Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka

Bc. Kateřina Průšová

Molekulárně genetická analýza pacientů s Usherovým syndromem
Molecular genetic analysis of patients with Usher syndrome

Diplomová práce

Školitelka: Ing. Ľubica Ďuďáková, Ph.D.
Konzultantka: doc. MUDr. Petra Lišková, MD, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného, nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.08.2020

……..……

Bc. Kateřina Průšová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce Ing. Ľubici Ďuďákové, Ph.D. a konzultantce doc. MUDr. Petře Liškové, M.D., Ph.D. za odborné vedení mé práce. Za jejich cenné rady a podnětné připomínky, za jejich čas, který obě věnovaly korekci a vedení mé práce. V neposlední řadě bych jim chtěla poděkovat za jejich trpělivost a za možnost vypracování práce v Laboratoři pro studium vzácných nemocí na Klinice pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN v Praze.

Také bych velmi ráda poděkovala celému kolektivu z Laboratoře pro studium vzácných nemocí, a to především kolegům ze skupiny oční genetiky, kteří mi byli vždy ochotni poradit a pomoci.

Práce byla vypracována s grantovou podporou UNCE 204011, EJPRD2019-234 projekt Solve-RET a PROGRES Q26.

Abstrakt

Práce je zaměřena na molekulárně genetické testování pacientů s Usherovým syndromem - na potvrzení správné diagnózy, určení kauzální příčiny vzniku onemocnění a popis nových mutací způsobující Usherův syndrom u českých pacientů. Usherův syndrom je klinicky a geneticky heterogenní onemocnění, které je nejčastější příčinou dědičné hluchoslepoty. Je klasifikováno do tří klinických subtypů. Vzhledem k tomu, že v současné době neexistuje žádná specifická léčba, je potřeba pochopit patofyziologii tohoto onemocnění a rozšířit spektrum kauzálních mutací.

Teoretická část práce se věnuje anatomii oka, a to především stavbě sítnice. Pozornost je rovněž věnována onemocněním sítnice, jako je progresivní ztrátou zraku charakteristická *Retinitis pigmentosa* (RP). RP se může vyskytovat buď jako izolovaná porucha nebo také spolu s dalšími poškozeními jako tzv. syndromová RP. Mezi klasické syndromové RP patří Usherův syndrom, jímž se práce zabývá. V teoretické části se práce věnuje především mechanismu vzniku onemocnění, funkcím jednotlivých usherovských proteinů a genům, které tyto proteiny kódují. Rovněž jsou uvedeny nejčastější mutace způsobující Usherův syndrom v Evropě a výsledky haplotypových analýz, které byly u těchto frekventovaných mutací provedeny. Na základě jejich výsledků byl již dříve potvrzen efekt zakladatele.

V praktické části pak byla provedena testování usherovských genů a haplotypová analýza. Pomocí molekulárně genetického testování 20 českých probandů přímým, celoexomovým či celogenomovým sekvenováním, byly nalezeny nové mutace pravděpodobně způsobující Usherův syndrom. Jedná se o mutace v genu *USH2A*: c.1651C>T; p.(Arg551Cys), c.485+1G>A; p.?, c.5414_5416delTTA; p.(Ile1805del) a v genu *PCDH15*: c.2305G>A; p.(Gly769Arg). Dále byly zmapovány delece v genu *USH2A* o rozsahu 167 569 bp a v genu *ADGRV1* o rozsahu 10 641 bp. Také byly nalezeny vzácné intronové varianty v genu *USH2A*, pro potvrzení jejichž patogenity bude třeba provést další vyšetření a funkční studie.

Kromě molekulárně genetického vyšetření 20 českých probandů s USH, byla u 9 pacientů s mutací *USH2A*: c.11864G>A; p.(Trp3955*) provedena haplotypová analýza, která potvrdila vliv efektu zakladatele. U těchto pacientů byla vymezena sdílená oblast na chromozomu 1 o rozsahu 83 743 bp.

Podrobná molekulárně genetická testování pacientů s Usherovým syndromem mohou rozšířit spektrum známých mutací způsobující onemocnění a mohou přispět k pochopení mechanismu vzniku onemocnění.

Klíčová slova

Sítnice; Usherův syndrom; Retinitis pigmentosa; kongenitální hluchota, molekulárně genetická analýza, Sangerovo sekvenování, sekvenování nové generace, mutace, haplotypová analýza, haplotyp, efekt zakladatele

Abstract

The work focuses on molecular genetic testing of patients with Usher syndrome to confirm the diagnosis, to determine the causal cause of the disease and describe new mutations causing Usher syndrome in Czech patients. Usher syndrome is a clinically and genetically heterogeneous disease that is the most common cause of hereditary deafblindness. Based on responsible genes and disease onset is classified into three clinical subtypes. Given the fact that there is currently no specific treatment, there is a need to understand the pathophysiology of this disease and to broaden the spectrum of causal mutations.

The theoretical part of the thesis deals with the anatomy of the eye, especially the structure of the retina. Attention is also paid to retinal diseases, such as the progressive loss of vision characteristic for retinitis pigmentosa (RP). RP may occur either as an isolated disorder or also affecting other organs, so-called syndromic RP. Classic syndromic RP includes Usher's syndrome, which the work mainly deals with. The theoretical part of the thesis describes mainly the mechanism of the disease, the functions of individual Usher proteins and the genes that encode these proteins. The haplotype analysis has been previously done for the most common mutations causing Usher's syndrome in Europe Based on their results, the founder effect was confirmed.

In the practical part, Usher gene testing and haplotype analysis were performed. Using molecular genetic testing of 20 Czech probands by direct, whole exome or whole genome sequencing, new mutations likely causing Usher syndrome were found. These are mutations in *USH2A*: c.1651C>T; p.(Arg551Cys), c.485+1G>A; p.?, c.5414_5416delTTA; p.(Ile1805del) and *PCDH15:* c.2305G>A; p.(Gly769Arg). Furthermore, 167,569 bp deletion in the *USH2A* gene and 10,742 bp in *ADGRV1* were also mapped. Rare intronic variants have also been found in the *USH2A* gene, however further investigation and functional studies is needed to confirm their pathogenicity.

In addition to molecular genetic testing, the haplotype analysis was performed on 9 patients with *USH2A* mutation c.11864G>A; p.(Trp3955*), which confirmed the founder effect. In these patients, a shared area on chromosome 1 of 83,743 bp was defined.

Detailed molecular genetic testing of patients with Usher syndrome can broaden the spectrum of known disease-causing mutations and can contribute to understanding the mechanism of the disease development.

Keywords

Retina; Usher syndrome; *Retinitis pigmentosa*; congenital deafness, molecular-genetics analysis, Sanger sequencing, next-generation sequencing, mutation, haplotype analysis, haplotype, founder effect

Obsah

1 Úvod 10

1.1 Anatomie oka se zaměřením na retinu 10

1.1.1 Retina (sítnice) 11

1.1.2 Zraková dráha 14

1.2 Onemocnění sítnice 15

1.2.1 Retinitis pigmentosa 15

1.2.2 Nesyndromová RP 15

1.2.3 Syndromová RP 15

1.2.4 Metabolická onemocnění sítnice 16

1.3 Usherův syndrom 17

1.3.1 Mechanismus vzniku onemocnění 18

1.3.2 Prevalentní mutace USH v Evropě 21

1.3.3 USH2 haplotypy 24

2 Cíl práce 25

3 Materiál a metody 26

3.1 Materiál 26

3.2 Izolace DNA z krve 26

3.3 Izolace DNA ze slin 27

3.4 Návrh primerů 29

3.5 Polymerázová řetězová reakce 29

3.6 Elektroforéza amplikonů 30

3.7 Sangerovo sekvenování 31

3.8 Analýza sekvencí 31

3.9 Celoexomové sekvenování (Whole Exome Sequencing – WES) 32

3.10 Celogenomové sekvenování (Whole Genome Sequencing – WGS) 32

3.11 Hodnocení nalezených variant 33

3.11.1 Hodnocení nalezených variant pomocí literatury 33

3.11.2 Hodnocení nalezených variant pomocí databází 33

3.11.3 Hodnocení variant pomocí predikčních programů 33

3.11.4 Klasifikace nalezených variant na základě segregační analýzy 34

3.12 Mapování delece po WGS 34

3.13 Tvorba rodokmenů 35

3.14 Haplotypová analýza 35

4 Výsledky 37
4.1 Molekulárně genetická analýza 38
4.1.1 Testování nejčastější mutace 38
4.1.2 Molekulárně genetická analýza probanda A 39
4.1.3 Molekulárně genetická analýza probandky B 41
4.1.4 Molekulárně genetická analýza probandky C 42
4.1.5 Molekulárně genetická analýza probandky D 43
4.1.6 Molekulárně genetická analýza probandky E 46
4.1.7 Molekulárně genetická analýza probandky F 48
4.1.8 Molekulárně genetická analýza probandky G 49
4.1.9 Molekulárně genetická analýza probandky H 52
4.1.10 Molekulárně genetická analýza probandky CH 54
4.1.11 Molekulárně genetická analýza probandky I 56
4.1.12 Molekulárně genetická analýza probandky J 59
4.1.13 Molekulárně genetická analýza probandky K 61
4.1.14 Molekulárně genetická analýza probandky L 61
4.2 Souhrn výsledků molekulárně genetické analýzy 63
4.3 Haplotypová analýza 65
5 Diskuze 68
6 Závěr 74
7 Seznam zkratek 75
8 Webové zdroje 77
9 Seznam použité literatury 78
10 Přílohy 85
10.1 Informovaný souhlas pacientů 85
10.2 Primery použité pro Sangerovo sekvenování 87
10.3 Výřezy sekvencí SNP testovaných při haplotypové analýze 90

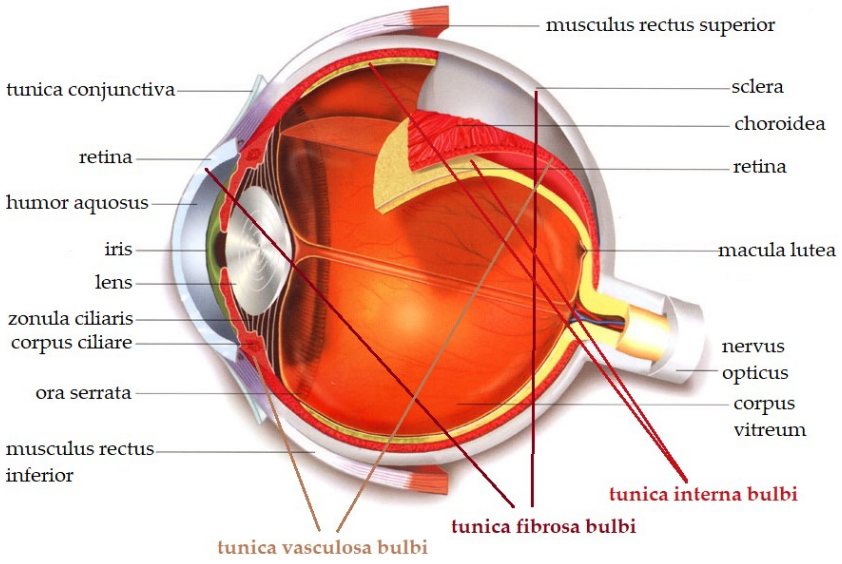
1 Úvod

1.1 Anatomie oka se zaměřením na retinu

Bulbus oculi je oční koule, která spolu s přídatnými orgány oka zajišťuje zrak. Je uložena v orbitě a obklopena tukovým polštářem. Přijímá zrakové podněty a převádí je na nervové vzruchy. Je složená ze dvou do sebe vsazených polokoulí. Přední část představuje průhledná *retina* (sítnice) s menším poloměrem a větším zakřivením. Větší zadní úsek oční koule tvoří neprůhledná bílá *sclera* (bělima). Obě části spolu tvoří vnější vazivovou část oka zvanou *tunica fibrosa bulbi* (Hudák et al., 2017).

Druhá vrstva oka se nazývá *tunica vasculosa bulbi*. Jedná se o bohatě cévně zásobenou vrstvu oka, jejíž převážnou část představuje *choroidea* (cévnatka). Vpředu přechází *v corpus ciliare*, neboli řasnaté těleso, na jehož vnitřním okraji je zavěšena *lens* (čočka). Před čočkou se nachází *iris* (duhovka) patřící také k cévnaté střední vrstvě. Jedná se o individuálně zabarvenou vrstvu, jejíž zabarvení je určeno melanocyty a množstvím v nich obsaženého melaninu. Její vnitřní okraj *margo pupillaris* obkružuje *pupilu* (zornici) (Hudák et al., 2017).

Tunica interna bulbi je vnitřní nervová vrstva (viz. Obrázek 1). Tvoří ji jemná průhledná *retina* (sítnice). Retinu kromě vnitřní vrstvy světločivných buněk (primární smyslové buňky) a vnější vrstvy pigmentového epitelu tvoří další nervové buňky spolu s nervovými vlákny. V této části dochází k přeměně elektromagnetické energie (světla) na nervové vzruchy (Hudák et al., 2017).



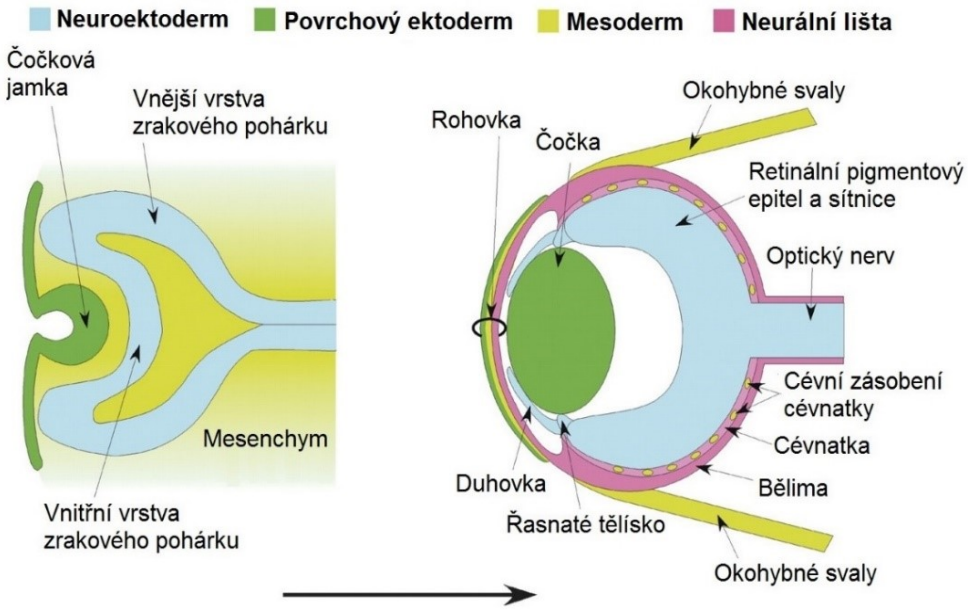
Obrázek 1: *Vrstvy oka. Upraveno podle (Šafariková, 2012).*

Funkce oka je také závislá na přídatných ústrojích oka. K přídatným ústrojím oka patří: *palpebrae* (víčka), *supercilium* (obočí), *apparatus ligamentosus* (vazivové ústrojí), *tunica conjunctiva* (spojivka*), apparatus lacrimalis* (slzné ústrojí), *apparatus muscularis* (svalové ústrojí), cévy a nervy (Hudák et al., 2017).

K příkladu *musculi bulbi* (okohybné svaly) zajišťují pohyb oční koule, *conjunctiva* (spojivka) umožňuje hladké pohyby víček. Slzní aparát obsahující slzní žlázu, která produkuje slzy, je významnou součástí imunitní obrany oka. Slzy jsou pomocí pohybu víček roztírány po rohovce a také po spojivce, čímž je zabráněno vysychání oka. Rovněž je zajištěno zásobení rohovky a také odstraňování škodlivých látek (Hudák et al., 2017).

1.1.1 Retina (sítnice)

Základ retiny vzniká během vývoje jako výchlipka *diencephala*. Párové váčky přichází do kontaktu s ektodermem, jejich společným prohnutím vzniká dvouvrstevný oční pohárek (viz. Obrázek 2). Z první vnější vrstvy vzniká pigmentový epitel retiny a vnitřní vrstva dává vzniknout nervovým buňkám (Čihák et al., 2004a).

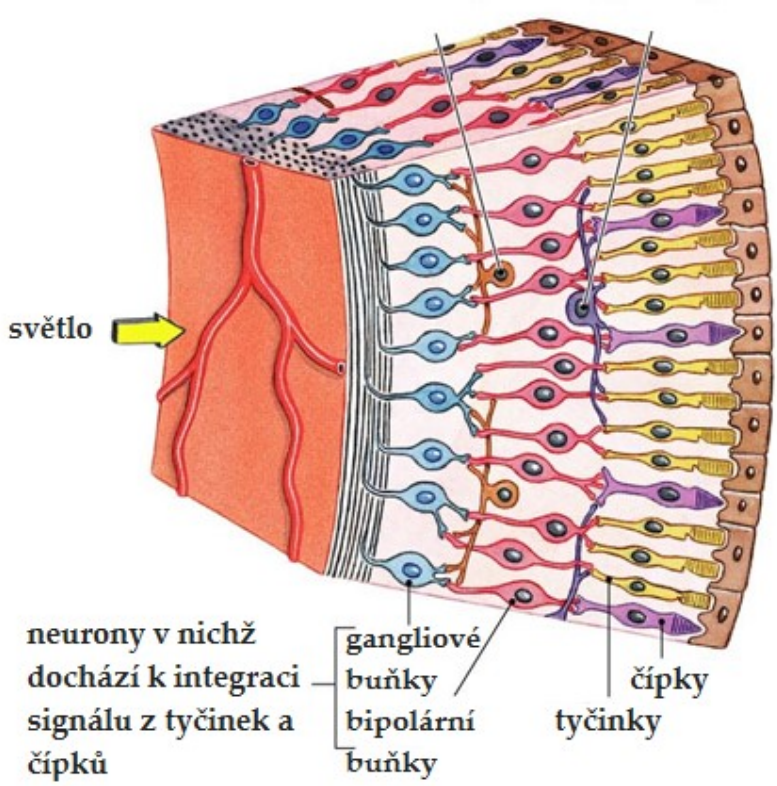


Obrázek 2: *Schéma zachycující vývoj jednotlivých vrstev oka podle (Harada et al., 2007).*

Sítnice se topograficky dělí na dvě části – *pars optica retinae* (optická část sítnice) a *pars caeca retinae. Pars optica retinae* pokrývá vnitřní stranu oční koule. Je tvořena pigmentovým epitelem a nervovou vrstvou sítnice. Při zadním okraji řasnatého tělesa přechází pigmentový epitel retiny (retinal pigment epithelium - RPE) v *pars caeca retinae*, která pokračuje na zadní plochu *corpus ciliare* a *iris* (Čihák et al., 2004a).

Ve vlastní nervové vrstvě retiny jsou světločivné buňky a další nervové elementy uspořádané v 11 vrstvách. Vnitřní vrstvu sítnice tvoří světločivné buňky, jedná se o první neurony zrakové dráhy. Další vrstvu tvoří bipolární buňky, sekundární nervové buňky, které převádí nervové vzruchy ze světločivných elementů na gangliové buňky tvořící vnitřní vrstvu sítnice. Četná synaptická spojení mezi nervovými buňkami uvedených vrstev vytváří jedenáctivrstevnou stavbu sítnice (Čihák et al., 2004a).

Kubický pigmentový epitel, nejzevnější část sítnice, vytváří výběžky mezi světločivné buňky - tyčinky a čípky. Jeho hlavní funkcí je výživa těchto elementů (Obrázek 3) (Čihák et al., 2004a).



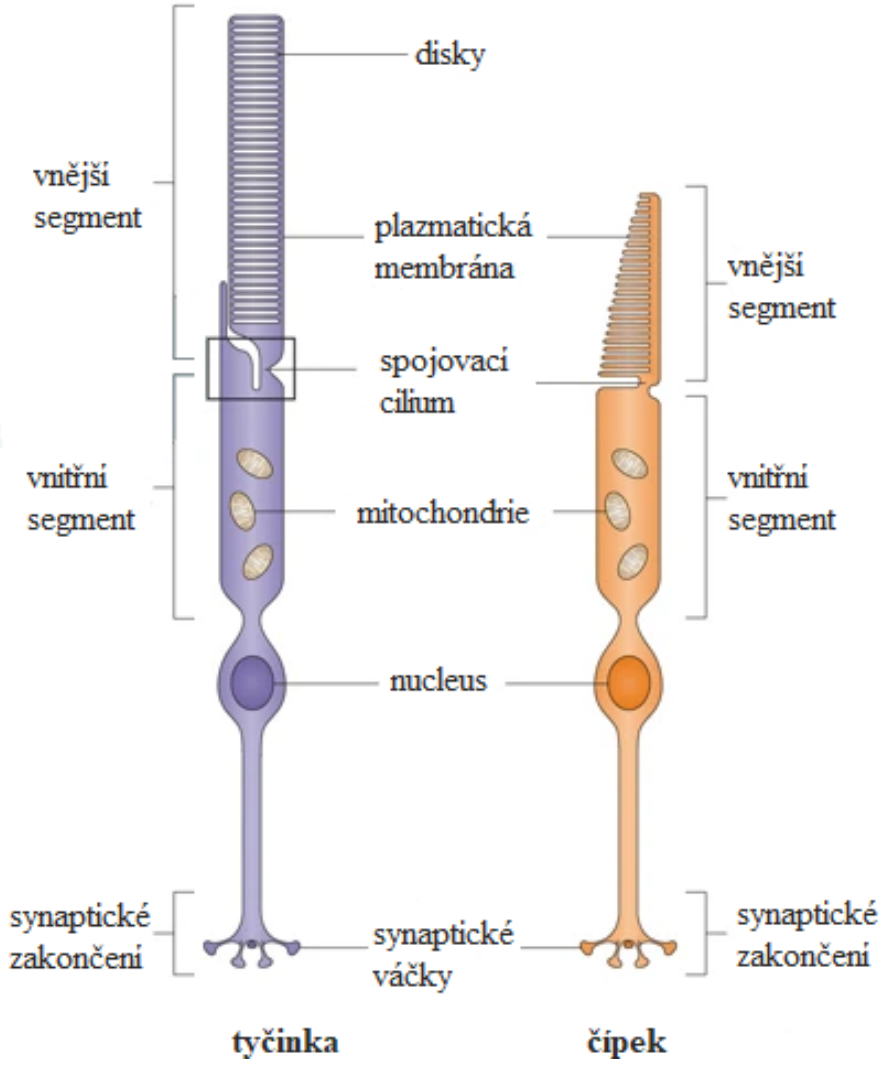
Obrázek 3: *Vrstvy sítnice. Upraveno podle (Cummings, 2007).*

Světločivné elementy (na Obrázku 4) jsou primární smyslové buňky, nervové buňky přijímající světelné podněty a předávající je na další neurony zrakové dráhy. Světločivné buňky tvoří:

- **Tyčinky:** jsou četnějšími světločivnými elementy, v sítnici jich je kolem 120 milionů. Obsahují tzv. zevní segment, což je světločivný úsek tvořený vezikuly. V těchto vezikulách je obsaženo zrakové barvivo rhodopsin. Rhodopsin po dopadu světla

na sítnici mění barvu a vyvolává nervové vzruchy, které jsou poté předávány na bipolární buňky.

- **Čípky:** jsou kratší, silnější světločivné elementy, v sítnici jich je méně než tyčinek, asi 6-7 miliónů. Zevní segment obsahuje rovněž membránové duplikatury, netvoří však vezikuly, jako tomu je u tyčinek. Iodopsin, barvivo na membránách čípků, je maximálně citlivý na červené světlo. Po dopadu červeného světla vyvolává nervové vzruchy, které přecházejí neuritem na bipolární buňky (Čihák et al., 2004a).



Obrázek 4: *Stavba světločivných elementů. Upraveno podle (Wright et al., 2010).*

Zadní část oka tvořená sítnicí spolu s cévami, které ji vyživují, se označuje jako oční pozadí. V této části nalezneme *discus nervi optici*, místo, kam se sbíhají nemyelinizovaná vláka z gangliových buněk sítnice. Skrz *lamina cribrosa sclerae* (perforovanou skléru) tudy vystupuje *nervus opticus* (oční nerv) a *vena centralis retinae* a vstupuje *artiriae centralis*

retinae. V této části oka chybí světločivné elementy, proto je označovaná jako „slepá skvrna“ (Čihák et al., 2004a).

Zevně od *discus nervi optici* leží *macula lutea* (žlutá skvrna), uprostřed žluté skvrny je vkleslá *fovea centralis*, jamka, jejíž středem prochází zorná osa. *Macula lutea* je místem nejostřejšího vidění a místem s maximální rozlišovací schopností sítnice. Jsou zde uloženy jen světločivné složky, zevní segmenty čípků. Zbylé části světločivných elementů, gangliové a bipolární buňky jsou odkloněny stranou (Čihák et al., 2004a).

1.1.2 Zraková dráha

Zraková dráha vede podněty ze sítnice do primární zrakové oblasti týlního laloku a patří mezi senzorické dráhy. První tři neurony dráhy se nachází v sítnici, čtvrtý se nachází v thalamu. Proto se používá označení čtyřneuronová zraková dráha (Čihák et al., 2004b).

První neuron tvoří primární smyslové buňky – tyčinky a čípky sítnice. Impulsy jsou předávány na druhé neurony, na bipolární buňky sítnice. Bipolární buňky sítnice předávají jako druhé neurony zrakové dráhy vzruchy na gangliové buňky sítnice. Gangliové buňky (3. neurony zrakové dráhy) vysílají své nemyelinizované axony k místu výstupu zrakového nervu, axony tvoří *nervus opticus* (zrakový nerv) (Čihák et al., 2004b).

Po průchodu skrz *discus nervi optici* a *lamina sclerae* jsou vlákna již myelinizovaná. Prochází skrz *canalis opticus* a vstupují do lebky, v místě *chiasma opticum* se část vláken zkříží, dále pokračují jako *tractus opticus. Tractus opticus se* dále rozděluje na 2 ramena - *radix lateralis*, který směřuje do *corpus geniculatum laterale* thalamu a *radix medialis*, který vstupuje do *colliculus superior* tekta, jehož vlákna se dále dělí na *radix optica mesencephalica* a *radix optica hypthalamica* (Čihák et al., 2004b).

Čtvrtý neurony tvoří buňky v *nucleus corporis geniculati lateralis*. Axony čtvrtých neuronů zrakové dráhy vytváří *tractus geniculocorticalis Gratioleti*. Tento svazek se při svém průběhu dělí na dolní a horní část. Horní část tvoří Baumanovu kličku a dolní část Meyerovu-Archimbaultovu kličku. Obě části končí v mozkové kůře v *lobus occipitalis* v oblasti area 17 (Čihák et al., 2004b; Hudák et al., 2017)

1.2 Onemocnění sítnice

1.2.1 Retinitis pigmentosa

Retinitis pigmentosa (RP) je nejčastější příčinou dědičné progresivní degenerace sítnice způsobující slepotu. Degenerace sítnice je způsobena předčasnou apoptózou fotoreceptorů, dochází k postupné ztrátě funkce světločivných buněk sítnice. Nejprve dochází k poruchám funkce tyčinek, poté je také poškozena funkce čípků. Dochází rovněž k poškození pigmentového epitelu sítnice (Zhang, 2016).

Mezi prvotní klinické příznaky onemocnění patří noční slepota způsobená degenerací tyčinek, dochází k zúžení zorného pole a postupně se snižuje ostrost zraku. Dochází k degenerativním změnám na očním pozadí, které jsou obvykle detekovány až v pozdním stádiu onemocnění, a to u pacientů s autozomálně recesivní RP. Progresivní ztráta zraku v mnoha případech vyústí až v úplnou slepotu (Zhang, 2016).

RP je skupina dědičných onemocnění nejčastěji s autozomálně recesivní dědičností (50-60 %), s autozomálně dominantní dědičností (30-40 %), nebo také s X-vázanou dědičností (5-15 %). Vzácnější jsou formy onemocnění s mitochondriální dědičností a forma digenická, která je způsobená mutacemi ve dvou různých genech (Parmeggiani et al., 2011).

RP se vyskytuje většinou samostatně jako izolovaná nesyndromová forma omezená pouze na oko. Pokud se vyvíjí ve spojitosti s jiným očním nebo systémovým onemocněním, označujeme ji jako syndromovou formu RP. Nejčastější formou syndromové RP je Usherův syndrom a Bardet-Biedelův syndrom (Zhang, 2016).

1.2.2 Nesyndromová RP

Nesyndromová RP je asociována s více než 80 geny. Detailní popis nesyndromového onemocnění retiny je obtížný vzhledem ke genové variabilitě a variabilní možnosti dědičnosti. Jak již bylo zmíněno, jedná se o autozomálně dominantní RP, autozomálně recesivní RP, X-vázanou RP či digenickou formu RP (Parmeggiani et al., 2011).

Každý z více než 80 asociovaných genů odpovídá specifickému podtypu RP se specifickým věkem nástupu onemocnění, zrakovým postižením, vzhledem sítnice a rychlostí progrese. Vliv na výsledný projev onemocnění mají také faktory environmentální (Verbakel et al., 2018).

1.2.3 Syndromová RP

Většinou se RP vyskytuje jako izolovaná porucha, existují však i syndromové formy poškození sítnice, vznikající jako následek systémové patologie. Nejčastějším typem

syndromového onemocnění sítnice je Usherův syndrom (10 %) a Bardet-Biedlův syndrom (5 %) (Parmeggiani et al., 2011).

Bardet-Biedlův syndrom (BBS) je vzácné dědičné onemocnění spojené s dystrofií světločivných elementů sítnice. Prvním příznakem poškození sítnice je noční slepota objevující se kolem sedmého roku života. Postupně dochází k progresi onemocnění a k úplné slepotě pak kolem 15 let. BBS s autozomálně recesivní dědičností postihuje asi 1 jedince z 120 000, s vyšší frekvencí se onemocnění (asi 1 z 13 000) vyskytuje u obyvatel Newfounlandu nebo u beduínů na území Kuvajtu. S rozvojem BBS je asociováno 14 známých genů (viz. Tabulka 1). Syndrom je charakterizován obezitou, polydaktylií a kognitivními poruchami. U mužů je rovněž přítomen hypogonadotropní hypogonadismus. Během ontogeneze dochází k vývojovým abnormalitám ledvin, jejichž poškození je nejčastější příčinou morbidity a mortality (Parmeggiani et al., 2011).

Tabulka 1: *Geny asociované s BBS podle (Parmeggiani et al., 2011).*

Geny asociované s BBS	*BBS1, BBS2, ARL6/BBS3, BBS4, BBS5, MKKS/BBS6, BBS7, TTC8/BBS8, B1/BBS9, BBS10, TRIM32/BBS11, BBS12, MKS1/BBS13, CEP290/BBS14*

Druhým ze zmíněných syndromů je Usherův syndrom. Usherův syndrom je autozomálně recesivní onemocnění spojené se ztrátou sluchu, RP a v některých případech i s poškozením funkce vestibulárního aparátu. Jedná se o nejčastější příčinu hluchoslepoty – více než 50 % pacientů s tímto syndromem je slepých a rovněž hluchých (Parmeggiani et al., 2011).

1.2.4 Metabolická onemocnění sítnice

Poruchy oka se vyskytují také u vrozených poruch metabolismu. U většiny případů je onemocnění oka zapříčiněno v důsledku poruch syntetických drah a kumulací normálních produktů metabolických drah, méně často přímým toxickým působením abnormálních produktů (Poll-The et al., 2011).

