

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Analýza regulačních elementů sestřihu v genech spojených se vznikem primárních imunodeficiencí

Kateřina Štouračová

Brno, 2014

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

## Analýza regulačních elementů sestřihu v genech spojených se vznikem primárních imunodeficiencí

**Autor:**

Kateřina Štouračová  
Gymnázium Brno-Řečkovice  
Terezy Novákové 2  
Brno, 621 00  
Jihomoravský kraj  
Septima B

**Školní konzultant:**

Mgr. Lenka Bučková  
Gymnázium Brno-Řečkovice

**Odborný konzultant:**

Mgr. Lucie Grodecká

Brno, 2014

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Lucii Grodecké za vedení mé práce, cenné rady a připomínky při zpracování. Dále chci poděkovat Bc. Pavle Lockerové za její pomoc při vypracování praktické části mé práce a své školní konzultantce Mgr. Lence Bučkové.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně, použila jsem pouze podklady citované v práci a uvedené v příloženém seznamu zdrojů a postup při zpracování práce je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 23.2. 2014

podpis .....

## Anotace

Procesem genové exprese je genetická informace převáděna na konkrétní funkční jednotky buněk. Genová exprese probíhá na několika úrovních, mezi které patří transkripce DNA, posttranskripční úpravy primárního transkriptu, transport z jádra do cytoplazmy, v případě strukturních genů dále translace mRNA, následné posttranslační úpravy proteinů a jejich lokalizace v buňce. V této středoškolské odborné práci se zabývám jednou z posttranskripčních modifikací pre-mRNA, sestřihem. Bezchybný průběh procesu sestřihu je nezbytný pro správné fungování živého organismu. Genové mutace, které naruší sestřih, často vedou ke vzniku dědičných onemocnění. Mezi takovéto dědičné choroby patří například i Wiskott-Aldrich Syndrome, jehož konkrétní jednou mutací, popsanou v odborném článku, se následně v práci věnuji. Cílem byla analýza vlivu této mutace na funkci sestřihu mutovaného genu. Připravené minigeny, jeden obsahující inzerť ve variantě divokého typu a druhý v mutantní variantě, byly transfekovány do více druhů nádorových buněčných linií, z kterých byla následně izolována RNA. Poté byla provedena reverzní transkripce (RT), při které se molekula RNA přepsala do malého množství jednořetězcové DNA, ze které bylo následně pomocí PCR syntetizováno větší množství cDNA. Při kontrole výsledků elektroforézou bylo bohužel zjištěno, že zkoumaný exon nebyl do minigenové mRNA vůbec začleňován, ani ve variantě divokého typu, ani v mutantní variantě. Metodami, které byly pro pokus zvoleny, se tedy nepovedlo vliv mutace na sestřih analyzovat.

**Klíčová slova:** DNA, posttranskripční modifikace, sestřih, genová mutace, regulační elementy, WAS

## Annotation

During the process of gene expression the genetic information is transformed into specific active cellular units. Gene expression process occurs on various different levels such as DNA transcription, posttranscriptional modifications, transportation of RNA from the nucleus to cytoplasm, and in the case of structural genes also translation of mRNA into proteins, followed by their posttranslation modification and their final localization in the cell. In this project the focus lies mainly on one of the pre-mRNA posttranscriptional modification steps – splicing. Flawless process of splicing is fundamental for proper function of all living organisms. Virtually any gene mutation can violate the process of splicing which most often results in development of inherited diseases. One of these diseases is Wiskott-Aldrich Syndrome. I have chosen to focus my project on one specific mutation described to lead to the development of this disease on a patient and shown to aberrantly influence the splicing of WASP gene. The aim of this work was to analyze the mechanisms by which this mutation influences the splicing of the WASP gene. For the analysis, I have chosen a method called splicing minigene assay. Prepared minigenes in the wild type and mutant variant were transfected into several various types of tumor cell lines. Later, RNA was isolated from the transfected cell lines. In the next step a reverse transcription was done during which the RNA molecule was transcribed into a small amount of single strand cDNA. This cDNA was used for a synthesis of plentitude of its amplicons using PCR method. Unfortunately, inspection of the results (visualised by gel electrophoresis) revealed that the examined exon was entirely spliced out from the mRNA, in every tested variant of the minigene (including both wild type and mutant variants). In conclusion, using the chosen methods the influence of mutation on the process of splicing could not have been examined properly.

**Keywords:** DNA, posttranscriptional modifications, splicing, gene mutation, regulation elements, WAS

---

## Obsah

Úvod.....	9
Kapitola 1: Genetika.....	10
1.1 Historie genetiky.....	10
Kapitola 2: Wiskott-Aldrich Syndrom.....	11
2.1 Historie.....	11
2.2 Gen WASP.....	12
2.3 Mutace WASP genu.....	12
2.4 Příznaky.....	12
2.5 Zhu a kol. - mutace c.1001_1002insT.....	13
Kapitola 3: Genová exprese.....	14
Kapitola 4: Sestřih.....	15
4.1 Sestřih RNA.....	15
4.2 Alternativní sestřih.....	16
4.3 Mutace ovlivňující sestřih.....	16
4.3.1 Mutace poškozující místa sestřihu.....	16
4.3.2 Mutace posilující kryptická místa sestřihu.....	16
4.3.3 Mutace poškozující regulační elementy sestřihu.....	17
4.3.4 Mutace tvořící de novo místa sestřihu.....	18
Kapitola 5: Metodika.....	20
5.1 Klonování.....	20
5.1.1 Polymerázová řetězová reakce inzertu.....	20
5.1.2 Štěpení restričními endonukleázami.....	21
5.1.3 Ligace.....	22
5.1.4 Transformace.....	22
5.1.5 Colony PCR.....	23
5.2 Mutageneze.....	23
5.2.1 PCR mutageneze.....	23
5.3 Sestřihová minigenová analýza.....	24
5.3.1 Transfekce.....	24
5.3.2 Izolace RNA.....	25
5.3.3 Reverzní transkripce (RT).....	25
5.3.4 PCR (Polymerázová řetězová reakce).....	26
5.3.5 Elektroforéza.....	26
5.4 Sekvence amplikonů.....	27
Kapitola 6: Výsledky.....	28
6.1 Výchozí stav.....	28
6.2 Mutageneze a sestřihová analýza.....	29
6.3 Výsledek 1. sestřihové analýzy.....	30

---

6.5 Klonování.....	31
6.7 Východisko a výsledky.....	32
Závěr a diskuze.....	34
Seznam použité literatury.....	36



## Úvod

Bezchybný průběh sestřihu pre-mRNA je velmi podstatný pro správné fungování živého organismu. Jedná se o jednu z posttranskripčních úprav, v průběhu které dochází k vystřížení nekódujících oblastí genů (intronů) a následnému spojení kódujících oblastí (exonů). Genové mutace, které nějakým způsobem sestřih naruší, mohou vést ke vzniku dědičných onemocnění.

Jednou z dědičných nemocí zapříčiněnou právě genovými mutacemi je i Wiskott-Aldrich Syndrom, jehož jednou konkrétní mutací se ve své práci zabývám. Cílem mé práce byla analýza vlivu této mutace na sestřih pre-mRNA.

V první kapitole je krátce představen obor, do kterého zkoumání genů a jejich sestřihu spadá. Druhá kapitola je zaměřená na Wiskott-Aldrich Syndrom, jeho základní projevy a příčiny. Ve třetí kapitole se pak věnuji genové expresi a v navazující kapitole je popsán již samotný sestřih a jeho možné aberace. V druhé polovině práce jsou shrnuty použité experimentální metody. Na samém konci práce jsou uvedeny výsledky experimentu a krátké shrnutí celého pokusu v závěru.

## Kapitola 1: Genetika

Genetika je věda, která se zabývá dědičností a proměnlivostí živých soustav. Sleduje rozdílnost a přenos dědičných znaků mezi rodiči a potomky a mezi potomky navzájem. [1, 2]

### 1.1 Historie genetiky

Za zakladatele tohoto vědního oboru je považován augustiniánský mnich z brněnského kláštera Johann Gregor Mendel (1822 – 1884). Zabýval se hybridizačními pokusy na rostlinách. Pro své pokusy si vybral hrách, u kterého během křížení pozoroval 7 dědičných znaků. Těmito pokusy dal vzniknout základům klasické genetiky. Ve své době se však neseťkal s příliš velkým ohlasem a tak byla jeho práce na určitou dobu zcela zapomenuta.

