

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Ivona Marešová

**Molekulárně genetická analýza u Niemann-Pickovy
choroby typu C**

Molecular genetic analysis in Niemann-Pick type C disease

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Dvořáková, Csc.

Praha 2013

Autor: Bc. Ivona Marešová

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Dvořáková, CSc.

Název práce: Molekulárně genetická analýza u Niemann-Pickovy choroby typu C

Pracoviště: Ústav dědičným metabolických poruch 1. lékařské fakulty UK v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Rok obhajoby práce: 2013

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, 02.05.2013

Podpis

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala především vedoucí této práce paní RNDr. Lence Dvořákové, CSc. za její odborné rady, laskavý přístup a veškerý čas, který mi věnovala.

Dále chci poděkovat celému kolektivu ÚDMP, a to především paní MUDr. Larise Stolnaya za její nekonečnou trpělivost a ochotu mi kdykoli pomoci.

Velké dík patří i mé rodině za podporu jak finanční, tak morální během celého mého studia.

Poslední osobou, které patří poděkování je můj přítel Bc. David Hanel, který byl vždy připraven ochotně řešit mé záludné dotazy, co se práce s počítačem týče.

Práce vznikla za finanční podpory IGA MZ ČR (NT12239-5/2011): *Niemann-Pickova choroba typu C: klinická, molekulárně genetická, biochemická a morfologická studie. Návrh nových diagnostických a prediktivních algoritmů.*

Abstrakt

Niemann-Pickova choroba typu C je velice závažné onemocnění s autozomálně recesivním typem dědičnosti. Příčinou nemoci jsou patogenní mutace nacházející se v genech *NPC1/NPC2*. Tyto geny kódují lysozomální neenzymatické NPC1/NPC2 proteiny, které se podílejí na transportu lipidů. V důsledku deficitu těchto proteinů dochází k intracelulárnímu hromadění lipidů, především neesterifikovaného cholesterolu a glykolipidů.

Kauzální terapie je v současnosti neuspokojivá, vyvíjejí se proto nové léčebné postupy. Některé z nich závisí na tom, zda se v buňkách pacientů vyskytuje alespoň zbytkové množství transkriptu genu *NPC1*.

U vybraných pacientů, u kterých byla k dispozici kultura kožních fibroblastů, jsem charakterizovala vliv patogenních mutací na množství transkriptu. Výsledky ukázaly, že u všech patogenních mutací je množství transkriptu detekovatelné.

Současně jsem charakterizovala strukturu promotoru genu *NPC1*. Sekvenační analýzou jsem v promotoru našla polymorfizmy rs8099071, rs28403610, rs2981422, rs1652354, rs1788774, rs1788772. Analyzovala jsem skladbu polymorfizmů u jednotlivých pacientů, výsledky svědčí pro existenci šesti různých haplotypů.

U nově diagnostikované pacientky jsem mutační analýzu našla pouze jednu patogenní mutaci p.I1061T (c.3182T>C) v genu *NPC1*. Z tohoto důvodu jsem pomocí metody MLPA vyšetřila geny *NPC1/NPC2* na přítomnost rozsáhlejší delece či duplikace. Ani pomocí této metody nebyla druhá mutace nalezena.

Klíčová slova: Niemann-Pickova choroba typu C, promotor genu *NPC1*, analýza transkriptu genu *NPC1*, restriční analýza, sekvenační analýza, MLPA

Abstract

Niemann-Pick disease type C (NPC) is a rare, severe disease with autosomal recessive inheritance. Disease is caused by pathogenic mutations located in genes *NPC1/NPC2*. These genes encode lysosomal non enzymatic NPC1/NPC2 proteins that are part of lipid transport. As a result of malfunction of these proteins intracellular accumulation of lipids occurs, in particular unesterified cholesterol and glycolipids.

Causal therapy is currently still unsatisfactory therefore new therapies are evolved. However these therapies depend on whether the patient cells contain at least residual amount of transcript *NPC1* gene.

In a group of patients, for which a fibroblast culture was available, I analyzed the effect of pathogenic mutations on the expression level of the transcript. Results showed that for all pathogenic mutations transcript level is low, but detectable.

Moreover, I characterized the structure of the *NPC1* gene promoter. By sequence analysis I found polymorphisms rs8099071, rs28403610, rs2981422, rs1652354, rs1788774, rs1788772 in promoter, which are common for European population. On the basis of the composition of polymorphisms in individual patients, I estimate six different haplotypes.

I performed mutation analysis in DNA of recently diagnosed patient. I found only one pathogenic mutation p.I1061T (c.3182T> C) in the *NPC1* gene. Therefore I tested genes *NPC1/NPC2* for the presence of extensive deletions or duplications using the MLPA method. However, even using this method, the second mutation was not detected.

Key words: Niemann-Pick disease type C, *NPC1* gene promoter, analysis of *NPC1* gene transcript, restriction analysis, sequencing analysis, MLPA

Obsah

Prohlášení.....	- 2 -
Poděkování.....	- 3 -
Abstrakt.....	- 4 -
Abstract.....	- 5 -
Obsah	- 6 -
Seznam zkratk	- 8 -
1 Úvod.....	- 9 -
2 Cíle práce.....	- 11 -
3 Přehled literatury	- 12 -
3.1 Niemann-Pickova choroba.....	- 12 -
3.2 Niemann-Pickova choroba typ C.....	- 14 -
4 Materiály	- 26 -
4.1 Chemikálie.....	- 26 -
4.2 Roztoky a pufry	- 26 -
4.3 Standardy molekulových hmotností	- 26 -
4.4 Restrikční enzymy	- 27 -
4.5 Komerční soupravy.....	- 27 -
4.6 Oligonukleotidy	- 27 -
5 Metody	- 31 -
5.1 Vyšetření množství transkriptu genu <i>NPCI</i>	- 31 -
5.2 Studie promotoru genu <i>NPCI</i>	- 38 -
5.3 Mutační analýza genu <i>NPCI</i> u nově diagnostik. pacientky .-	- 42 -
5.4 Metoda MLPA.....	- 44 -
6 Výsledky.....	- 49 -
6.1 Výsledky vyšetření množství transkriptu genu <i>NPCI</i>	- 49 -
6.2 Výsledky analýzy promotoru <i>NPCI</i>	- 53 -
6.3 Výsledky mutační analýzy u nově diagnostik. pacientky	- 56 -

6.4	Výsledky MLPA metody	57 -
7	Diskuze	61 -
7.1	Vyšetření množství transkriptu genu <i>NPCI</i>	61 -
7.2	Analýza promotoru genu <i>NPCI</i>	63 -
7.3	Mutační analýza u nově diagnostikované pacientky	65 -
7.4	Metoda MLPA	65 -
7.5	Závěr diskuze	66 -
8	Souhrn	67 -
9	Seznam použité literatury	68 -
10	Příloha	73 -

Seznam zkratek

BSA	Hovězí sérový albumin
cDNA	Komplementární (syntetická) deoxyribonukleová kyselina
CRD	Cystein-bohatá doména (<i>cystein-rich domain</i>)
DEPC	Diethylpyrokarbonát
DTT	Dithiothreitol (<i>Cleland's reagent</i>)
gDNA	Genomová deoxyribonukleová kyselina
LAL	Lysozomální kyselná lipáza (<i>lysosomal acid lipase</i>),
LDL	Lipoprotein o nízké hustotě (<i>low density lipoprotein</i>)
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
NB-DNJ	N-butyl-deoxynojirimycin
NEB	New England BioLabs® Inc.
NPC	Niemann-pickova choroba typu C
PCR	Polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RFLP	Restrikční analýza (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus (<i>single-nucleotide polymorphism</i>)
SSD	Vazebné místo pro sterol (<i>sterol-sensing domain</i>)
ÚDMP	Ústav dědičných metabolických poruch

1 ÚVOD

Diplomová práce byla součástí projektu podporovaného IGA MZ ČR (NT12239-5/2011): *Niemann-Pickova choroba typu C: klinická, molekulárně genetická, biochemická a morfologická studie. Návrh nových diagnostických a prediktivních algoritmů.*

Niemann-Pickova choroba typu C (NPC, MIM 257220, 607625) je velmi vzácné závažné neurodegenerativní onemocnění, které řadíme k lysozomálním stádatavým poruchám. Nemoc s autozomálně recesivním typem dědičnosti postihuje všechny věkové skupiny od prenatálního období až po sedmou dekádu života (Vanier & Millat 2003). Důsledkem deficitu NPC1/NPC2 proteinu je intracelulární hromadění neesterifikovaného cholesterolu a dalších lipidů zejména v neuronech a makrofázích (Vanier 2010). Deficit těchto proteinů je způsoben patogenními mutacemi v příslušných genech *NPC1/NPC2*.

Analýza mutací je jedním ze základních diagnostických přístupů při potvrzení diagnózy onemocnění NPC. Je to také metoda, která odlišuje typ NPC1 od NPC2 typu, a současně také umožňuje prenatální diagnostiku.

Kauzální terapie je u Niemann-Pickovy choroby typu C v současnosti stále neuspokojivá. U závažných a rychle se rozvíjejících forem onemocnění je zatím jedinou pomocí v rodinách včasné a správné určení diagnózy.

Pro pomalu gradující formy onemocnění se vyvíjejí nové terapeutické postupy, které jsou založeny na posílení exprese mutovaného NPC1/NPC2 proteinu či na využití chaperonů, které napomáhají ke správnému prostorovému uspořádání a stabilitě proteinů (Ericson 2008). U těchto terapeutických postupů je důležité, aby v buňce bylo přítomno alespoň reziduální množství proteinu.

Velká část této práce je zaměřena právě na problematiku vlivu patogenních mutací na množství transkriptu. V této souvislosti byla charakterizována struktura promotoru *NPCI* genu z důvodu, že by zde nalezené polymorfizmy či jiné genetické varianty mohly ovlivňovat úroveň transkripce a tím se podílet na molekulární patogenezi onemocnění NPC.

U nově přichozí pacientky byla provedena mutační analýza, neboť na charakteru mutace závisí předpověď vývoje onemocnění a v budoucnu i návrh nových typů léčby.

2 CÍLE PRÁCE

- Zavést metody založené na technice PCR/RFLP pro analýzu exprese transkriptu u vybraných patogenních mutací v genu *NPC1*.
- Zavedené metody použít pro vyšetření kultur kožních fibroblastů od pacientů s NPC1.
- Zavést sekvenační analýzu promotorové oblasti genu *NPC1*.
- Provést sekvenační analýzu promotoru u pacientů.
- U nově diagnostikované pacientky provést analýzu mutací v genu *NPC1* (sekvenační analýza, případně metoda MLPA).

3 PŘEHLED LITERATURY

3.1 Niemann-Pickova choroba

Niemann-Pickova choroba je soubor klinicky a geneticky heterogenních neuroviscerálních onemocnění s autozomálně recesivním typem dědičnosti a fatálním průběhem (Popětová *et al.* 2010).

3.1.1 Historie

Německý pediatr Albert Niemann jako první popsal chorobu roku 1914. Histologické potvrzení, že se jedná o novou nosologickou jednotku, podal o pár let později patolog Ludwig Pick (Vanier 2010).

Roku 1958 lékaři Crocker a Faber poukázali na širokou variabilitu věků pacientů, při jehož dosažení nemoc manifestuje, na heterogenitu klinických projevů a na úroveň skladování sfinogmyelinu ve tkáních (Crocker & Faber 1958). Tyto informace následně vedly k rozčlenění nemoci do čtyř skupin, A až D (Crocker 1961).

3.1.2 Klasifikace typů Niemann-Pickovy choroby

Onemocnění typů A a B je způsobené mutacemi v genu *SMPD1*, které mají za následek deficit kyselé sfinogmyelinázy, což později vede k progresivnímu hromadění sfinogmyelinu v orgánech (Schuchman *et al.* 2007).

Typ A je závažnější neuropatická forma. Onemocnění se manifestuje obvykle okolo 3 až 4 měsíce věku neprospíváním a hepatosplenomegalií¹. Častá je novorozenecká žloutenka a přibližně u poloviny případů se vyskytne třešňová skvrna na sítnici. Pacienti se převážně dožívají 2 až 4 let. Zajímavostí je zvýšený výskyt u etnické skupiny Aškenázských Židů (Schuchman 2007) (Fernandes *et al.* 2008).

Typ B je chronickou formou, která se může manifestovat během celého života. Zdá se, že tento typ má vyšší prevalenci v jižní Evropě, severní Africe, Turecku a na Arabském poloostrově (Fernandes *et al.* 2008).

Typ C a D jsou způsobené mutacemi v genech *NPCI/NPC2* a jedná se o neenzymopatické varianty Niemann-Pickovy choroby charakterizované poruchou intracelulárního transportu lipidů (Vanier & Millat 2003).

Později bylo zjištěno, že Niemann-Pickova choroba typu D je pouze endemická varianta typu C u populace obývající jihozápadní část Nového Skotska v Kanadě (Greer *et al.* 2008)

¹ neobvyklé zvětšení jater a sleziny

3.2 Niemann-Pickova choroba typ C

Niemann-Pickova choroba typu C je vzácné vrozené autozomálně recesivní onemocnění ze skupiny strádavých lysozomálních poruch, při kterém dochází k hromadění cholesterolu, sfingomyelinu, sfingosinu a glykosfingolipidů. Kumulací je zasažen především mozek, játra a slezina (Vanier 2010). Minimální odhadovaná celosvětová incidence je 1:120 000 (Vanier 2010). Incidence v České republice se od celosvětové nijak výrazně neliší (Popětová *et al.* 2010).

3.2.1 Klinický obraz

Závažnost průběhu onemocnění NPC se velice různí a koreluje s věkem manifestace prvních příznaků. Od těžkých forem nemoci v prenatálním období až po relativně mírný průběh v adultním věku (Garver *et al.* 2007).

Důležité je rozlišit systémová postižení od neurologických a psychiatrických, neboť se vyvíjejí nezávisle na sobě (Fernandes *et al.* 2008) (Vanier 2010). Věk nástupu systémových příznaků nesouvisí s průběhem a závažností neurologických postižení, zatímco u neurologických symptomů nacházíme korelaci mezi věkem nástupu prvních příznaků a průběhem nemoci respektive životností pacientů (Vanier 2010).

Systémové příznaky nemusejí být vždy přítomny a mimo perinatální období nebývají tato postižení závažná (Vanier & Millat 2003).

Kategorizace pacientů dle věku nástupu prvních neurologických příznaků, může být užitečná pro odhad průběhu nemoci a následnou léčbu (Patterson *et al.* 2012).

3.2.1.1 Perinatální období

Projeví-li se onemocnění v této etapě, může důsledkem poškození plodu nastat potrat či předčasný porod. U takto dříve narozených pacientů se často vyskytuje hepatosplenomegalie a ascites² (Garver *et al.* 2007) (Spiegel *et al.* 2009).

Nezřídka kdy se objevuje ikterus neboli žloutenka, která vede k selhání jater, což obvykle má fatální následky (Vanier 2010).

Mutace v genu *NPC2* často vedou k plicním postižením s respiračním selháním (Vanier 2010).

3.2.1.2 Časně infantilní období (2 měsíce až 2 roky)

V kojeneckém věku jsou jako typické projevy uváděny hypotonie³, jako často první neurologický projev, dále intenční třes a psychomotorická retardace (Vanier 2010). Často je přítomná splenomegalie nebo hepatosplenomegalie. Většina pacientů umírá do 5. roku života (Vanier & Millat 2003). Zvýšený výskyt této formy onemocnění NPC můžeme nalézt u obyvatel jižní Evropy, a to ve více než u 20 % pacientů, a u obyvatel Blízkého východu (Iturriaga *et al.* 2006).