Funkce sítnice je podmíněna funkcí světločivných buněk sítnice. Degenerace světločivných buněk může nastat v případě biochemického defektu přímo ve fotoreceptorových buňkách, v důsledku biochemického poškození okolních buněk (ku příkladu buňky retinálního pigmentového epitelu) nebo je způsobena citlivostí fotoreceptorových buněk či buněk pigmentového epitelu k metabolickým vadám (Poll-The et al., 2011).

Tuto spojitost mezi onemocněním sítnice a poruchami biochemických drah podporuje výskyt RP u metabolických poruch jako jsou mukopolysacharidózy (poruchy metabolismu

mukopolysacharidů), různá lyzozomální onemocnění či Refsumova nemoc (defekt peroxizomů) (Poll-The et al., 2011).

1.3 Usherův syndrom

Usherův syndrom je nejčastější příčinou dědičné hluchoslepoty. Jedná se o skupinu onemocnění, jejíž společnou charakteristikou je vrozená hluchota, progredující RP a v některých případech porucha funkce vestibulárního aparátu. Na základě klinických studií byl Usherův syndrom rozdělen na tři typy (viz. Tabulka 2) (Vaché et al., 2012).

- Usherův syndrom I. typu (USH1)

U pacientů s USH1 se projevuje kromě postižení sluchového a zrakového ústrojí i vestibulární dysfunkce, která je příčinou poruchy rovnováhy. Pacienti trpí těžkou až hlubokou senzoricko-neurální vrozenou sluchovou ztrátou a k rozvoji RP dochází již v dětství. Sedm USH1 lokusů bylo identifikováno a subklasifikováno jako USH1B-K (Well et al., 1995).

Subtyp USH1B je zapříčiněn mutacemi genu *MYO7A* (Well et al., 1995) kódující protein myosin VIIA. Tento protein je tvořen ve vnitřním uchu a v sítnici. Myosin VIIA hraje ve vnitřním uchu důležitou roli, jelikož se podílí na vývoji a udržování stereocilií. V sítnici je součástí RPE, kde se zřejmě podílí na podpoře a výživě sítnice (Sato et al., 2017). Subtyp USH1C je způsoben mutacemi v genu *USH1C* (Verpy et al., 2000), USH1D je asociován s mutacemi v genu *CDH23*, USH1F v genu *PCDH15* (Zheng et al., 2005), USH1G v genu *USH1G* (také známého jako *SANS*) a USH1J v genu *CIB2* (Weil et al., 2003). Odpovědný gen USH1K, mapovaný na chromozomu 10 (10p11.21-q21.1), zatím nebyl identifikován (Jaworek et al., 2012).

- Usherův syndrom II. typu (USH2)

Pacienti s USH2 vykazují mírnou až těžkou vrozenou ztrátu sluchu, která je zřejmá především při vyšších frekvencích. Na rozdíl od USH1 není poškozena funkce vestibulárního aparátu a k progresi RP dochází později. První příznaky poškození zraku, mezi které patří noční slepota, začínají obvykle v dospívání nebo rané dospělosti (Yan et al., 2010).

Na základě molekulárně genetické příčiny byl USH2 rozdělen na tři subtypy. USH2A je způsoben mutacemi genu *USH2A* kódující protein usherin. Usherin je důležitou součástí bazálních membrán, které oddělují a podporují buňky v mnoha tkáních. Funkce usherinu nebyla zatím dobře objasněna. Studie naznačují, že je součástí proteinového komplexu podílejícího se

na vývoji a udržování buněk ve vnitřním uchu a sítnici. USH2C je asociován s mutacemi v genu *ADGRV1* (také známý jako *GPR98*) nebo složenými heterozygotními mutacemi *ADGRV1/PDZD7* (tzv. digenická dědičnost). Gen *ADGRV1* kóduje membránový receptor spřažený s G proteinem mající zásadní roli ve vývoji sluchu a zraku. Subtyp USH2D je zapříčiněn mutacemi v genu *WHRN* (Bonnet et al., 2016).

- Usherův syndrom III. typu (USH3)

Pacienti s USH3 netrpí vrozenou hluchotou. Dochází u nich k postupné ztrátě sluchu a k progredujícímu poškození sítnice, a to v první nebo druhé dekádě života. Vestibulární ústrojí je bez poškození, může ale docházet k pozdějším problémům s rovnováhou. Subtyp USH3A je spojen s mutacemi v genu *CLRN1* (Bonnet et al., 2016) a subtyp USH3B s mutacemi v genu *HARS1* (Abbott et al., 2017).

Usherův syndrom III. typu není běžný, jako je tomu u USH1 a USH2, avšak ve Finsku nebo mezi aškenázskými Židy je to převládající forma USH a tvoří zde až 40% podíl (Bonnet et al., 2016).

Tabulka 2: *Typy Usherova syndromu (Usher Syndrome, ©1996-2020)*

	Typ I	**Typ II**	**Typ III**
Sluch	Hluboká hluchota již od narození	Od narození mírné až závažné poškození sluchu	Po narození normální, progresivní ztráty v dětství/během dospívání
Zrak	Porucha nočního vidění před dosažením 10 let	Snížené noční vidění začíná později v dětství, během dospívání	Variabilní, často začínají problémy s nočním viděním v dospívání
Funkce vestibulárního aparátu (rovnováha)	Od narození problémy s rovnováhou	Normální	Normální, mírné problémy; možnost pozdějších problémů
Geny	*MYO7A, USH1C, CDH23, PCDH15, USH1G, CIB2*	*USH2A, ADGRV1 (ADGRV1/PDZD7), WHRN*	*CLRN1, HARS*

1.3.1 Mechanismus vzniku onemocnění

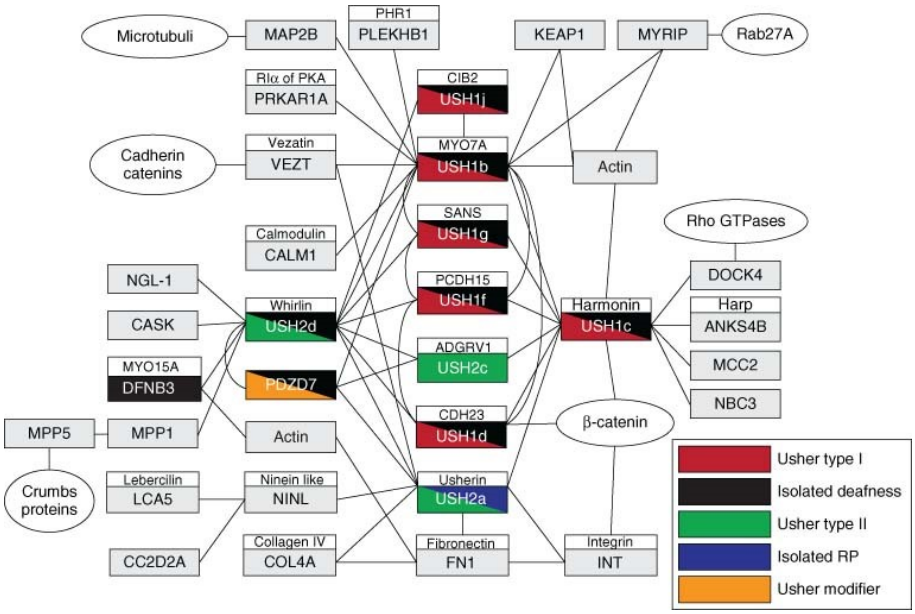
Proteiny kódované USH geny hrají zásadní roli při správném vývoji oka a ucha. Jsou důležité pro soudržnost vláskových buněk ve vnitřním uchu a v sítnici poskytují mechanickou oporu membránovému spojení. Jedná se o členy proteinových tříd s velmi odlišnými funkcemi, kteří spolu interagují a vytváří tak interakční síť (Yan et al., 2010).

Myosin VIIA je motorický protein, harmonin a SANS jsou členy signální kaskády pomáhající rychleji přenášet informace mezi buněčnou membránou a jádrem. Cadherin 23 a protocadherin 15 jsou molekuly buněčné adheze. Usherin a ADGRV1 jsou transmembránové proteiny, které mohou být zapojeny do vnější signalizace. Protein clarin-1 kódovaný genem

USH3A je členem rodiny klarinů, která je specifická pro obratlovce a která zahrnuje proteiny se čtyřmi transmembránovými doménami. Funkce tohoto proteinu zatím nebyla objasněna (Yan et al., 2010).

Mutace v různých USH genech mohou, vzhledem k existenci integrované sítě USH proteinů, vést k širokému spektru projevů postižení oka a ucha. (viz. Obrázek 5) (Yan et al., 2010).

Předpokládá se, že v této síti jsou USH1 a USH2 proteiny smotány do multiproteinového scaffoldu (lešení), přičemž ústřední funkci zde mají PDZ domény obsahující homology proteinů, harmonin a whirlin a doména SAM proteinu SANS. Ve většině případů se tyto proteinové homology harmonin a whirlin vážou s jednou nebo více doménami PDZ (Yan et al., 2010).



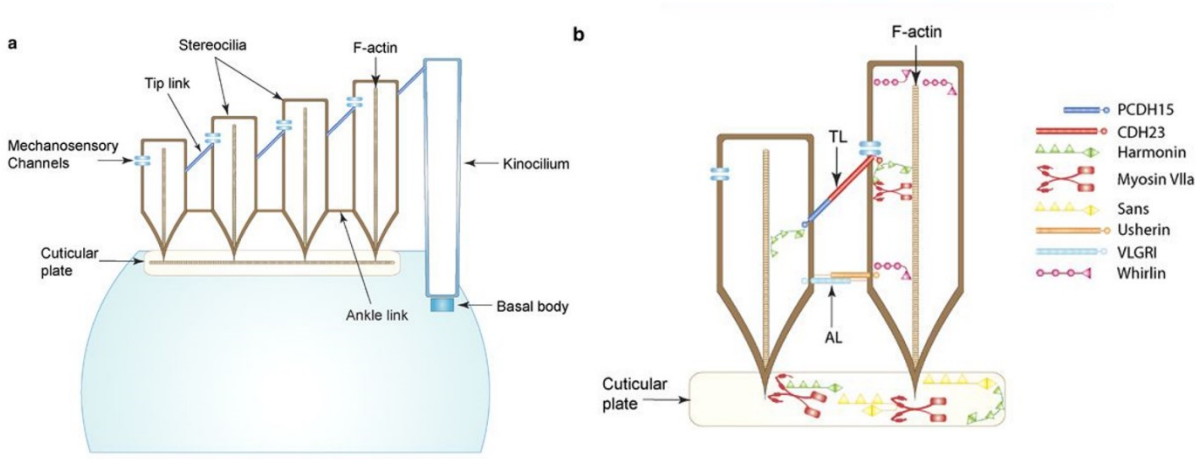
Obrázek 5: *Síť USH proteinů. Jsou znázorněny všechny identifikované interakce protein-protein. Červená barva označuje spojení s USH1, černá s izolovanou hluchotou, zelená asociaci s USH2, modrá barva označuje spojení s izolovanou RP a oranžová protein modifikující projevy USH podle (Kremer et al., 2006).*

Hlavním místem lokalizace USH proteinů ve vnitřním uchu jsou stereocilie a synaptické oblasti vláskových buněk. Stereocílie jsou mechanosenzitivní organely umístěné na apikálním povrchu vláskových buněk sluchového a vestibulárního aparátu. Ohyb svazku vláskových buněk zvukovou vlnou mechanicky otevírá uzavřené transdukční kanály na vrcholu stereocílie, čímž se spouští elektrická signální kaskáda vnímání zvuku (Yan et al., 2010).

V sítnici je signalizace spojena s diskovými membránami uvnitř vnějšího segmentu fotoreceptorových buněk. Aktivace kaskády vizuální signalizace vede k hyperpolarizaci fotoreceptorové buňky a k redukci neurotransmiteru jeho uvolněním na synapse fotoreceptorových buněk, které jsou umístěné ve vnější plexiformní vrstvě sítnice. USH

proteiny jsou lokalizovány v synaptické vrstvě, především v ciliární oblasti mezi vnějším a vnitřním segmentem. Protocadherin 15, USH2A a VLGR1 byly také detekovány ve vrstvě *membrana limitans externa* mezi fotoreceptorovými buňkami a Müllerovými buňkami. Harmonin a protocadherin 15 jsou rovněž přítomny ve vnějším segmentu buněk, harmonin a SANS byly objeveny ve vnitřním segmentu fotoreceptoru (Kremer et al., 2006).

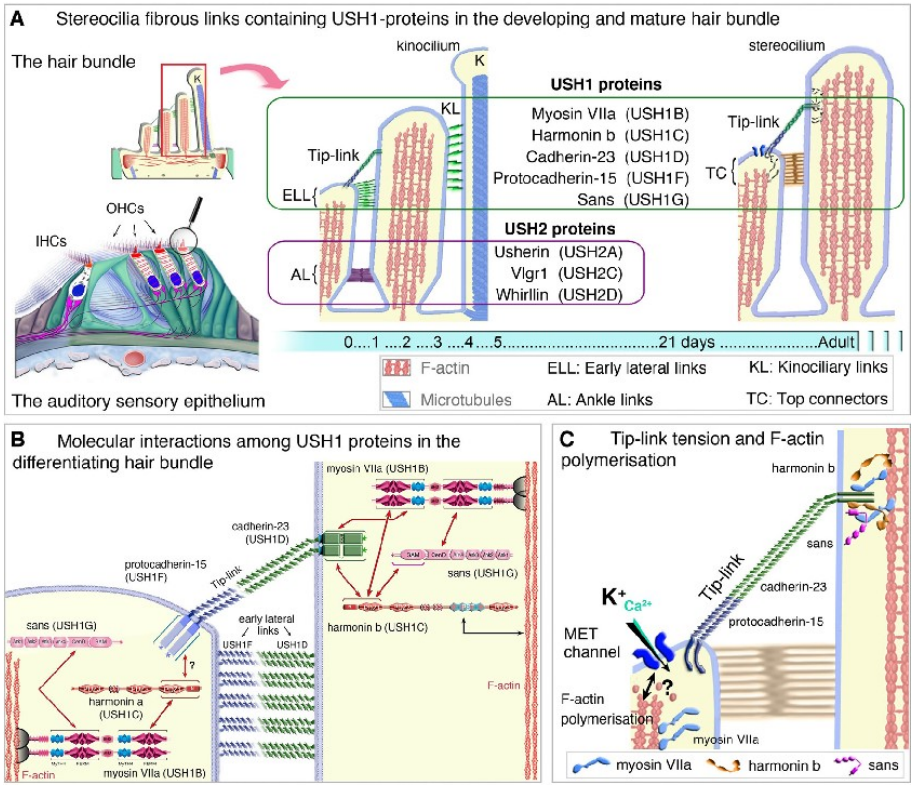
Molekulární a kolokalizační analýzy na myších modelech prokázaly mnoho interakcí mezi USH1 a USH2 proteiny. Ve vnitřním uchu jsou tyto interakce nezbytné pro správný vývoj vláskových buněk a mohou mít vliv na mechanoelektrický přenos signálu a rovněž na synaptickou funkci zralých vláskových buněk. Mutace v kterémkoli z USH genů povede k selhání interakční sítě proteinů a dojde ke vzniku onemocnění (Yan et al., 2010).



Obrázek 6: *Schéma zachycující a) vyvíjející se vláskové buňky vnitřního ucha b) lokalizaci USH proteinů ve vláskových buňkách a jejich účast na postranních vazbách vláskových buněk podle (Yan et al., 2010). Extracelulární filamenta TP (tip links) tvoří spoje mezi stereocíliemi vláskových buněk/ spoje mezi stereocíliemi a kinocíliemi, AL (ankle links) připojují stereocílie vláskových buněk k jejich bázi.*

Stereocílie jsou drženy pohromadě a připojeny ke kinociliím pomocí různých postranních vazeb (viz Obrázek 6 a 7). Myosin VIIA je součástí vláskových buněk vnějšího i vnitřního ucha, používá dlouhá vlákna aktinu k transportu dalších molekul USH komplexu spolu s proteinem SANS. Extracelulární vazby mezi stereociliemi jsou intracelulárně ukotveny pomocí harmoninu a whirlinu na aktinový cytoskelet. Na ukotvení se rovněž podílí myosin VIIa, myosin XV nebo myosin 1c. Na základě výzkumu na myších modelech a na základě exprese whirlinu ve vnitřním uchu se předpokládá, že může tento protein koordinovat růst F-aktinu. Molekuly CDH23 a PCDH15 jsou součástí vazeb mezi senzorickými buňkami vnitřního ucha, jsou zásadní pro morfogenezi a mechanostransdukci (u myší missence mutace *Cdh23* ovlivňuje pouze transdukci, bez účinku na vývoj vláskových buněk). Usherin a VLGR1 jsou součástí

laterálních vazeb (ankle links), které jsou připojeny k aktinovému jádru stereocilie prostřednictvím whirlinu a případně harmoninu B (Yan et al., 2010).



Obrázek 7: *Stereociliální vazby obsahující proteiny USH1 a USH2 a) ve vyvíjejících se a ve zralých vláskových buňkách, b) interakce USH1 proteinů ve vyvíjejících se svazcích vláskových buněk, c) napětí tip-links a polymerace aktinu podle (El-Amraoui et al., 2014).*

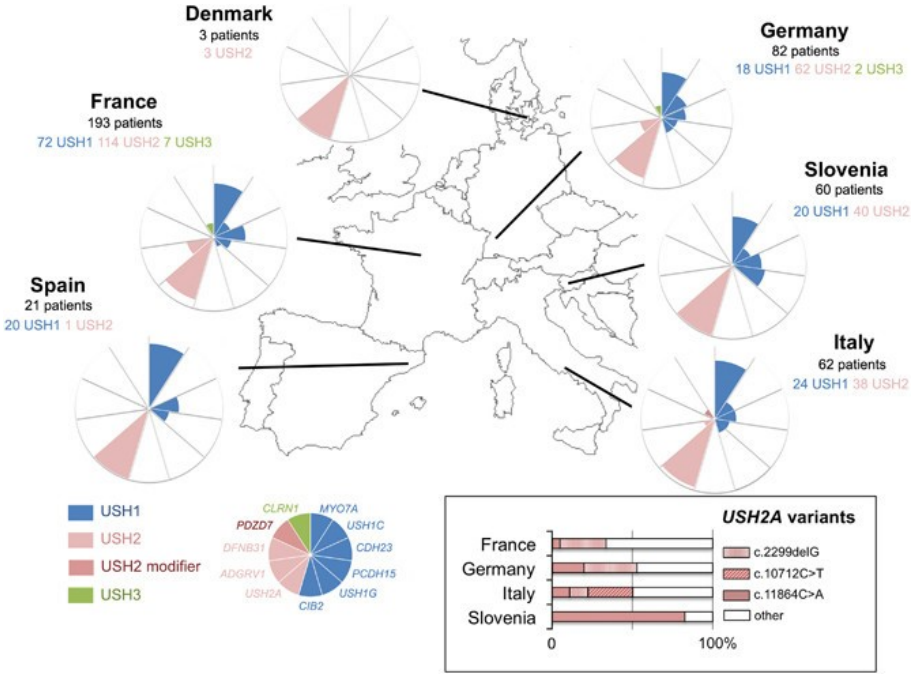
1.3.2 Prevalentní mutace USH v Evropě

Nejčastěji se vyskytujícím klinickým subtypem je USH2, představuje asi dvě třetiny hlášených případů USH. Kauzální příčinou onemocnění je nejčastěji mutace genu *USH2A* (58-90 %), *ADGRV1* (5-19 %) a *WHRN* (0-9,5 %). USH1 představuje zhruba 35 % USH případů a je způsoben mutací pěti hlavních genů *MYO7A* (53-73 %), *CDH23* (7-20 %), *PCDH15* (7-12 %), *USH1C* (1-15 %) a *USH1G* (0-4 %). Pouze 3 % případů Usherova syndromu tvoří klinický subtyp USH3, výjimkou je populace Finů a aškenázských Židů, kde tvoří *USH3A* téměř 40 % všech případů USH. Frekvence výskytu jednotlivých klinických subtypů USH a také frekvence jednotlivých variant se mezi populacemi liší (Bonnet et al., 2016).

Vyšetření evropských pacientů (celkem 427): Francie (194), Německo (86), Itálie (62), Slovinsko (61), Španělsko (21) a Dánsko (3)) s Usherovým syndromem zachytilo opakující se bodové mutace v genech *USH2A*, *CDH23* a *USH1C* a pomohlo tak odhalit dvě nejčastější mutace v genu *USH2A*. Jedná se o variantu s posunem čtecího rámce (tzv. frameshift mutaci) c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21) a nesmyslnou (tzv. nonsence) mutaci c.11864G>A;

p.(Trp3955*) způsobující předčasné ukončení syntézy proteinu. Obě byly detekovány v téměř 22 % případů, jejich distribuce mezi jednotlivými zeměmi je však odlišná. Zatímco mutace v exonu 61 c.11864G>A; p.(Trp3955*) byla detekována u 4,9 % pacientů ve Francii, 11,1% v Itálii, 20 % pacientů v Německu a s nejvyšší frekvencí 82,5 % ve Slovinsku (viz. Obrázek 8), mutace c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21) byla nejčastěji zachycena u pacientů ve Španělsku s frekvencí 100 %, dále v Německu s frekvencí téměř 38 % a v Dánsku s frekvencí 33,3 %. U slovinských pacientů nebyla varianta c.2299delG nalezena (Bonnet et al., 2016).

Konkrétní zastoupení variant v populacích je zaneseno v Tabulce 3.



Obrázek 8: *Prevalence a distribuce mutací USH1, USH2 a USH3 genů podle (Bonnet et al., 2016).*

V kohortě ruských pacientů s Usherovým syndromem byla prevalence USH2 nižší, než bylo předpokládáno (asi 39 %). U 90 % pacientů s USH2 bylo nalezeno celkem 11 variant v genu *USH2A*. Nejčastější variantou byla u ruské populace, stejně jako u středoevropské populace, stanovena *USH2A:* c.11864G>A. Byla nalezena u 50 % pacientů s USH2 a většinou v heterozygotní formě. S vyšší prevalencí v Rusku byl diagnostikován USH1, byl stanoven u 54 % pacientů. Nejčastěji byl postižen gen *MYO7A* (V 73 % případů) a detekováno bylo celkem 11 variant. *MYO7A*: c.52C>T; p.(Gln18*) byla nejčastější mutací (27 %) a byla s ní asociovaná dřívější manifestace onemocnění a závažnější průběh nemoci. USH3 nebyl diagnostikován (Ivanova et al., 2018).

Výsledky distribuce varianty *USH2A*: c.11864G>A; p.(Trp3955*) (viz. Tabulka 3) ukazují na častější výskyt této mutace na území slovanských států a možnost stejného geografického původu (Bonnet et al., 2016).

Tabulka 3: *Distribuce dvou nejčastějších mutací genu USH2 podle (Bonnet et al., 2016).*

	Stát					
	Dánsko	**Francie**	**Německo**	**Itálie**	**Slovinsko**	**Španělsko**
Celkem USH2 pacientů	3	101	55	36	40	1
Pacientů s c.2299delG	1	29	18	4	0	1
Pacientů s c.11864G>A	-	5	11	4	33	-
Pacientů s c.2299delG (%)	33,33	28,71	37,73	11,11	0	100
Pacientů s c.11864G>A (%)	0	4,95	20	11,11	82,5	0

U některých populací, jako je finská populace, aškenázští Židé či Cajunové v jihozápadní Louisianě, existují výjimky z této distribuce. Vzhledem k mutacím zakladatelů je zde relativně častý záchyt specifických subtypů USH (např. USH3 u Finů a u aškenázských Židů) (Millán et al., 2011).

U francouzských Kanaďanů v Québecu byla jako převládající mutace zakladatele stanovena *USH2A*: c.4338_4339delCT a to v 55,6 % případech USH2. Šest z deseti pacientů USH2 s touto variantou sdílelo společný rodový haplotyp, což je v souladu s efektem zakladatele (Ebermann et al., 2009).

Na rozdíl od jiných populací tvoří ve Finsku USH3 40 % všech případů, 34 % USH1 a USH2, který je v ostatních populacích subtypem s největším zastoupením, pouze 12 %. Všichni pacienti USH3 jsou navíc nositeli stejné mutace zakladatele v genu *CLRN1*: c.528T>G; p.(Tyr176*) (Västinsalo et al, 2013). Stejné zastoupení má USH3 u aškenázských Židů evropského a severoamerického původu. Zde je však nejčastěji zastoupena mutace *CLRN1:* c.144T>G; p.(Asn48Lys), což naznačuje více účinků zakladatele (Isosomppi et al., 2009).

1.3.3 USH2 haplotypy

USH2 pacienti z Quebecu nesoucí variantu *USH2A*: c.4338_4339delCT sdílejí stejný haplotyp, což je v souladu s konceptem efektu (mutace) zakladatele (Ebermann et al., 2009).

Vzhledem k vysoké frekvenci výskytu mutace c.2299delG a jejímu geografickému rozšíření byla snaha zjistit, zda alely c.2299delG mají společný rodový původ nebo se jedná o tzv. hotspoty (místa, kde dochází častěji k mutacím) v genu *USH2A*.

U pacientů ze 14 zemí (USA, Dánsko, Nizozemí, Velká Británie, Španělsko, Švédsko, Norsko, Belgie, Kanada, Čína, Kolumbie, Francie, Německo a Jižní Afrika) nesoucích variantu c.2299delG byla provedena haplotypová analýza. Testováním 6 SNP bylo odhaleno 12 haplotypů, jeden (větší než 250 kb) z nich byl asociován s danou variantou, což poukazuje na společného předka. Široké geografické rozšíření mutace c.2299delG je tak zřejmě výsledkem rodové mutace, která se v důsledku migrace rozšířila po celé Evropě. V nedávné době byla přivedena do Ameriky a Oceánie, což podporuje její výskyt v zemích s historií evropského přistěhovalectví (Dreyer et al., 2001).

Tento haplotyp byl stanoven dříve, než byla objevena dlouhá izoforma usherinu. Dalším testováním rozšířeným na oblast 800 kb genu *USH2A* s celkem 14 intagenními SNP bylo identifikováno 10 různých haplotypů vykazujících vysokou variabilitu. U všech těchto haplotypů byl však zachován dříve popsaný haplotyp. Provedená studie haplotypů c.2299delG ukazuje, že zdrojem variability je rekombinace a data rovněž potvrzují společný původ mutace c.2299delG (Aller et al., 2010).

Haplotypová analýza pacientů s USH2 byla provedena také na Slovinsku, kde tvoří majoritní mutaci c.11864G>A. U homozygotních pacientů byly objeveny čtyři haplotypy (chr1:215,901,492-216,595,306), nejčastější z nich byl zachycen s frekvencí 65 %. Vysoká frekvence mutace a její relativně homogenní haplotypová struktura detekovaná u nepříbuzných pacientů může být objasněna efektem zakladatele. Mutace c.11864G>A se rovněž vyskytuje s vysokou frekvencí u ruských pacientů, u nichž haplotyp nebyl dosud určen (Zupan et al., 2019).

2 Cíl práce

Usherův syndrom je klinicky a geneticky velmi heterogenní onemocnění. Testování známých a objevování nových kauzálních mutací přispěje k pochopení etiopatogeneze syndromu. Odhalení kauzálních příčin a objasnění faktorů podílejících se na vzniku onemocnění je důležité pro zlepšení klinického poradenství a pro péči o postižené jedince.

Cílem práce bylo, vzhledem k uvedené heterogenitě onemocnění, zhodnocení správného určení klinické diagnózy Usherova syndromu. V 8 rodinách vyšetřovaných pacientů mělo být provedeno molekulárně genetické testování pro potvrzení diagnózy a pro zjištění segregace kauzálních mutací v rodině.

Na základě molekulárně genetického testování pacientů Oční kliniky nebo Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN v Praze s Usherovým syndromem mělo být rozšířeno spektrum patogenních mutací zachycených v České republice. Identifikace kauzálních mutací měla být provedena v již izolovaných vzorcích DNA získaných ze vzorků krve nebo slin metodami přímého, celoexomového a celogenomového sekvenováníči SNP array. K ověření přítomnosti nalezených variant a ke zjištění segregace nalezených mutací v rodinách mělo být použito Sangerovo sekvenování.

Mutace *USH2A:* c.11864G>A byla v předchozím projektu nalezena u téměř 60 % probandů s Usherůvým syndromem. Proto byl v iniciální fázi molekulárně genetického testování proveden cílený screening exonu 61 genu *USH2A*. Součástí práce měla být i haplotypová analýza pacientů, kteří jsou nositeli mutace *USH2A*: c.11864G>A; p.(Trp3955*). Vysoký podíl pacientů nesoucích variantu c.11864G>A naznačuje možnost efektu zakladatele. Cílem práce bylo na základě výsledků analýzy tuto hypotézu vyvrátit či potvrdit.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Vzorky krve či slin byly získány od pacientů Oční kliniky nebo Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN v Praze a jejich rodinných příslušníků. Na základě vyšetření a rodinné anamnézy byla stanovena předběžná diagnóza Usherova syndromu.

3.2 Izolace DNA z krve

Pacientům bylo po podání informací a podpisu informovaného souhlasu (viz. Příloha 1) standardně odebráno 2 x 6 ml žilní krve do zkumavek s antikoagulačním činidlem EDTA. Izolace DNA byla provedena z jedné z odebraných zkumavek, druhá zkumavka byla uskladněna při -20 °C pro případnou kontrolu. Při izolování DNA byl použit kit Puregene Blood Core Kit (kat. číslo: 158389, QIAGEN, Německo) a izolovaná DNA byla získaná z narušených jader leukocytů.

Sada pro izolaci DNA z krve obsahovala:

- RBC Lysis Solution
- Cell Lysis Solution
- Protein Precipitation Solution
- DNA Hydratation Solution
- Rnase A Solution

Dále byly použity roztoky 100% isopropanolu a 70% ethanolu k pročištění a vysrážení DNA, které nebyly součástí kitu.

Do zkumavek s 18 ml roztoku RBC Lysis Solution bylo přidáno 6 ml krve. Směs ve zkumavkách byla promíchána opakovaným otočením zkumavky a obsah zkumavek se nechal odstát 5 minut při pokojové teplotě, přičemž došlo k jeho občasnému promíchávání.

Následně byly zkumavky centrifugovány 5 minut při 2000 x G. Vlivem odstředivého zrychlení došlo k vytvoření pelety s leukocyty na dně zkumavek. Supernatant byl opatrně ze zkumavky odstraněn tak, aby nedošlo k poškození či vylití pelety a aby ve zkumavce zůstalo asi 2,5 ml supernatantu. Ve zbylém objemu supernatantu byla peleta resuspendována promícháním na vortexu. Poté bylo přidáno 6 ml Cell Lysis Solution, obsah zkumavky byl promíchán na vortexu a následně 2 hodiny inkubován při 37 °C.

Po inkubaci bylo do zkumavky přidáno 30 µl RNase A roztoku. Obsah zkumavky byl promíchán 25 otočeními a inkubován nejprve 15 minut při 37 °C, poté byl vzorek rychle zchlazen pětiminutovou inkubací na ledu. Ke vzorku bylo přidáno 2,7 ml Protein Precipitation Solution a obsah zkumavky byl 20 sekund vortexován. Poté byly zkumavky při 2000 x G stočeny v centrifuze na 10 minut a na dně zkumavky se z vysrážených proteinů vytvořila peleta.

