

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

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Molekulárna štúdia génu pre alfa-L-iduronidázu.

Charakterizácia mutácií u pacientov
s mukopolysacharidózou typu I a
polymorfizmov v českej populácii.

Alžbeta Vážna

Praha 2006

Vedúca diplomovej práce: *RNDr. Lenka Dvořáková, CSc.*
Ústav dědičných metabolických poruch, 1. lékařská fakulta a
Všeobecná fakultní nemocnice Univerzity Karlovy v Praze

Prehlasujem, že diplomovú prácu som vypracovávala samostatne v Ústavu dědičných metabolických poruch 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a v Institute of the Child Health, University College London v Londýne, s použitím citovanej literatúry a pod odborným vedením RNDr. Lenky Dvořákovéj, CSc. a Dr. Clare Beesley, PhD.

Marka Alžbeta

Týmto ďakujem nielen RNDr. Lenke Dvořákovéj, CSc., ale rovnako aj:

- spolupracovníkom z pražského laboratória, menovite Ing. Linde Bernej, PhD., za potrebné dávky optimizmu a energie, MUDr. Larise Stolnaje za neuveriteľnú ochotu a rýchlosť pri laborantskej výpomoci
- spolupracovníkom z londýnskeho laboratória, menovite Dr. Clare Beesley, PhD. za skvelý pedagogický a osobný prístup, Prof. Bryanovi Winchestrovi za umožnenie pracovať na jeho oddelení a manželom Millsovým za vytváranie domácej pohody
- Prof. RNDr. Stanislavovi Zdražilovi, DrSc. za pomoc a podporu na katedre
- a v poslednej rade mojím rodičom za neustálu podporu nielen pri štúdiu

Práca bola vypracovaná od októbra 2003 do januára 2006 v Ústave dedičných metabolických poruch a v Institute of the Child Health v rámci týchto grantových projektov:

Domáce granty:

1/ výskumný zámer VZ MSM CR 0021620806; Molekulární biologie a patologie buňky za normy a u vybraných klinicky závažných patologických procesů

2/ projekt Grantovej agentúry Univerzity Karlovej v Prahe; Studium vlivu mutací a polymorfismů na klinické projevy mukopolysacharidosy typu I, (GA UK 25/2003).

3/ projekt Grantovej agentúry Univerzity Karlovej v Prahe; Studium struktury genu pro alfa-L-iduronidasu: charakterizace polymorfismů v české populaci a mutací u pacientů s mukopolysacharidosou typu I, (GA UK 154/2004/C/PřF).

Molecular study of the gene for alpha-L-iduronidase. Characterization of mutations in patients with mucopolysaccharidosis type I and polymorphisms in the Czech population.

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal storage disorder caused by a deficiency of alpha-L-iduronidase (IDUA, E.C 3.2.1.76), which is involved in breakdown of dermatan and heparan sulfates within the lysosome. MPS I is inherited in an autosomal recessive manner. During the last 25 years the diagnosis of MPS I was proved enzymatically in 19 patients from Czech and Slovak populations. Fifteen of them had severe Hurler syndrome, 2 had least severe Scheie syndrome and two had the intermediate Hurler/Scheie phenotype.

We performed the mutation analysis in 17 Czech and Slovak MPS I patients and found 32 mutated alleles with a high prevalence of null mutations W402X (11/34) and Q70X (7/34). Three of eleven mutations were novel (V620F (3/34), W626X (1/34) and E640fs (2/34)). In addition, we followed 13 known polymorphisms, which were used for haplotype determination in most mutant alleles. Frequencies of five of these polymorphisms (A8, A20, Q33H, L118 a R105Q) and haplotypes derived from these/their nucleotide changes were determined in control population. The novel mutations together with another mutation D315Y, which was not studied previously, were characterized by transient expression studies in CHO cells. All mutations but one (E640fs) caused a severe reduction of expressed enzyme activity. The residual activity found in the E640fs corresponds to the milder phenotype of patients carrying the allele. Definite accordance seems to be in patients homozygous for the prevalent alleles W402X or Q70X. Prediction of phenotype from other combinations is complicated and is discussed in the thesis.

Klíčové slová:

Mukopolysacharidóza typu I, alfa-L-iduronidáza, Hurlerovej syndróm, Scheieov syndróm, mutácie, polymorfizmy, haplotypy, genotyp-fenotypová korelácia

Mucopolysaccharidosis type I, alpha-L-iduronidase, Hurler syndrome, Scheie syndrome, mutations, polymorphisms, haplotypes, genotype-phenotype correlation

OBSAH

1.	Úvod a ciele diplomovej práce.....	9
2.	Literárny úvod.....	10
2.1.	Základná charakteristika metabolických ochorení.....	10
2.1.1.	Mukopolysacharidózy.....	10
2.2.	Mukopolysacharidóza typu I.....	13
2.2.1.	Klinický aspekt.....	13
2.2.2.	Biochemický aspekt.....	15
2.2.3.	Liečebné postupy a prevencia.....	15
2.2.4.	Genetický aspekt.....	17
2.2.5.	Korelácia genotyp-fenotyp u pacientov s MPS I.....	24
2.2.6.	Funkčná štúdia.....	25
3.	Materiál.....	26
3.1.	Chemikálie.....	26
3.2.	Roztoky.....	27
3.3.	Kultivačné média.....	29
3.4.	Enzýmy.....	29
3.5.	Markery molekulových hmotností.....	30
3.6.	Bakteriálne kmene a vektory.....	30
3.7.	Eukaryotické bunky.....	30
3.8.	Komerčné súpravy.....	31
3.9.	Primery.....	31
3.10.	Prístroje a pomôcky.....	35
3.11.	Počítačové vybavenie a software.....	35
3.12.	Referenčné sekvencie pre IDUA.....	35
4.	Metódy.....	36
4.1.	Izolácia genómovej DNA.....	36
4.1.1.	Izolácia genómovej DNA z krvi.....	36
4.1.2.	Izolácia genómovej DNA z archívnych vzoriek.....	36
4.2.	Izolácia celkovej RNA.....	36
4.3.	Reverzná transkripcia mRNA do cDNA.....	37
4.4.	Navrhovanie primerov.....	37
4.5.	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	38
4.5.1.	PCR amplifikácia genómovej DNA.....	38
4.5.2.	PCR amplifikácia komplementárnej DNA (cDNA).....	39
4.6.	Prečistenie PCR produktov preparatívnou gélovou elektroforézou.....	40
4.7.	Sekvenovanie metódou cycle sequencing.....	40
4.7.1.	Sekvenácia na planárnom sekvenátore AlfExpress.....	40
4.7.2.	Sekvenácia na kapilárnom sekvenátore Avant / MegaBACE.....	41
4.8.	PCR/RFLP pre overenie mutácií a polymorfizmu L118.....	42
4.9.	ACRS.....	43
4.10.	ARMS.....	43
4.11.	Overenie delécie klonovaním.....	44
4.11.1.	Amplifikácia PCR produktu.....	44
4.11.2.	Pripojenie 3'-A konca k prečistenému PCR produktu a ligácia inzertu do plazmidu.....	44
4.11.3.	Transformácia.....	45

4.11.4.	Kultivácia baktérií z vybraných kolónií a izolácia plazmidovej DNA	45
4.12.	Príprava expresného systému pre IDUA.....	45
4.12.1.	Príprava mutovaného inzertu cDNA-IDUA.....	45
4.12.2.	Transformácia	46
4.12.3.	Kultivácia baktérií z vybraných kolónií a izolácia plazmidovej DNA	46
4.12.4.	Overenie správnosti vzniknutej mutácie	46
4.13.	Klonovanie IDUA z vektoru pSP72 do expresného vektoru pIRES2-EGFP .	47
4.13.1.	Príprava vektoru pIRES2 - EGFP	47
4.13.2.	Príprava cDNA.....	47
4.13.3.	Ligácia.....	48
4.13.4.	Transformácia	48
4.13.5.	Kultivácia baktérií z vybraných kolónií a izolácia plazmidovej DNA	48
4.13.6.	Overenie orientácie inzertu	49
4.14.	Expresia.....	49
4.14.1.	Transfekcia CHO buniek.....	49
4.14.2.	Proteínová assay.....	50
4.14.3.	IDUA assay	51
4.15.	Pacienti a kontroly.....	51
5.	Výsledky	53
5.1.	Optimalizácia podmienok pre amplifikáciu metódou PCR	53
5.2.	PCR amplifikácia komplementárnej DNA (cDNA)	55
5.3.	Analýza mutácií v géne pre IDUA.....	56
5.3.1.	Priame sekvenovanie PCR produktov.....	56
5.3.2.	Metóda PCR/RFLP	59
5.3.3.	ACRS	61
5.3.4.	Sekvenovanie klonovaného PCR produktu.....	61
5.4.	Identifikácia polymorfizmov u pacientov s MPS I a v súbore kontrolných vzoriek	62
5.5.	Overenie nových mutácií	65
6.	Diskusia.....	67
6.1.	Mutačná analýza.....	67
6.2.	Polymorfizmy a haplotypy	67
6.3.	Genotyp – fenotypová korelácia	69
7.	Súhrn	74
8.	Použitá literatúra	75

Použité skratky

A	adenín
ACRS	artificial created restriction site
AK	aminokyselina
ARMS	amplification refractory mutation system
ATP	adenozín-5'-trifosfát
bp	pár bázi
C	cytozín
cDNA	komplementárna DNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
ddNTP	dideoxyribonukleotid trifosfát
G	guanín
gDNA	genómová DNA
CHO	Chinese hamster ovary
IDUA	alfa-L-iduronidáza
IH	Hurlerovej syndróm
IH/S	Hurlerovej/Scheieov syndróm
IS	Scheieov syndróm
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NEB	New England Biolabs
PCR	polymerase chain reaction
RFLP	restriction fragment length polymorfism
RNA	ribonukleová kyselina
SDM	site directed mutagenesis
SNP	single nucleotid polymorphism
T	tymín

1. Úvod a ciele diplomovej práce

Projekt diplomovej práce bol zameraný na štúdium molekulárnej podstaty lyzozomálneho ochorenia mukopolysacharidózy typu I (MPS I, OMIM 252800), ktorého príčinou je porucha degradácie glykosaminoglykanov dermatansulfátu a heparansulfátu v dôsledku nefunkčnosti špecifickej hydrolázy alfa-L-iduronidázy (IDUA, EC 3.2.1.76) (NEUFELD a MUENSER 2001). Toto závažné ochorenie s autozomálne recesívnym typom dedičnosti a krajne nepriaznivou prognózou je v svetových laboratóriách študované na biochemickej i molekulárne genetickej úrovni. V géne *IDUA* bolo nájdených viac ako 100 mutácií (HGMD databáza, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>) a 30 polymorfizmov (BEESLEY *et al.* 2001).

V slovanskej populácii genotyp pacientov s MPS I nebol až na výnimky študovaný. Podľa našich znalostí zmeny v géne pre *IDUA* u zdravej slovanskej populácie neboli popísané vôbec.

Cieľom diplomovej práce bola prvá molekulárne genetická štúdia génu pre *IDUA* v českej populácii a u českých a slovenských pacientov s rôznymi fenotypmi MPS I. Boli zavedené metodické postupy umožňujúce analýzu genotypu ďalších možných pacientov s MPS I, čo je dôležité aj pri prenatálnej diagnostike. Ďalej sme charakterizovali gén *IDUA* na úrovni polymorfizmov a haplotypov, čo prispeje k poznatkom o pôvode mutantných aliel aj aliel vyskytujúcich sa v populácii. V budúcnosti by tieto údaje mohli pomôcť pri predikcii fenotypu na základe znalosti pacientovho genotypu.

2. Literárny úvod

2.1. Základná charakteristika metabolických ochorení

Mukopolysacharidózy (MPS) sú vzácne ochorenia patriace k dedičným poruchám metabolizmu (DPM). Spoločným menovateľom DPM sú geneticky podmienené zmeny v tvorbe proteínov, zvyčajne enzýmov. Znížená, až nulová aktivita konkrétneho enzýmu môže viesť k metabolickému bloku s hromadením fyziologických alebo atypických metabolitov v tkanivách alebo v telesných tekutinách, čím u postihnutého jedinca dochádza postupne k poškodeniu funkcie jednotlivých tkanív a orgánov. Klinicky závažná metabolická porucha môže vzniknúť aj na základe postihnutia transportných proteínov, receptorov, štruktúrnych proteínov bunkovej membrány alebo regulačných proteínov.

Prejav metabolických ochorení je vždy do určitej miery ovplyvnený aj pôsobením vonkajšieho prostredia.

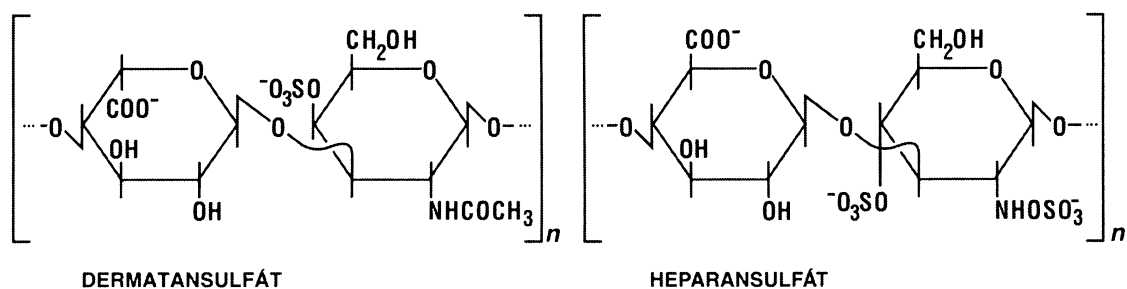
Klinicky, biochemicky i geneticky predstavujú dedičné poruchy metabolizmu heterogénnu skupinu viac ako 450 ochorení, ktoré sú závažné a majú vysokú morbiditu a mortalitu hlavne v detskom veku. Včasná diagnóza je dôležitá ako pre liečbu, aj keď len časť metabolických ochorení je liečiteľná alebo liečbou ovplyvniteľná, tak aj pre potrebu genetického poradenstva a prenatálnu diagnostiku v postihnutej rodine (NEUFELD a MUENSER 2001).

2.1.1. Mukopolysacharidózy

Mukopolysacharidózy (MPS) patria medzi lyzozomálne ochorenia s hromadením substrátu (lysosomal storage diseases (LSD)). Lyzozóm je cytoplazmatická organela obsahujúca viac ako 50 hydrolytických enzýmov a asociovaných proteínov, ktoré napomáhajú bunečnej degradácii makromolekúl zahrňujúcich polypeptidy, sacharidy, lipidy a nukleové kyseliny (BROOKS *et al.* 2001). Tieto makromolekuly, ktoré by sa normálne odbúrali, sa pri LSD ukladajú.

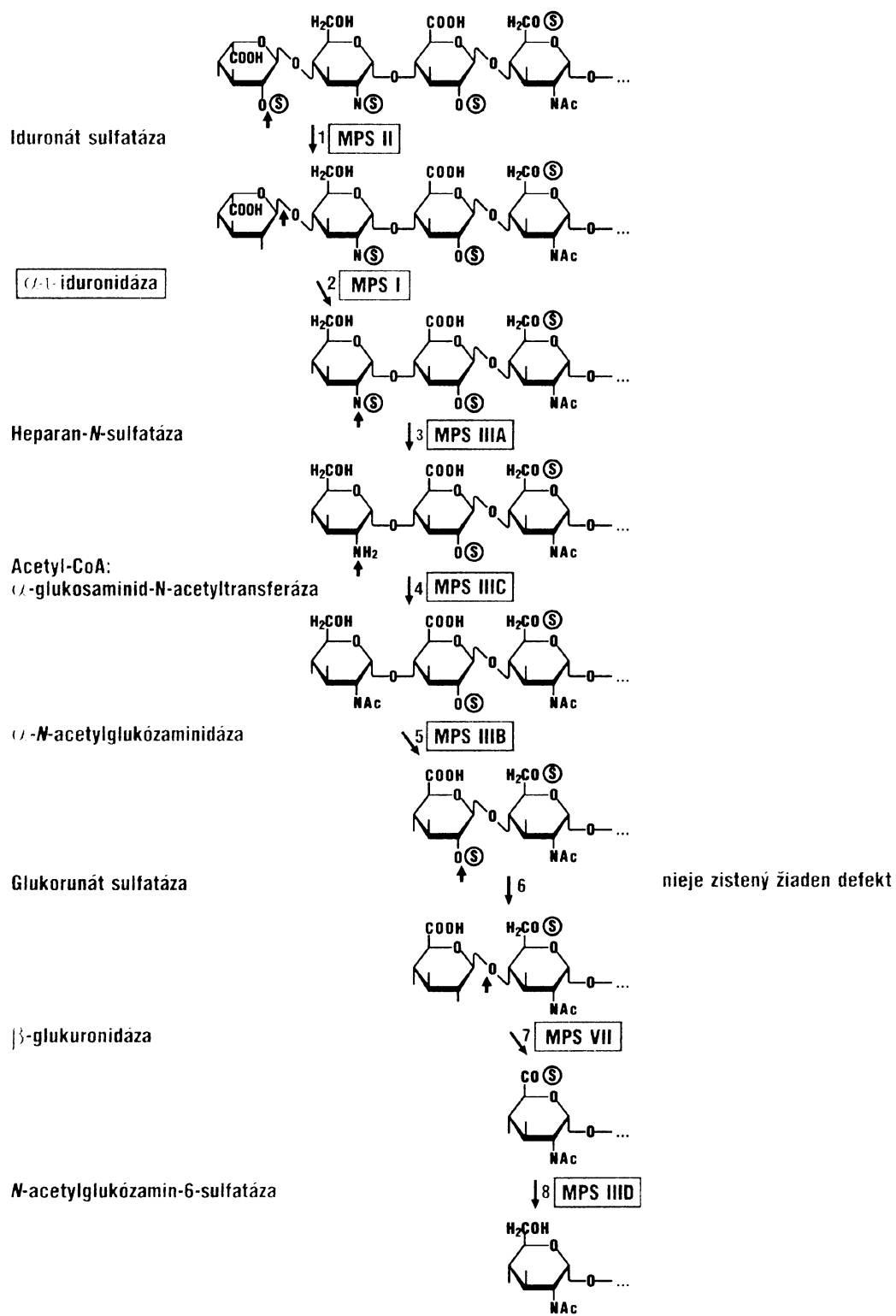
Mukopolysacharidózy sa klasifikujú do viacerých typov na základe klinickej, genetickej a biochemickej rozdielnosti. Na degradácii glykosaminoglykanov (GAG) sa zúčastňuje 11 enzýmov. Medzi GAG patrí dermatan-, heparan- a keratansulfát a chondroitinsulfáty. GAG sú komplexné heterosacharidy pozostávajúce z dlhého polysacharidového reťazca kovalentne sa viažuceho k proteínovému jadru (VOGEL *et al.*

1997). Dermatansulfát obsahuje zvyšky L-iduronátu a N-acetyl-D-galaktosamin-4-sulfátu, heparansulfáty majú zložitejšiu štruktúru, v ktorej sa v lineárnom reťazci striedajú zvyšky D-glukuronátu, L-iduronátu, D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu v rôznej miere esterifikované kyselinou sírovou (Obr. 1). Oba tieto GAG sú súčasťou medzibunečnej hmoty, spojivových tkanív, kože atď. (ŠÍPAL *et al.* 1992).



Obr. 1 Štruktúrna jednotka dermatansulfátu a časť reťazca heparansulfátu

Katabolizmus GAG začína endohydrolyzou polysacharidov na oligosacharidy a pomocou exohydrolyz sa tieto oligosacharidy postupne redukujú na monosacharidy a anorganický sulfát (Obr. 2). V 1. kroku sa odstraňuje sulfát z koncovej iduronátovej skupiny pomocou iduronát sulfatázy. Defekt v géne kódujúcom tento enzým spôsobuje MPS typu II (Hunterov syndróm), ktorá jediná z MPS má gonozomálnu dedičnosť. Druhého kroku degradácie GAG sa zúčastňuje enzým α -L-iduronidáza, ktorá odbúrava koncovú iduronátovú skupinu a zmeny v tomto enzýme spôsobujú MPS I. Mutácie enzýmov v ďalších troch krokoch vedú k vzniku MPS III, ktorá sa delí až na 4 podtypy, Sanfilippo A-D. MPS typu VII (Sly syndróm) je spôsobená defektnou β -glukuronidázou. MPS IV (Morquiova choroba) je spôsobená genetickým defektom pri degradácii keratansulfátu. Geneticky aj enzymaticky rozdielne typy MPS majú veľmi podobný klinický obraz.



Obr. 2 Degradácia heparansulfátu ôsmimi lyzozomálnymi enzýmami

Vľavo sú názvy enzýmov, ktoré katalyzujú označené reakcie.
Názvy chorôb odpovedajú deficitom aktivít príslušných enzýmov.

2.2. Mukopolysacharidóza typu I

2.2.1. *Klinický aspekt*

Mukopolysacharidóza typu I je jednou z najčastejších mukopolysacharidóz. Na svete je registrovaných takmer 4000 pacientov s MPS I (WRAITH *et al.* 2005). Jej výskyt sa v jednotlivých populáciách líši, ale približne je to 1:100 000 živo narodených detí. V českej populácii je incidencia 1:165 000, v slovenskej 1:100 000 (POUPĚTOVÁ, osobný kontakt).

MPS I (OMIM 252800) je ochorenie spôsobené deficitom aktivity lyzozomálneho enzýmu α -L-iduronidázy (IDUA, E.C 3.2.1.76) s autozomálne recesívnym typom dedičnosti. Podľa závažnosti klinických prejavov sa rozlišujú tri základné fenotypy: syndróm Hurlerovej (MPS IH), Scheieov syndróm (MPS IS) a medzi nimi sa nachádza syndróm Hurlerovej/Scheieov (MPS IH/S) (NEUFELD a MUENSER 2001).

Najťažšia forma, Hurlerovej syndróm, bola popísaná už v roku 1919. Typickým príznakom je charakteristická tvár s hlbokým, plochým koreňom nosu a veľkými nosnými otvormi, širokým rozstupom očí a zákalmi rohovky, s odutými perami (vzhľad tváre pripomína gotické chrliče), veľkým jazykom a rozostúpenými zubami (Obr. 3). Postihnutí sú malého vzrastu, majú krátky krk, vyklenuté brucho, dráповité prsty, široké, neohrabané nohy (WIEDEMANN *et al.* 1996) a progredujúce zmeny štruktúry kostí v zmysle „dysostosis multiplex“. Z ďalších závažných prejavov je to hepatosplenomegália, zväčšenie srdca a chlopňové vady a ťažká mentálna retardácia. Prvé príznaky sa objavujú behom niekoľkých mesiacov po narodení. Ochorenie má progresívny priebeh, po počiatočnom normálnom vývoji dochádza k zástave a neskôr k regresii psychomotorického vývoja, keď pacient stráca už naučené vedomosti. Postihnutie orgánov má tiež progresívny charakter. Opakované ušné a nosné infekcie, obštruktívne ochorenie dýchacích ciest a kardiomyopatia vedú obvykle k úmrtiu už počas prvých desiatich rokov pacientovho života.



Obr. 3 Pacienti s Hurlerovej syndrómom.

Typické črty tváre a tela.

Fenotyp MPS IH/S bol popísaný v roku 1976 (STEVENSON *et al.* 1976). Tento fenotyp je charakterizovaný normálnym alebo mierne zníženým intelektom a somatickými symptómami, ktoré sa začínajú prejavovať obvykle medzi 3. a 8. rokom života. Prejavy ochorenia sú miernejšie ako pri MPS IH, ale stále sa vyskytujú závažné prejavy ako napr. „dysostosis multiplex“, kĺbna stuhlosť, hepatosplenomegália, zákal rohovky, hluchota a srdcové vady. Pacienti sa často dožívajú dospelosti, ale v 2. decéniu života sa prejavujú vážne poruchy mobility a problémy spojené s postihnutím kardiovaskulárneho aparátu.

Pacienti so Scheieovým syndrómom, ktorý bol prvýkrát popísaný v roku 1962, majú zvyčajne len mierne neurologické postihnutie. Hoci dĺžka ich života sa blíži normálnej, tiež je limitovaná postihnutím kardiovaskulárneho a spojivového systému. Prejavy „dysostosis multiplex“, kĺbnej stuhlosti spojenej s krátkym krkom a malými karpálnymi kostičkami, hepatosplenomegálie, postihnutie rohoviek a srdcové vady bývajú už ľahšie ako u typu MPS IH/S. Prejavujú sa po 5. roku života.

Klasifikácia pacientov do troch základných skupín nie je vždy možná, pretože jednotlivé klinické prejavy ochorenia predstavujú kontinuum fenotypov medzi MPS IH a MPS IS.

2.2.2. *Biochemický aspekt*

IDUA je jedným z lyzozomálnych enzýmov, ktorý sa zúčastňuje degradácie GAG. Pri 2. kroku hydrolyzy glykosaminoglykanov IDUA odštiepuje neredukujúci terminálny iduronát (Obr. 2 hore) (NEUFELD a MUENSER 2001). U pacientov s MPS I dochádza v dôsledku deficitu enzýmu IDUA k akumulácii týchto čiastočne degradovaných GAG v tkanivách (fibroblasty, bunky pečene, sleziny a lymfatických uzlín, leukocyty, epiteliálne bunky v glomeruloch, nervové bunky, Kupferove bunky) (VOGEL *et al.* 1997) a k zvýšenej exkrécii GAG v moči. BUNGE *et al.* (1998) ukázali rozdiel medzi Scheie a Hurler pacientmi aj v množstve akumulovaných GAG. Scheie pacienti majú menej akumulovaných GAG a zároveň aj ich rýchlejší obrat (turn over).

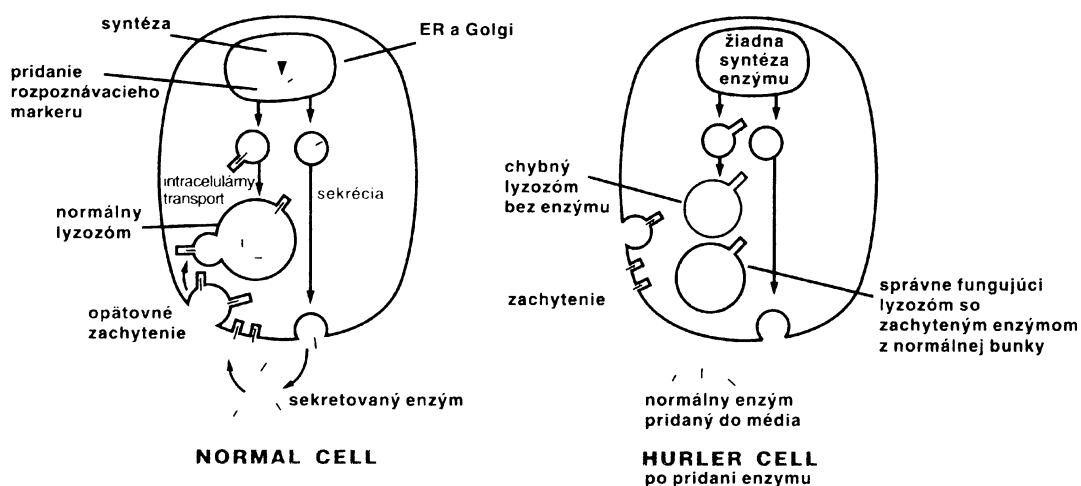
Kvantitatívnou a kvalitatívnou analýzou GAG izolovaných z moča je možné zaradiť pacienta do skupiny mukopolysacharidóz s možnými diagnózami MPS typu I, II, VI a VII. Oligosacharidy izolované z moču týchto pacientov tvoria di-, tri-, tetra-, penta-, a hexasacharidy (FULLER *et al.* 2004). K potvrdeniu diagnózy MPS I je nutné stanoviť deficit aktivity α -L-iduronidázy v leukocytoch izolovaných z periférnej krvi, v kultivovaných kožných fibroblastoch alebo autoptických tkanivách.

