (outwardly rectified chloride channels) nebo epitelového sodíkového kanálu (ENaC) (Vávrová et al. 2006).

CFTR protein je tvořen pěti základními doménami. Dvěma transmembránovými doménami MSD1 a MSD2 (membrane spanning domain), které slouží k uchycení CFTR proteinu v apikální membráně, dále dvěma doménami NBD1 a NBD2 (nucleotide binding domains), které tvoří vazebná místa pro aktivovaný ATP, a R doménou (regulatory domain) mající regulační schopnost (Sheppard & Welsch 1999, Zielenski et al. 2000). Schéma struktury genu *CFTR*, proteinu a topologie v cytoplazmatické membráně je uvedena na Obr. 1.



Obr. 1: Schéma struktury genu *CFTR* (na horní straně genu je uváděno číslování exonů, dle původní nomenklatury a ve spodní části genu je uváděno nynější číslování exonů genu *CFTR*), struktura proteinu a jeho topologie v cytoplazmatické membráně.

Upraveno podle Zielenski (2000), [www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca).

## 2. 3 Mutace *CFTR* genu

V současné době je dle „*Cystic Fibrosis Mutation Database*“ ke dni 1. 5. 2017 známo 2017 mutací v *CFTR* genu ([www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca)). Asi 82 % z těchto dosud nalezených mutací způsobuje závažné příznaky asociované s cystickou fibrózou, dalších 14 % mutací *CFTR* genu je zřejmě bez klinických projevů a u zbývajících 4 % je klinický dopad nejasný (Ferec & Cutting 2012).

Mutace *CFTR* jsou germinálního původu (tj. vyskytují se ve všech buňkách jedince) a přenášejí se z generace na generaci. Germinální mutace de novo jsou v tomto případě velmi vzácné (Křenková et al. 2013). Nejčastěji se vyskytující typ mutací jsou „missense“. U těchto

mutací dochází k záměně aminokyseliny za jinou, a tím se mění smysl čtecího rámce. Dalším typem mutací často se vyskytujících v *CFTR* genu jsou „frameshift“ (posunové mutace), u kterých dochází k posunu čtecího rámce v důsledku delecí či inzercí. V *CFTR* genu byly nalezeny i sestřihové mutace a „nonsense“ (nesmyslné mutace), kdy dojde k předčasnému vytvoření STOP kodonu s následným ukončením syntézy *CFTR* proteinu ([www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca)). Přehled typů mutací v *CFTR* genu uvádím v tab. 1.

Tab. 1: Přehled typů mutací, jejich počtu a frekvenčního výskytu ve světové populaci. Upraveno podle [www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca).

Typ mutace	Počet	Frekvence (%)
<b>Missense</b>	796	39,46
<b>Frameshift</b>	315	15,62
<b>Splicing</b>	228	11,30
<b>Nonsense</b>	169	8,38
<b>In frame in/del</b>	42	2,08
<b>Large in/del</b>	52	2,58
<b>Promoter</b>	15	0,74

Mutace jsou většinou rozloženy po celé kódující sekvenci a postihují tak všechny funkční jednotky *CFTR* proteinu. V exonech 3 – 8 se nalézají mutace narušující funkci domény MSD1. Mutace v exonech 10 – 13 postihují funkční doménu NBD1, v exonu 14 dochází k poruše funkce R domény, v exonu 15 – 21 ovlivňují mutace funkční doménu MSD2 a v exonech 22 – 25 dochází k narušení funkce domény NBD2. Exony uvádím dle nové nomenklatury ([www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca)).

Za jednu z nejčastějších a nejstarších mutací je pokládána F508del. Existovala již v paleolitu, před více než 52 tisíci lety (Morral et al. 1994). Tato mutace je způsobena delecí tří nukleotidů kódujících aminokyselinu fenylalanin v pozici 508 v exonu 10, dle nové nomenklatury v exonu 11 (Bobadilla et al. 2002). Celosvětově se vyskytuje přibližně u 66 % pacientů trpících CF. V české populaci se F508del vyskytuje asi u 67,42 % pacientů s CF (Křenková et al. 2013). Ze všech známých mutací se pouze 20 vyskytuje s větší frekvencí než 0,1 % (Castellani et al. 2008).

Mutace *CFTR* genu se dělí do pěti tříd podle toho, jaký vliv mají na funkci, tvorbu či intracelulární transport proteinu.

### **2. 3. 1 Třída I. – Porucha syntézy proteinu**

Mutace řazené do této třídy vedou k narušení syntézy proteinu CFTR. Většinou jde o „*nonsense*“ a „*frameshift*“ mutace, které vedou k vytvoření předčasného STOP kodonu. Příkladem takových mutací jsou „*nonsense*“ G542X, R533X a „*frameshift*“ 2143delT, 2184insA. Předčasné vytvoření STOP kodonu vede k rychlé degradaci proteinu, což se projeví nepřítomností na apikální membráně epitelálních buněk (Vávrová et al. 2006). Tyto mutace jsou asociovány se závažnými projevy klasické formy CF (Bush et al. 2006).

### **2. 3. 2 Třída II. – Porucha transportu a vyzrávání proteinu**

Do této třídy jsou řazeny mutace, které způsobují abnormální posttranslační glykosilaci, což má za důsledek omezení či blokaci vyzrávání proteinu s následnou poruchou transportu na apikální membránu (Welsh & Smith 1993, Bush et al. 2006). Zástupcem této třídy je celosvětově nejrozšířenější mutace F508del (Ferec a Cutting 2012). Stejně tak jako mutace řazené do první třídy vyvolávají těžké formy CF (Vávrová et al. 2006).

### **2. 3. 3 Třída III. – Porucha regulace**

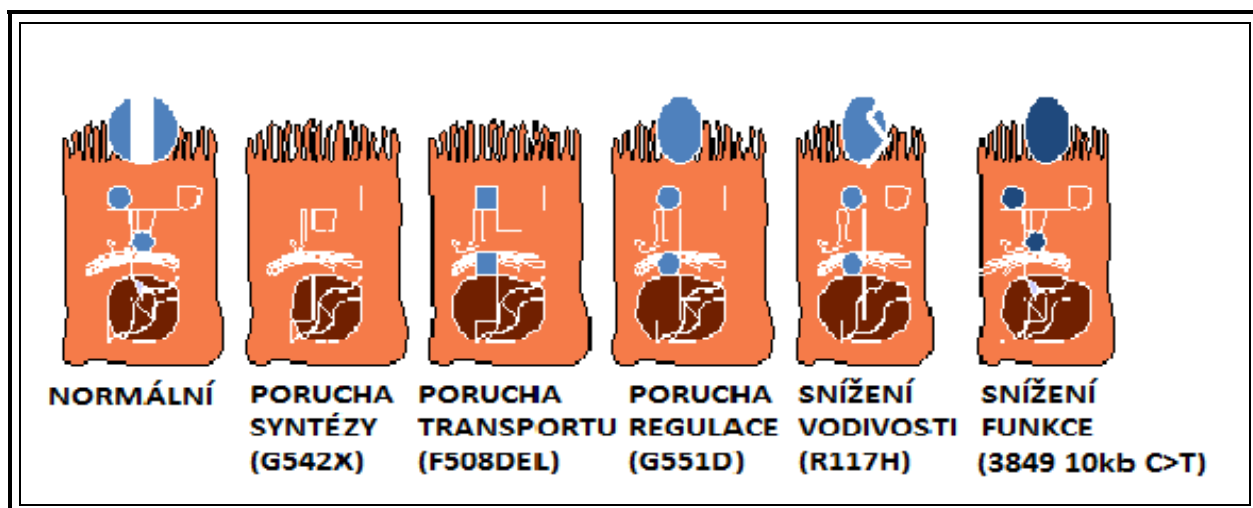
Tato třída zahrnuje mutace, které blokují vazbu ATP na NBD doménu. Tyto domény jsou nezbytné pro aktivaci a otevření (zavření) iontového kanálu proteinu CFTR (Welsh & Smith 1993). Příkladem je mutace G551D. Projevy těchto mutací jsou stejně tak jako u předešlých tříd závažné a jsou spojovány s relativně nízkou variabilitou klinického průběhu CF mezi jednotlivými pacienty s CF (Vávrová et al. 2006).

### **2. 3. 4 Třída IV. – Snížení vodivosti**

Do třídy IV. jsou řazeny mutace, které umožňují normální syntézu a transport na apikální membránu, ale snižují vodivost chloridového kanálu. Většinou jde o „*missense*“ mutace, například R117H, R347P, R334W (Welsh & Smith 1993). Tyto mutace jsou spojovány s mírnějšími klinickými projevy a s variabilnějším průběhem onemocnění (Vávrová et al. 2006).

### **2. 3. 5 Třída V. – Snížená funkce syntézy**

Mutace této třídy vedou k produkci normálního proteinu, ale dochází ke snížení funkce syntézy. Většinou jde o sestřihové mutace, které ovlivňují sestřih pre – mRNA *CFTR* genu. Příkladem je mutace 3849 + 10kb C→T (Bush et al. 2006). Jsou asociovány s mírnými projevy CF, hraničními hodnotami chloridů v potu a variabilním průběhem (Vávrová et al. 2006). Normální funkce proteinu CFTR a jeho poruch či snížení funkce znázorňuje obrázek 2.



Obr. 2: Základní třídy mutací v *CFTR* genu se zástupci nejčastějších mutací těchto tříd. Upraveno podle Boyle (2013). Dostupné z <http://www.medscape.org>.

## 2. 4 Diagnostika cystické fibrózy

Diagnostika cystické fibrózy by měla být provedena co nejdříve a co nejspolehlivěji, aby mohla být indikována léčba klinických příznaků tohoto onemocnění. Dále se včasnou diagnostikou může předejít vzniku komplikací asociovaných s cystickou fibrózou, např. bronchiectázie, hemoptýza, pneumotorax, až respirační selhání (Wallis 1997, Vávrová et al. 2006). Včasnou diagnostikou se může předejít řadě návštěv nemocnic, což může mít neblahý vliv na psychický stav pacienta.

Diagnostika CF je založena na přítomnosti jednoho či více klinických příznaků (Rosenstein & Cutting 1998). Příznaky, které mohou vyvolat podezření na cystickou fibrózu, jsou časté infekční onemocnění dýchacích cest, chronický kašel, pankreatická insuficience, mekoniový ileus u novorozenců, porucha stavu výživy, akutní ztráty solí a obstruktivní azoospermie u mužů (Vávrová et al. 2006).

Zlatým standardem diagnostiky cystické fibrózy je potní test, pomocí kterého se stanovuje koncentrace chloridů v potu (Koch & Hoiby 2000). V případě pozitivního potního testu je indikováno molekulárně genetické vyšetření *CFTR* genu, jehož mutace vyvolávají cystickou fibrózu (Vávrová et al. 2009).

Za posledních několik let se včasný záchyt mutací v *CFTR* genu v České republice zvýšil. Důvodem je zavedení novorozeneckého screeningu CF (Balaščaková et al. 2009). Novorozenci je odebrána krev z paty na tzv. Guthrieho kartu. Test spočívá ve vyšetření koncentrace IRT (imunoreaktivního trypsinogenu), kdy u novorozenců s podezřením na CF jsou nalézány zvýšené hodnoty (Southern et al. 2007). IRT test však není pro cystickou fibrózu specifický. V případě pozitivního nálezu je nutné provést další specifitější testy -

potní test či molekulárně genetické vyšetření *CFTR* genu (Southern et al. 2007). V České republice je algoritmus vyšetření u novorozenců následovný: Pokud je IRT rovno či vyšší než 65ng/ml, pak se provádí molekulárně genetické vyšetření genu *CFTR* z DNA izolované z Guthrieho karty a v případě pozitivitu následuje provedení potního testu u novorozence. Při pozitivním výsledku potního testu se confirmace diagnózy doplňuje molekulárně genetickým vyšetřením mutací *CFTR* genu z DNA izolované z periferní krve pacienta a jeho rodičů (Krulišová et al. 2012).

#### **2. 4. 1 Potní test**

První, kdo upozornil na zvýšenou koncentraci chloridů v potu u pacientů s CF, byl Sant Agnese v roce 1952 (Littlewood 1986, Pohunek & Lebl, 2008). Praktické uplatnění tohoto objevu nastalo po publikaci Gibsona a Cooka, kteří vypracovali metodu stimulace potních žláz pilokarpinovou iontoforézou (Littlewood 1986, Vávrová et al. 2006).

Metoda spočívá ve sběru potu, který je vyvolán již zmíněnou pilokarpinovou iontoforézou. Jde o velmi jednoduchou, bezbolestnou a bezpečnou metodu. Je však zapotřebí, aby byla prováděna zkušeným personálem a v laboratoři, kde se provádí minimálně pět potních testů týdně (Vávrová et al. 2009).

Normální hodnoty chloridů v potu jsou 10 – 30 mmol/l. Pacienti s CF mají hodnoty chloridů v potu většinou větší než 60 mmol/l. V případě, že jsou hodnoty mezi 30 – 59 mmol/l, hovoříme o tzv. hraničních hodnotách. V tomto případě se diagnóza cystické fibrózy nemůže ani potvrdit, ale ani vyvrátit. U takového hraničního výsledku, stejně tak jako u pozitivních výsledků, se přistupuje k molekulárně genetickému vyšetření *CFTR* genu (Vávrová et al. 2009).

#### **2. 4. 2 Molekulárně genetické vyšetření *CFTR* genu**

Jak již bylo zmíněno, molekulárně genetické vyšetření je indikováno při klinických projevech CF a při opakovaných hraničních hodnotách či při zvýšené koncentraci chloridů v potu (Fila 2014). Vyšetření může být prováděno postnatálně z periferní krve, ze které se izoluje DNA. Dále může být vyšetření prováděno prenatálně, kdy se odebírají choriové klky v 10-13 týdnu těhotenství, plodová voda v 16 týdnu těhotenství, v krajních případech pupečnicková krev od 18 týdne těhotenství. Mutace *CFTR* genu se mohou vyšetřovat i z preimplantačního vzorku, což může být pólové tělísko, trofoektoderm nebo blastomera (Balašáková et al. 2008).

V současné době se k vyšetření *CFTR* genu využívají komerční kity s populačně specifickým spektrem mutací, založené na PCR. Příkladem takového kitu je ELUCIGENE CF



– EU2v1, jehož panel obsahuje 50 nejčastějších mutací *CFTR* genu (v evropské populaci) a Tn polymorfismů (elucigene.com). Jiné kity jsou založené na principu multiplexní PCR s následnou hybridizací. Příkladem takového kitu je ViennaLab CF StripAssay obsahující panel 34 nejčastěji se vyskytujících mutací *CFTR* genu a Tn polymorfismů (viennalab.com). Další metodou vyšetření mutací v celé kódující oblasti *CFTR* genu je sekvenování DNA dle Sangera, kdy je sekvenováno 27 exonů *CFTR* genu. Pro detekci rozsáhlejších delecí či duplikací *CFTR* genu se využívá metoda MLPA (mrc-holland.com). I přes velmi dobře zavedenou metodiku není u některých pacientů s klinickým obrazem cystické fibrózy nalezena mutace v *CFTR* genu. Díky rozvoji molekulárně genetických metod dochází k zefektivnění nejen detekce mutací *CFTR* genu, ale i k efektivnější sekvenaci rozsáhlejších oblastí genomu.

### 2. 4. 3 Transepitheliální rozdíl potenciálů

Diagnostika CF se v současné době stanovuje hlavně pomocí potního testu a molekulárně genetického vyšetření. V některých případech nemusí být výsledky testů zcela jednoznačné. V takovém případě můžeme využít metodu měření transepitheliálních potenciálů (Ahrens et al. 2002).

Tuto metodu popsal v roce 1981 Knowles et al. (Alton et al. 1990). Měří se transepitheliální rozdíl potenciálů *in vitro* mezi povrchem nosní sliznice a podkožím. V Evropě je zatím jen několik málo pracovišť, která toto vyšetření provádí. V České republice není toto vyšetření zatím dostupné (Vávrová et al. 2009).

