

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Markéta Juřicová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**CNV analýza pacientů s mentální retardací:
stanovení kandidátních genů pro účely masivně
paralelního sekvenování**

Bakalářská práce

Markéta Juřicová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Čapková

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Zuzany Čapkové. Veškeré zdroje uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

SOUHRN

Mentální retardace (MR) je závažné onemocnění, které postihuje celosvětově 1–3% dětí. Geneticky podmíněná MR může být vyvolána změnami na mnoha úrovních celé genetické informace od chromozomálních aberací až po změny jediného genu. Celosvětově jsou popsány stovky genů asociovaných s touto nemocí, ale testování takového množství genů u pacientů s MR je nákladné, zdlouhavé a má nízkou efektivitu.

V této práci byla provedena CNV analýza 59 pacientů s MR metodami SNP array a MLPA po vyloučení chromozomálních aberací a Syndromu fragilního X. Klinický význam nalezených CNV a anotace genů zasazených těmito variantami byly stanoveny pomocí genetických databází (ClinVar, DECIPHER, OMIM) pro účely masivně paralelního sekvenování (MPS).

Celkem bylo anotováno 42 genů, které jsou asociovány s poškozením centrálního nervového systému, abnormálním vývojem *corpus callosum*, degenerací/špatnou funkcí neuronů v mozku a/nebo epilepsií, popř. abnormálním EEG.

Tyto geny považujeme za významné z hlediska genetické diagnostiky mentální retardace, a proto navrhuje jejich zařazení do panelů masivně paralelního sekvenování, které by umožnilo identifikovat přítomnost sekvenčních změn těchto genů. Důkladný výběr genů pro tyto účely by mohl zvýšit efektivitu a snížit finanční náklady celé genetické diagnostiky pacientů s mentální retardací.

SUMMARY

Intellectual disability (ID) is a serious disorder that affects 1–3 % of children worldwide. Genetic conditioned ID can be induced by changes at many levels of the entire genetic information, such as chromosomal aberrations or changes in single genes. Hundreds of genes were associated with this disorder, but the testing of so much genes in ID patients is expensive, time-consuming and low-efficiency.

CNV analysis was prepared in 59 patients with ID by MLPA and SNP array. Chromosomal aberrations and Fragile X syndrome were excluded. The clinical significance of the found CNVs and the annotation of the affected genes was determined using genetic databases (ClinVar, DECIPHER, OMIM) for purposes of next generation sequencing (NGS).

In total, 42 annotated genes that are associated with central nervous system damage, abnormal development of the *corpus callosum*, degeneration/malfunction of brain's neurons and/or epilepsy, alternatively abnormal EEG.

We consider these genes to be important for genetic diagnosis of intellectual disability, and therefore we suggest their inclusion in next generation sequencing panels to identify the presence of sequence changes in these genes. A thorough selection of genes for these purposes could increase efficiency of testing and so does reduce the cost of the entire genetic diagnosis of intellectual disability patients.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Zuzaně Čapkové, za cenné rady, ochotu a čas, který mi během zpracování této práce věnovala. Dále bych ráda poděkovala pracovnímu kolektivu Ústavu lékařské genetiky a RNA laboratoře Fakultní nemocnice Olomouc a Univerzity Palackého v Olomouci. Tato práce vznikla za finanční podpory SUG 87_82 a IGA_LF_2019_003.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Klinický popis mentální retardace	3
3.2	Kategorie mentální retardace	3
3.3	Příčiny mentální retardace	4
3.3.1	Exogenní příčiny mentální retardace.....	4
3.3.2	Endogenní příčiny mentální retardace.....	5
3.4	Genetické příčiny mentální retardace	5
3.4.1	Chromozomální abnormality.....	5
3.4.1.1	Numerické chromozomální abnormality	5
3.4.1.2	Nebalancované strukturní chromozomální abnormality	7
3.4.2	Variabilita počtu kopií (copy number variants, CNVs)	7
3.4.2.1	Popis vybraných CNV	8
3.4.3	Monogenní onemocnění	9
3.4.4	Polygenní dědičnost	11
3.4.5	Mitochondriální onemocnění	11
3.5	Genetické diagnostické nástroje	11
3.5.1	Konvenční G-pruhování	11
3.5.2	CNV analýza	12
3.5.2.1	MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).....	12
3.5.2.2	aCGH (Array Comparative Genomic Hybridization).....	14
3.5.2.3	SNP array (Single Nucleotide Polymorphism).....	15
3.5.2.4	Sangerovo sekvenování	16
3.5.2.5	Masivně paralelní sekvenování (MPS)	17
3.5.3	Genetické databáze.....	19
4	MATERIÁL A METODY	20
4.1	Biologický materiál	20
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	20
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	21
4.4	Použitý software	22
4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	22

4.5.1	Stanovení karyotypu k vyloučení chromozomálních aberací.....	22
4.5.2	Izolace DNA z plné krve Millerovou metodou	23
4.5.3	Stanovení koncentrace DNA	25
4.5.4	Vyloučení Syndromu Fragilního X	25
4.5.5	MLPA	25
4.5.6	SNP array	27
4.5.7	Klinické vyhodnocení nalezených CNV a anotace genů	28
5	VÝSLEDKY	29
5.1	Pacienti	29
5.2	Analýza fenotypů pacientů	29
5.3	Výsledky metody MLPA a SNP array	29
5.3.1	Patogenní varianty	29
5.3.2	Varianty s neznámým významem	31
6	DISKUZE.....	33
7	ZÁVĚR.....	35
8	LITERATURA.....	36

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

aCGH	komparativní genomová hybridizace na čipu (z angl. array comparative genomic hybridization)
ADHD	porucha pozornosti s hyperaktivitou (z angl. attention deficit hyperactivity disorder)
ASD	porucha autistického spektra (z angl. autism spectrum disorder)
CMA	analýza chromozomů pomocí techniky mikroarray (z angl. chromosomal microarray analysis)
CNS	centrální nervový systém
CNV	variabilita počtu kopií (z angl. copy number variants)
ddNTP	dideoxynukleotid
dH ₂ O	deionizovaná voda
dNTP	deoxynukleotid
DQ	dávkový kvocient
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EPI	epilepsie
H ₂ O	voda
HCl	kyselina chlorovodíková
ID	mentální retardace (z angl. intellectual disability)
IQ	intelligenční kvocient
kb	tisíc párů bází
KCl	chlorid draselný
KHCO ₃	hydrogenuhličitan draselný
LOH	ztráta heterozygosity (z angl. loss of heterozygosity)
Mb	milionů párů bází
MELAS	syndrom mitochondriální myopatie, encefalopatie, laktátové acidózy a iktu (stroke) podobné příhody
MLPA	multiplexová PCR (z angl. multiplex ligation-dependent probe amplification)
MPS	masivně paralelní sekvenování
MR	mentální retardace
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
NARP	syndrom neurogení svalové slabosti s ataxií a <i>Retinitis Pigmentosa</i>

NGS	sekvenování nové generace=masivně paralelní sekvenování (z angl. new generation sequencing)
NH ₄ Cl	chlorid amonný
p. a.	pro analýzu
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PK	periferní krev
POP	perzistentní organický polutant (z angl. Persistent organic pollutant)
SDS	dodecylsulfát sodný
Sm	směrnice
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (z angl. single nucleotide polymorphism)
SOP	standartní operační postup (standard operating procedure)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan nebo (2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol)
VVV	vrozené vývojové vady
ZL	zdravotní laborant

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Přehled příčin mentální retardace	4
Obrázek 2: Karyotyp Downova syndromu 47, XY, +21	6
Obrázek 3: Růst prevalence Downova syndromu s věkem matky	6
Obrázek 4: Schéma lokalizace genů na chromozomu X zodpovědných za vznik MR	10
Obrázek 5: Mužský karyotyp 46, XY (G-pruhování)	12
Obrázek 6: Popis sondy MLPA	12
Obrázek 7: Schéma MLPA reakce	13
Obrázek 8: Schéma aCGH	15
Obrázek 9: Ukázka technologie SNP microarray	16
Obrázek 10: Schéma Sangerova sekvenování	17
Obrázek 11: Schéma MPS na platformě Illumina	18
Obrázek 12: Schéma MPS na platformě IonTorrent	19
Obrázek 13: Graf znázorňující výskyt klinických nálezů u sledovaných pacientů	29

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled syndromů nejčastěji spojovaných s mentální retardací.....	7
Tabulka 2: Vztah dávkového kvocientu a počtu kopií.....	14
Tabulka 3: Příprava Ligase-65 master mixu pro jednu reakci	26
Tabulka 4: Složení polymerázového master mixu pro jednu reakci	26
Tabulka 5: Program termocykléru pro PCR.....	26
Tabulka 6: Nalezené patogenní CNV a anotované geny.....	30
Tabulka 7: Klinické nálezy u pacientů nesoucích patogenní CNV	30
Tabulka 8: Nalezené CNV s neznámým významem a anotované geny.....	31
Tabulka 9: Přehled klinických znaků pacientů s CNV neznámého významu.....	32

1 ÚVOD

Mentální retardace (MR) je závažné onemocnění, které postihuje celosvětově 1–3% dětí. Příčina tohoto onemocnění může pocházet z prostředí a/nebo může být geneticky podmíněna. Genetické vady pacientů s mentální retardací jsou sledovány přípravou konvenčního karyotypu již desetiletí. Avšak nalezené cytogenetické změny dokázaly vysvětlit pouze zlomek případů s MR. Až příchod čipových technologií umožnil studovat genetické aberace pacientů s větším rozlišením a odhalit tak celou řadu variabilit počtu kopií genomu (CNV), které jsou a/nebo mohou být příčinou tohoto onemocnění. Přes veškeré snahy se u mnoha pacientů nedaří odhalit přesnou genetickou příčinu mentální retardace. Velkou nadějí v této oblasti přináší masivně paralelní sekvenování (MPS), které umožnilo sledování jednonukleotidových změn DNA v mnoha genech a u mnoha pacientů paralelně. Celosvětově jsou popsány stovky genů asociovaných s touto nemocí. Avšak testování takového množství genů u pacientů s MR je stále ještě nákladné, zdoluhavé a má nízkou efektivitu.

Vzhledem k tomu je zapotřebí vybrat vhodné geny, které by mohly sehrát klíčovou roli v etiologii MR. Cílem této práce je sledovat variabilitu počtu kopií v genomu (CNV) u jedinců s mentální retardací (MR) pomocí metod single nucleotide polymorphisms array (SNP array) a multiplexové PCR (MLPA). U nalezených CNV budou anotovány zasažené geny, které mohou být dále studovány pomocí technik MPS ke zjištění přítomnosti sekvenčních změn těchto genů.

Důkladný výběr genů pro účely MPS, by mohl zvýšit efektivitu a snížit náklady celé genetické diagnostiky u pacientů s mentální retardací a tím také rozšířit naše znalosti genetického původu tohoto onemocnění.

2 CÍLE PRÁCE

1. Literární rešerše genetické podstaty mentální retardace a možností její genetické diagnostiky.
2. CNV analýza pacientů s MR metodami MLPA a SNP array.
3. Anotace genů zasažených CNV.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Klinický popis mentální retardace

Mentální retardace (MR) je trvalé snížení inteligence v důsledku poškození mozku nebo nedostatečné funkce nervové soustavy (Švarcová-Slabinová, 2011). Prevalence MR se liší v závislosti na věku pacientů, jak dokládají dva australské průzkumy, ve kterých byla prevalence 3,3 : 1000, pokud bylo věkové rozmezí 20 až 50 let, ale zvýšila se na 14,3 : 1000, pokud byl věkový rozsah snížen na 6 až 15 let (Chiurazzi *et Pirozzi*, 2016). U Evropanů se prevalence MR pohybuje mezi 1 : 700 až 1 : 1100. Pacienti trpí různou měrou motorické, řečové, sociální a poznávací nedostatečnosti (Valenta *et al.*, 2012). Mentální retardace se může vyskytovat jako samostatné postižení jedince, nebo může být kombinována s jinými onemocněními a vadami (ASD, schizofrenie, parkinsonismus, ADHD, epilepsie, kongenitální malformace aj.). Tato nemoc má celoživotní dopad na nemocného i členy jeho rodiny (Winnepenninckx *et al.*, 2013).

3.2 Kategorie mentální retardace

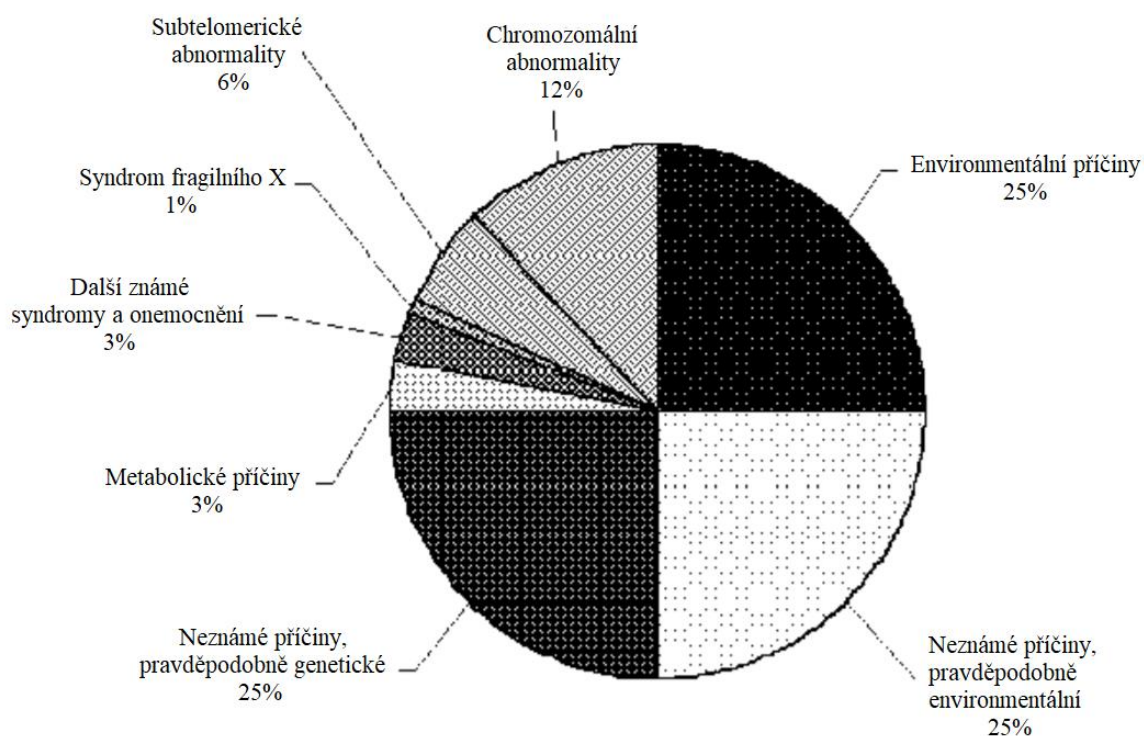
Mentální retardaci klasifikujeme v šesti základních kategoriích na základě inteligenčního kvocientu (IQ). IQ definuje míru inteligence, jinými slovy poměr mezi „mentálním“ a skutečným věkem jedince. Tato měřitelná veličina vypovídá o schopnosti člověka učit se, rozumět, rozhodovat a řešit problémy, popř. o schopnosti komunikovat s ostatními a starat se o sebe, a také o tom, zda je jedinec schopen tyto činnosti vykonávat přiměřeně svému věku (Švarcová-Slabinová, 2011).