Pri interpretácii biochemických výsledkov treba mať na pamäti pseudodeficit IDUA. Pseudodeficit spôsobuje u klinicky zdravých jedincov nulovú alebo veľmi nízku aktivitu enzýmu pri vyšetrení s umelým substrátom (TAYLOR *et al.* 1993).

Pseudodeficit IDUA bol v literatúre popísaný trikrát, pričom v jednom prípade bola molekulárnou podstatou tohoto javu variácia A300T (ARONOVICH *et al.* 1996).

2.2.3. *Liečebné postupy a prevencia*

Pre diagnostikovanie MPS I sa využíva aj kultúra kožných fibroblastov pacientov s MPS I. Tieto fibroblasty akumulujú rovnaké dermatan- a heparansulfátové di- a trisacharidy, aké boli identifikované v moči. Pokusné pridanie rekombinantného enzýmu IDUA k médiu tkanivovej kultúry spôsobilo, že množstvo týchto oligosacharidov sa redukovalo až na úroveň v normálnych kontrolných bunkách (Obr. 4) (MONTGOMERY *et al.* 1990, FULLER *et al.* 2004). Tento objav ukázal cestu k možnostiam liečby.



Obr. 4 Sekrécia a opätovné zachytenie lyzozomálneho enzýmu normálnymi a mutovanými bunkami rastúcimi v kultúre.

Hurlerovej bunky zlyhávajú v produkcii alfa-L-iduronidázy, ale defekt môže byť napravený pridaním enzýmu do média (VOGEL *et al.* 1997).

Súčasná liečba MPS I pacientov sa môže rozdeliť na tri základné typy, ktoré sa zvyčajne prelínajú (www.genezyme.com):

- podporná starostlivosť a liečba komplikácií, ktoré zľahčia symptómy
- intravenózne podávanie rekombinantného ľudského enzýmu (enzyme replacement therapy, ERT) je určené pre pacientov s miernymi formami ochorenia (ľahšie IH, IH/S a ťažšie IS), u ktorých nie je postihnutá CNS, pretože enzým neprechádza hematoencefalickou bariérou, ale môže byť prevenciou pred zhoršovaním klinických príznakov. Klinické skúšky s laronidázou (Aldurazyme®) ukázali viditeľné zlepšenie dýchacích funkcií, funkčnú kapacitu a výdrž (napr. schopnosť chodenia) alebo zmenšenie veľkosti pečene (WRAITH *et al.* 2004). Napriek pozitívnym ohlasom sa vyskytli aj úmrtia jedného IH a troch IH/S pacientov liečených rôzne dlhú dobu rekombinátovým enzýmom (LIN *et al.* 2005, WRAITH *et al.* 2005).
- v súčasnosti najefektívnejší terapeutický postup, ktorý je používaný u pacientov s ťažkými formami ochorenia je transplantácia kostnej drene, prípadne buniek fetálnej krvi, ktorá sa robí od roku 1980 (HOBBS *et al.* 1981). Všeobecne platí, že transplantácia uskutočnená pred nástupom klinických príznakov má väčšiu nádej na úspech (PETERS *et al.* 1998), pretože dokáže predísť závažnému postihnutiu CNS alebo príznaky čiastočne zmierniť. Na druhej strane je transplantácia kostnej drene metóda nesúca vysoké riziko

morbidity a mortality a mala by byť používaná len v starostlivo vybraných prípadoch. Vhodným kandidátom pre transplantáciu je presymptomatický pacient, u ktorého sa predpokladá ťažký fenotyp.

Prenatálna diagnostika je jediná účinná pomoc rodinám, v ktorých bola MPS I diagnostikovaná. Najčastejšie sa stanovuje aktivita IDUA v choriových klkoch (natívnych alebo kultivovaných), alebo je možné použiť aj bunky plodovej vody.

V krajinách s vysokou frekvenciou manželstiev pokrvne-blízkych osôb, ako napr. v Tunisku, má detekcia heterozygotov a prenatálna diagnostika v postihnutých rodinách dôležitý sociálny a ekonomický význam (LARADI *et al.* 2005).

Predimplantačná genetická diagnostika, pri ktorej je embryo vyšetrované pre jednotlivé genetické choroby, je ďalšia sľubná metóda pre postihnuté rodiny. Na vyšetrenie je potrebný odber 1–2 embryonálnych buniek, čiže biopsia blastomér, ktorá sa uskutočňuje na 3. deň v štádiu, keď má embryo ešte len 6–10 buniek. Niekedy stačí testovať len polárne telieska, čiže len chromozómy od matky. Týmto spôsobom sa narodilo zdravé dieťa zdravým rodičom, ktorí sú pokrvní príbuzní a zároveň nositelia mutantnej alely s Q70X (TOMI *et al.* 2006).

2.2.4. Genetický aspekt

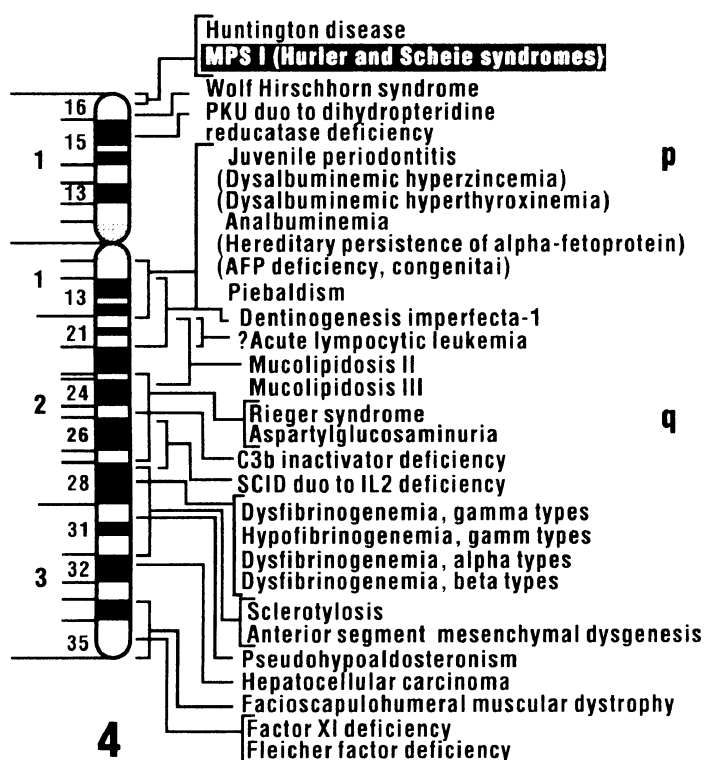
Ako bolo povedané vyššie, vo voľbe liečebného postupu hraje významnú úlohu včasná a správna znalosť fenotypu. Potom, čo bol izolovaný a charakterizovaný gén pre IDUA, sa pozornosť obrátila k možnosti využiť k predikcii fenotypu molekulárnu diagnostiku, pretože snaha rozlíšiť jednotlivé klinické formy biochemickými a imunologickými technikami sa stretla len s čiastočným úspechom.

Gén pre IDUA

Gén pre IDUA sa nachádza v oblasti 4p16.3 (Obr. 5) a je mapovaný na lokuse D4S111, 1,5-2 Mb od génu pre Huntingtonovu chorobu a 700kb od teloméry (MAC DONALD *et al.* 1991, WEBER *et al.* 1991). Zaberá oblasť približne 19 kb a obsahuje 14 exónov s dĺžkou od 77 bp do 217 bp. Prvé dva exóny génu pre IDUA sú separované intrónom 2 o dĺžke približne 13 kb od zvyšku exónov. Ostatných 12 exónov tvorí 4,5 kb dlhý reťazec s intrónmi o dĺžke 78 – 478 bp. Intrón 2 obsahuje Alu-repetitívnu časticu a vysoko polymorfnú VNTR repetíciu (používa sa na definovanie D4S111 lokusu) (SCOTT *et al.* 1992d). Všetky intrón-exónové zostrihové miesta spĺňajú GT/AG pravidlo, okrem intrónu 11, kde sa uplatňuje GC/AG výnimka. Potenciálny promóter pre IDUA má len GC-box konsensus sekvencie a možné viacpočetné iniciačné miesta

transkripcie (CA), ktoré sa zhodujú s housekeeping promótorom s nízkou úrovňou transkripcie (SCOTT *et al.* 1995). Transkripcia *IDUA* prebieha smerom k centromére (SCOTT *et al.* 1992a).

Gén pre *IDUA* sa čiastočne prekrýva s génom pre sat-1 (kódujúci sulfát/aniónový transportér), ktorý je lokalizovaný na komplementárnom vlákne DNA a jeho 1. exón je umiestnený v oblasti intrónu 2 génu pre *IDUA* (SCOTT *et al.* 1995).



Obr. 5 Lokalizácia *IDUA* génu na chromozóme 4 (4p16.3)

Proteín *IDUA*

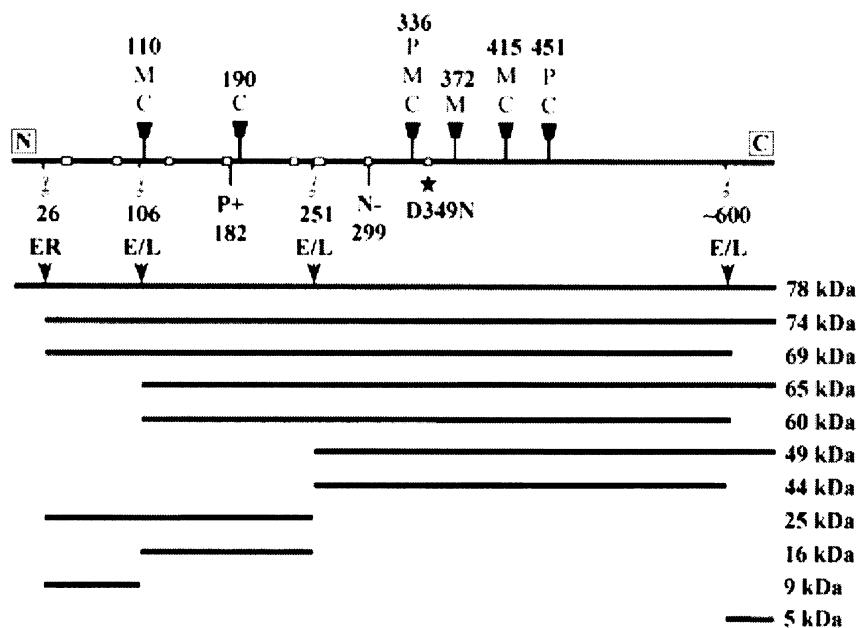
IDUA gén kóduje 2,3 kb dlhú mRNA s otvoreným čítacím rámcom o veľkosti 1959 bp a polypeptidový reťazec o 653 aminokyselinách. *IDUA* proteín tvorí monomér.

U mRNA izolovanej z fibroblastov, pečene a obličiek sa zistila existencia alternatívne zostrihutej mRNA. Pri alternatívnom zostrihu dochádza k vypusteniu exónu 2 alebo 4, pri zachovaní čítacieho rámca (SCOTT *et al.* 1991).

Zistilo sa, že alfa-L-iduronidáza prechádza rozsiahlym proteolytickým spracovávaním, pričom sa tvorí najmenej 10 polypeptidov (Mr 5 – 74 kDa) (Obr. 6)

(SCOTT *et al.* 1991, TAYLOR *et al.* 1991). Aktívna forma IDUA proteínu má 69 kDa. Táto rozsiahla proteolýza je pravdepodobne vnútrobunková, ako výsledok normálneho výskytu v endozo-lyzozomálnych váčkoch (BROOKS *et al.* 2001).

Proteínová sekvencia obsahuje 6 potencionálnych N-glykozylovaných miest (N110, N190, N336, N372, N415 a N451). Všetky sú využité (SCOTT *et al.* 1991, KAKKIS *et al.* 1994), ale pravdepodobne len na dvoch z nich (N336 a N451) sa nachádza manóza-6-fosfát marker, potrebný pre transport enzýmov do lyzozómov (ZHAO *et al.* 1997).



Obr. 6 Schéma α -L-iduronidázy

Otvorené boxy na α -L-iduronidázovej sekvencii reprezentujú β -listy navrhnuté DURAND *et al.* (2000), okrem β 8-listu. Tento β 8-list nie je v IDUA jasne určený a tu je prezentovaný na základe publikovanej mutácie D349N (pozícia zvyšku je naznačená *), ktorá spôsobuje zrušenie IDUA katalytickej aktivity a môže preto reprezentovať možnú oblasť pre viazanie substrátu (BROOKS *et al.* 2001). Navrhovaný nukleofilný zvyšok E299 (N-) a kyslo-zásaditý katalyzátor E182 (P+) sú tiež naznačené. Sacharidovú štruktúru určil ZHAO *et al.* (1997), kde C reprezentuje komplex sacharidových reťazcov, M reprezentuje oligosacharidový reťazec s vysokým obsahom manózy a P reprezentuje oligosacharidový reťazec s vysokým obsahom manóza-6-fosfátu. Miesta proteolýzy, u ktorých je známe, že dávajú vznik viacerým IDUA formám (SCOTT *et al.* 1991), sú naznačené nožičkami a číslom aminokyselinového zvyšku. Známe spracované polypeptidové formy sú zobrazené v dolnej časti obrázku so šípkami ukazujúcimi proteolytické miesta spracovania proteínu. Tieto miesta sú buď pre štiepenie signálneho peptidu, ktorý sa vyskytuje v ER, alebo pre iné proteolytické javy, ktoré sa zdajú byť endozóm/lyzozómálnymi (E/L) javmi. Ohraničené C a N reprezentujú príslušné konce proteínu.

IDUA proteín patrí medzi glykozyldrolázy (GH), ktoré sa klasifikujú do 58 rodín na základe podobnosti ich aminokyselinových sekvencií (HENRISSAT 1991; HENRISSAT a BAIROCH 1993, 1996). IDUA patrí do rodiny 39 klanu GH-A (HENRISSAT a BAIROCH 1996). Enzýmy tohoto klanu hydrolyzujú glykozidovú väzbu pomocou všeobecného kyslého katalytického mechanizmu so zachovaním anomérnej konfigurácie. Tento mechanizmus využíva dva zvyšky glutámovej kyseliny, z ktorých jeden je nukleofil a druhý protónový darca. Protónovému darcovi vždy predchádza asparagínový zvyšok. Analýzou súboru známych 3D štruktúr z tejto skupiny proteínov sa odhalili ich katalytické domény, ktoré pozostávajú z $(\alpha/\beta)_8$ súdku, pričom glykozidázové katalytické miesta sú umiestnené na šiestich C-koncoch z ôsmich β reťazcov (DURAND *et al.* 2000). V roku 2001 BROOKS *et al.* z 2D analýzy predpovedal funkčné konzervované aminokyseliny pre niektoré GH-A enzýmy, vrátane IDUA. Reťazec β_2 obsahuje nukleofilný aktivátor R89 a H91, β_3 reťazec miesto na naviazanie substrátu v pozícii H139, β_4 obsahuje N181 a protónový donor E182, v β_6 reťazci je aminokyselina H262 pre deprotonáciu nukleofilu a β_7 má na pozícii G299 nukleofil. Enzým IDUA má osem α -helixov a len sedem β -listov, β_8 reťazec chýba (BROOKS *et al.* 2001).

Mutácie vznikajúce v týchto β reťazcoch sa zdajú byť časté. Pri deficite IDUA, ale aj iných glykozyldroláz, sa často vyskytuje zámena arginínového zvyšku R pre nukleofilný aktivátor na reťazci β_2 (DURAND *et al.* 2000).

REMPEL *et al.* (2005) potvrdil niektoré predošlé predpoklady vytvorením 3D modelu pre ľudský IDUA proteín (Obr. 7). 3D model vytvoril pomocou homológneho modelu enzýmu β -D-xylozidázy z *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, ktorý tiež patrí do GH-A rodiny 39. Proteín IDUA je však dlhší o 153 AK zvyškov, preto prvých 34 a posledných 129 AK zvyškov sa v modeli neobjavili a sú naznačené ako voľné konce.

Model potvrdzuje, že katalytická doména IDUA pozostáva z $(\alpha/\beta)_8$ súdku, pričom β_8 reťazec nebol pozorovaný. Niektoré očakávané zvyšky AK v aktívnych miestach enzýmu sa vskutku našli v tesnej blízkosti nukleofilov (R89, H91, E182), hoci niektoré iné sa nepotvrdili (H139, H262).



Obr. 7 Stužkový model IDUA s vyznačeným aktívnym miestom.

Pohľad pozdĺž $(\alpha/\beta)_8$ súdku, ôsmy β -list nie je prítomný v IDUA. α helixy sú červené, β -listy zelené. (REMPER *et al.* 2005).

Mutácie v géne IDUA

V 90-tych rokoch sa podarilo nájsť a charakterizovať gény enzýmov pre hydrolyzu glykosaminoglykanov. Mutácie identifikované v týchto génoch sú väčšinou vzácne alebo privátne, existujú však aj mutácie predominantné v určitej geografickej alebo etnickej populácii (tzv. prevalentné mutácie).

Mutácie v géne pre IDUA boli analyzované u pacientov rôznych národností a etnických skupín (BACH *et al.* 1993; BUNGE *et al.* 1994, SCOTT *et al.* 1995; VOSKOBOEVA *et al.* 1998, BEESLEY *et al.* 2001, atď.). Dodnes bolo popísaných viac ako 100 mutácií (www.hgmd.org, TERLATO *et al.* 2003). Mutácie zahŕňajú nonsense a missense mutácie, delécie a inzercie a zostrihové mutácie. Dosiaľ neboli v géne pre IDUA nájdené žiadne rozsiahle zmeny, vždy sa jedná o mutáciu týkajúcu sa nanajvýš niekoľkých nukleotidov. Pri deléciách aj inzerciách ide zvyčajne o zmenu 1-12 bp (s výnimkou 703del22ins10 (MOSKOWITZ *et al.* 1993), 1952del25 (LI *et al.* 2002) a 1839del29 (VENTURI *et al.* 2002)).

Zmeny v géne môžeme rozlíšiť na mutácie, zjavne spôsobujúce poškodenie transkriptu a následne aj vznikajúceho proteínu, a na nepatogénne varianty v sekvencii a/alebo polymorfizmy, ktorých škodlivosť je relatívna.

Prevalentné mutácie

U pacientov s MPS I sa vyskytujú prevalentné mutácie, ktorých charakter aj početnosť závisia na populácii, v ktorej bola štúdia robená.

SCOTT *et al.* (1992b) bol prvým, kto určil dve prevalentné mutácie Q70X a W402X pre kaukazské národy.

V ďalších štúdiách týkajúcich sa aj týchto prevalentných mutácií sa určili ich frekvencie v rôznych kaukazských národoch. V Európe dosahujú tieto mutácie rozličných hodnôt – pri W402X od 11 % v Taliansku, cez 17 % v Škandinávii, 52 % v Británii až po 60 % v Španielsku (malá vzorka pacientov). Pre mutáciu Q70X je to od 7% v Británii, 13 % v Taliansku, 10% v Španielsku a 62 % v Škandinávii (BUNGE *et al.* 1994, GATTI *et al.* 1997, GORT *et al.* 1998). Rozdiel je aj vo frekvencii samotných mutácií – v určitých oblastiach je W402X približne 2,5krát viac frekventovaná ako Q70X (BUNGE *et al.* 1994).

Medzi jednotlivými oblasťami Európy sú aj ďalšie viditeľné rozdiely – v severnej Európe prevláda ťažšia forma fenotypu (MPS IH), spôsobená dvoma spomínanými mutáciami, kým v strednej Európe sú časté aj iné mutácie: A327P – 11 % (SCOTT *et al.* 1995), P533R – 11 % v Taliansku (SCOTT *et al.* 1995) a 10 % v Španielsku (GORT *et al.* 1998), L218P – 6,5 % (BUNGE *et al.* 1994). Vyššia frekvencia mutácie P533R v stredozemnej oblasti je pravdepodobne spôsobená dávnymi nájzdami Islamistov, u ktorých vyzerá byť táto mutácia bežnou – 92% u marockých pacientov (ALIF *et al.* 1999) a 40% v Tunisku (LARADI *et al.* 2005).

Aj v oblasti potomkov Staroeurópanov, v Severnej Amerike, sú prevalentné mutácie zhodné s európskymi. Frekvencie troch významných mutácií: W402X – 46%, Q70X – 8,6%, A75T – 2,9% sa veľmi líšia od frekvencií rovnakých mutácií vyskytujúcich sa prevažne v severnej Európe, výnimku tvorí štvrtá mutácia 474-2a→g - 5,7 %, ktorá sa v Európe vyskytuje zriedka. Hoci rozdiely v mutačných frekvenciách medzi týmito dvoma skupinami nie sú štatisticky významné, môžu odrážať genetický drift v bežnej zakladateľskej populácii (CLARKE *et al.* 1994).

Na opačnej strane zemskej pologule, v Austrálii, prevláda v beloške populácii mutácia W402X – 55 % (SCOTT *et al.* 1995).

Štúdiá spracovaná na ruských pacientoch Elenou Y. VOSKOBOEVOU *et al.* (1998) tiež potvrdzuje výsledky ostatných populačných štúdií. Mutácie prevalentné pre Európanov neboli nájdené u pacientov pochádzajúcich z neeurópskych etnických skupín bývalého ZSSR (Tatári, Arméni, Gruzínci) a Japonska. Pacienti patriaci k moslimským a transkaukazským etnikám sú charakterizovaní unikátnou sadou *IDUA* aliel (VOSKOBOEVA *et al.* 1998). Ani ďalšia práca o izraelských moslimských a arabských pacientoch nepotvrdila európske prevalentné mutácie pre túto oblasť. Vyskytujú sa tu iné mutácie, ktoré nie sú bežné pre kaukazské národy (BACH *et al.* 1993). U japonských pacientov bola identifikovaná prevalentná mutácia R89Q (24%), ktorá sa vyskytuje u Európanov zriedka a druhá prevalentná mutácia 704ins5 (18%) (YAMAGISHI *et al.* 1996) bola okrem Japonska nájdená ešte u kórejských pacientov (LEE *et al.* 2004).

Polymorfizmy

V porovnaní s génmi podobnej veľkosti bolo v géne pre *IDUA* identifikované veľké množstvo intragénnych polymorfizmov. Z 29 nájdených SNP (single nucleotide polymorphism) je 18 v kódujúcej oblasti a sedem z nich spôsobuje aminokyselinové substitúcie. Okrem toho bola nájdená jedna inzercia C v 8. intróne a vysoko informatívna VNTR v intróne 2 (SCOTT *et al.* 1995). Na rozdiel od mutácií polymorfizmy nie sú tak závislé na etniku, v ktorom sa vyskytujú. Napr. polymorfná alela A361T sa vyskytuje u Japoncov rovnako často ako u kaukazských národov. Predpokladá sa, že polymorfizmy sú jednou z príčin rozdielov v aktivite *IDUA* u zdravých jedincov (LEE-CHEN *et al.* 1998) a že u pacientov s MPS I modifikujú závažnosť prejavov primárne spôsobených mutáciami v géne pre *IDUA* (SCOTT *et al.* 1993b).

Haplotypy

Analýza haplotypov, ktorá využíva intragénne polymorfizmy, ukázala, že väčšina rekurentných mutácií v géne *IDUA* je asociovaných s viac ako jedným haplotypom, čo je evidencia rozdielov genetického základu (SCOTT *et al.* 1993a). Množstvo prípadov MPS I mutácií, ktoré sa viažu s viacerými haplotypmi, je v kontraste s bežnými genetickými ochoreniami s autozomálne recesívnou dedičnosťou,

ako napr. cystická fibróza, a tieto údaje môžu naznačovať vysokú frekvenciu intragénej rekombinácie v *IDUA* (SCOTT *et al.* 1993b).

SCOTT *et al.* (1992b) popísal mutáciu W402X v spojení s tromi haplotypmi, čo znamená, že pre danú mutáciu existuje viac ako jedna ancestrálna alela. YAMAGISHI *et al.* (1996) zistil, že každá z dvoch prevalentných japonských mutácií (R89Q a 704ins5) je viazaná na rozdielny špecifický haplotyp, čo naznačuje, že každá mutácia má spoločného zakladateľa (common founder).

LI *et al.* (2002) predpokladá, že reprezentatívne haplotypy viažuce sa na európske prevalentné mutácie sú L118-W402X a Q33H-Q70X, čím potvrdzuje, že tieto dve mutácie nemajú spoločného zakladateľa. Zdá sa, že existujú dve hlavné haplotypové štruktúry C-G a A-A pre polymorfizmy A8-A20 v prvom segmente a T-G-G-G-C a C-C-A-C-G v druhom segmente (N181-A314-A361T-T388-T410). Podobné výsledky popísal aj LEE-CHEN *et al.* (1998), ktorý navyše pozoroval aj rekombináciu v intróne 2.

2.2.5. Korelácia genotyp-fenotyp u pacientov s MPS I

Charakter niektorých mutácií dovoľuje predpovedať ich vplyv na aktivitu proteínu, napr. mutácie vedúce k posunu v čítacom rámci alebo predčasné ukončenie translácie dôsledkom vzniku stop kodónu budú mať pravdepodobne za následok nulovú aktivitu enzýmu (nulová alela). V prípade mutácií spôsobujúcich aminokyselinovú zmenu môže byť aspoň čiastočne zachovaná aktivita enzýmu a klinický efekt môže byť predpovedaný len na základe genotypu skôr opísaného pacienta. Predstava je taká, že dve nulové alely povedú k ťažkým prejavom choroby, zatiaľ čo aspoň jedna alela nesúca mutáciu dovoľujúcu syntézu enzýmu s nenulovou zvyškovou aktivitou vedie k ľahším fenotypom (Scott *et al.* 1995). Niektoré prípady túto teóriu potvrdzujú. Napr. mutácie časté v európskych krajinách (Q70X a W402X) vedú v homozygotnom stave alebo vo vzájomnej kombinácii vždy k závažným prejavom IH. Naopak mutácie R89Q, R89W a R383H boli v homozygotnom stave zatiaľ vždy spojené s fenotypom IS.

Na druhej strane boli opísané mutácie, ktoré vedú k rozdielnym fenotypom. Mutácia P533R v homozygotnom stave je u sicílskych pacientov spojená s miernym až stredne ťažkým fenotypom (GATTI *et al.* 1997), ale u marockých pacientov vyvoláva ťažké prejavy MPS IH (ALIF *et al.* 1999).