### 2. 5 Algoritmus vyšetření

Pacienti, u kterých je podezření na cystickou fibrózu (vykazují fenotyp CF a zvýšené chloridy v potu), podstupují kaskádu molekulárně genetických vyšetření. Algoritmus vyšetření se může v každé laboratoři lišit. V této kapitole popisují algoritmus vyšetření, který se provádí v molekulárně genetické laboratoři Ústavu biologie a lékařské genetiky (ÚBLG) ve Fakultní Nemocnici Motol.

Základní molekulárně genetické vyšetření je detekce 50 nejčastějších mutací v *CFTR* genu, vyskytujících se v České republice, pomocí kitu ELUCIGENE CF-EU 2v1, založeném na principu alelově specifické hybridizace. Pokud není identifikace mutací úspěšná, přistupuje se k použití metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), která slouží k detekci rozsáhlých delecí a duplikací v *CFTR* genu. Pokud ani v tomto případě není identifikace mutace na obou alelách úspěšná, přistupuje se k sekvenování celé kódující sekvence genu *CFTR*. Sekvenování celého genu je cenově i časově nákladné, proto jedním

z cílů diplomové práce je zavést do algoritmu vyšetření metodu sekvenování nové generace pomocí kitu CFTR MASTR Dx (Multiplicom). Tato metoda by mohla zefektivnit vyšetření z hlediska ceny, časové náročnosti provedení a rychlejší analýzy výsledků.

## **2. 6 Historie sekvenování**

Za počátek výzkumu sekvenování DNA můžeme považovat padesátá léta 20. století, konkrétně rok 1953, kdy James D. Watson a Francis H. C. Crick objevili molekulární strukturu DNA (Watson & Crick 1953).

První úspěšné sekvenování provedli mezi lety 1968 – 1971 pánové Wu a Kaiser. Využili modifikovanou metodu prodlužování primerů, díky které přečetli 12 nukleotidů z okrajových regionů DNA fága lambda (Hutchison 2007). V roce 1977 byly nezávisle na sobě objeveny dvě metody sekvenování. Jedna je známa jako chemické sekvenování a publikována Maxamem a Gilbertem, druhá metoda byla objevena Sangerem a je známa jako dideoxynukleotidové sekvenování (Gužvic 2013). V roce 1980 získali průkopníci obou metod Nobelovu cenu. V dalších letech docházelo k rozvoji a zlepšování především Sangerovy metody sekvenování. Radioaktivní značení nukleotidů bylo nahrazeno fluorescenčním značením, které detekoval laser a daný signál zaznamenával počítač (Karger & Guttman 2009). Později byla tato metoda dále vylepšena nahrazením gelové elektroforézy za kapilární (Heather & Chain 2015).

Od roku 2005 se objevují nové metody umožňující masivní paralelní sekvenování DNA (Reinert & Huson 2008). První metoda sekvenování byla navržena 454 Life Sciences. Metoda funguje na principu pyrosekvenování (Hutchinson 2007). O této a dalších tzv. metodách nové generace se zmiňují v následující kapitole: Sekvenování nové generace.

## **2. 7 Sekvenování nové generace**

V roce 1977 byla publikována Frederikem Sangerem et al. enzymatická metoda sekvenování (Sangerovo sekvenování). O pár let později došlo k automatizaci této metody, kdy byl na trh uveden první sekvenátor využívající kapilární elektroforézu k separaci jednotlivých úseků DNA. Docházelo ke stálému zdokonalování těchto metod a vývoji nových technologií s vyšší výkonností, menší pracovní náročností a nižšími náklady (Koubková et al. 2014). Tyto technologie jsou označovány jako sekvenování nové generace, nazývány také masivně paralelní sekvenování.

V současné době na trhu dominují tři platformy: Roche 454 Genome Sequence, Illumina Genome Analyzer a Life Technologies SOLiD systém (Zhou et al. 2010). I přesto, že jsou tyto platformy založeny na rozdílných principech, sdílejí následující kroky: příprava

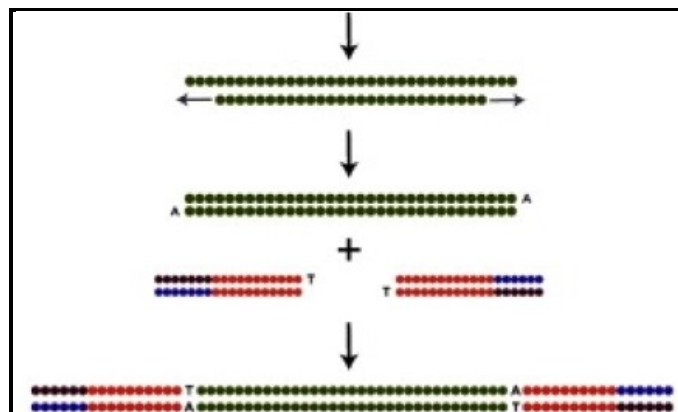
knihovny vytvořená náhodnou fragmentací DNA, sekvenování a detekce inkorporovaných nukleotidů a analýza dat (Shendure & Hanlee 2008, Koubková et al. 2014).

Jako první technologie nové generace byla na trh uvedena platforma Roche 454, která je založena na principu emulzní PCR s následnou pyrosekvenací (Rothberg & Leamon 2008). Na rozdíl od této technologie je technologie SOLiD (Sequencing by oligonucleotide ligation and detection) založena na sekvenování ligací (Koubková et al. 2014). Technologii Illumina se důkladněji věnuji v podkapitole 2. 7. 1.

### 2. 7. 1 Illumina

Tato metoda je založena na principu sekvenování syntézou ve spojení s tzv. můstkovou (z angl. bridge) amplifikací (Shokralla et al. 2012). Původně bylo možné přečíst jen velmi krátké sekvence DNA (typicky úseky dlouhé 36 nukleotidů) a primárně byla určena pro resekvenování. V dnešní době je tato metoda využívána pro sekvenování DNA (celogenomové sekvenování, exomové sekvenování, mitochondriální sekvenování), ale i pro analýzu RNA (sekvenování total RNA, mRNA i malých RNA molekul) (www.illumina.com).

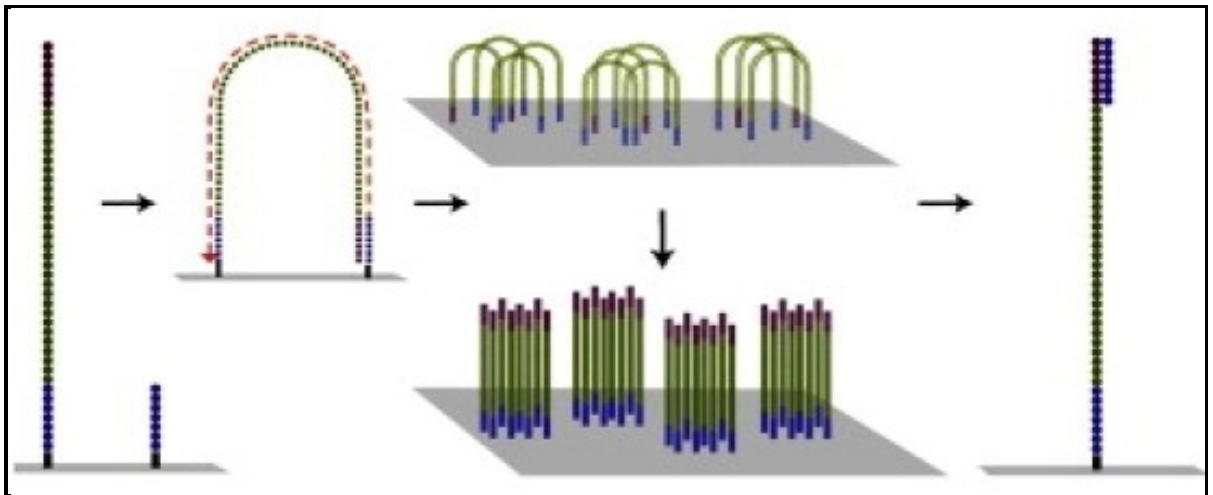
Příprava knihovny, což je první krok při sekvenování, zahrnuje fragmentaci DNA pomocí nebulizéru, kde vlivem stlačeného vzduchu dochází ke štěpení molekuly (Croucher et al. 2009). Konce fragmentů jsou zarovnávány, fosforylovány a 3' konce adenylvány. Následně dochází k ligaci adaptorů k oběma koncům fragmentu DNA (Koubková et al. 2014). Schéma přípravy knihovny znázorňuje obrázek 3.



Obr. 3: Příprava knihovny DNA – fragmentace DNA, zarovnání konců DNA fragmentů a připojení adeninu, následná ligace adaptorů k oběma koncům fragmentu. Upraveno podle Tucker et al. (2009).

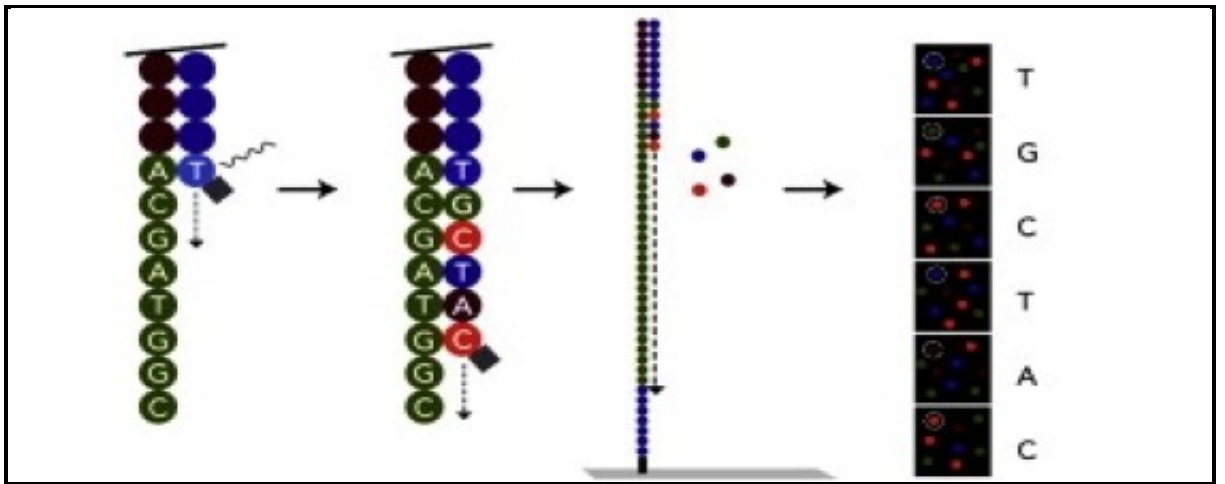
Dalším krokem je amplifikace fragmentované DNA pomocí tzv. můstkové PCR, kdy jednotlivé adaptory připojené k fragmentu DNA hybridizují s komplementárními oligonukleotidy, které jsou kovalentně vázány na pevném povrchu. Vlákno DNA se ohne, druhým adaptorem se připojí k pevnému povrchu a vytvoří přemostění. Oligonukleotid

ukotvený na desce slouží jako primer pro syntézu druhého vlákna DNA. Poté proběhne denaturace a ohnutí k dalšímu oligonukleotidu. Dochází k tvorbě shluků (tzv. klastrů), z nichž každý obsahuje přibližně 1000 kopií o průměru asi 1  $\mu\text{m}$  (Pettersen et al. 2009). Klastry jsou jednovláknové sekvence, na které nasedá sekvenční primer (Shendure & Hanlee 2008). Postup můstkové PCR je znázorněn na obrázku 4.



Obr. 4: Můstková PCR amplifikace, vytvoření klastrů a následné navázání sekvenčního primeru. Upraveno podle Tucker et al. (2009).

Vlastní sekvenování, jehož postu je znázorněn na obrázku 5, se provádí pomocí cyklické reverzibilní terminace. Využívá fluorescenčně značené nukleotidy, kdy každý nukleotid je značen jiným fluorochromem (Pettersen et al. 2009). Nukleotidy jsou na 3' konci modifikovány, což zaručuje, že v jednom cyklu se zabuduje pouze jeden nukleotid (Koubková et al. 2014). Po inkorporaci fluorescenčně značeného nukleotidu do řetězce DNA následuje laserová detekce fluorescenčního barviva z každého klastru. Na základě detekce určitého fluorescenčního signálu se pozná, o kterou bázi se jedná. Přebývající nukleotidy i fluorescenční barvivo jsou odstraněny, terminální báze jsou aktivovány a je tak umožněn vstup do dalšího cyklu (Shokralla et al. 2012). Tento cyklus se opakuje do té doby, dokud není přečtena celá sekvence.



Obr 5: Laserová detekce fluorescenčně značeného nukleotidu. Po odstranění fluorochromu z 3' konce se celý cyklus opakuje až do sekvenace celého úseku. Upraveno podle Tucker et al. (2009).

### 3 Cíle práce

1. Analytická validace kitu CFTR MASTR Dx (Multiplicom) a zařazení metody sekvenování nové generace do algoritmu vyšetření *CFTR* genu v laboratoři ÚBLG FN Motol.
2. Molekulárně genetická analýza vybraných pacientů s fenotypem cystické fibrózy bez dosud zjištěné molekulárně genetické příčiny onemocnění
  - a) kitem Elucigene CF-EU2 (Elucigene)
  - b) MLPA
3. Využití metody sekvenování nové generace kitem CFTR MASTR Dx (Multiplicom) pro analýzu pacientů, u nichž nebyla zjištěna molekulárně genetická příčina onemocnění předchozími metodami.
4. Klasifikace a popis variant detekovaných sekvenováním nové generace platformou Illumina s použitím kitu CFTR MASTR Dx (Multiplicom).
5. Ověření potenciálně patologických nálezů klasickým Sangerovým sekvenováním a porovnání platformy sekvenování nové generace s klasickým Sangerovým sekvenováním z hlediska ceny, časové náročnosti, a efektivnosti.
6. Navržení algoritmu dalšího vyšetření pacientů bez objasněné molekulární podstaty onemocnění cystickou fibrózou.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Vzorky DNA

Materiál, který byl využit k analýze, je DNA izolována z periferní krve lidského druhu (*Homo sapiens sapiens* Linné). Vzorky pocházejí z DNA banky z Ústavu biologie a lékařské genetiky (ÚBLG) ve Fakultní nemocnici Motol. Soubor 30 vzorků pro NGS kit Multiplicom byl sestaven ve spolupráci s klinickými genetiky z Ústavu biologie a genetiky a s pediatrií z Pediatrické kliniky FN Motol. Pacienti, jejichž vzorky byly vybrány, vykazují klinické příznaky odpovídající cystické fibróze (pankreatická insuficience, neprospívání, bronchitidy), mají pozitivní potní test (zvýšená hladina chloridů v potu) a byla u nich dosud nalezena pouze jedna nebo žádná mutace *CFTR* genu. Každý pacient podal informovaný souhlas o vyšetření.

### 4.2 Molekulárně genetické vyšetření *CFTR* genu pomocí kitu ELUCIGENE CF- EU2v1

Metoda je založena na principu fluorescenční alelicky specifické amplifikační technologii ARMS (Amplification Refractory Mutation System, amplifikační refrakční mutační systém), která detekuje delece, inserce nebo jiné genové mutace v DNA. Analýza výsledku se provádí kapilární elektroforézou a následné vyhodnocení prostřednictvím softwaru GeneMapper, který identifikuje PCR produkty dle velikosti a fluorescenční barvy.