Supernatant obsahující DNA byl přelit k 8,1 ml isopropanolu připraveného v 50 ml zkumavkách. Po promíchání supernatantu s isopropanolem byla DNA okem viditelná a po pětiminutové centrifugaci při 2000 x G se DNA usadila na dně zkumavky ve formě pelety.

Supernatant byl slit a do zkumavky bylo přilito 6 ml 70% ethanolu k pročištění izolované DNA. Obsah zkumavky byl promíchán opakovaným otočením a stočen v centrifuze na 5 minut při 2000 x G. Supernatant byl opatrně odstraněn a zkumavky s DNA na dně zkumavky byly sušeny při pokojové teplotě po dobu 5-10 minut. Nakonec byla DNA rozpuštěna v roztoku DNA Hydratation Solution. Směs se promíchala na vortexu po dobu 5 sekund a poté byla inkubována při teplotě 65 °C po dobu 1 hodiny.

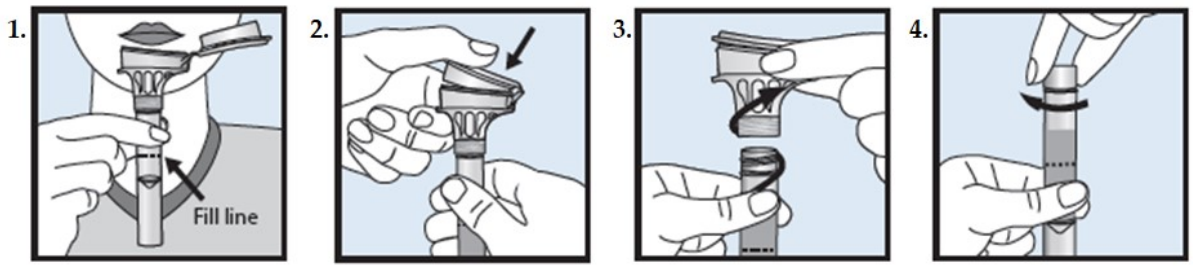
Koncentrace izolované DNA byla měřena na přístroji NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, USA), poté byl vzorek uskladněn při -20 °C.

3.3 Izolace DNA ze slin

Pokud nebylo možné odebrat příbuzným postižených jedinců vzorek žilní krve, byla DNA izolována ze vzorku slin. Byly použity soupravy Oragene DNA (kat. číslo: OG-500) firmy DNA Genotek, které umožňují snadno a rychle odebrat vzorek, lze je tak využít i k samoodběru, a vytváří vhodné podmínky pro následnou izolaci DNA z buněk bukální sliznice ze slin (Obrázek 9).

Obrázek 9: *Součásti kitu Orange DNA. Převzato a upraveno z http://www.dnagenotek.com.*

Kromě výhody snadného použití kitu, které je znázorněno na schématu níže (Obrázek 10), je další výhodou možnost skladování při pokojové teplotě a možnost izolovat DNA i několik let po odběru. Podmínkou je však správné odebrání vzorku.



Obrázek 10: *Schéma použití kitu* ***1.*** *Sliny (bez bublin) musí naplnit zkumavku až po vyznačenou hranici.* ***2.*** *Po naplnění zkumavky je nutné pečlivě zavřít víčko, ve kterém se nachází roztok zajišťující optimální prostředí vzorku pro následnou izolaci. Aby se všechen roztok uvolnil z víčka do zkumavky, je potřeba víčko pečlivě zamáčknout.* ***3.*** *Původní víčko se ze zkumavky uvolní.* ***4.*** *Zkumavka se zašroubuje pevným víčkem a obsah se důkladně promíchá. Zdroj: http://www.dnagenotek.com.*

Izolace DNA ze slin byla prováděna pomocí kitu PrepIT-L2P (kat. číslo: PT-L2P-5) firmy Genotek.

K izolaci DNA ze slin bylo použito:

- PrepIT-L2P roztok (součástí sady)
- 97% a 70% ethanol
- TE pufr (10 mM TrisCl, 1 mM EDTA) – pro dlouhodobé uskladnění DNA

Vzorek slin určený k izolaci DNA byl na začátku řádně promíchán. Následovalo zahřátí vzorku na 2 hodiny při 50 °C v inkubátoru za účelem uvolnění DNA z buněk (především leukocytů). K 500 µl vzorku bylo přidáno 20 µl PrepIT-L2P roztoku. Vzorek byl opět důkladně promíchán a 10 minut chlazen na ledu. Poté byl při 15 000 x G na 5 minut centrifugován.

Oddělený supernatant byl odpipetován do nové zkumavky a k supernatantu bylo přidáno 600 µl 97% ethanolu. Obsah zkumavky byl opakovaným otočením promíchán a inkubován na 10 minut při pokojové teplotě. Během tohoto kroku bylo již možné vidět vysráženou DNA. Vzorek byl opět centrifugován na 2 minuty při 15 000 x G.

Vzniklý supernatant byl opatrně odstraněn pomocí pipety, aniž by došlo k poškození pelety s DNA. Do zkumavky bylo přidáno 250 µl 70% ethanolu a obsah zkumavky byl inkubován na 1 minutu při pokojové teplotě. Po inkubaci byl ethanol ze zkumavky opatrně odstraněn. Aby došlo k redukci zbylého ethanolu ve zkumavce, byla peleta obsahující DNA sušena 5 minut při pokojové teplotě. Následovalo rozpuštění pelety v 100 µl TE pufru, který je vhodný

k uskladnění DNA, a hodinová inkubace při 50 °C. Po stanovení výsledné koncentrace DNA na přístroji NanoDrop byl takto připravený vzorek skladován při -20 °C.

3.4 Návrh primerů

U pacientů s diagnózou Usherova syndromu byl jako první proveden cílený screening exonu 61 genu *USH2A* pomocí sekvenování dle Sangera. V případě pozitivního nálezu byl pacient zařazen do souboru jedinců určeného k analýze haplotypu.

Pokud pacient nenesl variantu c.11864G>A; p.(Trp3955*), bylo u vzorku provedeno Sangerovo sekvenování exonu 2, 6, 7, 11, 13, 20 a 61 (Kousal et al., 2016). Tyto exony byly vybrány na základě vysokého výskytu patogenních variant dle dostupné literatury.

Všechny primery pro cílený screening exonů *USH2A*, i následné ověření mutací nalezených pomocí celoexomového sekvenování, analýzu haplotypu a pro mapování delecí byly navrženy pomocí programu Primer3 (Untergasser et al., 2012; Koressaar & Remm, 2007) tak, aby byla pokryta oblast zájmu a primery nasedali ve vzdálenosti nejméně 50 bp před a za touto oblastí.

Sekvence primerů včetně použité referenční sekvence získané z databáze NCBI, teploty přisedání primerů či délky výsledných produktů jsou zaznamenané v Příloze 2 - Primery použité pro Sangerovo sekvenování.

3.5 Polymerázová řetězová reakce

PCR je široce využívaná metoda molekulární biologie, která byla použita k amplifikaci specifických úseků DNA.

PCR mix se připravil podle následujícího schématu:

- 10 µl MasterMix (DreamTaq Green PCR Master Mix (kat. číslo: K1082, Thermo Fisher Scientific, USA a ReddyMix PCR Master Mix (kat. číslo: AB-0575/DC/LD, Thermo Fisher Scientific, USA)
- 2 µl DNA
- 0,5 µl primerů (0,5 µl forward a 0,5 µl reverse)
- 7 µl PCR H_2O

PCR mix v eppendorfce byl vložen do thermocycleru (MyCycler^{TM}Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, California, USA), následně byl spuštěn program polymerázové řetězové reakce podle teploty nasedání (Tm) primerů a podle amplifikované sekvence (viz. Příloha 2 - Primery použité pro Sangerovo sekvenování).

Fáze a teploty polymerázové řetězové reakce jsou zaznamenány v Tabulce 4. Teplota hybridizace (dosednutí) primerů se lišila podle teploty tání použitých primerů.

Tabulka 4: *Schéma PCR*

Fáze cyklu	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	94 °C	3:00	1x
Denaturace DNA	94 °C	0:45	30x
Dosedání primerů na DNA	60 °C	0:30	
Elongace	72 °C	0:30	
Konečná fáze PCR	70 °C	5:00	1x
Zchlazení vzorku	4 °C	∞	1x

Pro mapování delecí byl použit LongRange MasterMix (kat. číslo: BIO-25052, Bioline, London, UK). Tento MasterMix je vhodný pro amplifikaci delších úseků DNA, které obvykle nelze amplifikovat rutinními metodami PCR s běžnými reagenciemi. Schéma PCR programu LongRange je zaznamenán v Tabulce 5.

Tabulka 5: *Schéma PCR programu LongRange*

Fáze cyklu	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	1:00	1x
Denaturace DNA	98 °C	0:10	30x
Nasedání primerů a elongace PCR produktu	62 °C	4:00	
Zchlazení vzorku	4 °C	∞	1x

3.6 Elektroforéza amplikonů

Elektroforetické dělení se používá k separaci molekul na základě odlišné velikosti. Molekuly DNA se pohybují v elektrickém poli, vzhledem k jejich negativnímu náboji podmíněným zbytkem kyseliny fosforečné, ke kladně nabité anodě. Po PCR nám toto rozdělení na gelu umožňuje zkontrolovat produkty reakce a odhalit případné nespecifické produkty.

Horizontální elektroforéza amplikonů probíhala na 0,1% agarosovém gelu ponořeném v TBE pufru (Tris/Borát/EDTA) a připraveném rozpuštěním 0,4 g agarózy (kat. číslo: 11404.05,

Serva, Germany) ve 40 ml 1 x TBE pufru. Pro vizualizaci elektroforeticky rozdělených fragmentů DNA byla použita fluorescenční barvička GelRed (kat. číslo: 41003, Biotium, Fremont, USA).

Po ztuhnutí a přemístění agarosového gelu do elektroforézní vany byly do vytvořených jamek naneseny vzorky, vždy po 5 µl, a do krajních jamek byl pro kontrolu délky DNA fragmentů nanesen žebříček (kat. číslo: BIO-33054, HyperLadderTM 50 bp, Bioline, United Kingdom) spolu s barvičkou DNA Loading Buffer Blue 5x (kat. číslo: BIO-37045, Bioline, United Kingdom). Do jedné jamky bylo nanášeno 5 µl žebříčku spolu s 1 µl barvičky.

Elektroforetické dělení probíhalo při elektrickém napětí 100 V po dobu nejméně 30 minut. Výsledek elektroforetického dělení byl analyzován pomocí UV transluminátoru firmy Ultra-Lum Inc.

3.7 Sangerovo sekvenování

Pro přímé sekvenování byly použity PCR produkty získané pomocí navržených primerů zajišťujících amplifikaci oblastí zájmu. Po PCR byly vzorky purifikovány pomocí směsi ExoSAP-IT (kat. číslo: 78201.1.ML, Thermo Fisher Scientific, USA). Tato směs konzervuje amplifikované segmenty DNA a také odstraňuje přebytečné nukelotidy a použité primery.

Ke vzorkům bylo přidáno 2 µl roztoku ExoSAP-IT a následně byla směs inkubována v termocycleru při 37 °C po dobu 30 minut. Při této teplotě docházelo k degradaci nevyužitých primerů a nukleotidů. Poté zahřátím směsi na 80 °C po dobu 15 minut byly inaktivovány složky roztoku ExoSAP-IT.

Do pročištěných vzorků o objemu 5 µl byl následně přidán 1 µl naředěného příslušného primeru a vzorky byly spolu s protokolem odeslány do sekvenační laboratoře (Core facility Genomika, PřF UK, Biocev, https://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna).

3.8 Analýza sekvencí

Výsledné sekvence byly zasílány sekvenační laboratoří ve formátu Chromatogram file (.seq). Tyto sekvence byly analyzovány a porovnány s referenčními sekvencemi v programu Chromas (Technelysium, Austrálie).

Pokud při manuální analýze sekvencí byla nalezena varianta, byla zkontrolována její četnost výskytu v populační databázi gnomAD (online přístupné na stránce https://gnomad.broadinstitute.org/). Databáze gnomAD obsahuje exomová a genomová data

více než 140 000 jedinců bez onemocnění. Proto i frekvence výskytu dané varianty v databázi může poukazovat na její klinický význam. Dále byly prohledávány databáze ClinVar a LOVD a literatura pro zjištění, zda byla nalezená varianta již v minulosti ve spojitosti s USH popsána.

3.9 Celoexomové sekvenování (Whole Exome Sequencing – WES)

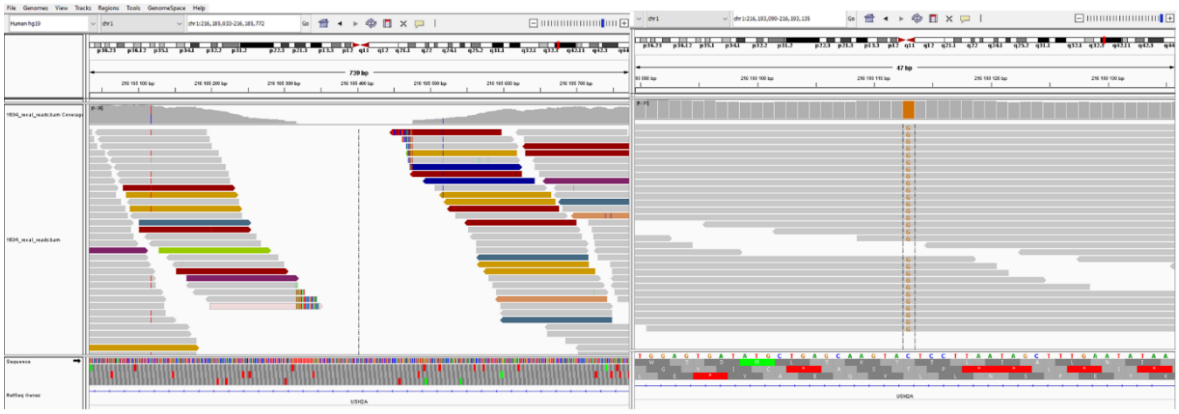
Metoda celoexomového sekvenování byla použita k odhalení mutací u pacientů, u kterých byla cíleným screeningem vybraných exonů *USH2A* nalezena pouze jedna patogenní varianta v heterozygotním stavu nebo nebyla nalezena žádná.

Celoexomové sekvenování bylo zajištěno firmou Novogene Hong Kong a bylo provedeno na analyzátoru HiSeq 4000 firmy Illumina. Pomocí SureSelectXT Linrary Prep Kitu byla připravena DNA knihovna a samotná sekvenace byla provedena pomocí kitu TruSeq 3000/4000 SBS. Výsledky analýzy byly nejprve ve formátu tzv. hrubých dat pro následnou analýzu, následně byly firmou pomocí HCS (HiSeq Control Software v3.3) programu přezkoumány a následně dodatečně ověřeny analytickým softwarem RTA (Real Time Analysis v2.7.3). V programu Novoalign firmy NovoCraft byly dále mapovány sekvence ve formátu FASTAQ na sekvenci lidského referenčního genomu. Takto mapované sekvence byly následně konvertovány do formátu BAM. Výsledná data byla zaznamenána v tabulce spolu s informacemi o pozici varianty, informacemi o kvalitě přečtení, typu varianty i její anotaci a frekvenci v databázi gnomAD. Data byla rovněž prohlížena v programu IGV2.3 (Integrative Genomics Viewer).

3.10 Celogenomové sekvenování (Whole Genome Sequencing – WGS)

WGS umožňuje komplexní analýzu sekvence celé DNA buňky. Jedná se tedy o metodu, díky které mohou být identifikované dosud neznámé mechanizmy, varianty mimo kódující oblasti genů a pod. Tato metoda byla použita u pacienta nesoucí homozygotní mutaci c.11864G>A; p.(Trp3955*) v genu *USH2A* k ověření možného sdíleného haplotypu, u pacientů k mapování oblastí zlomu a pacientů, u nichž nebyly nalezeny patogenní varianty pomocí Sangerova sekvenování a WES.

WGS bylo provedeno rovněž firmou Novogene Hong Kong na analyzátoru HiSeq 4000 firmy Illumina. Získané celogenomové sekvence byly manuálně analyzovány pomocí programu IGV2.3 (Robinson et al, 2011). Tento vizualizační nástroj umožňuje analýzu velkých genomických datových souborů. Vizualizace takovéto analýzy je znázorněno na Obrázku 11.



Obrázek 11: *Analýza sekvencí v programu IGV2.3.*

3.11 Hodnocení nalezených variant

Hodnocení významu nalezených variant bylo provedeno pomocí literatury, databází a predikčních programů.

3.11.1 Hodnocení nalezených variant pomocí literatury

Zda byla nalezená varianta již dříve zachycena u pacientů s Usherovým syndromem či pacientů se stejnými obtížemi bylo ověřeno pomocí databáze PubMed (dostupné na https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

3.11.2 Hodnocení nalezených variant pomocí databází

Zda se jedná o kauzální varianty bylo zjišťováno rovněž podle záznamu ve specializovaných databázích ClinVar a LOVD. Součástí výsledku databáze ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) bylo klinické hodnocení varianty, její popis, pozice, rozsah a molekulární důsledek mutace. Rovněž jsou uvedeny publikace, kde byla varianta popsána a jakým způsobem byla vyhodnocena. Při vyhledávání v databázi LOVD Whole genome datasets (https://www.lovd.nl/) bylo zadání pozice varianty na chromozomu, díky čemuž bylo možné zjistit, zda se v tomto místě nacházejí mutace častěji (hot-spot místa) či nikoliv. Součástí výsledku bylo hodnocení varianty, odkaz na publikace či popis varianty. Bylo také uvedeno, kolikrát byla vyhledávaná mutace opublikována.

3.11.3 Hodnocení variant pomocí predikčních programů

Data získaná WES a WGS byla analyzována v tabulkách či programu IGV2.3. Nalezené potencionálně patogenní varianty (varianty s nejasnou klasifikací, dříve nezachycené, s nízkou frekvencí, v blízkosti místa sestřihu) byly analyzovány pomocí online programů.

Pro predikce missence mutací byly použity programy SIFT (provean.jcvi.org/protein_batch_submit.php?species=human), MutationTasting (mutationtaster.org/), Polyphen2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), SNP&GO (snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html) a Provean (provean.jcvi.org/seq_submit.php).

Pro predikci sestřihových variant (intronových a exonových mutací vedoucích potenciálně k sestřihovým defektům) byly použity online dostupné programy Human Splicing Finder 3.1 a MaxEntScan (umd.be/HSF3/HSF.shtml), NetGene2 (cbs.dtu.dk/services/NetGene2/) a NNSPLICE (fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Tyto predikční programy potenciálnímu místu sestřihu přiřazují skóre s jakou pravděpodobností dochází v tomto místu k sestřihu. Toto skóre se může zvyšovat (a zvyšuje se tak pravděpodobnost sestřihu), zůstat beze změny (tedy nedochází ke změně pravděpodobnosti sestřihu) nebo snižovat (a místo sestřihu tak může zanikat). Jako signifikantní pro poruchu sestřihu je rozdíl skóre mezi mutovanou a standardní alelou o větší než 10 % pro HSF a větší než 30 % pro MaxEntScan a NNSPLICE (Desmet et al., 2009).

Dalším nástrojem na hodnocení potenciální patogenity mutace byl online nástroj dostupný na https://www.medschool.umaryland.edu/Genetic_Variant_Interpretation_Tooll.html. Tento program umožnuje rychlou interpretaci na základě standardů a pokynů „American College of Medical Genetics and Genomics“ (Richards et al., 2015).

3.11.4 Klasifikace nalezených variant na základě segregační analýzy

U variant s nejasnou klasifikací byla provedena segregační analýza. Byli vyšetřeni rodiče či jiní příbuzní pacienta.

3.12 Mapování delece po WGS

U dvou pacientů byla po analýze sekvencí v programu IGV2.3 nalezena delece. K přesnému určení rozsahu těchto delecí byly pomocí programu Primer3 navrženy primery komplementární k vytipovaným hraničním oblastem delece. Poté byla provedena PCR podle uvedeného schématu v Tabulce 5 (Kapitola 3.5). Na místo 10 µl DreamTaq Green PCR Master Mixu bylo použito 10 µl.

Vzorky po PCR byly pročištěny výše zmíněným postupem a odeslány na sekvenování.

3.13 Tvorba rodokmenů

Rodokmeny pacientů byly vytvořeny pomocí programu HaploPainter (Thiele&Nurnberg, 2005) za použití standardních symbolů, které jsou používané v genealogické nomenklatuře.

3.14 Haplotypová analýza

Na základě výstupu WGS výchozího pacienta s homozygotní mutací c.11864G>A; p.(Trp3955*) v *USH2A* byly vytipovány homozygotní varianty s nízkou frekvencí výskytu. U pacientů nesoucích stejnou mutaci (Tabulka 6) byla poté pomocí přímého sekvenování dle Sangera provedena haplotypová analýza, tedy se sledovala distribuce těchto variant (Tabulka 7).

Tabulka 6: *Soubor pacient pro haplotypovou analýzu. Zkratkou hom je označen homozygot, zkratkou het pak heterozygot pro variantu USH2A: c.11864G>A; p.(Trp3955*).*

ID pacienta	M	B	F	N	O	P	Q	R	S
Pohlaví	Žena	Žena	Žena	Žena	Muž	Muž	Muž	Žena	Žena
Zygozita	Hom	Het	Het	Hom	Hom	Het	Het	Het	Het
Věk pacienta	27	15	13	34	65	77	64	52	45

Pacienti s variantou c.11864G>A; p.(Trp3955*) zařazeni do souboru, u kterého byla provedena haplotypová analýza. Věk, pohlaví a zygozita těchto pacientů jsou zaneseny v Tabulce 6.

Tabulka 7: *Testované SNP vybrané na základě výsledků WGS probandky M.*

Pozice v genomu	SNP	WT alela	MUT alela	Frekvence (gnomAD)	Označení
chr1:214,350,124	rs12123993	C	T	0,0838	**H1**
chr1:214,389,756	rs77088565	G	T	0,0730	**H2**
chr1:214,411,966	rs945499142	G	T	0,0006	**H3**
chr1:214,462,995	rs893926021	T	C	0,0006	**H4**
chr1:214,526,142	rs938555978	G	A	0,0006	**H5**
chr1:214,529,838	rs184046469	G	A	0,0060	**H6**
chr1:214,696,278	rs145898961	G	A	0,0034	**H7**
chr1:214,710,700	rs144884754	G	A	0,0033	**H8**
chr1:214,733,052	rs141835813	T	C	0,0033	**H9**
chr1:214,753,790	rs141451487	T	C	0,0069	**H10**
chr1:214,773,161	rs144855727	T	C	0,0720	**H11**
chr1:214,774,210	rs11120366	A	T	0,0303	**H12**
chr1:214,796,211	rs145115553	A	G	0,0083	**H13**
chr1:214,813,782	rs3795524	A	G	0,0811	**H14**
chr1:214,819,328	rs3748695	G	A	0,0816	**H15**
chr1:214,830,252	rs181019579	G	T	0,0024	**H16**
chr1:214,830,253	rs186175358	A	T	0,0024	**H17**
chr1:214,838,417	rs190516553	G	A	0,0023	**H18**
chr1:215,037,766	rs77309733	G	A	0,0091	**H19**
chr1:215,049,286	rs7547989	T	C	0,1127	**H20**
chr1:215,065,401	rs114198802	A	G	0,0982	**H21**
chr1:215,128,241	rs61818238	C	T	0,0960	**H22**
chr1:215,183,687	rs61819980	G	A	0,0658	**H23**
chr1:215,218,139	rs11590918	T	C	0,0770	**H24**
chr1:215,403,171	rs34938215	C	A	0,1417	**H25**
chr1:215,419,671	rs10494996	G	A	0,1422	**H26**
chr1: 215,854,279	rs201207331	G	-	0,0056	**H27**
chr1:215,854,280	rs543281621	C	T	0,0056	**H28**
chr1:215,864,830	rs912190299	C	T	0,0003	**H29**
chr1:215,866,300	rs541068132	T	C	0,0004	**H30**
chr1:215,901,924	rs59113488	-	(CA)4	-	**H31**
chr1:215,918,842	rs34420029	T	C	0,2748	**H32**
chr1:215,938,022	rs12748877	A	C	0,0950	**H33**

4 Výsledky

Při vypracování diplomové práce bylo v Laboratoři pro studium vzácných nemocí Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze molekulárně geneticky vyšetřeno 20 probandů (viz. Tabulka 8) a jejich rodiny. Pacienti, kteří byli nositeli varianty c.11864G>A v genu *USH2A*, byli podrobeni haplotypové analýze. Analyzovaná DNA byla izolována z venózní krve (viz Kapitola 3.2) odebrané pacientům na Oční klinice VFN a 1. LF UK, případně ze vzorků slin. Koncentrace izolované DNA jsou zaneseny do Tabulky 8.

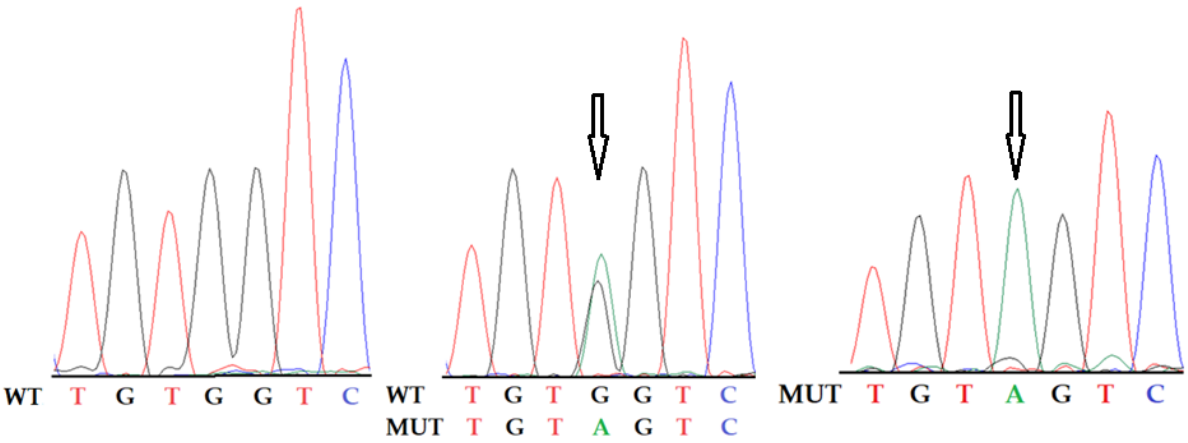
Tabulka 8: *Koncentrace a čistota DNA pacientů s Usherovým syndromem*

ID probanda	Koncentrace DNA ng/µl	Čistota 260/280
A	663,5	1,85
B	111,04	1,84
C	1163,69	1,85
D	249,4	1,82
E	287,27	1,83
F	386,8	1,86
G	456,88	1,79
H	934,04	1,89
CH	512,22	1,82
I	407,5	1,86
J	515,21	1,85
K	1027,62	1,86
L	188,56	1,91
M	1033,72	1,85
N	215,29	1,88
O	954,83	1,85
P	1805,19	1,84
Q	213,77	1,77
R	314,94	1,79
S	671,55	1,79

4.1 Molekulárně genetická analýza

4.1.1 Testování nejčastější mutace

Pacientům s diagnózou Usherova syndromu byl nejprve proveden cílený screening exonu 61 genu *USH2A (*viz. Kapitola 3.4). Na přítomnost frekventované mutace c.11864G>A; p.(Trp3955*) v exonu 61 *USH2A* genu bylo otestováno 20 pacientů (Obrázek 12), 11 z nich bylo negativních, 3 byli homozygoti a 7 pacientů bylo heterozygotních.



Obrázek 12: *Sekvence analyzované při screeningu exonu 61 získané Sangerovým sekvenováním. WT je divoká alela (referenční sekvence), MUT je alela mutovaná.*

4.1.2 Molekulárně genetická analýza probanda A

Pacient byl nejprve vyšetřován cíleným screeningem exonu 61, po negativním výsledku testu byl vzorek s jeho DNA odeslán na WES. V excelové tabulce obsahující data z WES (Obrázek 13) byly vyfiltrovány varianty USH genů s frekvencí menší než 0,005.

chr_	chr_start	chr_end	ref_ba	alt_ba	hom_het	region	gene	change	annotation	dbSNP_138	gnomAD_tot	clinvarClinical
1	**216073487**	**216073487**	**A**	**-**	**het**	**exonic**	**USH2A**	**frameshift del**	**USH2A:NM_2**	**rs751176116**	**4,07E-06**	**Pathogenic**
1	**215853720**	**215853720**	**T**	**C**	**het**	**splicing**	**USH2A**	**-**	**-**	**rs397517978**	**8,17E-05**	**Pathogenic**
9	117169021	117169021	G	A	het	exonic	WHRN	nonsynonymous	WHRN:NM_0	rs150146590	0,000253055	
19	17366111	17366112	AA	-	het	intronic	USHBP	-	-	rs1227593144	0,00028806	
10	73512556	73512556	C	T	het	intronic	CDH23;	-	-	rs187991087	0,000549664	
10	73570217	73570217	C	T	het	intronic	CDH23	-	-	rs111583276	0,001281228	Conflicting interpretations
11	17544865	17544865	C	T	het	intronic	USH1C	-	-	rs189575414	0,001897958	
1	215853416	215853416	C	T	het	intronic	USH2A	-	-	rs55895740	0,002132058	
1	215853692	215853692	G	A	het	exonic	USH2A	synonymous SN	USH2A:NM_2	rs55921307	0,002930968	Benign/Likely benign
10	73511397	73511397	C	T	het	intronic	CDH23;	-	-	rs183458408	0,002934602	

Obrázek 13: *Data z WES v tabulce Excel, červeně jsou znázorněny nalezené varianty. Pro jejich patogenicitu svědčí i nízká frekvence výskytu uvedená v 15. sloupci – gnomAD_total.*

Nalezené varianty USH genů s frekvencí menší než 0,005 jsou zaznamenány v Tabulce 9.

Tabulka 9: *Vzácné varianty s frekvencí nižší než 0,5 % u probanda A získané pomocí WES.*

Proband A							
Gen	**DNA level**	**Protein level**	**SNP**	**Oblast**	**Genotyp**	**Frekvence**	**Klinický význam**
USH2A	**c.7524del**	p.(Arg2509Glyfs*19)	**rs751176116**	**Exon**	**Heterozygot**	**4,07 x 10^{-6}**	**Patogenní**
	c.12067-2A>G	**-**	**rs397517978**	**Oblast sestřihu**	**Heterozygot**	**8,17 x 10^{-5}**	**Patogenní**
	c.12093C>T	p.(=)	rs55921307	Exon	Heterozygot	2,93 x 10^{-3}	Benigní
	c.12294+75G>A	-	rs55895740	Intron	Heterozygot	2,13 x 10^{-3}	Bez dat
WHRN	c.1850C>T	p.(Ser617Leu)	rs150146590	Exon	Heterozygot	2,53 x 10^{-4}	Nejistý význam
CDH23	c.4845+10878C>A	-	rs187991087	Intron	Heterozygot	5,50 x 10^{-4}	Bez dat
	c.8980-12C>T	-	rs111583276	Intron	Heterozygot	1,28 x 10^{-3}	Nejistý význam
	c.4845+9719C>T		rs183458408	Intron	Heterozygot	2,93 x 10^{-3}	Bez dat
USH1C	c.820-51G>A		rs189575414	Intron	Heterozygot	1,90 x 10^{-3}	Bez dat

Klinický význam variant byl doplněn na základě dat ClinVar (dostupné na https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/). Nalezené vzácné varianty s velmi nízkou frekvencí rs751176116 a rs397517978 (vyznačeny v Tabulce 9 a na Obrázku 14) byly vyhodnocené jako patogenní a jejich patogenita byla ověřena pomocí predikčních programů uvedených v Kapitole 3.11.3. Výsledky analýz jsou zaneseny v Tabulce 10 a 11.