Mutácie v mieste zostrihu sú spájané so všetkými fenotypmi MPS I, kým inzercie a delécie popísané v literatúre zatiaľ vždy viedli k ťažkej forme ochorenia. Skôr opísané mutácie tiež môžu pomôcť charakterizovať mutáciu novú: intrónová mutácia c.678-7g→a bola definovaná ako mierna, pretože v kombinácii so známou nulovou mutáciou W402X vedie k miernemu fenotypu IS (SCOTT *et al.* 1993a).

Nevie sa, aký efekt môžu mať polymorfizmy, jednotlivito alebo v kombinácii, na stabilitu a spracovanie IDUA mRNA, na množstvo vytvoreného IDUA proteínu, na aktivitu, stabilitu a transport IDUA proteínu (SCOTT *et al.* 1995). Ukázalo sa ale, že majú vplyv na aktivitu enzýmu u zdravých jedincov. LEE-CHEN *et al.* (1998) preukázal pozitívnu koreláciu medzi haplotypom R105Q-A361T-V454I a IDUA aktivitou. Tieto tri polymorfizmy sa javia ako nenáhodne asociované.

Zaznamenaný je pacient z Talianska, ktorý má tri zmeny v sekvencii: 974ins12, P496R a polymorfizmus A591T. Táto inzercia s akoukoľvek inou mutáciou vždy viedla k miernemu typu (IS). Tento pacient je postihnutý ťažkou formou - Hurlerovej syndrómom, ku ktorému môže prispievať A591T polymorfizmus s účinkom na jednu z mutantných aliel (BEESLEY *et al.* 2001).

Japonské prevalentné mutácie spôsobujú u homozygotov miernu (R89Q/R89Q) alebo ťažkú formu (704ins5/704ins5) ochorenia a strednú formu (IH/S) u zložených heterozygotov (YAMAGISHI *et al.* 1996). U kaukazského pacienta s miernou homozygotnou mutáciou R89Q sa predpokladá možný negatívny účinok polymorfizmu A361T na stupeň IDUA aktivity, keďže pacient má MPS IH/S (SCOTT *et al.* 1993a).

Pri predikcii fenotypu z genotypu by sa nemalo zabúdať na opatrnosť, pretože zatiaľ sa neurčilo, do akej miery sa na diverzifikácii fenotypu podieľajú polymorfizmy, iné gény alebo faktory prostredia.

2.2.6. Funkčná štúdia

Rôznorodosť mutácií identifikovaných mutácií v géne pre IDUA viedla k viacerým úvahám, ako mutácia ovplyvňuje funkčnosť proteínu. Komplementárna DNA pre IDUA bola už klonovaná, sekvenovaná a exprimovaná v rôznych typov zvieracích buniek po začlenení do expresného vektoru. Pre expresiu IDUA proteínu sa používajú COS 1 a COS 7 bunky (BACH *et al.* 1993, LEE-CHEN *et al.* 1998, BEESLEY *et al.* 2001) alebo CHO bunky (SCOTT *et al.* 1991, KAKKIS *et al.* 1994, MATTE *et al.* 2003).

3. Materiál

3.1. Chemikálie

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega
ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)	USB
4-metylbelloferyl α -L-iduronide	Glycosynth
Adenozín-5'-trifosfát, ATP	Sigma
AG [®] 501-X8	Bio Rad
Agaróza	Serva
Akrylamid	USB
Ammonium peroxydisulfát, APS	Fluka
Ampicilín	Sigma
Albumín hovädzí sérový, BSA	Fermentas
Betaín	Sigma
Binding silan	Sigma
Bromfenolová modrá	Sigma
Dimetylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dodecylsírán sodný, SDS	USB
Dulbecco Modified Eagle Medium, DMEM	Invitrogen
Etanol	Merck
Etídium bromid	Sigma
Etyléndiamintetraoctan disodný, EDTA	Sigma
Fetálne bovinné sérum, FBS	Sigma
Fenol	Sigma
Ficoll 400	Merck
Formamid	Fluka
Glycerol	Fluka
Guanidínium tiokyanát, GuSCN	Sigma
Hydrolink Long Ranger Gel Solution	Serva
Hydroxid sodný	Lachema
Chloroform	Merck
Izoamylalkohol	Sigma
Izopropyl-1-tio- β -D-galaktozid, IPTG	Sigma

Kvasničný hydrolyzát (Yeast extract)	Oxoid
Kyselina boritá	Merck
Lipofektamín	Invitrogen
Močovina	USB
N,N-dimetylformamid	USB
N,N'-metylénbisakrylamid, BIS	USB
N',N',N',N'-tetrametyletylendiamín, TEMED	Serva
Orange G sodiumsolt (farba)	Sigma
OptiMEM (bezsérové médium)	Invitrogen
Primery	Generi Biotech
Rnazín	Promega
Trypsín	Sigma
Tris (hydroxymetyl) aminometán	Merck
Tris(hydroxymetyl)aminometán hydrochlorid	Merck
Tryptón	Oxoid

Všetky chemikálie boli najvyššej dostupnej kvality (molecular biology grade nebo p.a.).

3.2. Roztoky

Lyzačný roztok na červené krvinky (príprava RNA)

10 mmol/l KHCO₃
155 mmol/l NH₄Cl
0,1 mmol/l EDTA

TBE pufor 10x

0,89 mol/l Tris
0,89 mol/l Kyselina boritá
0,2 mol/l EDTA

PBS (Phosphate Buffer Saline)

1 x roztok

137 mmol/l NaCl
2,7 mmol/l KCl
4,3 mmol/l Na₂HPO₄ · 7 H₂O
1,4 mmol/l KH₂PO₄

**AGTC (*Acid guanidinium thiocyanate*)
roztok (príprava RNA)**

4 mmol/l Guanidínium tiokyanát

25 mmol/l Citrát sodný

0,5% Sarcosyl

Fenol sýtený H₂O (príprava RNA)

Po rozpustení pri 60°C pridať 0,1% 8-hydroxychinolínu a sýtiť rovnakým objemom H₂O, sýtiť jeden deň, potom zamraziť v malých alikvótoch.

STOP mix (sekvenovanie)

50 ml N,N-dimetylformamid

5 g AG[®] 501-X8

Miešať 30 min pri laboratórnej teplote, prefiltrovať cez filtračný papier. Pridať dextran blue na konečnú koncentráciu 6 mg/ml a EDTA na konečnú koncentráciu 20 mmol/l.

Roztok IPTG 100mmol/l

28,2 mg IPTG rozpustiť v 1 ml H₂O.

Príprava roztoku etídium bromidu

50mg etídium bromid (EtBr)

100 ml H₂O

Do farbiacej vaničky 150 ml H₂O a 150μl roztoku EtBr

Sekvenačný gél (AlfExpress)

5,5% Hydrolink Long Ranger Gel Solution

6 mol/l močovina

1,5x TBE

**Lyzačný roztok na biele krvinky –
AGTC roztok + ME (príprava
RNA)**

0,72% merkptoetanolu (ME)
v AGTC roztoku

TAE pufo 50 x

2 mol/l Tris.HCl

1 mol/l kyselina octová (98%) ľadová

100 mmol/l EDTA

**Vzorkový pufo pre elektroforézu
(loading buffer) 10x**

20% (w/v) Ficoll 400

0,25% bromfenolová modrá

0,25% xylenkyanolová modrá

0,1 mol/l EDTA, pH 8

1% SDS

Roztok X-gal

20 mg X-gal rozpustiť v 1 ml N,N-dimetylformamidu.

Extrakčný pufo (príprava g DNA)

10 mmol/l Tris/HCl

100 mmol/l NaCl

25 mmol/l Na₄EDTA

0,5 % SDS

Upraviť pH pomocou HCl na 8,0. Sterilne zfiltrovať a ožiariť 3 x 7 minút na UV žiariči. Tesne pred použitím pridať proteinázu K (zásobný roztok 20 mg/ml), tak aby jej konečná koncentrácia bola 0,1 mg/ml, tj. na 1 ml extrakčného pufru pridať 5 μl zásobného roztoku proteinázy K.

3.3. Kultivačné média

Luria-Bertani (LB) médium s ampicilínom/kanamycínom

	Na 1000 ml
Kvasničný hydrolyzát	5 g
Tryptón	10 g
NaCl	10 g

Po premiešaní upraviť pH na 7-7,2 pomocou 1 mol/l NaOH (pridať cca 1ml). Autoklávovať, po vychladnutí na 50°C pridať ampicilín alebo kanamycín na konečnú koncentráciu 50 µg/ml.

Luria-Bertani (LB) agar s ampicilínom/kanamycínom

	Na 1000 ml
Kvasničný hydrolyzát	5 g
Tryptón	10 g
NaCl	10 g
Bakteriologický agar	15 g

Po premiešaní upraviť pH na 7-7,2 pomocou 1 mol/l NaOH (pridať cca 1ml). Autoklávovať, po vychladnutí na 50°C pridať ampicilín alebo kanamycín na konečnú koncentráciu 50 µg/ml. Rozliať na misky (25-30 ml LB agaru na jednu misku).

3.4. Enzýmy

Alkalická fosfatáza (CIAP)	TaKaRa
AmpliTaq FS DNA polymeráza	AP Biotech
<i>ApaI</i>	NEB
<i>ApaLI</i>	NEB
<i>BfaI</i>	NEB
<i>BstUI</i>	NEB
<i>DeepVent</i> DNA polymeráza	NEB
DNáza	TaKaRa
<i>DpnI</i>	NEB

<i>EcoRI</i>	TaKaRa, NEB
Exonuclease I	NEB
<i>FspBI</i>	Fermentas
<i>KlenTaq1</i> DNA polymeráza	Ab Peptides
KlenowI	TaKaRa
<i>KpnI</i>	TaKaRa
<i>NdeI</i>	NEB
<i>RsaI</i>	NEB
Shrimp alkalická fosfatáza, SAP	USB
SUPERSCRIPT™II Rnáza H- reverzná transkriptáza	GIBCO BRL
<i>Taq</i> DNA polymeráza	Promega
T4 DNA ligáza	NEB
<i>Tsp509I</i>	NEB

Ku všetkým použitým enzýmom boli použité komerčne dodávané a doporučované pufry.

3.5. Markery molekulových hmotností

GeneRuler™100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
1kb Plus DNA Ladder	Invitrogen

3.6. Bakteriálne kmene a vektory

TOP10 One Shot™ Cells	Invitrogen
XL 10- Gold Ultracompetent Cells	Stratagene
XL1-Blue Competent Cells	Stratagene
vektor pCR®2.1-TOPO	Invitrogen
vektor pSP72	Promega
vektor pIRES2-EGFP	BD Bioscience
	Clontech

3.7. Eukaryotické bunky

CHO cells	poskytnuté laboratóriom v Londýne
-----------	-----------------------------------

3.8. Komerčné súpravy

QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen
PPP Master Mix (PCR kit)	Top – Bio
QIAquick Mini Columns 2ml	Qiagen
QIA quick® PCR Purification Kit 250	Qiagen
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma
Fast Plasmid Mini Kit	Eppendorf
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosysteme
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen
Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

3.9. Primery

Primery pre PCR amplifikáciu genómovej a komplementárnej DNA

Prvá sada PCR primerov pre amplifikáciu genómovej DNA (Tab. 1) obsahovala na 5' konci previsy (overhangy) a tieto primery sa používali na sekvenovanie na planárnom sekvenátore AlfExpress, na klonovanie PCR produktu a na časť reštrikčných analýz.

Druhá sada PCR primerov pre amplifikáciu genómovej DNA pochádzala z londýnskej spolupráce (Tab. 2, BEESLEY *et al.* 2001). Tieto primery sa používali na sekvenovanie na kapilárnom sekvenátore Avant a MegaBACE a na časť reštrikčnej analýzy. Táto sada primerov pre PCR neobsahovala na 5' konci overhangy.

PCR primery pre amplifikáciu komplementárnej DNA sú v tabuľke 3.

Primery pre metódy ARMS, ACRS PCR a ciele mutagenézu Quickchange sú v tabuľke 4.

Tab. 1 Špecifické primery a dĺžka PCR produktov z genómovej DNA

Označenie primeru	Primer	Dĺžka PCR produktu (bp)
Ex1U Ex1L	5'- CGCGCCCAGACTCCGACC -3' 5'- CGCCCACTCAGGTGGAGGAC -3'	441
Ex2U Ex2L	5'- TGGCCCCTCGTCTTACTGCT -3' 5'- CGGGAGGTGGGGGAACAAG -3'	491
Ex3/4U Ex3/4L	5'- AGGCTCCCACATGCTCCGTT -3' 5'- GCAACCTGCCCAGGAGTACC -3'	568
Ex5/6U Ex5/6L	5'- GTGGGAGTCACTGAGGCGAG -3' 5'- CTCAGCACCACCAGGGTCAG -3'	594
Ex7U Ex7L	5'- GGCCTGCGGCTGGACTACAT -3' 5'- GGGCGGGTGTGTTGACCTG -3'	615
Ex8U Ex8L	5'- TTCGCGGACACCCCATTTA -3' 5'- GAGCCGCTCCCCAGCCTGGA -3'	523
Ex9/10U Ex9/10L	5'- TCGGGGGGCGGCTGGGCAAC -3' 5'- CGCTCCACCTCCCACCCACA -3'	622
Ex11/12U Ex11/12	5'- GCTCCCCTGGAGAACCCTGA -3' 5'- CGAGTGACCGCATGGGTGAA -3'	441
Ex13/14U Ex13/14L	5'- GGGGCTTGAGGGAATGAGGC -3' 5'- AGGGCAGCATGGGCACAGTG -3'	602

Overhangy prítomné na 5' konci špecifických primerov pre gDNA:

Upper: KS 5'- TCGAGGTCGACGGTATC -3'

Lower: T3 5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG -3'

Tab. 2 Špecifické primery a dĺžka PCR produktov z genómovej DNA

Označenie primeru	Primer	Dĺžka PCR produktu (bp)
IDUA 1(+)	5'- ACCCAACCCCTCCCAC -3'	398
IDUA 1(-)	5'- GCTCCGGTCTCTGAAGCT -3'	
IDUA 2(+)	5'- GAACGTGTGTGTCAGCCG -3'	304
IDUA 2(-)	5'- ACAAGGGGTCTTCCGAGC -3'	
IDUA 3(+)	5'- TCCCACATGCTCCGTTGT -3'	273
IDUA 3(-)	5'- GAATGGACATCCAAGGACTCA -3'	
IDUA 4(+)	5'- ACCCTCTCCCTCACCCAG -3'	312
IDUA 4(-)	5'- GCGTGATAGGGTGCAAC -3'	
IDUA 5(+)	5'- CATCACCTTGCACCCTCC -3'	273
IDUA 5(-)	5'- CGTCTACACCTGCCCTGG-3'	
IDUA 6(+)	5'- GAGGAAGGCAGGAGCAGAG -3'	359
IDUA 6(-)	5'- CTCAGCACCACCAGGGTC -3'	
IDUA 7(+)	5'- TGCGGCTGGACTACATCTC -3'	448
IDUA 7(-)	5'- AGTAGCAGGTTCTGATGCTGC -3'	
IDUA 8(+)	5'- CCACCTTCCCTCCCGAGAC -3'	386
IDUA 8(-)	5'- CTGGAGGAAGTGCGCTCC -3'	
IDUA 9(+)	5'- TCCTTACCAAGGGGAGG -3'	400
IDUA 9(-)	5'- CTGACACTCAGGCCTCGG -3'	
IDUA 10(+)	5'- TCCAGGGAGGTCTCTGGC -3'	291
IDUA 10(-)	5'- ACCCACACCGCCTCGGA -3'	
IDUA 11/12(+)	5'- GTGTGGGTGGGAGGTGGA -3'	466
IDUA 11/12(-)	5'- GTGACCGCATGGGTGAAG -3'	
IDUA 13(+)	5'- GGGGCTTGAGGGAATGAG -3'	300
IDUA 13(-)	5'- CCTGACCCAGGCTTCTC -3'	
IDUA 14(+)	5'- CAGGGCAGTACTGGGTGG -3'	331
IDUA 14(-)	5'- TATATTGCAAAGGGGGTGATG -3'	

Tab. 3 Špecifické primery a dĺžka PCR produktu z komplementárnej DNA

Označenie primeru	Primer	Dĺžka PCR produktu (bp)
cEx1U	5'- GCAGTGCAGCCCGAAGCCC -3'	2082
Ex13/14L	5'- AGGGCAGCATGGGCACAGTG -3'	

Overhangy prítomné na 5' konci špecifických primerov pre cDNA:

Upper: T7 5'-TAATACGACTCACTATAG - 3'

Lower: T3 5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG - 3'

Tab. 4 Primery pre ARMS, ACRS PCR a cieleńú mutagenézu Quickchange

SNP/mutácia	Primer	Metóda
R105Q	5'-ACCGTCCTTCTGCAGGGGGTCCAGTGGCCG-3' 5'-ACCGTCCTTCTGCAGGGGGTCCAGTGGCCA-3' 5'-AGCCCTGAATGGACATCCAAGGACTCAGAG-3'	ARMS
V620F	5'-AGACACAGGTGCTGTCTCTGGCTCCTACCA-3' 5'-TATATTGCAAAGGGGGTGATG-3'	ACRS
IVS11+5g>a	5'-GCGCGCCCCGAGAAGCCGCCCCGGCAGGCAT-3' 5'-GTGACCGCATGGGTGAAG-3'	ACRS
D315Y	S: 5'-CCGTGGAGGGCGTACGTGACCTACG-3' A/S: 5'-CGTAGGTCACGTACGCCCTCCACGG-3'	SDM
W402X	S: 5'-GGAGCAGCTCTAGGCCGAAGTGTGC-3' A/S: 5'-CGACACTTCGGCCTAGAGCTGCTCC-3'	SDM
V620F	S: 5'-GGCTCCTACCGATTTTCGAGCCCTGG-3' A/S: 5'-CCAGGGCTCGAAATCGGTAGGAGCC-3'	SDM
W626X	S: 5'-CCTGGACTACTAGGCCCGACCAGG-3' A/S: 5'-CCTGGTCGGGCCTAGTAGTCCAGG-3'	SDM
E640fs	S: 5'-GCAGTGCAGCCCCGAAG-3' A/S: 5'-ATATTGCAAAGGGGGTGA-3'	SDM

ARMS = amplification refractory mutation system, ACRS = artificial created restriction site, SDM = site-directed mutagenesis; S = sense, A/S = antisense

Primery na sekvenovanie PCR produktov

Na sekvenovanie PCR produktov na planárnom sekvenátore AlfExpress boli použité univerzálne sekvenačné primery T3, T7 a KS, ktorých sekvencie sa zhodovali so sekvenciami overhangov a ktoré boli značené na 5' konci karbocyanínom 5 (Cy5). Primery pre sekvenovanie na kapilárnom sekvenátore (Avant, MegaBACE) sa zhodovali s druhou sadou primerov pre PCR (Tab. 2)

Primery na kontrolné sekvenovanie cDNA-IDUA na kapilárnom sekvenátore

SP6 – vektorová sekvencia ATTTAGGTGACACTATAGAA

ID1 - CAACCTGCCTATGTG

ID2 - GTTTCCAAGTGGAAGTTC

ID3 - AGCTCTTCCCCAAGTTC

ID4 - TCCTGGACAGCAACCAC

ID5 - TGCCGTCGCTTTTGCTG

ID6 - CTTCAACCTCTTTGTGTTT

3.10. Prístroje a pomôcky

Autokláv	SANYO LaboAutoclave 2420
Bioblock	Scientific Pharmacia Biotech
Elektroforézy	EMBL PS143
Centrifúgy	Eppendorf
Digitálny fotografický prístroj	Olympus – Camedia C2000 Z
Kapilárny génový analyzátor 3100-Avant	ABI Prism
Kapilárny sekvenátor MegaBACE	Amersham Biosciences
LS50B fluorimeter	Perkin Elmer
Planárny sekvenátor	AlfExpress
Prístroj pre úpravu vody Milli-Q RG	Millipore
Spektrofotometer	Eppendorf
Termobloky	Grant QBT2, Techne DB T3
Termocyklery (Dyad a Tetrad DNA Engine)	BIO-Rad Laboratories
Trepačka	Cellstar
UV-žiarič	Macrovue 2011, Vilber Lourmat
Vodný kúpeľ	Frigomix
Vertikálny laminárny box	Holten Lamin Air

3.11. Počítačové vybavenie a software

3100 Avant Data Collection	ABI Applied Biosystems
ALFwin™ Sequence Analyser 2.0	Amersham Pharmacia Biotech
Oligo 5.0	National Biosciences
Prophet 5.0	BBN Systems and Technologies
Fragment Manager V1.2	Amersham Pharmacia Biotech
Blast	http://130.14.29.110/BLAST/
NEB cutter V 2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php

3.12. Referenčné sekvencie pre IDUA

GenBank - genómová DNA: NC_000004.10, REGION: 970615..988147 (CON 03
MAR-2006
- mRNA: NM_000203.2, 06-NOV-2005

4. METÓDY

4.1. Izolácia genómovej DNA

4.1.1. *Izolácia genómovej DNA z krvi*

K izolácii genómovej DNA z čerstvej celkovej nezrážanlivej krvi bola použitá komerčná súprava QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit od firmy Qiagen.

4.1.2. *Izolácia genómovej DNA z archívnych vzoriek*

K izolácii genómovej DNA z archívnych vzoriek bola použitá štandardná metóda fenolovej extrakcie (STRAUSS 2000). Peleta z leukocytov (z 2,5 ml krvi) bola resuspendovaná v 700 µl extrakčného pufru s proteinázou K a vzorka bola inkubovaná pri 50°C cez noc. K vzorke bolo pridaných 700 µl zmesi fenolu pufrovaného Tris-HCl na pH 8 s chloroformom a izoamylalkoholom v pomere 25:24:1 a extrakcia prebiehala 10 min pomalým kývaním na kývavej plošine. Organická a vodná fáza boli oddelené 2 min centrifugáciou pri 1700g. Vodná fáza bola extrahovaná rovnakým objemom zmesi chloroformu a izoamylalkoholu. Po 2 min centrifugácii pri 1700 g bola vodná fáza ešte raz extrahovaná zmesou chloroformu a izoamylalkoholu. DNA bola z vodnej fáze precipitovaná pridaním 7,5 mol/l octanu amónneho na konečnú koncentráciu 2,5 mol/l (tzn. na 1 ml vzorky bolo pridané 0,5 ml 7,5 mol/l octanu amónneho). Po premiešaní otáčaním bol pridaný jeden diel 100% etanolu. Precipitácia prebiehala 10 min pri pomalom kývaní. Precipitovaná DNA bola vytiahnutá z roztoku očkovacou kľučkou, rýchlo opláchnutá 70% etanolom, vysušená na vzduchu a rozpustená v H₂O. Kontrola genómovej DNA bola urobená elektroforézou v 1 % agarózovom géle v 1x TBE puFRE, k vizualizácii bol použitý etídium bromid.

4.2. Izolácia celkovej RNA

Celková RNA bola extrahovaná z izolovaných lymfocytov metódou izolácie ToRNAzolom, ktorá vychádza z metódy podľa CHOMCZYNSKEHO a SACCHIHO (1987).

Na prípravu celkovej RNA sa použili lymfocyty izolované z čerstvej krvi, ktoré sa lyzovali pridaním 1 ml ToRNAzolu a inkubovali 5 min pri pokojovej teplote. Po 10 min centrifugácii 12000 g, pri 2-8°C sa supernatant preniesol do novej 1,5 ml skúmavky, a doplnil ToRNAzolom do 1 ml. Ku každej vzorke sa pridalo 0,2 ml chloroformu = 1/5 objemu ToRNAzolu, 15 s sa dôkladne vortexovali a inkubovali 2-3

min pri pokojovej teplote. Znova sa vzorky centrifugovali 12000 g 15 min pri 2-8°C. Vodná fáza sa preniesla opatrne do novej skúmavky. V tomto kroku je dôležité dať pozor, aby sa nenabrala medzifáza ani spodná fenolová fáza. K vodnej fáze sa pridalo 0,5 ml izopropanolu (bez ohľadu na objem odobratej vodnej fázy) - 1/2 pôvodného množstva ToRNAzolu. Obsah skúmavky sa jemne premiešal preklápaním, inkuboval 10 min pri laboratórnej teplote a znova centrifugoval za rovných podmienok. Supernatant sa odsal a k pelete (RNA) sa pridalo 1 ml 75% etanolu, jemne vortexoval a 5 min centrifugoval 9000 g pri 2-8°C. Tieto 2 kroky sa opakovali ešte 2x kvôli omytiu RNA. Peleta sa usušila a rozpustila v 30 µl H₂O.

Úspešnosť sa overila na 1% agarózovom géle v 1x TBE pufre, predtým sa elektroforetická vaňa a hrebeň naložili na 1 hod do 3% H₂O₂. Potom bola celková RNA uložená v -80°C alebo ihneď použitá pre reverznú transkripciu.

4.3. Reverzná transkripcia mRNA do cDNA

V ľadovom kúpeli v tenkostennej PCR skúmavke bolo zmiešaných 1 µl primeru Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) s 10 µl celkovej RNA. Po inkubácii 2 min v 72°C bola zmes ihneď premiestnená do ľadového kúpeľa a boli pridané 4 µl 5x FBS (First Strand Buffer), 2 µl 0,1 mol/l ditiotritolu, 1 µl 10 mmol/l dNTP mixu (10 mmol/l každý deoxynukleotid), 1 µl RNAzínu (inhibítora RNáz) a 1 µl reverznej transkriptázy SUPERSCRIPTTM II (200U/µl). Zmes bola premiešaná pipetovaním a inkubovaná v termocyklere 50 min pri 42°C a 15 min pri 72°C. Vzorka bola nariedená na 40 µl, rozdelená na dva alikvóty a skladovaná v -80°C.

4.4. Navrhovanie primerov

Všetky PCR primery boli navrhnuté pomocou programu Oligo 5.0. Program ponúka vyhľadanie najvhodnejších umiestnení primerov pre PCR amplifikáciu podľa zadaných parametrov (napr. dĺžka oligonukleotidu, tvorba duplexov, tvorba smyčiek a vláseniek, vnútorná stabilita, nukleotidové zloženie, teplota topenia, možnosť a úspešnosť hybridizácie oligonukleotidu, optimálna teplota nasadenia (annealing) primerov). Primery sa navrhovali s overhangami, aby sme mohli používať univerzálne sekvenčné primery.

4.5. PCR (Polymerase Chain Reaction)

4.5.1. PCR amplifikácia genómovej DNA

Polymerázová reťazová reakcia je jednou z najpoužívanejších techník vo všetkých oboroch molekulárnej biológie, pri ktorej sa *in vitro* až miliónkrát amplifikuje zvolený úsek genómovej DNA (väčšinou do 3000 párov báz).