Tato multiplexní analýza zahrnuje dvě PCR reakce (A a B). Ve směsi A jsou detekované mutantní sekvence, které jsou znázorňovány jako modré píky. Směs A dále obsahuje opakované sekvence polythymidinového (Poly – T) traktu, které jsou znázorněny černými píky. Ve směsi A detekujeme také normální alelu pro nejrozšířenější mutaci v evropské populaci - deltaF508. Směs B obsahuje normální „*wild type*“ sekvence, které jsou znázorňovány jako zelené píky. V obou směsích (A i B) jsou přidány vnitřní kontrolní markery amplifikace, které zobrazují kontrolu amplifikace a jsou znázorňovány jako červené píky.

#### 4. 2. 1 Reagencie

- směs primerů CF-EU2v1 A, obsahující primery pro amplifikaci následujících mutantních alel: R347H, R347P, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 711+1G>T, R334W, I507del, F508del, 3849+10kbC>T, 1677delTA, 1078delT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delG, Q890X, R553X, G551D, S549N, M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X(C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delTT, G85E, R1066C, 1898+1G>A, W846X, 2184delA, D1152H, CFTRdele2,3, P67L, 2143delT, E60X, 3659delC, 3272-26A>G, 621+1G>T, A455E, R1162X a R1158X.

Tato směs obsahuje také primery wild type pro detekci zdravé alely F508del, primery pro detekci polythymidinových variant, IVS8-5T, IVS8-7T, IVS8-9T a primery pro identifikaci 2 hypervariabilních markerů typu STR (short tandem repeat) – (*Elucigene® CF-EU2v1*)

- směs primerů CF-EU2v1 B obsahující primery „wild type“ pro amplifikaci normálních alel mutantů amplifikovaných směsí primerů A, s výjimkou normální alely F508del, která je amplifikována primery zahrnutými ve směsi primerů– (*Elucigene® CF-EU2v1*)
- směs pro PCR s obsahem HotStart Taq DNA polymerázy a deoxynukleotid trifosfátů
- velikostní standard GeneScan™ 600 LIZ® (Applied Biosystems)
- Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems)

#### 4. 2. 2 Postup

##### Amplifikace produktů

Pro každý vzorek se připraví zkumavka řádně označená identifikačním číslem vzorku a písmenem A nebo B, a to z důvodu, že se přidává Primer mix A nebo Primer mix B. Do jednotlivých zkumavek se napipetuje Master mix, Primer mix A nebo B a vyšetřovaná DNA. Přesné množství reagentů je uvedeno v tabulce 2. K sérii vyšetřovaných vzorků se vždy připravuje i negativní kontrola, která obsahuje všechny složky reakční směsi kromě vyšetřované DNA, která je nahrazena deionizovanou vodou.



Tab. 2: Reagencie a jejich množství, které je potřeba pro jednu PCR reakci.

<b>Reagencie pro jednu reakci (μl)</b>	
Směs primeru A nebo B	4,5 μl
MasterMix	7,5 μl
Vyšetřovaná DNA	2,5 μl
<b>Celkový objem</b>	<b>14,5 μl</b>

Připravené vzorky se vkládají do termocykleru (Veriti, Applied Biosystem, USA), kde proběhne multiplexní alelicky specifická PCR za reakčních podmínek uvedených v tabulce 3.

Tab. 3: Teplotní režim, při kterém probíhá PCR reakce.

<b>Teplotní režim</b>	
Počáteční denaturace	94 °C – 20 min
Cyklování: 30 cyklů	94 °C – 60 s
	58 °C – 120 s
	72 °C – 60 s
Konečná elongace	72 °C – 20 min

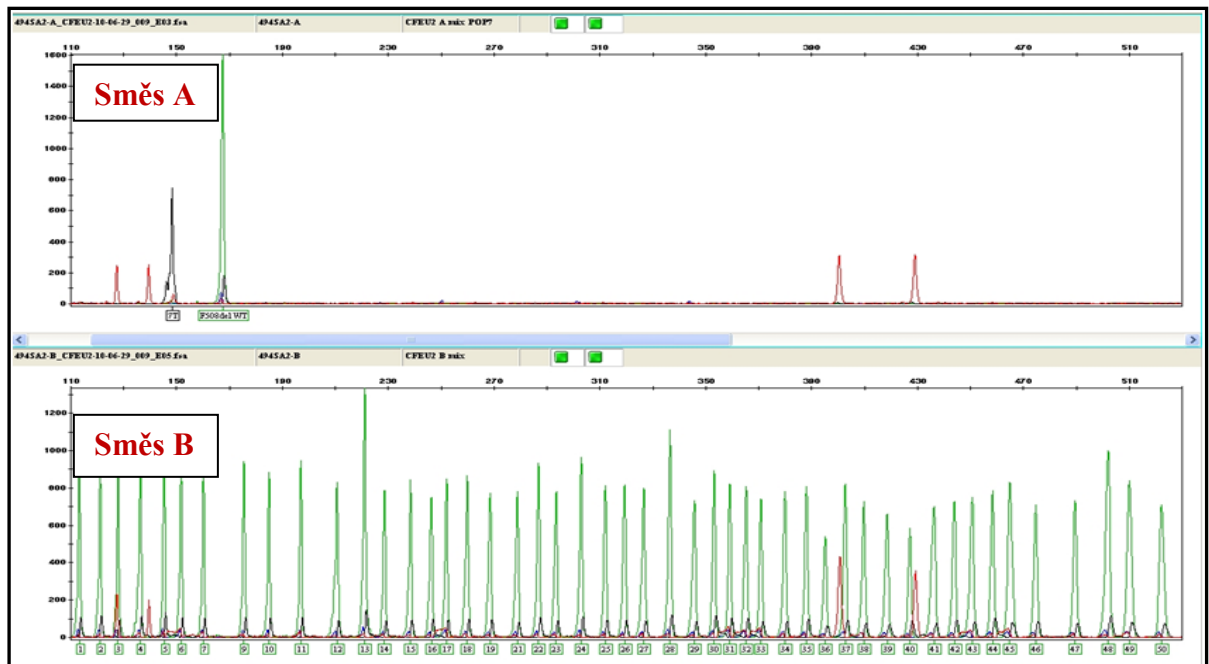
### **Kapilární elektroforéza**

Amplifikované produkty jsou analyzovány na přístroji ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), fungující na principu kapilární elektroforézy. Pro analýzu je nutno smíchat 6,8 μl velikostního standardu GeneScan™ 600 LIZ® (Applied Biosystems) a 250 μl Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems). Do každé jamky 96 jamkové PCR destičky se napipetuje 15 μl výše popsané směsi. Dalé přidáme 3 μl PCR produktu směsi A nebo B. Destičku vložíme do genetického analyzátoru, nastaví se požadované parametry a spustí se fragmentační analýza.

### **Interpretace výsledků**

Vzniklé fragmenty jsou po rozdělení kapilární elektroforézou vizualizovány pomocí fluorescenčních barviv. Vyhodnocení jednotlivých píků probíhá v programu GeneMapper Software version 4.0 (Applied Biosystems, USA). Směs A obsahuje mutantní sekvence, „*wild type*“ alelu F508, díky které můžeme rozlišit, zda se jedná o „*wild type*“ alelu F508 (přítomnost zeleného píku), heterozygota (přítomnost modrého i zeleného píku) nebo homozygota (nepřítomnost zeleného píku). Ve směsi A jsou detekovány ještě polymorfismy Tn intronu 8, které jsou znázorněny jako černé píky. Ve směsi B jsou detekovány „*wild type*“

sekvence, znázorněné jako zelené píky. V případě heterozygotního jedince je pík přítomen, ale dochází ke snížení původní výšky píku. U jedinců v homozygotním stavu je pík ve směsi B nepřítomen. Příklad negativního nálezu je uveden na obrázku 6, detekce mutace je znázorněna na obrázku 7 a homozygotní záchyt mutace je uveden na obrázku 8.

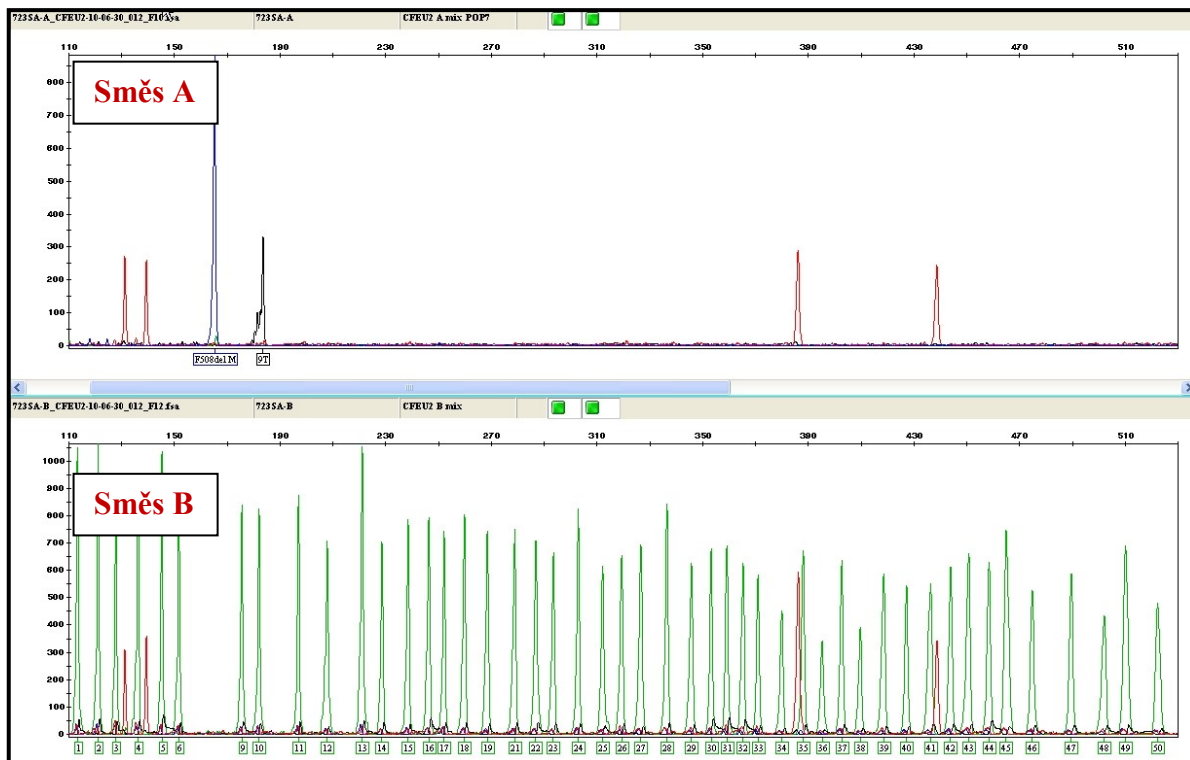


Obr. 6: Negativní záchyt mutací *CFTR* genu pomocí kitu ELUCIGENE CF-EU2. Ve směsi A můžeme vidět wild type alelu F508 v podobě zeleného píku a polymorfismus intronu 8 (označován jako Poly T – polythymidinový trakt) v podobě černého píku. V tomto případě se jedná o 7T/7T, což znamená, že obě alely obsahují 7 repetice Thyminů. Ve směsi B vidíme nepřítomnost 8 píku, což je wt F508 přítomen v mixu A a nepřítomnost 20 píku - S549R(T>G), který se vyskytuje pouze ve směsi A v případě heterozygotního stavu. Tento výsledek můžeme označit, za negativní, bez nálezu mutace v genu *CFTR*.



Obr. 7: Heterozygotní záchyt mutace F508del pomocí kitu ELUCIGENE CF-EU2.

Ve směsi A vidíme wild type alelu F508 v podobě zeleného píku a mutantní alelu F508 v podobě modrého píku. V takovém případě se jedná o heterozygota pro mutaci F508del. Dále vidíme polymorfismus intronu 8 – Poly 7T/9T, což znamená, že na jedné alele se opakuje 7 Thyminů a na druhé alele se opakuje 9 Thyminů. Ve směsi B je snižená výška píku č. 7 pro I507del WT, jelikož v heterozygotním stavu mutace F508del zabraňuje správné hybridizaci I507del WT.



Obr. 8: Homozygotní záchyt mutace F508del pomocí kitu ELUCIGENE CF-EU2.

Ve směsi A vidíme pouze přítomnost modrého píku pro F508, což znázorňuje homozygotní stav pro mutaci F508del. Dále vidíme Poly T 9T/9T. Ve směsi B chybí pik číslo 7 pro I507del, jelikož přítomnost mutace F508del zabrání hybridizaci primeru I507del WT.

#### 4. 3 Molekulárně genetické vyšetření mutací *CFTR* genu metodou MLPA

MLPA (multiplex ligation – dependent probe amplification) je metoda, která slouží k detekci rozsáhlejších delecí a duplikací. Jde o multiplexní metodu, která je založena na principu hybridizace sondy s vyšetřovanou DNA. Každá sonda je složena ze dvou oligonukleotidů, které hybridizují k přilehlým cílovým sekvencím. Po proběhnutí hybridizace jsou oligonukleotidy spojeny pomocí DNA ligázy. Pouze sondy, které jsou propojeny, jsou následně amplifikovány pomocí PCR reakce. Amplifikovaná DNA je poté analyzována pomocí kapilární elektroforézy a následné zobrazení analýzy se provádí pomocí softwaru GeneMapper Software version 4.0 (Applied Biosystems, USA), který identifikuje PCR produkty dle velikosti a fluorescenční barvy. Hodnocení se provádí softwarem Coffalyser (MRC – Holland) a webovou aplikací eMLPa (<http://emlpa.lf2.cuni.cz>).

### 4. 3. 1 Reagencie

- SALSA MLPA KIT P091 (MRC – Holland) složení: SALSA MLPA buffer, SALSA Probe, ligase buffer A a B, SALSA Ligase-65, SALSA PCR primer mix, SALSA polymerase
- Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems)
- GeneScan™ – 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems)

### 4. 3. 2 Postup

#### **Denaturace DNA vzorků**

DNA vzorek o reakčním objemu 5 µl a koncentraci 50 – 250 ng inkubujeme v termocykleru (Veriti, Applied Biosystem, USA) 5 minut při teplotě 98 °C. Následně necháme vzorek ochladit na 25 °C.

#### **Hybridizace MLPA prob**

Reagencie necháme roztát při pokojové teplotě, promícháme je a stočíme. Dále připravíme hybridizační směs dle tabulky 4.

Tab. 4: Přehled reagentů a objemů pro přípravu hybridizační směsi.

<b>Reagencie pro jednu reakci (µl)</b>	
SALSA Probe – Mix (černá čepička)	1,5 µl
SALSA MLPA Buffer (žlutá čepička)	1,5 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>3 µl</b>

Do každé zkumavky, které jsou stále v PCR cykleru (Veriti, Applied Biosystem, USA) při 25 °C se přidají 3 µl hybridizační směsi. Jemně směs promícháme a necháme inkubovat 1 minutu při 95 °C, poté inkubujeme 16 hodin při teplotě 60 °C v PCR cykleru (Veriti, Applied Biosystem, USA).

#### **Ligace MLPA prob**

Druhý den před doběhnutím programu hybridizace si připravíme ligační směs dle tabulky 5. Enzym ligázu vyjmeme z mrazícího boxu jen na nezbytně nutnou dobu. Teplotu v PCR cykleru (Veriti, Applied Biosystem, USA) necháme klesnout na 54 °C.

Tab. 5: Přehled reagensií a objemů pro přípravu ligační směsi.

<b>Reagencie pro jednu reakci (μl)</b>	
Sterilní injekční voda	25 μl
Ligase buffer A (průsvitná čepička)	3 μl
Ligase buffer B (bílá čepička)	3 μl
Ligase-65 (zelená čepička)	1 μl
<b>Celkový objem</b>	<b>32 μl</b>

Ligační směs s enzymem jemně promícháme pipetou. Ke každému vzorku, který je v PCR cyklu (Veriti, Applied Biosystem, USA) při teplotě 54 °C, přidáme 32μl ligační směsi a jemně promícháme pipetou. Necháme inkubovat v PCR cyklu (Veriti, Applied Biosystem, USA) 15 minut při teplotě 54 °C, dále 5 minut při teplotě 98 °C a poté při 20 °C.