- Lehká mentální retardace (F70) je charakterizována IQ od 50 do 69. Tito jedinci mají problémy se čtením a psaním, ale zvládají dobře komunikovat s ostatními a v dospělosti jsou schopni žít samostatně.
- Střední mentální retardace (F71) se vyznačuje hodnotami IQ od 35 do 49, které umožňují postiženým jedincům naučit se základy čtení, psaní a počítání. Mohou mít problémy s komunikací, ve většině případů nejsou schopni žít samostatně.
- Těžká mentální retardace (F72) se pohybuje v rozmezí 20–34. U těchto pacientů je narušena motorika a vývoj centrálního nervového systému.
- Hluboká mentální retardace (F73) je popisována při hodnotách IQ nižších než 20 a vyznačuje se inkontinencí, neschopností se samostatně starat o vlastní potřeby a pouze neverbální komunikací.

- Jiná mentální retardace (F78) by měla být indikována pouze tehdy, je-li stanovení stupně mentální retardace nesnadné či nemožné z důvodu jiného postižení. Používá se např.: u nevidomých, neslyšících jedinců, u osob s poruchou autistického spektra apod.
- Nespecifická mentální retardace (F79) je popisována u pacientů, u kterých neexistuje dostatek informací sloužících k zařazení do výše uvedených kategorií (Švarcová-Slabinová, 2011).

3.3 Příčiny mentální retardace

Příčina mentální retardace je odhalena pouze v polovině případů. Bylo odhadnuto, že vznik mentální retardace je v 50 % případů způsoben exogenními (získanými) vlivy a v 50 % případů vlivy endogenními (vrozenými) (Obr. 1, Winnepenninckx *et al.*, 2013).



Obrázek 1: Přehled příčin mentální retardace (převzato a upraveno z Winnepenninckx *et al.*, 2013)

3.3.1 Exogenní příčiny mentální retardace

Do exogenních příčin vzniku mentální retardace řadíme vlivy prostředí již od prenatálního období. Organismus gravidní ženy může být v průběhu těhotenství vystaven nežádoucím vlivům, jako jsou např.: drogy, alkohol, působení ionizujícího záření, infekce apod. Také předčasný porod a nízká porodní hmotnost mohou způsobit vznik mentální retardace.

Z perinatálních vlivů jsou nejvýznamnějšími faktory přidušení novorozence v porodních cestách a mechanická poškození hlavy dítěte. V postnatálním období může dojít k poškození mozku např. v důsledku různých onemocnění (meningitida, encefalitida atd.) nebo úrazu hlavy (Matulay *et al.*, 1986; Winnepenninckx *et al.*, 2013).

3.3.2 Endogenní příčiny mentální retardace

Endogenní příčiny mají genetický původ od chromozomálních abnormalit, přes submikroskopické změny, známé jako variabilita počtu kopií genomu (CNV), až po monogenní, polygenní nebo mitochondriální onemocnění (Winnepenninckx *et al.*, 2013; Aloui *et al.*, 2017).

3.4 Genetické příčiny mentální retardace

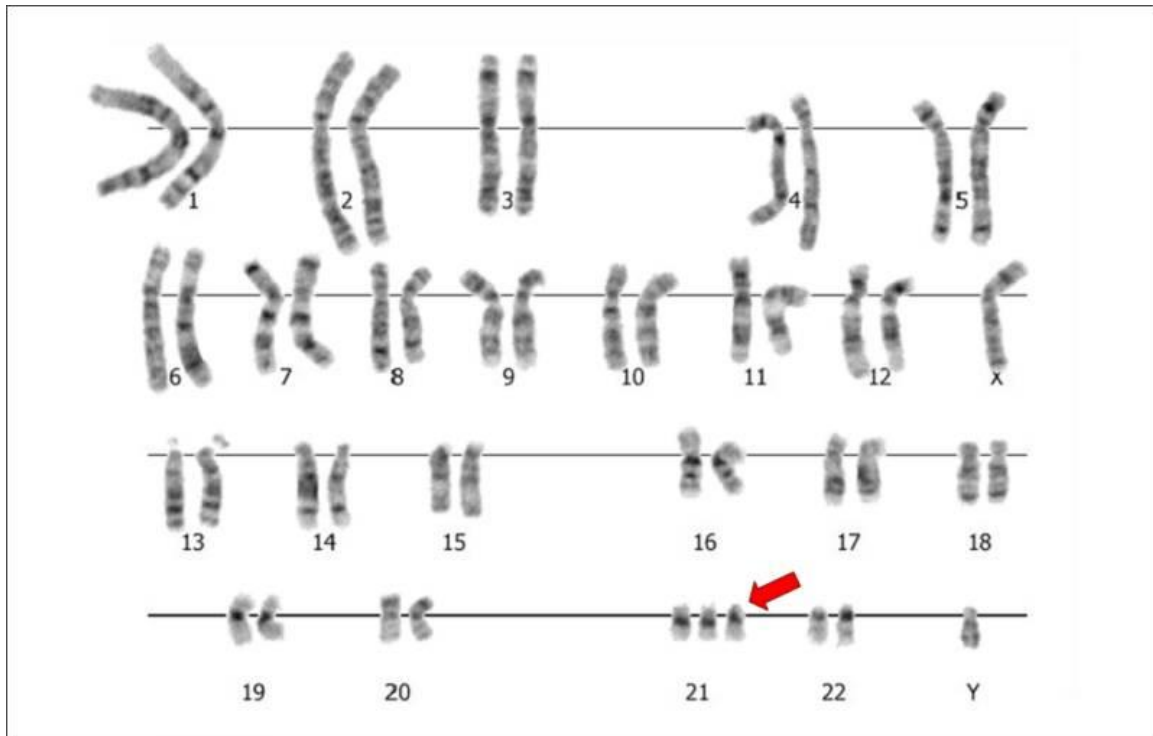
3.4.1 Chromozomální abnormality

Chromozomální abnormality jsou příčinou až 12 % případů mentální retardace. Klinicky nejzávažnější jsou numerické a nebalancované strukturní změny chromozomů. Balancované chromozomální aberace nijak nepostihují své nositele, avšak mají predikční význam pro jejich potomky (Raymond, 2005; Winnepenninckx *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014; Aloui *et al.*, 2017; Samango-Sprouse *et al.*, 2018).

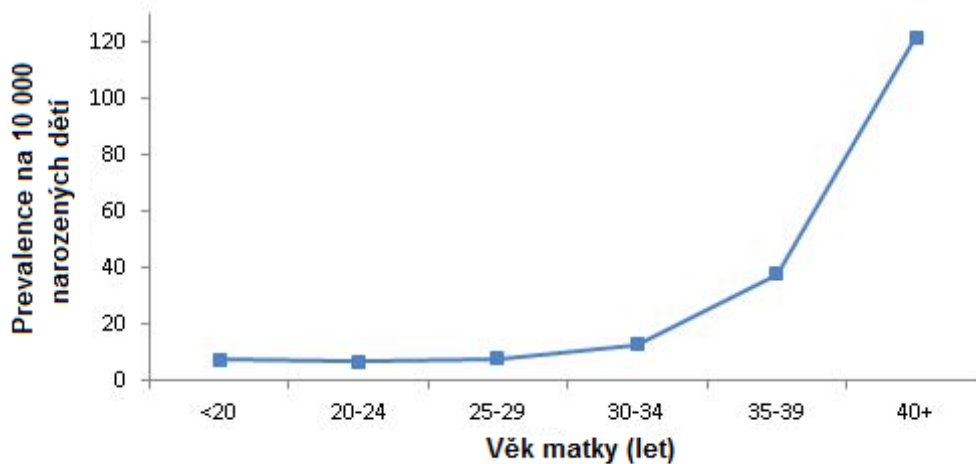
3.4.1.1 Numerické chromozomální abnormality

Numerické chromozomální abnormality jsou charakterizovány jako změna počtu chromozomů v buňkách oproti normálnímu stavu, 46,XY/46,XX. Početní aberace mohou být snížení i zvýšení počtu kopií jednotlivých chromozomů – monozomie/polyzomie – avšak z hlediska intelektu jsou významnější pouze polyzomie chromozomů (Mundhofir *et al.*, 2012).

U pacientů s mentální retardací nejčastěji pozorujeme nadpočet chromozomů 13, 18 a 21 (Mundhofir *et al.*, 2012). Trizomie chromozomu 21, známá také jako Downův syndrom (Obr. 2), je pozorována u 14 % pacientů s MR (Mundhofir *et al.*, 2012; Samango-Sprouse *et al.*, 2018). Celková frekvence tohoto onemocnění je 1 : 800. Avšak riziko výskytu tohoto syndromu se odvíjí od věku matky (Obr. 3) a rozdílů v jednotlivých populacích (Kazemi *et al.*, 2016; Aloui *et al.*, 2017).



Obrázek 2: Karyotyp Downova syndromu 47, XY, +21 (Trevisan *et al.*, 2014)



Obrázek 3: Růst prevalence Downova syndromu s vekom matky (převzato a upraveno z Centers for Disease Control and Prevention, 2019)

Edwardsův a Patauův syndrom (trizomie chromozomu 18 a 13) se vyskytují s mnohem menší frekvencí (Tab. 1). Důvodem nízké frekvence výskytu je spontánní či umělé ukončení těhotenství (Cereda *et Carey*, 2012; Satgé *et al.*, 2017).

Trizomie může nastat také u pohlavních chromozomů – gonozomů. Jedná se zejména o nadpočet chromozomu X. Snížení intelektu je popisováno u některých pacientů s karyotypem 47, XXY (Klinefelterův syndrom), jehož frekvence je 1 : 500 až 1000 narozených chlapců (Bonomi *et al.*, 2017). Avšak odhaduje se, že je odhaleno pouze 25 % těchto pacientů. Tato skutečnost nasvědčuje tomu, že se zbylých 75 % pacientů fenotypově neodlišuje od běžné populace (Samango-Sprouse *et al.*, 2018).

Tabulka 1: Přehled syndromů nejčastěji spojovaných s mentální retardací

Název syndromu	Karyotyp	Incidence*	% pacientů s MR trpících tímto syndromem**
Downův syndrom	47, XY, +21	1 : 800	14
Edwardsův syndrom	47, XY, +18	1 : 5000	3,6
Patayův syndrom	47, XY, +13	1 : 16000	3
Klinefelterův syndrom	47, XXY	1 : 500–1000	-

* Genetics Home Reference, 2019

**Uwineza *et al.*, 2016

3.4.1.2 Nebalancované strukturní chromozomální abnormality

Strukturní chromozomální abnormality vznikají jako důsledek chromozomových zlomů a chybného spojení vzniklých segmentů. Během těchto procesů může dojít ke změně množství genetického materiálu. V případě, že dojde ke ztrátě (deleci) nebo zmnožení (amplifikaci) části chromozomu, jež nelze zachytit konvenčním G-pruhováním, je třeba využít molekulárně genetických metod ke stanovení rozsahu variability počtu kopií (CNV) genomu (Pereira *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017)

3.4.2 Variabilita počtu kopií (copy number variants, CNVs)

CNV je definována jako segment DNA delší než 1 kb vykazující variabilní počet kopií v porovnání s referenčním genomem (Stuppia *et al.*, 2012). Řada těchto variant byla asociována s rozvojem postižení intelektu (Kaufman *et al.*, 2010). Vývoj čipové technologie (microarray, CMA) a multiplexové PCR (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) umožnil jejich sledování, avšak účinnost těchto metod se liší na základě klinických obrazů pacientů a jejich výběru. Odhadovaný záchyt patogenních variant se pohybuje od 10 do 20 % u čipových technologií a průměrně 8 % při použití jednotlivých MLPA probemixů. Kombinací

jednotlivých MLPA targetových sad lze dosáhnout účinnosti až 24 % (Lefebvre *et al.*, 2016; Blanco-Lago *et al.*, 2017; Ceroni *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018,). Nalezené CNV u pacientů s MR mohou být zděděné i získané *de novo* (Choucair *et al.*, 2015; Sansović *et al.*, 2017). Ačkoli vzniklo mnoho studií zabývajících se analýzou CNV u pacientů s MR, nepodařilo se objasnit význam všech variant. Interpretaci genetických nálezů také ztěžuje fakt, že řada CNV vykazuje neúplnou penetranci a variabilní expresivitu (Kaufman *et al.*, 2010).

3.4.2.1 Popis vybraných CNV

CNV, jež jsou asociovány se snížením intelektu, je celá řada. Obecně je lze rozdělit na změny vedoucí k zisku (mikroduplikace) nebo ztrátě (mikrodelece) genetického materiálu (Kaufman *et al.*, 2010; Stuppia *et al.*, 2012).

Mikroduplikace

Nejvýznamnější mikroduplikace z hlediska přítomnosti MR jsou duplikace 1q21.1 a 22q11. Obě varianty jsou doprovázeny vrozenými malformacemi (makrocefálie, hypertelorismus, mírné faciální dysmorfické rysy, srdeční vady, zaostání růstu atd.), ale také poruchami autistického spektra (ASD) a schizofrenií (Sanders *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015; Demily *et al.*, 2018; Xavier *et al.*, 2018).

Mikroduplikace v oblasti chromozomu X (Xp11.23–p11.22, Xp11.22–p11.23, Xq28, Xp22.12) jsou asociovány, obdobně jako autozomální duplikace, zejména se syndromickými poruchami intelektu (makrocefálie, hrubé obličejové rysy, strabismus aj.) a také s dalšími neurovývojovými vadami – ADHD, záchvaty, poruchy řeči (Zanni *et Bertini*, 2011; Di-Battista *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Sajorda *et al.*, 2018). Speciální skupinu pak tvoří duplikace zahrnující gen *MECP2*, jež jsou velice často asociovány s poruchou autistického spektra (Rett syndrom, OMIM 312750) (Tang *et al.*, 2017).

