

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

***ANALÝZA MUTACÍ GENU TSC2:  
srovnání účinnosti detekce metodou  
prosté DGGE a DGGE s tvorbou  
heteroduplexu***

**Diplomová práce**

Autor:	Petra Kotlářová
Studijní program:	Biologie B1501
Studijní obor:	Zoologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí bakalářské práce:	doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	listopad 2010

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně a všechny prameny, které jsem v této práci použila, jsou uvedeny v části Použitá literatura a internetové adresy.

V Českém Těšíně 15. 11. 2010

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Radku Vrtělovi, Ph.D. za odborné vedení při psaní této práce a za vše co mě dosud naučil.

Děkuji také Evě Schneiderové a Hance Filipové a všem ostatním pracovníkům laboratoře DNA analýzy FN v Olomouci za pomoc a za všechny užitečné rady při práci.

Své rodině a přátelům bych chtěla poděkovat za skvělé zázemí, podporu a trpělivost při tvorbě této práce.

Děkuji všem, díky kterým jsem se mohla na tomto zajímavém výzkumu podílet.

Infrastrukturální část projektu byla podporována v rámci Ústavu molekulární a translační medicíny z operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace: CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

## **BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE**

**Jméno a příjmení autora:** Petra Kotlářová

**Název práce:** Analýza mutací genu TSC2: srovnání účinnosti detekce metodou  
prosté DGGE a DGGE s tvorbou heteroduplexu

**Typ práce:** Diplomová práce

**Pracoviště:** Oddělení genetiky a fetální medicíny, FN Olomouc

**Vedoucí práce:** doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2010

### **Abstrakt:**

Komplex tuberózní sklerózy je multisystémové autozomálně dominantně dědičné onemocnění způsobené mutacemi v genech TSC1 a TSC2.

Teoretická část této práce zahrnuje stručnou charakteristiku klinických, histologických a genetických aspektů této choroby a přehled nejčastěji používaných metod umožňujících odhalování mutací v genech TSC1 a TSC2.

Praktická část je zaměřena na srovnání účinnosti v odhalování mutací prosté DGGE a DGGE s tvorbou heteroduplexu na základě výsledků získaných vyšetřováním genu TSC2 u přiděleného souboru pacientů. U jednotlivých typů mutací detekovaných v genu TSC2 je stanoveno jejich procentuální zastoupení, které je porovnáno s mezinárodním seznamem dosud detekovaných mutací v genu TSC2. Dále byla zjišťována proporce odhalených mutací z celkového množství detekovaných změn v genu TSC2 a stanovena proporce pacientů s odhalenou jednou nebo i více změnami v genu TSC2 z celkového počtu všech pacientů vyšetřovaných v genu TSC2.

**Klíčová slova:** komplex tuberózní sklerózy, TSC1, TSC2, DGGE po prosté PCR, DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu, PCR, PCR s tvorbou heteroduplexu, heteroduplex, mutace

**Počet stran:** 100

**Počet příloh:** 6

**Jazyk:** Čeština

## **BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION**

**Autor's first name and surname:** Petra Kotlárová

**Title:** Analysis of TSC2 gene mutations: comparison of detection using classical DGGE and DGGE with heteroduplex creation.

**Type of thesis:** Diploma thesis

**Department:** Department of genetics and fetal medicine, Faculty Hospital  
in Olomouc

**Supervisor:** doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D.

**The year of presentation:** 2010

### **Abstract:**

The tuberous sclerosis complex is a multisystem autosomal dominant hereditary disorder that is caused by mutations in genes TSC1 and TSC2.

The theoretical part of this thesis includes a characteristic of clinical, histological and genetical aspects of the disorder and a summary of the most frequently used methods for detecting mutations.

The experimental part of the thesis is focused on comparing the efficiency of mutation detection using classical DGGE to using DGGE with heteroduplex creation, based on the results of the investigation of TSC2 gene in the assigned group of patients. The percentage distribution of various mutation types detected in TSC2 gene is compared with the international register of all the detected mutations in TSC2 gene up to this date. Additionally, the proportion of detected mutations in the total number and the proportion of patients with one or more detected mutations in TSC2 gene in the total number of assigned group of patients have been determined.

**Keywords:** tuberous sclerosis complex, TSC1, TSC2, DGGE, DGGE with heteroduplex creation, PCR, PCR with heteroduplex creation, heteroduplex, mutation

**Number of pages:** 100

**Number of appendices:** 6

**Language:** Czech language

# **OBSAH**

<b>ČÁST TEORETICKÁ.....</b>	<b>8</b>
1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY TUBERÓZNÍ SKLERÓZY .....	9
1.1 Klinické aspekty TSC .....	9
1.1.1 Kůže .....	9
1.1.2 Srdce .....	11
1.1.3 CNS – centrální nervová soustava .....	11
1.1.4 Ledviny .....	12
1.1.5 Plíce .....	13
1.1.6 Oči.....	14
1.2 Histologické aspekty TSC .....	16
1.3 Genetické aspekty TSC.....	18
1.3.1 Buněčná úroveň TSC .....	18
1.3.2 Zodpovědné geny.....	18
1.3.2.1 Gen TSC1 (Tuberous sclerosis 1 ) a jeho produkt.....	18
1.3.2.2 Gen TSC2 (Tuberous sclerosis 2).....	19
1.3.3 Produkty genů TSC1 a TSC2.....	20
1.3.4 Problematika mutací v genech TSC1 a TSC2.....	22
1.3.4.1 Mutace v genu TSC1 .....	23
1.3.4.2 Mutace v genu TSC2 .....	24
2 Možnosti detekce mutací v zodpovědných genech.....	25
2.1 Metody vhodné pro detekci rozsáhlých delecí a genomových přestaveb .....	26
2.1.1 Southernova hybridizace.....	26
2.1.2 FISH - fluorescenční in situ hybridizace .....	26
2.1.3 MLPA - Multiplexová ligačně-dependentní amplifikace práb....	27
2.2 Metody vhodné pro odhalování bodových mutací a jiných drobných změn .....	28
2.2.1 SSCP – Polymorfismus konformace jednořetězců .....	28
2.2.2 PTT - Test zkrácení proteinu .....	29
2.2.3 HA (HDA) – heteroduplexová analýza.....	29
2.2.4 DHPLC - Denaturační vysoce účinná kapalinová chromatografie .....	30

2.2.5	DGGE - Denaturační gradientová gelová elektroforéza.....	31
2.2.6	TGGE – Teplotní gradientová gelová elektroforéza.....	32
2.2.7	HRM(HRMA) – Detekce mutací pomocí analýzy křivek tání ve vysokém rozlišení .....	32
2.2.8	Přímé sekvenování .....	33
<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>		<b>35</b>
3	ÚVOD K VLASTNÍMU ŘEŠENÍ PRÁCE.....	36
4	CÍLE PRÁCE.....	37
5	POUŽITÝ MATERIÁL.....	38
5.1	Přístroje a ostatní vybavení laboratoře.....	38
5.2	Reagencie a chemikálie .....	39
5.3	Složení roztoků .....	40
5.4	Složení elektroforetických gelů .....	41
6	METODY POUŽITÉ K VYPRACOVÁNÍ DÍLČÍCH ÚKOLŮ .....	43
6.1	PCR a PCR s tvorbou heteroduplexu - rozdíly v jejich průběhu .....	43
6.2	Analýza PCR produktů za použití DGGE .....	48
6.3	Sekvenování fragmentů DNA s pozitivním signálem v DGGE .....	50
6.3.1	Předsekvenační PCR.....	50
6.3.2	Post – PCR purifikace.....	51
6.3.3	Sekvenační PCR (Sangerova enzymová metoda).....	51
6.3.4	Post-sekvenační purifikace .....	53
7	VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ .....	54
7.1	Srovnání účinnosti metody DGGE po klasické PCR a DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu.....	54
7.2	Stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých typů mutací .....	59
7.3	Stanovení počtu odhalených mutací z celkového počtu všech mutací nacházejících se ve vyšetřovaném souboru pacientů.....	67
8	DISKUZE .....	70
9	ZÁVĚR .....	74
10	POUŽITÁ LITERATURA A INTERNETOVÉ ADRESY.....	75
11	PŘÍLOHY .....	89

**ČÁST**  
**TEORETICKÁ**



# **1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY TUBERÓZNÍ SKLERÓZY**

Komplex tuberózní sklerózy (TSC, epiloa, Bournevillova choroba) je genetickou chorobou, která je v lidské populaci autozomálně dominantně dědičná. Za samostatnou klinickou jednotku je tato choroba uznávána již přes 100 let. I když pro většinu lidské populace není tato choroba tak známá jako některá jiná současná a mnohem „populárnější“ onemocnění, je její prevalence poměrně vysoká. Odhaduje se přibližně na 1 : 10 000. Penetrace této choroby je v současnosti považována za 100%.

*(Gómez et al., 1999)*

## **1.1 Klinické aspekty TSC**

Charakteristickým projevem tohoto onemocnění je tvorba benigních (nezhoubných) nádorů – hamartomů v nejrůznějších orgánových systémech. Postižen tedy může být jakýkoliv orgán v lidském těle.

TSC je choroba s vysokou klinickou heterogenitou, proto i její expresivita je velmi variabilní.

Mezi pacienty postiženými TSC lze najít jak případy s velmi těžkými projevy choroby – mentální retardací a závažným orgánovým postižením, tak i případy pouze s lehkými kožními příznaky, které však nijak neohrožují život pacienta.

*(Gómez et al., 1999)*

Přehled nejčastěji se vyskytujících lézí:

### **1.1.1 Kůže**

Hypomelanotické skvrny (*viz. obr. č. 1,a*)

Jsou to nejfrekventovanější časně příznaky TSC (*Alper et al., 1983*). Jedná se o nepigmentované plošky kůže oválných, eliptických, okrouhlých a jiných tvarů o maximálních rozměrech 2 x 5 cm (*Ishibashi et Hori, 1990*). Lze je nalézt u 90 – 97 % pacientů s TSC a jejich výskyt je zde většinou vícečetný. Tyto skvrny se však vyskytují i u 0,8 % normální novorozenecké populace.

Jozwiak et al. ve své práci uvádí, že u 66 zkoumaných dětí (z celkového počtu 106) byly hypomelanotické skvrny dobře zřetelné již krátce po narození a u 20 dalších zkoumaných dětí se objevily do 1 měsíce jejich života (Jozwiak et al., 1998).

Dříve přítomnost těchto skvrn nebyla považována za znak patognomonický (znak charakteristický pro TSC) z toho důvodu, že je lze nalézt i u normální populace (Ishibashi et Hori, 1990).

#### Faciální angiofibromy (dříve též adenoma sebaceum) (viz. obr. č. 1,d)

Mají vzhled malých zarudlých výrůstků či uzlinek, které jsou překryty jemnou pokožkou. Zpravidla se nacházejí v obličejové části – často jsou symetricky rozsety po obou stranách nosu, lze je také nalézt na bradě nebo na dolním rtu. Výjimečně se mohou nacházet i na rtu horním (Ishibashi et Hori, 1990).

Dle práce Jozwiaka et al. byly faciální angiofibromy druhým nejčastěji se vyskytujícím znakem. Vyskytovaly se přibližně u 75 % zkoumaných pacientů (u 79 osob z celkového počtu 103) (Jozwiak et al., 1998).

#### Fibrózní plaky čela (viz. obr. č. 1,e)

Jsou také lokalizovány v obličejí. Jedná se vypouklé plošky jemné kůže, které mohou být žlutavě nebo až masově červeně zbarvené. Mohou pomalu růst před obdobím puberty nebo se zvětšovat v průběhu života (Gómez et al., 1999).

#### Unguální fibromy (viz. obr. č. 1,c)

Jedná se o drobné nádorky rostoucí v oblasti nehtů (okolo nich a pod nimi) na prstech rukou i nohou – na prstech nohou se však vyskytují častěji. Vyskytují se přibližně u 20 % pacientů s TSC – spíše u osob starších (častěji u žen než u mužů). (Ishibashi et Hori, 1990), (Ahlsén et al., 1994), (Jozwiak et al., 1998), (Webb et al., 1996)

#### Šagrénové skvrny (viz. obr. č. 1,b)

Mírně vystouplé útvary, hnědožluté až masově červené barvy, s hrbolatým povrchem, jež svou strukturou připomíná pomerančovou kůru.

Nejčastěji jsou lokalizovány v hrudní a bederní oblasti zad. Vyskytují se u 20 % pacientů s TSC (Ishibashi et Hori, 1990).

### 1.1.2 Srdce

Rhabdomyomy (viz. obr. č. 1,f)

Tyto útvary šedobílé barvy (*Ishibashi et Hori, 1990*) lze detekovat pomocí fetální echokardiografie již okolo 20. týdne gravidity (*Krapp M. et al., 1999*). Nalezeny byly u 47 – 67 % pacientů s TSC (*Webb et al., 1993*), (*Jozwiak et al., 1994*), (*Sanczak O. et al., 2005*). Jejich výskyt je obvykle vícečetný. Sice mohou být asociovány se srdeční arytmií plodu, ale ve většině případů se klinicky vůbec neprojeví (*Watson G.H., 1991*). Rhabdomyomy větších rozměrů (až několik cm) však mohou kromě arytmií způsobovat v srdci i různé obstrukce, které mohou vést až k úplnému selhání srdeční činnosti (*Ishibashi et Hori, 1990*).

Vytvořené rhabdomyomy pravděpodobně již dále nerostou (*Ishibashi et Hori, 1990*) a u většiny pacientů s TSC se jejich velikost, případně i počet, postupně snižuje do 4 let věku (*Webb D.W. et al., 1993*), (*Nir A. et al., 1995*).

Vznik rhabdomyomů a jejich následné postupné mizení může mít souvislost s přítomností transplacentárních maternálních gestačních hormonů. Hormonální změny pravděpodobně hrají roli i v období puberty, kdy přibližně u 4 % pacientů s TSC dochází znova k růstu či novotvorbě rhabdomyomů (*Jozwiak S. a kol., 2006*).

### 1.1.3 CNS – centrální nervová soustava

Mozková tkáň bývá postižená třemi druhy lézí:

- Kortikální tubery
- Subependymální noduly (SEN) (viz. obr. č. 1,h)
- Subependymální obrovskobuněčný astrocytom (SEGA) (viz. obr. č. 1,i)

U některých TSC pacientů lze detekovat všechny zde zmíněné mozkové léze, u jiných TSC pacientů nebyla nalezena žádná z nich.

Kortikální tubery a subependymální noduly se nacházejí u 70 % resp. 90 % pacientů s TSC (*Gómez et al., 1999*), subependymální obrovskobuněčné astrocytomy lze detekovat v 6 - 14 % případů (*Torres et al., 1998*).

Podle počtu, lokalizace, velikosti a růstu kortikálních tuberů a subependymálních nodulů lze odvodit závažnost postižení mozku. Zpravidla se však střední až těžká

mentální retardace a těžko kontrolovatelná epilepsie častěji projevuje u osob s větším počtem tuberů (*Goodman et al., 1997*), (*Hosoya et al., 1999*). Velikost a lokalizace tuberů dále negativně ovlivňuje i psychomotorický vývoj TSC pacientů (*Humphrey et al., 2004*).

TSC je velmi často provázena epilepsií, která postihuje 92 – 95 % TSC pacientů. První epileptické záchvaty, jejichž časný výskyt dále souvisí s opožděním vývoje, se mohou objevit již mezi 3. až 6. měsícem života. (*Wiederholt et al., 1985*), (*Jozwiak et al., 2000*). Přibližně 52 – 68 % epileptických pacientů s TSC je současně postiženo i mentální retardací (*Ahlsén et al., 1994*), (*Hunt et Lindenbaum, 1984*), (*Osborne et al., 1991*).

Dalším průvodním jevem TSC lézí mozku jsou kognitivní potíže. Autismus či jiné poruchy chování byly diagnostikovány u 25 - 50 % TSC pacientů (*Curatolo P. et al., 2004*).

Přibližně 10 % z celkové autistické populace trpící současně epilepsií je postiženo TSC (*Smalley, 1998*).

Sklony ke kognitivním potížím mají i TSC pacienti s normální inteligencí, kteří netrpí žádnou mentální retardací (*Harrison et al., 1999*). Kromě autismu je TSC velmi často provázena poruchami spánku, hyperaktivitou nebo agresivním chováním (*Gómez et al., 1999*).

#### **1.1.4 Ledviny**

Dvě formy lézí: renální cysty a renální angiomyolipomy, způsobují ledvinné komplikace u 40 – 80 % pacientů s TSC (*Zimmerhackl L.B. et al., 1994*), (*Ewalt et al., 1998*).

##### Renální cysty

Jsou podobné cystám choroby autozomálně dominantních polycystických ledvin. Při této chorobě dochází k rozsáhlým delecím v genu PKD1 (polycystic kidney disease – polycystická choroba ledvin), které mohou zasáhnout až do sousedního genu TSC2. Výsledkem těchto delecí pak je TSC/PKD fenotyp (syndrom sousedících genů). Renální cysty lze detekovat přibližně u 20 % TSC pacientů (*Brook-Carter et al., 1994*), (*Klymenova et al., 2001*). Jejich přítomnost se

z klinického hlediska projevuje hematurií, příležitostně proteinurií nebo bolestmi. Zvětšování cyst způsobuje kompresi funkčního parenchymu ledviny, což může vést až k jejímu úplnému selhání (*Ishibashi et Hori, 1990*).

#### Renální angiomyolipomy (AML)

Z celkového počtu nálezů angiomyolipomů je v asociaci s TSC přibližně 20 – 50 % z nich (*Steiner et al., 1993*), (*Hirasaki et al., 1999*). Z hlediska pacientů s TSC jsou angiomyolipomy přítomny přibližně u 70 %. Přítomnost angiomyolipomů se klinicky projevuje bolestí v oblasti bederní, nevolností, zvracením, horečkou nebo hematurií (*Ishibashi et Hori, 1990*).

Výskyt angiomyolipomů je často bilaterální. Na rozdíl od renálních cyst, angiomyolipomy nikdy nezmizí – spíše naopak – mají tendenci se pozvolna zvětšovat, čímž ohrožují život pacienta (i když se jedná o tumory benigní), protože jejich neustálý růst může způsobit náhlé vnitřní krvácení nebo porušit správnou funkci ledvin (*Steiner et al., 1993*), (*Ewalt et al., 1998*).

U pacientů s TSC je oproti normální populaci zvýšené riziko vzniku maligního angiomyolipomu a karcinomu renálních buněk. Maligními formami těchto tumorů bývá postiženo 0,5 – 3 % TSC pacientů (*Cook et al., 1996*), (*Al-Saleem et al., 1998*), (*Northrup H. et Au K.S., 2005*), (*Patel U. et al., 2005*).

### **1.1.5 Plíce**

#### Lymfangioleiomyomatóza (LAM)

Toto vzácné avšak závažné plicní onemocnění, které může v některých případech končit i smrtí pacientky, je jednou z chorob doprovázející TSC. Dochází při něm k proliferaci abnormálních buněk hladkých svalů v plicních lymfatických cévách, okolo cév, bronchů apod. (*viz. obr. č. 1,i*) Postiženy bývají výhradně ženy a to ve věkovém rozmezí 20 – 40 let. U TSC pacientek byla LAM v různých souborech prokázána

u 1 – 34 % z nich.

Klinicky se LAM může projevit dušností, zkráceným dechem, kašlem, dispneou, hemoptýzou, pneumothoraxem či chylothoraxem. (*Castro et al., 1995*), (*Vokurka et al., 2006*), (*Costello et al., 2000*)

Mimo jiné existuje i sporadická forma LAM, která je charakterizována ztrátou heterozygoty v lokusu TSC2. U 50 – 60 % všech pacientek se sporadickou LAM byly detekovány i renální angiomyolipomy. (*Carsillo et al., 2000*), (*Smolarek et al., 1998*), (*Astrinidis et al., 2000*), (*Costello et al., 2000*)

Z toho vyplývá, že gen TC2 se podílí na vzniku sporadické LAM. Příčinou sporadické LAM jsou pravděpodobně mutace tohoto genu až v somatických buňkách – tzv. somatický mozaicismus, proto nejspíš nebyl genetický přenos LAM dosud dokázán A protože se LAM vyskytuje výhradně u žen, vznikla zde domněnka o estrogenem regulované TSC signalizaci, která má vliv na migraci TSC2 abnormálních buněk (*Crino P.B. et al., 2006*, (*Yu et al., 2001*)).

### **1.1.6 Oči**

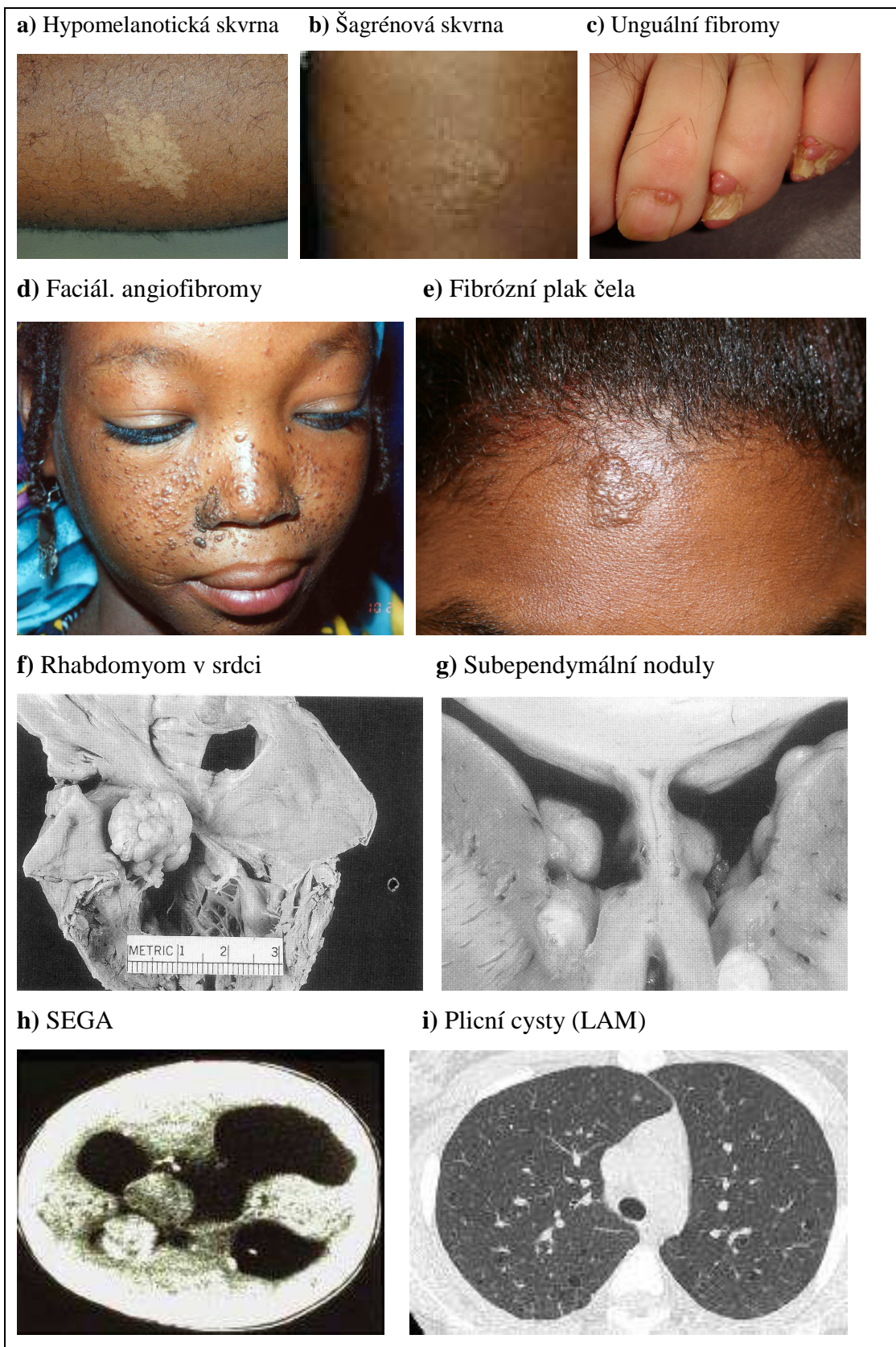
Tvorba achromatických skvrn či retinálních hamartomů může být rovněž projevem TSC. Retinální hamartomy byly nalezeny u 44 – 75 % TSC pacientů.

(*Rowley et al., 2001*), (*Northrup H. et Au K.S. 2005*).

Kromě zde zmíněných může být TSC lézemi postižená i jakýkoliv jiná orgánová soustava. Jisté symptomy TSC lézí bývají nalézány i v trávicím traktu či na žlázách s vnitřní sekrecí – viz. (*Gómez et al., 1999*) nebo (*Ishibashi et Hori, 1990*).

Nejčastějšími symptomy TSC jsou kožní léze, které lze najít asi u 96 % TSC pacientů, 90 % pacientů vykazuje symptomy nebo má přímo příznaky lezí mozku, 84 % pacientů trpí či trpělo záchvaty, zhruba u 60 % pacientů lze detekovat renální léze a téměř u 50 % pacientů byly nalezeny retinální hamartomy (*Gómez et al., 1999*).

