

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Optimalizace molekulárně genetické analýzy  
genu *NPR2* u pacientů s idiopatickým malým  
vzrůstem**

**Diplomová práce**

**Bc. Nikola Golová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2021**

**Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Čapková, Ph.D**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Nikola GOLOVÁ  
Osobní číslo: R190057  
Studijní program: N1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Optimalizace molekulárně genetické analýzy genu NPR2 u pacientů s idiopatickým malým vzrůstem  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

1. Literární řešení genu NPR2 a jeho produktu.
2. Zavedení Sangerovy sekvenace genu NPR2.
3. Ověření vhodnosti zavedené metody pro použití v klinické laboratoři.
4. Pilotní analýza skupiny pacientů s ISS zavedenou metodou.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tiskněná**

#### Seznam doporučené literatury:

1. Ullah I, Zeb A, Shinwari N, Shah K, Gilani S.Z.T., Khan S., Lee K.W., Raza S.J., Hussain S., Liaqat K., Ahmad W. (2018): Molecular and in silico analyses validates pathogenicity of homozygous mutations in the NPR2 gene underlying variable phenotypes of Acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 102, 76-86.
2. Shuhaibar L.C., Egbert J.R., Edmund A.B., Uliasz T.F., Dickey D.M., Yee S.P., Potter L.R., Jaffe L.A. (2016): Dephosphorylation of juxtamembrane serines and threonines of the NPR2 guanylyl cyclase is required for rapid resumption of oocyte meiosis in response to luteinizing hormone. *Developmental biology* 400(1), 194-201.
3. Shuhaibar L.C., Robinson J.W., Vigone G., Shuhaibar N.P., Egbert J.R., Baena V., Uliasz T.F., Kaback D., Yee S.P., Feil R., Fisher M.C., Dealy C.N., Potter L.R., Jaffe L.A. (2017): Dephosphorylation of the NPR2 guanylyl cyclase contributes to inhibition of bone growth by fibroblast growth factor. *eLife* 6, e31343.
4. Amano N., Makai T., Ito Y., Narumi S., Tanaka T., Yokota S., Ogata T., Hasegawa T. (2014): Identification and functional characterization of two novel NPR2 mutations in Japanese patients with short stature. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99(4), 713-718.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Zuzana Čapková**  
Ústav lékařské genetiky

Datum zadání diplomové práce: 12. října 2019  
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Pohoří  
tel.: +420 585 634 901  
+2-

LS.

15-04-2021

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 12. dubna 2021

## BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

<b>Jméno a příjmení autora:</b>	Bc. Nikola Golová
<b>Název práce:</b>	Optimalizace molekulárně genetické analýzy genu <i>NPR2</i> u pacientů s idiopatickým malým vzrůstem
<b>Typ práce:</b>	Diplomová práce
<b>Pracoviště:</b>	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
<b>Vedoucí práce:</b>	Mgr. Zuzana Čapková, Ph.D.
<b>Rok obhajoby práce:</b>	2021
<b>Klíčová slova:</b>	idiopatický malý vzrůst, <i>NPR2</i> , Sangerovo sekvenování, natriuretický peptid, AMDM, varianta, MPS
<b>Počet stran:</b>	55
<b>Počet příloh:</b>	0
<b>Jazyk:</b>	český

## SOUHRN

Malý vzrůst u dítěte může být znakem mnoha závažných onemocnění. Je popsána celá řada příčin rozvoje této poruchy včetně genetických. Ačkoliv je malý vzrůst předmětem multioborového studia, v řadě případů se nepodaří objasnit příčinu tohoto onemocnění (idiopatický malý vzrůst, ISS).

Cestou optimalizace teploty *annealingu* primerů a složení PCR směsi byla zavedena Sangerova sekvenace kódujících oblastí genu *NPR2* a jejich nejbližších intronických oblastí (+/-20 nt), která splňuje všechny nároky kladené na metody užívané v klinické praxi. Rovněž byla zachycena varianta NM\_003995.4(*NPR2*):c.1711-8dupT neznámého klinického významu u 1 z 22 pacientů s ISS (4,5 %).

Protein genu *NPR2* je významně zapojen do správného vývoje a funkce chondrocytů v růstových ploténkách dlouhých kostí. Odhalená varianta by mohla objasnit příčinu ISS u pacienta, avšak je zapotřebí dalšího studia k potvrzení této hypotézy.

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATIONS

<b>Author's first name and surname:</b>	Bc. Nikola Golová
<b>Title:</b>	Optimization of <i>NPR2</i> gene molecular genetics analysis in case of patients with idiopathic short stature
<b>Type of thesis:</b>	Master thesis
<b>Department:</b>	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
<b>Supervisor:</b>	Mgr. Zuzana Čapková, Ph.D.
<b>The year of presentation:</b>	2021
<b>Keywords:</b>	idiopathic short stature, <i>NPR2</i> , Sanger sequencing, natriuretic peptide, AMDM, variants, MPS
<b>Number of pages:</b>	55
<b>Number of appendices:</b>	0
<b>Language:</b>	Czech

## SUMMARY

Short stature in children may indicate many serious diseases. A lot causes of the development of this disorder have already been described, including genetic ones. Although short stature is the subject of a multidisciplinary study, in many cases, it is not possible to clarify the cause of this disease (Idiopathic Short Stature, ISS).

Sanger sequencing of the coding regions of the *NPR2* gene and their nearest intronic regions (+/- 20 nt) was set up by optimizing primers annealing temperature and the components of the PCR master mix. This method meets all the requirements for being used in clinical practice. Also, variant NM\_003995.4 (*NPR2*): c.1711-8dupT of uncertain clinical significance was detected in 1 of 22 patients with ISS (4.5 %).

The *NPR2* gene protein is significantly involved in the proper development and function of chondrocytes in the growth plates of long bones. This disclosed variant could explain the cause of ISS in the patient, however further study is needed to confirm this hypothesis.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala zcela samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů pod vedením Mgr. Zuzany Čapkové, Ph.D.

V Olomouci dne .....

Podpis: .....

# PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Zuzaně Čapkové, Ph.D. za její ochotu, čas a odborné rady, které mi poskytla během vypracování teoretické i experimentální části této diplomové práce. Děkuji také kolektivu Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc za jejich trpělivost a poskytnutí cenných informací během vykonávání laboratorních úkonů. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým, kteří mi byli po celou dobu mého studia velkou oporou.

Tato práce vznikla za finanční podpory MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892) a IGA\_LF\_2021\_019.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>3</b>
3.1	Popis struktury a exprese genu <i>NPR2</i> .....	3
3.2	Struktura a funkce receptoru NPR-B .....	3
3.3	Význam <i>NPR2</i> v růstu dlouhých kostí.....	4
3.4	Genetické aberace postihující <i>NPR2</i> .....	5
3.5	Molekulární mechanismy variant <i>NPR2</i> .....	7
3.6	Klinický obraz pacientů s poruchou <i>NPR2</i> .....	9
3.7	Signální dráha <i>NPR2</i> při růstu kostí u myších modelů.....	10
3.8	Možnosti genetické analýzy <i>NPR2</i> .....	11
3.8.1	Karyotypizace G-pruhováním.....	11
3.8.2	Metoda Sangerova sekvenování .....	11
3.8.3	MPS Ion Torrent .....	13
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>16</b>
4.1	Biologický materiál .....	16
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	16
4.3	Použité oligonukleotidy .....	17
4.4	Použité přístroje a pomůcky .....	19
4.5	Použité softwary .....	20
4.6	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	20
4.6.1	Izolace DNA z plné krve metodou dle Millera.....	20
4.6.2	Optimalizace Sangerova sekvenování .....	21
4.6.3	Cílené amplikonové sekvenování na platformě Ion Torrent s využitím celoexomového virtuálního genového panelu .....	29
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>31</b>
5.1	Optimalizace sekvenování <i>NPR2</i> genu Sangerovou metodou.....	31
5.2	Verifikace metody.....	39
5.3	Pilotní analýza .....	43
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>51</b>



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<i>ACAN</i>	aggrecan core protein
AK	aminokyselina
AMDM	akromesomelická dysplázie typu Maroteaux
bp	pár bází
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNP	natriuretický peptid C
CNV	variabilita počtu kopií (z angl. copy number variation)
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
FGF	fibroblastový růstový faktor
<i>FGFR3</i>	receptor fibroblastového růstového faktoru 3
Gb	gigabáze
GTP	guanosintrifosfát
H <sup>+</sup>	vodíkový kation
ID	identifikační číslo
ISS	idiopatický nízký vzrůst (z angl. idiopathic short stature)
kb	kilobáze
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
Mb	megabáze
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MPS	masivně paralelní sekvenování
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
<i>NPPC</i>	prekurzor natriuretického peptidu C
<i>NPR2</i>	receptor natriuretického peptidu 2
NPR-B	receptor natriuretických peptidů typu B
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PGM	Personal Genome Machine
<i>SHOX</i>	short stature homeobox
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (z angl. single nucleotide polymorphism)
WT	standardní alela (z angl. wild type)

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Struktura genu <i>NPR2</i> .....	3
Obr. 2: Detailní struktura receptoru NPR-B (převzato a upraveno ze Shuhaibar <i>et al.</i> , 2015).....	4
Obr. 3: Princip signální dráhy CNP-NPR-B ve spojení s FGF-FGF3 dráhou (převzato a upraveno z Klag <i>et Horton</i> , 2016). ....	5
Obr. 4: Fotografie demonstrující charakteristické patologické projevy AMDM (převzato a upraveno z Faivre <i>et al.</i> , 2000). ....	9
Obr. 5: RTG snímek ocasní kosti normální myši a myši s geneticky modifikovaným <i>NPR2</i> genem (převzato a upraveno ze Shuhaibar <i>et al.</i> , 2017). ....	10
Obr. 6: Jednotlivé kroky při sekvenování dle Sangerovy metody (převzato a upraveno ze Zhang <i>et al.</i> , 2014). ....	12
Obr. 7: Schéma postupu sekvenace na platformě Ion Torrent. a) příprava knihovny emulzní PCR; b) detail sekvenačního chipu s mikrojamkami; c) sekvenace (převzato a upraveno z Churko <i>et al.</i> , 2013; Kohn <i>et al.</i> , 2013). ....	14
Obr. 8: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 1 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.....	31
Obr. 9: Dva elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonu 2 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.....	31
Obr. 10: Čtyři elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonu 3 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu. ....	32
Obr. 11: Dva elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonu 4 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu. ....	32
Obr. 12: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 5 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.....	33
Obr. 13: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 6 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.....	33
Obr. 14: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 7 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.....	33
Obr. 15: Dva elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonu 8 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu. ....	34
Obr. 16: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 9 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.....	34

Obr. 17: Tři elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonu 10 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu. ....	35
Obr. 18: Pět elektroforetogramů produktů PCR amplifikace exonů 11 a 12 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu. ....	35
Obr. 19: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 13 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.....	36
Obr. 20: Dva elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonů 14 a 15 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu. ....	36
Obr. 21: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 16 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.....	36
Obr. 22: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 17 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.....	37
Obr. 23: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 18 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.....	37
Obr. 24: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonů 19 a 20 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu. ....	37
Obr. 25: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonů 21 a 22 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu. ....	38
Obr. 26: Elektroforetogram získaný po PCR reakci se vstupní DNA o koncentraci pod detekčním limitem. ....	39
Obr. 27: Dva elektroforetogramy PCR produktů kódujících oblastí genu <i>NPR2</i> vyhotovené ve stejném dni. ....	39
Obr. 28: Dva elektroforetogramy ověřující robustnost metody.....	40
Obr. 29: Varianta NM_003995.4( <i>NPR2</i> ):c.1711-8dupT u pacientky 229_20 zachycená Sangerovým sekvenováním ve forward řetězci (nahore) i reverse řetězci (dole).....	45
Obr. 30: Genealogické schéma nositelky varianty NM_003995.4( <i>NPR2</i> ):c.1711-8dupT. ....	46

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Klinický význam genetických variant genu <i>NPR2</i> .....	7
Graf 2: Četnosti skupin dysmorfických znaků u pacientů vyšetřovaných na přítomnost variant genu <i>NPR2</i> . ....	44

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Přehled variant genu <i>NPR2</i> menších než 51 bp dle jejich klinické significance (převzato a upraveno z ClinVar, 2020).....	6
Tab. 2: Představené systémy Ion Torrent (převzato a upraveno z Dlamini <i>et al.</i> , 2020; Thermo Fisher Scientific, 2020). .....	15
Tab. 3: Přehled primerů použitých na PCR amplifikaci a Sangerovo sekvenování. ....	18
Tab. 4: Složení reakční směsi obsahující DMSO pro PCR amplifikaci. ....	21
Tab. 5: Složení reakční směsi bez DMSO pro PCR amplifikaci. ....	21
Tab. 6: Základní teplotní a časový rozpis PCR reakce. ....	22
Tab. 7: Přehled všech testovaných podmínek v PCR reakci. ....	23
Tab. 8: Složení PCR sekvenační směsi na 1 reakci. ....	26
Tab. 9: Teplotní a časový profil termocykléru pro sekvenační PCR reakci. ....	26
Tab. 10: Složení směsi pro post-sekvenační purifikaci na 1 reakci. ....	27
Tab. 11: Specifické parametry a hodnoty pro sekvenování exonů <i>NPR2</i> genu kapilární elektroforézou SeqStudio. ....	28
Tab. 12: Teploty <i>annealingu</i> a použití DMSO pro úspěšnou PCR amplifikaci všech exonů genu <i>NPR2</i> . ....	38
Tab. 13: Záchyt variant Sangerovým sekvenováním v porovnání s MPS. ....	41
Tab. 14: Přehled změněných parametrů pro testování reprodukovatelnosti metody. ....	41
Tab. 15: Dva soubory délek čtení řetězců exonů <i>NPR2</i> (+/-20 nt) Sangerovou metodou. ....	42
Tab. 16: Statistické vyhodnocení sekvenačních výsledků dvou pracovníků. ....	43
Tab. 17: Varianty genu <i>NPR2</i> zachycené u pacientů Sangerovým sekvenováním. ....	44

# 1 ÚVOD

Malý vzrůst může být znakem mnoha závažných onemocnění. U dětí s touto poruchou jsou cestou kaskádové diagnostiky postupně vyloučeny exogenní a metabolické příčiny onemocnění. Genetická analýza je indikována u dětí, u kterých nebyla odhalena jiná příčina malého vzrůstu (idiopatický malý vzrůst, ISS).

Cílem těchto analýz jsou zejména geny, jejichž produkty jsou zapojeny do správného vývoje a funkce chondrocytů v růstových ploténkách dlouhých kostí.

Jedním z těchto genů je i *Natriuretic peptide receptor 2 (NPR2)* jehož exprese dává vznik transmembránovému receptoru NPR-B. Tento receptor je se svým ligandem jedním z významných regulátorů endochondrální osifikace. U nositelů patogenních sekvenčních variant tohoto genu dochází k narušení parakrinní signalizace při růstu dlouhých kostí a obratlů. Konečné fenotypové projevy variant genu *NPR2* jsou variabilní. Homozygotní varianty genu vedou ke vzniku vzácné akromesomelické dysplasie typu Maroteaux, zatímco u heterozygotů je pozorován malý vzrůst, někdy doprovázen necharakteristickými skeletálními poruchami.

Cílem této diplomové práce bude zavést metodu Sangerova sekvenování genu *NPR2* a ověření vhodnosti použití této metody v klinické laboratoři. Dále bude analyzován pilotní soubor 22 pacientů s ISS zavedenou metodou Sangerova sekvenování genu *NPR2*.

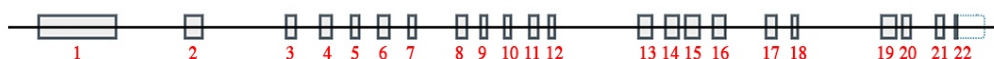
## **2 CÍLE PRÁCE**

1. Literární rešerše genu *NPR2* a jeho produktu.
2. Zavedení Sangerovy sekvenace genu *NPR2*.
3. Ověření vhodnosti zavedené metody pro použití v klinické laboratoři.
4. Pilotní analýza skupiny pacientů s ISS zavedenou metodou.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Popis struktury a exprese genu *NPR2*

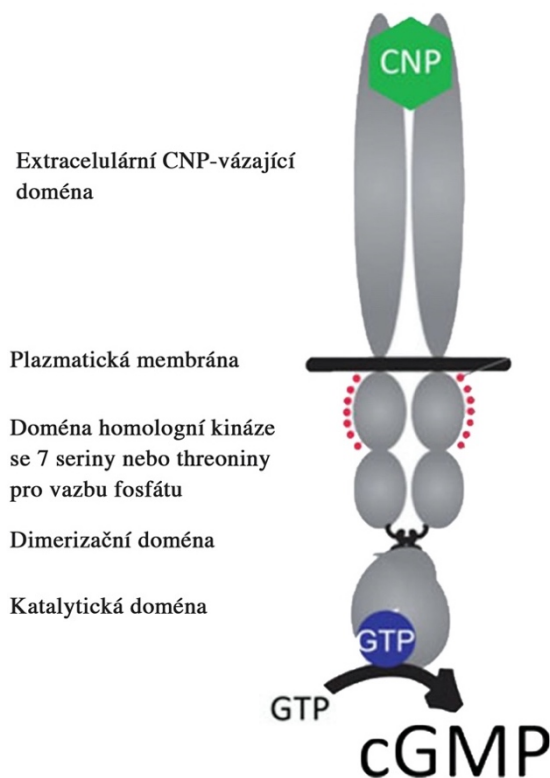
*Natriuretic peptide receptor 2 (NPR2)* je gen kódující jeden ze dvou integrálních membránových receptorů pro natriuretické peptidy (Wang *et al.*, 2015). *NPR2* je lokalizován na krátkém raménku autosomálního chromozomu 9 (chr9: 35791588-35809728, dle GRCh37.p13/hg19). Tento gen se skládá z 22 exonů (viz Obr. 1) a je velký 18,1 kb (NCBI, 2020). Součástí genu jsou dvě domény, jedna slouží pro vznik proteinkinázy a druhá tvoří guanlyátcyklázu. Přepis *NPR2* genu dává vznik celkem 7 různým transkriptům. Avšak pouze transkript NM\_003995.4 kóduje výsledný funkční protein o délce 1047 aminokyselin (AK) (ENSEMBL, 2020; NCBI Gene, 2020). K vysoké expresi *NPR2* genu dochází v lidské tkáni mozkové, plicní, ledvinové, chrupavčité a tkáni vaječníků a varlat (Potthast *et Potter*, 2005).