Ke znovuobjevení jeho výsledků došlo až na začátku 20. století, kdy byla znovu prokázána Mendelova zjištění jako pravdivá. V souvislosti s tímto znovuobjevením se v literatuře setkáme převážně se jmény Hugo de Vriese, Erich Tschermak von Seysenegg a Carl Correns. [3]

## Kapitola 2: Wiskott-Aldrich Syndrom

Wiskott-Aldrich Syndrom (WAS) se řadí mezi jednu z chorob, způsobující primární imunodeficienci<sup>1</sup> (PID = *primary immunodeficiency disease*). Imunodeficienci je stav, kdy imunitní systém nefunguje zcela správně. Wiskott-Aldrich Syndrom je definován jako vzácná dědičná nemoc způsobená mutacemi v genu WASP. Protože se tento gen nachází na chromozomu X, je toto onemocnění vázané na pohlaví s výskytem převážně u chlapců. [4]

V současné době se řadí již mezi „dobře definované poruchy imunity“. Od ostatních poruch, řadících se do této kategorie se liší, a proto můžeme říct, že se jedná o zcela jedinečnou poruchu funkce imunitního systému.

### 2.1 Historie

První záznamy o této chorobě pochází z roku 1937, kdy německý pediatr Alfred Wiskott popsal případ tří bratrů, u kterých se krátce po narození objevily problémy s ekzémem, řídkou stolicí s obsahem krve, opakujícími se ušními infekcemi a trombocytopenií<sup>2</sup>. Všichni chlapci zemřeli ještě před dovršením dvou let na střevní krvácení a sepsi. U jejich čtyř sester se přitom nevyskytovaly žádné příznaky této choroby. [4,5,6]

O sedmnáct let později, v roce 1954, popsal R. A. Aldrich šest generací jedné rodiny, kde zemřelo na podobné příznaky (jako u Wiskottova případu) 16/40 mužů, žena žádná. Příznaky u různých pacientů byly však odlišné a různorodé, takže nebylo zcela jednoduché zjistit příčinu této nemoci. [4]

---

1 PID – vrozené dysfunkce imunitního systému

2 Trombocytopenie – snížené množství trombocytů (krevních destiček); důsledkem jsou různá podkožní krvácení

## 2.2 Gen WASP

Gen WASP byl v roce 1994 identifikován jako gen zodpovědný za WAS. Jedná se o gen, který je složený z 12ti exonů celkově čítajících 1823 bp, které kódují 502 aminokyselin. Výsledný protein je důležitý pro funkci hematopoetických<sup>3</sup> buněk. Gen se nachází na X chromozomu, což je příčina projevu onemocnění převážně u chlapců. [4]

## 2.3 Mutace WASP genu

V genu WASP bylo doposud zaznamenáno na 300 různých mutací. Mutace se vyskytují na různých místech v celém genu, nejčastěji však v prvních čtyřech exonech nebo v 7. a nebo 10. exonu. Jednotlivé mutace mohou mít své specifické projevy, ve většině případů se však jako jedny z prvních projevů vůbec objevují ekzémy. [6]

## 2.4 Příznaky

Ekzém, jeden z prvních projevů WAS (viz výše), který se vyskytuje až u 80% pacientů, se objevuje velmi brzy po narození. Ekzém se liší podle závažnosti poruchy genu. Někdy se dá alespoň částečně léčit jako běžné ekzémy.

Dále pak abnormální chování imunitního systému (poruchy imunitního systému) – chování B i T lymfocytů je změněné<sup>4</sup>. Vyskytuje se u 40-70% pacientů. Většinou se objevují ještě před dovršením druhého roku života. Postižení jedinci mají zpočátku obvykle normální počet lymfocytů, později se však objevuje lymfopenie<sup>5</sup> a dochází ke ztrátě T-lymfocytů. V těle se tak nevyskytuje dostatečné množství protilátek pro některé z antigenů. U 10-20% pacientů se objevila i maligní onemocnění jako leukémie a lymfom<sup>6</sup>.

---

3 Buňky, ze kterých v procesu krvetvorby vznikají krevní destičky a červené i bílé krvinky

4 Lymfocyty – bílé krvinky řadí se do skupiny imunitních buněk

5 Lymfopenie – snížený počet lymfocytů v krvi; snižuje se odolnost proti infekčním nemocím

6 Leukémie a lymfom – nádorová onemocnění

Mezi nejčastěji se vyskytující komplikace patří také hemolytická anémie<sup>7</sup>, neutropenie<sup>8</sup> a trombocytopenie. Může se objevit také například artritida<sup>9</sup> nebo nefritida<sup>10</sup>.

Pacienti trpící WAS se ukázali jako velmi náchylní k velkému spektru patogenů<sup>11</sup>. Mezi nejčastěji se vyskytující se řadí herpes viry a bakterie – pneumokoky. [4,5,6]

## 2.5 Zhu a kol. - mutace c.1001\_1002insT

Ve své práci se zabývám jednou konkrétní mutací genu WASP, popsanou v článku od Zhu a kol. (r. 1997). Pojmenování mutace vychází z transkriptu: ESTN00000376701. Jedná se o mutaci v exonu 10. V místě c.1001\_1002 se nachází inserce jedné báze T. Tato mutace pravděpodobně poškozuje regulační elementy sestřihu, protože jejím důsledkem je vznik aberantně (tedy chybně) sestřižené mRNA. Tato inserce T však byla detekována pouze u 25% všech transkriptů mRNA daného pacienta. U 50% transkriptů došlo k využití kryptického místa sestřihu, což způsobilo delecí prvních 52 aminokyselin exonu 10. Posledních 25% transkriptů exon 10 vystřihlo celý. [4]

---

7 Hemolytická anémie – souhrn nemocí, které způsobují zvýšenou hemolýzu (rozpad červených krvinek)

8 Neutropenie – nedostatek jednoho druhu bílých krvinek (neutrofilů)

9 Artritida – zánětlivé onemocnění kloubů

10 Nefritida – zánět ledvin

11 Patogeny – biologický faktor způsobující onemocnění hostitele

## Kapitola 3: Genová exprese

U všech živých organismů jsou funkce buněk určeny zejména pomocí molekul bílkovin. Různé typy bílkovin rozlišují různé typy buněk. Samotné bílkoviny, neboli proteiny, jsou určeny tzv. strukturálními geny, jejichž sekvence DNA kóduje pořadí konkrétních aminokyselin v proteinu.

Genová exprese je proces, kterým je genetická informace měněna na konkrétní funkční buněčné struktury. Proces je složitý a probíhá na více úrovních. Zahrnuje transkripci DNA, posttranskripční úpravy pre-mRNA<sup>12</sup>, transport transkriptu z jádra do cytoplazmy a v případě strukturálních genů také translaci mRNA do struktury proteinů.

Tento proces samozřejmě není a nemůže být bezchybný. Na všech úrovních může být ovlivňován mutacemi genů. Mutace v kódujících oblastech (oblasti obsahující informace o konkrétních sekvencích aminokyselin), ale i nekódujících regulačních oblastech genu mohou vést k dědičným chorobám. Jelikož se ve své práci zabývám převážně sestřihem, budu se nadále věnovat právě jemu. Sestřih je jedna z nejdůležitějších částí posttranskripčních úprav primárních transkriptů a je důležité, aby probíhal rychle a bezchybně, jelikož jen nepatrná chyba může vést k posunu čtecího rámce a vzniku nějakého závažného onemocnění.

---

<sup>12</sup> pre-mRNA – jeden z produktů vznikající transkripcí, který následně podléhá posttranskripčním úpravám

## Kapitola 4: Sestřih

Během transkripce strukturních genů dochází k přepisu genetické informace do primárního transkriptu, který je složen z exonů a intronů a tvoří pre-mRNA. Exony jsou části genu, které nesou genetickou informaci o primární struktuře bílkovin. Naopak introny jsou oblasti pre-mRNA, které tuto genetickou informaci nenesou, nadále se nepřekládají do proteinu a v procesu sestřihu jsou z primárního transkriptu vystřiženy [7].

### 4.1 Sestřih RNA

Jedná se o vystřižení intronů a následné spojení kódujících oblastí, tedy exonů. Pro to, aby sestřih vůbec započal, je nutné, aby měl intron konkrétní sekvenci, kvůli rozlišení intronů a exonů sestřihovým aparátem. Jedná se o tzv. pravidlo GU-AG, které říká, že „na 5' konci intronu v RNA se nachází dinukleotid GU a na 3' konci dinukleotid AG.“ [7] Podle toho se pak nazývají místa sestřihu – spojení mezi 3'- koncem exonu a 5'- koncem intronu se nazývá 5' místo sestřihu (také donorové) a spojení mezi 5'- koncem exonu a 3'- koncem intronu se nazývá 3' místo sestřihu (také akceptorové). Každé z těchto míst je charakteristické určitou sekvencí (delší než pouhými dinukleotidy), kterou jsou schopny rozpoznat tzv. částice U1 pro 5'- místo sestřihu a U5 pro 3'- místo sestřihu. [8]

Dále se v intronech a exonech nacházejí sekvence, které zesilují nebo naopak zeslabují sestřih v přilehlých místech sestřihu, pomocí regulačních proteinů, které se na ně vážou. Obecně se nazývají regulační elementy sestřihu. Rozlišujeme tyto typy: ESE (*exonic splicing enhancers* = exonové zesilovače), ESS (*exonic splicing silencers* = exonové zeslabovače), a ISE (*intronic splicing enhancers* = intronové zesilovače) a ISS (*intronic splicing silencers* = intronové zeslabovače), které se nacházejí v intronech. [9] Důležité je, že některé mutace těchto sekvencí mohou způsobovat vznik patogenních mutací. Zesilovače i zeslabovače se uplatňují jak při normálním, tak při alternativním sestřihu. Ve většině

případů mají shodnou sekvenci. [8]

## 4.2 Alternativní sestřih

Alternativní sestřih znamená, že z jedné molekuly RNA vznikají různé izoformy proteinu. Děje se tomu tak, že se do RNA začleňují jen některé exony z celkového počtu exonů, které obsahují konkrétní gen. Proto nutně neznamená, že jeden gen kóduje pouze jeden protein, ale může kódovat hned několik jeho izoform [10].