### **PCR reakce**

Dle tabulky 6 si připravíme Master mix pro PCR reakci.

Tab. 6: Přehled reagensií a jejich množství pro jednu PCR reakci.

<b>Reagencie pro jednu reakci (μl)</b>	
Sterilní injekční voda	7,5 μl
SALSA PCR primers (hnědá čepička)	2 μl
SALSA Polymerase (oranžová čepička)	0,5 μl
<b>Celkový objem</b>	<b>10 μl</b>

Master mix promícháme pipetou. Při laboratorní teplotě přidáme do každé zkumavky v PCR cyklu (Veriti, Applied Biosystem, USA) 10 μl PCR Master mixu a jemně promícháme pipetou. Ihned poté spustíme příslušný PCR program, popsáný v tabulce 7.

Tab. 7: Teplotní režim PCR reakce.

<b><u>Teplotní režim</u></b>	
Cyklování: 31 cyklů	95 °C – 30 s
	60 °C – 30 s
	72 °C – 60 s
Konečná elongace	72 °C – 20 min

### **Kapilární elektroforéza**

Po proběhnutí PCR reakce si připravíme směs Hi-Di™ Formamidu (Applied Biosystems) (9 µl) a interního standardu pro kapilární elektroforézu GeneScan™ – 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems) (0,5 µl) pro každý vzorek. Připravenou směs rozpipetujeme do jednotlivých jamek 96 jamkové destičky, do každé jamky přidáme 1 µl PCR produktu a jemně promícháme pipetou. Amplifikované produkty jsou analyzovány na přístroji ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

## **4. 4 Molekulární genetické vyšetření mutací *CFTR* genu metodou sekvenování dle Sangera**

### **4. 4. 1 Reagencie**

- sekvenčně specifické primery F a R
- PCRBIO HS Taq Master Mix
- FastAP Thermosensitivní Alkalická Fosfatáza (1U/µl, Thermo Scientific)
- Exonukleáza I *E. coli* (20U/µl, Fermentas)
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing
- Acetátový pufr, 3 mol/l, pH 5,2
- 70% etanol
- Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems)

### **4. 4. 2 Postup**

Metoda sekvenování dle Sangera byla využita k ověření patologických nálezů zachycených pomocí NGS. Vyšetřovaná DNA je amplifikována pomocí PCR reakce s využitím sekvenčně specifických primerů. Přečištěný produkt je využit jako templát pro sekvenační reakci využívající dideoxynukleotidy. Pomocí kapilární elektroforézy je stanoveno pořadí nukleotidů ve vyšetřovaném úseku DNA. Porovnáním s referenční sekvencí DNA je zjištěna případná přítomnost mutace DNA.

### **Amplifikace DNA metodou PCR**

Reagencie uvedené v tabulce 8 napipetujeme do zkumavky, vložíme do termocykleru (Veriti, Applied Biosystem) a spustíme prc program nastavený na teplotní režim uvedený v tabulce 9.

Tab. 8: Přehled reagensií a množství potřebné k jedné PCR reakci.

<b>Reagencie pro jednu reakci (μl)</b>	
2x PCRBIO HS Taq Mix	5 μl
Injekční voda	3,2 μl
Primer R+F 10 pmol/μl	0,8 μl
DNA o koncentraci 10 ng/μl	1 μl
<b>Celkový objem</b>	<b>10 μl</b>

Tab. 9: Teplotní režim PCR reakce.

<b><u>Teplotní režim</u></b>	
Počáteční denaturace	95 °C – 1 min
Cyklování: 35 cyklů	95 °C – 15 s
	60 °C – 5 s
	72 °C – 15 s
Chlazení	15 °C – do ukončení programu

### **Přečištění pcr produktů: EXOSAP**

K 10 μl PCR produktu se přidá 3 μl EXOSAPu. Příprava směsi je uvedena v tabulce 10. Vzorčky vložíme do termocykleru (Veriti, Applied Biosystem, USA) a pustíme pro program, jehož teplotní režim je uveden v tabulce 11.

Tab. 10: Reagencie a jejich potřebné množství pro přípravu EXOSAPu.

<b>Reagencie pro jednu reakci (μl)</b>	
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	2 μl
Exonuclease I	1 μl
<b>Celkový objem</b>	<b>3 μl</b>

Tab. 11: Teplotní režim, při kterém běží enzymatické přečištění PCR produktu.

<b><u>Teplotní režim</u></b>	
	37 °C – 15 min
	80 °C – 15 min
Chlazení	15 °C – do ukončení programu



## **Sekvenační PCR**

Sekvenační PCR reakce, jejichž složení je uvedeno v tabulce 12 se připravuje zvlášť pro R (reverse) primer a F (forward) primer.

Tab. 12: Reagencie a jejich množství pro sekvenační PCR reakci.

<b>Reagencie pro jednu reakci (μl)</b>	
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing	2 μl
Primer F/R 2,5 pmol/μl	1 μl
Přečištěný PCR produkt	4 μl
<b>Celkový objem</b>	<b>7 μl</b>

Směs připravenou pro sekvenační PCR promícháme a vložíme do termocykleru (Veriti, Applied Biosystem, USA) a pustíme pcr program, jehož teplotní režim je uveden v tabulce 13.

Tab. 13: Teplotní režim, při kterém probíhá sekvenační PCR reakce.

<b><u>Teplotní režim</u></b>	
Počáteční denaturace	95 °C – 1 min
Cyklování: 25 cyklů	96 °C – 10 s
	50 °C – 5 s
	60 °C – 4 min
Chlazení	15 °C – do ukončení programu

## **Přečištění PCR produktů: Ethanolová precipitace**

Po proběhnutí sekvenační PCR reakce k 7 μl produktu napipetujeme 40 μl roztoku acetátu, promícháme a přeneseme do 1,5 ml zkumavek. Vzorky se centrifugují v centrifuze (Minispin plus, Eppendorf) 20min při odstředění 11300xg. Důležité je myslet na stejnou orientaci zkumavek v centrifuze. Supernatant ihned odsajeme a přidáme do každé zkumavky 300 μl 70% etanolu, promícháme a opět necháme centrifugovat 10 min při odstředění 11300xg. V dalším kroku supernatant odsajeme a přidáme 25 μl Hi-Di™ Formamidu (Applied Biosystems), promícháme a napipetujeme do platička.

## **Kapilární elektroforéza**

Vzorky jsou analyzovány genetickým analyzátozem ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, USA), který pracuje na principu kapilární elektroforézy. Parametry analýzy jsou specifikovány v softwaru 3130xl Genetic Analyzer Data Collection Software v3.0 (Applied Biosystems, USA). Nasbíraná data jsou následně vyhodnocována v automatizovaném softwaru Sequencing Analysis Software v5.3 (Applied Biosystems, USA).

### **4. 5 Molekulárně genetické vyšetření *CFTR* genu pomocí NGS kitu *CFTR MASTR Dx (Multiplicom)***

*CFTR MASTR Dx (Multiplicom)* je kit, založený na principu amplikonového sekvenování, který umožňuje identifikaci všech exonů, některých přilehlých intronových oblastí a některých promotorových oblastí genu. Metoda je založena na dvou multiplexních reakcích, kdy v první reakci dochází k amplifikaci DNA vzorku a v druhé, univerzální PCR reakci, dochází k připojení specifických indexů, které jsou unikátní pro každého pacienta. Každá knihovna se skládá ze 48 odlišných amplikonů. Vzniklé knihovny jsou čištěny od malých reziduálních fragmentů DNA, poolovány (vzorky jsou ekvimolárně míseny) a denaturovány. Spoolované, denaturované knihovny jsou analyzovány pomocí sekvenátoru MiSeq.

#### **4. 5. 1 Reagencie**

- PCR Mix Plex 1 (obsahuje specifické oligonukleotidové primery, dNTPs v Tricinovém pufru o pH 8, KCl a MgCl<sub>2</sub>)
- PCR Mix Plex 2 (obsahuje BSA s KCl a Mg Cl<sub>2</sub>)
- Taq DNA polymerasa
- Universal PCR Mix
- Amplification Reagent 1 (AR1)
- vybrané indexy MID p7 a MID p5
- magnetické kuličky Agencourt AMPure XP beat
- 70% etanol
- Read 1 Primer Mix (R1) a Read 2 Primer Mix (R2)
- Index Primer Mix (I)
- hybridizační pufr (HT1)
- hydroxid sodný (NaOH)
- pufr TRIS-Cl

## 4. 5. 2 Postup

### Amplifikace DNA metodou PCR

Připravíme si vzorky DNA o koncentraci 10 – 20 ng/μl. Z mrazničky si vyndáme MasterMixy (1,2) a necháme roztát na ledu. Dále smícháme 25 μl DNA o koncentraci 10 – 20 ng/μl a 25 μl sterilní destilované vody. Vzorky proměříme na Qubitu (Qubit 2.0 Fluorometer, Life Technologies). Požadovaná výsledná koncentrace DNA je v rozmezí 4 – 10 ng/μl.

V dalším kroku si připravíme reakční mixy pro 2 multiplexy (pro každý vzorek se připraví 2 různé mastermixy). MasterMixy promícháme na vortexu a krátce stočíme, Taq polymerázu promícháme, krátce stočíme a před použitím uchovááme na ledu. Mastermix připravujeme dle rozpisu uvedeného v tabulce 14.

Tab. 14: Příprava Master Mixu pro PCR reakci.

<b>Reagencie pro jednu reakci (μl)</b>	
PCR Mix Plex	10 μl
Taq DNA Polymerase	0,075 μl
<b>Celkový objem</b>	<b>10,075 μl</b>

Mastex mix krátce promícháme na vortexu a centrifugujeme 10 s při 12 000xg. Připravené mixy pipetujeme do platíčka po 10 μl. Ke každému mixu přidáváme 5 μl vzorku DNA o koncentraci 4 -10 ng/μl. K NTC (negativní kontrola) přidáváme místo DNA 5 μl sterilní destilované H<sub>2</sub>O. Platíčko se vzorky překryjeme folií, utěsníme, krátce promícháme na vortexu a centrifugujeme 10 s při 12 000xg. Vložíme do termocykleru (Veriti, Applied Biosystem, USA) a spustíme pcr program, jehož teplotní režim je uveden v tabulce 15.

Tab. 15: Teplotní režim, při kterém běží první PCR reakce.

<b><u>Teplotní režim</u></b>	
	98 °C – 10 min
	95 °C – 45 s
20 cyklů	60 °C – 45 s
	68 °C – 2 min
	72 °C – 10 min
Chlazení	4 °C – max 1h

Amplifikační program trvá 2 hodiny 24 minut, po doběhnutí programu je nutné vzorky do hodiny vyndat a pokračovat v dalším kroku nebo plátíčko zamrazit při -20 °C. 30 minut před doběhnutím programu z chladničky vyndáme reagentie Agilent DNA 1000 kitu do pokojové teploty.

### **Ověření úspěšné amplifikace po 1. PCR pomocí Agilent chipu**

Úspěšnost amplifikace se ověřuje pomocí Agilent chipu DNA 1000 kit (Agilent Technologies).



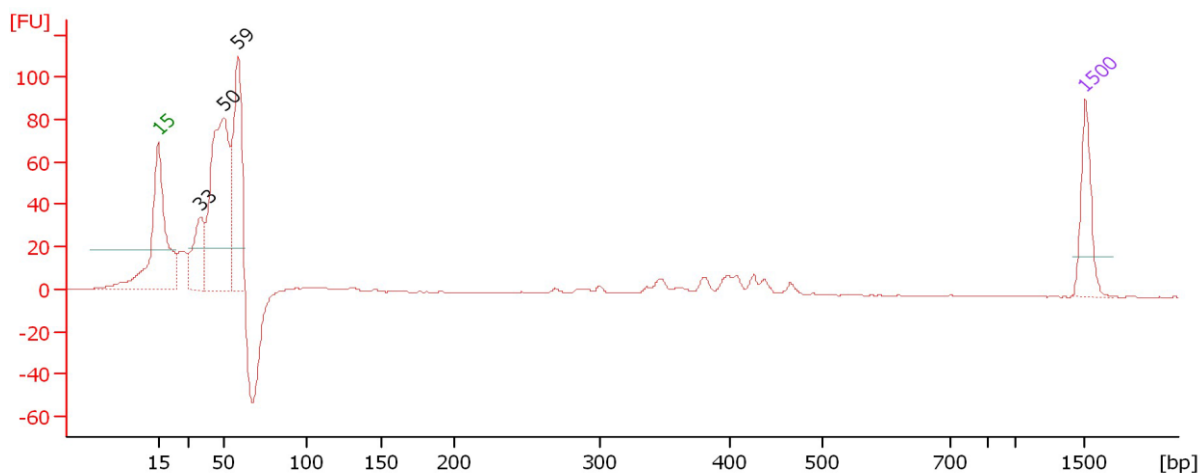
Obr. 9: Obrázek ukazuje chip, pomocí kterého ověřujeme úspěšnost amplifikace a přístroj 2100 Bioanalyzer pomocí kterého je chip analyzován.  
Převzato z gmi-inc.com.

Pro ověření amplifikace DNA na čipu vybereme 12 náhodných vzorků. Dále postupujeme dle návodu k Agilent chipu následovně: Nový DNA čip vložíme do „*chip priming station*“ (obrázek 10). Do chipu (obrázek 9) nepipetujeme 9 $\mu$ l gel-dye mix do jamičky značené **G**. Zkontrolujeme, zda je píst nastaven na 1ml a přiklopíme víko „*chip priming station*“. Stiskneme píst směrem dolů, než uslyšíme cvaknutí. Po 1 min uvolníme píst.



Obr. 10: „Chip priming station“ Převzato z agilent.com

Po otevření „chip priming station“ se napipetuje 9  $\mu$ l gel-dye mix do dvou jamiček značených **G**. Dále napipetujeme 5  $\mu$ l markeru do 12 jamiček pro vzorky a přidáme 1  $\mu$ l náhodně vybraných DNA amplifikovaných vzorků. 5  $\mu$ l markeru přidáme i do jamičky pro „ladder“ spolu s 1  $\mu$ l DNA „ladder“. Čip vortexujeme po dobu 1 min a poté vzorek analyzujeme pomocí přístroje 2100 Bioanalyzer (znázorněný na obrázku 9) v programu 2100 Expert. U vzorků, u kterých proběhla úspěšná amplifikace, detekujeme produkty o velikosti 250 – 500bp. Na obrázku 11 je znázorněn správný výstup amplifikovaného vzorku.



Obr. 11: Na obrázku je vidět výsledný elektrogoreogram z Agilent chipu DNA 1000. Signály 15 – 1500 bp ohraničují signály vnitřního standardu Agilent chip.

## Univerzální PCR 2 a připojení indexů

Univerzální PRC provádíme z důvodu připojení specifických indexů k fragmentům DNA, které svou unikátní kombinací přiřazují vzorky k jednotlivým pacientům.

Připravíme si Universal PCR Mix, Amplification Reagent 1 (obojí jsou součástí kitu CFTR MASTR™ Dx) a vybrané indexy s ověřenou kompatibilitou. Necháme roztát na ledu, krátce promícháme na vortexu a stočíme 10 s při 12 000x g. Taq DNA polymerázu vyndáme těsně před přidáním do master mixu z mrazničky. Master mix připravujeme dle tabulky 16.

Tab. 16: Reagencie a jejich množství pro přípravu Master mixu.

<b>Reagencie pro jednu reakci (μl)</b>	
Universal PCR Mix	10 μl
Amplification Reagent1 (AR)	10 μl
Taq DNA Polymerase	0,125 μl
<b>Celkový objem</b>	<b>20,125 μl</b>

Master mix lehce promícháme (2 – 3s) a centrifugujeme 10 s při 12 000x g. Připravený mix rozpipetujeme do nového plátíčka po 20 μl. Do rozplněného plátíčka pak přidáváme příslušné kompatibilní indexy.