Oblasti génu obsahujúce exóny a dôležité úseky intrónov boli amplifikované v 9, respektíve 13 produktoch v závislosti na sade primerov. Komplementárna DNA bola amplifikovaná ako jeden produkt. Najskôr sa museli nájsť vhodné podmienky pre PCR amplifikáciu. Podmienky reakcie musia byť zvolené tak, aby primery prisadali veľmi špecificky len na určené miesto, a zároveň, aby bola DNA amplifikovaná v dostatočnom množstve (5 a viac ng/ μ l). Optimalizácia PCR sa robila postupným hľadaním najvhodnejších kombinácií teploty a doby nasadania primerov na templát, doby predlžovania vznikajúceho reťazca (extense), počtom cyklov a pridávaním rôznych aditív, ako je napr. DMSO, betain.

Vo väčšine amplifikácií sa použila technika PCR s PPP master mixom, kde DNA polymerázou je *Taq*-Purple. Zloženie reakčnej zmesi udáva tabuľka 5 a 6. Vo firemnom PPP mixe (2x koncentrovaný) je 5 mmol/l $MgCl_2$. Konečná koncentrácia $MgCl_2$ v reakčnej zmesi tak bola 2,5 mmol/l, pokiaľ nie je uvedené inak.

Tab. 5 Zloženie reakčných zmesí pre PCR s 1. sadou primerov – celkový objem 25 μ l

	Zásobná koncentrácia	Množstvo pre Ex1,2,3/4,7,8,9/10, 11/12(μ l)	Množstvo pre Ex 5/6(μ l)	Množstvo pre Ex13/14 (μ l)
PPP mix	2x	12,5	12,5	12,5
primery S+AS	10pmol/l	1,5	1,5	1,5
DMSO 5%		1,25	1,25	0
$MgCl_2$	10mmol	0	1,5	0
betain	5M	0	0	5,0
H ₂ O		7,75	6,25	4,0

Primery: S – sense, AS – antisense

Tab. 6 Zloženie reakčných zmesí pre PCR s 2.sadou primerov – celkový objem 25 µl

	Zásobná koncentrácia	Množstvo pre Ex 1,8,9,10,11/12 (µl)	Množstvo pre Ex 2,3,4,5,6,7,13,14 (µl)
PPP mix	2x	12,5	12,5
primery S+AS	10pmol/l	1,5	1,5
DMSO 5%		1,25	0
H ₂ O		8,25	9,0
gDNA	100 ng/µl	1,5	1,5

Primery: S – sense, AS – antisense

Všetky zložky (okrem DNA) pre stanovený počet reakcií sa dopredu zmiešali v 1,5 ml skúmavke v tzv. „Master Mix“. Po vortexovaní sa Master Mix rozpipetoval do jednotlivých mikroskúmaviek, pridala sa DNA a zmes sa krátko centrifugovala. PCR reakcie prebiehali v termocyklerochoch.

Podmienky pre amplifikáciu PCR produktov sú uvedené vo výsledkoch.

Kontrolná elektroforéza bola urobená v 1% agarózovom géle v 1x TBE pufre (100 V, 500 mA, 30 min.), k vizualizácii bol použitý etídium bromid.

4.5.2. PCR amplifikácia komplementárnej DNA (cDNA)

Pri príprave cDNA sa použili polymerázy *KlenTaq1* a *DeepVent* v pomere 625:1 (U:U). DNA polymeráza *DeepVent* má 3'-5' exonukleázovú aktivitu (proofreading activity) a je schopná odštepovať nukleotidy, ktoré chybné včlenila DNA polymeráza. Postup bol zhodný ako pri amplifikácii produktov z gDNA. Tabuľka 7 udáva podmienky pre amplifikáciu cDNA-IDUA.

Tab. 7 Zloženie reakčnej zmesi pre PCR – celkový objem 25 µl

10x pufor PC2	2,5 µl
dNTP	2,5 µl
Primery cEx1U+Ex13/14L	1,5 µl
<i>KlenTaq</i> polymeráza	0,06 µl
<i>DeepVent</i> polymeráza	0,05 µl
DMSO 5%	1,25 µl
H ₂ O	15,14 µl
cDNA	2,0 µl

4.6. Prečistenie PCR produktov preparatívnou gélovou elektroforézou

Do elektroforetickej vaničky sa pripravil 1% agarózový gél v 1x TAE pufre. Na gél bola nanesená vzorka a marker molekulových hmotností GeneRuler™100 bp DNA Ladder Plus. Elektroforéza prebiehala pri intenzite maximálne 10 V/cm vzdialeností elektród. Po krátkom farbení v roztoku etídium bromidu boli na UV-transluminátore z gélu vyrezané prúžky o žiadanej veľkosti.

Na izolovanie DNA z gélu sa použila súprava Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Pre kontrolnú elektroforézu v 1% agarózovom géle v 1x TBE bolo použitých 5 µl roztoku DNA alebo sa stanovila koncentrácia DNA meraním na spektrofotometre.

4.7. Sekvenovanie metódou cycle sequencing

Určenie sekvencie génu cyklickým sekvenovaním (cycle sequencing) je založené na princípe *Sangerovej metódy* (SANGER *et al.* 1977). V priebehu polymerizačnej reakcie je *in vitro* syntetizovaný úsek DNA za použitia oligonukleotidových primerov, dNTP a fluorescenčne označených terminátorov reakcie dideoxy-nukleotid-trifosfátov (ddNTP). V tejto práci bol pre sekvenačnú analýzu použitý planárny fluorescenčný sekvenátor AlfExpress a kapilárne sekvenátory ABI Prism 3100 Avant a MegaBACE.

4.7.1. Sekvenácia na planárnom sekvenátore AlfExpress

K sekvenovaniu prečisteného dvojreťazcového (double stranded) PCR produktu bola použitá *AmpliTaq* FS DNA polymeráza s univerzálnymi značenými sekvenačnými primerami T3, T7 a KS.

V celkovom objeme 20 µl sa najprv pripravila zmes podľa tabuľky 8. Do štyroch 0,2 ml skúmaviek na PCR bolo napipetovaných po 4,8 µl tejto zmesi k 2 µl terminačných mixov. Zásobný roztok dNTP 2,5 mmol/l bol zmiešaný so zásobnými roztokmi ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, každý 100 µmol/l, v pomere koncentrácií 120:1. Teplotný a časový program pre cyklické sekvenovanie udáva tabuľka 9.

Tab. 8 Zloženie reakčnej zmesi pre cycle sequencing (AlfExpress)

Templát	100-200 fmol
10x pufor PC2	2,8 µl
Cy5 - primer 2 µmol/l	1,0 µl
AmpliTaQ FS	1,0 µl
MgCl ₂ 25 mmol/l	1,7 µl
Voda	do 20,0 µl

Tab. 9 Program pre termocykler pre sekvenačné reakcie (AlfExpress)

teplota °C	čas (s)	počet cyklov
95	180	1
95	15	25
50	30	
68	55	
68	600	1

Po skončení reakcie sa do skúmaviek napipetovalo 5 µl STOP mixu. Tesne pred nanesením reakčnej zmesi na denaturujúci polyakrylamidový gél sa vzorky denaturovali (94°C, 3 min, 85°C, 10 min). Z 50% komerčnej zmesi (Hydroling) sa pripravil 5,5% gél s 6 mol/l močovinou v 1,5x TBE. Polymerácia sa zahájila pridaním 10% peroxidisíranu amónného (APS) a TEMEDu. Ako anódový a katódový pufor sa použil 0,5x TBE (running buffer).

Získané sekvencie boli porovnávané s publikovanou sekvenciou.

4.7.2. Sekvenácia na kapilárnom sekvenátore Avant / MegaBACE

Pre sekvenáciu sa používal BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Primery sa používali bez overhangov, pričom ale bolo potrebné použiť značené ddNTP, ktoré sú súčasťou už zmieňovanej súpravy. Jednotlivé reakcie sa pripravovali v 96-jamkovej doštičke, do každej jamky sa pripravila reakčná zmes podľa tabuľky 10. Teplotný a časový program pre cyklické sekvenovanie udáva tabuľka 11.

Tab. 10 Zloženie reakčnej zmesi pre sekvenovanie na kapilár. sekvenátore

Templát	100-200 fmol
BigDye Terminator Mix	8µl
Primer (3,2 pmol)	1,0 µl
Pufor (5x)	1,0 µl
Voda	do 20,0 µl

Tab. 11 Program termocyklieru pre sekvenovanie na kapilár. sekvenátore

teplota °C	čas (s)	počet cyklov
96	60	1
96	10	25
50	5	
60	240	
4	∞	

20µl produkt sa vyžrážal pomocou 3M acetátu sodného a 96% etanolu. Potom sa peleta prečistila vyžrážaním 70% etanolom. Po centrifugácii a úplnom vysušení sa k peletke pridalo 20µl formamidu (Hi-Di), ľahko premiešalo špičkou a denaturovalo 3 min pri 95°C. Doštička sa krátko ochladila na ľade a vložila do sekvenátora.

4.8. PCR/RFLP pre overenie mutácií a polymorfizmu L118

Metóda PCR/RFLP na zistenie bodových mutácií alebo polymorfizmov je založená na vzniku alebo zániku reštrikčného miesta v sekvencii. V tabuľke 12 sú uvedené mutácie nájdené sekvenovaním, ktoré sa overili touto metódou pomocou reštrikčných endonukleáz a okrem nich sme takto analyzovali polymorfizmus L118 (*KpnI*).

Tab. 12 Prehľad podmienok pre jednotlivé reštrikčné reakcie

Lokalizácia	Mutácia	Zmena v sekvencii	Enzým	Rozoznávacia sekvencia	T °C	Pufor + aditíva
Exón 2	Q70X	CCAG>CTAG	<i>Bfal</i>	CTAG	37	NEB 4
			<i>FspBI</i>	CTAG	37	Tango
Exón 5	Y167X	GTAC>GTAA	<i>Rsal</i>	GTAC	37	NEB 1
Exón 7	D315Y	GGAC>GTAC	<i>Rsal</i>	GTAC	37	NEB 1
Exón 8	A327P	CGCG>CCCG	<i>BstUI</i>	CGCG	60	NEB 2
Exón 9	W402X	CTGG>CTAG	<i>Bfal</i>	CTAG	37	NEB 4
			<i>FspBI</i>	CTAG	37	Tango
Exón 11	V538fs	GTGCAC>GTCAC	<i>ApaI</i>	GTGCAC	37	NEB 4, BSA
Exón 14	W626X	CTGG>CTAG	<i>Bfal</i>	CTAG	37	NEB 4
Exón 14	R628X	GGGCC>GGCCT	<i>Apal</i>	GGGCC	25	NEB 4, BSA

T - teplota

PCR produkty použité na PCR/RFLP boli získané rovnakým spôsobom ako produkty na sekvenovanie (viď Tab 1). Zloženie bežnej reštrikčnej reakčnej zmesi je uvedené v tabuľke 13. Objem použitého PCR produktu závisel na množstve amplifikovaného produktu odhadnutého z kontrolnej elektroforézy. Všetky reštrikcie boli inkubované cez noc, čiže minimálne 16 hodín.

Tab. 13 Zloženie reakčnej zmesi pre štiepenie reštrikčnou endonukleázou

pufor pre príslušný enzým 10x	1,5 µl
PCR produkt	5 - 12 µl
enzým *	1µl
BSA 10x	0 – 1,5 µl
H ₂ O	x µl
Celkom	15 µl

* podľa koncentrácie enzýmu (U/ul)

Rozdelenie fragmentov bolo robené v 1,5 - 4% agarózovom géle v 1x TBE na horizontálnej elektroforéze v závislosti na veľkosti fragmentov. Na gél bola nanesená celá reštrikčná reakčná zmes a marker molekulových hmotností GeneRuler™100 bp DNA Ladder Plus.

4.9. ACRS

V prípade, že mutácia vznikla na mieste, kde sa nenachádza žiadne prirodzené reštrikčné miesto a ani sa mutáciou žiadne nové nevytvorí, je možné použiť ACRS metódu (artificial created restriction site). Reštrikčné miesto sa vytvorí pomocou primeru, v ktorom je navrhnutá ďalšia *in vitro* mutácia, ktorá spolu s pôvodnou mutáciou vytvorí miesto pre reštrikciu. Po PCR reakcii s takto modifikovaným primerom sa pokračuje ako pri bežnom PCR/RFLP. Táto metóda sa použila na overenie mutácií IVS11+5G>A (*NdeI*) a V620F (*Tsp509I*) (Tab. 14) pomocou primerov uvedených v tabuľke 4.

Tab. 14 Prehľad podmienok pre jednotlivé reštrikčné reakcie pri ACRS metóde

Lokalizácia	Mutácia	Zmena v sekvencii*	Enzým	Rozoznávacia sekvencia	Teplota °C	Pufor
Intrón 11	IVS11+5G>A	CAAGTG >CA A TG	<i>NdeI</i>	CATATG	37	NEB 4
Exón 14	V620F	GAGT>aATT	<i>Tsp509I</i>	AATT	65	NEB 1

* tučným písmom vyznačená nájdená mutácia, malým písmenom *in vitro* mutácia

4.10. ARMS

K testovaniu jedného polymorfizmu (R105Q) bol použitý amplifikačný refrakčný mutačný systém (ARMS). ARMS je metóda detekcie akejkoľvek zmeny v rozsahu zámenej jedného nukleotidu alebo malej delécie a jasne rozlíši heterozygota v sledovanom lokuse od homozygotov pre jednu alebo druhú alelu (FERRIE *et al.* 1992). Test sa skladá z dvoch samostatných PCR reakcií s odlišnými primerami, z ktorých jeden je špecifický pre normálnu DNA sekvenciu a druhý pre sekvenciu s mutáciou (Tab. 15, 16A,B). Do jednoduchého ARMS testu musí byť zaradená vnútorná PCR kontrola, aby bola istota, že amplifikačná reakcia prebieha správne. Vlastná polymerázová reťazová reakcia prebieha v termocyklery v bežnom prevedení.

Tab. 15 Zloženie reakčnej zmesi pre ARMS

PC2 pufor	1 µl
dNTP	1 µl
Primer A/B	0,5 µl
Primer C	0,5 µl
Primer K	1 µl
<i>KlenTaq</i> poly	0,06 µl
DMSO	0,5 µl
H ₂ O	4,44 µl
DNA	1 µl

Primery: A - sense bez mutácie,
B - sense s mutáciou, C - antisense,
K - kontrolný sense+antisense

Tab. 16A Program termocyklieru pre ARMS, primery A+C

teplota °C	čas (s)	počet cyklov
94	120	1
94	15	25
71	15	
71	180	1

Tab. 16B Program termocyklieru pre ARMS, primery B+C

teplota °C	čas (s)	počet cyklov
94	120	1
94	30	35
68	5	
71	20	
71	300	1

4.11. Overenie delécie klonovaním

4.11.1. Amplifikácia PCR produktu

Pre klonovanie do plazmidu bol amplifikovaný PCR fragment obsahujúci exóny 13/14. Zloženie reakčnej zmesi a teplotný a časový program boli zhodné s podmienkami uvedenými hore (viď str. 38 a 54). PCR produkt o veľkosti 602 bp bol prečistený preparatívnou gélovou elektroforézou, ako je uvedené na strane 40.

4.11.2. Pripojenie 3'-A konca k prečistenému PCR produktu a ligácia inzertu do plazmidu

Inzert bol pripravený pripojením 3'-A konca k prečistenému PCR produktu (Tab. 17). Objemový pomer inzertu k plazmidu pri ligácii bol 1 ku 1. Ligačná zmes bola pripravená v celkovom objeme 6 µl podľa nasledujúcej tabuľky (Tab. 17).

Tab. 17 Zloženie reakčnej zmesi pre pripojenie 3'-A konca k PCR produktu a zloženie ligačnej zmesi

templát	5 µl
10x pufor	0,6 µl
<i>Taq</i> polymeráza (5U/ul)	0,2 µl
dATP (10 mmol/l)	0,2 µl
celkom	6 µl
inkubácia	75°C, 15min

templát	3 µl
soľný roztok	1 µl
H ₂ O	1 µl
TOPO vektor	1 µl
celkom	6 µl
inkubácia	25°C, 5min

4.11.3. Transformácia

K transformácii kompetentných buniek TOP10 bola použitá metóda heat shock. Kompetentné bunky boli rozmrazené na ľade (50 μ l alikvóty v 1,5 ml skúmavkách), k nim boli pridané 2 μ l ligačnej zmesi a všetko bolo jemne horizontálne premiešané. Po 30 min inkubácii na ľade boli bunky vo vodnom kúpeli zahrievané 30 s pri 42°C a potom ihneď uložené na ľad. K bunkám bolo pridaných 250 μ l SOC média vytemperovaného na laboratórnu teplotu. Ľahko zavreté skúmavky s bunkami boli inkubované 1 hodinu pri 37°C pri trepaní 200 rpm. Platne s LB agarom s ampicilínom, do ktorých bolo zatrených 80 μ l roztoku X-gal (20mg/ml) a 40 μ l IPTG (0,1 mol/l) na jednu platňu (modrobiela selekcia), boli predhriate na 37°C. Po predhriatí bolo na ne natrených 50 μ l bunečnej suspenzie, respektíve 25 μ l bunečnej suspenzie spolu s 25 μ l SOC média a takto pripravené platne boli inkubované cez noc pri 37°C.

4.11.4. Kultivácia baktérií z vybraných kolónií a izolácia plazmidovej DNA

Plazmid pCR[®]2.1-TOPO[®] nesie gén pre ampicilínovú rezistenciu. Z 10 vybratých kolónií boli založené tekuté kultúry v 3 ml LB média s ampicilínom a inkubované cez noc pri 37°C a trepaní (225 rpm).

Plazmidová DNA bola izolovaná podľa protokolu výrobcu použitej súpravy Fast Plasmid Mini Kit. Pre kontrolnú elektroforézu na 1% agaróze v 1x TBE bolo použitých 5 μ l roztoku DNA.

Oddelené alely boli sekvenované metódou cycle sequencing s vhodnými primerami.

4.12. Príprava expresného systému pre IDUA

4.12.1. Príprava mutovaného inzertu cDNA-IDUA

Wild type cDNA-IDUA klonovaná do *Hind*III a *Bam*HI miest vektoru pSP72 bola použitá z archívnych materiálov Dr. Clare Beesley v londýnskom laboratóriu, kde sa táto časť experimentov robila. Na vytvorenie žiadaných mutácií sa použila metóda cielenej mutagenézy (Site-Directed Mutagenesis, SDM) s použitím súpravy Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit. Táto metóda je založená na PCR reakcii s primerami, ktorých sekvencia obsahuje žiadanú zmenu v géne. Primery navrhnuté pre

jednotlivé mutácie sú v tabuľke 4, str. 33. Zloženie reakčnej zmesi a teplotný a časový program sú uvedené v nasledujúcich tabuľkách (Tabuľka 18 a 19).

Tab. 18 Zloženie reakčnej zmesi pre SDM

Reakčný pufor	5 µl
cDNA	10 ng
Q roztok	3 µl
Sense primer	125ng
antisense primer	125ng
dNTP	1 µl
<i>PfuTurbo</i> ® DNA polymeráza	1 µl
H ₂ O	x µl
Celkom	51 µl

Tab. 19 Program termocyklieru pre SDM

teplota °C	čas (s)	počet cyklov
95	60	1
95	50	18
60	50	
68	120	
68	350	1

Po ukončení mutagenézy sa pridal 1 µl enzýmu *DpnI*, ktorý štiepi nemutovaný plazmid a zmes sa inkubovala 2 hod pri 37°C. Mutovaná cDNA sa skladovala zamrazená až do ďalšieho použitia.

4.12.2. Transformácia

K transformácii kompetentných buniek XL 10 - Gold Ultracompetent Cells bola použitá metóda heat shock. Postup je zhodný s postupom uvedeným v kapitole 4.11.3., líši sa len použitím 4 µl inzertu.

4.12.3. Kultivácia baktérií z vybraných kolónií a izolácia plazmidovej DNA

Plazmid pSP72 nesie gén pre ampicilínovú rezistenciu. Zo 6 (respektíve 12) vybraných kolónií boli založené tekuté kultúry v 3 ml LB média s ampicilínom a inkubované cez noc pri 37°C a trepaní (225 rpm). Z kultúry rastúcej 12-16 hodín v LB médiu bolo najprv odobraných 800 µl do 1,5 ml skúmaviek a pridaných 150 µl glycerolu. Skúmavky po vortexovaní boli uložené do - 80°C. Zvyšok suspenzie sa použil na izoláciu plazmidovej DNA pomocou súpravy GenElute™ Plasmid Miniprep Kit. Bolo nutné zmerať koncentráciu DNA na spektrofotometri, aby sa potvrdila prítomnosť plazmidu v každej vzorke.

4.12.4. Overenie správnosti vzniknutej mutácie

Správnosť vzniknutých mutácií sa overovala na kapilárnom sekvenátore sekvenovaním všetkých vzoriek konkrétnej oblasti cDNA-IDUA, kde mala daná mutácia vzniknúť, a u vzorky s najvyššou koncentráciou bola sekvenovaná celá

kódujúca oblasť cDNA-IDUA. V prípade, že v celej sekvencii nebola žiadna zmena okrem nami požadovanej, táto vzorka bola používaná pre ďalšie postupy.

4.13. Klonovanie IDUA z vektoru pSP72 do expresného vektoru pIRES2-EGFP

4.13.1. Príprava vektoru pIRES2 - EGFP

Cicavčí expresný vektor pIRES2 - EGFP bol použitý z materiálov Dr. Beesley. Tento vektor obsahuje gén pre zelený fluorescenčný proteín (EGFP), ktorý sa používa ako marker úspešnosti transfekcie. EGFP aj klonovaná cDNA-IDUA sú pod kontrolou CMV (cytomegalovírus) promótoru. Pred použitím bol vektor štiepený *EcoRI* enzýmom a potom defosforylovaný alkalickou fosfatázou (Calf intestinal – CIAP). Defosforylácia je prevencia pred seba-ligáciou vektoru. Reakčné podmienky sú uvedené v tabuľke 20. Reakčná zmes bola v oboch krokoch inkubovaná 2 hod pri 37°C a takto ošetrený vektor bol pripravený pre ligáciu.

Tab. 20 Zloženie reakčnej zmesi pre štiepenie vektoru *EcoRI* enzýmom a pre defosforyláciu CIAP

Vektor pIRES2 - EGFP	8 µl
<i>EcoRI</i>	1 µl
<i>EcoRI</i> pufor	1 µl
CIAP	1 µl
<i>EcoRI</i> pufor	1 µl
H ₂ O	8 µl
Celkom	20 µl

4.13.2. Príprava cDNA

Kontrolná wild-type cDNA-IDUA a cDNA nesúca príslušnú mutáciu boli z pSP72 vektoru štiepené reštrikčnou endonukleázou *EcoRI*. Reakčné podmienky sú uvedené v tabuľke 21. Reakčná zmes bola inkubovaná 2 hod pri 37°C a takto ošetrená cDNA bola pripravená pre ligáciu.

Tab. 21 Zloženie reakčnej zmesi pre štiepenie cDNA-IDUA *EcoRI* enzýmom

Plazmidová DNA	8 µl
<i>EcoRI</i>	0,8 µl
NEB 4 pufor	1,5 µl
<i>DraI</i>	0,8 µl
H ₂ O	3,9 µl
Celkom	15 µl

cDNA po reštrikcii bola prečistená preparatívnou gélovou elektroforézou na 0,8% agarózovom géle, úsek so správnou dĺžkou vyrezaný a cDNA následne izolovaná z gélu pomocou súpravy QIAquick Mini Columns 2ml.

4.13.3. Ligácia

Objemový pomer inzertu k plazmidu pri ligácii bol 1 ku 1. Ligačná zmes bola pripravená v celkovom objeme 8 μ l a inkubovaná 5 min pri 45°C a následne 3 min na ľade. Po pridaní 1 μ l T4 DNA ligázy a 1 μ l pufru T4 DNA ligázy do každej skúmavky sa zmes inkubovala 1 hod pri 25°C.

4.13.4. Transformácia

K transformácii kompetentných buniek XL1-Blue Competent Cells bola použitá metóda heat shock. 200 μ l kompetentných buniek bolo rozmrazených na ľade, a rozdelených na 40 μ l alikvóty do 1,5 ml predchladených skúmaviek. Do každej z nich bolo pridaných 0,68 μ l β -merkaptotanolu a premiešané jemným točením každé 2 min. Po 10 min k nim boli pridané 4 μ l ligačnej zmesi a všetko bolo jemne horizontálne premiešané. Po 30 min inkubácii na ľade boli bunky vo vodnom kúpeli zahrievané 45 s pri 42°C a potom ihneď uložené na ľad. K bunkám bolo pridaných 460 μ l NZY+ média predhriateho na 42°C. Ľahko zavreté skúmavky s bunkami boli inkubované pri 37°C pri trepaní 200 rpm. Po 1 hodine inkubácie sa bunky centrifugovali 1 min pri 13000 rpm a odstránil sa supernatant. Bunky sa resuspendovali v 200 μ l NZY+. Na platne predhriate na 37°C s LB agarom s kanamycínom bola natretá celá bunečná suspenzia a takto pripravené platne boli inkubované cez noc pri 37°C.

4.13.5. Kultivácia baktérií z vybraných kolónií a izolácia plazmidovej DNA

Plazmid pIRES2 – EGFP nesie gén pre kanamycínovú rezistenciu. Z 12 vybratých kolónií boli založené tekuté kultúry v 5 ml LB média s kanamycínom a inkubované cez noc pri 37°C a trepaní (225 rpm). Z kultúry rastúcej 12-16 hodín v LB médiu bolo najprv odobraných 800 μ l do 1,5 ml skúmaviek a pridaných 150 μ l glycerolu. Skúmavky boli uložené do mraziaceho boxu do - 80°C. Zvyšok suspenzie sa použil na izoláciu plazmidovej DNA pomocou súpravy GenElute™ Plasmid Miniprep Kit.

4.13.6. Overenie orientácie inzertu

Správna orientácia ligovaného inzertu bola potvrdená štiepením *EcoRI/KpnI*. Každá vzorka bola v osobitnej reakcii štiepená *EcoRI* a *KpnI* enzýmami ako je uvedené v tabuľke 22. Po 2 hod inkubácii pri 37°C boli vzorky kontrolované na 0,8% agarózovom géle a vybrané tie klony, ktoré mali správnu orientáciu.

Tab. 22: Zloženie reakčnej zmesi pre štiepenie *EcoRI/KpnI*

Plazmidová DNA	3 µl
<i>EcoRI</i>	0,8 µl
<i>EcoRI</i> pufor	1 µl
BSA 10x	-
H ₂ O	5,2 µl
Celkom	10 µl

Plazmidová DNA	3 µl
<i>KpnI</i>	0,8 µl
NEB 1 pufor	1 µl
BSA 10x	1 µl
H ₂ O	4,2 µl
Celkom	10 µl

Konkrétne klony vybrané na expresiu sa znova kultivovali zo zamrazených buniek v glycerole. Po izolácii plazmidov iným, účinnejším postupom pomocou súpravy QIAGEN Plasmid Mini Kit sa zmerala ich koncentrácia a EB pufrom sa nariedili na koncentráciu 0,2 µg/µl.

4.14. Expresia

Experimenty vo funkčnej štúdií sa robili dvakrát, vždy s 3 pokusmi pre jednotlivú vzorku, takže výsledné hodnoty sú priemerom šiestich meraní.