## 4.3 Mutace ovlivňující sestřih

### 4.3.1 Mutace poškozující místa sestřihu

Nejčastěji vznikají v dinukleotidech GU na 5' místě sestřihu nebo v dinukleotidech AG na 3' místě sestřihu. Není však výjimkou, že se mutace objevují i v sekvencích, které tyto dinukleotidy obklopují. Často způsobují, že jsou místa sestřihu vynechána (nejsou rozpoznána sestřihovým aparátem), a tak dochází k úplnému vynechání exonu. Další variantou, ke které tyto mutace vedou, je retence intronu<sup>13</sup>, mRNA je sestřižena tak, že v ní zůstává intron. V neposlední řadě může také dojít k aktivaci tzv. kryptických míst sestřihu.

Kryptická místa sestřihu jsou místa sestřihu, která nejsou za normálních okolností sestřihovým aparátem využívána. Když však dojde k oslabení původního místa sestřihu mutací, může dojít k tomu, že se stane kryptické místo silnější a pak je využíváno při sestřihu místo původního [11].

### 4.3.2 Mutace posilující kryptická místa sestřihu

Mutace může způsobit silnější kontext kryptického místa sestřihu v mRNA, než jaký má původní místo sestřihu. V takovém případě je velká pravděpodobnost, že se v průběhu

---

<sup>13</sup> Retence intronu neboli začlenění intronu. Během sestřihu se nevystřihnou kvůli mutaci některé sekvence intronů a zařadí se tak mezi exony.



sestřihu využije právě kryptické místo. [11]



Obrázek 1: Obrázek znázorňuje mutace kvůli kterým se využívá kryptické místo sestřihu. (A) Sekvence, ve které se mutace nevyskytuje a pro sestřih se využívá normální místo sestřihu. (B) Mutace v místě sestřihu. Dochází k částečné retenci intronu a tedy ke vzniku aberantního (chybného) exonu. (C) Mutace posilující kryptické místo, důsledek stejný jako v předchozím případě. (Zdroj: vlastní)

#### 4.3.3 Mutace poškozující regulační elementy sestřihu

Mutacemi v sestřihových regulačních elementech může dojít k narušení jejich interakce s proteiny, které se na ně vážou, případně i k posílení této interakce nebo ke vzniku interakce s jiným, v tomto kontextu nepatřičným regulačním proteinem. Všechny tyto změny mohou mít výrazný dopad na regulaci sestřihu. Mezi následky těchto mutací patří vynechání exonu, retence intronu, aktivace kryptických míst sestřihu či retence pseudo<sup>14</sup> exonu v mRNA.

<sup>14</sup> Pseudoexon je aberantní exon, jež vzniká po genové mutaci z vnitřní části původně intronové sekvence.

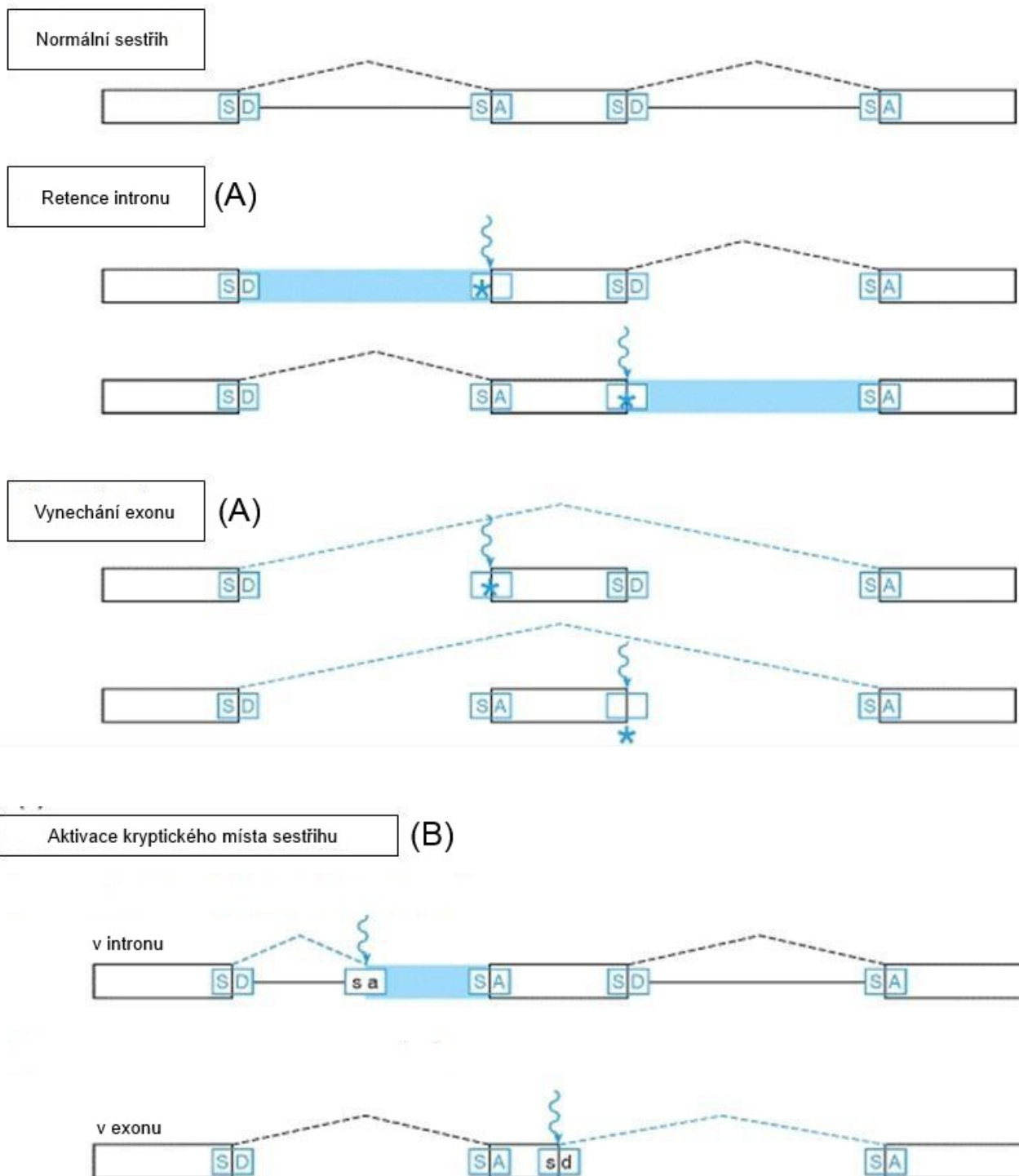
#### 4.3.4 Mutace tvořící *de novo* místa sestřihu

*De novo* místa sestřihu vzniknou mutací v intronu nebo v exonu genu. Jedná se o nově vzniklá místa se sekvencí napodobující autentická místa sestřihu, a proto mezi nimi dojde ke kompetici o využití sestřihovým aparátem [11].



Obrázek 2: (A) Normální sekvence. (B, C) Mutace způsobující záměnu báze C za G/ T za A → *de novo* místo sestřihu. (Zdroj: vlastní)

V některých případech je možné, že se objeví i více efektů zároveň.