Na rozdíl od CNV na autozomech se X vázané syndromy exprimují velmi variabilně a u řady z nich je klinická interpretace/predikce velice obtížná. Například duplikace Xp22.31 se vyskytuje u pacientů s intelektuálním postižením poměrně často. Tato varianta je téměř vždy zděděna od rodiče, jehož fenotyp je v některých případech normální. Duplikace se v menším měřítku vyskytuje také v běžné populaci. V souvislosti s Xp22.31 se mluví také o triplikaci, která je oproti duplikaci více penetrantní (Polo-Antúnez *et al.*, 2017).

Mikrodelece

Mikrodelece klasifikované jako patogenní ve vztahu k MR jsou podstatně čtenější než mikroduplikace. Mezi nejvýznamnější z nich řadíme aberace na chromozomu 1 (1q21.1, 1q43q44, 1p36, 1q22q23.1), chromozomu 2 (2p16.1–p15), chromozomu 4 (4p16.3), chromozomu 7 (7q11.23), chromozomu 9 (9q34.3, 9p), chromozomu 10 (10q26), chromozomu 15 (15q11.2–q13), chromozomu 16 (16p11.2) a chromozomu 22 (22q11.2, 22q13.33) a mnoho dalších. Většina těchto syndromů je doprovázena malformacemi skeletu a mohou být zahrnuty i do dalších neurovývojových chorob jako jsou poruchy autistického spektra a schizofrenie (Pérez-García *et al.*, 2011; Bassuk *et al.*, 2013; Zollino *et al.*, 2014; Sanders *et al.*, 2015; He *et al.*, 2016; Grand *et al.*, 2018).

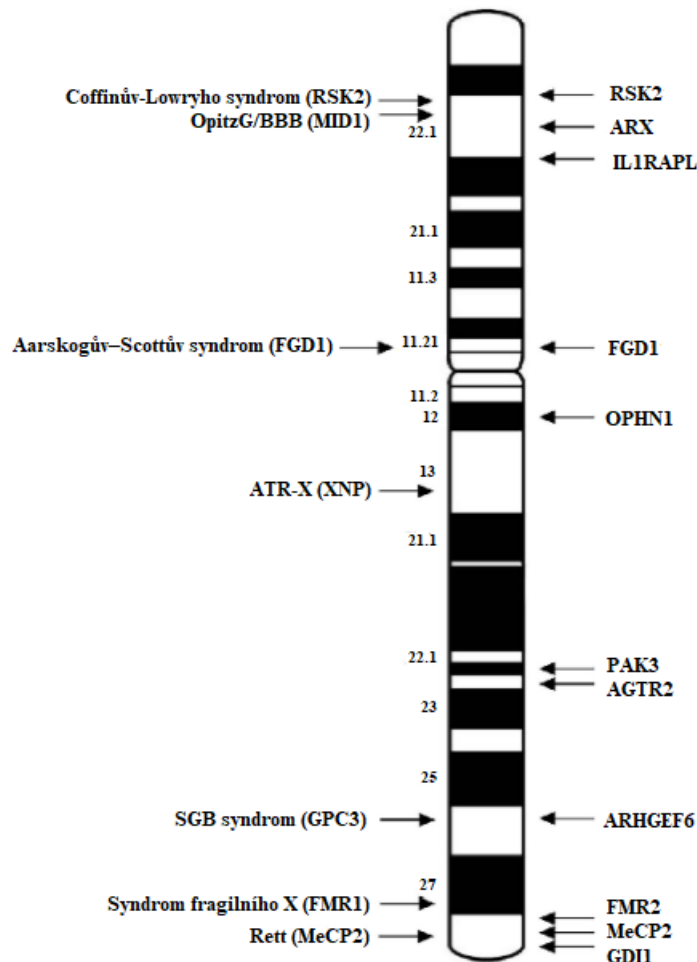
V současné době je možno všechny již popsané patogenní delece zachytit pomocí CMA. Avšak například Prader-Williho/Angelmanův syndrom, jehož příčinou je chybění oblasti 15q11.2–q13, může vznikat třemi způsoby. Mimo mikrodeleci, může být daná oblast místem uniparetální dizomie (oba chromozomy 15 pocházejí od jednoho rodiče) nebo může dojít k defektu imprintingu. Tyto změny jsou sledovány pomocí speciálně upravených metod CMA a MLPA (Cassidy *et Driscoll*, 2009). Obdobnou situaci lze pozorovat i u syndromu Silver-Russell/Beckwithův-Wiedeman (Öunap, 2016).

3.4.3 Monogenní onemocnění

Vznik mentální retardace může být spojen s mutací pouze jediného genu. Aberace mohou mít charakter velice krátkých změn v úseku daného genu (delece/inzerce několika nukleotidů), nebo i bodových změn. Monogenní onemocnění dělíme na základě typu dědičnosti do tří skupin (Winnepeninckx *et al.*, 2013).

X-vázaná dědičnost je pozorována u 10–20 % všech případů mentální retardace. Vzhledem k X vázané dědičnosti je mentální retardace častější u mužů než u žen (Winnepeninckx *et al.*, 2013). Byla popsána celá řada genů, jež hrají významnou roli v etiologii mentální retardace, např. *ARX*, *FGD*, *PAK3* a další, viz Obr. 4. Nejvýznamnější z nich jsou *FMRI* a *MECP2* (Allen *et al.*, 1998; Raymond, 2005; Griffin *et al.*, 2016). Mutace genu *FMRI* se nejčastěji nacházejí v jeho promotoru, kde dochází k nárůstu počtu repetice (>200 repetice), jež v konečném důsledku způsobí inhibici exprese výsledného proteinu a onemocnění známé jako Syndrom fragilního X (Winnepeninckx *et al.*, 2013). Jedná se o jednu z nejčastějších příčin mentální retardace, prevalence u mužů je 1 : 5000 a u žen 1 : 8000 (Suhl *et Warren*, 2016). *MECP2* působí na epigenetickou kontrolu transkripce genu

prostřednictvím methylace DNA a remodelace chromatinu. Jeho aberace vyvolává klinický obraz zvaný Rettův syndrom (Percy, 2016)



Obrázek 4: Schéma lokalizace genů na chromozomu X zodpovědných za vznik MR (převzato a upraveno z Winnepenninckx *et al.*, 2013)

Autozomálně recesivní typ dědičnosti je často pozorován ve spojení s metabolickými poruchami, ve kterých ztráta funkce obou alel vede ke snížení hladin enzymů, ty poté nejsou schopny plnit svou funkci (Winnepenninckx *et al.*, 2013). Nejčastější příčinou autozomálně recesivně způsobené mentální retardace je fenylketonurie (12q23.2, *PAH*), nedostatek enzymu fenylalaninhydroxylázy znemožní přeměnu fenylalaninu na tyrosin, což vede k hromadění fenylalaninu (Williams *et al.*, 2008).

Onemocnění s autozomálně dominantní dědičností vznikají nejčastěji mutacemi *de novo*. Typickým příkladem je Rubinstein-Taybi syndrom (16p13.3, *CREBBP*) (Hosek *et Borková*, 2008; Winnepenninckx *et al.*, 2013).

3.4.4 Polygenní dědičnost

Obecně se předpokládá, že polygenní formy MR, tedy ty, které jsou způsobeny mutací více než jednoho genu, jsou častou příčinou především lehké mentální retardace. Na rozdíl od závažnějších forem nejsou ty lehké děděny dle Mendelovského vzorce (Winnepeninckx *et al.*, 2013).

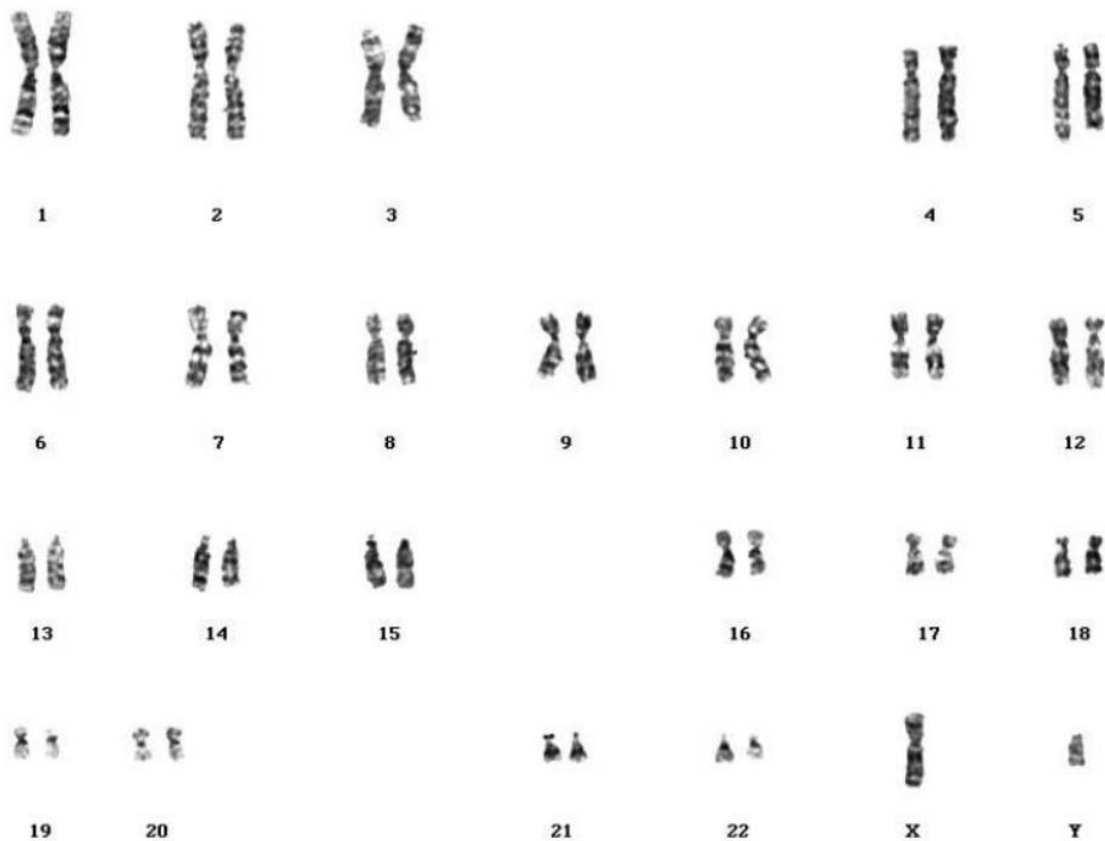
3.4.5 Mitochondriální onemocnění

Mitochondriální onemocnění jsou velice často doprovázeny vadou intelektu (Guevara-Campos *et al.*, 2015). Příkladem mohou být syndromy MELAS (OMIM# 540000), NARP (OMIM# 551500), Leighův syndrom (OMIM# 256000) a další (Valiente-Pallejà *et al.*, 2018).

3.5 Genetické diagnostické nástroje

3.5.1 Konvenční G-pruhování

Zavedení metody obarvení chromozomů v 70. letech 19. století bylo jednou z nejvýznamnějších inovací v oblasti cytogenetiky a je dodnes používáno ke sledování numerických a strukturních změn chromozomů (Ferguson-Smith, 2015). Nejvíce používanou technikou barvení chromozomů je G-pruhování, které je založeno na barvení metafázních chromozomů Giemsou. Samotnému barvení předchází denaturace alkalickými, tepelnými nebo proteolytickými enzymy (např. trypsin). Po obarvení dojde k vytvoření tmavých G-pruhů, které jsou bohaté na adenin a thymin a světlých pruhů obsahující kódující oblasti bohaté na cytosin a guanin. Na základě tmavých a světlých pruhů lze jednoznačně identifikovat každý lidský chromozom viz Obr. 5 (Kannan *et al.*, 2009; Ferguson-Smith, 2015).

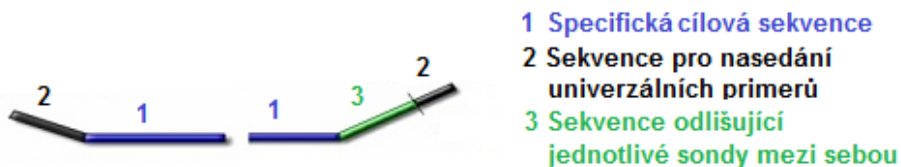


Obrázek 5: Mužský karyotyp 46, XY (G-pruhování) (Seabright M., 1971)

3.5.2 CNV analýza

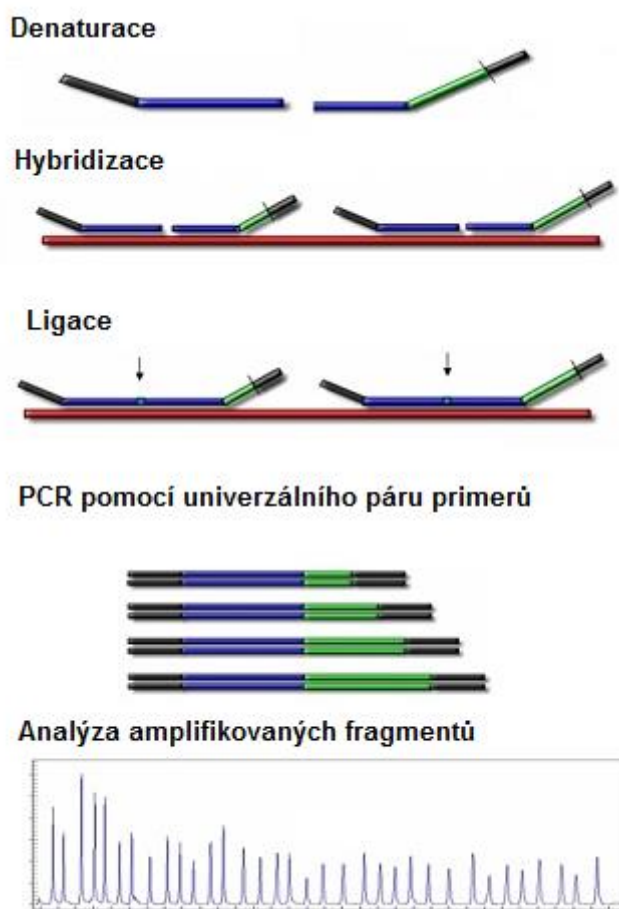
3.5.2.1 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

MLPA je semikvantitavní metoda, která našla své uplatnění v cílené detekci CNV (MRC-Holland, 2018). V jedné MLPA reakci hybridizuje až 60 sond, které jsou amplifikovány pomocí PCR v jediné reakci (multiplexová PCR). Každá sonda detekuje specifickou sekvenci DNA. Sondy jsou složeny ze dvou oligonukleotidů, jež obsahují specifickou (komplementární) cílovou sekvenci a nekomplementární sekvence pro univerzální PCR primery a sekvence odlišující jednotlivé sondy mezi sebou viz Obr. 6 (Stuppia *et al.*, 2012).