Obr. 1: Struktura genu *NPR2*.

#### 3.2 Struktura a funkce receptoru NPR-B

*NPR2* gen kóduje integrální receptor pro natriuretické peptidy NPR-B (Natriuretic Peptide Receptor B). Tento transmembránový receptor se skládá z glykosylované extracelulární domény, která váže natriuretický peptid C (CNP). Dále je receptor tvořen doménou překlenující membránu a intracelulární homologní proteinkinázovou doménou, která zajišťuje vazbu fosfátů na 7 serinových nebo threoninových míst. Další intracelulární část receptoru tvoří dimerizační doména. Koncovou doménu receptoru tvoří guanlyátcykláza katalyzující konverzi guanosintrifosfátu (GTP) na cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a pyrofosfát (viz Obr. 2). cGMP je významný intracelulární posel v signální transdukcii a reguluje cGMP-dependentní proteinkinázy, specifické fosfodiesterázy a iontové kanály řízené cyklickými nukleotidy (Potthast *et Potter*, 2005).



Obr. 2: Detailní struktura receptoru NPR-B (převzato a upraveno ze Shuhaibar *et al.*, 2015).

Aktivita natriuretického receptoru je regulována fosforylací obdobně jako je tomu u receptorů spojených s G-proteinem, avšak u receptoru NPR-B fosforylace/defosforylace způsobuje chování opačné. Je-li NPR-B maximálně fosforylovaný, je nejvíce vnímavý vůči signální kaskádě. Ve své defosforylované formě je guanylátcykláza B inaktivní (Dickey *et al.*, 2015).

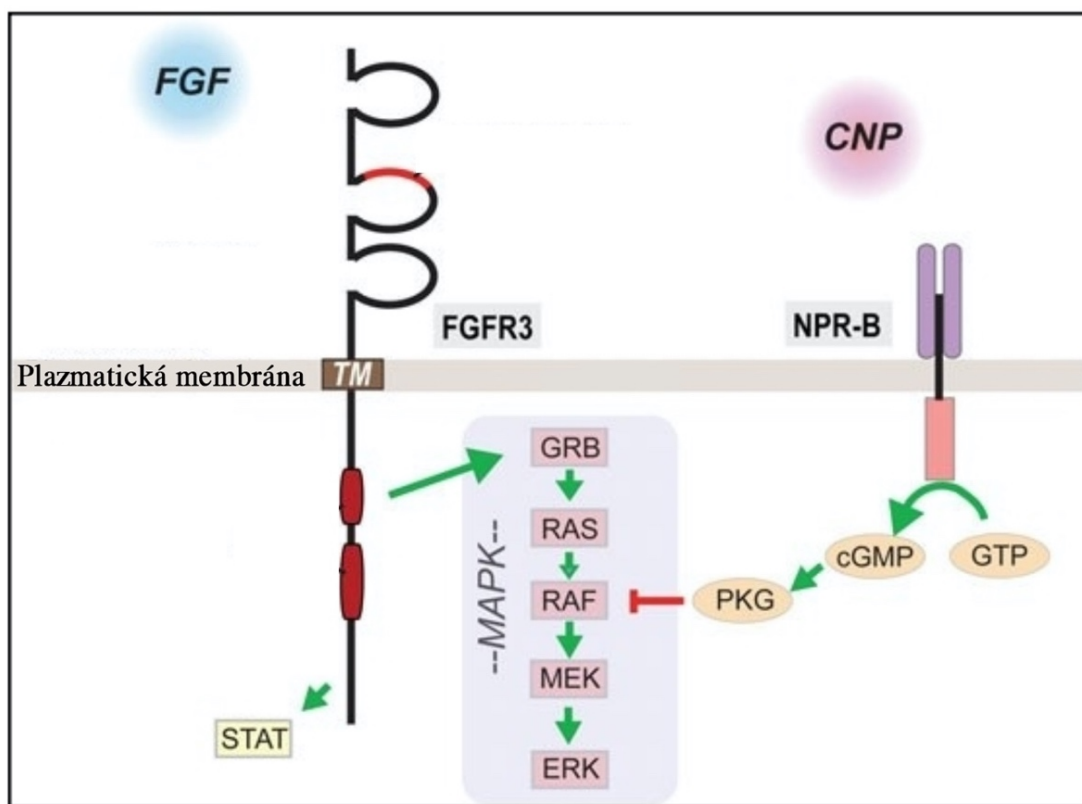
Receptor NPR-B patřící do skupiny membránových receptorů je po aktivaci ligandem CNP internalizován, následně degradován v lysozomech a poté recyklován zpět na buněčný povrch (Pandey, 2015).

### 3.3 Význam *NPR2* v růstu dlouhých kostí

V období mezi narozením a dospíváním dochází u savců k nejvýznamnějšímu prodlužování kostí. Tento proces je kontrolován mnoha proteiny a případná aberace ovlivňující jejich konformaci, strukturu nebo funkci může způsobit změnu v délce kosti, tedy její zkrácení, ale i prodloužení. Jedním z regulátorů je právě guanylátcykláza B (NPR-B) kódovaná genem *NPR2* (Shuhaibar *et al.*, 2017).



Receptor NPR-B hraje klíčovou roli v signální dráze endochondrální osifikace, která je zodpovědná za růst dlouhých kostí končetin a obratlů (Amano *et al.*, 2014). Aktivace receptoru vyžaduje přítomnost ligandu CNP a fosforylaci na intracelulárních serinech či threoninech. Po nasednutí ligandu CNP na receptor NPR-B dochází k dimerizaci NPR-B a následné aktivaci cytosolické domény guanylátcyklázy, která syntetizuje druhého posla cGMP z molekuly GTP. cGMP dále aktivuje cGMP-dependentní proteinkinázu typu II a ta inhibuje mitogenem aktivovanou proteinkinázovou (MAPK) dráhu v signální dráze receptoru 3 pro růstový faktor fibroblastů (*FGFR3*) (viz Obr. 3). Úkolem CNP-NPR-B dráhy je tedy zvýšení proliferace a terminální diferenciace chondrocytů (Olney, 2006).



Obr. 3: Princip signální dráhy CNP-NPR-B ve spojení s FGF-FGFR3 dráhou (převzato a upraveno z Klag *et Horton*, 2016).

### 3.4 Genetické aberace postihující *NPR2*

Odhalení kauzální varianty v zodpovědných genech má zásadní význam pro diagnózu, prognózu a predikci u pacientů, případně pro vhodnou léčbu onemocnění. Určení genetické příčiny vzniku onemocnění umožňuje také určení rizika u příbuzných osob a jejich následné vyšetření (McPherson, 2006).

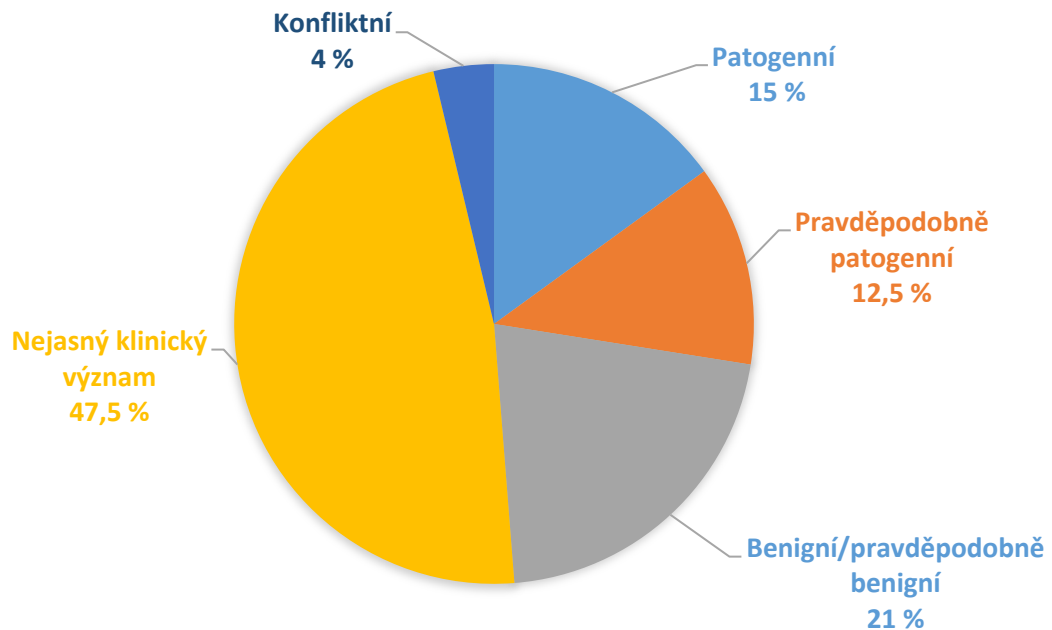
Gen *NPR2* může být poškozen různě velkými změnami. Ačkoliv je klinická klasifikace přirozeně závažnější u variant většího rozsahu (> 1 Mb), jsou pozorovány podobné fenotypové obrazy i u variant menších (< 51 pb) (ClinVar, 2020).

Celkem je klinicky popsáno 32 variant o délce větší než 1 Mb, které mimo jiné geny zasahují i gen *NPR2*. Na základě doporučení Miller *et al.* z roku 2010 jsou všechny klasifikovány jako patogenní nebo pravděpodobně patogenní. Pouze varianta NC\_000009.11:g.(?\_34645556)\_(36277059\_?)dup je klasifikována jako neznámá. Klinický obraz nositelů těchto variant zahrnuje akromesomelickou dysplasií, epifysální chondrodysplasií, nespecifické skeletální abnormality a jiné (ClinVar, 2020).

S nástupem sekvenačních technik byly odhaleny varianty menšího charakteru (< 51 pb). Celkem bylo zaznamenáno 160 takových změn (viz Tab. 1) a z nich byl u počtu 24 prokázán patogenní klinický význam. Dalších 20 je interpretováno jako pravděpodobně patogenní. Nositelé těchto změn mají obdobný klinický fenotyp jako pacienti s rozsáhlejšími variantami (tj. akromesomelická dysplasiie, epifysální chondrodysplasiie, nespecifické skeletální abnormality aj.). Celkem 34 variant je klasifikováno jako benigní či pravděpodobně benigní. V neposlední řadě bylo popsáno 76 variant, u kterých je klinický význam nejasný a u 6 variant je klinická interpretace různá u různých autorů záznamu (konfliktní interpretace) (ClinVar, 2020). Procentuální rozložení variant podle jejich klinického významu je znázorněno v Grafu 1.

Tab. 1: Přehled variant genu *NPR2* menších než 51 bp dle jejich klinické signifikance (převzato a upraveno z ClinVar, 2020).

Interpretace	Počet variant	Celkový počet variant
Patogenní	24	
Pravděpodobně patogenní	20	
Benigní/pravděpodobně benigní	34	160
Nejasný klinický význam	76	
Konfliktní	6	



Graf 1: Klinický význam genetických variant genu *NPR2*.

### 3.5 Molekulární mechanismy variant *NPR2*

V současné době je nejdůležitějším úkolem molekulární genetiky interpretace vzácných genetických variant nejasného klinického významu. Důkazy o patogenitě genetické varianty jsou zásadní pro poskytnutí optimální péče, předpovězení průběhu onemocnění a poskytování genetického poradenství ostatním členům rodiny (Rodenburg, 2018).

Byla popsána řada molekulárních mechanismů, které mohou narušit správnou funkci receptoru NPR-B. Nejzávažnějšími variantami jsou tzv. *frame shift* (tj. varianty posunující čtecí rámeček) a varianty vedoucí ke vzniku nového stop kodonu. U *missense* variant neboli variant měnících smysl záleží na záměně aminokyseliny v polypeptidovém řetězci. Závažnost *missense* variant je do jisté míry předvídatelná pomocí predikčních nástrojů (např. SIFT či PolyPhen). Avšak nezastupitelnou roli zde hrají funkční analýzy (Hu *et al.*, 2012).

Funkční analýza je důležitým nástrojem pro objasnění a popis molekulárních mechanismů vybraných sekvenčních variant genu *NPR2*. Výzkum produkce cGMP mutantními buňkami *in vitro* je stěžejní metodou pro větší porozumění toho, jak varianta ovlivňuje *downstream* signalizaci, a tím i skeletální vývoj. Odhadnutí množství vyprodukovaného cGMP ve vzorku je založeno na principu radioimunoanalýzy či enzymové imunoanalýzy (Dickey *et al.*, 2017).

U několika alel genu *NPR2* je znám jak funkční dopad daných variant, tak i popřípadě jejich klinicky patogenní význam. U jedné ze 3 sekvenčních variant, jejichž vzniklý polypeptidový produkt se nachází v extracelulární doméně, dochází k záměně isoleucinu za valin (V187I) v receptoru. Ta nevykazuje významnou odchylku v produkci cGMP ve srovnání se standardní variantou alely (WT) po stimulaci ligandem CNP, z tohoto důvodu je tato sekvenční varianta shledána jako funkčně neutrální. U dalších dvou heterozygotních *missense* variant, konkrétně substituce cysteinu za arginin (R110C) a kyseliny glutamové za glutamin (Q417E), dochází k významnému poklesu v produkci cGMP po vystavení proteosyntetického produktu ligandu CNP *in vitro*. Tyto poznatky prokazují dominantně negativní efekt těchto dvou variant a také to, že jejich dominantně negativní mechanismus odpovídá molekulární patogenezi mutací *NPR2* genu (Amano *et al.*, 2014).

Další 3 heterozygotní varianty *NPR2* se vyznačují patogenním dopadem na fyziologickou funkci receptoru NPR-B v buňce, který je genem kódován. Dvě z těchto *missense* variant jsou lokalizovány v extracelulární oblasti receptoru vázající ligand CNP. U první z nich dochází k záměně serinu za prolin (S76P) a u druhé argininu za prolin (R263P). Třetí varianta s výměnou argininu za cystein (R819C) se nachází v oblasti mezi kinázovou doménou a guanylátcyklázovou doménou. Následkem každé této varianty dochází v *in vitro* analýze k podstatnému poklesu hladiny po stimulaci CNP oproti buňkám transfekovaným WT receptorem a prázdným vektorem (Vasques *et al.*, 2013).

Pro studium hypotéz na molekulární úrovni týkajících se konkrétních variant má své místo také konfokální mikroskopie. Spolu s imunofluorescenčním značením umožňuje konfokální mikroskop lokalizovat receptor NPR-B v buňce a potvrdit tak případné defekty v transportu receptorů v buňkách s patogenní variantou *NPR2* genu. Existují rozdíly v chování buněk obsahující určité *missense* varianty pozměňující extracelulární CNP-vázající doménu a v chování WT buněk s NPR-B receptory, které se transportují k plazmatické membráně a vykazují silnou kolokalizaci s proteinem asociovaným s plazmatickou membránou, tzv. H-Ras. U buněk s variantou S76P dochází alespoň k částečně normálnímu přenosu NPR-B k plazmatické membráně, avšak u buněk s variantami R263P a R819C dochází vlivem ztráty funkce k retenci proteinových produktů na endoplazmatickém retikulu. U buněk s některými dalšími podobnými variantami lze právě po vizualizaci identifikovat vazbu defektních receptorů s proteinem kalnexinem přítomného uvnitř endoplazmatického retikula. Je tak pravděpodobné, že právě pouze částečná glykosylace snižuje aktivitu receptoru a nedochází tak k jeho

přesunu k buněčnému povrchu. Pro plné porozumění dominantně negativních efektů *NPR2* variant jsou zapotřebí další studie (Hume *et al.*, 2009; Vasques *et al.*, 2013).