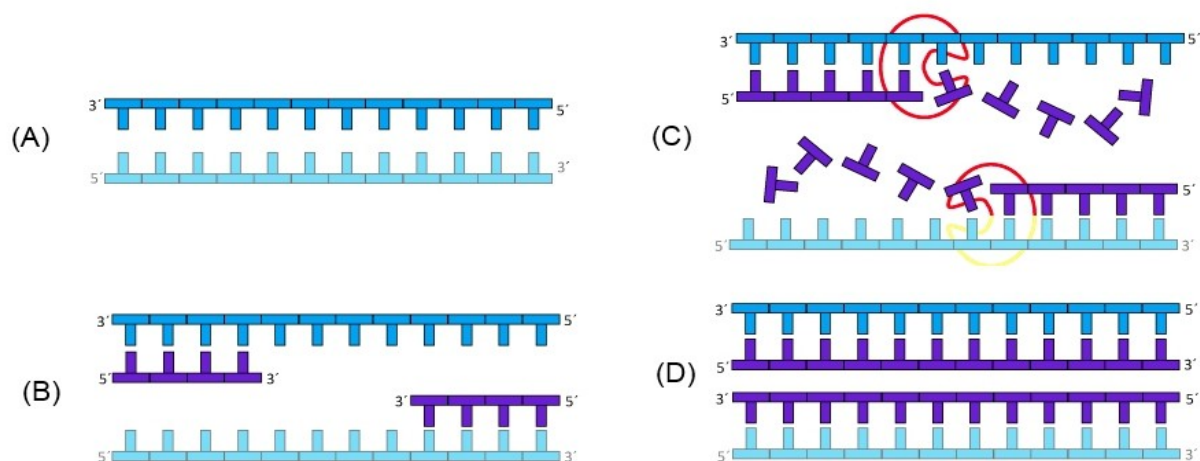
Obrázek 3: Důsledky sestřihových mutací; Na prvním obrázku je znázorněn správný sestřih pre-mRNA probíhající bez mutace; (A) Mutace v místech sestřihu způsobují retenci intronu neboli zachování intronových sekvencí, nebo vynechání exonu; (B) Sekvence podobné sestřihovým místům (potenciální kryptická místa sestřihu) se mohou nacházet v intronech i exonech a v důsledku mutace mohou být využity během sestřihu namísto původních. (Zdroj: Strachan a Read, 1999; upravené)

## Kapitola 5: Metodika

### 5.1 Klonování

#### 5.1.1 Polymerázová řetězová reakce inzertu

Polymerázová řetězová reakce, neboli PCR (z anglického *polymerase chain reaction*) je enzymatická amplifikace DNA. Je založena na principu replikace nukleových kyselin. Jedná se o *in vitro* syntézu mnoha kopií námi zvolené sekvence DNA (vymezené pomocí primerů<sup>15</sup>) v reakci s cyklickým střídáním teplot. Celá reakce je katalyzována DNA polymerázou. [12]



Obrázek 4: Na obrázku je znázorněn proces PCR. (A) Nejdříve proběhne za teploty přibližně 95°C denaturace DNA – přeruší se vodíkové vazby a vlákna se od sebe oddělí. (B) Při nižší teplotě (obvykle mezi 50 a 72 °C) nasednou primery na komplementární báze, aby ohraničily požadovanou sekvenci pro replikaci. (C) Následně DNA polymeráza započne při teplotě 72 °C replikaci a naváže na každé vlákno volné komplementární nukleotidy . Vzniknou tak dvě molekuly DNA z každého komplementárního vlákna. (D) Proces se opakuje v několika cyklech (v našem případě mezi 36 a 40), abychom získali dostatečné množství DNA. (Zdroj: [openwetware.org](http://openwetware.org), upravené) (Zdroj: [http://openwetware.org/images/5/52/BME103\\_Group9\\_Taq\\_Polymerase.gif](http://openwetware.org/images/5/52/BME103_Group9_Taq_Polymerase.gif))

<sup>15</sup> Primer – jedná se o krátký řetězec nukleových kyselin, dlouhý několik bází a slouží jako počátek pro replikaci DNA či RNA

<i>Chemikálie</i>	<i>Množství do jedné reakce</i>
Sterilní voda (H <sub>2</sub> O)	8,8 µl
Pufr pro polymerázu Platinum Pfx	1,25 µl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	0,5 µl
dNTP	0,375 µl
Specifické primery	á 0,5 µl
DNA	0,5 µl
Platinum Pfx polymeráza (Life Technologies)	0,1 µl

*Příklad rozpisu jedné PCR z našeho pokusu.*

### 5.1.2 Štěpení restričními endonukleázami

Restriční endonukleázy jsou enzymy, které jsou schopny štěpit DNA dvoušroubovici ve specifických sekvencích. Pro klonování inzertu do vektoru bylo nutné provést štěpení obou těchto DNA. Bylo nutné štěpit, abychom získali potřebné přesahující jednořetězcové konce DNA umožňující snadnou ligaci.

<i>Chemikálie</i>	<i>Štěpení plazmidu (pET)</i>	<i>Štěpení inzertu (WAS e. 8-11)</i>
Voda (H <sub>2</sub> O)	1,5µl	2,5µl
Pufr BamHI	2,5µl	6,5µl
DNA	4 ng	2,5 ng
Enzym BamHI (Thermo Scientific)	1µl (10 U)	1µl (10 U)
Enzym Sall (Thermo Scientific)	2µl	2µl

*Příklad rozpisu pro štěpící reakci.*

### 5.1.3 Ligace

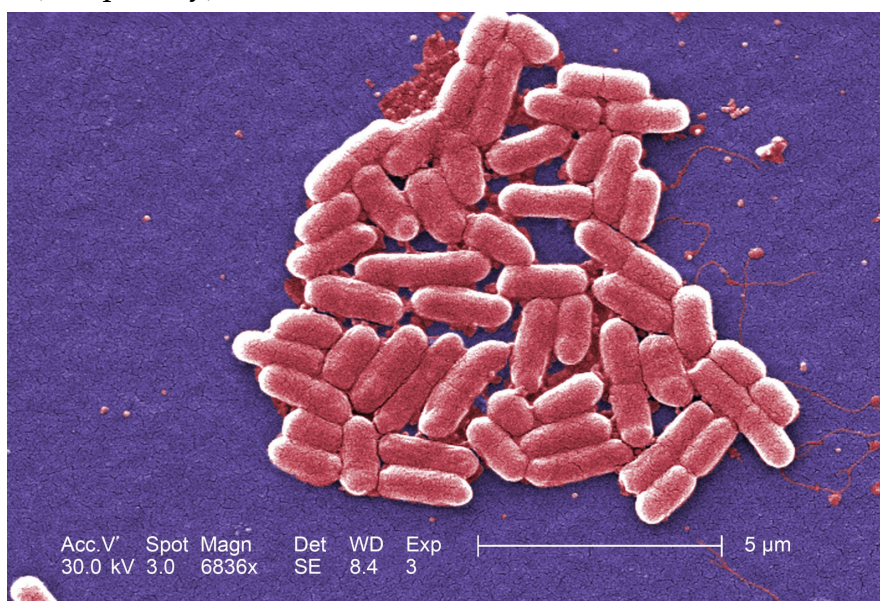
Při této metodě se využívá DNA ligáza, která slouží ke spojení DNA. Pro jednodušší ligaci je lepší vytvořit si štěpením přesahy jednovláknové DNA. Přesahy musí obsahovat komplementární báze, aby bylo možné je propojit. Propojovali jsme štěpené plazmidy pET a pZW4 s inzerty WAS e.10/e.8-11.

<i>Chemikálie</i>	<i>Množství do jedné reakce</i>
Pufř (10x ředěný pro T4 DNA ligázu)	1,5μl
T4 DNA ligáza (New England Biolabs)	0,3μl (600 U)
DNA	0,66μl pET + 1,98μl inzertuWAS
Voda (H <sub>2</sub> O)	12,56μl

*Příklad rozpisu ligační reakce (WAS e. 8-11 do pET).*

### 5.1.4 Transformace

Jedná se o přenos určitého genetického materiálu do bakteriálních buněk [13]. V našem případě šlo o přenos minigenu do kompetentních bakteriálních buněk E.coli GTX10B. Transformaci jsem prováděla podle transformačního protokolu, který připravila Mgr. Lucie Grodecká (viz. přílohy).



Obrázek 5: Bakterie E.coli (Zdroj: <http://media-3.web.britannica.com/eb-medial/87/141087-050-24850517.jpg>)

### 5.1.5 Colony PCR

Colony PCR je založena na stejném principu jako klasická PCR (viz str. 20). Slouží k detekci kolonií bakterií, které obsahují plazmid s inzertem patřičné délky. Rozdílným prvkem je, že se do reakce přidává přímo bakteriální kultura odebraná z kolonií *E.coli* po transformaci.

<i>Chemikálie</i>	<i>Množství do jedné reakce</i>
Voda (H <sub>2</sub> O)	6,7μl
Pufr (Dream Taq)	1μl
MgCl <sub>2</sub>	0,4μl
dNTP	0,2μl
Primer 1A (RT-GFP)	0,5μl
Primer 1B (RT-GFP)	0,5μl
Drem Taq polymeráza (Thermo Scientific)	0,2μl
Bakteriální kultura	cca 0,5μl (odebrat z kolonie)

*Příklad rozpisu reakce pro colony PCR (WAS e. 8-11 v plazmidu pZW4 → minigen transfekován do E.coli).*

## 5.2 Mutageneze

### 5.2.1 PCR mutageneze

Jedná se o reakci umožňující přípravu cílených mutací v plazmidech. Tato PCR reakce je specifická tím, že v ní používáme ne zcela komplementární primery nasedající na totéž místo v DNA a nesoucí námi zvolenou mutaci (viz. str. 20). V našem případě se jedná o primery s inzercí jedné báze T, která se během PCR začlení do minigenu. Mutagenezí

získáme mutaci (c.1001\_1002insT) popsanou v článku od Zhu a kol. (r. 1997), která by mohla způsobit odlišné chování transkriptu minigenu WASP při sestřihu.