**Obrázek č. 1: Přehled symptomů TSC**



(Gómez et al., 1999),(Franz et al.,2010), (Cohen et al., 2010),  
(<http://www.thachers.org/dermatology.htm>)

## **1.2 Histologické aspekty TSC**

Z histologického hlediska je TSC chorobou abnormálního buněčného růstu, jejich migrace, chybné diferenciaci a organizace buněk.

TSC léze se vytvářejí především v tkáních ektodermálního a mezodermálního původu. Tyto léze lze rozdělit na tři skupiny:

### **Hamarcie**

Jedná se o vývojovou vadu při růstu určitého orgánu, která může získat až charakter nádoru (hamartomu) (*Vokurka et al., 2006*). Hamarcie mohou být tvořeny buď jen chybně uspořádanými dysplastickými buňkami, které mohou být i nediferencované, nebo mohou být tvořeny kombinací tkání zdravých a tkání postižených. Nediferencované dysplastické buňky pak rostou ve srovnání s buňkami zdravými daleko pomaleji (*Gómez et al., 1999*), (*Johnson et al., 1991*).

### **Hamartomy**

Jsou benigní tumory tvořené skupinami neorganizovaných a nadměrně proliferujících dysplastických buněk (*Gómez et al., 1999*), (*Johnson et al., 1991*).

### **Hamartoblastomy**

Modifikací hamartomu se vytvoří hamartoblastom, který je sice benigní, ale vzácně tak mohou vzniknout i tumory maligní (*Gómez et al., 1999*).

Většina kožních lézí je tvořena hamartomatózní pojivovou tkání, ve které jsou často přítomny velké, pomalu se dělící dendritické buňky – tzv. N-buňky, které vznikají z primitivních prekurzorů gliových buněk a neuronů.

Výjimkou jsou hypomelanotické skvrny, jež jsou výsledkem redukce počtu, velikosti a pigmentace melanosomů.

Faciální angiofibromy jsou tvořeny vazivem obsahujícím větší množství cév – proto získávají narudlou barvu. (*Vokurka et al., 2006*), (*Johnson et al., 1991*), (*Ishibashi et Hori, 1990*)



Rhabdomyomy jsou šedobílé nekontraktilní tumory tvořené zvětšenými myocyty vyplněnými glykogenem, které jsou svou strukturou podobné Purkyňovým buňkám (*Ishibashi et Hori, 1990*).

Kortikální tubery jsou kombinací zvětšených buněk neznámého původu a chybně uspořádaných neuronů a gliových buněk.

Subependymální noduly (SEN) a subependymální obrovskobuněčné astrocytomy (SEGA) jsou tvořeny neuspořádanými hypertrofickými neurony a zvětšenými astrocyty.

Identickou histologickou strukturu, jako mají SEN, lze nalézt i u retinálních hamartomů. Ty však mohou, na rozdíl od SEN, kalcifikovat (*Ishibashi et Hori, 1990*).

Renální cysty jsou histologicky velmi podobné cystám choroby autozomálně dominantních polycystických ledvin. Vytvářejí hypertrofickými a hyperplastickými eosinofilními buňkami vystlané dutinky, které jsou vyplněny tekutinou. Takto dojde k obstrukci lumina, což je pravděpodobnou příčinou vzniku renálních cyst (*Ishibashi et Hori, 1990*).

Renální angiomyolipomy (AML) jsou tvořeny kombinací neuspořádané dysplastické vaskulární tkáně, hladké svaloviny a tkáně tukové. Často se zde nacházejí i N-buňky (*Torres et al., 1994*).

### **1.3 Genetické aspekty TSC**

TSC je velmi heterogenním onemocněním i po genetické stránce. Je způsobeno vznikem mutací v genech TSC1 a TSC2. Kauzální mutace se mohou objevit ve kterékoliv části kódující sekvence obou genů – nelze tedy v těchto genech určit tzv. „horké místo“, což detekci mutací rozhodně neulehčuje (*Databáze Chromium, 2010*).

TSC se může projevit v jakémkoliv věku. Toto onemocnění postihuje všechny lidské rasy s rovnoměrným zastoupením postižených mužů i žen. Výjimku tvoří pouze LAM, které je častěji detekována u žen.

Přestože je TSC – co se týče buněčné úrovně – recesivní, je děděna jako znak autozomálně dominantní. To je způsobeno téměř 100% penetrací této choroby.

(*Gómez et al., 1999*),

#### **1.3.1 Buněčná úroveň TSC**

V defektních buňkách byl objeven protein o molekulární hmotnosti 55 kDa, který je významnou složkou intermediálních filament. Tento protein je post-translačně fosforylován, což pozměňuje asociace ostatních intermediálních filament s buněčnými organelami a dalšími buněčnými strukturami. Výsledkem tohoto jevu je, že se chromosomy defektních buněk v metafázi nevyrovnají do charakteristické metafázní destičky, ale budou v buňce rozmístěny chaoticky. I takto uspořádané chromosomy se však nakonec - sice s velkým opožděním - rozdělí do dvou nebo i více dceřiných buněk, které jsou často nestejně velké. V některých případech k rozdělení chromosomů dojít nemusí, pak vznikají mnohojaderné gigantické buňky (*Ishibashi et Hori, 1990*).

#### **1.3.2 Zodpovědné geny**

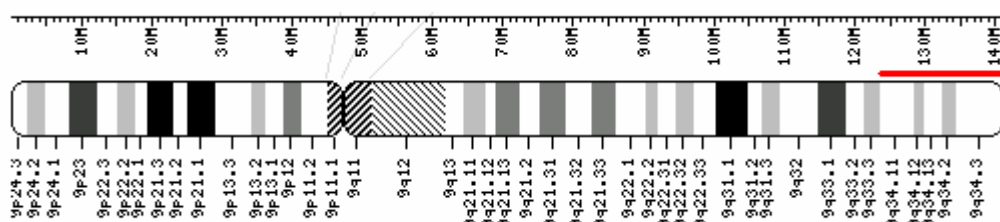
Za normálních okolností mají TSC1 i TSC2 funkci tumor-supresorových genů.

##### ***1.3.2.1 Gen TSC1 (Tuberous sclerosis 1) a jeho produkt***

Tento gen o přibližné velikosti 50 kb se podařilo identifikovat v roce 1997 na 9. chromozómu - v oblasti 9q34. Je tvořen 23 exony. První 2 exony však nejsou

kódující – jsou součástí tzv. 5'UTR (untranslated region). Zbýlých 21 exonů kóduje protein o molekulové hmotnosti 130 kDa - **hamartin**, který je tvořen 1164 aminokyselinami (*van Slegtenhorst et al., 1997*). Svou strukturou se hamartin nepochybá žádnému z dosud známých proteinů. Určitá homologie byla nalezena pouze u organismu *Schizosaccharomyces pombe* (*Sampson, 2003*).

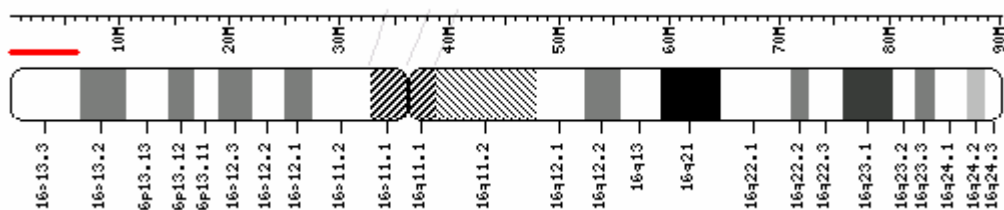
**Obrázek č. 2:** Ideogram 9. chromosomu, oblast genu TSC1 je zvýrazněna červeně (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)



### 1.3.2.2 Gen TSC2 (*Tuberous sclerosis 2*)

Gen TSC2 byl úspěšně klonován již v roce 1993. Je lokalizován na 16. chromozómu – v oblasti 16p 13.3, mezi geny PKD1 (polycystic kidney disease) a OCTS3. Na tomto genu dlouhém 5474 pb se nachází 41 exonů, z nichž však exon 25, první kodon exonu 26 a exon 31 jsou alternativně sestřihovány. Produktem genu TSC2 je protein **tuberin** (*The European Chromosome 16 TSC Consortium, 1993*), (*Xu et al., 1995*).

**Obrázek č. 3:** Ideogram 16. chromosomu, oblast genu TSC2 je zvýrazněna červeně (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)



### 1.3.3 Produkty genů TSC1 a TSC2

Oba zmíněné proteiny jsou součástí buněčné cytoplazmy, kde se soustřeďují převážně v oblasti centrozomu, na jehož stavbě se pravděpodobně podílejí. V obzvláště vysokých koncentracích lze tyto proteiny nalézt v srdečních a kosterních svalech, fibroblastech, v cerebrálních neuronech a gliálních buňkách, nebo také v renálních močotvorných a sběrných tubulech (*van Slegtenhorst et al., 1997*), (*The European Chromosome 16 TSC Consortium, 1993*), (*Astrinidis et al., 2006*).

#### **Hamartin**

Hamartin se v buněčné cytoplazmě vyskytuje během celého buněčného cyklu. Jeho koncentrace se však v G<sub>0</sub> fázi zvyšuje, což negativně ovlivňuje buněčnou proliferaci. Hamartin je tedy pravděpodobným růstovým inhibitorem buněk, který ve své aktivní formě ovlivňuje buněčnou proliferaci prostřednictvím deregulace G<sub>1</sub> fáze (*Miloloza et al., 2000*).

Hamartin může být součástí ERM (ezrin-moesin-radixin) aktinového systému, nebo se může vázat na kinázy regulující buněčné dělení, nebo na malé proteiny ze skupiny Rho, které regulují buněčnou soudržnost. Inhibice hamartinu tedy vede k porušení buněčné soudržnosti, což může výrazně přispět ke vzniku tumoru (*Krymskaya, 2003*), (*Northrup et Au., 2005*), (*Lamb et al., 2000*).

#### **Tuberin**

Tuberin je z evolučního hlediska velmi konzervativní molekulou, která je v lidském těle dále alternativně sestřihována, čímž dává vznik dalším minimálně šesti transkriptům (*Northrup et Au., 2005*).

V blízkosti jeho C-konce se nachází oblast homologická GTPáze. GTPáza je aktivační protein, který je kódován 35. – 39. exonem genu TSC2. Hlavní funkcí GTPázy je aktivace G – proteinů RAP1 a RAB5 (Rabaptin-5). RAP1 je signální molekulou, která pozitivně ovlivňuje mitogenezi buňky (*The European Chromosome 16 TSC Consortium, 1993*), (*Sancak et al., 2005*), (*Wienecke et al., 1995*).

Na opačné straně tuberinu – u jeho N-konce jsou lokalizovány dvě helikální coiled-coil domény, které jsou nezbytné pro spojení s hamartinem a vytvoření tak funkčního komplexu (*van Slegtenhorst et al., 1998*).

Tuberin dále ovlivňuje i činnost CDK (cyklin dependentní kinázy) a to prostřednictvím regulace buněčného cyklu, kde inhibuje přechod buňky z fáze G<sub>1</sub> do fáze S. Namísto toho však podporuje přechod do fáze G<sub>0</sub> (Soucek et al., 1997).

### **Interakce tuberinu s hamartinem**

Dosud je známo 30 proteinů, které tvoří interakce s produkty obou TSC genů. Z toho 22 proteinů jako je např. Rap1a, Rabaptin-5, VDR (vitamín D receptor), ampk (activated protein kinase) a další...reaguje pouze s tuberinem, dalších 5 proteinů (ezrin, moesin, radixin, merlin a NF-L – neurofilament-light chain) interaguje jen s hamartinem. Zbylé 3 proteiny CDK1 – cyklin dependentní kináza 1, cyklín B1 a mTor – mammalian target of rapamycin vytváří komplexy obsahující hamartin i tuberin (Rosner et al., 2004). Takové komplexy, kterých se účastní oba zmíněné TSC proteiny vznikají mnohem snáze, než komplexy obsahující pouze jeden z těchto TSC produktů (van Slegtenhorst et al., 1998).

Kromě toho mohou hamartin s tuberinem spolu vzájemně vytvářet predominantně cytosolický, funkční heterodimerický komplex, který lze detekovat ve všech fázích buněčného cyklu. Tuberin má zde funkci chaperonu, který zabraňuje homodimerické autoagregaci hamartinu. Vznik tohoto komplexu mimo jiné chrání tuberin před navázáním ubiquitinu. Spojení obou proteinů je umožněno prostřednictvím coiled-coil domény a je regulováno fosforylací tuberinu pomocí GSK3 (Glycogen synthase kinase 3-alpha) zbytky serinu a tyrosinu. Nedostatečná či defektní fosforylace tuberinu (např. onkogenem WNT, který inhibuje GSK3) brání vzniku hamartin-tuberinového funkčního komplexu a tím i ruší jeho tumor supresorovou funkci (van Slegtenhorst et al., 1998), (Nellist et al., 1999), (Aicher et al., 2001), (Hengstschläger et Rosner, 2003), (Inoki et al., 2006).

Funkční komplex hamartinu a tuberinu inaktivuje v buňce G-protein Rheb (Ras homolog enriched in brain) jeho hydrolýzou z GTP formy na formu GDP a inhibuje cílové místo na mTOR (mammalian target of rapamycin) pro navázání rapamycinu (Tee et al., 2002), (Roux. et al., 2004), (Astrinidis et Henske, 2005).

Kináza mTOR sdružuje signály týkající se množství energie a živin v buňce a signály od růstových faktorů (mitogenů). Vytváří tak dva funkčně odlišné komplexy. TOR komplex 1 (TORC1) reguluje buněčný růst a translaci v buňce a je citlivý na rapamycin. TOR komplex 2 (TORC2) reguluje růst a morfologii buňky, na rapamycin senzitivní není. (Yang et al., 2006).

Za normálních okolností je tedy Rheb inaktivní a rapamycin prostřednictvím dalších signálních molekul inhibuje fosforylaci mTOR a S6 kinázy 1 (S6K1).

Pokud je však porušena tumor-supresorová funkce komplexu hamartinu a tuberinu, dochází ke zvýšené expresi Rheb v aktivní formě a následné nadměrné fosforylaci mTOR a S6K1, což může vést ke ztrátě kontroly nad buněčným růstem a proliferací a následně i k tvorbě tumoru (*Astrinidis et Henske, 2005*).

#### **1.3.4 Problematika mutací v genech TSC1 a TSC2**

U TSC lze rozlišit dva základní typy mutací – dle doby jejich vzniku:

##### Mutace germinální

Původcem mutace je gameta jednoho z rodičů. Mutace se pak nachází ve všech buňkách (germinálních i somatických) tohoto potomka, ten však nemusí trpět klinickými příznaky choroby TSC.

##### Mutace somatické

K mutaci nedochází v buňkách germinálních, ale později ve vývoji jedince pouze v určité linii buněk somatických.

##### **Mozaicismus**

Ve většině případů je způsoben mutací pouze v určité linii somatických buněk. Tělo takového člověka tedy obsahuje jak buňky zdravé, tak část buněk s mutací. Přítomnost tohoto jevu se u většiny jedinců klinicky neprojeví. Pokud je však mutací zasaženo přibližně 5 – 50 % tělesných buněk, objeví se příznaky choroby pouze v omezené míře, nejčastěji vznikem faciálních angiofibromů, renálních angiofibromů atd. Místo a typ manifestace příznaku choroby je závislé na lokalizaci buněk nesoucích mutaci.

Vzácněji se vyskytuje germinální mozaicismus, kdy je mutací postižena část buněk podílejících se na tvorbě vajíček a spermií. Takový jedinec je klinicky bezpříznakový, všechny jeho somatické buňky jsou bez mutace, ale mutaci může přenést na své potomky prostřednictvím mutované varianty pohlavních buněk (*Gómez et al., 1999*).

Mozaicismus se vyskytuje přibližně u 10 % TSC pacientů (*Verhoef et al., 1999*).

## **Ztráta heterozygoty - LOH (loss of heterozygosity)**

„*Knudsonův model druhého zásahu*“

V tomto případě mutace vzniká již na germinální úrovni, kde dojde k poškození jedné z alel alelového páru zodpovědného genu. Tato abnormalita bude tedy přítomna i ve všech somatických buňkách. I přes tuto skutečnost většina takto postižených buněk proliferuje a diferencuje se zcela normálně jako zdravé buňky. Později může dojít ještě i k mutaci zdravé alely postiženého alelového páru v některé ze somatických buněk (tzv. druhý zásah), což může spustit tvorbu tumoru. Dle této teorie je mutace jedné alely alelového páru zodpovědného genu pravděpodobně vrozenou predispozicí k tvorbě tumoru. Tvorbu tumoru však zapříčiní až vznik následné mutace i druhé alely alelového páru v somatických buňkách.

Častěji je výskyt LOH detekován ve spojení s genem TSC2 (*Gómez et al., 1999*).

### **1.3.4.1 Mutace v genu TSC1**

Společným znakem všech dosud detekovaných mutací v tomto genu je zkrácení proteinového řetězce.

Nejčastěji dochází v TSC1 genu k různým bodovým mutacím, kde je jeden nukleotid zaměněn za nukleotid jiný. Ve většině případů se jedná o mutace nonsense, které vytvoří z postiženého kodonu kodon terminační, drobné delece, inserce několika málo nukleotidů nebo mutace sestřihové. Missence mutace, kde vlivem záměny nukleotidů dojde i k záměně aminokyseliny v postiženém kodonu a tím pádem i ke změně jeho smyslu, se vyskytují jen velmi zřídka. Podobně i výskyt rozsáhlejších genomových delecí nebo přestaveb v genu TSC1 je naprostou výjimkou (*viz. tabulka č. 1*) (*Gómez et al., 1999*), (*Vokurka et al., 2006*), (*Cheadle et al., 2000*).

Mutace může postihnout kterýkoliv z exonů genu TSC1. Největší frekvence mutací byla zaznamenána v exonu 15, dále v exonech 17 a 18. Tento výsledek může být zapříčiněn tím, že exon 15 je oproti ostatním TSC1 exonům relativně rozsáhlý. Naopak v exonech 3, 22 a 23 nebyla dosud nalezena žádná z mutací (*Gómez et al., 1999*), (*Sancak et al., 2005*).

### 1.3.4.2 Mutace v genu TSC2

Narozdíl od genu TSC1 jsou pro gen TSC2 charakteristické rozsáhlé delece a genomové přestavby. Kromě toho se v tomto genu běžně vyskytují i menší delece nebo inserce, mutace sestřihové, či mutace bodové – především typu missense (viz. tabulka č. 1). Při mutacích v tomto genu dochází také spíše ke zkracování proteinových molekul (Gómez et al., 1999).

Dosud nebylo potvrzeno žádné „horké místo“ tohoto genu, kde by byla větší pravděpodobnost vzniku mutací. V genu TSC2 jsou oproti genu TSC1 mutace detekovány daleko častěji – a to přibližně v poměru 3,4 : 1 (Sancak et al., 2005). Možnou příčinou může být skutečnost, že gen TSC2 je oproti genu TSC1 rozsáhlejší (The European Chromosome 16 TSC Consortium, 1993).

**Tabulka č. 1:** Zastoupení jednotlivých typů mutací v genech TSC1 a TSC2

Typ mutace	Gen TSC1	Gen TSC2
Rozsáhlé delece a přestavby	1 - 2 %	1 - 18 %
Drobné delece a inserce	45 - 59 %	20 - 34 %
Missence mutace	0 - 1 %	19 - 27 %
Nonsense mutace	33 - 45 %	15 - 24 %
Sestřihové mutace	7 - 9 %	12 - 15 %
Celkový počet mutací	328 (100 %)	1509 (100 %)

(Jones et al., 1997), (Mayer et al. 1999), (Cheadle et al., 2000), (Dabora et al. 2001), (Au et al., 2004), (Sancak et al., 2005), (Rendtorff et al., 2005), (Hung et al., 2006), (Choi et al., 2006), (Au et al., 2007), (Kozłowski et al., 2007) a (Sasongko et al., 2008)



## **2 Možnosti detekce mutací v zodpovědných genech**

Mutace vznikající v genech TSC1 a TSC2 jsou natolik variabilní, že není možné vybrat jen jednu metodu, která by byla schopna zachytit vše. Proto je pro analýzu mutací v těchto genech nutné používat detekčních metod více, protože každá z nich dokáže spolehlivě zachytit jiný typ vzniklé abnormality.

Jedním z nejdůležitějších kritérií pro výběr vhodné detekční metody je velikost očekávané abnormality. Podle tohoto hlediska lze dostupné detekční metody rozdělit do dvou skupin:

### 1. Metody vhodné pro detekci rozsáhlých delecí a genomových přestaveb

- Southernova hybridizace
- FISH
- MLPA

### 2. Metody vhodné pro odhalování bodových mutací a jiných drobných změn

- SSCP
- PTT
- Heteroduplexová analýza
- DHPLC
- DGGE
- TGGE
- HRM
- Přímé sekvencování

Detekčních metod, kterými lze analyzovat vzniklé změny ve struktuře DNA v nejrůznějších genech je samozřejmě daleko více. V tomto přehledu jsou však uvedeny pouze metody nejčastěji užívané k vyšetřování genů TSC1 a TSC2.

*(Vrtěl R., 2010, pers. comm.)*

## **2.1 Metody vhodné pro detekci rozsáhlých delecí a genomových přestaveb**

### **2.1.1 Southernova hybridizace**

#### **(Southern blotting)**

Vzorky DNA jsou nejprve rozštěpeny vhodnou endonukleázou a vzniklé DNA fragmenty jsou pak pomocí elektroforézy na agarózovém gelu rozděleny dle jejich velikosti. Na svrchní část gelu je přiložena membrána z nitrocelulóзовého nebo nylonového materiálu, která obsahuje fluorescenčně nebo radioaktivně značené sondy s komplementární sekvencí k vyšetřovanému úseku DNA. Na základě vztlínání jsou fragmenty DNA přeneseny na membránu, kde hybridizují s komplementárními sondami. K detekci výsledků se většinou používá autoradiografie (*Šmarda et al., 2005*).

Southernova hybridizace je vhodná k odhalování rozsáhlejších přestaveb či delecí (jako je např. TSC2-PKD1 syndrom), které však tvoří přibližně jen 6 % ze všech detekovatelných abnormalit v těchto genech. Rozsáhlé delece a přestavby se sice nacházejí převážně v genu TSC2, ale výjimečně je lze detekovat i v genu TSC1. S pomocí podrobné mapy restričních míst analyzovaných genů je možné touto metodou i velmi detailně popsat nalezenou přestavbu (*Sampson et al., 1997*), (*Jones et al., 1999*), (*Kozłowski et al., 2007*), (*Wang et al., 1998*),

Kromě toho je tato metoda schopna detekovat i výskyt mozaicismu u relativně bezpříznakových pacientů (*Verhoef et al., 1999*).

Nevýhodou této metody je její časová náročnost (*Vrtěl et al., 2008*).

### **2.1.2 FISH - fluorescenční in situ hybridizace**

#### **(Fluorescent in situ hybridization)**

FISH je cytogenetická metoda, kterou je možné odhalit výraznější změny ve stavbě jednotlivých chromozomů, či změny v celkovém počtu chromozomů v jednom genomu.

Buňky obsahující analyzovanou DNA jsou fixovány na mikroskopickém skle, kde probíhá hybridizace vybraných úseků DNA s komplementárními sekvencemi fluorochromy značených sond. Lze takto barvit buď celé chromozómy nebo jen jejich části. Vyhodnocení vzorků probíhá pod fluorescenčním mikroskopem.

Výhodou metody je, že je možné v jednom vzorku pozorovat najednou až několik desítek různě barevně označených sekvencí (Rédei, 2008).

Vzhledem k tomu, že tato metoda je schopna rozlišovat úseky DNA o délce přibližně 500 000 – 10 000 000 nukleotidů, je vhodná (stejně jako Southernova hybridizace) k detekci TSC2-PKD1 syndromu. (Sampson *et al.*, 1997), (Rédei, 2008) Tato metoda byla dále použita k analýze neoplastických buněk u LAM pacientek, nebo také k určení poměru buněk zdravých a buněk obsahujících mutaci v případě výskytu mozaiky (Crooks *et al.*, 2004), (Vrtěl, 2007).

### **2.1.3 MLPA - Multiplexová ligačně-dependentní amplifikace prób**

#### **(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)**

Tato metoda byla původně vyvinuta pro odhalování bodových mutací. Dnes je však hojně používána především k detekci větších genomových delecí nebo duplikací. V jednom vzorku lze vyšetřovat až 50 různých lokusů. Každá cílová sekvence hybridizuje s dvojicí komplementárních prób, které jsou dále spojeny ligační reakcí. Následuje amplifikace všech cílových sekvencí jediným univerzálním párem primerů, při které vznikají různě dlouhé amplikony. Ty jsou separovány pomocí kapilární elektroforézy. Rozdíl ve výšce píku analyzovaného vzorku a negativní kontroly znamená rozdílný počet kopií analyzované sekvence v obou vzorcích. To je způsobeno přítomností delecí či duplikací cílové sekvence v analyzovaném vzorku (Schouten *et al.*, 2002), ([www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com)).