Jako templát k univerzálnímu PCR slouží produkt z první PCR reakce zředěný 1/1000. Po rozmrznutí a krátkém stočení PCR produktu z první reakce provedeme dvoukrokové ředění. V prvním kroku ředíme v poměru 1:100 (tzn. 99 μl destilované vody a 1 μl PCR produktu) a promícháme na vortexu. V druhém kroku ředíme v poměru 1: 10 (tzn. 90 μl destilované vody a 10 μl PCR produktu z prvního ředění), následně promícháme na vortexu.

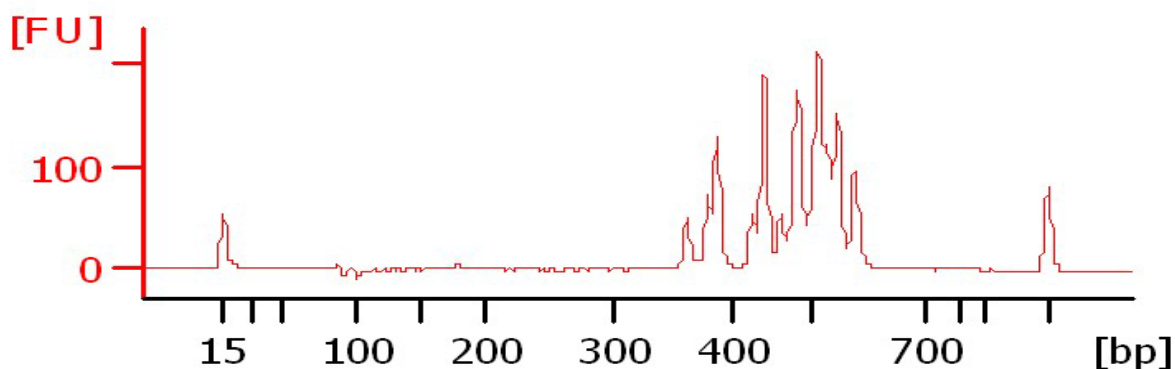
K 24 μl master mixu s indexy přidáme 1 μl naředěného PCR produktu z první reakce a doplníme tak objem na 25 μl. Plátíčko se vzorky překryjeme folií, krátce promícháme na vortexu (2 -3s) a stočíme 10 s při 12 000x g. Připravené plátíčko vložíme do termocyklu a spustíme pcr program s teplotním režimem uvedeným v tabulce 17.

Tab. 17: Teplotní režim, při kterém probíhá univerzální PCR 2.

<b>Teplotní režim</b>	
Počáteční denaturace	98 °C – 10 min
Cyklování: 20 cyklů	95 °C – 45 s
	64 °C – 5 s
	68 °C – 2 min
Konečná elongace	72 °C – 10 min
Chlazení	4 °C – ∞

Po doběnutí programu, který trvá zhruba 1,5 hodiny je nutné vzorky nejpozději do 12 hodin vyndat a pokračovat v dalších krocích nebo můžeme platičko zamrazit při – 15 C° až – 25 C°.

V následujícím kroku, stejně tak jak jako po proběhnutí první PCR reakce, se ověřuje úspěšná amplifikace univerzálního PCR pomocí Agilent chipu. Postup je stejný jako při ověření úspěšné amplifikace po 1. PCR pomocí Agilent chipu. U úspěšně amplifikovaných vzorků detekujeme produkty o velikosti 350 – 550 bp. Ukázka správného výstupu z amplifikovaného vzorku je vidět na obrázku 12.



Obr. 12: Na obrázku je vidět výsledný elektroforeogram z Agilent chipu DNA 1000. Signály 15 – 1000 bp ohraničují signály vnitřního standardu Agilent chip.

### **Mísení obou multiplexních reakcí pro jednoho pacienta**

V tomto kroku se smísí obě multiplexní reakce do jednoho vzorku pro každého pacienta. Multiplexy mícháme do označených Lo-Bind DNA zkumavek (materiál zamezuje ulpívání DNA na povrchu zkumavky) dle rozpisu uvedeného v tabulce 18.

Tab. 18: Rozpis množství mísení obou multiplexů.

<b>Multiplex</b>	<b>objem</b>
Multiplex 1	20 µl
Multiplex 2	16,5 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>36,5 µl</b>

Krátce promícháme na vortexu (2 – 3s) a stočíme 10 s při 12 000x g. Po smíchání obou multiplexů ihned přistoupíme k čištění od malých zbytkových fragmentů pomocí magnetických kuliček nebo amplifikovanou knihovnu zmrazíme při – 15 C° až – 25 C°.

### **Čištění amplifikovaných knihoven**

Nejdříve si z chladničky vyndáme magnetické kuličky a necháme vytemperovat minimálně 30 min. na pokojovou teplotu. Dále si připravíme čerstvý 70% etanol a postupujeme následovně: Do 1,5ml Lo-Bind DNA zkumavek napipetujeme 30 µl amplifikované knihovny a 34 µl magnetických kuliček, opatrně promícháme pouze pomocí pipety. Necháme 5 minut inkubovat a poté vzorky vložíme na 2 minuty do magnetického stojánku. Čirá tekutina se odebere pipetou a vyhodí. Ke každému vzorku přidáme 200 µl 70% etanolu a inkubujeme 30 s při pokojové teplotě. Poté etanol odsajeme pipetou a vyhodíme. Čištění etanolem se provádí celkem dvakrát. Při druhém čištění etanolem důkladně odsajeme a necháme pelet vysušit, dokud nezačne povrch pelety praskat (cca 5 min). Pozor na přesušení pelety, takovéto pelety se pak špatně rozpouští. Z magnetického stojánku přendáme vzorky do plastového a ke každému přidáme 20 µl destilované vody, ve které pelet opakovaným promícháním pipetou jemně rozpustíme. Znovu vložíme zkumavky do magnetického stojánku (na 1 minutu). Po uplynutí času přeneseme 17 µl vzorku do nových 1,5ml Lo-Bind DNA zkumavek.

### **Změření koncentrace přečištěných knihoven vyšetřovaných vzorku**

Koncentrace knihoven vyšetřovaných vzorků proměříme na Qubitu (Qubit 2.0 Fluorometer, Life Tecgnologies) pomocí BR reagensí. Změřená koncentrace se pře počítá na molalitu dle vzorce:

$$\text{koncentrace vzorku (nM)} = \frac{\text{koncentrace vzorku (ng/}\mu\text{l)} \times 10^6}{656,6 \times 460}$$

460 je průměrná délka fragmentů po univerzální PCR a 656,6 je průměrná molární hmotnost báze v DNA.

Koncentrace jednotlivých knihoven upravíme na 4nM a koncentraci ověříme na Qubitu (Qubit 2.0 Fluorometer, Life Tecgnologies).



### **Poolování knihoven**

Do 1,5ml Lo-Bind DNA zkumavky napipetujeme 10  $\mu$ l od každé patientské knihovny o koncentraci 4 nM. Výsledkem je tedy jedna 4nM knihovna.

### **Příprava sekvenčních primerů a indexovacího primeru**

Z mrazničky vyndáme sekvenační primery (Read1 Primer Mix - R1 a Read2 Primer Mix - R2) a indexovací primery (Index Primer Mix - I, dodávané v MID Dx for Illumina MiSeq Amplification box a hybridizační primer (HT1), který je dodávaný spolu se sekvenační cartridge) a necháme roztát na ledu. Každý primer je dodávaný jako 100  $\mu$ M. Pro každý primer připravíme 600  $\mu$ l roztoku o výsledné koncentraci 0,5  $\mu$ M dle rozpisu:

HT 1	597 $\mu$ l
Primer Mix (R1, R2, I)	3 $\mu$ l
<b>Celkový objem</b>	<b>600 <math>\mu</math>l</b>

Směs vortexujeme 2-3 s. Připravené vzorky uchováme na ledu až do nanesení do sekvenační cartridge.

### **Příprava čerstvého roztoku NaOH**

Dle rozpisu připravíme čerstvý 0,2M roztok NaOH.

dH <sub>2</sub> O	980 $\mu$ l
10M NaOH	20 $\mu$ l
<b>Celkový objem</b>	<b>1000 <math>\mu</math>l</b>

Zkumavku s roztokem promícháme několikerým obrácením zkumavky. Roztok NaOH je důležitý pro správnou denaturaci knihovny a k tvorbě klastrů. Po přípravě roztoku je použitelný 12 hodin.

### **Denaturace a ředění knihovny**

4nM knihovnu denaturujeme 0,2M roztokem NaOH dle rozpisu:

4nM knihovna	5 $\mu$ l
0,2M NaOH	5 $\mu$ l
<b>Celkový objem</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

Směs krátce promícháme na vortexu a lehce stočíme při 280x g. Vzniklou směs inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě, kdy dochází k denaturaci DNA na jednovláknové řetězce.

K denaturované knihovně přidáme HT1 pufr dle rozpisu:

Denaturovaná knihovna	10 µl
Vychlazená HT1	990 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>1000 µl</b>

Získáme 1ml 20pM denaturované knihovny v 1mM NaOH. Zkumavku promícháme opakovaným překlápěním. 20pM knihovna se naředí do nové LoBind zkumavky na 10pM knihovnu dle následujícího rozpisu:

20pM denaturovaná knihovna	300 µl
Vychlazená HT1	300 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>600 µl</b>

Zkumavku promícháme opakovaným překlápěním. Získáme denaturovanou 10pM knihovnu, kterou uložíme na led a připravíme si kontrolní knihovnu PhiX. Denaturovaná knihovna (10pM) je vhodná pro nanesení do sekvenační cartridge.

### **Denaturace a ředění kontroly PhiX**

Na ledu necháme roztát DNA knihovnu PhiX, která není součástí kitu, ale je dodávána samostatně. Do nové 1,5 ml LoBind zkumavky naředíme danou knihovnu 10mM Tris – Cl (pH 8,5 s 0,1% Tweenem 20) dle rozpisu:

10nM knihovna PhiX	2 µl
10nM Tric – Cl	3 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>5 µl</b>

Opatrně promícháme pipetou. Získáme 4nM knihovnu PhiX. Tuto knihovnu denaturujeme 0,2M NaOH dle rozpisu:

4nM knihovna PhiX	5 µl
0,2M NaOH	5 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>10 µl</b>

Po krátkém promíchání na vortexu a stočení, získáváme 2nM knihovnu PhiX, kterou inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě, kdy dochází k denaturaci DNA.

Pro získání 20pM knihovny PhiX přidáváme k denaturované 2nM knihovně PhiX HT1 dle rozpisu:

2nMD knihovna PhiX	10 µl
Vychlazená HT1	990 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>1000 µl</b>

20pM knihovna PhiX může být skladována až tři týdny bez snížení účinnosti tvořit klastry. Knihovnu skladujeme při -20°C.

Při použití k sekvenci knihovny PhiX dále ředíme na 12,5pM dle rozpisu:

20pM knihovna PhiX	375 µl
Vychlazená HT1	225 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>600 µl</b>

Získanou 12,5pM knihovnu Phi X uložíme na led do dalšího použití.

### **Kombinace knihoven vzorků DNA a kontrolní PhiX**

V tomto kroku smícháme denaturované knihovny DNA vzorků a kontrolní PhiX dle následujícího rozpisu:

12,5 pM denaturovaná knihovna PhiX	30 µl
10 pM denaturovaná knihovna CFTR vzorků	570 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>600 µl</b>

### **Sekvenace na MiSeq**

V Illumina Experiment Manageru si připravíme Sample Sheet – workflow parametry, který nahrajeme na MiSeq. Vzorky se nanášejí do sekvenační cartridge dle pokynů na MiSeq následovně:

pozice 17 – knihovna CFTR s kontrolní PhiX knihovna

pozice 18 – Read 1 custom primer

pozice 19 – Index custom primer

pozice 20 – Read 2 custom primer

Pro ilustraci uvádím sekvenační cartridge na obrázku 13. Vložíme cartridge do MiSequ a spustíme. Po dvou hodinách se zkontroluje počet klastrů. Výsledné data se nahrají do softwaru Sophia Genetics, kde jsou data analyzována.



Obr. 13: Cartridge, do které se nanáší CFTR knihovna a kontrolní knihovna PhiX – pozice 17, Read 1 custom primer – pozice 18, Index custom primer – pozice 19 a Read 2 custom primer – pozice 20.

## 5 Výsledky

Soubor 30 pacientů byl vybrán s pomocí klinických genetiků a pediatrů z FN Motol. Byli vybráni takový jedinci, kteří vykazovali klinické příznaky cystické fibrózy. Soubor těchto pacientů jsem nejdříve analyzovala pomocí komerčního kitu ELUCIGENE CF-EU2v1, který je schopen zachytit 50 nejčastěji se vyskytujících mutací *CFTR* genu v české populaci. U některých pacientů byla touto metodou odhalena jedna mutace, což by naznačovalo, že pacienti mohou být heterozygoti pro danou mutaci a jsou tedy přenašeči pro dané onemocnění. Jelikož pacienti vykazovali klasické příznaky cystické fibrózy, bylo potřeba využít dalších molekulárně genetických metod pro odhalení příčiny jejich onemocnění. U některých pacientů vykazujících fenotyp CF nebyla objevena mutace žádná. V dalším kroku jsme provedli vyšetření metodou MLPA, která zkoumá rozsáhlé delece a duplikace v genu *CFTR*. Touto metodou však nebyla žádná rozsáhlejší delece či duplikace odhalena, proto jsme přistoupili k analýze celého genu *CFTR* pomocí sekvenování nové generace kitem *CFTR* MASTR Dx s následným ověřením pomocí Sangerova sekvenování.

### 5. 2 Výsledky molekulárně genetického vyšetření *CFTR* genu u vybraného souboru pacientů pomocí kitu ELUCIGENE CF-EU2

Pomocí metody založené na principu ARMS, za použití komerčního kitu ELUCIGENE CF-EU2v1, který je referenční metodou v molekulárně genetické laboratoři FN Motol, byly u pacientů vykazujících fenotyp cystické fibrózy zjištěny mutace, které jsou popsány v tabulce 19.

Tab. 19: Přehled nalezených mutací u souboru pacientů pomocí kitu ELUCIGENE CF-EU2

Pacient číslo	Nalezené mutace
1	Poly T: 5T/7T
2	Bez nálezu
3	Bez nálezu
4	c.1521_1523delCTT (F508del)
5	Bez nálezu
6	Bez nálezu
7	Bez nálezu
8	Bez nálezu
9	Bez nálezu
10	Bez nálezu

11	Poly T: 5T/7T
12	c.1521_1523delCTT (F508del)
13	Bez nálezu
14	c.1521_1523delCTT (F508del)
15	c.350G>A (R117H)
16	Bez nálezu
17	c.1521_1523delCTT (F508del)
18	Poly T: 5T/7T
19	Bez nálezu
20	Bez nálezu
21	Bez nálezu
22	c.1521_1523delCTT (F508del)
23	Poly T: 5T/7T
24	Bez nálezu
25	Poly T: 5T/7T
26	c.1521_1523delCTT (F508del)
27	c.54-5940_2731+10250del21kb (CFTRdele2,3)
28	Bez nálezu
29	c.2215G>A
30	Bez nálezu

### 5. 3 Sekvenování celého genu *CFTR* pomocí NGS s následným ověřením

U souboru pacientů bylo provedeno sekvenování genu *CFTR* s využitím platformy Illumina na přístroji MiSeq Illumina. Hodnocení naměřených dat bylo analyzováno pomocí softwaru Sophia Genetics. Výsledný report *CFTR* genu uvádí výsledky pro každého pacienta zvlášť. V reportu je uvedeno, v jakém exonu *CFTR* genu se nachází varianta, o jaký typ mutace se jedná, rozsah pokrytí uváděný v procentech z R a F strany a stupeň patogenity nalezené varianty, kdy A – pravděpodobně patogenní, B – potenciálně patogenní, C – varianty neznámého původu a D – pravděpodobně nepatogenní.