<i>Chemikálie</i>	<i>Množství do jedné reakce</i>
Voda (H <sub>2</sub> O)	6,78μl
Pufr pfx	1,25μl
MgSO <sub>4</sub> (5 mM)	3μl
dNTP	0,375μl
Primery (WAS_e.10 – SA3A/SA3B)	á 0,5μl
DNA (minigen)	0,5μl
Pfx polymeráza (Life Technologies)	0,1μl

*Rozpis reakce mutagenese inserce báze T do minigenu WAS ex. 8-11 v plazmidu pET*

## 5.3 Sestřihová minigenová analýza

### 5.3.1 Transfekce

Jedná se o proces přenosu konkrétního genetického materiálu do eukaryotických buněk [14]. Tato metoda přenosu byla poprvé popsána Grahamem a Van der Ebem. Transfekci můžeme rozdělit na dva typy podle transfekovaného systému – *in vivo* a *in vitro*.

*In vivo* transfekce je přenos genetické informace do živého organismu za účelem např. terapeutického účinku.

*In vitro* transfekce je proces, při kterém je genetický materiál vpraven do buněk buněčné kultury.

Při mých pokusech byla využívána právě *in vitro* transfekce. Do více druhů nádorových



linií jsem postupně transfekovala vytvořený minigen, který obsahoval část genu WASP naklonovaného do vektoru pET01 nebo pZW4 (od společnosti Mobitec). Buňky byly transfekovány v 1 ml média RPMI 1640 (Sigma) a s 10 % fetálního telecího séra (Zooservis).

<i>Chemikálie</i>	<i>Množství do 1 jamky destičky</i>
Minigenová DNA	400 ng
Xtreme Gene 9	1,2μl
Medium RPMI	50μl

*Rozpis reakce pro jednu jamku destičky při transfekci do buněk HeLa.*

### 5.3.2 Izolace RNA

Izolace proběhla po 24 hodinové kultivaci transfekovaných buněk v kultivačním boxu, který vytváří příznivé podmínky pro kultivaci buněčných linií (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Pro izolaci RNA jsem používala kit „Rneasy Plus Mini Kit“ od firmy Qiagen a postupovala jsem přesně podle jejich návodu.

### 5.3.3 Reverzní transkripce (RT)

Jedná se o enzymatickou reakci, při které dochází k přepisu molekuly RNA na DNA. Celá reakce je katalyzována enzymem, který se nazývá *reverzní transkriptáza* [15]. Při RT vzniká malé množství jednořetězcové DNA. Ve svých experimentech jsem používala kit L-Glutamine–Penicillin–Streptomycin solution od firmy Roche.

<i>Chemikálie</i>	<i>Množství pro jednu reakci</i>
RNA	5,5 $\mu$ l
Hexanukleotidy (primery)	1 $\mu$ l
→ inkubace 10 minut při 65°C a následně při -80°C → přidáme:	
pufr	2 $\mu$ l
dNTP	1 $\mu$ l
Reverzní transkriptáza	0,25 $\mu$ l
protektor	0,25 $\mu$ l

*Rozpis reakce pro RT.*

### 5.3.4 PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Pro amplifikaci DNA po RT jsme použili opět PCR (viz. str. 20)

### 5.3.5 Elektroforéza

Je to separační elektromigrační metoda založená na rozdílné pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli [16]. DNA (či RNA) jakožto polyaniont má v pufru s neutrálním pH záporný náboj, a proto se pohybuje ke kladnému pólu (anodě). V porézním prostředí agarózového gelu se nejmenší molekuly pohybují nejrychleji, zatímco ty větší mají pohyblivost nižší. Tím dochází k rozdělení molekul nukleových kyselin dle jejich velikost.

Pro elektroforézu RNA/DNA jsem použila 1-1,5% (pro RNA) a 2% (pro DNA) agarózový gel. Do jedné jamky jsem napipetovala hmotnostní standart od firmy Thermo Scientific a do dalších RNA/DNA (mutant i divoký typ). Gel jsem ponořila do pufru TBE (tris-boratový pufr). Elektroforézu jsem nechala probíhat při napětí 100-120 V přibližně 30

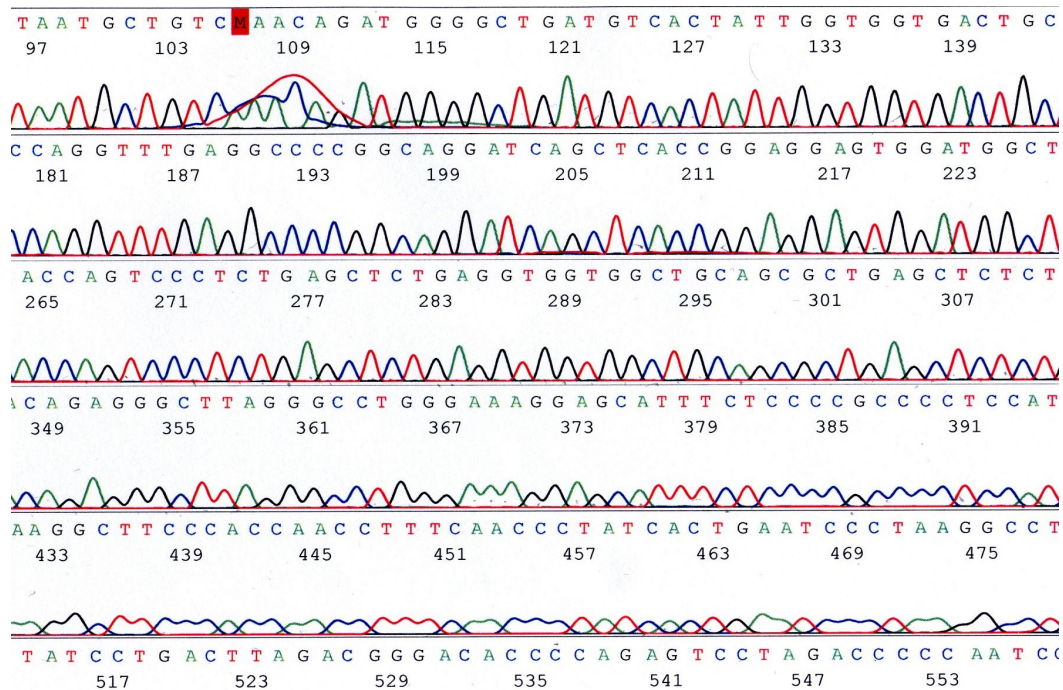
minut. Poté jsem výsledky zkontrolovala a zaznamenala pod UV světlem.

## 5.4 Sekvence amplikonů

Sekvenování DNA je metoda pro stanovení sekvence DNA [17]. V našem případě jsme využili Sangerovo sekvenování s pomocí fluorescenčně značených dideoxynukleotidů.

Sekvence genů má mnoho využití jako je nalezení genů, určitých segmentů genů, mutací, ... [17] V našem případě byla využita pro kontrolu připraveného minigenu a pro identifikaci amplikonů po minigenové sestřihové analýze. Díky sekvenaci jsme zjistili zda se nám exon 10 začlenil či nezačlenil do minigenové mRNA.

K sekvenování byl použit přístroj od firmy Life Technologies (dříve Applied Biosystems) a sekvenační kit stejné značky.



Obrázek 6: Ukázka sekvence z analyzátoru. (Zdroj: vlastní)