3.2.1.3 Pozdně infantilní období (2 až 6 let)

Hepatosplenomegalie je v tomto období diagnostikována téměř ve všech případech. U pacientů se často objeví problémy s chůzí v důsledku rozvíjející se kataplexie⁴ a ataxie⁵. Mezi klasické symptomy patří dysartrie⁶

² hromadění tekutiny v dutině břišní

³ snížené napětí svalu

⁴ výpadek svalového napětí

⁵ porucha koordinace pohybů

⁶ porucha řeči, špatná artikulace

a dysfagie⁷, které obvykle časem vedou ke gastrostomii. Zaznamenány jsou i případy ztráty sluchu či výskyt epilepsie (Vanier 2010). K úmrtí dochází nejčastěji mezi 7. a 12. rokem. (Vanier 2010).

Společně s juvenilní formou patří do skupiny takzvané klasické Niemann-Pickovy choroby typu C, která zahrnuje 60 až 70 % případů (Fernandes *et al.* 2008).

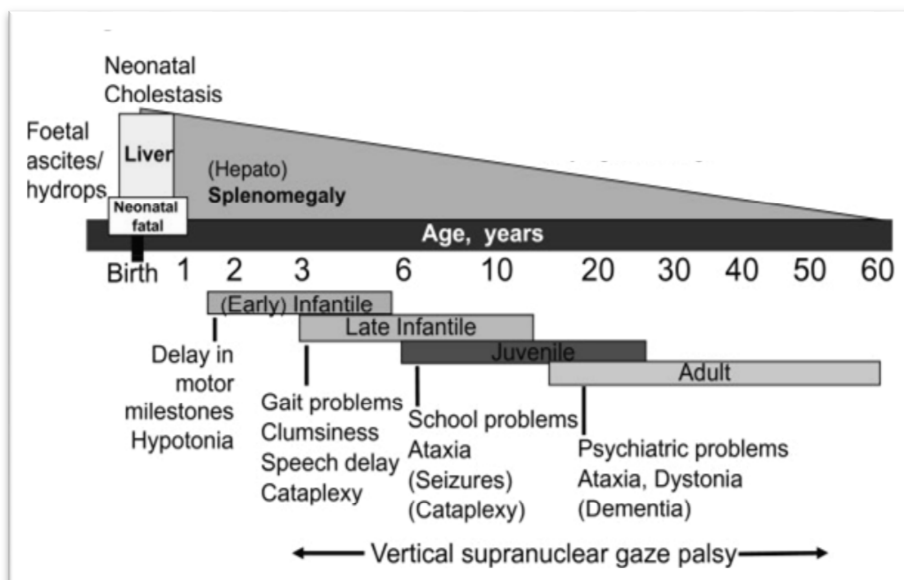
3.2.1.4 Juvenilní období (6 až 15 let)

Příznačným projevem v této etapě bývá obrna pohledu vzhůru společně s kataplexií, kterou často vyvolaná emoční podmět, jako například smích (Vanier 2010). Rozvíjející se ataxie způsobuje časté pády (Vanier 2010). Dysfagie společně s dysartrií, později vedou k neschopnosti mluveného projevu. Zpravidla dochází k problémům s učením a pozorností. Délka dožití se udává okolo 30. let (Wraith *et al.* 2009). U této formy onemocnění NPC však bývá věk dožití vysoce variabilní (Vanier 2010).

3.2.1.5 Adolescentní a adultní období (15 let a výše)

U adolescentních a adultních pacientů je častá absence splenomegalie, ovšem může nastat mírné zvětšení sleziny (Vanier 2010). Nejčastějším projevem je psychóza, a to konkrétně paranoidní bludy či sluchové a zrakové halucinace (Walterfang *et al.* 2006). Průběh nemoci bývá pozvolný. Pacienty lze rozdělit na ty, u kterých se vyskytuje pokročilá ataxie a dystonie, a na ty, u kterých převažují psychické poruchy, často vedoucí až k demenci (Trendelenburg *et al.* 2006) (Vanier 2010).

⁷ potíže s polykáním



Obrázek 1. Schematické znázornění forem onemocnění NPC s důrazem na typické jednotlivé klinické příznaky. Převzato a upraveno dle (Vanier 2010).

3.2.2 Genetické pozadí

Za projevy Niemann-Pickovy choroby typu C stojí patogenní mutace v genu *NPC1* či *NPC2* (Steinberg *et al.* 1994). Patogenními mutacemi se označují ty genetické varianty, které nepříznivě ovlivňují funkci NPC1/NPC2 proteinu.

V 95 % případů je mutován gen *NPC1*. Tento gen je lokalizován na 18q11-q12 chromozomu, kóduje 25 exonů a celková délka transkriptu je 4827 bp (Vanier & Millat 2003).

Zbývajících 5 % připadá mutacím v genu *NPC2*. Tento gen je lokalizován na chromosomu 14q24.3 a kóduje 5 exonů (Vanier & Millat 2003).

3.2.3 Protein NPC1 a NPC2

Produktem genu *NPC1* je 170 až 190 kDa velký glykoprotein skládající se z 1278 aminokyselin (Carstea 1997) (Infante 2008). Nachází se v membráně pozdních endozomů respektive lysozomů (Higgins *et al.* 1999).

Strukturu proteinu NPC1 lze rozdělit do několika oblastí (viz obrázek 3). Dvě ze tří laminárních smyček hrají roli v protein-proteinových interakcích, a to konkrétně konzervativní N-terminální konec a cystein-bohatá doména (CRD, *cysteine-rich domain*). Další důležité místo se nachází mezi třetí a sedmou transmembránovou doménou (Davies & Ioannou 200). Jedná se o vazebné místo pro sterol (SSD, *sterol-sensing domain*), které se jeví jako nezbytné pro správnou funkci proteinu (Davies & Ioannou 200). Celkově protein NPC1 obsahuje 13 transmembránových domén (Infante *et al.* 2008).

Gen *NPC2* kóduje malý solubilní lysozomální glykoprotein o velikosti 18 kDa skládající se ze 132 aminokyselin. S vysokou afinitou se váže k cholesterolu (Vanier & Miller 2004).

3.2.3.1 Role proteinů NPC1 a NPC2 v metabolismu cholesterolu

Cholesterol je nezbytnou součástí savčích buněčných membrán. Jeho distribuce a akumulace je pečlivě řízený proces. Lipidy, tedy i cholesterol jsou v těle transportovány pomocí lipoproteinů. Lipoproteiny jsou komplexy sestavené z lipidů a specifických proteinů. Hmotnostní poměr těchto látek udává jejich hustotu. Jsou tedy klasifikovány na VLDL⁸, IDL⁹, LDL¹⁰, HDL¹¹.

⁸ cholesterol o velmi malé hustotě

⁹ cholesterol o střední hustotě

¹⁰ cholesterol o malé hustotě

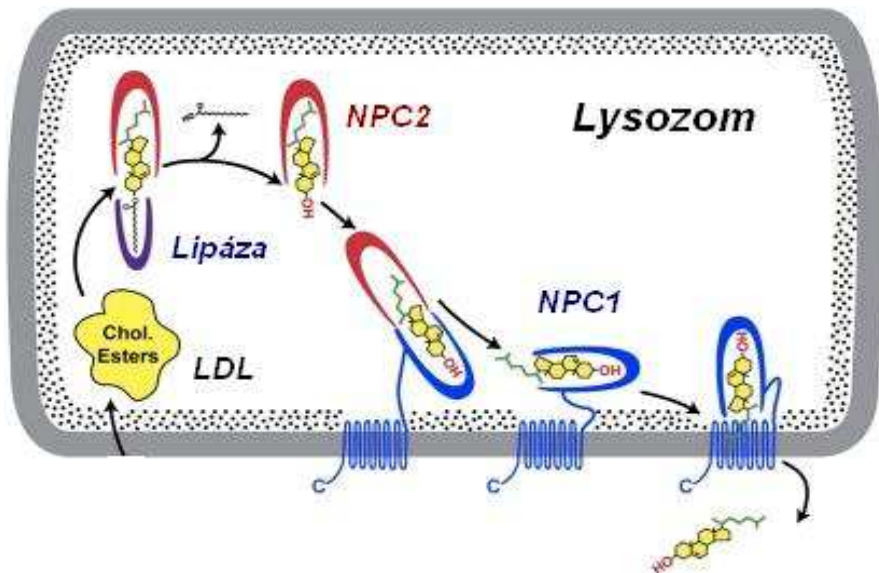
¹¹ cholesterol o vysoké hustotě

Lipoproteiny LDL transportují většinu cholesterolu do tkání. Odtud je cholesterol LDL receptory vychytáván a poté endocytózou dopraven do nitra buněk a odtud dále fúzí do lumenu lysozomů (Holeček 2006). Pomocí enzymu lysozomální kyselé lipázy (LAL, *lysosomal acid lipase*), jsou v lysozomech hydrolyzovány estery cholesterolu na neesterifikovaný cholesterol a mastné kyseliny (Cheruku *et al.* 2006). Děje se tak buď před, nebo až po navázání na protein NPC2 (Miller & Bose 2011).

Nedávné studie uvažují o proteinu NPC2 jako o dopravci cholesterolu v buňce (Cheruku *et al.* 2006). Konkrétně tak, že volný cholesterol je svým 8-uhlíkovým řetězcem zanořen do proteinu NPC2 (Vance 2010). Naopak během protein-proteinové interakce s transmembránovým proteinem NPC1 se cholesterol naváže na tento protein opačnou tedy 3 β -hydroxylovou skupinou (Vance 2010). Místem navázání je N-terminální doména proteinu NPC1 (Vance 2010).

Z N-terminální domény proteinu putuje neesterifikovaný cholesterol dále do membrány pozdních endozomů/lysozomů (Maxfield & Rosenbaum 2011) (Vance 2010). Pomocí cytoplazmatických váčků se dopraví na různá cílová místa v buňce, kterými může být membrána endoplazmatického retikula či membrány jiných buněčných organel (Miller & Bose 2011). (Maxfield & Rosenbaum 2011).

Biologická funkce proteinů NPC1 a NPC2 není zatím přesně popsána. Doposud například nebyl potvrzen mechanismus interakce mezi proteiny NPC1 a NPC2 (Maxfield & Rosenbaum 2011).



Obrázek 2. Navrhovaný transport cholesterolu z LDL na NPC2 dále na NPC1 a odtud například do membrán buněčných organel. Převzato a upraveno z (Kwon 2009).

3.2.4 Metabolické odchylky

Mutace v genech kódující protein NPC1 a NPC2 mají za následek jejich dysfunkci, která negativně ovlivňuje a narušuje buněčný transport LDL-vázaného cholesterolu (Vanier 2010).

Důsledkem těchto chyb dochází ke kumulaci lipidů v mozku a dalších orgánech. Profil střádaných tuků se však v jednotlivých orgánech výrazně liší (Sleat *et al.* 2003). V játrech a slezině jsou to kromě neesterifikovaného cholesterolu, především sfingomyeliny, sfingosiny a různé glykolipidy (Sleat *et al.* 2003) (Vanier & Millat 2003). U pacientů s onemocněním NPC zpravidla bývá výrazně více postižená kumulací slezina (Vanier 2010). Hromadění těchto látek vede k hepatomegalii a splenomegalii.

V mozkové tkáni bývá střádáno menší množství cholesterolu a sfingomyelinu, naopak lze nalézt zvýšený výskyt glykosfingolipidů, konkrétně gangliosidů GM2 a GM3 (Vanier & Millat 2003). Kumulací

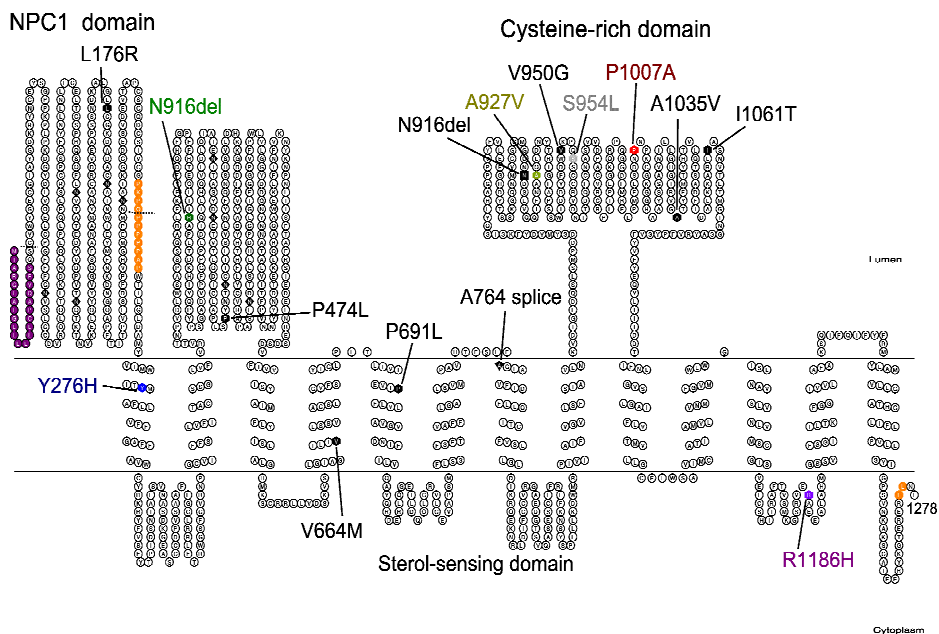
těchto lipidů dochází k progresivní ztrátě neuronů, především Purkyňových buněk a podpůrných gliových buněk (Miller & Bose 2011).

3.2.5 Spektrum mutací v *NPC1* genu

Analýzou komplementární DNA (cDNA) a genomové DNA (gDNA) u 40 pacientů s NPC1 onemocněním, bylo identifikováno přibližně 30 různých mutací, z nichž více než jedna třetina patří mezi nově popsané. Největší zastoupení mají substituční mutace měnící smysl (*missense mutation*), které vedou k záměně jedné aminokyseliny. Další abnormality zahrnují jednobodové a vícebodové delece a duplikace, čtyři mutace beze smyslu (*nonsense mutation*) a dvě sestřihové mutace (*splice station*). U třech pacientů byla doposud nalezena pouze mutace v jedné z alel.

Mutace jsou široce rozptýlené v celém proteinu NPC1 (viz obrázek 3). Až jedna třetina mutací je situována do oblasti CRD (*cystein-rich domain*) mezi transmembránovými doménami 8 a 9. V míře obsazení mutacemi následují SSD (*sterol-sensing domain*) a druhá hydrofilní smyčka. Ostatní mutace jsou rozmístěny ve zbylých hydrofilních i hydrofobních smyčkách. Zajímavostí je, že pouze jedna mutace leží v oblasti N-terminálního konce (*NPC1 domain*) a jen jedna v místě C-terminálního konce.

Výše popsané rozmístění mutací i četnost v daných doménách prakticky odpovídá výsledkům v jiných studovaných skupinách pacientů s onemocněním NPC1 (Millat *et al.* 2001).



Obrázek 3. Distribuce patogenních mutací v NPC1 proteinu, které se vyskytují u pacientů diagnostikovaných v ÚDMP. Obrázek poskytl Ing.Filip Majer,PhD.

3.2.6 Genotypová – fenotypová korelace

Podle informací z databáze pro onemocnění NPC bylo k 30. říjnu 2012 zaznamenáno 252 mutací v genu *NPC1* a 18 v genu *NPC2* (npc.fzk.de). Počet mutací je však s největší pravděpodobností mnohem vyšší, neboť jen u pacientů diagnostikovaných v ÚDMP bylo nalezeno 17 nových mutací, které nebyly doposud do databáze zahrnuty.

Mezi zaznamenanými (v ÚDMP) 30 různými mutacemi se nejčastěji vyskytuje mutace p.R1186H (c.3557G>A), nalezena byla u 14 ze 40 pacientů, z toho ve dvou případech v homozygotním stavu. U těchto dvou pacientů byl diagnostikován klinický fenotyp infantilní, z čehož lze usuzovat, že tato mutace patří mezi závažné. Této domněnce nahrává i fakt, že daná mutace v kombinaci s jinými mutacemi u složených heterozygotů má ve všech případech nepříznivý infantilní či juvenilní fenotyp.

