

## ABSTRAKT

V posledních letech došlo k výraznému rozvoji molekulárně genetické diagnostiky (DNA diagnostiky). Jsou zaváděny nové metody a technologie a rozšiřováno spektrum genetických služeb. Jelikož výsledky genetických testů zárodečného genomu mohou celoživotně ovlivnit zdraví a kvalitu života pacienta i jeho rodiny, je kladen důraz na neustálé zvyšování kvality poskytovaných diagnostických služeb. Stále více laboratoří přechází z „domácích metod“ na komerční diagnostické soupravy, ale často pak svévolně modifikují protokoly výrobce. Proto je pro zajištění kvality genetických testů nezbytné všechny metody a technologie před zavedením do rutinní diagnostické praxe řádně validovat a verifikovat.

V této dizertační práci jsem se věnovala otázce vhodnosti a využitelnosti metody High Resolution Melting (HRM) v diagnostice na základě její kompletní validace dle mezinárodních požadavků normy na řízení systému jakosti (ISO 15189). Potvrdili jsme užitečnost této metody a její výhody pro mutační skenování neznámých variant i genotypizaci častých polymorfismů, a to na příkladu různých genů (*BRCA1*, *MTHFR* či *CFTR*). Zároveň jsme poskytli metodické pokyny a postupy pro usnadnění diagnostické implementace této technologie a umožnění jejího úspěšného využití i v dalších genetických laboratořích, a na příkladu validace HRM poskytli návody a model pro validaci dalších DNA diagnostických metod.

O zvýšení kvality poskytovaných genetických služeb jsme se zasadili i v oblasti diagnostiky cystické fibrózy (CF). Toto frekventované monogenní onemocnění je charakterizováno velkým množstvím identifikovaných mutací v genu *CFTR* a molekulární heterogenitou v závislosti na etnicitě probanda, proto je znalost distribuce a četnosti mutací tohoto genu v každé populaci klíčová. Molekulárně genetickými studii jsme zmapovali spektrum mutací u českých a ukrajinských pacientů s CF, neboť identifikace obou kauzálních mutací podpoří klinickou diagnózu, umožní předpovědět průběh onemocnění, individuálně stanovit léčbu, poskytnout spolehlivou prenatalní diagnostiku a stanovit přenos těchto alel a rizik u dalších rodinných příslušníků. Vysoká populační záchytnost umožní zavedení novorozeneckého skríningu, který vyhledá postižené pacienty v preklinickém stádiu. Včasná stanovení diagnózy a brzká aplikace léčby příznivě ovlivní průběh choroby a zároveň sníží náklady na léčbu.

V současné době je věnována velká pozornost problematice neplodnosti, neboť postihuje až 15% párů a dochází k jejímu nárůstu. Muž se na neplodnosti páru podílí v přibližně 50% případech. Po vyloučení rutinně vyšetřovaných příčin mužské neplodnosti (např. mutace v genu cystické fibrózy, Klinefelterův syndrom, strukturální abnormality Y chromozomu, prodělané záněty varlat virem příušnic, tumor atd.) nadále zůstává mnoho případů neobjasněno. Proto jsem se v rámci tohoto studia zabývala analýzou protaminových genů (*PRM1*, *PRM2*), neboť plní stěžejní funkci při diferenciaci spermií a bylo prokázáno, že myši haploinsuficientní pro jeden z protaminových genů vykazují poruchu uspořádání chromatinu, jaderné integrity a produkují spermie abnormální morfologie a snížené pohyblivosti, které nejsou schopné oplodnit oocyt. Na reprezentativním souboru německých teratozoospermických mužů s normálním počtem spermií (simulující fenotyp PRM-haploinsuficientní myši) a mužů se sníženým počtem spermií, včetně souboru normozoospermických mužů jako kontrol, byla provedena mutační analýza protaminových genů zkoumající vliv případných mutací na poruchu spermiogeneze. Podařilo se nalézt statisticky signifikantní asociaci mezi haplotypem ACC, tvořeným třemi častými polymorfismy genů *PRM1/2*, a koncentrací spermií a jejich celkovým počtem. Homozygotní nosiči haplotypu ACC měli dvojnásobně vyšší počet spermií než muži bez tohoto haplotypu ( $45 \times 10^6/\text{ml}$  x  $24.2 \times 10^6/\text{ml}$ ). Je možné, že spermie nosičů jiného než ACC haplotypu nejsou životaschopné či podléhají negativní selekci. Pro určení klinického významu tohoto zjištění a jeho případného diagnostického využití je však potřeba nález ověřit studii na dalších souborech a populacích.