V tabulkách uvedených níže jsou pak znázorněny výsledky pacientů, u kterých byly metodou NGS Illumina MiSeq detekovány mutace, které nebyly běžnými metodami zachyceny, případně se lišily od původního nálezu. U ostatních pacientů, jejichž výsledky tu neuvádím, byly potvrzeny výsledky předchozích analýz.

Pacient č. 1					
EXON	POKRYTÍ (F/R)	TYP ZMĚNY	NALEZENÉ VARIANTY	POTVRZENÍ SANGEREM	KLINICKÁ ZÁVAŽNOST
3	49,67 % (387/382)	T>G	c.169T>G (W57G)	ANO	Kauzální
23	49,92 % (308/307)	G>A	c.4137-139G>A		
14a	43,97 % (343/270)	CAT>C	c.2619+86_2619+87 delTA		
10	48,83 % (131/125)	G>A	c.1408G>A		Polymorfní
24	50 % (392/392)	G>A	c.4389G>A		Tichá
10	% (/)		c.1210-12T[5];[=]		
14a	43,79 % (574/448)	T>G	c.2562T>G		Tichá
6	48,76 % (536/510)	A>G	c.743+40A>G		
16	53,83 % (265/309)	G>A	c.2909-92G>A		
12	49,39 % (292/285)	T>A	c.1680-870T>A		

Tab. 20: U pacienta číslo 1 byla nalezena kauzální mutace c.169T>G (W57G). Také byla detekována změna v intronu 9 (c.1210–12T[5]). Dále byla detekována varianta na pozici c.4389G>A, kdy dochází k výměně guaninu za adenin. Tato záměna nezpůsobuje změnu aminokyseliny. Jelikož pořadí aminokyselin se nemění a ve fenotypu se neprojevuje, označujeme tuto mutaci jako tichou. Další nalezenou tichou mutací u tohoto pacienta je varianta c.2562T>G, která by neměla mít vliv na fenotyp. Dále byla nalezena polymorfní mutace c.1408G>A. V homopolymerní oblasti intronu 9 nebyl stanoven počet čtení. Další varianty se vyskytují většinou v oblasti intronu a dosud nebyly popsány.

Pacient č. 6					
EXON	POKRYTÍ (F/R)	TYP ZMĚNY	NALEZENÉ VARIANTY	POTVRZENÍ SANGEREM	KLINICKÁ ZÁVAŽNOST
23	100 % (0/461)	G>A	c.4137-139G>A		
16	99,56 % (5/1144)	G>A	c.2909-92G>A		
4	48,46 % (335/315)	T>C	c.443T>C (I148T)	ANO	Kauzální
14a	99,78 % (0/452)	CAT>C	c.2619+86_2619+87 delTA		
10	100 % (0/387)	G>A	c.1408G>A		Polymorfní
24	99,79 % (1/486)	G>A	c.4389G>A		Tichá
14a	100 % (0/1166)	T>G	c.2562T>G		Tichá
12	99,79 % (1/943)	T>A	c.1680-870T>A		

Tab. 21: U pacienta číslo 6 byla potvrzena kauzální mutace c.443T>C (I148T), která nebyla detekována běžnými metodami. Dle databáze ClinVar a CFTR2 není tato varianta označena za patogenní. Stejně tak, jako u předešlého pacienta, byly detekovány dvě tiché a jedna polymorfní mutace (c.2562T>G, c.4389G>A a c.1408G>A). Žádná další kauzální mutace nebyla odhalena. Ostatní varianty nebyly dosud popsány.



Pacient č. 8					
EXON	POKRYTÍ (F/R)	TYP ZMĚNY	NALEZENÉ VARIANTY	POTVRZENÍ SANGEREM	KLINICKÁ ZÁVAŽNOST
23	49,3 % (328/319)	G>A	c.4137-139G>A		
10	49,45 % (139/136)	G>A	c.1408G>A		Polymorfní
16	50,08 % (309/310)	G>A	c.2909-92G>A		
12	50,81 % (332/343)	G>C	c.1727G>C (G576A)	ANO	Kauzální
16	45,48 % (386/322)	CAT>C	c.2619+86_2619+87 delTA		
12	50,98 % (274/286)	T>A	c.1680-870T>A		
14a	43,97 % (678/536)	T>G	c.2562T>G		Tichá
24	49,43 % (311/304)	G>A	c.4389G>A		Tichá
13	49,76 % (742/735)	C>T	c.20002C>T (R668C)	ANO	Kauzální

Tab. 22: U Pacienta číslo 8 byly pomocí kitu CFTR MASTR Dx odhaleny 2 kauzální mutace v heterozygotním stavu c.1727G>C (G576A) a c.20002C>T (R668C). Dle databáze CFTR2 nejsou tyto varianty považovány za patogenní. Stejně tak, jako u předešlého pacienta, byly detekovány dvě tiché a jedna polymorfní mutace (c.2562T>G, c.4389G>A a c.1408G>A).

Pacient č. 11					
EXON	POKRYTÍ (F/R)	TYP ZMĚNY	NALEZENÉ VARIANTY	POTVRZENÍ SANGEREM	KLINICKÁ ZÁVAŽNOST
3	49,39 % (332/324)	G>A	c.224G>A (R75Q)	ANO	kauzální
10	% (/)		c.1210-11T>G (TG13)		kauzální

Tab. 23: U pacienta číslo 11 byly detekovány pomocí NGS 2 kauzální mutace. Jedna kauzální mutace se vyskytuje v polymorfní oblasti intronu 9 c.1210-11T>G (Poly T 5/7) a druhá v exonu 3 c.224G>A (R75Q). Tato varianta není dle databáze CFTR2 považována za patogenní. Dále byla u pacienta detekována chybovost v homopolymerní oblasti.

Pacient č. 16					
EXON	POKRYTÍ (F/R)	TYP ZMĚNY	NALEZENÉ VARIANTY	POTVRZENÍ SANGEREM	KLINICKÁ ZÁVAŽNOST
3	47,5 % (378/342)	G>A	c.224G>A (R75Q).	ANO	kauzální

Tab. 24: U pacienta číslo 16 byla detekována pouze jedna kauzální mutace c.224G>A (R75Q). Tato varianta není dle databáze CFTR2 považována za patogenní.

Pacient č. 26					
EXON	POKRYTÍ (F/R)	TYP ZMĚNY	NALEZENÉ VARIANTY	POTVRZENÍ SANGEREM	KLINICKÁ ZÁVAŽNOST
6	49,16 % (608/588)	C>T	c.869+ 11C>T		Polymorfní
10	54,94 % (144/178)	ATCT>A	c.1521_1523del CTT (F508del)	ANO	Kauzální
16	50,14 % (347/350)	G>A	c.2909-92G>A		
10	99,69 % (1/323)	G>A	c.1408G>A		Polymorfní
13	51,13 % (180/816)	C>T	c.2002C>T (R668C)	ANO	Kauzální
6	47,61 % (615/587)	AGATT>A	c.744-9_744- 6delGATT		
24	51,0 % (294/306)	G>A	c.4389G>A		Tichá
14a	51,91 % (340/367)	CAT>C	c.2619+86_2619+87 delTA		
14a	51,72 % (534/572)	T>G	c.2562T>G		Tichá
12	99,8 % (0/498)	T>A	c.1680-870T>A		
12	53,91 % (294/345)	G>C	c.1727G>C (G576A)	ANO	Kauzální
23	50,79 % (341/352)	G>A	c.4137-139G>A		

Tab. 25: U pacienta číslo 26 byla potvrzena kauzální mutace c.1521\_1523del CTT (F508del), klasifikována dle databáze CFTR2 a ClinVar jako patogenní varianta. Pomocí kitu CFTR MASTR Dx byly detekovány další dvě kauzální mutace c.1727G>C (G576A) a c.2002C>T (R668C), vyskytující se v pozici cis jako komplexní alela. Ty jsou dle CFTR2 databáze klasifikovány jako nepatogenní varianty. Také byly detekovány často se vyskytující tiché mutace c.4389G>A a c.2562T>G a polymorfní mutace c.1408G>A a c.869+11C>T.

Pacient č. 27					
EXON	POKRYTÍ (F/R)	TYP ZMĚNY	NALEZENÉ VARIANTY	POTVRZENÍ SANGEREM	KLINICKÁ ZÁVAŽNOST
10	49,32 % (111/108)	G>A	c.1408G>A		Polymorfní
14a	50,75 % (561/578)	CAT>C	c.2619+86_2619+87 delTA		
12	48,31 % (229/215)	T>A	c.1680-870T>A		
7	50,26 % (575/584)	G>T	c.874G>T (E292X)	ANO	Kauzální
23	50,75 % (528/544)	G>A	c.4137-139G>A		
14a	49,35 % (755/755)	T>G	c.2562T>G		Tichá
24	50,63% (509/522)	G>A	c.4389G>A		Tichá
13	49,06 % (838/813)	G>A	c.2126G>A (R709Q)	ANO	Kauzální
16	48,88 % (273/261)	G>A	c.2909-92G>A		

Tab. 26: U pacienta číslo 27 byla pomocí kitu Elucigen CF-EU2 detekována mutace c.54-5940\_273+10250del21kb (CFTRdele 2,3). Tato mutace však pomocí NGS metody nebyla zaznamenána. Byly detekovány dvě kauzální mutace c.874G>T (E292X) a c.2126G>A (R709Q) v pozici cis jako komplexní alela. Tyto mutace jsou dle databáze HGMD hodnoceny jako patogenní. Také byly, jako u většiny pacientů, zaznamenány tiché mutace c.4389G>A a c.2562T>G a polymorfní mutace c.1408G>A.

Pacient č. 28					
EXON	POKRYTÍ (F/R)	TYP ZMĚNY	NALEZENÉ VARIANTY	POTVRZENÍ SANGEREM	KLINICKÁ ZÁVAŽNOST
6	50,55 % (431/462)	AGATT>A	c.744-9_744- 6delGATT		
23	49,11 % (258/249)	G>A	c.4137-139G>A		
4	52,44 % (185/204)	T>C	c.443T>C (I148T)	ANO	Kauzální
10	50,69 % (142/146)	G>A	c.1408G>A		Polymorfní
12	47,85 % (326/300)	T>A	c.1680-870T>A		
14a	49,38 % (324/316)	CAT>C	c.2619+86_2619+87 delTA		
24	49,4 % (254/248)	G>A	c.4389G>A		Tichá
14a	47,5 % (681/618)	T>G	c.2562T>G		Tichá
6	52,72 % (417/465)	C>T	c.869+11C>T		Polymorfní
16	51,37 % (390/412)	G>A	c.2909-92G>A		

Tab. 27: U pacienta číslo 28 byla detekována kauzální mutace c.443T>C (I148T), která je dle databáze ClinVar hodnocena jako nepatogenní varianta. Dále byly detekovány tiché mutace c.4389G>A a c.2562T>G a polymorfní mutace c.1408G>A a c.869+ 11C>T.

Pacient č. 29					
EXON	POKRYTÍ (F/R)	TYP ZMĚNY	NALEZENÉ VARIANTY	POTVRZENÍ SANGEREM	KLINICKÁ ZÁVAŽNOST
6	95,23 % (18/978)	AGATT>A	c.744-9_744- 6delGATT		
1	52,19 % (393/429)	G>C	c.-8G>C		
12	99,86 % (1/735)	T>A	c.1680-870T>A		
10	100 % (0/393)	G>A	c.1408G>A		Polymorfní
13	46,49 % (587/510)	G>A	c.2215G>A (V739I)	ANO	Kauzální
14a	50,76 % (260/268)	CAT>C	c.2619+86_2619 +87 delTA		
14a	51,04 % (258/269)	T>A	c.2619+106T>A		
14a	48,74 % (589/561)	T>G	c.2562T>G		Tichá
6	51,09 % (492/514)	C>T	c.869+11C>T		Polymorfní

Tab. 28: U pacienta číslo 29 byla pomocí kitu Elucigen CF-EU2 detekována kauzální mutace c.2215delG (2347delG), software Sophia Genetics však vyhodnotil tuto variantu jako c.2215G>A (V739I). Tato varianta nebyla dosud popsána v žádné databázi. Predikčními programy PolyPhen je tato varianta považována za nepatogenní. Dále byly detekovány polymorfní mutace c.1408G>A a c.869+11C>T a tichá mutace c.2562T>G.

### 5. 3 Kompletace výsledků

V tabulce 29 je uveden kompletní výsledek po multiplexní analýze a sekvenování *CFTR* genu s následným cíleným ověřením nalezené mutace. Pomocí sekvenování nové generace jsem zachytila druhou mutaci, a tím jsem u některých pacientů mohla potvrdit molekulární původ onemocnění, který byl dosud neznámý. U většiny vyšetřených pacientů však podstata onemocnění potvrzena nebyla, z důvodu nezachycení žádné mutace, nálezu pouze jedné mutace v heterozygotním stavu nebo nálezu dvou mutací, které jsou podle odborných publikací spíše benigní a nezpůsobují onemocnění cystickou fibrózou.

Tab. 29: Zápis genotypů u jednotlivých pacientů detekovaných pomocí kitu ELUCUGENE CF-EU2 a kitu CFTR MASTR Dx.

Pacient číslo	Nalezené mutace
1	c.169T>G
2	Bez nálezu
3	Bez nálezu
4	c.1521_1523delCTT
5	Bez nálezu
6	c.443T>C
7	Bez nálezu
8	c.1727G>C, c.2002C>T
9	Bez nálezu
10	Bez nálezu
11	c.224G>A
12	c.1521_1523delCTT
13	Bez nálezu
14	c.1521_1523delCTT
15	c.350G>A
16	c.224G>A
17	c.1521_1523delCTT
18	Bez nálezu
19	Bez nálezu
20	Bez nálezu
21	Bez nálezu

22	c.1521_1523delCTT
23	Bez nálezu
24	Bez nálezu
25	Bez nálezu
26	c.1521_1523delCTT, c.1727G>C/c.2002C>T
27	c.54-5940_273+10250del21kb, c.874G>T/c.2126G>A
28	c.443T>C
29	c.2215G>A
30	Bez nálezu

#### 5. 4 Validace metody

K validaci soupravy CFTR MASTR Dx byl využit sekvenátor MiSeq. Verifikace byla provedena pomocí validačního programu společnosti Sophia Genetics. Vyhodnocené vzorky s genetickými variantami byly vyšetřeny a ověřeny Sangerovým sekvenováním ve FN Motol v laboratoři ÚBLG. Analyzovali jsme 26 vzorků organizovaných do dvou běhů po 13.

Všechny identifikované varianty byly ověřeny a nebyly nalezeny žádné patogenní varianty, které nebyly detekovány v laboratoři ÚBLG.

##### Výkonnostní charakteristiky postupu vyšetření

##### **Specifičnost**

Definice: specifičnost měření je pravděpodobnost negativního výsledku testu v případě nepřítomnosti hledané varianty testovaného znaku. Je vyjádřena jako poměr mezi správnou negativitou (True Negativity TN) a součtem správné negativity a falešné positivity (False Positivity FP) dle vzorce:  $TN/(TN+FP)$ . Výsledná hodnota je vyjádřena jako relativní číslo, jehož hodnota se pohybuje v rozmezí 0-1. V ideálním případě se blíží jedné.

U všech vzorků byl genotyp správně určen a specifičnost se rovná 1.

##### **Citlivost**

Definice: citlivost je pravděpodobnost pozitivního výsledku testu v případě přítomnosti hledané varianty testovaného znaku. Je vyjadřována jako poměr mezi správnou pozitivitou (True Positivity TP) a součtem správné positivity a falešné negativity (False Negativity FN) dle vzorce:  $TP/(TP+FN)$ . Výsledná hodnota je vyjádřena jako relativní číslo, jehož hodnota se pohybuje v rozmezí 0-1. V ideálním případě se blíží jedné.

U všech vzorků byl genotyp správně určen a citlivost se rovná 1.