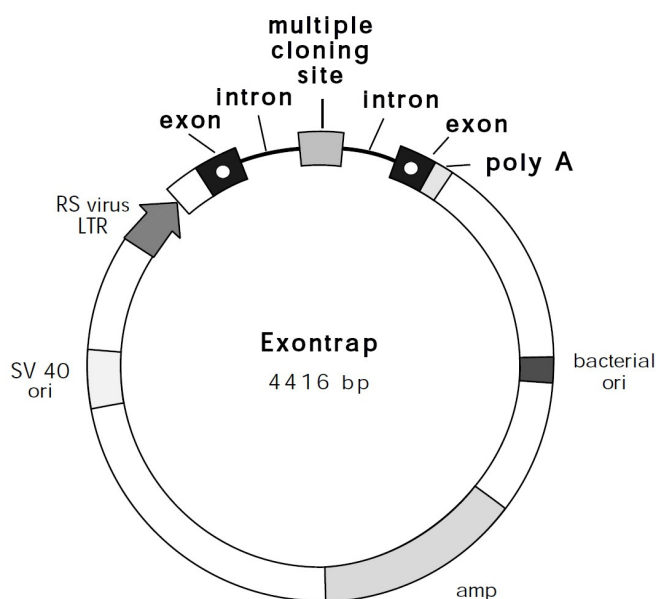
## Kapitola 6: Výsledky

### 6.1 Výchozí stav

Mutace c.1001\_1002insT (v publikaci od Zhu a kol. (r. 1997) nalezena u pacienta označeného jako „JVT“), kterou jsme si pro náš pokus vybrali, se nachází v exonu 10. Jedná se o inserci jedné báze T, která pravděpodobně narušuje regulační elementy sestříhu a způsobuje tak poruchu sestříhu. Konkrétně autoři detekovali pomocí klonování ampliconů po RT-PCR částečné vystřížení exonu 10 u 25% klonů. Z publikace ovšem jasně nevyplývá, zda bylo provedeno obdobné klonování i u zdravých kontrol a zda tedy minimálně některý z výše uvedených transkriptů nalezených u pacienta JVT (zejména vynechání exonu 10) není možné detekovat i u zdravých osob. Minimálně u transkriptu využívajícího kryptického akceptorového místa sestříhu v exonu 10 je však velmi pravděpodobné, že se jedná o variantu specifickou pro tuto mutaci. V publikaci totiž autoři prováděli analýzu proteinu WASP u tohoto pacienta stejně jako u dalších pacientů a zdravých kontrol. Z výsledků jasně vyplývá, že zkrácená forma proteinu detekovaná u pacienta JVT (a vzniklá pravděpodobně jako následek užití výše zmíněného kryptického místa sestříhu) je jedinečná a u žádného dalšího z analyzovaných vzorků se neobjevuje. V článku se však autoři dále nezabývají způsobem, jakým k poruše sestříhu u daného pacienta došlo, a proto jsme se rozhodli ověřit vliv JVT mutace na sestřih exonu 10 v minigenu a identifikovat tak konkrétní porušené regulační elementy sestříhu.

Podle naší predikce (programem Sroogle) by měl v místě inserce T vznikat nový zesilovač sestříhu, na nějž se váže protein SC35.

Měli jsme připravený plazmid pET čítající 2 exony, do kterého byl naklonován exon 10 genu WASP (pozn. naklonováno dříve v laboratoři). Takto připravený minigen jsme použili pro další fáze pokusu.



Obrázek 7: Na obrázku je znázorněn plazmid pET obsahující 2 exony a 2 introny. Do klonovacího místa (multiple cloning site), které se nachází uvnitř intronu mezi dvěma exony, jsme vkládali exon 10 (popř. exony 8-11) genu WASP s jemu přilehlými intronovými sekvencemi. (Zdroj: Exontrap - Product Information and Instructions, 2002)

## 6.2 Mutageneze a sestřihová analýza

Mutagenezí jsme do minigenu divokého typu vložili inzerci báze T a vytvořili si tak mutantní minigen. Správné začlenění inzerce jsme ověřili sekvenací celého inzertu. Poté byla provedena kompletní sestřihová analýza<sup>16</sup>. V prvním kroku byl minigen transfekován do nádorových linií buněk HeLa a následně byla izolována z buněk RNA, která byla použita pro RT. Získaná DNA byla amplifikována pomocí PCR a výsledky byly zkontrolovány gelovou elektroforézou. Celá sestřihová analýza byla provedena jak s variantou divokého typu, tak s variantou mutantní.

První transfekce do buněk HeLa<sup>17</sup>, které jsou velmi dobře popsány a provádí se na nich celosvětově obrovské množství experimentů nevyjímaje analýzy sestřihu, nebyla úspěšná. Měli jsme podezření, že buňky HeLa nejsou pro WAS zcela vhodné a proto jsme se

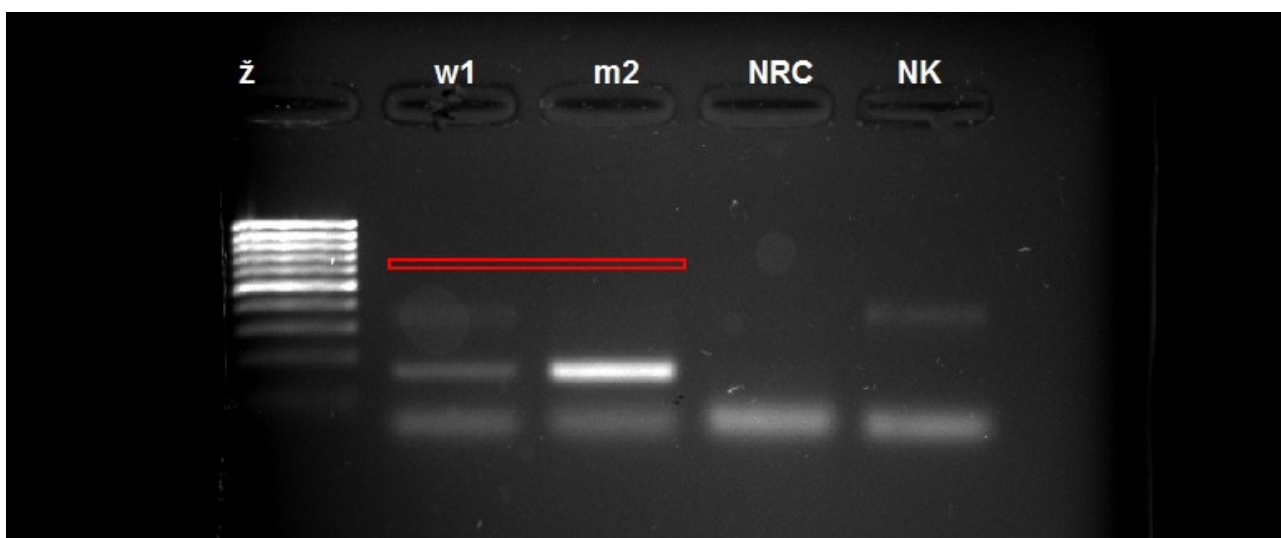
<sup>16</sup> Sestřihová analýza – proces skládající se z transfekce, izolace RNA a RT + PCR

<sup>17</sup> Jedná se o linii odvozenou z karcinomu děložního čípku

rozhodli vyzkoušet jiné, pro minigen příhodnější buňky. Jednalo se opět o nádorovou linii, tentokrát však buněk monocytárního původu, označovanou jako U-937.

### 6.3 Výsledek 1. sestřihové analýzy

Exon 10, který se měl podle očekávání v mutantní variantě částečně vynechat se bohužel vůbec nezačlenil do minigenové mRNA a byl vystřížen celý. A to ani v mutantní variantě, ani ve variantě divokého typu. Nezačlenil se ani při transfekci do buněk linie HeLa ani do buněk linie U-937.

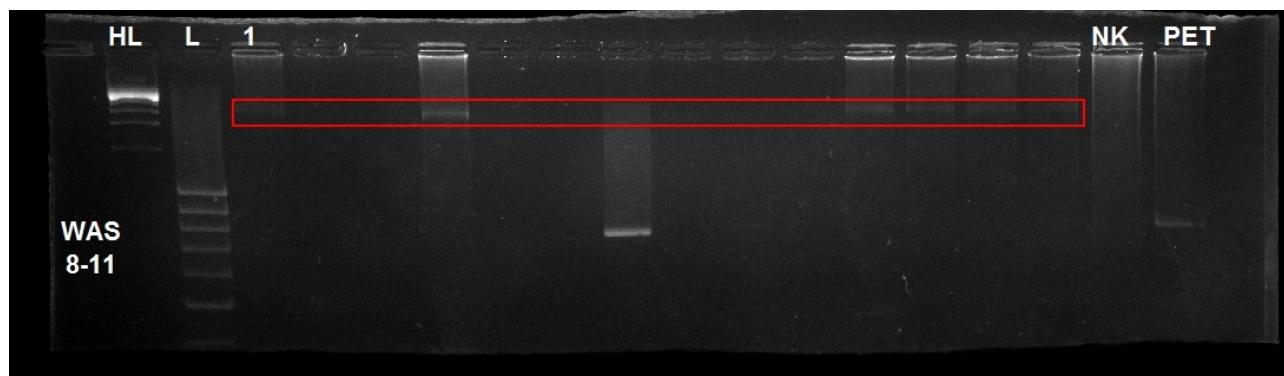


Obrázek 8: Tento snímek gelu po elektroforéze nám ukazuje výsledky po RT exonu 10 v plazmidu pET. Jak můžeme vidět, varianta divokého typu (w1) je totožná s mutantní variantou (m2) a v délce, kde by se měla nacházet celá minigenová mRNA i se začleněným exonem 10 (u wt – červený rámeček), nevidíme nic. (Zdroj: vladtni)

Jedním z dalších možných důvodů pro úplné vyčleňování exonu 10 může být omezený genomický kontext. Je možné, že sestřih v exonu 10 je ovlivňován regulačními elementy z okolních exonů v genu WASP podobně, jak bylo popsáno například u sestřihu exonu 37 NF1 [8]. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli genomický kontext pro další pokus rozšířit a proto jsme do minigenu přidali další tři exony genu WASP – exon 8,9 a 11.