4.14.1. Transfekcia CHO buniek

1.deň

CHO bunky boli transfekované plazmidom nesúcim wild-type alebo mutovanou cDNA-IDUA a plazmidom bez inzertu.

CHO bunky sa pestovali v 75cm² fľaštičkách za štandardných podmienok (10% FCS DMEM, 37°C, 5% CO₂ atmosféra). Po odstránení kultivačného média sa bunky opláchli 10 ml PBS a uvoľnili pridaním 4 ml trypsínu a krátkou inkubáciou v termostate. K trypsínovaným bunkám sa pridalo 10 ml DMEM média, prudkým trasením sa bunky úplne oddelili od steny fľaše a preliali sa do 50 ml skúmavky. Po opätovnom premiešaní sa odobralo 100 µl do 1,5 skúmavky s 50 µl trypanovej modrej, premixovalo a tieto bunky sa použili na určenie množstva buniek pomocou hemocytometru. Modré (= mŕtve) bunky sa nepočítali. Z množstva buniek sa vypočítala

ich koncentrácia v 1 ml a z nej sa určil riediaci pomer. Do každej jamky sa nasadilo 2×10^5 CHO buniek v 2 ml suspenzii s médiom.

2. deň

Transfekcia CHO buniek bola urobená pomocou transfekčného činidla lipofektamínu. Pre každý konštrukt (=3 jamky) sa nariedilo 7 μ l DNA a 168 μ l OptiMEM (bezsérové médium). Do ďalších skúmaviek sa pre každú jamku zvlášť pripravilo 5 μ l lipofektamínu a 45 μ l OptiMEM, do ktorých sa po krátkej inkubácii pridalo 50 μ l roztoku s DNA (0,4 μ g) a ihneď sa začal odpočítavať čas 30 min pre každú skúmavku. Táto zmes sa pipetovaním premiešala a inkubovala pri pokojovej teplote. Počas inkubácie sa platne s kultivovanými bunkami dvakrát premyli PBS, do každej jamky sa pridal 1 ml OptiMEM a platne sa znova inkubovali pri 37°C. Po 30 min inkubácii komplexu DNA-lipofektamín sa postupne po jednej platni vybrali bunky z termostatu, odstránil sa OptiMEM a do každej jamky sa na CHO bunky po kvapkách pipetovala zmes komplexu a 900 μ l OptiMEM. Nakoniec sa platňou jemne zakrúžilo, aby sa roztok rovnomerne rozliel po bunkách a platňa sa uložila späť do inkubátora. Inkubácia prebiehala 6 hodín, potom sa médium nahradilo 2 ml čerstvého DMEM média a bunky sa inkubovali cez noc.

3. deň

Po 24 hodinách od transfekcie bola jej účinnosť overená pomocou inverzného fluorescenčného mikroskopu – vizualizácia EGFP nám potvrdila, že transfekcia bola účinná a rovnaká vo všetkých jamkách. Po opláchnutí buniek 2ml PBS sa do každej jamky pridal 1 ml PBS a bunky sa pomocou gumenej mäkkej časti piestu z injekčnej striekačky opatrne oškrabali. PBS s bunkami sa ihneď premiestnili na ľad do predchladených sklenených skúmaviek. Po 10 min centrifugácii pri 2000 rpm sa zliel supernatant a k pelete buniek sa pridalo 50 μ l studenej H₂O. Bunky sa lyzovali opakovaným zmrazením v metanole so suchým ľadom a roztápaním pri 37°C. Do ďalšieho spracovania boli bunky uložené na ľade.

4.14.2. Proteínová assay

Množstvo celkových proteínov bolo stanovených za použitia BCA (bicinchonic acid) protein assay reagentov (SMITH *et al.* 1985). Kalibračná krivka bola urobená pomocou riediacej rady BSA (bovine serum albumin) proteínu o známej koncentrácii (0 - 0,25 mg/ml). Pre každú vzorku sa pripravil duplikát 45 μ l vody s 5 μ l lyzovaných



buniek. V presne sledovaných intervaloch 15 sekúnd sa do každej skúmavky pridal 1 ml BCA, zmes sa vortexovala a inkubovala vo vodnom kúpeli pri 37°C najmenej 10 minút. Po uplynutí času inkubácie sa znova v presných 15 s intervaloch pridalo 20 µl roztoku sulfátu meďnatého, skúmavka sa vortexovala a umiestnila späť do kúpeľa. Inkubácia trvala 35 minút a v 15 s intervaloch sa skúmavky postupne vyberali z kúpeľa a obsah sa preliat do plastických kyviek. Na spektrofotometri sa určila absorbancia pri 562 nm.

4.14.3. IDUA assay

Aktivita IDUA bola stanovená podľa YOUNG (1992), s použitím syntetického substrátu 4-metyl-umbelliferyl alfa-L-iduronidu (4-MUI).

Bunkové lyzáty sa nariesili s vodou 1:10. Pripravil sa čerstvý laktónový inhibítor z 5 ml vody a 124 mg soli kyseliny cukrovej, ktorý sa po 5 min vo vriacom kúpeli zriedil s vodou v pomere 1:19. Pre každú vzorku sa pripravil duplikát z 20 µl buniečného homogenátu, 20 µl mravenčanového pufru, 10 µl laktónu a 10 µl substrátu 4-MUI o koncentrácii 4mmol, ktorý sa do jednotlivých skúmaviek postupne pridával v 15 s intervaloch. Blank na porovnanie mal namiesto buniek 20 µl H₂O. Vzorky sa vortexovali a inkubovali 60 min pri 37°C. Reakcia sa ukončila pridaním 1,14 ml 0,25M glycinového pufru pH 10,4 a vortexovaním. Štandardy sa pripravili z 1 ml glycinového pufru, 1 nmol 4-MUI a 200 µl vody. Na luminiscenčnom spektrometre sa pri excitácii 365 nm a emisii 450 nm odčítali hodnoty fluorescence.

Tabuľka s konkrétnymi nameranými hodnotami a jednotlivými krokmi pre výpočet aktivity proteínu je uvedená v prílohe. Špecifická aktivita je vyjadrená v nmol 4-MUI uvoľneného zo substrátu za 1 hod na 1mg proteínu. Je uvedená vo výsledkoch.

4.15. Pacienti a kontroly

V Ústave dedičných metabolických porúch bolo v priebehu 25 rokov diagnostikovaných 19 prípadov mukopolysacharidózy typu I. Do molekulárne biologickej štúdie bolo zahrnutých 17 pacientov s touto vzácnou chorobou a 18 rodinných príslušníkov. U dvoch pacientov nebol materiál pre izoláciu DNA dostupný. Väčšina vzoriek sa archivovala vo forme zamrazených leukocytov, len v niektorých prípadoch boli vo forme nezrážanlivej krvi. U pacienta 6, ktorý je po transplantácii kostnej drene a nebol k dispozícii materiál z obdobia pred transplantáciou, boli mutácie identifikované na základe analýzy vzoriek rodičov.

Ako kontrolný materiál bola použitá genómová DNA a celková RNA izolovaná z nezrážlivej krvi zdravých jedincov.

Do štúdie sa zahrnulo aj 100 vzoriek DNA z krvi anonymných zdravých jedincov. Tieto vzorky sa použili na identifikáciu polymorfizmov a určenie haplotypov v českej populácii.

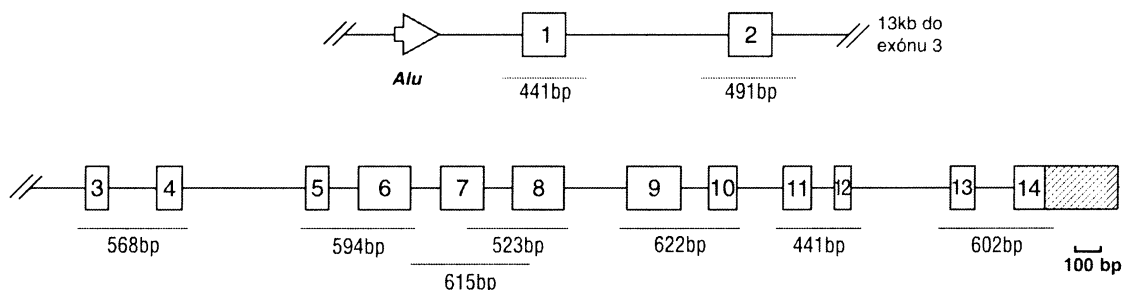
5. Výsledky

Na základe výsledkov optimalizácie metód pre mutačnú analýzu sme boli schopní analyzovať mutácie u pacientov s deficitom IDUA. V tejto diplomovej práci sme sa zaoberali probandami zo sedemnástich nepříbuzných rodín. Pacienti z týchto rodín manifestujú všetky tri základné fenotypy deficitu IDUA: mierny fenotyp - čiastočný deficit (Scheieov syndróm, pacienti č. 8 a 14), mierne ťažký fenotyp (Hurlerovej/Scheieov syndróm, pacienti č. 6 a 7) a ostatní pacienti majú ťažký Hurlerovej syndróm.

Okrem pacientov s MPS I sme vyšetřovali skupinu kontrolných vzoriek, u ktorých sme sa zamerali na vyšetřovanie polymorfizmov a haplotypov spájajúcich sa s génom *IDUA*.

5.1. Optimalizácia podmienok pre amplifikáciu gDNA metódou PCR

Dĺžka PCR produktov, ktorá je vymedzená navrhnutými párami primerov, bola zvolená tak, aby tieto produkty mohli byť spoľahlivo sekvenované, t.j. nie viac ako 700 bp dlhé (Obr. 8).



Obr. 8 Schéma génu *IDUA* s naznačením jednotlivých PCR produktov.

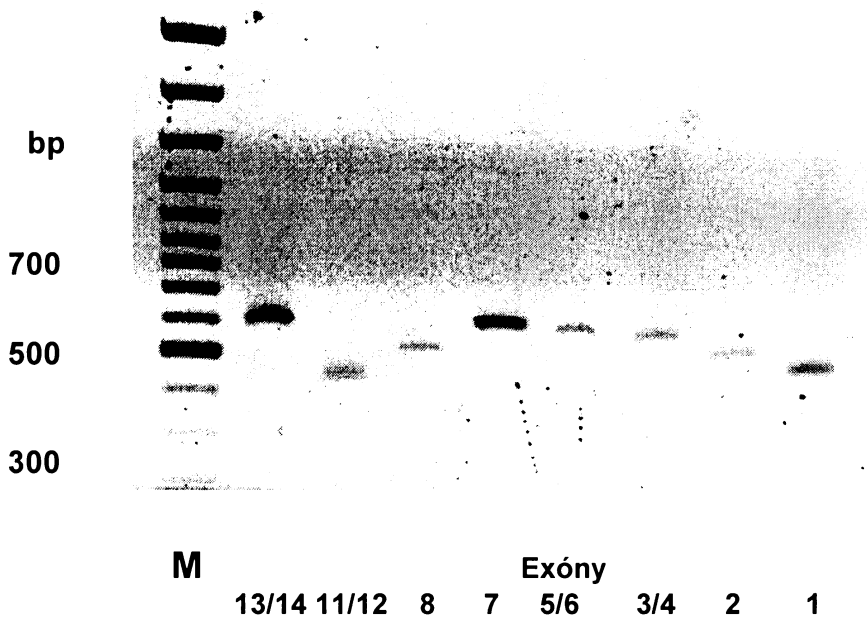
Obdĺžniky označujú jednotlivé exóny. Naznačené PCR produkty boli amplifikované 1.sadou primerov (Tab. 1).

Optimalizáciu podmienok pre amplifikáciu všetkých produktov sme robili na genómovej DNA získanej z krvi zdravých kontrol.

Konečné podmienky po optimalizácii amplifikácie všetkých exónov génu s ich príľahlými intrónovými oblasťami sú uvedené v tabuľke 23. Ukážka výsledkov amplifikácie jednotlivých PCR fragmentov je na obrázku 9.

Tab. 23 Programy pre termocykler pre PCR amplifikáciu všetkých exónov IDUA aj s ich príslušnými intrónovými oblasťami

Použitý pár primerov	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklov
Ex1U + Ex1L	94	120	1
Ex2 U + Ex2 L	94	30	35
Ex3/4 U + Ex3/4 L	67	20	
	71	50	
	71	300	1
Ex5/6 U + Ex5/6 L	94	120	1
Ex7 U + Ex7 L	94	30	35
Ex8 U + Ex8 L	65	40	
Ex9/10 U + Ex9/10 L	71	50	
	71	300	1
Ex11/12U + Ex11/12L	94	120	1
Ex13/14 U + Ex13/14 L	94	30	35
	55	40	
	71	50	
	71	300	1
IDUA 1(+)/IDUA 1(-)	94	120	1
IDUA 8(+)/IDUA 8(-)	94	20s	35
IDUA 9(+)/IDUA 9(-)	62	20s	
IDUA 10(+)/IDUA 10(-)	71	30s	
IDUA 11/12(+)/IDUA 11/12(-)	71	300	1
IDUA 2(+)/IDUA 2(-), IDUA 3(+)/	94	120	1
IDUA 3(-),IDUA 4(+)/IDUA 4(-),	94	20s	35
IDUA 5(+)/IDUA 5(-),IDUA 6(+)/	64	20s	
IDUA 6(-),IDUA 13(+)/IDUA 13(-)	71	30s	
IDUA 14(+)/IDUA 14(-)	71	300	1
IDUA 7(+)/IDUA 7(-)	94	120	1
	94	20s	35
	66	20s	
	71	30s	
	71	300	1



Obr. 9 Jednotlivé PCR produkty obsahujúce exóny génu pre IDUA

Elektroforéza v 1% géle v 1x TBE, k vizualizácii bol použitý etídium bromid.
Dráha M: marker molekulových hmotností

5.2. PCR amplifikácia komplementárnej DNA (cDNA)

Pre PCR amplifikáciu cDNA sme najprv použili niektoré páry primerov z 1. sady: Ex1U+Ex13/14L, Ex1U+Ex7L a Ex7U+Ex13/14. Napriek všetkému úsiliu sa nám nepodarilo zoptimalizovať podmienky a naamplifikovať patričné úseky, okrem úseku obsahujúceho exóny 7 až 14, a preto boli navrhnuté nové primery (Tab. 7). Skúšali sme pripraviť PCR produkty, určené rôznymi kombináciami pôvodných a nových primerov. Pri optimalizácii sme brali do úvahy množstvo a čistotu produktu. Ako templát pre PCR amplifikáciu bola použitá cDNA získaná reverznou transkripciou z RNA, ktorá bola izolovaná z leukocytov zdravých kontrol a niektorých vyšetovaných osôb.

Najlepší výsledok sme dosiahli pri PCR amplifikácii pomocou kombinácie primerov cEx1U a Ex13/14L. Veľkosť takto získaného produktu je 2082bp. Pri ostatných kombináciách nebol amplifikovaný požadovaný produkt v dostatočnom

množstve, alebo sa tvorili aj nešpecifické produkty. Konečné podmienky po optimalizácii sú uvedené v tabuľke 24.

Tab. 24 Program pre termocykler pre amplifikáciu cDNA-IDUA

teplota °C	čas (s)	počet cyklov
94	120	1
94	30	40
65	30	
71	150	
71	900	1

5.3. Analýza mutácií v géne pre IDUA

5.3.1. Priame sekvenovanie PCR produktov

Analýzu mutácií sme začali priamym sekvenovaním PCR produktov z genómovej DNA. PCR produkty sme museli najskôr prečistiť, aby sme odstránili prípadné nešpecifické produkty a ostatné komponenty PCR reakčnej zmesi, predovšetkým diméry primerov, ktoré sú nežiaducou kontamináciou v sekvenačnej reakcii. Nedostatočné prečistenie sa prejaví vyššou fluorescenciou pozadia a v sekvencii zvlnením základnej čiary (base line).

Celú kódujúcu oblasť génu pre IDUA a príľahlé intrónové oblasti sme sekvenovali z oboch strán u 16 pacientov, pre určenie mutácií u pacienta 6 sme analyzovali gén jeho rodičov. Najprv sme používali planárny sekvenátor (AlfExpress), neskôr po zavedení kapilárneho systému sa zvyšok pacientov dokončil týmto spôsobom (Avant a MegaBACE). Analýzou sekvencií sme identifikovali 23 zmien v exónoch a 1 zmenu v príľahlej intrónovej oblasti, zvyšok intrónov sa neskúmal. Tieto výsledky sú zhrnuté v tabuľke 25.

Tabuľka 25 : Zmeny identifikované v jednotlivých exónoch IDUA génu

Exón	zmena	Exón	zmena
1	A8, A20, Q33H	8	A327P , A361T, T388
2	Q70X	9	T410, V454I, W402X
3	R105Q, L118	10	R489
5	N181, Y167X	11	V538fs
7	N297, A314, D315Y	14	V620F , W626X , R628X , E640fs

Mutácie sú od polymorfizmov odlišené tučným písmom.

Výsledkom sekvenačnej analýzy bolo identifikovanie oboch mutácií u 15 pacientov, u pacientov 5 a 17 sme identifikovali len jednu mutáciu. V tabuľke 26 je uvedený prehľad všetkých analyzovaných pacientov, ich genotypy a fenotypy a prípadne liečba.

Na 34 alelách sme identifikovali celkom 11 rôznych mutácií, z ktorých osem už bolo publikovaných (Q70X, Y167X, D315Y, A327P, W402X, V538fs, IVS11+5G>A, R628X) a tri sú nové: **V620F**, **W626X** a **E640fs** (Tab. 27).

Na obrázkoch 10 a 11 sú uvedené príklady výsledkov zo sekvenačnej analýzy: na obrázku 10 je znázornený úsek sekvencie obsahujúci novú mutáciu V620F, ktorá bola identifikovaná u pacientov 4 a 16 a na obrázku 11 časť sekvencie s mutáciou W626X nájdenou v heterozygócii u pacienta 10.

Tabuľka 26. Genotypy a fenotypy pacientov s MPS I

Pacient	Mutácia 1	Mutácia 2	Fenotyp	Liečba
1	W402X	W402X	H, veľmi ťažký	
2	W402X	W402X	H, veľmi ťažký	
3	W402X	W402X	H	TKD
4	W402X	V620F	H	
5	W402X	?	H	
6	W402X	IVS11+5g>a	IH/S	TKD
7	W402X	E640fs	IH/S	TKD
8	W402X	E640fs	S	
9	Q70X	Q70X	H, veľmi ťažký	TKD
10	Q70X	W626X	H	
11	Q70X	D315Y	H	
12	Q70X	Y167X	H	TKD
13	Q70X	IVS11+5g>a	H	
14	Q70X	R628X	S	ERT
15	c.1614delG	IVS11+5g>a	H	
16	V620F	V620F	H	
17	A327P	?	H	

TKD - transplantácia kostnej drene, ERT - enzýmová substitučná terapia
H - Hurlerovej syndróm, ťažké postihnutie, IH/S - Hurlerovej/Scheieov syndróm, mierne ťažké postihnutie, S - Scheieov syndróm, miernejšie postihnutie

Tabuľka 27. Charakterizácia mutovaných aliel u českých a slovenských pacientov s MPS I

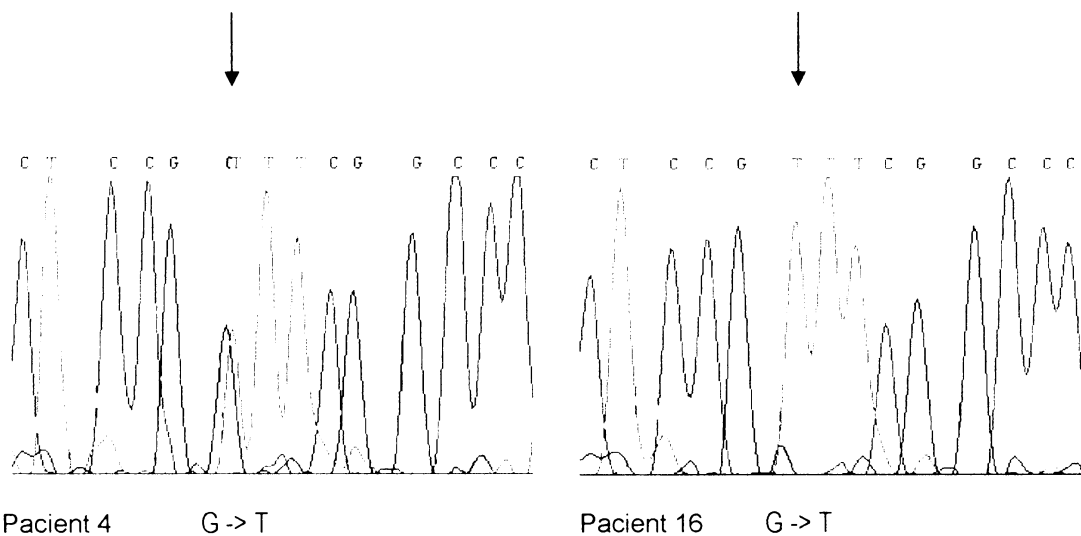
Lokalizácia	Mutácia ^a	Zmena v sekvencii ^b	Zmena v kodóne	Frekvencia ^c	Referencie
Exón 2	Q70X	c.208C>T	CAG>TAG	7 (20%)	SCOTT <i>et al.</i> 1992c
Exón 5	Y167X	c.501C>A/G	TAC>TAA	1 (3%)	BEESLEY <i>et al.</i> 2001
Exón 7	D315Y	c.943G>T	GAC>TAC	1 (3%)	SCOTT <i>et al.</i> 1995
Exón 8	A327P	c.979G>C	GCG>CCG	1 (3%)	BUNGE <i>et al.</i> 1994
Exón 9	W402X	c.1205G>A	TGG>TAG	11 (32%)	SCOTT <i>et al.</i> 1992b
Exón 11	V538fs	c.1614delG		1 (3%)	SCOTT <i>et al.</i> 1993a
Intrón 11	zostrih	IVS11+5G>A		3 (9%)	VENTURI <i>et al.</i> 2002
Exón 14	V620F	c.1858G>T	GTT>TTT	3 (9%)	nová
Exón 14	W626X	c.1877G>A	TGG>TAG	1 (3%)	nová
Exón 14	R628X	c.1882C>T	CGA>TGA	1 (3%)	BEESLEY <i>et al.</i> 2001
Exón 14	E640fs	c.1918-1927del		2 (6%)	nová

^aNové mutácie sú vyznačené tučne

^bNukleotidy sú číslované od A v iniciačnom kodóne ATG pre metionín (ANTONARAKIS 1998)

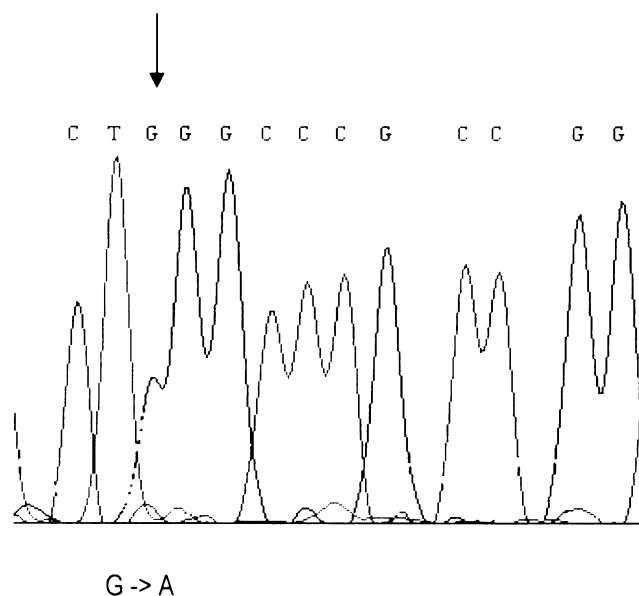
^cCelkový počet aliel (N=34) použitý pre výpočet frekvencií zahrňuje aj alely, na ktorých neboli nájdené mutácie

Referenčná sekvencia cDNA: GenBank, NM_000203.2, 06-NOV-2005



Obr. 10 Sekvencie pacientov 4 a 16 v oblasti novo nájdenej mutácie V620F

Sekvenačná analýza identifikovala u oboch pacientov zámenu G za T (c.1858G>T). Pacient 4 má túto zámenu len na 1 alele, pacient 16 je homozygot pre túto mutáciu.



Obr. 11 Sekvencia pacienta 10 v oblasti novo nájdenej mutácie W626X

Sekvenačná analýza identifikovala u pacienta zámenu c.1877G>A. Pacient 10 má túto zámenu v heterozygícii.

Všetky mutácie sme overili viacerými spôsobmi. Najprv sa sekvenoval novo amplifikovaný PCR produkt, v ktorom sa identifikovala mutácia. Ak sa nález potvrdil, mutácia sa overila reštrikčnou analýzou alebo v prípade delécie sekvenovaním oddelených aliel po zaklonovaní PCR produktu do plazmidu (viď ďalej). U rodičov pacientov, od ktorých sme mali vzorky, sme tiež overili mutáciu v géne pre IDUA.

5.3.2. Metóda PCR/RFLP

Reštrikčná analýza bola použitá pre overenie identifikovaných mutácií u pacientov, prípadne pre vyšetrenie príslušných mutácií u rodičov. Pri interpretácii výsledkov reštrikčnej analýzy sme postupovali podľa tabuľky 28.

Všetky takto overované mutácie sa nám podarilo potvrdiť. Ukážka reštrikčného štiepenia enzýmom *ApaI* v mieste zmeny sekvencie (c.1882C>T) je na obrázku 12.

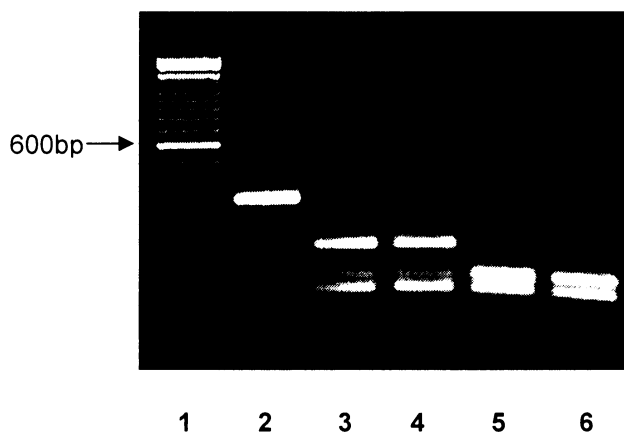
Tab. 28 Predikčná tabuľka pre interpretáciu výsledkov reštrikčnej analýzy pre mutácie nájdené v géne pre IDUA

Mutácia	Enzým	Dĺžka produktu (bp)			
		Neštiepený*	- / -	+ / -	+ / +
Q70X	<i>Bfal</i> / <i>FspBI</i>	304	304	119,185,304	119,185
Y167X	<i>RsaI</i>	273	87,186	87,186,273	273
D315Y	<i>RsaI</i>	448	448	165,283,448	283,165
A327P	<i>BstUI</i>	386	18,39,42,51, 51,183	18,39,42,51, 51,93,183	18,39,51, 93,183
W402X	<i>Bfal</i> / <i>FspBI</i>	400	400	119,281,400	119,281
V538fs	<i>ApaI</i>	466	193,273	193,273,466	466
W626X	<i>Bfal</i>	331	331	144,187,331	144,187
R628X	<i>ApaI</i>	331	59,122,150	59,122,150, 209	122,209

- / - jedinec bez mutácie, + / - heterozygot, + / + homozygot pre danú mutáciu

* PCR produkty amplifikované 2. sadou primerov (Tab. 2)

Pri reštrikčnej analýze sme narazili na problém s enzýmom *Bfal*, ktorý aj napriek skladovaniu pri -80°C nebol schopný úplne štiepiť príslušné PCR produkty. Neboli sme preto schopní odlišiť heterozygotov od homozygotov. Keďže práve tento enzým je dôležitý pre identifikáciu našich dvoch najčastejších mutácií, museli sme ho nahradiť izoschizomérom od inej firmy. S *FspBI* už neboli žiadne problémy.