Obrázek 6: Popis sondy MLPA (převzato a upraveno z BIOGEN Praha s.r.o. - molekulární biologie a genetika, 2019)

V prvním kroku je DNA o koncentraci 10–50 ng/μl denaturována a inkubována se směsí sond. Oba hybridizované oligonukleotidy jsou ligázou spojeny v jeden celek, jenž je amplifikován pomocí univerzálních primerů. Použití pouze jediné dvojice primerů je možné, protože během PCR se neamplifikují cílové sekvence, ale ligované sondy. Počet výsledných produktů je mírou počtu cílových sekvencí ve vzorku (Stuppia *et al.*, 2012). Výsledkem reakce je soubor jednotlivých DNA fragmentů, jejichž délka se pohybuje mezi 64 až 500 nt. Ty jsou následně detekovány kapilární elektroforézou (BIOGEN Praha s.r.o. - molekulární biologie a genetika, 2019). Schéma MLPA reakce je zobrazeno na Obr. 7.



Obrázek 7: Schéma MLPA reakce (převzato a upraveno z BIOGEN Praha s.r.o. - molekulární biologie a genetika, 2019)

Výsledný elektroferogram je porovnáván se záznamem referenčního vzorku. Vyhodnocuje se rozdíl výšek (popřípadě plochy) jednotlivých píků mezi vzorkem a referenční DNA. Relativní pokles signálu indikuje ztrátu genetického materiálu a opačně. Tato skutečnost je kvantifikována pomocí dávkového koeficient (DQ). Nabyde-li DQ hodnot 0,8–1,2 jedná se o stav fyziologický. Hodnoty mimo tento interval jsou vyhodnoceny jako zisk/ztráta

genetického materiálu. V případě homozygotní nebo hemizygotní delece dané píky zcela chybí, viz Tabulka 2 (BIOGEN Praha s.r.o. - molekulární biologie a genetika, 2019).

Tabulka 2: Vztah dávkového kvocientu a počtu kopií (převzato a upraveno z BIOGEN Praha s.r.o. - molekulární biologie a genetika, 2019)

Vyhodnocení	Dávkový kvocient	Status
Fyziologická hodnota	$0,80 < DQ < 1,20$	Normální hodnota
Heterozygotní duplikace	$1,30 < DQ < 1,65$	Kritická hodnota
Triplikace	$1,75 < DQ < 2,15$	Kritická hodnota
Heterozygotní delece	$0,40 < DQ < 0,65$	Kritická hodnota
Homozygotní delece	0	Kritická hodnota

*DQ-dávkový kvocient

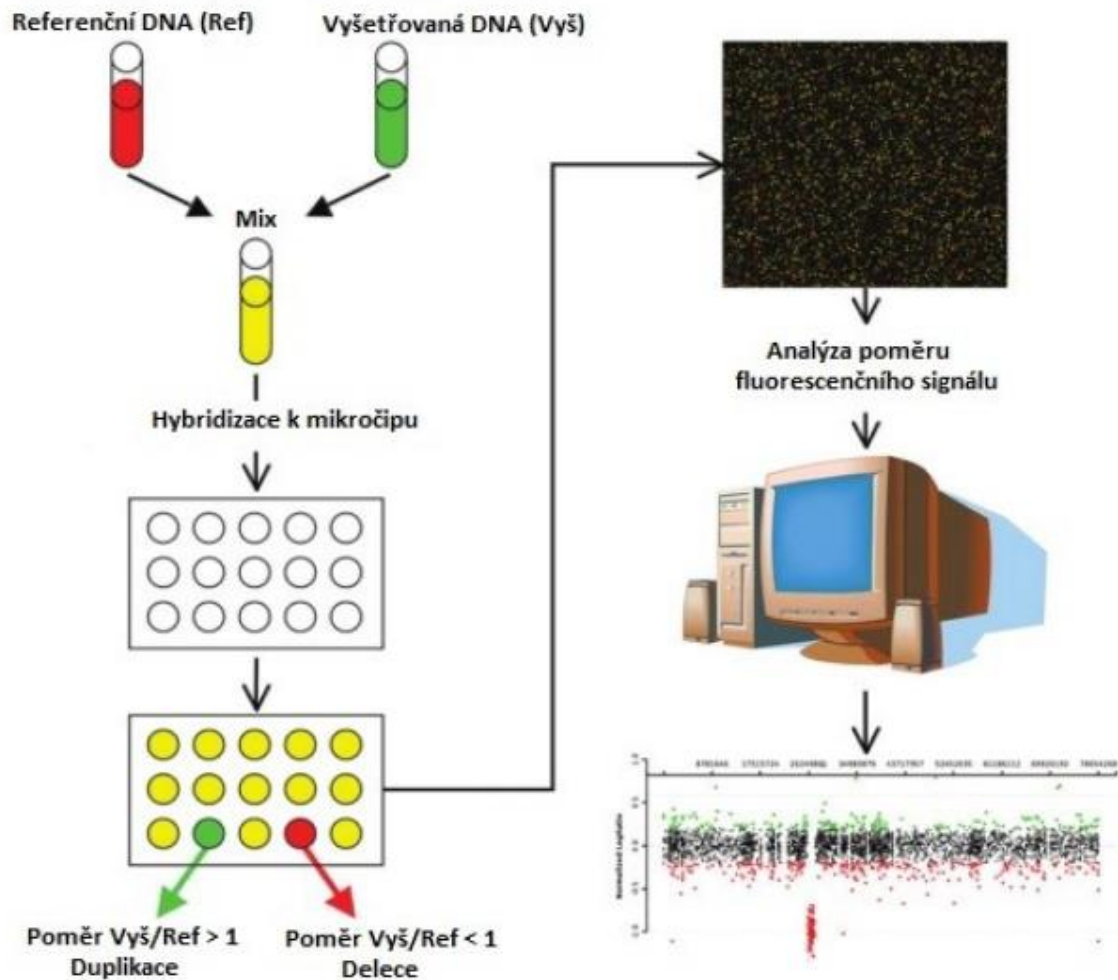
Výhodami této metody jsou zejména malé množství DNA (50–250 ng) a rychlost analýzy (cca 3 dny). Naopak metoda MLPA neodhalí změny mimo cílové oblasti ani balancované přestavby, jako jsou některé translokace a inverze. Tato metoda je také velice citlivá na integritu a čistotu DNA. V neposlední řadě přítomnost jednonukleotidových změn může inhibovat hybridizaci sondy a dojde k poklesu signálu. Avšak tato metoda není k detekci tak malých změn určena a je tedy nutné přítomnost těchto změn ověřit pomocí sekvenčních technik (BIOGEN Praha s.r.o. - molekulární biologie a genetika, 2019).

3.5.2.2 aCGH (Array Comparative Genomic Hybridization)

Porovnávací genomová hybridizace na čipu (aCGH) je cytogenetická metoda používaná k detekci nebalancovaných submikroskopických změn (amplifikace/delece) genomu (Ahn *et al.*, 2015).

Metoda aCGH je založena na detekci červeného a zeleného fluorescenčního signálu. Vzorek DNA od pacienta je značen fluorochromem (cyaninem 5) a referenční DNA opačným fluorochromem (cyaninem 3). Značené DNA se smísí a aplikují se na čip obsahující asi 60000 oligonukleotidových sond specifických k jednotlivým oblastem genomu. Po hybridizaci směsice značené DNA k sondám umístěným na čipu je pomocí skenerů snímán signál fluorochromů (Obr. 8). Jestliže je k dané sondě hybridizována referenční DNA i vzorek stejnou měrou (1 : 1) pak je výsledný signál žlutý a množství genomického materiálu je v daném místě shodné pro obě DNA (fyziologický). Pokud je výsledný signál červený, je referenční DNA

v nadbytku, resp. DNA vzorku v daném místě částečně nebo zcela chybí (heterozygotní delece: 1 : 0,5; homozygotní delece: 1 : 0). V případě zeleného signálu je poměr opačný a genom pacienta byl v daném místě amplifikován (duplikace: 1 : 2) (Ahn *et al.*, 2015).



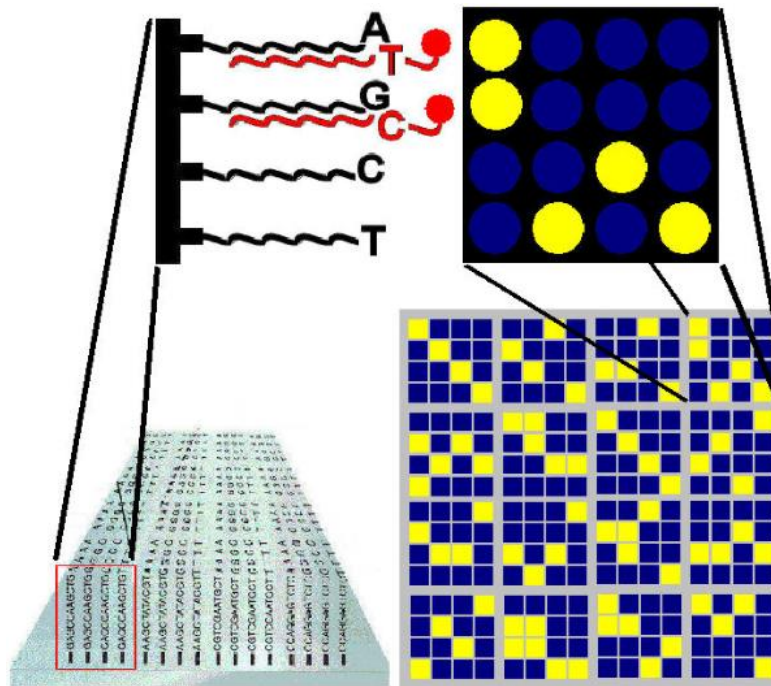
Obrázek 8: Schéma aCGH (Kocur T., 2012)

aCGH je zlatým standardem v genetickém vyšetřování pacientů s MR. Ačkoli se jedná o účinný nástroj genetiky, nelze tuto technologii použít k detekci bodových změn jednotlivých genů nebo k určení balancovaných změn (Redon *et Carter*, 2009).

3.5.2.3 SNP array (Single Nucleotide Polymorphism)

SNP microarray je stejně jako aCGH prováděna na čipu. Ten je osazen sondami, které jsou specifické k jednotlivým segmentům lidského genomu, avšak jejich sekvence se liší v jediném nukleotidu (Obr. 9). Princip SNP array využívá faktu, že lidský genom zahrnuje 325 milionů jednonukleotidových polymorfismů (SNP) a z toho 15 milionů se v populaci

vyskytuje s frekvencí vyšší než 1 %. DNA se pevně přichytí pouze k sondě, která má komplementární sekvenci. Výhod této technologie je celá řada: analýza probíhá pouze s DNA vzorku, která je označena jen jednou barvou, má mnohem větší rozlišení než standardní aCGH a umožňuje detekci ztrát heterozygoty (LOH). Na druhou stranu nelze tuto technologii použít k detekci bodových změn jednotlivých genů nebo k určení balancovaných změn (Plomin *et Schalkwyk*, 2007; LaFramboise T., 2009).

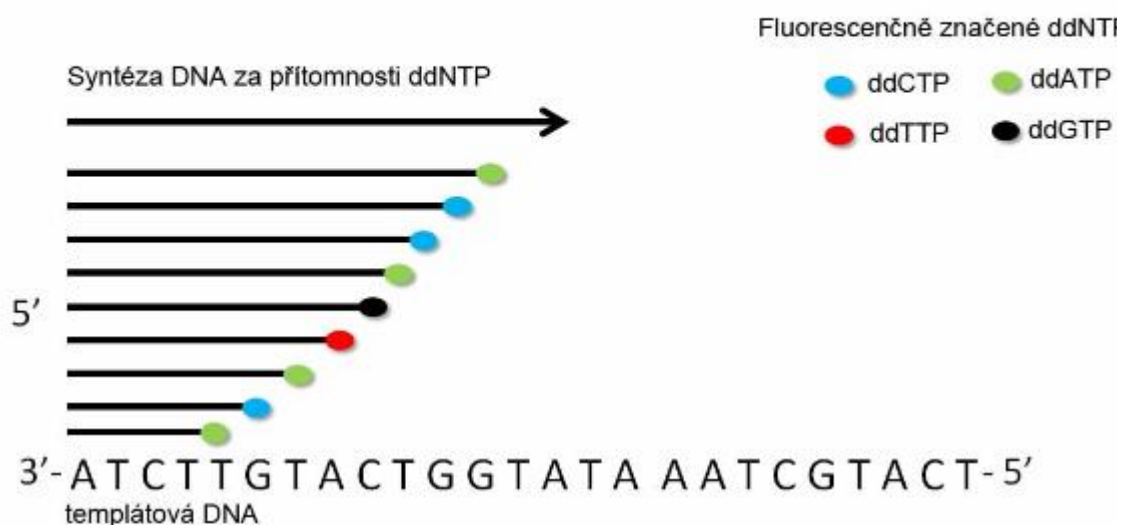


Obrázek 9: Ukázka technologie SNP microarray (převzato a upraveno z Memorial University of Newfoundland, 2019)

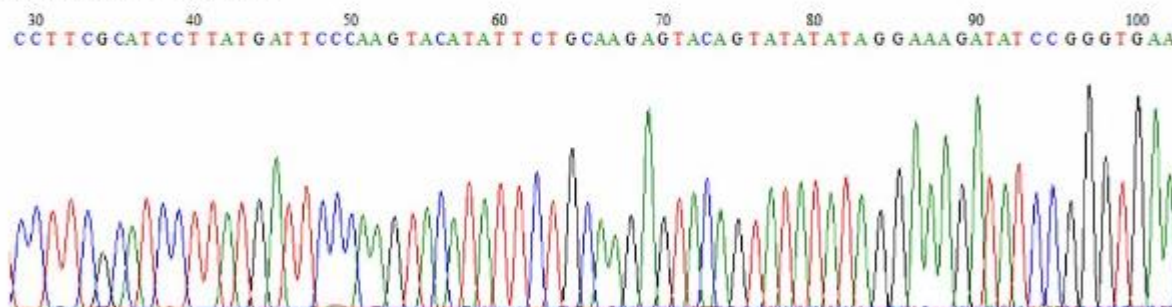
3.5.2.4 Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování se dnes běžně používá k detekci jednonukleotidových změn. Tato technika je založena na PCR reakci, do které je přidáno malé množství fluorescenčně značených dideoxynukleotidů (ddNTP). ddNTP postrádají 3'-hydroxylovou skupinu a jejich zařazením je ukončena syntéza DNA řetězce. ddNTP jsou v PCR zastoupeny v poměru 1 : 1000 vzhledem k deoxynukleotidům (dNTP) a jejich začlenění je náhodné. V důsledku toho vznikají DNA řetězce různých délek, které se liší délkou pouze o jeden nukleotid. Barva terminálního nukleotidu určuje, který ddNTP ukončil růst řetězce. Analýza těchto parametrů probíhá pomocí kapilární elektroforézy a softwaru určeného k zobrazení jednotlivých bází (base calling). Na základě toho lze přečíst sledovanou sekvenci (Heather *et Chain B.*, 2016). Schéma Sangerova sekvenování je zobrazeno na Obr. 10.