### 3.6 Klinický obraz pacientů s poruchou *NPR2*

Nejnovější studie prokázaly signalizaci CNP-NPR-B jako zásadní při kosterním vývoji u lidí. Výsledkem biialelické *loss-of-function* aberace inaktivující guanylátcyklázu B je akromesomelická dysplázie typu Maroteaux (AMDM). Typickými znaky této autozomálně recesivní genetické choroby jsou extrémně nízký vzrůst a krátké končetiny, zakřivené předloktí, zkrácené metakarpy a články prstů viz Obr. 4 (Lebl *et al.*, 2019).



Obr. 4: Fotografie demonstrující charakteristické patologické projevy AMDM (převzato a upraveno z Faivre *et al.*, 2000).

Heterozygotní varianty genu *NPR2*, u kterých je inaktivována pouze jedna ze dvou alel, se projevují nižším vzrůstem s nespécifickými skeletálními abnormalitami, např. disproporční poruchou vzrůstu. Uvádí se, že u 6 % pacientů s původní diagnózou ISS bývá nalezena právě heterozygotní varianta genu *NPR2*. Průměrná výška takových heterozygotů bývá v dospělosti nižší o 5,7 cm než průměrná výška kontrolních osob (Vasques *et al.*, 2013).

Naopak varianty *NPR2* způsobující získání další funkce (*gain-of-function*), a tudíž zvýšení hladiny cGMP, v chrupavce vedou k prodlužování dlouhých kostí. (Amano *et al.*,

2014). Jedná se o epifyzární chondrodysplázii typ Miura. U pacientů se projevuje typicky vyšším vzrůstem, zpravidla trpí mírnou skoliózou, vbočenými kyčlemi s epifyzární dysplázií a makrodaktylií, tedy, že jejich prsty jsou nepřírodně dlouhé a hubené (Miura *et al.*, 2012).

### 3.7 Signální dráha *NPR2* při růstu kostí u myších modelů

Myší modely jsou důležitým nástrojem pro studium lidských genů a pro manipulaci s nimi pomocí transgenních technologií. Více než 99 % myších genů je homologních vzhledem k lidskému genomu, což spolu s krátkou reprodukční dobou dělá z myši ideální organismus pro zkoumání fyziologických a patologických stavů (Kořínek *et Sedláček*, 2012).

Laboratorními výzkumy bylo zjištěno, že existuje řetězec chemických signálů, které spojují dva důležité proteiny FGFR3 a NPR-B ovlivňující prodlužování kostí. V případě, že je FGFR3 receptor aktivní, z NPR-B receptoru jsou odebírány molekuly fosfátů, dochází tím ke snižování produkce cGMP. Blokace NPR-B, a s tím spojená redukce tvorby druhého posla, vede ke vzniku kratších kostí. Až ve studii na myších z roku 2017 byla funkčnost tohoto kontrolního mechanismu prokázána i na skutečných kostech. Pro výzkum byly použity geneticky modifikované myši, u kterých patogenní varianta *NPR2* genu neumožňuje odstraňování molekul fosfátů z proteinkinázové domény NPR-B receptoru. Stále aktivní receptor tak produkuje vysoké množství cGMP potřebné pro endochondrální růst kostí. Výsledkem jsou delší kosti o 8–14 %, což dokazuje rentgenový snímek ocasní kosti modifikované myši v porovnání se standartní (viz Obr. 5) (Shuhaibar *et al.*, 2017).



Obr. 5: RTG snímek ocasní kosti normální myši a myši s geneticky modifikovaným *NPR2* genem (převzato a upraveno ze Shuhaibar *et al.*, 2017).

### 3.8 Možnosti genetické analýzy *NPR2*

Při výběru ze současných metod pro detekci genetických aberací genu *NPR2* je rozhodující velikost možné aberace a s tím souvisí především rozlišovací schopnost vhodných technik. Pro odhalení větších změn na úrovni několika Mb slouží metoda G-pruhování (Gullapalli *et al.*, 2012). Většina strukturních změn je však na úrovni desítek či jednotek bp, pro jejichž zachycení je nutné použít citlivější metody jako je Sangerovo sekvenování či masivně paralelní sekvenování (MPS) (Rusk, 2011).

#### 3.8.1 Karyotypizace G-pruhováním

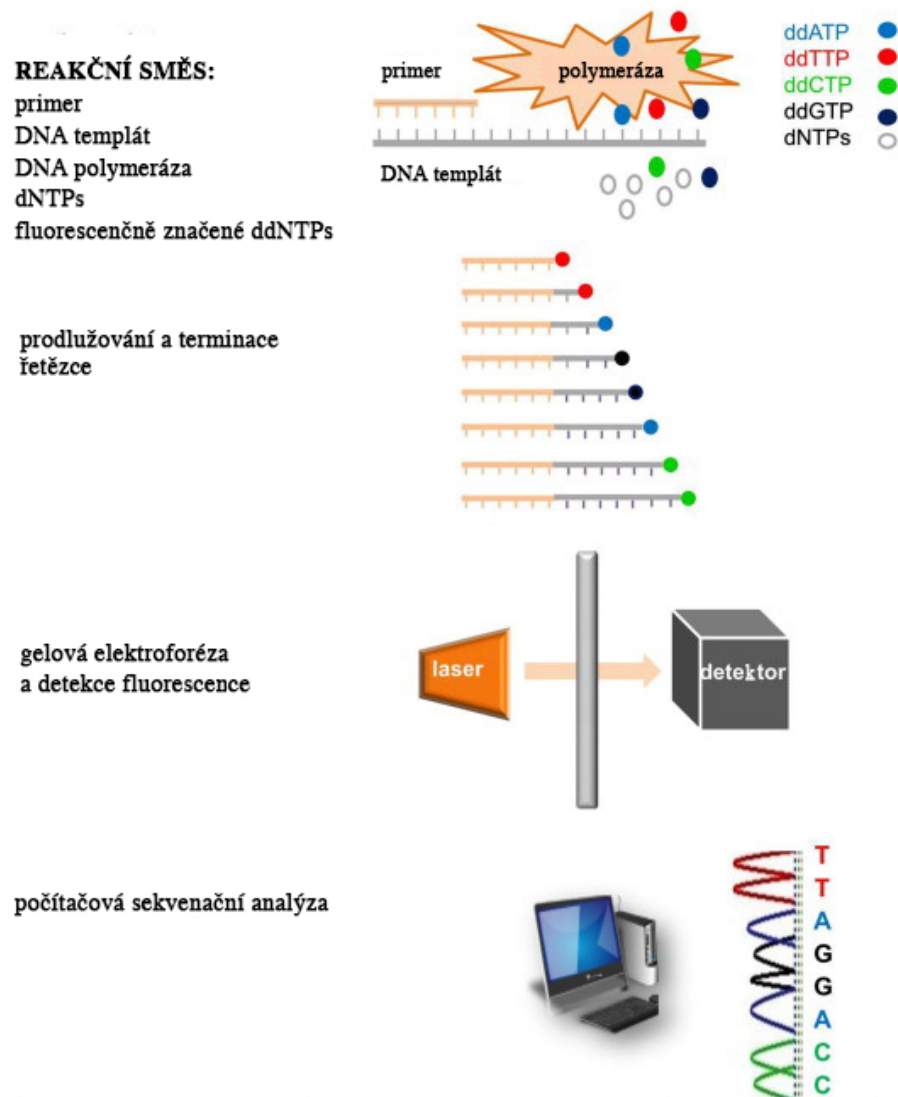
Cytogenetická metoda pro karyotypizaci G-pruhování umožňuje detekci chromozomálních aberací. Maximální rozlišení této metody je 5 Mb, tudíž je možné G-pruhováním zachytit velké duplikace genu *NPR2* na chromozomu 9 (Riegel, 2014).

Principem této metody je izolace metafázních chromozomů po inkubaci kolcemidem rozrušující mitotické vřeténko, následná inkubace s trypsinem a obarvení Giemsovým roztokem. Trypsin je proteolytický enzym a umožňuje denaturovat euchromatické histonové proteiny. Z tohoto důvodu se oblasti DNA s vysokou transkripční aktivitou, tj. euchromatin, jeví jako světlé pruhy. Vzniklé tmavé G-pruhy odpovídají vysoce kondenzovanému chromatinu s malou či žádnou transkripční aktivitou, tj. heterochromatinu, který nese mnoho histonů ochraňující před působením trypsinu (Howe *et al.*, 2014).

#### 3.8.2 Metoda Sangerova sekvenování

Sangerova metoda sekvenování z roku 1977 je založena na principu terminace syntézy nově vznikajícího řetězce. Jednotlivé deoxyribonukleotidy (dNTPs) jsou komplementárně inkorporovány k jednovláknové DNA molekule a zároveň dochází k náhodnému začlenění dideoxynukleotidu (ddNTP), a tím k dokončení syntézy nového řetězce. ddNTP na rozdíl od dNTP postrádá hydroxylovou skupinu na pozici 3' uhlíkového skeletu, která je klíčovou pro enzym polymerázu umožňující prodloužení řetězce o další bázi (Sanger *et al.*, 1977). Použitím různě barevně značených ddNTPs, např. dnes nejčastěji fluorescenčně, umožňuje provádět danou reakci v jediné zkumavce. Výsledkem jsou vlákna DNA o všech možných délkách s jedním koncovým značeným ddNTP, který je následně detekován laserem během kapilární elektroforetické separace

(viz Obr. 6). Přechtené signály jsou převáděny do výsledného sekvenogramu (Heather *et Chain*, 2016).



Obr. 6: Jednotlivé kroky při sekvenování dle Sangerovy metody (převzato a upraveno ze Zhang *et al.*, 2014).

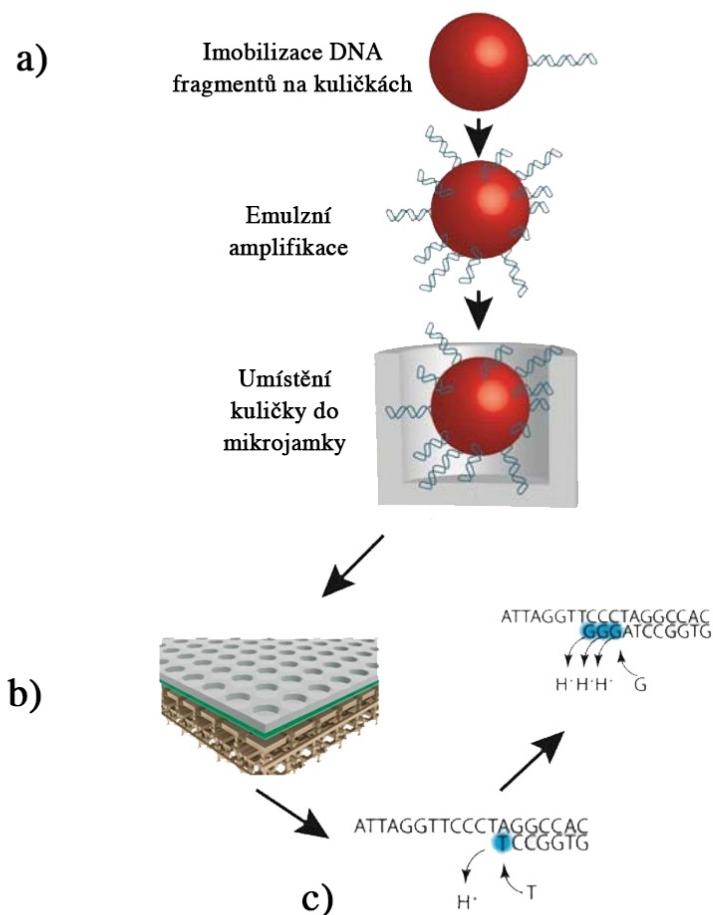
Přestože Sangerovo sekvenování je metodou první generace, patří stále mezi nejspolehlivější metody pro vyhledávání v DNA sekvenci. Sekvenační přístroje jsou schopny vyprodukovat desítky až stovky čtených úseků o délce mírně pod 1 kb (Podnar *et al.*, 2020). Nevýhodou Sangerova sekvenování v porovnání s technologiemi nové generace je především cena v přepočtu na jednu osekvenovanou bázi a také propustnost odrážející počet přečtených bází za jeden sekvenační běh (Besser *et al.*, 2018).



### 3.8.3 MPS Ion Torrent

Nové metody sekvenování překonávají nedostatky jako jsou nízká kapacita a relativně vysoká cena Sangerova sekvenování založeného na elektroforéze. MPS technologie umožňují paralelně sekvenovat tisíce DNA molekul, z tohoto důvodu jsou generovaná data o vysoké kvalitě i kvantitě za relativně krátký čas. V současné době je na trhu dostupných hned několik MPS platforem. V klinické praxi jsou dvěma nejpoužívanějšími platformami Illumina (nejběžněji typ Miseq) a Ion Torrent (nejběžněji PGM) vzhledem k jejich flexibilní kapacitě a rychlému času analýzy (Guan *et al.*, 2012).

Metoda pracuje s izolovanou DNA. Prvním krokem je příprava templátu, která zahrnuje přípravu knihovny pomocí fragmentace DNA na úseky o maximální délce několika stovek bází a jejich ligaci se speciálními oligonukleotidovými adaptory. Následuje emulzní PCR (polymerázová řetězová reakce), při které je sekvenační knihovna smíchána s malými iontovými kulatými částicemi, tzv. Ion Sphere™ Particles, na jejichž povrchu jsou kovalentně připojeny adaptory komplementární k adaptorům připravených fragmentů. Amplifikace probíhá v mikrokapičkách vodného roztoku s olejem (Heather *et al.*, 2016). Po simultánní amplifikaci následuje iontová polovodičová sekvenace. Mikrokuličky s miliony kopií DNA fragmentů jsou umístěny na speciální polovodičový křemíkový čip nesoucí miliony mikrojamek, na jejichž dně je umístěn detektor zaznamenávající změny pH (Kohn *et al.*, 2013). Při každém zařazení nukleotidu DNA polymerázou dojde k uvolnění pyrofosfátu a vodíkovému protonu ( $H^+$ ) z hydroxylové skupiny na třetím uhlíku deoxyribosy. Tento uvolněný  $H^+$  dokáže projít iontově selektivní vrstvou na dně mikrojamky a způsobí tak změnu povrchového napětí. Chemický signál je převeden do digitální podoby počítačem (Kringel *et al.*, 2016). Mikrojamky čipu jsou zaplavovány jednotlivými nukleotidy (dNTP), dojde-li k jeho inkorporaci ke komplementární bázi v řetězci, změní se pH o 0,02 jednotky. Pokud se zařadí v 1 cyklu nukleotidů více, je změna výsledného signálu vyšší. Při čtení homopolymerních úseků, tj. sekvence identických nukleotidů, však dochází k vysoké chybovosti, jelikož metoda při detekci velké síly signálu nedokáže přesně rozlišit, zda bylo přidáno např. 9, 10 nebo 11 adeninů po sobě (Kolisko, 2017). Maximální délka v homopolymerních úsecích, kterou dokáže systém správně určit na základě uvolněných  $H^+$ , je 7 nukleotidů (Beránek, 2016).



Obr. 7: Schéma postupu sekvenace na platformě Ion Torrent. a) příprava knihovny emulzní PCR; b) detail sekvenačního chipu s mikrojamkami; c) sekvenace (převzato a upraveno z Churko *et al.*, 2013; Kohn *et al.*, 2013).

Tato semikonduktorová sekvenační technologie je rychlou metodou vzhledem k real-time sekvenaci fragmentů o délce čtení 200 nukleotidů a zároveň se řadí mezi nízkonákladové, poněvadž během sekvenování není potřeba fluorescenčně značených nukleotidů, a tudíž ani drahé detekční optiky a vysokovýkonného laseru. Největším nedostatkem této platformy je vysoká chybovost v homopolymerních úsecích DNA dosahující 1,78 % (Ambardar *et al.*, 2016).

Tab. 2: Představené systémy Ion Torrent (převzato a upraveno z Dlamini *et al.*, 2020; Thermo Fisher Scientific, 2020).

<b>System</b>	<b>Délka čtení</b>	<b>Čas 1 běhu [hod]</b>	<b>Maximální kapacita</b>	<b>Kompatibilní čipy</b>
PGM	200–400	1–2	10 Mb–1 Gb	314, 316 a 318
Ion Proton	200	2,5	15 Gb	Ion PI v3
Genexus	400	30 hod/celý čip	4,8–6 Gb/řádek 19,2–24 Gb/celý čip	GX5
Ion S5 system	200–400	6,5–19	15 Gb	Ion 510, Ion 520, Ion 530 a Ion 540
Ion S5 XL	200	2,5	10–15 Gb	
Ion S5 Plus	200–400	10–11,5	30 Gb	Ion 510, Ion 520, Ion 530, Ion 540 a Ion 550
Ion S5 Prime	200–400	6,5	50 Gb	

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Pro zavedení a optimalizaci Sangerova sekvenování genu *NPR2* byla použita referenční DNA společnosti Promega (Human Genomic DNA, G1521). Pro přípravu pilotních dat optimalizovaného protokolu Sangerovy sekvenace genu *NPR2* byl použit biologický materiál souboru 22 pacientů s idiopatickým malým vzrůstem indikovaných ke genetické analýze *NPR2*, u nichž byly vyloučeny chromozomální aberace v Laboratoři cytogenetiky a cytogenomiky na Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc. Rovněž u nich byla vyloučena přítomnost patogenních variant v počtu kopií (CNV) a bodových variant (SNP) v genu *SHOX*.

