

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

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



Bc. Jana Moravíková

**MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ PŘÍČINY VÝVOJOVÝCH ONEMOCNĚNÍ PŘEDNÍHO
SEGMENTU OKA**

Anterior segment dysgenesis disorders and their molecular genetic cause

Diplomová práce

Školitel: doc. MUDr. Petra Lišková, M.D., Ph.D.

Školitel specialista: Ing. Ľubica Ďudáková, Ph.D.

Praha, 2018

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, 25. dubna 2018

.....
Bc. Jana Moravíková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. MUDr. Petře Liškové, M.D., Ph.D. a své školitelce specialiste Ing. Ľubici Ďud'ákové, Ph.D. za odborné vedení a za čas, který obě věnovaly korekcím a pečlivému vedení celé mé práce. Vážím si všech cenných rad, podnětných připomínek a hlavně trpělivosti. Chtěla bych také poděkovat celému kolektivu Oční kliniky VFN v Praze a kolektivu z Laboratoře pro studium vzácných onemocnění, hlavně ze skupiny oční genetiky, Kliniky dětského a dorostového lékařství, 1. LF UK a VFN za veškerou pomoc při vypracování práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Zbyňku Kozmíkovi, CSc. a celému kolektivu Oddělení transkripční regulace Ústavu molekulární genetiky AV ČR za možnost spolupráce na praktické části diplomové práce.

Práce vznikla za finanční podpory GAUK 82318 – 2018 a SVV 260367/2017.

Abstrakt

V průběhu vývoje oka je klíčová exprese a regulace mnoha genů, přičemž úloha řady z nich, nebyla doposud zcela objasněna. Dysgeneze předního segmentu (DPS) oka jsou geneticky vysoce heterogenní skupinou onemocnění vykazující všechny typy Mendelovské dědičnosti, které se projevují jako variabilní kombinace vrozeného postižení rohovky, duhovky, komorového úhlu anebo čočky. Běžně prováděné testování kódujících úseků známých genů asociovaných s DPS, nevede k nalezení kauzální mutace u více než poloviny probandů. Lze se tedy domnívat, že existují dosud nepopsané příčinné varianty anebo geny.

Molekulárně genetické vyšetření 12 českých probandů s DPS oka zahrnovalo analýzu přímým a celoexomovým sekvenováním. U mutací potenciálně narušující sestřih jsme provedli funkční analýzy pomocí metody Exon trappingu.

U 4 probandů jsme našli v heterozygotním stavu 4 mutace v genu *PAX6* c.183C>G; p.(Tyr61*), c.1032+1G>A, c.1183+1G>T a c.622C>T; p.(Arg208Trp). Další probandka byla složeným heterozygotem v genu *FOXE3* pro mutace c.244A>G; p.(Met82Val) a c.541delG; p.(Glu181Lysfs*26). U 7 probandů nebyly ve známých genech asociovaných s výskytem DPS detekovány žádné potenciálně patogenní varianty. Metodou Exon trappingu jsme prokázali, že mutace c.1032+1G>A a c.1183+1G>T narušují sestřih *PAX6*.

Podrobná molekulárně genetická vyšetření pacientů s DPS mohou přispět k prohloubení znalostí o mechanismech regulace morfogeneze a vývoje předního segmentu oka.

Klíčová slova: dysgeneze předního segmentu oka, aniridie, molekulárně genetická analýza, sekvenování nové generace, Sangerovo sekvenování, aberantní sestřih, funkční analýzy, Exon trapping

Abstract

Proper eye development depends on expression and mutual regulation of many genes. Anterior segment dysgenesis (ASD) are a highly heterogeneous group of diseases exhibiting all types of Mendelian inheritance, which manifest as combination of congenital abnormalities of the cornea, iris, anterior chamber angle or lens. Screening of genes associated with ASD does not often lead to the identification of the underlying genetic cause implying that there are still novel variants or genes to be discovered.

Molecular genetic analysis in 12 probands with ASD using Sanger and whole-exome sequencing were performed. Functional analysis by Exon trapping assay was provided in variants predicted to effect pre-mRNA splicing.

Four *PAX6* mutations evaluated as pathogenic or likely pathogenic in a heterozygous state were found in four probands c.183C>G; p.(Tyr61*), c.1032+1G>A, c.1183+1G>T and c.622C>T; p.(Arg208Trp). One proband was found to be a compound heterozygote for c.244A>G; p.(Met82Val) and c.541delG; p.(Glu181Lysfs*26) mutations in *FOXE3*. In 7 probands, no potentially pathogenic variants were identified. Exon trapping assay confirmed that mutations c.1032+1G>A and c.1183+1G>T have an effect on pre-mRNA splicing of the *PAX6* gene.

Detailed molecular-genetic analysis in patients with ASD may contribute to deepening our knowledge about developmental regulation and morphogenesis of the anterior segment of the eye.

Keywords: Anterior segment dysgenesis, aniridia, molecular-genetics analysis, Sanger sequencing, next-generation sequencing, splicing defects, functional analysis, Exon trapping

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Přehled literatury	10
2.1. Anatomie oka	10
2.1.1. Přední segment oka.....	13
2.2. Vývoj oka.....	14
2.2.2. Geny uplatňující se při vývoji oka.....	16
2.2.2.1. <i>PAX6</i>	17
2.3. Dysgeneze předního segmentu.....	18
2.3.1. Klinický obraz pacientů s dysgenezemi předního segmentu oka	18
2.3.1.1. Axenfeldovo Riegerovo spektrum malformací.....	19
2.3.1.2. Petersova anomálie	20
2.3.1.3. Aniridie	21
2.3.1.4. Kongenitální katarakta	22
2.3.1.5. Sklerokornea	22
2.3.2. Diagnostika pacientů s dysgenezemi předního segmentu	22
2.4. Molekulárně genetické metody použité při diagnostice pacientů.....	26
2.4.1. Sangerovo sekvenování	26
2.4.2. Sekvenování nové generace.....	27
2.4.3. Exon trapping.....	28
3. Cíle práce.....	30
4. Materiál a metody.....	31
4.1. Soubor pacientů.....	31
4.2. Zakreslování rodokmenů.....	31
4.3. Metody izolace DNA	32
4.3.1. Izolace DNA z krve	32
4.3.2. Izolace DNA ze slin.....	33
4.4. Návrh primerů a polymerázová řetězová reakce (PCR)	35
4.5. Elektroforéza PCR produktů.....	37
4.6. Přímé sekvenování dle Sangera	38
4.7. Analýza sekvencí	38
4.8. Celoexomové sekvenování	39

4.9.	Funkční analýzy – Exon trapping	40
4.9.1	Příprava vzorků	40
4.9.2.	Izolace DNA z gelu	41
4.9.3	Klonování	42
4.9.4	Izolace plasmidové DNA	43
4.9.5	Kontrola začlenění inzertu.....	44
4.9.6	Štěpení restrikčními enzymy a ligace.....	45
4.9.7	Klonování Exontrap vektoru spolu s inzertem	47
4.9.8	PCR kontrola	47
4.9.9	Buněčné linie a transfekce.....	48
4.9.10	Transfekce	48
4.9.11	Izolace RNA	49
4.9.12	Příprava cDNA	50
4.9.13	Kontrola transkriptu	50
5.	Výsledky.....	51
5.1.	Nalezené patogenní varianty	51
5.2.	Ověření patogenicity sestříhových variant metodou Exon trappingu	59
6.	Diskuze.....	65
7.	Závěr.....	71
8.	Webové zdroje.....	72
9.	Seznam použité literatury	73
10.	Přílohy.....	79

Seznam zkratek

Zkratka:	Anglický název:	Český význam:
AD	autosomal dominant	autozomálně dominantní
AR	autosomal recessive	autozomálně recesivní
bp	base pair	pár bazí
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
CFU	colony forming units	jednotky tvořící kolonie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Dublekovo modifikované Eagle médium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
FHD	forkhead domain	forkhead doména
FWD	forward	přední
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
HD	homeodomain	homeodoména
HEK	human embryonic kidney cells	lidské embryonální buňky ledviny
HNLS	homeonuclear localization signal	homeonukleární lokalizační signál
MPSS	massively parallel signature sequencing	masivně paralelní čtení
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
MUT	mutant	mutovaná

NCBI	National Center for Biotechnology Information	Národní centrum biotechnologických informací
NMD	nonsense-mediated decay	degradace (mRNA) zprostředkovaná nesmyslnou sekvencí
PBS	phosphate-buffered saline	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
pre-mRNA	precursor messenger RNA	prekurzorová mediátorová RNA
REV	reverse	opačný
RT-PCR	reverse transcription PCR	PCR s reverzní transkripcí
TAE	tris/acetate/EDTA	tris/acetát/EDTA
TBE	tris/borate/EDTA	tris/kyselina boritá/EDTA
TE	tris/EDTA	tris/EDTA
TER	tris/EDTA/RNase	tris/EDTA/RNáza
WAGR	Wilms tumour, aniridia, genitourinary anomalies, and mental retardation	Wilmsův tumor, aniridie, genitourinární anomálie a mentální retardace
WT	wild type	divoká

1. Úvod

Vývoj oka je složitý a dynamický proces, během kterého se uplatňuje velké množství transkripčních faktorů, signálních molekul a receptorů. Během tvorby očního orgánu je tedy klíčová správná exprese a regulace mnoha genů, přičemž úloha řady z nich nebyla doposud zcela objasněna (Zagozewski *et al.*, 2014).

Dysgeneze předního segmentu oka jsou heterogenní skupinou vrozených chorob přední části oka postihující variabilně rohovku včetně limbu, duhovku, komorový úhel anebo čočku. Fenotypové vyjádření onemocnění se může značně lišit i u pacientů nesoucí patogenní varianty ve stejném genu (Ito & Walter, 2014). U více než poloviny pacientů s dysgenézí předního segmentu oka dochází v důsledku poruchy odtoku komorové tekutiny ke vzniku sekundárního glaukomu (zelený zákal), který bývá obtížně léčitelný a nezřídka je příčinou absolutní ztráty zraku (Waring *et al.*, 1975; Quigley & Broman, 2006). Všechny tyto choroby patří do skupiny vzácných onemocnění s prevalencí menší než 5 osob na 10 000 obyvatel (dle prohlášení Evropské komise).

Geny, jejichž mutace vedou k dysgenézím předního segmentu oka, kódují nejčastěji transkripční faktory regulující funkce mnoha dalších genů. Klíčovou roli ve vývoji oka pak hraje transkripční faktor *PAX6* (OMIM *607108) (Burri *et al.*, 1989; Noll, 1993). Dysgeneze předního segmentu oka se mohou prolínat i s jinými klinickými jednotkami např. s anomáliemi sítnice, jinak řečeno mutace v jednom konkrétním genu mohou mít i další fenotypové projevy v jiné části oka (Prokudin *et al.*, 2014).

Sekvenováním kódujících úseků známých genů lze, v závislosti na studované populaci, zjistit příčinné mutace pouze u 41-70 % pacientů s dysgenézemi předního segmentu oka (Sun *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2016). Je tedy zřejmé, že buď existují ještě další, dosud neobjevené geny, anebo se mutace nachází v nekódujících úsecích známých genů, např. v regulačních oblastech.

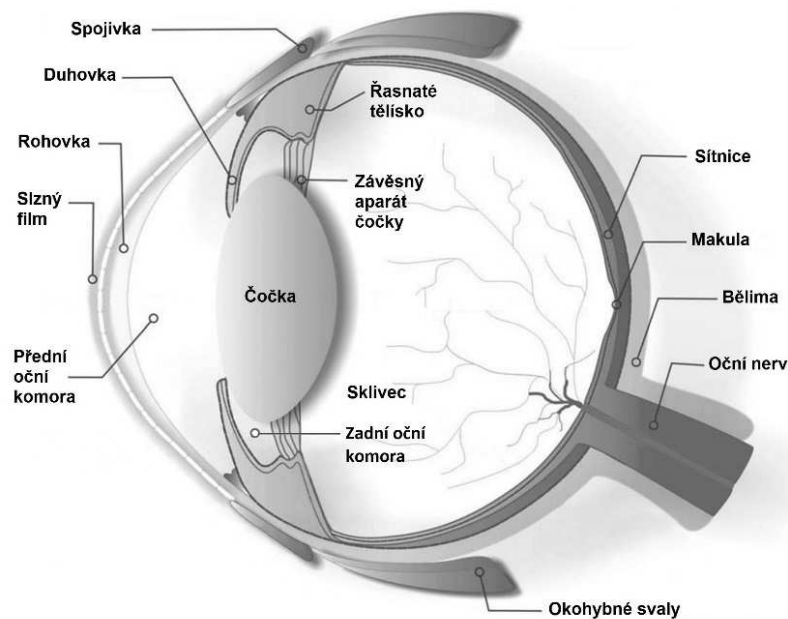
Komplexní molekulárně genetická analýza pacientů s dysgenézemi předního segmentu oka může v konečném důsledku přispět k pochopení složitých dějů během morfogeneze a vývoje oka.

2. Přehled literatury

2.1. Anatomie oka

Z biologického hlediska je oko velice složitý orgán tvořený množstvím jednotlivých struktur různých funkcí i embryonálního původu. Většina částí očního orgánu je uložena v očníci (*orbita*), až na dráhy a centra centrální nervové soustavy. Oční koule (*bulbus oculi*) je tvořena mnoha vrstvami a její vnitřní prostředí vyplňuje komorová voda. Anatomické složení oka je schematicky zachyceno na Obrázku 1.

Povrch oční koule je tvořen bělimou (*sclera*) a rohovkou (*cornea*). Bělina je tuhá, bílá vrstva obsahující elastická vlákna a kolagen, s tloušťkou 0,3 – 2,0 mm, která tvoří pevný obal očního bulbu. Tato vrstva je zodpovědná za udržení tvaru oka a za jeho mechanickou ochranu. Vytváří také otvor pro výstup zrakového nervu a pro vstup a výstup cév (Kuchynka *et al.*, 2007).

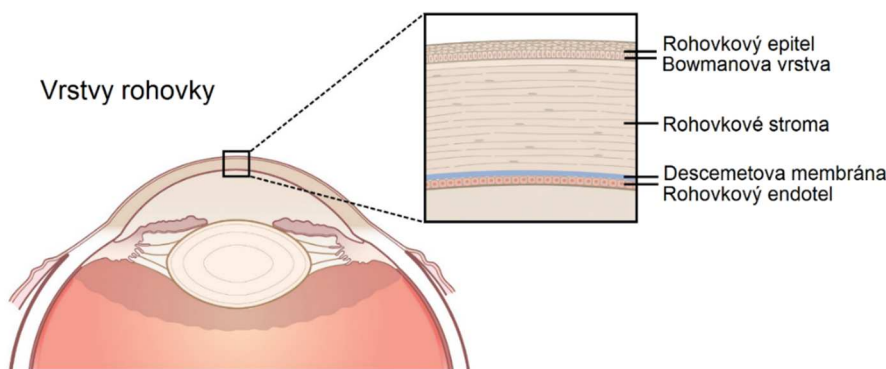


Obrázek 1: Schématický nákres struktury lidského oka. Převzato a upraveno z Willoughby *et al.*, 2010.

Rohovka je bezbarvá transparentní struktura, nacházející se v přední části oka. Lidská rohovka je složena z několika vrstev (Obrázek 2). Nejsvrchněji se nachází rohovkový epitel. Jedná se o 5 - 6 vrstev buněk se schopností regenerace. Pod rohovkovým epitelem se nachází Bowmanova vrstva, tvořená především kolagenem. Stroma je nejtlustší ze všech vrstev rohovky. Je tvořeno jak buněčnou složkou (keratocyty) tak nebuněčnou složkou (lamelární kolagenní vlákna). Descemetova membrána je produktem buněk rohovkového endotelu

a obsahuje především kolagen a laminin. Poslední, nejhlubší vrstvou rohovky je rohovkový endotel, tenká vrstva buněk, která odděluje rohovku od přední komory. Okraj rohovky se nazývá limbus (*limbus corneae*) a plynule přechází v bělimu. Jedná se o místo výskytu limbálních kmenových buněk, které jsou zdrojem nových epitelových buněk během reparace rohovky při jejím poškození (Cotsarelis *et al.*, 1989).

Rohovka obsahuje velké množství nervových zakončení, díky čemuž je extrémně citlivá na dotyk. Průměrná dioptrická mohutnost lidské rohovky je 41 - 43 dioptrií, což je přibližně 2krát tolik, než má samotná čočka (Krachmer & Palay, 2005).



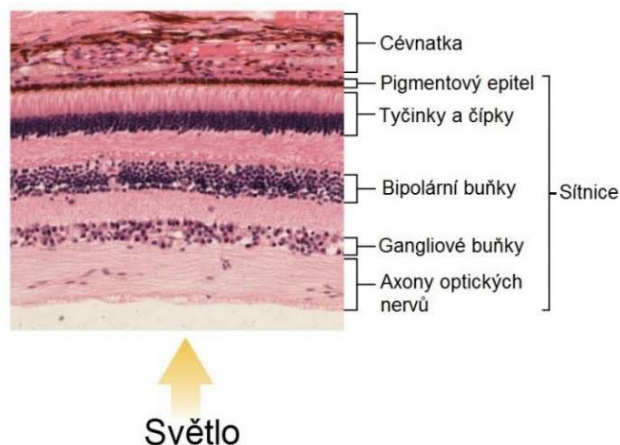
Obrázek 2: Jednotlivé vrstvy rohovky. Převzato a upraveno z © Cornea Research Foundation of America.

Střední vrstva oční koule je tvořena žílnatou (*uvea*), řasnatým tělískem (*corpus ciliare*), cévnatkou (*choroidea*) a duhovkou (*iris*). Žílnatka zodpovídá za výživu bulbu a je tvořena cévami, nervy a pigmentovými buňkami. Jedná se opět o tenkou vrstvu, která přiléhá z vnitřní části na bělimu. V zadní části je žílnatka tvořena cévnatkou, která pomáhá při výživě sítnice a v přední části, v oblasti tzv. zubaté linie (*ora serrata*) přechází do řasnatého tělíska. Řasnaté tělísko pomáhá pomocí tenkých vláken upevnit čočku. Mezi klíčové funkce řasnatého tělíska patří také tvorba nitrooční tekutiny, která vyplňuje oční komory a pomáhá vyživovat čočku a rohovku.

Duhovka je tvořena hladkou svalovinou a je protkána množstvím cév a nervů. Za barvu duhovky je zodpovědný pigment produkovaný buňkami dvouvrstvého epitelu v zadní části duhovky. Spolu s čočkou odděluje duhovka přední a zadní oční komoru. Uprostřed duhovky se nachází kruhový otvor, který vytváří zornici (*pupilla*). Tento otvor má proměnlivý průměr v závislosti na množství dopadajícího světla, což je regulováno pomocí svalů duhovky, mezi které řadíme svěrač zornice (*musculus sphincter iridis*) a dilatátor zornice (*musculus dilatator iridis*). V místě spojení rohovky s duhovkou se nachází tzv. komorový úhel. Tato struktura je složená ze zevní části duhovky, z přední části řasnatého tělíska, z trabekulární síťoviny

a ze Schlemmova kanálu. Společně tyto struktury vytváří drenážní systém odvádějící nitrooční tekutinu do jemných krevních vlásečnic.

Vnitřní vrstva očního bulbu je tvořena sítnicí (*retina*) a zrakovým nervem (*nervus opticus*). Sítnice těsně naléhá na cévnatku a její tloušťka je 0,1 - 0,4 mm. Sítnice má dvě hlavní vrstvy: vnitřní (neuroretina) a vnější (retinální pigmentový epitel). Podrobnější stavba sítnice je znázorněna na Obrázku 3.



Obrázek 3: Anatomický řez sítnicí a jejích přilehlých vrstev. Převzato a upraveno z <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>

Sítnice je klíčovou složkou samotného vidění, jelikož obsahuje fotoreceptory, což jsou světločivné buňky zpracovávající jednotlivé dávky světelné energie (fotony) a předávající tuto energii jako informaci v podobě elektrického signálu. Jedná se o primární smyslové buňky. U savců se v současnosti rozlišují tři typy fotoreceptorů: tyčinky, čípky a méně známé fotosenzitivní retinální gangliové buňky (Foster *et al.*, 1991). Tyčinky, které umožňují vnímání kontrastů a reakci na světlo, se v sítnici nachází asi 20krát častěji než čípky (Junqueira & Carneiro, 2005) Čípky jsou zodpovědné za zobrazení barevného vidění a vyskytující se hned v několika typech, specializovaných pro vnímání určitého barevného spektra. Největší koncentrace čípků se nachází v oblasti tzv. žluté skvrny (*macula lutea*). Vodivé části buněk fotoreceptorů jsou v kontaktu s bipolárními buňkami, které jsou propojeny s velkými multipolárními gangliovými buňkami. Axony gangliových buněk se postupně sbíhají do zrakového nervu, který ze sítnice vystupuje ven v oblasti tzv. slepé skvrny a přenáší zrakové informace ze sítnice až do týlních laloků mozkové kůry.

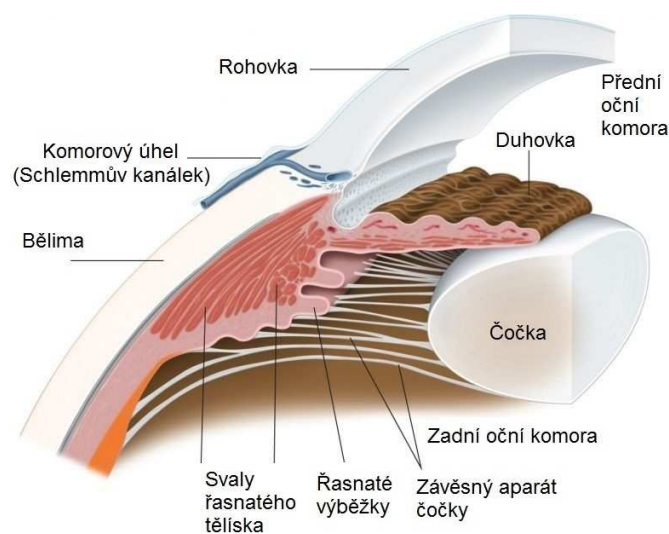
Oko obsahuje dvě oční komory, přičemž obě jsou vyplněné komorovou tekutinou vznikající sekrecí z řasnatého tělíska odpovědnou za výživu okolních tkání a odvod odpadních látek. Přední komora oční (*camera oculi anterior*) je ohraničená prostorem mezi čočkou,

duhovkou, a rohovkou. Zadní oční komora (*camera oculi posterior*) zahrnuje prostor mezi zadní plochou duhovky a závěsným aparátem řasnatého tělíska, který upevňuje čočku. Přední a zadní komora spolu komunikují skrze štěrbinu mezi čočkou a pupilou duhovky. Čočka je z velké části tvořena transparentními proteiny krystalíny, které vytváří vhodné optické prostředí a umocňují její optickou mohutnost (Hecht, 1987).

Mezi přídatné oční orgány patří okohybné svaly zajišťující pohyb a postavení očního bulbu (*musculi bulbi*). Přední část oka je kryta očním víčkem (*palpebra*). Na povrchu bělimy a očního víčka se nachází spojivka (*tunica conjunctiva*). Díky své elasticitě a podílu na tvorbě slzného filmu (gobletové buňky produkují mucin) umožňuje spojivka hladké pohyby bulbu. V horní části očníce je uložena slzná žláza (*glandula lacrimalis*), která produkuje vodnou složku slzného filmu, čímž dochází k neustálému zvlhčování povrchu oka. Slzy průběžně odplavují z oka nečistoty a chrání jej před infekcí. Součástí slzného filmu je také lipidová vrstva bohatá na estery, steroly a volné mastné kyseliny, která je produktem Meibomových žlázek nacházejících se přímo v očním víčku v tarzální ploténce pod spojivkou.

2.1.1. Přední segment oka

Přední segment oka představuje jeho pomyslnou první třetinu. Zahrnuje vnější části oka jako oční víčka, řasy, slzný film, rohovku a spojivku, dále duhovku, zornici, řasnaté tělísko, komorový úhel a oční čočku. Vrozené patologie této části očního orgánu postihují nejčastěji rohovku, duhovku a komorový úhel, přičemž zahrnují anomálie různého typu. Schéma předního segmentu oka je zachyceno na Obrázku 4.

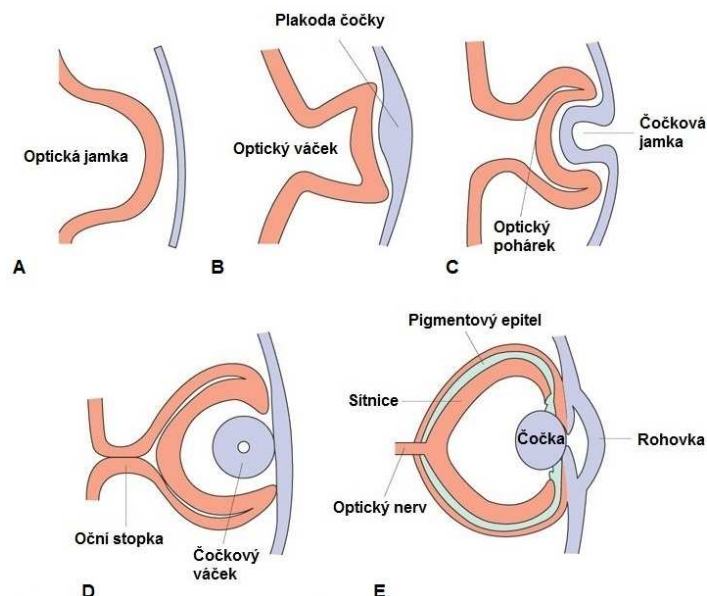


Obrázek 4: Schéma anatomie předního segmentu oka.
Převzato a upraveno z <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>

2.2. Vývoj oka

Vývoj oka je složitý a dynamický proces, který začíná již ve fázi rané gastruly embrya (Chow & Lang, 2001). Vlastní základy očního orgánu se aktivně vytváří v průběhu 4. týdne intrauterinního vývoje (Kuchynka *et al.*, 2007). Činnost oka, jakožto senzorického orgánu, je úzce spjata s centrální nervovou soustavou. Toto propojení není jen funkční, ale obě soustavy mají podobný tkáňový původ, jelikož oko vzniká jako vychlípenina základu předního mozku.

Základy předního mozku ve 4. embryonálním týdnu tvoří neurální ploténku původem z neuroektodermu. Okolo 22. dne se na vnitřní straně neurálních valů (gastruly/embrya) objevují oční rýhy. Tyto rýhy vznikají evaginací (vychlípení navenek) neuroepitelu. Následně se vytváří optické jamky, které se postupně plní tekutinou. Tento proces je znázorněn na Obrázku 5. Optické jamky se postupem času mění na optické váčky a posunují se z původní laterální strany dorzolaterálně (Obrázek 5A). K tvorbě optických váčků dochází zhruba na konci 4. týdně těhotenství (28. den). Optické váčky jsou propojeny s předním mozkem pomocí dutých očních stopek (*recessus opticus*). Postupem času se optické váčky zevnitř dotknou povrchového ektodermu v oblasti budoucího oka. Tento dotek iniciuje ztluštění této části ektodermu a tvoří se zde oční/čočková plakoda (Obrázek 5B). Dochází k postupnému vchlípení oční plakody směrem dovnitř a vzniká tak optický pohárek (Obrázek 5C).



