

ABSTRAKT

Úvod: Gen *SHOX* se nachází v pseudoautosomálním regionu 1 na konci krátkého raménka chromosomů X a Y (Xp22.32/Yp11.32) a kóduje transkripční faktor, který reguluje proliferaci a diferenciaci chondrocytů v růstových chrupavkách. Haploinsuficience *SHOX* je asociována s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou (LWD) a idiopatickým nízkým vzrůstem (ISS). Ve většině případů je způsobena CNV („copy number variation“) zahrnujícími exony *SHOX* a/nebo jeho regulační elementy, nicméně přibližně u 30 % případů zůstává příčina patologického fenotypu neodhalena. Oproti delecím zahrnujícím regulační elementy *SHOX*, zůstává význam duplikací v některých případech kontroverzní. Duplikace zahrnující regulační prvky v regionu *SHOX* byly popsány u pacientů s fenotypem LWD/ISS, ale také u zdravých jedinců. Za normálního stavu jsou CpG ostrůvky obklopující gen *SHOX* hypometylovány, což odpovídá skutečnosti, že *SHOX* nepodléhá inaktivaci. Některé studie ovšem předpokládají, že změny v úrovni metylace DNA genů mohou být asociovány s přestavbami v jejich okolí a známá je též role změn profilu metylace DNA v etiopatogenezi některých chorob. Cílem této práce bylo ověřit možný vliv duplikací zahrnujících regulační sekvence genu *SHOX* na stav metylace DNA tohoto genu, a to u pacientů s fenotypem LWD. Dalším cílem bylo ověřit, zda změny v metylačním profilu *SHOX* u pacientů s LWD/ISS bez detekovaných mutací mohou být zodpovědné za vznik patologického fenotypu.

Materiál a metody: Výzkumný soubor se skládal ze: a) 20 pacientů s fenotypem LWD a duplikací zahrnující regulační elementy *SHOX*; b) 30 pacientů s fenotypem LWD/ISS bez detekovaných strukturních a bodových mutací v oblasti *SHOX*; c) 23 zdravých jedinců. Zaměřili jsme se na stav metylace dvou CpG ostrůvků v „up-stream“ oblasti genu *SHOX*. Vzorky genomické DNA nejdříve podstoupily bisulfitovou konverzi, následně byly amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce a produkty reakce byly nakonec osekvenovány pomocí Sangerovy sekvenční metody. Stanovení míry metylace jednotlivých CpG dinukleotidů bylo provedeno za použití softwaru ABSP tool.

Výsledky: Naše výsledky naznačují, že CpG ostrůvky v oblasti *SHOX* vykazují nižší úroveň metylace u pacientů s duplikací, než u zdravých jedinců, ovšem pouze u jednoho ostrůvku byl zaznamenán rozdíl statisticky významný (CpG1: $p = 0,4224$; CpG 3: $p < 0,0001$). Výsledky metylačního profilování CpG ostrůvků u pacientů bez nalezené bodové či strukturní mutace naznačují, že metylační indexy pacientů se odlišovaly od průměru skupiny zdravých jedinců alespoň o dvojnásobek směrodatné odchylky u 86,6 % pacientů v případě ostrůvku CpG 1, a u 70 % pacientů ve sledovaném úseku ostrůvku CpG 3.

Rozdíl v úrovni metylace byl ovšem pozorován u jednotlivých CpG dinukleotidů, nikoliv u všech CpG v ostrůvku zároveň.

Závěr: Na základě provedené analýzy jsme zjistili, že duplikace v regulačních oblastech genu *SHOX* u pacientů s fenotypem LWD vedou ke statisticky významnému snížení míry metylace DNA pouze v CpG 3 ostrůvku genu *SHOX*. Biologický efekt tohoto rozdílu však bude patrně nevýznamný vzhledem k obecně velmi nízké míře metylace. Metylační indexy pacientů s fenotypem LWD/ISS bez detekovaných mutací se odchylují od průměru zdravých jedinců, nicméně jedná se o rozdíly v jednotkách procentních bodů. Za patologický fenotyp u těchto pacientů budou pravděpodobně zodpovědné jiné molekulárně-genetické mechanismy, nežli metylace DNA. Otázkami pro další výzkum zůstávají efekty konkrétních duplikací v závislosti na jejich lokaci, síla reálného biologického efektu pozorované změny metylace i význam změn profilu metylací v etiologii LWD a ISS.

Klíčová slova: metylace DNA, CpG ostrůvky, haploinsuficience, gen *SHOX*, Lériho-Weillova dyschondrosteóza