MLPA je relativně jednoduchou a na vybavení laboratoře nenáročnou metodou, jejíž výsledky jsou známy již po 24 hodinách. Ve srovnání se Southernovou hybridizací je MLPA rychlejší a citlivější metodou, protože je schopna zachytit i drobnější delecce. Díky této citlivosti byly pomocí MLPA zachyceny i mozaiky genu TSC2, které obsahovaly 34 – 62 % mutovaných buněk ([www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com)), (Kozłowski *et al.*, 2007), (Vrtěl *et al.*, 2008). V kombinaci s metodou DGGE lze odhalit kauzální mutace až u 78 % vyšetřovaných TSC pacientů (Rendtorff *et al.*, 2005).

## **2.2 Metody vhodné pro odhalování bodových mutací a jiných drobných změn**

Bodové mutace a jiné drobné změny vznikají v genech TSC1 a TSC2 daleko častěji než rozsáhlé delece a přestavby. Jejich analýza je důležitá nejen proto, že tvoří většinu detekovatelných změn, ale především proto, že i drobná záměna dvou nukleotidů může způsobit kauzální mutaci (*Vrtěl R., 2010, pers. comm.*).

### **2.2.1 SSCP – Polymorfismus konformace jednořetězců**

#### **(Single Strand Conformational Polymorphism)**

Tato metoda je schopna odhalovat drobné změny v krátkých úsecích DNA, proto je vhodná hlavně k vyhledávání polymorfismů - sekvenčních rozdílů mezi různými alelami TSC genů, jež se mezi sebou liší např. jen jedinou bází. Analyzované fragmenty DNA by měly být dlouhé maximálně 300 – 400 bp. Pokud jsou delší, je nutné je naštěpit vhodnými restrikcčními endonukleázami.

Fragmenty analyzované DNA, jež byly připraveny pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce), jsou dále podrobeny denaturaci za použití formamidu nebo vysoké teploty. Vzniklé jednořetězcové molekuly DNA jsou separovány elektroforézou v nedenaturačním polyakrylamidovém gelu (PAGE), který se před vizualizací obarví stříbrem.

Základem této metody je, že jednořetězcová DNA zaujímá v závislosti na své primární struktuře určitou prostorovou konformaci. Pokud dojde ke změně v řetězci DNA např. i v jen jediné bází, vede to i ke změně prostorové konformace této molekuly, což značně ovlivní rychlost jejího pohybu v nedenaturačním polyakrylamidovém gelu a lze ji tak snadno rozeznat dle odlišné polohy v gelu.

Aby byla citlivost metody dostatečná, je vhodné provádět elektroforetickou separaci ve dvou odlišných teplotách (např. 5°C a 20°C) (*Vrtěl, 2007*), (*Šmarda et al., 2005*).

I když je SSCP schopná odhalit kauzální mutaci přibližně u 61 % vyšetřovaných pacientů, je dnes spíše nahrazována metodou DGGE (*Jones et al., 2000*), (*Feng et al., 2003*), (*Vrtěl et al., 2008*).

## 2.2.2 PTT - Test zkrácení proteinu

### (Protein Truncation Test)

Tato metoda byla vyvinuta v roce 1993 pro odhalování bodových mutací, které vedou k předčasnému ukončení translace a tím pádem i ke zkrácení proteinového řetězce. Na rozdíl od ostatních zde zmíněných metod neprobíhá detekce mutací na úrovni DNA, ale až na úrovni proteinů (*Průša et al., 1998*), (*Roest et al., 1993*).

Vybraný úsek DNA je nejprve amplifikován pomocí RT-PCR (real – time PCR), následuje jeho transkripce do RNA a translace do molekuly proteinu. Takto získané proteiny jsou podrobeny separaci na SDS polyakrylamidovém gelu dle jejich molekulové hmotnosti. Detekce jednotlivých bandů je možná až po obarvení gelu stříbrem. Celá tato metoda (bez přípravy PCR produktů) trvá přibližně 6 hodin – je tedy relativně rychlá a kromě toho i poměrně levná. Další nespornou výhodou je, že touto metodou lze analyzovat i poměrně dlouhé fragmenty DNA o délce 2 – 3 kb (*Průša et al., 1998*), (*Roest et al., 1993*), (*Lim et al., 2010*).

V rámci vyšetřování TSC genů je vhodná především pro screening genu TSC1, protože většina zde vzniklých mutací vede ke zkrácení molekuly hamartinu.

Omezením metody je, že nedokáže zachytit polymorfismy, záměnové mutace, mutace, které ovlivňují množství či stabilitu mutované mRNA nebo *in frame* mutace, jež nemění čtecí rámeček. PTT může naprosto selhat v případě, dojde-li k rozsáhlejší inzerci nebo translokaci úseku DNA, kde by se za normálních okolností navázal primer (*Hogervorst et al., 1997*), (*Ozcelik et al., 1996*), (*Bénit et al., 1999*). I přes tato omezení lze touto metodou nalézt mutace u 52 % vyšetřovaných pacientů (*Mayer et al., 1999*).

## 2.2.3 HA (HDA) – heteroduplexová analýza

### (Heteroduplex analysis)

Jedná se o velmi jednoduchou, finančně nenáročnou a zároveň citlivou metodu, která je schopna zachytit i sekvenční změnu týkající se pouze jednoho nukleotidu. Vzorky analyzované DNA jsou nejprve podrobeny denaturaci (zpravidla při 95°C). Při následném pozvolném snižování teploty dochází k opětovné renaturaci vláken DNA. Toto pozvolné snižování teploty způsobí, že spolu hybridizují nejen vlákna zcela komplementární (vzn. homoduplex), ale i vlákna vzájemně komplementární jen zčásti - jedno z nich tedy obsahuje hledanou změnu v sekvenci (vzn.

heteroduplex). V místě nekomplementarity, se tedy buď vazba mezi oběma bázemi nevytvoří, nebo vznikne smyčka. Díky této chybějící vazbě mají heteroduplexy rozdílnou teplotu tání, což vede i k rozdílné pohyblivosti obou molekul v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Detekce separovaných fragmentů analyzované DNA je možná po obarvení gelu stříbrem nebo ethidiumbromidem (*Průša et al., 1998*), (*Vokurka et al., 2006*), (*Hass et al., 2000*). Hass (2000) ve své práci uvádí, že v porovnání s metodou TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) je HA mnohem citlivější metodou pro odhalování posunových delecí a inzercí. Účinnost této metody se pohybuje okolo 58 % (*Jones et al., 2000*).

#### **2.2.4 DHPLC - Denaturační vysoce účinná kapalinová chromatografie (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)**

DHPLC je velmi citlivou metodou, která je schopna odhalit i jednonukleotidovou sekvenční změnu, proto je vhodná k odhalování nejrůznějších bodových mutací, drobných delecí a inzercí v obou TSC genech (*Jones et al., 2000*).

Požadovaný úsek DNA je nejprve amplifikován pomocí PCR. Takto získané PCR produkty jsou nejprve podrobeny denaturaci a následně pozvolné renaturaci, kdy kromě původních homoduplexů vznikají i heteroduplexy. K separaci jednotlivých vzorků se používá kapalinová chromatografie, jež je založena na skutečnosti, že vzniklé heteroduplexy mají nižší teplotu tání a jsou tedy z kolonky eluovány dříve než původní homoduplexy (*Jones et al., 2000*).

Záchytnost mutací v obou TSC genech touto metodou je uváděna různými autory v rozsahu 68 – 83 % (*Jones et al., 2000*), (*Hung et al., 2006*), (*Dabora et al., 2001*). Díky poměrně velké citlivosti je DHPLC schopna odhalit i mozaicismus, který obsahuje méně než 10 % mutovaných buněk ve tkáni. Jedinou nevýhodou této metody je její vyšší pořizovací cena (*Jones et al., 2000*), (*Jones et al., 2001*).

## 2.2.5 DGGE - Denaturační gradientová gelová elektroforéza

### (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)

DGGE má stejně jako DHPLC velmi vysokou citlivost, proto je vhodná pro odhalování drobných delecí nebo inzercí a různých bodových mutací, kde je schopna rozlišit i změnu pouze v jednom z nukleotidů.

Vyšetřované úseky DNA je nejprve nutné amplifikovat. Takto získané PCR produkty jsou separovány v polyakrylamidovém gelu s denaturačním gradientem, vytvořeným zvyšující se koncentrací močoviny nebo formamidu, na základě jejich rozdílné teploty tání, jež je přímo závislá na počtu vodíkových můstků mezi oběma DNA vlákny. Analyzované dvouřetězcové molekuly DNA migrují polyakrylamidovým gelem směrem ke konci se zvyšující se koncentrací denaturačních látek. V místě, kde dojde k denuraci takového dvojvlákna se pohyb DNA molekuly zastaví. K úplnému rozdělení obou řetězců však nikdy nedojde díky přítomnosti tzv. GC – svorky (GC – clampu), což je vlákno DNA obsahující zpravidla 40 – 60 guaninů a cytosinů na jednom z konců analyzované molekuly DNA. Vizualizace výsledků se provádí (po obarvení gelu stříbrem nebo častěji ethidiumbromidem) pod UV – lampou, kde se každá abnormalita v sekvenci analyzovaného úseku DNA projeví vytvořením více než jednoho bandu (*Šmarda et al., 2005*), (*Průša et al., 1998*).

Citlivost metody je možné ještě zvýšit, zařazením tvorby heteroduplexu, jež sestává z denurace a pozvolné renaturace vláken analyzované DNA v závěru PCR, která samotné DGGE předchází. Díky této úpravě lze detekovat i záměny nukleotidů se stejným počtem vodíkových vazeb, které by byly za původních podmínek DGGE neodhalitelné (*Vrtěl, 2007*).

I bez této úpravy by tato metoda při optimálně stanovených podmínkách mohla být schopná zachytit 95 - 96 % všech abnormalit v analyzované DNA, což je srovnatelné s metodou DHPLC. Oproti DHPLC je však její pořizovací cena daleko nižší. Dále je metoda DGGE schopna zachytit i mozaikový výskyt mutací. Dle výzkumu provedeného ve FN v Olomouci pro detekci takového vzorku pravděpodobně postačuje přibližně 15 - 30% mutovaných buněk ve tkáni oproti metodě přímého sekvencování, kde byla mozaika odhalena až při 75 % mutovaných buněk ve tkáni (*Dabora et al., 1998*), (*Vrtěl, 2007*), (*Smutná, 2009*), (*Vrtěl et al., 2008*).

## **2.2.6 TGGE – Teplotní gradientová gelová elektroforéza**

### **(Temperature Gradient Gel Electrophoresis)**

TGGE je v podstatě obdobou DGGE s tím rozdílem, že požadovaný gradient, který zde ovlivňuje hybnost analyzovaných fragmentů DNA, namísto denaturačního činidla tvoří teplota, jež se směrem ke konci polyakrylamidového gelu pozvolna zvyšuje. Kratší vlákna analyzované DNA (zpravidla s menším počtem vodíkových vazeb) tedy denaturují mnohem dříve, než vlákna delší (s větším počtem vodíkových můstků) (*Hass et al., 2000*).

Hass (2000) ve své práci uvádí, že kombinace HA a TGGE je rychlou a stejně jako DHPLC a DGGE i citlivou metodou, kterou lze detekovat všechny typy drobných změn v TSC genech. Ve srovnání s DGGE a DHPLC je však tato metoda schopna analyzovat i fragmenty DNA delší než 300bp. Jednou z neposledních výhod oproti DGGE a DHPLC je i její nižší pořizovací cena (*Hass et al., 2000*).

## **2.2.7 HRM(HRMA) – Detekce mutací pomocí analýzy křivek tání**

### **ve vysokém rozlišení**

#### **(High-resolution DNA melting analysis)**

HRM je o něco mladší alternativní metodou k DGGE, kterou dnes na některých pracovištích nahrazuje. Podobně jako u DGGE je i u HRM schopnost detekce změn ve struktuře DNA založena na rozdílných teplotách tání analyzovaných fragmentů DNA. HRM je však schopna oproti DGGE podat o průběhu denaturace analyzovaných molekul mnohem podrobnější informace (*Tindall et al., 2009*), (<http://hrm.gene-quantification.info>).

Vzorky DNA je nejprve nutné amplifikovat buď pomocí RT-PCR (real – time PCR) nebo pomocí Rapid-Cycle PCR, která ve srovnání s RT-PCR není tak náročná na vybavení a může trvat méně než 15 minut (*Wittwer et al., 1997*).

Takto připravené PCR produkty jsou v průběhu HRM podrobeny denaturaci s následnou renaturací a posléze ještě konečné denaturaci. Získaná data jsou pak hodnocena v příslušném softwaru (*Tindall et al., 2009*).

HRM je tedy velmi citlivou metodou, která je vhodná pro odhalování všech typů bodových mutací, v některých případech je schopna rozlišit i změnu v cis/trans konformaci analyzované molekuly DNA. Podobně však jako DGGE, není HRM zcela spolehlivá v detekci tzv. „neutrálních záměn bází“ jako např. A>T, C>G atd. .



Přesto by HRM měla být schopna odhalit 95,6 – 96,1 % abnormalit ve vyšetřovaných fragmentech DNA, jež mohou být i delší než 300bp. Specifita této metody se odhaduje na 99,4 % (*Reed et Wittwer, 2004*), (*von Ahsen et al., 2001*), (*Tindall et al., 2009*). Pro analýzu mutací v genech TSC1 a TSC2 sice HRM zatím použita nebyla, zdá se však být jednou z nejvhodnějších detekčních technik současné doby.

Všechny zde výše zmíněné metody sloužící k detekci mutací jsou však schopny pouze více či méně přesně lokalizovat postižené místo v řetězci DNA. Není jimi možné zjistit konkrétní změnu vzniklou v sekvenci analyzované DNA – k tomuto účelu slouží metoda přímého sekvenování.

#### **2.2.8 Přímé sekvenování**

Tato metoda se tedy nejčastěji používá až ke zjišťování konkrétní změny v sekvenci analyzovaného úseku DNA, ve kterém byla tato abnormalita lokalizována již dříve jinou z výše uvedených metod.

V současné době se ve většině případů k sekvenování používají plně automatizované přístroje, které jsou časově mnohem úspornější než standartní postupy (*Šmarda et al., 2005*).

K amplifikaci vybraných vzorků se používá asymetrická PCR, za použití fluorescenčně čtyřbarevně značených dideoxynukleotidových terminátorů, které při zabudování do struktury DNA ukončí syntézu prodlužujícího se řetězce. Takto vznikají různě dlouhé fragmenty DNA, jež jsou v kapilární elektroforéze na základě různé délky separovány pomocí laserového detektoru napojeného k počítači. Ten z pořadí signálů v příslušných drahách přímo vyhodnocuje sekvenci celého analyzovaného vlákna DNA – vzniká tzv. chromatogram (elektroforetogram) (*Šmarda et al., 2005*).

Některá zahraniční pracoviště používají sekvenování i k vyhledávání vzniklé abnormality ve všech kódujících oblastech zodpovědných genů. Tento postup je však o něco nákladnější než kombinace některé z výše uvedených metod a následného sekvenování pouze vzorků obsahujících pozitivní nález (*Vrtěl R., 2010, pers. comm.*).

I přes nižší senzitivitu přímého sekvenování (ve srovnání s některými výše uvedenými technikami) je pravděpodobně touto metodou možné odhalit 74 - 80 % všech mutací v souboru (*Sancak et al., 2005*), (*Jones et al., 2001*). Dle výzkumu provedeného ve FN v Olomouci je přímým sekvenováním možné zachytit i mozaikový výskyt mutací, ovšem v případě, že zastoupení mutovaných buněk ve tkáni se pohybuje okolo 75 % (*Smutná, 2009*).

# **PRAKTICKÁ ČÁST**

### **3 ÚVOD K VLASTNÍMU ŘEŠENÍ PRÁCE**

Laboratoř DNA analýzy Fakultní nemocnice v Olomouci je jedním z mála pracovišť v Evropě, které se zabývá diagnostikou a výzkumem komplexu tuberózní sklerózy. K odhalování mutací v zodpovědných genech TSC1 a TSC2 se zde používají metody MLPA (pro detekci rozsáhlých změn v genech) v kombinaci s DGGE (pro vyhledávání drobných abnormalit v genech), která byla v podmínkách tohoto pracoviště shledána jako ekonomicky nejvýhodnější, dostatečně efektivní a přiměřeně spolehlivou vyšetřovací metodou (*Vrtěl et al., 2008*).

I přes nesporné výhody DGGE, zmíněné již výše, se u některých vyšetřovaných pacientů nepodaří vzniklou mutaci ani v jednom z obou zodpovědných genů nalézt.

K takové situaci může dojít hned z několika důvodů:

- Vyšetřovaný pacient netrpí TSC, má pouze některé charakteristické manifestace.
- Možnost, že tuto chorobu způsobují změny ještě i v jiném genu.
- Vliv lidského faktoru, ve kterém hraje velkou roli subjektivita.
- A v neposlední řadě i skutečnost, že žádná detekční metoda není 100% spolehlivá.

Z důvodu zvýšení efektivity vyšetření TSC genů, byla na zdejším pracovišti vyvinuta snaha o zvýšení účinnosti DGGE v záchytu mutací a to tím, že závěr PCR reakce, jež předchází samotné DGGE, byl rozšířen ještě o jednu závěrečnou denaturaci, kdy dochází k vytvoření heteroduplexových molekul DNA.

Prostá DGGE je sice schopna odhalit i změnu týkající se pouze jednoho nukleotidu, ale pouze v případě, že v tomto postiženém páru nukleotidů dojde i ke změně v počtu vodíkových vazeb mezi oběma bázemi.

Zařazení tvorby heteroduplexu do PCR předcházející DGGE by tedy mělo umožnit i odhalení záměny dvou bází se stejným počtem vodíkových vazeb, jež dříve mohly zůstat skryty, a tím zvýšit i účinnost metody DGGE v záchytu mutací.

Tato hypotéza byla posléze testována v rámci této práce na přiděleném souboru pacientů.

## 4 CÍLE PRÁCE

1. Srovnat účinnost metody DGGE po klasické PCR a DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu

*Hypotéza: DGGE s tvorbou heteroduplexu je účinnější než prostá DGGE, protože je navíc schopná odhalit i mutace, kdy dochází k záměně dvou bází se stejným počtem vodíkových vazeb.*

2. Stanovit procentuální zastoupení jednotlivých typů mutací

3. Zjistit, jaká část z celkového počtu mutací byla odhalena jednotlivými technikami

## 5 POUŽITÝ MATERIÁL

### 5.1 Přístroje a ostatní vybavení laboratoře

- Analytické váhy: BBC 32, BOECO Germany
- Centrifugy: MPW-310 (Mechanika Precyzyjna Warszawa)  
Spectrafuge 7M, Labnet (max. 10 000 rpm)
- Digitální fotoaparát: LUMIX DMC-LX1, Panasonic
- Elektroforetické hřebeny: na 8, 13 a 20 jamek, BIO-RAD
- Elektroforetické vany: BIO-RAD  
JSB-30, Shelton Scientific  
SUB-CELL<sup>®</sup> GT
- Horkovzdušný sterilizátor: HS 122A
- Kapilární elektroforéza: ABI PRISM<sup>™</sup> 310 Genetic Analyser, Applied  
Biosystems
- Lednice: Zanussi
- Mikrovlnná trouba: Elektrolux
- Mrazáky: Elektrolux (-26 °C)  
PMA 315 BL (-18 °C)  
Zanussi (-18 °C)  
Liebher Comfort (-18 °C)
- Pipety: Eppendorf Research (2,5 µl)  
Labmate (2 µl, 20 µl a 200 µl)  
Pipetman Gilson (2 µl, 20 µl, 200 µl a 10 ml)
- Sada elektroforetických skel pro DGGE
- „Spacery“ mezi elektroforetická skla pro DGGE: (1 mm)
- Stojan pro upevnění elektroforetických skel pro DGGE: BIO-RAD
- Svorky pro elektroforetická skla pro DGGE: BIO-RAD
- Soustava pro nalévání gelů a tvorbu denaturačního gradientu: FN Olomouc
- Termocyklery: Gradient Cycler, DNA Engine  
Life Expres, BIOER  
PTC-200, MJ Research
- Termostat: TV51 Laboratorní přístroje Praha

- Transluminátor: TRANSILLUMINATOR UVP
- Třepačka + centrifuga : Combi-Spin, BIOSAN EAST PORT (2400 rpm)
- Univerzální systém pro detekci mutací: DCode™ Systém, BIO-RAD
- Zdroje napětí: LKB.GPS 200/400, Pharmacia  
Power Pac Basic™, BIO-RAD  
Power Pac 3000, BIO-RAD

## 5.2 Reagencie a chemikálie

- ABI PRISM® Big Dye® Terminator v 3.1 (kit)
- ABI PRISM® Big Dye® Terminator v 1.1, v 3.1, 5x sekvenační pufr
- Agaróza: Serva
- Akrylamid: Serva
- APS (persulfát amonný): Serva
- Bisakrylamid (N,N'-methylenbisakrylamid): Serva
- Combi PPP Master Mix: Top Bio, ČR
  - 200 µmol/l dATP (deoxyadenosintrifosfát)
  - 200 µmol/l dTTP (deoxythymintrifosfát)
  - 200 µmol/l dCTP (deoxycytosintrifosfát)
  - 200 µmol/l dGTP (deoxyguanosintrifosfát)
  - 0,01 % Tween 20
  - 2,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>
  - 70 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8
  - 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 50 U/ml Taq Purple DNA polymerázy
  - 19 nmol/l monoklonální protilátky anti-Taq
  - stabilizátory a aditiva
- EDTA (ethylen diamin tetraoctová kyselina): Amresco
- 96% Ethanol: Lékárna FN Olomouc
- Ethidium bromid (EtBr): Sigma
- Formamid: Applied Biosystems
- Kyselina boritá: Tamda
- NaCl : Penta

- NaOAc: Lachema
- Močovina: Lach:ner
- QIAquick PCR Purification Kit : Qiagene
  - PB pufr (binding – pro navázání DNA)
  - PE pufr (wash – pro promývání DNA)
  - EB pufr (pro eluci DNA)
- SDS (sodium dodecylsulphate): Sigma
- TEMED (N,N,N',N'- tetramethylendiamin): Serva
- Tris: Lach:ner

### **5.3 Složení roztoků**

#### 40% akrylamid/bisakrylamid (37,5 : 1)

akrylamid.....38, 93 g

bisakrylamid.....1, 07 g

Doplněno destilovanou vodou do 60 ml

#### 0% denaturační roztok

40% akrylamid/bisakrylamid (37,5 : 1).....180 ml

50 x TAE.....8 ml

Doplněno destilovanou vodou do 800 ml

#### 80% denaturační roztok

40% akrylamid/bisakrylamid (37,5 : 1).....180 ml

50 x TAE.....8 ml

močovina.....268,8 g

formamid.....256 ml

Doplněno destilovanou vodou do 800 ml

#### TBE pufr

EDTA (0,5 mol/l)..... ..2 ml

Tris.....54 g

kyselina boritá.....27, 5 g

Doplněno destilovanou vodou do 5 litrů



#### TAE pufr

EDTA.....18,7 g  
Tris.....242 g  
kyselina octová.....57,1 l  
Úprava pH na pH = 8 koncentrovanou HCl  
Doplněno destilovanou vodou do 1 litru

#### TE pufr

EDTA (0,5 mol/l).....0,5 ml  
Tris (7,5 mol/l).....2,5 ml  
Úprava pH na pH = 8  
Doplněno destilovanou vodou do 250 ml

#### NaOAc/EDTA

NaOAc (1,5 mol/l, pH > 8).....1 ml  
EDTA (250 mol/l).....1,3 ml

### **5.4 Složení elektroforetických gelů**

#### „Malý“ agarózový gel

Agaróza.....0,9 g  
TBE – pufr.....60 ml  
Ethidium bromid.....3 µl

#### „Velký“ agarózový gel

Agaróza.....1,5 g  
TBE – pufr.....100 ml  
Ethidium bromid.....5 µl

#### Polyakrylamidový gel s denaturačním gradientem 30 – 70 %

30% denaturační roztok.....10,3 ml (0% d. roztoku) + 6,2 ml (80% d. roztoku)  
70% denaturační roztok.....2 ml (0% d. roztoku) + 14,5 ml (80% d. roztoku)  
TEMED.....14 µl  
10% APS.....100 µl

Polyakrylamidový gel s denaturačním gradientem 40 – 80 %

40% denaturační roztok.....8,25 ml (0% d. roztoku) + 8,25 ml (80% d. roztoku)

80% denaturační roztok.....0 ml (0% d. roztoku) + 16,5 ml (80% d. roztoku)

TEMED.....14  $\mu$ l

10% APS.....100  $\mu$ l

Polyakrylamidový gel s denaturačním gradientem 45 – 75 %

45% denaturační roztok.....7,2 ml (0% d. roztoku) + 9,3 ml (80% d. roztoku)

75% denaturační roztok.....1 ml (0% d. roztoku) + 15,5 ml (80% d. roztoku)

TEMED.....14  $\mu$ l

10% APS.....100  $\mu$ l

Polyakrylamidový gel s denaturačním gradientem 20 – 65 %

20% denaturační roztok.....12,4 ml (0% d. roztoku) + 4,1 ml (80% d. roztoku)

65% denaturační roztok.....3,1 ml (0% d. roztoku) + 13,4 ml (80% d. roztoku)

TEMED.....14  $\mu$ l

10% APS.....100  $\mu$ l

## **6 METODY POUŽITÉ K VYPRACOVÁNÍ DÍLČÍCH ÚKOLŮ**

Hlavní úkolem této práce bylo potvrdit či vyvrátit následující hypotézu:

*DGGE s tvorbou heteroduplexu je účinnější než prostá DGGE, protože je navíc schopná odhalit i mutace, kdy dochází k záměně dvou bází se stejným počtem vodíkových vazeb.*

Obě zmíněné metody byly testovány formou vyšetřování přiděleného souboru 44 pacientů pocházejících převážně z České republiky a Slovenska, u kterých bylo podezření na přítomnost tuberózní sklerózy. K tomuto testování byl vybrán rozsáhlejší z obou zodpovědných genů - gen TSC2, protože dle Rendtorffa (2005) v něm může být lokalizováno 80 – 90 % všech mutací spojených s chorobou TSC. Navíc ve srovnání s genem TSC1 je zde i větší zastoupení missence mutací. Každý ze 44 pacientů byl vyšetřen nejprve metodou DGGE s tvorbou heteroduplexu v 35 exonech TSC2 genu. Pozitivní nálezy byly dále vyšetřovány i pomocí prosté DGGE, která tuto pozitivitu buď potvrdila nebo danou změnu neodhalila.