Obrázek 5: Schéma vývoje komorového oka. Převzato a upraveno z Johnson *et al.*, 2006.

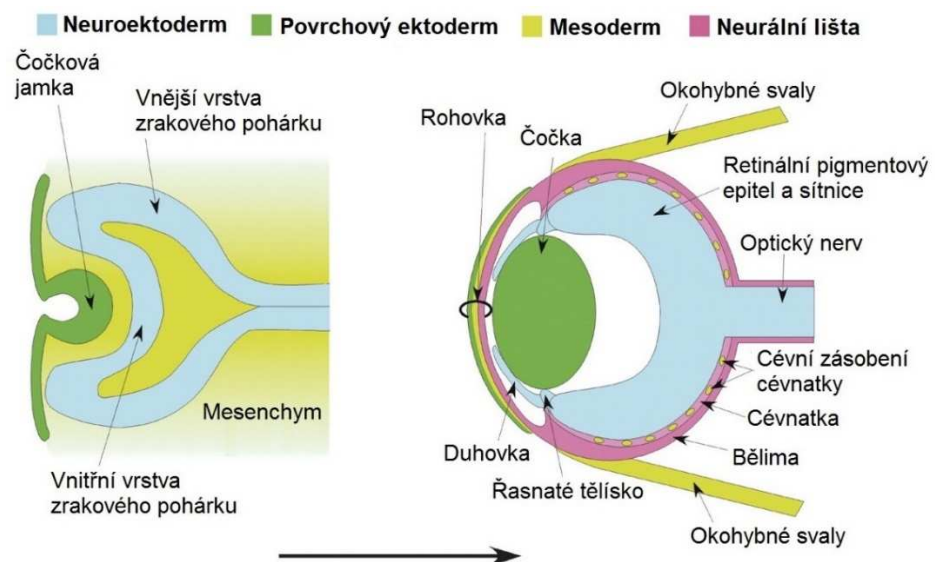
Při tvorbě zrakového pohárku je mezi jeho dvě vrstvy vtáhnutý i mesenchym. Vnitřní část tohoto pohárku je budoucí sítnice a budoucí vnější pigmentový epitel. Vchlípující se

čočkové jamky se nakonec oddělí od povrchového ektodermu úplně a vznikají čočkové váčky, jako základy očních čoček (Obrázek 5D). Čočkový váček je zpočátku v kontaktu s povrchovým ektodermem, ale postupem času se oddělí a prostor mezi budoucí čočkou a ektodermem vyplní mesenchym (Obrázek 5E). Spojení s předním mozkem se postupně zužuje z oční stopky do samotného očního nervu.

2.2.1. Vývoj struktur předního segmentu

Rohovka se na vnějším povrchu oka diferencuje z povrchového ektodermu a mesodermu (původem z neurální lišty), který vyplňuje prostor mezi ektodermem a čočkou. Mesodermální buňky se rozestoupí na dvě vrstvy. Z vnější vrstvy se vytvoří všechny vrstvy rohovky, až na povrchový epitel, který zůstane původem ektodermální a je avaskulární. Vnitřní vrstva mesodermu vytváří vrstvu na povrchu čočky (*tunica vasculosa lentis* - tzv. *membrana pupillaris*). Tato membrána se během 7. měsíce diferencuje v samotnou zornici.

Během tvorby zrakového pohárku a po utvoření samostatného čočkového váčku se ventrální strany pohárku předsunou, aby překryly čočku. V místech srůstu zrakového pohárku s povrchovým ektodermem se vytváří základ pro řasnaté tělísko. Ciliární sval řasnatého tělíska (*musculus ciliaris*) se diferencuje z mesodermu ležícího na hraně očního pohárku (Obrázek 6).



Obrázek 6: Schéma zachycující původ jednotlivých struktur oka. Převzato a upraveno z Harada *et al.*, 2007.

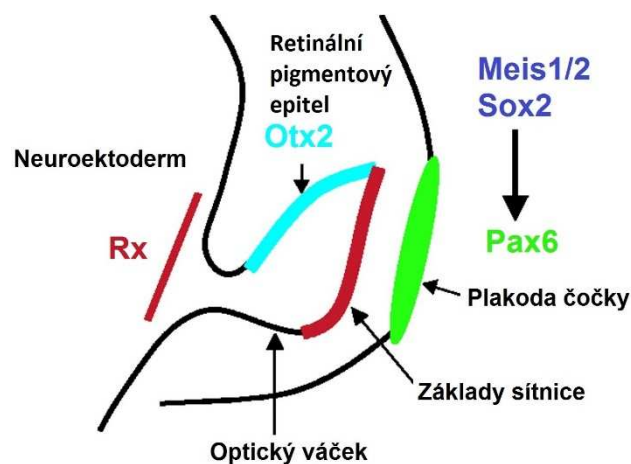
Duhovka se diferencuje z okraje očního pohárku v místě, kde se obě vrstvy očního pohárku překrývají a zůstávají zde tenké. Stroma duhovky má svůj původ z buněk neurální lišty

(mesenchymální buňky). Svaly duhovky (*musculus sphincter pupillae* a *musculus dilatator pupillae*) jsou ektodermálního původu.

Oko je zpočátku víčky nekryté. Ty se tvoří apozicí mesodermu krytého ektodermem z kraje očních štěrbin a z příslušných valů. Horní víčko se tvoří z čelního valu a spodní víčko z maxilárního valu. Výběžky očních víček spolu po 3. měsíci srostou, v 7. měsíci se opět rozdělí (Sadler, 2011). Původ jednotlivých očních struktur je znázorněn na Obrázku 6.

2.2.2. Geny uplatňující se při vývoji oka

Během vývoje oka se uplatňuje velké množství na sebe navazujících dějů, které zahrnují řadu signálních molekul a receptorů. Pro správně regulovaný vývoj oka je klíčová adekvátní exprese a regulace mnoha genů, přičemž úloha řady z nich nebyla doposud ještě zcela objasněna (Zagozewski *et al.*, 2014). Nejvýznamnější roli ve vývoji oka hrají regulátorové geny homeoboxu *RAX*, *HESX1*, *PAX6*, *OTX2*, *SIX3* a *SOX2* (Zhang *et al.*, 2000; Chow & Lang, 2001; Avilion *et al.*, 2003). V sestupné kaskádě reakcí se pod těmito geny nachází další, neméně důležité regulátory jako *FOXC1*, *FOXE3*, *PITX2*, *PITX3*, *PAX2* nebo *MAF* (Semina *et al.*, 1996; Mears *et al.*, 1998; Jordan *et al.*, 1992). Působení genů během rané tvorby očního váčku je zachyceno na Obrázku 7.



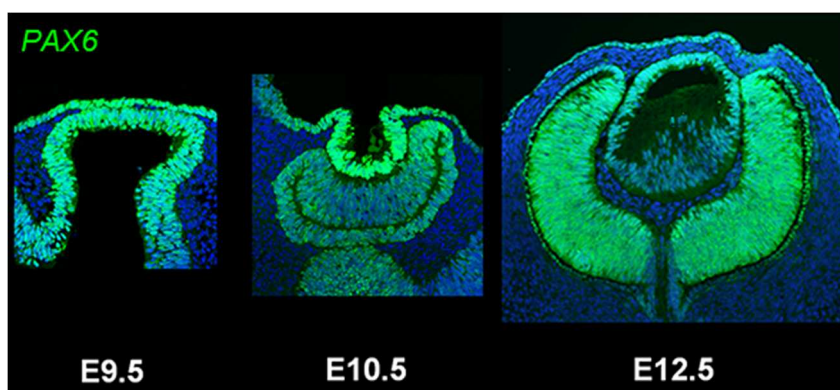
Obrázek 7: Transkripční faktory kontrolující vývoj oka ve fázi optického váčku. Transkripční faktor RX kontroluje vývoj červeně vyznačených struktur (evaginace optického váčku a tvorba základů sítnice). PAX6 je důležitý jak pro formaci optického váčku, tak pro tvorbu plakody čočky. Exprese PAX6 je regulována geny MEIS1/2 a SOX2. OTX2 iniciuje vznik retinálního pigmentového epitelu. Převzato a upraveno z Treisman, 2004.

Signální kaskády bývají zacíleny na funkci tkáňově specifických genu, jako například geny kódující proteiny tvořící čočku (krystalíny) (Cvekl & Piatigorsky, 1996). Vývoj oka vyžaduje extrémně hlídanou aktivitu těchto genů a je vysoce citlivý na přítomnost transkripčních faktorů pro tyto geny.

2.2.2.1. PAX6

PAX6 (Paired Box 6, OMIM *607108) se řadí mezi geny, které obsahují ve své sekvenci homeobox díky němuž se po translaci dokáží v podobě homeodomény vázat na DNA a regulovat tak transkripci jiných genů (Xu *et al.*, 1999). *PAX6* je naprosto klíčovou složkou správného vývoje oka jak u savců, tak i u jiných organismů (Gehring & Ikeo, 1999). Jeho esenciální význam pro organogenezi oka je podložen vysoce konzervovanou sekvenční podobností ve skupině *Metazoa* (živočichové) (Burri *et al.*, 1989; Noll, 1993). Úloha genu *PAX6* během embryogeneze není klíčová jen pro okulogenezi, ale účastní se také vývoje jiných orgánů a struktur (např. centrální nervové soustavy, nebo pankreatu) (Glaser *et al.*, 1994; Turque *et al.*, 1994).

PAX6 se u člověka nachází na chromosomu 11 v lokusu 11p13. Ve své sekvenci obsahuje 13 exonů a je u něj popsáno 11 transkripčních variant (databáze NCBI). Protein PAX6 je tvořen 422 aminokyselinami (isoforma A) a váží přibližně 46 683 Daltonů (Da). Úloha genu *PAX6* během embryonálního vývoje, s ohledem na vývin oka, začíná již při tvorbě neurální ploténky (jedná se o embryonální základ nervového systému). Při tvorbě této struktury se účastní geny *PAX6*, *SOX2* a *OTX2*. Tyto geny následně pomáhají při vzniku optického váčku a optického pohárku. V různých kombinacích tyto geny napomáhají vzniku pigmentového epitelu oka, sítnice i čočky (Hever *et al.*, 2006). Místa silné exprese *PAX6* během embryonálního vývoje myšího oka jsou znázorněna na Obrázku 8.



Obrázek 8: Vznikající struktury myšího oka vizualizovány pomocí značení PAX6. Během embryonálního dne 9,5 (E9.5) již u myši vzniká optický váček. Posléze se PAX6 účastní také tvorby čočkové jamky (E10.5) a napomáhá také tvorbě sítnice ve všech jejích vrstvách (E12.5). Zdroj: Archiv Oddělení transkripční regulace AV ČR, laboratoř RNDr. Zbyňka Kozmíka CSc.

V dospělém organismu je protein PAX6 přítomen pouze v sítnici, což značně komplikuje jeho funkční analýzu při prokazování důsledku detekovaných mutací u člověka

(GeneCards). Jako nejvýznamnější regulátory exprese *PAX6* bývají uváděny geny *MEIS1*, *MEIS2* a *SOX2* (Zhang *et al.*, 2002; Bessa *et al.*, 2002).

2.3. Dysgeneze předního segmentu

Vývojové vady oka jsou vzácná onemocnění, která mohou postihovat všechny části oka od rohovky až po oční nerv. Z hlediska vývojové biologie se jedná o poruchy diferenciaci mesenchymálních buněk neurální lišty (Taylor & Hoyt, 2005).

Vrozené anomálie oka mohou být způsobeny genetickými faktory, ale také například infekcí matky během těhotenství nebo dalšími škodlivými vlivy (alkohol, drogy, špatná medicína) (Sadler, 2011). Vzhledem k důkladným prenatálním screeningům a v důsledku eliminace některých onemocnění v populaci (např. zarděnky) se podíl infekčních onemocnění, zodpovědných za vznik vývojových anomálií oka, výrazně snížil a v současné době se předpokládá, že většina z nich, obzvláště bilaterálních, vzniká na podkladě genetických faktorů (Haargaard *et al.*, 2004).

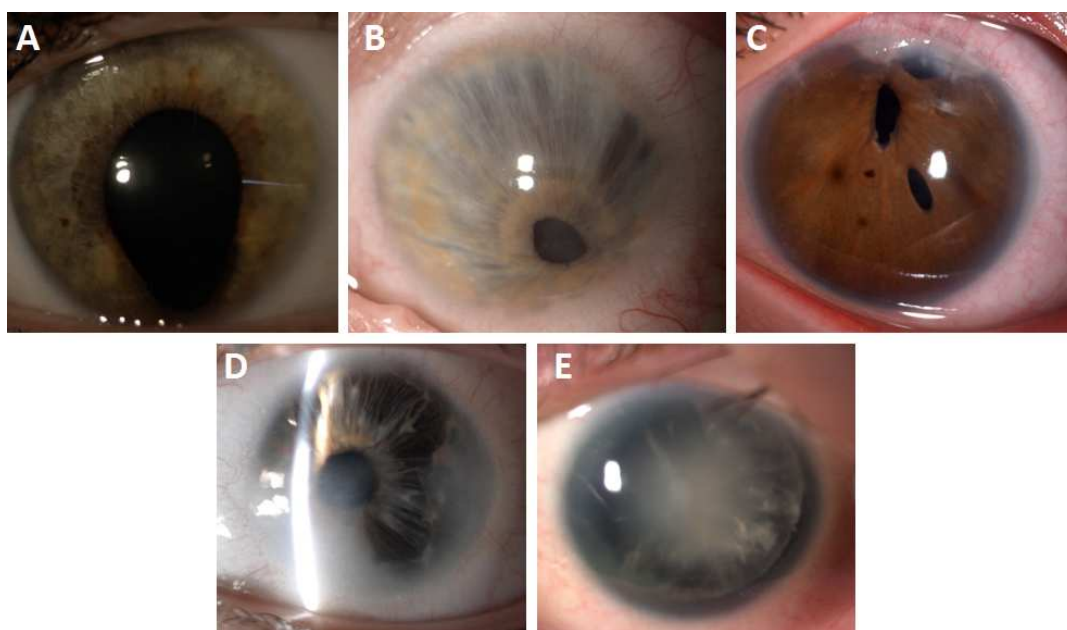
U přibližně 50 % pacientů s dysgenézí předního segmentu oka dochází v důsledku poruchy odtoku komorové tekutiny ke vzniku sekundárního glaukomu, projevující se většinou jako zvýšení nitroočního tlaku (nad 21 mm Hg), které v konečném důsledku způsobí neuropatii zrakového nervu (Waring *et al.*, 1975). Tento typ glaukomu je obtížně léčitelný a nezhřídkou bývá příčinou absolutní ztráty zraku. U většiny pacientů vzniká tato komplikace již v dětství nebo v časně dospělosti (Sowden, 2007; Idrees *et al.*, 2006).

2.3.1. Klinický obraz pacientů s dysgenézí předního segmentu oka

Tato skupina onemocnění se klinicky projevuje jako různé kombinace následujících znaků: opacifikace (zakalení) rohovky, někdy spojené i s vrůstáním cév do jejího stromatu, hypoplazie (nedovyvinutí) duhovky, kolobomy duhovky (rozštěp), přítomností výrazného zadního embryotoxonu (předsunutí a rozšíření Schwalbeho linie), ektopií zornice či čočky (výskyt mimo své obvyklé místo), adhezí mezi duhovkou a rohovkou, nebo rohovkou a čočkou. Výjimečně se mohou vyskytovat u těchto pacientů také mikroftalmie/nanoftalmie (malé oko), anoftalmie (nedovyvinutí očních váček, kdy oko zcela chybí), heterochromie (různá distribuce melaninu v duhovkách), polykorie (duhovka tvoří více zornic) nebo kryptoftalmus (neoddělení očních víček). Některé z těchto vad jsou zachyceny na Obrázku 9.

Dle závažnosti nálezu a stupně postižení zraku může být u pacientů přítomen nystagmus (kmitavý pohyb očí), strabismus (šilhání) a ambylopie (tupoizrakost).

Diagnostiku pacientů s dysgenezemi předního segmentu oka komplikuje skutečnost, že nezdědka nelze nález zařadit do jedné vyhraněné klinické jednotky. V rámci jedné rodiny se mohou navíc u různých rodinných příslušníků vyskytnout nálezy zařazené pod různé klinické diagnózy. U některých pacientů mohou být dysgeneze předního segmentu asociovány s různými dalšími mimoočními nálezy jako například se špatným vývojem chrupu, srdečními vadami nebo mentálními retardacemi.



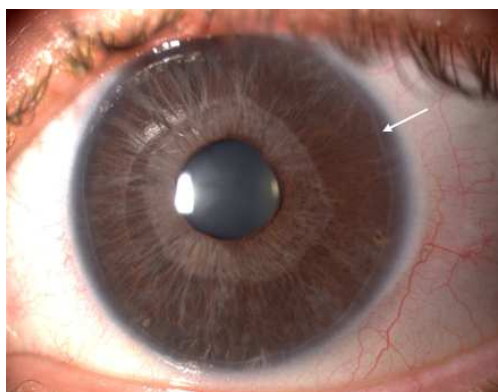
Obrázek 9: Nálezy u pacientů s dysgenezemi předního segmentu oka. A, Kolobom duhovky; B, Ektopie zornice; C, Polykorie; D, Zákal rohovky a atrofie duhovky; E, Aniridie a perseniální katarakta. Zdroj: Archiv Oční kliniky VFN a 1. LF UK a Archiv oční kliniky FN Motol.

2.3.1.1. Axenfeldovo Riegerovo spektrum malformací

Axenfeldovo Riegerovo spektrum malformací je vzácné, autozomálně dominantní onemocnění, přičemž incidence je přibližně 1 postižený na 200 000 obyvatel (Titheradge *et al.*, 2014). Onemocnění vzniká na podkladě abnormálního vývoje předněkomorového úhlu, rohovky a duhovky. Nález je bilaterální, často asymetrický a velmi variabilní. V minulosti bylo toto onemocnění označováno řadou názvů, např. mezodermální dysgeneze rohovky a duhovky, primární mezodermální dysgeneze duhovky, či Axenfeldův-Riegerův syndrom.

Jednotlivé popisované projevy zahrnují Axenfeldovu anomálii, která se projevuje jako pruhy duhovky připojené ke Schwalbeho linii. Při Riegerově anomálii se dále přidružuje atrofie

stromatu duhovky s dírami, nebo pseudodírami a korektopií (abnormální uložení zornice) (Obrázek 9). Kromě očních projevů mohou být při tomto spektru malformací přítomny specifické obličejové rysy: plochá střední část obličeje, prominující čelo, široký kořen nosu, hypoplazie maxily a nápadně velký dolní ret. Dentální anomálie je vyjádřena hypodoncií a parciální anodoncií (nejčastěji chybí řezáky). Méně často se vyskytují také srdeční vady. Fotografie oka pacientky s geneticky ověřeným Axenfeldovým Riegerovým spekterem je zachycena na Obrázku 10.



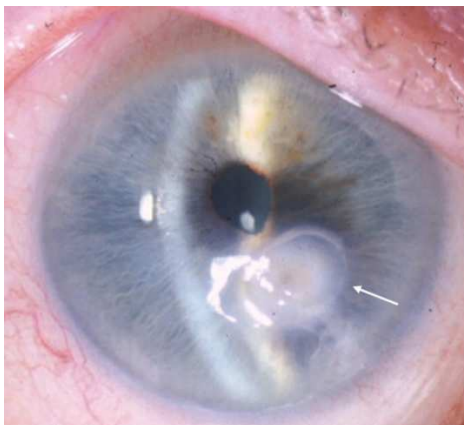
Obrázek 10: Levé oko pacientky s Axenfeldovým Riegerovým spektrem malformací. Je zde patrná prominentní Schwalbeho linie (šipka) a atrofie duhovky. Zdroj: Archiv Oční kliniky VFN a 1. LF UK.

2.3.1.2. Petersova anomálie

Typickými znaky Petersovy anomálie jsou: přítomnost centrálního leukomu (bělavé zakalení) rohovky, absence zadního stromatu rohovky a Decemetovy membrány, a různý stupeň připojení duhovky a čočky k centrální části rohovky (iridokorneální adherence). Spektrum postižení je velmi široké od slabého centrálního zákalu s malým pruhem připojené duhovky a čirou čočkou, až po zcela neprůhlednou rohovku a četné iridokorneální adherence. Petersova anomálie se může vyskytovat samostatně nebo mohou být přítomny další patologické oční nálezy. Popsány byly např. mikrokornea, glaukom, aniridie, kongenitální afakie (absence čočky) nebo totální zadní kolobom sítnice a cévnatky. Fotografie oka pacienta s Petersovou anomálií je zachycena na Obrázku 11.

Petersova anomálie v kombinaci s rozštěpý rtu a patra, mentální retardací a abnormálním tvarem zevního ušního boltce je označována jako Petersův plus syndrom, přičemž se variabilně mohou přidružovat i malformace kardiovaskulárního systému, genitourinálního systému, postižení sluchu a strukturální defekty centrálního nervového systému (Kuchynka *et al.*, 2007).

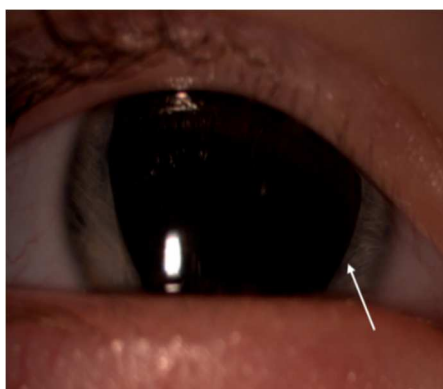
Oční nálezy u Petersovy anomálie bývají bilaterální, často asymetrické a velmi variabilní. Byl popsán jak autozomálně dominantní, tak autozomálně recesivní typ dědičnosti (Kuchynka *et al.*, 2007).



Obrázek 11: Detail pravého oka pacienta s diagnózou Petersovy anomálie. Je zde patrný leukom rohovky v centrální části (šipka). Zdroj: Archiv Oční kliniky VFN a 1. LF UK.

2.3.1.3. Aniridie

Aniridie je vzácná bilaterální vrozená vývojová malformace předního segmentu oka, charakterizovaná částečnou či úplnou absencí duhovky. Incidence tohoto onemocnění je 1 postižený na 56 000 - 76 000 obyvatel (Lee *et al.*, 2008). Kromě malformací duhovky, mohou být u postižených jedinců přítomny hypoplazie makuly nebo zřakového nervu, malformace komorového úhlu a progresivní keratopatie. Pacienti s aniridií také často trpí fotofobií (světloplachost). Méně často se mezi pacienty vyskytuje katarakta, ptóza (pokles víček) a ektopie čočky (Reynolds *et al.*, 2003). Aniridie bývá nejčastěji spojována s mutacemi v genu PAX6 (Weisschuh *et al.*, 2012). Fotografie oka pacienta s aniridií je zachycena na Obrázku 9E a na Obrázku 12.



Obrázek 12: Detail pravého oka s parciální aniridií. Zdroj: Archiv Oční kliniky VFN a 1. LF UK.

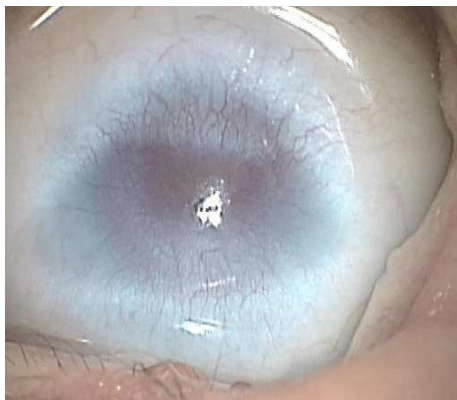
U pacientů s rozsáhlejšími (mikroskopickými i submikroskopickými) delecemi lokusu 11p13, kde se kromě genu *PAX6* nachází také gen *WT1* (Wilms Tumor 1) může být anidie asociovanána s výskytem Wilmsova tumoru, poruchami genito-urinálního systému a mentální retardací (tzv. WAGR syndrom) (Crolla *et al.*, 1997).

2.3.1.4. Kongenitální katarakta

Kongenitální/infantilní katarakta (vrozený zákal oční čočky, popř. zákal čočky zjištěný v dětském věku) je častou součástí klinického obrazu dysgenezí předního segmentu. Dochází při něm k narušení průhlednosti oční čočky, vyžadující v těžších případech operaci k zabránění vzniku amblyopie (Baráková & Hlotánek, 2008).

2.3.1.5. Sklerokornea

Sklerokornea je charakterizována sklerotizací rohovky (tkáň připomíná bělimu) a projevuje se jako cirkulární bělavá opacifikace s nejasným přechodem limbu a rohovky, v těžkých případech může být rozšířena až do centra rohovky. Často je spojena s dalšími anomáliemi jako jsou nízké zakřivení rohovky (*cornea plana*), mělká přední komora, anomálie duhovky a mikroftalmus (Autrata, 2008). Fotografie oka pacientky se sklerokorneou je zachycena na Obrázku 13.



Obrázek 13: Detail oka pacientky se sklerokorneou. Zdroj: Archiv Oční kliniky FN Motol.

2.3.2. Diagnostika pacientů s dysgenezí předního segmentu

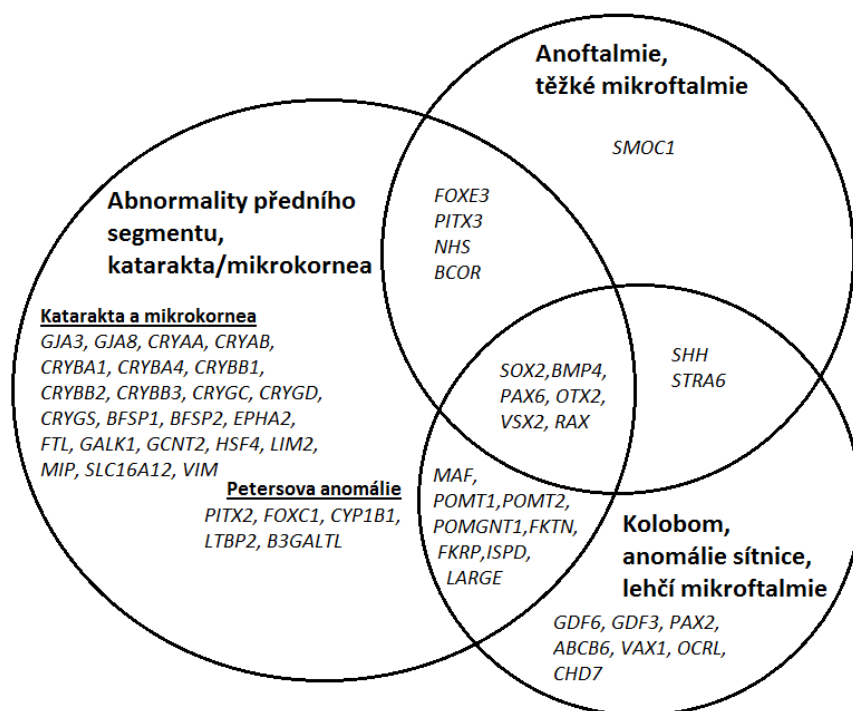
Diagnostika pacientů s dysgenezí předního segmentu je poměrně komplikovaná, jelikož se jedná o širokou skupinu chorob fenotypově i geneticky velice heterogenních. Jednotlivé fenotypové projevy se mohou značně překrývat a nespadat tak do typického

klinického obrazu určité konkrétní diagnózy. V průběhu let proběhlo již několik pokusů o vypracování klasifikace těchto chorob, která je neustále zpřesňována a vylepšována (Waring *et al.*, 1975; Wilson, 1990).