Veškerá genetická vyšetření byla indikována klinickým genetikem. Byla odebrána žilní krev do 9ml zkumavky s EDTA za informovaného souhlasu pacientů nebo jejich zákonných zástupců.

### 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

#### Použité chemikálie

- Agaróza (VWR Chemicals, kat. číslo: 438795A)
- Chlorid amonný (Sigma-Aldrich, kat. číslo: 254134)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, kat. číslo: 746398)
- DMSO (Sigma-Aldrich, kat. číslo: W387520)
- EDTA (Sigma-Aldrich, kat. číslo: 03609)
- Ethanol 96,5%, p.a. (Lékárna FNOL, datum přípravy: 4. 7. 2019)
- Exonukleáza I 4000 U (Thermo Fisher, kat. číslo: EL0011)
- FastAP termosenzitivní alkalická fosfatáza (Thermo Fisher, kat. číslo: EF0654)
- GelRed (Labmark, kat. číslo: 41003)
- Hydrogenuhličitan draselný (Sigma-Aldrich, kat. číslo: 237205)
- Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, kat. číslo: S8045)
- Proteináza K (Eurobio, kat. číslo: GEXPRK00-6R)
- SDS (Serva, kat. číslo: 20760.03)
- TRIS (Sigma Aldrich, kat. číslo: 252859)
- TRIS 10mmol·l<sup>-1</sup> o pH 8,2 (Lékárna FNOL, datum přípravy: 19. 6. 2019)
- TRIS-HCl (Thermo Fisher, kat. číslo: 4322682)

- Voda v PCR čistotě (Top Bio, kat. číslo: P440)

#### **Použité soupravy**

- Big Dye<sup>®</sup> X Terminator<sup>™</sup> Purification Kit (Thermo Fisher, kat. číslo: 4376486)
- Big Dye<sup>™</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher, kat. číslo: 4337454)
- Combi PPP Master mix (Top-Bio, kat. číslo: C208)
- 3.1 SeqStudio<sup>™</sup> Cartridge (Thermo Fisher, kat. číslo: A33671)
- SeqStudio<sup>™</sup> Cathode Buffer Container (Thermo Fisher, kat. číslo: A33401)

#### **Použité roztoky a jejich příprava**

- LB pufr (Lysis buffer): 8,825 g NH<sub>4</sub>Cl (155mmol·l<sup>-1</sup>), 1,001 g KHCO<sub>3</sub> (10mmol·l<sup>-1</sup>), 0,372 g EDTA (1mmol·l<sup>-1</sup>), doplněno deionizovanou vodou do 1 l, hodnota pH upravena přidáním cca 800 µl 1mol·l<sup>-1</sup> NaOH na 7,3–7,4
- NLB pufr (Nuclear Lysis buffer): 1,211 g 10mmol·l<sup>-1</sup> TRIS-HCl (10 ml 1mol·l<sup>-1</sup>), 23,376 g 400mmol·l<sup>-1</sup> NaCl, 0,745 g 2mmol·l<sup>-1</sup> EDTA (4 ml 0,5mol·l<sup>-1</sup>), doplněno deionizovanou vodou do 1 l, pH 7,3–7,4 upraveno přidáním cca 800 µl 1mol·l<sup>-1</sup> NaOH
- 20% SDS (w/v): 5 g SDS doplněno deionizovanou vodou do 25 ml
- 20mg·ml<sup>-1</sup> proteináza K: 500 mg proteinázy K doplněno deionizovanou vodou do 25 ml
- 0,5x TBE pufr: 27 g TRIS, 13,75 g kyseliny borité, 1 ml 0,5mol·l<sup>-1</sup> EDTA, pH 8, doplněno deionizovanou vodou na 5 l
- TE pufr: 2,5 ml 1mol·l<sup>-1</sup> TRIS-HCl, 0,5 ml EDTA (0,5mol·l<sup>-1</sup>), doplněno deionizovanou vodou do 250 ml

### **4.3 Použité oligonukleotidy**

Pomocí online nástroje primer-BLAST byl navrhnout design oligonukleotidových primerů (BLAST, 2020). Dle referenční sekvence GRCh37/hg19 bylo navrženo celkem 18 párů primerů k amplifikaci všech 22 exonů (viz Tab. 3). Oligonukleotidy byly dodány firmou Sigma-Aldrich v lyofilizovaném stavu. Následně byly rozpuštěny odpovídajícím množstvím vody v PCR čistotě. Výsledná koncentrace byla 100 µmol·l<sup>-1</sup>. Do sekvenační reakce byly oligonukleotidy desetkrát zředěny.

Tab. 3: Přehled primerů použitých na PCR amplifikaci a Sangerovo sekvenování.

Název primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	PCR produkt [bp]	Exon
NPR2_1F	ATCCCAGCCTACCTAGCCTACT	924	1
NPR2_1R	TGATCCCAACCACCACATACAG		
NPR2_2F	GGGGTTGATAGGTTAGGGCA	427	2
NPR2_2R	GCCTGGTTCCTAGGGTTTCTT		
NPR2_3F	CAAAGCCTTCAGACTCACCTGT	374	3
NPR2_3R	ATCCTGGACAGAAGCGGAGA		
NPR2_4F	AGTCAGGTCAAGCTTTGGGG	536	4
NPR2_4R	ATCTTGAGGTGTGGGCAACT		
NPR2_5F	AATATGGCAGAGTTGCCCA	303	5
NPR2_5R	AGTTTTGGTTCTGCCCCGA		
NPR2_6F	CTGGGGAGAAAAGCAGCGAA	342	6
NPR2_6R	AGAGGGAGGGATGCAGACGTA		
NPR2_7F	TCTCCATTCTGCCAAGTCCG	247	7
NPR2_7R	AGAAACCTACTACCCTATCCCA		
NPR2_8F	AGCCCTGTCTCTCAGGTGTA	515	8
NPR2_8R	TGGGGACCAGAACAAGCAAAT		
NPR2_9F	CCCAGCACATTGGCTTGTAAT	320	9
NPR2_9R	AAGGAAATGCTAGAGAGCAGTG		
NPR2_10F	ATCTTTGCCAACACCGGTCA	400	10
NPR2_10R	ACCCCTTGCCCATCTAGCC		
NPR2_11_12F	CCCGGCAGGTTCTGTTTGAA	675	11 a 12
NPR2_11_12R	AGACCATGGGAATAAGGGGAG		
NPR2_13F	TCCTGCTTCCTTGGGTGGAAA	479	13
NPR2_13R	AAAAGAGGAAACCGGCTGGC		

Tab. 3: Pokračování.

Název primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	PCR produkt [bp]	Exon
NPR2_14_15F	ACCTAGGGATGGTGGGAGAG	588	14 a 15
NPR2_14_15R	CCCCACTTCATGCACTAGGAC		
NPR2_16F	CGGCCAGACTTTGGACAGATTA	522	16
NPR2_16R	GCATAGCTGATGTGGAGACAGA		
NPR2_17F	GCAGCCACATACTTTCCC	317	17
NPR2_17R	GCCATCAAAAGATGTGGGAACT		
NPR2_18F	ATGAGTTTGTCTAGAGTTCCACA	261	18
NPR2_18R	GTAAGGTGTGTGGGGTTCAGG		
NPR2_19_20F	TGTCAAGCTTGTCTCCCTCTA	528	19 a 20
NPR2_19_20R	AGGAACTGTGGTCTCTCAGAT		
NPR2_21_22F	CTCCCAGGGATGGTTGGT	515	21 a 22
NPR2_21_22R	TTTCCCTGGAAGTGGGAGAGT		

#### 4.4 Použité přístroje a pomůcky

- Analytická digitální váha (Boeco)
- Automatický sekvenátor ABI 3130 (Thermo Fisher)
- Centrifuga FVL-2400N (Biosan)
- Chladnička kombinovaná (Electrolux)
- Genetický analyzátor SeqStudio (Thermo Fisher)
- Mikrovlnná trouba (Eta)
- Multifunkční třepačka MPS-1 (Biosan)
- Stolní nechlazená centrifuga NF 400 (Nüve)
- Termocyklér C1000 (Bio-Rad)
- Transluminátor MiniBis Pro (Serva)
- Vana pro agarózovou elektroforézu JSB-30 (Shelton Scientific)
- Zdroj napětí GPS 200/400 (Pharmacia)

## 4.5 Použité softwary

- Sequence Scanner v1.0

## 4.6 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

### 4.6.1 Izolace DNA z plné krve metodou dle Millera

Biologický materiál pacientů s ISS byl izolován vysolovací metodou neboli Millerovou metodou:

1. Odebraná krev byla přelita do 50ml zkumavky (falkony).
2. Do zkumavky bylo přidáno 50 ml LB vychlazeného pufru a promícháno.
3. Zkumavka (falkona) s krví a LB pufrem byla inkubována při pokojové teplotě a po dobu 15 min.
4. Poté proběhla centrifugace po dobu 30 min rychlostí 1 000 g.
5. Supernatant byl slit tak, aby na dně zůstal pelet bílých krvinek.
6. K peletu bylo přidáno 5 ml LB vychlazeného pufru a promícháno.
7. Opět byla falkona stočena rychlostí 1 000 g po dobu 10 min.
8. Supernatant byl slit, pelet byl lehce opláchnut vychlazeným LB pufrem a poté byla nechána zkumavka otočená dnem vzhůru na ubrousku.
9. K okapanému peletu byly přidány 3 ml NLB pufru, 50  $\mu$ l proteinázy K, 150  $\mu$ l 20% SDS. Směs byla důkladně protřepána (cca 15 s).
10. Následovala inkubace v termostatu přes noc při 37 °C.
11. Následující den byl přidán 1 ml  $6\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl a směs byla důkladně protřepána (cca 15 s).
12. Proběhla centrifugace při rychlosti 5 000 g po dobu 15 min.
13. Supernatant byl přelit do označené čisté zkumavky o objemu 10 ml.
14. Proběhla centrifugace při rychlosti 5 000 g po dobu 10 min.
15. Supernatant byl slit do popsané čisté zkumavky o objemu 15 ml a ta byla doplněna 96% vychlazeným ethanolem z mrazničky.
16. Pomalým převrácením zkumavky byla směs promíchávána až do vysrážení DNA.
17. Do předem označené mikrozukavky (typu Eppendorf) byl nalit 1 ml 70% ethanolu a přenesena vlákna vysrážené DNA pomocí sterilního skleněného háčku, který byl po ponoření do mikrozukavky zalomen a zůstal tak s DNA uvnitř.



18. Zkumavka byla stočena rychlostí 14 000 g po dobu 5 min.
19. 70% ethanol byl opatrně slit na ubrousek.
20. Při pokojové teplotě se po dobu 1 hod nechala vyschnout DNA.
21. V TE pufru se nechala DNA rozpustit, přičemž množství TE pufru se řídilo výchozím množstvím krve, tj. na 1 ml krve bylo použito 50  $\mu$ l TE pufru. Mikrozkumavka byla řádně opatřena štítkem se jménem, rodným číslem a evidenčním číslem.
22. DNA byla rozpouštěna při pokojové teplotě přes noc nebo 1 hod při 65 °C za současného míchání na míchače.
23. Mikrozkumavka s DNA byla uschována do lednice, popř. do mrazáku o teplotě -25 °C.

#### 4.6.2 Optimalizace Sangerova sekvenování

##### PCR amplifikace

1. Rozmražené reagenty PCR mixu (viz Tab. 4) byly promíchány na vortexu a zcentrifugovány.
2. PCR mix byl připraven podle Tab. 4 s DMSO nebo Tab. 5 bez DMSO do 1,5ml mikrozkumavky.

Tab. 4: Složení reakční směsi obsahující DMSO pro PCR amplifikaci.

Látka	Objem [ $\mu$ l] na 1 reakci	Celkový objem [ $\mu$ l] na 1 reakci
PPP Master Mix	3,75	
H <sub>2</sub> O v PCR čistotě	2,10	6,6
DMSO	0,75	

Tab. 5: Složení reakční směsi bez DMSO pro PCR amplifikaci.

Látka	Objem [ $\mu$ l] na 1 reakci	Celkový objem [ $\mu$ l] na 1 reakci
PPP Master Mix	3,75	
H <sub>2</sub> O v PCR čistotě	2,85	6,6

3. PCR mix v 1,5ml zkumavce byl promíchán a stočen.
4. Homogenní PCR mix byl rozpipetován po 6,6  $\mu$ l do 200 $\mu$ l zkumavek.
5. Do jednotlivých zkumavek bylo přidáno 0,4  $\mu$ l příslušného páru primerů uvedených v Tab. 2 (0,2  $\mu$ l forward a 0,2  $\mu$ l reverse primeru).
6. Nakonec bylo do každé zkumavky napipetováno 0,5  $\mu$ l referenční DNA.
7. PCR zkumavky byly uzavřeny, vloženy do termocykleru a byl nastaven teplotní a časový program uvedený v Tab. 6.

Tab. 6: Základní teplotní a časový rozpis PCR reakce.

Teplota [°C]	Čas	Počet opakování
95	180 s	1
94	30 s	
Viz Tab. 7	30 s	9
72	90 s	
90	30 s	24
Viz Tab. 7	30 s	
72	90 s	1
10	pauza	neomezeno

8. Pro optimalizaci podmínek PCR amplifikace jednotlivých exonů genu *NPR2* bylo nutné najít vhodnou teplotu *annealingu* i vhodné složení PCR mixu (s DMSO vs. bez DMSO). Přehled všech testovaných podmínek je uveden v Tab. 7.

Tab. 7: Přehled všech testovaných podmínek v PCR reakci.

<b>Pár primerů</b>	<b>Použité teploty [°C]</b>	<b>Použití DMSO</b>
NPR2_1F a NPR2_1R	55	Ano
	53	Ano
NPR2_2F a NPR2_2R	55	Ano
	50	Ano
NPR2_3F a NPR2_3R	53	Ano
	54	Ne
	55	Ano
NPR2_4F a NPR2_4R	53	Ano
	55	Ano
NPR2_5F a NPR2_5R	55	Ano
NPR2_6F a NPR2_6R	55	Ano
NPR2_7F a NPR2_7R	55	Ano
	55	Ano
NPR2_8F a NPR2_8R	57	Ano
	55	Ano
NPR2_9F a NPR2_9R	55	Ano
	53	Ano
NPR2_10F a NPR2_10R	54	Ano
	55	Ano
	50	Ano
	50	Ne
NPR2_11_12F a NPR2_11_12R	53	Ano
	54	Ne
	55	Ano

Tab. 7: Pokračování.

<b>Pár primerů</b>	<b>Použité teploty [°C]</b>	<b>Použití DMSO</b>
NPR2_13F a NPR2_13R	55	Ano
NPR2_14_15F a NPR2_14_15R	53	Ano
	55	Ano
NPR2_16F a NPR2_16R	55	Ano
NPR2_17F a NPR2_17R	55	Ano
NPR2_18F a NPR2_18R	55	Ano
NPR2_19_20F a NPR2_19_20R	55	Ano
NPR2_21_22F a NPR2_21_22R	55	Ano

### **Elektroforetická separace PCR produktů**

Pro detekci PCR produktů byla provedena gelová elektroforéza. K separaci byl použit 1,5% agarózový gel a barvicí roztok GelRed. Separace probíhala v elektroforetické vaně pro agarózovou elektroforézu.

#### **Příprava 1,5% agarózového gelu s barvicím roztokem GelRed**

1. Na analytické váze bylo do čisté misky naváženo 0,9 g agarózy. Toto množství bylo přesypáno do šroubovací láhve.
2. V odměrném válci bylo odměřeno 60 ml 0,5x TBE pufru. Celý objem byl přelit do láhve s agarózou.
3. Šroubovacím víčkem byla láhev uzavřena (pouze lehce utáhnuta) a zahřívána v mikrovlnné troubě na asi 1 min.
4. Po úplném rozpuštění agarózy v 0,5x TBE pufru byl roztok promíchán krouživým pohybem.
5. Do homogenního roztoku bylo přidáno 6 µl barvicího roztoku GelRed a opět byl roztok krouživým pohybem lahvi promíchán.
6. UV transparentní gelová podložka 7 x 10 cm byla vložena do stojanu a byla do ní nalita připravená homogenní směs. Případné vzduchové bubliny byly odstraněny plastovou špičkou a byl nasazen hřebínek.
7. Gel tuhnul nejméně 30 min.

8. Poté byl hřebínek vyjmut a ztuhnutý gel i s UV transparentní podložkou byl vložen do elektroforetické vany. V případě potřeby byl do vany dolit 0,5x TBE pufr po rysku tak, aby byl gel zcela ponořen.

### **Elektroforetická separace**

1. Vzhledem k zbarvení PCR produktu nebyla potřeba nanášecího pufru. 3  $\mu$ l každého PCR produktu byly napipetovány do jednotlivých jamek v ponořeném gelu.
2. Elektroforetická souprava byla uzavřena víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu.
3. Elektroforéza probíhala při 90 V po dobu 30 min.
4. Poté byl gel vložen do UV transluminačního zařízení MiniBis Pro a fotodokumentačním zařízením byla pořízena jeho fotografie.