### **6.1 PCR a PCR s tvorbou heteroduplexu - rozdíly v jejich průběhu**

DNA templáty jednotlivých pacientů byly získány vysolovací metodou z 10ml odebrané krve v EDTA<sup>1</sup> (Miller et al., 1988).

Z každého takto získaného zásobního roztoku DNA bylo naředěno 100 µl pracovního roztoku DNA o koncentraci 50 ng DNA v 1 µl TE-pufu.

Pracovně naředěná DNA každého vyšetřovaného pacienta byla dále amplifikována vždy v příslušných exonech TSC2 genu:

1. pomocí prosté PCR (bez vytvoření heteroduplexu v závěru reakce)
2. pomocí PCR , v závěru obohacené o vytvoření heteroduplexu

---

<sup>1</sup> EDTA – (ethylene diamine tetraacetic acid) – chelátová sloučenina užívaná k vyvazování některých dvojmocných kationtů. (Při odběru krve se tak krev vyvázáním vápníku stává nesrážlivou. (podobně působí i citrát) (Vokurka et al., 2006)

Reakční směs pro amplifikaci každého vyšetřovaného úseku DNA byla připravena v 0,2ml mikrozkuhavce. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 2.

**Tabulka č. 2:** Složení reakční směsi - množství pro 1 mikrozkuhavku (0,2 ml)

Složení	Množství (μl)
PCR-H <sub>2</sub> O	4,6
Master Mix	7,5
Primer F	0,2
Primer R	0,2
PCR-H <sub>2</sub> O/DMSO	1,5
DNA	1

Celkový objem reakční směsi v 1 mikrozkuhavce byl 15 μl.

DNA každého ze 44 vyšetřovaných pacientů byla postupně amplifikována v 35 ze 41 exonů TSC2 genu - nejprve pomocí PCR s tvorbou heteroduplexu, v případě potřeby později i prostou PCR. Pro amplifikaci v příslušných exonech byly použity předem optimalizované dvojice DGGE - primerů, navržené DNA laboratoří EUR v Rotterdamu, z nichž vždy jeden obsahoval tzv. GC – svorku.

*(Přehled DGGE – primerů použitých k amplifikaci – viz příloha č. 1, přehled sekvencí jednotlivých DGGE - primerů – viz. příloha č.2)*

Stejným způsobem byly pro každý exon připraveny negativní a pozitivní kontroly. Negativní kontroly obsahovaly DNA zdravého člověka. Kontroly pozitivní obsahovaly DNA s mutací v příslušném exonu, která byla vytvořena uměle DNA laboratoří EUR v Rotterdamu.

Samotná amplifikace takto připravených vzorků probíhala vždy v termocykleru s vyhřívaným víkem za použití programů TSC\_63A nebo PETRA\_63A (viz. tabulky č. 3 a 4).

**Tabulky č. 3 a 4:** Srovnání průběhu prosté PCR a PCR s tvorbou heteroduplexu

PCR bez tvorby heteroduplexu

Číslo fáze	Teplota °C	Doba trvání
1.	96	5 min
2.	94	30 s
3.	63	30 s
4.	72	45 s
Fáze 1. - 4. se 10x opakují		
5.	92	30 s
6.	63	30 s
7.	72	45 s
Fáze 5. - 7. se 25x opakují		
8.	72	10 min
9.	63	45 min
10.	10	neomezeně

Program: PETRA\_63A

PCR s tvorbou heteroduplexu

Číslo fáze	Teplota °C	Doba trvání
1.	96	5 min
2.	94	30 s
3.	63	30 s
4.	72	45 s
Fáze 1. - 4. se 10x opakují		
5.	92	30 s
6.	63	30 s
7.	72	45 s
Fáze 5. - 7. se 25x opakují		
8.	72	10 min
9.	95	10 min
10.	63	45 min
11.	10	neomezeně

Program: TSC\_63A

**Vytvoření heteroduplexu** (viz obrázek č. 4)

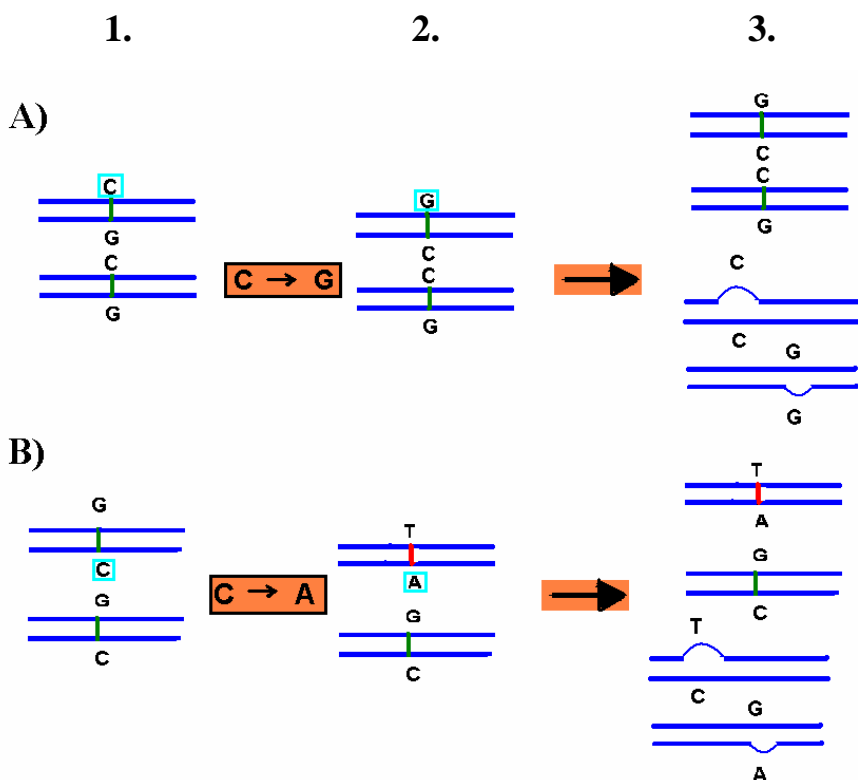
Oba amplifikační programy probíhaly identicky v 1. – 8. fázi, kdy se několikrát po sobě opakovala denaturace dvojitá vlákna analyzované DNA, připojení příslušných primerů ve specifických oblastech a následná syntéza nového protilehlého DNA vlákna pomocí termostabilní polymerázy. Rozdíl v obou programech nastal až v 9. fázi. V programu PETRA\_63A, po posledním dosyntetizování protilehlých vláken DNA v 8. fázi, už získaná směs dvouřetězcových molekul DNA pouze postupně chladne. V programu TSC\_63A však po poslední syntéze dochází v 9. fázi ještě jednou k denuraci všech vytvořených dvouřetězcových molekul DNA (v tabulce č. 4 zvýrazněno žlutě) a následné postupné ochlazování způsobí, že jednotlivá vlákna DNA spolu znova hybridizují. Za těchto podmínek však spolu mohou hybridizovat nejen vlákna zcela komplementární, ale i vlákna vzájemně komplementární jen zčásti (vzniklá změna v sekvenci může být hledanou mutací). V místě jejich vzájemné nekomplementarity, se mezi postiženými bázemi původní vodíková vazba nevytvoří, což vede ke změně teploty tání (zpravidla k jejímu snížení) celé dvouřetězcové molekuly DNA. Ta pak při analýze v polyakrylamidovém gelu denaturuje dřív, než dvouřetězce DNA bez této změny,

což umožňuje danou změnu díky odlišné lokalizaci postiženého DNA fragmentu v gelu detekovat.

### Význam tvorby heteroduplexu

Pokud došlo v pacientově DNA k záměnové mutaci pouze v jednom páru nukleotidů, kdy byla např. trojvazná báze zaměněna za jinou se stejným počtem vazeb, nebylo možné ji bez použití tvorby heteroduplexu v polyakrylamidovém gelu nikterak detekovat, protože vzniklá změna nepozměnila teplotu tání analyzované DNA molekuly. Bylo tedy nutné zařadit do amplifikačního programu i fázi, ve které se kromě homoduplexů vytvářejí i heteroduplexy, které mají narušenou od homoduplexů odlišnou teplotu tání, aby bylo možné detekovat i záměny mezi bázemi se stejným počtem vodíkových vazeb.

**Obrázek č. 4:** Vznik záměnové mutace se změnou / beze změny vodíkových vazeb a vytvoření příslušných heteroduplexů



Popis k obrázku č. 4:

**A** – záměna dvou bází beze změny v počtu vodíkových vazeb

**B** – záměna dvou bází se změnou v počtu vodíkových vazeb

1. **(A i B)** – dva páry alel neobsahující žádnou mutaci
2. **A** – Došlo k záměně, kdy cytosin byl nahrazen guaninem. Situace č. 2 zachycuje typy DNA vláken získané amplifikací prostou PCR (bez tvorby heteroduplexu). DNA vlákno nesoucí změnu je naprosto identické s DNA vláknem původním, proto je tato změna v DGGE nedetekovatelná.
2. **B** - Došlo k záměně, kdy cytosin byl nahrazen adeninem. Situace č. 2 zachycuje 2 rozdílné typy DNA vláken získaných amplifikací prostou PCR (bez tvorby heteroduplexu). Rozdíl mezi nimi lze detekovat za použití DGGE.
3. **A** - 2 identické homoduplexy a 2 odlišné heteroduplexy získané amplifikací PCR s tvorbou heteroduplexu. V tomto případě je vzniklá změna v DGGE detekovatelná.
3. **B** - 2 rozdílné homoduplexy a 2 rozdílné heteroduplexy získané amplifikací PCR s tvorbou heteroduplexu. Vzniklá změna je taktéž v DGGE detekovatelná.

### **Ověřování úspěšnosti amplifikace analyzovaných DNA fragmentů**

Úspěšnost amplifikace každého získaného PCR produktu byla ověřována elektroforeticky v agarózovém gelu (*složení - viz. kapitola 5.4*).

### **Pracovní postup**

Rozmíchaná směs agarózy a TBE pufru byla ve skleněné láhvi zahřáta v mikrovlnné troubě.

Po následném ochlazení (přibližně na 60 °C) bylo do vzniklého roztoku přidáno malé množství ethidium bromidu.

Důkladně promíchaný roztok byl nalit do předem sestavené nalévací gelové formy s nastaveným hřebínkem.

Asi po 30 minutách byl z utužlého agarózového gelu hřebínek opatrně vyjmut a gel byl přemístěn z gelové nalévací formy do elektroforetické vany naplněné TBE puftrem, kde bylo do každé jeho jamky nanášeno 5 µl získaného PCR produktu.

Elektroforéza probíhala 0,5 - 1 hodinu při napětí 80 – 100 V (přesný čas a napětí záviselo na velikosti gelu).

Pokud se amplifikace příslušných částí DNA pacientů zdařila, byly v gelu po jeho prosvícení UV-lampou (transluminátorem) patrné proužky (bandy) získaných PCR produktů.

## **6.2 Analýza PCR produktů za použití DGGE**

Pro odhalení a lokalizaci změn v TSC2 genu u přidělených pacientů bylo nutné připravené PCR produkty separovat v polyakrylamidovém gelu obsahujícím gradient denaturačního činidla. Celkem byly pro separaci PCR produktů na polyakrylamidovém gelu používány 4 různé denaturační gradienty: 30 -70 %, 40 – 80 %, 45 – 75 % a 20 – 65 %. Volba příslušného denaturačního gradientu byla závislá na použití konkrétního primeru při amplifikaci vyšetřované DNA.

*(Výpis konkrétních primerů u jednotlivých gradientů denaturačního činidla – viz. příloha č. 1, složení gelů s jednotlivými denaturačními gradienty - viz. kapitola 5.4.)*

### **Pracovní postup**

Ze dvou elektroforetických skel (jedno z nich bylo menší), přiložených k sobě, mezi nimiž byly po stranách svisle vloženy 2 „spacery“, byl po zpevnění svorkami na bocích, vytvořen tzv. „gelový sandvič“, který byl upevněn do stojanu.

Předem připravené roztoky o příslušných koncentracích byly smíchány a vpraveny mezi skla „gelového sandviče“ pomocí soustavy pro nalévání polyakrylamidových gelů a tvorbu denaturačního gradientu.

Mezi horní hrany skel byl opatrně vsunut hřebínek pro vytvoření 20 jamek a gel se nechal minimálně 45 minut polymerizovat.

Po utuhnutí gelu byl vyjmut hřebínek a ze stojanu uvolněný „gelový sandvič“ byl vsazen do tzv. „jádra elektroforézy“. Do „jádra elektroforézy“ se vždy vkládají 2 „gelové sandviče“ proti sobě (menším sklem vždy dovnitř), aby se tak v horní části „jádra elektroforézy“ vytvořila horní komora pro 0,5x zředěný TAE pufr. Aby nedošlo během separace k jeho úniku z této komory, byly všechny netěsnosti mezi „jádrům elektroforézy“ a „gelovými sandviči“ zalepeny předem připraveným roztokem agarózy.

Takto upravené „jádro elektroforézy“ obsahující 2 „gelové sandviče“ bylo vloženo do elektroforetické vany se 7 l 0,5x zředěného TAE pufru, jež byla předehřátá na teplotu 55 °C.



Po vyplnění horní komory „jádra elektroforézy“ 0,5x zředěným TAE pufrem, bylo do jednotlivých jamek polyakrylamidového gelu s denaturačním gradientem vnášeno po 10 µl příslušných PCR produktů.

V jednom gelu byly vždy vyšetřovány PCR produkty obsahující amplifikovanou DNA pacientů pro konkrétní exon spolu s pozitivní a negativní kontrolou pro tento exon, aby bylo při vyhodnocování gelu možné porovnat rozdíly v lokalizaci vytvořených proužků mezi vyšetřovanými vzorky DNA a použitými kontrolami.

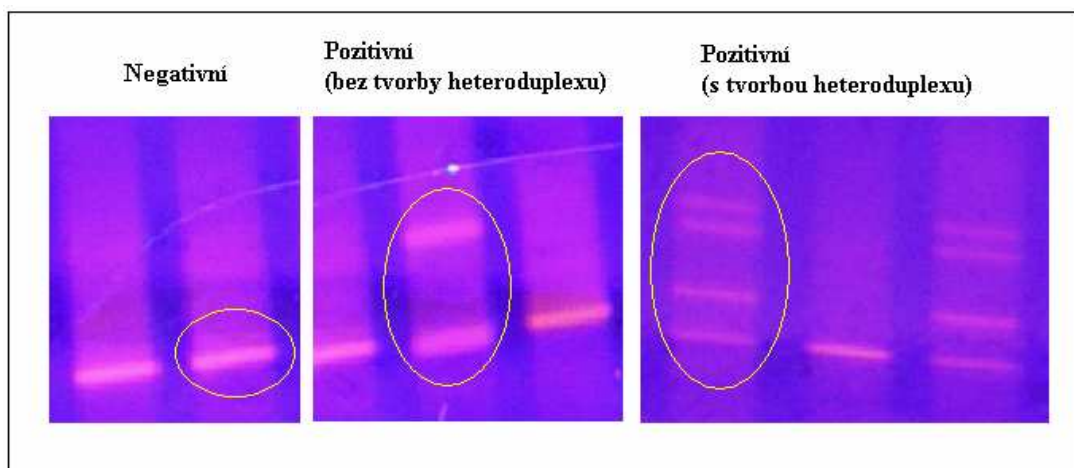
Každá separace PCR produktů v polyakrylamidovém gelu s příslušným denaturačním gradientem probíhala přibližně 18 hodin (1600 V.h) při stabilní teplotě 55 °C.

Po ukončení DGGE byl polyakrylamidový gel minimálně 20 minut barven v roztoku ethidium bromidu, aby bylo možné po prosvícení gelu UV – lampou vyhodnotit výsledky separace jednotlivých PCR produktů.

Pokud v analyzované DNA došlo k jakékoliv změně v sekvenci, projevila se její přítomnost odlišnou lokalizací postižených fragmentů DNA v gelu, narozdíl od DNA fragmentů beze změny v sekvenci. Pokud tedy byla vyšetřovaná DNA v pořádku, vytvořila po separaci v polyakrylamidovém gelu 1 proužek (band) – signál negativní. Když došlo ve vyšetřované DNA k jakékoliv změně v sekvenci, vznikly v polyakrylamidovém gelu proužky dva nebo i více – signál pozitivní.

Očekávány tedy byly následující signály (*viz. obrázek č. 5*):

**Obrázek č. 5:** Přehled očekávaných signálů po separaci vyšetřovaných DNA fragmentů v polyakrylamidovém gelu s denaturačním gradientem.



Popis k obrázku č. 5:

Jednotlivé typy očekávaných signálů jsou obtaženy žlutou barvou.

Výsledek každého vyšetření získaný pomocí DGGE, byl pečlivě zakreslen, případně i fotograficky zdokumentován.

Výsledky této analýzy byly klíčové pro porovnání DGGE, které předcházela prostá PCR, s DGGE, jež předcházela PCR s tvorbou heteroduplexu, v jejich úspěšnosti záchytu abnormalit ve vyšetřovaných fragmentech DNA.

Vyšetřované fragmenty DNA, které v polyakrylamidovém gelu vytvořily více jak jeden proužek – pozitivní signál, byly dále podrobeny sekvenaci.

### **6.3 Sekvencování fragmentů DNA s pozitivním signálem v DGGE**

Obě zde srovnávané metody DGGE jsou schopny více či méně úspěšně určit pouze místo v genu TSC2, kde se hledaná abnormalita v sekvenci vyšetřované DNA nachází. Díky možnosti sekvencování tohoto úseku DNA lze zjistit konkrétní změnu v sekvenci, která se zde udála.

#### **6.3.1 Předsekvenační PCR**

Úseky DNA určené k sekvenaci bylo však potřeba opět amplifikovat. K tomuto účelu byl použit amplifikační program TSC\_63A pro PCR s tvorbou heteroduplexu. (*Průběh programu TSC\_63A – viz. kapitola 6.1, tabulka č.4.*)

**Tabulka č. 5:** Složení reakční směsi pro „předsekvenační PCR“ - množství pro 1 mikrokumavku (0,2 ml)

Celkový objem reakční směsi v 1 mikrokumavce byl 15  $\mu$ l.

<b>Složení</b>	<b>Množství (<math>\mu</math>l)</b>
PCR-H <sub>2</sub> O	4,6
Master Mix	7,5
Primer F	0,2
Primer R	0,2
PCR-H <sub>2</sub> O/DMSO	1,5
DNA	1

### Poznámka k tabulce č. 5:

Primery použité v této PCR již neobsahují GC-svorky.

*(Přehled sekvencí jednotlivých primerů určených pro sekvenaci – viz. příloha č.3.)*

Úspěšnost amplifikace získaných PCR produktů byla opět ověřována elektroforézou na agarózovém gelu. K tomuto účelu bylo použito 5 µl každého PCR produktu.

### **6.3.2 Post – PCR purifikace**

Zbývajících 10 µl každého získaného PCR produktu bylo pomocí pipety promícháno s 50 µl PB pufru (poměr vzorku a PB - pufru = 1 : 5) a přeneseno na QIAquick kolonku, na kterou se analyzovaná DNA navázala, vloženou v 2ml mikrozkuhavce.

Po centrifugaci (60 s při 12 000 rpm) byl obsah mikrozkuhavky odstraněn a na kolonku, která byla opět vložena do prázdné mikrozkuhavky, bylo nanášeno 550 µl PE pufru (přečištění navázané DNA).

Následovala další centrifugace (60 s při 12 000 rpm) a po opakovaném odstranění obsahu mikrozkuhavky a opětovném vložení kolonky do ní se centrifugovalo ještě jednou po dobu 60 s při 12 000 rpm.

Poté byla kolonka přemístěna do čisté mikrozkuhavky (1,5 ml) a do jejího středu bylo nanášeno 50 µl EB pufru pro uvolnění navázané DNA z kolonky.

Po závěrečné centrifugaci (60 s při 12 000 rpm) byla kolonka z mikrozkuhavky obsahující vzorek přečištěné DNA odstraněna a tato mikrozkuhavka byla pečlivě uzavřena a označena.

### **6.3.3 Sekvenační PCR (Sangerova enzymová metoda)**

Aby bylo možné stanovit přesnou sekvenci vyšetřovaných úseků DNA, bylo nutné v sekvenační PCR amplifikovat každý řetězec přečištěné DNA zvlášť. Složení reakční směsi pro sekvenační PCR je uvedeno v tabulce č. 6.

**Tabulka č. 6:** Složení reakční směsi pro sekvenační PCR  
(množství pro 1 mikrozkušavku (0,2 ml))

Složení	Množství (μl)
Kit (1 : 7)	4
Primer F/R	2
DNA	4

Celkový objem reakční směsi v 1 mikrozkušavce byl 10 μl.

Poznámky k tabulce č. 6:

Templátovou DNA byly v této reakci přečištěné PCR produkty z předsekvenační PCR.

Sekvenační amplifikace DNA jednoho pacienta zde probíhala ve dvou samostatných mikrozkušavkách – v 1. byl amplifikován pouze řetězec F za použití příslušného primeru F, ve 2. byl amplifikován jen řetězec R pomocí příslušného primeru R.

Komerčně dodaný sekvenační kit byl z úsporných důvodů ředěn se sekvenačním pufrům v poměru 1 : 7.

Samotná reakce probíhala v termocykleru s vyhříváním víkem za použití sekvenačního programu SEQ – TSPY.

**Tabulka č. 7:** Průběh programu SEQ – TSPY

Číslo fáze	Teplota °C	Doba trvání
1.	94	2 min
2.	96	10 s
3.	teplota klesá o 1 °C za s na konečných 50 °C	
4.	50	0,05 s
5.	60	4 min
Fáze 2. - 5. se 34x opakují		
6.	10	neomezeně

Získané sekvenační produkty bylo nutné před analýzou v kapilární elektroforéze ještě jednou přečistit.

#### 6.3.4 Post-sekvenační purifikace

K 10  $\mu$ l každého sekvenačního produktu byly přidány 2  $\mu$ l roztoku ethanol-acetátu. Po promíchání vzniklé směsi pomocí pipety a následné centrifugaci (30 s při 2400 rpm) bylo ještě přidáno 25  $\mu$ l 100% ethanolu. Vše bylo opět lehce promícháno pipetou a po 30-ti minutách centrifugace při 12 000 rpm byl z mikrozkušavky opatrně odsán supernatant.

K fragmentům DNA usazeným na dně bylo přidáno 50  $\mu$ l 80% ethanolu. Po následné centrifugaci (10 minut při 12 000 rpm) byl opět opatrně odstraněn supernatant a celá purifikace pomocí 80% ethanolu (včetně odstranění supernatantu) byla provedena ještě jednou.

Otevřené mikrozkušavky obsahující na dně usazené DNA fragmenty byly vloženy do horkovzdušného sterilizátoru a vysoušeny po dobu 10-ti minut při teplotě 50 °C. Do každé mikrozkušavky bylo po vysušení napipetováno 15  $\mu$ l formamidu. Vzniklá směs byla v uzavřených zkumavkách ponechána 0,5 hodiny a déle v klidu, aby došlo k důkladnému vylouhování sekvenačního produktu DNA.

Po přenesení tohoto roztoku do sekvenačních mikrozkušavek proběhla 3-minutová denaturace při 95 °C, za níž následovalo prudké zchlazení ledem (cca 5 minut), aby nedošlo k nechtěnému párování řetězců přečištěných sekvenačních produktů.

Nakonec byly všechny sekvenační zkumavky umístěny do sekvenačního panelu.

Jednotlivé sekvence vyšetřovaných úseků DNA byly stanoveny pomocí kapilární elektroforézy na základě separace různě dlouhých fragmentů DNA v 1 mikrozkušavce laserovým detektorem napojeným na počítač.

Nasátí jednoho vzorku pro analýzu trvalo 30 s při napětí 1 kV. Elektroforetická separace jednoho vzorku probíhala 32 minut při napětí 11,3 kV.