Prvním krokem, ke správné diagnostice pacientů s tímto typem onemocnění, je pečlivý popis a dokumentace očního nálezu. V ideálním případě, se u pacientů dále pokračuje charakterizací onemocnění na molekulárně genetické úrovni, která pak následně potvrdí anebo i upřesní klinickou diagnózu.

Geny, jejichž mutace vedou ke vzniku dysgenezí předního segmentu oka, kódují nejčastěji transkripční faktory regulující funkce mnoha dalších genů (viz. Kapitola 2.2.1.). Seznam známých genů, o kterých je v současné době známo, že hrají úlohu při vzniku těchto dysgenezí, je uveden v Tabulce 1.

Na Obrázku 14 jsou znázorněny genetické překryvy, ze kterých je patrné, že dysgeneze předního segmentu oka nejsou izolovanou skupinou chorob, ale na molekulárně-genetické úrovni se prolínají s jinými klinickými jednotkami např. s anomáliemi sítnice. Mutace v různých genech se na klinické úrovni mohou projevit stejným fenotypem, jako příklad je možné uvést geny *FOXC1* a *PITX2*, které jsou asociovány se vznikem Axenfeldova Riegerova spektra (Alward, 2000).



Obrázek 14: Tabulka vybraných genů, jejichž mutace jsou zodpovědné za abnormální vývoj oka. Je patrný široký fenotypový překryv mutací v jednotlivých genech. Převzato a upraveno z Prokudin *et al.*, 2014.

Sekvenováním kódujících úseků známých genů lze zjistit příčinné mutace pouze u 41 % -70 % pacientů s dysgenezemi předního segmentu v závislosti na populaci a studovaném fenotypu (Sun *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2016). Je tedy zřejmé, že buď existují ještě další, dosud neobjevené geny anebo se mutace nachází v nekódujících úsecích známých genů (např. v regulačních oblastech nebo intronech).

Ve výjimečných případech se u pacientů mohou nacházet větší či menší chromosomové přestavby, pro jejichž odhalení je potřeba analýza variací počtu kopií anebo i klasické cytogenetické metody. Vždy je třeba počítat i s dalšími možnými negenetickými příčinami, o kterých se ale předpokládá, že jsou dnes díky pečlivé monitoraci těhotenství méně časté. Jedná se například o fetální alkoholový syndrom, intrauterinní infekce či vystavení izoretinoinu v prvním trimestru (Kuchynka *et al.*, 2007).

Tabulka 1: Seznam známých genů spojovaných s dysgenezemi předního segmentu podle databáze OMIM.

Gen	OMIM číslo	Lokus	Oční projevy	Typ dědičnosti
<i>ABCB6</i>	605452	2q35	Mikroftalmie, kolobom, anomálie sítnice	AD
<i>B3GALTL</i>	610308	13q12.3	Petersův plus syndrom	AR
<i>BCOR</i>	300485	Xp11.4	Mikroftalmie	X-vázaná
<i>BDNF</i>	113505	11p14.1	Aniridie	AD
<i>BFSP1</i>	603307	20p12.1	Katarakta, mikrokornea, dysgeneze předního segmentu	AD/AR
<i>BFSP2</i>	603212	3q22.1	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>BMP4</i>	112262	14q22-q23	Dysgeneze předního segmentu, anoftalmie, mikroftalmie	AD
<i>COL4A1</i>	120130	13q34	Axenfeldovo-Riegerovo spektrum	AD
<i>CPAMD8</i>	608841	19p13.11	Dysgeneze předního segmentu	AR
<i>CRYAA</i>	123580	21q22.3	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD/AR
<i>CRYAB</i>	123590	11q23.1	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD/AR
<i>CRYBA1</i>	123610	17q11.2	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>CRYBB2</i>	123620	22q11.23	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>CRYBB3</i>	123630	22q11.23	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD/AR
<i>CRYGC</i>	123680	2q33.3	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>CRYGD</i>	123690	2q33.3	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>CRYGS</i>	123730	3q27.3	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>CYP1B1</i>	601771	2p22	Petersonova anomálie, glaukom	AR
<i>EPHA2</i>	176946	1p36.13	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>EYA1</i>	601653	8q13	Branchio-oto-renální syndrom, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>FKRP</i>	606596	19q13.32	Dysgeneze předního segmentu, kolobom, anomálie sítnice	AR
<i>FKTN</i>	607440	9q31.2	Dysgeneze předního segmentu, kolobom, anomálie sítnice	AR
<i>FOXC1</i>	601090	6p25	Kongenitální glaukom, Petersova anomálie	AD
<i>FOXE3</i>	601094	1p23	Katarakta, Petersova anomálie, dysgeneze předního segmentu	AR
<i>FTL</i>	134790	19q13.33	Hyperferritinémie a kongenitální katarakta	AD/AR

Gen	OMIM číslo	Lokus	Oční projevy	Typ dědičnost
<i>GALK1</i>	604313	17q25.1	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AR
<i>GCNT2</i>	600429	6p24.3-p24.2	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD/AR
<i>GDF3</i>	606522	12p13.31	Mikroftalmie, kolobom, anomálie sítnice	AD
<i>GDF6</i>	601147	8q22.1	Leberova kongenitální amaurosa, mikroftalmie, kolobom	AD/AR
<i>GJA3</i>	121015	13q12.11	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>GJA8</i>	600897	1q21.2	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>HMX1</i>	142992	4p16.1	Katarakta, dysgeneze předního segmentu, retinální dystrofie	AR
<i>HSF4</i>	602438	16q22.1	Katarakta	AD
<i>CHD7</i>	608892	8q12.2	Mikroftalmie, kolobom, anomálie sítnice	AD
<i>ISPD</i>	614631	7p21.2	Kolobom, anomálie sítnice	AR
<i>JAG1</i>	601920	20p12.2	Alagillův syndrom	AD
<i>KERA</i>	603288	12q21.33	Cornea plana	AR
<i>LAMB2</i>	150325	3p21	Piersonův syndrom, mikrokornea, dysgeneze předního segmentu	AR
<i>LARGE1</i>	603590	22q12.3	Katarakta, optická atrofie, retinální dysplázie, abnormální retinogram, nystagmus	AR
<i>LIM2</i>	154045	19q13.41	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AR
<i>LMX1B</i>	602575	9q34	Nail-patella syndrom, glaukom	AD
<i>LTBP2</i>	602091	14q24.3	Ektopie čočky, mikrosférofakie, megalokornea, glaukom, Petersonova anomálie	AR
<i>MAF</i>	177075	16q23	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>MIP</i>	154050	12q13.3	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>MIR184</i>	613146	15q25.1	Endotelová dystrofie rohovky, hypoplázie duhovky, katarakta	AD
<i>NHS</i>	300457	Xp22.2-p22.1	Kongenitální katarakta, mikrokornea	X-vázaná
<i>OCRL</i>	300535	Xq26.1	Mikroftalmie, kolobom, anomálie sítnice	X-vázaná
<i>OTX2</i>	600037	14q22.3	Mikroftalmie, retinální dystrofie	AD
<i>PAX2</i>	167409	10q24.31	Kolobom, dysplázie zrakového nervu, mikroftalmie, anomálie sítnice	AD
<i>PAX6</i>	607108	11p13	Aniridie, katarakta, hypoplázie očního nervu, glaukom	AD
<i>PITX2</i>	601542	4q25	Axenfeldovo-Riegerovo spektrum, hypoplázie duhovky, glaukom, Petersova anomálie	AD
<i>PITX3</i>	602669	10q25	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>POMGNT1</i>	606822	1p34.1	Retinitis pigmentosa	AR
<i>POMT1</i>	607423	9q34.13	Dysgeneze předního segmentu, kolobom, defekty sítnice	AR
<i>POMT2</i>	607439	14q24.3	Kongenitální katarakta, myopie, hypermetropie	AR
<i>PXDN</i>	605158	2q25.3	Katarakta, mikrokornea	AR
<i>RAX</i>	601881	18q21.32	Mikroftalmie	AR
<i>SHH</i>	600725	7q36.3	Mikroftalmie, kolobom, anoftalmie	AD
<i>SLC16A12</i>	611910	10q23.31	Juvenilní katarakta, mikrokornea	AD
<i>SLC4A11</i>	610206	20p13	Kongenitální hereditární endotelová dystrofie	AR
<i>SMOC1</i>	608488	14q24.2	Mikroftalmie	AR
<i>SOX2</i>	184429	3q26.33	Mikroftalmie, hypoplázie očního nervu	AD
<i>STRA6</i>	610745	15q24.1	Mikroftalmie, kolobom, anoftalmie	AR
<i>VAX1</i>	604294	10q25.3	Mikroftalmie, kolobom, anomálie sítnice	AR
<i>VIM</i>	193060	10p13	Katarakta, dysgeneze předního segmentu	AD
<i>VSX2</i>	142993	14q24.3	Mikroftalmie, kolobom	?

AD – autosomálně dominantní, **AR** – autosomálně recesivní, **X-vázaná** – vázaná na X pohlavní chromosom.

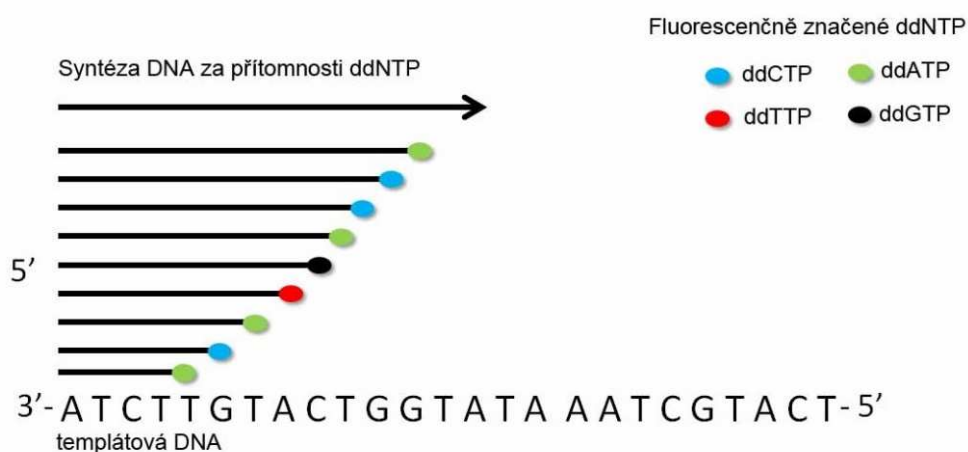
2.4. Molekulárně genetické metody použité při diagnostice pacientů

2.4.1. Sangerovo sekvenování

Sekvenování, je souhrnný termín pro biologicko-chemické metody, skrze které se určuje pořadí bází v sekvenci DNA. V 70. letech 20. století Frederic Sanger vyvinul sekvenační metodu, která do značné míry využívá v klasické podobě PCR reakci, spolu s koncovými dideoxynukleotidy a následné elektroforézy (Sanger *et al.*, 1977).

Sangerovo sekvenování poprvé komerčně využila v roce 1987 společnost Applied Biosystems. Jejich první automatický sekvenátor (AB370) využíval kapilární elektroforézu k separaci jednotlivých úseků DNA a umožňoval osekvenovat 500 kilobází za den s délkou čteného fragmentu okolo 600 bází (Liu *et al.*, 2012). Schéma tvorby sekvence pomocí značených dideoxynukleotidů je zachycena na Obrázku 15. V případě masivních čtení celých genomů, byla tato metoda postupně nahrazena sekvenačními metodami “nové generace“, nicméně Sangerovo sekvenování zůstává v širokém použití zejména pro cílený screening omezeného počtu sekvencí (např. při cíleném sekvenování vybraných exonů nebo sekvenování kódujících úseků menších genů) a dále k ověřování dat získaných pomocí sekvenování nové generace.

SANGEROVA METODA SEKVENOVÁNÍ (KAPILÁRNÍ PŘÍPRAVA)



Obrázek 15: Princip Sangerova sekvenování. Využití fluorescenčně značených dideoxynukleotidů pro následné čtení sekvence skrze kapilární elektroforézu. Převzato a upraveno z <http://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/>.

2.4.2. Sekvenování nové generace

Sekvenátory „první“ generace detekovaly DNA báze v řadě jednu po druhé, zatímco sekvenátory druhé generace (často označované jako sekvenátory nové generace) umožňují masivní paralelní čtení až tisíců molekul DNA současně.

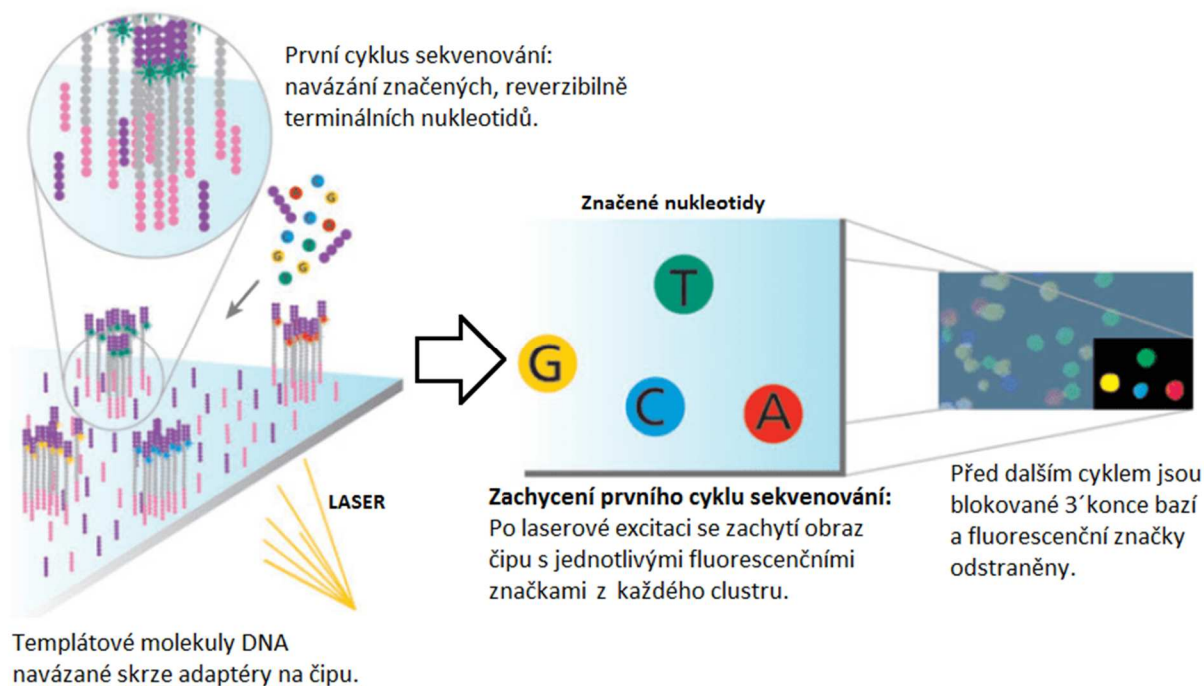
Masivně paralelní čtení je umožněno díky předcházející PCR amplifikaci jednotlivých DNA fragmentů. Přístroje jsou uzpůsobeny paralelizací mnoha jednotlivých PCR reakcí (stovky miliónů) a mnohonásobné kapilární sekvenací (až 96-kapilár).

Díky technologii masivně paralelního čtení se významně snížila doba potřebná k přečtení dlouhých DNA sekvencí. Na trhu se v současné době objevují tři platformy: Roche 454, Illumina a SOLiD (Zhou *et al.*, 2010). Tyto sekvenátory využívají rozdílnou chemii k určení nukleotidové sekvence, ale principiálně sdílejí přípravu knihovny ampliconů a sekvenování s následnou detekcí inkorporovaných nukleotidů.

Platforma Illumina, která byla pro účely diplomové práce využívána, představuje technologii založenou na PCR amplifikaci templátu (PCR-based technologies).

Pro tuto amplifikaci se využívá speciální můstkové PCR, kdy jsou templátové DNA molekuly pomocí adaptérových molekul uchyceny na čipu. Toto primární uchycení na čipu je čistě náhodné a umožňuje během jediné sekvenační reakce přečíst až stovky miliónů bazí. Následně je každý fragment na svém místě namnožen, což zvýší signál pro detekci v konkrétním místě čipu a vznikají tzv. clustery molekul DNA. Poté je čip promýván fluorescenčně značenými nukleotidy, které jsou chemicky modifikovány tak, že se na komplementární DNA fragmentu naváže vždy jen jeden nukleotid. Po navázání nukleotidů citlivý detektor zachytí fotografii čipu a vyhodnotí navázání konkrétního nukleotidu v konkrétní pozici. Syntéza následně pokračuje a po každém kroku je zachycen obraz. (Croucher *et al.*, 2009).

Softwarem je následně poskládána sekvence každého jednotlivého fragmentu v daném místě, tudíž získá najednou (sekvence miliónů fragmentů z jediného čipu). Na základě překryvů je sestavená souvislá sekvence DNA (Croucher *et al.*, 2009). Princip sekvenování pomocí platformy Illumina je zachycen na Obrázku 16.

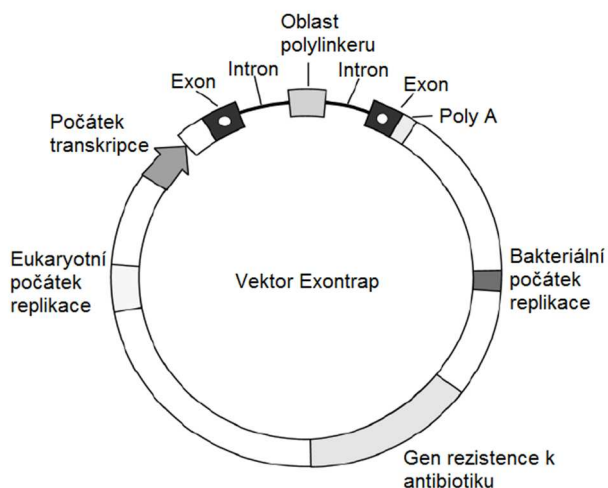


Obrázek 16: Princip sekvenování platformy Illumina. Převzato a upraveno z Chi, 2008.

2.4.3. Exon trapping

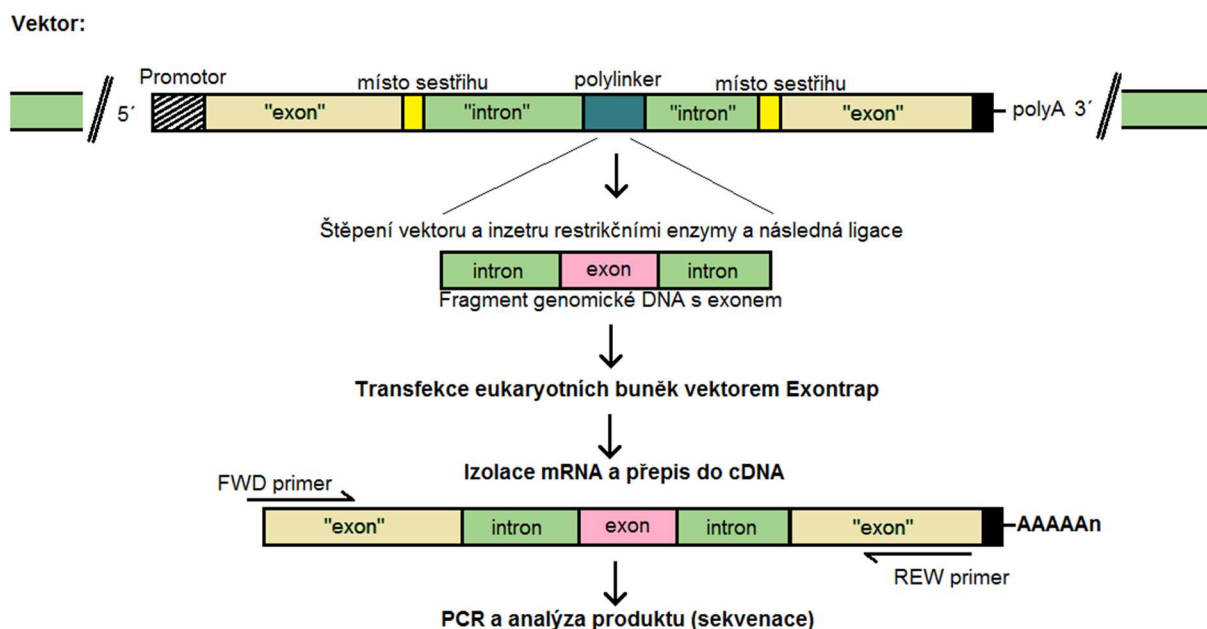
Exon trapping je molekulárně biologická metoda, které se běžně používá k odhalení potencionálních exonů v úsecích eukaryotické DNA s neznámými exonovými a intronovými částmi (Duyk *et al.*, 1990). Pomocí této metody lze určit, zda je daný úsek DNA součástí studovaného genu nebo nikoli. Tato technika se používá především při pátrání po nových genech v neznámých úsecích chromosomální DNA. V současné době se metoda používá i pro jiné aplikace, jako například funkční studie a ověření potenciálně sestřihových variant (Booth *et al.*, 2017).

Exontrap, je arteficielní sestřihový vektor kombinující eukaryotní i prokaryotní genetické elementy, který již obsahuje známou exon-intron-exon sekvenci. Schéma vektoru Exontrap je zachyceno na Obrázku 17. Intronová sekvence obsahuje klonovací místo (tzv. polylinker), které je tvořeno řadou krátkých sekvencí rozpoznávaných restrikčními enzymy. Tato sekvence značně usnadňuje práci s vektorem při vkládání inzetrů a při kontrole jejich začlenění. Oblast polylinkeru zpravidla podléhá kontrole silného eukaryotického promotoru (např. long terminal repeat viru Rousova Sarkomu). Dále vektor většinou obsahuje gen rezistence k antibiotiku a počátek replikace (prokaryotní i eukaryotní).



Obrázek 17: Obecné schéma vektoru užívaného při metodě Exon trappingu.

Schéma použití tohoto vektoru je zachyceno na Obrázku 18. Sekvence inzertu je pomocí restričních enzymů přenesena do vektoru a proběhne transfekce eukaryotických buněk, vybavených běžným sestřihovým aparátem (multiproteinový komplex spliceosomu). Jelikož je vektor vybaven silným promotorem, je aktivně produkována pre-mRNA, která je následně sestřihávána. Po izolaci celkové RNA z buněk, se pomocí reverzní transkripce připraví cDNA. Následně lze pomocí PCR analyzovat vzniklý fragment a vzorky podrobit sekvenační analýze.



Obrázek 18: Schéma funkce vektoru Exontrap. Do vektoru Exontrap lze pomocí restričních enzymů vkládat genomové sekvence obsahující potenciální exony a skrze transfekci do eukaryotních buněk lze analyzovat sestřih vkládaných sekvencí.

3. Cíle práce

Cílem této práce bylo:

- Studovat molekulárně genetickou příčinu dysgenezí předního segmentu oka na souboru 12 probandů vyšetřených na Oční klinice 1. LF UK a VFN v Praze
- Přispět k obecnému poznání molekulárně genetických příčin této skupiny chorob
- Zdůraznit a ověřit vhodnost celoexomového sekvenování u této klinické jednotky v diagnostickém procesu
- Ověřit vhodnost metody Exon trappingu pro verifikaci potenciálně sestřihových mutací
- Zlepšit klinické poradenství pacientům a jejich rodinám a tím napomoci při plánování životních cílů a rodičovství, včetně případné preimplantační anebo prenatální diagnostiky

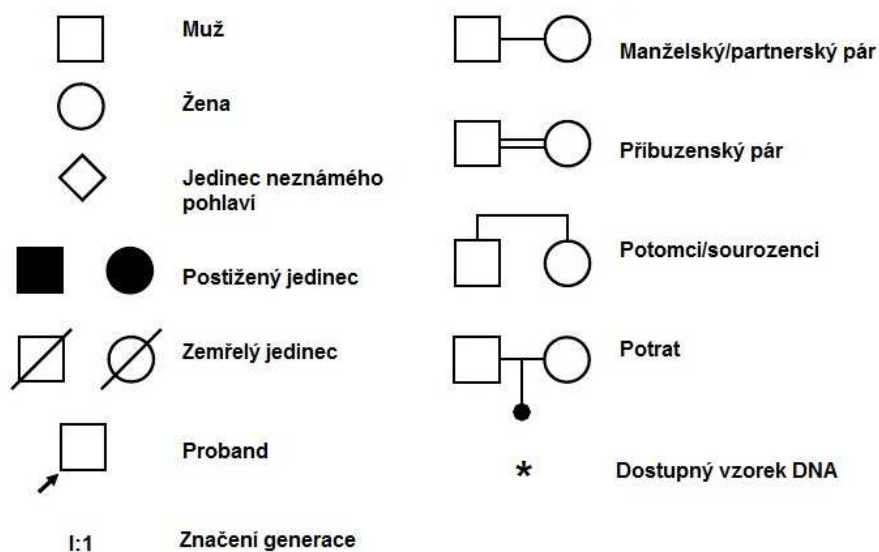
4. Materiál a metody

4.1. Soubor pacientů

Probandi s různým typem vývojových onemocnění oka byli vyšetřeni na Oční klinice 1. LF UK a VFN v Praze. Následně jim byla nabídnuta účast ve výzkumném programu Laboratoře pro studium vzácných onemocnění Kliniky dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN v Praze s cílem zjistit molekulárně genetickou příčinu jejich onemocnění. Účast ve výzkumu byla nabídnuta i všem příbuzným prvního stupně.

4.2. Zakreslování rodokmenů

Rodokmeny byly zakresleny pomocí programu HaploPainter (Thiele & Nurnberg, 2005). Dle informací od pacienta byli vždy vyznačeni postižení i nepostižení jedinci. Tyto informace byly dále upřesněny po absolvování očního vyšetření. Nákres rodokmenu obsahoval standardní symboly (Obrázek 19) odpovídající běžně užívané genealogické nomenklatuře (Bennett *et al.*, 1995). Rodokmeny sloužily především k odhadu typu dědičnosti onemocnění. Dále byly využity při segregáčních analýzách sledujících výskyt konkrétních vzácných variant s onemocněním.



Obrázek 19: Základní genealogické symboly využívané při tvorbě rodokmenů.