### **Enzymatické přečištění PCR produktů**

1. Ke zbylým 4,5  $\mu$ l PCR produktu v mikrozkušavce bylo přidáno 0,5  $\mu$ l exonukleázy I a 1  $\mu$ l FastAP termosenzitivní alkalické fosfatázy. Celý objem v mikrozkušavce byl krátce a jemně promíchán pipetováním a stočen.
2. Mikrozkušavka s DNA templátem a enzymy byla 15 min inkubována při 37 °C a 15 min při teplotě 85 °C v termocykléru.

### **Sekvenační PCR reakce**

1. Naředěním byl připraven sekvenační kit Big Dye<sup>TM</sup> Terminator v3.1 s fluorescenčně značenými ddNTPs. Pro ředění byl použit BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 & v3.1 5x sekvenační pufr v poměru 1 : 8 či ředící pufr BDX 256 v poměru 1 : 256.
2. Do čistých mikrozkušavek byla po 4  $\mu$ l rozpipetována připravená sekvenační směs pro potřebný počet vzorků (viz Tab. 8).
3. Ke směsi bylo připipetováno 0,5  $\mu$ l samostatného forward nebo reverse primeru.
4. Nakonec byl přidán 1  $\mu$ l přečištěného DNA templátu.

Tab. 8: Složení PCR sekvenační směsi na 1 reakci.

Reagencie	Objem [ $\mu\text{l}$ ]	Celkový objem na jednu reakci [ $\mu\text{l}$ ]
BigDye <sup>®</sup> Terminator v1.1 & v3.1 5x sekvenační pufr	0,750	
BDX64 pufr	0,469	
PCR voda	2,750	4,000
Nařaděný sekvenační kit (Big Dye <sup>™</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)	0,031	
Primer o koncentraci $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	0,500	
DNA templát	1,000	1,000

5. Připravená směs o objemu  $5 \mu\text{l}$  byla krátce a jemně promíchána pipetováním a poté vložena do termocykleru, na němž byl nastaven sekvenační teplotní profil uvedený v Tab. 9. Tento program byl dán výrobcem reakčního kitu.

Tab. 9: Teplotní a časový profil termocykleru pro sekvenační PCR reakci.

Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas [s]	Počet cyklů
94	120	1
96	10	
$50 \text{ }^{\circ}\text{C}/(1 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{s})$	5	34
60	240	
10	pauza	neomezeno

### Přečištění sekvenačních produktů

1. K přečištění sekvenačních produktů byl použit Big Dye<sup>®</sup> XTerminator<sup>™</sup> Purification Kit, který byl vytemperován na laboratorní teplotu.
2. Do 1,5ml zkumavky byla dle počtu vzorků připravena směs pro přečištění produktů po sekvenační PCR dle Tab. 10.

Tab. 10: Složení směsi pro post-sekvenační purifikaci na 1 reakci.

Reagencie	Objem [ $\mu$ l] na 1 reakci	Celkový objem [ $\mu$ l] na 1 reakci
SAM <sup>TM</sup> roztok	22,5	27,5
XTerminator <sup>TM</sup> roztok	5	

3. Mikrozkušavka byla uzavřena, upevněna na třepače a vortexována po dobu 40 min při 2 600 rpm. Po celou dobu třepání byly produkty sekvenační PCR chráněny před světlem alobalem.
4. Po promíchání byla směs centrifugována 2 min při rychlosti otáčení 1 000 g.

### Kapilární elektroforéza v přístroji SeqStudio

Kapilární elektroforéza byla provedena sekvenačním analyzátozem SeqStudio od výrobce Thermo Fisher. Kapiláry analyzátoru byly naplněny univerzální separační maticí v podobě polymeru POP1<sup>TM</sup>.

1. 96-jamková destička byla umístěna do laminárního boxu a zde byla dekontaminována UV lampou.
2. Ze zkumavky bylo opatrně pipetou odebráno 15  $\mu$ l supernatantu a přepipetováno do klasické dekontaminované 96-jamkové destičky.
3. Destička s 96 jamkami byla uzavřena gumovým septem (tzv. scolexem), zcentrifugována na 2 min při zrychlení 1 000 g.
4. Destička byla zasazena do plastového držáku, uzavřena krytem a vložena do sekvenačního analyzátoru SeqStudio.
5. Byla spuštěna kapilární elektroforéza dle Tab. 11. Čas separace jednotlivých sekvenačních produktů byl dán jejich očekávanou délkou.

Tab. 11: Specifické parametry a hodnoty pro sekvenování exonů *NPR2* genu kapilární elektroforézou SeqStudio.

Parametr	Hodnota
Teplota	60 °C
Elektrické napětí nástřiku	1,2 kV
Doba nástřiku	20 s
Elektrické napětí separace	8,5 kV
Čas separace	2 200 s/exony 5, 7, 9 a 18
	2 500 s/exony 3, 6, 10 a 17
	3 400 s/exony 2, 4, 8, 13, 14+15, 16, 19+20 a 21+22
	4 600 s/exony 1 a 11+12

### Analýza a zpracování sekvenačních dat

1. K vyvolání bázi (neboli *base calling*) byl použit software Sequence Scanner.
2. Specifičnost pozorovaných sekvencí byla ověřena nástrojem Alignment Sequences Nucleotide BLAST (BLAST, 2020).

### Verifikace metody

Pro verifikaci metody byly hodnoceny parametry:

1. Mez stanovitelnosti – tj. nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty. Byla použita referenční DNA, která byla naředěna na koncentraci  $> 10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  a  $< 10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ .
2. Reprodukovatelnost – ukazuje vzájemné porovnání mezi sériemi (v různých dnech a různými pracovníky). Pracovník 1 provedl verifikaci dne 16. 10. 2019 a pracovník 2 provedl verifikaci dne 21. 10. 2019. Každý pracovník použil jiný termocyklér a jiný sekvenátor.
3. Opakovatelnost – vzájemné porovnání výsledků v jedné sérii (současně v jeden den a jedním pracovníkem). Analýza byla provedena 2x dne 17. 10. 2019.



4. Robustnost – poskytuje informaci o spolehlivosti během běžného používání. Je taková vlastnost metody, kdy malou změnou jejich parametrů, poskytuje metoda pořád správné a přesné výsledky. Dvěma pracovníky byly použity 2 různé koncentrace DNA, tj.  $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  a  $880 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$
5. Specifičnost metody – pravděpodobnost negativního výsledku testu v případě nepřítomnosti hledané varianty testovaného znaku. Jedná se o poměr mezi správnou negativitou (TN) a součtem správné negativity a falešné pozitivitu (FP) dle vzorce  $\text{TN}/(\text{TN} + \text{FP})$ . Byla stanovena porovnáním výsledků sekvenace genu *NPR2* Sangerovým sekvenováním a MPS. K empirickému vyjádření rozdílu byl použit statistický T-test po ověření shody rozptylu F-testem.
6. Citlivost – pravděpodobnost pozitivního výsledku testu v případě přítomnosti hledané varianty testovaného znaku. Jedná se o poměr mezi správnou pozitivitou (TP) a součtem správné pozitivitu a falešné negativitu (FN) dle vzorce  $\text{TP}/(\text{TP} + \text{FN})$ . Citlivost byla stanovena porovnáním výsledků sekvenace genu *NPR2* Sangerovým sekvenováním a MPS. K empirickému vyjádření rozdílu byl použit statistický T-test po ověření shody rozptylu F-testem.

### **Klinické vyhodnocení identifikovaných SNP a CNV**

Význam nalezených variant v kódujících oblastech genu *NPR2* a jejich nejbližší intronické oblasti ( $\pm 20$  nt) byl hodnocen pomocí klinických databází ClinVar (Landrum *et al.*, 2016), VarSome (Kopanos *et al.*, 2019) a dbSNP (Sherry *et al.*, 2001).

#### **4.6.3 Cílené ampikonové sekvenování na platformě Ion Torrent s využitím celoexomového virtuálního genového panelu**

Vyhledávání variant v souboru genů asociovaných s ISS včetně genu *NPR2* metodou ampikonového masivního paralelního sekvenování bylo provedeno v DNA laboratoři Ústavu lékařské genetiky ve Fakultní nemocnici Olomouc. Byl použit Ion AmpliSeq™ on-demand panel, který je založen na více než 99% pokrytí všech cílených sekvencí. Každá cílená sekvence byla designována a optimalizována tak, aby zasahovala minimálně 5 bp do intronu. Jednalo se o tzv. scanningovou metodu určenou pro detekci bodových změn a menších inzercí, duplikací a delecí (do cca 20 bp). Minimální pokrytí ampikonů bylo 20, minimální průměrné pokrytí 200. I v případě menšího pokrytí byl daný lokus

analyzován, při nastavení Base Phread Quality větší než 18 a při pokrytí minimálně 4 (2 amplikony forward a 2 reverse).

Analýza pokrytí byla provedena pomocí Torrent Suite, analýza variant a jejich anotace byla provedena pomocí IonReporteru.

Na základě nastaveného prahu Base Phread Quality minimálně 18 (odpovídá to 98% pravděpodobnosti, že báze je určena správně) a na základě předpokladu, že v průběhu analýzy dat nebude softwarem varianta zachycena s pravděpodobností 1–2 %, lze úspěšnost scannigové metody odhadnout na 98 % až 99 %. Metoda není primárně určena k zachycení minoritní mozaiky. Referenční sekvencí pro analyzované geny byl hg19.

Význam nalezených variant byl hodnocen z klinických databází ClinVar (Landrum *et al.*, 2016), VarSome (Kopanos *et al.*, 2019) a dbSNP (Sherry *et al.*, 2001).

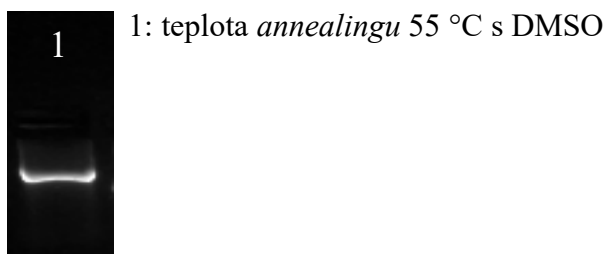
## 5 VÝSLEDKY

Cílem této diplomové práce bylo zavedení sekvenace genu *NPR2* Sangerovou metodou a prezentace pilotních dat tohoto vyšetření u pacientů s ISS. Metoda byla zavedena cestou optimalizace teploty *annealingu* primerů a složení PCR směsi. Rovněž byly posouzeny tyto parametry: mez stanovitelnosti, robustnost, opakovatelnost, reprodukovatelnost, citlivost a specifita.

### 5.1 Optimalizace sekvenování *NPR2* genu Sangerovou metodou

#### Primery *NPR2\_1F* a *NPR2\_1R*

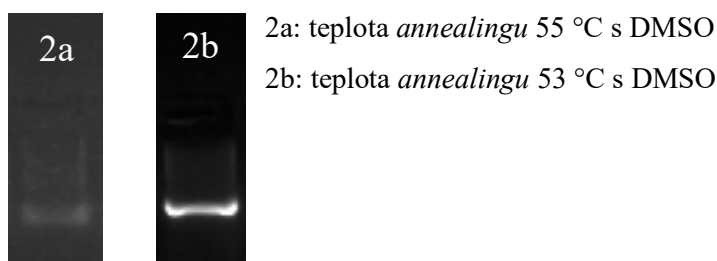
Exon 1 byl připraven amplifikační PCR za použití teploty *annealingu* 55 °C s DMSO (viz Obr. 8).



Obr. 8: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 1 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

#### Primery *NPR2\_2F* a *NPR2\_2R*

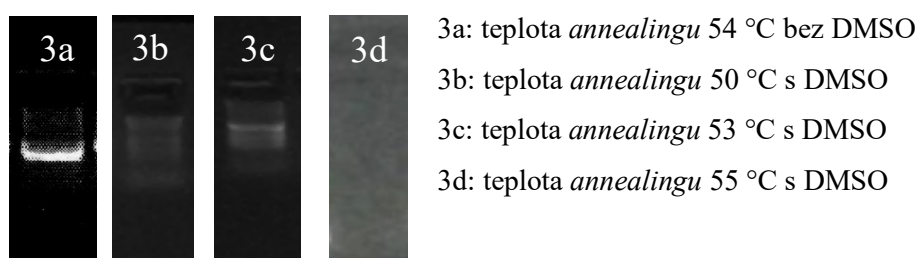
Exon 2 byl připraven amplifikačními PCR reakcemi pracující s teplotami *annealingu* 53 °C a 55 °C. Teplota 53 °C se pro nasedání navrhnutých primerů prokázala jako nejvhodnější. U vyšší teploty docházelo k redukci výtěžku PCR produktu. Směs PCR obsahovala DMSO (viz Obr. 9).



Obr. 9: Dva elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonu 2 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_3F a NPR2\_3R

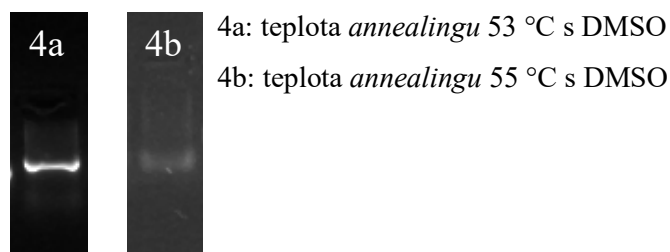
Při testování různých teplotních podmínek (tj. 50 °C, 53 °C a 55 °C) pro PCR amplifikaci exonu 3 byl následně detekován velmi slabý či žádný produkt. Proto bylo v dalších pokusech nahrazeno DMSO v reakční PCR směsi H<sub>2</sub>O v PCR čistotě. Jako neoptimálnější kombinace reakčních podmínek pro amplifikaci exonu 3 byla zjištěna teplota *annealingu* 54 °C a PCR reakční směs bez DMSO (viz Obr. 10).



Obr. 10: Čtyři elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonu 3 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_4F a NPR2\_4R

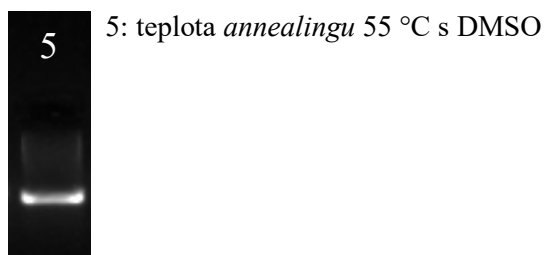
V případě amplifikace oblasti exonu 4 bylo teplotní optimum *annealingu* 53 °C. Při vyšší teplotě (55 °C) docházelo k nedostatečné amplifikaci požadovaného PCR produktu. PCR směs obsahovala DMSO (viz Obr. 11).



Obr. 11: Dva elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonu 4 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_5F a NPR2\_5R

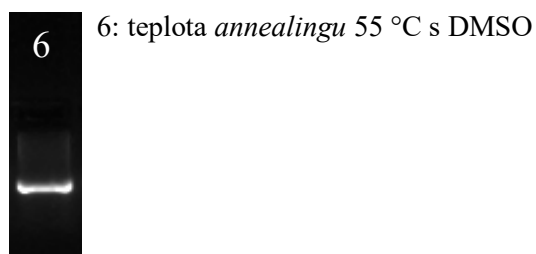
Teplota *annealingu* 55 °C pro amplifikaci oblasti exonu 5 těmito primery byla shledána optimální i s DMSO (viz Obr. 12).



Obr. 12: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 5 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_6F a NPR2\_6R

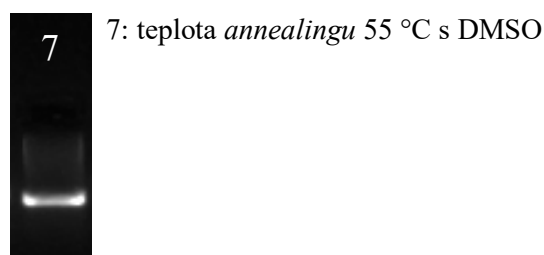
Nejintenzivnější fluorescence produktu PCR amplifikace exonu 6 byla pozorována při použití teploty *annealingu* 55 °C s DMSO (viz Obr. 13).



Obr. 13: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 6 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_7F a NPR2\_7R

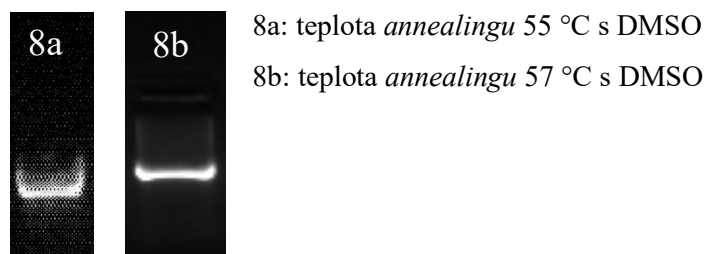
Z elektroforetogramu (viz Obr. 14) je patrné, že pro amplifikaci exonu 7 s DMSO byla zvolená teplota *annealingu* 55 °C optimální.