**Preciznost**

Definice: vzájemné porovnávání výsledků mezi sériemi – např. v různých dnech.

U opakovaných měření vzorků byl detekován stejný genotyp.

**Robustnost**

Definice: robustností ověřujeme vnímavost metody na případné odchylky od optimálních podmínek jejího provádění nebo za různých podmínek (např. různí pracovníci, matrice vzorku apod.)

Závěr validace: Data poskytnuté ÚBLG laboratoří jsou vysoce kvalitní, dosahují 100% specifčnosti, 100% citlivosti a 100% preciznosti. Na základě těchto výsledků bylo potvrzeno, že požadavky na výkonnost kitu CFTR MASTR Dx pro zamýšlené použití byly splněny.

## 6 Diskuse

Cystická fibróza je onemocnění způsobené mutacemi v *CFTR* genu. Dodnes je dle CFTR databáze známo 2017 mutací. Některé z nich mají kauzální vliv na fenotyp pacienta, jiné jsou asociovány pouze s mírnými projevy onemocnění, a některé jsou označovány pouze jako polymorfní varianty bez vlivu na funkci CFTR genu. Zastoupení jednotlivých mutací vykazuje velkou variabilitu. Můžeme nalézt mutaci v homozygotním stavu nebo dvě mutace v heterozygotním stavu. Můžeme však nalézt i tzv. složeného heterozygota, kdy se na jednom chromozomu vyskytuje komplexní alela (dvě heterozygotní mutace ve fázi cis) a na druhém chromozomu se vyskytuje heterozygot pro jinou variantu. V případě takového nálezu je nutné ověření fáze mutací vyšetřením rodičů.

### 6.1 Kauzální mutace

Mutace W57G (c.169T>G), u které dochází k záměně trypsinu za glycin, se nachází v exonu 3 a byla detekována u pacienta ze severní Itálie (Brancolini et al. 1995). Četnost této mutace v populaci není příliš vysoká a v literatuře není doposud podrobně popsána. Předpokládá se však, že by mohla přispívat k patologickému fenotypu cystické fibrózy (Brancolini et al. 1995). U jednoho pacienta ze souboru byla tato mutace nalezena spolu s 5T variantou. Tato kombinace by mohla mít vliv na onemocnění CF.

Bozon et al. (1994) detekovali variantu I148T (c.443T>C), u které dochází k záměně izoleucinu na treonin. Předpokládá se, že výskyt této varianty nemá vliv na správnou funkci genu. Není však zcela vyloučené, že nemůže ovlivňovat jeho další funkce, jako správné fungování sodných kanálů. V případě, že se mutace I148T vyskytuje v heterozygotním stavu spolu s další mutací, může pak dojít k ovlivnění fenotypu pacienta (Rohlf's et al. 2002). Tato mutace byla detekována u 2 pacientů z vybraného souboru. Ani u jednoho pacienta však nebyla nalezena další mutace. Z toho důvodu nemůžeme potvrdit ani vyloučit vliv této mutace na pacientův fenotyp.

Mutace G576A (c.1727G>C) byla původně popsána jako neutrální varianta (Pagani et al. 2003) Pozdější výzkumy však spojovaly tuto mutaci s mírnou formou spojovanou CBAVD (congenital bilateral absence of vas deferens) (Grangeia et al. 2007). Tuto mutaci nalézáme často v kombinaci s další mírnou mutací R668C (c.2002C>T). Často se tyto dvě mutace vyskytují v pozici cis jako komplexní alela. Dle současných znalostí jsou však tyto mutace hodnoceny jako nezpůsobující CF onemocnění. Tuto kombinaci mutací jsem v práci zaznamenala u dvou pacientů. V jednom případě jako 2 heterozygotní mutace v pozici trans. U druhého pacienta byly mutace detekovány ve fázi cis kombinací s kauzální mutací F508del

(c.1521\_1523delCTT). I přes tuto kombinaci bude však většina lidí bez fenotypového projevu, a jen u malého počtu se mohou projevit velmi mírné symptomy CF.

R75Q (c.274G>A) je mutace, která vede k záměně bazí guaninu za adenin, což působí záměnu aminokyselin argininu na glutamin v exonu 3. Dle databáze CFTR2 není považována za kauzální mutaci. Spolu s kauzální mutací může vyvolávat mírné formy CF nebo CFTR příbuzné onemocnění, jako například chronické pankreatitidy (LaRush et al. 2014). U pacientů s nálezem této mutace bych doporučila vyšetření pokrevních příbuzných pro zajištění primární prevence onemocnění. Případně vyšetření genů, jejichž mutace vyvolávají podobné onemocnění cystické fibróze.

U jednoho z pacientů byly detekovány dvě mutace v pozici cis (komplexní alela), a to E292X (c.874G>T), která vede k tvorbě STOP kodonu (nonsense mutace) a je považována za patogenní. Druhá mutace R709Q (c.2126G>A) je predikčními programy (MutationTaster, PolyPhen) a v databázi HGMD hodnocena jako pravděpodobně patogenní. Další mutace, která byla detekována u tohoto pacienta je mutace CFTR dele2,3 (c.54-5940 273+10250del21kb). Jde o rozsáhlou delecii, která vede ke ztrátě exonu 2 a 3 v *CFTR* mRNA a jedná se o poměrně rozšířenou mutaci slovanského typu (Dörk et al. 2000). Tento pacient je tedy složený heterozygot pro mutaci CFTR dele 2,3(21kb) a komplexní alely E292X/R709Q genu *CFTR*. Tento fenotyp je patologický a pacient trpí cystickou fibrózou. Na základě tohoto nálezu byli vyšetřeni oba rodiče, kdy u matky byla detekována komplexní alela E292X/R709Q a u otce mutace CFTR dele 2,3(21kb). Oba rodiče jsou tedy zdravými přenašeči těchto mutací *CFTR* genu. Riziko přenosu v případě další gravidity je 25 %. Na základě výsledku molekulárně genetického vyšetření bych doporučila partnerům v případě další gravidity prenatální diagnostiku cystické fibrózy. Z důvodu zajištění primární prevence cystické fibrózy bych dále doporučila molekulárně genetické vyšetření mutace CFTR dele 2,3(21kb) a komplexní alely E292X/R709Q u pokrevních příbuzných obou rodičů probanda.

Pomocí komerčního kitu Elucigen CF-EU2 byla detekována u jednoho z pacientů mutace 2347delG (c.2215delG) v heterozygotním stavu. Sekvenací pomocí kitu CFTR MASTR Dx na platformě Illumina a následným ověřením Sangerovým sekvenováním se tento nález však nepotvrdil, ale byla nalezena varianta V739I (c.2215G>A) v heterozygotním stavu, při které dochází k záměně valinu za izoleucin. Tato mutace není prozatím popsána v žádné databázi a predikční programy (PolyPhen a SIFT) ji hodnotí jako benigní variantu (s ohledem na podobnost fyzikálně-chemických vlastností valinu a izoleucinu). Tento případ poukazuje na důležitost cíleného ověření nelezene mutace. I přesto, že jsou metody detekce mutací *CFTR* genu velmi spolehlivé, může dojít k chybné analýze. Ověřením mutace druhou

nezávislou metodou pak můžeme předcházet chybné interpretaci daného nálezu. Vzhledem k tomu, že se jednoznačně nedá určit patogenita dané mutace, doporučila bych molekulárně genetické vyšetření také partnerky probanda, z důvodu prevence onemocnění u případných potomků.

## 6. 2 Tiché a polymorfni mutace

Mezi poměrně rozšířené tiché mutace patří c.2562T>G a c.4389G>A. Jedná se o záměnu nukleotidů, která nevede ke změně aminokyselin. Obě tyto varianty byly detekovány téměř u všech vyšetřených pacientů a nemají žádný vliv na projev onemocnění CF.

V *CFTR* genu na hranici intronu 8 a exonu 9 leží úsek označovaný jako polythimidinový trakt (Poly – T). Může být tvořen 5, 7 nebo 9T zbytky, po nichž následuje 10 - 13 TG opakování (Millson et al. 2005). Účinnost m-RNA sestřihu exonu 9 určuje počet tymidinů. Kratší úsek Poly – T traktu tak snižuje účinnost sestřihu (Chu et al. 1993). V kombinaci s jinou mutací na druhé alele se může fenotypově projevit jako mírná forma CF. Kombinace poly – T traktu a různý počet TG opakování se také může projevit na sestřihu exonu 9. Groman et al. (2004) prováděli experimenty, které dokazovaly, že kombinací kratšího traktu Poly – T (5T) a většího počtu TG opakování (12 – 13 TG) může vést k abnormálnímu fenotypu CF. V mé studii byl u jednoho pacienta detekován polymorfismus 5T s TG13 opakováním spolu s variantou c.224G>A (R75Q). Tato varianta není dle databáze CFTR2 považována za patogenní. Spolu s detekovaným polymorfismem by však mohli způsobovat mírné projevy CF.

U většiny pacientů v souboru byla detekována polymorfni mutace c.1408G>A. Tato varianta by však, dle současných poznatků, neměla mít vliv na fenotyp CF.

## 6. 3 Chybovost NGS technologie

Jedním z největších problémů, se kterým se v praxi můžeme setkat, je chybovost masivně paralelního sekvenování. U většiny dostupných platforem NGS se vykazuje vyšší chybovost v porovnání se Sangerovým sekvenováním. Můžeme rozlišit dva typy chyb, přičemž první vychází z chybovosti DNA polymerázy a druhý typ je specifický pro konkrétní technologii. V případě technologie Illumina jsou hlavním zdrojem chyb substituce a celková chybovost platformy je přibližně 0,1 %. (Lee et al. 2013).

Nejvíce problémů při sekvenaci způsobuje sekvenátorům pravděpodobně čtení v homopolymerních oblastech (De Leener et al. 2011). Tato chybovost bývá kompenzována mnohonásobným pokrytím čtených úseků (coverage). Optimálně by se hodnota pokrytí měla

pohybovat mezi 50 – 100 krát, dle interních nastavení laboratoří. Za správné považujeme i hodnotu coverage do 30 krát. U všech detekovaných pacientů v mé práci bylo pokrytí čteného úseku vždy vyšší než 40 krát. Výjimkou však bylo čtení polymorfních úseků Poly – T, kde coverage vůbec nebyla stanovena. Je možné, že některé změny v homopolymerních oblastech mohly být chybně stanoveny a při interpretaci výsledků je třeba brát na tento fakt ohled.

U pacienta číslo 29 byla dle klasických metod detekována kauzální mutace 2347delG, sekvenací na platformě miseq Illumina byla tato mutace vyhodnocena jako substituční záměna G za A. Další odlišnost byla nalezena u pacienta číslo 27, kdy klasickými metodami byla zachycena kauzální mutace CFTRdele 2,3 + 21kb, která však sekvenátorem MiSeq nebyla detekována. Důvodem může být chybné nasednutí primerů na daný úsek DNA, a tím může dojít k vynechání mutace ležící v této oblasti a následně k chybné interpretaci výsledků.

## **6. 4 Porovnání klasického sekvenování s platformou NGS**

Technologie sekvenování nové generace se v dnešní době rychle vyvíjí. Novější metody nám často přinášejí zvýšení efektivity analýzy z hlediska rychlosti, přesnosti a v neposlední řadě i nižší cenu za vyšetření. Zaměřila jsem se na porovnání dvou sekvenačních metod, a to Sangerovo sekvenování na přístroji ABI 3130 Genetic Analyzer od firmy Applied Biosystems a sekvenování nové generace na přístroji MiSeq od firmy Illumina, kit CFTR MASTR Dx.

V prvním bodě jsem porovnávala finanční hledisko obou sekvenčních metod. Pořizovací cena sekvenátoru MiSeq od firmy Illumina činí 3 125 000 Kč. Cena jednoho runu vychází přibližně na 50 000 Kč. Za předpokladu, že 1 run zahrnuje 16 pacientů, analýza *CFTR* genu pro jednoho pacienta vychází na 3125 Kč. Pořizovací cena přístroje 3130 Genetic Analyzer od společnosti Applied Biosystems, který je určen pro klasické Sangerovo sekvenování je přibližně 3 640 000 Kč. Cena za analýzu všech 27 exonů *CFTR* genu pro 16 pacientů vychází na 274 000 Kč. Cena analýzy pro jednoho pacienta tedy činí 17 125 Kč. Srovnáním obou metod můžeme říct, že sekvenování pomocí Sangera je 5,5 násobně vyšší než sekvenování pomocí platformy Illumina.

Porovnání sekvenčních metod z hlediska časové náročnosti vychází následovně. Celkovou dobu trvání analýzy jsem počítala za ideálních podmínek, kdy je všech 27 exonů sekvenováno najednou a žádnou sekvenaci nemusíme opakovat. Příprava PCR reakce s následnou amplifikací trvá přibližně 3 hodiny. PCR produkt se ověřuje na gelu, což zabere 0,5 hodiny. První purifikace DNA trvá zhruba 1,5 hodiny. Příprava sekvenační reakce s následnou vlastní sekvenací zabere 3,5 hodiny. Následná druhá purifikace a vysušení vzorků

trvá asi 3 hodiny. Analýza sekvencí na přístroji 3130 Genetic Analyzer pro všech 27 exonů *CFTR* genu trvá cca 2 hodiny. Celkem nám tedy sekvenace dle Sangera pro jednoho pacienta zabere přibližně 14 hodin. V případě, že bychom sekvenovali 16 pacientů, přičemž by byl každý pacient sekvenován zvlášť, trvala by analýza klasickou metodou sekvenování zhruba 224 hodin. Pomocí platformy Illumina, na přístroji MiSeq, se celková doba sekvenace výrazně sníží díky tomu, že v rámci jednoho runu sekvenujeme celý gen pro všech 16 pacientů najednou. Příprava PCR reakce s následnou amplifikací zabere asi 4,5 hodin. Obohacení kuliček trvá přibližně 4 hodiny, sekvence dat trvá asi 4 a následná sekvenční analýza trvá zhruba 10 hodin. Celkový čas pro 16 pacientů zabere asi 22,5 hodin. V praxi pak analýza trvá přibližně 1 týden. Dobu analýzy však nejde vypočítat pouze na základě sečtení časů jednotlivých úkonů. Je třeba zohlednit vytížení laboratoře, počet vzorků, které je možné analyzovat současně a nesmíme opomenout ani lidský faktor, který neumožňuje nepřetržitou práci bez zastavení. Můžeme však jednoznačně říci, že použitím NGS se doba analýzy pro 16 pacientů výrazně zkrátí.

Co se týče přesnosti platformy Illumina, je přesnost vyšší než 99%. Během jednoho runu je možné vygenerovat až 35 milionů bazí o délce 250 bp. Za nevýhody této platformy považují chybovost, a to hlavně v homopolymerních oblastech. Chybovost této platformy se udává 0,1%. Klasická metoda sekvenování se v tomto případě považuje za spolehlivější. Přesnost metody je 99,99%.

Z uvedeného porovnání můžeme vyvodit, že pořizovací cena Mi Seq je 0,8 krát levnější než analyzátor 3130 Genetic Analyzer. Provozní náklady klasického sekvenování je 5,5 krát vyšší. Časová náročnost je u platformy nové generace poměrně nižší. Z tohoto porovnání je zřejmé, že NGS je pro laboratoře poměrně výhodnou metodou. Chybovost homopolymerních oblastí u NGS metod je řešena ověřením případných nálezů varianty klasickým Sangerovým sekvenováním.