4.3. Metody izolace DNA

4.3.1. Izolace DNA z krve

Po přečtení informací pro pacienty (Příloha 1) a podepsání informovaného souhlasu (Příloha 2) bylo probandům a jejich příbuzným odebráno standardně 2 x 6 ml žilní krve (u dětí byl zohledněn věk a váha) do zkumavek s antikoagulačním činidlem EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová). Jedna ze zkumavek byla použita pro izolaci DNA a druhá se uskladnila v -20° C pro případnou kontrolu. DNA byla získávána z jader leukocytů. Izolace DNA probíhala pomocí kitu Puregene Blood Core Kit C firmy QIAGEN (kat. číslo: 158389).

Sada obsahovala:

- **RBC Lysis Solution** – zajišťuje optimální lýzu erytrocytů, šetrný k leukocytům
- **Cell Lysis Solution** – narušuje membrány buněk a umožňuje uvolnění DNA z leukocytů
- **Protein Precipitation Solution** – pufr s vysokou koncentrací solí, snižuje rozpustnost proteinů a umožňuje oddělení proteinů od roztoku s nukleovými kyselinami
- **DNA Hydratation Solution** (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,5) – vytváří vhodné prostředí pro dlouhodobé uskladnění DNA
- **RNase A Solution** – enzymatické odstranění RNA

Dále bylo použito (nebylo součástí kitu):

- 100% isopropanol a 70% etanol – k pročištění a vysrážení DNA

Do 50 ml zkumavek bylo napipetováno 18 ml RBC Lysis Solution a později se k roztoku přidal celý obsah jedné zkumavky s krví (6 ml). Pokud byl objem krve menší než 6 ml (v případě dětí) byly následující objemy roztoků poměrově přepočítány. Směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě a zkumavky byly v průběhu inkubace otáčeny, následovala centrifugace 5 minut při 2000 x g. Poté, co se ve spodní části zkumavky vytvořil pelet s bílými krvinkami, byl supernatant opatrně odstraněn až na přibližně 2,5 ml, které se následně využily k rozsuspendování peletu vortexováním po dobu 10 sekund. Do suspenze bylo přidáno 6 ml Cell Lysis Solution a následovalo vortexování dalších 10 sekund. Směs byla následně inkubována po dobu 2 hodin při teplotě 37° C. Poté se do roztoku přidalo 30 µl RNase A Solution, zkumavka byla několikrát otočena a pak ponechána dalších 15 minut v inkubátoru

na 37° C. Po inkubaci byl vzorek prudce zchlazen na ledu po dobu 5 minut. Bylo přidáno 2,7 ml Protein Precipitation Solution a vzorek byl vortexován po dobu 20 sekund. Následovala centrifugace 10 minut při 2000 x g. Vysrážené proteiny vytvořily na dně zkumavky hutný, tmavě hnědý pelet. Supernatant byl přelit do 50 ml zkumavek, ve kterých bylo připraveno 8,1 ml isopropanolu. Bylo důležité zachovat proteinový pelet uvnitř původní zkumavky. Zkumavky s DNA a isopropanolem byly promíchány. DNA v tomto bodě byla už okem viditelná. Následná centrifugace po dobu 5 minut při 2000 x g už pomohla oddělit DNA ve formě peletu na dně zkumavky.

Supernatant byl opatrně odstraněn a do zkumavky bylo přidáno 6 ml 70% etanolu. Zkumavka byla opět několikrát otočena a následovala poslední centrifugace 5 minut při 2000 x g. Opět byl velmi opatrně odstraněn supernatant. Zkumavky s DNA byly sušeny na absorpčním papíře při pokojové teplotě po dobu 5 – 10 minut. V závislosti na množství DNA bylo do zkumavek přidáno odpovídající množství DNA Hydratation Solution. Směs byla vortexována po dobu 5 sekund a po dobu 1 hodiny byla inkubována při teplotě 65° C.

Koncentrace DNA byla změřena na přístroji NanoDrop 2000/2000c firmy Thermo Fisher Scientific. Následně byl vzorek až do dalších analýz uskladněn při -80° C.

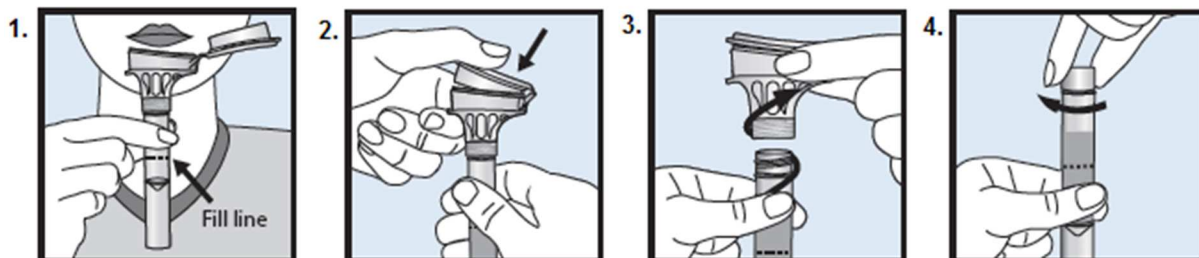
4.3.2. Izolace DNA ze slin

V případech, kdy příbuzným postižených jedinců nebylo možné odebrat vzorek žilní krve, byly použity soupravy pro odběr vzorku slin, které lze využít i k samoodběru. Soupravy Oragene DNA (kat. číslo: OG-500) firmy DNA Genotek umožňují snadný a rychlý odběr a vytváří optimální podmínky pro následnou izolaci DNA z buněk bukalní sliznice, které jsou obsažené ve slinách (Obrázek 20).



Obrázek 20: Součásti kitu Orange DNA. Převzato a upraveno z <http://www.dnagenotek.com>

Výhodou těchto kitů je také skladování při pokojové teplotě, a to i po odběru slin. Ze správně odebraného vzorku je možné izolovat DNA i několik let po odběru. Schematické použití kitu je zobrazeno na Obrázku 21.



Obrázek 21: Schematické znázornění použití kitu pro odběr slin. 1. Sliny (bez bublin) musí naplnit zkumavku až po danou hranici. 2. Po naplnění zkumavky až po hranici je nutné pečlivě zavřít víčko. Ve víčku se nachází roztok, který zachovává optimální prostředí vzorku pro následnou izolaci DNA. Je potřeba víčko zamáčknout pečlivě, aby se veškerá tekutina z víčka uvolnila do zkumavky. 3. Ze zkumavky se odstraní původní víčko. 4. Následně se zkumavka zašroubuje pevným víčkem a obsah je potřeba důkladně promíchat. Zdroj: <http://www.dnagenetek.com>

Samotná izolace DNA ze slin byla následně prováděna pomocí kitu PrepIT-L2P (kat. číslo: PT-L2P-5) stejné firmy – DNA Genetek.

Sada obsahovala:

- **PrepIT-L2P roztok**

Dále bylo potřeba (nebylo součástí kitu):

- 97% a 70% etanol
- TE pufr (10 mM TrisCl, 1 mM EDTA) – pufr vhodný pro dlouhodobé uskladnění DNA

Před samotnou izolací DNA ze vzorku slin bylo potřeba několikrát vzorek řádně promíchat. Následovala inkubace vzorku po dobu 2 hodin při 50° C v inkubátoru. Tento krok zajistil uvolnění DNA z jader buněk. Poté bylo odebráno 500 µl vzorku a k němu přidáno 20 µl PrepIT-L2P roztoku. Po důkladném promíchání byl vzorek inkubován 10 minut na ledu. Vzorek byl následně centrifugován 5 minut při 15 000 x g.

Supernatant byl opatrně odpipetován do čisté zkumavky a bylo přidáno 600 µl 97% etanolu. Zkumavka byla několikrát otočena a inkubována po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Při tomto kroku již bylo možno pozorovat vysráženou DNA. Vzorek byl dále centrifugován 2 minuty při 15 000 x g.

Pipetou byl opatrně odstraněn supernatant tak, aby nebyl poškozen pelet obsahující DNA. Pelet byl převrstven 250 μ l 70% etanolu. Po inkubaci při pokojové teplotě po dobu 1 minuty byl opatrně odstraněn etanol a zkumavka s peletem se sušila 5 minut při pokojové teplotě. Na závěr byl pelet rozpuštěn ve 100 μ l TE pufru a byl inkubován při 50° C po dobu 1 hodiny. Vzorek byl skladován při -80° C.

Výtěžky DNA získané touto metodou ze slin, byly často nižší než po izolaci DNA ze vzorku žilní krve. Výsledná koncentrace DNA byla také měřena na přístroji NanoDrop.

4.4. Návrh primerů a polymerázová řetězová reakce (PCR)

Primery pro amplifikaci kódujících úseků konkrétních genů byly připravovány pomocí volně dostupného programu Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar & Remm, 2007). Během navrhování primerů, byla vždy vybrána právě taková dvojice primerů, která pokrývala nejen oblast zájmu DNA, ale také ještě sekvenci minimálně 50 bp (base pair) na každém konci.

Primery pro PCR reakce z cDNA získávané pomocí vektoru Exontrap byly součástí balení kitu Exontrap pET01 firmy MoBiTec. Primery, včetně délky výsledného produktu, teploty nasedání primerů a referenční sekvence získané z databáze NCBI, jsou uvedeny v Tabulce 2. Primery byly objednávány u firmy Generi Biotech.

PCR reakce

Standardní PCR reakce byla prováděna se směsí Dream Taq Green PCR Master Mix (2x) firmy Thermo Fisher Scientific (kat. číslo: K1081). Jedná se o směs Dream Taq DNA polymerázy, optimalizovaného reakčního pufru (2x), deoxynukleotidů (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) a hořčnatých iontů ($MgCl_2$) s aditivy, stabilizátory a barvivy.

Ve směsi se nachází dvě barviva, která umožňují pozorování průběhu elektroforézy. V 1 % agarózovém gelu migruje modrá barva s fragmenty dlouhými 3-5 kbp a žlutá barva migruje s fragmenty kratšími než 10 bp. PCR reakce měly výsledný objem 20 μ l a jejich jednotlivé složky jsou zobrazeny v Tabulce 3.

Tabulka 2: Sekvence dvojic primerů. FWD (forward) a REV (reverse)

Primer	Sekvence 5'→3'	Teplota nasedání	Délka produktu
Primery pro přímé sekvenování genu <i>PAX6</i> (NG_008679.1, NM_000280.4)			
Ex4 FWD	CCCAAGAGGTTGAGTGGATCA	60°C	387 bp
Ex4 REV	CGAGAAGAGCCAAGCAAACG		
Ex5 FWD	CTGGTGGTCCTGTTGTCCTT	60°C	446 bp
Ex5 REV	ATGAAGAGAGGGCGTTGAGA		
Ex6 FWD	GGGCTACAAATGTAATTTAAGAA	55°C	509 bp
Ex6 REV	AGAGAGGGTGGGAGGAGGTA		
Ex7 FWD	GAGCTGAGATGGGTGACTG	55°C	300 bp
Ex7 REV	GAGAGTAGGGGACAGGCAAA		
Ex8 FWD	TCAGGTAACATCGCA	55°C	719 bp
Ex8 REV	GTTGACTGTAAGGAA		
Ex9 FWD	AGGTGGGAACCAAGTTTGATG	60°C	311 bp
Ex9 REV	CATGGCAGCAGAGCATTAG		
Ex10 FWD	GCTAAATGCTCTGCTGCCAT	60°C	329 bp
Ex10 REV	AGAGTGAGAGTCAGAGCCCG		
Ex11 FWD	CACCACACCGGTAATTTGAA	60°C	329 bp
Ex11 REV	AAGCTCTCAAGGGTGCAGACA		
Ex12 FWD	GAGGCTTGATACATAGGC	55°C	458 bp
Ex12 REV	CCATAAGACCAGGAGATT		
Ex13 FWD	TCCATGTCTGTTTCTCAAAGG	60°C	220 bp
Ex13 REV	TCAACTGTTGTGTCCCATAG		
Primery pro přímé sekvenování genu <i>FOXE3</i> (NG_016192.1, NM_012186.2)			
Ex1A FWD	ACCGTGAACAGAGTAAGGGG	60°C	834 bp
Ex1A REV	CTGTGACGCTGAACAGAC		
Ex1B FWD	CAAGGGCAACTACTGGACG	60°C	699 bp
Ex1B REV	ACGGAGAAGGATGTAGCAGG		
Primery pro metodu Exon trappingu			
c.1032+1G>A FWD	TTTCCTAGAGACAGAGGTGCTTG	60°C	828 bp
c.1032+1G>A REV	CCCACCACCACCAACATTAT		
c.1183+1G>T FWD	TGGCAACCATCTAGCTGGACA	60°C	664 bp
c.1183+1G>T REV	TGCAGTCTCAGGCCTTGTCTT		
Primery pro analýzu fragmentu získaného pomocí Exon trappingu			
Exontrap PCR-primer2	GATCTGCTTCCTGGCCC	60°C	
Exontrap PCR-primer3	GGCACTGGAGGTGGC		
TOPO M13 REV	CAGGAAACAGCTATGAC	60°C	
TOPO M13 FWD	CTGGCCGTCGTTTTAC		

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro jeden vzorek PCR.

Výsledný objem:	20 µl
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	10 µl
FWD primer	0,5 µl
REV primer	0,5 µl
Templátová DNA	2 µl
MiliQ H ₂ O	7 µl

Samotná reakce byla prováděna v termocykleru MyCycler společnosti Bio-Rad. Nastavení přístroje a doby trvání jednotlivých cyklů jsou uvedeny v Tabulce 4.

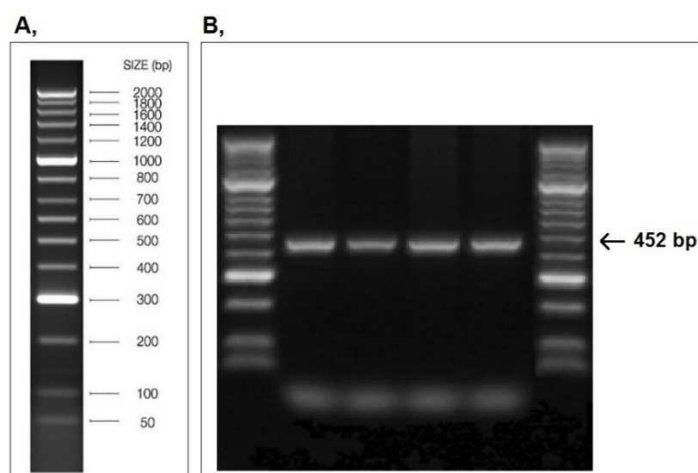
Tabulka 4: Teplotní profil PCR reakce.

Program	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	3 minuty	1x
Denaturace DNA	94	45 sekund	30x
Nasedání primerů na DNA	Dle použitých primerů (viz. Tabulka 2)	30 sekund	
Syntéza DNA (elongace)	72	30 sekund	
Závěrečná syntéza DNA	70	5 minut	1x
Zchlazení vzorku	4	∞	1x

4.5. Elektroforéza PCR produktů

Kontrola produktů byla prováděna pomocí horizontální elektroforézy v 1 % agarózovém gelu ponořeném v TBE pufru (Tris/Borát/EDTA). Pro rozpuštění agarózy byl použit TBE pufr. Vizualizace DNA byla zajištěna fluorescenční barvičkou GelRed firmy Biotium (kat. číslo: 41003).

Po zatuhnutí gelu a jeho umístění do elektroforézní vany spolu s TBE pufrem se do vytvořených jamek v gelu nanášely vzorky s produkty PCR reakcí, vždy po 5 μ l. Jako kontrola délky DNA fragmentů se do jamek v gelu přidal žebříček HyperLadder 50bp firmy Bionline (kat. číslo: BIO-33054) spolu s barvičkou DNA Loading Buffer Blue 5x stejné firmy (kat. číslo: BIO-37045). Do jedné jamky bylo nanášeno vždy 5 μ l žebříčku a 1 μ l barvičky. Detailní vizualizace takovéto kontroly je znázorněna na Obrázku 22.



Obrázek 22: Vizualizace fragmentů pomocí gelové elektroforézy. A, dsDNA žebříček v 1,5% agarózovém gelu. Převzato a upraveno z www.bionline.com. **B,** příklad kontroly produktů PCR genu *PAX6*, exonu 12 s velikostí 452 bp v 1 % agarózovém gelu.

Následovalo rozdělení fragmentů při napětí 100 V po dobu 30 minut. Gel byl analyzován pomocí UV transluminátoru firmy Ultra-Lum, Inc.

4.6. Přímé sekvenování dle Sanger

V případech, kdy klinický nález probandů naznačoval korelaci s konkrétním genotypem (mutaci v jednom konkrétním genu), bylo provedeno přímé sekvenování kódujících úseků tohoto genu. Metodou přímého sekvenování se také ověřovaly varianty nalezené pomocí celoexomového sekvenování (Kapitola 4.9.).

Pro sekvenační reakce byly využívány PCR produkty získané pomocí specifických primerů amplifikující exony a přilehlé intronové úseky konkrétních genů (viz. Kapitola 4.4.). Pro purifikaci PCR vzorků byla využívána směs ExoSAP-IT firmy Thermo Fisher Scientific (kat. číslo: 78201.1.ML). Tento roztok enzymaticky odstraní všechny nevyužité deoxynukleotidy a primery a také konzervuje PCR produkt pro následné optimální sekvenování. Do vzorků byly přidány 2 µl roztoku a na termocycleru byla směs inkubována při 37° C po dobu 15 minut pro optimální degradaci nevyužitých primerů a nukleotidů. Následně byla směs zahřata na 80° C po dobu 15 minut, přičemž byly inaktivovány složky směsi ExoSAP-IT.

Do pročištěných vzorků v objemu 5 µl byly následně přidávány příslušné primery naředěné dle požadavků sekvenační laboratoře (Core facility Genomika, PřF UK, Biocev, <https://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna>). Na tomto pracovišti se používají tři sekvenační analyzátory: čtyřkapilární 3130 Genetic Analyzer, šestnáctikapilární 3130xl Genetic Analyzer a dvacetičtyřkapilární 3500 Genetic Analyzer od firmy Applied Biosystems.

4.7. Analýza sekvencí

Výsledné sekvence získané metodou Sangerova sekvenování byly sekvenační laboratoří zasílány ve formátu Chromatogram file (.seq). Sekvence byly manuálně analyzovány a porovnávány s referenčními sekvencemi v programu Chromas společnosti Technelysium.

V případě nálezu varianty byl její výskyt zkontrolován v populační databázi gnomAD (Revill *et al.*, 2003). Tato databáze představuje konsenzus exomových a genomových dat více než 120 000 jedinců. Četnost výskytu varianty v databázi naznačuje, zda se jedná o běžný

polymorfismus, nebo zda by se mohlo jednat o potenciálně patogenní variantu. V případě nálezu varianty bez frekvence, byly prohlédávány databáze sdružující známé patogenní varianty (např. HGMD, LOVD) a literatura na dané téma s cílem zjistit, zda detekovaná změna již byla v minulosti s onemocněním spojována. Pokud se jednalo o zcela novou, nepopsanou variantu způsobující aminokyselinovou záměnu, byla vyhodnocena softwarovými nástroji: PolyPhen2 (Adzhubei *et al.*, 2010), MutPred (Li *et al.*, 2009), MutationTaser2 (Schwarz *et al.*, 2014), SIFT a SNPs&GO (Calabrese *et al.*, 2009). Potenciálně sestřihové varianty byly hodnoceny pomocí Human Splicing Finder (Desmet *et al.*, 2009), NNSPLICE (Reese *et al.*, 1997) a NetGene2 (Brunak *et al.*, 1991). Tyto programy pracují na základě různých algoritmů a dle kombinace výsledků těchto programů lze variantu prohlásit za pravděpodobně patogenní nebo za pravděpodobně benigní. Pro klasifikaci mutací a správnou nomenklaturu byl využíván program Mutalyzer 2.0.26 (Wildeman *et al.*, 2008; Vis *et al.*, 2015).

4.8. Celoxomové sekvenování

Metoda celoxomového sekvenování byla použita v případě probandů, jejichž klinický obraz byl v literatuře spojován s mutacemi ve více genech.

Celoxomové sekvenování bylo zprostředkováno firmou Macrogen Korea a prováděno na analyzátoru HiSeq 4000 firmy Illumina. Příprava DNA knihovny proběhla pomocí SureSelectXT Library Prep Kitu a samotná sekvenace pomocí TruSeq 3000/4000 SBS Kitu v3. Výsledné sekvence byly převedeny do formátu tzv. hrubých dat pro následnou analýzu. Data byla firmou přezkoumána pomocí HCS (HiSeq Control Software v3.3) programu a následně ještě dodatečně ověřena primární analytickým softwarem RTA (Real Time Analysis. v2.7.3).

Sekvence ve formátu FASTAQ byly dále mapovány na sekvenci lidského referenčního genomu (UCSC Genome Browser hg19) v programu Novoalign firmy NovoCraft. Mapované sekvence byly konvertovány do formátu BAM. Výsledná data byla zpracována do podoby tabulky obsahující informace o pozici varianty, informaci o kvalitě přečtení, o typu varianty, její anotaci a frekvenci v databázi gnomAD. V některých případech (například pro ověření dostatečného počtu čtení konkrétního úseku DNA) byla data prohlížena v programu IGV (Integrative Genomics Viewer).

V potaz byly vždy brány varianty s četností $< 0,006$ (0,6 %). Přítomnost pravděpodobně patogenní mutace zjištěné pomocí celoxomového sekvenování, byla následně ověřena pomocí Sangerova sekvenování, stejně jako její segregace v rodině.

4.9. Funkční analýzy – Exon trapping

Pro ověření a potvrzení patogenicity potenciálně sestřihových mutací byl použit Exontrap vektor pET01 firmy MoBiTec (kat. číslo: K2010).

4.9.1 Příprava vzorků

Ve formě inzertu byly do Exontrap vektoru vkládány sekvence získané PCR reakcí podle templátu DNA pacientů. Jelikož byly tímto způsobem ověřovány dvě potenciálně sestřihové varianty, bylo nutno připravit a použít dvě sady primerů, specifické pro tyto varianty (viz. Tabulka 2). Před samotným vložením inzertů do vektoru Exontrap, bylo potřeba sekvence naklonovat do bakteriálního plasmidu pro namnožení, purifikaci a kontrolu. Tímto způsobem se také oddělí DNA vlákno s mutovanou alelou od alely divokého typu (wild type). Pro začlenění sekvence inzertu do klonovacího vektoru je potřeba PCR produkt s tupými konci, který byl získán pomocí AccuPrime Pfx SuperMix firmy Invitrogen (kat. číslo: 12344040). Tento mix obsahuje Accu Prime Pfx polymerázu s 3'→5' exonukleázovou aktivitou (tzv. proofreadingová aktivita). Složky PCR reakce jsou znázorněny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Složky reakční směsi. Směs pro namnožení úseku DNA vhodného pro inzerci do plasmidového vektoru.

Výsledný objem	33 µl
AccuPrime Pfx SuperMix 1x	30 µl
FWD primer	0,5 µl
REV primer	0,5 µl
Templátová DNA	2 µl

Byly připraveny 4 PCR, přičemž byla použita vždy jedna sada primerů pro DNA pacienta a pro DNA kontroly (DNA izolovaná z HeLa buněk). Teplotní profil reakcí je uveden v Tabulce 6.

Tabulka 6: Teplotní profil PCR.

Program	Teplota [°C]	Čas	Opakování
Počáteční denaturace (HOT START)	95	5 minut	1x
Denaturace DNA	95	30 sekund	35x
Nasedání primerů na DNA	60	30 sekund	
Syntéza DNA (elongace)	72	1 minuta	
Závěrečná syntéza DNA	72	5 minut	1x
Zchlazení vzorku	4	∞	1x

Po dokončení PCR se vzorky nanášely na 1% agarózový gel připravený v TAE pufru (Tris/Kys.ledová/EDTA). Na gel byly vzorky nanášeny v celém svém objemu 33 μ l. Při nanášení vzorků byla vždy jedna jamka vynechána, aby se předešlo kontaminacím při izolaci z gelu. Příprava gelu a následná elektroforetická separace fragmentů proběhla stejně, jak je popsáno v Kapitole 4.5.

4.9.2. Izolace DNA z gelu

Jelikož je DNA extrémně náchylná na poškození UV zářením, proběhla izolace z gelu následujícím způsobem: po krátké vizualizaci UV světlem, byla do gelu zapíchnuta preparační lžička ve spodní části proužku. Až po preparaci proužků mohl být gel opět nasvícen a zkontrolován, popřípadě vyfocen. Izolace DNA z gelu proběhla pomocí komerčního kitu QUAEX II Gel Extraction Kit firmy QIAGEN (kat. číslo: 20021).

Sada obsahovala:

- QIAEX II suspension
- BufferQX1
- Buffer PE

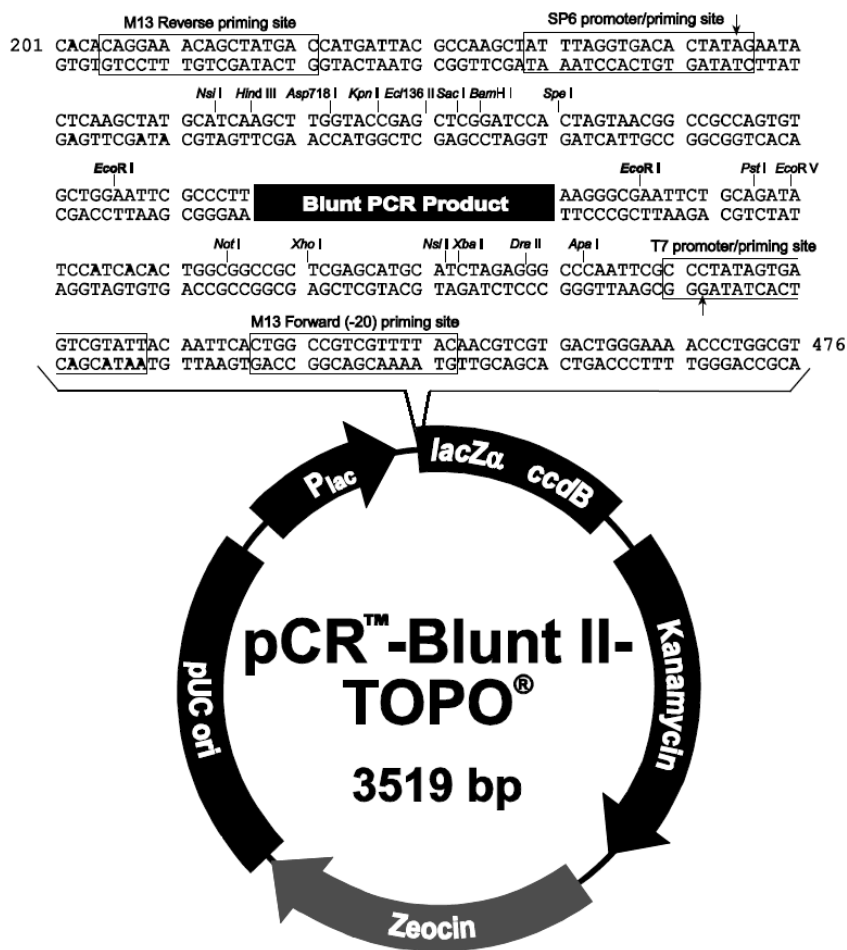
K vypreparovanému proužku/vzorku byl přidán odpovídající objem pufru BufferQX1 podle velikosti DNA fragmentu a podle hmotnosti gelu. Jelikož fragment DNA spadl do rozmezí 100 bp – 4 kb, byl do zkumavky přidán 3-násobný objem proužku. Po přidání Buffer QX1, byl připraven roztok QIAEX II, který bylo potřeba důkladně promíchat na vortexu po dobu 30 sekund a následně bylo přidáno do každé zkumavky s gelem po 30 μ l. Poté byly vzorky inkubovány při 50° C po dobu 10 minut. Každé 2 minuty byl vzorek důkladně promíchán. Po skončení inkubace následovala centrifugace při 17 900 x g. Poté byl odsát veškerý supernatant. Pelet byl rozpuštěn v 500 μ l roztoku Buffer QX1. Vzorek byl přenesen do zešikmené zkumavky pro lepší práci s peletem. Následovala krátká centrifugace 15 sekund při 17 900 x g. Opět byl odstraněn všechen supernatant. Poté byl pelet 2x promyt v 500 μ l roztoku Buffer PE. Vzorek byl opět promíchán a centrifugován. Nakonec se ze zkumavky odsál veškerý supernatant a pelet se nechal vysušit v otevřené zkumavce při pokojové teplotě po dobu 10 – 15 minut. Ke každému vzorku se přidalo 20 μ l EB pufru (10 mM Tris-Cl) firmy QIAGEN (kat. číslo: 19086). Vzorek byl promíchán pomocí vortexu a nechal se po dobu 5 minut rozpouštět při pokojové teplotě. Následně byl vzorek naposledy centrifugován, poté byl odsát veškerý supernatant, který již

obsahoval výsledný PCR fragment. Koncentrace PCR fragmentů byla změřena na přístroji Qubit firmy Invitrogen pomocí kitu Qubit dsDNA HS Assay firmy Thermo Fisher Scientific (kat. číslo: Q3285). Vzorky byly do dalšího použití uskladněny v lednici.