Obr. 14: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 7 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_8F a NPR2\_8R

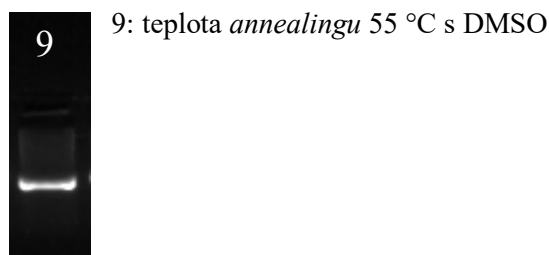
*Annealing* teplota 57 °C poskytla nejvyšší specifitu PCR produktu exonu 8 při zachování dobrého pozadí. Na Obr. 15 je porovnán s teplotou 55 °C. Směs obsahovala i DMSO.



Obr. 15: Dva elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonu 8 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_9F a NPR2\_9R

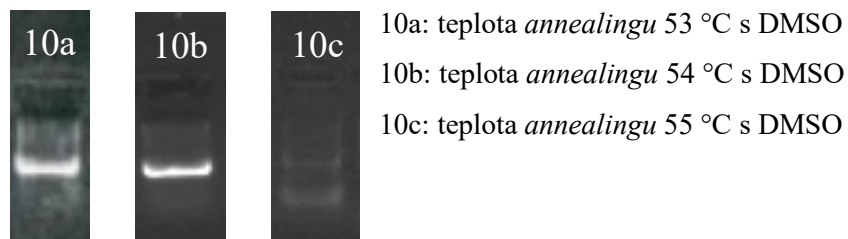
Optimální *annealing* teplotou pro amplifikaci exonu 9 s DMSO pomocí těchto primerů byla teplota 55 °C (viz Obr. 16).



Obr. 16: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 9 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_10F a NPR2\_10R

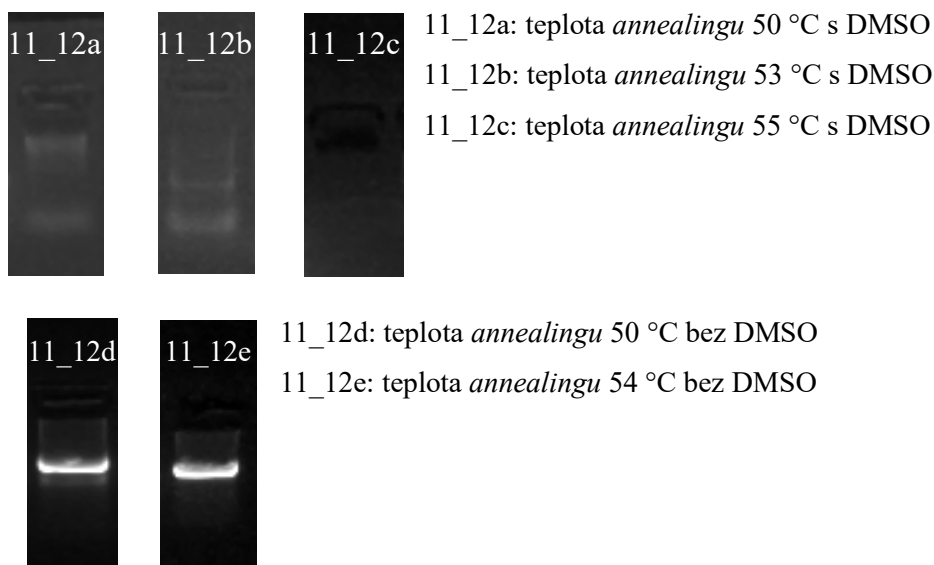
Při analýze nejvhodnější teploty *annealingu* pro amplifikaci exonu 10 bylo použito 3 různých teplot a směsi PCR, která obsahovala DMSO. Nižší teplota (53 °C) a poskytovaly menší množství PCR produktu. Při nastavení teploty vyšší (55 °C) nedocházelo k dostatečnému nasedání primerů na cílenou oblast a tyto nespotřebované primery byly po separaci v dráze zřetelné. Nejvíce PCR produktu bylo syntetizováno za použití teploty *annealingu* 54 °C (viz Obr. 17).



Obr. 17: Tři elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonu 10 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_11\_12F a NPR2\_11\_12R

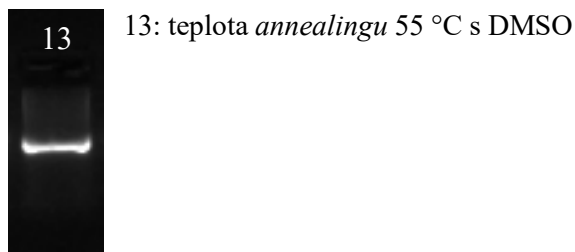
Pomocí tohoto páru primerů byla provedena amplifikace dvou exonů zároveň, konkrétně exonu 11 a 12. Tato amplifikace nebyla úspěšná při testování teplot *annealingu* 50, 53 a 55 °C, a proto byl DMSO v reakční směsi nahrazen vodou v PCR čistotě. Nejčistější produkt byl získán při teplotě *annealingu* 54 °C (viz Obr. 18).



Obr. 18: Pět elektroforetogramů produktů PCR amplifikace exonů 11 a 12 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_13F a NPR2\_13R

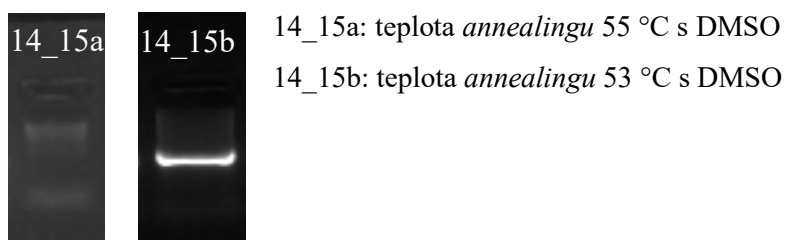
Teplota *annealingu* 55 °C poskytovala dostatečné množství PCR specifického produktu s PCR směsí obsahující DMSO (viz Obr. 19).



Obr. 19: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 13 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_14\_15F a NPR2\_14\_15R

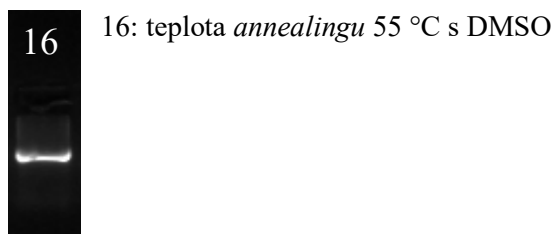
Vzhledem ke krátké vzdálenosti intronové oblasti mezi 14. a 15. exonem bylo možné amplifikovat tyto exony dohromady jedním párem primerů. Teplota *annealingu* 55 °C neposkytovala žádný produkt, zatím co teplota 53 °C se ukázala jako vhodná pro nasedání primerů souběžně s PCR směsí obsahující DMSO (viz Obr. 20).



Obr. 20: Dva elektroforetogramy produktů PCR amplifikace exonů 14 a 15 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_16F a NPR2\_16R

Uvedený pár primerů byl testován pro nasedání na jejich specifické oblasti při teplotě *annealingu* 55 °C, při které došlo k dostatečnému PCR výtěžku při zachování čistého pozadí za použití DMSO v PCR směsi (viz Obr. 21).

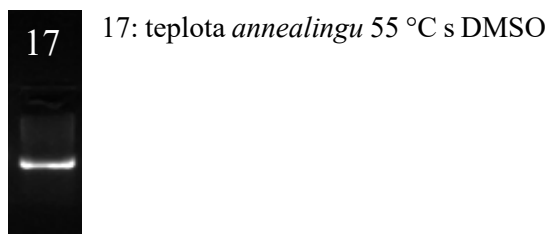


Obr. 21: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 16 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.



### Primery NPR2\_17F a NPR2\_17R

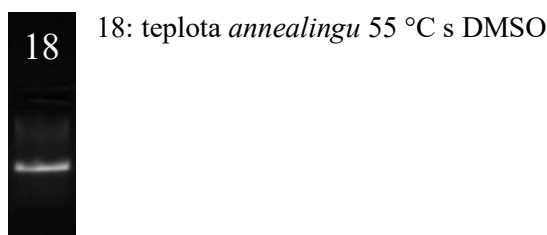
Při analýze optimální teploty *annealingu* pro tyto primery bylo zjištěno, že teplota 55 °C poskytuje specifický PCR produkt za použití DMSO v reakční směsi (viz Obr. 22).



Obr. 22: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 17 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_18F a NPR2\_18R

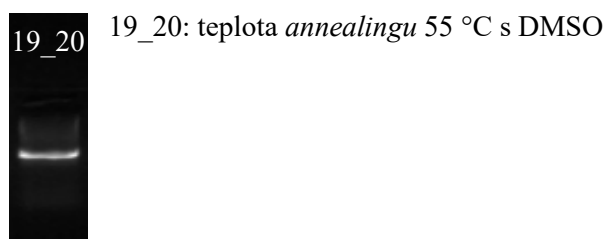
Exon 18 byl úspěšně amplifikován při teplotě *annealingu* 55 °C a PCR směsi s DMSO (viz Obr. 23).



Obr. 23: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonu 18 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_19\_20F a NPR2\_19\_20R

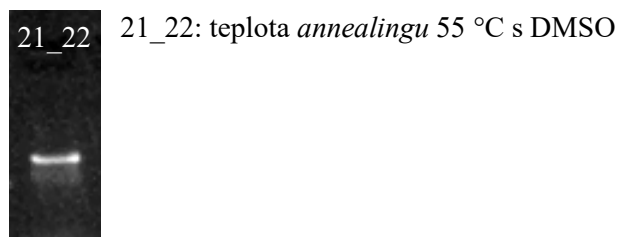
PCR produkt získaný párem primerů NPR2\_19\_20F a NPR2\_19\_20R představoval amplifikovaný úsek ohraničený exonem 19 a exonem 20. Tento amplikon byl připraven při teplotě 55 °C a reakční směsi s DMSO (viz Obr. 24).



Obr. 24: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonů 19 a 20 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

### Primery NPR2\_21\_22F a NPR2\_21\_22R

Exon 21 byl amplifikován dohromady s exonem 22 pomocí primerů NPR2\_21\_22F a NPR2\_21\_22R, které úspěšně nasedly na specifické místo při teplotě *annealingu* 55 °C a složení reakční směsi s DMSO (viz Obr. 25).



Obr. 25: Elektroforetogram produktu PCR amplifikace exonů 21 a 22 po elektroforetickém rozdělení v 1,5% agarózovém gelu.

Pro přehlednost jsou v Tab. 12 uvedené specifické reakční podmínky sekvenace pro všechny páry primerů.

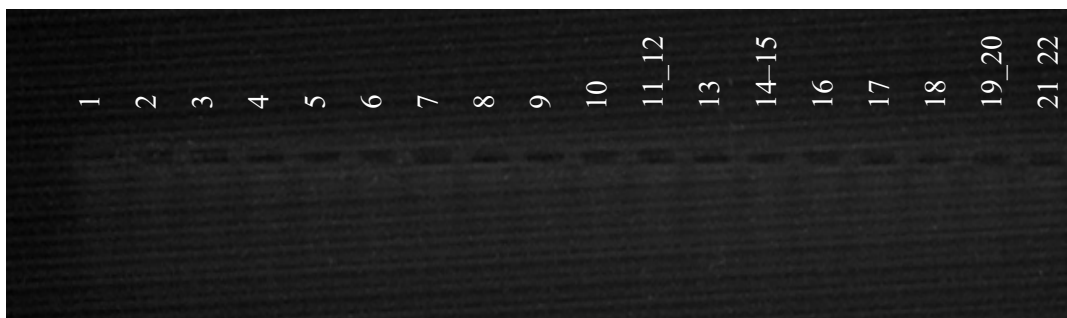
Tab. 12: Teploty *annealingu* a použití DMSO pro úspěšnou PCR amplifikaci všech exonů genu *NPR2*.

Teplota <i>annealingu</i> [° C]	Použití DMSO	Primery
53	Ano	NPR2_2F a NPR2_2R, NPR2_4F a NPR2_4R, NPR2_14_15F a NPR2_14_15R
	Ano	NPR2_10F a NPR2_10R
54	Ne	NPR2_3F a NPR2_3R, NPR2_11_12F a NPR2_11_12R
55	Ano	NPR2_1F a NPR2_1R, NPR2_5F a NPR2_5R, NPR2_6F a NPR2_6R, NPR2_7F a NPR2_7R, NPR2_9F a NPR2_9R, NPR2_13F a NPR2_13R, NPR2_16F a NPR2_16R, NPR2_17F a NPR2_17R, NPR2_18F a NPR2_18R, NPR2_19_20F a NPR2_19_20R, NPR2_21_22F a NPR2_21_22R
57	Ano	NPR2_8F a NPR2_8R

Čas separace kapilární elektroforézou byl dán délkou PCR produktů v bp.

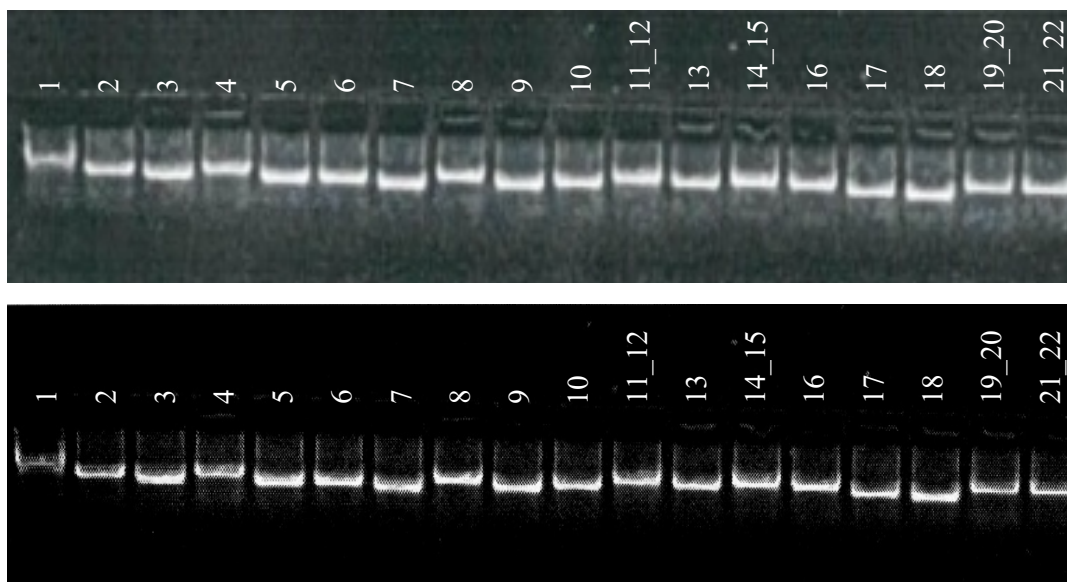
## 5.2 Verifikace metody

Jedním ze stanovovaných verifikačních parametrů byla mez stanovitelnosti. Koncentrace DNA, při níž byl získán validní výsledek, byla 10–880 ng·μl<sup>-1</sup>. Při použití koncentrace nižší než 10 ng·μl<sup>-1</sup> nedošlo k replikaci a vzniku PCR produktů (viz Obr. 26).



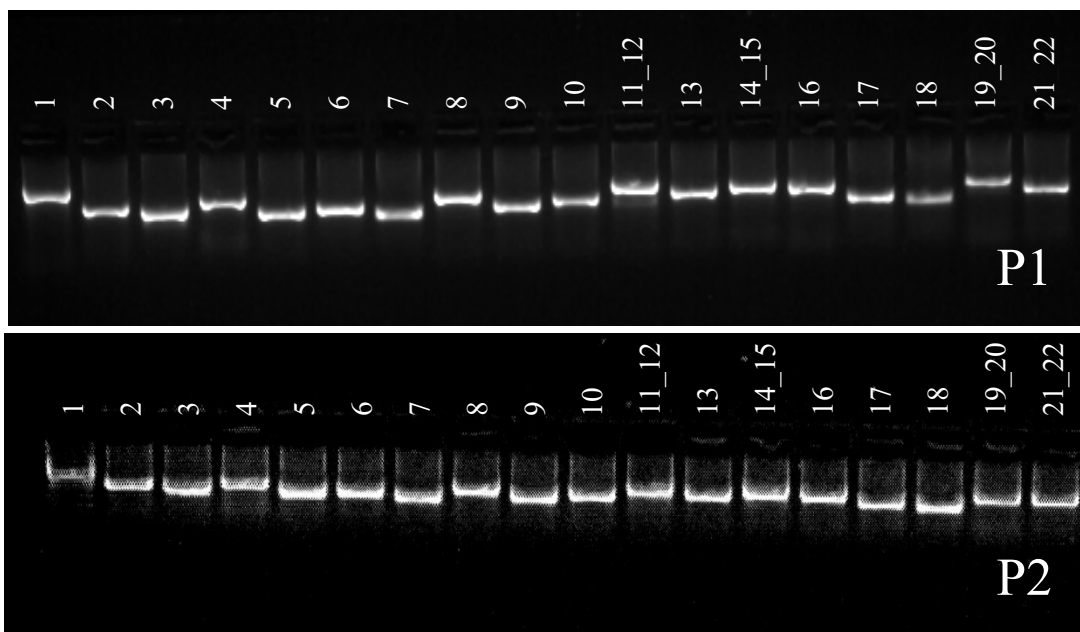
Obr. 26: Elektroforetogram získaný po PCR reakci se vstupní DNA o koncentraci pod detekčním limitem.