Získané výsledky, zpracované v programu Sequencing Analysis, byly následně vyhodnocovány v programu Sequence Scanner. Jako negativní kontrola sloužilo porovnání získaných sekvencí jednotlivých vzorků s příslušnými sekvencemi v BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 7 VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

### 7.1 Srovnání účinnosti metody DGGE po klasické PCR a DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu

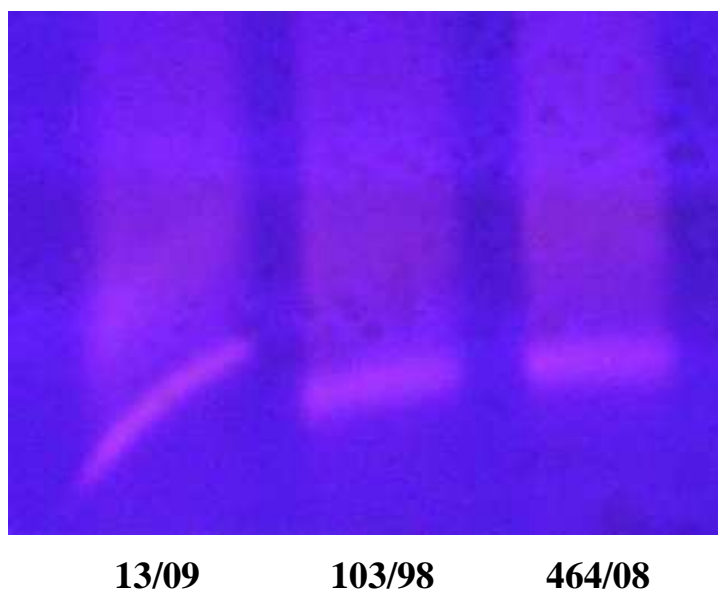
Vyšetřováno bylo 44 pacientů v 35-ti exonech genu TSC2 – celkem tedy bylo provedeno 1540 dílčích vyšetření (viz. příloha č.4).

U 32 z nich (pacienti pozitivní) byla použitými detekčními metodami (DGGE po prosté PCR nebo DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu a sekvencováním) odhalena 1 nebo i více abnormalit v DNA sekvenci vyšetřovaného TSC2 genu.

Za pozitivní signál na DGGE byl považován jak vzorek, jež se na polyakrylamidovém gelu projevil dvěma a více výraznými proužky, tak vzorek, u něhož byl pouhý náznak dvou a více proužků (*tyto vzorky jsou v příloze č. 4 označeny jako „?“*).

Později bylo zjištěno, že pozitivním signálem analyzovaného vzorku může být i jen 1 proužek, který se však od ostatních negativních vzorků odlišuje rozdílnou polohou v gelu. Tento jev byl pozorován u vzorků 13/09 v exonu 5 (po prosté PCR) a 685/08 v exonu 10 (po PCR s tvorbou heteroduplexu) (viz. obr. č.6).

**Obrázek č. 6:** Ukázka pozitivního signálu v exonu 5, který je u vzorku 13/09 tvořen jen 1 proužkem. Ten je umístěn ve srovnání se zbytkem vzorků negativních o něco výše.



Dalším překvapivým zjištěním bylo, že i některé pozitivní vzorky připravené prostou PCR bez tvorby heteroduplexu se v polyakrylamidovém gelu rozdělily do více jak dvou proužků (*viz. obr. č. 7*).

**Obrázek č. 7:** Ukázka pozitivních signálů v exonu 23, které jsou tvořeny víc jak dvěma proužky

Analyzované vzorky byly připraveny prostou PCR.



432/08      432/08      Pozitiv. k.      Negativ. k.

Celkem bylo na polyakrylamidovém gelu detekováno 56 abnormalit (pozitivních signálů) – nezávisle na tom, kterou metodou byly odhaleny.

Přitom metoda DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu zachytila 55 abnormalit, metoda DGGE po prosté PCR detekovala 45 abnormalit. Převážnou většinu abnormalit byly schopné zachytit obě srovnávané metody.

Rozdělení zachycených abnormalit dle detekce použitými metodami – *viz graf č. 1*.

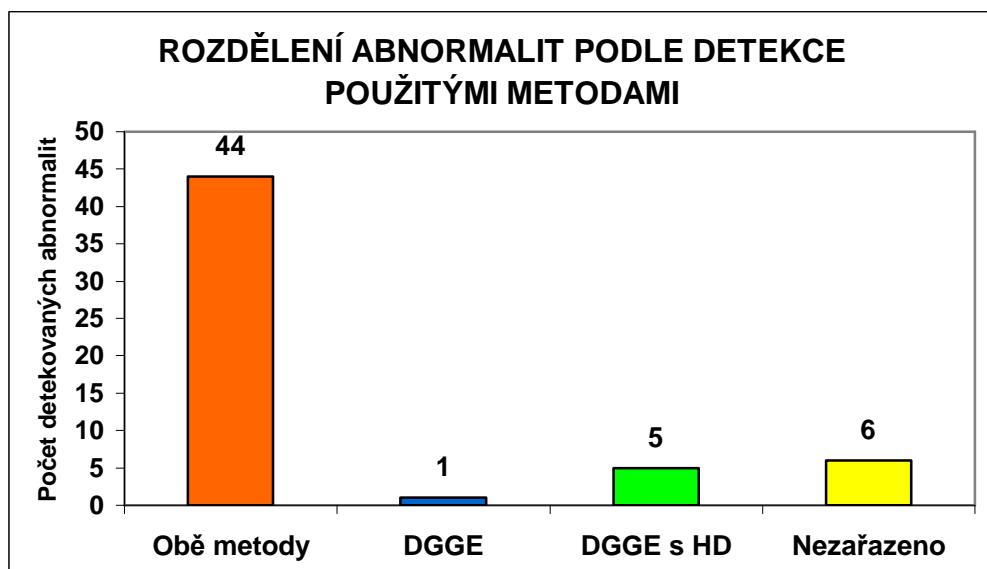
Následnou sekvenací těchto pozitivních vzorků však bylo zjištěno, že v 6-ti případech se jednalo pouze o falešně pozitivní signál. Ve všech šesti případech se však jednalo o vzorky označené „?“ , které byly 5x zachyceny pouze DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu (1x sice zachyceno DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu, ale neověřeno pomocí DGGE po prosté PCR).

Skutečně pozitivních signálů na DGGE tedy bylo 50, přičemž následnou sekvenací bylo zjištěno, že v pozitivním vzorku 685/08 se v exonu 10 nacházely záměny 2 – konečný počet pozitivních nálezů (mutací) byl 51.

Výsledky sekvenace jednotlivých pozitivních vzorků jsou uvedeny v příloze č. 5. Přehled úspěšnosti v zachytu jednotlivých typů abnormalit obou srovnávaných metod DGGE je uveden v tabulce č. 8.

**Graf č. 1:** Rozdělení všech zachycených abnormalit v genu TSC2 z hlediska zachytu jednotlivými metodami (DGGE po prosté PCR a DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu)

**Celkový počet abnormalit: 56**



Poznámky ke grafu č. 1:

Odhalené abnormality jsou do jednotlivých detekčních skupin zařazeny pouze na základě jejich zachycení jednotlivými metodami. Výsledek následné sekvenace zde není zohledněn.

**DGGE:** Denaturační gradientová gelová elektroforéza, které předchází prostá PCR.

**DGGE s HD:** Denaturační gradientová gelová elektroforéza, které předchází PCR s tvorbou heteroduplexu.

**Nezařazeno:** Vzorky, které sice byly detekovány DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu jako pozitivní, ale chybí u nich:



- analýza DGGE po prosté PCR....nebo...
- analýza DGGE po prosté PCR i ověření pozitivního výsledku sekvenací

Z těchto důvodů nebylo možné tyto vzorky zařadit do příslušné detekční kategorie.

**Tabulka č. 8:** Srovnání metod DGGE po prosté PCR a DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu v úspěšnosti záchytu abnormalit v genu TSC2

Celkový počet pozitivních pacientů: 32

Celkový počet detekovaných abnormalit v genu TSC2: 56

Počet negativních vyšetření nebyl do tohoto přehledu zahrnut.

Metoda	Výsledný stav detekované abnormality			
	Skutečně pozitivní	Falešně pozitivní	Falešně negativní	Nezařazeno
DGGE s HD	37	6	1	12
DGGE	38	0	0	13

Poznámky k tabulce č. 8:

**Skutečně pozitivní (true positive):** Přítomnost abnormality detekované v polyakrylamidovém gelu byla potvrzena následnou sekvenací.

**Falešně pozitivní (false positive):** Přítomnost abnormality detekované v polyakrylamidovém gelu nebyla následnou sekvenací potvrzena.

**Falešně negativní (false negative):** V tomto konkrétním případě se jednalo o abnormalitu, která byla detekována pouze DGGE po prosté PCR (DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu tuto abnormalitu nezachytila). Přítomnost této abnormality ale byla následně potvrzena sekvenací.

**Nezařazeno:** Vzorky, které sice byly detekovány DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu jako pozitivní, ale chybí u nich:

- analýza DGGE po prosté PCR....nebo...
- ověření pozitivního výsledku sekvenací....nebo...
- analýza DGGE po prosté PCR i ověření pozitivního výsledku sekvencí

Z těchto důvodů nebylo možné tyto vzorky zařadit do příslušné kategorie.

Dále byly obě testované metody podrobeny srovnání účinnosti pomocí ROC analýzy (Receiver operating characteristic).

Pro tuto analýzu byly ze souboru vybrány pouze vzorky těch pacientů, kteří byli vyšetřeni oběma srovnávanými metodami a správnost jejich detekce byla ověřena i sekvenací (pacienti s kompletními výsledky).

Tabulka č. 9. uvádí přehled sledovaných charakteristik obou metod

**Tabulka č. 9:** Přehled sledovaných charakteristik DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu a DGGE po prosté PCR

Sledované charakteristiky	DGGE(HD)	DGGE
True positive rate, citlivost (TPR)	1	1
False positive rate (FPR)	0,003	0
Přesnost (ACC)	0,997	1
Specifita (SPC)	0,997	1
Positive predictive value (PPV)	0,941	1
Negative predictive value (NPV)	1	1
False discovery rate (FDR)	0,059	0

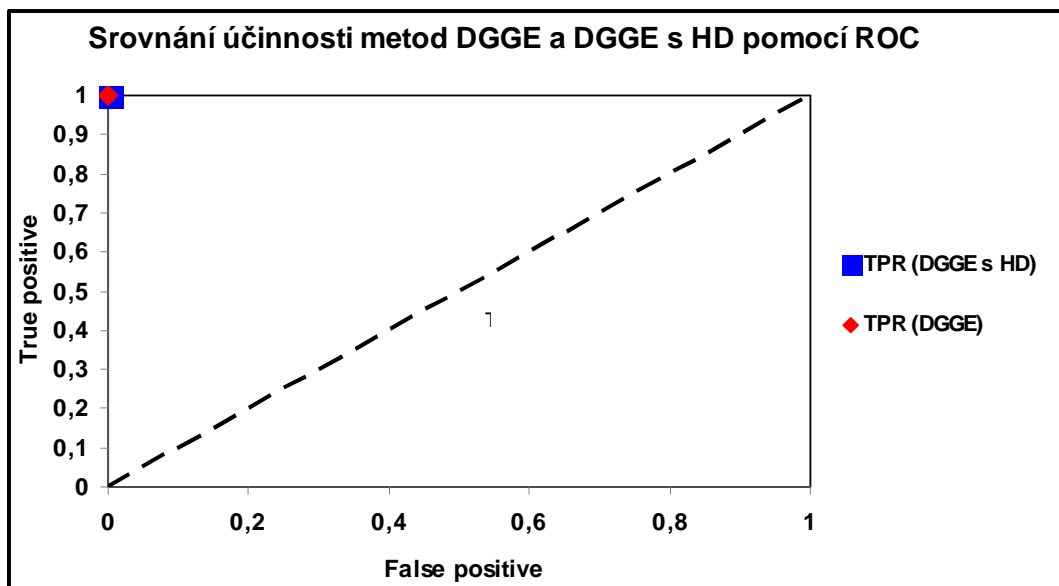
V grafu jsou použity hodnoty TPR a FPR obou testovaných metod.

**Graf č. 2:** Srovnání účinnosti metod DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu a DGGE po prosté PCR pomocí ROC analýzy

**Pozitivních pacientů 20**

**Celkový počet detekovaných abnormalit 34**

**Celkový počet vyšetření 700**



Citlivost u obou metod dle ROC analýzy dosáhla 100 %. Přesnost a specifita metody DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu byla odhadnuta na 99,7 %, kdežto přesnost a specifita DGGE po prosté PCR byla odhadnuta na 100 %.

V rámci této analýzy sice obě metody detekovaly 100 % všech negativních vzorků ve vyšetřovaném souboru, ale tento údaj je zkreslen použitím nízkého počtu pacientů k této analýze. (Z důvodu neúplnosti získaných výsledků totiž nebyl do analýzy zahrnut např. pacient s číslem DNA 104/98, u kterého byl vzorek nesoucí mutaci v exonu 7 metodou DGGE s HD označen za negativní – vznikl tak falešně negativní signál.)

Co se týče záchytu pozitivních vzorků nesoucích změnu, došlo u DGGE s HD přibližně v 6 % případů k omylu – vytvoření falešně pozitivního signálu.

Vzhledem k tomu, že pro srovnání obou testovaných metod byly použity jen vyšetření provedená v 35 exonech pouze 20-ti pacientů z celkového počtu 44, je potřeba brát výsledky ROC analýzy velmi orientačně.

Z předešlého přehledu získaných dat a výsledků ROC analýzy je zřetelné, že obě porovnávané metody mají účinnost v záchytu abnormalit v genu TSC2 relativně srovnatelnou, což nastolenou hypotézu o vyšší účinnosti DGGE s HD v záchytu abnormalit v genu TSC2 spíše vyvrací.

I přes veškerou snahu se u 12-ti pacientů v žádném z 35-ti vyšetřovaných exonů nepodařilo žádnou abnormalitu v sekvenci TSC2 genu odhalit.

## **7.2 Stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých typů mutací**

Jedním z hlavních cílů bylo zjistit, zda byly ve vyšetřovaném souboru pacientů zachyceny i záměnové mutace, kde nedochází ke změně v počtu vodíkových vazeb, a pokud ano – kterou ze dvou srovnávaných metod byly detekovány a v jakém procentuálním zastoupení se zde nacházely.

Kromě toho bylo stanoveno i procentuální zastoupení ostatních typů mutací nacházejících se ve vyšetřovaném souboru a všechny získané výsledky byly na závěr porovnány se záznamy v mezinárodní databázi Chromium – dostupné na: <http://chromium.liacs.nl>.

Nutno dodat, že pro účely této práce byl (kromě kauzálních mutací) důležitý i záchyt neutrálních mutací a polymorfismů.

Veškeré mutace vznikající v genu TSC2 byly rozděleny do 3 kategorií dle možnosti jejich detekce metodou DGGE:

**1. Rozsáhlé změny - nedetekovatelné** (rozsáhlé delece, duplikace a inserce nebo mutace v oblasti navázání primeru)

**2. Drobné změny - dobře detekovatelné** (drobné delece, duplikace a inserce, záměnové mutace, kde dochází ke změně v počtu vodíkových vazeb)

**3. Drobné změny - obtížněji detekovatelné** (záměnové mutace, kde nedochází ke změně v počtu vodíkových vazeb)

### **Předpoklady**

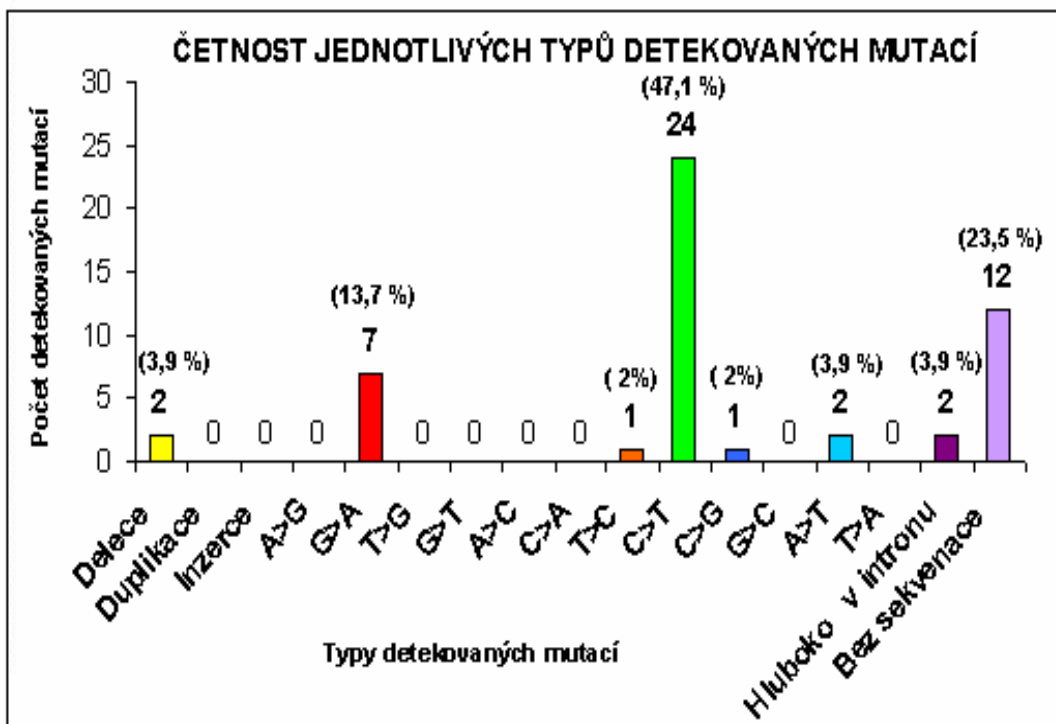
- Mutace patřící do 1. skupiny metoda DGGE nebude schopná zachytit, protože je zaměřena pouze na odhalování drobných změn v DNA analyzovaných genů.
- Vzhledem k tomu, že klíčovým faktorem pro detekci změny v sekvenci je rozdílná teplota tání analyzovaných DNA fragmentů, měla by DGGE téměř se 100% spolehlivostí odhalit všechny mutace spadající do 2. skupiny.
- DGGE po PCR rozšířené o tvorbu heteroduplexu bude ve srovnání s DGGE po prosté PCR úspěšnější v zachytu abnormalit, jež byly způsobeny záměnou dvou bází se stejným počtem vodíkových vazeb

Z 56 abnormalit detekovaných na polyakrylamidovém gelu se podařilo následným sekvenováním odhalit 45 konkrétních změn (pozitivní vzorek 685/08 obsahoval v exonu 10 změny 2). V 6-ti případech z těchto 45 bylo zjištěno, že se jedná o vzorky negativní – falešně pozitivní).

Graf č. 3 uvádí četnost a procentuální zastoupení jednotlivých typů drobných změn zachycených u analyzovaného souboru pacientů, následující graf č. 4 zobrazuje procentuální zastoupení mutací ve třech výše uvedených skupinách

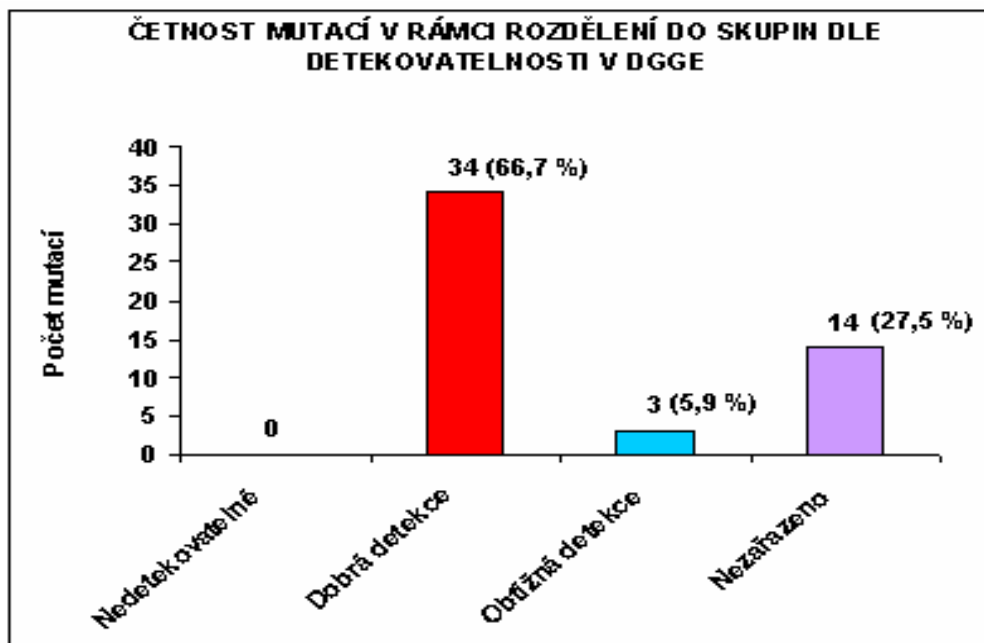
**Graf č. 3:** Procentuální zastoupení a četnost jednotlivých typů drobných změn, zachycených u analyzovaného souboru pacientů.

**Celkový počet mutací: 51**



**Graf č. 4:** Procentuální zastoupení a četnost mutací v rámci rozdělení do jednotlivých skupin dle schopnosti detekce DGGE

**Celkový počet mutací: 51**



#### Poznámky ke grafům č. 3 a 4:

Hodnoty procentuálního zastoupení jednotlivých typů mutací jsou v obou grafech zaokrouhleny na 1 desetinné místo.

Skupina „Bez sekvenace“ v grafu č. 3 zahrnuje vzorky, u kterých se ani po opakované sekvenaci nepodařilo získat výsledek, proto není možné je přiřadit k příslušným skupinám.

Skupina „Nezařazeno“ zahrnuje jak vzorky, které nebylo možné osekvenovat (12), tak vzorky, jejichž změna se nacházela hluboko v nekódující části DNA genu TSC2 (2).

Nejčastější změnou v genu TSC2 u vyšetřovaných pacientů byla záměna cytosinu za thymin, která byla detekována ve 47,1 % případů. Druhou nejfrekventovanější změnou byla záměna adeninu za guanin, jež se vyskytovala ve 13,7 % vyšetřovaných vzorků. Obě zmíněné záměny patří z pohledu schopnosti zachytu DGGE do skupiny dobře detekovatelných drobných mutací, která zde byla dle očekávání zastoupena nejvíce případy (66,7 % všech detekovaných změn). Z této skupiny byly zachyceny ještě i následující záměny: thymin za cytosin (2 %) a drobné delece (3,9 %).

Pozitivním zjištěním bylo, že vybrané detekční metody byly schopny zachytit i 3 případy (2x záměna adeninu za thymin a 1x záměna cytosinu za guanin), kdy došlo k záměně bází se stejným počtem vodíkových vazeb. Tyto změny tvořily 5,9 % všech odhalených změn ve vyšetřovaných vzorcích a staly se tak druhou „nejpočetněji“ zastoupenou skupinou.

Kromě těchto již zmíněných změn byly odhaleny ještě další 2 mutace, které se však nacházely hluboko v nekódující části DNA TSC2 genu a u nichž není známa konkrétní záměna.

Bohužel se nezdařilo osekvenovat všechny vzorky, jež se v polyakrylamidovém gelu jevíly pozitivně. Vzorky, u kterých i přes opakované sekvenování nebyl získán výsledek, tvoří 23,5 % všech pozitivních vzorků, což při celkovém počtu 51 skutečných záměn mohlo v případě jejich úspěšné sekvenace zcela pozměnit pořadí v procentuálním zastoupení jednotlivých typů mutací.

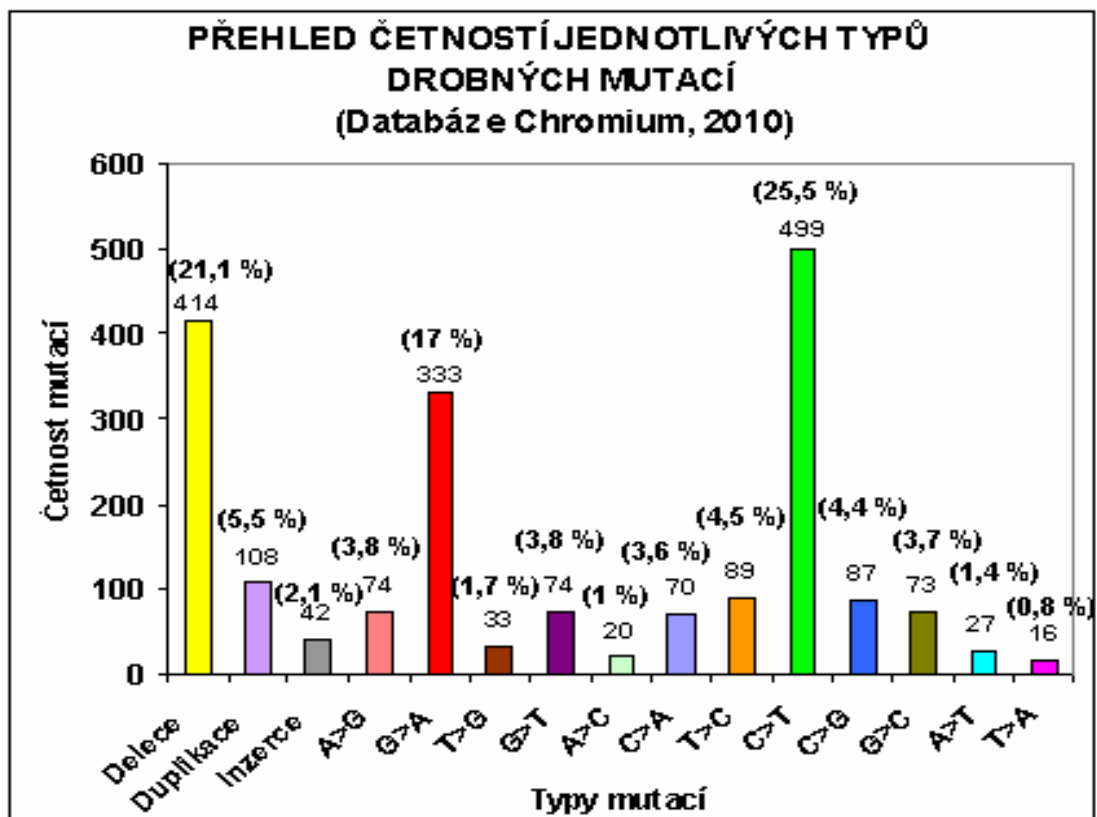
Jednotlivá procentuální zastoupení odhalených typů mutací byla dále porovnána se záznamy v mezinárodní databázi Chromium (*chromium.liacs.nl, 2010*). (viz. příloha č. 6).