Ve zvýšené frekvenci výskytu následuje mutace p.S954L (c.2861C>T). Všichni pacienti s touto mutací jsou složení heterozygoti, ve většině případů s juvenilním fenotypem.

Opakovaně byly nalezeny i mutace p.P1007A (c.3019C>G) a p.I1061T (c.3182T>C). Všichni pacienti nesoucí tyto mutace jsou rovněž složení heterozygoti, navíc s velmi odlišnými fenotypy. Nelze tudíž odhadovat závažnost těchto mutací.

Odborná literatura uvádí, že mutace p.P1007A (c.3019C>G) má pravděpodobně mírný biochemický defekt (Greer *et al.* 1999). Lze předpokládat, že by v kombinaci se závažnější mutací mohla mírnit její nepříznivý efekt (Millat *et al.* 2001).

3.2.7 Diagnostika

Vyslovit podezření na diagnózu onemocnění NPC je relativně snadné u pacientů s typickými příznaky, jako jsou hepatosplenomegalie, ataxie či obrna pohledu vzhůru (Vanier 2010). Ovšem u infantilní a juvenilní formy mohou být projevy snadno přehlédnuty vzhledem k silné heterogenitě příznaků. V některých případech je nemoc diagnostikována opožděně, či dokonce může být zaměněna za jiné lysozomální stádavé onemocnění (Wraith *et al.* 2009) (Vanier 2010).

Při podezření na onemocnění NPC je nutné provést komplexní vyšetření, které zahrnuje oftalmologické vyšetření, neboť obrna pohledu vzhůru je často prvním neurologickým příznakem choroby (Wraith *et al.* 2009). Dále histologické vyšetření, při kterém jsou kultivované fibroblasty podrobeny takzvanému testu s filipinem. Testování spočívá v barvení buněk filipinem, který váže selektivně neesterifikovaný cholesterol, po zátěži LDL. U pacientů se tímto prokáže akumulace neesterifikovaného cholesterolu (Vanier 2010). Toto vyšetření se však v České republice neprovádí z důvodu pracnosti. V současné době se za preferovanou metodu

určení správné diagnózy v ČR považuje nález v nátěru kostní dřeni a molekulárně-genetické vyšetření (Elleder 2010). Pomocí sekvenčních metod se ověřuje přítomnost mutací v genech *NPC1* a *NPC2* (Vanier 2010). Ovšem jsou i případy, i když v menším procentu zastoupení, kdy byla patogenní mutace nalezena pouze na jedné z alel. Zaznamenány jsou i případy, kdy mutace nebyly nalezeny v žádném z genů *NPC1* a *NPC2* (Vanier 2010).

Mutační analýza je jediná cesta, jak bezpečně stanovit přenašeče v rodinách. Genetické vyšetření také umožňuje prenatální diagnostiku, která by měla být nabídnuta ohroženým párům (Vanier 2010). Provádí se obvykle v 10. až 12. týdnu těhotenství a to standardně odběrem choriových klků (Vanier 2010).

Další novou, rychlou a citlivou metodou k určení diagnózy onemocnění NPC je pomocí oxidovaného derivátu cholesterolu - oxysterolu. Testováním bylo prokázáno, že u pacientů s onemocněním NPC je hladina množství oxysterolu v plazmě výrazně vyšší, než u běžné populace (Jiang *et al.* 2011).

3.2.8 Léčba

V současné době není k dispozici žádná specifická terapie, která by pacienty zcela vyléčila.

Od roku 2009 byl Evropskou unií schválen lék Miglustat (Zavesca®; Actelion Pharmaceuticals), někdy také uváděn pod zkratkou NB-DNJ (Patterson *et al.* 2007). Původně byl navržen pro léčbu Gaucherovy choroby typu 1, která také spadá do skupiny lysozomálních střeďavých poruch (Pastores & Barnett 2003). U pacientů s onemocněním NPC studie prokazují, že lék zpomaluje progresi neurologických příznaků a prodlužuje tak délku života pacientů (Patterson *et al.* 2007). Miglustat působí jako

inhibitor syntézy glukosylceremidu. Dochází tak k redukcí prekurzoru pro vznikající glykolipidy a sfinomyeliny (Patterson *et al.* 2007).

Jednou z možností experimentální léčby by v budoucnu mohlo být využití sloučeniny cyklodextrinu. Studie na tkáňových kulturách a zvířecích modelech prokazují, že pomocí cyklodextrinu lze iniciovat odstranění intracelulárního neesterifikovaného cholesterolu z pozdních endozomů/lysozomů (Rosenbaum *et al.* 2010).

Další možností experimentální léčby pro pacienty s onemocněním NPC by mohlo být využití chemických chaperonů, které napomáhají proteinům ke správnému prostorovému uspořádání a jejich stabilitě (Ericson 2008).

Ovšem hlavním pilířem léčby nadále zůstává léčba symptomů, jako jsou epilepsie, dystonie, kataplexie a další. Stejně tak se léčba zaměřuje i na duševní projevy nemoci. Součástí lékařské péče je genetické poradenství pro pacienty i jejich rodiny (Vanier 2010).

4 MATERIÁLY

4.1 Chemikálie

Agaróza	SERVA
Dimethylsulfoxid, DMSO, (CH ₃) ₂ SO	Sigma
DNA Loading Dye, roztok pro nanášení vzorků	Fermentas
Formamid Hi-Di, CH ₃ NO	Applied Biosystems®
GelRed™	Biotium, Inc.
Hovězí sérový albumin, BSA	NEB
Kyselina boritá, H ₃ BO ₃	Sigma
Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃	Sigma

4.2 Roztoky a pufry

TBE (Tris/Borate/EDTA) pufir 10x koncentrovaný

Tris baze	0,89 mol l ⁻¹
Kyselina trihydrogenboritá, H ₃ BO ₃	0,89 mol l ⁻¹
EDTA (0,5 mol l ⁻¹ , pH 8,0)	0,20 mol l ⁻¹

4.3 Standardy molekulových hmotností

GeneRuler* 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas*
GeneScan™ -500 ROX Standard	Applied Biosystems®

4.4 Restrikční enzymy

<i>BclI</i>	Fermentas*
<i>BsiHKA1</i>	NEB
<i>HphI</i>	NEB
<i>MspI</i>	NEB
<i>TspRI</i>	NEB

Všechny enzymy byly použity s doporučenými komerčně dodávanými pufry.

4.5 Komerční soupravy

SALSA® MLPA® probemix P193-A1 NPC1	MRC-Holland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems®
Plain PP Master Mix (PCR kit)	Top – Bio s. r. o.
PPP Master Mix (PCR kit)	Top – Bio s. r. o.
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen
ThermoScript™ Reverse Transcriptase	Invitrogen™
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems®

4.6 Oligonukleotidy

Pro účely sekvenace byl ke každému primeru připojen univerzální převis (*overhang*). Pro horní (U) primery byl použit převis T7 a pro dolní (L) primer byl použit převis RP (viz tabulka 1).

Dodavatelem primerů a převisů byla firma GENERI BIOTECH s. r. o.

Tabulka 1. Přehled sekvencí univerzálních specifických převisů T7 a RP.

Název	Sekvence (5'→3')	Délka (bp)
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG	18
RP	TGA AAC AGC TAT GAC CAT G	19

Tabulka 2. Přehled sekvencí primerů využitých pro amplifikaci promotoru genu *NPC1* na úrovni gDNA.

Název primeru	Sekvence (5'→3')	Délka primeru (bp)	Délka PCR produktu (bp)
NPC1-P1-U	CCC CCC ATT TTC TAC TTA TTG C	22	896
NPC1-P1-L	CCT GCC TTC TCA CCT CCT CAG	21	
NPC1-P2-U	AGC GAG AGC ACA GAG CTG AC	20	527
NPC1-P2-L	GTG GGG ACC AGG GTC TGT T	19	
NPC1-P3-U	ATC AAACGC ATG GCT CAA AAA TG	23	786
NPC1-P3-L	GAG GAG CGG AGG AGC AGG AG	20	

Tabulka 3. Přehled sekvencí primerů využitých pro amplifikaci genu *NPC1* na úrovni gDNA.

Název primeru	Sekvence (5'→3')	Délka primeru (bp)	Délka PCR produktu (bp)
NPC1-Ex1U	GGA GCC GAC GAC GCC TTC TTC	21	442
NPC1-Ex1L	TCT CCA TCG CCA GAC CAA CTT	21	
NPC1-Ex2U	AAG TGC CTG TTG CTG TTA CTT	21	491
NPC1-Ex2L	GCA CTG TAT GCC ACA GGT TAG	21	
NPC1-Ex3U	CAA AAA ACC CTA AGA AGA CAT	21	477
NPC1-Ex3L	TAT CTA CAG CCC AGT TGT TCT	21	
NPC1-Ex4U	TGT GCC TTT ATT TTA ACA TGA	21	526
NPC1-Ex4L	TTG TGA TTT TCC AGA GTT GAC	21	
NPC1-Ex5U	GTT CGT GTT TCC CTT CAA GAG	21	403
NPC1-Ex5L	CCA GTT CCT TGG CTT TAA AAC	21	

NPC1-Ex6U	AGT GGG CTT TTC TTT GAG TTT	21	466
NPC1-Ex6L	CAG TGG GCA ATT TTG CTC TTT	21	
NPC1-Ex7U	TTA GGG GAA AGA AGG CAG TAA	21	445
NPC1-Ex7L	ACA AAG GCA AGG ACC ATG TCT	21	
NPC1-Ex8U	TGC TTT CCC TGT TCC GAC TTT CA	23	623
NPC1-Ex8L	TTC AGC CCC AAA TCC CCA TCT	21	
NPC1-Ex9U	TTT CCC CAA ATA CTC TTT GTC	21	482
NPC1-Ex9L	TTT GCC CAT GTA CCC TAA GTC	21	
NPC1-Ex10U	CTC TTG CCC AGT GAT TCT GAG	21	523
NPC1-Ex10L	AAA CCC AAA GCC AAA GGA GAT	21	
NPC1-Ex11U	GAT TTT TCC CCT GGT ATG TGT	21	308
NPC1-Ex11L	CTA GCT TCC CAC AAT GCA AGG	21	
NPC1-Ex12U	AAA GTT AGG GAG AAG TTT CTT	21	420
NPC1-Ex12L	ATA AAG AGG CAA AAA TAT GAC	21	
NPC1-Ex13U	TCT AGG TTT AAT ACA GCC CTG T	22	489
NPC1-Ex13L	ACA CAG GGA AAG GAA ACA AAA	21	
NPC1-Ex14U	TTA ACA CAA GGC AGC AAG AAA	21	354
NPC1-Ex14L	ACA AAG GGA CAT GTT CAG GTA	21	
NPC1-Ex15,16U	TGT GCT GGC TCC TTG TAT CTG	21	625
NPC1-Ex15,16L	CAG GCT GTC TGG CTT CTT AGA	21	
NPC1-Ex17U	ACT CCC TAT TAG CCT GTC ATT	21	419
NPC1-Ex17L	GTC ACC ATT TGC AGT TAG AAG	21	
NPC1-Ex18U	GAT CCT CGC CTT GCT TAG TTA	21	338
NPC1-Ex18L	CTC CTC CGC TGC TTC TGA AGT	21	
NPC1-Ex19U	TTT GAA GGC TTT TTT CAT TAA	21	465
NPC1-Ex19L	AGA CCC AGC TTT GAT ATA CAA	21	
NPC1-Ex20U	AGT AAT GCC CCT CAC TGT CAG	21	380
NPC1-Ex20L	CTT AGC CCA GTC CTC TCC TAG	21	
NPC1-Ex21U	TTA GCC TCA AGT GCT CAG ATT	21	495
NPC1-Ex21L	TAC TGC CCT GTG CTC AGA ATG	21	
NPC1-Ex22U	GAC AGC CAG CAA GGT TTT CTG	21	503
NPC1-Ex22L	ACA GCC AAT TCC CCC AAG TGA	21	
NPC1-Ex23U	AAT TAG CAC CCA TCC TCA GAA	21	349
NPC1-Ex23L	TGC AAT CCT TAG AAG CTG CTT	21	

NPC1-Ex24U	GAA CCT GGG AGA AAT CCT TGT	21	406
NPC1-Ex24L	AAA GAA TGC CTC AGG ATA GAA	21	
NPC1-Ex25U	AAA GAG CCC ATC TCC AAA AGA	21	519
NPC1-Ex25L	ACT GCT TCC CAA GTC AAC TGT	21	

Tabulka 4. Přehled sekvencí primerů využitých pro amplifikaci úseku genu *NPC1* pro restriční analýzu.

Název primeru	Sekvence (5' → 3')	Délka primeru (bp)	Délka PCR produktu (bp)
NPC1-527-U	CAT GTA GCC CTC GAC AGA GTC AG	23	531
NPC1-527-L*	CAA AAA ATG CTC CAA AAA ACA CAA	24	
NPC1-1421-U	TGT CAT TTT CTT CTC GCT GGT CTT	24	455
NPC1-1421-L*	AGA AGT CGT CCC CTT TCT TGT GGT	24	
NPC1-1990-U	CGT GGC TTG TGT TGG GAG GCT ATG	24	453
NPC1-1990-L*	CCA GGA ACG GGA TGA CTT CAA TCA CA	26	
NPC1- 2849-U*	TGA TTC CCT GGT GCA GAT ATT T	22	571
NPC1- 2849-L	CAG GGA CAC ACC GAG GTT GAA GAT	24	
NPC1-3557-U	GAC CAT CAT TGA CGA CAC TAT CTT	24	533
NPC1-3557-L*	TTC CTT TGT ATC GCT CTT CAG TG	23	

*fluorescenčně značené primery HEX™

5 METODY

5.1 Vyšetření množství transkriptu genu *NPCI*

Analýza transkriptu byla provedena u složených heterozygotů. Důvodem vyšetření byla snaha o zjištění, do jaké míry ovlivňují patogenní mutace úroveň transkripce.

Primárním úkolem bylo odhalit procentuální zastoupení jednotlivých alel u každého pacienta. Následně byly získané poznatky korelovány s fenotypem daných pacientů.

5.1.1 Výběr restričních endonukleáz

K vyhledání dostupných restričních endonukleáz pro dané patogenní mutace byl použit program Prophet 5.0. Tyto enzymy musely štěpit v místě dané mutace a navíc v kontrolním restričním místě (viz tabulka 5).

Kritériem výběru pacientů pro vyšetření touto metodou byla dostupnost kultur kožních fibroblastů.

Tabulka 5. Přehled mutací a k nim náležící restriční endonukleázy s kontrolním restričním místem.

Exon	Mutace	Alela	Restriční endonukleáza	Specifické restriční místo
5	c.527T>C	L176R	<i>MspI</i>	5'...C▼CGG... 3' 3'...GGC▲C... 5'
9	c.1421C>T	P474L	<i>TspRI</i>	5'...NNCASTGNN▼... 3' 3'...▲NNGTSACNN ...5'
13	c.1990G>A	V664M	<i>BclI</i>	5'...T▼GATCA... 3' 3'...ACTAG▲T... 5'
19	c.2849T>G	V950G	<i>HphI</i>	5'...GGTGA(N) ₈ ▼... 3' 3'...CCACT(N) ₇ ▲... 5'
23	c.3557G>A	R1186H	<i>BsiHKAI</i>	5'...GWGCW▼C...3' 3'...C▲WCGWG...5'

N = C/G/A/T, S = C/G, W = A/T

5.1.2 Návrh primerů pro restrikční analýzu

Pro návrh primerů pro PCR reakci byl využit program Oligo 5.0. Program při navrhování primerů zohledňoval parametry jako teplotu tání, teplotu nasednutí primerů, délku oligonukleotidů, tvorbu duplexů a další. Oblast DNA ohraničena primery, musela obsahovat jak mutaci, tak specifické restrikční místo enzymu. Délka PCR produktu byla limitována do 600 bp.

Primer, který byl blíže mutovanému místu, byl označen fluoroforem HEX™, kvůli následné detekci při fragmentační analýze na kapilární elektroforéze.