V rámci prokázání opakovatelnosti byla provedena sekvenační analýza genu *NPR2* jedním pracovníkem v jednom dni. Pozitivní výsledek parametru opakovatelnosti, respektive dvou PCR amplifikací ze dne 17. 10. 2019, je zřetelný na Obr. 27.



Obr. 27: Dva elektroforetogramy PCR produktů kódujících oblastí genu *NPR2* vyhotovené ve stejném dni.

Dále byla ověřována robustnost metody vůči malým změnám. Dvěma pracovníky byly dvě různé koncentrace vstupní DNA. Pracovník 1 pracoval s koncentrací vzorku DNA  $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  a pracovník 2 s koncentrací  $880 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Výstupy z elektroforetické separace PCR produktů dokázaly, že metoda je necitlivá vůči malým změnám experimentálních podmínek (viz Obr. 28).



P1 (Pracovník 1): vstupní koncentrace DNA  $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; P2 (Pracovník 2): vstupní koncentrace DNA  $880 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$

Obr. 28: Dva elektroforetogramy ověřující robustnost metody.

Specifická a sensitivita metody byla ověřena nezávislou metodou, konkrétně MPS na platformě Ion Torrent využívající S5 systémem. Ke stanovení byly použity DNA vzorky pacientů. Sangerovo sekvenování nezachytilo 7 variant v intronických oblastech genu *NPR2*, protože k záchytu těchto variant nebyly navrženy příslušné primery (viz Tab. 13). Citlivost (TP) i specifická (TN) tak byly rovny hodnotě 1, tj. 100 %.

Tab. 13: Záchyt variant Sangerovým sekvenováním v porovnání s MPS.

ID	Ion S5		Stav	Záchyt Sangerovým sekvenováním
	Koordináta	Zápis		
3179_20	chr9:35808334	c.2713-172C>G	Homozygot	Ne
	chr9:35809328	c.3079-49A>G	Homozygot	Ano
	chr9:35792423	c.18T>C	Heterozygot	Ano
	chr9:35801233	c.1436+82T>C	Heterozygot	Ne
	chr9:35801856	c.1558-67C>A	Heterozygot	Ne
3132_20	chr9:35802583	c.1794C>T	Heterozygot	Ano
	chr9:35806831	c.2520-189C>A	Heterozygot	Ne
	chr9:35807401	c.2712+7_2712+15delGCTGGGGCC	Heterozygot	Ano
	chr9:35808334	c.2713-172C>G	Heterozygot	Ne
	chr9:35809328	c.3079-49A>G	Heterozygot	Ano
3113_20	chr9:35806831	c.2520-189C>A	Heterozygot	Ne
	chr9:35808334	c.2713-172C>G	Heterozygot	Ne
	chr9:35809328	c.3079-49A>G	Heterozygot	Ano
233/20	chr9:35809328	c.3079-49A>G	Heterozygot	Ano

dle referenčního genomu GRCh37/hg19 a transkriptu NM\_003995.4

Reprodukovatelnost metody byla ověřována dvěma pracovníky, zároveň každý z nich použil jiný termocyklér i sekvenátor a analýzu provedl v jiný den (viz Tab. 14).

Tab. 14: Přehled změněných parametrů pro testování reprodukovatelnosti metody.

Parametr	Pracovník 1	Pracovník 2
Termocyklér	I026255-000	I024640-000
Detektor	SeqStudio (Thermo Fisher)	ABI3130 (Thermo Fisher)
Datum	16. 10. 2019	21. 10. 2019

V Tab. 15 jsou uvedeny délky osekvenovaných reverse a forward řetězců jednotlivých exonů genu *NPR2* v bp.

Tab. 15: Dva soubory délek čtení řetězců exonů *NPR2* (+/-20 nt) Sangerovou metodou.

Amplikon	Reverse řetězec [bp]			Forward řetězec [bp]		
	Pracovník 1	Pracovník 2	Požadovaný počet	Pracovník 1	Pracovník 2	Požadovaný počet
<b>Exon 1</b>	304	289	304	402	387	404
<b>Exon 2</b>	244	241	246	244	246	246
<b>Exon 3</b>	154	153	154	154	145	154
<b>Exon 4</b>	174	174	176	176	166	176
<b>Exon 5</b>	131	122	135	135	132	135
<b>Exon 6</b>	173	173	173	160	170	173
<b>Exon 7</b>	123	122	125	93	65	125
<b>Exon 8</b>	161	155	161	161	149	161
<b>Exon 9</b>	115	98	115	114	108	115
<b>Exon 10</b>	115	101	118	118	109	118
<b>Exon 11-12</b>	338	328	341	335	306	341
<b>Exon 13</b>	198	185	200	200	199	200
<b>Exon 14-15</b>	337	338	444	402	426	444
<b>Exon 16</b>	187	171	187	187	186	187
<b>Exon 17</b>	163	160	164	164	163	164
<b>Exon 18</b>	0	0	0	97	98	98
<b>Exon 19-20</b>	382	175	385	379	379	385
<b>Exon 21-22</b>	329	309	331	330	325	331
<b>Celkem</b>	3 628 (96,5 %)	3 294 (87,6 %)	3 759 (100 %)	3 521 (97,3 %)	3 759 (95 %)	3 957 (100 %)

Oblasti byly při verifikaci dvěma pracovníky sekvenovány s průměrným pokrytím od 87,6 % do 97,3 %.

Na základě testování rozptylu dvou rozdílů, rozdílu dvou středních hodnot a na stanovené hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  bylo zjištěno, že rozdíl mezi jednotlivými pracovníky v pracující v různé dny za použití různých koncentrací DNA, různých termocyklerů a různých sekvenátorů nebyl statisticky významný ( $p = ns$ ) (viz Tab. 16).

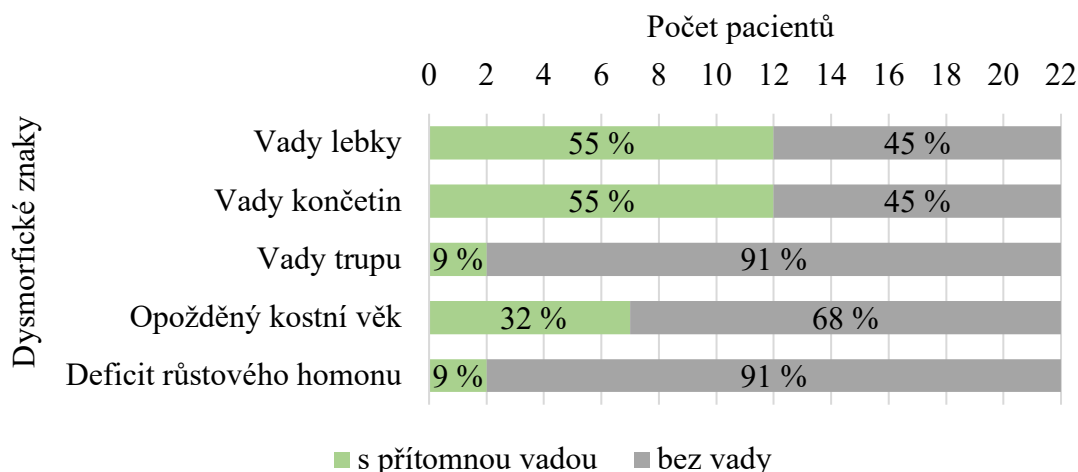
Tab. 16: Statistické vyhodnocení sekvenačních výsledků dvou pracovníků.

Řetězec	F-test	T-test
Reverse	0,602	0,561
Forward	0,919	0,889

### 5.3 Pilotní analýza

22 pacientů s indikací ISS bylo analyzováno metodou Sangerova sekvenování v kódujících oblastech genu *NPR2* a jejich nejbližších intronických oblastí (+/-20 nt). Celkem bylo zařazeno 13 dívek a 1 dospělá žena (63,6 %) a 8 chlapců (36,4 %). Průměrný věk pacienta byl 9 let a 7 měsíců, přičemž nejmladšímu pacientovi bylo 2,5 roků a nejstaršímu 34 let. U 19 pacientů byl indikován vzrůst na 3. percentilu nebo pod ním (86,4 %). Výška dvou pacientů (9,1 %) se nacházela mezi 3.–10. percentilem. U jednoho pacienta (4,5 %) byla stanovena výška na 30. percentilu, avšak se současnou indikací nízké hmotnosti (3.–10. percentil).

Na základě zpráv z klinických vyšetření pacientů byly vyhodnoceny podíly významných dysmorfických příznaků, které by mohly být diagnostickým vodítkem a determinovat geneticky podmíněnou chorobu. U 12 z 22 pacientů byly zpozorovány vady lebky, kam byla řazena např. makrocefalie, faciální stigmatizace, hypertelorismus nebo přítomnost gotického patra. Celkem 12 pacientů mělo minimálně jednu vadu končetin. Tato kategorie zahrnovala kratší metatarzy či metakarpy, rhizomelicky zkrácené končetiny, valgózní postavení chodidel nebo syndaktylie. Třetí skupinu tvořily vady trupu. Deformovaný hrudník nebo vadné držení těla měli 2 pacienti. Samostatnou skupinu tvořil opožděný kostní věk. Tento faktor neprospívání byl diagnostikován u celkem 7 pacientů. Posledním důležitým ukazatelem byly hormonální poruchy. Deficit růstového hormonu byl diagnostikován u 2 pacientů. Procentuální zastoupení dysmorfických znaků je vyobrazen v Grafu 2.



Graf 2: Četnosti skupin dysmorfických znaků u pacientů vyšetřovaných na přítomnost variant genu *NPR2*.

Screening variant genu *NPR2* Sangerovým sekvenováním odhalil 1 variantu neznámého významu a 4 varianty benigního charakteru. Procento záchytu klinicky významných variant, respektive jedné varianty bylo 4,5 % (viz Tab. 17).

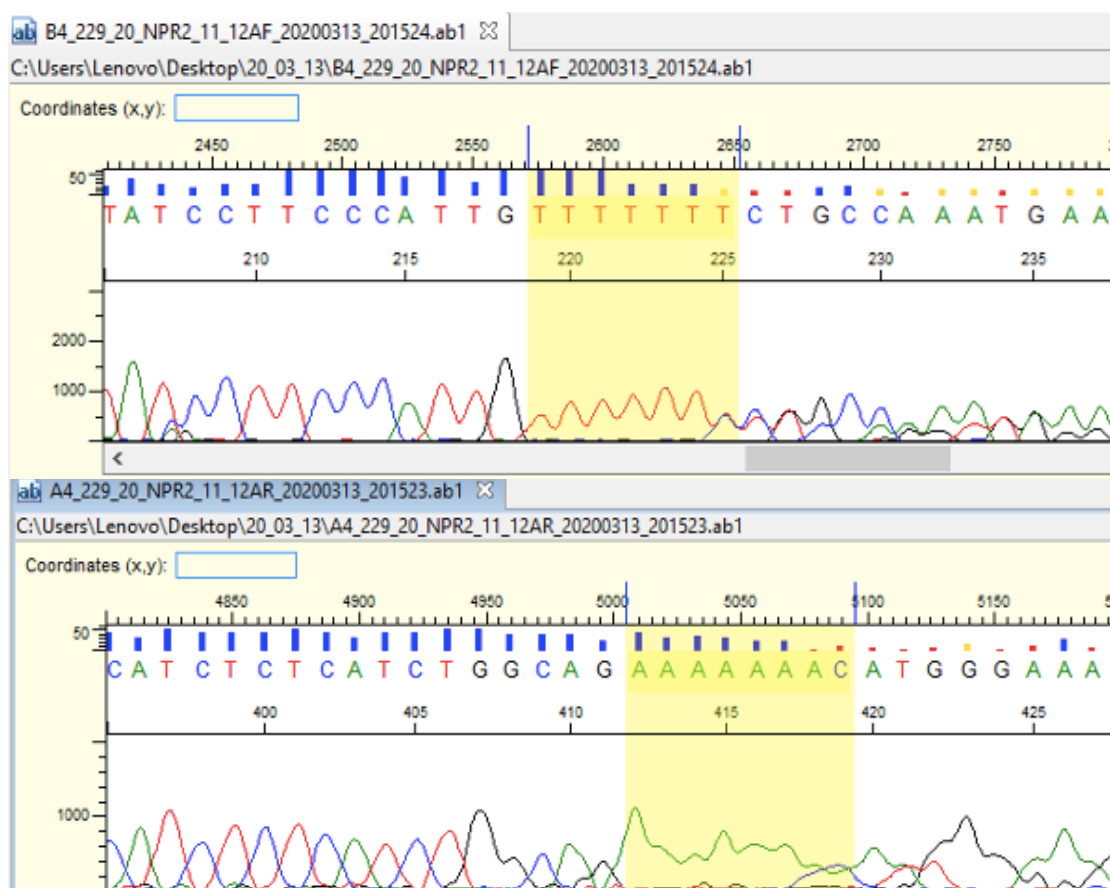
Tab. 17: Varianty genu *NPR2* zachycené u pacientů Sangerovým sekvenováním.

Zápis varianty	Pozice	Stav	Význam	Počet záchytů
c.18T>A	Exon 1	Heterozygot	Benigní	7
		Homozygot	Benigní	2
c.1711-8dupT	Intron 10	Heterozygot	Neznámý	1
c.1436+82T>C	Exon 11	Heterozygot	Benigní	7
		Homozygot	Benigní	2
c.2712+7_2712+15delGCTGGGGCC	Exon 18	Homozygot	Benigní	1
		Heterozygot	Benigní	3
c.3079-49A>G	Intron 21	Homozygot	Benigní	1
		Heterozygot	Benigní	8

dle referenčního genomu GRCh37/hg19

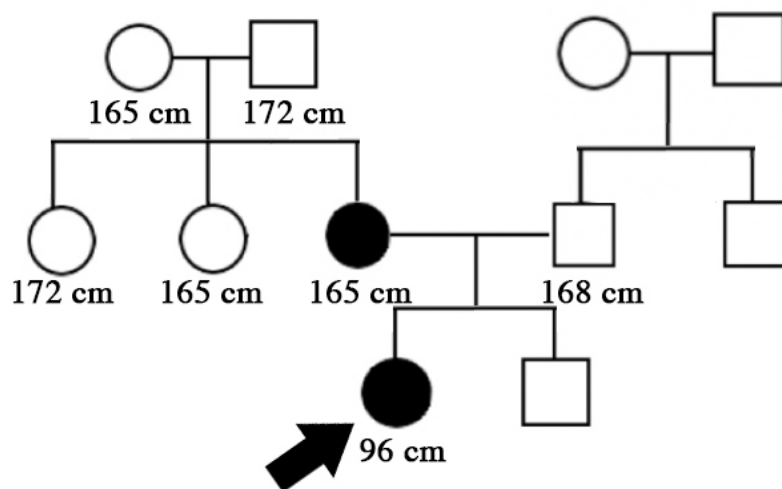


Zachycená duplikace v poly T oblasti (viz Obr. 29) je neznámého významu. Podle predikčních nástrojů by varianta mohla být středně patogenní. Její frekvence je v evropské populaci nefinského původu velmi nízká ( $f = 0.00008359$ ). Tato inserce T se nachází v intronové oblasti před 11. exonem (NM\_003995.4(NPR2):c.1711-8dupT).



Obr. 29: Varianta NM\_003995.4(NPR2):c.1711-8dupT u pacientky 229\_20 zachycená Sangerovým sekvenováním ve forward řetězci (nahore) i reverse řetězci (dole).

Varianta byla detekována u čtyřleté pacientky, jejíž výška je dle růstového grafu pod 3. percentilem a byly u ní diagnostikovány vývojové vady lebky. Výsledky molekulární analýzy prokázaly, že daná varianta byla zděděna od matky, která měří 165 cm. Podle genealogického rozboru jedna sestra matky měří 165 cm, druhá sestra matky měří 172 cm. Navíc matka matky měří také 165 cm a otec matky 172 cm. Otec žadatelky měří 168 cm (viz Obr. 30).



Obr. 30: Genealogické schéma nositelky varianty NM\_003995.4(NPR2):c.1711-8dupT.

## 6 DISKUZE

Idiopatický malý vzrůst charakterizuje heterogenní skupinu pacientů s výškou pod 3. percentilem, u které nebyla dosud identifikována příčina tohoto onemocnění. Systematické fenotypování v kombinaci s vhodně zvoleným genetickým testováním zvyšuje pravděpodobnost identifikace příčiny ISS. Odhalení molekulární příčiny malého vzrůstu je důležité pro predikci výšky v dospělosti, nastolení odpovídající léčby a genetické poradenství pro plánovanou těhotenství (Inazghi *et al.*, 2019).

*NPR2* je gen kódující natriuretický receptor typ B. NPR-B hraje důležitou roli v komplexu parakrinní regulace růstové ploténky. Po připojení CNP ligandu k receptoru dochází ke stimulaci buněčného dělení, diferenciaci a syntéze extracelulárního matrixu. Změny v *NPR2* signální kaskádě mohou vést k růstovým poruchám u dětí (Plachy *et al.*, 2020).