4.9.3 Klonování

Inzert ve formě DNA fragmentu (PCR produkt vyizolován z gelu) byl následně vkládán do bakteriálního vektoru (plasmidu) a vnášen do kompetentních bakterií *E. coli*. Pro účely klonování byl vybrán TOPO vektor, jako součástí balení kitu Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit firmy Invitrogen (kat. číslo: 450245).

Zkrácená mapa tohoto vektoru je znázorněna na Obrázku 23. Selekcí buněk nesoucích tento plasmid zajistil gen rezistence k antibiotiku kanamycinu, který TOPO vektor ve své sekvenci obsahuje.



Obrázek 23: Mapa TOPO vektoru. Vektor je dlouhý 3519 nukleotidů. Zkrácená mapa zobrazuje místa pro restriční enzymy a sekvence pro forward i reverse primery. Zdroj: www.lifetechnologies.com

Ligační směs byla připravena v objemu 3 μ l a je podrobně popsána v Tabulce 7. Ligace proběhla při pokojové teplotě a následně byla směs přidána k 120 μ l kompetentních *E. coli* buněk (TOP10, Thermo Fisher Scientific, kat. číslo: C404010). Transformační účinnost těchto buněk je 1×10^5 cfu/ μ g. Po přidání ligační směsi byly buňky 30 minut ponechány na ledu a následně přeneseny do vodní lázně s teplotou 42° C na 30 sekund. Jelikož rezistence ke kanamycinu je zprostředkována enzymem zneškodňující toto antibiotikum, bylo potřeba ponechat buňkám dostatek času pro jeho syntézu. Buňky byly jednu hodinu při teplotě 37° C protřepávány a až poté byly vysety na misky s antibiotikem.

Tabulka 7: Jednotlivé složky ligační směsi.

Výsledný objem:	3 μ l
Inzert (DNA izolovaná z gelu)	0,5 - 2 μ l (cca 8 -15 ng)
Vektor pCR-Blunt II-TOPO	0,5 μ l (cca 5 ng)
Roztok solí (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)	0,5 μ l
H ₂ O	0,0 – 1,5 μ l (do výsledného objemu)

Buňky byly pomocí kličky přeneseny na agarové plotny s přídatkem kanamycinu. Misky byly přes noc kultivovány při teplotě 37° C a ráno proběhl odběr jednotlivých kolonií. Kolonie byly přenášeny do zkumavek s Luria-Bertani médiem (2 ml) s přídatkem kanamycinu v poměru 1:1000 (2 μ l). Z každé misky bylo odebráno 12 izolovaných a ohraničených kolonií. Kultivace proběhla opět přes noc při teplotě 37° C při soustavném provzdušňování.

4.9.4 Izolace plasmidové DNA

Izolace DNA z bakteriální kultury byla provedena pomocí komerčního kitu QIAprep Spin Miniprep firmy QIAGEN (kat. číslo: 27104).

Sada obsahovala:

- **P1 roztok** – 25 mM TRIS pufr, 10 mM EDTA, 1 % glukosa
- **P2 roztok** – 0,2 M NaOH, 1 % SDS
- **P3 roztok** – 5 M KAc/HAc
- **TER pufr** – 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, RNasa
- **TE pufr** - 1mM EDTA, 10 mM TRIS

Dále bylo použito (nebylo součástí kitu):

- Isopropanol a 80% etanol

Po 14 hodinách (kultivace přes noc) byly buněčné kultury přelévány do 2 ml zkumavek. Zkumavky byly následně centrifugovány při 17 900 x g po dobu 2 minut. Supernatant byl odstraněn odsávacíčkou a pelet, jenž obsahoval buňky z kultury, byl resuspendován v roztoku P1 (300 µl). Do zkumavky bylo následně přidáno 300 µl roztoku P2 a po opatrném promíchání také 300 µl roztoku P3. Zkumavky byly poté opět centrifugovány při 17 900 x g po dobu 10 minut. Supernatant byl opatrně odebrán tak, aby nedošlo k poškození peletu a poté byl přenesen do čisté zkumavky, kde k němu bylo přidáno 500 µl isopropanolu a směs byla opatrně promíchána. Následovala centrifugace při 17 900 x g po dobu 5 minut. Supernatant byl opatrně odsát. Pelet obsahující DNA byl rozpuštěn v 250 µl 80% etanolu. Následovala závěrečná centrifugace při 17 900 x g po dobu 5 minut. Veškerý etanol byl pečlivě odstraněn a pelety byly sušeny při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Pelet byl na závěr převrstven 30 µl směsí TE a TER pufru v poměru 1:1. Zkumavky byly na 30 minut přeneseny do 37° C a následně uchovávány v -20° C.

4.9.5 Kontrola začlenění inzertu

Ze získaných plasmidových DNA bylo odebráno 5 µl pro štěpení restriktčním enzymem, jako kontrola pro začlenění inzertu do vektoru. Pro tuto kontrolu byl použit enzym EcoRI, jelikož TOPO vektor obsahuje dvě místa pro štěpení tímto enzymem, která těsně ohraničují prostor začlenění inzertu do vektoru. Po následné elektroforetické separaci lze rozlišit vyštípnutý kus DNA inzertu v definované délce. Připravené reakční směsi v celkovém objemu 20 µl (Tabulka 8) byly po dobu 2 hodin ponechány při 37° C. Následně byly vzorky nanášeny na 1 % agarózový gel a po elektroforetické separaci byla zkontrolována délka vyštěpených fragmentů.

Tabulka 8: Složky reakční směsi. Jednotlivé složky směsi pro štěpení restriktčním enzymem EcoRI.

Složka směsi:	Objem:
Vzorek plasmidové DNA	5 µl
EcoRI enzym	0,5 µl
EcoRI pufr	2 µl
MiliQ H ₂ O	12,5 µl

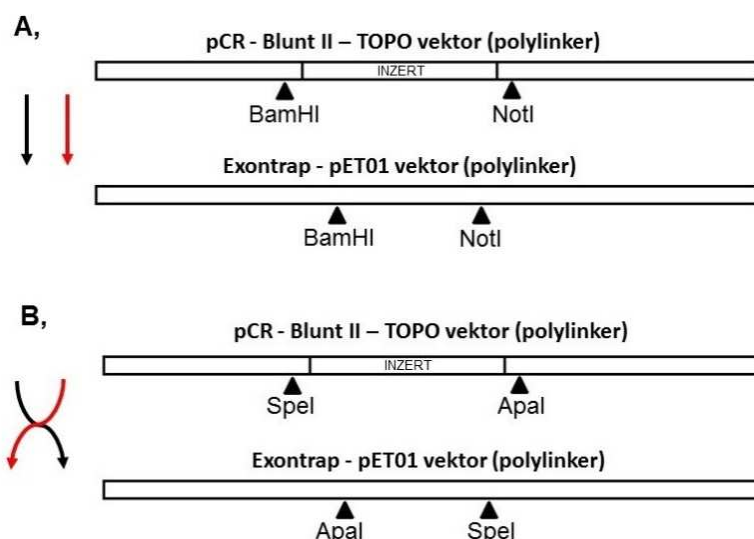
Pomocí plasmidových primerů (součást balení vektoru pCR-Blunt II-TOPO) byly připraveny PCR reakce pro následné sekvenování. Tyto primery jsou uvedeny v Tabulce 2 a jsou také zachyceny na Obrázku 19. Sekvenace inzertů pomohla určit, zda se jedná

o mutovanou alelu nebo o alelu divokého typu. Byla také určena orientace inzertu v plasmidu a mohla být naplánována strategie štěpení inzertu a vektoru Exontrap tak, aby po ligaci zůstala zachována správná orientace inzertu.

4.9.6 Štěpení restrikčními enzymy a ligace

Po sekvenaci vzorků byly vybrány pro každou variantu dva vzorky: jedna s mutovanou alelou a jedna s divokou alelou. Inzerty v plasmidech byly uloženy v obou orientacích (po i proti směru transkripce). Inzerty začleněné “opačně” (proti směru transkripce) bylo potřeba do vektoru Exontrap vložit obráceně.

Pro vyjmutí inzertů z TOPO vektoru a jejich následné vložení do vektoru Exontrap, bylo potřeba vhodně připravit dvojité štěpení restrikčními enzymy pro tvorbu specifických konců inzertů a vektoru pro zachování správné orientace inzertů. Během přípravy tohoto experimentu byly použity *in silico* online softwarové programy, jako například Double Digest Finder firmy New England Biolabs, nebo The Sequence Manipulation Suite. Nezbytná byla také detailní znalost map obou vektorů, především pak oblastí jejich polylinkerů. Pro inzerty uloženy v TOPO vektoru po směru transkripce byly vybrány enzymy BamHI a NotI. Pro obrácení inzertů uloženy naopak byly vybrány enzymy SpeI a ApaI. Tyto strategie jsou graficky znázorněny na Obrázku 24. Obě strategie byly také použity na Exontrap vektor.



Obrázek 24: Schéma strategie štěpení restrikčními enzymy. V případě správné orientace (po směru transkripce) inzertu ve vektoru byla aplikována strategie **A** a orientace byla zachována. V případě obrácené orientace inzertu (proti směru transkripce) byla použita strategie **B** a inzert byl po ligaci do Exontrap vektoru začleněn správně.

Toto štěpení zajistilo, že vyštěpená sekvence inzertu byla začleněna do stejně štěpeného vektoru, a to v přesně definované orientaci, díky specifitě vzniklých „lepivých“ konců.

Jednotlivé složky reakčních směsí obou strategií jsou uvedeny v Tabulce 9. V případě strategie A, byla reakční směs ponechána po dobu 2 hodin při 37° C, což je teplota optimální pro aktivitu obou použitých enzymů. V případě strategie B byla reakční směs prvních 30 minut ponechána při pokojové teplotě (20 – 25° C), což je optimální teplota pro aktivitu enzymu ApaI a následně byla směs přenesena do 37° C na další 1 hodinu a 30 minut, aby bylo dosaženo optimálních inkubačních podmínek pro enzym SpeI. Po enzymatickém štěpení Exontrap vektoru, byla do směsi přidána alkalická fosfatáza, která odstraní fosfát z 5' konce molekuly a zabrání tak cirkularizaci vektoru bez začleněného inzertu.

Tabulka 9: Složky reakční směsi. Složky použité při dvojitém štěpení restrikčními enzymy. Při štěpení Exontrap vektoru byla na závěr použita alkalická fosfatáza.

Složka reakční směsi	Objem	Složka reakční směsi	Objem
Strategie A (štěpení enzymy BamHI a NotI)		Strategie B (štěpení enzymy SpeI a ApaI)	
Plasmidová DNA / Exontrap	3 µl / 7 µl	Plasmidová DNA / Exontrap	3 µl / 7 µl
Cut Smart pufr (10x)	6 µl	Cut Smart pufr (10x)	6 µl
BamHI	1,5 µl	SpeI	2 µl
NotI	1,5 µl	ApaI	1 µl
MiliQ H ₂ O	48 µl / 44 µl	MiliQ H ₂ O	48 µl / 44 µl

Po ukončení inkubace byly vzorky nanесeny na gel a elektroforeticky rozděleny. Proužky, obsahující DNA inzertů nebo štěpený vektor Exontrap, byly vypreparovány z gelu pomocí komerčního kitu, jako je popsáno v Kapitole 4.9.2.

Ligace štěpených inzertů a komplementárně štěpených vektorů proběhla v malém objemu a jednotlivé složky ligační směsi jsou uvedeny v Tabulce 10. Ligační směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 minut a následně byla vkládána rovnou do kompetentních buněk.

Tabulka 10: Složky ligační směsi. Byl vždy použit komplementárně štěpený vektor a inzert.

Složka ligační směsi:	Objem:
Vektor Exontrap	2 µl
Inzert	3 µl
T4 DNA ligáza	1 µl
T4 DNA ligáza – pufr (10x)	1 µl
MiliQ H ₂ O	3 µl

4.9.7 Klonování Exontrap vektoru spolu s inzertem

Pro získání většího množství vektoru, a také pro snadnou kontrolu, byla ligační směs opět vkládána do kompetentních buněk *E. coli* TOP10. Pomocí 5 µl ligační směsi bylo transformováno 100 µl kompetentních bakterií. Bakterie byly nanесeny na Petriho misky s agarem s přidavkem antibiotika ampicilinu. Misky byly inkubovány přes noc (cca 14 hodin) při 37° C. Následně bylo z každé misky vybráno 6 jasně ohraničených izolovaných kolonií a pomocí špičky byly přeneseny do zkumavky s Luria-Bertani médiem s přidavkem ampicilinu v poměru 1:1000. Následovala inkubace při 37° C po dobu 14 hodin při soustavném provzdušňování. Po skončení kultivace byla z kultur izolována plasmidová DNA pomocí komerčního kitu QIAprep Spin Miniprep. Postup je popsán v Kapitole 4.9.4.

Po skončení izolace bylo odebráno 5 µl plasmidové DNA a pro kontrolu bylo provedeno štěpení restriční enzymem KpnI. Místa štěpení tohoto enzymu jsou znázorněny v místě polylinkeru Exontrap vektoru (pET01) na Obrázku 19. Složky reakční směsi jsou uvedeny v Tabulce 11.

Tabulka 11: Složky reakční směsi použité pro enzymatické štěpení Exontrap vektoru enzymem KpnI.

Složka směsi:	Objem:
Vzorek plasmidové DNA	5 µl
KpnI enzym	2µl
KpnI pufr	2 µl
MiliQ H ₂ O	12,5 µl

4.9.8 PCR kontrola

Jako dodatečná kontrola začlenění inzertu byla provedená také PCR reakce s „vnějším primerem“ (komplementární k sekvenci vektoru) a „vnitřním primerem“ (komplementární k sekvenci inzertu).

Pokud byl inzert ve vektoru orientován správně (po směru transkripce), namnožený úsek měl definovanou délku odpovídající délce inzertu a několika desítek bp okolo (po vyštěpení restričními enzymy). Pokud by byl inzert orientován naopak, výsledný produkt měl pouze několik málo bp a byl by těžko zachytitelný na gelu. Složky reakční směsi jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12: Složky směsi pro PCR. PCR kontrola správné orientace inzertu v plasmidu.

Celkový objem:	20µl
Templátová DNA (vektor Exontrap včetně inzertu)	1 µl
Vnější primer (FWD)	0,5 µl
Vnitřní primer (REV)	0,5 µl
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	10 µl
MiliQ H ₂ O	8 µl

4.9.9 Buněčné linie a transfekce

Pro transfekci byly vybrány buňky „Human Embryonic Kidney“ (HEK) 293T firmy ATCC (kat. číslo: CRL-3216). Tato buněčná linie byla vybrána především proto, že přirozeně obsahuje aparát zajišťující pre-mRNA posttranskripční modifikace.

Buňky byly po rozmražení z -80° C přeneseny na misky s ohřátým kompletním médiem (Tabulka 13). Pak byla provedena jedna pasáž a buňky byly nasazeny na misky o průměru 60 mm. Samotná transfekce proběhla 1 den po pasáži.

Tabulka 13: Složky kultivačního média pro HEK293T buněčnou linii.

Složka média	Objem (1 l)
Dulbecco's Modified Eagle's Medum (DMEM) High Glucose Firmy Sigma Aldrich (kat. číslo: D6429-1L)	880 ml
Inaktivované fetální bovinní sérum Firmy Thermo Fisher Scientific (kat. číslo: 10270106)	100 ml
Antibiotikum Pen Strep Firmy Thermo Fisher Scientific (kat. číslo: 15140122)	10 ml

4.9.10 Transfekce

Jako transfekční reagens bylo použito FuGENE HD transfection reagent firmy Promega (kat. číslo: E2311). Byly připraveny 4 zkumavky s 500 µl média DMEM (bez séra a antibiotik) a do každé zkumavky bylo přidáno 9 µl FuGENE HD. Po promíchání byly do každé zkumavky přidány 3 ng různé plasmidové DNA (pro obě varianty jak divoká, tak mutovaná alela) tak, aby v každé reakci bylo 9 µl FuGENE HD na 1 µg plasmidové DNA (3:1).

Jako kontrola bylo do každé transfekční směsi přidáno 200 ng pEPGFP C1 firmy Addgen (kat. číslo: 6085-1). Jedná se o plasmid, nesoucí gen pro zelený fluorescenční protein (GFP), který se v menším množství také začlení do buněk a umožní vizuální kontrolu

transfekce pod fluorescenčním mikroskopem. Následně byla směs ve svém plném objemu opatrně přidávána rovnou na buňky v obohaceném médiu. Buňky byly ponechány po dobu dvou dnů při 37° C.

4.9.11 Izolace RNA

Po kontrole GFP signálu byly buňky sklizeny z misek. Po odstranění média, byly opatrně propláchnuty PBS pufrem (Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr s 0,15 M NaCl) a nakonec, za přítomnosti 1 ml tohoto pufru, mechanicky (gumovou špachtlí) odstraňovány z podkladu. V tomto objemu byly buňky přeneseny do zkumavek a v centrifuze stočeny po dobu 1 minuty při 12 000 x g. Supernatant byl opatrně odstraněn pomocí pipety. RNA byla izolována z peletu buněk na dně.

Izolace RNA proběhla pomocí TRIzolu firmy Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (kat. číslo: 15596026).

Sada obsahovala:

- **TRIzol Reagent**

Dále bylo potřeba:

- Isopropanol
- 75% etanol
- Chloroform
- Voda zproštěna RNáz

V průběhu celé izolace RNA byla zachována vysoká čistota práce. Izolace probíhala v laminárním boxu a při pipetování byly používány špičky s filtry. Na pelet buněk byl přidán 1 ml TRIzolu a vše bylo důkladně propipetováno. Následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Do zkumavek bylo následně přidáno 200 µl chloroformu. Směs byla opatrně promíchána otáčením zkumavek. Následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Směs byla po skončení inkubace centrifugována 15 minut při 12 000 x g.

Vrchní vodná fáze byla odebrána a přenesena do čisté zkumavky. Na vodnou fázi bylo nanášeno 500 µl isopropanolu a směs byla ponechána při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Směs byla poté centrifugována 10 minut při 12 000 x g. Supernatant byl opatrně odstraněn a pelet byl rozpuštěn v 1 ml 75% etanolu. Následovala centrifugace 10 minut při 7 500 x g.

Veškerý supernatant byl odstraněn a pelet byl 10 minut sušen v laminárním boxu při pokojové teplotě. Pelety byly rozpuštěny v 50 μ l vody zbavené RNáz.

Koncentrace RNA byla měřena na přístroji Nanodrop, podobně jako v předešlých krocích DNA. Následně byla RNA zkontrolována pomocí gelové elektroforézy na 1% gelu.

4.9.12 Příprava cDNA

Příprava cDNA proběhla pomocí kitu SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit firmy Invitrogen (kat. číslo: 11754050). Složky reakční směsi jsou uvedeny v Tabulce 14. Směs byla ponechána 10 minut při pokojové teplotě a následně byla inkubována 60 minut při 42° C. Následovala závěrečná inkubace 5 minut při 85° C. cDNA byla skladována v -20° C.

Tabulka 14: Složky reakční směsi.

Celkový objem:	20 μl
5x VILO Reaction Mix	4 μ l
10x SuperScript Enzyme Mix	2 μ l
Templátová RNA	1,3 – 1,7 μ l (1 μ g)
MiliQ H ₂ O	12,3 – 12,7 μ l

4.9.13 Kontrola transkriptu

Připravená cDNA byla následně použita jako templát pro PCR reakci, pro kterou byly použity sekvenační primery (součást balení vektoru Exontrap). Jednalo se o primery Exontrap PCR-primer2 (FWD) a Exontrap PCR-primer3 (REV), které jsou uvedeny v Tabulce 2. PCR produkty byly osekvenovány a sekvence byly dále analyzovány.

5. Výsledky

V rámci diplomové práce bylo v Laboratoři pro studium vzácných onemocnění Kliniky dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN v Praze molekulárně geneticky vyšetřeno 12 probandů (A-L). Pro účely tohoto vyšetření byla probandům odebrána venózní krev, ze které proběhla izolace DNA (viz. Kapitola 4.3.) Výsledné koncentrace DNA probandů jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15: Čistota a koncentrace DNA.

Proband	Koncentrace DNA ng/μl	260/280	260/230
A	120,52	1,80	-8,49
B	339,22	1,81	4,1
C	287,32	1,88	2,23
D	436,02	1,81	6,57
E	326,09	1,78	14,29
F	728,63	1,79	1,51
G	808,69	1,83	2,70
H	1827,57	1,86	3,50
I	897,63	1,84	5,14
J	364,93	1,89	1,9
K	304,60	1,86	1,89
L	305,20	1,67	1,34

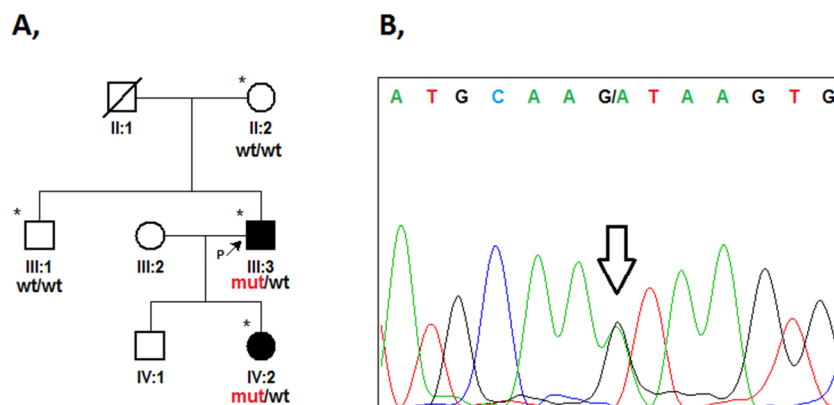
Jelikož u probandů A-C bylo klinické vyšetření v souladu s diagnózou aniridie, a ta je ve většině případů spojována s mutacemi v genu *PAX6*, bylo u těchto probandů provedeno přímé sekvenování kódujících exonů tohoto genu (exon 4 -13).

U probandů D-L byla klinická diagnóza buď nejasná (oční nález změněn po mnohočetných operacích v dětství a nebylo tedy možno určit výchozí stav), nebo byla stanovená diagnóza asociována s mutacemi ve více genech. Z tohoto důvodu byla DNA těchto probandů odesílána k celoexomovému sekvenování.

5.1. Nalezené patogenní varianty

U probanda A byla v genu *PAX6* nalezena v heterozygotním stavu varianta za exonem 11: c.1032+1G>A, která již byla popsána v literatuře jako patogenní (Gronskov *et al.*, 1999;

Redeker *et al.*, 2008). Predikční programy tuto variantu vyhodnotily také jako patogenní – ovlivňující sestřih (Tabulka 16). K dispozici byly vzorky DNA tří příbuzných prvního stupně, pomocí kterých se podařilo ověřit segregaci varianty s onemocněním v rodině. Vzhledem k výše uvedenému jí bylo možné prohlásit za kauzální. Efekt této varianty na vzniklý protein byl dále ověřován metodou Exon trappingu (viz. Kapitola 5.2.). Rodokmen a sekvenogram probanda jsou zachyceny na Obrázku 25.



Obrázek 25: Výsledek molekulární genetiké analýzy v rodině A. A, Rodokmen spolu se segregací v rodině. B, Sekvenogram se zachycenou variantou c.1032+1G>A (program Chromas).

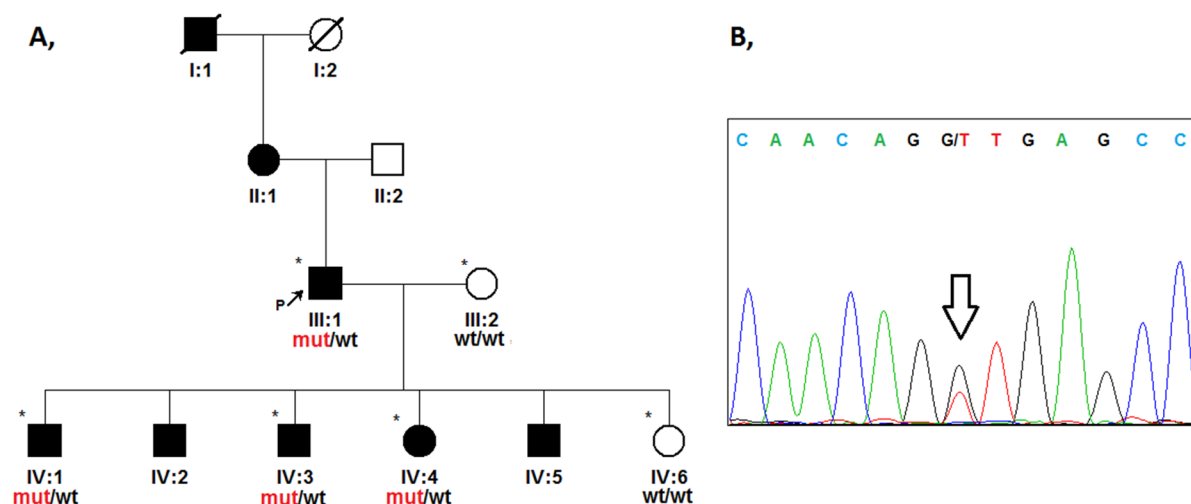
Tabulka 16: *In silico* analýza potenciálně sestřihové varianty c.1032+1G>A v genu *PAX6* pomocí online predikčních programů dle referenční sekvence NM_000280.4. Potenciálně sestřihovému místu je podle predikčních programů přiřazeno skóre (skóre pravděpodobnosti sestřihu v tomto místě). V případě variant, se toto skóre může buď zvýšit (zvýší se pravděpodobnost sestřihu v tomto bodě), zůstat beze změny nebo sníží (sestřihové místo může zanikat).