5.1.3 Reverzní transkripce mRNA

Reverzní transkripce je proces syntézy cDNA podle mRNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Jako templát byla použita mRNA izolovaná z fibroblastů vybraných pacientů.

Všechny vzorky byly připraveny dvěma systémy: ThermoScript™ Reverse Transcriptase a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Oba systémy se liší v použitých primerech zahajujících reversní transkripci. První systém používá primer oligo dT zaručující syntézu plnodélkové cDNA, druhý systém využívá směsi oligodT a random primerů.

Cílem analýzy bylo porovnání obou systémů a zhodnocení zda některý z nich má vliv na zkreslení výsledků analýzy poměru exprese daných alel.

5.1.3.1 Systém High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Tímto systémem byly vzorky připraveny pracovníkem ÚDMP. Postupováno bylo dle protokolu.

5.1.3.2 Systém ThermoScript™ Reverse Transcriptase

Vzorky mRNA byly naředěny na koncentraci $120 \text{ ng } 1\mu\text{l}^{-1}$ při celkovém objemu $9 \mu\text{l}$, k ředění byla použita voda ošetřená DEPC (bez RNáz, které by degradovaly mRNA).

Ředěná mRNA byla společně se směsí (viz tabulka 6a) primerů oligo dT a dNTPs mixem inkubována po dobu 5 minut při $65 \text{ }^\circ\text{C}$. Dalším krokem bylo přidání směsi (viz tabulka 6b), která obsahovala DNA syntéza pufr, stabilizátor enzymu DTT, ThermoScript™ RT, vodu ošetřenou DEPC a inhibitor ribonukleáz RNazaOUT™. Tato směs byla opět inkubována, tentokrát po dobu 60 minut při $52 \text{ }^\circ\text{C}$. Po uplynutí předepsaného času následovala denaturace enzymu po dobu 5 minut při $85 \text{ }^\circ\text{C}$.

Následně byla směs zředěna na objem $40 \mu\text{l}$ a zmrazena na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabulka 6a a 6b. Složení reakčních směsí pro reverzní transkripci.

6a)		6b)	
Složení	Objem (μl)	Složení	Obejm (μl)
primer oligo dT	1,0	DNA syntéza pufr 5x	4,0
dNTPs mix	2,0	DTT ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$)	1,0
mRNA ($120 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$)	9,0	RNazaOUT ($40 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$)	1,0
celkový objem	12,0	DEPC ošetřená voda	1,5
		ThermoScript™ RT ($15 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$)	0,5
		celkový objem	8,0

Před následným použitím byla pracovníkem ÚDMP provedena kontrola cDNA pomocí dvou kontrolních PCR. Sledována byla funkčnost, hodnocením délky amplifikovaného produktu, a čistota, tedy zda nedošlo ke kontaminaci gDNA.

5.1.4 PCR amplifikace úseků *NPC1* genu pro restrikční analýzu

PCR amplifikace cDNA s navrženými primery pro dané mutace byla provedena za podmínek, které shrnují tabulky 7 a 8. Společně se vzorky daných pacientů byly amplifikovány i kontrolní vzorky.

Všechny vzorky pacientů i kontrol byly amplifikovány za stejných podmínek ve stejném složení reakční směsi.

Tabulka 7. Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci cDNA.

Složení	Objem (μl)
cDNA	1,00
Plain PP Master Mix	12,50
primer horní (U) 10 pmol μl ⁻¹	1,00
primer dolní (L) 10 pmol μl ⁻¹	1,00
DMSO 100%	0,25
voda	9,25 μl
celkový objem	25,00 μl

Tabulka 8. Podmínky PCR amplifikace.

Fáze	Teplota	Doba trvání	Počet opakování
úvodní denaturace	95 °C	2 min.	1 x
denaturace	95 °C	10 s	
nasednutí primerů	60 °C	10 s	35 x
elongace	70 °C	50 s	
závěrečná elongace	70 °C	5 min.	1 x

5.1.5 Štěpení restrikčními enzymy

Restrikční analýza pro jednotlivé mutace s danými restrikčními endonukleázami (viz tabulka 5) byla vždy provedena podle protokolu připraveného výrobcem a dodaného s enzymem.

Podmínky restrikčních analýz jsou shrnuty v tabulkách 9, 10, 11, 12 a 13.

Tabulka 9. Složení směsi a podmínky restrikční analýzy pro enzym *MspI*.

Složení	Objem (μl)
<i>MspI</i>	0,5
pufr NEB 1	5,0
gDNA	3,0
voda	41,5
celkový objem	50,0

Směs byla inkubována v cykleru po dobu 2 hodin při 37 °C, poté byl přidán 1 μl enzymu *MspI* a dále probíhala inkubace po stejnou dobu a při stejné teplotě.

Enzym byl inaktivován při 65 °C po dobu 20 minut.

Tabulka 10. Složení směsi a podmínky restrikční analýzy pro enzym *TspRI*.

Složení	Objem (μl)
<i>TspRI</i>	1,0
pufr NEB 4	5,0
BSA	0,5
gDNA	6,0
voda	37,5
celkový objem	50,0

Směs byla inkubována v cykleru po dobu 2 hodin při 65 °C, poté byl přidán 1 μl enzymu *TspRI* a dále probíhala inkubace po stejnou dobu a při stejné teplotě.

Enzym nebylo třeba inaktivovat.

Tabulka 11. Složení směsi a podmínky restriční analýzy pro enzym *BclI*.

Složení	Objem (μl)
<i>BclI</i>	1,0
pufr G	5,0
gDNA	3,0
voda	41,0
celkový objem	50,0

Směs byla inkubována v cyklu po dobu 2 hodin při 55 °C, poté bylo přidáno 0,5 μl enzymu *BclI* a dále probíhala inkubace po dobu 1 hodiny při stejné teplotě.

Inaktivace enzymu byla provedena při 80 °C po dobu 20 minut.

Tabulka 12. Složení směsi a podmínky restriční analýzy pro enzym *HphI*.

Složení	Objem (μl)
<i>HphI</i>	1,0
pufr NEB 4	5,0
gDNA	3,0
voda	41,0
celkový objem	50,0

Směs byla inkubována v cyklu po dobu 2 hodin při 37 °C, poté byl přidán 1 μl enzymu *HphI* a dále probíhala inkubace po dobu 2 hodiny při stejné teplotě.

Inaktivace enzymu byla provedena při 65 °C po dobu 20 minut.

Tabulka 13. Složení směsi a podmínky restriční analýzy pro enzym *BsiHKAI*.

Složení	Objem (μl)
<i>BsiHKAI</i>	1,0
pufr NEB 4	5,0
BSA	0,5
gDNA	3,0
voda	40,5
celkový objem	50,0

Směs byla inkubována v cykleru po dobu 2 hodin při 65 °C, poté bylo přidáno 0,5 µl enzymu BsiHKAI a dále probíhala inkubace po dobu 1 hodiny při stejné teplotě.

Enzym nebylo třeba inaktivovat.

5.1.6 Agarózová elektroforéza

Kontrola přítomnosti štěpených fragmentů DNA byla ověřena horizontální agarózovou elektroforézou v 2% agarózovém gelu ponořeném do 1x koncentrovaného TBE.

Na gel bylo nanášeno 15 µl štěpeného vzorku s danou mutací, 15 µl štěpeného vzorku bez mutace a 5 µl neštěpeného kontrolního vzorku. Ke každému vzorku byly přidány 4 µl barviva GelRed™ pro vizualizaci.

Společně se vzorky byl nanášen i hmotnostní standard GeneRuler* 100 bp DNA Ladder Plus k určení délky fragmentů. Reakce probíhala přibližně 30 minut při napětí 100 V.

Vizualizace délek fragmentů DNA byla provedena pod UV transiluminátorem.

5.1.7 Fragmentační analýza kapilární elektroforézou

Po rozštěpení PCR produktů restričními enzymy následovala fragmentační analýza na automatickém kapilárním sekvenátoru ABI 3500xL od firmy Applied Biosystems®. Jedná se o proces během, kterého jsou amplifikované fragmenty rozděleny podle své velikosti.

Do mikrotitrační destičky (MicroAmp 96 Well Reaction Plate) byl napipetován 1 µl PCR produktů, dále 0,5 µl vnitřního velikostního standardu GeneScan™ -500 ROX a 8,5 µl Hi-Di formamidu pro denaturaci.

Destička byla během pipetování vzorků udržovaná na ledu a mimo přímé osvětlení.

Následně byla destička se směsí promíchána na vertexu, krátce centrifugována a připravena pro stanovení na automatickém kapilárním sekvenátoru. Pro separaci na kapiláře o délce 50 cm byl použit polymer POP-7™. Fluorofory byly excitovány laserem s vlnovou délkou 505 nm.

Denaturace probíhala v cykleru při 95 °C po dobu 3 minut.

5.1.8 Hodnocení výsledků fragmentační analýzy

Získaná data z fragmentační analýzy byla analyzována pomocí programu GeneMapper® 4.1.

Fragmenty DNA byly značeny fluoroforem HEX™, ten během průchodu kapilárou po ozáření laserem emitoval světlo určité vlnové délky a intenzity. Automatický sekvenátor toto světlo detekoval a zaznamenal jako pík.

Pro vyhodnocení byly analyzovány ty plochy píků, které odpovídaly svou délkou daným alelám. Společně se štěpenými a neštěpenými vzorky pacientů byly analyzovány také píky kontrol a slepých vzorků.

5.2 Studie promotoru genu *NPC1*

U všech dostupných vzorků pacientů byla sekvenována oblast s promotorovou aktivitou tj. 2000 bp nad počátkem transkripce (Watari *et al.* 2000).

5.2.1 Návrh primerů pro PCR

Pro návrh primerů pro PCR reakci byl využit program Oligo 5.0. Vybraná oblast promotoru byla rozdělena na tři části o délkách 896 bp, 527 bp a 786 bp. Bylo tak potřeba tří sad primerů, které se vzájemně přesahovaly (minimálně o 50 bp), tak aby byla pokryta celá vybraná oblast promotoru.

Důležitým kritériem při navrhování bylo zamezení umístění primerů do oblasti repetitivních sekvencí. Kontrola byla provedena pomocí programu RepeatMesker.

5.2.2 PCR amplifikace promotoru genu *NPCI*

Během optimalizace na kontrolních vzorcích bylo zjištěno, že pro amplifikaci je vhodné používat 2% DMSO, což bylo možné předpokládat, neboť amplifikovaný promotor genu *NPCI* obsahuje vysoké procento CpG ostrůvků.

Přehled sekvencí primerů využitých pro amplifikaci promotoru genu *NPCI* na úrovni gDNA viz tabulka 2.

Složení reakční směsi a podmínky PCR amplifikace jsou shrnuty v tabulkách 14 a 15.

Tabulka 14. Složení reakční směsi pro jednu reakci a jeden pár primerů v celkovém objemu 25 ml.

Složení	Objem (μl)
templátová DNA	1,00
PPP Master Mix	12,00
primer horní (U) 10 pmol μl ⁻¹	0,38
primer dolní (L) 10 pmol μl ⁻¹	0,38
DMSO 100%	0,50
voda	10,75
celkový objem	25,00

Tabulka 15. Podmínky PCR reakce pro amplifikaci promotoru genu *NPCI*.

Fáze	Teplota	Doba trvání	Počet opakování
úvodní denaturace	95 °C	2 min.	1 x
denaturace	95 °C	30 s	
nasednutí primerů	62 °C	15 s	35 x
elongace	71 °C	50 s	
závěrečná elongace	71 °C	5 min.	1 x

5.2.3 Agarózová elektroforéza pro produkty PCR

Kontrola přítomnosti fragmentů DNA byla ověřena horizontální agarózovou elektroforézou v 1% agarózovém gelu ponořeném do 1x koncentrovaného TBE.

Nanesený měřený vzorek obsahoval 5 μ l produktu PCR a 4 μ l barviva GelRed™ pro vizualizaci. Společně se vzorky byl nanášen i hmotnostní standard GeneRuler* 100 bp DNA Ladder Plus k určení délky fragmentů. Elektroforetická separace fragmentů probíhala přibližně 25 minut při napětí 100 V.

Vizualizace výsledných délek byla provedena pod UV transiluminátorem.

5.2.4 Purifikace produktů PCR

Přečištění produktů PCR bylo provedeno pomocí komerční soupravy Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Postupováno bylo dle protokolu.

Na spektrofotometru NanoDrop (ND-1000) byla po přečištění změřena koncentrace DNA v PCR produktech. Výsledná koncentrace DNA se pohybovala přibližně v rozmezí 30 až 60 ng μ l⁻¹.

5.2.5 Sekvenační analýza

Promotor genu *NPCI* byl sekvenován klasickou Sangerovou metodou na automatickém kapilárním sekvenátoru ABI 3500xL. Cyklické sekvenování proběhlo s využitím BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kitu od firmy Applied Biosystems®.

Reakce probíhala v mikrotitrační destičce (MicroAmp 96 Well Reaction Plate). Do jednotlivých jamek byla nanesena reakční směs (viz tabulka 16). K této směsi bylo přidáno 1,9 μl Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitu a 3 μl Big Dye Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer. Sekvenační reakce probíhala v termocykleru za předepsaných podmínek (viz tabulka 17).

Dalším krokem bylo přečištění sekvenační reakce přidáním 55 μl BigDye XTerminator Purification Kitu.

Po přečištění reakce se následně mikrotitrační destička vložila do sekvenátoru ABI 3500xL.

Tabulka 16. Složení reakční směsi pro sekvenační analýzu pro jeden vzorek.

Složení	Objem (μl)
PCR produkt	1,00
primer (T7 nebo RP) 10 pmol μl^{-1}	1,00
voda	13,00
celkový objem	15,00

Tabulka 17. Podmínky sekvenační analýzy v termocykleru.

Fáze	Teplota	Doba trvání	Počet opakování
úvodní denaturace	96 °C	1 min.	1 x
denaturace	96 °C	10 s	
nasednutí primerů	50 °C	5 s	25 x
závěrečná elongace	60 °C	4 min.	

5.2.6 Hodnocení výsledků sekvenační analýzy

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programů Sequencing Analysis 5.1 a GeneMapper® 4.1. Referenční sekvencí byla GenBank, NM_000271.4, 07-JAN-2013.

5.3 Mutační analýza genu *NPC1* u nově diagnostikované pacientky

5.3.1 Amplifikace genů *NPC1*

Přehled sekvencí primerů použitých pro amplifikaci genu *NPC1* na úrovni gDNA viz tabulka 3.

Složení reakční směsi a podmínky PCR amplifikace jsou shrnuty v tabulkách 18, 19 a 20.

Tabulka 18. Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci genu *NPC1*.

Složení	Objem (μl)
templátová DNA	1,000
PPP Maser Mix	12,500
DMSO	0,250
primer dolní (L) 10 pmol μl ⁻¹	0,375
primer horní (U) 10 pmol μl ⁻¹	0,375
voda	10,500
celkový objem	25,000

Tabulka 19. Podmínky PCR reakce pro amplifikaci exonu 4, 12, 17, 19 genu *NPC1*.

Fáze	Teplota	Doba trvání	Počet opakování
úvodní denaturace	95 °C	2 min.	1 x
denaturace	95 °C	10 s	
nasednutí primerů	56 °C	10 s	35 x
elongace	70 °C	50 s	
závěrečná elongace	70 °C	5 min.	1 x

Tabulka 20. Podmínky PCR reakce pro amplifikaci exonu 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25 genu NPC1.

Fáze	Teplota	Doba trvání	Počet opakování
úvodní denaturace	95 °C	2 min.	1 x
denaturace	95 °C	10 s	
nasednutí primerů	60 °C	10 s	35 x
elongace	70 °C	50 s	
závěrečná elongace	70 °C	5 min.	1 x

5.3.2 Agarózová elektroforéza

Kontrola přítomnosti fragmentů DNA byla ověřena horizontální agarózovou elektroforézou. Provedena byla, tak jak je uvedeno v kapitole 5.2.3.

