

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicíně  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**Ing. Lenka Piherová**

**Využití metod celoexomového sekvenování pro studium vzácných  
dědičně podmíněných chorob**

**Application of whole-exome sequencing methods for the study of rare inherited  
diseases**

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: **prof. Ing. Stanislav Kmoč, CSc.**

Konzultant: **MUDr. Jakub Sikora, PhD.**

Praha, 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 8. 4. 2021

Lenka Piherová

Podpis

## **Identifikační záznam**

Piherová, Lenka. *Využití metod celoexomového sekvenování pro studium vzácných dědičně podmíněných chorob. [Use of whole-exome sequencing methods for the study of rare inherited diseases]*. Praha, 2021. 50 s., 7 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, Laboratoř pro studium vzácných nemocí. Vedoucí práce Kmoch, Stanislav, Konzultant Sikora, Jakub.

## Abstrakt

Vzácná onemocnění jsou heterogenní skupinou onemocnění a postihují okolo 5 % celosvětové populace. Tvoří více než 7 000 různých fenotypových jednotek a jejich podstata je u řady z nich dána geneticky. Výsledky studia molekulární podstaty vzácných onemocnění slouží nejen pro diagnostiku a případnou léčbu pacientů, ale přináší také unikátní biologické modely, které napomáhají k pochopení patofyziologie těchto onemocnění a hlubšímu porozumění jednotlivých biologických principů. Výrazný pokrok v molekulárně-genetických metodách, konkrétně zavedení metody sekvenování nové generace (NGS) do klinické praxe, otevřel širší možnosti diagnostiky pro řadu vzácných onemocnění či vedl k jejich zpřesnění.

Tato dizertační práce popisuje využití metod sekvenování nové generace a bioinformatické zpracování získaných dat při studiu molekulární podstaty vzácných geneticky podmíněných onemocnění. Tyto postupy vedly k určení kauzální příčiny u akademické varianty Fanconiho syndromu (*NDUFAF6*) a vzácné vrozené srdeční vady u novorozenců (*PLDI*). Také byly využity při exomové analýze souboru pacientů s různými typy kardiomyopatií, což vedlo k charakterizaci fenotypově odlišných skupin pacientů a k určení přesné genetické diagnózy u řady z nich.

**Klíčová slova:** vzácná onemocnění, sekvenování nové generace, Fanconiho syndrom, vrozená srdeční vada, kardiomyopatie

## **Abstract**

Rare diseases (RD) are a heterogeneous group of diseases that affect about 5% of the world population. RDs represent more than 7.000 different phenotypes and many of them are genetically determined. RDs provide unique biological models for understanding the basic principles of molecular and cellular organization and function of human tissues and organs. Results of studies focused at pathogenesis of RDs are often used to diagnose and treat the affected patients. Significant progress in molecular genetic techniques, specifically the use of the next generation sequencing (NGS) in clinical practice, substantially facilitated and improved efficiency of RD laboratory diagnostics. Moreover, these novel testing algorithms identified the previously unknown molecular causes of many RDs.

This thesis demonstrates the utility of NGS techniques and bioinformatics processing of obtained data in studies aimed at understanding molecular basis of selected RDs. These methods led to identification and characterization of causative pathogenic variants in the *NDUFA6* and *PLD1* genes among patients affected by the Acadian variant of Fanconi disease and patients with a rare congenital heart defect, respectively. This approach was further used to analyze exomes of a large cohort of patients with different types of cardiomyopathies. This part of the project characterized phenotypically different groups of patients and established accurate molecular genetic diagnosis in many of them.

**Key words:** rare diseases, next generation sequencing, Fanconi disease, congenital heart defect, cardiomyopathy

## Poděkování

Rád bych poděkovala především Standovi Kmochovi za vytvoření odborného a přátelského pracovního prostředí a za možnost být součástí jeho týmu. Dále děkuji všem svým kolegům za příjemnou atmosféru, podnětné rozhovory, cenné rady a odbornou expertízu. Mé díky patří konkrétně Hátě Hartmannové, Káče Hodaňové, Lence Noskové, Ditě Mušálkové, Ivě Jedličkové, Petrovi Vyleťalovi, Martině Živné, Martinovi Řebounovi, Heleně Myškové, Veronice Barešové a všem ostatním.