Obr. 12 Potvrdenie mutácie R628X u pacienta 14 reštrikčným štiepením *ApaI*.

Profil reštrikčnej analýzy: 1 marker molekulových hmotností, 2 neštiepená kontrola (331bp), 3 pacient 14 – heterozygot pre R628X (59,122,150, 209), 4 matka - heterozygot pre R628X, 5 otec – bez mutácie, 6 štiepená kontrola (59,122,150)

Elektroforéza v 1,5% géla v 1x TBE, k vizualizácii bol použitý etídium bromid.

5.3.3. *ACRS*

Na overenie mutácií IVS11+5G>A a V620F, pri ktorých nebolo možné hneď použiť PCR/RFLP, sme použili metódu ACRS. Po amplifikácii PCR produktu, kde sa so špeciálne navrhnutými primerami vytvorilo miesto pre reštrikciu, sme pokračovali ako pri bežnom PCR/RFLP. Výsledky štiepenia sú v tabuľke 29. V oboch prípadoch sme potvrdili prítomnosť mutácie u daných pacientov.

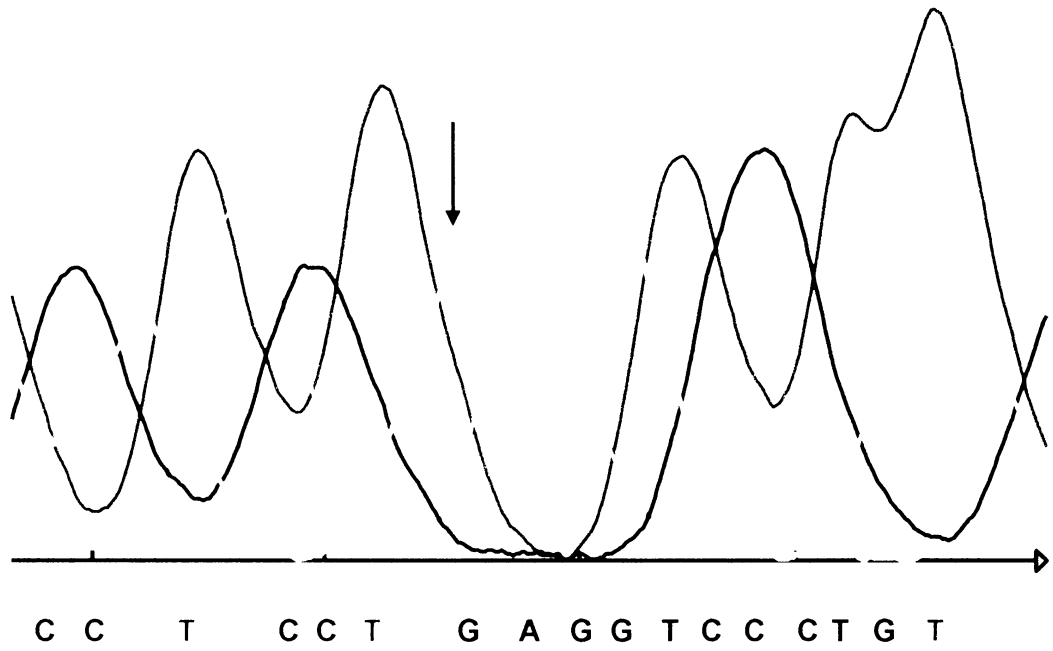
Tab. 29 Štiepenie PCR produktov amplifikovaných metódou ACRS

Enzým	Mutácia	Lokalizácia	Dĺžka produktu (bp)			
			Neštiepený	- / -	+ / -	+ / +
<i>NdeI</i>	IVS11+5G>A	Intrón 11	260	260	30,230,260	30,230
<i>Tsp509I</i>	V620F	Exón 14	280	280	30,250,280	30,250

- / - jedinec bez mutácie, + / - heterozygot, + / + homozygot pre danú mutáciu

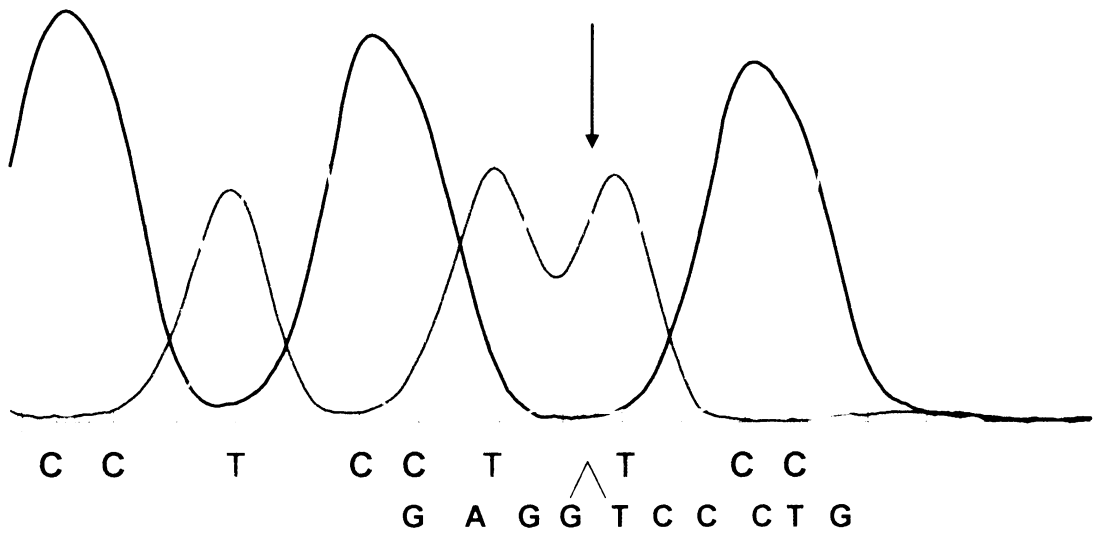
5.3.4. *Sekvenovanie klonovaného PCR produktu*

Mutáciu E640fs (c.1918-1927del) sme overili sekvenovaním oddelených aliel oboch pacientov, u ktorých sme túto mutáciu našli. Aby sme mohli analyzovať každú alelu zvlášť, bolo treba zaklonovať PCR produkt genómovej DNA obsahujúci exóny 13 a 14 do plazmidového vektoru a sekvenovať izolované plazmidové klony. Na obrázkoch 13 a 14 sú sekvencie jednotlivých aliel, s deléciou a bez nej.



Obr. 13 Sekvencia normálnej alely

Zdravá alela bez mutácie, deletované nukleotidy v c.1918-1927del sú naznačené čiernou farbou



Obr. 14 Sekvencia mutovanej alely s c.1918-1927del

Mutovaná alela s deléciou 10 nukleotidov, vyznačených čiernou farbou

5.4. Identifikácia polymorfizmov u pacientov s MPS I a v súbore kontrolných vzoriek

Okrem analýzy mutácií sme sa zamerali aj na SNP (single nucleotid polymorphism) v géne IDUA. Zo sekvencií 16 pacientov sme v exónoch identifikovali 13 už popísaných polymorfizmov (Tabuľka 25 - hore). Päť vybraných polymorfizmov A8, A20, Q33H, L118 a R105Q sme tiež analyzovali v súbore 100 českých kontrol, aby sme zistili, či sa nejako výrazne líšia frekvencie medzi pacientami a zdravými kontrolami a frekvencie v našej populácii sme porovnávali s inými populáciami.

Vzhľadom k tomu, že polymorfizmy A8, A20, Q33H sa nachádzajú v exóne 1, zvolili sme na ich identifikovanie sekvenačnú analýzu. U polymorfizmu L118 v exóne 3 sme použili metódu PCR/RFLP, keďže polymorfizmus mení rozpoznávacie miesto pre endonukleázu *KpnI*. Posledný polymorfizmus R105Q sme analyzovali metódou ARMS.

Z výsledkov zhrnutých v Tabuľke 30 vyplýva, že frekvencie polymorfizmov v našej kontrolnej skupine sú v súlade s frekvenciami nájdenými u Američanov európskeho pôvodu (Li *et al.* 2002). Výnimkou je len polymorfizmus L118, ktorý sme našli na 26% kontrolných aliel pri porovnaní so 76% u Američanov. U pacientov sa frekvencia vyšetrovaných polymorfizmov pri porovnaní s kontrolnou skupinou najviac líši v prípade polymorfizmov A8 a A20, čo je pravdepodobne dané tým, že ani jeden z týchto polymorfizmov nie je spojený s našimi najčastejšími mutáciami Q70X a W420X. Naopak len polymorfizmus R105Q je zastúpený v oboch skupinách približne rovnako. K podobným záverom sme došli aj v prípade zrovnania genotypových frekvencií (Tabuľka 31).

Tab. 30 Frekvencie polymorfizmov (SNP) v géne IDUA u českých a slovenských pacientov a u kontrol z rôznych populácií

Frekvencie polymorfných aliel					
SNP	nukleotidová zmena	českí a slovenskí pacienti (n=32)	česká populácia	kaukazská populácia ^a	afroamerická populácia ^a
A8	c.24C→A	13%	43% (n=190)	44%	33%
A20	c.60G→A	13%	46% (n=192)	43%	31%
Q33H	c.99G→T	38%	20% (n=192)	17%	8%
R105Q	c.314G→A	16%	13% (n=200)	14% (CEU) ^b	6% (YRI) ^b
L118	c.352C→T	16%	26% (n=200)	74%	69%

^a údaje prevzaté z (Li *et al.* 2002)

^b údaje prevzaté z HapMap (<http://www.hapmap.org/>), CEU = Utah residents with ancestry from northern and western Europe, YRI: Yoruba in Ibadan, Nigeria

Tab. 31 Genotypové frekvencie u českých a slovenských pacientov a kontrol z rôznych populácií

SNP	nukleotidová zmena	pacienti			česká populácia		
		-/- ^a	+/- ^a	+/+	-/-	+/-	+/+
A8	c.24C→A	12	4	0	27	54	14
A20	c.60G→A	12	4	0	26	52	18
Q33H	c.99G→T	8	4	4	62	29	5
R105Q	c.314G>A	12	3	1	76	23	1
L118	c.352C→T	12	3	1	57	34	9
		kaukazská populácia ^b			afroamerická populácia ^b		
		-/-	+/-	+/+	-/-	+/-	+/+
A8	c.24C→A	19	24	12	24	26	5
A20	c.60G→A	20	21	12	26	24	5
Q33H	c.99G→T	36	19	0	48	5	2
R105Q	c.314G>A	43 (17%)	17 (28%)	0 (CEU ^c)			
L118	c.352C→T	1	25	26	6	22	27

^a symbolizuje bežnú - a polymorfnú alelu +

^b údaje prevzaté (Li *et al.* 2002)

^c údaje prevzaté z HapMap (<http://www.hapmap.org/>), CEU = CEPH (Utah residents with ancestry from northern and western Europe), YRI: Yoruba in Ibadan, Nigeria

Z celkového počtu 100 kontrolných vzoriek bolo 26 vzoriek homozygotných pre všetky vyšetované markery a 4 boli heterozygotmi v maximálne jednom polymorfizme. Na základe analýzy týchto 30 vzoriek (60 aliel) sme zistili, že v českej populácii sa vyskytuje najmenej 8 haplotypov (Tabuľka 32).

Tab. 32 Frekvencie haplotypov v 60 kontrolných alelách

Haplotyp	A8	A20	Q33H	R105Q	L118	Frekvencie
1	A	A	G	G	C	28 (46%)
2	C	G	G	G	C	15 (25%)
3	C	G	T	G	T	7 (12%)
4	C	G	T	G	C	5 (8%)
5	C	G	G	G	T	4 (7%)
6	A	A	T	G	C	1 (1,5%)
7	C	G	G	A	C	1 (1,5%)
8	A	A	G	A	C	1 (1,5%)

Haplotypy na mutovaných alelách pacientov boli určené buď na základe homozygotného stavu daného polymorfizmu a/alebo na základe analýzy vzoriek rodičov (Tab. 33). Z výsledkov vyplýva, že najčastejšia mutácia W402X je spojená s druhým najčastejším haplotypom v súbore českých kontrol (C-G-G-G-C). S rovnakým haplotypom sú spojené aj mutácie IVS11+5G>A, A327P a nová E640fs. Druhú najčastejšiu mutáciu Q70X sme našli v spojení s dvoma haplotypmi, z ktorých jeden (C-G-T-G-T) bol nájdený na siedmich zo 60 kontrolných aliel, zatiaľ čo druhý (C-G-T-A-C) sme vo vyšetrovaných kontrolách nenašli vôbec (Tabuľky 32 a 33). Skutočnosť, že Q70X a W420X sú spojené s rôznymi haplotypmi, potvrdzujú aj iní autori (SCOTT *et al.* 1992b, CLARKE *et al.* 1994, LI *et al.* 2002).

Tab. 33 Haplotypy asociované s mutantnými alelami

Mutace	H ^a	8 ^b	20 ^b	33 ^b	105 ^b	118 ^b	181 ^b	314 ^b	361 ^b	388 ^b	410 ^b	454 ^b	489 ^b
Q70X	3	C	G	T	G	T	-	-	-	-	-	-	-
Q70X	n.i.	C	G	T	A	C	+	+	-	-	+	+	+
Y167X	4	C	G	T	G	C	-	-	-	-	-	-	-
D315Y	1	A	A	G	G	C	-	-	-	-	-	-	-
A327P	2	C	G	G	G	C	-	-	-	-	-	-	-
W402X	2	C	G	G	G	C	-	-	-	-	-	-	-
V538fs		A	A	T	G	C	-	-	-	-	-	-	-
IVS11+5G>A	2	C	G	G	G	C	+	+	-	-	+	+	+
IVS11+5G>A	2	C	G	G	G	C	-	-	-	-	-	-	-
V620F	7	C	G	G	A	C*	+	+	-	-	+	+	+
V620F	7	C	G	G	A	C	+	+	+	+	+	+	+
W626X	4	C	G	T	G	C**	-	-	-	-	-	-	-
R628X	6	A	A	T	G	C	-	-	-	-	-	-	-
E640fs	2	C	G	G	G	C	-	-	-	-	-	-	-

* - haplotyp odvodený z bežného haplotypu druhej alely (W402X)

** - haplotyp odvodený z bežného haplotypu druhej alely (Q70X)

^a haplotyp odpovedajúci kontrolám

^b polymorfizmy sú označené len poradím aminokyseliny, po poradí A8, A20, Q33H, R105Q, L118, N181, A314, A361T, T388, T410, V454, R489

5.5. Overenie nových mutácií

Dôležitou časťou expresnej štúdie je cieleňá mutagenéza, v prípade, že nie je k dispozícii cDNA od pacienta, ale je nutné použiť wild type cDNA. Riziko vzniku náhodnej chyby pri zlom zaradení báze pri PCR amplifikácii znižuje použitie DNA polymerázy s 3'-5' exonukleázovou aktivitou (proofreading activity). Druhým problémom pri SDM metóde je vznik nežiadanej zmeny namiesto špecifickej mutácie. S oboma problémami sme sa stretli pri mutagenéze wild type *IDUA*. Najväčší problém

nám robila mutácia E640fs, ktorá sa nachádza blízko C-konca a preto bol problém aj s navrhovaním primerov. Z prvých šiestich kolónií, u ktorých sme overovali sekvenovaním vznik žiadanej mutácie, ani jedna nebola so správnou mutáciou. Sekvencie deléciu 10 bp buď vôbec neobsahovali, alebo len spolu s rôzne dlhými repetitívnymi inzerciami. Z ďalších 12 kolónií sa ako správne ukázali dve, ktoré sme použili v ďalších krokoch.

Patogenitu sme potvrdili u všetkých študovaných mutácií – V620F, W626X, E640fs a D315Y (Tab. 34). V porovnaní s aktivitou wild type IDUA bola aktivita znížená vo všetkých bunkách transfekovaných mutovanou cDNA-IDUA. U mutácií V620F, W626X a D315Y bola nameraná takmer nulová aktivita. V prípade enzýmu s deléciou 10 báz v poslednom exóne (E640fs) sme namerali nízku reziduálnu aktivitu (3% aktivity wild type IDUA), čo koreluje tiež s ľahšími fenotypmi u oboch pacientov 7 a 8.

Tab. 34 Aktivita α -L-iduronidázy v CHO bunkách tranzientne transfekovaných normálnou alebo mutovanou cDNA.

Transfekčný vektor	Aktivita α -L-iduronidázy (nmol/h/mg proteínu)	Asociovaný fenotyp
CHO	4.1	
pIRES2	4.7	
pIRES2/WT AV	1005.7	
pIRES2/D315Y	4.2	IH
pIRES2/W402X	6.1	IS, IH/S, IH
pIRES2/V620F	8.2	IH
pIRES2/W626X	4.6	IH
pIRES2/c.1918 – 1927del	29.1	IS, IH/S

Hodnoty sú priemerom šiestich experimentov

6. Diskusia

6.1. Mutačná analýza

Pre mutačnú analýzu je najvhodnejšia metóda priameho sekvenovania PCR produktov. Aj napriek použitiu polymeráz s „proofreading“ aktivitou sa pri amplifikácii vzácne môžu do PCR produktu inkorporovať chybné nukleotidy. Zatiaľ čo pri analýze PCR produktu po klonovaní sa táto chyba prejaví ako mutácia, pri priamom sekvenovaní sa chyba neprejaví, pretože analyzujeme tisíce kópií v jednej reakcii.

Napriek tomu, že sme u našich pacientov očakávali vysoké frekvencie mutácií Q70X a W402X, nezamerali sme sa prednostne na ich vyhľadávanie, ale sekvenovali sme celú kódujúcu oblasť s cieľom charakterizovať aj ostatné zmeny v géne.

Metódou priameho sekvenovania sme dokázali v 17 českých a slovenských rodinách s MPS I prevalentný výskyt mutácií Q70X a W402X, ktoré sa našli celkom na 53% aliel. Tento výsledok odpovedá výskytu týchto dvoch mutácií aj v iných beloškých populáciách (60% v Severnej Amerike, 78% v Škandinávii, 48% v Rusku, 70% v Španielsku) (BUNGE *et al.* 1994, SCOTT *et al.* 1995, GORT *et al.* 1998, VOSKOBEOVA *et al.* 1998).

Z celkového počtu 34 aliel sa nám podarilo nájsť mutácie na 32 alelách – u pacientov 5 a 17 sme identifikovali len jednu mutantnú alelu. Naša úspešnosť je teda 94%, čo je zrovnateľné s inými štúdiami, kde sa úspešnosť pohybuje medzi 80 až 95% (SCOTT *et al.* 1995, BEESLEY *et al.* 2001). Dôvodom nezachytenia mutácií môže byť zvolená metodika priameho sekvenovania, ktorú dnes používajú takmer všetci autori. Ako je uvedené vyššie, táto metóda je veľmi spoľahlivá a citlivá, a počet identifikovaných mutácií to potvrdzuje, ale nie je zvyčajne schopná zachytiť veľké delécie, inzercie alebo génové prestavby. Ďalší dôvod môže byť ten, že u väčšiny vzoriek sme vychádzali z archívnych materiálov a preto sme nemohli pripraviť cDNA, teda sme mohli minúť niektoré typy mutácií, napr. zostrihové mutácie.

6.2. Polymorfizmy a haplotypy

Doteraz bolo popísaných 30 polymorfizmov (BEESLEY *et al.* 2001), z ktorých sme u našich pacientov identifikovali 13, všetky boli lokalizované v exónoch. Žiadny doteraz nepopísaný polymorfizmus sme nenašli.

U pacientov je najčastejší polymorfizmus Q33H, ktorý sme našli na 12 z 32 aliel. Jeho častý výskyt v súbore pacientov je čiastočne daný tým, že sa spája s prevalentnou mutáciou Q70X, čo potvrdzuje výsledky LI *et al.* (2002). U kontrolnej českej populácie je jeho frekvencia nižšia.

Polymorfizmus N297 sme identifikovali iba na jednej alele. Doposiaľ bol popísaný iba u troch pacientov (MATTE *et al.* 2003, KETUDAT CAIRNS *et al.* 2005), z nich jeden je v podstate identický s našim prípadom, pacientom 5. Obaja pacienti majú rovnaký fenotyp (IH), rovnakú mutáciu na jednej alele (W402X) a druhú mutáciu neznámu. Genotypovou analýzou matky nášho pacienta sme zistili, že tento polymorfizmus je asociovaný s alelou s neznámou mutáciou.

Polymorfizmus A361T, u ktorého sa špekuluje o negatívnom vplyve na fenotyp pacienta (SCOTT *et al.* 1993a), bol nájdený v spojení so siedmimi ďalšími polymorfizmami a to iba pri jednom pacientovi s ťažkým ochorením, preto túto teóriu nemôžeme ani potvrdiť, ani vyvrátiť.

Z nájdených polymorfizmov sme vybrali 5, ktoré boli už podrobnejšie študované – A8, A20, Q33H, L118 a R105Q (LI *et al.* 2002), určili ich frekvenciu a odvodili 8 haplotypov v súbore 100 českých kontrol.

Polymorfizmy A8 a A20, ktoré sme našli na štyroch mutantných alelách sa javia byť vo väzbe. Rovnako sa javia polymorfizmy N181-A314-A361T-T388-T410-V454I-R489, ktoré sme našli spolu na dvoch alelách jedného pacienta, kým kombináciu N181-A314-T410-V454I-R489 sme zistili na štyroch alelách. Polymorfizmy A8 a A20 boli vo väzbe aj u všetkých 8 haplotypov nájdených v kontrolnej populácii. Naše výsledky sú v súlade so štúdiami LEE-CHEN *et al.* (1998) a LI *et al.* (2002), ktorí zistili existenciu dvoch haplotypových segmentov oddelených intrónom 2.

Niektoré mutácie nájdené u pacientov s MPS I boli popísané v spojení s rôznymi haplotypmi, čo znamená, že pre danú mutáciu existuje viac ako jedna ancestrálna alela (SCOTT *et al.* 1995). Napríklad mutácia W402X bola zatiaľ nájdená v spojení s najmenej tromi haplotypmi (SCOTT *et al.* 1992b), u našich pacientov však je spojená len s jedným. Tento haplotyp však potvrdzuje asociáciu W402X s polymorfizmom L118 (LI *et al.* 2002). S dvoma haplotypmi sú u našich pacientov asociované mutácie Q70X, V620F a IVS11+5G>A.

Zaujímavý výsledok sme získali pri analýze pacientov 4 a 16 s novou mutáciou V620F. Pacient 4 je z ČR (kaukazská populácia), pacient 16 patrí do rómskej populácie a pochádza zo Slovenska. Porovnaním polymorfizmov sme zistili, že táto nová mutácia je asociovaná s dvoma rozdielnymi haplotypmi. Rozdiel medzi nimi je v neprítomnosti dvoch polymorfizmov (A361T a T388) na alele pacienta 4, zatiaľ čo všetky ostatné sledované polymorfizmy sme našli u oboch pacientov. To znamená, že táto dosiaľ neznáma mutácia musela vzniknúť hneď dvakrát, nezávisle, na dvoch alelách. Zaujímavý je práve poznatok, že vznikla v dvoch rozdielnych populáciách.

6.3. Genotyp – fenotypová korelácia

Na základe štúdia vplyvu niektorých mutácií na aktivitu enzýmu boli tieto mutácie rozdelené do dvoch skupín. Mutácie, ktoré neumožňujú syntézu funkčného enzýmu, sa dajú zaradiť do skupiny takzvaných nulových a predpokladá sa, že pokiaľ by sa tieto mutácie vyskytli v homozygotnom stave alebo vo vzájomnej kombinácii, viedli by k ťažkému typu ochorenia. Dve mutácie, ktoré umožňujú určitú reziduálnu aktivitu enzýmu, môžu potom viesť k neskoršej manifestácii ochorenia a ľahšiemu postihnutiu. Kombinácia nulovej alely s alelou so zvyškovou aktivitou môže viesť k strednému alebo ľahkému typu ochorenia. Táto genotyp-fenotypová korelácia bola popísaná aj u niektorých lipidóz (napr. GM2-gangliozidóza, metachromatická leukodystrofia).

Z doteraz popísaných genotyp-fenotypových korelácií u MPS I sa vyššie uvedený model zhoduje so skutočnosťou pomerne často, ale existuje aj dosť veľa výnimiek, ktoré nám nedovolia s istotou predpovedať fenotyp pacienta len na základe znalosti jeho genotypu. Medzi nulové alely patria obe prevalentné mutácie Q70X a W402X a rada ďalších mutácií spôsobujúcich predčasný stop kodón, medzi mutácie so zvyškovou aktivitou patria niektoré missense mutácie. Inzercie a delécie popísané v literatúre zatiaľ vždy viedli k ťažkej forme ochorenia, mutácie vedúce k chybnému zostrihu sú spájané so všetkými fenotypmi MPS I.

Pred pokusom predpovedať genotyp-fenotypovú koreláciu alebo štruktúrny a funkčný dôsledok mutácií treba vziať do úvahy, aký vplyv na štruktúru proteínu môže mutácia mať v skutočnosti (SCOTT *et al.* 1995). Napr. mutácia Y343X, ktorá spôsobuje vznik stop kodónu, vzniká na 3'- mieste zostrihu a predpokladá sa, že sa produkuje kratší IDUA proteín s chýbajúcimi 19-timi AK zvyškami z kodónov 325-343 (TIEU *et*

al. 1994). Táto mutácia poukazuje na dôležitosť brať do úvahy mutantnú mRNA. Aj iné mutácie *IDUA* môžu spôsobiť odchýlny mRNA zostrih. Napríklad 3 mutácie nachádzajúce sa blízko hranice medzi intrónom 5 a exómom 6, (703del22ins10, 678-7g→a a 682insAC) a tiež Q310X v exóne 7, všetky využívajú -28 pozíciu intrónu 5 ako krytické 3'-miesto zostrihu. (SCOTT *et al.* 1993a, BUNGE *et al.* 1994).

U MPS I je genotyp-fenotypová korelácia možná hlavne u pacientov s bežnými nulovými mutáciami, kde kombinácia dvoch nulových aliel vedie k ťažkému fenotypu. V ostatných prípadoch dochádza u pacientov so zjavne rovnakým genotypom veľmi často k odchýlkam vo fenotypových prejavoch (MATTE *et al.* 2003). *IDUA* gén sa totiž vyznačuje prítomnosťou veľkého množstva polymorfizmov, ktoré môžu ovplyvniť stabilitu a spracovanie mRNA alebo proteínu (SCOTT *et al.* 1995). Okrem toho je ťažké zrovnávať klinické fenotypy, pretože neexistuje žiadny štandardný skórovací systém pre hodnotenie klinických príznakov.