5.3.3 Purifikace produktů PCR

Purifikace produktů PCR byla provedena, tak jak je uvedeno v kapitole kapitole 5.2.4.

5.3.4 Sekvenační analýza

Gen *NPC1* byl sekvenován klasickou Sangerovou metodou na automatickém kapilárním sekvenátoru ABI 3500xL. Cyklické sekvenování proběhlo s využitím BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kitu od firmy Applied Biosystems®.

Sekvenační analýza provedena, tak jak je uvedeno v kapitole 5.2.5

5.3.5 Hodnocení výsledků sekvenační analýzy

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programů Sequencing Analysis 5.1 a GeneMapper® 4.1. Referenční sekvencí byla GenBank, NM_000271.4, 07-JAN-2013.

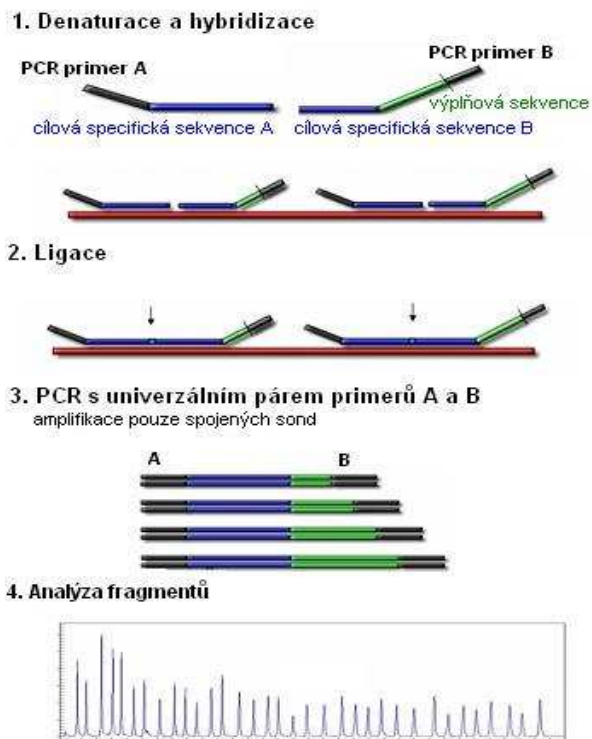
5.4 Metoda MLPA

Technika MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) patří mezi nové nástroje molekulární cytogenetiky. Pomocí této metody lze analyzovat počet kopií (*copy number*) v sekvencích DNA.

Po provedení dané metody je potřeba souboru daných specifických sond. Sondy se skládají ze dvou oligonukleotidů. Každý z nich obsahuje cílovou specifickou sekvenci a univerzální primer. U jednoho oligonukleotidu je navíc mezi specifickou sekvencí a primer vložena výplňová sekvence o různé délce.

Podstatou metody (viz obrázek 4) je navázání sond k cílové sekvenci DNA na základě jejich komplementarity. Teprve po správné hybridizaci oligonukleotidů k cílovému místu v DNA mohou být oligonukleotidy spojeny ligací do úplné sondy. Následuje PCR amplifikace, avšak namnoženy jsou pouze ligované sondy. PCR reakce proběhne za použití jednotného páru primerů.

Po rozdělení kapilární elektroforézou dle jejich různých délek, jsou výsledky analyzovány pomocí počítačového programu.



Obrázek 4. Princip metody Multiplex ligation-dependent probe amplification. Převzato a upraveno dle (www.mlpa.com).

5.4.1 Systéma SALSA® MLPA® probemix P193-A1 NPC1

K vyšetření vybraného vzorku byla využita komerční souprava SALSA® MLPA® probemix P193-A1 NPC1 od firmy MRC-Holland. Postupováno bylo přesně dle příslušného protokolu.

5.4.1.1 Denaturace DNA a hybridizace sond

Směs obsahující 1,8 μ l gDNA pacienta a 3,2 μ l roztoku TE byla umístěna do termocykleru, kde při 98 °C po dobu 5 minut proběhla denaturace gDNA, poté byl vzorek ochlazen na 25 °C. V této fázi byla k denaturovanému vzorku přidána hybridizační směs obsahující 1,5 μ l

MLPA pufru a 1,5 μ l probemixu. Po počáteční minutové inkubaci v termocykleru při 95 $^{\circ}$ C následovala dvacetihodinová hybridizace při 60 $^{\circ}$ C.

5.4.1.2 Ligační reakce

Hybridizovaná směs byla zchlazena na teplotu 54 $^{\circ}$ C. Do takto připravené směsi bylo přidáno 32 μ l ligační směsi obsahující 3 μ l Ligáza pufru A, 3 μ l Ligáza pufru B, 25 μ l vody a 1 μ l Ligáza-65 enzymu. Směs byla následně vložena do termocykleru a inkubována při teplotě 54 $^{\circ}$ C po dobu 15 minut. Inaktivace Ligáza-65 enzymu následně probíhala při teplotě 98 $^{\circ}$ C po dobu 5 minut.

5.4.1.3 PCR reakce

Další krok představovala PCR reakce, složení reakční směsi a podmínky jsou shrnuty v tabulce 21 a 22.

Tabulka 21. Složení PCR reakce, která je součástí metody MLPA.

Složení	Objem (μ l)
SALSA PCR primer mix	2,0
SALSA Polymerase	0,5
voda	7,5
ligovaná směs	40,0
celkový objem	50,0

Tabulka 22. Podmínky PCR reakce, která je součástí metody MLPA.

Fáze	Teplota	Doba trvání	Počet opakování
denaturace	95 $^{\circ}$ C	30 s	
nasednutí primerů	60 $^{\circ}$ C	30 s	35 x
elongace	72 $^{\circ}$ C	60 s	
závěrečná elongace	72 $^{\circ}$ C	20 min.	1 x

5.4.2 Fragmentační analýza kapilární elektroforézou

Identifikace a kvantifikace PCR produktů fragmentační analýzou probíhala na automatickém kapilárním sekvenátoru ABI 3500xL.

Do 96 jamkové mikrotitrační destičky byl napipetován 1 μ l PCR produktů, dále 0,5 μ l vnitřního velikostního standardu GeneScan™ -500 ROX a 8,5 μ l Hi-Di formamidu pro denaturaci. Denaturace v cyklu probíhala při 80 °C po dobu 2 minut.

Jeden z MLPA PCR primerů byl značen barvivem 6-FAM™, které po ozáření laserem emitovalo světlo určité vlnové délky a intenzity. Automatický sekvenátor toto světlo detekoval a zaznamenal jako pík.

5.4.3 Hodnocení výsledků fragmentační analýzy

Pro vyhodnocení výsledků z automatického kapilárního sekvenátoru byl použit program GeneMapper® 4.1.

SALSA® MLPA® probemix P193-A1 NPC1 obsahuje 42 sond, které po amplifikaci dávají produkty o délkách od 130 do 454 bp. Ze 42 sond je 25 sond specifických pro jednotlivé exony genu *NPC1*, 5 sond pro exony genu *NPC2*. Dalších 9 sond je referenčních a 3 sondy jsou pro nejčastěji se vyskytující mutace v genu *NPC1*, které generují signál pouze v případě, že vyšetřovaný vzorek tyto mutace obsahuje.

Probemix dále obsahuje Q-fragments k ověření kvality testované DNA a D-fragments, které slouží k otestování denaturace. X-fragment specifický pro X chromozom dává produkt o délce 100 bp a Y-fragment specifický pro Y chromozom dává produkt o délce 105 bp. Všechny tyto kontrolní fragments dávají produkty amplifikace menší než 120 bp a do výsledných hodnot se výšky ani plochy píků nezapočítávají.

Pro analýzu dat jsou důležité dva výpočetní kroky. Prvním krokem, je v rámci vzorku pacienta, tzv. vnitřní normalizace, kdy porovnávané plochy

a výšky píků generované sondami pro geny *NPC1/NPC2* ku plochám a výškám píků všech sond (globální hodnota) nebo referenčních sond (bloková hodnota). U referenčních sond je předpoklad, že mají standardní počet kopií jak u testovaného vzorku, tak u kontrol.

Druhým krokem je tzv. vnější normalizace, kdy jsou do výpočtů zahrnuty i hodnoty dvou kontrolních vzorků (muže a ženy). Jsou tedy porovnávány plochy a výšky píků testovaného vzorku ku plochám a výškám píků kontrolních vzorků. Jelikož jsou kontrolní vzorky DNA od zdravých jedinců, je předpoklad že budou mít standardní počet kopií jak u referenčních sond, tak u sledovaného genu *NPC1*.

Touto cestou je tak možné detekovat abnormální signály sond, které poukazují na delece/duplikace. Výsledkem porovnávání výšek a ploch píků jsou číselné hodnoty. V rozmezí od 0,7 do 1,3 jsou hodnoty v normálu, tudíž je v této oblasti nález negativní. Pokud je hodnota nižší, než 0,7 jedná se o delecii. V případě, že výsledek dosahuje hodnoty vyšší, než 1,3 jedná se o duplikaci.

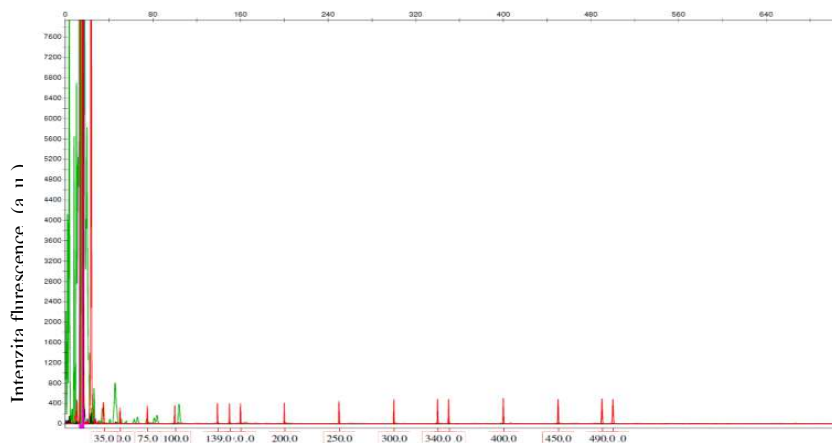
6 VÝSLEDKY

6.1 Výsledky vyšetření množství transkriptu genu *NPC1*

Tabulka 23. Přehled analýzy délek fragmentů pro dané mutace na kapiláře.

Mutace	Alela	Enzym	neštěpený produkt	Délky fragmentů (bp)	
				alela bez mutace	alela s mutací
c.527T>C	p.L176R	<i>MspI</i>	531	385* + 146	340* + 45 + 146
c.1421C>T	p.P474L	<i>TspRI</i>	455	262* + 193	193 + 176 + 86*
c.1990G>A	p.V664M	<i>BclI</i>	453	427* + 26	95* + 332 + 26
c.2849T >G	p.V950G	<i>HphI</i>	571	112* + 327 + 132	439* + 132
c.3557G>A	p.R1186H	<i>BsiHKAI</i>	533	439* + 132	251* + 194 + 87

* fluorescenční fragmenty barvivem HAX™



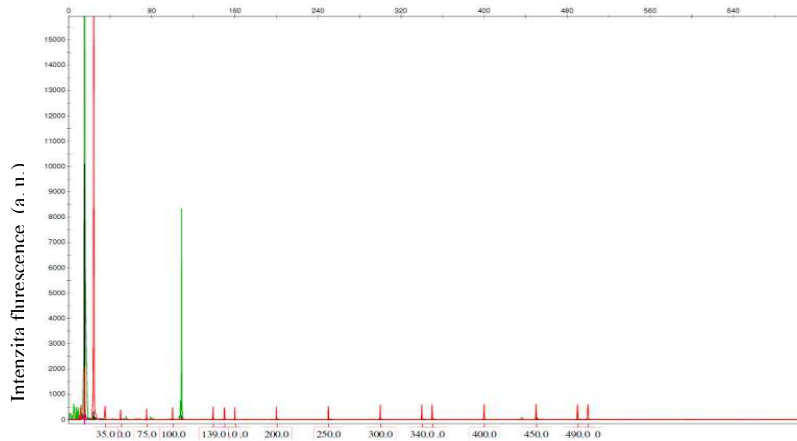
Délka produktů (bp)

Obrázek 5. Ukázka záznamu z kapilární elektroforézy pro slepý vzorek. Standard molekulových hmotností GeneScan™ -500 ROX je znázorněn červeně. U píků odpovídající délkám menších než 50 bp se lze domnívat, že se jedná o fragmenty pramerů.



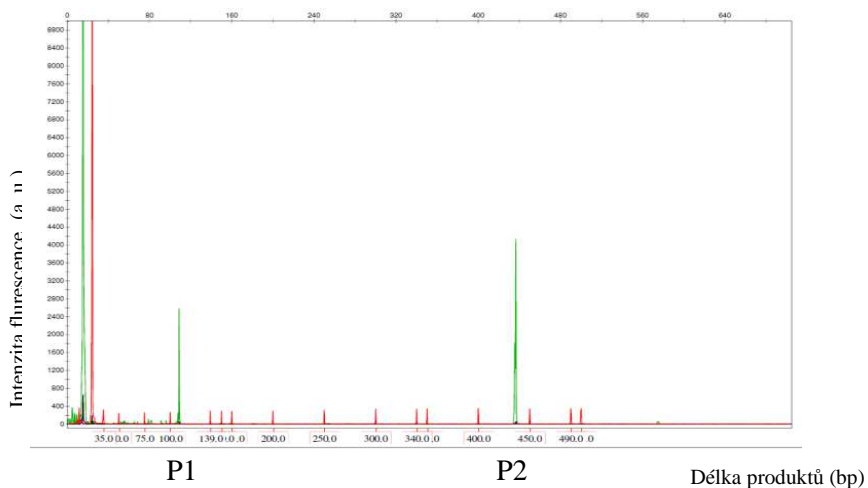
Délka produktů (bp)

Obrázek 6. Ukázka záznamu z kapilární elektroforézy u neštěpeného vzorku pacienta s mutací p.V950G. Standard molekulových hmotností GeneScan™ - 500 ROX je znázorněn červeně, stanovený produkt o délce 571 bp zeleně.



Délka produktů (bp)

Obrázek 7. Ukázka záznamu z kapilární elektroforézy u štěpeného vzorku bez mutace. Standard molekulových hmotností GeneScan™ -500 ROX je znázorněn červeně. Viditelný je pouze produkt fluorescenčně značený barvivem HAX™ o délce 112 bp zeleně.



Obrázek 8. Ukázka záznamu z kapilární elektroforézy u štěpeného vzorku pacienta s mutací p.V950G. Standard molekulových hmotností GeneScan™ - 500 ROX je znázorněn červeně. Stanovené produkty o délce 112 bp a 439 bp jsou znázorněny zeleně, viditelné jsou pouze ty fragmenty, které byly fluorescenčně značeny barvivem HAX™.

Pro výpočet poměru jednotlivých alel byly použity následující vzorce. Předpokladem je, že platí $A1 + A2 = 100\%$.

$$A1 (\%) = \frac{P1}{(P1 + P2)} \cdot 100$$

$$A2 (\%) = \frac{P2}{(P2 + P1)} \cdot 100$$

A1...zastoupení alely 1

A2...zastoupení alely 2

P1...plocha píku 1

P2...plocha píku 2

Restrikční analýza byla provedena pro každou mutaci dvakrát (viz kapitola 5.1.3).

Tabulka 24. Procentuální zastoupení jednotlivých alel s danou patogenní mutací.