Za podporu děkuji svému manželovi Pavlovi a synům Pětovi a Míšovi.

Finanční podporu pro projekty zmíněné v této práci poskytly následující grantové agentury a granty: institucionální programy Univerzity Karlovy: UNCE 204064, UNCE 204011, PRVOUK-P24/LF1/3, PROGRES-Q26/LF1, PROGRES-Q39/LF1, SVV 2016/260148, SVV 260367/2017; výzkumné projekty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy: LL1204, LH12015, NT13116-4/2012, LO1304 NPU I, LQ1604 NPU II; programy a granty Ministerstva zdravotnictví ČR: AZV15-33297A NV15-28208A, NV15-27682A, NV17-29786A, NV19-08-137, NV19-08-00122, RVO-VFN 64165; grantová agentura České Republiky: 14-36804G; Grantová agentura Univerzity Karlovy: 269615, 1402213; Akademie věd: RVO 67985823.

# Obsah

1. ÚVOD .....	1
1.1 Vzácná onemocnění a význam jejich studia .....	1
2. Technologie a metody používané pro studium vzácných onemocnění .....	4
2.1 Sekvenační technologie .....	4
2.1.1 Sekvenování nové generace využívající amplifikaci fragmentů .....	5
2.1.2 Sekvenování nové generace se čtením v reálném čase.....	7
2.2 Bioinformatická analýza sekvenačních dat .....	8
2.2.1 Základní bioinformatická analýza .....	8
2.2.2 Interpretace sekvenačních dat.....	10
2.2.3 Další analýzy sekvenačních dat.....	11
3. Cíle dizertační práce.....	12
4. Seznam publikací, které jsou podkladem disertace.....	13
5. Výsledky a komentář k vybraným publikovaným pracím .....	15
5.1 Studium genetické podstaty vybraných vzácných onemocnění a identifikace kauzálních genů a patogenních variant.....	15
5.1.1 Objasnění molekulární podstaty vzácné akadské varianty Fanconiho syndromu .....	15
5.1.2 Objasnění molekulární podstaty vzácné vrozené srdeční vady. ....	17
5.2 Studium genetické příčiny kardiomyopatií.....	19
5.2.1 Studium genetické architektury dilatační kardiomyopatie (DKMP) a patofyziologických mechanismů vedoucích k fenotypovému obrazu remodelace levé komory srdeční a k srdečnímu selhání.....	23
5.2.2 Studium variant v genech kontraktálního systému kardiomyocytů vedoucích k různým fenotypickým projevům. ....	25
5.2.3 Studium variant způsobujících Danonovu chorobu u žen. ....	28
6. Souhrn výsledků.....	33
7. Význam dosažených výsledků .....	34
8. Seznam publikací, které nejsou součástí disertace.....	35
9. Literatura .....	37
10 Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertace .....	50

## Seznam zkratek

ACMG	Americká společnost lékařské genetiky a genomiky (American College of Medical Genetics)
AD	autozomálně dominantní typ dědičnosti
AR	autozomálně recesivní typ dědičnosti
AVFS	akadská varianta Fanconi syndromu (Acadian Variant of Fanconi syndrome)
BAM	binární forma formátu SAM (Binar Alignment/Map)
bp	pár bází (base pair)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CNV	změny genové dávky (Copy Number Variants)
CRT	cyklická reverzibilní terminace
DD	Danonova choroba
DKMP	dilatační kardiomyopatie
DNA	deoxyribonukleová kyselina (DeoxyriboNucleic Acid)
EKG	elektrokardiografie
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
EMT	mezenchymově-epitelový přechod
ESC	Evropská kardiologická společnost
ExAC	databáze (Exome Aggregation Consortium)
FASTQ	datový formát pro ukládání sekvencí a jim odpovídajícím skóre kvality
FDA	Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
FNUSA	Fakultní nemocnice u sv. Anny
GB	jednotka udávající $10^9$ bajtů
gDNA	genomová deoxyribonukleová kyselina
gnomAD	databáze (GeNOMe Aggregation Database)
hg19	referenční sekvence lidského genomu verze 19 (Human Genome)
IBD	identické oblasti pocházejí od společného předka (Identity By Descent)
IGV	prohlížeč genomických variant (Integrative Genome Browser)
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
kb	jednotka udávající $10^3$ bází
KMP	kardiomyopatie

