Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat přehled o genové konverzi, její roli v patogenezi lidských onemocnění a zhodnotit využití metod založených na sekvenování nové generace (NGS) pro detekci vzácných změn sekvence DNA. Jedná se o pilotní studii využití NGS pro detekci bodových mutací vznikajících *de novo* v genu pro β-glukocerebrosidasu genovou konverzí mezi ním a jeho pseudogenem v meiotických a mitotických buňkách kontrolních osob. Primery specifické pro aktivní gen byly použity pro selektivní amplifikaci úseku devátého a desátého exonu genu, kde se „rekombinantní" změny vyskytují nejčastěji. Byla využita metoda značení cílových molekul DNA pomocí náhodných sekvencí v primeru.

Bioinformatickým zpracováním byly detekovány bodové mutace v sekvencích získaných z 20 vzorků genomové DNA na platformě Illumina MiSeq. Sekvence byly filtrovány, tříděny podle unikátního značení jednotlivých molekul DNA a byly vytvořeny alignmenty těchto sekvencí. Softwarovou detekcí se záměrně nestriktními kritérii bylo v jednotlivých vzorcích nalezeno 12-48 potenciálních bodových mutací, které byly následně ověřovány přehodnocením alignmentů sekvencí nesoucích shodnou značící sekvenci. Počet alignmentů s unikátním značením byl v rozmezí 7-15 tisíc na vzorek. Ve třech vzorcích byly nalezeny v genu pro β-glukocerebrosidasu mutace potenciálně vzniklé genovou konverzí, což svědčí pro nižší frekvenci, než jaká byla detekována staršími metodami. Analýza značících sekvencí v primeru naznačuje možné způsoby zlepšení citlivosti metody.

Dalším cílem bylo testování metod přípravy templátu pro NGS pomocí obohacování konvertovaných sekvencí. Jednalo se o metodu založenou na principu zámkových sond, mutačně specifického PCR a izotermické amplifikace zprostředkované smyčkou. Při aplikaci na lidskou genomovou DNA tyto metody však nevedly k získání dostatečného množství kvalitního templátu pro NGS.

Klíčová slova: genová konverze, gen pro β-glukocerebrosidasu, pseudogen pro β-glukocerebrosidasu, sekvenování nové generace, bodová mutace