Byla prokázána souvislost mezi bialelickou ztrátou funkce mutací v *NPR2* a akromesomelickou dysplázií typu Maroteaux (AMDM; OMIM 602875), která je doprovázena významně sníženou výškou pacienta ( $< -5$  SD) (Jacob *et al.*, 2018). Na druhou stranu dopad heterozygotních variant v genu *NPR2* je stále zkoumán.

Podle některých studií mohou heterozygotní varianty představovat příčinu 2 % až 6 % idiopatického malého vzrůstu (Hanley *et al.*, 2020; Hwang *et al.*, 2020).

Práce Hwang *et al.* reportovala 2 známé varianty (rs114147262 a rs770276670) a 2 nové varianty (c.1483C>T a c.1792T>A) v heterozygotním stavu u pacientů s výškou, která dosahovala průměrného z-skóre -2,65 (Hwang *et al.*, 2020). Rovněž byla publikována kazuistika pacientky, jejíž růst byl stabilní, avšak dlouhodobě mezi 3. a 10. percentilem s potvrzenou maternálně zděděnou heterozygotní variantou c.2761 C>T v genu *NPR2*. Kromě malého vzrůstu byla u této pacientky také zaznamenána brachydaktylie 5. prstu, oba palce krátké a široké, mírná mezomelie horních končetin a radiologicky byly prokázány zkrácené metakarpy levé ruky. U pacientky i její matky bylo také identifikováno 11 párů žeber (Jacob *et al.*, 2018). V neposlední řadě byla publikována skupina 6 pacientů s heterozygotními změnami v genu *NPR2*, kteří byli klinicky charakterizováni malým vzrůstem, anomáliemi obličeje a dysplázií skeletu (brachydaktylie, zkrácené metakarpy nebo metatarzály) (Ke *et al.*, 2021).

V této diplomové práci byla cestou optimalizace teploty *annealingu* a složení PCR směsi zavedena Sangerova sekvenace kódujících oblastí genu *NPR2* a jejich nejbližších intronických oblastí ( $\pm 20$  nt). Teploty *annealingu* 18 navržených primerů pokrývajících

všech 22 exonů genu byly 53 °C (NPR2\_2F a NPR2\_2R, NPR2\_4F a NPR2\_4R, NPR2\_14\_15F a NPR2\_14\_15R), 54 °C (NPR2\_10F a NPR2\_10R, NPR2\_3F a NPR2\_3R, NPR2\_11\_12F a NPR2\_11\_12R), 55 °C (NPR2\_1F a NPR2\_1R, NPR2\_5F a NPR2\_5R, NPR2\_6F a NPR2\_6R, NPR2\_7F a NPR2\_7R, NPR2\_9F a NPR2\_9R, NPR2\_13F a NPR2\_13R, NPR2\_16F a NPR2\_16R, NPR2\_17F a NPR2\_17R, NPR2\_18F a NPR2\_18R, NPR2\_19\_20F a NPR2\_19\_20R, NPR2\_21\_22F a NPR2\_21\_22R) a 57 °C (NPR2\_8F a NPR2\_8R). Složení PCR směsi obsahovalo komerční PPP Master Mix (Top-Bio) vodu v PCR čistotě a DMSO pro zvýšení specifity *annealingu* primerů s výjimkou NPR2\_3F a NPR2\_3R, NPR2\_11\_12F a NPR2\_11\_12R. Zavedená metoda splňuje požadavky robustnosti, opakovatelnosti, specifčnosti i sensitivity pro účely správné laboratorní praxe.

V souboru 22 pacientů s ISS byla zavedenou metodou u jedné pacientky (1/22, tj. 4,5 %) identifikována maternálně zděděná heterozygotní varianta NPR2(NM\_003995.4):c.1711-8dupT.

Vzhledem k pozici varianty, tj. v blízkosti rozhraní exon/intron, existuje možnost vzniku poškozeného proteinu po nesprávném sestřihu. Varianta je uvedena v databázi ClinVar, ale doposud nebyla publikována žádná klinická data, která by naznačila klinický dopad varianty na fenotyp pacientky. Tato varianta byla v evropské populaci zachycena s frekvencí 0,00008359. Rovněž nebyla pozorována v homozygotním stavu (VarSome, 2021). U této pacientky byl pozorován idiopatický malý vzrůst, ploché nohy s přítomnou sandálovou rýhou a naznačený bilaterální epikantus s hypertelorismem.

Genealogický rozbor rodiny nositelky varianty NPR2(NM\_003995.4):c.1711-8dupT naznačuje možnou segregaci této varianty s malým vzrůstem.

Význam sekvenace genu *NPR2* byl prokázán i na úrovni léčebných postupů. Ačkoliv byla léčba lidským rekombinantním růstovým hormonem u pacientů s ISS schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA), výsledky se u nositelů heterozygotních změn genu *NPR2* liší. Výškové skóre pacientů s těmito variantami se významně zvýšilo zejména u dívek ( $p < 0,001$ ). Rovněž byl prokázán značný benefit léčby růstovým hormonem u heterozygotních variant, které kódují katalytickou doménu karboxy-terminální guanylyl cyklázy, nežli u variant v kódu extracelulární domény, která váže ligandy ( $p = 0,019$ ). Také byla prokázána nepřímá úměra mezi věkem pacienta s heterozygotní variantou v genu *NPR2* a účinností léčby lidským rekombinantním hormonem ( $p = 0,034$ ) (Jacob *et al.*, 2018; Ke *et al.*, 2021).

Výsledky pilotních dat této práce mají své limity plynoucí z podstaty metody Sangerova sekvenování a vyžadují další metodické postupy k objasnění klinického významu varianty NPR2(NM\_003995.4):c.1711-8dupT.

## 7 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla cestou optimalizace teploty *annealingu* a složení PCR směsi zavedena metoda Sangerova sekvenování kódujících oblastí genu *NPR2* a jeho nejbližších intronických oblastí (+/-20 nt). Všechny 22 exonů bylo úspěšně amplifikováno pomocí 18 navržených primerů. Zavedená metoda splňuje požadavky robustnosti, opakovatelnosti, specifčnosti i sensitivity pro účely správné laboratorní praxe.

V rámci pilotní analýzy byla metoda sekvenace genu *NPR2* aplikována na souboru 22 pacientů s ISS. U tohoto souboru pacientů byla zachycena maternálně zděděná heterozygotní varianta NM\_003995.4(NPR2):c.1711-8dupT, která by mohla objasnit příčinu onemocnění u pacientky, avšak je potřeba dalších analýz k potvrzení této hypotézy.

## 8 LITERATURA

- Amano N., Mukai T., Ito Y., Narumi S., Tanaka T., Yokoya S., Ogata T., Hasegawa T. (2014): Identification and functional characterization of two novel *NPR2* mutations in Japanese patients with short stature. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 99(4):E713–E718.
- Ambardar S., Gupta R., Trakroo D., Lal R., Vakhlu, J. (2016): High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian journal of microbiology*, 56(4), 394–404.
- Beránek M. (2016): Molekulární genetiky pro bioanalytiky. Karolinum, Praha. 164–166.
- Besser J., Carleton H. A., Gerner-Smidt P., Lindsey R. L., Trees E. (2018): Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(4), 335–341.
- BLAST. [online] [navštíveno 2. 3. 2020] Dostupné z <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Churko J. M., Mantalas G. L., Snyder M. P., Wu J. C. (2013): Overview of high throughput sequencing technologies to elucidate molecular pathways in cardiovascular diseases. *Circulation research*, 112(12), 1613–1623.
- ClinVar. [online] [navštíveno 29. 12. 2020] Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>
- Dickey D.M., Edmond A.B., Chaffee T. et al. (2015): Catalytically active guanylyl cyclase-B requires glycosylation and mutations that inhibit this process cause dwarfism. *BMC Pharmacol Toxicol* 16, A44.
- Dickey D. M., Otto N. M., Potter L. R. (2017): Skeletal overgrowth-causing mutations mimic an allosterically activated conformation of guanylyl cyclase-B that is inhibited by 2,4,6,-trinitrophenyl ATP. *The Journal of biological chemistry*, 292(24), 10220–10229.
- Dlamini Z., Francies F. Z., Hull R., Marima R. (2020): Artificial intelligence (AI) and big data in cancer and precision oncology. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 2300–2311.

- ENSEMBL. [online] [navštíveno 7. 2. 2020] Dostupné z [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000159899;r=9:35792154-35809732](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000159899;r=9:35792154-35809732)
- Faivre L., Le Merrer M., Megarbane A., Gilbertc B., Mortierd G., Cusina V., Munnicha A., Maroteauxa P., Cormier-Dairea V. (2000): Exclusion of chromosome 9 helps to identify mild variants of acromesomelic dysplasia Maroteaux type. *Journal of Medical Genetics*, 37, 52–54.
- Guan Y. F., Li G. R., Wang R. J., Yi Y. T., Yang L., Jiang D., Zhang X. P., Peng Y. (2012): Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chinese journal of cancer*, 31(10), 463–470.
- Gullapalli R. R., Lyons-Weiler M., Petrosko P., Dhir R., Becich M. J., LaFramboise W. A. (2012): Clinical integration of next-generation sequencing technology. *Clinics in laboratory medicine*, 32(4), 585–599.
- Hanley P. C., Kanwar H. S., Martineau C., Levine M.A. (2020): Short Stature is Progressive in Patients with Heterozygous NPR2 Mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 105(10), dgaa491.
- Heather J. M., Chain B. (2016): The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8.
- Howe B., Umrigar A., Tsien F. (2014): Chromosome preparation from cultured cells. *Journal of visualized experiments. Journal of visualized experiments : JoVE*, (83), e50203.
- Hu J., Ng P. C. (2012): Predicting the effects of frameshifting indels. *Genome biology*, 13(2), R9.
- Hume A. N., Buttgerit J., Al-Awadhi A. M., Al-Suwaidi S. S., John A., Bader M., Seabra M. C., Al-Gazali L., Ali B. R. (2009): Defective cellular trafficking of missense NPR-B mutants is the major mechanism underlying acromesomelic dysplasia-type Maroteaux. *Human molecular genetics*, 18(2), 267–277.
- Hwang I. T., Mizuno Y., Amano N., Lee H. J., Shim Y. S., Nam H. K., Rhie Y. J., Yang S., Lee K. H., Hasegawa T., Kang M. J. (2020): Role of *NPR2* mutation in idiopathic short stature: Identification of two novel mutations. *Molecular genetics & genomic medicine*, 8(3), e1146.
- Jacob M., Menon S., Botti C., Marshall I. (2018): Heterozygous NPR2 Mutation in Two Family Members with Short Stature and Skeletal Dysplasia. *Case Report in Endocrinology*, 2018.



- Ke X., Liang H., Miao H., Yang H., Wang L., Gong F., Pan H., Zhu H. (2021): Clinical Characteristics of Short-Stature Patients With an NPR2 Mutation and the Therapeutic Response to rhGH. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 106(2), 431-441.
- Klag K. A., Horton W. A. (2016): Advances in treatment of achondroplasia and osteoarthritis. *Human molecular genetics*, 25(R1):R2–R8.
- Kohn A. B., Moroz T. P., Barnes J. P., Netherton M., Moroz, L. L. (2013): Single-cell semiconductor sequencing. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1048, 247–284.
- Kolísko M. (2017): Moderní metody sekvenování DNA. *Živa*, 3, 73–76.
- Kopanos C., Tsiolkas V., Kouris A., Chapple C. E., Albarca Aguilera M., Meyer R., Massouras A. (2019): VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 35(11), 1978–1980.
- Kořínek V., Sedláček R. (2012): Transgenní technologie a laboratorní myši. *Vesmír*, 91, 720.
- Kringel D., Lötsch J. (2016): Next-generation sequencing of human opioid receptor genes based on a custom AmpliSeq™ library and ion torrent personal genome machine. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 463, 32–38.
- Landrum M. J., Lee J. M., Benson M., Brown G., Chao C., Chitipiralla S., Gu B., Hart J., Hoffman D., Hoover J., Jang W., Katz K., Ovetsky M., Riley G., Sethi A., Tully R., Villamarin-Salomon R., Rubinstein W., Maglott D. R. (2016): ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic acids research*, 44(D1), D862–D868.
- Lebl J., Plachý L., Dimova K., Kučerová P., Maratová K., Zemková D., Průhová Š. (2019): Dvě holky pro radost. *Česko – Slovenská pediatrie*, 74(1), 49–50.
- McPherson E. (2006): Genetic diagnosis and testing in clinical practice. *Clinical medicine & research*, 4(2), 123–129.
- Miller D. T., Adam M. P., Aradhya S., Biesecker L. G., Brothman A. R., Carter N. P., Church D. M., Crolla J. A., Eichler E. E., Epstein C. J., Faucett W. A., Feuk L., Friedman J. M., Hamosh A., Jackson L., Kaminsky E. B., Kok K., Krantz I. D., Kuhn R. M., Lee C., Ostell J. M., Rosenberg C., Scherer S. W., Spinner N. B., Stavropoulos D. J., Tepperberg J. H., Thorland E. C., Vermeesch J. R., Waggoner D. J., Watson M. S., Martin C. L., Ledbetter D. H. (2010): Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with

- developmental disabilities or congenital anomalies. *American journal of human genetics*, 86(5), 749–764.
- Miura K., Namba N., Fujiwara M., Ohata Y., Ishida H., Kitaoka T., Kubota T., Hirai H., Higuchi C., Tsumaki N., Yoshikawa H., Sakai N., Michigami T., Ozono K. (2012): An overgrowth disorder associated with excessive production of cGMP due to a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 gene. *Public Library of Science one*, 7, e42180.
- NCBI Gene. [online] [navštíveno 7. 2. 2020] Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4882>
- Olney R. C. (2006): C-type natriuretic peptide in growth: a new paradigm. *Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, 16 (A), S6–S14.
- Pandey K. N. (2015): Endocytosis and Trafficking of Natriuretic Peptide Receptor-A: Potential Role of Short Sequence Motifs. *Membranes*, 5(3), 253–287.
- Plachy L., Dusatkova P., Maratova K., Petruzekova L., Zemkova D., Elblova L., Kucerova P., Toni L., Kolouskova S., Snajderova M., Sumnik Z., Lebl J., Pruhova S. (2020): NPR2 Variants Are Frequent among Children with Familiar Short Stature and Respond Well to Growth Hormone Therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 105(3), dgaa037.
- Podnar J. W., Pantano L., Zeller M. J., Kolling F. W., Zhang, Y., Alekseyev Y. O., Niece J., Deiderick H., Fan J., Xuei X., Kieleczawa J., Levine S. S., Herbert Z. T., Adams M. (2020): Cross-Site Evaluation of Commercial Sanger Sequencing Chemistries. *Journal of biomolecular techniques*, 31(3), 88–93.
- Potthast R., Potter L. R. (2005): Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. *Peptides*, 26(6), 1001–1008.
- Riegel M. (2014): Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genetics and molecular biology*, 37(1), 194–209.
- Rodenburg R. J. (2018): The functional genomics laboratory: functional validation of genetic variants. *Journal of inherited metabolic disease*, 41(3), 297–307.
- Rusk N. (2011): Torrents of sequence. *Nature Methods* 8, 44.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.

- Sherry S. T., Ward M. H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E. M., Sirotkin, K. (2001): dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, 29(1), 308–311.
- Shuhaibar L. C., Edmund A. B., Egbert J. R. Yee S., Potter L. R., Jaffe L. A. (2015): Dephosphorylation of juxtamembrane serines and threonines of the NPR2 guanylyl cyclase regulates oocyte meiotic resumption. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 16, A30.
- Shuhaibar L. C., Robinson J. W., Vigone G., Shuhaibar N. P., Egbert J. R., Baena V., Uliasz T. F., Kaback D., Yee S. P., Feil R., Fisher M. C., Dealy C. N., Potter L. R., Jaffe L. A. (2017): Dephosphorylation of the NPR2 guanylyl cyclase contributes to inhibition of bone growth by fibroblast growth factor. *eLife*, 6, e31343.
- Thermo Fisher Scientific [online] [navštíveno 3. 12. 2020] Dostupné z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/ion-torrent-next-generation-sequencing-run-sequence.html>
- VarSome [online] [navštíveno 31. 3. 2021] Dostupné z [https://varsome.com/variant/hg19/NPR2\(NM\\_003995.4\)%3Ac.1711-8dupT?annotation-mode=germline](https://varsome.com/variant/hg19/NPR2(NM_003995.4)%3Ac.1711-8dupT?annotation-mode=germline)
- Vasques G. A., Amano N., Docko A. J., Funari M. F. A., Quedas E. P. S., Nishi M. Y., Arnhold I. J. P., Hasegawa T., Jorge A. A. L. (2013): Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (*NPR2*) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98, E1636–E1644.
- Wang S. R., Jacobsen C. M., Carmichael H., Edmund A. B., Robinson J. W., Olney R. C., Miller T. C., Moon J. E., Mericq V., Potter L. R., Warman M. L., Hirschhorn J. N., Dauber A. (2015): Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (*NPR2*) gene as a cause of short stature. *Human mutation*, 36(4), 474–481.
- Zhang P., Seth A., Fernandes H. (2014): Other Post-PCR Detection Technologies. In: McManus L., Mitchell R. (eds.): *Pathobiology of Human Disease*, 4074–4088, Academic Press, Amsterdam.