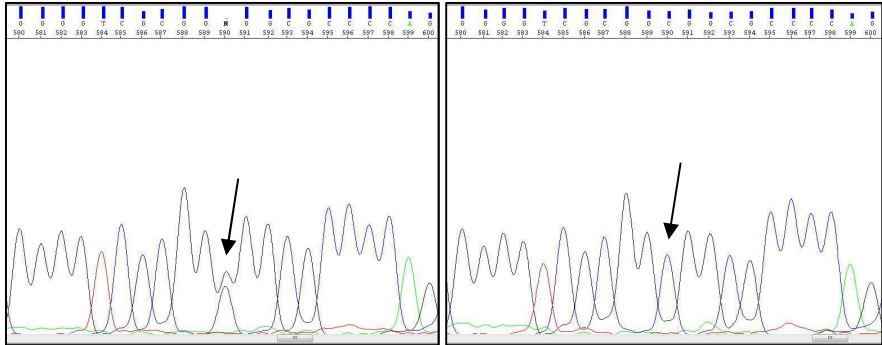
Pacient	Systém reverzní transkripce	Mutace A1	Mutace A2	Zastoupení A1 (%)	Zastoupení A2 (%)
001	1.	p.R1186H	?	30	70
005	1.	p.R1186H	p.S954L	30	70
006	1.	p.R1186H	p.S954L	30	70
015	1.	p.R1186H	p.S954L	32	68
030	1.	p.R1186H	p.S954L	28	72
008	1.	p.R1186H	p.Y276H	30	70
031	1.	p.R1186H	p.Y276H	30	70
019	1.	p.R1186H	p.P1007A	25	75
019	2.	p.R1186H	p.P1007A	25	75
009	1.	p.P1007A	p.V950G	22	78
009	2.	p.P1007A	p.V950G	20	80
009	2.	p.P1007A	p.V950G	21	79
004	1.	p.L176R	p.S954L	34	66
004	2.	p.L176R	p.S954L	41	69
004	2.	p.L176R	p.S954L	38	62
016	1.	p.V664M	p.Arg404GlyfsX45	50	50
016	2.	p.V664M	p.Arg404GlyfsX45	47	53
016	2.	p.V664M	p.Arg404GlyfsX45	42	58
013	1.	p.P691L	p.P474L	50	50
013	2.	p.P691L	pP474L	42	58
013	2.	p.P691L	pP474L	53	47

? mutace nenalezena v genech *NPC1/NPC2*

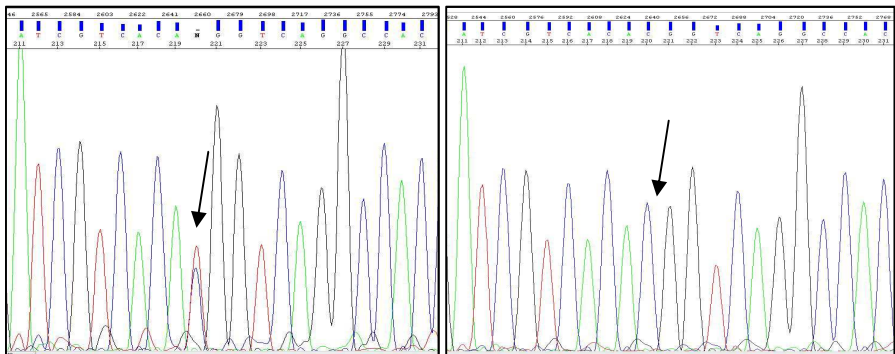
1. – restrikční analýza provedena Systém High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

2. – restrikční analýza provedena Systém ThermoScript™ Reverse Transcriptase

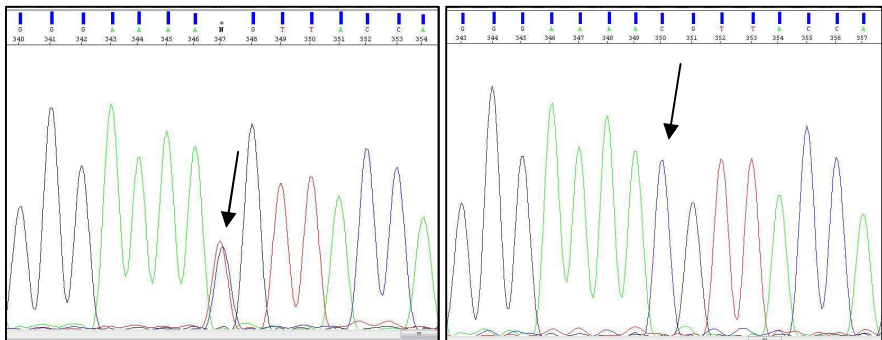
6.2 Výsledky analýzy promotoru *NPC1*



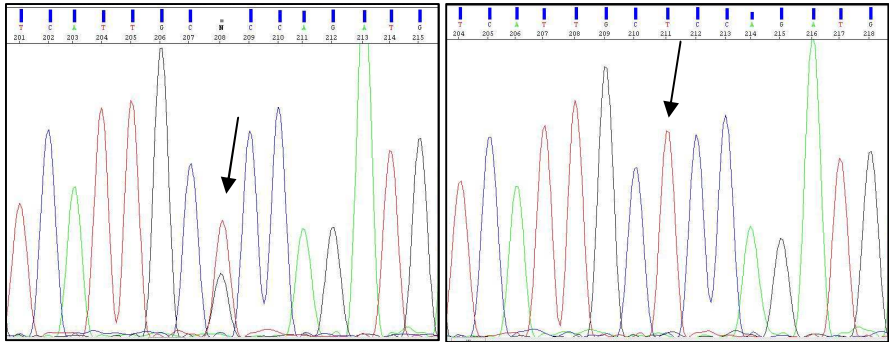
Obrázek 9. Nalevo sekvence pacienta v oblasti nalezené SNP rs8099071 (C > G). Napravo sekvence jiného pacienta ve stejné oblasti bez SNP.



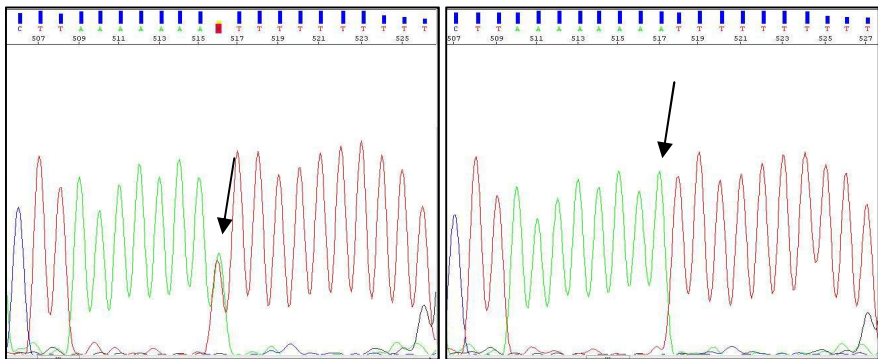
Obrázek 10. Nalevo sekvence pacienta v oblasti nalezené SNP rs28403610 (C>T). Napravo sekvence jiného pacienta ve stejné oblasti bez SNP.



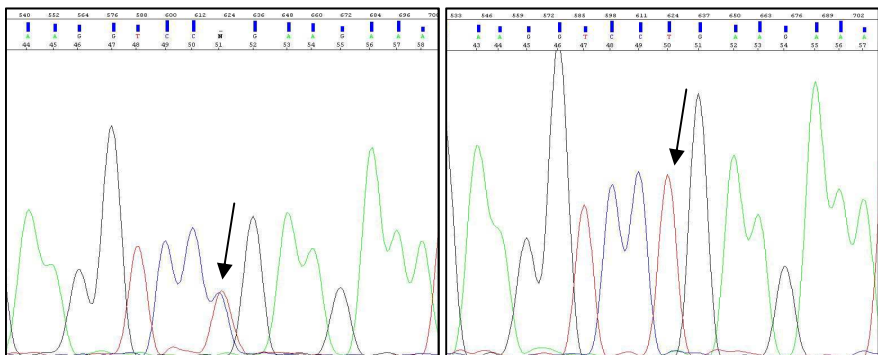
Obrázek 11. Nalevo sekvence pacienta v oblasti nalezené SNP rs2981422 (C > T). Napravo sekvence jiného pacienta ve stejné oblasti bez SNP.



Obrázek 12. Nalevo sekvenční pacienta v oblasti nalezené SNP rs1652354 (T > G). Napravo sekvenční jiného pacienta ve stejné oblasti bez SNP.



Obrázek 13. Nalevo sekvenční pacienta v oblasti nalezené SNP rs1788772 (A > T). Napravo sekvenční jiného pacienta ve stejné oblasti bez SNP.



Obrázek 14. Nalevo sekvenční pacienta v oblasti nalezené SNP rs1788774 (T > C). Napravo sekvenční jiného pacienta ve stejné oblasti bez SNP.

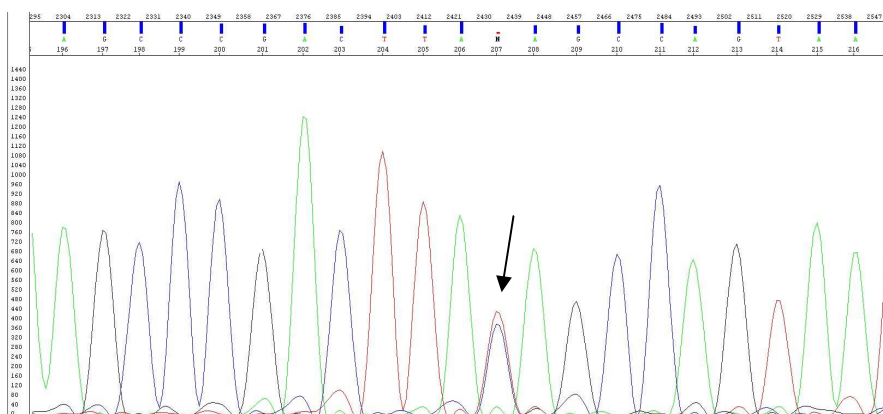
Tabulka 25. Nalezené SNP v oblasti promotoru genu *NPCI* u pacientů s onemocněním NPC.

Pacient	Název SNP	Pozice (ATG=1)	Varianta SNP	Alelická frekvence	Genotyp pro SNP
001	rs8099071	-238	C > G	C: 18% G: 82%	heterozygot
003	rs8099071	-238	C > G	C: 18% G: 82%	heterozygot
009	rs8099071	-238	C > G	C: 18% G: 82%	heterozygot
010	rs2981422	-887	C > T	C: 63% T: 37%	heterozygot
	rs1652354	-1026	T > G	T: 68% C: 32%	heterozygot
	rs1788774	-1186	T > C	T: 68% G: 32%	heterozygot
	rs1788772	-1435	A > T	A: 65% T: 35%	heterozygot
012	rs8099071	-238	C > G	C: 18% G: 82%	heterozygot
	rs2981422	-887	C > T	C: 63% T: 37%	heterozygot
	rs1652354	-1026	T > G	T: 68% C: 32%	heterozygot
	rs1788774	-1186	T > C	T: 68% G: 32%	heterozygot
	rs1788772	-1435	A > T	A: 65% T: 35%	heterozygot
013	rs2981422	-887	C > T	C: 63% T: 37%	heterozygot
	rs1652354	-1026	T > G	T: 68% C: 32%	heterozygot
	rs1788774	-1186	T > C	T: 68% G: 32%	heterozygot
	rs1788772	-1435	A > T	A: 65% T: 35%	heterozygot
014	rs1788772	-1435	A > T	A: 65% T: 35%	heterozygot
016	rs2981422	-887	C > T	C: 63% T: 37%	heterozygot
	rs1652354	-1026	T > G	T: 68% C: 32%	heterozygot
	rs1788774	-1186	T > C	T: 68% G: 32%	heterozygot
	rs1788772	-1435	A > T	A: 65% T: 35%	heterozygot
017	rs8099071	-238	C > G	C: 18% G: 82%	heterozygot
022	rs2981422	-887	C > T	C: 63% T: 37%	heterozygot
	rs1652354	-1026	T > G	T: 68% C: 32%	heterozygot
	rs1788774	-1186	T > C	T: 68% G: 32%	heterozygot
	rs1788772	-1435	A > T	A: 65% T: 35%	heterozygot
023	rs2981422	-887	C > T	C: 63% T: 37%	heterozygot
	rs1652354	-1026	T > G	T: 68% C: 32%	heterozygot
	rs1788774	-1186	T > C	T: 68% G: 32%	heterozygot
	rs1788772	-1435	A > T	A: 65% T: 35%	heterozygot
024	rs2981422	-887	C > T	C: 63% T: 37%	heterozygot

	rs1652354	-1026	T > G	T: 68% C: 32%	heterozygot
	rs1788774	-1186	T > C	T: 68% G: 32%	heterozygot
	rs1788772	-1435	A > T	A: 65% T: 35%	heterozygot
026	rs28403610	-609	C > T	C: 96% T: 4%	heterozygot
	rs2981422	-887	C > T	C: 63% T: 37%	homozygot
	rs1652354	-1026	T > G	T: 68% C: 32%	heterozygot
	rs1788774	-1186	T > C	T: 68% G: 32%	heterozygot
	rs1788772	-1435	A > T	A: 65% T: 35%	heterozygot
027	rs2981422	-887	C > T	C: 63% T: 37%	heterozygot
	rs1652354	-1026	T > G	T: 68% C: 32%	heterozygot
	rs1788774	-1186	T > C	T: 68% G: 32%	heterozygot
	rs1788772	-1435	A > T	A: 65% T: 35%	heterozygot
029	rs8099071	-238	C > G	C: 18% G: 82%	heterozygot

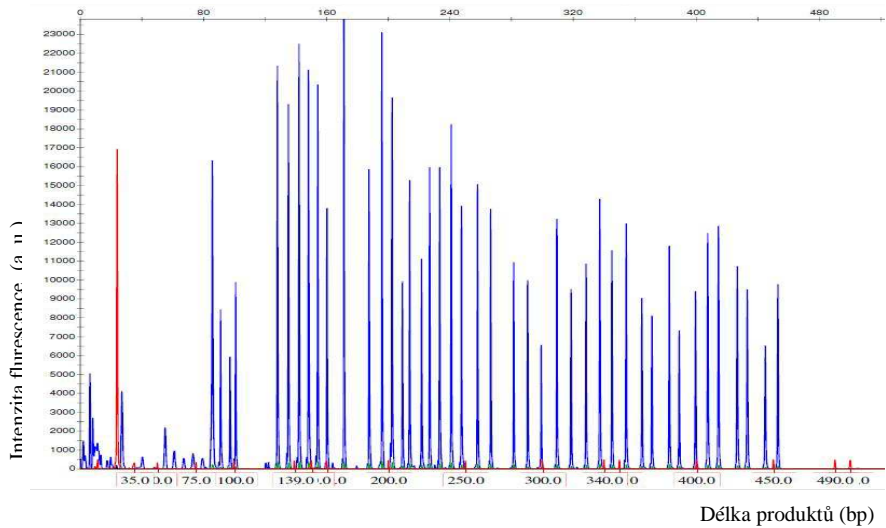
Alelické frekvence byly nalezena v databázi Ensembl vydání 71 - 04 2013© (www.ensembl.org) pro evropskou populaci.

6.3 Výsledky mutační analýzy u nově diagnostikované pacientky

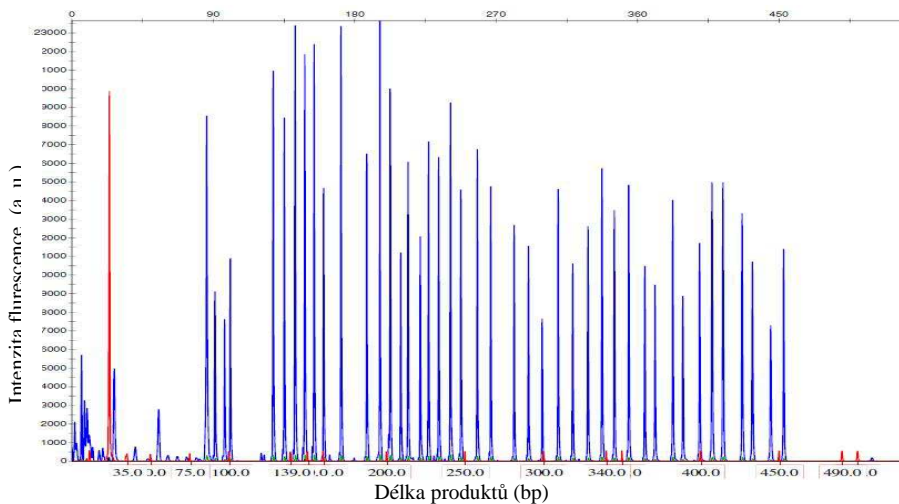


Obrázek 15. Sekvence pacientky v oblasti nalezené patogenní mutace p.I1061T (c.3182T>C) v genu *NPC1*.