DNA	HSF 3.0			NetGene2	NNSPLICE			MaxEntScan			Celkové vyhodnocení varianty
	WT	MUT	Skóre varianty	Efekt mutované alely	WT	MUT	Skóre varianty	WT	MUT	Skóre varianty	
c.1032+1G>A	89,42	62,59	-30%	Ztráta sestřihového místa	0,98	<0,4	-60%	10,08	1,9	-81%	Patogenní

WT (wild type) divoká alela, **MUT** (mutant) mutantní alela.

U probanda B byla v genu *PAX6* v heterozygotním stavu nalezena varianta za exonem 12: c.1183+1G>T, která dosud nebyla popsána. Predikční programy tuto variantu vyhodnotily jako patogenní – ovlivňující sestřih (Tabulka 17). K dispozici byly čtyři vzorky DNA příbuzných prvního stupně a také DNA manželky probanda. Varianta v rodině plně segregovala s onemocněním, což podpořilo její kauzalitu. Podobně jako v případě varianty probanda A, byl

efekt této varianty na vzniklý protein dále ověřován metodou Exon trappingu (viz. Kapitola 5.2). Rodokmen a sekvenogram probanda jsou zachyceny na Obrázku 26.



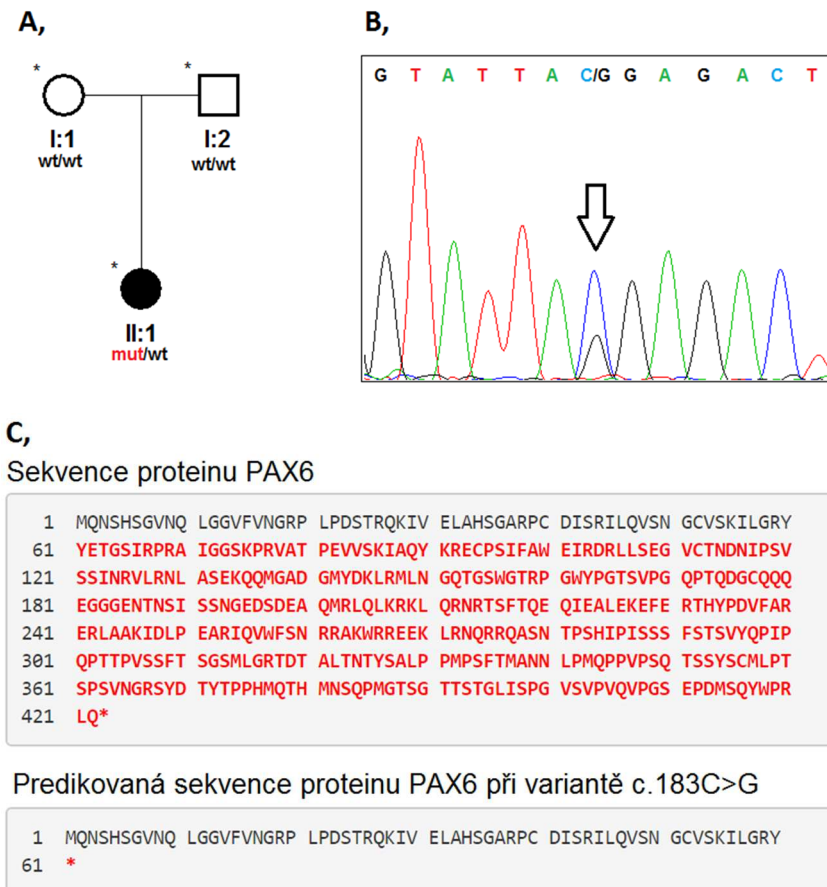
Obrázek 26: Výsledek molekulárně genetické analýzy v rodině B. **A**, Rodokmen spolu se segregací v rodině. Vyšetření postižení potomci probanda jsou nositelé mutantní varianty, naopak zdravý potomek, podobně jako manželka probanda, nositeli varianty nejsou. **B**, Sekvenogram se zachycenou variantou c.1183+1G>T (program Chromas).

Tabulka 17: *In silico* analýza varianty c.1183+1G>T v genu *PAX6* potenciálně narušující sestřih. Použity byly online predikční programy dle referenční sekvence NM_000280.4. Potenciálně sestřihovému místu je podle predikčních programů přiřazeno skóre (skóre pravděpodobnosti sestřihu v tomto místě). V případě variant, se toto skóre může buď zvýšit (zvýší se pravděpodobnost sestřihu v tomto bodě), zůstat beze změny nebo sníží (sestřihové místo může zanikat).

DNA	HSF 3.0			NetGene2	NNSPLICE			MaxEntScan			Celkové vyhodnocení varianty
	WT	MUT	Skóre varianty	Efekt mutované alely	WT	MUT	Skóre varianty	WT	MUT	Skóre varianty	
c.678+1G>T	96,67	69,83	-28%	Ztráta sestřihového místa	1,00	<0,4	-60%	9,6	1,1	-89%	Patogenní

WT (wild type) divoká alela, **MUT** (mutant) mutantní alela.

U probandky C byla v genu *PAX6* v heterozygotním stavu objevena, již dříve popsaná, varianta c.183C>G; p.(Tyr61*) (Perez-Solorzano *et al.*, 2017). Vzhledem k tomu, že ani jeden z rodičů tuto mutaci v genomové DNA získané z krve neměl, vznikla varianta u probandky pravděpodobně *de novo*. Tato varianta s největší pravděpodobností způsobuje tvorbu předčasného stop kodonu. Rodokmen a sekvenogram probandky, včetně predikované sekvence aberantního proteinu, jsou zachyceny na Obrázku 27.



Obrázek 27: Výsledek molekulárně genetické analýzy v rodině C. A, Rodokmen spolu se segregací patogenní mutace v rodině. Rodiče probandky variantu nenesou. Varianta tedy vznikla nejpravděpodobněji *de novo*. **B,** Sekvenogram se zachycenou variantou c.183C>G. **C,** Predikovaná sekvence proteinu (program Mutalyzer).

U probandů D-L, byla provedena celoxomová analýza. Souhrn kvality exomových dat je znázorněn v Tabulce 18. U probandů z rodin s autosomálně dominantním typem přenosu onemocnění byly v celoxomových datech přednostně vyhledávány vzácné varianty (bez výskytu v databázi gnomAD) v genech, jejichž mutace byly již dříve asociovány s dysgenезemi předního segmentu oka (Tabulka 1). V případech sporadického výskytu onemocnění anebo v rodinách s autozomálně recesivní typem dědičnosti byly přednostně zvažovány jako potenciálně patogenní varianty s frekvencí < 0,006.

Tabulka 18: Souhrnné informace k celoxomovým datům probandů D-L.

Proband	Počet přečtených bází (bp)	Počet čtení (number of reads)	CG (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
D	6 214 115 294	61 525 894	50,12	49,88	98,248	94,925
E	7 171 738 916	71 007 316	50,30	49,70	98,080	95,075
F	6 367 243 212	63 042 012	50,05	49,95	98,264	94,982
G	7 218 962 880	71 474 880	50,56	49,44	98,441	95,444
H	8 522 552 508	84 381 708	49,00	51,00	97,905	94,731
I	8 424 266 984	83 408 584	49,17	50,83	97,829	94,686
J	7 892 197 368	78 140 568	49,06	50,94	97,811	94,664
K	7 758 117 242	76 813 042	49,16	50,84	97,810	94,647
L	7 096 015 176	70 257 576	49,02	50,98	98,016	94,921

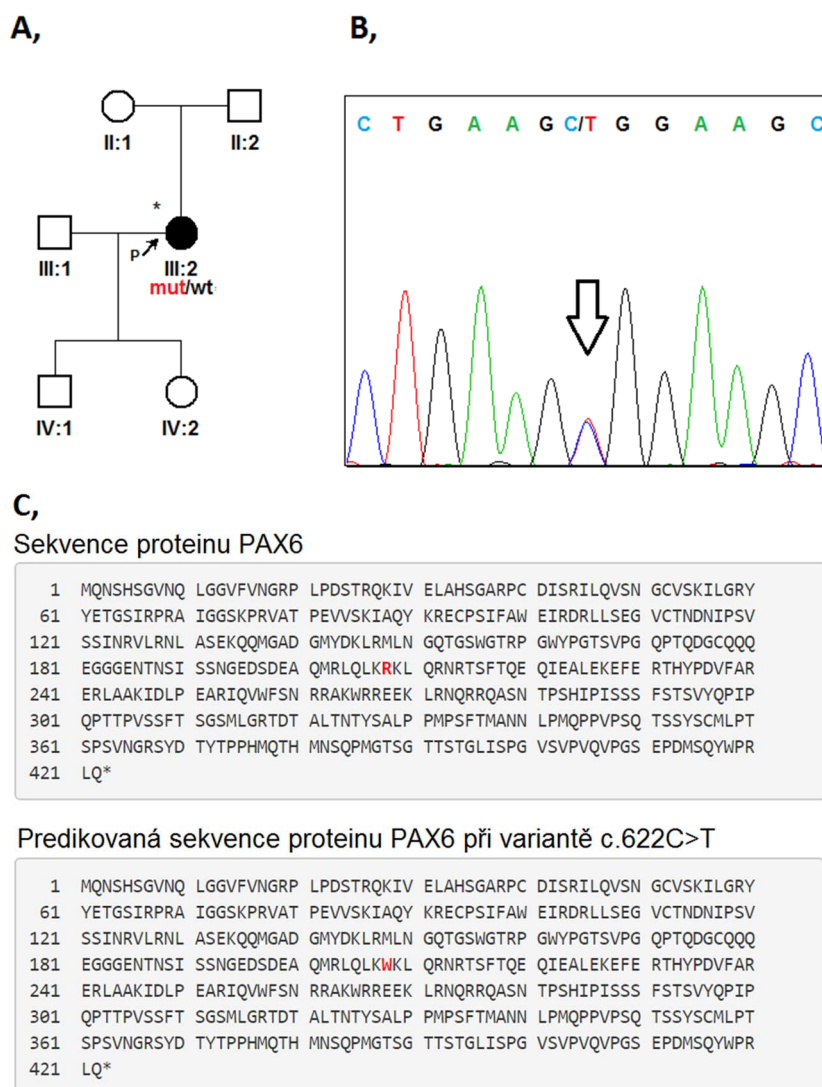
CG značí obsah CG bází, **AT** značí obsah AT bází, **Q20** značí počet čtení, které mají kvalitu vyšší než 20 (tzn. přítomnost chybné báze 1:100), **Q30** značí počet čtení, které mají kvalitu vyšší než 30 (tzn. přítomnost chybné báze 1:1000)

U probandky D bylo, vzhledem k výše uvedeným kritériím, nalezeno několik vzácných variant. Tyto varianty jsou uvedeny v Tabulce 19. Na základě práce s databázemi a s přihlédnutím k diagnóze probandky, byla podrobněji zkoumána varianta v genu *PAX6* c.622C>T; p.(Arg208Trp). Proběhlo ověření nálezu této mutace pomocí přímého sekvenování a varianta byla potvrzena.

Tato varianta byla již dříve popsána jako kauzální (Hanson *et al.*, 1993, Lim *et al.*, 2012). K aminokyselinové substituci v tomto případě dochází v sekvenci tzv. homeonukleárního lokalizačního signálu (HNLS, homeonuclear localization signal). Jde o několik evolučně konzervovaných aminokyselin, které se nacházejí před samotnou homeodoménou proteinu PAX6 (Ploski *et al.*, 2004). Tato sekvence je jednou ze dvou jaderných lokalizačních signálů v PAX6 sekvenci (Robbins *et al.*, 1991). Jedná se o aminokyseliny Leu-Lys-Arg-Lys-Leu-Gln-Arg, které jsou pravděpodobně zodpovědné za transport proteinu PAX6 do jádra, kde může fungovat dále jako transkripční faktor (Ploski *et al.*, 2004). Evoluční konzervovanost této sekvence byla ověřena programem T-coffee a je zachycena na Obrázku 29. Predikční programy tuto variantu vyhodnotily také jako patogenní (Tabulka 20). Rodokmen a sekvenogram probandky, včetně predikované sekvence aberantního proteinu, jsou zachyceny na Obrázku 28.

Tabulka 19: Vzácné varianty nalezené v heterozygotním stavu v datech z celoxomového sekvenování probandky D. Jedná se o varianty s frekvencí pod 0,006 v databázi gnomAD. V tabulce jsou uvedeny také počty heterozygotů pro konkrétní varianty z celkového počtu alel.

Gen	Dědičnost	Varianta na úrovni DNA	Varianta na úrovni proteinu	Referenční sekvence	Frekvence v gnomAD (počty heterozygotů)	dbSNP
<i>ABCB6</i>	AD	c.1424C>G	p.(Thr475Ser)	NM_001349828	0,004177278 (1158 / 277214)	rs149363094
<i>EYA1</i>	AD	c.49A>G	p.(Ser17Gly)	NM_172058	0,0000252494 (7 / 277234)	rs747231434
<i>HSF4</i>	AD	c.636G>T	p.(Met212Ile)	NM_001040667	0,002020523 (560 / 277156)	rs199742128
<i>CHD7</i>	AD	c.1018A>G	p.(Met340Val)	NM_001316690	0,004603075 (1276 / 277206)	rs41305525
<i>PAX6</i>	AD	c.622C>T	p.(Arg208Trp)	NM_000280.4	0.000008122 (2 / 246256)	rs374396492



Obrázek 28: Výsledek molekulárně genetické analýzy v rodině D. **A,** Rodokmen probandky D. Pro nedostupnost DNA příbuzných probandky nebylo možné provést segregaci analýzu. **B,** Sekvenogram se zachycenou variantou c.622C>T (program Chromas). **C,** Predikovaná sekvence proteinu (program Mutalyzer).



Obrázek 29: Analýza evoluční konzervovanosti aminokyseliny argininu v sekvenci proteinu PAX6. (program T-coffee)

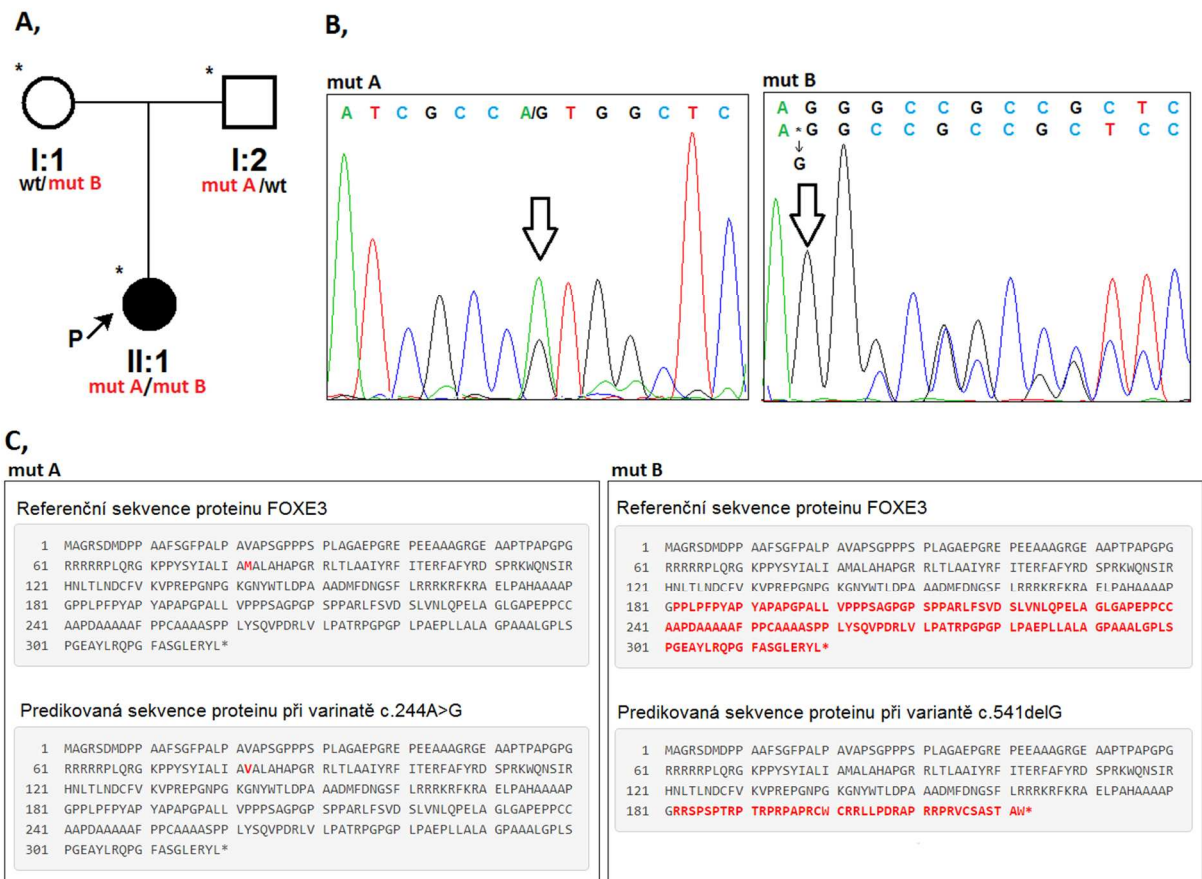
Tabulka 20: *In silico* analýza varianty c.622C>T v genu PAX6 pomocí online predikčních programů dle referenční sekvence NM_000280.4.

DNA	Protein	SIFT	PolyPhen2	MutPred2	Mutation taster	SNP&GO	PROVEAN	Závěr
c.622C>T	p.(Arg208Trp)	Patogenní	Patogenní	Patogenní	Patogenní	Patogenní	Patogenní	Patogenní

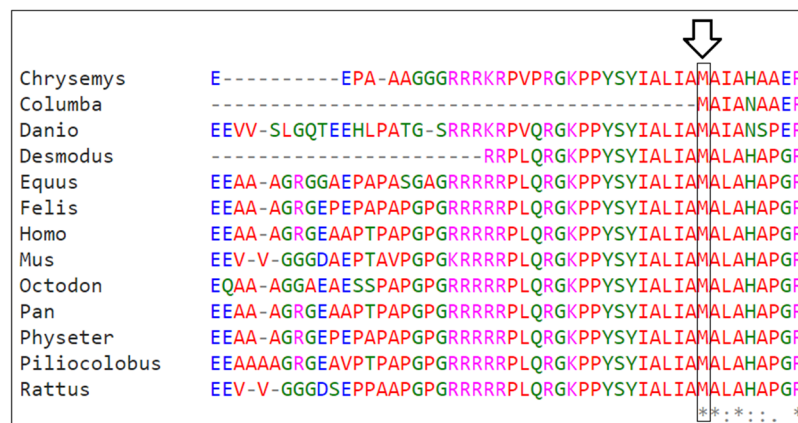
U probandky E byly, vzhledem k výše uvedeným kritériím, nalezeny tři vzácné varianty. Tyto varianty jsou uvedeny v Tabulce 21. Na základě práce s databázemi a s přihlédnutím k diagnóze probandky, byly podrobněji zkoumány varianty v genu *FOXE3* c.244A>G; p.(Met82Val) a c.541delG; p.(Pro181Argfs*42). Pomocí Sangerova sekvenování byla ověřena jejich přítomnost a provedena segreganční analýza v rodině (Obrázek 30). Varianta c.244A>G; p.(Met82Val) byla již dříve popsána jako kauzální (Iseri *et al.*, 2009). Místo, ve kterém se tato mutace nachází, je evolučně konzervované pro celou rodinu *FOX* genů, napříč mnoha taxony (Clark *et al.*, 1993). Konzervovanost aminokyseliny v této pozici byla ověřena programem T-coffee a je zachycena na Obrázku 31. Predikční programy tuto záměnu také vyhodnotily jako patogenní (Tabulka 22).

Tabulka 21: Vzácné varianty nalezené v exomových datech probandky E. Jedná se o varianty s frekvencí < 0,006 v databázi gnomAD.

Gen	Dědičnost	Varianta na úrovni DNA	Varianta na úrovni proteinu	Referenční sekvence	Frekvence v gnomAD (počty heterozygotů)	dbSNP
FOXE3	AR	c.244A>G	p.(Met82Val)	NM_012186	0,000923389 (24/259912)	rs746531116
FOXE3	AR	c.541delG	p.(Gly181Argfs*42)	NM_012186	-	-
PXDN	AR	c.1964A>G	p.(Asn655Ser)	NM_012293	0,00010474 (24/229138)	rs773445177



Obrázek 30: Výsledek molekulární genetické analýzy v rodině E. A, Z rodokmenu je patrná autozomálně recesivní dědičnost onemocnění. Otec probandky je heterozygot pro variantu c.244A>G a matka pro variantu c.541delG. Probandka je složený heterozygot. **B,** Sekvenogram se zachycenými variantami (program Chromas) **mut A,** c.244A>G a **mut B,** c.541delG **C,** Predikované sekvence proteinu při obou variantách (program Mutalyzer).



Obrázek 31: Analýza evoluční konzervovanosti aminokyseliny metioninu v sekvenci proteinu FOXE3 (program T-coffee).

Tabulka 22: *In silico* analýza varianty c.244A>G v genu FOXE3 pomocí online predikčních programů dle referenční sekvence NM_012186.

DNA	Protein	SIFT	PolyPhen2	MutPred2	Mutation taster	SNP&GO	PROVEAN	Závěr
c.244A>G	p.(Met82Val)	Patogenní	Patogenní	Patogenní	Patogenní	Patogenní	Patogenní	Patogenní

U probandů F-L se v celoxomových datech nepodařilo ve známých genech asociovaných s výskytem dysgenézí předního segmentu nalézt mutaci způsobující onemocnění.

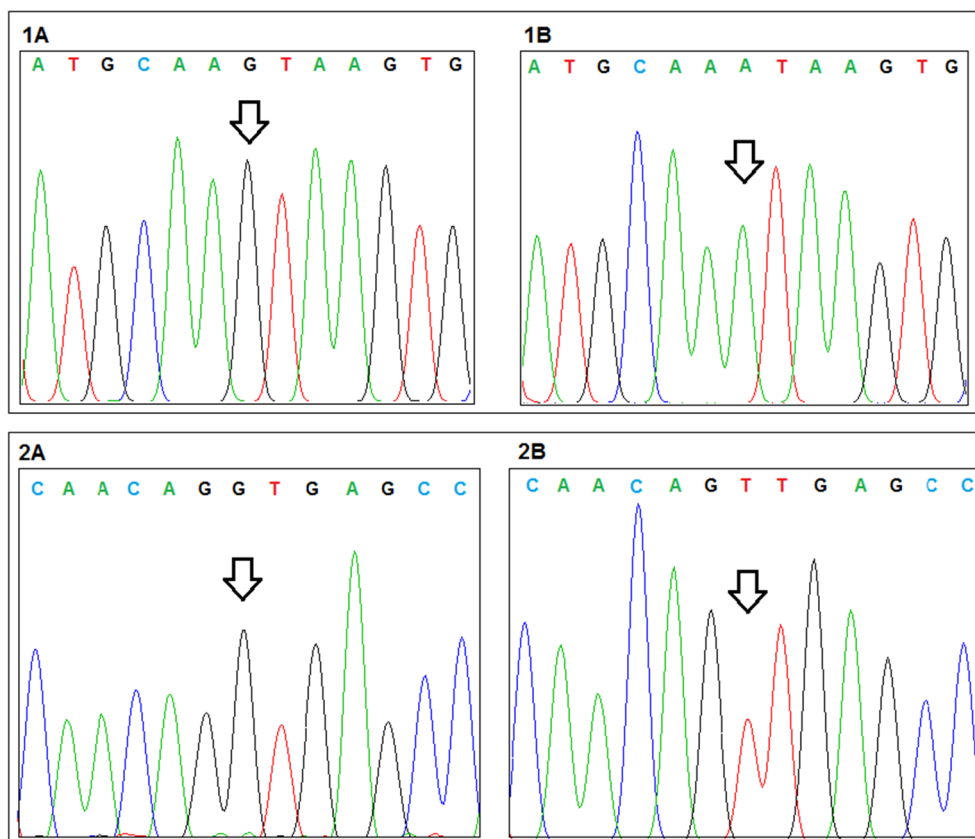
5.2. Ověření patogenicity sestřihových variant metodou Exon trappingu

Varianty probandů A a B se nachází na tzv. kanonickém sestřihovém místě (canonical splice site) na 3' části exonů 11 a 12. V této části se většinou vyskytuje konzervovaná dvojice nukleotidů GT, která je rozpoznávána snRNA spliceosomu. Analýza vzorků metodou Exon trappingu vyžadovala přípravu nových sad primerů tak, aby v případě varianty c.1032+1G>A (u probanda A) obsahovala sekvence analyzovaného exonu 11 také exon 10, jelikož byl intron mezi těmito exony příliš krátký a nevhodný pro design primerů (Tabulka 2). U probanda B, nesoucího variantu c.1183+1G>T, byla namnožena pouze sekvence exonu 12 s okolními introny. PCR produkty byly separovány pomocí elektroforézy a následně izolovány z gelu. Výsledné koncentrace DNA izolované z agarózového gelu jsou zachyceny v Tabulce 23. DNA izolovaná z gelu byla ve formě inzertů vkládaná do bakteriálního vektoru a dále klonována pomocí bakterie *E. coli*.

Tabulka 23: Koncentrace vzorků DNA izolované z gelu.

Vzorek	Koncentrace DNA
DNA probanda A (c.1032+1G>A)	5 ng/μl
DNA probanda B (c.1183+1G>T)	25,8 ng/μl

Po izolaci plasmidové DNA z jednotlivých bakteriálních klonů, byla ověřena sekvence místa zkoumaných variant přímým sekvenováním. Sekvenogramy klonů jsou zachyceny na Obrázku 32. Pomocí sekvenace se podařilo určit přítomnost divokých a mutovaných alel v jednotlivých klonech, stejně jako jejich orientace v rámci vektoru, která byla čistě náhodná. Následně se z vektorů inzerty vyštěpily pomocí restričních enzymů a vkládaly se do vektoru Exontrap.