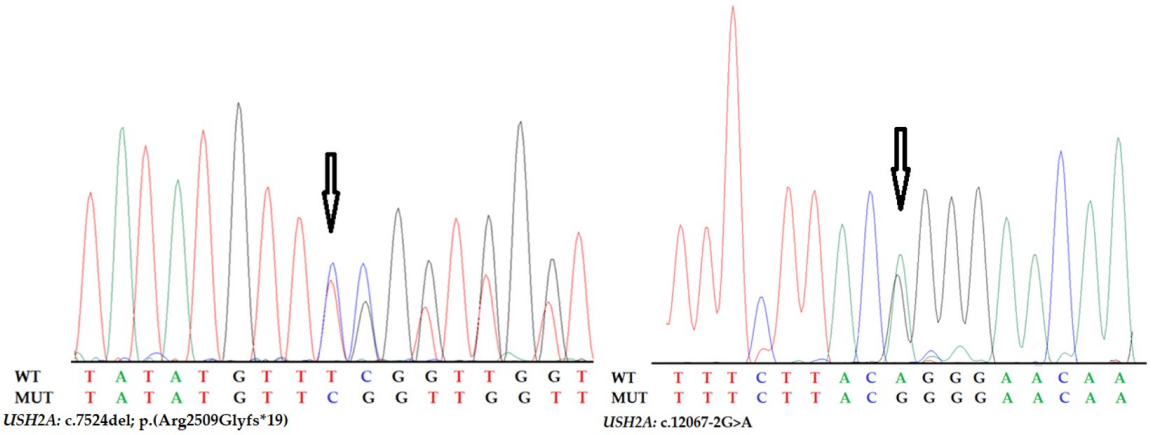
Tabulka 10: *Predikce nalezené varianty USH2A: c.7524del; p.(Arg2509Glyfs*19) u probanda A dle referenční sekvence NM_206933.3.*

DNA	Protein	SIFT	PolyPhen	Mutation taster	SNP&GO	PROVEAN	Závěr
***USH2A:* c.7524del**	p.(Arg2509Glyfs*19)	Škodlivá	Pravděpodobně škodlivá	Patogenní	Patogenní	Patogenní	**Patogenní**

Tabulka 11: *Predikce nalezené varianty USH2A: c.12067-2A>G u probanda A dle referenční genomové sekvence NG_009497.1. WT = divoká alela, MUT = mutovaná alela*

DNA	HSF (0-100)			NetGene2	NNSplice (0-1)			MaxEntScan			Celkové vyhodnocení varianty
	WT	MUT	Skóre varianty	Efekt mutované alely	WT	MUT	Skóre varianty	WT	MUT	Skóre varianty	
***USH2A:* c.12067-2A>G**	94,23	65,29	-30,71%	Ztráta sestřihového místa	0,95	<0,4	-60%	9,53	1,57	-83,53%	**Patogenní**

Vzhledem k robuscitě celogenomového sekvenování, jehož výsledkem je zisk velkého množství dat, bylo potřeba nalezené varianty ověřit. Ověření bylo provedeno pomocí Sangerova sekvenování cíleného na tyto konkrétní varianty. Výřez sekvencí je na Obrázku 14.



Obrázek 14: *Varianty USH2A: c.7524del; p.(Arg2509Glyfs*19)a c.12067-2G>A u probanda A analyzované pomocí Sangerova sekvenování.*

Jelikož se jednalo o pacienta ve věku 82 let, bez potomstva, nebylo možné provést segregační analýzu.

4.1.3 Molekulárně genetická analýza probandky B

U probandky B byla pomocí Sangerova sekvenování nalezena varianta c.11864G>A; p.(Trp3955*) v exonu 61 *USH2A* v heterozygotním stavu. Pro hledání další varianty bylo nejprve použito WES, po negativním nálezu byl vzorek s DNA pacientky odeslán na WGS (Obrázek 15).

chr_	chr_start	chr_end	ref_ba	alt_ba	hom_het	region	gene	change	annotation	dbSNP_138	gnomAD_total	clinvarClinical
1	216218559	216218559	T	G	het	intronic	USH2A	-	-	-	-	
1	216423487	216423487	T	G	het	intronic	USH2A	-	-	-	-	
1	**216595193**	**216595193**	**C**	**T**	**het**	**splicing**	**USH2A**	**-**		**-**	**-**	
1	**215901574**	**215901574**	**C**	**T**	**het**	**exonic**	**USH2A**	**stopgain**	**USH2A:NM_20**	**rs111033364**	**0,00011918**	**Pathogenic**
1	215864830	215864830	C	T	het	intronic	USH2A	-	-	rs912190299	0,00032281	
1	216375100	216375100	G	A	het	intronic	USH2A	-	-	rs535367110	0,00067834	
1	216092537	216092537	T	A	het	intronic	USH2A	-	-	rs192039850	0,00184430	
1	216220047	216220047	A	G	het	intronic	USH2A	-	-	rs56174811	0,00297023	
1	216242072	216242072	G	A	het	intronic	USH2A	-	-	rs12135552	0,00326333	
1	215795537	215795537	C	G	het	downstream	KCTD3;US	-	-	rs12023213	0,00330183	

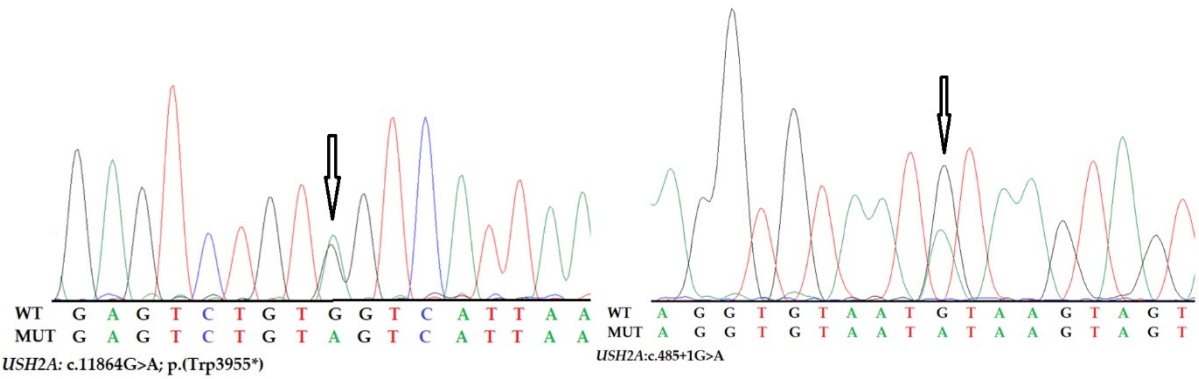
Obrázek 15: *Data WGS v tabulce Excel, červeně jsou znázorněny nalezené varianty. Pro jejich patogenicitu svědčí i nízká frekvence výskytu uvedená v 15. sloupci – gnomAD_total.*

K ověření patogenity druhé nalezené varianty byly použity predikční programy uvedené v Kapitole 3.11.3. Výsledky analýz jsou zaneseny v Tabulce 12.

Tabulka 12: *Predikce nalezené varianty USH2A: c.485+1G>A u probandky B dle referenční genomové sekvence NG_009497.1. WT = divoká alela, MUT = mutovaná alela*

Pozice	HSF (0-100)			NetGene2	NNSplice (0-1)			MaxEntScan			Celkové vyhodnocení varianty
	WT	MUT	Skóre varianty	Efekt mutované alely	WT	MUT	Skóre varianty	WT	MUT	Skóre varianty	
c.485+1G>A	88,18	61.34	-30,44%	Ztráta sestřihového místa	0,97	<0,4	-60%	8,62	0,44	-94,9%	**Patogenní**

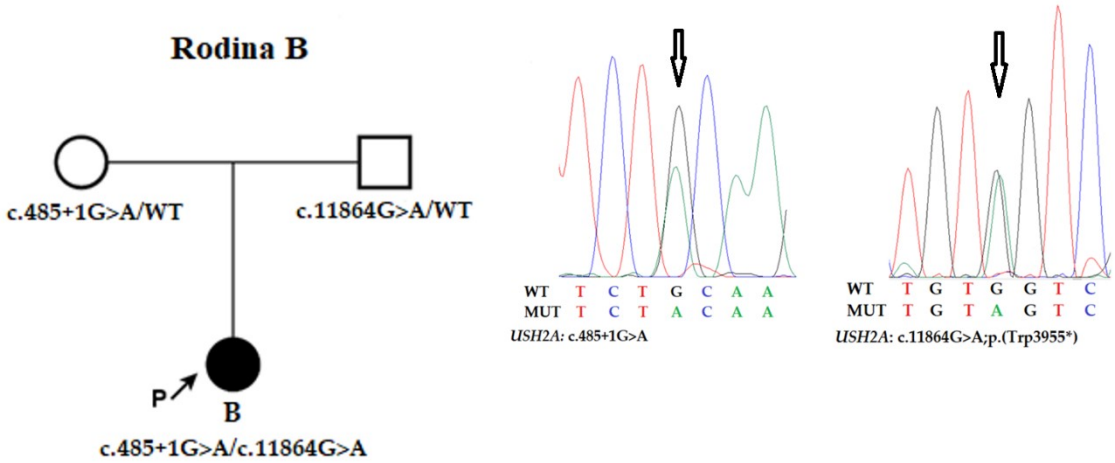
K ověření nalezených variant bylo použito Sangerovo sekvenování, výřezy ze získaných sekvencí jsou na Obrázku 16.



Obrázek 16: *Varianty c.11864G>A; p.(Trp3955*) a c.485+1G>A v genu USH2A u probandky B analyzované pomocí Sangerova sekvenování.*

- **Segregace nalezených variant v rodině probanky B**

Pro zjištění segregace nalezených variant u probandky B byla provedena segregační analýza v rodině. Vyšetřeni byli oba rodiče. Předpokladem bylo zdědění každé z mutovaných alel od jiného rodiče, jelikož ani u jednoho z rodičů nebylo onemocnění diagnostikováno. Sangerovým sekvenováním došlo k potvrzení tohoto předpokladu (Obrázek 17). U matky byla v heterozygotním stavu nalezena mutace *USH2A:* c.485+1G>A, u otce byla zjištěna mutace *USH2A*: c.11864G>A; p.(Trp3955*). Segregační analýza tedy prokázala trans polohu obou variant.



Obrázek 17: *Segregace nalezených variant v rodině probandky B. Mutace USH2A: c.485+1G>A (chr1:216595193G>A) detekována u matky a mutace USH2A: c.11864G>A; p.(Trp3955*) nalezená u otce.*

4.1.4 Molekulárně genetická analýza probandky C

Screening exonu 61 a Sangerovo sekvenování exonů *USH2A* genu byly negativní, proto byla pacientka odeslána na WES. Nalezené vzácné varianty s frekvencí pod 0,5 % jsou zapsány v Tabulce 13.

Tabulka 13: *Vzácné intronové varianty u probandky C získané pomocí WES.*

Gen	DNA level	Protein level	SNP	Oblast	Genotyp	Frekvence	Klinický význam
WHRN	c.618+125_618+126del	-	rs1245718936	Intron	Heterozygot	-	Bez dat
USHIC	c.1591-41C>T	-	rs200004245	Intron	Heterozygot	$1{,}80 \times 10^{-3}$	Bez dat
CIB2	c.52-68C>T	-	rs576311744	Intron	Heterozygot	$1{,}94 \times 10^{-4}$	Bez dat

Pro nalezené varianty byla provedena predikce, avšak ani u jedné varianty nebyl prokázán patogenní efekt mutované alely (viz. Tabulka 14).

Tabulka 14: *Predikce vzácných intronových variant u probandky C dle dle referenční genomových sekvencí: NG_016700.1 pro WHRN, NG_011883.2 pro USH1C a NG_033006.1 pro CIB2. WT = divoká alela, MUT = mutovaná alela*

DNA	HSF (0-100)			NetGene2	NNSplice (0-1)			MaxEntScan			Celkové vyhodnocení varianty
	WT	MUT	Skóre varianty	Efekt mutované alely	WT	MUT	Skóre varianty	WT	MUT	Skóre varianty	
WHRN: **c.618+125_618+126del**	Bez rozdílu										Benigní
USH1C: **c.1591-41C>T**	70,91	70,3	-0,86%	Bez rozdílu	Bez rozdílu			Bez rozdílu			Benigní
CIB2: **c.52-68C>T**	76,14	75,48	-0,87%	Bez rozdílu	Ztráta sestřihového místa			Bez rozdílu			Benigní

Při další analýze dat byla nalezena exonová varianta c.1816C>T; p.(Pro606Ser) v genu *COL9A1* kódující kolagen (viz. Tabulka 15 a Obrázek 18).

chr	chr_start	chr_end	ref_b	alt_b	hom_het	region	gene	change	annotation	dbSNP_138	gnomAD_tot	clinvarClinical
6	70961967	70961967	G	A	het	exonic	COL9A1	nonsynonymou	COL9A1:NM_	rs773380068	0,000007222	Uncertain significance
21	47423309	47423309	G	A	het	exonic	COL6A1	synonymous SN\	COL6A1:NM_(	rs146662894	0,000963055	Conflicting interpretations
21	46924389	46924389	C	T	het	exonic	COL18A	synonymous SN\	COL18A1:NM_	rs11544971	0,01348334231	Uncertain significance

Obrázek 18: *Analýza dat získaných celoexomovým sekvenováním a detekce mutace v genu COL9A1 u probandky C.*

Tabulka 15: *Exonová varianta genu COL9A1 nalezena u probandky C.*

Gen	DNA level	Protein level	SNP	Oblast	Genotyp	Frekvence	Klinický význam
COL9A1	**c.1816C>T**	**p.(Pro606Ser)**	**rs773380068**	**Exon**	**Heterozygot**	**7,22 x 10^{-6}**	**Nejistý význam**

Mutace genu *COL9A1* jsou asociované s mnohočetnou epifyzární dysplázií či Sticklerovým syndromem (Van Camp et al., 2006). U této pacientky byl tedy chybně diagnostikován Usherův syndrom, jelikož Sticklerův syndrom je také spojen s poruchami sítnice a hluchotou (Kuchynka, 2007).

4.1.5 Molekulárně genetická analýza probandky D

U probandky D byly výsledky screeningu exonu 61 negativní, vzorek DNA byl tedy odeslán na WES. Pomocí WES byly u pacientky nalezeny 2 exonové varianty: frekventovaná USH varianta *USH2A:* c.2299delG a pravděpodobně patogenní varianta *USH2A:* c.4714C>T (viz. Tabulka 16), pro kterou byla následně provedena predikce (Tabulka 17).

Tabulka 16: *Exonové varianty s frekvencí menší než 0,5 % nalezené u probandky D pomocí WES.*

Gen	DNA level	Protein level	SNP	Oblast	Genotyp	Frekvence	Klinický význam
USH2A	**c.2299del**	**p.(Glu767Serfs*21)**	**rs80338903**	**Exon**	**Heterozygot**	**7,02 x 10^{-4}**	**Patogenní**
	c.4714C>T	**p.(Leu1572Phe)**	**rs111033333**	**Exon**	**Heterozygot**	**7,28x 10^{-4}**	**Nejednotná klasifikace**

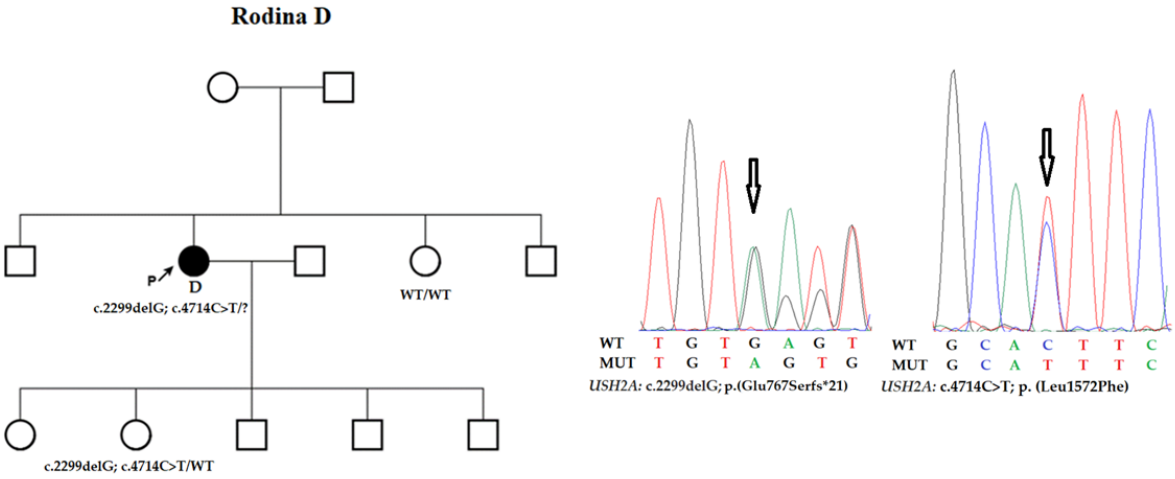
Tabulka 17: *Predikce exonové varianty USH2A: c.4714C>T; p.(Leu1572Phe) u probandky D podle referenční sekvence NM_206933.3.*

DNA	Protein	SIFT	PolyPhen	Mutation taster	SNP&GO	PROVEAN	Závěr
USH2A: **c.4714C>T**	p.(Leu1572Phe)	Škodlivá	Pravděpodobně škodlivá	Patogenní	Patogenní	Neutrální	**Pravděpodobně patogenní**

Mutace *USH2A:* c.2299del; p.(Glu767Serfs*21) je součástí mnoha publikací a je nejčastější mutací u USH pacientů. Rovněž v databázích LOVD a ClinVar je klasifikována jako patogenní. Varianta *USH2A*: c.4714C>T; p.(Leu1572Phe) byla pomocí predikčních programů vyhodnocena jako varianta pravděpodobně patogenní, zatímco v databázi ClinVar je uváděna jako varianta s nejednotnou klasifikací. V LOVD je zaznamenána jako varianta patogenní. Pro potvrzení kauzality obou variant byla provedena segregační analýza u dcery a sestry probandky.

- **Segregace nalezených variant v rodině probandky D**

Při segregační analýze byly vyšetřeny sestra a dcera pacientky D. Obě varianty genu *USH2A* c.4714C>T (nejasná klasifikace) a c.2299delG byly nalezeny u nepostižené dcery probandky. Na základě segregační analýzy byla určena cis-pozice těchto variant na chromozomu 1. U sestry probandky pak nebyla detekována žádná z exonových variant.



Obrázek 19: *Segregace nalezených variant v rodině probandky D. Dcera je nositelkou mutací c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21) a c.4714C>T; p.(Leu1572Phe).*

K hledání další možné kauzální varianty bylo použito WGS, s jehož pomocí bylo nalezeno 13 vzácných intronových variant genu *USH2A* (viz. Tabulka 18)

Tabulka 18: *Vzácné intronové varianty genu USH2A nalezené u probandky D pomocí WGS*

Gen	DNA level	Protein level	SNP	Oblast	Genotyp	Frekvence	Klinický význam
USH2A	c.1550+173A>T	-	rs578164684	Intron	Heterozygot	3,51 x 10^{-4}	Bez dat
	c.651+1683_651+1684insG	-	rs886553512	Intron	Heterozygot	5,50 x 10^{-4}	
	c.2993+5928T>C	-	rs554506986	Intron	Heterozygot	2,58 x 10^{-4}	
	c.1971+16365G>A	-	rs574312582	Intron	Heterozygot	1,29 x 10^{-4}	
	c.652-3420C>T	-	rs548009718	Intron	Heterozygot	5,81 x 10^{-4}	
	c.651+22049G>T	-	rs182099878	Intron	Heterozygot	2,26 x 10^{-4}	
	c.651+17099C>T	-	rs190080794	Intron	Heterozygot	5,50 x 10^{-4}	
	c.651+17098G>T	-	rs182729272	Intron	Heterozygot	5,50 x 10^{-4}	
	c.651+14751T>A	-	rs144477820	Intron	Heterozygot	5,49 x 10^{-4}	
	c.651+13064C>G	-	rs186000324	Intron	Heterozygot	5,49 x 10^{-4}	
	c.651+9826C>G	-	rs547393588	Intron	Heterozygot	1,29 x 10^{-4}	
	c.651+9496T>C	-	rs185974809	Intron	Heterozygot	5,49 x 10^{-4}	
	c.485+958T>G	-	rs141030511	Intron	Heterozygot	5,49 x 10^{-4}	

Pro vzácné intronové varianty byla rovněž provedeny predikce (Tabulka 19), jejichž výsledky nevedly k jasnému potvrzení či vyvrácení patogenity.

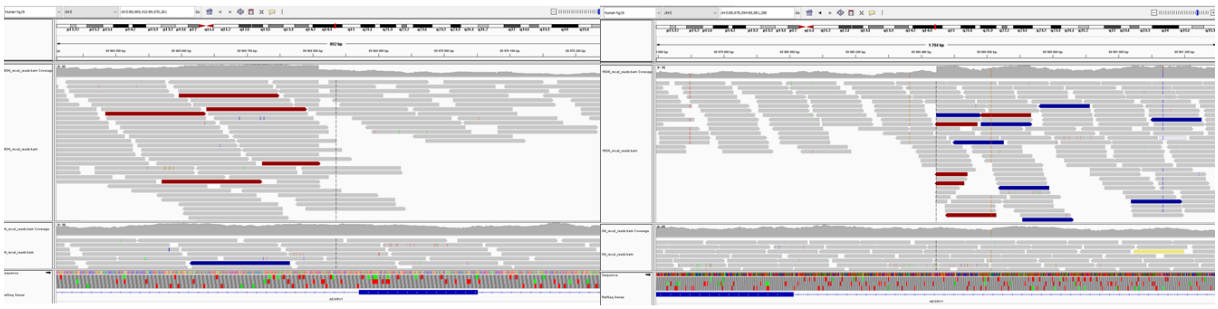
Tabulka 19: *Predikce vzácných intronových variant u probandky D dle referenční genomové sekvence NG_009497.1.*

DNA level	HSF (0-100)			NetGene2	NNSPLICE (0-1)			MaxEntScan			Klasifikace
	WT	MUT	Skóre varianty	Efekt mutované alely	WT	MUT	Skóre varianty	WT	MUT	Skóre varianty	
***USH2A:* c.1971+16365G>A**	79,4	50,46	-36,45	Beze změny	Beze změny			Bez výsledků			**Nejednotná klasifikace**
***USH2A:* c.2993+5928T>C**	Mutace nemá pravděpodobně vliv na sestřih			Beze změny	Beze změny			Bez výsledků			Neutrální
***USH2A:* c.652-3420C>T**	84.12	85.38	+1.5%	Beze změny	Beze změny			Bez výsledků			Neutrální
***USH2A:* c.651+22049G>T**	72.9	72.71	-0.26%	Beze změny	Beze změny			3.39	3.6	+6.19%	Neutrální
***USH2A:* c.651+17099C>T**	43.14	69.98	+62.22%	Beze změny	Beze změny			Bez výsledků			**Nejednotná klasifikace**
***USH2A:* c.651+17098G>T**	75.01	62.7	-16.41%	Beze změny	Beze změny			Bez výsledků			**Nejednotná klasifikace**
***USH2A:* c.651+14751T>A**	Mutace nemá pravděpodobně vliv na sestřih			Beze změny	Beze změny			Bez výsledků			Neutrální
***USH2A:* c.651+13064C>G**	41.5	68.33	+64.65%	Beze změny	Beze změny			Bez výsledků			**Nejednotná klasifikace**
***USH2A:* c.651+9826C>G**	38.29	65.13	+70.1%	Beze změny	Beze změny			Bez výsledků			**Nejednotná klasifikace**
***USH2A:* c.651+9496T>C**	9.27	9.49	+2.37%	Beze změny	Ztráta akceptorového místa sestřihu			Bez výsledků			**Nejednotná klasifikace**
***USH2A:* c.485+958T>G**	5.55	4.82	-13.15%	Beze změny	0.43	0.55	+12%	Bez výsledků			**Nejednotná klasifikace**
***USH2A:* c.1550+173A>T**	Mutace nemá pravděpodobně vliv na sestřih			Beze změny	Beze změny			Bez výsledků			Neutrální
***USH2A:* c.651+1683_651+1684insG**	36.51	67	+83.51%	Beze změny	Beze změny			Bez výsledků			**Nejednotná klasifikace**

Vzhledem k diagnóze Usherova syndromu a vzhledem k výskytu nalezených potencionálně patogenních variant u nepostižené dcery lze tedy předpokládat, že alespoň jedna z intronových variant je varianta způsobující onemocnění. Umístění těchto intronových variant naznačuje možnost vzniku pseudoexonu.

4.1.6 Molekulárně genetická analýza probandky E

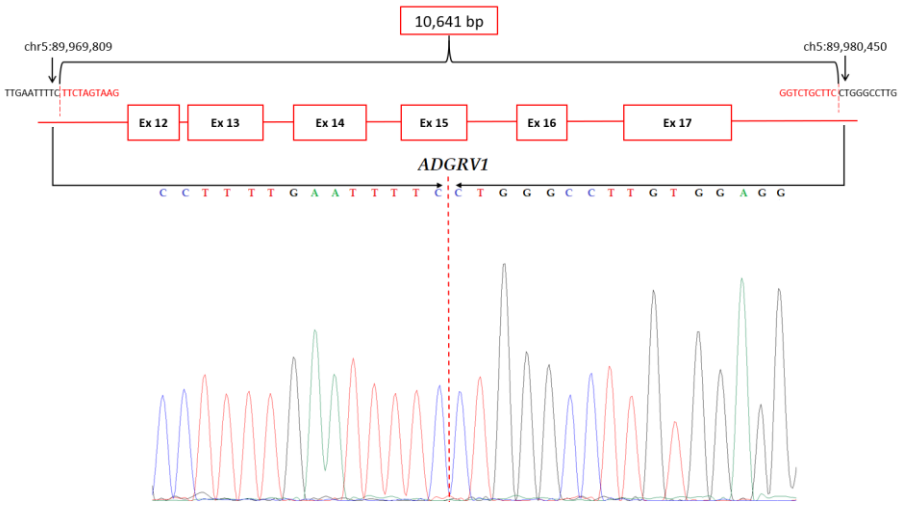
U probandky E byl proveden standardní postup vyšetření: vyšetření exonů genu *USH2A* a screening exonu 61 genu *USH2A* a následná WES analýza. Na základě WES byla nalezena varianta v genu *ADGRV1* (referenční sekvence NM_032119.4*)*: c.11954_11955insTGC; p.(Ile3985_Glu3986insAla) v heterozygotním stavu. Vzorek s DNA byl následně odeslán na WGS. Získané celogenomové sekvence byly analyzovány v programu IGV2.3 (viz. Kapitola 3.10), přičemž byla nalezena delece v genu *ADGRV1*. Při manuální analýze byly predikovány oblasti zlomu (Obrázek 20).



Obrázek 20: *Analýza celogenomového sekvenování a predikce oblasti zlomů u probandky E v programu IGV2.3.*

Po predikci oblasti zlomů byly pomocí programu Primer3 (Untergasser et al., 2012; Koressaar & Remm, 2007) navrženy vhodné primery (viz. Kapitola 3.4) pro následující PCR. Jelikož se jednalo o delší amplikony, byl pro PCR použit LongRange mix (viz. Kapitola 3.5). Sangerovým sekvenováním byla získána DNA sekvence, po jejíž manuální analýze bylo určeno přesné místo zlomu.

Rozsah delece je znázorněn na schématu níže (Obrázek 21). Shrnutí výsledků mapování bodů zlomu u probandky E, jako rozsah, začátek a konec delecí, je zapsáno v Tabulce 20.



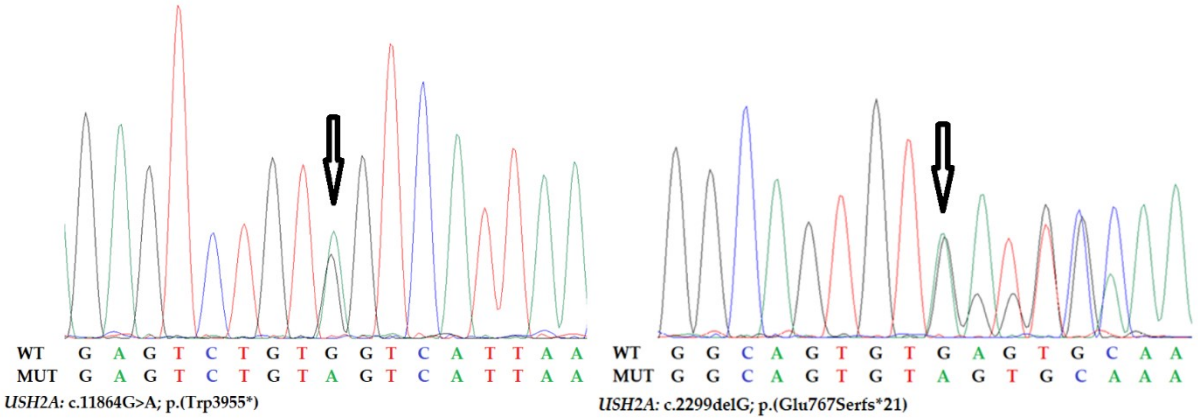
Obrázek 21: *Znázornění rozsahu delece genu ADGRV1 včetně sekvencí, probandka E.*

Tabulka 20: *Shrnutí výsledků mapování breakpointů u probandky E*

Pacientka	Gen	Začátek	Konec	Rozsah delece
E	*ADGRV1*	chr5:89,969,809	chr5:89,980,450	10 641 bp

4.1.7 Molekulárně genetická analýza probandky F

U probandky F byla na základě cíleného screeningu exonu 61 odhalena mutace *USH2A*: c.11864G>A; p.(Trp3955*) v heterozygotním stavu. Pomocí testování exonu 13 genu *USH2A* mutací byla odhalena mutace *USH2A:* c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21) (viz. Obrázek 22). Obě nalezené mutace jsou nejčastějšími mutacemi genu *USH2A* v Evropě.