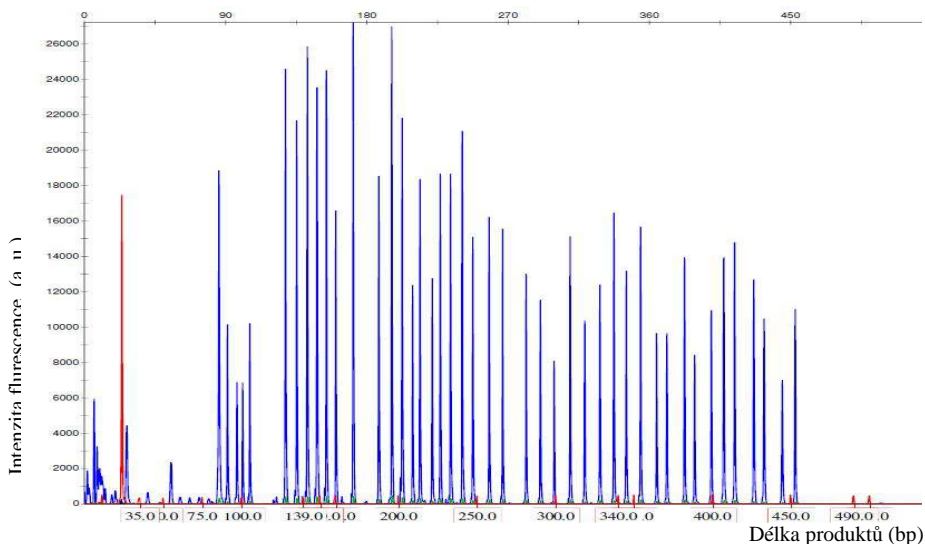
6.4 Výsledky metody MLPA



Obrázek 15. Ukázka záznamu z kapilární elektroforézy u vzorku pacientky. Stanovené produkty jsou znázorněny modře, červeně je značen velikostní standard.



Obrázek 16. Ukázka záznamu z kapilární elektroforézy u referenčního vzorku (negativní kontrola žena). Stanovené produkty jsou znázorněny modře, červeně je značen velikostní standard.



Obrázek 17. Ukázka záznamu z kapilární elektroforézy u referenčního vzorku (negativní kontrola muž). Jelikož se jedná o vzorek muže, vyskytuje se zde pík charakteristický pro chromozom Y o délce 105 bp. Stanovené produkty jsou znázorněny modře, červeně je značen velikostní standard.

Pro analýzu získaných dat z kapilární elektroforézy (viz kapitola 5.3.3) byly použity následující vzorce:

Vzorce pro výpočet hodnot **vnitřní normalizace** (pouze píky vzorku):

$$\begin{aligned}
 \text{Globální výška} &= \frac{\text{výška píky}}{\sum \text{výšek všech píků}} & \text{Bloková výška} &= \frac{\text{výška píky}}{\sum \text{výšek referenčních píků}} \\
 \text{Globální plocha} &= \frac{\text{plocha píky}}{\sum \text{ploch všech píků}} & \text{Bloková plocha} &= \frac{\text{plocha píky}}{\sum \text{ploch referenčních píků}}
 \end{aligned}$$

Vzorce pro výpočet hodnot **vnější normalizace** (píky vzorku i obou kontrol):

$$\text{Globální výška} = \frac{\text{Hodnota globální výšky vnitřní normalizace}}{\sum \text{průměrných hodnot výšek daného píky}}$$

$$\text{Globální plocha} = \frac{\text{Hodnota globální plochy vnitřní normalizace}}{\sum \text{průměrných hodnot ploch daného píku}}$$

$$\text{Bloková výška} = \frac{\text{Hodnota blokové výšky vnitřní normalizace}}{\sum \text{průměrných hodnot výšek referenčních píků}}$$

$$\text{Bloková plocha} = \frac{\text{Hodnota blokové plochy vnitřní normalizace}}{\sum \text{průměrných hodnot ploch referenčních píků}}$$

Tabulka 26. Výsledné hodnoty analýzy MLPA pro vyšetřovanou pacientku. Hodnoty výšky a plochy normalizovaných píků, získané metodou MLPA, byly vždy v rozmezí od 0,7 do 1,3, což jsou hodnoty, které nepoukazují na výskyt delece ani duplikace v genech NPC1/NPC2.

Sonda	Vnitřní normalizace				Vnější normalizace			
	Globální		Bloková		Globální		Bloková	
	výška	plocha	výška	plocha	výška	plocha	výška	plocha
referenční	0,040	0,037	0,172	0,161	1,0324	1,0388	1,0334	1,0369
NPC1 ex6	0,036	0,033	0,156	0,142	1,0515	1,0489	1,0526	1,0470
NPC1 ex15	0,042	0,038	0,182	0,166	1,0151	1,0151	1,0161	1,0132
NPC1 ex3	0,039	0,037	0,171	0,158	1,0284	1,0290	1,0295	1,0271
referenční	0,038	0,036	0,164	0,154	0,9792	1,0053	0,9802	1,0034
NPC1 ex21	0,026	0,024	0,112	0,105	0,9922	1,0063	0,9932	1,0044
mutační	0,000	0,000	0,000	0,000				
NPC1 ex16	0,044	0,040	0,192	0,174	1,0361	1,0330	1,0371	1,0311
mutační	0,000	0,000	0,000	0,000				
NPC1 ex2	0,029	0,027	0,128	0,117	1,0082	0,9872	1,0093	0,9854
NPC1 ex11	0,043	0,039	0,187	0,170	1,0145	1,0056	1,0155	1,0037
referenční	0,037	0,035	0,159	0,151	1,0355	1,0334	1,0366	1,0315
NPC1 ex21	0,018	0,017	0,080	0,074	0,9602	0,9670	0,9612	0,9652
NPC1 ex1	0,028	0,027	0,123	0,115	0,9950	0,9874	0,9960	0,9855
NPC1 ex24	0,021	0,019	0,090	0,081	1,0014	0,9757	1,0024	0,9739
referenční	0,030	0,027	0,129	0,117	0,9976	0,9892	0,9986	0,9874
NPC2 ex1	0,030	0,028	0,129	0,122	1,0143	1,0157	1,0153	1,0139
NPC1 ex10	0,034	0,033	0,147	0,142	1,0084	1,0112	1,0094	1,0093
NPC1 ex18	0,026	0,025	0,113	0,107	1,0340	1,0184	1,0350	1,0165
NPC1 ex8	0,028	0,028	0,122	0,120	1,0157	1,0218	1,0168	1,0199
NPC2 ex4	0,026	0,025	0,111	0,109	1,0108	1,0228	1,0119	1,0209
mutační	0,000	0,000	0,000	0,000				

NPC1 ex17	0,020	0,020	0,088	0,085	0,9663	0,9622	0,9673	0,9604
NPC1 ex9	0,019	0,019	0,081	0,083	0,9777	0,9901	0,9787	0,9882
referenční	0,012	0,012	0,053	0,054	0,9523	0,9666	0,9532	0,9648
NPC1 ex5	0,025	0,025	0,107	0,107	0,9972	0,9953	0,9982	0,9934
referenční	0,018	0,018	0,077	0,080	1,0103	1,0219	1,0113	1,0200
NPC1 ex14	0,020	0,021	0,088	0,090	0,9802	0,9767	0,9812	0,9749
NPC2 ex5	0,027	0,028	0,115	0,121	0,9948	0,9926	0,9958	0,9907
NPC1 ex23	0,022	0,023	0,093	0,099	0,9795	0,9814	0,9805	0,9795
NPC1 ex17	0,024	0,027	0,105	0,117	0,9666	0,9761	0,9675	0,9743
NPC2 ex2	0,017	0,019	0,073	0,081	1,0029	1,0253	1,0039	1,0234
referenční	0,015	0,017	0,066	0,074	0,9649	0,9778	0,9659	0,9760
NPC1 ex13	0,022	0,025	0,095	0,108	0,9606	0,9682	0,9616	0,9664
NPC1 ex22	0,014	0,015	0,059	0,066	0,9630	0,9583	0,9639	0,9565
NPC1 ex4	0,018	0,020	0,076	0,087	0,9500	0,9568	0,9509	0,9551
referenční	0,023	0,027	0,101	0,116	0,9760	0,9622	0,9770	0,9604
NPC1 ex20	0,024	0,028	0,104	0,120	0,9776	0,9798	0,9786	0,9780
NPC1 ex19	0,020	0,023	0,087	0,102	0,9455	0,9518	0,9465	0,9500
NPC2 ex4	0,018	0,022	0,077	0,093	1,0023	1,0184	1,0033	1,0165
NPC1 ex12	0,012	0,015	0,053	0,064	1,0153	1,0209	1,0163	1,0190
referenční	0,018	0,021	0,079	0,092	0,9835	0,9769	0,9845	0,9751

7 DISKUZE

7.1 Vyšetření množství transkriptu genu *NPC1*

Analýza množství transkriptu byla u pacientů vyšetřena pomocí metody PCR/RFLP s následnou fragmentační analýzou. Primárním úkolem bylo určit procentuální zastoupení jednotlivých alel nesoucích nejfrekventovanější patogenní mutace u pacientů (složených heterozygotů).

V souboru 40 pacientů diagnostikovaných v ÚDMP s onemocněním *NPC1* se nejčastěji vyskytuje mutace **p.R1186H** (c.3557G>A), nalezena byla u 14 pacientů. Z toho ve dvou případech v homozygotní formě, zbytek pacientů tvořili složení heterozygoti. Přestože, v odborné literatuře není povaha této mutace zaznamenána, lze se domnívat, že má za následek těžší formy onemocnění *NPC1* a řadí se tak k závažným mutacím. Tomuto závěru nahrává několik faktů zjištěných v našem souboru pacientů. U homozygotních pacientů nesoucích tuto mutaci se nemoc projevila už v raném věku, což obnáší nepříznivý infantilní fenotyp. Stejně tak v případech, kdy pacient nesl tuto mutaci pouze na jedné z alel, byl zaznamenán infantilní či juvenilní fenotyp.

Restrikční analýzou odhaleno, že poměr exprese alely, která nese mutaci **p.R1186H** je vždy výrazně nižší, výsledky analýzy jsou tak v souladu s předchozími informacemi o mutaci. Kombinace s mutací p.S954L a p.Y276H dávala poměr **30:70**. V kombinaci s mutacemi p.P1007A a p.V950G byl poměr průměrně **23:77**.

Na dalším místě, co se frekvence výskytu týče, se nachází mutace **p.S954L** (c.2861C>T). Nalezena byla doposud u 10 složených heterozygotů ve většině případů s časným juvenilním fenotypem.

Analýzou bylo zjištěno, že poměr alel v kombinaci s mutací p.L176R dává v průměru **63 : 37 (p.S954L : p.L176R)**.

Přestože v obou genotypech (p.R1186H/ p.S954L a p.L176R/ p.S954L) je alela p.S954L exprimována ve vyšším množství, patří podle literatury také mezi závažnější mutace (www.npc.fzk.de) (Bauer *et al.* 2002).

Mezi vyšetřované mutace patří také **p.P1007A** (c.3019C > G) nalezená u 8 pacientů, vždy v heterozygotním stavu s jinou mutací. Tato mutace je vícekrát v literatuře uváděna jako frekventovaná u evropské populace s mírným dopadem na fenotyp pacienta (Vanier & Millat 2003) (Greer *et al.* 1999). Navíc je uváděno, že by tato mutace mohla mírnit nepříznivý účinek závažných mutací (Millat *et al.* 2001). Literární údaje korelují s výsledky analýzy transkriptu, kdy u pacienta p.R1186H/ p.P1007A byla přednostně exprimována právě alela p.P1007A (**25:75**).

Překvapivým zjištěním byl fakt, že u pacienta nesoucího mutaci **p.V664M** (c.1990G>A) a delecí mutaci **p.Arg404GlyfsX45** (c.1210delC) byl poměr alel vyrovnaný, v průměru **48:52**. Očekávalo se, že se bude mutace s delecí exprimovat méně. Mutace **p.Arg404GlyfsX45** totiž způsobuje posun ve čtecím rámci, který vede k předčasnému stop kodonu. Z charakteru mutace lze usuzovat na syntézu zkráceného bílkovinného řetězce obsahujícího navíc oproti normální bílkovině 15 odlišných aminokyselinových zbytků. Jelikož se tato mutace vyskytuje přibližně v první třetině proteinu, byl očekáván zásah kontrolního ochranného mechanismu NMD (*Nonsense-mediated mRNA decay*), který rozpoznává a odstraňuje přepisy nesoucí předčasně zařazené terminační kodóny. V tomto případě k tomuto ochrannému mechanismu nedochází a mutovaná alela se i přesto exprimuje.

Mutace **p.P474L** (c.1421C>T) byla doposud nalezena u dvou pacientů. Literatura popisuje tuto mutaci jako vzácně se vyskytující (Tarugi *et al.* 2002). Exprese této alely byla v kombinaci s alelou nesoucí mutaci **p.P691L**

(c.2072C>T) vyrovnaná (**49:51**). Kvůli nedostatku informací o této mutaci, nelze vyvozovat závěry o vlivu na fenotyp pacienta.

Reverzní transkripce mRNA, která byla součástí studie exprese transkriptu, byla provedena dvěma různými systémy, abychom eliminovali zkreslení výsledků analýzy vlivem různé účinnosti.

Ke zkreslení poměrů exprese alel nedošlo, oba systémy dávaly shodné výsledky.

7.2 Analýza promotoru genu *NPCI*

Metodou přímého sekvenování byl analyzován promotor genu *NPCI* u 31 českých a slovenských pacientů s Niemann-Pickovou chorobou typu C. Z tohoto počtu pacientů bylo u 15 z nich nalezeno 6 různých variant jednonukleotidových polymorfizmů (SNP): **rs8099071** (c.-238C>G), **rs28403610** (c.-609C>T), **rs2981422** (c.-887C>T), **rs1652354** (c.-1026T>G), **rs1788774** (c.-1186T>C), **rs1788772** (c.-1435A>T). Pozice je přepočítána od počátku translace ATG = 1. Všechny nalezené SNP jsou uvedené v databázi Ensembl (www.ensembl.org) jako relativně běžné polymorfismy.

Žádné vzácné varianty nebyly u sledovaného souboru pacientů zjištěny. Z výskytu a frekvencí nalezených SNP lze odhadovat šest různých variant haplotypů.

Prvním haplotypem je ta varianta, u které se v promotoru genu *NPCI* nevyskytuje žádný SNP. Tento haplotyp byl zaznamenán u 16 pacientů.

Druhá varianta haplotypu, charakterizovaná přítomností pouze jediného SNP rs8099071, byla nalezena u 5 pacientů.

Třetí variantou je haplotyp, u kterého se v promotoru nachází varianta SNP rs1788772. Tento haplotyp byl zjištěn pouze u 1 pacienta.

Čtvrtým haplotypem je varianta, kdy se v promotoru genu NPC1 pacientů nalézala kombinace čtyř SNP rs2981422, rs1652354, rs1788774, rs1788772. Tato kombinace SNP byla u pacientů druhou nejčastěji se vyskytující, zjištěna byla u 7 pacientů.

Pátou variantou haplotypu je výskyt pěti SNP: rs8099071, rs2981422, rs1652354, rs1788774, rs1788772. Tento haplotyp byl nalezen u jednoho pacienta.