LKS	levá komora srdeční
MAF	frekvence minoritní alely, frekvence druhé nejčastější alely v populaci (Minor Allele Frequency)
Mb	jednotka udávající 10 <sup>6</sup> bází
MELAS	mitochondriální onemocnění (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes)
mRNA	mediátorová RNA
NGS	nové metody sekvenace (Next Generation Sequencing)
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
OMIM	databáze (Online Inheritance In Men)
PacBio	firma zabývající se SMRT sekvenováním (Pacific Biosciences)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	kvantitativní PCR
QRS	depolarizace srdečních komor
RKDMP	recentní dilatační kardiomyopatie
RNA	ribonukleotidová kyselina (RiboNucleic Acid)
rRNA	ribosomální RNA
RT-PCR	PCR spojená s reverzní transkripcí
SAM	formát využívaný pro uchování alignmentu (Sequence Alignment/Map)
SMRT	sekvenační technologie firmy Pacific Biosciences (Single Molecule Real Time Sequencing)
SNA	přidání jednoho nukleotidu (Single Nucleotide Addition)
SNPs	jednonukleotidové polymorfismy (Single Nucleotide Polymorphisms)
TB	jednotka udávající 10 <sup>12</sup> bajtů
VCF	formát využívaný pro uchování variant (Variant Calling Format)
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice Praha



# 1. ÚVOD

Tato dizertační práce se zabývá studiem molekulární podstaty vybraných vzácných geneticky podmíněných onemocnění pomocí metod sekvenování nové generace. To umožňuje sekvenovat vybrané oblasti genomu, všechny jeho kódující oblasti či celý genom. Posun od přímého a cíleného sekvenování již známých vybraných kandidátních genů k celoexomovému či celogenomovému přístupu umožňuje identifikovat nejen kauzální varianty v genech již asociovaných s onemocněním, ale také definovat nové varianty v genech s dosud neznámou funkcí. Potenciálně kauzální varianty získané těmito metodami lze díky stále rostoucímu množství veřejně dostupných lidských exomových a genomových dat porovnávat s variantami přítomnými v populačních databázích.

Od roku 2010 na našem pracovišti – Laboratoři pro studium vzácných onemocnění na Klinice pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN (v té době ještě Ústavu dědičných metabolických poruch 1. lékařské fakulty UK a VFN) využíváme nové sekvenační metody (Next Generation Sequencing, NGS); s jeho pomocí se nám podařilo objasnit příčiny již více než 20ti vzácných onemocnění.

Ve své disertační práci prezentuji příklady využití metodiky NGS a dalších molekulárně-biologických metod, které vedly k odhalení molekulární podstaty několika skupin vzácných onemocnění a k popsání nových kauzálních genů. Na základě spolupráce s mnoha českými kardiology se podařilo získat unikátní soubor pacientů s kardiomyopatiemi. U velké řady z nich se pomocí exomového sekvenování podařilo odhalit genetickou příčinu vzniku onemocnění.

## 1.1 Vzácná onemocnění a význam jejich studia

Vzácná onemocnění jsou heterogenní skupinou onemocnění postihující okolo 5% celosvětové populace, což představuje přibližně 300 milionů lidí (Nguengang et al., 2020). Definice vzácných onemocnění se v jednotlivých částech světa liší. V současné době existuje 296 různých definic. V Evropě jsou jako vzácná onemocnění definována jako choroby s prevalencí nižší než 5 jedinců na 10 000 obyvatel; tj. 1: 2 000 (European Union, 2000), v Japonsku jsou definovány s prevalencí 1: 2 500 (Richter et al., 2015) a v USA jako onemocnění postihující méně než 200 000 pacientů v celé zemi; s prevalencí k aktuálnímu

počtu obyvatel 1: 1 630 (Federal Food, Drug, 1983). Vzácna onemocnění definovaná v USA tedy nemusí být považovaná za vzácna v jiných zemích světa.