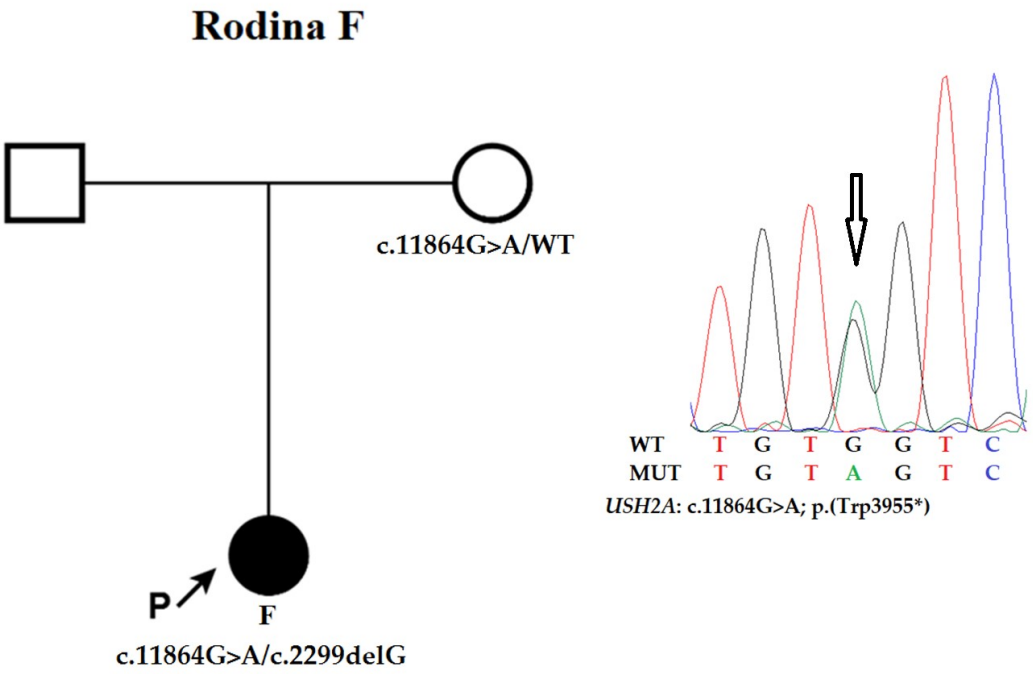


Obrázek 22: *Nalezené varianty USH2A: c.11864G>A; p.(Trp3955*) a USH2A: c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21) u probandky F.*

Nonsence mutace *USH2A:* c.11864G>A; p.(Trp3955*) a *USH2A:* c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21) způsobující posun čtecího rámce patří mezi nejčastěji zachycené mutace u evropských pacientů s Usherovým syndromem (viz. 1.3.2 Prevalentní mutace USH v Evropě). Vzhledem k časté přítomnosti u USH pacientů a k tomu, že klinický nález pacientky odpovídá diagnóze Usherova syndromu, jsou tyto detekované mutace považovány za patogenní.

- **Segregace nalezených variant v rodině probandky F**

Při segregační analýze byla testována matka pacientky, u které byla nalezena mutace *USH2A*: c.11864G>A; p.(Trp3955*) v heterozygotním stavu, v souladu s autosomálně recesivní dědičností onemocnění (Obrázek 23).



Obrázek 23: *Segregace nalezených variant v rodině pacientky F a výřez sekvence s mutací USH2A: c.11864G>A; p.(Trp3955*) zachycenou u matky.*

Otec pacientky nebyl testován. Vzhledem k autosomálně recesivní dědičnosti onemocnění a výskytu dvou mutovaných alel u pacientky je předpokladem, že otec je heterozygotem pro druhou nalezenou variantu varianta *USH2A:* c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21) nebo vznikla *de novo*.

4.1.8 Molekulárně genetická analýza probandky G

Pacientka G byla nejprve vyšetřována cíleným screeningem exonu 61 a také u ní bylo provedeno Sangerovo sekvenování exonů *USH2A* genu. Na základě negativních výsledků byl vzorek DNA odeslán na WES. V excelové tabulce obsahující data z WES byly vyfiltrovány varianty USH genů s frekvencí menší než 0,005. Výsledky jsou vyneseny v Tabulce 21.

Tabulka 21: *Exonové varianty USH genů s frekvencí menší než 0,5 % u probandky G.*

Gen	DNA level	Protein level	SNP	Oblast	Genotyp	Frekvence	Klinický význam
USH2A	**c.12234_12235del**	**p.(Asn4079Trpfs*19)**	**rs398124618**	**Exon**	**Heterozygot**	**8,13x10^{-6}**	**Patogenní**
	c.5414_5416del	p.(Ile1805del)	-	Exon	Heterozygot	-	Bez dat
ADGRV1	c.12181G>T	p.(Val4061Phe)	rs200816323	Exon	Heterozygot	7,05x10^{-4}	Nejistý význam
	c.7134-190T>G	-	rs189399904	Intron	Heterozygot	2,10x10^{-3}	Bez dat
MYO7A	c.4153-236_4153-235insT	-	rs572654675	Intron	Heterozygot	1,48x10^{-3}	Bez dat
PCDH15	c.3232+252C>T	-	rs45563941	Intron	Heterozygot	2,94x10^{-3}	Bez dat

Byla nalezena 1 patogenní varianta *USH2A:* c.12234_12235del; p.(Asn4079Trpfs*19) a dalších 5 variant s nejasným významem. Nejprve byly testovány 2 exonové varianty (1 genu *USH2A* a 1 genu *ADGRV1*) pomocí predikčních programů (viz. Kapitola 3.11.3). Pro predikci in-frame delece genu *USH2A* byly použity online predikční programy podle (Douville et al., 2016). Vzhledem k omezenému množství on-line predikčních programů pro in-frame delece, není predikce varianty c.5414_5416del dostatečná. Výsledky testování jsou zaznamenány v Tabulce 22 a 23.

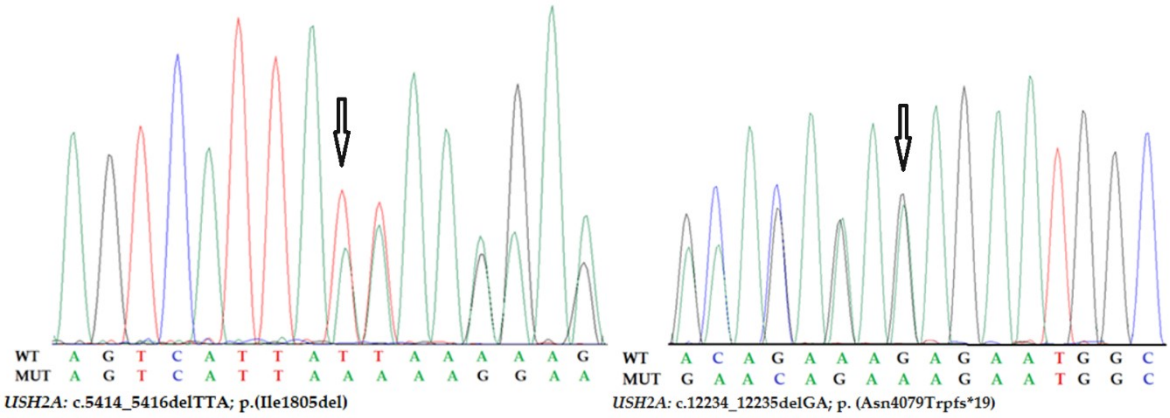
Tabulka 22: *Predikce exonové varianty genu USH2A u pacientky G dle referenční sekvence NM_206933.3.*

DNA	Protein	SIFT-indel	PROVEAN	Závěr
c.5414_5416del	**p.(Ile1805del)**	Patogenní	Patogenní	**Nejistý význam**

Tabulka 23: *Predikce exonové varianty genu ADGRV1 u pacientky G dle referenční sekvence NM_032119.4.*

DNA	Protein	SIFT	PolyPhen	Mutation taster	SNP&GO	PROVEAN	Závěr
c.12181G>T	**p.(Val4061Phe)**	Patogenní	Možná patogenní	Polymorfismus	Neutrální	Neutrální	**Nejednotná klasifikace**

Na základě predikcí byla jako potenciálně druhá kauzální varianta určena *USH2A:* c.5414_5416del; p.(Ile1805del). Přítomnost obou mutací byla ověřena pomocí Sangerova sekvenování (viz. Obrázek 24).



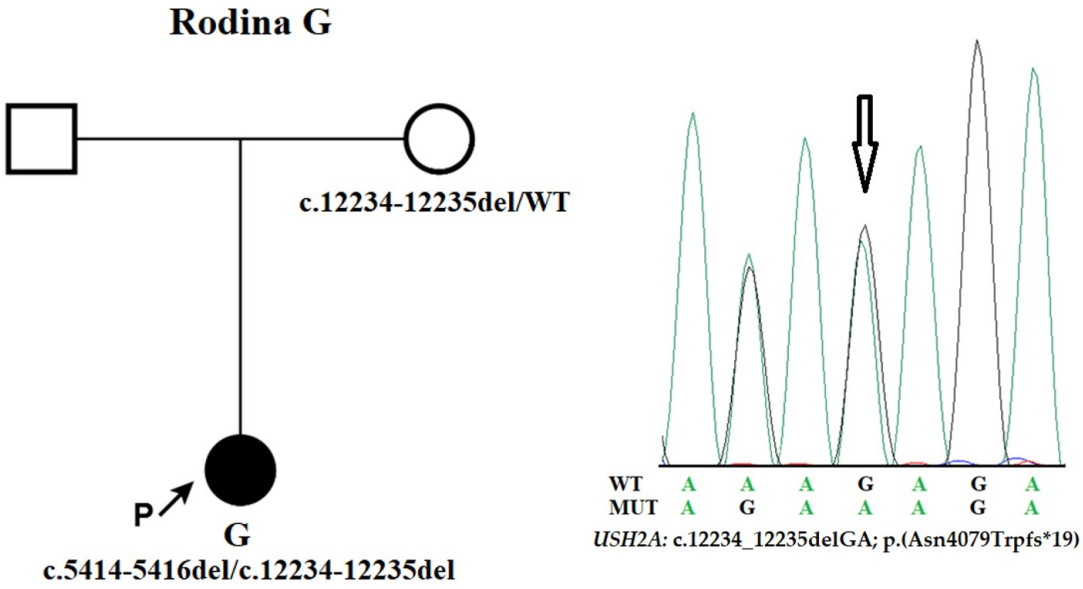
Obrázek 24: *Ověření varianty USH2A: c.5414_5416delTTA; p.(Ile1805del) a c.12234_12235delGA; p.(Asn4079Trpfs*19) u pacientky G.*

Varianta *USH2A*: c.5414_5416del; p.(Ile1805del) není součástí databází ClinVar ani LOVD, rovněž není součástí žádné publikace o Usherově syndromu. Její patogenicitu by bylo nutné dále ověřit.

- **Segregace nalezených variant v rodině probandky G**

U pacientky G byly nalezeny patogenní mutace *USH2A*: c.5414_5416del; p.(Ile1805del) a c.12234_12235del; p.(Asn4079Trpfs*19). Pro zachycení segregace kauzálních mutací v rodině byla vyšetřena matka pacientky.

U matky byla pomocí Sangerova sekvenování nalezena varianta způsobující posun čtecího rámce *USH2A*: c.12234_12235del; p.(Asn4079Trpfs*19) v heterozygotním stavu (viz. Obrázek 25). Vzhledem k autozomálně recesivní dědičnosti onemocnění a absenci výskytu onemocnění u obou rodičů lze předpokládat, že otec probandky je nositelem varianty *USH2A*: c.5414_5416del; p.(Ile1805del) v heterozygotní formě.



Obrázek 25: *Segregace nalezených variant v rodině pacientky G. Mutace USH2A:c.12234_12235delA; p.(Asn4079Trpfs*19) byla nalezena pomocí Sangerova sekvenování u matky probandky.*

4.1.9 Molekulárně genetická analýza probandky H

Cíleným screeningem exonu 61 a testováním exonů *USH2A* nebyly odhaleny žádné patogenní varianty, proto byl vzorek DNA odeslán na WES. Data získaná WES byla filtrována, byly vyhledávány varianty USH genů s frekvencí pod 0,5 % (viz. Tabulka 24).

Tabulka 24: *Vzácné varianty s frekvencí pod 0,5 % nalezené pomocí WES u pacientky H.*

Gen	DNA level	Protein level	SNP	Oblast	Genotyp	Frekvence	Klinický význam
PCDH15	**c.2305G>A**	**p.(Gly769Arg)**	**rs748808565**	**Exon**	**Heterozygot**	**4,06x10^{-6}**	**Bez dat**
	c.3817C>A	**p.(Arg1278Ser)**	**rs111033363**	**Exon**	**Heterozygot**	**6,02x10^{-4}**	**Nejednotná klasifikace**
ADGRV1	c.9660C>T	p.(=)	rs769968855	Exon	Heterozygot	1,62x10^{-5}	Bez dat
	c.558+63A>G	-	rs185757607	Intron	Heterozygot	4,47x10^{-3}	Bez dat
USH2A	c.4397-172G>C	-	rs1367114188	Intron	Heterozygot	6,46x10^{-5}	Bez dat
	c.14753C>T	p.(Thr4918Met)	rs56136489	Exon	Heterozygot	1,20x10^{-3}	Bez dat

Celkem byly nalezeny 4 exonové a 2 intronové varianty s frekvencí pod 0,5 %, Nejprve byla provedena predikce pro exonové varianty (podle Kapitoly 3.11.3). Výsledky predikce jsou zaneseny v Tabulce 25-26.

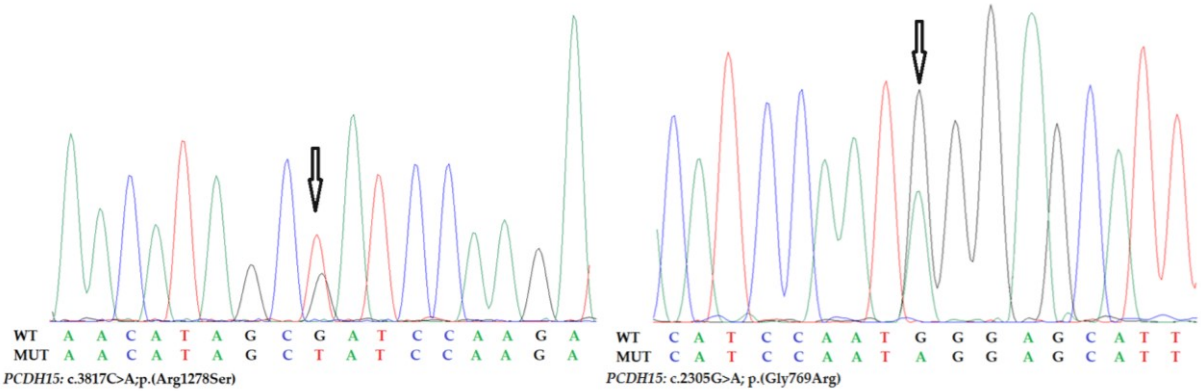
Tabulka 25: *Predikce exonových variant genu PCDH15 u pacientky H dle referenční sekvence NM_033056.4.*

DNA	Protein	SIFT	PolyPhen	Mutation taster	SNP&GO	PROVEAN	Závěr
c.2305G>A	**p.(Gly769Arg)**	Patogenní	Pravděpodobně škodlivá	Patogenní	Patogenní	Škodlivá	**Patogenní**
c.3817C>A	**p.(Arg1278Ser)**	Patogenní	Pravděpodobně škodlivá	Patogenní	Neutrální	Škodlivá	**Pravděpodobně patogenní**

Tabulka 26: *Predikce exonové variant genu USH2A u pacientky H dle referenční sekvence NM_206933.3.*

DNA	Protein	SIFT	PolyPhen	Mutation taster	SNP&GO	PROVEAN	Závěr
c.14753C>T	**p.(Thr4918Met)**	Patogenní	Pravděpodobně škodlivá	Polymorfismus	Neutrální	Škodlivá	**Nejednotná klasifikace**

Na základě výsledků predikční analýzy byly jako kauzální varianty označeny varianty v genu *PCDH15*: c.2305G>A; p.(Gly769Arg) a c.3817C>A; p.(Arg1278Ser). Přítomnost variant byla ověřena pomocí Sangerova sekvenování (viz. Obrázek 26).



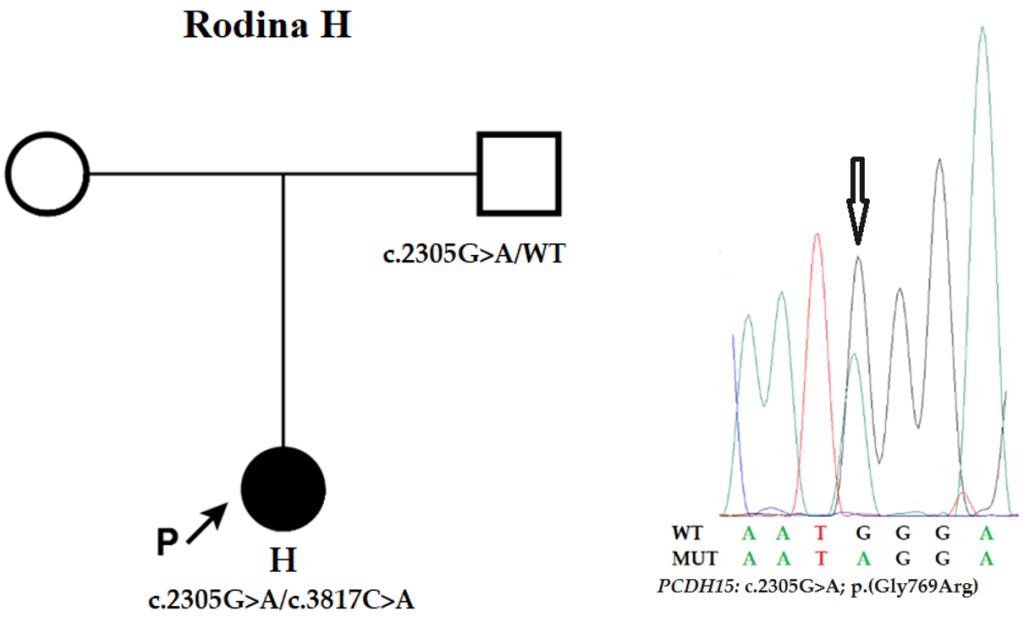
Obrázek 26: *Ověření variant PCDH15: c.3817C>A; p.(Arg1278Ser) a c.2305G>A; p.(Gly769Arg) u pacientky H pomocí Sangerova sekvenování.*

Substituční varianta *PCDH15:* c.3817C>A; p.(Arg1278Ser) je součástí databází ClinVar i LOVD. Byla opublikována v souvislosti se vznikem Usherova syndromu, kdy byla zachycena u pacientů s Usherovým syndromem pouze v heterozygotní formě, není tak jasný její klinický význam.

- **Segregace nalezených variant v rodině probandky H**

V rámci segregační analýzy kauzálních variant nalezených u pacientky H byl vyšetřen otec probandky, u něhož byla nalezena substituční varianta *PCDH15:* c.2305G>A; p.(Gly769Arg). Jelikož u obou rodičů nebyly zjištěny žádné problémy a nebylo jim onemocnění diagnostikováno, je předpokladem zdědění každé z mutovaných alel od jiného rodiče.

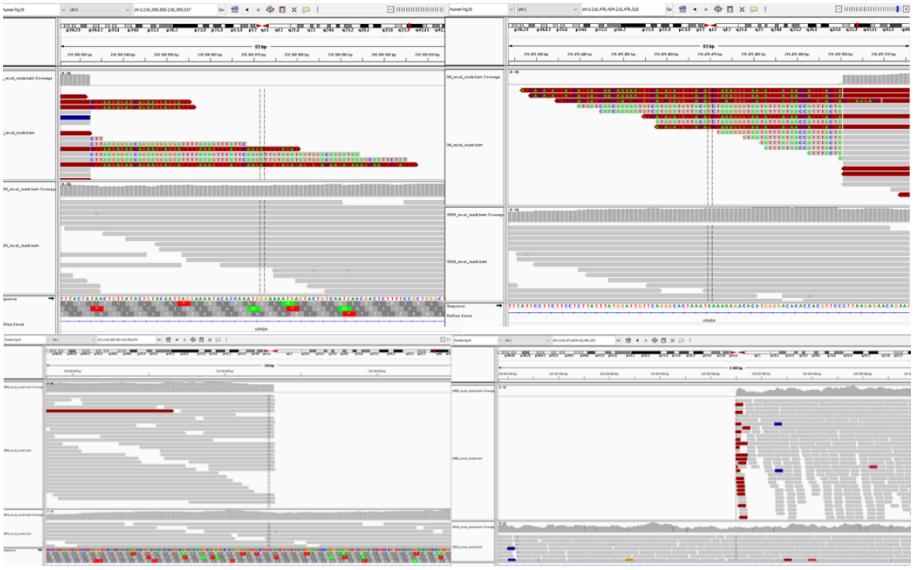
Předpokládá se, že matka probandky je heterozygotem pro variantu *PCDH15:* c.3817C>A; p.(Arg1278Ser) (Obrázek 27).



Obrázek 27: *Segregace nalezených variant v rodině pacientky H. Na základě vyšetření byla u otce probandky nalezena mutace PCDH15: c.2305G>A; p.(Gly769Arg).*

4.1.10 Molekulárně genetická analýza probandky CH

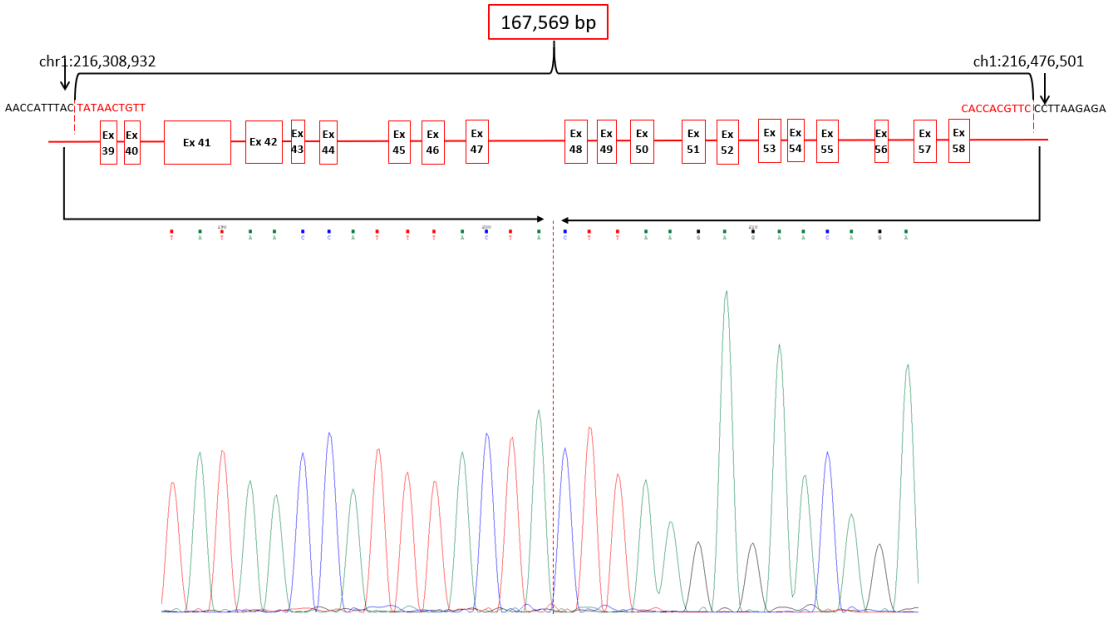
U probandky CH byly výsledky screeningu exonu 61 a WES negativní. Na základě analýzy WGS dat byla nalezena homozygotní delece genu *USH2A*. Po manuální analýze sekvencí byly predikovány oblasti zlomů (Obrázek 28).



Obrázek 28: *Analýza celogenomového sekvenování a predikce oblasti zlomů delece v genu USH2A u pacientky CH v programu IGV.*

Pomocí programu Primer3 (Untergasser et al., 2012; Koressaar & Remm, 2007) byly pro oblasti zlomu navrženy vhodné primery (viz. Kapitola 3.4), aby mohla být provedena PCR a Sangerovo sekvenování pro přesné určení místa zlomu. Jelikož se jednalo o delší amplikony, byl pro PCR použit LongRange mix (viz. Kapitola 3.12).

Po manuální analýze sekvencí byla určena přesná pozice zlomů delece u pacientky CH. Rozsah delece je znázorněn na schématech níže (Obrázek 29). Shrnutí výsledků mapování bodů zlomu u pacientky CH je zapsáno v Tabulce 27. Kromě rozsahu delece je zde zapsána pozice začátku a konce delecí.



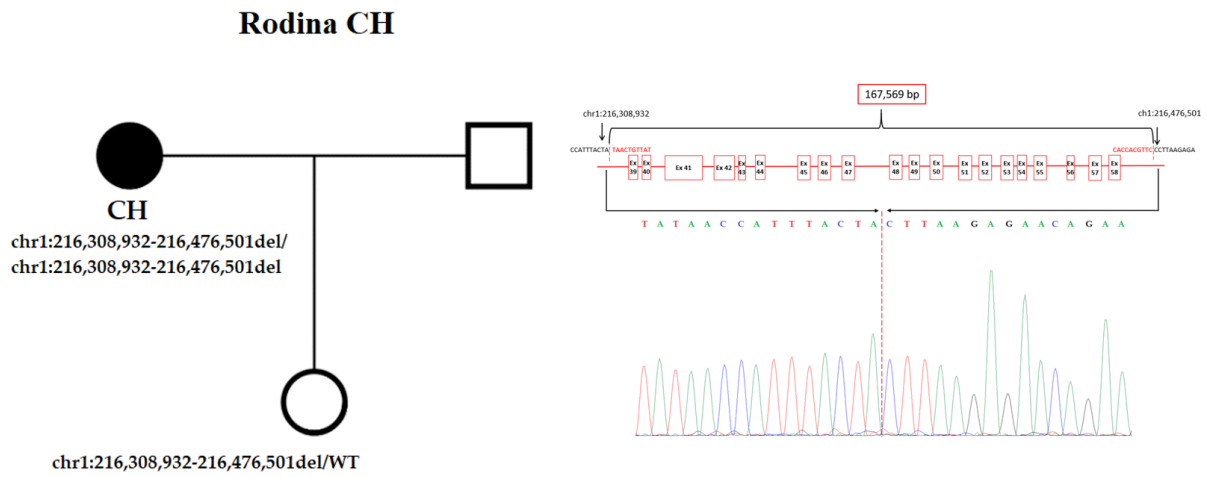
Obrázek 29: *Znázornění rozsahu delece genu USH2A včetně sekvencí, pacientka CH.*

Tabulka 27: *Shrnutí výsledků mapování breakpointů u pacientky CH.*

Pacientka	Gen	Začátek	Konec	Rozsah delece
CH	*USH2A*	chr1:216,308,932	chr1:216,476,501	167 569 bp

- **Segregace nalezených variant v rodině probandky CH**

Na základě molekulárně genetického testování byla u dcery probandky CH nalezena heterozygotní delece genu *USH2A* v rozsahu chr1:216,308,932-216,476,501(viz. Obrázek 30).



Obrázek 30: *Segregace nalezených variant v rodině pacientky CH. U pacientky byla na základě Sangerova sekvenování nalezena heterozygotní delece genu USH2A o rozsahu 167 569 bp.*

4.1.11 Molekulárně genetická analýza probandky I

Na základě negativních výsledků testování exonu 61 a exonů genu *USH2A* byl vzorek s DNA pacientky I odeslán na WES. Data získaná z WES byla analyzována, byly nalezeny varianty USH genů s frekvencí nižší než 0,5 % (viz. Tabulka 28).

Tabulka 28: *Vzácné varianty USH genů s frekvencí pod 0,5% nalezené u pacientky I.*

Gen	DNA level	Protein level	SNP	Oblast	Genotyp	Frekvence	Klinický význam
CDH23	c.5484G>A	p.(Met1828Ile)	-	Exon	Heterozygot	-	Bez dat
	c.7872+108A>T	-	rs886336351	Intron	Heterozygot	$3{,}20 \times 10^{-5}$	Bez dat
	c.9633+161-169del	-	-	Intron	Heterozygot	-	Bez dat
	c.7823G>A	**p.(Arg2608His)**	**rs202052174**	**Exon**	**Heterozygot**	**$6{,}32 \times 10^{-4}$**	**Nejistý význam**
ADGRV1	c.4929+226A>G	-	rs777466986	Intron	Heterozygot	$4{,}84 \times 10^{-4}$	Bez dat
	c.6133G>T	p.(Gly2045*)	rs41308846	Exon	Heterozygot	$6{,}40 \times 10^{-4}$	Nejistý význam

U nalezených variant nebyl v databázi ClinVar uveden význam, v LOVD databázi byla nalezena exonová varianta genu *CDH23*: c.7823G>A; p.(Arg2608His). Byla detekována u pacientů s Usherovým syndromem v heterozygotním stavu, proto se jedná pravděpodobně o patogenní variantu.

Varianta c.6133G>T v genu *ADGRV1* byla v databázi ClinVar uváděna jako varianta s nejasnou klasifikací, pravděpodobně benigní, v databázi LOVD jako varianta s nejistým významem. Intronová varianta c.4929+226A>G nebyla v databázích nalezena, proto byly

použity predikční programy (Kapitola 3.11.3). Výsledky predikcí jsou zaneseny pro exonové varianty v Tabulkách 29 a 30, pro intronové varianty jsou zaznamenané v Tabulkách 31 a 32.

Tabulka 29: *Výsledky predikční analýzy exonové varianty ADGRV1 pacientky I dle referenční sekvence NM_032119.4*

DNA	Protein	SIFT	PolyPhen	Mutation taster	SNP&GO	PROVEAN	Závěr
c.6133G>A	p.(Gly2045Arg)	Škodlivá	Pravděpodobně škodlivá	Patogenní	Patogenní	Škodlivá	**Patogenní**

Tabulka 30: *Výsledky predikční analýzy exonové varianty CDH23 pacientky I dle referenční sekvence NM_022124.5.*

DNA	Protein	SIFT	PolyPhen	Mutation taster	SNP&GO	PROVEAN	Závěr
c.5484G>A	p.(Met1828Ile)	Tolerovaná	Benigní	Patogenní	Neutrální	Neutrální	Pravděpodobně benigní
c.7823G>A	p.(Arg2608His)	Škodlivá	Pravděpodobně škodlivá	Patogenní	Neutrální	Neutrální	**Nejednotná klasifikace**

Tabulka 31: *Výsledky predikční analýzy intronové varianty ADGRV1 pacientky I dle refereční genomové sekvence NG_007083.2.*

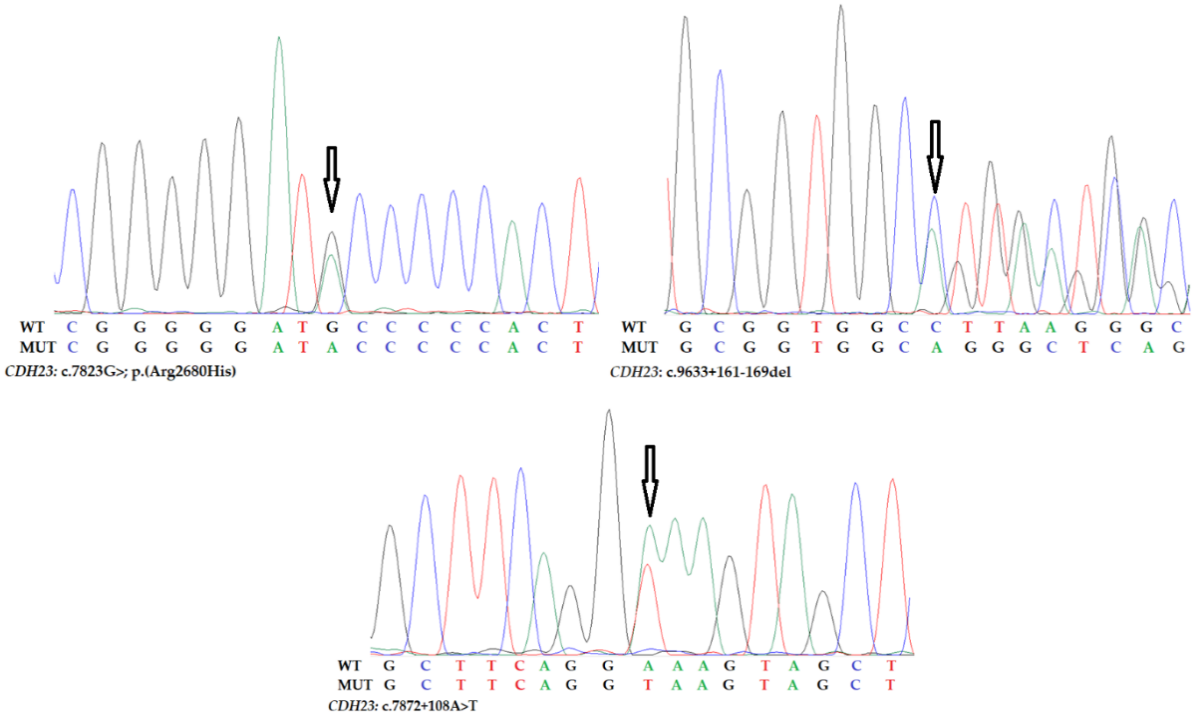
DNA	HSF (0-100)			NetGene2	NNSplice (0-1)			MaxEntScan			Celkové vyhodnocení varianty
	WT	MUT	Skóre varianty	Efekt mutované alely	WT	MUT	Skóre varianty	WT	MUT	Skóre varianty	
***USH2A:* c.4929+226A>G**	Beze změny			Beze změny	Beze změny			Beze změny			Benigní

Tabulka 32: *Výsledky predikční analýzy intronové varianty CDH23 pacientky I dle referenční genomové sekvence NG_008835.1*

DNA	HSF (0-100)			NetGene2	NNSplice (0-1)			MaxEntScan			Celkové vyhodnocení varianty
	WT	MUT	Skóre varianty	Efekt mutované alely	WT	MUT	Skóre varianty	WT	MUT	Skóre varianty	
***CDH23:* c.7872+108A>T**	73,16	100	+36,69 %	Beze změny	<0,4	1	+60%	2,67	10,86	+506,74 %	**Pravděpodobně patogenní**
***CDH23:* c.9633+161_169 del**	10,41	78,28	+651,97 %	Změna pozice akceptorového místa sestřihu	Změna pozice akceptorového místa sestřihu			Bez výsledků			**Pravděpodobně patogenní**

Přítomnost variant v genu *CDH23* byla ověřena pomocí sekvenování dle Sangera. Výřezy získaných sekvencí jsou zaznamenány na Obrázku 31.