## 6.5 Klonování

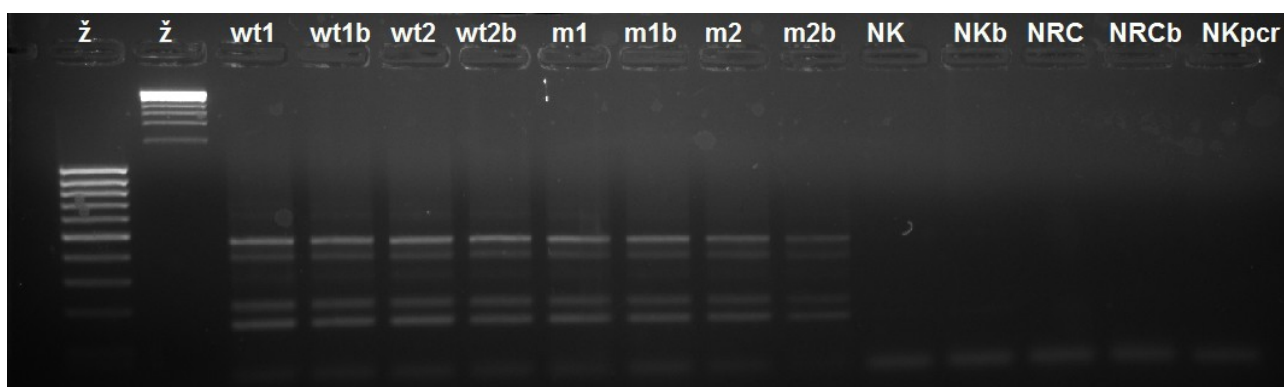
Pro nový pokus bylo nutno připravit si minigen obsahující kromě exonu 10 také exony 8,9 a 11 s přilehlými intronovými oblastmi, které musely čítat nejméně 150 bp.



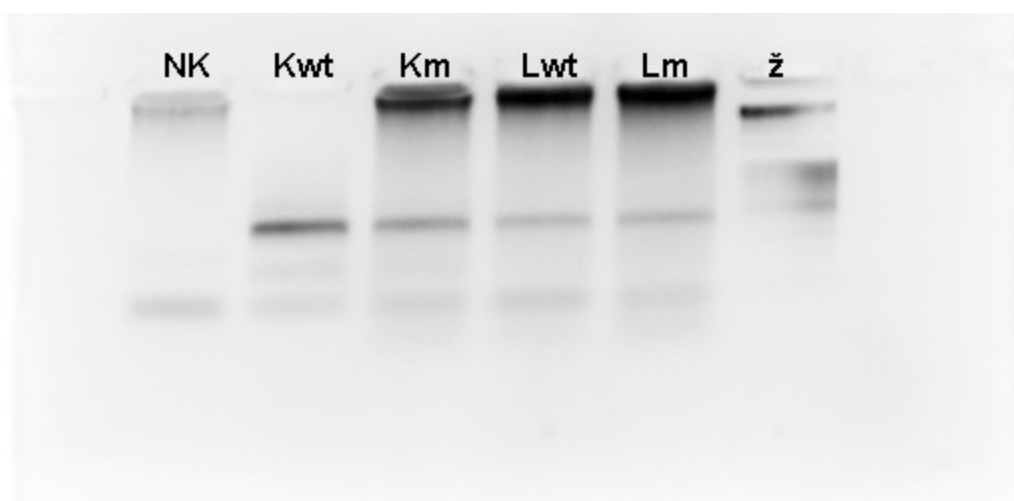
Obrázek 9: Fotka zobrazuje výsledky cPCR provedené pro kontrolu ligace (tedy začlenění našeho inzertu do plazmidu). (Zdroj: vlastní)

Po klonování a ověření sekvence inzertu sekvenací byla opět provedena mutagenese, kterou jsem si vytvořili mutantní minigen (s požadovanou inzercí báze T) a jako při prvním pokusu následovala sestřihová analýza. Pro transfekci byly tentokrát využity 3 různé nádorové linie buněk a to: HeLa, U-937 a EBV. EBV linie je podobně jako linie U-937 odvozena z buněk imunitního systému, konkrétně z B-lymfocytů. Proto by pro sestřih genu WAS měla nabízet příhodnější podmínky než všeobecně používaná linie HeLa.

Ani napodruhé nebyl výsledek pozitivní. Ve všech typech testovaných nádorových buněk nám vznikly transkripty, ve kterých jsme po elektroforéze a sekvenaci detekovali exony 8, 9 a 11 genu WAS, avšak exon 10 se opět do minigenové mRNA vůbec nezačlenil a ze sekvence byl vystřižen celý, a to i u varianty divokého typu. Důvodem mohlo být nevhodné prostředí plazmidu pET, které zapříčinilo, že regulace sestřihu genu WASP nefungovala v minigenu tak, jak funguje v lidském těle.



Obrázek 10: Na obrázku můžeme vidět cDNA po RT a PCR v rámci sestřihové analýzy. Nejdélší amplikony obsahují exony 8, 9 a 11 jak u varianty divokého typu, tak u varianty mutantní. Kratší amplikony pak obsahují pouze některé z těchto exonů. Exon 10 se opět vyčlenil v obou případech. (Zdroj: vlastní)

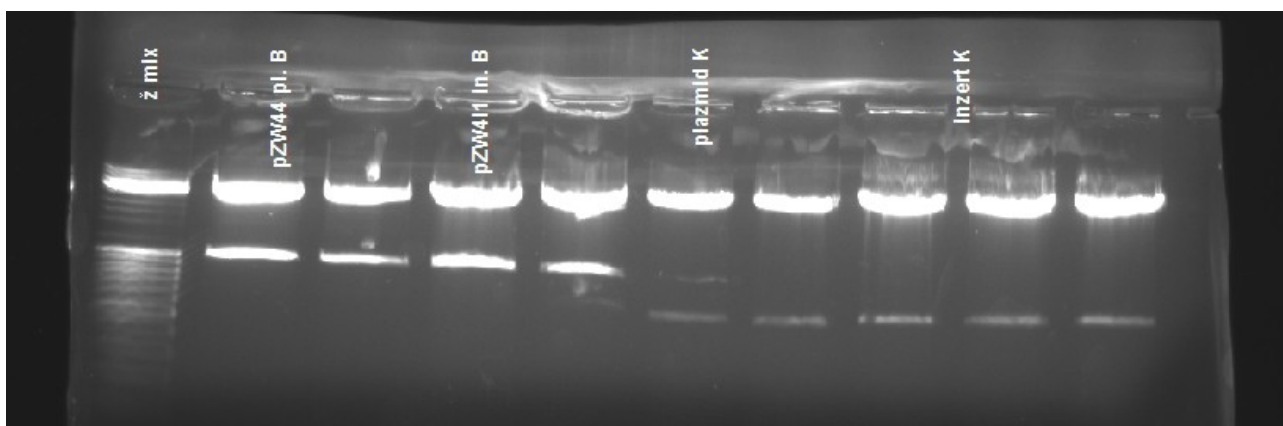


Obrázek 11: Výsledky RT a PCR po transfekci buněk EBV linie . (Zdroj: vlastní)

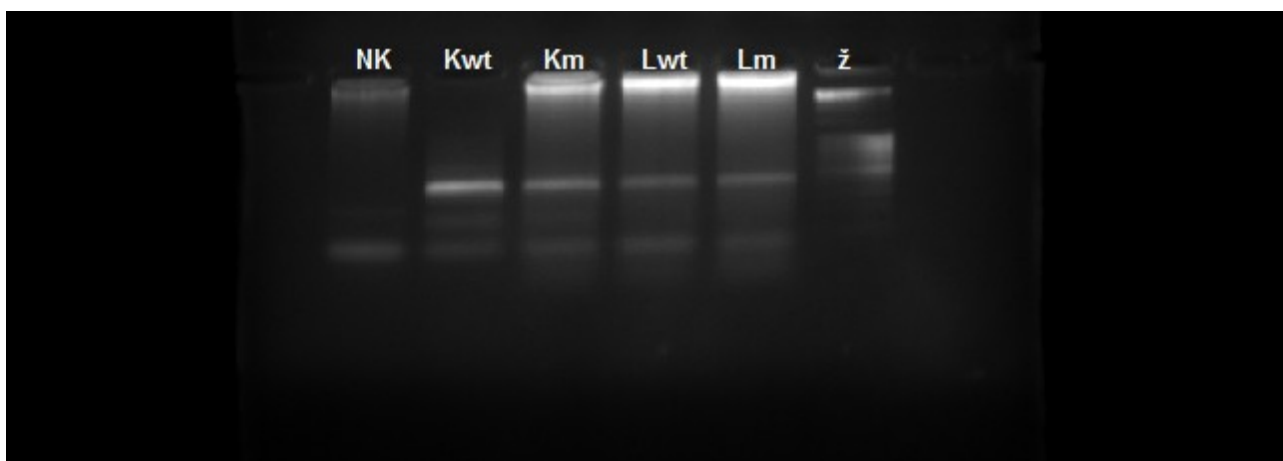
## 6.7 Východisko a výsledky

Kvůli podezření na nevhodné prostředí plazmidu pET, jsme se rozhodli celý inzert genu WAS (exony 8 až 11) klonovat do jiného vektoru. Zvolili jsme plazmid pZW4, který byl darem od dr. Z. Wanga. Poprvé jsme klonovali mutantní variantu i variantu divokého typu. Jako inzert jsme využili amplikon získaný z vektoru pET z předešlého pokusu. Následně byla provedena sestřihová analýza.