SANGEROVA METODA SEKVENOVÁNÍ (KAPILÁRNÍ PŘEVEDENÍ)



Výsledný sekvenogram



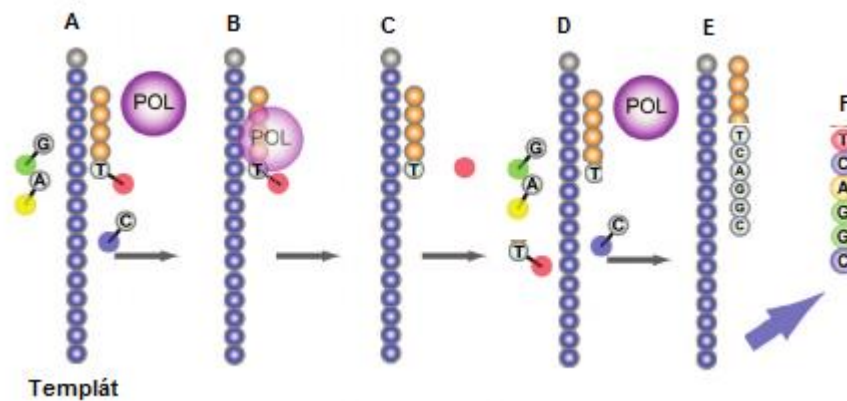
Obrázek 10: Schéma Sangerova sekvenování (převzato a upraveno z LabGuide Průvodce laboratoří, 2019)

Sangerovo sekvenování se stalo průlomovým na poli poznání lidského genomu, avšak vzhledem k technickým omezením je možno sledovat v jedné reakci úseky DNA o délce do 1000 nukleotidů. Vzhledem k velikosti jednotlivých genů a celého genomu je sekvenování dle Sangera velice zdlouhavé. V klinické praxi je tato technika využita hlavně k cílené detekci bodových změn (Heather *et Chain*, 2016).

3.5.2.5 Masivně paralelní sekvenování (MPS)

Masivně paralelní sekvenování (MPS) je postup, který navazuje na Sangerovo sekvenování. Tento postup byl vyvinut k urychlení sekvenací lidských genomů. V současnosti rozlišujeme základně dva typy MPS (de Magalhães *et al*, 2010).

Platforma Illumina využívá obdobného principu jako Sangerovo sekvenování. Značené ddNTP jsou zařazeny do řetězce DNA a tím jeho růst zastaví. V tomto případě je však pozice pro 3'-hydroxylovou skupinu inhibována jen po krátkou dobu, kdy je skenován snímek. Poté je opět uvolněna pomocí pufru k navázání dalšího ddNTP. Proces se opakuje a každý nově přiřazený ddNTP je snímán. Výsledný záznam je podle pořadí barev přeložen do pořadí nukleotidů (Obr. 11). Celý proces probíhá v mikroskopických podmínkách průtokové cely (Illumina, 2019).



Obrázek 11: Schéma MPS na platformě Illumina (převzato a upraveno z ResearchGate, 2019)

A Přidání ddNTP

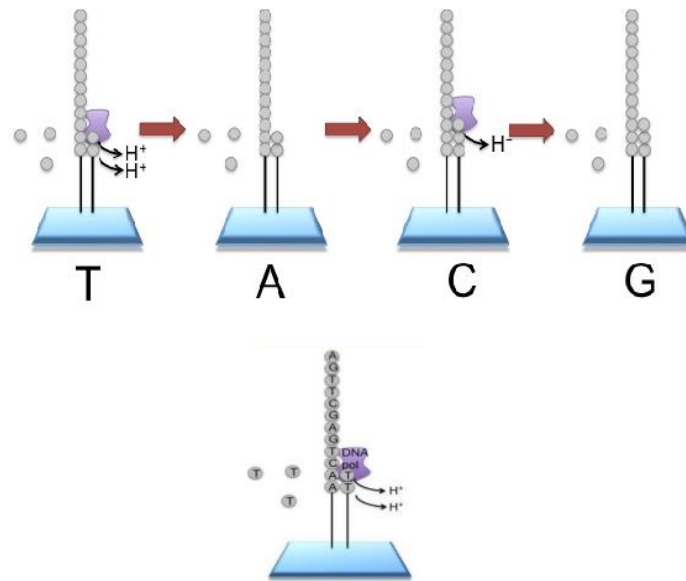
B Začlenění ddTP, skenování

C Odstranění blokovací skupiny z pozice pro 3'-hydroxylovou skupinu

D Opakování procesu

E, F Sestavení sekvence

Platforma IonTorrent pracuje na principu mikrokuliček, na kterých je uchyceno jedno vlákno DNA, to je při probíhající PCR komplementárně doplňováno postupným přidáváním jednotlivých deoxynukleotidů. Pokud je nukleotid komplementární, naváže se a tím změní pH roztoku kolem mikrokuličky. Tato změna je následně zaznamenána pH metrem a překládána do příslušné báze. Takto je sestavena výsledná sekvence (Thermo Fisher Scientific, 2019). Schéma reakce je zobrazeno na Obr. 12.



Obrázek 12: Schéma MPS na platformě IonTorrent (převzato a upraveno z The European Bioinformatics Institute, 2019)

Produktem MPS je velké množství sekvencí, jež je třeba za pomoci genetických softwarů správně seřadit a analyzovat. Výhodou tohoto přístupu je množství jednotlivců a oblastí genomu, které lze analyzovat v krátké době paralelně (de Magalhães *et al.*, 2010).

3.5.3 Genetické databáze

Genetické databáze jsou knihovny genetických dat získaných z vědeckých experimentů, publikované literatury, experimentálních technologií a počítačových analýz. Obsahují zejména informace o funkcích genů, o jejich struktuře, lokalizaci (buněčné i chromozomální), klinickém efektu jejich změn a podobnosti biologických sekvencí a struktur. Mezi nejpoužívanější databáze při vyšetřování pacientů s MR patří ClinVar, dbSNP, DECIPHER, OMIM, ISCA, ID Gene Database Project a The Developmental Brain Disorders Database (DBDB).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pacienti s MR byli konzultováni lékaři Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc v letech 2015–2017. V průběhu této konzultace byla pacientům odebrána krev ke genetickému testování za doprovodu informovaného souhlasu zákonného zástupce pacienta. Krev byla odebrána do zkumavky s heparinem k vyloučení chromozomálních aberací a do zkumavky s EDTA k CNV analýze a vyloučení Syndromu fragilního X.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Bovinní sérum (PAN Biotech GmbH, katalogové číslo: P30-190602)
- EDTA (Sigma Aldrich, katalogové číslo: 03609)
- Ethanol 96,5% p.a. (Lékárna FNOL, datum přípravy: 18. 1. 2018, 3. 5. 2017)
- Formamid HIDI (Applied Biosystems, katalogové číslo: 4311320)
- Fytohemaglutinin (Thermo Scientific™, katalogové číslo: R30852801)
- Giemsa-Romanowski roztok (PENTA, katalogové číslo: 14460-11000)
- GS LIZ 500 ® (Applied Biosystems, katalogové číslo: 4322682)
- Hydrogenuhlčitan draselný (Sigma Aldrich, katalogové číslo: 237205)
- Hydroxid sodný (Sigma Aldrich, katalogové číslo: S8045)
- Chlorid amonný (Sigma Aldrich, katalogové číslo: 254134)
- Chlorid draselný p. a. (LACHEMA, katalogové číslo: 30076-AP0)
- Chlorid sodný (Sigma Aldrich, katalogové číslo: 746398)
- Imerzní olej 500CC (Olympus, katalogové číslo: N5218800)
- Kolcemid 10 ug/ml (EuroClone, katalogové číslo: ECM0040N)
- Kyselina octová ledová 99%, p. a. (Lach-Ner, katalogové číslo: 10047-A99)
- Médium RPMI 1640 (SIGMA Aldrich, katalogové číslo: R8758)
- Methanol p. a. (Lach-Ner, katalogové číslo: 20038-AT0)
- Penicilin-Streptomycin 10000 U/ml 10mg/ml (ThermoFisher, katalogové číslo: 15140122)
- POP7 polymer (Applied Biosystems, katalogové číslo: 4363785)
- Proteináza K (EUROBIO, katalogové číslo: GEXPRK00-6R)
- SDS (Serva, katalogové číslo: 20760.03)
- Sörensenův roztok, pH 6,8 ± 0,1 (Lékárna FNOL, datum přípravy: 25. 2. 2019, 2. 5. 2017)
- TRIS 10mmol·l⁻¹ o pH 8,2 (Lékárna FNOL, datum přípravy: 18. 1. 2018, 3. 5. 2017)
- TRIS-HCl (ThermoFisher, katalogové číslo: 15506017)

- Trypsin (SIGMA-Aldrich, katalogové číslo: T2600000)
- Voda pro injekci sterilní (Braun, katalogové číslo: 3500098)
- Voda v PCR čistotě (Top Bio, katalogové číslo: P440)

Použité soupravy

- SALSA MLPA kit (MRC Holland, katalogové číslo: EK1/EK5-FAM)
- SALSA probe mix P036 (MRC Holland, katalogové číslo: E2,E3)
- SALSA probe mix P070 (MRC Holland, katalogové číslo: B2,B3)
- SALSA probe mix P096 (MRC Holland, katalogové číslo: B1)
- SALSA probe mix P106 (MRC Holland, katalogové číslo: C1)
- SALSA probe mix P245 (MRC Holland, katalogové číslo: B1)
- SALSA probe mix P297 (MRC Holland, katalogové číslo: B2,C1)

Použité roztoky a jejich příprava

- 20% SDS: 5 g SDS doplněno deionizovanou vodou do 25 ml
- 20mg/ml proteináza K: 500 mg proteinázy K doplněno deionizovanou vodou do 25 ml
- Fixační roztok: kyselina octová konc. p. a. a methanol konc. p. a. (1:3)
- LB pufr: 8,285 g $155\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4Cl , 1,001 g $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KHCO_3 , 0,37 g $1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA ($2\text{ ml } 0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), doplnit dH_2O do objemu 1 l, přidáním cca 800 μl koncentrovaného NaOH upravit hodnotu pH na 7,3–7,4
- NLB pufr: 1,211 g $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS-HCl (10 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 23,376 g $400\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 0,745 g $2\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA (4 ml $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), doplnit deionizovanou vodou do 1 l, přidáním cca 800 μl $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH upravit hodnotu pH na 7,3–7,4
- TE pufr (pro izolace DNA z plné krve Millerovou metodou): 2,5 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS-HCl (pH 7,5), 0,3 ml $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, doplnit deionizovanou vodou do 250 ml
- TE pufr (pro MLPA reakci): $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS-HCl (pH 8,2), $0,1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga NF 800/800R (Nüve)
- Centrifuga ROTOFIX 32 (Hettich Zentrifugen)
- Centrifuga/vortex Combispin (biovendor)
- Digestor Merci (Merci)
- Genetický analyzátor ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems)

- Chladnička (BOSCH)
- Karyotypovací zařízení Lucia Cytogenetics (Laboratory Imaging)
- Laminární box Biostar Plus (KRD)
- Mrazák (BOSCH)
- Nahřívací ploténka SW 85 (Adamas)
- Nanodrop (Thermo Fisher)
- Světelný mikroskop BX 53 (Olympus)
- Světelný mikroskop BX40 (Olympus)
- Světelný mikroskop BX41 (Olympus)
- Termocyklér (MJ Research)
- Termostat BT 120-TLK 38 (Laboratorní přístroje Praha)

4.4 Použitý software

- ABI PRISM 3130 Data Collection (Applied Biosystems)
- Coffalyser (MRC Holland)
- GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems)
- Lucia Karyo (Laboratory Imaging)

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.5.1 Stanovení karyotypu k vyloučení chromozomálních aberací

Kultivace lymfocytů periferní krve

1. Smíchat 100 ml kultivačního média s 25 ml fetálního bovinního séra a dvěma kapkami penicilinu (dávkováno žlutou jehlou).
2. Do 10ml plastové sterilní zkumavky přenést 2,5 ml kultivačního roztoku (sterilní injekční stříkačkou se žlutou jehlou).
3. Přidat 10 až 15 kapek (žlutou jehlou), 3 kapky fytohaemaglutininu (žlutou jehlou), uzavřít zátkou a lehce protřepat.
4. Kultivace probíhá 69–73 hod při 36,5–38,0 °C v termostatu v šikmé poloze.

Zpracování kultury

1. Přidat 4 kapky kolcemidu černou jehlou, lehce protřepat.
2. Asi 1,5 hod kultivovat v termostatu při 36,5–38,0 °C.
3. Centrifugovat při 900–1000 otáček/min po dobu 9–10 min.