Tato skupina onemocnění zahrnuje více než 7 000 různých fenotypových jednotek. Konkrétním onemocněním často trpí jen desítky až stovky pacientů na celém světě. Nejčastěji takto postiženými pacienty jsou děti, z nichž 1/3 umírá již před pátým rokem života (The Lancet Diabetes & Endocrinology, 2019).

V počtu vzácných onemocnění způsobených genetickými příčinami se literární prameny rozcházejí. Některé zdroje uvádějí 72 % (Nguengang et al., 2020) jiné méně než 40 % (Ferreira, 2019), nicméně genetická příčina stále u řady z nich nebyla určena. Pro mnoho pacientů to znamená až 20 návštěv lékaře a podstoupení řady vyšetření v průběhu několika let, než dojde k určení molekulární podstaty jejich onemocnění (Vissers et al., 2017). Neznalost správné diagnózy často vede ke zhoršení kvality života pacientů i jejich rodin. Přesné určení kauzální příčiny je důležité pro klasifikaci studovaného onemocnění a je východiskem pro cílenou DNA diagnostiku, následné genetické poradenství, prevenci a případně i léčbu.

Komplikace při studiu vzácných onemocnění jsou spojeny s jejich klinickou heterogenitou, fenotypickou variabilitou a řadou nespecifických symptomů. Včasná diagnostika a případné nasazení léčby či její změna je u řady vzácných onemocnění klíčová. Léčba musí být zahájena dříve, než může dojít nenávratnému poškození tkání. Do roku 2018 bylo Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration) schváleno 747 léků pro vzácna onemocnění a v Evropě bylo Evropskou lékovou agenturou (EMA, European Medicines Agency) schváleno 164 léků. Vývoj léků pro vzácna onemocnění je pro farmaceutické společnosti finančně velmi náročný, proto je v případě léčiv a terapeutik pro vzácna onemocnění zvolen jednodušší způsob registrace takových látek.

Ač pro většinu vzácných onemocnění není dostupná kauzální léčba, znalost diagnózy přináší pacientům řadu benefitů, ať již ve formě cíleného sledování předpokládané progresse onemocnění v odborných ambulancích, možnosti prekoncepčního či prenatalního vyšetření a poradenství a někdy i příležitosti zapojit se do případných experimentálních léčebných studií. V neposlední řadě hraje stanovení genetické podstaty onemocnění velkou psychologickou roli při získání jistoty konečné diagnózy. Rodiny pacientů se také čím dál častěji zapojují do patientských skupin vznikajících pro jednotlivá onemocnění.

Studium vzácných onemocnění a hledání jejich molekulární příčiny zároveň slouží jako unikátní biologický model pro hlubší pochopení jednotlivých biologických principů. Definice kauzálních genů a dopad přítomnosti patogenních variant může vést k objasnění funkce řady genů a umožňuje studium patofyziologických procesů v lidských buňkách. V databázi OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) je k datu 26. 3. 2021 uvedeno přes 6 tisíc fenotypů (tabulka č. 1) s vysvětlenou molekulární podstatou. Stále však zůstává velká řada fenotypů, jejichž patofyziologická podstata je neznámá.