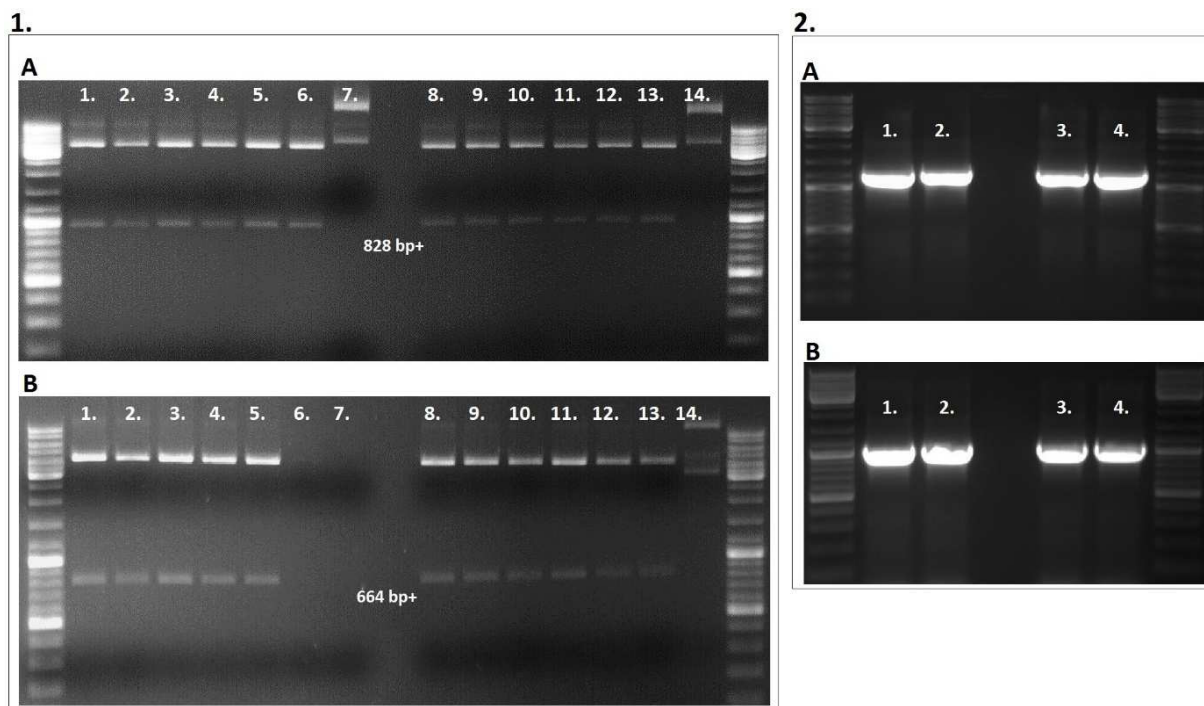


Obrázek 32: Sekvenogramy izolovaných plasmidů bakteriálních klonů. 1A divoká alela c.1032+1G, 1B mutovaná alela c.1032+1A. 2A divoká alela c.1183+1G, 2B mutovaná alela c.1183+1T.

Tyto enzymy byly specifické pro 3' a 5' konce inzertu. V případě varianty c.1183+1G>T byly orientace inzertů v plasmidu správné (po směru transkripce), ale u varianty c.1032+1G>A byly inzerty v opačné orientaci (proti směru transkripce). Pro fragment nesoucí variantu c.1183+1G>T byly vybrány dva enzymy: BamHI a NotI. Pro obrácení inzertu s variantou c.1032+1G>A byly vybrány enzymy: SpeI a ApaI.

Po ligaci bylo potřeba vložit vektor Exontrap spolu s inzerty do bakterií *E. coli* pro získání většího množství vektoru, a také pro snadnou kontrolu začlenění inzertů do vektorů ve správné orientaci. Jako kontrola přítomnosti inzertu v plasmidech, bylo provedeno štěpení enzymem KpnI, který štěpí vektor Exontrap z obou stran okolo inzertu. Gelová elektroforéza štěpených vektorů je zachycena na Obrázku 33.

Následně proběhla PCR reakce s jedním vnitřním (komplementární k sekvenci inzertu) a jedním vnějším primerem (komplementární k sekvenci Exontrap vektoru) pro kontrolu orientace inzertů (Obrázek 33).

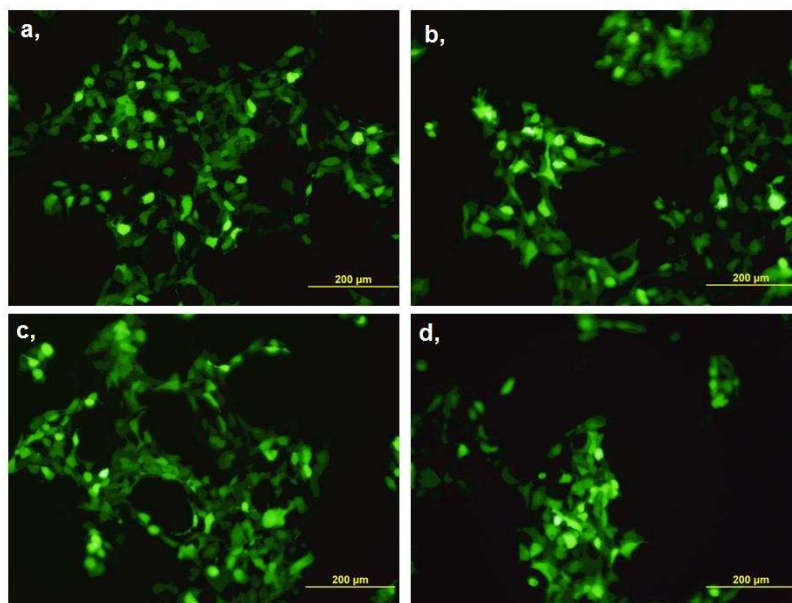


Obrázek 33: 1. Gelová elektroforéza vzorků Exontrap vektoru s vyštěpeným inzertem. A, vektory nesoucí inzert s variantou c.1032+1G>A. Inzert je dlouhý 828 bp a je ohraničen několika desítkami nukleotidů původem z TOPO vektoru. Vzorky **1. - 6.** nesou mutovanou alelu. Vzorky **8. - 13.** nesou divokou alelu. **7. a 14.** jsou vzorky neštěpeného vektoru, které slouží jako kontrola. **B,** vektory nesoucí inzert s variantou c.1183+1G>T. Vzorky **1. - 6.** nesou mutovanou alelu a vzorky **8. - 13.** nesou divokou alelu. Vzorek **14.** opět slouží jako neštěpená kontrola. V případě vzorku 6. zřejmě nastala chyba při izolaci plasmidové DNA (odsátí peletu) a vzorek neobsahuje DNA, podobně jako neštěpená kontrola (vzorek 7), která byla původem z tohoto vzorku. **2. Gelová elektroforéza produktů PCR. A,** vektory nesoucí inzert s variantou c.1032+1G>A. **1. a 2.** inzerty s mutovanou alelou, **3. a 4.** inzerty s divokou alelou. Délka produktu je >828 bp. **B,** vektory nesoucí inzert s variantou c.1183+1G>T. **1. a 2.** inzerty s mutovanou alelou, **3. a 4.** inzerty s divokou alelou. Délka produktu je >664 bp.

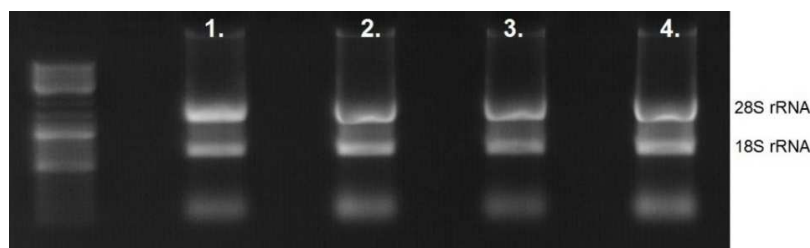
Exontrapové vektory s inzerty byly pomocí transfekce vkládány do lidských buněk HEK293T. Pro snadnou kontrolu byl spolu s Exontrap vektorem do buněk vkládán také plasmid nesoucí gen GFP, který umožnil vizuální kontrolu transfekce.

48 hodin po transfekci byl v buňkách zkontrolován GFP signál pomocí fluorescenčního mikroskopu. Fluorescence buněk je zachycena na Obrázku 34. Signál vykazovala většina buněk na všech miskách. Jelikož bylo plasmidu s GFP proteinem přidáno do transfekční směsi 4x méně než vektoru Exontrap, dá se předpokládat, že plasmid Exontrap v sobě nesla většina buněk.

Buňky byly následně mechanicky sklizeny pro izolaci celkové RNA pomocí TRIzol. Poté byla odizolovaná RNA zkontrolována gelovou elektroforézou na 1 % gelu. Fotografie gelu je zachycena na Obrázku 35.

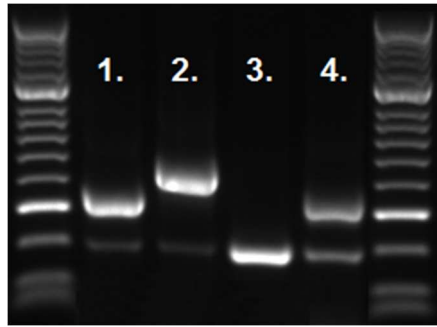


Obrázek 34: HEK293T buňky po transfekci Exontrap vektorem a plasmidy nesoucími GFP. Lze pozorovat zelený signál GFP po ozáření buněk modrým světlem. **A**, buňky transfekované Exontrap plasmidem nesoucí inzerť s variantou c.1032+1A, **B**, buňky nesoucí inzerť s variantou c.1032+1G, **C**, buňky nesoucí inzerť s variantou c.1183+1T a **D**, buňky nesoucí inzerť s variantou c.1183+1G. Zvětšeno 200x.



Obrázek 35: Kontrola RNA po izolaci. Na gelu jsou viditelné dva proužky. Horní proužek znázorňuje velkou ribosomální podjednotku 28S rRNA a spodní proužek znázorňuje malou ribosomální podjednotku 18S rRNA. RNA ze vzorku **1.** je izolovaná z buněk s transfekovaným vektorem s inzertem c.1032+1A, vzorek **2.** má v sobě zahrnut inzerť c.1032+1G, vzorek **3.** obsahuje inzerť s variantou c.1183+1T a vzorek **4.** obsahuje inzerť s variantou c.1183+1G.

RNA byla reverzní transkripcí převedena na cDNA, která byla následně použita jako templát pro PCR reakci se sekvenačními primery vektoru Exontrap. Již během kontrolní elektroforetické separace vzorků byla patrná rozdílná délka mRNA transkriptu izolovaných z buněk, které v sobě nesly vektor s mutantní alelou (kratší produkt) a těch, které nesly alelu divokou (delší produkt). Fotografie gelu s PCR produkty je zachycena na Obrázku 36. PCR produkty byly následně osekvenovány pro přesnou kontrolu sestřihu. Sekvenogramy těchto produktů jsou zachyceny na Obrázku 37. Jako důsledek ztráty sestřihového místa dochází v případě varianty c.1032+1G>A k vyřazení exonu 11 a v případě varianty c.1032+1G>T vyřazení exonu 12 ze sekvence mRNA. Pokud by na podkladě těchto mRNA vznikl aberantní protein, jeho sekvence by byla značně pozměněna (Obrázek 38).



Obrázek 36: Gelová elektroforéza PCR produktů podle templátu cDNA. 1. PCR produkt inzertu s variantou c.1032+1A (mutantní alela), 2. s variantou c.1032+1G (divoká alela), 3. PCR produkt s variantou c.1183+1T (mutantní alela), 4. a s variantou c.1183+1G (divoká alela). Spodní proužek vždy značí malé množství vektoru Exontrap s nezačleněným inzertem. V případě varianty 3 je v důsledku vynechání exonu 12 délka vzniklého PCR produktu totožná s délkou prázdného vektoru.



Obrázek 37: Sekvence cDNA produktů. 1A sekvence původem z vektorů s inzertem s variantou c.1032+1G (divoká alela) 1B inzert s variantou c.1032+1A (mutovaná alela). 2A sekvence původem z vektorů s variantou c.1183+1G (divoká alela). 2B sekvence původem z vektoru s variantou c.1183+1G (mutovaná alela).

A,

Sekvence proteinu PAX6	
1	MQNSHSGVNIQ LGGVFVNGRP LPDSTRQKIV ELAHSGARPC DISRILQVSN GCVSKILGRY
61	YETGSIRPRA IGGSKPRVAT PEVVSKEIAQY KRECPSIFAW EIRDRLLESEG VCTNDNIIPSV
121	SSINRVLRLNL ASEKQMGAD GMYDKLRMLN GQTGSWGTRP GWYPGTSVPG QPTQDGCQQQ
181	EGGGENTNSI SINGEDSDEA QMRLQLKRKL QRNRSTFTQE QIEALEKEFE RTHYPDVVFAR
241	ERLAAKIDL P EARIQVWFNS RRAKWRREEK LRNQRQASN TPSHIPISSS FSTSVYQPIP
301	QPTTPVSSFT SGSMLGRTDT ALTNYSALP PMPSTMANN LPMQPPVPSQ TSSYSCLMPT
361	SPSVNGRSYD TYTPPHMQTH MNSQPMGTSG TTSTGLISPG VSVVQVPGS EPDMSQVWPR
421	LQ*

Sekvence proteinu PAX6 při ztrátě exonu 11	
1	MQNSHSGVNIQ LGGVFVNGRP LPDSTRQKIV ELAHSGARPC DISRILQVSN GCVSKILGRY
61	YETGSIRPRA IGGSKPRVAT PEVVSKEIAQY KRECPSIFAW EIRDRLLESEG VCTNDNIIPSV
121	SSINRVLRLNL ASEKQMGAD GMYDKLRMLN GQTGSWGTRP GWYPGTSVPG QPTQDGCQQQ
181	EGGGENTNSI SINGEDSDEA QMRLQLKRKL QRNRSTFTQE QIEALEKEFE RTHYPDVVFAR
241	ERLAAKIDL P EARIQVWFNS RRAKWRREEK LRNQRQASN TPSHIPISSS FSTSVYQPIP
301	QPTTPAPSPQ PDLILLHAA HQPFGEWEL *

B,

Sekvence proteinu PAX6	
1	MQNSHSGVNIQ LGGVFVNGRP LPDSTRQKIV ELAHSGARPC DISRILQVSN GCVSKILGRY
61	YETGSIRPRA IGGSKPRVAT PEVVSKEIAQY KRECPSIFAW EIRDRLLESEG VCTNDNIIPSV
121	SSINRVLRLNL ASEKQMGAD GMYDKLRMLN GQTGSWGTRP GWYPGTSVPG QPTQDGCQQQ
181	EGGGENTNSI SINGEDSDEA QMRLQLKRKL QRNRSTFTQE QIEALEKEFE RTHYPDVVFAR
241	ERLAAKIDL P EARIQVWFNS RRAKWRREEK LRNQRQASN TPSHIPISSS FSTSVYQPIP
301	QPTTPVSSFT SGSMLGRTDT ALTNYSALP PMPSTMANN LPMQPPVPSQ TSSYSCLMPT
361	SPSVNGRSYD TYTPPHMQTH MNSQPMGTSG TTSTGLISPG VSVVQVPGS EPDMSQVWPR
421	LQ*

Sekvence proteinu PAX6 při ztrátě exonu 12	
1	MQNSHSGVNIQ LGGVFVNGRP LPDSTRQKIV ELAHSGARPC DISRILQVSN GCVSKILGRY
61	YETGSIRPRA IGGSKPRVAT PEVVSKEIAQY KRECPSIFAW EIRDRLLESEG VCTNDNIIPSV
121	SSINRVLRLNL ASEKQMGAD GMYDKLRMLN GQTGSWGTRP GWYPGTSVPG QPTQDGCQQQ
181	EGGGENTNSI SINGEDSDEA QMRLQLKRKL QRNRSTFTQE QIEALEKEFE RTHYPDVVFAR
241	ERLAAKIDL P EARIQVWFNS RRAKWRREEK LRNQRQASN TPSHIPISSS FSTSVYQPIP
301	QPTTPVSSFT SGSMLGRTDT ALTNYSALP PMPSTMANN LPMQDSFPLV CQFQKFPFV
361	NLICLNTGQD YSKKKKKKKK ERKYCVNSVS DYGDITVELS GKKEKWLLEP LQFYNCVLYC
421	TTGEGMDLKQ GPLYTEGTIS VGTNLHFGIQ TFIMFGVLFV NGHLVYIMKK RTM*

Obrázek 38: Sekvence proteinů při ztrátě exonu predikované programem Mutalyzer. A, Sekvence proteinu při ztrátě exonu 11 (při variantě c.1032+1G>A) B, sekvence proteinu při ztrátě exonu 12 (c.1183+1G>T).

6. Diskuze

Cílem práce bylo studium molekulárně genetické příčiny dysgenezí předního segmentu oka u českých pacientů a zavedení metodiky pro analýzu vlivu potenciálně sestřihových variant na výsledný transkript. Ze souboru 12 probandů se podařilo určit kauzální mutaci u pěti z nich, přičemž až na jeden případ, byly veškeré varianty nalezeny v genu *PAX6*.

Dvě z pěti nalezených mutací se nenacházely v kódujícím úseku genu, ale v kanonickém sestřihovém místě, tedy jeden až dva nukleotidy od rozhraní intronu-exonu. U probanda A byla nalezena v heterozygotním stavu varianta v genu *PAX6* c.1032+1G>A. Tato změna byla již dříve popsána v literatuře jako IVS11+1G-A (jiná nomenklatura), přičemž jedinec nesoucí tuto mutaci měl částečnou aniridii, mírným nystagmus, těžkou dystrofií rohovky a mírnou fotofobií (Gronskov *et al.*, 1999) (Redeker *et al.*, 2008).

U probanda B byla nalezena v heterozygotním stavu varianta v genu *PAX6* c.1183+1G>T. Tato mutace doposud nebyla v literatuře popsána, nicméně ve stejné pozici byla v souvislosti s klasickou aniridií již detekována jiná nukleotidová záměna (c.1183+1G>A), kterou autoři našli u dvou probandů (Bobilev *et al.*, 2016).

Jelikož je gen *PAX6* v dospělém lidském organismu aktivně transkribován jen v sítnici a v ostatních tkáních (např. lymfocyty) se jeho mRNA vyskytuje ve velmi nízkých hladinách, je funkční analýza transkriptu popř. proteinu problematická.

Varianta probanda A (c.1032+1G>A) byla již dříve funkčně ověřena metodou RT-PCR (Gronskov *et al.*, 1999). Jako zdroj mRNA zvolili autoři lymfocyty izolované z krve pacientů a zdravých kontrol, následně transformované virem Epstein-Barrové. Po izolaci RNA a přepisu mRNA do cDNA byla provedena tzv. nested PCR. Touto metodou se zvýší pravděpodobnost amplifikace pouze specifického úseku a je možné ji aplikovat i při nízkých koncentracích mRNA. Produkty PCR reakce autoři rozdělili pomocí gelové elektroforézy a v případě pacienta s heterozygotní mutací c.1032+1G>A se na gelu objevily dva proužky. První proužek měl očekávanou délku přibližně 378 bp (stejně jako v případě zdravých kontrol) a druhý proužek měl délku přibližně 265 bp, což odpovídá vynechání sekvence exonu 11 ze sekvence. Následně byl kratší proužek z gelu vypreparován a osekvenován. Sekvence dle předpokladů postrádala exon 11.

V případě nové varianty probanda B c.1183+1G>T, ani v případě obdobně popsané varianty c.1183+1G>A nebylo dosud provedeno žádné funkční ověření vlivu na sestřih.

Mutace c.1032+1G>A způsobuje posun čtecího rámce, v jehož důsledku dochází k předčasnému ukončení translace proteinu po začlenění 25 chybných aminokyselin. Karboxylový koncový segment (PST doména, proline-serine-threonine rich domain) proteinu PAX6 je tvořen exony 10 – 13. Pokud je tato část sekvenčně narušena, může docházet k ovlivnění transkripční aktivace skrze PAX6 protein. Takto může v buňkách vznikat aberantní protein, anebo může docházet k haploinsuficienci v důsledku nonsense-mediated mRNA decay (NMD). NMD je pretranslační proces, který zabraňuje produkci zkrácených proteinů, které by se syntetizovaly v důsledku přítomnosti předčasného stop kodonu v rámci sekvence mRNA.

Mutace c.1183+1G>T způsobuje posun čtecího rámce, v jehož důsledku dochází k začlenění 129 chybných aminokyselin, přičemž výsledný protein je oproti klasickému delší o 51 aminokyselin. Opět může docházet k ovlivnění karboxylového koncového segmentu proteinu PAX6. Takto může v buňkách vznikat aberantní protein nebo může docházet k haploinsuficienci v důsledku nejasné degradace aberantního proteinu.

U probandky C byla v genu *PAX6* v heterozygotním stavu nalezena mutace c.183C>G; p.(Tyr61*). Jelikož u rodičů probandky tato varianta nebyla zjištěna, pravděpodobně vznikla *de novo*, tj. mutací pohlavní buňky jednoho z rodičů nebo v oplodnění vajíčku během časné embryogeneze. K ověření této hypotézy by bylo potřeba v rodině provést testy otcovství. Ani poté, však nelze s jistotou vyloučit například germinální mosaicismus. Varianta c.183C>G; p.(Tyr61*) byla již dříve objevena ve spojitosti s diagnózou aniridie spolu s nystagmem, foveální hypoplázií a ptózou víčka (Perez-Solorzano *et al.*, 2017). Varianta byla autory považována za patogenní, jelikož způsobuje tvorbu předčasného stop kodonu. Autoři se domnívají, že probanda dochází k haploinsuficienci na podkladě NMD mechanismu.

U probandky D bylo v datech z celoexomového sekvenování objeveno hned několik variant, které odpovídaly nastaveným parametrům. Všechny tyto varianty se nacházely v heterozygotním stavu, přičemž všechny geny, ve kterých se nacházely, jsou spojovány s autosomálně dominantním typem dědičnosti. Průzkumem databází byly podrobněji zkoumány počty heterozygotů popř. homozygotů pro konkrétní varianty a jako kauzální byla dále zkoumána jen varianta v genu *PAX6* c.622C>T; p.(Arg208Trp). Přestože se v kontrolních datech více než 120 000 jedinců nacházeli dva heterozygoté (viz. Tabulka 19), vyhodnotili jsme ji jako patogenní z následujících důvodů. Tato varianta byla již dříve popsána v souvislosti s aniridií dvěma vědeckými skupinami nezávisle na sobě (Hanson *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 2012). Ve druhém případě byly oční projevy závažné; u probanda byl zjištěn nystagmus, foveální

hypolázie, keratopatie, mikrokornea a katarakta (Lim *et al.*, 2012). Jelikož se jednalo o již popsanou mutaci a varianta segregovala v rodině s onemocněním (měla ji také postižená matka probandky), byla považována za kauzální. Analýza pomocí predikčních programů patogenicitu mutace potvrdila, podobně jako analýza programem T-coffee potvrdila vysokou konzervovanost aminokyseliny argininu v této pozici. K aminokyselinové substituci v tomto případě dochází v sekvenci, která je pravděpodobně zodpovědná za transport proteinu PAX6 do jádra (sekvence HNLS). Jde o několik evolučně konzervovaných aminokyselin, které se nacházejí před samotnou homeodoménou proteinu PAX6 a nesou převážně pozitivní náboj. Tato sekvence je jednou ze dvou jaderných lokalizačních signálů v PAX6 sekvenci a bylo prokázáno, že vytváří vazebné místo pro protein IPO13 (Importin13, OMIM *610411), který je zodpovědný za zprostředkování transportu proteinů z cytoplasmy do jádra (Ploski *et al.*, 2004). V důsledku této aminokyselinové záměny, by tedy mohlo toto vazebné místo zanikat a transport PAX6 do jádra by mohl být narušen.

Přítomnost dvou heterozygotů v databázi gnomAD lze vysvětlit tak, že se může jednat o chybu během sekvenace nebo chybu v rámci alignmentu generovaných dat. Varianty ve velkých populačních databázích již nejsou manuálně ověřovány pomocí Sangerova sekvenování. Je třeba ale myslet i na to, že sekvenační data jsou do databází vkládána z různých projektů, a ne vždy jsou studovaní jedinci vyšetřeni oftalmologem, přítomnost onemocnění u nich tedy nelze vyloučit.

Jelikož v případě probandky D nebyly vyšetřeni žádní další příbuzní, nebylo v tomto případě možné provést segregáční analýzu.

U probandky E byly nalezeny v genu *FOXE3* dvě heterozygotní varianty c.244A>G; p.(Met82Val) a c.541delG; p.(Pro182Argfs*42). Segregační analýzou v rodině bylo potvrzeno, že pacientka je složený heterozygot.

Varianta c.244A>G; p.(Met82Val) byla již dříve popsána ve spojitosti s mikroftalmem, afakií (absence čočky) a sklerokorneou (Iseri *et al.*, 2009). Predikční programy tuto variantu také vyhodnotily jako patogenní. Tato jednoaminokyselinová záměna se nachází ve vysoce konzervovaném místě sekvence proteinu *FOXE3*, které je součástí forkhead DNA-vazebné domény (FHD). Tato sekvenční konzervovanost byla potvrzena také analýzou T-coffee programem. V případě této varianty (c.244A>G) jde ve výsledném proteinu o záměnu methioninu za valin, přičemž v obou případech se jedná o nepolární a elektroneutrální

aminokyseliny, přesto je methionin v této pozici naprosto klíčový pro správnou funkci FHD domény (Clark *et al.*, 1993).

Varianta c.541delG; p.(Pro182Argfs*42) doposud nebyla v literatuře popsána. Jedná se o mutaci, která způsobí posun čtecího rámce, v jehož důsledku dochází k začlenění 41 chybných aminokyselin do vznikajícího peptidu a následně dochází k zařazení předčasného stop kodonu. S velkou pravděpodobností dochází u probanda k haploinsulficienci v důsledku NMD.

Nálezem kauzálních mutací u pěti probandů se podařilo potvrdit diagnózu dysgeneze předního segmentu oka. Pokud se u pacientů s aniridií podaří zjistit příčinnou variantu v genu *PAX6*, je velkým přínosem vyloučení syndromu WAGR (van Heyningen *et al.*, 2007). WAGR syndrom je způsoben rozsáhlejšími (mikroskopickými i submikroskopickými) delecemi lokusu 11p13, zahrnujícími geny *PAX6* a *WT1* (Crolla *et al.*, 1997). Vzhledem k tomu, že až u 98 % pacientů s WAGR syndromem vzniká již v dětství Wilmsův tumor, je potřeba pacienty pravidelně monitorovat (Breslow *et al.*, 2003). V minulosti, před zavedením molekulárně genetické diagnostiky, se toto sledování týkalo všech pacientů s aniridií.

Neméně podstatný je nález kauzálních mutací u probandů při plánování rodičovství, včetně případného využití prenatální či preimplantační diagnostiky. Znalost kauzální mutace(i) dále umožňuje přesný odhad pravděpodobnosti přenosu mutace na potomstvo.

Jak je již výše zmíněno, při jasně definované diagnóze aniridie, bývají kauzální mutace nejčastěji nalezeny právě v genu *PAX6*. Toto tvrzení podporuje například práce, ve které byly nalezeny mutace v tomto genu u 61 probandů z celkových 66 s diagnózou aniridie (Bobilev *et al.*, 2016). V našem souboru pacientů, byla diagnóza aniridie stanovena u probandů ze tří rodin a ve všech třech případech se potvrdila mutace v genu *PAX6*.