Vzhledem k nejasné klasifikaci exonové varianty c.7823G>A; p.(Arg2608His) v genu *CDH23* a absenci záznamu intronových variant genu *CDH23* v databázích ClinVar a LOVD či publikacích, byli vyšetřeni rodiče pacientky pro zachycení segregace těchto variant v rodině.

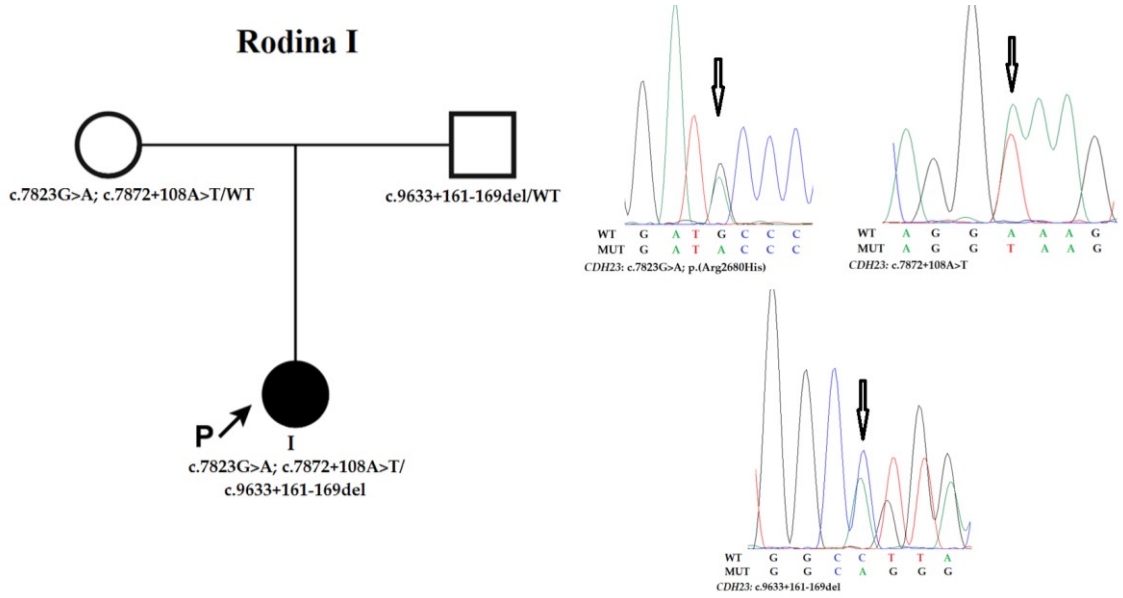


Obrázek 31: *Ověření variant CDH23: c.7823G>A; p.(Arg2608His), c.9633+161-169del a c.7872+108A>T pomocí Sangerova sekvenování u pacientky I.*

- **Segregace nalezených variant v rodině probandky I**

Vzhledem k tomu, že bylo u pacientky I nalezeno více variant, u kterých nebyla jednoznačná jejich patogenita, byla provedena segregační analýza těchto variant v rodině. Byli vyšetřeni oba rodiče pacientky, otec je nositelem deleční varianty *CDH23*: c.9633+161_169del v heterozygotním stavu. Jelikož se jedná o hlubokou intronovou variantu, je třeba, i vzhledem k výsledkům segregační analýzy a výsledkům predikční analýzy, provést funkční studii.

U matky byla nalezena exonová varianta *CDH23:* c.7823G>A; p.(Arg2608His) a rovněž intronová varianta *CDH23:* c.7872+108A>T (Obrázek 32).



Obrázek 32: *Segregace nalezených variant v rodině probandky I. U matky nalezené varianty c.7823G>A; p.(Arg2608His) a c.7872+108A>T v genu CDH23, u otce nalezená varianta CDH23: c.9633+161-169del.*

4.1.12 Molekulárně genetická analýza probandky J

Probandka J byla rovněž po negativním screeningu exonu 61 genu *USH2A* a testování exonů *USH2A* (uvedených v Kapitole 3.4) testována pomocí WES. Varianty USH genů s frekvencí pod 0,5% nalezené u pacientky J jsou zapsány v Tabulce 33.

Tabulka 33: *Vzácné varianty u probandky J získané pomocí WES.*

Gen	DNA level	Protein level	SNP	Oblast	Genotyp	Frekvence	Klinický význam
ADGRV1	c.6186T>A	p.(=)	-	Exon	Heterozygot	-	Bez dat
	c.-2G>A	-	rs763683206	UTR5	Heterozygot	$4{,}75\times10^{-5}$	Bez dat
USH2A	c.1651C>T	p.(Arg551Cys)	rs776211037	Exon	Heterozygot	$2{,}90\times10^{-5}$	Bez dat
	c.11048-191G>A	-	rs143167127	Intron	Heterozygot	$5{,}50\times10^{-4}$	Bez dat
	c.8846-144A>C	-	rs147753110	Intron	Heterozygot	$3{,}49\times10^{-3}$	Bez dat
	c.15519+23G>A	-	rs115058075	Intron	Heterozygot	$7{,}25\times1010^{-3}$	Bez dat

Vzhledem k nejasnému klinickému významu nalezených variant byla provedena predikce patogenity(viz. Tabulky 34 a 35).

Tabulka 34: *Predikce exonové varianty USH2A genu u pacientky J dle referenční sekvence NM_206933.3.*

DNA	Protein	SIFT	PolyPhen	Mutation taster	SNP&GO	PROVEAN	Závěr
c.1651C>T	**p.(Arg551Cys)**	Škodlivá	Pravděpodobně škodlivá	Patogenní	Patogenní	Škodlivá	**Patogenní**

***Tabulka 35**: Predikce UTR‘5 varianty genu ADGRV1 u pacientky J dle referenční genomové sekvence NG_007083.2.*

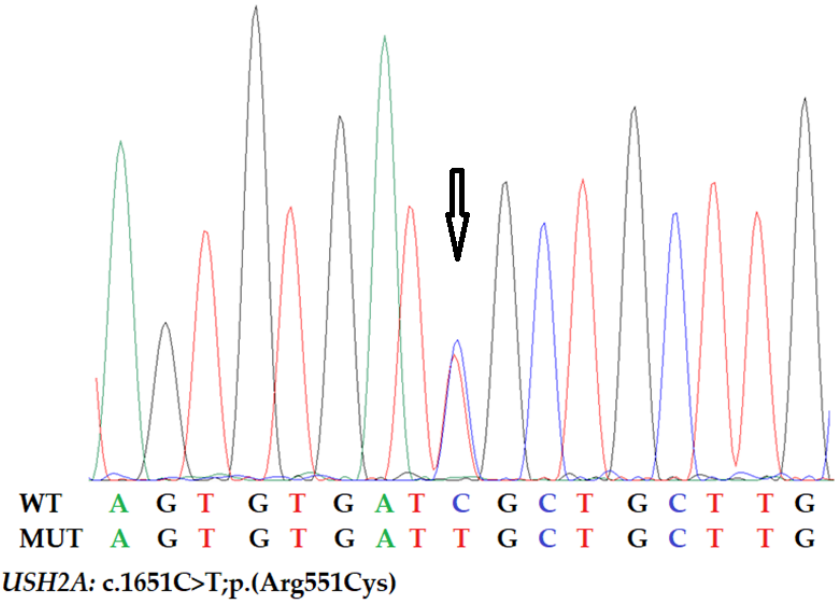
DNA	HSF (0-100)			NetGene2	NNSplice (0-1)			MaxEntScan			Celkové vyhodnocení varianty
	WT	MUT	Skóre varianty	Efekt mutované alely	WT	MUT	Skóre varianty	WT	MUT	Skóre varianty	
***ADGRV1:* c.-2G>A**	47,26	76,21	+61,26	Bez efektu	Beze změny			Bez výsledku			**Nejednotná klasifikace**

Jelikož byla potvrzena patogenita pouze jedné exonové varianty, byla provedena predikce rovněž pro intronové varianty *USH2A* genu (Tabulka 36).

***Tabulka 36:** Predikce intronových variant USH2A genu u pacientky J dle referenční genomové sekvence NG_009497.1.*

DNA	HSF (0-100)			NetGene2	NNSplice (0-1)			MaxEntScan			Celkové vyhodnocení varianty
	WT	MUT	Skóre varianty	Efekt mutované alely	WT	MUT	Skóre varianty	WT	MUT	Skóre varianty	
***USH2A:* c.11048-191G>A**	71,3	73,15	+2,59%	Bez efektu	Beze změny			Beze změny			**Neutrální**
***USH2A:* c.8846-144A>C**	40,86	69,81	+70,85%	Bez efektu	Beze změny			Bez výsledků			**Nejedenotná klasifikace**
***USH2A:* c.15519+23G>A**	43,58	72,52	+66,41%	Nové donorové místo sestřihu	0,91	0,86	-5%	6,77	5,66	-16,4%	**Nejednotná klasifikace**

Přítomnost exonové varianty *USH2A:* c.1651C>T; p.(Arg551Cys) u pacientky J byla ověřena pomocí Sangerova sekvenování (Obrázek 33).

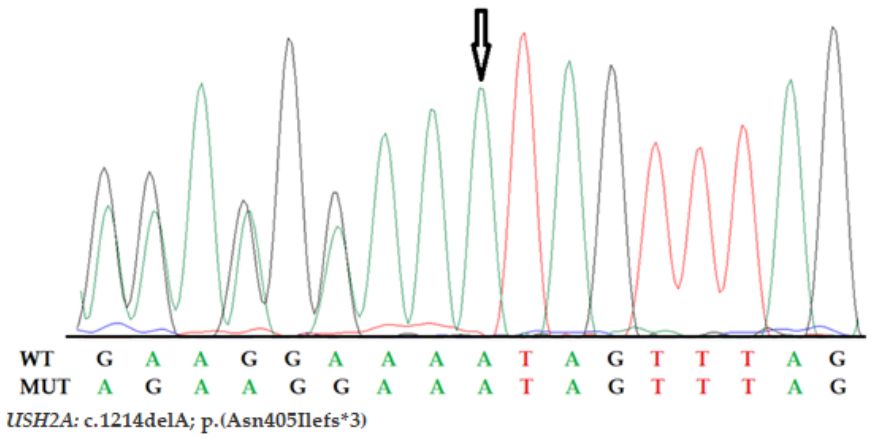


***Obrázek 33:** Ověření varianty USH2A: c.1651C>T; p.(Arg551Cys) u pacientky J.*

Jako patogenní varianta byla na základě predikcí určena varianta c.1651C>T; p.(Arg551Cys) v genu *USH2A*. Dále byly vytipovány 2 intronové varianty, by mohly mít vztah ke vzniku onemocnění. Vzhledem k tomu, že žádná z variant není uvedena v databázích jako varianta způsobující onemocnění, bude třeba provést další vyšetření včetně segregační analýzy pro potvrzení patogenity.

4.1.13 Molekulárně genetická analýza probandky K

Cíleným testováním exonů *USH2A* genu byla u probandky K v heterozygotním stavu nalezena varianta *USH2A:* c.1214delA; p.(Asn405Ilefs*3) v exonu 7 (Obrázek 34). Tato varianta je v databázi ClinVar a LOVD uvedena jako patogenní, je rovněž součástí několika publikací o Usherově syndromu (Garcia-Garcia et al.,2011; Schwartz et al., 2005 a další).

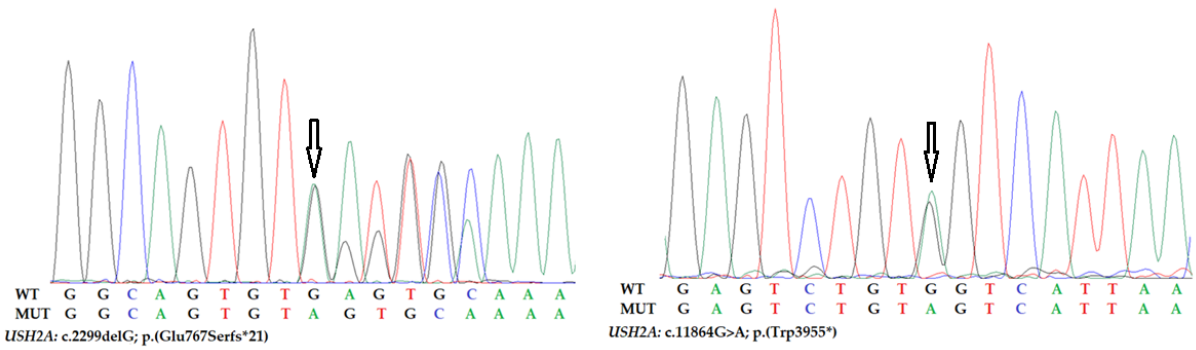


Obrázek 34: *Ověření varianty USH2A: c.1214delA; p.(Asn405Ilefs*3) u pacientky K.*

Na základě Sangerova sekvenování nebyla nalezena druhá kauzální mutace. Pro nalezení druhé mutace genu *USH2A* je třeba provést další testování – WES či WGS.

4.1.14 Molekulárně genetická analýza probandky L

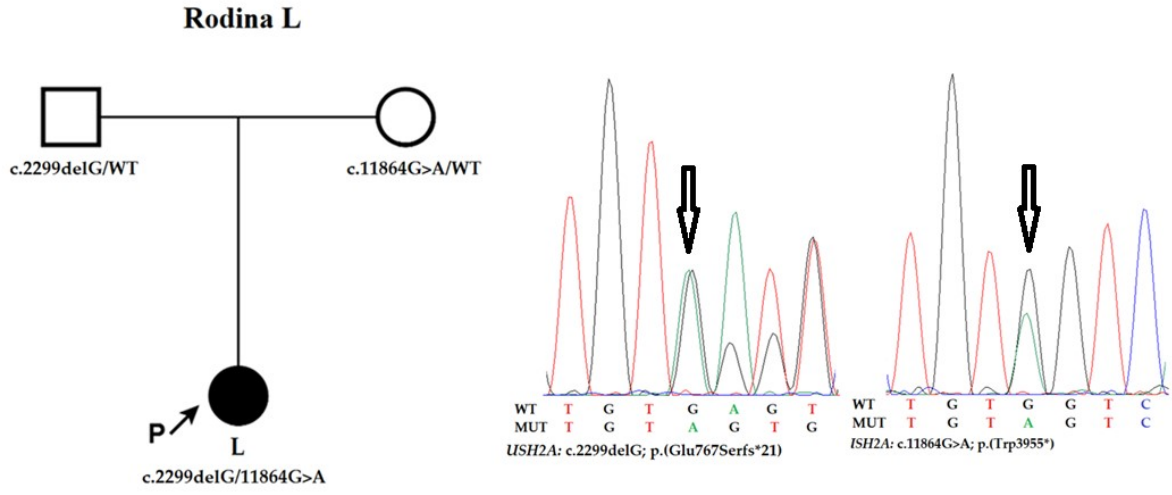
U pacientky L byly na základě testování exonů genu *USH2A* pomocí Sangerova sekvenování (Obrázek 35) detekovány kauzální mutace *USH2A:* c.11864G>A; p.(Trp3955*) a mutace *USH2A:* c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21). Obě tyto varianty jsou v databázích LOVD i ClinVar vedené jako patogenní, jsou rovněž nejčastěji zachycenými variantami u evropských pacientů s Usherovým syndromem.



Obrázek 35: *Varianty USH2A: c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21) a c.11864G>A; p.(Trp3955*) ověřené pomocí Sangerova sekvenování u pacientky L.*

- **Segregace nalezených variant v rodině probandky L**

V rámci segregační analýzy byli vyšetřeni rodiče probandky. U matky byla nalezena mutace *USH2A:* c.11864G>A; p.(Trp3955*) a u otce *USH2A:* c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21) (Obrázek 36).



Obrázek 36: *Segregace nalezených variant v rodině probandky L. U otce byla Sangerovým sekvenováním odhalena mutace c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21) a u matky mutace c.11864G>A; p.(Trp3955*) v genu USH2A.*

4.2 Souhrn výsledků molekulárně genetické analýzy

Výsledky molekulárně genetického testování pacientů s Usherovým syndromem jsou shrnuty v Tabulce 37. U pacientky C (zvýrazněno modrou barvou) byla diagnóza USH na základě výsledků molekulárně genetického testování změněna.

V Tabulce 38 jsou pak shrnuty výsledky segregační analýzy, která byla provedena u rodinných příslušníků vyšetřovaných pacientů. Celkem byla provedena v 8 rodinách s výskytem USH.

Tabulka 37: *Výsledky molekulárně genetické analýzy u pacientů s Usherovým syndromem. S = Sangerovo sekvenování, WES = celoexomové sekvenování a WGS = celogenomové sekvenování. U probandky C byl na základě molekulárně genetické analýzy diagnostikován Sticklerův syndrom.*

Proband	Metoda	***USH2A* exon 61** c.11864G>A p.(Trp3995*)	DNA level varianty (*USH2A*)	DNA level varianty (jiné geny)	Protein level
A	S, WES	Negativní	c.7524del c.l2067-2A>G	-	p.(Arg2509Glyfs*19) p.?
B	S, WES, WGS	Heterozygot	c.11864G>A c.485+1G	-	p.(Trp3995*) p.?
D	S, WES, WGS	Negativní	c.47l4C>T c.2299delG + Vzácné intronové varianty	-	p.(Leul572Phe) p.(Glu767Serfs*21)
E	S, WES, WGS	Negativní	-	*ADGRV1*: c.11954_11955insTGC Delece *ADGRV1* o rozsahu 10 641 bp	p.(Ile3985delinsIle_Ala) delece exonu 12-17
F	S	Heterozygot	c.11864G>A c.2299delG	-	p.(Trp3995*) p.(Glu767Serfs*21)
G	S, WES	Negativní	c.12234_12235del c.5414_5416del	-	p (Asn4079Trpfs*19) p.(Ile1805del)
H	S, WES	Negativní	-	*PCDH15*:c.2305G>A *PCDH15*:c.3817C>A	p.(Gly769Arg) p.(Arg1278Ser)
CH	S, WES, WGS, MLPA	Negativní	Homozygotní delece *USH2A* l67 569 bp	-	delece exonu 39-58
I	S, WES	Negativní	-	*CDH23:*c.7823G>A *CDH23*:c.9633+161-169del *CDH23*:c.7872+108A>T	
J	S, WES	Negativní	c.1651C>T + intronová varianta?	-	p.(Arg551Cys)
K	S	Negativní	c.l2l4del	-	p.(Asn405Ilefs*3)
L	S, WES	Heterozygot	c.l1864G>A c.2299delG	-	p.(Trp3995*) p.(Glu767Serfs*21)
C	S, WES	Negativní	-	*COL9A1*:c.1816C>T	p.(Pro606Ser)

Tabulka 38: *Souhrn výsledků segregační analýzy a hodnocení nalezených variant dle kapitoly 3.11.4. M je označení pro matku probanda, O pro otce, D pro dceru a Se pro sestru. Zkratka S = Sangerovo sekvenování, WES = celoexomové sekvenování, WGS = celogenomové sekvenování. VUS = varianta nejasného významu (variant of unknown significance)*

Proband	Segregace	Nalezené varianty	Použité metody	Důkaz	Hodnocení varianty
B	Ano	*USH2A:* c.11864G>A	S, WES, WGS	PVS1, PS1, PM2, PP2, PP3	**Patogenní**
		USH2A: c.485+1G		PVS1, PP3	**VUS**
	M	*USH2A:* c.485+1G	S		**VUS**
	O	*USH2A:* c.11864G>A	S		**Patogenní**
D	Ano	*USH2A:* c.4714C>T	S, WES, WGS	PP3, BP6	**VUS**
		USH2A: c.2299delG		PVS1, PS1, PM1, PM4, PP3	**Patogenní**
		+ Vzácné intronové varianty		-	
	D	*USH2A:* c.4714C>T	S		**VUS**
		USH2A: c.2299delG			**Patogenní**
	Se	*USH2A* wild type	S		
F	Ano	*USH2A:* c.11864G>A	S	PVS1, PS1, PM2, PP2, PP3	**Patogenní**
		USH2A: c.2299delG		PVS1, PS1, PM1, PM4, PP3	**Patogenní**
	M	*USH2A:* c.11864G>A	S		**Patogenní**
G	Ano	*USH2A:* c.12234_12235del	S, WES	PVS1, PS1, PP3, PP5	**Patogenní**
		USH2A: c.5414_5416del		PP3, BP4	**VUS**
	M	*USH2A*: c.12234-12235del	S		**Patogenní**
H	Ano	*PCDH15*: c.2305G>A	S, WES	PM1, PP3	**VUS**
		PCDH15: c.3817C>A		PM1, PP3	**VUS**
	O	*PCDH15:* c.2305G>A	S		**VUS**
P	Ano	Homozygotní delece *USH2A* 167 569 bp	S, WES, WGS	-	**Patogenní**
	D	Heterozygotní delece *USH2A* 167 569 bp	S	-	**Patogenní**
I	Ano	*CDH23:* c.7823G>A	S, WES	PS1, BP4, PP3	**VUS**
		CDH23: c.9633+161-169del		PP3, BP4	**VUS**
		CDH23: c.7872+108A>T		PP3	**VUS**
	M	*CDH23:* c.7823G>A	S		**VUS**
		CDH23: c.7872+108A>T			**VUS**
	O	*CDH23*: c.9633+161-169del	S		**VUS**
L	Ano	*USH2A*: c.11864G>A	S	PVS1, PS1, PM2, PP2, PP3	**Patogenní**
		USH2A: c.2299delG		PVS1, PS1, PM1, PM4, PP3	**Patogenní**
	M	*USH2A:* c.11864G>A	S		**Patogenní**
	O	*USH2A:* c.2299delG	S		**Patogenní**

4.3 Haplotypová analýza

Do souboru pro haplotypovou analýzu bylo vybráno 9 pacientů nesoucích variantu *USH2A:* c.11864G>A; p.(Trp3955*). Dva z těchto pacientů měli variantu v homozygotním stavu, dalších sedm v heterozygotním (viz. Tabulka 39). Sedm pacientu bylo identifikováno již v předchozím projektu.

Tabulka 39: *Soubor pacientů nesoucích mutaci USH2A: c.11864G>A; p.(Trp3995*) v exonu 61 určený pro haplotypovou analýzu. S=Sangerovo sekvenování, WES = celoexomové sekvenování, WGS = celogenomové sekvenování.*

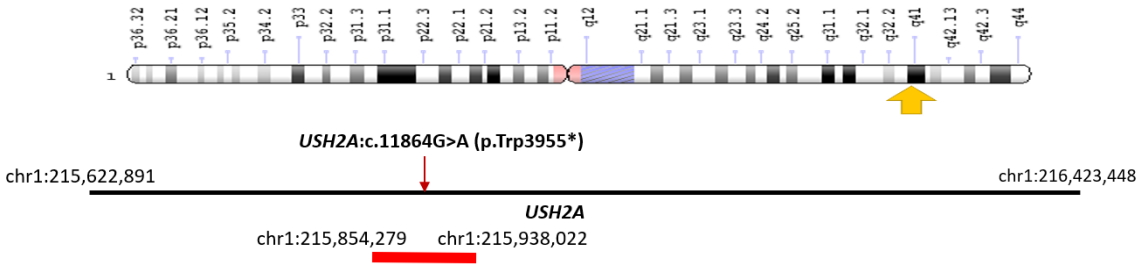
Proband	Metoda	Pohlaví	Věk	*USH2A* exon 61 c.11864G>A p.(Trp3995*)	DNA level varianty (*USH2A*)	Protein level	Koncentrace DNA ng/µl	260/280
B	S, WES, WGS	Žena	15	Heterozygot	c.11864G>A c.485+1G	p.(Trp3995*) p.?	111,04	1,84
F	S	Žena	13	Heteterozygot	c.11864G>A c.2299delG	p.(Trp3995*) p.(Glu767Serfs*21)	386,8	1,86
M	S, WES, WGS	Žena	27	Homozygot	c.11864G>A	p.(Trp3995*)	1033,72	1,85
N	S	Žena	34	Homozygot	c.11864G>A	p.(Trp3995*)	215,29	1,88
O	S	Muž	65	Homozygot	c.11864G>A	p.(Trp3995*)	954,83	1,85
P	S	Muž	77	Heterozygot	c.11864G>A c.1256G>A	p.(Trp3995*) p.(Cys419Tyr)	1805,19	1,84
Q	S	Muž	64	Heterozygot	c.11864G>A c.187C>T	p.(Trp3995*) p.(Arg63*)	213,77	1,77
R	S	Žena	52	Heterozygot	c.11864G>A c.12525G>C	p.(Trp3995*) p.(Trp4175Cys)	314,94	1,79
S	S	Žena	45	Heterozygot	c.11864G>A c.13207_13208del	p.(Trp3995*) p.(Gly4403*)	671,55	1,79

Haplotypová analýza byla provedena analyzováním 33 vybraných SNP s nízkou frekvencí (viz. Kapitola 3.14). Sekvence k ověření vybraných alel byly získávány pomocí Sangerova sekvenování (viz. Kapitola 3.7). Výřezy sekvencí haplotypové analýzy jsou součástí přílohy (viz. Příloha 3).

Na základě testování jednotlivých SNP byla u pacientů vymezena sdílená oblast v okolí varianty c.11864G>A; p.(Trp3955*) genu *USH2A* v poloze chr1:215,854,279-215,938,022 (viz. Obrázek 37 a 38).

	H27	H28	H29	H30	*USH2A*: c.11864G>A	H31	H32	H33
Pozice	chr1:215,854,279	chr1:215,854,280	chr1:215,864,830	chr1:215,866,300	**chr1:215,901,574**	chr1:215,901,924	chr1:215,918,842	chr1:215,938,022
dbSNP	*rs201207331*	*rs543281621*	*rs912190299*	*rs541068132*	**rs111033364**	*rs59113488*	*rs34420029*	*rs12748877*
Frekvence	0,0056	0,0056	0,0003	0,0004	**0,0001**	-	0,2748	0,0950

Obrázek 37: *Rozsah sdílené oblasti pacientů s c.11864G>A; p.(Trp3955*) USH2A, včetně rozsahu mutovaných oblastí jednotlivých pacientů.*



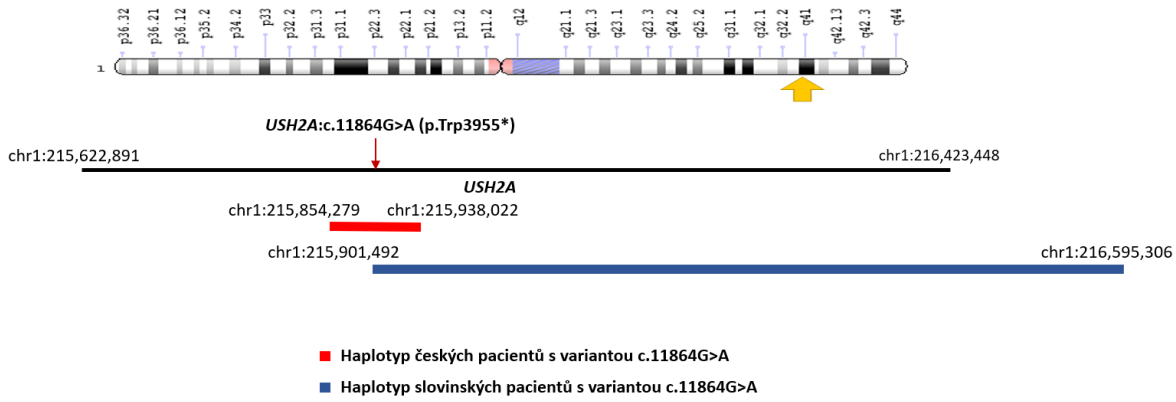
Obrázek 38: *Rozsah sdílené oblasti na chromozomu 1.*

Rozsah sdílené oblasti byl na základě haplotypové analýzy určen na 83 743 bp. Jedná se o oblast mezi SNP označené jako H27 a H33. Frekvence těchto variant a jejich dbSNP jsou zaznamenány v tabulce na obrázku 37.

5 Diskuze

Usherův syndrom je autozomálně recesivní onemocnění jehož prevalence se pohybuje v rozmezí 1 z 6 000-25 000 jedinců. V současnosti bylo odhaleno minimálně 11 genů asociovaných se vznikem Usherova syndromu, přičemž nejčastěji dochází k mutacím v genu *USH2A* lokalizovaném na chromozomu 1. Bylo popsáno více než 600 mutací v tomto genu, které vedou ke vzniku USH2 (Sanjurjo-Soriano et al.,2020). I přes vysoký počet mutací se některé patogenní mutace vyskytují s vysokou frekvencí. Jednou z těchto mutací je tzv. nonsence mutace *USH2A*: c.11864G>A; p.(Trp3955*), která způsobuje předčasné ukončení translace a zkrácení či absenci proteinu. Varianta byla zachycena s vysokou frekvencí u pacientů na Slovinsku či v Rusku, kde tvořila více než 80 % resp. 50 % mutací genu *USH2A* (Ivanova et al., 2018; Bonnet et al., 2016). V Laboratoři pro studium vzácných nemocí (Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze) byla zachycena u 20 pacientů (více než 66 %) s Usherovým syndromem, celkem u 30 pacientů tak způsobovaly rozvoj onemocnění mutace v genu *USH2A*.