4. Odsát nebo slít supernatant.
5. Přidat cca 5–6 ml $0,075 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Hypotonický roztok připravit den předem, ponechat při laboratorní teplotě a před použitím nahřát v termostatu na teplotu $36,5\text{--}38,0 \text{ }^\circ\text{C}$ cca 1,5 hod.
6. Hypotonizace nechat probíhat 0–10 min v termostatu při $36,5\text{--}38,0 \text{ }^\circ\text{C}$.
7. Centrifugovat 9–10 min při 900–1000 otáček/min.
8. Odsát nebo slít supernatant.
9. 1. fixace: přidat cca 8 ml fixačního roztoku, zpočátku po kapkách a protřepávat asi 1 ml, zbytek je možno dolít, jemně ale důkladně protřepat.
10. Centrifugovat 9–10 min při 900–1000 otáček/min.
11. 2. fixace: přidat cca 8 ml fixačního roztoku, protřepat.
12. Centrifugovat 9–10 min při 900–1000 otáček/min.
13. Odsát nebo slít supernatant.
14. 5–10 kapek suspenze sedimentu nakapat automatickou pipetou na podložní skla nadýchnutá, namražená nebo namočená do destilované vody.
15. Následně z jedné zkumavky nakápnout 3–4 skla.
16. Skla před barvením ponechat 2 dny při laboratorní teplotě nebo nahřát na plotýnce cca 10 min při $75\text{--}85 \text{ }^\circ\text{C}$.

Barvení:

1. Skla ponořit na 2–12 s do peroxidu vodíku, umýt pod proudem studené vody (z kohoutku).
2. Ihned ponořit do roztoku trypsinu na 2–10 s, opláchnout pod tekoucí vodou a barvit v 5% roztoku Giemsy 2–5 min.
3. Opláchnout vodou, na vzduchu nechat oschnout.

Hodnocení preparátů postnatálního cytogenetického vyšetření barvených G-pruhováním

1. U každého případu hodnotit minimálně 10–15 metafázi numericky a zakreslit je.
2. Ze dvou mitóz jsou sestaveny karyogramy, které jsou zdokumentovány pomocí zobrazovací techniky Lucia Karyo a uloženy do databáze.

4.5.2 Izolace DNA z plné krve Millerovou metodou

Izolace DNA byla provedena vysolovací metodou (Millerova metoda):

1. den:

1. Krev přelít do číslem označené zkumavky (50ml falkony).
2. Přidat chlazený LB pufr do 50 ml a promíchat.
3. Inkubovat při pokojové teplotě po dobu 15 min.
4. Centrifugovat 30 min při 1000 g.
5. Slít supernatant tak, aby na dně zůstal pelet bílých krvinek.
6. Přidat 5 ml LB pufru (chlazený) a promíchat.
7. Centrifugovat 10 min při 1000 g.
8. Slít supernatant, lehce opláchnout pelet chlazeným LB pufrem a nechat falkonky otočené dnem vzhůru okapat na ubrousku.
9. Přidat 3 ml NBL pufru, 50 μ l proteinasy K, 150 μ l 20% SDS a důkladně protřepat (cca 15 s).
10. Inkubovat v termostatu při 37 °C přes noc.

2. den:

1. Přidat 1 ml $6\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a důkladně protřepat (cca 15 s).
2. Centrifugovat 15 min při 5000 g.
3. Přelít supernatant do čisté 10ml označené zkumavky.
4. Centrifugovat 10 min při 5000 g.
5. Slít supernatant do čisté 15ml označené zkumavky a doplnit 96% vychlazeným ethanolem.
6. Promíchat pomalým převrácením zkumavky až do vysrážení DNA.
7. Do označené mikrozkušavky nalít cca 1 ml 70% ethanolu a přenést DNA pomocí sterilního skleněného háčku, který po ponoření do mikrozkušavky zalomíme tak, aby háček s DNA zůstal uvnitř.
8. Centrifugovat 5 min při 14000 g.
9. Opatrně slít 70% ethanol na ubrousek.
10. DNA nechat vyschnout při pokojové teplotě (cca 1 hod).
11. DNA rozpustit v TE pufru (množství TE pufru se řídí výchozím množstvím krve, na 1 ml krve se použije 50 μ l TE pufru) a označit štítkem (jméno, rodné číslo, evidenční číslo).
12. DNA rozpustit při pokojové teplotě přes noc nebo 1 hod při 65 °C za současného promíchávání na míchačce.
13. Uschovat v chladničce. Pro delší skladování dát do -25 °C

4.5.3 Stanovení koncentrace DNA

Koncentraci vyizolované DNA změřit pomocí spektrofotometru NanoDrop. Pro další použití DNA je nutno upravit příslušnou koncentraci pro jednotlivé metody (MLPA, SNP array).

4.5.4 Vyloučení Syndromu Fragilního X

Vyloučení Syndromu Fragilního X u pacientů s MR proběhlo na Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc podle SOP_03_35.

4.5.5 MLPA

Pro metodu MLPA naředit DNA na koncentraci $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ pomocí $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ TRIS.

1. den:

Denaturace DNA

1. Označit 0,2ml zkumavky, nebo stripy popř. PCR desku.
2. Napipetovat 5 μl DNA vzorku ($50\text{--}250 \mu\text{g/vzorek}$) do každé zkumavky (do BLANKu místo DNA TE pufr).
3. Vzorky DNA denaturovat po dobu 5 min při $98 \text{ }^\circ\text{C}$ a následně ochladit na $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Hybridizační reakce

1. Před použitím vortexovat viskózní MLPA pufr a MLPA probemix.
2. Připravit hybridizační master mix obsahující pro každou reakci:
1,5 μl MLPA pufru + 1,5 μl a MLPA probemix.
Dobře promíchat hybridizační master mix pipetováním nebo vortexováním.
3. Po denuraci DNA přidat 3 μl směsi hybridizačního master mixu do každé zkumavky se vzorkem. Dobře promíchat pipetováním nahoru a dolů.
4. Inkubovat DNA vzorky s master mixem 1 min při $95 \text{ }^\circ\text{C}$, poté 16 až 20 hodin při $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

2. den:

Ligační reakce

1. Před použitím vortexovat dva ligační pufr (A, B ligační pufr).
2. Připravit Ligase-65 master mix dle Tabulky 3. Dobře promíchat pipetováním nahoru a dolů.

Tabulka 3: Příprava Ligase-65 master mixu pro jednu reakci

Reagencie	Objem [μ l]
H ₂ O (v PCR čistotě)	25
Ligase pufr A	3
Ligase pufru B	3
Ligase-65 enzym	1

- Vzorky zchladit na 54 °C a přidat 32 μ l směsi (Ligase-65 master mix) do každé zkumavky. Promíchat jemným pipetováním nahoru a dolů.
- Pokračovat v inkubaci 15 min při 54 °C, následuje 5 min při teplotě 98 °C (inaktivace Ligase-65 enzymu teplem) a poté pauza při teplotě 20 °C.

PCR reakce

Před použitím vortexovat SALSА PCR primer mix a zahřát polymerázu po dobu 10 s v ruce, aby se snížila její viskozita.

- Připravit polymerázový master mix dle Tabulky 4. Dobře promíchat pipetováním nahoru a dolů, nevortexovat. Až do použití skladovat na ledě.

Tabulka 4: Složení polymerázového master mixu pro jednu reakci

Reagencie	Objem [μ l]
H ₂ O (v PCR čistotě)	7,5
SALSА PCR primer mix	2
SALSА polymeráza	0,5

- Při pokojové teplotě přidat do každé zkumavky 10 μ l polymerázového master mixu. Promíchat jemně pipetováním nahoru a dolů.
- Provést PCR podle tabulky 5.

Tabulka 5: Program termocykléru pro PCR

Teplota [°C]	Čas [min]
95	00:30
60	00:30
72	01:00
72	20:00
15	neomezeno

4. PCR produkty je možno skladovat při teplotě 4 °C po dobu jednoho týdne. Pro delší dobu skladování je doporučena teplota mezi -25 °C a -15 °C. PCR produkty skladovat zabalené v alobalu kvůli použití fluorescenční barvy, která je citlivá na světlo.

Kapilární elektroforéza v přístroji ABI PRISM 3130

Pro separaci v kapiláře slouží genetický analyzátor ABI PRISM 3130. Jako separační gel se využívá polymer POP7™.

1. Do 1,5ml zkumavky napipetovat 1 ml HIDi formamidu a 22,2 µl GS LIZ 500 ®, směs zvortexovat a stočit.
2. Do připravené 96x0,2ml PCR destičky napipetovat po 14 µl formamidu s hmotnostním standardem a následně napipetovat 1 µl PCR produktu.
3. PCR destičku překrýt pomocí gumového septa a denaturovat v termocykléru po dobu 3 min při 86 °C.
4. Následně zchladit v ledové lázni po dobu 2 min.
5. PCR destičku řádně osušit buničinou a zkompletovat do stojánku s plastovým krytem.

Podmínky elektroforézy:

Nasátí vzorku: 1,6 kV po dobu 5 s. Vlastní elektroforéza probíhá po dobu 30 min při teplotě 60 °C a při napětí 15 kV. Pro stanovení délky jednotlivých fragmentů slouží velikostní standard GS LIZ 500 ®. Ke snímání a digitalizaci hrubých dat fluorescence je používán software ABI 3130 Data Collection.

Vyhodnocení výsledků MLPA

1. Pro vyvolání elektroferogramu použít software GeneMapper v4.1.
2. K vyhodnocení dat použít software Coffalyser.

4.5.6 SNP array

SNP array pacientů s MR byla provedena na Ústavu molekulární a translační medicíny v RNA laboratoři dle C_SOP_14.

4.5.7 Klinické vyhodnocení nalezených CNV a anotace genů

Nalezené CNV byly klinicky hodnoceny podle informací dostupných v databázích ClinVar a DECIPHER. Referenčním genomem byla Human GRCh37/hg19. Anotace genů zasazených klinicky relevantními CNV byla provedena pomocí databáze OMIM.

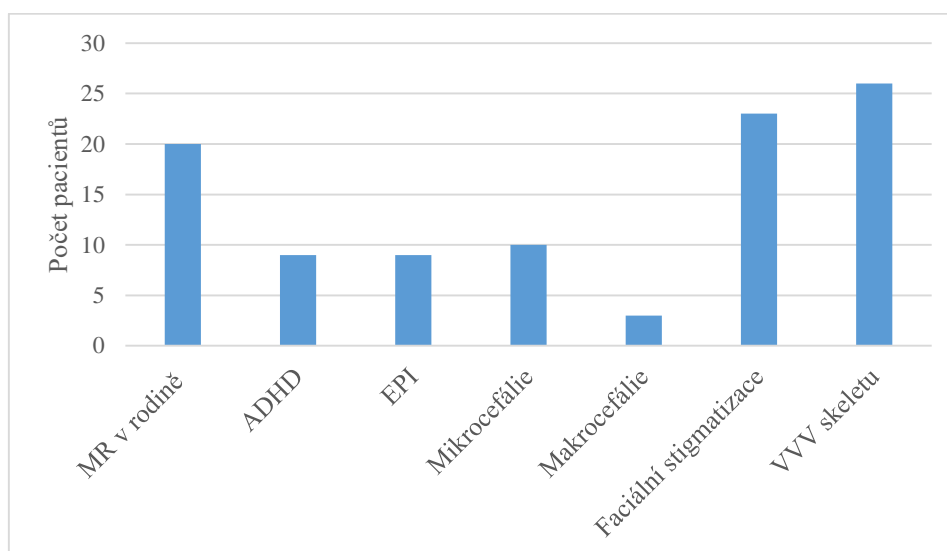
5 VÝSLEDKY

5.1 Pacienti

CNV analýza pacientů s MR byla provedena u 59 pacientů (28 žen, 31 mužů), u kterých byly vyloučeny chromozomální vady a Syndrom fragilního X. Průměrný věk pacientů byl 11 let (min 2 roky, max 36 let).

5.2 Analýza fenotypů pacientů

U pacientů s MR byly zachyceny tyto klinické znaky: přítomnost MR v rodině (n=20), ADHD (n=9), epilepsie (EPI, n=9), mikrocefálie (n=10), makrocefálie (n=3), faciální stigmatizace (n=23), vrožené vývojové vady skeletu (VVV skeletu, n=26). Četnost sledovaných fenotypových znaků je uvedena v závorkách (n) a zobrazena na Obr. 13.



Obrázek 13: Graf znázorňující výskyt klinických nálezů u sledovaných pacientů

5.3 Výsledky metody MLPA a SNP array

5.3.1 Patogenní varianty

Pacienti byli podrobeni vyšetření pomocí metody MLPA a SNP array pro odhalení CNV spojovaných s mentální retardací. U osmi pacientů bylo zachyceno 9 patogenních variant (8 delecí, 1 duplikace). Delece byly pozorovány v oblastech 1q21.1, 7q11.23, 9q34.3, 12p.13.33, 20q13.33, 22q11.21, Xp21.2p21.1 a Xq21.1q21.31. Duplikace 14q31.3 byla pozorována u pacienta s delecí na chromozomu 12. Nalezené varianty zasahovaly 30 genů, které jsou v databázi OMIM asociovány s poškozením centrálního nervového systému (CNS). Nalezené varianty a anotované geny shrnuje tabulka 6. Klinická pozorování jednotlivých pacientů nesoucích patogenní CNV jsou shrnuta v tabulce 7.

Tabulka 6: Nalezené patogenní CNV a anotované geny

CNV	Začátek varianty	Konec varianty	Geny*
1q21.1	145372549	145888926	<i>PEX11B</i> (614920), <i>RBM8A</i> (274000)
7q11.23	72701018	74143060	-
9q34.3	140623027	140838033	<i>EHMT1</i> (610253)
12p13.33	1	5168849	<i>CCND2</i> (615938), <i>NDUFA9</i> (256000)
14q31.3	86991381	107283504	<i>APOPT1</i> (220110), <i>BCL11B</i> (617237), <i>BRF1</i> (616202), <i>DYNC1H1</i> (614228,614563,158600), <i>EML1</i> (600348), <i>GALC</i> (245200), <i>PACS2</i> (618067), <i>SPATA7</i> (604232), <i>TECPR2</i> (615031), <i>TTC8</i> (615985), <i>VRK1</i> (607596), <i>YY1</i> (617557), <i>ZC3H14</i> (617125)
20q13.33	61323418	62909908	<i>CHRNA4</i> (600513), <i>EEF1A2</i> (616409, 616393), <i>KCNQ2</i> (613720), <i>RTEL1</i> (615190), <i>SOX18</i> (137940)
22q11.21	18844632	21068659	<i>CDC45</i> (617063), <i>PRODH</i> (239500), <i>TANGO2</i> (616878)
Xp21.2p21.1	29698622	34735336	<i>DMD</i> (310200), <i>GK</i> (307030), <i>IL1RAPL1</i> (300143)
Xq21.1q21.31	81324685	86231162	<i>ZNF711</i> (300803)

*V závorkách jsou uvedena MIM čísla chorob asociovaných s daným genem

Tabulka 7: Klinické nálezy u pacientů nesoucích patogenní CNV

CNV	MR v rodině	ADHD	EPI	Mikrocefálie	Faciální stigmatizace	VVV skeletu
1q21.1	-	+	-	-	+	+
7q11.23	-	-	-	-	+	+
9q34.3	-	-	-	+	-	-
12p13.33, 14q31.3	+	-	-	+	+	+
20q13.33	-	-	-	+	+	+
22q11.21	-	+	-	-	+	+
Xp21.2p21.1	+	-	-	-	-	-
Xq21.1q21.31	-	-	-	-	+	-

MR – mentální retardace, EPI – epilepsie, VVV – vrožené vývojové vady

Znaménka plus (+) a mínus (-) vyjadřují, zda se u pacientů daný znak vyskytoval (+) či nevyskytoval (-).