Poslední šestá varianta haplotypu je charakterizovaná přítomností šesti různých SNP: rs8099071, rs28403610, rs2981422, rs1652354, rs1788774, rs1788772 . Tato varianta haplotypu byla nalezena pouze u jednoho pacienta.

Nález a frekvence výskytu těchto SNP v oblasti promotoru genu *NPC1* odpovídá i výskytu v jiných evropských populacích (www.ensembl.org) (Tarugi *et al.* 2002). Tarugi a kol. v článku *Niemann-Pick type C disease: mutations of NPC1 gene and evidence of abnormal expression of some mutant alleles in fibroblasts* popisují pacienta s promotorovými polymorfismy **rs1788774** a **rs1652354**. U českých a slovenských pacientů byly tyto dva SNP ve všech případech detekovány v kombinaci se SNP **rs2981422** a dalším SNP (viz varianty haplotypů 4, 5 a 6). Z uvedených dat vyplývá, že existujících haplotypů bude v evropské populaci patrně více.

Cílem sekvenační analýzy promotoru byla identifikace vzácných variant, které by mohly ovlivnit hladinu transkripce. Takové varianty však u našeho souboru pacientů nebyly nalezeny. Výsledkem sekvenování promotorů u 31 pacientů byla identifikace šesti různých, ale v evropské populaci běžných polymorfismů, které jsou součástí šesti odhadovaných haplotypů.

7.3 Mutační analýza u nově diagnostikované pacientky

Mutační analýzu genu *NPC2* provedl pracovník ÚDMP, sekvenční analýza neodhalila žádnou patogenní mutaci v genu *NPC2*.

Sekvenační analýzou genu *NPC1* byla odhalena mutace p.I1061T (c.3182T>C) v exonu 21. Ověření, že se jedná o patogenní mutaci, tedy tu genetickou variantu, která nepříznivě ovlivňuje funkci NPC1 proteinu, bylo provedeno pomocí databáze *Niemann-Pick Type C Disease Gene Variation Database* (www.npc.fzk.de). Databáze kromě základního popisu mutace odkazuje také na první publikaci, ve které byla mutace p.I1061T poprvé popsána (Millat *et al.* 1999). Později byla provedena také funkční studie pro tuto mutaci (Zampieri *et al.* 2011).

7.4 Metoda MLPA

Metoda MLPA jako jedna z mála běžných diagnostických metod dokáže detekovat v genu delece či duplikace, které se u složených heterozygotů běžným sekvenováním neodhalí.

Jelikož sekvenační analýzou byla nalezena pouze mutace na jedné alele, byla u pacientky provedena metoda MLPA.

Vypočtené hodnoty výšky a plochy normalizovaných píků získané metodou byly vždy v rozmezí od 0,7 do 1,3, což jsou hodnoty, které nepoukazují na výskyt delece ani duplikace v genech *NPC1/NPC2*.

Tento výsledek ovšem stoprocentně nezaručuje, že se v genech *NPC1/NPC2* nenachází delece ani duplikace. K falešně negativnímu

výsledku by mohlo dojít třeba v případě, že by se daná delece/duplikace nacházela mimo sekvence, se kterými hybridizují MLPA sondy.

7.5 Závěr diskuze

Ve fibroblastových kulturách pacientů diagnostikovaných v ÚDMP jsem hledala vhodné genotypy pro testování nových potenciálních terapeutik. Podmínkou těchto experimentů ovšem je přítomnost alespoň reziduálního množství transkriptu v buňkách.

U všech dvanácti vybraných pacientů bylo množství NPC1 transkriptu detekovatelné. Výsledky byly také v souladu s metodou Western blot, kterou provedl pracovník ÚDMP a která je součástí grantu.

Kromě patogenních mutací v kódující části genu by množství transkriptu mohla ovlivnit i struktura promotoru. U všech vyšetřovaných pacientů jsem však našla pouze běžné varianty SNP. Nepředpokládá se tedy, že by tyto varianty SNP zjevně ovlivňovaly množství transkriptu genu *NPC1*. Konečnou odpověď ovšem dá až luciferázová esej, která je plánovaná a je součástí grantu.

U nově diagnostikované pacientky byla mutační analýzou nalezena pouze jedna patogenní mutace p.I1061T (c.3182T>C) v genu *NPC1*. Přestože druhá mutace odhalena nebyla, lze kulturu kožních fibroblastů použít k dalšímu testování tak, jak bylo provedeno u ostatních vzorků popsaných v této práci.

Výsledky práce budou součástí přednášky na konferenci 28. pracovní dny *Dědičné metabolické poruchy*. 15. - 17. května 2013., Tábor. Abstrakt přiložen viz příloha.

8 SOUHRN

- Analýza transkriptu pro protein NPC1 byla provedena PCR/RFLP s následnou fragmentační analýzou.
- Byly zavedeny metody pro analýzu transkriptu u šesti patogenních mutací v genu *NPC1*.
- Na základě zavedených metod bylo zjištěno procentuální zastoupení exprese jedenácti alel, mezi nimi i tří alel nejčastěji se vyskytujících u českých a slovenských pacientů.
- Byla zavedena sekvenační analýza promotoru
- Sekvenční analýza promotoru genu *NPC1* byla provedena u 31 pacientů. Bylo nalezeno šest různých SNP: rs8099071, rs28403610, rs2981422, rs1652354, rs1788774, rs1788772. Výsledky analýzy budou dále použity pro funkční luciferázovou esej.
- U nově diagnostikované pacientky byla sekvenační analýzou nalezena pouze jedna patogenní mutace p.I1061T (c.3182T>C) v genu *NPC1*. Metodou MLPA byla proto vyšetřována možná přítomnost rozsáhlejší delece či duplikace, ale ani pomocí této metody nebyla druhá mutace nalezena.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Bauer P., Knoblich R., Bauer C., Finckh U., Hufen A., Kropp J., Braun S., Kustermann-Kuhn B., Schmidt D., Harzer K., Rolfs A. (2002): NPC1: Complete genomic sequence, mutation analysis, and characterization of haplotypes. *Hum. Mutat.* 19: 30-38.
2. Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, *et al.*(1997): Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science.* 277: 228-231.
3. Crocker A.C. (1961): The cerebral defect in Tay-Sachs disease and Niemann-Pick disease. *J. Neurochem.* 7: 69-80.
4. Crocker A.C., Faber S. (1958): Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients. *Medicine (Baltimore).* 37: 1-95.
5. Davies J.P., Ioannou Y.A. (2000): Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J. Biol. Chem.* 275: 24367-24374.
6. Elleder M. (2010): Diagnosis of Niemann–Pick type C (NPC) – Decisions at the cell level. Pathologist’s report. *Mol. Gen. Met.* 99: 98.
7. Ericson G. (2008): Chemical chaperone could open door to treatment of neurological disorder. Washington Univerzity of St. Louis
8. Fernandes J., Saudubray JM, Berghe, Walter J.H. (2008): Niemann-Pickova choroba typ A a B, Niemann-Pickova choroba typu C. *In: Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch.* Triton, Praha. 533-535, 542-543.
9. Garver W.S., Francis G.A., Jelinek D., Shepherd G., Flynn J., Castro G., Walsh Vockley C., Coppock D.L., Pettit K.M., Heidenreich R.A., Meaney F.J.(2007): The National Niemann-Pick C1 disease database:

- report of clinical features and health problems. *Am. J. Med. Genet. A.* 143: 1204-1211.
10. Greer W.L., Dobson M.J., Girouard G.S., Byers D.M., Riddell D.C., Neumann P.E. (1999): Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1252-1260.
 11. Greer W.L., Riddell D.C., Gillan T.L., Girouard G.S., Sparrow S.M., Byers D.M., Dobson M.J., Neumann P.E. (1998): The Nova Scotia (type D) form of Niemann-Pick disease is caused by a G3097-->T transversion in NPC1. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 52-54.
 12. Higgins M.E., Davies J.P., Chen F.W., Ioannou Y.A. (1999): Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol. Genet. Metab.* 68: 1-13.
 13. Holeček M. (2006): Metabolizmus lipidů. *In: Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin.* © Grada Publishing a. s., Praha. 116-131.
 14. Cheruku S.R., Xu Z., Dutia R., Lobel P., Storch J. (2006): Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport. *J. Biol. Chem.* 281: 31594-31604.
 15. Infante R.E., Abi-Mosleh L., Radhakrishnan A., Dale J.D., Brown M.S., Goldstein J.L. (2008): Purified NPC1 protein. I. Binding of cholesterol and oxysterols to a 1278-amino acid membrane protein. *J. Biol. Chem.* 283: 1052-1063.
 16. Iturriaga C., Pineda M., Fernández-Valero E.M., Vanier M.T., Coll M.J. (2006): Niemann-Pick C disease in Spain: clinical spectrum and development of a disability scale. *J. Neurol. Sci.* 249: 1-6.
 17. Jiang X., Sidhu R., Porter F.D., Yanjanin N.M., Speak A.O., te Vrugte D.T., Platt F.M., Fujiwara H., Scherrer D.E., Zhang J., Dietzen D.J., Schaffer J.E., Ory D.S. (2011): A sensitive and specific LC-

MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *J. Lipid. Res.* 52: 1435-1445.

18. Kwon H.J., Abi-Mosleh L., Wang M.L., Deisenhofer J., Goldstein J.L., Brown M.S., Infante R.E. (2009): Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell.* 137: 1213–1224.
19. Millat G., Marçais C., Rafi M.A., Yamamoto T., Morris J.A., Pentchev P.G., Ohno K., Wenger D.A., Vanier M.T. (1999): Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 65:1321-1329.
20. Millat G., Marçais C., Tomasetto C., Chikh K., Fensom A.H., Harzer K., Wenger D.A., Ohno K., Vanier M.T. (2001): Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 1373-1385.
21. Miller W.L., Bose H.S. (2011): Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J. Lipid. Res.* 52: 2111-2135.
22. Pastores G.M., Barnett N.L. (2003): Substrate reduction therapy: miglustat as a remedy for symptomatic patients with Gaucher disease type 1. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 12: 273-281.
23. Patterson M.C., Hendriksz C.J., Walterfang M., Sedel F., Vanier M.T., Wijburg F.; NP-C Guidelines Working Group (2012): Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Mol. Genet. Metab.* 106: 330-344.
24. Patterson M.C., Vecchio D., Prady H., Abel L., Wraith J.E. (2007): Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet. Neurol.* 6:765-772.

25. Poupětová H., Ledvinová J., Berná L., Dvořáková L., Kožich V. and Elleder M. (2010): The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33: 387–396.
26. Rosenbaum A.I., Zhang G., Warren J.D. and Maxfield F.R. (2010): Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 5477–5482.
27. Schuchman E.H. (2009): The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *Int. J. Clin. Pharmacol Ther.* 47: 48-57.
28. Sleat D.E., Wiseman J.A., El Banna M., Price S.M., Verot L., Shen M.M., Tint G.S., Vanier M.T., Walkley S.U., Lobel P. (2004): Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 5886-5891.
29. Spiegel R., Raas-Rothschild A., Reish O., Regev M., Meiner V., Bargal R., Sury V., Meir K., Nadjari M., Hermann G. *et al.* (2009): The clinical spectrum of fetal Niemann-Pick type C. *Am. J. Med. Genet.* 149: 446-450.
30. Steinberg S.J., Ward C.P., Fensom A.H. (1994): Complementation studies in Niemann-Pick disease type C indicate the existence of a second group. *J. Med. Genet.* 31: 317-320.
31. Tarugi P., Ballarini G., Bembi B., Battisti C., Palmeri S., Panzani F., Di Leo E., Martini C., Federico A., Calandra S. (2002): Niemann-Pick type C disease: mutations of NPC1 gene and evidence of abnormal expression of some mutant alleles in fibroblasts. *J. Lipid Res.* 43: 1908-1919.
32. Trendelenburg G., Vanier M.T., Maza S., Millat G., Bohner G., Munz D.L., Zschenderlein R. (2006): Niemann-Pick type C disease in a 68-year-old patient. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 77: 997–998.
33. Vance J.E. (2010): Transfer of cholesterol by the NPC team. *Cell Metabolism.* 12: 105-106.

34. Vanier M.T. (2010): Niemann-Pick disease type C. Orphanet J. Rare Dis. 5:16.
35. Vanier M.T., Millat G. (2003): Niemann-Pick disease type C. Clin. Genet. 64: 269-281.
36. Vanier M.T., Millat G. (2004): Structure and function of the NPC2 protein. Biochim. Biophys. Acta., 1685: 14-21.
37. Walterfang M., Fietz M., Fahey M., Sullivan D., Leane P., Lubman D.I., Velakoulis D.(2006): The neuropsychiatry of Niemann-Pick type C disease in adulthood. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 18: 158-170.
38. Watari H., Blanchette-Mackie J., Dwyer N.K., Watari M., Budr Ch.G., Patel S., Pentchev P.G., Strauss J.F. (2000): Determinants of NPC1 expression an action: key promoter regions, postranscriptional control, and the importace of a cystein rich look. Experimental Cell Research. 259: 247-256.
39. Wraith J.E., Baumgartner M.R., Bembi B., Covanis A., Levade T., Mengel E., Pineda M., Sedel F., Topcu M., Vanier M.T. *et al.* (2009): Recommendations on the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C. Mol. Genet. Metab. 98: 152–165.
40. Zampieri S., Bembi B., Rosso N., Filocamo M., Dardis A. (2012): Treatment of Human Fibroblasts Carrying NPC1 Missense Mutations with MG132 Leads to an Improvement of Intracellular Cholesterol Trafficking. JIMD Rep. 2: 59-69.
41. www.ensembl.org
42. www.mlpa.com
43. www.ncbi.nlm.nih.gov
44. www.npc.fzk.de

10 PŘÍLOHA

Niemann Pickova choroba typu C1: Molekulárně genetická diagnostika a charakterizace mutací

L. Dvořáková, F. Majer, I. Marešová, D. Mušálková, H. Vlášková, A. Loužecká, H. Jahnová, H. Hůlková, M. Hřebíček

Ústav dědičných metabolických poruch, 1. LF UK a VFN, Praha

Niemann Pickova choroba typu C (NPC1 OMIM #257220, NPC2 #607625) je závažné autosomálně recesivní neuroviscerální onemocnění, charakterizované hepatosplenomegalií a rozvojem neurologických příznaků. Základním biochemickým rysem onemocnění je lysosomální střádání lipidů, hlavně cholesterolu a glykolipidů, v důsledku poruchy intracelulárního transportu lipidů. Příčinou onemocnění jsou mutace v jednom ze dvou genů - *NPC1* nebo *NPC2*, které kódují funkčně kooperující proteiny neenzymové povahy lokalizované v pozdních endosomech/lysosomech.

Diagnostika tohoto onemocnění je založena na klinickém a histologickém nález. Pro potvrzení diagnózy jsou biochemické testy esterifikace (tj. filipinový test nebo test s radioaktivně značenou mastnou kyselinou) často nahrazovány metodami molekulárně genetickými. Algoritmus vyšetření zahrnuje sekvenaci genu na úrovni DNA, metodu MLPA pro zjištění rozsáhlejších delecí/duplikací a sekvenaci na úrovni transkriptu.

Molekulární podstatu onemocnění jsme určili u probandů z 38 rodin komplementační skupiny NPC1. U deseti pacientů, u nichž byla identifikována alespoň jedna missense mutace, jsme v tkáňových kulturách fibroblastů sledovali vliv genotypu na množství transkriptu a rovnovážné množství imunoreaktivního NPC1 proteinu.

Výsledky ukázaly, že množství NPC1 transkriptu i proteinu jsou sníženy, ale detekovatelné.

Analyzované missense mutace tedy umožňují reziduální produkci proteinu a testované kultury fibroblastů mohou být použity pro další analýzy sloučenin stabilizujících mutantní NPC1 protein.

Podpora: IGA MZ CR NT12239-5/2011, RVO-VFN64165/2012, PRVOUK-P24/LF1/3