U 9 probandů s mutací *USH2A*: c.11864G>A; p.(Trp3955*) se pomocí haplotypové analýzy povedlo stanovit společný rodový haplotyp, což je v souladu s konceptem zakladatelské mutace. Vysoká uniformita mutace c.11864G>; p.(Trp3955*) by se zavedením genové terapie znamenala možnost léčby větší skupiny pacientů, především pokud by stejná mutace vykazovala vysokou prevalenci také v jiných evropských zemích. Jednou z takovýchto zemí je Slovinsko, kde byla v roce 2019 rovněž provedena haplotypová analýza u pacientů nesoucích mutaci *USH2A*: c.11864G>A; p.(Trp3955*). Na základě testování 12 SNP byly sestaveny 4 haplotypy, přičemž nejčastější z nich byl zastoupen s frekvencí 65 % (Zupan et al., 2019). Tyto 4 haplotypy vykazovaly sdílenou oblast v rozsahu chr1:215,901,492-216,595,306. U českých pacientů byla oblast sdílení vymezena na rozsah chr1:215,854,279-215,938,022. Je tedy zřejmé, že se haplotypy pacientů ze Slovinska a Česka překrývají (viz. Obrázek 39). Pro potvrzení sdílení společného haplotypu by bylo třeba zvolit stejné SNP pro haplotypovou analýzu, které by pokrývaly oblast okolo varianty c.11864G>A na chromozomu 1. Na základě takovýchto výsledků by bylo také možné určit, před jakou dobou došlo ke vzniku mutace.



Obrázek 39: *Porovnání výsledků haplotypové analýzy u českých a u slovinských pacientů s variantu c.11864G>A.*

Během testování 20 pacientů Oční kliniky nebo Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. LF UK a VFN v Praze a jejich příbuzných byly nalezeny 4 nové mutace pravděpodobně způsobující Usherův syndrom.

U probandky J byla nalezena substituční varianta *USH2A*: c.1651C>T; p.(Arg551Cys) v desátém exonu, která způsobuje záměnu aminokyseliny v proteinovém řetězci. Tato mutace zatím nebyla opublikována, není součástí databáze ClinVar, v databázi LOVD je jen záznam o mutaci, nikoliv však o jejím efektu či zmínka o asociaci se vznikem Usherova syndrom. Na základě hodnocení varianty pomocí predikčních programů, vzhledem k její nízké frekvenci v databázi GnomAD a vzhledem ke klinické diagnóze lze předpokládat, že se jedná o kauzální variantu.

Rovněž in-frame delece *USH2A:*c.5414_5416delTTA, která má za následek deleci aminokyseliny isoleucinu v usherinu na pozici 1805 nalezená u probandky G, nebyla doposud zachycena. Mutace je lokalizována v extracelulární části proteinu, v laminin G-like doméně 2 (viz. https://www.uniprot.org/uniprot/O75445). Laminin G-like domény (jak uvádí Rudenko et al., 2001) se nacházejí často v extracelulárních proteinech, mají schopnost vázat různorodé ligandy a podílet se na řadě biologických funkcí – mohou tak zprostředkovávat buněčnou adhezi či migraci buněk, buněčné rozpoznávaní, nebo také transport. Zdá se tedy, že jsou tyto domény zapojeny v řadě biologických mechanismů.

A i když je usherin velký protein skládající se z 5 202 aminokyselin, je zřejmě rozhodující, ve které části proteinu ke změně dochází (v databázi LOVD nalezeny především varianty mající vliv na funkci proteinu lokalizované v této doméně). Již dříve byly popsány in-frame delece, při nichž dochází k deleci jedné aminokyseliny a které ovlivňují jeho funkci. Příkladem je

mutace *USH2A:* c.12302_12304del; p.(Asn4101del), která byla zachycena u pacienta s Usherovým syndromem v heterozygotním stavu (Bonnet et al., 2016). Také byly in-frame delece genu *USH2A* nalezeny u pacientů s RP.

Nová sestřihová varianta *USH2A:* c.485+1G>A zachycená u probandky B má, dle výsledků *in silico* analýzy, pravděpodobně za následek zánik místa sestřihu. Substitucí guaninu za adenin dochází k poruše donorového místa sestřihu v kanonickém místě. Sestřihový aparát tak nemůže rozeznat 5‘ konec a může docházet ke vzniku aberantního proteinu. Již dříve byly popsány mutace, při kterých dochází k poruše sestřihu genu *USH2A* a při kterých dochází k projevu onemocnění (Le Quesne Stabej et al., 2011). Alternativně tato mutace může způsobovat frameshift v důsledku začlenění jednoho či více nukleotidů.

Dále byly zmapovány delece v genech *USH2A* a *ADGRV1.* U probandky CH byla zmapována delece o rozsahu 167 569 bp v genu *USH2A*. Tato delece postihuje 20 z celkově 72 exonů genu. Velikost delece genu *ADGRV1* byla stanovena na 10 641 bp a zahrnuje 6 exonů. Takto rozsáhlá delece nebyla u genu *ADGRV1* doposud popsána, v případě genu *USH2A* byla popsána delece postihující i 34 exonů (González-del Pozo et al., 2018). Korelace mezi závažností onemocnění a velikostí delece USH genu nebyla nalezena. Obě detekované delece jsou delece intersticiální, které pravděpodobně vznikly v důsledku dvou zlomů na dlouhém raménku chromozomu 1 (*USH2A*) a 5 (*ADGRV1*). Ke zlomům a vzniku velkých delecí dochází především vlivem chromozomové nestability a působením klastogenů. Takto rozsáhlé delece usherovských proteinů nepatří mezi časté příčiny vzniku Usherova syndromu, ale vzhledem k jejich rozsahu jsou zcela jistě patogenní.

Při molekulárně genetickém testování se potvrdila vysoká prevalence mutací c.11864G>A a c.2299delG v genu *USH2A* u českých pacientů. Deset probandů bylo nositeli mutace *USH2A*: c.11864G>A; p.(Trp3955*) a u tří ze 20 probandů byla zjištěna mutace *USH2A:* c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21). Mutace *USH2A:* c.2299delG způsobuje posun čtecího rámce a vede k vytvoření předčasného stop kodonu o 21 nukleotidů dále. Předpokládá se, že tato varianta vede k poruše funkce proteinu buď jeho zkrácením nebo kvůli předčasnému rozpadu mRNA. Na základě charakteru varianty dochází pravděpodobně k nonsense-mediated mRNA decay (NMD). Jedná se o pretranslační proces, který odstraňuje aberantní mRNA s přítomností předčasného stopkodonu a zabraňuje tak produkci zkrácených proteinů (He & Jacobson, 2015). V některých populacích, především v Evropě a Americe, je tato mutace nejčastější příčinou vzniku USH2 (viz. Kapitola 1.3.2) a byla také objevena u pacientů s nesyndromovou autozomálně recesivní RP. Stanovením haplotypu a následnou matematickou

analýzou byl odhadnut vznik varianty c.2299delG genu *USH2A* před 6476 až 6871 lety (Aller et al., 2010).

U probandky D byly jako kauzální příčiny zprvu určeny 2 exonové varianty *USH2A*: c.4714C>T a c.2299delG. Již dříve byly tyto mutace u pacientů s Usherovým syndromem zachyceny (Aller et al., 2010), druhá ze zmíněných variant je dokonce nejčastější příčinou vzniku USH2. Na základě segregační analýzy, při které byla vyšetřena nepostižená dcera a sestra pacientky, byla jejich kauzalita vyloučena. Při segregační analýze byly totiž obě mutace nalezeny u dcery probadky, což vedlo ke zjištění, že se obě tyto varianty nacházejí na stejném chromozomu v pozici cis. V cis-pozici byly obě zmíněné varianty nalezeny již dříve (Baux et al., 2007). Častá asociace variant c.4714C>T a c.2299delG je zřejmě způsobená vazebnou nerovnováhou. Jelikož nebyla určena kauzální příčina USH, bylo provedeno celogenomové sekvenování. Při WGS bylo nalezeno celkem 13 intronových variant, z nichž u 8 byla na základě predikce uvedena nejednotná klasifikace. Jelikož se jedná o hluboké intronové a doposud nepublikované varianty, bude třeba provést funkční analýzy, které by potvrdily jejich vliv na stavbu či funkci proteinu.

Další vyšetření bude třeba provést u probandky K, u které byla nalezena pouze 1 kauzální mutace c.1214del; p.(Asn405Ilefs*3) v genu *USH2A*. Při této mutaci dochází k vytvoření předčasného stop kodonu, což způsobuje zkrácení (či úplnou absenci) finálního produktu. Frekvence varianty se blíží nule, přesto byla hlášena nejméně u 5 jedinců s Usherovým syndromem.

I když USH2 tvoří téměř 2/3 případů a téměř v 90 % je způsoben mutacemi v genu *USH2A*, byl u dvou pacientek na základě molekulárně genetického testování stanoven subtyp USH1.

U probandky H byly nalezeny varianty v genu *PCDH15* způsobující USH1D, přičemž jedna z kauzálních mutací c.2305G>A; p.(Gly769Arg), je rovněž nově objevená varianta. Substituční varianta, při které dochází na pozici 769 k záměně glycinu za arginin, byla označena jako patogenní na základě *in silico* analýzy. Ani u druhé varianty *PCDH15*: c.3817C>A; p.(Arg1278Ser) v exonu 19 nebyla prozatím potvrzena její klasifikace a byla zachycena pouze v heterozygotním stavu. V některých případech je uváděna jako benigní varianta vzhledem k vysokému záchytu v evropské populaci (0,09 %, viz. GnomAD). Vysoká frekvence však nemusí patogenitu varianty *PCDH15*: c.3817C>A; p.(Arg1278Ser) vylučovat. Se stejnou frekvencí (tedy 0,09 %) je zastoupena u evropské populace rovněž varianta *USH2A:* c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21), která již byla potvrzena jako varianta patogenní.

Druhým případem pacientem s USH1 je probandka I. U té byly na základě molekulárně genetického testování nalezeny 3 potenciálně patogenní varianty c.7823G>A; p.(Arg2608His), c.7872+108A>T, c.9633+161_169del v genu *CDH23* způsobující USH1D. Varianta v exonu 55 *CDH23*: c.7823G>A; p.(Arg2608His) je uvedena jako varianta pravděpodobně mající vliv na funkci proteinu. V 55. exonu byly popsány další 2 varianty – synonymní benigní mutace c.7722C>T a pravděpodobně patogenní mutace c.7872G>A. Doposud nebyly publikovány hluboké intronové varianty genu *CDH23* v souvislosti se vznikem Usherova syndromu. Jelikož nebyla provedena funkční analýza, která by potvrdila vliv detekovaných intronových variant u probandky I na vznik onemocnění, nelze určit, zda se jedná o kauzální příčinu onemocnění.

Celkem byly obě kauzální příčiny určeny u 16 z 20 probandů (přičemž u jedné probandky byla diagnóza USH překlasifikována na Sticklerův syndrom). Důvodem je především vysoká genetická heterogenita a široké spektrum mutací způsobující Usherův syndrom, které se stále rozšiřuje. U probandky K je proto třeba provést rozšířené testování (WES či WGS), které umožnuje detekovat i méně četné varianty či varianty intronové, k nalezení druhé patogenní varianty. Rovněž u probandek D, J a I je třeba provést další funkční analýzy pro potvrzení vlivu intronových variant na vznik onemocnění. Varianty se také mohou nacházet v lokusech či genech, které nebyly v souvislosti se vznikem Usherova syndromu doposud spojovány, nebo nejsou dostatečně prozkoumány.

Pro stanovení rizika pro další členy rodiny a pro lepší klinické poradenství by bylo vhodné provést segregační analýzu u všech pacientů a vyšetřit vždy oba rodiče (případně také sourozence). Pokud je u jednoho z rodičů nalezena pouze 1 kauzální varianta v heterozygotním stavu, nemusí být důvodem vzniku onemocnění zdědění další mutované alely od druhého rodiče. Mutace může vznikat tzv. *de novo* – kdy mutace vzniká nově, ve spermii či vajíčku, případně v časném embryonálním vývoji. Jelikož se však jedná o onemocnění, jehož typické projevy mohou nastat až v pokročilém věku, není vždy možné segregační analýzu provést (jako u probanda A). Vyšetření obou partnerů, kdy jeden z páru trpí USH, je pak žádoucí především při plánovaném rodičovství.

V současné době není možné Usherův syndrom vyléčit a není ani možné zcela zabránit přenosu onemocnění do další generace. U jedinců s Usherovým syndromem nedochází totiž k omezení reprodukčních schopností a nedochází tak k zabránění přenosu mutované alely na potomky. V případě vysokého rizika vzniku onemocnění u potomků, kdy je například jednomu z rodičů Usherův syndrom diagnostikován a kdy je druhý rodič přenašečem pro patogenní alelu, lze provést IVF a selekci embrya. Jelikož se však jedná o onemocnění

s autozomálně recesivní dědičností, k jehož typickým projevům v některých případech dochází až v pozdní dospělosti a v souvislosti s jehož vznikem bylo popsáno minimálně 11 genů, nelze vždy opakovanému výskytu onemocnění v rodině zabránit.

6 Závěr

Cílem práce bylo provést molekulárně genetické testování českých probandů s Usherovým syndromem a určit kauzální příčinu vzniku onemocnění. Tento typ vyšetření spolu s genetickými databázemi umožňují rozšiřování spektra mutací asociovaných se vznikem Usherova syndromu. Napomáhají snazšímu záchytu a následné klasifikaci nalezených variant v USH genech. Rovněž vedou k neustálému zlepšování klinického poradenství a zlepšování péče o postiženého jedince.

U 16 z 19 probandů se podařilo stanovit obě kauzální mutace v usherovských genech, pro určení či potvrzení kauzální příčiny u zbylých probandů bude třeba provést rozšířené testování a funkční analýzy. U 16 z 19 probandů byly příčinou vzniku Usherova syndromu mutace v genu *USH2A,* u jedné probandky bylo onemocnění způsobeno mutacemi v genu *ADGV1,* u jedné v genu *PCDH15* a u jedné zřejmě mutacemi v genu *CDH23*. Celkem tak bylo vyšetřeno 17 pacientů s USH2 a 2 pacientky s USH1. U jedné probandky byla na základě testování diagnóza Usherova syndromu změněna.

Během molekulárně genetického testování se podařilo rozšířit spektrum mutací asociovaných se vznikem USH. Byly nalezeny nové mutace v genu *USH2A* a to: substituční varianta c.1651C>T; p.(Arg551Cys), sestřihová varianta c.485+1G>A, a in-frame delece c.5414_5416delTTA; p.(Ile1805del). Také byla nalezena nová substituční varianta *PCDH15*: c.2305G>A; p.(Gly769Arg). Pomocí celogenomového a Sangerova testování byly zmapovány delece v genu *USH2A* a *ADGRV1* o rozsahu 167 569 bp, resp. 10 641 bp. U nově nalezených intronových variant *USH2A* a *CDH23* je třeba provést další vyšetření a funkční studie.

Mimo stanovení genetické příčiny vzniku Usherova syndromu byla u pacientů nesoucích mutaci *USH2A*: c.11864G>A; p.(Trp3955*) provedena haplotypová analýza. Na základě testování 33 SNP byl stanoven společný haplotyp o rozsahu 83 743 bp. Sestavením společného rodového haplotypu se podařilo potvrdit efekt zakladatele u mutace c.11864G>A, který je pravděpodobně příčinou vysoké frekvence mutace u evropské (a především středoevropské a východoevropské) populace.

Určení mutací způsobujících onemocnění vedlo ke zlepšení klinického poradenství pacientům s Usherovým syndromem a jejich rodinám, umožnilo stanovení rizika pro další členy rodiny. Rovněž přispělo k lepší péči o postižené jedince.

7 Seznam zkratek

1. LF UK – 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

bp – Pár bazí (Base pair)

BBS - Bardet-Biedlův syndrom

DNA – Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)

EDTA - Kyselina ethylendiaminotetraoctová

Het – Heterozygot

Hom - Homozygot

ID – Identifikační číslo (Identity card)

M – Matka probanda/probandky

MUT – Mutovaná alela

NMD - Nonsense-mediated mRNA decay

O – Otec probanda/probandky

PCR – Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)

RP – Retinitis pigmentosa

RPE – Retinální pigmentový epitel

S – Sangerovo sekvenování

Se – Sestra probanda/probandky

SNP – Jednonukleotidový polymorfismus (Single nucleotide polymorphism)

TBE – Tris/kyselina boritá/EDTA

TE – Tris/EDTA

USH – Usherův syndrom (Usher syndrome)

VFN – Všeobecná fakultní nemocnice

VUS – Varianta nejasného významu (Variant of unknown significance)

WES – Celoexomové sekvenování (Whole Exome Sequencing)

WGS – Celogenomové sekvenování (Whole Genome Sequencing)

WT – Standardní alela (Wild type)

8 Webové zdroje

Zkratka	Celý název	Odkaz
ClinVar		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
	Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/index.html
GnomAD	Genome Aggregation Database	http://gnomad.broadinstitute.org/
GVIT	Genetic Variant Inerpretation Tool	www.medschool.umaryland.edu/Genetic_Variant_Interpretation_Tool1.html/
HSF 3.0	Human Splicing Finder	http://umd.be/Redirect.html
HOPE		https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/input/
IGV2.3	Integrative Genomics Viewer	http://software.broadinstitute.org/software/igv/
LOVD	Leiden Open Variation Database	http://www.lovd.nl/3 .0 /home
MaxEntScan	Maximum Entropy Scan	http://umd.be/Redirect.html
MutationTaster		http://www.mutationtaster.org/
NCBI	National Center for Biotechnology Information	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NetGene2		http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/
NNSplice		https://omictools.com/nnsplice-tool
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	https://www.omim.org/
PolyPhen2	Polymorphism Phenotyping v2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Primer3		http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
Provean	Protein Variation Effect Analyzer	http://provean.jcvi.org/index.php
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant	http://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html
SNPandGO		http://snps.biofold.org/snps-and-go/index.html
Uniprot		https://www.uniprot.org/

9 Seznam použité literatury

ABBOTT, Jamie A., Ethan GUTH, Cindy KIM et al., 2017. The Usher Syndrome Type IIIB Histidyl-tRNA Synthetase Mutation Confers Temperature Sensitivity. Biochemistry. 56(28), 3619-3631. DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00114. ISSN 0006-2960. Dostupné také z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.7b00114

ALLER, Elena, Lise LARRIEU, Teresa JAIJO, et al. The USH2A c.2299delG mutation: dating its common origin in a Southern European population. European Journal of Human Genetics. 2010, 18(7), 788-793. DOI: 10.1038/ejhg.2010.14. ISSN 1018-4813. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/ejhg201014

BAUX, David, Lise LARRIEU, Catherine BLANCHET et al., 2007. Molecular and in silico analyses of the full-length isoform of usherin identify new pathogenic alleles in Usher type II patients. *Human Mutation. 28(8*), 781-789. DOI: 10.1002/humu.20513. ISSN 10597794. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/humu.20513

BONNET, Crystel, Zied RIAHI, Sandra CHANTOT-BASTARAUD et al., 2016. An innovative strategy for the *molecular* diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *European Journal of Human Genetics*. **24**(12), 1730-1738. DOI: 10.1038/ejhg.2016.99. ISSN 1018-4813. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/ejhg201699

CUMMINGS, Benjamin. How many colors are really in a rainbow? In: ScienceBlogs [online]. Pearson Education, © 2006-2020, 2007 [cit. 2019-06-26]. Dostupné z: https://scienceblogs.com/startswithabang/2012/08/14/how-many-colors-are-really-in-a-rainbow

ČIHÁK, Radomír, 2004a. Organum visus-Zrakové ústrojí. ČIHÁK, Radomír, Rastislav DRUGA a Miloš GRIM. *Anatomie 3*. 2., upravené a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., s. 594-620. ISBN 80-247-1132-X.

ČIHÁK, Radomír, 2004b. Zraková dráha. ČIHÁK, Radomír, Rastislav DRUGA *a* Miloš GRIM. Anatomie 3. 2., upravené a doplněné vydání. Praha*: Grada Publishing*, **a**.s., s. 450-454. ISBN 80-247-1132-X.

DESMET, François-Olivier, Dalil HAMROUN, Marine LALANDE, Gwenaëlle COLLOD-BÉROUD, Mireille CLAUSTRES a Christophe BÉROUD, 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool *to predict splicing* signals**.** Nucleic Acids Research. 37(9), 67-67.

DOI: 10.1093/nar/gkp215. ISSN 1362-4962. Dostupné také z: https://**academic**.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkp215

DOUVILLE, Christopher, David L. MASICA, Peter D. STENSON, David N. COOPER, Derek M. GYGAX, Rick KIM, Michael RYAN a Rachel KARCHIN, 2016. Assessing the Pathogenicity of Insertion and Deletion Variants with the Variant Effect Scoring Tool (VEST-Indel). Human Mutation. 37(1), 28-35. DOI: 10.1002/humu.22911. ISSN 10597794. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/humu.22911

DREYER, Bo, Lisbeth TRANEBJæRG, Vigdis BROX et al., 2001. A Common Ancestral Origin of the Frequent and Widespread 2299delG USH2A Mutation. The American Journal of Human Genetics. 69(1), 228-234. DOI: 10.1086/321269. ISSN 00029297. Dostupné také z: *https://linkinghub.elsevier.*com/**retrieve**/pii/S0002929707614633

EBERMANN, Inga, Robert K KOENEKOOP, Irma LOPEZ, Lara BOU-KHZAM, Renée PIGEON a Hanno J BOLZ, 2009. An USH2A founder mutation is the major cause of Usher syndrome type 2 in Canadians of French origin and confirms common roots of Quebecois and Acadians. *European Journal of Human Genetics*. **17**(1), 80-84. DOI: 10.1038/ejhg.2008.143. ISSN 1018-4813. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/ejhg2008143

EL-AMRAOUI, Aziz a Christine PETIT, 2014. The retinal phenotype of Usher syndrome: Pathophysiological insights from animal models. Comptes Rendus Biologies. 337(3)*, 167-177.* DOI: 10.1016/j.crvi.2013.12.004. ISSN 16310691. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1631069113002886

GARCIA-GARCIA, Gema, Maria J APARISI, Teresa JAIJO et al., 2011. Mutational screening of the USH2A gene in Spanish USH patients reveals 23 *novel pathogenic mutations*. **Orphanet** Journal of Rare Diseases. 6(1). DOI: 10.1186/1750-1172-6-65. ISSN 1750-1172. Dostupné také z: http://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-6-65

GONZÁLEZ-DEL POZO, María, Marta MARTÍN-SÁNCHEZ, Nereida BRAVO-GIL, Cristina *MÉNDEZ-VIDAL,* Ángel CHIMENEA, Enrique RODRÍGUEZ-DE LA RÚA, Salud BORREGO a Guillermo ANTIñOLO, 2018. Searching the second hit in patients with inherited retinal dystrophies and monoallelic variants in ABCA4, USH2A and CEP290 by whole-gene targeted sequencing. Scientific Reports. 8(1). DOI: 10.1038/s41598-018-31511-5. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/s41598-018-31511-5

HARADA, T., C. HARADA a L. F. PARADA, 2007. Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes & Development*. **21**(4), 367-378. DOI: 10.1101/gad.1504307. ISSN 0890-9369. Dostupné také z: http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1504307

HE, Feng & Allan JACOBSON, 2015. Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. Annual Review of Genetics. 49(1), 339-366. DOI: 10.1146/annurev-genet-112414-054639. ISSN 0066-4197. Dostupné také z: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-112414-054639

HUDÁK, Radovan a David KACHLÍK, 2017. Organum visus. Memorix anatomie. 4. vydání. Praha: Triton, s. 508-514. ISBN 978-80-7553-420-0.

ISOSOMPPI, Juha, Hanna VÄSTINSALO, Scott *GELLER, Elise* HEON, John FLANNERY a Eeva-Marja SANKILA, 2009. Disease-causing mutations in the CLRN1 gene alter normal CLRN1 protein trafficking to the plasma membrane. *Molecular Vision*. (15), 1806-1818. ISSN 1090-0535.

IVANOVA, Marianna E., Vladimir N. TRUBILIN, Dmitry S. ATARSHCHIKOV et al., 2018. Genetic screening of Russian Usher syndrome patients toward selection for gene therapy. *Ophthalmic Genetics*. **39**(6), 706-713. DOI: 10.1080/13816810.2018.1532527. ISSN 1381-6810.

JAWOREK, Thomas J, Rashid BHATTI, Noreen LATIEF, Shaheen N KHAN, Saima RIAZUDDIN a Zubair M AHMED, 2012. USH1K, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 10p11.21–q21.1. *Journal of Human Genetics*. **57**(10), 633-637. DOI: 10.1038/jhg.2012.79. ISSN 1434-5161. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/jhg201279

KOUSAL, B., L. DUDAKOVA, P. SKALICKA, K. BUJAKOWSKA a P. LISKOVA, 2016. Pseudodominance in a Czech family with Usher syndrome type II. *Acta Ophthalmologica*. **94**. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2016.0367. ISSN 1755375X. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-3768.2016.0367

Koressaar, T. & Remm, M. (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics, 23, 1289-91.

KREMER, Hannie, Erwin VAN WIJK, Tina MÄRKER, Uwe WOLFRUM a Ronald ROEPMAN, 2006. Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways.

Human Molecular Genetics. 15*(2),* 262-270. DOI: 10.1093/hmg/ddl205. ISSN 1460-2083. Dostupné také z: http://academic.oup.com/hmg/article/15/suppl_2/R262/624350/Usher-syndrome-molecular-links-of-pathogenesis

KUCHYNKA, Pavel, 2007. KUCHYNKA, Pavel. Oční lékařství [online]. Praha: Grada, s. 52 [cit. 2020-01-05]. ISBN 9788024711638.

LE QUESNE STABEJ, Polona, Zubin SAIHAN, Nell RANGESH et al., 2011. Comprehensive sequence analysis of nine Usher syndrome genes in the UK National Collaborative Usher Study. Journal of Medical Genetics. 49(1), 27-36. DOI: 10.1136/jmedgenet-2011-100468. ISSN 0022-2593. Dostupné také z: http://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmedgenet-2011-100468

MILLÁN, José *M., Elena* ALLER**,** Teresa JAIJO, Fiona BLANCO-KELLY, Ascensión GIMENEZ-PARDO a Carmen AYUSO, 2011. An Update on the Genetics of Usher Syndrome. Journal of Ophthalmology. 2011, 1-8. DOI: 10.1155/2011/417217. ISSN 2090-004X. Dostupné také z: http://www.hindawi.com/journals/joph/2011/417217/

PARMEGGIANI, Francesco, Francesco **S**. SORRENTINO, Diego PONZIN, Vanessa BARBARO, Stefano FERRARI a Enzo DI IORIO, 2011. Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. Current Genomics. 12(4**)**, 238-249. DOI: 10.2174/138920211795860107. ISSN 13892029.

POLL-THE, B.T. a C.J. MAILLETTE DE BUY WENNIGER-PRICK, 2011. The eye in metabolic diseases: Clues to diagnosis. *European Journal of Paediatric Neurology*. **15**(3), 197-204. DOI: 10.1016/j.ejpn.2011.03.005. ISSN 10903798. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090379811000407

RICHARDS, Sue, Nazneen AZIZ, Sherri BALE et al., 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a *joint consensus recommendation of the* American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. **17**(5), 405-423. DOI: 10.1038/gim.2015.30. ISSN 1098-3600. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/gim201530

ROBINSON, James T, Helga THORVALDSDÓTTIR, Wendy WINCKLER, Mitchell GUTTMAN, Eric S LANDER, Gad GETZ a Jill P MESIROV, 2011. Integrative genomics viewer. Nature Biotechnology. 29(1), 24-26. DOI: 10.1038/nbt.1754. ISSN 1087-0156. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/nbt.1754

RUDENKO, Gabby, Erhard **HOHENESTER** a Yves A MULLER, 2001. LG/LNS domains: multiple functions – one business end?. Trends in Biochemical Sciences. 26(6), 363-368. DOI**:** 10.*1016/*S0968-0004(**01**)01832-1. ISSN 09680004. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000401018321

SANJURJO-SORIANO, Carla, Nejla ERKILIC, David BAUX, Daria MAMAEVA, Christian P. HAMEL, Isabelle MEUNIER, Anne-Françoise ROUX a Vasiliki KALATZIS, 2020. Genome Editing in Patient iPSCs Corrects the Most Prevalent USH2A Mutations and Reveals Intriguing Mutant mRNA Expression Profiles. 17, 156-173. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.11.016. ISSN 23290501. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S232905011930141X

SATO, Osamu, Satoshi KOMATSU, Tsuyoshi SAKAI et al., 2017. Human myosin VIIa is a very slow processive motor protein on various cellular actin structures. Journal of Biological Chemistry. 292(26), 10950-10960. DOI: 10.1074/jbc.M116.765966. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M116.765966

SCHWARTZ, Sharon B., Tomas S. ALEMAN, Artur V. CIDECIYAN et al., 2005. Disease Expression in Usher Syndrome Caused by VLGR1 Gene Mutation (USH2C) and Comparison with USH2A *Phenotype*. **46**(2). DOI: 10.1167/iovs.04-1136. ISSN 1552-5783. Dostupné také z: http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.04-1136

ŠAFARIKOVÁ, Hana, 2012. Anatomie lidského oka. In: OPTIKA Hana Šafariková [online]. Vsetín: OPTIK Hana Šafariková [cit. 2019-06-25]. Dostupné z: http*://www*.optika-safarikova**.**cz/oko.html

Thiele, H. & Nurnberg, P. (2005) HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. Bioinformatics, 21, 1730-2.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. & Rozen, S.G. (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res, 40, e115.

Usher Syndrome, ©1996-2020. In: *MedicineNet* [online]. San Clemente: MedicineNet, Inc [cit. 2020-02-13]. Dostupné z: https://www.medicinenet.com/usher_syndrome/article.htm

VACHÉ, Christel, Thomas BESNARD, Pauline LE BERRE et al., 2012. Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: Implications for diagnosis and therapy. *Human Mutation*. **33**(1), 104-108. DOI: 10.1002/humu.21634. ISSN 10597794. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/humu.21634

VAN CAMP, Guy, Rikkert L. SNOECKX, Nele HILGERT et al., 2006. A New Autosomal Recessive Form of Stickler Syndrome Is Caused by a Mutation in the COL9A1 Gene. The American Journal of Human Genetics. 79(3), 449-457. DOI: 10.1086/506478. ISSN 00029297. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000292970762744X

VÄSTINSALO, Hanna, Reetta JALKANEN, Carsten BERGMANN, Christine NEUHAUS, Leenamaija KLEEMOLA, Liisa JAUHOLA, Hanno Jörn BOLZ a Eeva-Marja SANKILA, 2013. Extended mutation spectrum of Usher syndrome in Finland. Acta Ophthalmologica. 91(4), 325-334. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2012.02397.x. ISSN 1755375X. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-3768.2012.02397.x

VERBAKEL, Sanne K., Ramon A.C. VAN HUET, Camiel J.F. BOON et al., 2018. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Progress in Retinal and* Eye **Research**. 66, 157-186. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2018.03.005. ISSN 13509462. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350946217300721

VERPY, Elisabeth, Michel LEIBOVICI, Ingrid ZWAENEPOEL et al., 2000. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nature Genetics*. (26), 51-55. DOI: DOI: 10.1038/79171.