Přehled četností a procentuálního zastoupení jednotlivých typů mutací v genu TSC2 v celosvětovém měřítku je uveden v grafu č. 5.

Graf č. 6 zobrazuje situaci po rozdělení těchto mutací opět do 3 skupin dle schopnosti detekce DGGE

**Graf č. 5:** Přehled četností a procentuálního zastoupení jednotlivých typů drobných mutací v genu TSC2 v celosvětovém měřítku (*chromium.liacs.nl, 2010*)

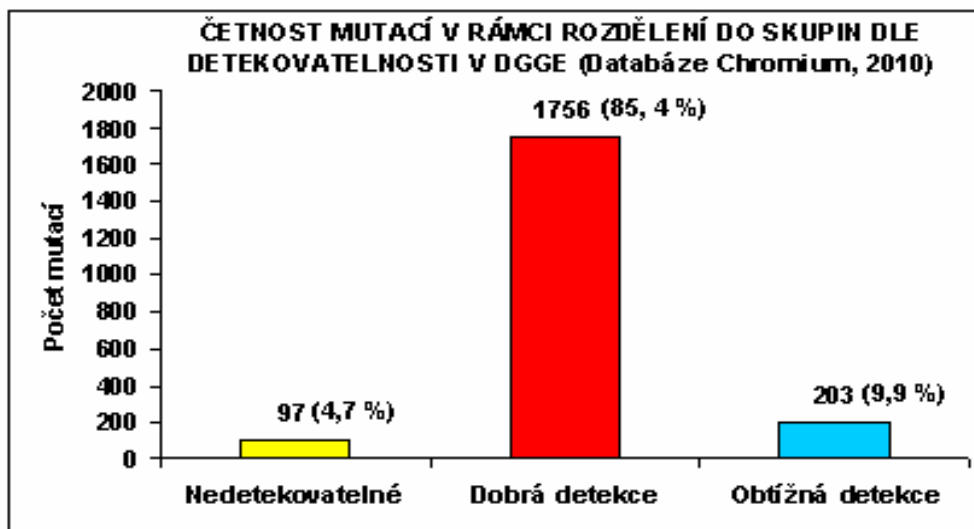
**Celkový počet mutací: 1959**



Do grafu č. 5. jsou zahrnuty pouze drobné změny (dobře a obtížněji detekovatelné) v sekvenci genu TSC2.

**Graf č. 6:** Četnost a procentuální zastoupení jednotlivých skupin mutací, které se mezi sebou liší mírou obtížnosti detekce mutací pomocí DGGE, v celosvětovém měřítku (*chromium.liacs.nl, 2010*)

**Celkový počet mutací: 2056**



V celosvětovém měřítku byla (stejně jako u vyšetřovaného souboru pacientů) nejčastější detekovanou změnou záměna cytosinu za thymin (25,5 %). Druhým nejfrekventovanějším typem mutace však byly (narozdíl od vyšetřovaného souboru pacientů) drobné delece (21,1 %) a záměna guaninu za adenin se nacházela (co do početnosti) až na třetí pozici (17 %). Procentuální zastoupení ostatních typů mutací byla poměrně vyrovnaná, jejich hodnota se pohybovala mezi 0,8 – 5,5 %.

Po rozdělení jednotlivých typů mutací z databáze Chromium do tří skupin dle obtížnosti detekce metodou DGGE bylo zjištěno, že převážná většina mutací (85,4 %) je v DGGE dobře detekovatelná. Tato skutečnost byla potvrzena i získanými výsledky z vyšetřovaného souboru pacientů, kde tato skupina tvořila 66,7 % všech zachycených mutací.

Obtížněji detekovatelné mutace tvořily dle databáze Chromium přibližně 10 % všech zaznamenaných případů – jsou tedy druhou nejfrekventovanější skupinou mutací, což bylo zjištěno i při analýze vyšetřovaného souboru pacientů (5,9 %).



Skupinou s nejnižším zastoupením (pouze 4,7 %) byly rozsáhlé změny v genu TSC2 (pro DGGE nedetekovatelné), což znamená, že používáním metody DGGE je teoreticky možné zachytit až 95,3 % všech mutací, jež se mohou vyskytnout v genu TSC2.

Co se týče stanovené hypotézy, že DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu je v záchytu mutací v genu TSC2 účinnější než DGGE po prosté PCR, došlo spíše k jejímu vyvrácení – viz. tabulka č. 10.

**Tabulka č. 10:** Srovnání úspěšnosti DGGE po prosté PCR a DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu v záchytu mutací v genu TSC2

Metoda	Delece	G>A	T>C	C>T	C>G	A>T	Hluboko v intronu	Falešně pozitivní (negativní)	Bez sekven.	Nevyš.	Celkem detek.
DGGE s HD	2	7	1	24	0	2	2	6	12	0	56
DGGE	2	7	1	24	1	2	2	0	7	6	46

Poznámky k tabulce č. 10:

Skupina „Nevyšetřeno“ zahrnuje vzorky, které se sice projeví pozitivně při analýze DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu, ale z technických důvodů již nebylo možné je vyšetřit i DGGE po prosté PCR.

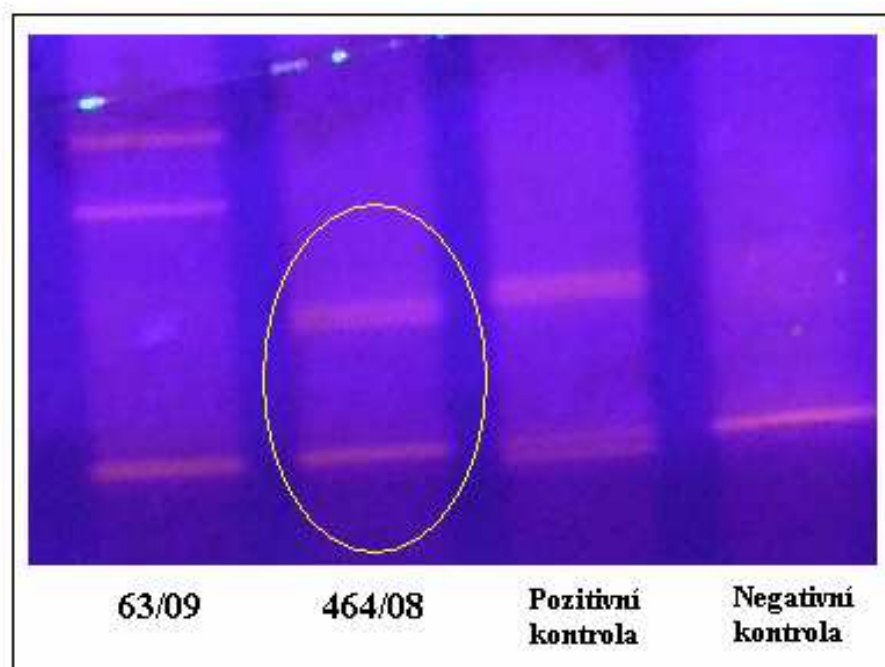
Za použití obou srovnávaných metod bylo na polyakrylamidovém gelu detekováno dohromady 56 pozitivních signálů. Po následné sekvenaci bylo zjištěno, že v 6-ti případech se jednalo pouze o falešně pozitivní signál a pozitivní signál vzorku 685/08 skrýval v exonu 10 změny 2. Celkově bylo tedy odhaleno 39 skutečných změn v sekvenci genu TSC2 z 51 vzorků pozitivních v polyakrylamidovém gelu.

Metoda DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu byla schopna zachytit celkem 38 skutečných mutací ve vyšetřovaných vzorcích (u 12-ti pozitivních vzorků nebylo, bohužel, možné získat výsledek sekvenace) . Na druhou stranu však označila jako pozitivní signál i 6 vzorků, ve kterých následnou sekvenací žádná mutace nalezena nebyla.

Metodou DGGE po prosté PCR bylo odhaleno 39 konkrétních mutací bez jakýchkoli falešně pozitivních vzorků. Dalších 7 vzorků se však nezdařilo osekvenovat a 6 vzorků jevících se pozitivně v DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu nebylo z technických důvodů, bohužel, v DGGE po prosté PCR již možné ověřit.

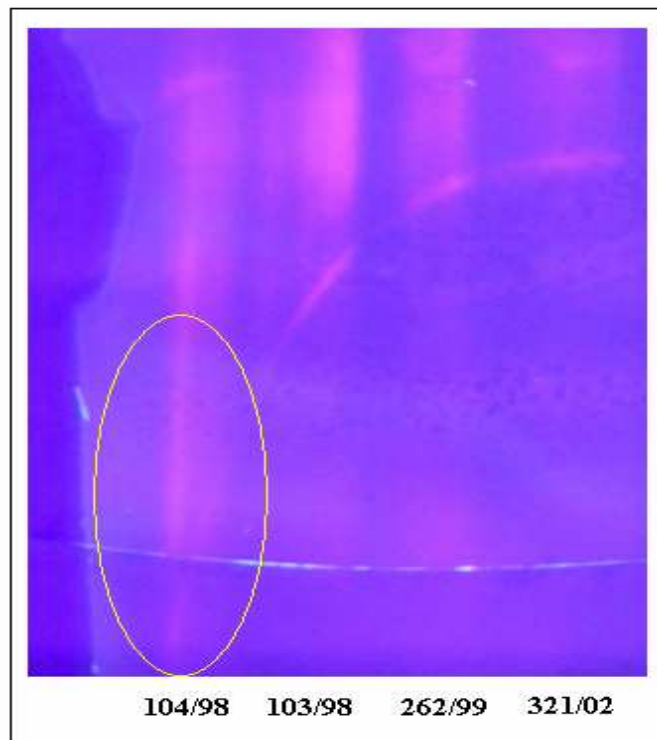
Co se týče záchytu jednotlivých typů mutací, tak převážnou většinu všech odhalených mutací byly schopné zachytit obě srovnávané metody. Obě metody také detekovaly ve dvou případech záměnu A>T (viz. obr. č. 8), u které se předpokládalo, že tento typ záměny je detekovatelný pouze metodou DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu. Naopak záměna C>G, u níž se taktéž předpokládalo, že ji lze zachytit jen DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu, byla nečekaně detekována jen metodou DGGE po prosté PCR. Při vyšetření této mutace v DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu se tento vzorek jevil negativně (viz. obrázek č. 9).

**Obrázek č. 8:** Záměna A>T u vzorku 464/08 v exonu 19 po vyšetření metodou DGGE po prosté PCR (pozitivní signál)



Pozn.: Fotka záměny A>T u vzorku 464/08 v exonu 19 po vyšetření metodou DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu a některé další, bohužel, nejsou k dispozici. Vzhledem k tomu, že zdejší pracoviště nebyla fotoaparátem vybavena nastalo, nebylo možné fotograficky dokumentovat všechny analyzované gely.

**Obrázek č. 9:** Záměna C>G u vzorku 104/98 v exonu 7 po vyšetření metodou DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu (negativní signál)



Pozn.: Fotka této záměny u vzorku 104/08 v exonu 19 po vyšetření metodou DGGE po prosté PCR s tvorbou heteroduplexu a některé další, bohužel, nejsou k dispozici. Vzhledem k tomu, že zdejší pracoviště nebyla fotoaparátem vybavena nastálo, nebylo možné fotograficky dokumentovat všechny analyzované gely.

### **7.3 Stanovení počtu odhalených mutací z celkového počtu všech mutací nacházejících se ve vyšetřovaném souboru pacientů**

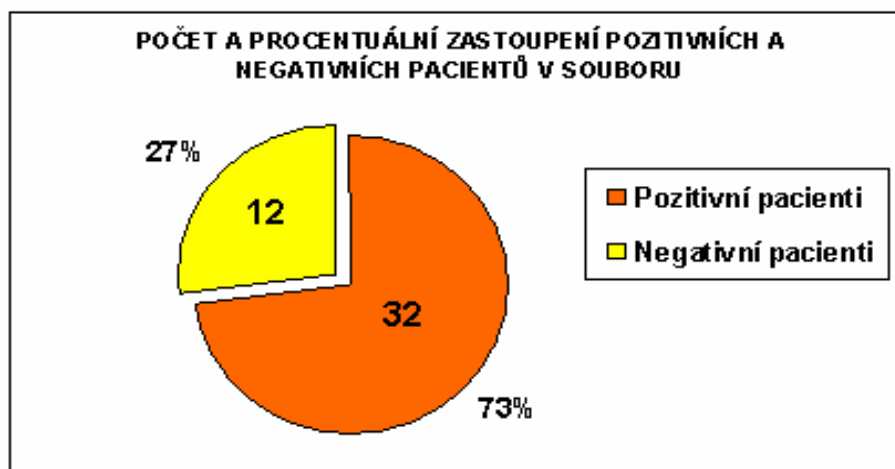
V rámci této práce bylo vyšetřeno 44 pacientů v 35 exonech genu TSC2 (viz. příloha č.4).

Použitými detekčními technikami (DGGE po prosté PCR nebo DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu) se podařilo u 32 (73 %) osob ve vyšetřovaných exonech genu TSC2 nalézt 1 nebo i více abnormalit v sekvenci - viz. graf č. 7.

U 12-ti (27 %) pacientů nebyla v žádném z 35-ti vyšetřovaných exonů genu TSC2 nalezena žádná abnormalita.

**Graf č. 7:** Počet a procentuální zastoupení pozitivních pacientů ve vyšetřovaném souboru

**Celkový počet vyšetřených pacientů: 44**

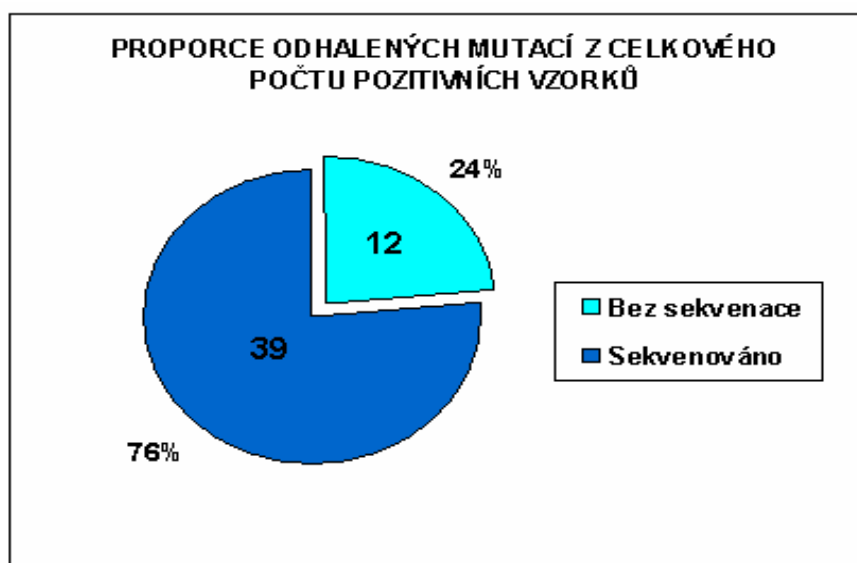


Dalo by se říci, že úspěšnost v záchytu mutací v genu TSC2 obou použitých metod byla srovnatelná. V souboru se totiž nenacházel ani jeden pacient, jehož pozitivita by byla stanovena na základě detekce mutace v genu TSC2 pouze jednou z obou použitých detekčních technik.

Z 51 vyšetřovaných vzorků, jež se v polyakrylamidovém gelu jeví pozitivně, se podařilo u 39 z nich, pomocí sekvenace odhalit konkrétní typ mutace - viz. graf č. 8.

**Graf č. 8:** Proporce odhalených typů mutací z celkového počtu pozitivních vzorků

**Celkový počet pozitivních vzorků: 51**



Přestože byla mutace v genu TSC2 objevena u 73 % všech vyšetřovaných pacientů, je nutné dodat, že konečný počet pacientů nesoucích mutaci v genu TSC2 může být vyšší - a to z těchto důvodů:

- V rámci této práce bylo vyšetřováno pouze 35 ze 41 exonů genu TSC2. Je možné, že někteří dosud negativní pacienti nesou mutaci právě v některém z nevyšetřovaných exonů.
- Tato práce byla zaměřena pouze na vyhledávání mutací v genu TSC2. Pacienti, u kterých nebyla mutace v tomto genu nalezena mohou nést mutaci v genu TSC1.

## 8 DISKUZE

Protože se ne vždy podaří nalézt mutaci zapříčiňující vznik choroby TSC u všech vyšetřovaných pacientů, vznikla snaha o zdokonalení používané detekční metody. V tomto případě se jednalo o metodu DGGE, jež byla doplněna o vytváření heteroduplexů v závěru PCR reakce, která předchází samotné analýze vyšetřovaných vzorků DNA v DGGE. Vytvoření heteroduplexových molekul mělo při analýze vyšetřovaných fragmentů DNA v polyakrylamidovém gelu s denaturačním gradientem umožnit i detekci takových změn, jako jsou záměny dvou nukleotidů s bázemi o stejném počtu vodíkových vazeb, jež tvoří přibližně 10 % všech mutací vyskytujících se v genu TSC2 (*Databáze Chromium, 2010*). Předpokládalo se tedy, že právě tento typ záměnových mutací při použití DGGE po prosté PCR (bez tvorby heteroduplexu) zůstává neodhalen.

Hlavní náplní této práce tedy bylo zjistit, zda DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu je (dle předpokladu) schopná zachytit více abnormalit vyskytujících se v genu TSC2 než DGGE po prosté PCR.

Srovnávací test obou zmíněných metod probíhal formou vyšetřování 35 exonů genu TSC2 u 44 pacientů, u nichž bylo na základě jejich klinických příznaků podezření na přítomnost tuberózní sklerózy (*viz. příloha č. 4*). Nutno ještě dodat, že u obou testovaných metod v této práci nebyl hodnocen jen počet zachycených kauzálních mutací, ale důležitý pro hodnocení byl počet všech zachycených abnormalit (neutrálních mutací i polymorfismů) v genu TSC2.

Výsledek této analýzy však překvapivě vyšší účinnost zdokonalené metody (DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu) nepotvrdil. Schopnost odhalovat abnormality v genu TSC2 byla u obou testovaných metod srovnatelná. Převážná většina mutací byla detekována oběma typy DGGE.

Dalším překvapením bylo, že záměny, při nichž nedochází ke změně v počtu vodíkových vazeb, byly kromě DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu detekovány i DGGE po prosté PCR (2 případy záměny A>T). Důvodem mohla být skutečnost, že již za těchto podmínek (*viz. str. 45, program PETRA\_63A*) mohlo docházet k vytváření heteroduplexů v průběhu PCR.

Tomuto jevu nasvědčuje i skutečnost, že i některé PCR produkty připravené prostou PCR bez tvorby heteroduplexu se v případě jejich positivity rozseparovaly

v polyakrylamidovém gelu na více jak dva proužky (např. vzorek 432/08 vyšetřovaný v exonu 23, viz. str. 54).

Průběh prosté PCR bez tvorby heteroduplexu (dle programu PETRA\_63A) je složen z 35 cyklů. V každém z nich dochází k denuraci analyzovaných dvouřetězců DNA, připojení příslušných primerů a následné syntéze nových protilehlých vláken DNA pomocí termostabilní polymerázy.

Počet 35-ti cyklů je již na horní hranici bezchybnosti a spolehlivosti PCR. Čím je počet cyklů PCR vyšší, tím větší je možnost vzniku nespecifických produktů v reakční směsi (*Šmarda et al., 2005*).

Z toho vyplývá, že v závěrečných cyklech PCR dle programu PETRA\_63A už nemusí být v reakční směsi dostatek primerů či funkční polymerázy. Amplifikované fragmenty DNA jsou tedy v reakční směsi v nadbytku, a pokud nedojde vždy po denaturační fázi k navázání příslušného primeru na rozdělená DNA vlákna či dosyntetizování protilehlého řetězce pomocí DNA-polymerázy, můžou spolu tato volná vlákna opět hybridizovat a vzhledem k tomu, že se jedná o vlákna relativně dlouhá, mohou vytvořit i heteroduplexové molekuly za teplotních podmínek, jež nabízí program PETRA\_63A (Čím více vodíkových vazeb ve vlákně DNA – čím delší vlákno, tím menší vliv na hybridizaci dvojice vláken mají drobné rozdíly v obou řetězcích).

Tvorbou heteroduplexových molekul v PCR probíhající dle programu PETRA\_63A jako vedlejšího neočekávaného produktu lze vysvětlit téměř stejnou účinnost obou srovnávaných detekčních metod. Pravděpodobně byly však získané výsledky do jisté míry ovlivněny i subjektivním hodnocením signálů v polyakrylamidovém gelu, protože převážná většina vyšetřovaných vzorků byla prvotně analyzována pomocí DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu (zde nebylo dopředu jasné, zda bude signál určitého vzorku pozitivní nebo negativní) a metodou DGGE po prosté PCR byly dále vyšetřovány již jen detekované pozitivní vzorky (zde byl již očekáván pozitivní signál).

Lidským faktorem byl nejspíše ovlivněn i výsledek vzorku 104/98 v exonu 7, kde došlo k záměně beze změny v počtu vodíkových vazeb (C>G). Ta byla odhalena pouze metodou DGGE po prosté PCR. Při analýze metodou DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu se tento vzorek jevil negativně. Nutno však dodat, že zmiňovaný vzorek byl v tomto případě nanesen do krajní jamky gelu, kde často dochází k nestejně rychlému průchodu PCR produktů gelem, což následně vede

k ohnutí výsledného proužku a tím pádem i k jeho ztíženému hodnocení. (Vzorek na okraji gelu by vůbec neměl být hodnocen).

I přes všechny tyto překvapivé poznatky se podařilo u 73 % vyšetřovaných osob nalézt použitými detekčními technikami v 35-ti exonech genu TSC2 1 nebo i více změn. Metoda DGGE po prosté PCR byla schopná odhalit 39 skutečných změn v genu TSC2, metoda DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu jich detekovala 38. Kromě toho však metoda DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu zachytila ještě dalších 6 pozitivních signálů, v nichž následnou sekvenací nebyla nalezena žádná změna. DGGE po prosté PCR tyto vzorky označila za negativní. Otázkou však zůstává, zda zde opět sehrál roli lidský faktor (sekvenovaly se i vzorky obsahující i pouhý náznak dvou a více proužků) nebo jestli je možné, aby DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu byla ještě citlivější metodou ke změnám v DNA než sekvenování, protože při záchytu mozaikově se vyskytujících mutací byla metoda DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu schopna detekovat mozaiku s mnohem nižším zastoupením mutovaných buněk než sekvenování (*Smutná, 2009*) – tento test proběhl taktéž ve FN v Olomouci.

Co se týče úspěšnosti záchytu jednotlivých typů mutací (hlavně drobných záměn), po zpracování dat z databáze mutací v genu TSC2 (*Chromium, 2010*) bylo zjištěno, že většina možných typů mutací (85,4 %) je analýzou v DGGE (obecně) dobře detekovatelná. Typy obtížněji zachytitelných mutací (záměny bez změny v počtu vodíkových vazeb) tvoří přibližně 10 % všech možných typů mutací genu TSC2. Dokonale optimalizovanou metodou DGGE by tedy bylo teoreticky možné zachytit až 95,3 % všech možných typů mutací v genu TSC2.

Nejčastěji detekovanou drobnou záměnou v genu TSC2 je dle uvedené databáze záměna cytosinu za thymin, druhou nejfrekventovanější skupinou jsou drobné delece a třetí záměna adeninu za guanin. Největší počet mutací byl dosud nalezen v exonu 40.

Některé výsledky získané v této práci korelují s daty uvedenými v celosvětové databázi. Dobře detekovatelné mutace tvořily 66,7 % všech odhalených mutací, obtížně detekovatelných záměn bylo zachyceno 5,9 %. Typem mutace s největším počtem detekcí byla i zde záměna cytosinu za thymin. Druhou nejčastější záměnou ale byla záměna adeninu za guanin. Nejvíce skutečných nálezů bylo detekováno v exonech 16 (8 změn) a 5 (8 změn). Procentuální zastoupení jednotlivých typů mutací uvedena v této práci ale nejsou konečná, protože ve 24 % (respektive



v 27,5 % - u 2 mutací v intronu konkrétní záměna také není uvedena) případů se nepodařilo zjistit konkrétní typy záměn v příslušných vzorcích ani opakovanou sekvenací.