5.3.2 Varianty s neznámým významem

U 16 pacientů s MR bylo pozorováno 9 variant s neznámým klinickým významem. 6 duplikací zahrnovalo oblasti 1q43, 4p15.2p14, 11p15.4, 17q21.31, 17q21.32 a 22q11.21, které pokrývaly 6 genů asociovaných s poruchou CNS. Duplikace 11p15.4, 17q21.31 a 17q21.32 byly zachyceny u pacientů s patogenními variantami. Nejčastěji pozorovanou duplikací neznámého významu byla 17q21.31, pozorovaná u 8 pacientů¹. U čtyř pacientů byly pozorovány delecce 6p26.1, 14q31.3q32.12 a 17q12, které postihly 6 genů asociovaných s poruchou CNS. Nalezené varianty a anotované geny shrnuje tabulka 8. Fenotyp odpovídající CNV s neznámým významem je shrnut v tabulce 9.

Tabulka 8: Nalezené CNV s neznámým významem a anotované geny

CNV	Začátek varianty	Konec varianty	Geny*
1q43	241458102	241706533	<i>FH</i> (606812)
4p15.2p14	20479620	27553045	<i>RBPJ</i> (614814), <i>SEPSECS</i> (613811)
6p26.1	5245260	5391424	<i>FARS2</i> (614946)
11p15.4	2905474	2906648	<i>CDKN1C</i> (614732)
14q31.3q32.12	87390293	92177983	<i>GALC</i> (245200), <i>TTC8</i> (615985), <i>ZC3H14</i> (617125)
17q12	34822465	36307773	<i>PIGW</i> (616025), <i>ZNHIT3</i> (260565)
17q21.31 ¹	44177103	44350293	<i>KANSL1</i> (610443)
17q21.32	44215896	44350293	<i>KANSL1</i> (610443)
22q11.21	18844632	19008108	<i>PRODH</i> (239500)

* V závorkách jsou uvedena MIM čísla chorob asociovaných s daným genem

¹ Oblast 17q21.31 je v rámci používané SNP array (CytoScan® HD Array Kit and Reagent Kit Bundle) velmi špatně pokrytá sondami, proto výsledek nemusí být validní. Nález je třeba ověřit jinou metodou.

Tabulka 9: Přehled klinických znaků pacientů s CNV neznámého významu

Četnost výskytu klinických znaků u pacientů s uvedenými CNV						
CNV	MR v rodině	ADHD	EPI	Mikrocefálie Makrocefálie	Faciální stigmatizace	VVV skeletu
1q43	0	0	0	0	0	0
4p15.2p14	0	1	0	0	0	0
6p26.1	1	0	0	0	0	0
11p15.4	0	1	0	0	1	1
14q31.3q32.12*	0	0	0	0	0	0
17q12	1	0	0	0	0	0
17q21.31 ¹	4	2	0	1 (mikro)	4	4
17q21.32	1	0	0	0	0	0
22q11.21	1	0	1	1 (makro)	1	1

MR – mentální retardace, EPI – epilepsie, VVV – vrozené vývojové vady, makro – makrocefálie, mikro – mikrocefálie

* 14q31.3q32.12 zachycena dvakrát u jednovaječných dvojčat

¹ Oblast 17q21.31 je v rámci používané SNP array (CytoScan® HD Array Kit and Reagent Kit Bundle) velmi špatně pokrytá sondami, proto výsledek nemusí být validní. Nález je třeba ověřit jinou metodou.

6 DISKUZE

Mentální retardace (MR) je trvalé snížení inteligence v důsledku poškození mozku nebo nedostatečné funkce nervové soustavy (Švarcová-Slabinová, 2011). 1–3 % celosvětové populace trpí touto nemocí. Ta může být až z 50 % zapříčiněna genetickými vadami. Ačkoliv jsou dnes pacienti zcela běžně vyšetřováni různými genetickými metodami, daří se odhalit genetickou příčinu MR pouze u části pacientů (Ramiah *et al.*, 2019).

Velkým posunem v genetické diagnostice pacientů s MR byl vývoj čipových technologií ke stanovení variability počtu kopií (CNV) genomu (Ramiah *et al.*, 2019). V nedávné době Souza *et al.* (2019) publikovali záchyt patogenních a neznámých CNV na obdobně velkém souboru, jaký je reportován v této práci, pacientů s MR (14,2 %, 12,7 %) (Souza *et al.*, 2019). Naše analýza odhalila u 8 pacientů patogenní variantu (13,5 %) a u 9 pacientů CNV s neznámým klinickým významem (15,3 %). Pozorované CNV dohromady zahrnovaly 42 genů asociovaných s onemocněními, která zahrnovala poškození centrálního nervového systému (CNS).

V naší práci považujeme za nejvýznamnější kandidátní geny právě ty, které jsou zahrnuty v již klinicky prokázaných patogenních CNV. Řada těchto genů (*CCND2*, *NDUFA9*, *APOPT1*, *RTEL1*, *PEX11B*) je asociována se změnou velikosti lidského mozku, ta koreluje s kognitivními, emocionálními a sociálními schopnostmi (Filomena *et al.*, 2018). Dále jsme v této práci pozorovali patogenní CNV zasahující geny *BCL11B*, *BRF1*, *EML1*, *TECPR2*, *KCNQ2* a *RBM8*, jejichž poškození je asociováno s nefyziologickým vývojem *corpus callosum*. *Corpus callosum* je hlavní komisura lidského mozku spojující mozkové hemisféry. Jeho poškození patří k nejčastějším malformacím mozku a postihuje 2–3 % osob s mentálním postižením (Heide *et al.*, 2017). Patogenní varianty v naší kohortě také postihly geny *DYNC1H1*, *GALC*, *PACS2* a *VRK1*, které jsou asociovány s degenerací a/nebo špatnou funkcí neuronů v mozku a geny *CHRNA4*, *EEF1A2*, *EHMT1*, *GK*, *PRODH*, *TANGO2*, které se zapojují do vzniku epilepsie, popř. abnormálního EEG (Online Mendelian Inheritance in Man, 2018).

Navíc jsme v této práci pozorovali CNV s nejasným klinickým významem, které obsahovaly 12 genů a mohly by se podílet na vzniku MR. Stejně jako geny skupiny patogenních variant i tyto geny se mohou podílet na agenezi *corpus callosum* (*FH*, *SEPSECS*), špatné funkci neuronů nebo jejich degeneraci (*ZNHIT3*, *GALC*) a/nebo vzniku epilepsie, popř. abnormálního EEG (*PRODH*, *FARS2*, *PIGW*) (Online Mendelian Inheritance in Man, 2018). Gen *KANSL1* je popisován u Koolen-De Vries syndromu, jehož klinický obraz také zahrnuje záchvaty,

strukturální abnormality mozku a hypoplastické *corpus callosum*, avšak nálezy CNV v této oblasti nepovažujeme za průkazné, vzhledem k malému pokrytí detekčními sondami zvolené techniky (Nascimento *et al.*, 2017).

Dnes se již celá řada vědních skupin soustředí u pacientů s mentální retardací na masivně paralelní sekvenování (Han *et al.*, 2018; Nagappa *et al.*, 2018). Rozsáhlé panely exomového sekvenování mohou identifikovat až 30 % klinicky relevantních změn. Na druhou stranu ale identifikují mnoho variant, jejichž význam není jasný nebo s onemocněním nesouvisí. Interpretace těchto nálezů může v klinické praxi znamenat častěji přítěž nežli benefit (Nagappa *et al.*, 2018). Eileen *et al.* (2015) publikovali výsledky sekvenování vybraných 180 genů u pacientů s mentální retardací a vrozenými vadami. Mezi studovanými geny byly i *CDKN1C*, *EHMT1* a dále pak geny z rodiny *CHRNA*, *KCNQ* a *SOX*. Tato práce odhalila 40 % klinicky relevantních genetických změn (Eileen *et al.*, 2015).

Naše práce se soustředila na pacienty s mentálním postižením různé úrovně a s různými doprovodnými klinickými znaky. Přesnější klinická stratifikace těchto pacientů a důkladný výběr genů pro účely masivně paralelního sekvenování by mohl zvýšit efektivitu celého testu a snížit časové i finanční náklady.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo pomocí CNV analýzy stanovit kandidátní geny, které by mohly hrát klíčovou roli v etiologii MR, pro účely masivně paralelního sekvenování. Celkem bylo anotováno 42 genů, které jsou asociovány s poškozením centrálního nervového systému, abnormálním vývojem *corpus callosum*, degenerací/špatnou funkcí neuronů v mozku a/nebo epilepsií. Z hlediska genetické diagnostiky mentální retardace považujeme tyto geny za významné, a proto je navrhuje zařadit do panelů masivně paralelního sekvenování, které by umožnilo identifikovat přítomnost sekvenčních změn těchto genů. Důkladný výběr genů pro tyto účely by mohl zvýšit efektivitu a snížit náklady celé genetické diagnostiky pacientů s mentální retardací.

8 LITERATURA

Ahn J. W., Coldwell M., Bint S., Mackie Ogilvie C. (2015): Array Comparative Genomic Hybridization (Array CGH) for Detection of Genomic Copy Number Variants. *Journal of Visualized Experiments* 2015(96): 51718

Allen K. M., Gleeson J. G., Bagrodia S., Partington M. W., Macmillan J. C., Cerione R. A., Mulley J. C., Walsh C. A. (1998): PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nature Genetics* 20(1): 25–30

Aloui M., Nasri K., Jemaa N. B., Sahraoui M., Masmoudi A., Zghal D., Chelli D., Chaâbouni H., Hamida A. M. B., Siala Gaigi S., Marrakchi R. (2017): Fetopathological examination for the fetuses with Down syndrome in Tunisia: Epidemiological study and associated malformations. *Pathology - Research and Practice* 213(9): 1200–1206.

Bassuk A. G., Geraghty E., Wu S., Mullen S. A., Berkovic S. F., Scheffer I. E., Mefford H. C. (2013): Deletions of 16p11.2 and 19p13.2 in a family with intellectual disability and generalized epilepsy. *American Journal of Medical Genetics Part A* 161(7): 1722–1725

BIOGEN Praha s.r.o. - molekulární biologie a genetika. [online] [navštíveno 4. 1. 2019] Dostupné z <https://biogen.cz/mlpa-kity>

Blanco-Lago R., Malaga-Dieguez I., Granizo-Martinez J. J., Carrera-Garcia L., Barruz-Galian P., Lapunzina P., Nevado-Blanco J., En Representacion Del Grupo Colaborativo Para El Estudio Del Síndrome de Wolf-Hirschhorn Erdgcpeedsw. (2017): Wolf-Hirschhorn syndrome. Description of a Spanish cohort of 51 cases and a literature review. *Revista de neurologia* 64(9): 393–400.

Bonomi M., Rochira V., Pasquali D., Balercia G., Jannini E. A., Ferlin A., (2017): Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *Journal of Endocrinological Investigation* 40(2): 123–134

Cassidy S. B., Driscoll D. J. (2009): Prader–Willi syndrome. *European Journal of Human Genetics* 17(1): 3–13

Centers for Disease Control and Prevention. [online] [navštíveno 30. 1. 2019] Dostupné z <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/downsyndrome/data.html>

Cereda A., Carey J. C. (2012): The trisomy 18 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 7 (1): 81

Ceroni J. R. M., Dutra R. L., Honjo R. S., Llerena J. C., Acosta A. X., Medeiros P. F. V., Galera M. F., Zanardo É. A., Piazzon F. B., Dias A. T., Novo-Filho G. M., Montenegro M. M., Madia F. A. R., Bertola D. R., de Melo J. B., Kulikowski L. D., Kim C. A. (2018): A

Multicentric Brazilian Investigative Study of Copy Number Variations in Patients with Congenital Anomalies and Intellectual Disability. *Scientific Reports* 8(1): 13382.

de Magalhães J. P., Finch C. E., Janssens G. (2010): Next-generation sequencing in aging research: emerging applications, problems, pitfalls and possible solutions. *Ageing Research Reviews*. 9(3), 315–323

Demily C., Lesca G., Poisson A., Till M., Barcia G., Chatron N., Sanlaville D., Munnich A. (2018): Additive Effect of Variably Penetrant 22q11.2 Duplication and Pathogenic Mutations in Autism Spectrum Disorder: To Which Extent Does the Tree Hide the Forest?. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 48(8): 2886–2889

Di-Battista A., Meloni V. A., da Silva M. D., Moysés-Oliveira M., Melaragno M. I. (2016): Unusual X-chromosome inactivation pattern in patients with Xp11.23-p11.22 duplication: Report and review. *American Journal of Medical Genetics Part A* 170(12): 3271–3275.

