# Identifikace a lokalizace mutací v repetitivní oblasti genu *MUC1*

Přistoupilová A.1,2,3, Stránecký V.1,2,3, Hodaňová K.1,3, Hartmannová H.1,3, Piherová L.1,3, Vrbacká Čížková A.1, Živná M.1, Kmoch S.1,2,3

1 *Ústav dědičných metabolických poruch, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Ke Karlovu 2, Praha 2, 128 08, anna.pristoupilova@lf1.cuni.cz*

*2 Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci, Průmyslová 595, Vestec, 252 42*

*3 Národní centrum lékařské genomiky, Ke Karlovu 2, Praha 2, 128 08*

Rozvoj nových metod sekvenace genomu (Next Generation Sequencing Technologies, NGS), v posledních letech velmi zjednodušil analýzu lidského genomu. I přesto ale zůstávají některé jeho části obtížně přístupné.

Jedním z takových příkladů je gen *MUC1*, kódující transmembránový glykoprotein mucin-1, jehož kódující sekvence je GC bohatá (82%) a sestává z variabilního počtu (25-120) polymorfních tandemových repetic (VNTR) o délce 60 bází. Posunové mutace v tomto genu vedou k syntéze abnormálního proteinu, který má začátek sekvence shodný s původní sekvencí mucinu-1 a koncovou část naprosto unikátní. Syntéza, přítomnost a toxické působení mutovaného proteinu v tubulárních buňkách vede k postupné ztrátě tubulárních funkcí a medulárnímu cystickému onemocnění ledvin (MCKD1), které ve většině případů končí renálním selháním s nutností transplantace ledvin.

K včasné diagnostice MCKD1 je klíčová identifikace kauzálních mutací a jejich lokalizace ve VNTR. Jedním z faktorů ovlivňujících dobu nástupu a tíži onemocnění je totiž s největší pravděpodobností délka mutovaného proteinu, která závisí na celkovém počtu tandemových repetic a lokalizaci kauzální mutace v rámci VNTR. Identifikace a lokalizace mutací v *MUC1* je obtížná. Vzhledem k délce a povaze repetitivní oblasti nelze použít klasické Sangerovo sekvenování a NGS sekvenování je limitováno obtížnou mapovatelností sekvenovaných fragmentů.

Naše metoda, založená na amplifikaci VNTR oblasti pomocí Long Range PCR, jejím sekvenování na sekvenátoru Illumina HiSeq a specifické bioinformatické analýze získaných dat, umožňuje identifikaci mutací v genu *MUC1*. Tuto metodu jsme úspěšně otestovali na vzorcích s již známými kauzálními mutacemi a dále se nám pomocí této metody podařilo identifikovat další dvě nové mutace. Pro lokalizaci mutací ve VNTR oblasti v současné době testujeme metodu nanopórového sekvenování na přístroji MinION od firmy Oxford Nanopore, který umožňuje sekvenování jednotlivých molekul až o délce desítek kilobází.