V rámci této práce byly u 73 % všech vyšetřovaných pacientů v 35 exonech genu TSC2 nalezeny 1 a více změn ve struktuře DNA. Skutečný počet pozitivních pacientů ale bude o něco vyšší, protože u některých dosud negativních pacientů může být mutace skryta ve zbývajících dosud nevyšetřovaných šesti exonech genu TSC2 nebo v některém z exonů genu TSC1.

Detekční metoda DGGE je velmi citlivá ke změnám v sekvenci analyzované DNA a její rozšíření o tvorbu heteroduplexových molekul v závěru PCR je určitě přínosným řešením. Ale aby bylo možné využívat všech předností této citlivé detekce, je potřeba pečlivé a důkladné optimalizace této metody.

## 9 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byly shrnuty základní informace o klinických, histologických a genetických aspektech dědičného onemocnění komplexu tuberózní sklerózy. Dále zde byl uveden přehled nejčastěji používaných detekčních technik, jež umožňují odhalování mutací v zodpovědných genech TSC1 a TSC2.

Praktická část byla věnována rozdílům v detekčních schopnostech denaturační gradientové gelové elektroforézy po polymerázové řetězové reakci v závěru rozšířené o tvorbu heteroduplexů a denaturační gradientové gelové elektroforézy po prosté polymerázové řetězové reakci bez tvorby heteroduplexů. Vyšetřováním genu TSC2 u přiděleného souboru pacientů byla testována hypotéza - DGGE po PCR rozšířené o tvorbu heteroduplexových molekul DNA bude mít vyšší účinnost než DGGE po prosté PCR, protože bude navíc schopna odhalovat i mutace, v nichž při záměně dvou nukleotidů nedochází ke změně v počtu vodíkových vazeb mezi párem bází. Hypotézu se však potvrdit nepodařilo, protože obě srovnávané metody dosáhly srovnatelných výsledků. Dále bylo stanoveno procentuální zastoupení jednotlivých typů mutací detekovaných v genu TSC2 testovanými metodami u vyšetřovaného souboru pacientů. Po srovnání získaných výsledků s daty v mezinárodní databázi pro mutace genu TSC2 bylo zjištěno, že nejčastěji detekovanou mutací jsou záměny se změnou v počtu vodíkových vazeb. Záměnové mutace beze změny v počtu vodíkových vazeb tvoří přibližně desetinu všech detekovaných mutací v genu TSC2. Použitými detekčními technikami se podařilo ve vyšetřovaných exonech genu TSC2 odhalit jednu nebo i více abnormalit u 73 % analyzovaných pacientů.

## 10 POUŽITÁ LITERATURA A INTERNETOVÉ ADRESY

- Ahlsén G., Lindblom R., Gilberg C. (1994): Tuberous sclerosis in Western Sweden. *Arch. Neurol.* 51: 76-81.
- Aicher L.D., Campbell J. S., Raymond S. Y. (2001): Tuberin phosphorylation regulates its interaction with hamartin. *The Journal of Biological Chemistry.* 276 (24):21017-21021.
- Alper J.C., Holmes J.B. (1983): The incidence and significance of birthmarks in a cohort of 4,641 newborns. *Pediatr. Dermatol.* 1: 969-972.
- Astrinidis A., Henske E.P. (2005): Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Onkogene.* 24: 7475-7481.
- Astrinidis A., Khare L., Carsillo T., Smolarek T., Au K.S., Northrup H., Henske E.P. (2000): Mutational analysis of the tuberous sclerosis gene TSC2 in patients with pulmonary lymphangiomyomatosis. *J. Med. Genet.* 37 (1): 55 – 57.
- Astrinidis A., Senapedis W., Henske E.P. (2006): Hamartin, the tuberous sclerosis complex 1 gene product, interacts with polo-like kinase 1 in a phosphorylation-dependent manner. *Hum. Mol. Genet.* 15(2): 287-297.
- Au K.S., Williams A.T., Gambello M.J., Northrup H. (2004): Molecular genetic basis of tuberous sclerosis complex: from bench to bedside. *J. Child. Neurol.* 19(9): 699-709. Review.

- Au K.S., Williams A.T., Roach E.S., Batchelor L., Sparagana S.P., Delgado M.R., Wheless J.W., Baumgartner J.E., Roa B.B., Wilson C.M., Smith-Knuppel T.K., Cheung M.Y., Whittemore V.H., King T.M., Northrup H.(2007): Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. *Genet Med.* 9(2): 88-100.
- Bénit P., Kara-Mostefa A., Hadj-Rabia S., Munnich A., Bonnefont J.-P. (1999): Protein truncation test for screening hamartin gene mutations and report of a new disease-causing mutations. *Human Mutation* 14(5): 428-432.
- BLAST –Basic local alignment search tool [online]. [cit 2010-10-31]. Dostupné na: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Brook-Carter P.T., Peral B., Ward C.J., Thompson P., Hughes J., Maheshwar M.M., Nellist M., Gamble V., Harris P.C., Sampson J.R. (1994): Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease – a contiguous gene syndrom. *Nature Genet.* 8: 328-332.
- Castro M., Shepherd C.W., Gómez M.R., Lie J.T., Ryu J.H. (1995): Pulmonary tuberous sclerosis. *Chest.* 107: 189-195.
- Cohen B.A., Lehmann Ch.U. DermAtlas, John Hopkins University [online]. c 2000 – 2010. [cit 2010-11-1]. Dostupné na: <http://dermatlas.med.jhmi.edu/derm/result.cfm?OutputSet=1&BO=AND&Diagnosis=189>. (updated 24.10. 2010)
- Costello L.C., Hartman T.E., Ryu J.H. (2000): High frequency of pulmonary lymphangiomyomatosis in women with tuberous sclerosis complex. *Mayo Clin. Proc.* 75: 591-594.
- Crino P.B., Nathanson K.L., Henske E.P.( 2006): The tuberous sclerosis complex. *N. Engl. J. Med.* 355(13):1345-1356. Review.

- Crooks D.M., Pacheco-Rodriguez G., DeCastro, R.M., McCoy J.P. Jr., Wang J.A., Kumaki F., Darling T., Moss J. (2004): Molecular and genetic analysis of disseminated neoplastic cells in lymphangiomyomatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(50): 17462-17467.
- Curatolo P., Porfirio M.C., Manzi B., Seri S. (2004): Autism in tuberous sclerosis. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 8(6):327-32. Review.
- Dabora S.L., Jozwiak S., Franz D.N., Roberts P.S., Nieto A., Chung J., Choy Y.S., Reeve M.P., Thiele E., Egelhoff J.C., Kasprzyk-Obara J., Domanska-Pakiela D., Kwiatkowski D.J.(2001): Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. *Am. J. Hum. Genet.* 68(1): 64-80.
- Dabora S.L., Sigalas I., Hall F., Eng C., Vijg J., Kwiatkowski D.J. (1998): Comprehensive mutation analysis of TSC1 using two-dimensional DNA electrophoresis with DGGE. *Ann. Hum. Genet.* 62(6): 491-504.
- Ewalt D.H., Sheffield E., Sparagana S.P., Deigado M.R., Roach E.S. (1998): Renal lesion growth in children with tuberous sclerosis complex. *J. Urol.* 160 (1): 141-145.
- Feng J.H., Dinq M.P., Yanq C.W. (2003): [Analysis of gene mutation in patients with tuberous sclerosis complex with polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism.] *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 41 (3): 223-226.
- Franz D.N., Thomas C.W. Tuberous sclerosis, Medscape [online]. c 1994 – 2010. [cit 2010-11-1]. Dostupné na: <http://emedicine.medscape.com/article/1177711-overview>. (updated 1. 11. 2010)

- Gómez M. R., Sampson J. R., Whittemore V. H. (1999): Tuberos sclerosis complex. New York, Oxford University Press: 340p.
- Goodman M., Lamm S.H., Engel A., Shepherd C.W., Houser O.W., Gómez M.R. (1997): Cortical tuber count: a biomarker indicating neurologic severity of tuberous sclerosis complex. *J. Child. Neurol.* 12: 85-90.
- Harrison J.E., O'Callaghan F.J., Hancock E., Osborne J.P., Bolton P.F. (1999): Cognitive deficits in normally intelligent patients with tuberous sclerosis. *Am. J. Med. Genet.* 88: 642-646.
- Hass J., Mayer K., Rott H.-D. (2000): Tuberos sclerosis Type 1: Three novel mutations detected in exon 15 by a combination of HDA and TGGE. *Human Mutation* 16(1):88. *Brief.*
- Hengstschläger M., Rosner M. (2003): The cell cycle and tuberous sclerosis. *Progress in Cell Cycle Research.* 5: 43-48.
- High resolution melt [online]. c 2002 – 2010. [cit 2010-10-28]. Dostupné na: <http://hrm.gene-quantification.info>.
- Hirasaki S., Koide N., Ogawa A., Ujike K., Shinji T., Tsuji T. (1999): Tuberos sclerosis associated with multiple hematic lipomatous tumors and hemorrhagic renal angiomyolipoma. *Intern. Med.* 38:345-348.
- Hogervorst F.B.L. (1997): The Protein Truncation Test (PTT). *Promega Notes Magazine* 62: 7-7.
- Hosoya M., Naito H., Nihei K. (1999): Neurological prognosis correlated with variations over time in the number of subependymal nodules in tuberous sclerosis. *Brain Dev.* 21: 544-547.
- <http://www.thachers.org/dermatology.htm>. (Obrázek č. 1,d).

- Humphrey A., Higgins J.N.P., Yates J.R.W., Bolton P.F. (2004): Monozygotic twins with tuberous sclerosis discordant for the severity of developmental deficits. *Neurology* 62: 795. Brief.
- Hung C.C., Su Y.N., Chien S.C., Liou H.H., Chen C.C., Chen P.C., Hsieh C.J., Chen C.P., Lee W.T., Lin W.L., Lee C.N. (2006): Molecular and clinical analyses of 84 patients with tuberous sclerosis complex. *BMC Med. Genet.* 18(7): 72.
- Hunt A., Lindenbaum R.H. (1984): Tuberous sclerosis: A new estimate of prevalence within the Oxford region. *J. Med. Genet.* 21: 272-277.
- Cheadle J.P., Reeve M.P., Sampson J.R., Kwiatkowski D.J. (2000): Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Hum. Genet.* 107: 97-114.
- Choi J.E., Chae J.H., Hwang Y.S., Kim K.J. (2006): Mutational analysis of TSC1 and TSC2 in Korean patients with tuberous sclerosis complex. *Brain. Dev.* 28(7): 440-446.
- Inoki K., Ouyang H., Zhu T., Lindvall C., Wang Y., Zhang X., Yang Q., Bennett C., Harada Y., Stankunas K., Wang C.Y., He X., MacDougald O.A., You M., Williams B.O., Guan K.L. (2006): TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell.* 126(5): 955-968.
- Ishibashi Y., Hori Y. (1990): Tuberous sclerosis and neurofibromatosis: epidemiology, pathophysiology, biology and management, *Excerpta Medica, Amsterdam-New York-Oxford*: 338p.
- Johnson W.G., Yoshidome H., Stenroos E.S., Davidson M.M. (1991): Tuberous sclerosis and allied disorders: origin of the neuron-like cells in tuberous sclerosis tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 615: 211-219.

- Jones A.C., Austin J., Hansen N., Hoogendoorn B., Oefner P.J., Cheadle J.P., O'Donovan, M.C. (1999): Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem.* 45(8): 1133-1140.
- Jones A.C., Daniells C.E., Snell R.G., Tachataki M., Idziaszczyk S.A., Krawczak M., Sampson J.R., Cheadle J.P. (1997): Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated familial and sporadic tuberous sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 6: 2155-2161.
- Jones A.C., Sampson J.R., Hoogendoorn B., Cohen D., Cheadle J.P. (2000): Application and evaluation of denaturing HPLC for molecular genetic analysis in tuberous sclerosis. *Hum. Genet.* 106: 663-668.
- Jones A.C., Sampson J.R., Cheadle J.P. (2001): Low level mosaicism detectable by DHPLC but not by direct sequencing. *Human Mutation* 17(3): 233-234.
- Jozwiak S., Kasprzyk-Obara J., Domanska-Pakiela D. (2000): [Phacomatoses: structural substrate of epilepsy]. *Neurol. Neurochir. Pol. Suppl.* 1 (33): 243-251.
- Jozwiak S., Kawalec W., Dłuzewska J., Daszkowska J., Mirkowicz-Malek M., Michalowicz R. (1994): Cardiac tumors in tuberous sclerosis: their incidence and course. *Eur. J. Pediatr.* 153: 155-157.
- Jozwiak S., Kotulska K., Kasprzyk-Obara J., Domanska-Pakiela D., Tomyn-Drabik M., Roberts P., Kwiatkowski D. (2006): Clinical and genotype studies of cardiac tumors in 154 patients with tuberous sclerosis complex. *Pediatrics.*, 118(4): 1146-51.



- Jozwiak S., Schwartz R.A., Janniger C.K., Michallovicz R., Chmielik J. (1998): Skin lesions in children with tuberous sclerosis complex: their prevalence, natural course and diagnostic significance. *Int. J. Dermatol.* 37: 911-917.
- Kleymenova E., Ibraghinov-Beskrovnaya O., Kugoh H., Everitt J., Xu H., Kiguchi K., Landes G., Harris P., Walker C.L. (2001): Tuberin-dependent membrane localization of polycystin-1: a functional link between polycystic kidney disease and the TSC2 tumor suppressor gene. *Mol. Cell.* 7: 823-832.
- Kozłowski P., Roberts P., Dabora S., Franz D., Bissler J., Northrup H., Au K.S., Lazarus R., Domanska-Pakiela D., Kotulska K., Jozwiak S., Kwiatkowski D.J. (2007): Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA and genotype-phenotype correlations. *Hum. Genet.* 121 (3-4): 389-400.
- Krapp M., Baschat A.A., Gembruch U., Gloeckner K., Schwinger E., Reusche, E. (1999): Tuberous sclerosis with intracardiac rhabdomyoma in a fetus with trisomy 21. *Prenat. Diagn.*, 19 (7): 610-613.
- Krymskaya V.P. (2003): Tumour suppressors hamartin and tuberin: intracellular signalling. *Cell Signal.* 15(8): 729-39. Review.
- Lamb R.F., Roy Ch., Diefenbach D.J., Vinters H.V., Johnson M.W., Jay D.G., Hall A. (2000): The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. *Nature Cell Biology* 2: 281-287.
- Lim M.J., Foster G.J., Gite S., Ostendorff H., Narod S., Rothschild K. (2010): An ELISA-based high throughput protein truncation test for inherited breast cancer. *Breast Cancer Research* 12: R78.

- LOVD –Leiden open variation database, Tuberous sclerosis database [online]. [cit 2010-11-3]. Dostupné na: [http://chromium.liacs.nl/LOVD2/TSC/variants.php?select\\_db=TSC2&action=view\\_all](http://chromium.liacs.nl/LOVD2/TSC/variants.php?select_db=TSC2&action=view_all).
- Mayer K., Ballhausen W., Rott H.D.(1999): Mutation screening of the entire coding regions of the TSC1 and the TSC2 gene with the protein truncation test (PTT) identifies frequent splicing defects. *Hum. Mutat.* 14(5): 401-411.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 16: 1215 -1216.
- Miloloza A., Rosner M., Nellist M., Halley D., Bernaschek G., Hengstschlager M. (2000): The TSC1 gene product, hamartin, negatively regulates cell proliferation. *Hum. Molec. Genet.* 9: 1721-1727.
- MLPA-an introduction [online]. c 2010. [cit 2010-10-28]. Dostupné na: <http://www.mrc-holland.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVl/tHJIM\fa9FWO8KMqctOGIoqYwxaGF9Y>.
- Nellist M., van Slegtenhorst M.A., Goedbloed M., van den Ouweland A.M., Halley D.J., van der Sluijs P.( 1999): Characterization of the cytosolic tuberin-hamartin complex. Tuberin is a cytosolic chaperone for hamartin. *J. Biol. Chem.* 274: 35647-52.
- Nir A., Tajik A.J., Freeman W.K., Seward J.B., Offord K.P., Edwards W.D., Mair D.D., Gomez M.R. (1995): Tuberous sclerosis and cardiac rhabdomyoma. *Am. J. Cardiol.*, 76: 419-21.

- Northrup H., Au K.S.(2005): Tuberous Sclerosis Complex in: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. c. 1997-2006. [cit 2010-7-10].University of Washington, Seattle. Dostupné na: <http://www.genetests.org>.
- Obr. č. 2: Ideogram 9. chromosomu – gen TSC1  
NCBI Map Viewer [online]. [cit. 2010-7-28]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=9>.
- Obr. č. 3: Ideogram 16. chromosomu – gen TSC1  
NCBI Map Viewer [online]. [cit 2010-7-28]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=16>.
- Osborne J.P., Fryer A., Webb D. (1991): Epidemiology of tuberous sclerosis. *Ann. NY. Acad. Sci.* 615:125-127.
- Ozcelik H., Antebi Y.J., Cole D.E., Andrulis I.L.(1996): Heteroduplex and protein truncation analysis of the BRCA1 185delAG mutation. *Hum. Genet.* 98(3): 310-312.
- Patel U., Simpson E., Kingswood J.C., Saggarr-Malik A.K. (2005): Tuberose sclerosis complex: analysis of growth rates aids differentiation of renal cell carcinoma from atypical or minimal-fat-containing angiomyolipoma. *Clin. Radiol.* 60(6):665-73.
- Průša R., Lány J., Vejvalka J., Karger V., Kotaška K. (1998): Multimediální učebnice DNA diagnostiky [online]. Praha, 2. lékařská fakulta UK. Dostupné na: <http://www.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-dna/newlook/defa12.htm>.
- Rédei G.P. (2008): *Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics and informatics*. Springer: 2202p.

- Reed G.H., Wittwer C.T. (2004): Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high – resolution melting analysis. *Clinical Chemistry* 50(10): 1748-1754.
- Rendtorff N.D., Bjerregaard B., Frödin M., Kjaergaard S., Hove H., Skovby F., Brøndum-Nielsen K., Schwartz M., Danish Tuberous Sclerosis Group. (2005): Analysis of 65 tuberous sclerosis complex (TSC) patients by TSC2 DGGE, TSC1/TSC2 MPLA and TSC1 long-range PCR sequencing and report of 28 novel mutations. *Hum. Mutat.* 26 (4): 374-383.
- Roest P.A.M., Roberts R.G., van der Tuijn A.C., Heikoop J.C., van Ommen G.B., den Dunnen J.T. (1993): Protein truncation test (PTT) rapidly screen the DMD gene for translation terminating mutations. *Neuromuscular disorders.* 3(5-6): 391-394.
- Rosner M., Freilinger A., Hengstschläger M. (2004): Proteins interacting with the tuberous sclerosis gene product. *Amino Acids.* 27: 119-128.
- Roux P.P., Ballif B.A., Anjum R., Gygi S.P., Blenis J. (2004): Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(37): 13489-13494.
- Rowley S.A., O'Callaghan F.J., Osborne J.P. (2001): Ophthalmic manifestation of tuberous sclerosis: a population based study. *Br. J. Ophthalmol.* 85(4): 420-423.
- Sampson J.R. (2003): TSC1 and TSC2: genes that are mutated in the human genetic disorder tuberous sclerosis. *Biochemical Society Transactions.* 31, part 3: 592-596.

- Sampson J.R., Maheshwar M.M., Aspinwall R., Thompson P., Cheadle J.P., Ravine D., Roy S., Haan E., Bernstein J., Harris P.C. (1997): Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 843-851.
- Sanczak O., Nellist M., Goebloed M., Elfferich P., Wouters C., Maat-Kievit A., Zonnenberg B., Verhoef S., Halley D., van den Ouweland A. (2005): Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in diagnostic setting: genotype–phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex. *Eur. J. Hum. Genet.*, 13: 731-41.
- Sasongko T.H., Wataya-Kaneda M., Koterazawa K., Gunadi, Yusoff S., Harahap I.S.K., Lee M.J. Matsuo M., Nishio H. (2008): Novel mutations in 21 patients with tuberous sclerosis complex and variation of tandem splice-acceptor sites in TSC1 exon 14. *Kobe J. Med. Sci.* 54(1): E73-E81.
- Schouten J.P., McElgunn C.J., Waaijer R., Zwijnenburg D., Diepvens F., Pals G. (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 15/30(12): E57.
- Smalley S.L. (1998): Autism and tuberous sclerosis. *J. Autism Dev. Disord.* 28: 407-414.
- Smolarek T.A., Wessner L.L., McCormackm F.X., Mylet J.C., Menon A.G., Henske E.P. (1998): Evidence that lymphangiomyomatosis is caused by TSC2 mutations: chromosome 16p13 loss of heterozygosity in angiomyolipomas and lymph nodes from women with lymphangiomyomatosis. *Am. J. Hum. Genet.* 62(4): 810- 815.
- Smutná V. (2009): Srovnávání detekčních schopností DGGE a sekvencování mozaikového výskytu bodových mutací TSC genů.: 67p. (*Bakalářská práce*)

- Soucek T., Pusch O., Wienecke R., DeClue J.E., Hengstschlager M. (1997): Role of the tuberous sclerosis-2 gene product in cell cycle control. *J. Biol. Chem.* 272: 29301-29308.
- Steiner M.S., Goldman S.M., Fishman E.K., Marshall F.F. (1993): The natural history of the angiolioma. *J. Urol.* 150: 1782-1786.
- Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. (2005): *Základy molekulární biologie.* MU Brno, 188p.
- Tee A.R., Fingar D.C., Manning B.D., Kwiatkowski D.J., Cantley L.C., Blenis J. (2002): Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(21): 13571-13576.
- The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium (1993): Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell.* 75 (7): 1305-1315.
- Tindall E.A., Petersen D.C., Woodbridge P., Schipany K., Hayes V.M. (2009): Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Human Mutation* 30(6): 876-883.
- Torres O.A., Roach E.S., Delgado M.R., Sparagana S.P., Sheffield E., Swift D., Bruce D. (1998): Early diagnosis of subependymal giant cell astrocytoma in patient with tuberous sclerosis. *J. Child. Neurol.* 13 (4): 173-177.
- van Slegtenhorst M., de Hoogt R., Hermans C., [eds ] (1997): Identification of the tuberous sclerosis gene (TSC1) on chromosome 9q34. *Science.* 277: 805-808.

- van Slegtenhorst M., Nellist M., Nagelkerken B., Cheadle J., Snell R., van den Ouweland A., Reuser A., Sampson J., Halley D., van der Sluijs P. (1998): Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 products. *Human molecular genetics*. 7(6): 1053-1057.
- Verhoef S., Bakker L., Tempelaars A.M., Hesselting-Janssen A.L., Mazurczak T., Jozwiak S., Fois A., Bartalini G., Zonnenberg B.A., van Essen A.J., Lindhout D., Halley D.J., van den Ouweland A.M. (1999): High rate of mosaicism in tuberous sclerosis complex. *Am. J. Hum. Genet.* 64:1632-1637.
- Vokurka M., Hugo J., [eds ] (2006): *Velký lékařský slovník* [online]. Praha, Maxdorf: 1024p. Dostupné na: <http://lekarske.slovníky.cz>.
- von Ahsen N., Oellerich M., Schütz E. (2001): Limitations of genotyping based on amplicon melt temperature. *Clin. Chem.* 47: 1331–1332.
- Vrtěl R. (2007): *Tuberózní skleróza a komplexní přístup k její diagnostice.*: 111p. (*Habilitační práce*)
- Vrtěl R., Voutsinas G., Vodička R., Filipová H., Kotlářová P., Smutná V., Šimková D., Konvalinka A., Šantavá A., Šantavý J. (2008): Tuberózní skleróza: optimalizace postupu její DNA diagnostiky. *Cesk. Slov. Neurol. N* 71/104 (4): 478 – 482.
- Wang Q., Verhoef S., Tempelaars A.M.P, Bakker P.L., Vrtel R., Hesselting-Janssen A.L., Nellist M., Oranje A.P., Stroink H., Lindhout D., Halley D.J., van den Ouweland A.M. (1998): Identification of a large insertion and two novel point mutations (3671del8 and S1221X) in tuberous sclerosis complex (TSC) patients. *Hum. Mut.:* 331-332.
- Watson G.H. (1991): Tuberous sclerosis and allied disorders: Cardiac rhabdomyomas in tuberous sclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 615: 50-57.

- Webb D.W., Clarke A., Fryer A., Osborne J.P. (1996): The cutaneous features of tuberous sclerosis: a population study. *Br. J. Dermatol.* 135: 1-5.
- Webb D.W., Thomas R.D., Osborne J.P. (1993): Cardiac rhabdomyomas and their association with tuberous sclerosis. *Arch. Dis. Child.* 68: 367-370.
- Wiederholt W.C., Gómez M.R., Kurland L.T.(1985): Incidence and prevalence of tuberous sclerosis in Rochester, Minnesota, 1950 through 1982. *Neurology.* 35: 600-603.
- Wienecke R., König A., DeClue J.E. (1995): Identification of tuberin, the tuberous sclerosis-2 product. Tuberin possesses specific Rap1GAP activity. *J. Biol. Chem.* 270(27): 16409-16414.
- Wittwer C.T., Hermann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. (1997): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* 22: 130-131, 134-138.
- Xu L., Sterner C., Maheshwar M. M., Wilson P. J., Nellist M., Short P. M., Haines J. L., Sampson J. R., Ramesh V. (1995): Alternative splicing of the tuberous sclerosis 2 (TSC2) gene in human and mouse tissues. *Genomics.* 27: 475-480.
- Yang Q., Inoki K., Kim E., Guan K.L. (2006): TSC1/TSC2 and Rheb have different effects on TORC1 and TORC2 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(18): 6811-6816.
- Yu J., Astrinidis A., Henske E.P. (2001): Chromosome 16 loss of heterozygosity in tuberous sclerosis and sporadic lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 164(8 Pt 1):1537-1540.
- Zimmerhackl L.B., Rehm M., Kaufmehl K., Kurlemann G., Brandis M. (1994): Renal involvement in tuberous sclerosis complex: retrospective survey. *Pediatr. Nephrol.* 8: 451-457.



