

## Abstrakt

Konečná diagnóza dědičných metabolických poruch je obvykle určena na základě vyšetření enzymové aktivity (což je mnohdy komplikované) a/nebo za pomoci molekulárně genetického vyšetření. Výsledky standardní mutační analýzy však mohou být někdy zavádějící, zejména v případě rozsáhlých reorganizací na úrovni chromozomu či u mutací v regulačních oblastech. Předkládaná práce je zaměřena na charakterizaci komplexních mutací v genu pro ornitin transkarbamylyázu (*OTC*), studium regulačních oblastí *OTC* a genu pro  $\beta$ -galaktozidázu (*GBA*).

V rámci studie provedené na souboru čítajícím 37 pacientů s kongenitální hyperamonémií II. typu (OTCD) bylo identifikováno a charakterizováno 14 nových mutací včetně tří rozsáhlých delecí. Byl zaznamenán i případ symptomatické heterozygotky pro hypomorfní mutaci p.R129H, u níž byl fenotyp OTCD zřejmě podmíněn posunem v X-inaktivaci ve prospěch mutované alely. Nález byl podložen sledováním nevýhodné X-inaktivace ve třech různých periferních tkáních.

Za účelem prověření patogenity promotorové variace c.-366A>G v *OTC* nalezené v jedné rodině s mírným fenotypem OTCD byly identifikovány tři alternativní počátky transkripce (PT) a vymezen promotor lidského *OTC*. Transkripční aktivita promotoru, stejně tak jako aktivita nově nalezeného distálního enhanceru, byla ověřena funkční esejí. Výsledky ukázaly klíčový význam interakce promotoru s enhancerem pro tkáňově specifickou expresi *OTC* v játrech. Přítomnost variace c.-366A>G vedla k padesátiprocentnímu snížení aktivity mutovaného promotoru v interakci s enhancerem.

Detailní charakterizace promotoru lidského *OTC* odhalila dva silné *cis*-aktivní regulační elementy odpovídající vazebným místům pro HNF-4 $\alpha$ . V oblasti proximálního promotoru byl nalezen třetí vysoce konzervovaný motiv rozpoznávaný HNF-4 $\alpha$ , přičemž všechna tři vazebná místa se nalézají ve vzdálenosti do 35 bp nad PT. Promotor *OTC* přitom postrádá základní elementy nezbytné pro iniciaci transkripce v konvenčních pozicích. Dosažené výsledky silně podporují úlohu HNF-4 $\alpha$  v iniciaci transkripce *OTC* u člověka.

Metodický postup zavedený při studiu *OTC* byl následně aplikován na charakterizaci alternativního promotoru *GBA*. V případě alternativního transkriptu nesoucího dva nepřekládané exony -1 a -2 byly nalezeny tři různé PT. Při porovnání s normálním promotorem vykazoval alternativní promotor nižší transkripční aktivitu, expresní profil napříč několika různými tkáněmi však byl srovnatelný. Byla vyslovena hypotéza, že výrazné rozdíly ve fenotypu u pacientů se stejným genotypem *GBA* mohou být dány variabilní expresí mutovaného alternativního transkriptu. Tuto hypotézu se však nepodařilo experimentálně potvrdit na souboru 20 pacientů s Gaucherovou chorobou.

Výsledky výše uvedených studií rozšiřují možnosti molekulární diagnostiky OTCD a Gaucherovy choroby.

**Klíčová slova:** Ornitin transkarbamylyáza, kongenitální hyperamonémie II. typu, kyselá  $\beta$ -glukocerebrosidáza, Gaucherova choroba, genová exprese, regulace transkripce, promotor, enhancer