Ferguson-Smith M. A. (2015): History and evolution of cytogenetics. *Molecular Cytogenetics* 8(1): 19

Genetics Home Reference. [online] [navštíveno 4. 1. 2019] Dostupné z <https://ghr.nlm.nih.gov>

Grand K., Levitt Katz L. E., Crowley T. B., Moss E., Lessig M., Bamba V., Lord K., Zackai E. H., Emanuel B. S., Valverde K., McDonald-McGinn D. M. (2018): The impact of hypocalcemia on full scale IQ in patients with 22q11.2 deletion syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 176(10): 2167–2171

Griffin L. B., Farley F. A., Antonellis A., Keegan C. E., (2016): A novel FGD1 mutation in a family with Aarskog–Scott syndrome and predominant features of congenital joint contractures. *Molecular Case Studies* 2(4): a000943

Guevara-Campos J., González-Guevara L., Cauli O. (2015): Autism and intellectual disability associated with mitochondrial disease and hyperlactacidemia. *International Journal of Molecular Sciences* 16(2): 3870–3884

He X., Caluseriu O., Srivastava R., Denny A. M., Bolduc F. V. (2016): Reversible white matter lesions associated with mutant EHMT1 and Kleefstra syndrome. *Neurology Genetics* 2(2): e58

Heather J. M., Chain B. (2016): The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 107(1): 1–8

Heide S., Keren B., Billette de Villemeur T., Chantot-Bastaraud S., Depienne C., Nava C., Mignot C., Jacquette A., Fonteneau E., Lejeune E., Mach C., Marey I., Whalen S., Lacombe D., Naudion S., Rooryck C., Toutain A., Caignec C. L., Haye D., Olivier-Faivre L., Masurel-

Paulet A., Thauvin-Robinet C., Lesne F., Faudet A., Ville D., des Portes V., Sanlaville D., Siffroi J.-P., Moutard M.-L., Héron D. (2017): Copy Number Variations Found in Patients with a Corpus Callosum Abnormality and Intellectual Disability. *The Journal of Pediatrics* 185: 160-166.e1

Hosek J., Borková A. (2008): The Rubinstein-Taybi syndrome or a broad thumb-hallux syndrome. *Časopis českých lékařů*. 2008; 147(3), 136–40.

Chen C. P., Yip H. K., Wang L. K., Chern S. R., Chen S. W., Lai S. T., Wu P. S., Wang W. (2017): Molecular genetic characterization of a prenatally detected 1.484-Mb Xq13.3-q21.1 duplication encompassing ATRX and a literature review of syndromic intellectual disability and congenital abnormalities in males with a duplication at Xq13.3-q21.1. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 56(3): 385–389.

Chiurazzi P., Pirozzi F. (2016): Advances in understanding – genetic basis of intellectual disability. *F1000Research* 5(5): 1000–599.7134.1.

Choucair N., Ghoch J. A., Corbani S., Cacciagli P., Mignon-Ravix C., Salem N., Jalkh N., El Sabbagh S., Fawaz A., Ibrahim T., Villard L., Mégarbané A., Chouery E. (2015): Contribution of copy number variants (CNVs) to congenital, unexplained intellectual and developmental disabilities in Lebanese patients. *Molecular Cytogenetics* 8(1): 26

Illumina. [online] [navštíveno 4. 1. 2019] Dostupné z <https://www.illumina.com/techniques/sequencing.html>

Kannan T. P., Zilfalil B. A. (2009): Cytogenetics: Past, Present And Future. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 16(2): 4–9.

Kaufman L., Ayub M., Vincent J. B. (2010): The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 2010(24): 182–209

Kazemi M., Salehi M., Kheirollahi M. (2016): Down Syndrome: Current Status, Challenges and Future Perspectives. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* 5(3): 125–133

Kocur T. (2012): Původ chromozómových abnormit v lidských embryích a jejich diagnostika pomocí metody aCGH. *Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno*

LabGuide Průvodce laboratoří. [online] [navštíveno 4. 1. 2019] Dostupné z <http://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/>

LaFramboise T. (2009): Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research* 37(13): 4181–4193

Lee J. S., Hwang H., Kim S. Y., Kim K. J., Choi J. S., Woo M. J., Choi Y. M., Jun J. K., Lim B. C., Chae J. H. (2018): Chromosomal Microarray With Clinical Diagnostic Utility in Children With Developmental Delay or Intellectual Disability. *Annals of Laboratory Medicine* 38(5): 473–480.

Lefebvre M., Sanlaville D., Marle N., Thauvin-Robinet C., Gautier E., Chehadeh S.E., Mosca-Boidron A.-L., Thevenon J., Edery P., Alex-Cordier M.-P., Till M., Lyonnet S., Cormier-Daire V., Amiel J., Philippe A., Romana S., Malan V., Afenjar A., Marlin S., Chantot-Bastaraud S., Bitoun P., Heron B., Piparas E., Morice-Picard F., Moutton S., Chassaing N., Vigouroux-Castera A., Lespinasse J., Manouvrier-Hanu S., Boute-Benejean O., Vincent-Delorme C., Petit F., Meur N. L., Marti-Dramard M., Guerrot A.-M., Goldenberg A., Redon S., Ferrec C., Odent S., Caignec C. L., Mercier S., Gilbert-Dussardier B., Toutain A., Arpin S., Blesson S., Mortemousque I., Schaefer E., Martin D., Philip N., Sigaudy S., Busa T., Missirian C., Giuliano F., Benailly H.K., Kien P.K.V., Leheup B., Benneteau C., Lambert L., Caumes R., Kuentz P., François I., Heron D., Keren B., Cretin E., Callier P., Julia S., Faivre L. (2016): Genetic counselling difficulties and ethical implications of incidental findings from array-CGH: a 7-year national survey. *Clinical Genetics* 89(5): 630–635.

Matulay K., Černay J., Dolejší M., Benko J. (1986): *Mentálna retardácia*. Vyd. 1. Martin: Vydavateľstvo Osveta

Memorial University of Newfoundland. [online] [navštíveno 4. 1. 2019] Dostupné z www.mun.ca

MRC-Holland. [online] [navštíveno 16. 9. 2018] Dostupné z https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_g2hKwvshD9I.

Mundhofir F. E., Winarni T. I., van Bon B. W., Aminah S., Nillesen W. M., Merckx G., Smeets D., Hamel B. C., Faradz S. M., Yntema H. G. (2012): A cytogenetic study in a large population of intellectually disabled Indonesians *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 16(5): 412–417.

Nagappa M., Bindu P. S., Sinha S., Mathuranath P. S., Taly A. B. (2018): Exome sequencing in adult neurology practice: Challenges and rewards in a mixed resource setting. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 174: 48–56.

Nascimento G. R., Pinto I. P., de Melo A. V., da Cruz D. M., Ribeiro C. L., da Silva C. C., da Cruz A. D., Minasi L. B. (2017): *Molecular Syndromology* 8(3): 155–160

Őunap Katrin. (2016): Silver-Russell Syndrome and Beckwith-Wiedemann Syndrome: Opposite Phenotypes with Heterogeneous Molecular Etiology. *Molecular Syndromology* 7(3): 110–121

Online Mendelian Inheritance in Man. [online] [navštíveno 28. 11. 2018] Dostupné z <https://www.omim.org>

Percy A. K. (2016): Progress in Rett Syndrome: from discovery to clinical trials. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 166(11-12): 325–332

Pereira R. R., Pinto I. P., Minasi L. B., de Melo A. V., da Cruz e Cunha D. M., Cruz A. S., Ribeiro C. L., da Silva C. C., de Melo e Silva D., da Cruz A.D. (2014): Screening for intellectual disability using high-resolution CMA technology in a retrospective cohort from Central Brazil. *PLoS One* 9(7): e103117.

Pérez-García D., Granero R., Gallastegui F., Pérez-Jurado L. A., Brun-Gasca C. (2011): Behavioral features of Williams Beuren syndrome compared to Fragile X syndrome and subjects with intellectual disability without defined etiology. *Research in Developmental Disabilities* 32(2): 643–52

Plomin R., Schalkwyk L. C. (2007): Microarrays. *Developmental Science*. 10(1), 19–23

Pirozzi F. , Nelson B., Ghayda Mirzaa G. (2018): From microcephaly to megalencephaly: determinants of brain size. *Dialogues in clinical neuroscience* 20(4): 267–282

Polo-Antúnez A., Ignacio Arroyo-Carrera. (2017): Severe Neurological Phenotype in a Girl with Xp22.31 Triplication. *Molecular Syndromology* 8(4): 219–223

Raymond F. L. (2005): X linked mental retardation: a clinical guide. *Journal of Medical Genetics* 43(3): 193–200

Redon R., Carter N. P. (2009): Comparative Genomic Hybridization: Microarray Design and Data Interpretation. *Methods in Molecular Biology* 529: 37–49.

ResearchGate. [online] [navštíveno 4. 1. 2019] Dostupné z https://www.researchgate.net/figure/Illumina-Genome-Analyzer-sequencing-Adapter-modified-single-stranded-DNA-is-added-to_fig2_24043867

Sajorda B. J., Gonzalez-Gandolfi C. X., Hathaway E. R., Kalish J. M. (2006): Simpson-Golabi-Behmel Syndrome Type 1. *GeneReviews*[®]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle: 1993–2019.

Samango-Sprouse C., Stapleton E., Chea S., Lawson P., Sadeghin T., Cappello C., de Sonneville L., van Rijn S. (2018): International investigation of neurocognitive and behavioral phenotype in 47, XXY (Klinefelter syndrome): Predicting individual differences. *American Journal of Medical Genetics Part A* 176(4): 877–885.

Sanders S. J., He X., Willsey A. J., Ercan-Sencicek A. G., Samocha K. E., Cicek A. E., Murtha M. T., Bal V. H., Bishop S. L., Dong S., Goldberg A. P., Jinlu C., Keaney J. F. 3rd, Klei L., Mandell J. D., Moreno-De-Luca D., Poultney C. S., Robinson E. B., Smith L., Solli-

Nowlan T., Su M. Y., Teran N. A., Walker M. F., Werling D. M., Beaudet A. L., Cantor R. M., Fombonne E., Geschwind D. H., Grice D. E., Lord C., Lowe J. K., Mane S. M., Martin D. M., Morrow E. M., Talkowski M. E., Sutcliffe J. S., Walsh C. A., Yu T. W.; Ledbetter D. H., Martin C. L., Cook E. H., Buxbaum J. D., Daly M. J., Devlin B., Roeder K., State M. W. (2015): Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron* 87(6): 1215–1233

Sansović I., Ivankov A. M., Bobinec A., Kero M., Barišić I. (2017): Chromosomal microarray in clinical diagnosis: a study of 337 patients with congenital anomalies and developmental delays or intellectual disability. *Croatian medical journal*. 58(3): 231–238.

Satgé D., Nishi M., Sirvent N., Vekemans M., Chenard M. P., Barnes A. (2017): A tumor profile in Patau syndrome (trisomy 13). *American Journal of Medical Genetics Part A* 173(8): 2088–2096

Seabright M. (1971): A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971–972.

Souza L. C., Santos A. P., Sgardioli I. C., Viguetti-Campos N. L., Marques Prota J. R., Oliveira-Sobrinho R. P., Vieira T. P., Gil-da-Silva-Lopes V. L. (2019): Phenotype comparison among individuals with developmental delay/intellectual disability with or without genomic imbalances. *Journal of Intellectual Disability Research*.

Stuppia L, Antonucci I., Palka G., Gatta V. (2012): Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012 13(3): 3245–3276.

Suhl J. A., Warren S. T. (2016): Single-Nucleotide Mutations in FMR1 Reveal Novel Functions and Regulatory Mechanisms of the Fragile X Syndrome Protein FMRP. *Journal of Experimental Neuroscience* 9 (Suppl 2): 35–41

Sun G., Tan Z., Fan L., Wang J., Yang Y., Zhang W. (2015) 1q21.1 microduplication in a patient with mental impairment and congenital heart defect. *Molecular Medicine Reports* 12(4): 5655–5658

Švarcová-Slabinová Iva (2011): *Mentální retardace: vzdělávání, výchova, sociální péče*. Vyd. 4., přeprac. Praha: Portál, Speciální pedagogika. ISBN 978-80-7367-889-0.

Tang D. X., Li D. F., Wu R. H., Zhang L. N., Luo X. Y. (2017): ECP2 duplication syndrome: a clinical analysis of three cases and literature review. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 19(5):489–493.

The European Bioinformatics Institute. [online] [navštíveno 4. 1. 2019] Dostupné z <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/ebi-next-generation-sequencing-practical-course/what-next-generation-dna-sequencing/ion-torre>

Thermo Fisher Scientific. [online] [navštíveno 4. 1. 2019] Dostupné z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/ion-torrent.html>

Trevisan P., Rosa R. F. M., Koshiyama D., Zen T. D., Paskulin G. A., Zen P. R. G. (2014): Congenital heart disease and chromosomopathies detected by the karyotype. *Revista Paulista de pediatria sociedade de pedratria de Sao Paulo* (32): 262–271

Uwineza A, Hitayezu J., Jamar M., Caberg J. H., Murorunkwere S., Janvier N., Bours V., Mutesa L. (2016): Cytogenetic Studies of Rwandan Pediatric Patients Presenting with Global Developmental Delay, Intellectual Disability and/or Multiple Congenital Anomalies. *Journal of Tropical Pediatrics* 62(1): 38–45.

Valenta M., Michalík J., Lečbych M. (2012): Mentální postižení: v pedagogickém, psychologickém a sociálně-právním kontextu. Vyd. 1. Praha: Grada Publishing, Psyché. ISBN 978-80-247-3829-1.

Valiente-Pallejà A., Torrell H., Muntané G., Cortés M. J., Martínez-Leal R., Abasolo N., Alonso Y., Vilella E., Martorell L. (2018): Genetic and clinical evidence of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder and intellectual disability. *Human Molecular Genetics* 27(5): 891–900

Voelkerding K. V., Dames S. A., Durtschi J. D. (2009): Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry* 55(4): 641–658

Wang R., Lei T., Fu F., Li R., Jing X., Yang X., Pan M., Li D., Liao C. (2017): Application of chromosome microarray analysis in 489 children with developmental delay/intellectual disability. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 34(4): 528–533.

Williams R. A., Mamotte C. D. S., Burnett. J. R. (2008): Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism. *The clinical biochemic reviews* 29(1): 31–41

Winnepenninckx B., Rooms L., Kooy R. (2013): Mental Retardation: A Review of the Genetic Causes. *The British Journal of Development Disabilities* 49(96): 29–44

Xavier J., Zhou B., Bilan F., Zhang X., Gilbert-Dussardier B., Viaux-Savelon S., Pattni R., Ho S. S., Cohen D., Levinson D. F., Urban A. E., Laurent-Levinson C. (2018): 1q21.1 microduplication: large verbal-nonverbal performance discrepancy and ddPCR assays of HYDIN/HYDIN2 copy number. *Npj Genomic Medicine* 3(1): 24

Zanni G., Bertini E. S. (2011): X-linked disorders with cerebellar dysgenesis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6: 24.

Zollino M., Orteschi D., Rüter M., Pfundt R., Steindl K., Cafiero C., Ricciardi S., Contaldo I., Chieffo D., Ranalli D., Acquafondata C., Murdolo M., Marangi G., Asaro A., Battaglia D. (2014): Unusual 4p16.3 deletions suggest an additional chromosome region for the Wolf-Hirschhorn syndrome-associated seizures disorder. *Epilepsia* 55(6): 849–857