## 11 PŘÍLOHY

Příloha č.1:

Přehled DGGE primerů použitých k amplifikaci DNA ve vyšetřovaných exonech

Název primeru	Amplifikovaný exon	DMSO	Gradient	Relativní pozice v DGGE
<b>3</b>	3	•	40 - 80%	.-----
<b>14</b>	14		40 - 80%	55
<b>17</b>	17	•	40 - 80%	60
<b>35</b>	36	•	40 - 80%	57,5
<b>19</b>	19		30 - 70%	50
<b>23</b>	23		30 - 70%	47,5
<b>30a</b>	30	•	45 - 75%	60
<b>36</b>	37		30 - 70%	55
<b>10</b>	10		40 - 80%	52,5
<b>15</b>	15		40 - 80%	55
<b>22</b>	22	•	40 - 80%	60
<b>25,1</b>	25		40 - 80%	47,5
<b>16</b>	16	•	40 - 80%	57,5
<b>20,2</b>	20		40 - 80%	50
<b>29</b>	29	•	40 - 80%	60
<b>40</b>	41		40 - 80%	55
<b>12</b>	12	•	40 - 80%	50
<b>27</b>	27	•	40 - 80%	57,5
<b>33</b>	34	•	45 - 75%	.-----
<b>37-38</b>	38 - 39	•	45 - 75%	60
<b>6</b>	6	•	40 - 80%	60
<b>20,1</b>	20	•	45 - 75%	52,5
<b>25,2</b>	25	•	40 - 80%	57,5
<b>7</b>	7	•	40 - 80%	55
<b>21</b>	21	•	40 - 80%	57,5
<b>11</b>	11		40 - 80%	50
<b>32,2</b>	33	•	45 - 75%	60
<b>30b</b>	31	•	40 - 80%	55
<b>34</b>	35	•	40 - 80%	60
<b>2</b>	2		20 - 65%	37,5
<b>5</b>	5		40 - 80%	43
<b>26</b>	26	•	45 - 75%	55
<b>4</b>	4	•	30 - 70%	40
<b>9</b>	9	•	30 - 70%	50
<b>20,3</b>	20	•	30 - 70%	46

(Materiály Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny FN v Olomouci)

**Příloha č. 2:****Sekvence jednotlivých DGGE primerů – reverse pro gen TSC2 (1. část ze 2)**

<b>TSC2-03r</b>	ACGTCACCCATCCCAGCGTC
<b>TSC2-14r</b>	AGCCTCACCTACGGACACA
<b>TSC2-17r</b>	AGACATGCAAACAGCGCCAC
<b>TSC2-35r</b>	TAGCAGGACTGGATGGGAGC
<b>TSC2(40GC)-19r</b>	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCGTTTTTTTTTGAGGCTCGCAGTCTTTTGG
<b>TSC2-23r</b>	TGGCTTACCGAGAGACACA
<b>TSC2-30ar</b>	CAGAGAGGAGCCACATTGC
<b>TSC2(40GC)-36r</b>	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCGTTTTTTTTTTTTTTGACACAGCAGTGGGCACCT
<b>TSC2-10r</b>	TGTCTGGGTTCCTGGTGCT
<b>TSC2-15r</b>	AACAGACTCCAACACAACGC
<b>TSC2-22r</b>	GCTGCCGGGGCTTTCTGC
<b>TSC2-25,1r</b>	AGACACACTGATGCTGCG
<b>TSC2-16r</b>	CAGCTTCCAGGAACCACACC
<b>TSC2(40GC)-20,2r</b>	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCGCCCGGGTTTTGTCCAGGTAGTT
<b>TSC2-29r</b>	TGTGGGTGACTGGCAGAAAG
<b>TSC2(40GC)-40r</b>	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCGTGCCTGAGGGTTCAGGACTTT
<b>TSC2-12r</b>	AGACAGAGACAGGGCCAGGC

*(Materiály Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny FN v Olomouci)*

**Sekvence jednotlivých DGGE prumerů – reverse pro gen TSC2 (2. část ze 2)**

<b>TSC2-27r</b>	GCAGGCGCGGAGGAAAGGAA
<b>TSC2 (40GC) - 33r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGTTTTTTTTTTTATTACCCGAGCCACACAGC
<b>TSC2-37-38r</b>	GGCCTGTCCCACCAGCTCAC
<b>TSC2 (60GC) - 06r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCGCCCTTTTTAAGCCCCAGCCTCCCAGAAA
<b>TSC2 (40GC) - 20, 1r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGTTTTTTTTTTTTTACGGCCAGGTGCAAGTCAG
<b>TSC2-25, 2r</b>	ACACGGGCAGACGATGAGGT
<b>TSC2 (40GC) - 07r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGTTGTCCCATCCATGTG
<b>TSC2 (60GC) - 21r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCGCCCTTTTTTGAGAAGCCCGCACAGGTTA
<b>TSC2 (40GC) - 11r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGTTTTTTTTTTTTTACCAGCCAAAGCCCAAAG
<b>TSC2 (60GC) - 32, 2r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCGCCCTTTTTTTTTTTGGGAGCTGGAAGGCAAGGGA
<b>TSC2 (40GC) - 30br</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGTTTTTTTTTCTATGAGGCAGAGTGGCGCT
<b>TSC2 (60GC) - 34r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCGCCCTTTTTTTTTTTTGCCAGACTCCCTACCCACT
<b>TSC2 (40GC) - 02r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGAAACTCAGGCTCTGAATAG
<b>TSC2 (40GC) - 05r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGACAGGATCTCAATTCTTTTC
<b>TSC2-26r</b>	TGAAACCCAGCTTGCCCGTG
<b>TSC2 (40GC) - 04r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGTTTTTTTTTTTTTTTTTCGTCAAGGCCAGAGAAACC
<b>TSC2 (40GC) - 09r</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGAGCTCTCCCGTTCCTGCCAG
<b>TSC2-20, 3r</b>	CGGGCCCAACTCACTCATCCCTGGCCT

*(Materiály Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny FN v Olomouci)*

**Sekvence jednotlivých DGGE primerů – forward pro gen TSC2 (1. část ze 2)**

<b>TSC2 (60GC) -03f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCTCACGGCACTGCTCCAGTTG
<b>TSC2 (40GC) -14f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGAAGTGTACAGAGATGTGGC
<b>TSC2 (60GC) -17f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCTTGGCTCTGGCTTTTAC
<b>TSC2 (60GC) -35f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCTTTTAGTGATGCCACCCTGCCTCT
<b>TSC2 (40GC) -19f</b>	TAGCTTCCGCCTCTGTCTC
<b>TSC2 (40GC) -23f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGTTTTTTTTTTTGGATGTTTCCCTGCTGCCA
<b>TSC2 (60GC) -30af</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCAGAGATGGGTAAGGGGAG
<b>TSC2-36f</b>	TCAGCACTGGCCCCACAAAC
<b>TSC2 (40GC) -10f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGTTTTTTTTTTTAAAGCAAGCAGCTCTGACCCT
<b>TSC2 (40GC) -15f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGCATGAGCCTGTGTGTAAGTC
<b>TSC2 (60GC) -22f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCTTTTTTTTTTTTACCCCGGCTCCCCTGACCA
<b>TSC2 (40GC) -25,1f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTTGTCTCCCCTTCCC
<b>TSC2 (40GC) -16f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGTTTTTGGTGCTGTCTTAGGACTGCG
<b>TSC2-20,2f</b>	TTCAGGCCCAAAGACT
<b>TSC2 (60GC) -29f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCCGCCCGCGCCTTGGAGGCTGGTGGTTTTG
<b>TSC2-40f</b>	ACGCCTCCAGACTTACTGC
<b>TSC2 (40GC) -12f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCGAGGGGCAACACCGGCTCTTC

*(Materiály Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny FN v Olomouci)*

**Sekvence jednotlivých DGGE primerů – forward pro gen TSC2 (2. část ze 2)**

<b>TSC2 (40GC) -27f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCGACGGGCAAGCTGGGTTTCAC
<b>TSC2-33f</b>	CGGGCCCTCTGTGTTCCCTCCCTGTGG
<b>TSC2 (60GC) -37-38f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCGCGCCCGCCGCGCCCCGCGCCGATCAGCCTTCAGCACACGC
<b>TSC2-06f</b>	CGGGCCCTGACTAGACCACAGCCCGT
<b>TSC2-20,1f</b>	CGGGCCTCTGGCTACCCCGTGACCT
<b>TSC2 (60GC) -25,2f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCGCGCCCGCCGCGCCCCGCGCCGGCTTGAATAACTCTCCACC
<b>TSC2-07f</b>	GGGGGGGAGGCTGAAGGAGGTGGGAAG
<b>TSC2-21f</b>	TGCTAAGCCTCGGCTGTTC
<b>TSC2-11f</b>	AGTGGAAGTCAGCCTGTGTC
<b>TSC2-32,2f</b>	CAGCCAGGAGGAGAAGTCGC
<b>TSC2-30bf</b>	CGGGCCCTGTGTGTAGCCCCTCCTCCT
<b>TSC2-34f</b>	CTGGCCTAAGCTCCCTGTGG
<b>TSC2-02f</b>	GGGGGGTCTCTAGTCTGGAAAATGC
<b>TSC2-05f</b>	CGGGTGAGTGGGAGATGTAGATT
<b>TSC2 (40GC) -26f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCGTTTTTTTTTTTTGGTGATAGGTGGCTCGGC
<b>TSC2-04f</b>	CTGGCAGGCTCTGCTGATC
<b>TSC2-09f</b>	CGGCAACCTCACACATCCAT
<b>TSC2 (40GC) -20,3f</b>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCGTTTTTTTTTTTTTTACTGACTTGCACCTGGCCGT

*(Materiály Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny FN v Olomouci)*

**Příloha č. 3:****Sekvence primerů pro gen TSC2 bez GC-svorky (alterující za TSC2 primery s GC-svorkou)**








<b>TSC2-03f</b>	TCACGGCACTGCTCCATTG
<b>TSC2-14f</b>	AAGTGTCACGAGATGTGGC
<b>TSC2-17f</b>	GCTTGGCTCTGGCTTTCAC
<b>TSC2-35f</b>	TTTTAGTGATGCCACCCTGCCTCT
<b>TSC2-23f</b>	TTTTTTTTTTTGATGTTTCCCTGCTGCCA
<b>TSC2-30af</b>	CAGAGATGGGTAAGGGGAG
<b>TSC2-10f</b>	TTTTTTTTTTAAGCAAGCAGCTCTGACCCT
<b>TSC2-15f</b>	CATGAGCCTGTGTGTAAGTC
<b>TSC2-22f</b>	TTTTTTTTTTTACCCCGGCTCCCTGACCA
<b>TSC2-25,1f</b>	TTTTTTTTTTTTTTTTGGCTTGTCTCCCCTTCCC
<b>TSC2-16f</b>	TTTTTGGTGCTGTCTTAGGACTGCG
<b>TSC2-29f</b>	GCTTGAGGCTGGTGGTTTTG
<b>TSC2-12f</b>	AGGGGCAACACCGGCTCTTC
<b>TSC2-27f</b>	ACGGGCAAGCTGGGTTTCAC
<b>TSC2-37-38f</b>	GATCAGCCTTCAGCACACGC
<b>TSC2-25,2f</b>	GGCTTGAATAACTCTCCACC
<b>TSC2-26f</b>	TTTTTTTTTTTTGGTGATAGGTGGCTCGGC
<b>TSC2-20,3f</b>	TTTTTTTTTTTTTACTGACTTGCACCTGGCCGT
<b>TSC2-19r</b>	TTTTTTTTTGAGGCTCGCAGTCTTTTGG
<b>TSC2-36r</b>	TTTTTTTTTTTTTTGACACAGCAGTGGGCACCT
<b>TSC2-20,2r</b>	GGTTTTGTCCAGGTAGTT
<b>TSC2-40r</b>	TGCACTGGGGTCAGGACTTT
<b>TSC2-33r</b>	TTTTTTTTTTTATTACCCGAGCCACACAGC
<b>TSC2-06r</b>	TTTTTAAGCCCCAGCCTCCCAGAAA
<b>TSC2-20,1r</b>	TTTTTTTTTTTTTACGGCCAGGTGCAAGTCAG
<b>TSC2-07r</b>	GCCCTTGTCCCATCCATGTG
<b>TSC2-21r</b>	TTTTTTGAGAAGCCCGCACAGGTTA
<b>TSC2-11r</b>	TTTTTTTTTTTTTTCACCAGCCAAAGCCCAAAG
<b>TSC2-32,2r</b>	TTTTTTTTTTTTTGGGAGCTGGAAGGCAAGGGA
<b>TSC2-30br</b>	TTTTTTTTTCTATGAGGCAGAGTGGCGCT
<b>TSC2-34r</b>	TTTTTTTTTTTTTGCCAGACTCCCTACCCACT
<b>TSC2-02r</b>	CAAACCTCAGGCTCTGAATAG
<b>TSC2-05r</b>	ACAGGATCTCAATTCTTTTC
<b>TSC2-04r</b>	TTTTTTTTTTTTTTTTTCGTCAAGGCCAGAGAAACC
<b>TSC2-09r</b>	AGCTCTCCCGTTCCCTGCCAG

(Materiály Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny FN v Olomouci)

**Příloha č. 4:**

**Přehled detekovaných abnormalit v genu TSC2 pomocí prosté DGGE a DGGE s tvorbou heteroduplexu u vyšetřovaného souboru pacientů (1. část ze 3)**

Pacient	Číslo DNA	Primery (exony)																																				
		3	14	17	35	19	23	30a	36	10	15	22	25,1	16	20,2	29	40	12	27	33	37-38	6	20,1	25,2	7	21	11	32,2	30b	34	2	5	26	4	9	20,3		
1.	51/02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	?	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2.	53/03	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3.	137/98	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4.	183/05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5.	364/01	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6.	414/02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7.	481/04	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8.	507/07	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9.	104/98	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10.	103/98	.	•	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11.	262/99	.	.	.	.	.	.	•	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12.	321/02	.	•	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13.	414/04	.	•	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14.	584/06	.	•	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15.	501/07	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

 Detekováno jen DGGE	 Detekováno jen DGGE s HD	 Nejasné 2 proužky	 Pozitivní pacient
 Detekováno DGGE i DGGE s HD	 Vyšetřeno pouze DGGE s HD	 Pozitivní signál	





**Přehled detekovaných abnormalit v genu TSC2 pomocí prosté DGGE a DGGE s tvorbou heteroduplexu u vyšetřovaného souboru pacientů (3. část ze 3)**

Pacient	Číslo DNA	Primery (exony)																																						
		3	14	17	35	19	23	30a	36	10	15	22	25,1	16	20,2	29	40	12	27	33	37-38	6	20,1	25,2	7	21	11	32,2	30b	34	2	5	26	4	9	20,3				
31.	117/98	.	.	.	.	.	.	.	•	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32.	263/98	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
33.	447/08	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
34.	163/07	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
35.	790/06	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
36.	464/08	.	.	.	.	•	.	.	.	.	•	•	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
37.	438/06	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
38.	1104/08	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	•	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
39.	465/08	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
40.	432/08	•	•	.	.	.	.	.	.	.	•	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
41.	441/08	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
42.	347/09	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	•	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
43.	130/09	.	.	.	.	.	.	.	.	.	•	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
44.	691/09	.	.	.	.	.	.	?	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

- Detekováno jen DGGE
- Detekováno DGGE i DGGE s HD
- Detekováno jen DGGE s HD
- Vyšetřeno pouze DGGE s HD
- ? Nejasné 2 proužky
- Pozitivní signál
- Pozitivní pacient

Poznámka: Signál v exonu 2 byl u všech vyšetřovaných pacientů velmi špatně čitelný.

**Příloha č. 5:**

**Výsledky sekvenace jednotlivých pozitivních vzorků (1. část ze 2)**

Pacient	Číslo DNA	Primer (exon)	Signál v DGGE	Výsledek sekvenace
1.	465/08	21	2 proužky	sekvenční změna nalezena v nekódující sekvenci
2.	691/09	20,2	2 proužky	c.2251C>T R751X
		30a	?	negativní
3.	117/98	36	2 proužky	c.4959C>T, S1653S
4.	321/02	14	2 proužky	c.1578C>T,S526S
		15	2 proužky	c.1600-14C>T (intron)
5.	414/02	20,2	2 proužky	c.2251C>T, R751X
6.	414/04	14	2 proužky	c.1578C>T,S526S
		15	2 proužky	c.1600-14C>T (intron)
7.	57/09	10	2 proužky	c.1110G>A , Q370Q
		32,2	2 proužky	c.4269G>A , L1423L
8.	347/09	6	2 proužky	c.600-2A>T (intron)
9.	432/08	3	2 proužky	c.228C>T, H76H,
		14	2 proužky	c.1578C>T, S526S,
		15	2 proužky	c.1600-14C>T (intron)
		23	2 proužky	c.2713C>T, R905W
10.	438/06	5	2 proužky	c.482-3C>T (dle jednoho řetězce)
11.	464/08	15	2 proužky	c.1600-14C>T (intron) (dle 1 řetězce)
		19	2 proužky	c.2098-2A>T
		22	2 proužky	c.2580T>C,p.F860F
12.	790/06	5	2 proužky	c.482-3C>T(špatně hodnotitelná sekvence)
13.	447/08	5	2 proužky	c.482-3C>T(dle jednoho řetězce)
14.	683/08	5	2 proužky	c.482-3C>T(dle jednoho řetězce)
		20,2	?	negativní
15.	584/06	14	2 proužky	c.1578C>T,S526S,
		15	2 proužky	c.1600-14C>T (intron)
16.	148/01	5	2 proužky	c.482-3C>T
17.	63/09	19	2 proužky	delCTCT
		32,2	2 proužky	c.4269G>A, L1423L

Poznámka: Výsledky prvních 20-ti pacientů byly použity v ROC analýze

## Výsledky sekvenace jednotlivých pozitivních vzorků (2. část ze 2)

Pacient	Číslo DNA	Primer (exon)	Signál v DGGE	Výsledek sekvenace
18.	262/99	5	2 proužky	c.482-3C>T
		30a	2 proužky	c.3693_3696delGTCT
19.	685/08	10	2 proužky	c.1100G>A (R367Q), c.1110G>A (Q370Q)
20.	53/03	32,2	2 proužky	c.4269G>A
21.	104/98	27	2 proužky	nehodnotitelné
		29	?	negativní
		7	2 proužky	c. 729C>G (L243L)
22.	507/07	27	2 proužky	nehodnotitelné
		29	?	negativní
23.	103/98	14	2 proužky	c.1578C>T,S526S
		15	2 proužky	sekvenční změna nalezena v nekódující sekvenci
		22	?	bez sekvenace
24.	13/09	5	2 proužky	nehodnotitelné
		16	2 proužky	c.1833G>A, R611Q
25.	1104/08	5	2 proužky	c.482-3C>T
		37-38	2 proužky	nehodnotitelné
26.	501/07	7	2 proužky	bez sekvenace
27.	143/05	14	2 proužky	bez sekvenace
		15	2 proužky	c.1600-14C>T(intron)(dle ř řetězce,r-nehodnotitelné)
		4	?	negativní
28.	465/09	14	2 proužky	c. 1578C>T S526S
		15	2 proužky	bez sekvenace
30.	712/08	20,2	?	negativní
		21	2 proužky	bez sekvenace
32.	130/09	10	2 proužky	nehodnotitelné
33.	51/02	33	2 proužky	nehodnotitelné
34.	622/07	37-38	2 proužky	nehodnotitelné

	Detekováno jen DGGE
	Detekováno DGGE i DGGE s HD
	Detekováno jen DGGE s HD
	Vyšetřeno pouze DGGE s HD
?	Nejasné 2 proužky

**Příloha č. 6:**

**Přehled jednotlivých typů mutací v celosvětovém měřítku (Databáze Chromium, 2010)**

Exon	ROZSÁHLÉ ZMĚNY			DROBNÉ ZMĚNY													Celkem v exonech		
	Delece	Duplikace	Inzerce	Dobře detekovatelné										Obtížně detekovatelné					
				Delece	Duplikace	Inzerce	A>G	G>A	T>G	G>T	A>C	C>A	T>C	C>T	C>G	G>C		A>T	T>A
1	80	2	1	10	2	0	4	8	0	0	0	0	1	1	2	0	2	0	113
2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	2	0	7
3	1	0	0	4	3	2	2	5	2	2	0	2	0	24	0	0	1	0	48
4	0	0	0	5	3	1	1	1	1	4	0	0	0	1	5	0	1	0	23
5	0	0	0	8	2	2	2	9	1	1	1	1	1	15	2	2	1	1	49
6	0	0	0	1	0	0	3	6	0	0	0	1	0	4	2	2	0	0	19
7	1	0	0	5	2	0	2	3	0	4	0	2	2	3	3	3	0	1	31
8	0	0	0	7	1	0	0	3	0	1	0	4	1	3	0	2	0	0	22
9	0	0	0	9	5	2	6	10	1	3	0	2	4	2	2	0	0	0	46
10	0	0	0	4	0	0	0	32	5	4	0	1	2	8	4	1	1	0	62
11	0	0	0	9	1	0	0	4	4	1	0	0	2	4	0	0	1	0	26
12	1	0	0	5	1	0	0	8	2	3	1	6	0	7	2	2	0	0	38
13	0	0	0	6	1	2	4	3	2	0	1	2	1	18	2	1	0	0	43
14	1	0	0	6	1	0	9	7	0	3	0	2	3	35	1	1	1	0	70
15	2	0	0	5	1	1	1	3	0	1	0	3	0	13	0	1	0	0	31
16	2	0	0	5	2	0	4	48	1	4	0	0	5	25	6	2	1	0	105
17	0	0	0	3	3	0	0	6	0	1	0	1	2	0	0	2	1	0	19
18	0	0	0	13	6	6	1	2	0	1	0	1	5	21	0	1	1	0	58
19	0	0	0	7	5	1	2	8	1	1	0	0	3	2	0	1	0	0	31
20	1	0	0	12	2	0	5	3	2	0	1	1	2	13	1	1	0	2	46
21	0	0	0	12	6	2	2	7	4	2	1	5	8	9	1	0	2	2	63
22	0	0	0	5	4	2	2	1	0	2	0	0	11	12	7	3	2	1	52
23	0	0	0	2	2	0	0	16	0	2	0	2	2	25	1	1	1	0	54
24	0	0	0	5	5	2	3	1	2	4	1	2	0	3	2	2	0	0	32
25	0	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	5
26	2	0	0	7	6	3	1	6	0	2	0	2	5	16	1	6	0	0	57
27	0	0	0	6	4	1	1	4	0	0	1	1	4	5	2	3	1	0	33
28	0	0	0	7	1	1	0	4	1	0	0	1	0	8	0	0	0	0	23
29	1	0	0	5	4	0	1	10	0	4	0	1	1	35	1	1	0	0	64
30	0	0	0	20	3	2	0	3	1	1	0	4	0	13	3	0	0	0	50
31	0	0	0	2	0	0	1	6	0	0	0	1	0	3	3	0	0	0	16
32	0	0	0	4	2	0	0	11	0	2	0	0	0	4	7	0	4	1	35
33	0	0	0	33	4	4	1	14	0	6	0	5	0	41	4	3	0	1	116
34	0	0	0	22	0	1	0	4	1	1	2	1	1	10	0	2	0	2	47
35	0	0	0	8	5	3	1	7	0	2	1	1	1	8	3	2	2	2	46
36	0	0	0	20	6	0	0	12	1	0	0	1	3	7	7	0	0	0	57
37	0	0	0	22	4	2	7	12	0	2	1	2	3	25	2	3	1	1	87
38	0	0	0	17	4	0	1	8	0	1	1	1	1	30	3	2	0	0	69
39	0	0	0	10	2	0	5	12	1	3	0	5	3	10	1	8	0	2	62
40	0	0	0	64	2	1	0	16	0	2	8	3	12	23	4	3	0	0	138
41	1	0	0	17	3	1	0	9	0	2	0	3	0	12	3	12	0	0	63
<b>Celkem typy mutací</b>	<b>93</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>414</b>	<b>108</b>	<b>42</b>	<b>74</b>	<b>333</b>	<b>33</b>	<b>74</b>	<b>20</b>	<b>70</b>	<b>89</b>	<b>499</b>	<b>87</b>	<b>73</b>	<b>27</b>	<b>16</b>	<b>2056 (100 %)</b>
<b>Celkem skupiny</b>	<b>97 (4,7 %)</b>			<b>1756 (85,4 %)</b>										<b>203 (9,9 %)</b>					