Aj naše výsledky potvrdzujú publikované údaje. Štyria pacienti sú homozygoti pre nulové mutácie Q70X alebo W402X a všetci majú ťažký fenotyp (IH). Ďalších sedem pacientov, ktorí sú zloženými heterozygotmi pre jednu prevalentnú mutáciu a mutáciu, ktorá bola popísaná alebo nami overená ako ťažká, má tiež IH. U jedného z týchto pacientov (pacient 10) sme našli novú mutáciu W626X v kombinácii s Q70X. Expresia potvrdila nulovú aktivitu mutovaného proteínu. V rovnakom kodóne bola identifikovaná missense mutácia W626R u pacienta s mierne ťažkým postihnutím (IH/S) (BUNGE *et al.* 1995).

K prekvapivému výsledku sme došli u pacienta 14. Tento pacient s kombináciou dvoch nulových mutácií Q70X a R628X, ktoré by mali viesť k ťažkému klinickému prejavu, má mierny fenotyp, Scheieov syndróm (IS). Vysvetlenie pre túto genotyp-fenotypovú odchýlku by mohlo spočívať v prítomnosti stop kodónu TGA nahradzujúceho arginínový zvyšok v 14. exóne (R628X). TGA je v porovnaní s TAA a TAG najslabším stop kodónom, ktorý umožňuje čiastočné pokračovanie translácie k prirodzenému stop kodónu. V štúdií efektu stop kodónov na stabilitu mRNA, HEIN *et al.* (2004) ukázali, že predčasný TGA stop kodón by mohol viesť k miernejším klinickým prejavom v porovnaní so stop kodónom TAG, ktorý sa vyskytuje v mutáciách Q70X a W402X. Napriek tomu, dvaja pacienti homozygotní pre R628X boli popísaní s IH fenotypom (BEESLEY *et al.* 2001) a jeden s IH/S fenotypom (VENTURI

et al. 2002). Teda výsledný fenotyp je pravdepodobne ovplyvnený aj ďalšími faktormi ako polymorfizmy, genetický základ, faktory prostredia atď.

Podobná situácia s mierne rozdielnym fenotypom, ale rovnakou kombináciou mutácií aj polymorfizmov je u pacientov s deléciou E640fs (pacienti 7 a 8). Hoci sa delécie obyčajne spájajú s ťažkým fenotypom (TERLATO *et al.* 2003), u našich pacientov aj v kombinácii s nulovou alelou spôsobujú „len“ miernejší fenotyp - u pacienta 7 syndróm IH/S, u pacienta 8 syndróm IS. Expressia proteínu s touto mutáciou potvrdila reziduálnu aktivitu enzýmu, čo je neobvyklé u delecíí, hlavne keď spôsobujú posun v čítacom rámci.

Zostrihovú mutáciu IVS11+5G>A, ktorú sme našli na troch alelách, je možné pokladať za nulovú mutáciu. U dvoch pacientov (13 a 15) vedie v kombinácii s nulovými mutáciami Q70X a V538fs k ťažkým prejavom ochorenia.

Pacient 6, ktorý má v súčasnosti prejavy IH/S, je zloženým heterozygotom pre W402X a IVS11+5G>A. Z veku, kedy bol pacient diagnostikovaný (10. mesiac života), je možné usudzovať, že pôvodným fenotypom pacienta bol IH a súčasný fenotyp môže byť výsledkom transplantácie kostnej drene v 13. mesiaci. Rovnakú situáciu popísal aj VENTURI *et al.* (2002): pacient s rovnakými mutáciami a syndrómom Hurlerovej bol diagnostikovaný v priebehu prvého roku života a transplantovaný do 24. mesiaca. Fenotyp bol určený len na základe veku, kedy sa objavili prvé príznaky.

Všetky nonsense mutácie doteraz nájdené v exóne 14 (R619X, R621X, R628X) boli spojené s ťažkými prejavmi ochorenia, zatiaľ čo väčšina missense mutácií R619G, W626R a S633L viedla k ľahším fenotypom (BEESLEY *et al.* 2001). V súbore našich pacientov sme našli dve mutácie, ktoré neodpovedajú tejto schéme.

Prvý prípad je IS pacient 14 (Q70X/R628X), ktorý je diskutovaný vyššie. Druhým prípadom sú dvaja pacienti s IH syndrómom (4 a 16), ktorí majú novú mutáciu V620F. U pacienta 4 bola nájdená v zloženej heterozygocii s nulovou mutáciou W402X, kým u pacienta 16 je v homozygotnej forme. Expressná štúdia potvrdila túto mutáciu ako nulovú. Zdá sa, že vysoko konzervovaná C-koncová oblasť nie je tolerantnejšia k zámene aminokyselín rovnako, ako ostatné časti génu *IDUA* a aj missense mutácie v tejto oblasti môžu spôsobovať ťažký fenotyp.

U určitých mutácií (napr. delécie a inzercie meniace čítací rámec, rozsiahle delécie a inzercie, mutácie vedúce k chybe v zostrihu) môžeme hneď predpokladať

zníženú prípadne až nulovú aktivitu enzýmu. Ale napr. u bodových mutácií nedokážeme dopredu odhadnúť, nakoľko poškodia funkciu enzýmu. Hlavne v týchto prípadoch je pre určenie závažnosti mutácie dôležitá funkčná analýza (expresná štúdia).

Väčšina mutácií s IS alebo IH/S je missense, čo odzrkadľuje, že tieto mutácie pravdepodobne najviac umožňujú nejakú zbytkovú enzymatickú funkčnosť. Rolu tu ale zohráva, kde tie mutácie vznikli. Expresiou proteínov s dvomi missense mutáciami (E178A a E182A), ktoré by mohli vzniknúť v katalytickom mieste, BROOKS *et al.* (2001) ukázal, že tieto mutované proteíny síce vznikajú v rovnakom množstve ako nemutovaný proteín, ale sú katalyticky neaktívne. Pri iných typoch mutácií sa predpokladá, že proteín nevzniká vôbec.

V budúcnosti by predikcii fenotypu na základe mutácií mohlo pomôcť dokončenie 3D modelu pre IDUA, ktorý vytvoril REMPEL *et al.* (2005). Už teraz sa ale dá určiť pre väčšinu AK zvyškov, kde v proteíne sa nachádza ich konkrétna pozícia. V tejto práci sa zamerali aj na koreláciu missense mutácií. Zo siedmich miernych mutácií sa šesť nachádza na povrchu proteínu, a siedmy vzniká v aktívnom mieste na 89. arginínovom zvyšku (R89). Tento AK zvyšok sa spája s dvoma mutáciami (R89Q a R89W), ktoré sú v jednotlivých populáciách bežné až prevalentné (YAMAGISHI *et al.* 1996). Z 11 mutácií spájajúcich sa s IH/S fenotypom je tiež jedna v aktívnom mieste (E178K), sedem na povrchu proteínu, jedna vo vnútornej doméne a u dvoch mutácií na C-konci je oblasť ich umiestnenia zatiaľ neznáma. S IH fenotypom sa spája 13 missense mutácií, takisto jedna je v aktívnom mieste (E182K), štyri sú na povrchu, jedna s neurčenou oblasťou výskytu, ale najviac (7) ich je vo vnútornej doméne proteínu. Porovnaním fenotypov a počtu mutácií v aktívnych miestach, sa nepotvrdila teória, že niektoré missense mutácie spojované s ľahkým a stredným fenotypom MPS I sa zdajú byť združené okolo aktívnych alebo potencionálnych glykozylačných miest. (SCOTT *et al.* 1995).

Všetky naše nové mutácie V620F, W626X a E640fs, sa nachádzajú v exóne 14, ktorý v spomínanom 3D modeli nemá určenú terciárnu štruktúru. To, či je tento región potrebný pre katalytickú aktivitu, signálne rozoznávanie alebo štruktúrnu stabilitu, sa momentálne nedá určiť. C-koniec IDUA proteínu je však bohatý na mutácie. O mieste vzniku mutácie V620F, ktorá vznikla nezávisle dvakrát v dvoch rôznych populáciách, vieme zatiaľ len toľko, že vznikla v konzervovanej pozícii a je súčasťou β -listu. Mutácia

W626X sa nachádza tiež v konzervovanej oblasti. Pri delícii E640fs dochádza k strate 10 nukleotidov, z ktorých prvé tri tvoria posledný AK zvyšok β -listu.

Teórií o konkrétnych možných vplyvoch na fenotyp sa objavuje čoraz viac – diskutuje sa typ mutácie, konkrétna zámena aminokyseliny, konzervovanosť a miesto vzniku mutácie. Ako zaujímavá sa javí hypotéza genetickej regulácie obratu GAG (WEGRZYN *et al.* 2004). Vychádza z možnosti regulácie génov kódujúcich syntézu GAG, ktorá sa môže líšiť medzi jednotlivcami, čo má za následok rozdielne množstvá GAG u zdravých jedincov. Normálna úroveň nameranej IDUA aktivity sa môže líšiť až 4x u jedincov nesúcich dve identické wild type alely. Preto by sa v budúcnosti malo zamerať na meranie množstva nielen degradovaných, ale aj syntetizovaných GAG u postihnutých jedincov. Rozdielny fenotyp u jedincov s rovnakým genetickým základom môže byť spôsobený práve touto odchýlkou v regulácii syntézy.

Naše doterajšie poznatky nám zatiaľ nedovoľujú pochopiť komplexnosť faktorov ovplyvňujúcich pacientove fenotypy.

7. Súhrn

Molekulárno-genetická analýza *IDUA* génu u českých a slovenských pacientov s MPS I a u zdravej populácie je prvou systematickou štúdiou v slovanskej populácii.

Výsledky môžeme zhrnúť v nasledujúcich bodoch:

- boli zavedené a optimalizované metódy DNA analýzy v *IDUA* géne, ktoré boli použité pre charakterizáciu mutácií v skupine 17 MPS I pacientov. Bolo zistených celkom 11 mutácií, z toho osem známych a tri nové. Na osemnástich alelách boli nájdené mutácie Q70X a W402X, ktoré sú prevalentné v kaukazskej populácii.
- u troch nových a jednej zatiaľ neoverenej mutácie (D315Y, V620F, W626X a E640fs) bola prevedená expresná štúdia, ktorá potvrdila ich patogenitu. Všetky mutácie okrem delécie c.1918-1927del vedú k vzniku nefunkčného enzýmu. Mutovaný enzým s deléciou c.1918-1927del vykazuje nízku zvyškovú aktivitu, ktorá korešponduje s miernejšími prejavmi ochorenia.
- genotyp-fenotypová korelácia je najočividnejšia u homozygotov pre prevalentné mutácie. U ďalších pacientov vzťah medzi genotypom a fenotypom viac menej tiež súhlasí. Najväčším prekvapením bol nález dvoch predčasných stop kodónov Q70X a R628X u pacienta so Scheieovým syndrómom.
- u pacientov bolo identifikovaných 13 polymorfizmov, u piatich vybraných boli sledované frekvencie v súbore českých kontrol. Frekvencie polymorfizmov v našej kontrolnej skupine sú s výnimkou polymorfizmu L118 v súlade s frekvenciami nájdenými u Američanov európskeho pôvodu. Naopak u pacientov sa frekvencie väčšiny polymorfizmov v porovnaní s kontrolnou skupinou líšia.
- na základe vyšetrení polymorfizmov u kontrolných vzoriek bolo odvodených osem haplotypov. Najčastejšia mutácia W402X je spojená s druhým najčastejším haplotypom v súbore českých kontrol (C-G-G-G-C). Mutované alely sa spájajú zvyčajne s jedným, alebo v prípade Q70X, IVS 11+ 5g>a a V620F s najmenej dvoma rozdielnymi haplotypmi, tzn. niektoré mutácie nemajú v našej populácii len jednu ancestrálnu alelu.

8. Použitá literatúra

1. Alif, N., Hess, K., Straczek, J., Sebbar, S., N'Bou, A., Nabet, P., Dousset, B. (1999): Mucopolysaccharidosis type I: characterization of a common mutation that causes Hurler syndrome in Moroccan subjects. *Ann Hum Genet.* 63(Pt 1): 9-16.
2. Antonarakis, S.E. (1998): Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat.* 11(1): 1-3.
3. Aronovich, E.L., Pan, D., Whitley, C.B. (1996): Molecular genetic defect underlying alpha-L-iduronidase pseudodeficiency. *Am J Hum Genet.* 58(1): 75-85.
4. Bach, G., Moskowitz, S.M., Tieu, P.T., Matynia, A., Neufeld, E.F. (1993): Molecular analysis of Hurler syndrome in Druze and Muslim Arab patients in Israel: multiple allelic mutations of the IDUA gene in a small geographic area. *Am J Hum Genet.* 53(2): 330-8.
5. Beesley, C.E., Meaney, C.A., Greenland, G., Adams, V., Vellodi, A., Young, E.P., Winchester, B.G. (2001): Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations. *Hum Genet.* 109(5): 503-11.
6. Brooks, D.A., Fabrega, S., Hein, L.K., Parkinson, E.J., Durand, P., Yogalingam, G., Matte, U., Giugliani, R., Dasvarma, A., Eslahpazire, J., Henrissat, B., Mornon, J.P., Hopwood, J.J., Lehn, P. (2001): Glycosidase active site mutations in human alpha-L-iduronidase. *Glycobiology.* 11(9): 741-50.
7. Bunge, S., Kleijer, W.J., Steglich, C., Beck, M., Zuther, C., Morris, C.P., Schwinger, E., Hopwood, J.J., Scott, H.S., Gal, A. (1994): Mucopolysaccharidosis type I: identification of 8 novel mutations and determination of the frequency of the two common alpha-L-iduronidase mutations (W402X and Q70X) among European patients. *Hum Mol Genet.* 3(6): 861-6.
8. Bunge, S., Kleijer, W.J., Steglich, C., Beck, M., Schwinger, E., Gal, A. (1995): Mucopolysaccharidosis type I: identification of 13 novel mutations of the alpha-L-iduronidase gene. *Hum Mutat.* 6(1): 91-4.
9. Bunge S., Clements P.R., Byers S., Kleijer W.J., Brooks D.A., Hopwood J.J. (1998): Genotype-phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics, immunoquantification and in vitro turnover studies. *Biochim Biophys Acta.* 1407(3): 249-56.
10. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1): 156-9.
11. Clarke, L.A., Nelson, P.V., Warrington, C.L., Morris, C.P., Hopwood, J.J., Scott, H.S. (1994): Mutation analysis of 19 North American mucopolysaccharidosis type I patients: identification of two additional frequent mutations. *Hum Mutat.* 3(3): 275-82.
12. Durand, P., Fabrega, S., Henrissat, B., Mornon, J.P., Lehn, P. (2000): Structural features of normal and mutant human lysosomal glycoside hydrolases deduced from bioinformatics analysis. *Hum Mol Genet.* 9(6): 967-77.
13. Ferrie, R.M., Schwarz, M.J., Robertson, N.H., Vaudin, S., Super, M., Malone, G., Little, S. (1992): Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am J Hum Genet.* 51(2): 251-62.
14. Fuller, M., Meikle, P.J., Hopwood, J.J. (2004): Glycosaminoglycan degradation fragments in mucopolysaccharidosis I. *Glycobiology.* 14(5): 443-50.
15. Gatti, R., DiNatale, P., Villani, G.R., Filocamo, M., Muller, V., Guo, X.H., Nelson, P.V., Scott, H.S., Hopwood, J.J. (1997): Mutations among Italian mucopolysaccharidosis type I patients. *J Inherit Metab Dis.* 20(6): 803-6.
16. Gort, L., Chabas, A., Coll, M.J. (1998): Analysis of five mutations in 20 mucopolysaccharidosis type I patients: high prevalence of the W402X mutation. *Mutations in brief no. 121.* Online. *Hum Mutat.* 11(4): 332-3.

17. Hein L.K., Bawden M., Muller V.J., Sillence D., Hopwood J.J., Brooks D.A. (2004): alpha-L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients. *J Mol Biol.* 338(3): 453-62.
18. Henrissat, B. (1991): A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 280 (Pt 2): 309-16.
19. Henrissat, B.,Bairoch, A. (1993): New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 293 (Pt 3): 781-8.
20. Henrissat, B.,Bairoch, A. (1996): Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 316 (Pt 2): 695-6.
21. Hobbs, J.R., Hugh-Jones, K., Barrett, A.J., Byrom, N., Chambers, D., Henry, K., James, D.C., Lucas, C.F., Rogers, T.R., Benson, P.F., Tansley, L.R., Patrick, A.D., Mossman, J., Young, E.P. (1981): Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet.* 2(8249): 709-12.
22. Kakkis, E.D., Matynia, A., Jonas, A.J., Neufeld, E.F. (1994): Overexpression of the human lysosomal enzyme alpha-L-iduronidase in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif.* 5(3): 225-32.
23. Ketudat Cairns, J.R., Keeratchamroen, S., Sukcharoen, S., Champattanachai, V., Ngiwsara, L., Lirdprapamongkol, K., Liammongkolkul, S., Srisomsap, C., Surarit, R., Wasant, P., Svasti, J. (2005): The molecular basis of mucopolysaccharidosis type I in two Thai patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 36(5): 1308-12.
24. Laradi, S., Tukel, T., Erazo, M., Shabbeer, J., Chkioua, L., Khedhiri, S., Ferchichi, S., Chaabouni, M., Miled, A., Desnick, R.J. (2005): Mucopolysaccharidosis I: alpha-L: -Iduronidase mutations in three Tunisian families. *J Inherit Metab Dis.* 28(6): 1019-26.
25. Lee, I.J., Hwang, S.H., Jeon, B.H., Song, S.M., Kim, J.S., Paik, K.H., Kwon, E.K., Jin, D.K. (2004): Mutational analysis of the alpha-L-iduronidase gene in 10 unrelated Korean type I mucopolysaccharidosis patients: Identification of four novel mutations. *Clin Genet.* 66(6): 575-6.
26. Lee-Chen, G.J., Wang, C.K., Huang, S.F., Day, K.R. (1998): Human alpha-L-iduronidase (IDUA) gene: correlation of polymorphic DNA haplotype and IDUA activity in Chinese population. *Proc Natl Sci Counc Repub China B.* 22(1): 31-8.
27. Li, P., Wood, T., Thompson, J.N. (2002): Diversity of mutations and distribution of single nucleotide polymorphic alleles in the human alpha-L-iduronidase (IDUA) gene. *Genet Med.* 4(6): 420-6.
28. Lin, H.Y., Lin, S.P., Chuang, C.K., Chen, M.R., Chen, B.F., Wraith, J.E. (2005): Mucopolysaccharidosis I under enzyme replacement therapy with laronidase--a mortality case with autopsy report. *J Inherit Metab Dis.* 28(6): 1146-8.
29. MacDonald, M.E., Scott, H.S., Whaley, W.L., Pohl, T., Wasmuth, J.J., Lehrach, H., Morris, C.P., Frischauf, A.M., Hopwood, J.J., Gusella, J.F. (1991): Huntington disease-linked locus D4S111 exposed as the alpha-L-iduronidase gene. *Somat Cell Mol Genet.* 17(4): 421-5.
30. Matte, U., Yogalingam, G., Brooks, D., Leistner, S., Schwartz, I., Lima, L., Norato, D.Y., Brum, J.M., Beesley, C., Winchester, B., Giugliani, R., Hopwood, J.J. (2003): Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Mol Genet Metab.* 78(1): 37-43.
31. Montgomery R., Conway T.W., Spector A.A. (1990): *Biochemistry, A Case-Oriented Approach.* 5th edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis.
32. Moskowitz, S.M., Tieu, P.T., Neufeld, E.F. (1993): A deletion/insertion mutation in the IDUA gene in a Libyan Jewish patient with Hurler syndrome (mucopolysaccharidosis IH). *Hum Mutat.* 2(1): 71-3.
33. Neufeld E.F., Muenzer J. (2001): The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.L., Valle D. (eds.): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases.* Mc Graw Hill, Inc., New York. 3421-3452.
34. Peters, C., Shapiro, E.G., Anderson, J., Henslee-Downey, P.J., Klemperer, M.R., Cowan, M.J., Saunders, E.F., deAlarcon, P.A., Twist, C., Nachman, J.B., Hale, G.A., Harris, R.E., Rozans, M.K., Kurtzberg, J., Grayson, G.H., Williams, T.E., Lenarsky, C., Wagner, J.E., Krivit, W. (1998): Hurler syndrome: II. Outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty- four children. The Storage Disease Collaborative Study Group. *Blood.* 91(7): 2601-8.

35. Rempel, B.P., Clarke, L.A., Withers, S.G. (2005): A homology model for human alpha-L-iduronidase: insights into human disease. *Mol Genet Metab.* 85(1): 28-37.
36. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12): 5463-7.
37. Scott, H.S., Anson, D.S., Orsborn, A.M., Nelson, P.V., Clements, P.R., Morris, C.P., Hopwood, J.J. (1991): Human alpha-L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(21): 9695-9.
38. Scott, H.S., Guo, X.H., Hopwood, J.J., Morris, C.P. (1992a): Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene. *Genomics.* 13(4): 1311-3.
39. Scott, H.S., Litjens, T., Hopwood, J.J., Morris, C.P. (1992b): A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype. *Hum Mutat.* 1(2): 103-8.
40. Scott, H.S., Litjens, T., Nelson, P.V., Brooks, D.A., Hopwood, J.J., Morris, C.P. (1992c): alpha-L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associate with a severe Hurler phenotype. *Hum Mutat.* 1(4): 333-9.
41. Scott, H.S., Nelson, P.V., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Hopwood, J.J., Morris, C.P. (1992d): An 86-bp VNTR within IDUA is the basis of the D4S111 polymorphic locus. *Genomics.* 14(4): 1118-20.
42. Scott, H.S., Litjens, T., Nelson, P.V., Thompson, P.R., Brooks, D.A., Hopwood, J.J., Morris, C.P. (1993a): Identification of mutations in the alpha-L-iduronidase gene (IDUA) that cause Hurler and Scheie syndromes. *Am J Hum Genet.* 53(5): 973-86.
43. Scott, H.S., Nelson, P.V., Litjens, T., Hopwood, J.J., Morris, C.P. (1993b): Multiple polymorphisms within the alpha-L-iduronidase gene (IDUA): implications for a role in modification of MPS-I disease phenotype. *Hum Mol Genet.* 2(9): 1471-3.
44. Scott, H.S., Bunge, S., Gal, A., Clarke, L.A., Morris, C.P., Hopwood, J.J. (1995): Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications. *Hum Mutat.* 6(4): 288-302.
45. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1): 76-85.
46. Stevenson, R.E., Howell, R.R., McKusick, V.A., Suskind, R., Hanson, J.W., Elliott, D.E., Neufeld, E.F. (1976): The iduronidase-deficient mucopolysaccharidoses: clinical and roentgenographic features. *Pediatrics.* 57(1): 111-22.
47. Strauss W.M. (2000): Preparation of Genomic DNA from Mammalian Tissue. In: Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (eds.): *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, Inc., New York.
48. Šípal Z., Anzebacher P., Peč P., Pospíšil J., Ružička I. (1992): *Biochemie.* 3rd edition. SNP Praha.
49. Taylor, J.A., Gibson, G.J., Brooks, D.A., Hopwood, J.J. (1991): alpha-L-iduronidase in normal and mucopolysaccharidosis-type-I human skin fibroblasts. *Biochem J.* 274 (Pt 1): 263-8.
50. Taylor, H.A., Thomas, G.H. (1993): Pseudodeficiency of alpha-iduronidase. *J Inher Metab Dis.* 16(6): 1058-9.
51. Terlato, N.J., Cox, G.F. (2003): Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature. *Genet Med.* 5(4): 286-94.
52. Tieu, P.T., Menon, K., Neufeld, E.F. (1994): A mutant stop codon (TAG) in the IDUA gene is used as an acceptor splice site in a patient with Hurler syndrome (MPS IH). *Hum Mutat.* 3(3): 333-6.
53. Tomi, D., Schultze-Mosgau, A., Eckhold, J., Schopper, B., Al-Hasani, S., Steglich, C., Gal, A., Axt-Fliedner, R., Schwinger, E., Diedrich, K., Griesinger, G. (2006): First pregnancy and life after preimplantation genetic diagnosis by polar body analysis for mucopolysaccharidosis type I. *Reprod Biomed Online.* 12(2): 215-20.
54. Venturi, N., Rovelli, A., Parini, R., Menni, F., Brambillasca, F., Bertagnolio, F., Uziel, G., Gatti, R., Filocamo, M., Donati, M.A., Biondi, A., Goldwurm, S. (2002): Molecular analysis of 30

mucopolysaccharidosis type I patients: evaluation of the mutational spectrum in Italian population and identification of 13 novel mutations. *Hum Mutat.* 20(3): 231.

55. Vogel F., Motulsky A.G. (1997): *Human Genetics: Problems and Approaches*. 3rd edition. Springer, New York.

56. Voskoboeva, E.Y., Krasnopolskaya, X.D., Mirenburg, T.V., Weber, B., Hopwood, J.J. (1998): Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: mutation analysis among the patients of the former Soviet Union. *Mol Genet Metab.* 65(2): 174-80.

57. Weber, B., Riess, O., Hutchinson, G., Collins, C., Lin, B.Y., Kowbel, D., Andrew, S., Schappert, K., Hayden, M.R. (1991): Genomic organization and complete sequence of the human gene encoding the beta-subunit of the cGMP phosphodiesterase and its localisation to 4p 16.3. *Nucleic Acids Res.* 19(22): 6263-8.

58. Wegrzyn, G., Wegrzyn, A., Tylki-Szymanska, A. (2004): A general model for genetic regulation of turnover of glycosaminoglycans suggests a possible procedure for prediction of severity and clinical progress of mucopolysaccharidoses. *Med Hypotheses.* 62(6): 986-92.

59. Wiedemann H.R., Kunze J. (1996): *Atlas klinických syndrómu pro kliniku a praxi*. Osveta, Martin.

60. Wraith J.E., Clarke L.A., Beck M., Kolodny E.H., Pastores G.M., Muenzer J., Rapoport D.M., Berger K.I., Swiedler S.J., Kakkis E.D., Braakman T., Chadbourne E., Walton-Bowen K., Cox G.F. (2004): Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *J Pediatr.* 144(5): 581-8.

61. Wraith J.E. (2005): The first 5 years of clinical experience with laronidase enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I. *Expert Opin Pharmacother.* 6(3): 489-506.

62. Yamagishi, A., Tomatsu, S., Fukuda, S., Uchiyama, A., Shimosawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., Sukegawa, K., Orii, T. (1996): Mucopolysaccharidosis type I: identification of common mutations that cause Hurler and Scheie syndromes in Japanese populations. *Hum Mutat.* 7(1): 23-9.

63. Young, E.P. (1992): Prenatal diagnosis of Hurler disease by analysis of alpha-iduronidase in chorionic villi. *J Inher Metab Dis.* 15(2): 224-30.

64. Zhao, K.W., Faull, K.F., Kakkis, E.D., Neufeld, E.F. (1997): Carbohydrate structures of recombinant human alpha-L-iduronidase secreted by Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 272(36): 22758-65.