## **6. 5 Návrh dalšího algoritmu vyšetření**

I přes využití nejnovějších a poměrně spolehlivých NGS metod, kterými jsme osekvenovali všech 27 exonů *CFTR* genu, se u některých pacientů z vybraného souboru, kteří vykazují fenotyp cystické fibrózy, nepodařilo odhalit žádnou mutaci v *CFTR* genu. Důvodem může být výskyt mutací v intronové oblasti genu *CFTR*. V roce 2016 Venonica Felício et al publikovali krátký report, ve kterém popisují poměrně rychlou a levnou metodu pro identifikaci *CFTR* mutací v celé kódující oblasti a intronových regionech. Metoda je založena na 9 RT-PCR reakcí, jejichž primery pokrývají celý gen *CFTR*. Amplifikované produkty jsou

pak analyzované na agarozovém gelu. Jde o poměrně levnou metodu, která by mohla sloužit jako rutinní diagnostika *CFTR* genu.

U pacientů, s fenotypem CF bez nálezů kauzální mutace v *CFTR* genu je šance na objasnění jejich onemocnění na molekulární úrovni analýzou tzv. *CFTR* - like genů. V tomto případě bych přistoupila k sestavení panelu genu spojených s onemocněním CF. Souvislosti daného fenotypu by se u případných nálezů v jiném genu konzultovaly s klinickým genetikem a hodnotily pomocí databáze OMIM, NCBI případně dalších užitečných databází a softwarů.

## **ZÁVĚR**

V rámci této práce jsem analyzovala 30 pacientů pomocí NGS, platformou Illumina na přístroji MiSeq. Předpokládala jsem, že touto analýzou budou detekovány mutace v *CFTR* genu a bude potvrzena molekulárně genetická podstata onemocnění CF. Dvě kauzální mutace v genu byly však detekovány pouze u jednoho pacienta. U tohoto jediného pacienta jsme mohli na základě molekulárně genetické analýzy potvrdit onemocnění CF. U dalších dvou pacientů jsme detekovali 2 mutace v *CFTR* genu v heterozygotním stavu. Ty jsou však dle odborné literatury popisovány jako nezpůsobující onemocnění CF. U šesti pacientů jsme detekovali pouze jednu mutaci v heterozygotním stavu a u dalších pacientů jsme detekovali pouze několik frekventovaných polymorfizmů nebo tichých mutací, které by dle současných poznatků neměly mít vliv na fenotyp onemocnění. V důsledku toho, že u většiny pacientů nebyla odhalena příčina onemocnění, bych se v budoucnu ráda dále věnovala studiím tzv. *CFTR* like - genů, které by mohly odhalit molekulárně genetickou podstatu onemocnění u pacientů, kteří vykazují fenotyp podobný cystické fibróze, ale nemají prokázané kauzální mutace v *CFTR* genu.

## 7 Souhrn

- Požadavky na výkonnost kitu CFTR MASTR Dx (Multiplicom) pro zamýšlené účely byly splněny a kit byl úspěšně validován.
- V současné době se nám nepodařilo metodu NGS zařadit do algoritmu diagnostických vyšetření *CFTR* genu. Důvodem je nutné splnění doby odezvy vzorků v akreditované diagnostické laboratoři FN Motol. Není tedy možné vyčkat s vyšetřením pacientů do té doby, než bude naplněna kapacita počtu vzorků pro sekvenování na přístroji MiSeq.
- U vybraného souboru pacientů, bez molekulárně genetického nálezu, jsem provedla analýzu *CFTR* genu s použitím kitu Eluigene CF-EU2, což představuje detekci 92,8 % všech mutací v *CFTR* genu. Následně jsem za pomoci metody MLPA vyloučila rozsáhlé delece či duplikace *CFTR* genu.
- Využitím sekvenování nové generace, na platformě Illumina, kitem CFTR MASTR Dx (Multiplicom), jsem detekovala varianty, které nebyly zachyceny předešlými metodami. U většiny pacientů byla však mutace detekována pouze v heterozygotním stavu nebo nebyla odhalena žádná.
- Patogenitu nalezených variant jsem zhodnotila dle současných poznatků, databází a predikčních programů. Byla však nalezena varianta, která doposud není popsána v žádné *CFTR* databázi. Tato varianta je proto klasifikována jako varianta nejasného klinického významu.
- Veškeré nalezené varianty byly potvrzeny Sangerovým sekvenováním.
- Metody nové generace v porovnání se Sangerovým sekvenováním se zdají být z hlediska ceny a časové náročnosti výhodnější. Existují však limity, které vedou k falešně pozitivním či falešně negativním výsledkům. Ačkoli technologie NGS postupuje stále vpřed a je snaha o překonání těchto limitů, zůstává Sangerovo sekvenování nadále velmi spolehlivou a důležitou metodou v molekulárně genetické diagnostice.
- U pacientů vykazujících fenotyp CF a bez nálezu mutací v *CFTR* genu bych navrhovala provést další studie zaměřené na analýzu celé kódující oblasti *CFTR* genu pomocí RT – PCR. Dále navržení panelu genů, jejichž mutace mohou vyvolat fenotyp podobný onemocnění cystickou fibrózou.



## 8 Seznam použité literatury

- Alton, E.W., Currie, D., Logan-Sinclair, R., Warner, J.O., Hodson, M.E., Geddes, D.M. (1990): Nasal potential difference: A clinical diagnostic test for Cystic Fibrosis. *The European Respiratory Journal*, 3: 922 – 6.
- Ahrens, R.C., D., Standaert, T.A., Launspach, J., Han, S.H., Teresi, M.E., Aitken, M.L., Kelley, T.J., Hilliard, K.A., Milgram, L.J., Konstan, M.W., Weatherly, M.R., McCarty, N.A. (2002): Use of nasal potential difference and sweat chloride as outcome measures in multicenter clinical trials in subjects with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 33: 142 – 150.
- Balašáková, M., Piskáčková, T., Holubová, A., Raušová, E., Kazáková, V., Krebsová, A., Koudová, M., Štrambergová A., Čamajová, J., Norambuena, P., et al. (2008): Současné metodické postupy a přehled preimplantační, prenatalní a postnatalní DNA diagnostiky cystické fibrózy v České republice. *Československá Pediatrie*, 63: 62-75.
- Balašáková, M., Holubová, A., Skalická, V., Zemková, D., Kračmar, P., Gonsorčíková, L., Čamajová, J., Piskáčková, T., Lebl, J., Dřevínek, P., et al. (2009): Pilot newborn screening project for Cystic Fibrosis in the Czech Republic: sfing role of the delay in its symptomatic diagnosis and influence of ultrasound – based prenatal diagnosis on the incidence of the disease. *Journal of Cystic Fibrosis*, 8: 224 – 227.
- Bobadilla, J.L., Macek, M. Jr, Fine, J.P., Farrell, P.M., et al. (2002): Cystic fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations – Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human mutation*, 19: 575 – 606.
- Bozon, D., Zielenski, J., Rininsland, F., Tsui, L.C. (1994): Identification of four new mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: I148T, L1077P, Y1092X, 2183AA>G. *Human mutation*, 3: 330-332.
- Brancolini, V., Cremonesi, L., Belloni E., Pappalardo, E., Bordoni, R., Russo, S., Padoan, R., Giunta, A., Ferrari, M. (1995): Search for mutations in pancreatic sufficient cystic fibrosis Italian patients: detection of 90% of molecular defects and identification of three novel mutations. *Human Genetics*, 96: 312-318.
- Bush, A., Alton, E.W.F.W., Davies, J.C., Griesenbach, U., Jaffe, A. (2006): Cystic Fibrosis in the 21 st Century. Karger 341s. ISBN: 1422-2140.
- Castellani, C., Cuppens, H., Macek, M. Jr, Cassiman, J.J., Kerem, E., Duric, P., Tullis, E., Assael, B.M., Bombieri, C., Brown, A., et al. (2008): Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis station analysis in clinical practice. *Journal of Cystic fibrosis*, 7: 179 – 196.
- Croucher, N.J., Fookes, M.C., Perkins, T.T., Turner, D.J., Marquerat, S.B., Keane, T., Quail, M.A., He, M., Assefa, S., Bähler, J., et al. (2009): A simple method for directional transcriptome sequencing using Illumina technology. *Nucleic Acids Research*, 37: e148.
- De Leener, K., Schrijver, J., Clement, L., Baetens, M., Lefever, S., Keulenaer, S., Crieckinge, W., Deforce, D., Nieuwerburgh, F., Bekaert, S., et al. (2011): Practical tools to implement massive parallel pyrosequencing of PCR products in next generation molecular diagnostics. *PLoS ONE*. 6: e25531.
- Dörk, T., Macek, M. Jr, Mekus F., Tümmler, B., Tzountzouris, J., Casals, T., Krebsová, A., Koudová, M., Sakmaryová, I., Macek, M. Sr, et al. (2000): Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Human Genetics*, 106: 259-268.
- Farrel, P.M. (2008): The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *Journal of Cystic fibrosis*, 7: 450 – 453.
- Felício, V., Ramalho, A., Igreja, S., Amaral, M. (2016): mRNA based Detection of Rare CFTR Mutations Improves Genetic Diagnosis of Cystic Fibrosis in Populations with High Genetic Heterogeneity. *Clinical Genetics*, 91: 476 – 481.

- Ferec, C., Cutting, G.R.** (2012): Assessing the Disease – Liability of Mutations in CFTR. *Cold Spring Harbor Laboratory Perspectives in Medicine*, 2: 009480.
- Fila, L.** (2014): Cystická fibróza u dospělých. *Interní medicína v praxi*, 16: 54 – 60.
- Grangeia, A., Sá, R., Carvalho, F., Martin, J., Girodon, E., Silva, J., Ferráz, L., Barros, A., Sousa, M.** (2007): Molecular characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in congenital absence of the vas deferens. *Genetics in Medicine* 9: 163–172.
- Groman, J.D., Hefferon, T.W., Casals, T., Bassas, L., Estivill, X., Des Georges, M., Guittard, C., Koudova, M., Fallin, M.D., Nemeth, K., et al.** (2004): Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *The American Journal of Human Genetics*, 74: 176-179.
- Gužvic, M.** (2013): The History of DNA sequencing. *Journal of Medical Biochemistry*, 32: 301 – 312.
- Heatler, J.M., Chain, B.** (2015): The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107: 5(1- 8).
- Hutchinson, C.A.** (2007): DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research*, 35: 6227 – 6237.
- Chu, C.S., Trapnell, B.C., Curristin, S., Cutting, G.R., Crystal, R.G.** (1993): Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature Genetics*, 3: 151-156.
- Karger, B.L., Guttman, A.** (2009): DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis*, 30:196 – 202.
- Koch, CH., Hoiby, N.** (2000): Diagnosis and Treatment of Cystic Fibrosis. *Respiration*, 67: 239-247.
- Koubková, L., Vojtěšek, B., Vyzula, R.** (2014): Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klinická Onkologie*, 27: 61 – 68.
- Krulišová, V., Balašáková, M., Skalická, V., Piskáčková, T., Holubová, A., Paděrová, J., Křenková, P., Dvořáková, L., Zemková, D., Kračmar, P., et al.** (2012): Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and /PAP/DNA. *European Journal of Pediatrics*, 171: 1223-1229.
- Křenková, P., Piskáčková, T., Holubová, A., Balašáková, M., Krulišová, V., Čamajová, J., Turnovec, M., Libík, M., Norambuena, P., Štrambergová, A., et al.** (2013): Distribution of CFTR mutations in the Czech population: Positive impact of integrated clinical and laboratory expertise detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *Journal of Cystic fibrosis* 12: 532-537.
- LaRush, J., Jung, J., General, I.J., Lewis, M.D., Park, H.W., Brand, R.E., Gelrud, A., Anderson, M.A., Banks, P.A., Conwell, D., et al.** (2014): Mechanisms of CFTR functional variants that impair regulated bicarbonate permeation and increase risk for pancreatitis but not for cystic fibrosis. *PLoS Genet*, 10: 1004778.
- Lee, CH., Chiu, Y., Wang, L., Kuo, Y., Chuang, E., Lai, L., Tsai, M.** (2013): Common applications of next-generation sequencing technologies in genomic research. *Translational Cancer Research*, 2: 33-45.
- Littlewood, J.M.** (1986): The sweat test. *Archives Disease in Childhood*, 61:1041-1043.
- Millson, A., Pont-Kingdon, G., Page, S., Lyon, E.** (2005): Direct molecular haplotyping of the IVS-8 poly(TG) and polyT repeat tracts in the cystic fibrosis gene by melting curve analysis of hybridization probes. *Clinical Chemistry*, 51:1619-1623.
- Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., Nunes, V., Casals, T., Giménez, J., Reis, A., Varon-Mateeva, R., Macek, M. Jr, Kalaydjieva, L., et al.** (1994): The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nature Genetics*, 7: 169 – 175.

- Pagani, F., Stuani, C., Tzetis, M., Kanavakis, E., Efthymiadou, A., Doudounakis, S., Casals T., Baralle F.E.** (2003): New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Human Molecular Genetics*, 12: 1111–1120.
- Pettersson, E., Lundeberg, J., Ahmadian, A.** (2009): Generations of sequencing technologies. *Genomics*, 93: 105 – 111.
- Pohunek, P., Lebl, J.** (2008): Historie cystické fibrózy v České republice. *Československá Pediatrie*, 2: 59-61.
- Reinert, K., Huson, D.H.** (2008): Bioinformatics Support for Genome. Sequencing Project Bioinformatics. *Genome to Therapies*, 1: 25 – 56.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N. Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., et al.** (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245: 1066-1073.
- Rohlf, E.M., Zhou, Z., Sugarman, E.A., Heim, R.A., Pace, R.G., Knowles, M.R., Silverman, L.M, Allitto, B.A.** (2002): The I148T CFTR allele occurs on multiple haplotypes: a complex allele is associated with cystic fibrosis. *Genetics in Medicine*, 4: 319-323.
- Rosenstein, B.J., Cutting, G.R.,** (2008): The Diagnosis of Cystic Fibrosis: a konsensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *Journal of Pediatrics*, 132: 589 – 595.
- Rothberg, J.M., Leamon, J.H.** (2008): The development and impact of 454 sequencing. *Nature Biotechnology*, 26: 1117 – 1124.
- Shendure, J., Hanlee, J.** (2008): Next generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26: 1135 – 1145.
- Sheppard, D.N., Welsch, M.J.** (1999): Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews*, 79: 23-45.
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., Hajibabaei, M.** (2012): Next generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21: 1794 – 1805.
- Skalická, V.** (2014): Terapeutické trendy cystické fibrózy. *Pediatric v praxi*, 15(6): 340 – 343.
- Southern, K.W., Munck, A., Pollitt, R., Travert, G., Zanolta, L., Dankert-Roelse, J., Castellani, C.** (2007): A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *Journal of Cystic Fibrosis*, 6: 57 – 65.
- Tucker, T., Marra, M., Friedman, J.M.** (2009): Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. *Human Genetics*, 85: 142 – 154.
- Vávrová, V. et al.** (2006): Cystická fibróza. Grada Publishing a.s, 516 s. ISBN: 80-247-0531-1.
- Vávrová, V., Bartošová, J. a kolektiv CF centra FN Motol** (2009): Cystická fibróza, příručka pro nemocné a jejich rodiče, druhé rozšířené vydání. Professional Publishing. 165 s. ISBN 978-80-7431-000-3.
- Votava, F., Kožich, V., Chrastina, P., Pěšková, K., Adam, T., Friedecký, D., Hlídková E., Vinohradská, H., Dejmek P., Krulišová, V., et al.** (2014): Výsledky rozšířeného novorozeneckého screeningu v České republice. *Československá Pediatrie*, 69: 77–86.
- Wallis, C.** (1997): Diagnosing Cystic Fibrosis: blood, sweat and tears. *Archives of disease in childhood*, 76:85-91.
- Watson, J.D., Crick, F.H.C.** (1953): A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171: 737 – 738.
- Welsh, M.J., Smith, A., E.** (1993): Molecular Mechanisms of CFTR Chloride Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis. *Cell*, 73: 1251–1254

**Zielenski, J.** (2000): Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Respiration*, 67:117–133.

**Zhou, X., Ren, L., Meng, Q., Li, Y., Yu, Y., Yu, J.** (2010): The next generation sequencing technology and application. *Protein Cell*, 6: 520–536.