Obrázek 12: Plazmid pZW4 po štěpící reakci. (Zdroj: vlastní)



Obrázek 13: Výsledek PCR po RT. Divoký typ opět stejný jako mutantní. Ani do jedné z variant se nám nezačlenil inzert.

Výsledek se nijak nelišil od předchozích. Exon 10 se nám opět z minigenu vyčlenil celý a na gelu byly detekovány pouze amplikony délkou odpovídající začlenění exonů 8, 9 a 11.

## Závěr a diskuze

Cílem práce byla analýza vlivu mutace JVT (c.1001\_1002) nacházející se v exonu 10 genu WASP, popsané v článku od Zhu a kol. (r. 1997), na sestřih tohoto genu. Pro pokus byla použita metoda sestřihové minigenové analýzy, tedy analýza sestřihu pre-mRNA v uměle vytvořeném minigenu obsahujícím zkoumanou sekvenci genu WASP naklonovanou do plazmidu pET nebo pZW4.

Klonování i mutageneze proběhly ve všech případech úspěšně. Podařilo se nám tedy získat minigen obsahující jak inzert divokého typu, tak inzert mutantní. Úspěšně proběhla i celá sestřihová minigenová analýza, skládající se z transfekce, RT a následné PCR. Výsledky této analýzy ovšem ukázaly, že nedošlo k chybnému sestřihu exonu 10 jen u mutantní varianty, jak jsme očekávali, ale že se exon 10 do minigenové mRNA vůbec nezačlenil ani u sekvenční varianty divokého typu. Tato situace bohužel zcela znemožnila analyzovat vliv zvolené mutace na sestřih mutovaného genu.

Jedním z důvodů neúspěchu zvolené metody mohl být nedostatečný genomický kontext, který je pro minigenové analýzy obecně velmi důležitý. Je možné, že sestřih v exonu 10 mohou ovlivňovat regulační elementy nacházející se ve větší vzdálenosti od místa mutace, než jen v původně klonovaném exonu 10 a v přilehlých intronech. Proto jsme se rozhodli genomický kontext rozšířit a kromě exonu 10 genu WASP jsme do minigenu začlenili i 8., 9. a 11. exon s přilehlými intronovými úseky. Výsledek byl však bohužel neuspokojivý a exon 10 se do minigenové mRNA opět nezačlenil.

Dalším možným důvodem tohoto překvapivého výsledku jinak poměrně spolehlivé metody mohl být nesprávný typ buněk. Pro první pokusy byla využita nádorová linie buněk HeLa, která je běžně celosvětově využívána i pro sestřihovou analýzu. Dokonce je často využívána i pro pokusy s geny, které se v buňkách HeLa běžně neexprimují. Ani gen WASP se v této linii buněk běžně neexprimuje, ale vhodné buňky exprimující WAS

bohužel nebyly v naší laboratoři dostupné. Kvůli nečekaným výsledkům byly experimenty opakovány v další nádorové linii, a to konkrétně U-937. Tato linie je odvozena z monocytárních buněk, které gen WAS běžně exprimují. Kromě toho byly pokusy později rozšířeny i o transfekce EBV-linie, která je odvozena z B-lymfocytů a měla by tedy odrážet imunologický kontext exprese genu WAS. Naneštěstí se ukázalo, že ani jedna z těchto linií gen WAS neexprimuje, a že exon 10 byl bohužel opět během sestřihové analýzy vystřižen.

Minigenová analýza, jako taková, je *in vitro* metoda využívána převážně pro výzkumné účely. V dnešní době se však stále častěji používá také pro diagnostiku a to díky její obvyklé spolehlivosti. Výsledky minigenové analýzy většinou odpovídají sestřihové aberaci zjištěné u pacienta. [18] Ne však ve všech případech. Byly zjištěny i situace, kdy tomu tak nebylo. [8] Stále musíme mít na paměti, že minigenové analýzy jsou přeci jen arteficiální metody. Gen se nenachází ani ve svém přirozeném genomickém kontextu, ani v běžném chromatinovém kontextu (pro pokusy jsou využívány v bakteriích připravené plazmidy), což obojí ovlivňuje funkci sestřihu. Dalším neopominutelným faktem je, že nádorové linie, které byly v našem případě využívány, sice dobře rostou, ale přeci jen neodpovídají normální zdravé tkáni v těle.

Do budoucna je možné sestřihovou analýzu opět opakovat, ale s typem buněk, které WAS exprimují, pokud budou takové buňky dostupné. Případně je možné pomocí mutagenese posílit místa sestřihu exonu 10 a sestřihovou analýzu opakovat v již použitých buněčných liniích.

## Seznam použité literatury

- [1] „Genetika obecně.“ *Genetika-biologie* [online]. Čerpáno 23.12. 2013, URL: <http://www.genetika-biologie.cz/genetika-obecne>
- [2] „Genetics.“ *Encyklopaedia Britannica* [online]. Čerpáno 15.11. 2013, URL: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/228936/genetics>
- [3] „Historie genetiky.“ *Genetika-biologie* [online]. Čerpáno 8.1. 2014, URL: <http://www.genetika-biologie.cz/historie-genetiky>
- [4] OCHS, H. D., FILIPOVICH, A. H., VEYS, P., COWAN, M. J., KAPOOR, N.: Wiskott-Aldrich Syndrome: Diagnosis, Clinical and Laboratory Manifestations, and Treatment. *Biol Blood Marrow Transplant* 15, 2009: 84-90.
- [5] ALBERT, M. H., BITTNER, T. C., NONOYAMA, S., NOTARANGELO, L. D., BURNS, S., IMAI, K., ESPANOL, T., FASTH, A., PELLIER, I., STRAUSS, G., MORIO, T., GATHMANN, B., NOORDZIJ, J. G., FILLAT, C., HOENIG, M., NATHRATH, M., MEINDL, A., PAGEL, P., WINTERGERST, U., FICHER, A., THRASHER, A. J., BELOHRADSKY, B. H., OCHS, H. D.: X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood* 115, 2010: 3231-3238.
- [6] TADASHI, A.: Wiskott-Aldrich Syndrome; An X-linked Primary Immunodeficiency Disease with Unique and Characteristic Features. *Allergy International* 61, 2012: 183-189
- [7] ROSYPAL, S.: Úvod do molekulární biologie, díl druhý. *Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc.*, 2002: 375-381
- [8] BARALLE, D., BARALLE, M.: Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of Medical Genetics*, 2008: 737-748
- [9] ZHU, M., CHEN, H. M., WANG, Y. P.: Missense mutations of MLH1 and MSH2 genes detected in patients with gastrointestinal cancer are associated with exonic splicing enhancers and silencers. *Oncol Lett* 5, 2013: 1710-1718
- [10] CHEN, M., MANLEY, J. L.: Mechanism of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010: 2-26
- [11] VOŘECHOVSKÝ, I.: Aberrant 30 splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic Acids Research* 34, 2006: 4630-4641
- [12] STANĚK, L.: [Polymerase chain reaction: basic principles and applications in molecular pathology]. *Cesk Patol* 49, 2013: 119-21
- [13] „Transformation.“ *Encyklopaedia Britannica* [online]. Čerpáno 15.1. 2014, URL: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/602613/transformation>
- [14] „Transfection.“ *Encyklopaedia Britannica* [online]. Čerpáno 6.10. 2013, URL: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/602520/transfection>
- [15] „Reverse – transcriptase.“ *Encyklopaedia Britannica* [online]. Čerpáno 12.9. 2013,

- URL: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/500460/reverse-transcriptase>
- [16] „Elektroforéza.“ [online] Čerpáno 16.2. 2014, URL: <http://web.lfhk.cuni.cz/siman/Prednasky/Elfo.pdf>
- [17] "DNA – sequencing." *Encyklopaedia Britannica* [online]. Čerpáno 23.8. 2013, URL: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/422006/DNA-sequencing>
- [18] GAILDRAT, P., KRIEGER, S., DI GIACOMO, D., ABDAT, J., RÉVILLION, F., CAPUTO, S., VAUR, D., JAMARD, E., BOHERS, E., LEDEMENEY, D., PEYRAT, J. P., HOUDAYER, C., ROULEAU, E., LIDEREAU, R., FRÉBOURG, T., HARDOUIN, A., TOSI, M., MARTINS, A.: Multiple sequence variants of BRCA2 exon 7 alter splicing regulation. *JMG Online First* 10, 2012: 2-9