Príloha k diplomovej práci

1. tabuľka výsledných meraní pri funkčnej štúdií a vzorec pre stanovenie špecifickej aktivity IDUA enzýmu
2. výstupy tejto štúdie na rôznych konferenciách, priložené abstrakty

Vzorka	čas	Y1	Y2	Y	Y-blank	10xredeni	Y-blk/std	nmol/ho d	nmol/hod/m	Protein v 5ul	Protein v 1ml	SA	Priemer
CHO 1	60	15,32	15,027	15,1735	3,1835	31,835	0,1144	0,1144	5,7216	5,959	1191,8	4,8	5,6
CHO 2	60	16,855	16,513	16,684	4,694	46,94	0,1687	0,1687	8,4364	7,119	1423,8	5,9	
CHO 3	60	17,08	16,241	16,6605	4,6705	46,705	0,1679	0,1679	8,3941	6,914	1382,8	6,1	
IRES 1	60	15,885	15,574	15,7295	3,7395	37,395	0,1344	0,1344	6,7209	6,144	1228,8	5,5	5,4
IRES 2	60	16,03	16,572	16,301	4,311	43,11	0,1550	0,1550	7,7480	7,422	1484,4	5,2	
IRES 3	60	16,655	16,252	16,4535	4,4635	44,635	0,1604	0,1604	8,0221	7,376	1475,2	5,4	
WT 1	60	551,28	561,611	556,4455	544,4555	5444,555	19,5707	19,5707	978,5325	5,636	1127,2	868,1	767,5
WT 2	60	692,087	749,177	720,632	708,642	7086,42	25,4724	25,4724	1273,6197	8,365	1673,0	761,3	
WT 3	60	617,761	527,76	572,7605	560,7705	5607,705	20,1571	20,1571	1007,8550	7,485	1497,0	673,2	
D315Y	60	15,628	14,422	15,025	3,035	30,35	0,1091	0,1091	5,4547	13,438	2687,6	2,0	3,0
D315Y	60	16,434	16,16	16,297	4,307	43,07	0,1548	0,1548	7,7408	14,687	2937,4	2,6	
D315Y	60	17,286	16,057	16,6715	4,6815	46,815	0,1683	0,1683	8,4139	9,827	1965,4	4,3	
V620F1	60	15,835	16,888	16,3615	3,3665	33,665	0,1201	0,1201	6,0056	4,109	821,8	7,3	8,0
V620F2	60	15,364	16,246	15,805	2,81	28,1	0,1003	0,1003	5,0128	2,286	457,2	11,0	
V620F3	60	15,214	13,922	14,568	1,573	15,73	0,0561	0,0561	2,8061	2,461	492,2	5,7	
W626X	60	16,759	14,883	15,821	3,831	38,31	0,1377	0,1377	6,8853	7,628	1525,6	4,5	4,8
W626X	60	15,276	15,469	15,3725	3,3825	33,825	0,1216	0,1216	6,0793	6,001	1200,2	5,1	
W626X	60	15,927	15,898	15,9125	3,9225	39,225	0,1410	0,1410	7,0498	7,345	1469,0	4,8	
W402X	60	14,584	14,098	14,341	2,351	23,51	0,0845	0,0845	4,2254	5,064	1012,8	4,2	6,1
W402X	60	15,533	16,671	16,102	4,112	41,12	0,1478	0,1478	7,3904	6,016	1203,2	6,1	
W402X	60	17,121	16,868	16,9945	5,0045	50,045	0,1799	0,1799	8,9944	5,67	1134,0	7,9	
del 10 1	60	22,745	19,794	21,2695	8,2745	82,745	0,2952	0,2952	14,7611	2,453	490,6	30,1	30,2
del 10 2	60	22,132	22,132	22,132	9,137	91,37	0,3260	0,3260	16,2998	2,685	537,0	30,4	
del 10 3	60	20,002	24,153	22,0775	9,0825	90,825	0,3241	0,3241	16,2025	2,586	517,2	31,3	

Ukážka výsledkov meraní proteinovej a IDUA assay.

Na výpočet špecifickej aktivity mutovaného proteínu sa môže odvodiť jednoduchý vzorec:

$$SA = X^{IDUA} \cdot 2500 / S^{IDUA} \cdot Y^{prot}$$

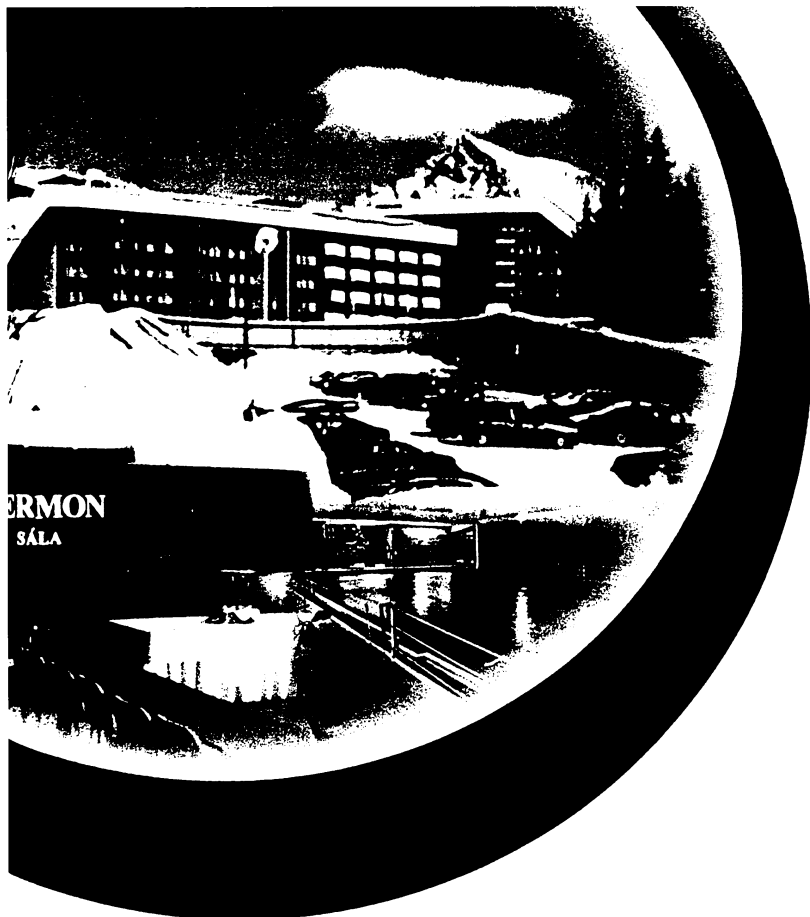
SA je špecifická aktivita mutovaného proteínu (nmol odbúraného substrátu / hod / mg proteínu)

X^{IDUA} je priemer nameraných hodnôt fluorescence mutovaného IDUA proteínu

S^{IDUA} je priemer nameraných hodnôt fluorescence štandardov

Y^{prot} je priemer nameraných absorbancií celkových bunecných proteínov

2500 zahŕňa prepočty jednotlivých riedení.



PROGRAM

19. pracovné dni

DEDIČNÉ METABOLICKÉ PORUCHY

26. - 28. 5. 2004

HOTEL PERMON ****

PODBANSKÉ, VYSOKÉ TATRY

FAKULTNÁ NEMOCNICA KOŠICE
NÁ NEMOCNICA S POLIKLINIKOU KOŠICE
ÁLNA LEKÁRSKA KOMORA KOŠICE
IONÁLNA LEKÁRSKA KOMORA KOŠICE

NUTRICIA
SHS **milupa**
INTERNATIONAL NAŠE ZNALOSTI A VAŠE PÉČE

Mucopolysaccharidosis type I: mutation analysis and polymorphisms in the *IDUA* gene in Czech and Slovak population

Vážna A.¹, Berná L.², Stolnaja L.², Poupětová H.², Tietzeová E.², Hřebíček M.², Hrubá E.², Zeman J.³, Dvořáková L.²

¹Faculty of Science, Charles University, Prague

²Institute of Inherited Metabolic Diseases, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague

³Department of Pediatrics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I; McKusick 25280; Hurler syndrome, Hurler-Scheie syndrome and Scheie syndrome) is a lysosomal storage disorder caused by a deficiency of the lysosomal hydrolase, alpha-L-iduronidase (EC 3.2.1.76), which is involved in the breakdown of dermatan and heparan sulphates. There is a broad spectrum of clinical phenotypes ranging from the severe (Hurler) characterised by mental retardation, skeletal deformities, hepatosplenomegaly, coarse facial features and corneal clouding to mild phenotype (Scheie) characterised by only mild skeletal changes, corneal clouding and preserved intelligence.

Until now more than 75 deleterious mutations and 30 polymorphisms, seven of them changing the amino acid residue, were identified in the *IDUA* gene (1) (2).

Nineteen Czech and Slovak MPS I patients have been diagnosed in our Institute. The diagnosis was confirmed biochemically by the demonstration of α -iduronidase deficiency in leucocytes. We performed mutation analysis of the *IDUA* gene in two patients and two obligatory heterozygotes by direct sequencing of PCR products. So far, we have identified 3 different mutant alleles and one novel polymorphism.

One patient with mild Scheie phenotype has a prevalent nonsense mutation W402X. The second mutation identified in this patient is a deletion of ten nucleotides in exon 14 (the last exon of the gene). The deletion GGAGGTCCCT results in a frameshift commencing at the 640th amino acid residue (E640fs). Analysis of this patient's gene revealed also one novel polymorphism c.1589C>T (L530L) in heterozygosity and one previously described polymorphism Q33H, which is present on both alleles.

In the second patient with intermediate phenotype we found another prevalent mutation, Q70X. This mutation was not detected in DNA isolated from leukocytes of her mother. The mutant allele, which the proband inherited from her mother, remains to be elucidated.

The third patient underwent bone marrow transplantation in the 10th month of her life. The phenotype was not apparent at that age. This patient inherited the nonsense mutation W402X from her mother. Unfortunately, we have no samples from the patient's father.

Molecular diagnosis of MPS I is important for analysis of genotype-phenotype correlation and for selection of patients for innovative therapies. It is also a helpful tool for carrier identification and for prenatal diagnosis in affected families.

References:

1. E. F. Neufeld, J. Muenzer, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases* C. R. Scriver, e. al., Eds. (Mc Graw Hill, Inc., 2001) pp. 3421-3452.
2. H. S. Scott *et al.*, *Hum Mutat* 6, 288-302 (1995).

Supported by grant projects GA UK 25/03 and MSM-111100003 of the Ministry of Education and Youth of the Czech Republic.

**8. Celostátní konference
DNA diagnostiky
s mezinárodní účastí**

Sborník příspěvků



Brno, 8. - 9. prosince 2004

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA U PACIENTŮ S MUKOPOLYSACHARIDOSOU TYPU I

Vážna Alžbeta

Přírodovědecká fakulta, UK, Praha a UDMP, Praha

b.vazna@orangemail.sk

Mukopolysacharidosa typ I je střádavé onemocnění způsobené deficitem lysosomální hydro-lasy, -L-iduronidasy (IDUA, EC 3.2.1.76). Závažnost příznaků tohoto onemocnění souvi-sí se zbytkovou aktivitou enzymu IDUA. Volba léčby MPS I závisí na tíži onemocnění - u pacientů s mírnější formou onemocnění (MPS I/S) je indikována enzymová suplementační terapie, zatím-co vhodným terapeutickým přístupem pro těžkou formu onemocnění s postižením CNS (MPS I/H) je transplantace kostní dřeně. Pouze rychlá a správná predikce fenotypu postiženého dítěte v počátečních fázích onemocnění, kdy nelze typ onemocnění odhadnout z klinických příznaků, umožňuje volbu optimální léčby. Cílem naší studie je proto přispět k poznání, zda a do jaké míry lze z genotypu predikovat fenotyp a v jaké míře se s genotypem asociují intragenní polymorfismy. Ze 17 rodin s celkovým počtem 17 probandů a 21 příbuzných se nám podařilo najít alespoň jednu mutaci u sedmi pacientů. Jedná se o známé prevalentní mutace Q70X a W402X a jednu novou mutaci, c.1917-1926del. U pacientů jsme identifikovali šest dříve publikovaných polymorfismů (A8, A20, Q33H, A314, A361T a L118). Analýzu polymorfismů Q33H, A8 a L118 jsme dokončili u všech probandů, rodinných příslušníků a stovky kontrolních alel. Určení haplotypů u pacientů bude záviset na výsledcích analýzy dalších mutací a všech šesti polymorfismů. V příspěvku jsou diskutovány první výsledky týkající se analýzy mutací u českých a slovenských pacientů a identifi-kace polymorfismů v genech pacientů i zdravých jedinců.

GAUK 154/2004/C/PrF.

Finální program

**20. pracovní dny DĚDIČNÉ
METABOLICKÉ
PORUCHY**

18. – 20. května 2005
Hotel MY, Lednice na Moravě



**KLINICKÁ NEMOCNICE BRNO, 1. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA
CENTRUM MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A GENOVÉ TERAPIE IHOK**

AKCE JE POŘÁDÁNA POD ZÁŠTITOU

Všeobecné zdravotní pojišťovny
Masarykovy univerzity Brno
České lékařské společnosti J. E. Purkyně
ČLK Brno-město



VLÁDNÍ SPONZOŘI

NUTRICIA

milupa
NAŠE ZNALOSTI A VAŠE PÉČE

SHS
INTERNATIONAL

I/15 MUTATION ANALYSIS OF THE *IDUA* GENE IN CZECH AND SLOVAK PATIENTS WITH MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I

L. Dvořáková¹, A. Vážná², L. Berná¹, L. Stolnaja¹, M. Boučková¹, L. Mrázová¹, J. Zeman³, H. Poupětová¹, M. Hřebíček¹

¹Institute of Inherited Metabolic Diseases, 1st Faculty of Medicine, ²Faculty of Science, ³Department of Pediatrics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

During the last 25 years the diagnosis of mucopolysaccharidosis (MPS) was proved enzymatically in 89 patients from Czech and Slovak populations (15 mil.), including 18 mucopolysaccharidosis type I (MPS I) patients. Fourteen of the patients had the severe form of the disease (Hurler syndrome), two had the mild form (Scheie syndrome) and two had intermediate Hurler/Scheie phenotype.

All forms of MPS I are caused by the deficiency of a lysosomal hydrolase, α -L-iduronidase (*IDUA*, EC 3.2.1.76). The disease is inherited in an autosomal recessive manner. We have analyzed the entire *IDUA* gene coding region sequence, exon-intron boundaries and a part of 5' and 3' UTR in 15 unrelated Czech and Slovak MPS I patients.

Up to now we have identified 20 mutated alleles: W402X (10/20), Q70X (7/20), c.1614delG (1/20), R628X (1/20) and c.1917-1926del (1/20). Among our Hurler patients the most severe phenotypical manifestation was associated with homozygosity for Q70X, two other patients who manifested very serious clinical symptoms were homozygous for W402X. Patients with less severe manifestation of Hurler syndrome were heterozygous for W402X, Q70X or c.1614delG and another not yet identified mutation. Among our patients no compound heterozygote for Q70X and W402X has been identified. Two patients with Scheie syndrome were compound heterozygotes for one of the prevalent mutations combined with a mutation in exon 14 (W402X/c.1917-1926del and Q70X/R628X).

We screened fourteen our patients for six known polymorphisms (A8, A20, Q33H, L118, A314 and A361T). Polymorphisms A8 and A20 were identified in only 4 out of 28 patients' alleles, while Q33H seemed to be very frequent (14/28). The L118 polymorphism was observed in 5 out of 28 patient alleles which is by 8% lower frequency than that observed in 200 control alleles. The difference can be explained by the observation, that L118 does not seem to be associated with the prevalent mutant allele W402X. The A314 and A361T have not been identified in any of the twelve patients examined up to now. The presented preliminary data do not allow to suggest any involvement of polymorphisms in phenotypic variation.

This work was supported by grants GA UK 154/2004/C/PrF and partially by VZ MSM CR 0020620806 and IGA-MZ 1A/8239-3.



European Journal of Human Genetics

The Official Journal of the European Society of Human Genetics

EUROPEAN HUMAN GENETICS CONFERENCE 2005

MAY 7 - 10, 2005, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

PROGRAMME AND ABSTRACTS

nature publishing group



have been identified to date in MFS with prominent cardiovascular phenotype (Mizuguchi T, et al, 2004).

The TGFBR2 encodes the human transforming growth factor beta type II receptor (70/80 kDa). It belongs to the serine-threonine kinase family of cell surface receptors, which regulate many cellular processes including proliferation, cell cycle arrest, apoptosis, differentiation and formation of extracellular matrix.

We identified two novel heterozygous mutations (M425V, P525R) in two unrelated patients with MFS, who were proven not to be carriers of FBN1 gene mutations.

The M425V mutation was identified in a 27-year-old male patient whose father died suddenly at the age of 40 of an unknown cardiovascular cause. He had major cardiovascular (aortic dilatation) and skeletal signs plus a minor cardiac and ocular signs. The P525R was identified in 17-year-old girl. Her phenotype was characterised by aortic dilatation (she recently underwent preventive cardiac surgery), major skeletal signs, retinal degeneration.

Both mutations were absent in 50 healthy controls. We confirm TGFBR2 gene as associated with MFS with major cardiovascular involvement

P0930. Mucopolysaccharidosis type I: Molecular studies of IDUA gene in Czech and Slovak populations

L. Dvorakova, A. Vazna, L. Berna, L. Stolnaja, M. Bouckova, J. Zeman, H. Poupetova, M. Hrebicek;

Inst. Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine and General Faculty Hospital, Praha 2, Czech Republic.

During the last 25 years the diagnosis of mucopolysaccharidosis (MPS) was proved enzymatically in 89 patients from Czech and Slovak populations (15 mil.), including 18 mucopolysaccharidosis type I (MPS I) patients. Fourteen of the patients had the severe form of the disease (Hurler syndrome), two had the mild form (Scheie syndrome) and two had intermediate Hurler/Scheie phenotype.

All forms of MPS I are caused by the deficiency of a lysosomal hydrolase, alpha-L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76). The disease is inherited in autosomal recessive manner. We have analyzed the entire IDUA gene coding region sequence, exon-intron boundaries and a part of 5' and 3' UTR in 15 Czech and Slovak MPS I patients. Up to now we identified 19 mutated alleles: W402X (9/19), Q70X (7/19), c.1614delG (1/19), R628X (1/19) and c.1917-1926del (1/19). Two patients with severe phenotype were homozygous for the prevalent mutations, W402X and Q70X, respectively. Two patients with Scheie syndrome were compound heterozygotes for one of the prevalent mutations combined with a mutation in exon 14 (W402X/c.1917-1926del and Q70X/R628X).

We observed six known polymorphisms (A8, A20, Q33H, L118, A314, A361T). The Q33H, A8 and L118 were polymorphic in approximately 1/3 of the patient as well as control alleles. Preliminary results of haplotype analysis based on polymorphisms A8, A20 and Q33H showed that the alleles containing the mutation Q70X shared the same haplotype, suggesting a founder effect and a common ancestral origin.

This work was supported by grants GA UK 154/2004/C/PrF and partially by VZ MSM CR 0021620806 and IGA-MZ 1A/8239-3.

P0931. Deletion scanning of the CFTR gene using multiplex ligation-dependent probe amplification

T. Dörk¹, D. Gläser², C. Aulehla-Scholz³, A. Nygrén⁴, J. Schoutert⁵;

¹Medical School, Hannover, Germany, ²Gregor Mendel Laboratories, Neu-Ulm, Germany, ³Institute for Clinical Genetics, Stuttgart, Germany, ⁴MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands.

Large genomic deletions in the CFTR gene (also called ABCC7) may account for several unidentified mutant alleles in cystic fibrosis and other CFTR-related disorders. We have employed multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) to screen for the presence of genomic CFTR deletions in 24 patients who had cystic fibrosis or obstructive azoospermia with only one mutation identified after sequencing of the whole coding region. In control samples, four out of five known genomic deletions were readily detected by MLPA. The mutation 134del120ins300 (also called CFTRdele1) was missed by this method because the probe is located upstream of the deleted exon. Our subsequent MLPA screening uncovered a new deletion, CFTRdele17(2.5kb), that had previously escaped detection by routine sequencing. Examination of the breakpoints showed that a highly

polymorphic dinucleotide repeat at the IVS17b(TA)_n locus is implicated in the generation of this deletion, which leads to the loss of the exons 17a and 17b in two unrelated German cystic fibrosis patients in the heterozygous state. We conclude that MLPA is a sensitive and robust method for the rapid deletion scanning of the CFTR gene in cystic fibrosis samples with hitherto incomplete mutation detection.

P0932. Mutations in the DYSF gene: the importance of analysing DNA and RNA

A. Freixas¹, E. Gallardo¹, C. Márquez², L. Allas¹, N. de Luna¹, E. del Río¹, M. Calaf¹, I. Ila¹, M. Baiget¹, P. Gallano¹;

¹Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain, ²Hospital Valme, Sevilla, Spain.

Mutations in the dysferlin gene (DYSF) cause different muscular dystrophy phenotypes including Limb Girdle Muscular Dystrophy 2B, Miyoshi Myopathy and Distal Anterior Compartment Myopathy. These disorders are characterized by autosomal recessive inheritance, adult onset and elevated levels of serum CK. The DYSF gene maps to chromosome 2p13, has 55 exons and encodes a protein of about 237 kDa that is located in the sarcolemma.

We have studied 32 patients from 20 families clinically diagnosed as MM, LGMD2B and DAT through: 1) analysis of dysferlin expression by immunohistochemistry in muscle biopsies and by Western blotting in CD14⁺ peripheral blood monocytes and, 2) screening for mutations in the DYSF gene by sequencing cDNA from monocytes, amplifying 14 fragments that cover the 55 exons. Finally, genomic DNA was studied to check mutations found in monocyte RNA.

Seventeen different mutations were identified: 7 missense, 6 frameshift and 4 nonsense. One of the mutations consist in a G>A transition at position 1924 of the genomic DNA, causing a G519R change in the polypeptide chain. RNA analysis revealed that this apparent missense mutation causes a deletion of 34 nucleotides in exon 18 causing a frameshift that produces a stop codon in exon 19. The deletion was probably induced by the activation of a cryptic splice site.

We consider that when considering a new mutation it is necessary to perform the analysis of both genomic DNA and RNA, including the analysis of normal controls to prove the pathogenicity of the mutation.

P0933. The use of real time PCR for detection of proteolipid protein-1 gene (PLP1) copy number in Pelizaeus-Merzbacher patients.

E. Milkesova, I. Sakmaryova, L. Barankova, P. Seeman;

Charles University, 2nd School of Medicine, Prague, Czech Republic.

Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) is an X-linked recessive disorder of CNS myelination. More frequent classic form presents shortly after birth by nystagmus, psychomotor delay and hypotonia and later by spasticity and cerebellar ataxia. Rarer congenital type of PMD shows rapid progression and is fatal in infancy.

PMD is caused most frequently by duplication of the PLP1 gene located on Xq22, less frequently by PLP1 point mutations and very rarely by PLP1 deletion. Carrier women show usually no clinical signs.

Our aim was to distinguish samples with 1, 2 and 3 PLP1 copies using real time PCR and to define non-overlapping diagnostic ranges of $\Delta\Delta Ct$ values for these groups. We tested 40 gDNA samples which were previously analyzed by microsatellite markers analysis: healthy men (n=10) (1 PLP1 copy), PMD patients (n=9) (2 PLP1 copies), control group of healthy women (n=7) (2 PLP1 copies), carrier women (n=14) (3 PLP1 copies). Samples were run on ABI 7900 in multiplex reaction using primers and TaqMan probes for exon 3 of PLP1 and exon 12 of albumin gene, which was used as endogenous control. Results were processed using the relative quantitative comparative threshold cycle method ($\Delta\Delta Ct$).

The ranges of $\Delta\Delta Ct$ values are: < 1,3 for healthy men, 1,7 - 2,3 for PMD patients and healthy women, > 2,5 for carrier women.

Non overlapping ranges of $\Delta\Delta Ct$ values were detected for selected groups. Real time PCR can be employed in PMD testing.

Supported by the Grant Agency of Charles University (GAUK).

European
Study
Group
on
Mitochondrial
Diseases

15th ESGLD Workshop

September 15-18, 2005

SORIA MORIA CONFERENCE CENTRE, HOLMENKOLLEN
OSLO, NORWAY



P 15 Mucopolysaccharidosis type I –Molecular analysis of IDUA gene in Czech and Slovak patients

L. Berná¹, L. Dvořáková¹, A. Vážna², L. Stolnaja¹, M. Boučková¹, L. Mrázová¹, J. Zeman³, H. Poupětová¹, M. Hřebíček¹, C. Beesley⁴ and B. Winchester⁴

¹*Institute of Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine,* ²*Faculty of Science,* ³*Department of Pediatrics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic,* ⁴*Biochemical, Endocrinology and Metabolism Unit (BEM), The Institute of Child Health, (UCL) London, UK*

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I, Hurler syndrome, Hurler-Scheie syndrome and Scheie syndrome) is a rare lysosomal storage disorder caused by the deficiency of a lysosomal hydrolase, α -L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76). The disease is inherited as an autosomal recessive trait.

During the last 25 years the diagnosis of MPS I was proved enzymatically in 18 patients from Czech and Slovak populations (15 mil.). Fourteen of the patients had the severe form of the disease (Hurler syndrome), two had the less severe form (Scheie syndrome) and two had intermediate Hurler/Scheie phenotype.

We have analyzed the entire *IDUA* gene coding region sequence, exon-intron boundaries and a part of 5' and 3' UTR in 16 unrelated Czech and Slovak MPS I patients. Up to now we have identified 30 mutated alleles carrying eleven different mutations including two prevalent mutations W402X (10/30) and Q70X (7/30), 5 recurrent mutations (IVS11+5g>a (2/30), Y167X (1/30), D315Y (1/30), A327P (1/30), R628X (1/30)) and 4 novel mutations (c.1614delG (1/30), c.1917-1926del (2/30), W626X (1/30) and V620F (3/30)). Among our Hurler patients the most severe phenotypical manifestation was associated with homozygosity for Q70X, two other patients who manifested very serious clinical symptoms were homozygous for W402X. Two patients with Scheie syndrome were compound heterozygotes for one of the prevalent mutations combined with a mutation in exon 14 (W402X/c.1917-1926del and Q70X/R628X). One of the H/S patient is a heterozygote for the prevalent mutation W402X and a novel mutation c.1917-1926del.

Since multiple SNP alleles coexist with the disease-causing mutations, the patients have also been screened for six known polymorphisms (A8, A20, Q33H, L118, A314 and A361T). We determined allelic and haplotype frequencies of four polymorphisms (A8, A20, Q33H, L118) both in the patients and controls. The prevalent haplotype in the patient alleles (C-G-G-C) seems to be associated, but not restricted to the W402X allele. Q70X is associated with at least two haplotypes differing in L118 marker (C-G-T-C and C-G-T-T). Up to now A361T, which is suggested to contribute to phenotypic variation, was not found in our patients *IDUA* gene. The presented data do not allow to suggest any involvement of polymorphisms in phenotypic variation.

This work was supported by grants GA UK 154/2004/C/PrF and partially by VZ MSM CR 0020620806 and IGA-MZ 1A/8239-3.