WEIL, Dominique, Aziz EL-AMRAOUI, Mirna MUSTAPHA et al., 2003. Usher syndrome type I G (USH1G) is caused by mutations in the gene encoding SANS, a protein *that associates with* the USH1C protein, harmonin. Human Molecular Genetics. *12(5*), 463–471. DOI: https://doi.org/10.1093/hmg/ddg051.

WELL, Dominique, Stéphane BLANCHARD, Josseline KAPLAN et al., 1995. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type IB. *Nature*. **374**(6517), 60-61. DOI: 10.1038/374060a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/374060a0

WRIGHT, Alan F., Christina F. CHAKAROVA, Mai M. ABD EL-AZIZ a Shomi S. BHATTACHARYA, 2010. Photoreceptor degeneration: genetic *and mechanistic dissection of a complex* trait**.** Nature Reviews Genetics. **11**(4), 273-284. DOI: 10.1038/nrg2717. ISSN 1471-0056. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/nrg2717

YAN, Denise a Xue Z LIU, 2010. Genetics and pathological mechanisms of Usher syndrome. Journal of Human Genetics. 55(6), 327-335. DOI: 10.1038/jhg.2010.29. ISSN 1434-5161. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/jhg201029

ZHANG, Qingjiong, 2016. Retinitis Pigmentosa*:* Progress and Perspective. Asia-Pacific Journal of Ophthalmology. 5(4), 265-271. DOI: 10.1097/APO.0000000000000227. ISSN 2162-0989.

ZHENG, Qing Yin, Denise Yan YAN, Xiao Mei OUYANG, Li Lin DU, Heping YU, Bo CHANG, Kenneth R. JOHNSON a Xue Zhong LIU, 2005. Digenic inheritance of deafness caused by mutations in genes encoding cadherin 23 and protocadherin 15 in mice and humans. *Human Molecular Genetics*. **14**(1), 103-111. DOI: https://doi.org/10.1093/hmg/ddi010.

ZUPAN, Andrej, Ana FAKIN, Saba BATTELINO, Martina JARC-VIDMAR, Marko HAWLINA, Crystel BONNET, Christine PETIT a Damjan GLAVAČ, 2019. Clinical and Haplotypic Variability of Slovenian USH2A Patients *Homozygous* for **the** c. 11864G>A Nonsense Mutation. Genes. 10(12). DOI: 10.3390/genes10121015. ISSN 2073-4425. Dostupné také z: https://www.mdpi.com/2073-4425/10/12/1015

10 Přílohy

10.1 Informovaný souhlas pacientů

Laboratoř biologie a patologie oka, ÚDMP, 1. LF UK a VFN
Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2
vedoucí pracoviště: prof. MUDr. Viktor Kožich, CSc.
tel: 224 967 139

Souhlas vyšetřované/ho (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením

Jméno vyšetřované/ho:…….…….
Rodné číslo:…….

Účel genetického laboratorního vyšetření

- Ověření/potvrzení diagnózy nemoci:……
- Zjištění predispozice pro nemoc:..……
- Zjištění přenašečství pro nemoc:.…..……

Předpokládaný prospěch tohoto vyšetření…….
Znalost přesné příčiny nemoci, která umožňuje zlepšení poradenství pacientům

A. Prohlášení lékaře
Prohlašuji, že jsem vyšetřované/mu (zákonnému zástupci vyšetřovaného) jasně a srozumitelně vysvětlil/a účel, povahu, předpokládaný prospěch, následky i možná rizika výše uvedeného genetického laboratorního vyšetření. Rovněž jsem vyšetřovanou osobu seznámil/a s možnými výsledky a s důsledky toho, že by vyšetření nebylo možno za výše uvedeným účelem provést (nezdařilo by se) nebo by nemělo potřebnou vypovídací schopnost pro naplnění sledovaného účelu. Seznámil/a jsem vyšetřovanou osobu (zákonného zástupce) i s možnými riziky a důsledky v případě odmítnutí tohoto vyšetření. Výsledky laboratorního vyšetření budou důvěrné a nebudou bez souhlasu vyšetřované osoby/zákonného zástupce sdělovány třetí straně, pokud platné právní předpisy neurčují jinak.
Jméno lékaře:…….……
Podpis: ……. Dne…… …… 201……

B. Prohlášení vyšetřované osoby
1. Potvrzuji, že jsem četl(a) a rozumím informacím pro pacienta „Molekulárně genetická charakteristika Usherova syndromu u pacientů českého původu“. Vše mi bylo sděleno a vysvětleno jasně a srozumitelně. Měl/a jsem možnost vše si řádně, v klidu a v dostatečně poskytnutém čase zvážit, měl/a jsem možnost se lékaře zeptat na vše, co jsem považoval/a za pro mne podstatné a potřebné vědět a probrat s ním vše, čemu jsem nerozuměl/a. Na ty to mé dotazy jsem dostal/a jasnou a srozumitelnou odpověď.

2. Jsem si vědom(a), že při zařazení do studie budou moje osobní data / data mého dítěte uchována s plnou ochranou důvěrnosti dle platných zákonů ČR.

3. Souhlasím s odebráním a darováním krevního vzorku / vzorku buněk z dutiny ústní určeného k izolaci genetického materiálu (DNA) a následnému molekulárně genetickému vyšetření onemocnění sítnice diagnostikovaného u mě nebo u mých rodinných příslušníků.

4. Souhlasím s tím, že výzkumný tým může nahlížet do částí mé klinické dokumentace / dokumentace mého dítěte, které mají vztah k výzkumnému projektu. Pro tyto případy je zaručena

ochrana důvěrnosti mých osobních dat. Jiným subjektům (akademickým nebo komerčním institucím), pokud to bude vyžadovat řešení výzkumného úkolu, mohou být data nebo vzorky DNA poskytnuty pouze bez identifikačních údajů (tj. anonymně) pod číselným kódem.

5. Jsem si vědom(a), že ani já ani mé dítě nezíská v budoucnosti žádný finanční prospěch, povedou-li výsledky tohoto výzkumu k vývoji nových terapií, testů nebo patentů.

6. Souhlasím s tím, aby výsledky a informace získané v rámci této studie byly publikovány ve vědeckých a lékařských časopisech. Porozuměl(a) jsem tomu, že budou odstraněny všechny osobní informace, které by mohly vést k mojí identifikaci / k identifikaci mého dítěte.

B. 2 Dále si přeji následující:

- ❑ Abych s výsledky genetického laboratorního vyšetření : byl(a) / nebyl(a) seznámen (a)* Mé kontaktní údaje pro tento účel jsou (email, telefon, adresa):

……
……

- ❑ Aby o výsledku vyšetření byly informovány následující osoby:

…….....

B. 3 Rozhodl (a) jsem, že se vzorkem bude po ukončení testování naloženo takto:

- ❑ Pokud to bude možné, bude můj vzorek (vzorky) skladován pro další analýzu provedenou k mému prospěchu a prospěchu mé rodiny, ale vždy budu před dalším vyšetřením poučena a nově navrhovaná genetická laboratorní vyšetření budou provedena až s mým aktuálním informovaným souhlasem.
- ❑ Můj vzorek (vzorky) bude po provedení genetického laboratorního vyšetření zlikvidován s tím rizikem, že nebude již možné v budoucnosti výsledek vyšetření v případě potřeby znovu ověřit a pro další genetické testování bude nutný nový odběr materiálu.
- ❑ Souhlasím s anonymním využitím DNA k lékařskému výzkumu
- ❑ Nesouhlasím s anonymním využitím DNA k lékařskému výzkumu

Na základě tohoto poučení prohlašuji, že souhlasím s odběrem příslušného vzorku a s provedením genetického laboratorního vyšetření s výše uvedenými podmínkami.
Jsem si vědom, že svůj souhlas mohu kdykoliv odvolat.

Podpis vyšetřované osoby (zákonného zástupce)……

V ……. **Dne……. 20……**

Jméno zákonného zástupce:…….……Rodné číslo:……
Vztah k vyšetřované osobě:……
Tento informovaný souhlas je vyhotoven ve dvou stejnopisech, z nichž jeden obdrží vyšetřovaná osoba (zákonný zástupce) a druhý informující lékař. Pro potřeby ostatních subjektů, podílejících se na diagnostice, se poskytuje (lékařem potvrzená) kopie tohoto dokumentu.

Děti starší 12 let podepisují informovaný souhlas současně s rodiči.

10.2 Primery použité pro Sangerovo sekvenování

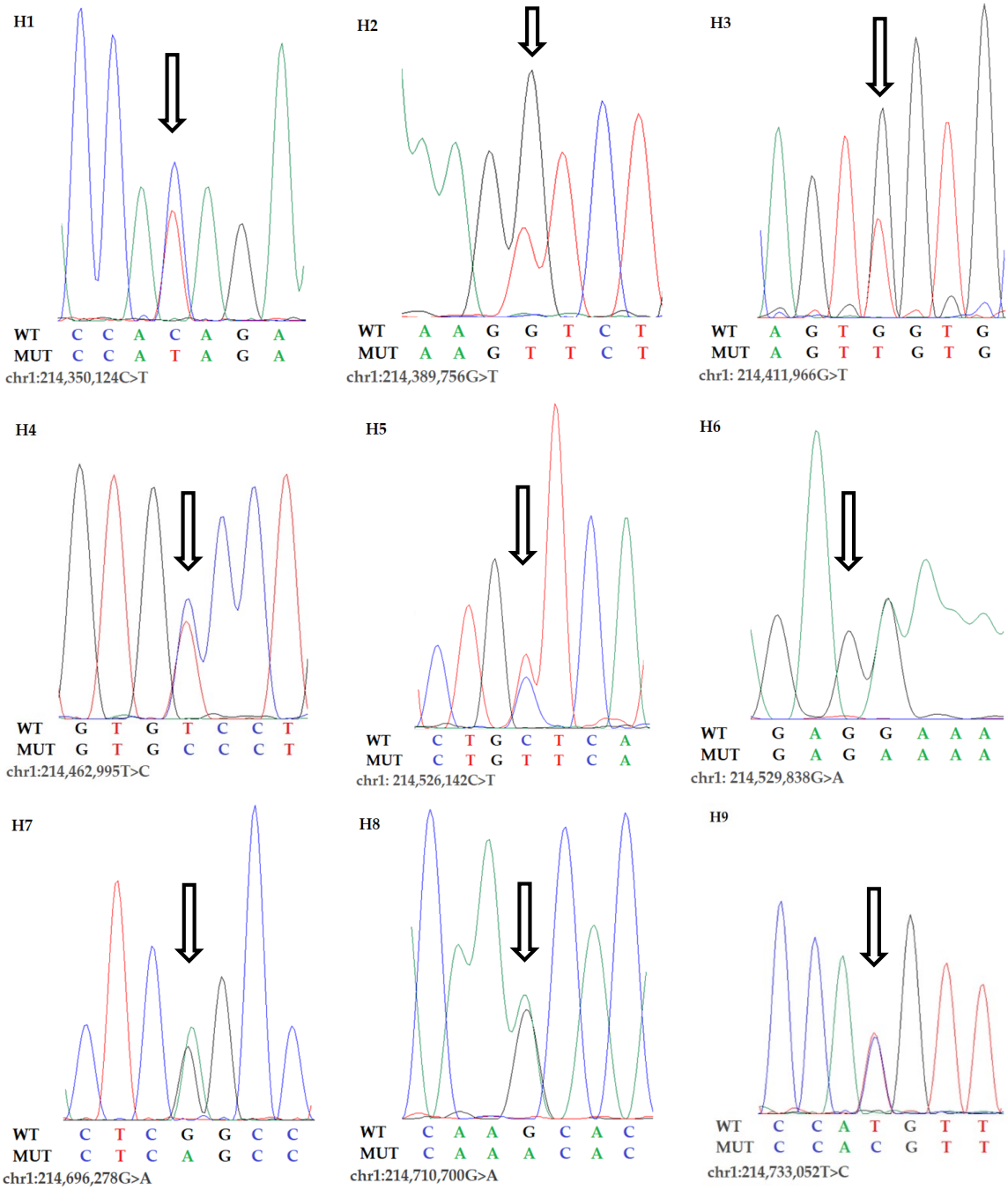
Primer	Sekvence 5´→3´	Teplota nasedání	Délka produktu
Primery pro analýzu haplotypu (NG_009497.1)			
H1F	TTTTCAGGCGAGACTGGAGTG	60 °C	233
H1R	TCCTTATGAGCCTTTAACACGAA	60 °C	233
H2F	GAAAGGCCCAGAAGGAGTTCA	60 °C	223
H2R	CTCTGGGGCGTTATCTGCTTT	60 °C	223
H3F	TGCTTCCTCACATCTGTGTTCTG	60 °C	295
H3R	GAGCGTGCCTGTAGTTTCAGC	60 °C	295
H4F	TGTTCCCTCTCATTTCCTGCTC	60 °C	204
H4R	ACAGCCACAGAAAAACGCTGA	60 °C	204
H5F	GCCAACCATAAGGCTGTAGGC	60 °C	215
H5R	GGGAATTGAGCATTCCCATGT	60 °C	215
H6F	CACCACGTAACAACAGGTGCAT	60 °C	247
H6R	CAGAGCCCTGTGCTTCTTTCC	60 °C	247
H7F	GGACGGCATAAAATTGCAGGT	60 °C	226
H7R	CCCATAACCTTAGGTGCCTCAC	60 °C	226
H8F	GGCTGCTGCAGATCAGGTCTA	60 °C	221
H8R	CAACTCGGGCTTAGAAAGGCTA	60 °C	221
H9F	TGCATCCCAGGGTAACTCCTT	65 °C	338
H9R	CTGGGCGACAGAGCAAGATT	65 °C	338
H10F	AGTTGCACACCACCACACACA	63 °C	249
H10R	CCATAAGCCTCACCACCTGAA	63 °C	249
***H11F**	CTCCCGAGTAGCTGTGGGACT	63 °C	243
***H11R**	ACCGCACCTGGCTGAAAATC	63 °C	243
H12F	CCTTCAGGGGATCATGAGATTG	60 °C	228
H12R	TCCTGTTACAACCATGGGAAATG	60 °C	228
***H13F**	AATTAATCTGCTCTTGGGATCGT	60 °C	392
***H13R**	CATGTGGGCTAGCTGGTCTTG	60 °C	392
H14F	CAACTTGCCCAGTAAGCTGAGAA	60 °C	198
H14R	CGCTGGAGATGGACAGAGAAA	60 °C	198
H15F	GCTGAGCTCAACACAGGAGGA	60 °C	225
H15R	TTGGAATTCTCGGCATCAAGA	60 °C	225
H16F=H17F	TCCCGAACAAGAGTTGTTTGAA	60 °C	262
H16R=H17R	TTCATCTGCCTCCTTGGTTTTT	60 °C	262
H17F = H16F	TCCCGAACAAGAGTTGTTTGAA	60 °C	262
H17R = H16R	TTCATCTGCCTCCTTGGTTTTT	60 °C	262
H18F	CAGGGCATGCGCTAGTAAAAG	60 °C	216
H18R	TCAACCCCAAGCAACTGAAGA	60 °C	216
H19F	AGGTGCGATTGTAGATTATGCAG	60 °C	250
H19R	TGGTTTGTGCTTTTTCTCACTTT	60 °C	250
H20F	TGGAACTTCAGATGGAAAAGAGA	60 °C	334
H20R	TCGTGACAAGGTGAAAATGGC	60 °C	334
H21F	TCATTATGAAATGAAACACAACCA	60 °C	230
H21R	CCATTTACAGTAGCCACACATGA	60 °C	230
H22F	GGTCACTTGGCCATTGGTAGTC	60 °C	202

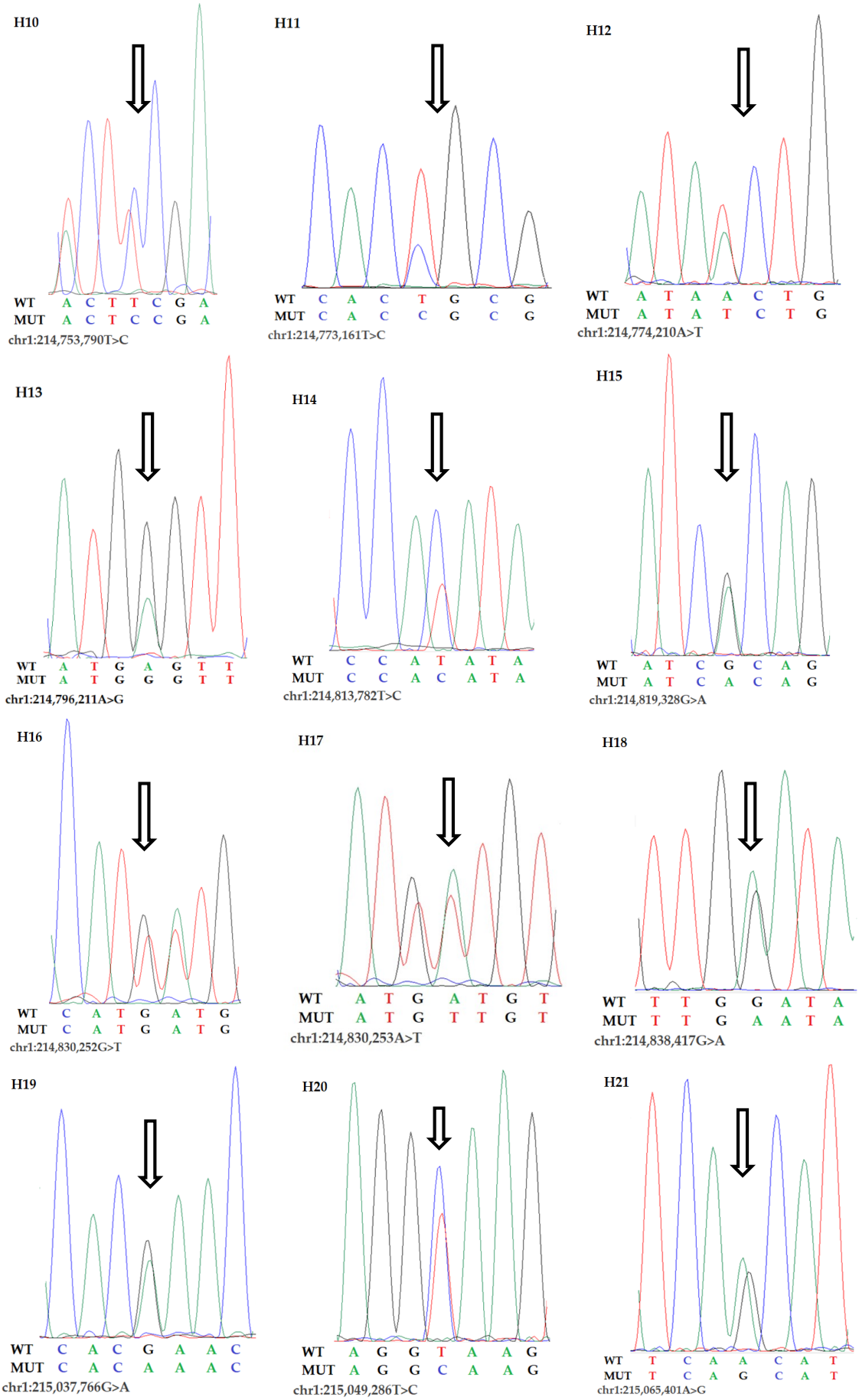
H22R	GTAACGTGGTGGCCTGAATTG	60 °C	202
H23F	TTTTTCGCAAGTTAACCACCA	60 °C	220
H23R	TAGAGGGCTTCGATGCATTTTG	60 °C	220
H24F	AGCCAGGATGGTCTCGATCTC	64 °C	485
H24R	ACAGCCCATCAGGATCCCTAA	64 °C	485
H25F	TGCCCAAGTGCACACTTTTATG	60 °C	194
H25R	AGCACCCTTGGCAAACCATAT	60 °C	194
H26F	GCAGGAAGCCAGAGTGCTTTT	60 °C	395
H26R	CTCCAAGGGGAAATGCATTCT	60 °C	395
H28F	CCATCTTCCCAGTCTCCCTCT	63 °C	247
H28R	TTGGAGAATTTGGTCTTTGTTGC	63 °C	247
H29F	CCCACCCTTCCACTTCCTTT	63 °C	248
H29R	ACTGACCCACTCTCCTCCCTG	63 °C	248
***H30F**	AAGTGAAGGGTGCAGCAACAA	63 °C	243
***H30R**	CACCTCAGCCTCCTGAGTCAC	63 °C	243
H31F	CAGCTGTTTCTTCCTGGTGTCA	60 °C	210
H31R	CACAAAAGGTGAAACCTCATCCA	60 °C	210
H32F	TCATTTCAATGCATCCCTGTG	60 °C	180
H32R	TGAATGAATGAACGAACCCTCA	60 °C	180
H33F	AAAAGAGCTCAGCTTGCGTTG	60 °C	220
H33R	TGTGATTGCTAAGGTGTTCCCA	60 °C	220
Primery pro cílený screening exonu 61 genu *USH2A* (NG_009497.1:g.700165G>A, NM_206933.3:c.11864G>A)			
USH2A_ex61F	TGACACCAGGAAGAAACAGC	60 °C	638
USH2A_ex61R	TTATCCCCGTGACTACATTGC	60 °C	638
Primery pro mapování delecí genu *ADGRV1* a *USH2A* (NG_007083.2 a NG_009497.1)			
ADGRV1_1634_del_F	CCCTCATCACCTCCTGAAAA	62 °C	349
ADGRV1_1634_del_R	TGGGGTTAGTCCCCATGTAA	62 °C	349
USHdel52_F	AGGTTGCCAGAGGTTTCACATC	64 °C	752
USHdel52_R	CATGCCACCACACCCAGTTA	64 °C	752
USHdel_F	ACGTGTCACCCTTGGTTCCTT	62 °C	233
USHdel_R	GCCACCACACCCAGTTAACAC	62 °C	233
Primery pro analýzu *USH2A* exonů (NM_206933.3)			
USH2A_ex2F	GCCTGGGATGAGCTTCAG	60 °C	841
USH2A_ex2R	GGTTTGGAATTCAGGCTGA	60 °C	841
USH2A_ex6F	CGAGTGACATTCATTTGTAACGA	60 °C	437
USH2A_ex6R	GGCATTTGTTGCAATAACCA	60 °C	437
USH2A_ex7F	TTTGAATCTAATAATTCCATGGTTTG	60 °C	372
USH2A_ex7R	TGGTGGTGAAGGGAAGTCTC	60 °C	372
USH2A_ex11F	TGGCAGGTAGAGATGAAAGG	60 °C	371
USH2A_ex11R	GCAAATGCAGTCTTCAATTCTAC	60 °C	371
USH2A_ex13F	GCAGTAGCATTGTTTGTGTCTC	60 °C	816
USH2A_ex13R	GTAGAAGCCACAAACCAGAAAC	60 °C	816
USH2A_ex20F	TGGTGGTTGGCAATAATTCC	60 °C	381
USH2A_ex20R	GAGTTAGTGAGGGAGGAGAAGACA	60 °C	381

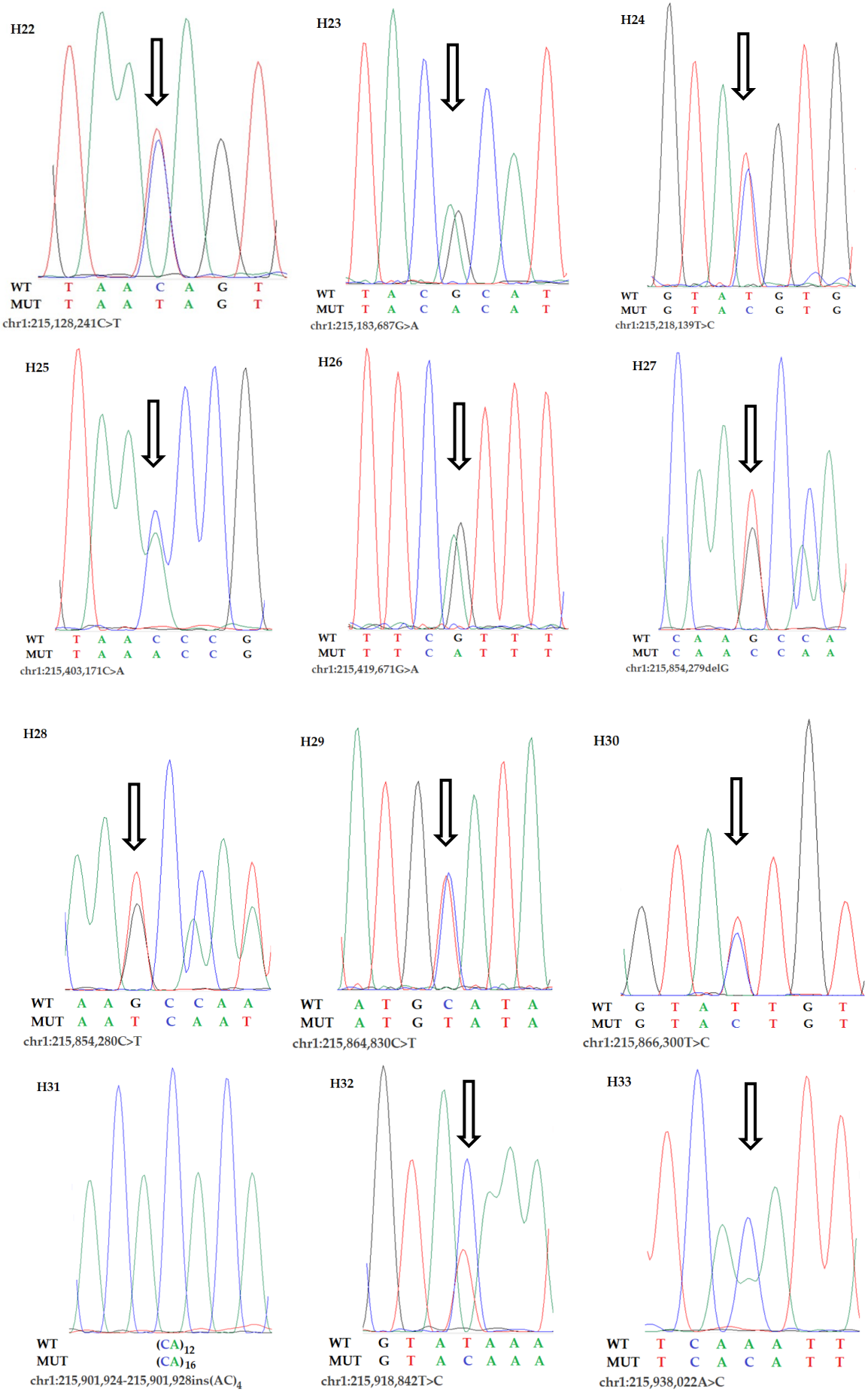
Primery pro ověřování variant nalezených pomocí WES a WGS			
USH2A (NG_009497.1 a NM_206933.3)			
USH2A_rs147753110F	AGCCTGAGTGACAGAGCGAGA	60 °C	192
USH2A_rs147753110R	CTGAGGCTTTCAGGGGAAAAA	60 °C	192
USH2A_rs115058075F	GCCAGCTCATGGACATTCAAG	60 °C	197
USH2A_rs115058075R	TAAGTGCTCAGAGGCGAGTGC	60 °C	197
USH2A_ex10F	ACACAGGCCTCCAAACCAACT	60 °C	321
USH2A_ex10R	ACACAGGCCTCCAAACCAACT	60 °C	321
USH2A_ex22F	AATGGGATATATTTAAAACCAAATGGC	60 °C	387
USH2A_ex22R	TTCAGTGTGAAAACAGAAGCATTTAGG	60 °C	387
USH2A_ex27F	CTCTCTCCCAAACTGCCCTTC	60 °C	388
USH2A_ex27R	AGCACCAGGGCTGTATGGATT	60 °C	388
USH2A_ex40F	GAGATCTCATTTGATGGCAGAA	60 °C	373
USH2A_ex40R	GGCTCATTTCTTTGCTTTGG	60 °C	373
PCDH15 (NM_033056.4)			
PCDH15_ rs748808565F	CAACAGACCCTGATGCTGGAA	60 °C	161
PCDH15_ rs748808565R	TCCATCTGTTGCCACAACAAC	60 °C	161
PCDH15_rs111033363_F	ATCGATGGCTCTGTTGGTTT	62 °C	390
PCDH15_rs111033363_R	GGACATGGTTGGTGACCTTT	62 °C	390
CDH23 (NG_007083.2 a NM_022124.5)			
CDH23_exon42_F	ACACCCAGGGGAGTTTGTGAT	60 °C	238
CDH23_exon42_R	CCTCTCTTGGCACAAGGGTAA	60 °C	238
CDH23_rs886336351F	CTCCTGCCCACCAGTATTTCC	60 °C	200
CDH23_rs886336351R	ATACTGCCCTGTGTGGCACTG	60 °C	200
Intron_CDH23F	GGACCCCACTCCAGAGAACAC	60 °C	221
Intron_CDH23R	ACGGACATCTGATCCTGGTGA	60 °C	221

* ReddyMix PCR Master Mix

10.3 Výřezy sekvencí SNP testovaných při haplotypové analýze




H10
WT A C T T C G A
MUT A C T C C G A
chr1:214,753,790T>C
H11
WT C A C T G C G
MUT C A C C G C G
chr1:214,773,161T>C
H12
WT A T A A C T G
MUT A T A T C T G
chr1:214,774,210A>T
H13
WT A T G A G T T
MUT A T G G G T T
chr1:214,796,211A>G
H14
WT C C A T A T A
MUT C C A C A T A
chr1:214,813,782T>C
H15
WT A T C G C A G
MUT A T C A C A G
chr1:214,819,328G>A
H16
WT C A T G A T G
MUT C A T G A T G
chr1:214,830,252G>T
H17
WT A T G A T G T
MUT A T G T T G T
chr1:214,830,253A>T
H18
WT T T G G A T A
MUT T T G A A T A
chr1:214,838,417G>A
H19
WT C A C G A A C
MUT C A C A A A C
chr1:215,037,766G>A
H20
WT A G G T A A G
MUT A G G C A A G
chr1:215,049,286T>C
H21
WT T C A A C A T
MUT T C A G C A T
chr1:215,065,401A>G


H22
WT T A A C A G T
MUT T A A T A G T
chr1:215,128,241C>T
H23
WT T A C G C A T
MUT T A C A C A T
chr1:215,183,687G>A
H24
WT G T A T G T G
MUT G T A C G T G
chr1:215,218,139T>C
H25
WT T A A C C C G
MUT T A A A C C G
chr1:215,403,171C>A
H26
WT T T C G T T T
MUT T T C A T T T
chr1:215,419,671G>A
H27
WT C A A G C C A
MUT C A A C C A A
chr1:215,854,279delG
H28
WT A A G C C A A
MUT A A T C A A T
chr1:215,854,280C>T
H29
WT A T G C A T A
MUT A T G T A T A
chr1:215,864,830C>T
H30
WT G T A T T G T
MUT G T A C T G T
chr1:215,866,300T>C
H31
WT (CA)12
MUT (CA)16
chr1:215,901,924-215,901,928ins(AC)4
H32
WT G T A T A A A
MUT G T A C A A A
chr1:215,918,842T>C
H33
WT T C A A A T T
MUT T C A C A T T
chr1:215,938,022A>C