U 7 ze 12 probandů nebyla zjištěna kauzální mutace způsobující jejich onemocnění. Důvody mohou být jak metodické (je potřeba doplnit analýzu počtu kopií detekující rozsáhlejší delece) anebo se mutace mohou nacházet mimo zkoumané regiony (může se jednat o promotorové oblasti jednotlivých genů nebo například o hluboké intronové varianty způsobující aberantní sestřih). Konkrétně i v případě genu *PAX6* bylo prokázáno, že u pacientů s aniridií mohou být kauzální varianty vzdálené až 85 kb od kódujících úseků (Fantès *et al.*, 1995). Varianty se také mohou nacházet v genech, které doposud nebyly s dysgenézemi předního segmentu oka vůbec spojovány. V takovýchto případech bude vyžadována podrobnější práce s databázemi, navýšení počtu vzorků v rodinách nebo společná analýza

mnoho různých vzorků od pacientů vykazujícími podobné fenotypy, popř. i provedení celogenomového sekvenování.

Dvě nalezené mutace se nacházely v kanonickém sestřihovém místě, přičemž již dříve bylo prokázáno, že mutace v těchto místech často vedou k aberantnímu sestřihu (vynechání exonu ze sekvence mRNA, zařazení nového exonu apod.) (Lewandowska, 2013).

Pro ověření vlivu těchto potenciálně sestřihových variant na výslednou sekvenci mRNA, byla zvolena metoda Exon trappingu (Duyk *et al.*, 1990). Tato metoda byla vybrána na základě práce, ve které autoři zkoumali vliv potenciálně sestřihových mutací v genu *PAX6* právě u pacientů s aniridií (Miao *et al.*, 2017). Jedna z potenciálně sestřihových variant, které byly v článku ověřovány, se nachází ve stejné pozici, jako mutace probanda B (c.1183+1G>T), ale s jinou nukleotidovou záměnou (c.1183+1G>A). Druhou zkoumanou variantou byla c.1033-1_1033delinsCT. Stejně jako v publikaci Miano *et al.*, 2017, byly inzerty s DNA probandů zkoumány pomocí metody Exon trappingu, s tím rozdílem, že v rámci této práce jsme před použitím samotného vektoru Exontrap použili vektor TOPO a transformaci *E. coli* bakterií pro amplifikaci a purifikaci výsledných inzertů. Výhodou tohoto vektoru je, že pro začlenění inzertu není potřeba do směsi přidávat ligázu a nevyžaduje ani použití žádných specifických sekvencí. TOPO vektor umožňuje také přímou selekci rekombinantů skrze disrupci letálního *E. coli* genu *ccdB* (sebevražedný gen) (Bernard *et al.*, 1994). Zároveň vektor nese gen rezistence proti antibiotiku (kanamycin), což zajišťuje růst pouze těch kolonií, které nesou jak plasmid, tak i v něm začleněný inzert.

Po izolaci plasmidové DNA, byly vektory spolu s inzerty osekvenovány a genotypovány (divoké a mutantní alely). Vložením tohoto kroku (amplifikace inzertů v TOPO vektoru) jsme zajistili dostatečné množství DNA inzertů v dostatečné kvalitě a sekvenováním jsme doplnili práci o informaci ohledně charakteru alely konkrétního klonu a její orientaci.

Následně byly inzerty pomocí restrikčních enzymů přenášeny z TOPO vektoru do vektoru Exontrap a těmito konstrukty byly transfekovány HEK293T buňky. Jedná se o immortalizovanou linii, izolovanou z primárních lidských embryonálních ledvin, přestože fyziologicky odpovídají spíše neurálním buňkám (Shaw *et al.*, 2002). Tato linie je stabilně transfekována genem pro velký T antigen polyomaviru SV40, který umožňuje episomální replikaci plasmidů obsahujících replikační počátek SV40. Tyto buňky se hojně využívají jako expresní systémy pro rekombinantní molekuly DNA (Thomas & Smart, 2005).

HEK293T byly vybrány proto, že přirozeně obsahují aparát zajišťující pre-mRNA processing. Do tohoto aparátu lze zahrnout proteiny zajišťující polyadenylaci na 3' konci, přidání čepičky na 5' konec, ale zejména správný sestřihový aparát (spliceosom). V předešlé práci byla také využita tato buněčná linie (Miao *et al.*, 2017).

V rámci výše zmíněné publikace bylo pro transfekci buněk vektorem Exontrap využito metody lipofekce. V našem případě bylo jako transfekční reagens použito FuGENE HD transfection reagent (neznámé složení neliposomálního charakteru). Toto činidlo umožňuje vysoký transfekční výkon s minimálním dopadem na fyziologii buněk (Jacobsen *et al.*, 2009). Buňky byly následně sklizeny a proběhla izolace RNA, přepis mRNA do cDNA, PCR reakce a sekvenace produktů podobně jako v publikaci výše.

Kolektivu Miao *et al.*, 2017 se pomocí metody Exon trappingu podařilo ověřit patogenní efekt obou variant. Zjistili, že při variantě c.1183+1G>A se ze sekvence mRNA vynechává exon 12 (podobně jako v našem případě při variantě c.1183+1G>T) a při variantě c.1033-1_1033delinsCT se aktivuje jiné sestřihové místo a ze sekvence mRNA je vynecháno 7 nukleotidů exonu 12.

Metoda Exon trappingu se využívá především pro odhalení kódujících částí v neznámých úsecích eukaryotické DNA. Dá se ale využít i pro rozsáhlejší studie genomové DNA organismů, nebo také při tvorbě exon-specifických prób. Tato metoda se také využívá při ověření potenciálně sestřihových mutací, které se nacházejí jak v intronových, tak i v exomových oblastech genů. Tímto způsobem se dají rovněž zachytit synonymní mutace, které mohou být také příčinou aberantního sestřihu pre-mRNA (Kim *et al.*, 2013). Pomocí Exon trappingu se dají například zkoumat intragenetické motivy ovlivňující alternativní sestřih, nebo je možné ji využít při studiu amplifikace genů u nádorových buněk (Mueller *et al.*, 1997; Boddu *et al.*, 2014).

7. Závěr

Cílem diplomové práce bylo určit molekulárně genetickou příčinu dysgenezí předního segmentu oka u pacientů českého původu a tím v konečném důsledku zlepšit klinické poradenství postiženým rodinám. V rámci práce byla ověřována vhodnost celoexomového sekvenování při pátrání po kauzálních variantách a také byla zkoumána vhodnost metody Exon trappingu pro analýzy potenciálně sestřihových variant.

Vyšetřeno bylo celkem 12 probandů českého původu s diagnózou dysgeneze předního segmentu oka. U těchto pacientů jsme zjišťovali molekulárně genetickou příčinu a následně studovali i funkční důsledky detekovaných mutací. Kauzální mutaci se podařilo určit v pěti rodinách.

Byly nalezeny dvě mutace v genu *FOXE3* c.244A>G; p.(Met82Val) (popsaná) a c.541delG; p.(Pro181Argfs*42) (nová) u pacientky s diagnózou kongenitálního glaukomu, sklerokorneou a mikroftalmem (autosomálně recesivní typ dědičnosti). Dále byly u čtyř probandů s diagnózou aniridie detekovány čtyři mutace v genu *PAX6* c.1032+1G>A (popsaná), c.1183+1G>T (nová), c.183C>G; p.(Tyr61*) (popsaná) a c.622C>T; p.(Arg208Trp) (popsaná). První dvě z těchto mutací byly vyhodnoceny jako pravděpodobně narušující sestřih, třetí vedla k zařazení předčasného stop kodonu a poslední k zařazení nesprávné aminokyseliny do sekvence proteinu.

Pomocí Exon trappingu byl ověřen vliv obou potenciálně sestřihových variant na výslednou sekvenci mRNA. Tato metoda se ukázala jako vhodná pro podobné aplikace, tedy u genů exprimovaných v nedostupných tkáních, a potvrdila správný odhad predikčních programů vlivu varianty na sestřih mRNA.

U sedmi probandů, přestože bylo provedeno celoexomové sekvenování, nebyla kauzální mutace určena. V těchto případech je dále naplánována analýza počtu kopií s cílem detekovat rozsáhlejší delece/duplikace. Pokud nebude kauzální mutace zjištěna ani touto metodou, bude v těchto rodinách provedena vazebná analýza anebo celogenomové sekvenování. Výsledky práce byly prezentovány formou posteru na XVIII. Interdisciplinary meeting of young life scientists (viz. Přílohy). Tato práce bude dále řešena v rámci postgraduálního studia na 1. LF UK a byla podpořena projektem agentury GAUK (hlavní řešitelka Bc. Jana Moravíková, počátek řešení 4/2018).

Nalezením kauzálních mutací se v rámci personalizované medicíny podařilo zlepšit klinické poradenství pacientům a jejich rodinám.

8. Webové zdroje

Zkratka	Celý název	Odkaz
EC	European commission	https://ec.europa.eu/commission/index_en
GeneCards		http://www.genecards.org/
GnomAD	Genome Aggregation Database	http://gnomad.broadinstitute.org/
HGMD	Human Gene Mutation Database	https://portal.biobase-international.com/
HSF 3.0	Human Splicing Finfer	
IGV	Integrative Genomics Viewer	http://software.broadinstitute.org/software/igv/
LOVD	Leiden Open Variation Database	http://www.lovd.nl/3.0/home
MaxEntScan	Maximum Entropy Scan	https://omictools.com/maxentscan-tool
MutationTaster	-	http://www.mutationtaster.org/
MutPred	-	http://mutpred.mutdb.org/
NCBI	National Center for Biotechnology Information	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NEBcloner	-	https://nebcloner.neb.com/#!/redigest
NetGene2	-	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/
NNSplice	-	https://omictools.com/nnssplice-tool
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	https://www.omim.org/
PolyPhen2	Polymorphism Phenotyping v2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Primer3	-	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
Provean	Protein Variation Effect Analyzer	http://provean.jcvi.org/index.php
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant	http://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html
SMS2	The Sequence Manipulation Suite	www.bioinformatics.org/sms2
SNPandGO	-	http://snps.biofold.org/snps-and-go/index.html
T-Coffee	T-COFFEE Multiple Sequence Alignment Server	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/

9. Seznam použité literatury

- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S. & Sunyaev, S.R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7, 248-9.
- Alward, W.L. (2000) Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. *Am J Ophthalmol*, 130, 107-15.
- Autrata, R. (2008) Dětská oftalmologie. 1. vyd. Brno: Lékařská fakulta MU
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N. & Lovell-Badge, R. (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 17, 126-40.
- Baráková, D., Hlotánek, M. (2008) Nové postupy v léčbě dětské katarakty, Trendy soudobé oftalmologie. Praha: Galén
- Bennett, R.L., Steinhaus, K.A., Uhrich, S.B., O'sullivan, C.K., Resta, R.G., Lochner-Doyle, D., Markel, D.S., Vincent, V. & Hamanishi, J. (1995) Recommendations for standardized human pedigree nomenclature. Pedigree Standardization Task Force of the National Society of Genetic Counselors. *Am J Hum Genet*, 56, 745-52.
- Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E.M. & Couturier, M. (1994) Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene*, 148, 71-4.
- Bessa, J., Gebelein, B., Pichaud, F., Casares, F. & Mann, R.S. (2002) Combinatorial control of Drosophila eye development by eyeless, homothorax, and teashirt. *Genes Dev*, 16, 2415-27.
- Bobilev, A.M., Mcdougal, M.E., Taylor, W.L., Geisert, E.E., Netland, P.A. & Lauderdale, J.D. (2016) Assessment of PAX6 alleles in 66 families with aniridia. *Clin Genet*, 89, 669-77.
- Boddu, R., Yang, C., O'connor, A.K., Hendrickson, R.C., Boone, B., Cui, X., Garcia-Gonzalez, M., Igarashi, P., Onuchic, L.F., Germino, G.G. & Guay-Woodford, L.M. (2014) Intragenic motifs regulate the transcriptional complexity of Pkhd1/PKHD1. *J Mol Med (Berl)*, 92, 1045-56.
- Booth, K.T., Azaiez, H., Kahrizi, K., Wang, D., Zhang, Y., Frees, K., Nishimura, C., Najmabadi, H. & Smith, R.J. (2017) Exonic mutations and exon skipping: Lessons learned from DFNA5. *Hum Mutat*.
- Breslow, N.E., Norris, R., Norkool, P.A., Kang, T., Beckwith, J.B., Perlman, E.J., Ritchey, M.L., Green, D.M., Nichols, K.E. & National Wilms Tumor Study, G. (2003) Characteristics and outcomes of children with the Wilms tumor-Aniridia syndrome: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol*, 21, 4579-85.
- Brunak, S., Engelbrecht, J. & Knudsen, S. (1991) Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol*, 220, 49-65.

- Burri, M., Tromvoukis, Y., Bopp, D., Frigerio, G. & Noll, M. (1989) Conservation of the paired domain in metazoans and its structure in three isolated human genes. *EMBO J*, 8, 1183-90.
- Calabrese, R., Capriotti, E., Fariselli, P., Martelli, P.L. & Casadio, R. (2009) Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat*, 30, 1237-44.
- Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E. & Burley, S.K. (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, 364, 412-20.
- Cotsarelis, G., Cheng, S.Z., Dong, G., Sun, T.T. & Lavker, R.M. (1989) Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*, 57, 201-9.
- Crolla, J.A., Cawdery, J.E., Oley, C.A., Young, I.D., Gray, J., Fantes, J. & Van Heyningen, V. (1997) A FISH approach to defining the extent and possible clinical significance of deletions at the WAGR locus. *J Med Genet*, 34, 207-12.
- Croucher, N.J., Fookes, M.C., Perkins, T.T., Turner, D.J., Marguerat, S.B., Keane, T., Quail, M.A., He, M., Assefa, S., Bahler, J., Kingsley, R.A., Parkhill, J., Bentley, S.D., Dougan, G. & Thomson, N.R. (2009) A simple method for directional transcriptome sequencing using Illumina technology. *Nucleic Acids Res*, 37, e148.
- Cvekl, A. & Piatigorsky, J. (1996) Lens development and crystallin gene expression: many roles for Pax-6. *Bioessays*, 18, 621-30.
- Desmet, F.O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Beroud, G., Claustres, M. & Beroud, C. (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*, 37, e67.
- Duyk, G.M., Kim, S.W., Myers, R.M. & Cox, D.R. (1990) Exon trapping: a genetic screen to identify candidate transcribed sequences in cloned mammalian genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 8995-9.
- Fantes, J., Redeker, B., Breen, M., Boyle, S., Brown, J., Fletcher, J., Jones, S., Bickmore, W., Fukushima, Y., Mannens, M. & Et Al. (1995) Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. *Hum Mol Genet*, 4, 415-22.
- Foster, R.G., Provencio, I., Hudson, D., Fiske, S., De Grip, W. & Menaker, M. (1991) Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol A*, 169, 39-50.
- Gehring, W.J. & Ikeo, K. (1999) Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet*, 15, 371-7.
- Glaser, T., Jepeal, L., Edwards, J.G., Young, S.R., Favor, J. & Maas, R.L. (1994) PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat Genet*, 7, 463-71.
- Gronskov, K., Rosenberg, T., Sand, A. & Brondum-Nielsen, K. (1999) Mutational analysis of PAX6: 16 novel mutations including 5 missense mutations with a mild aniridia phenotype. *Eur J Hum Genet*, 7, 274-86.

- Haargaard, B., Wohlfahrt, J., Fledelius, H.C., Rosenberg, T. & Melbye, M. (2004) A nationwide Danish study of 1027 cases of congenital/infantile cataracts: etiological and clinical classifications. *Ophthalmology*, 111, 2292-8.
- Hanson, I.M., Seawright, A., Hardman, K., Hodgson, S., Zaletayev, D., Fekete, G. & Van Heyningen, V. (1993) PAX6 mutations in aniridia. *Hum Mol Genet*, 2, 915-20.
- Harada, T., Harada, C. & Parada, L.F. (2007) Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes Dev*, 21, 367-78.
- Hecht, E., (1987) Optics. In: Hecht, E. (eds.) Optics 2nd edition. Addison-Wesley
- Hever, A.M., Williamson, K.A. & Van Heyningen, V. (2006) Developmental malformations of the eye: the role of PAX6, SOX2 and OTX2. *Clin Genet*, 69, 459-470.
- Chi, K.R. (2008) The year of sequencing. *Nat Methods*, 5, 11-4.
- Chow, R.L. & Lang, R.A. (2001) Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Bi*, 17, 255-296.
- Idrees, F., Vaideanu, D., Fraser, S.G., Sowden, J.C. & Khaw, P.T. (2006) A review of anterior segment dysgeneses. *Surv Ophthalmol*, 51, 213-31.
- Iseri, S.U., Osborne, R.J., Farrall, M., Wyatt, A.W., Mirza, G., Nurnberg, G., Kluck, C., Herbert, H., Martin, A., Hussain, M.S., Collin, J.R., Lathrop, M., Nurnberg, P., Ragoussis, J. & Ragge, N.K. (2009) Seeing clearly: the dominant and recessive nature of FOXE3 in eye developmental anomalies. *Hum Mutat*, 30, 1378-86.
- Ito, Y.A. & Walter, M.A. (2014) Genomics and anterior segment dysgenesis: a review. *Clin Exp Ophthalmol*, 42, 13-24.
- Jacobsen, L., Calvin, S. & Lobenhofer, E. (2009) Transcriptional effects of transfection: the potential for misinterpretation of gene expression data generated from transiently transfected cells. *Biotechniques*, 47, 617-24.
- Johnson, K., Shewan, D. & Holt, C. (2006) *Visual System Development in Vertebrates*.
- Jordan, T., Hanson, I., Zaletayev, D., Hodgson, S., Prosser, J., Seawright, A., Hastie, N. & Van Heyningen, V. (1992) The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat Genet*, 1, 328-32.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2005): Basic Histology text and atlas. McGraw Hill
- Kim, Y., Kim, H.R., Kim, J., Shin, J.W., Park, H.J., Choi, J.Y., Kim, U.K. & Lee, K.A. (2013) A novel synonymous mutation causing complete skipping of exon 16 in the SLC26A4 gene in a Korean family with hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun*, 430, 1147-50.
- Koressaar, T. & Remm, M. (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23, 1289-91.
- Krachmer, J.H., & Palay, D. (2005): Cornea Atlas. In: Krachmer, J.H., Mannis, M.J., Edward, J.H. (eds.): Cornea Atlas, 2nd Edition, Elsevier Mosby.
- Kuchynka, P. a kol. (2007) Oční lékařství, Grada Publishing a.s.

- Lee, H., Khan, R. & O'keefe, M. (2008) Aniridia: current pathology and management. *Acta Ophthalmol*, 86, 708-15.
- Lewandowska, M.A. (2013) The missing puzzle piece: splicing mutations. *Int J Clin Exp Pathol*, 6, 2675-82.
- Li, B., Krishnan, V.G., Mort, M.E., Xin, F., Kamati, K.K., Cooper, D.N., Mooney, S.D. & Radivojac, P. (2009) Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics*, 25, 2744-50.
- Lim, H.T., Seo, E.J., Kim, G.H., Ahn, H., Lee, H.J., Shin, K.H., Lee, J.K. & Yoo, H.W. (2012) Comparison between aniridia with and without PAX6 mutations: clinical and molecular analysis in 14 Korean patients with aniridia. *Ophthalmology*, 119, 1258-64.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. & Law, M. (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 251364.
- Ma, A.S., Grigg, J.R., Ho, G., Prokudin, I., Farnsworth, E., Holman, K., Cheng, A., Billson, F.A., Martin, F., Fraser, C., Mowat, D., Smith, J., Christodoulou, J., Flaherty, M., Bennetts, B. & Jamieson, R.V. (2016) Sporadic and Familial Congenital Cataracts: Mutational Spectrum and New Diagnoses Using Next-Generation Sequencing. *Hum Mutat*, 37, 371-84.
- Mears, A.J., Jordan, T., Mirzayans, F., Dubois, S., Kume, T., Parlee, M., Ritch, R., Koop, B., Kuo, W.L., Collins, C., Marshall, J., Gould, D.B., Pearce, W., Carlsson, P., Enerback, S., Morissette, J., Bhattacharya, S., Hogan, B., Raymond, V. & Walter, M.A. (1998) Mutations of the forkhead/winged-helix gene, FKHL7, in patients with Axenfeld-Rieger anomaly. *Am J Hum Genet*, 63, 1316-28.
- Miao, Q., Ping, X., Tang, X., Zhang, L., Zhang, X., Cheng, Y. & Shentu, X. (2017) Experimental assessment of novel PAX6 splicing mutations in two Chinese families with aniridia. *Gene*, 630, 44-48.
- Mueller, H.W., Michel, A., Heckel, D., Fischer, U., Tonnes, M., Tsui, L.C., Scherer, S., Zang, K.D. & Meese, E. (1997) Identification of an amplified gene cluster in glioma including two novel amplified genes isolated by exon trapping. *Hum Genet*, 101, 190-7.
- Noll, M. (1993) Evolution and role of Pax genes. *Curr Opin Genet Dev*, 3, 595-605.
- Perez-Solorzano, S., Chacon-Camacho, O.F., Astiazaran, M.C., Ledesma-Gil, G. & Zenteno, J.C. (2017) PAX6 allelic heterogeneity in Mexican congenital aniridia patients: expanding the mutational spectrum with seven novel pathogenic variants. *Clin Exp Ophthalmol*, 45, 875-883.
- Ploski, J.E., Shamsher, M.K. & Radu, A. (2004) Paired-type homeodomain transcription factors are imported into the nucleus by karyopherin 13. *Mol Cell Biol*, 24, 4824-34.
- Prokudin, I., Simons, C., Grigg, J.R., Storen, R., Kumar, V., Phua, Z.Y., Smith, J., Flaherty, M., Davila, S. & Jamieson, R.V. (2014) Exome sequencing in developmental eye disease leads to identification of causal variants in GJA8, CRYGC, PAX6 and CYP1B1. *Eur J Hum Genet*, 22, 907-15.
- Quigley, H.A. & Broman, A.T. (2006) The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*, 90, 262-7.

- Redeker, E.J., De Visser, A.S., Bergen, A.A. & Mannens, M.M. (2008) Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) enhances the molecular diagnosis of aniridia and related disorders. *Mol Vis*, 14, 836-40.
- Reese, M.G., Eeckman, F.H., Kulp, D. & Haussler, D. (1997) Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol*, 4, 311-23.
- Revill, P.A., Ha, C.V., Porchun, S.C., Vu, M.T. & Dale, J.L. (2003) The complete nucleotide sequence of two distinct geminiviruses infecting cucurbits in Vietnam. *Arch Virol*, 148, 1523-41.
- Reynolds, J.D., Olitsky, S.E. (2003) Pediatric Glaucoma. In: Wright, K.W., Spiegel, P.H. (eds.): Pediatric Ophthalmology and Strabismus. 2nd ed., Springer, New York
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. & Dingwall, C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, 64, 615-23.
- Sadler, W.T. (2011) Langmanova lékařská embryologie. 1. české vydání. Praha: Grada
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- Semina, E.V., Reiter, R., Leysens, N.J., Alward, W.L., Small, K.W., Datson, N.A., Siegel-Bartelt, J., Bierke-Nelson, D., Bitoun, P., Zabel, B.U., Carey, J.C. & Murray, J.C. (1996) Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet*, 14, 392-9.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. & Graham, F.L. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*, 16, 869-71.
- Schwarz, J.M., Cooper, D.N., Schuelke, M. & Seelow, D. (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*, 11, 361-2.
- Sowden, J.C. (2007) Molecular and developmental mechanisms of anterior segment dysgenesis. *Eye (Lond)*, 21, 1310-8.
- Sun, W., Xiao, X., Li, S., Guo, X. & Zhang, Q. (2011) Mutation analysis of 12 genes in Chinese families with congenital cataracts. *Mol Vis*, 17, 2197-206.
- Taylor, D., Hoyt, C. (2005) Pediatric Ophthalmology and Strabismus. 3rd. ed., Elsevier Saunders, London
- Thiele, H. & Nurnberg, P. (2005) HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics*, 21, 1730-2.
- Thomas, P. & Smart, T.G. (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51, 187-200.
- Titheradge, H., Togneri, F., McMullan, D., Brueton, L., Lim, D. & Williams, D. (2014) Axenfeld-Rieger syndrome: further clinical and array delineation of four unrelated patients with a 4q25 microdeletion. *Am J Med Genet A*, 164A, 1695-701.
- Treisman, J.E. (2004) How to make an eye. *Development*, 131, 3823-7.

- Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carriere, C. & Saule, S. (1994) Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol Endocrinol*, 8, 929-38.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. & Rozen, S.G. (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40, e115.
- Van Heyningen, V., Hoovers, J.M., De Kraker, J. & Crolla, J.A. (2007) Raised risk of Wilms tumour in patients with aniridia and submicroscopic WT1 deletion. *J Med Genet*, 44, 787-90.
- Vis, J.K., Vermaat, M., Taschner, P.E., Kok, J.N. & Laros, J.F. (2015) An efficient algorithm for the extraction of HGVS variant descriptions from sequences. *Bioinformatics*, 31, 3751-7.
- Waring, G.O., 3rd, Rodrigues, M.M. & Laibson, P.R. (1975) Anterior chamber cleavage syndrome. A stepladder classification. *Surv Ophthalmol*, 20, 3-27.
- Weisschuh, N., Wissinger, B. & Gramer, E. (2012) A splice site mutation in the PAX6 gene which induces exon skipping causes autosomal dominant inherited aniridia. *Mol Vis*, 18, 751-7.
- Wildeman, M., Van Ophuizen, E., Den Dunnen, J.T. & Taschner, P.E. (2008) Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum Mutat*, 29, 6-13.
- Willoughby, C.E., Ponzin, D., Ferrari, S., Lobo, A., Landau, K. & Omid, Y. (2010) Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function – a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 38, 2-11.
- Wilson, M.E. (1990) Congenital iris ectropion and a new classification for anterior segment dysgenesis. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 27, 48-55.
- Xu, H.E., Rould, M.A., Xu, W., Epstein, J.A., Maas, R.L. & Pabo, C.O. (1999) Crystal structure of the human Pax6 paired domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding. *Genes Dev*, 13, 1263-75.
- Zagozewski, J.L., Zhang, Q. & Eisenstat, D.D. (2014) Genetic regulation of vertebrate eye development. *Clin Genet*, 86, 453-60.
- Zhang, L., Mathers, P.H. & Jamrich, M. (2000) Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genesis*, 28, 135-42.
- Zhang, X., Friedman, A., Heaney, S., Purcell, P. & Maas, R.L. (2002) Meis homeoproteins directly regulate Pax6 during vertebrate lens morphogenesis. *Genes Dev*, 16, 2097-107.
- Zhou, X., Ren, L., Meng, Q., Li, Y., Yu, Y. & Yu, J. (2010) The next-generation sequencing technology and application. *Protein Cell*, 1, 520-36.

10. Přílohy

Seznam příloh:

1. Informace pro pacienty podepisující informovaný souhlas
2. Informovaný souhlas pacientů
3. Abstrakt z konference XVIII. Interdisciplinary meeting of young life scientists v Czech Chemical Society Symposium Series (Chemické listy) Vol. 16 no 1 (2018)