**Tabulka č. 1** Počet záznamů v OMIM databázi k 26. 3. 2021 (<https://omim.org/statistics/entry>)

	Autozomální dědičnost	X- vázaná dědičnost	Y- vázaná dědičnost	Mitochondriální dědičnost	Celkem
Geny se známou sekvencí	15 615	747	51	37	16 450
Geny se známou sekvencí a fenotypem	27	0	0	0	27
Fenotyp se známou molekulární podstatou	5 639	356	5	34	6 034
Fenotyp nebo lokus s neznámou molekulární podstatou	1 412	112	4	0	1 528
Ostatní, především fenotypy s pravděpodobnou mendelovskou dědičností	1 656	102	3	0	1 761
<b>celkem</b>	<b>24 349</b>	<b>1 317</b>	<b>63</b>	<b>71</b>	<b>25 800</b>

## **2. Technologie a metody používané pro studium vzácných onemocnění**

Vzácná onemocnění jsou ve většině případů způsobena patogenními změnami v jednotlivých genech či funkčně významných genetických elementech. V posledních letech došlo díky technologickému pokroku ke značnému rozšíření metod používaných ke studiu těchto onemocnění. Analýzy dat získané sekvenováním exomů, genomů, transkriptomů či metabolomů umožňují postihnout komplexitu patogenních změn na buněčné či tkáňové úrovni. Nejčastěji jsou využívány různé druhy sekvenačních technologií.

### **2.1 Sekvenační technologie**

V roce 1977 byly nezávisle na sobě vyvinuty dvě odlišné metody sekvenace DNA – Sangerova enzymatická metoda (Sanger et al., 1977) a Maxam-Gilbertova chemická metoda (Maxam & Gilbert, 1977). Tyto metody umožnily zkoumání genetické informace všech živých organismů. Sangerova enzymatická metoda se stala na dalších téměř 30 let metodou nejrozšířenější a stále má své místo v téměř všech molekulárně genetických laboratořích, zejména pro nutnost ověření nalezených variant a pro provedení segregací analýzy v rodinách.

Vylepšení Sangerovy metody umožnilo sekvenaci kompletních genomů včetně lidského, který byl dokončen v roce 2003. Jeho „přečtení“ trvalo 13 let a stálo 2,7 miliard dolarů (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004; E. S. Lander et al., 2001). Limitem této technologie je vysoká cena a možnost číst maximálně stovky vzorků najednou o délce ~1000 párů bází (bp).

Vzhledem k potřebě levnějšího a zejména vysokokapacitního sekvenování byla vyvinuty nové technologie (NGS, Next Generation Sequencing). Ty umožňují sekvenovat až stovky miliónů molekul najednou a jsou označovány jako masivně paralelní sekvenování (Massively Parallel Sequencing).

S rozvojem a rozšířením sekvenování nové generace se již nemusíme soustředit na malé části genomu. Pomocí NGS technologie můžeme porovnávat genomy zdravých lidí a hledat vzácné varianty, které by mohly vysvětlit studovaný fenotyp. Tento přístup v řadě případů vede k určení nových kauzálních variant vysvětlujících dané onemocnění.

V současné době jsou nejrozšířenějšími následující dva typy NGS metod.

## 2.1.1 Sekvenování nové generace využívající amplifikaci fragmentů

Základní princip této metody je u všech používaných platforem sekvenování velmi podobný – zahrnuje přípravu knihovny, cílené obohacení definovaných oblastí (s výjimkou genomového sekvenování) a vlastní sekvenaci. Tyto metody je možné použít na celogenomové sekvenování, studium genetické variability kódujících oblastí genomu, studium vybraných genů i transkriptomovou analýzu. Nejčastějším vstupním materiálem je genomová DNA (gDNA), lze použít komplementární DNA (cDNA) připravenou z RNA nebo PCR produkt.

### *RNA-sekvenování (RNA-Seq)*

Tato metoda se používá pro studium exprese proteinů na úrovni RNA. Z izolované RNA se nejprve odstraní ribozomální frakce RNA (rRNA), která tvoří až 95% celkové RNA v buňce. Nejčastěji používaná metoda odstranění rRNA je tzv. deplece (Kraus et al., 2019). Takto přečištěná RNA je následně přepsána na komplementární DNA (cDNA), která se dále zpracovává podle níže popsaného postupu. Dle typu experimentu se může přidávat krok obohacení nebo je možné jej přeskočit.

### *Příprava DNA knihovny*

Molekula DNA je při přípravě knihovny naštěpena na malé fragmenty (100 – 500 bp). Fragmentace probíhá buď mechanicky (akustickou sonikací) nebo enzymaticky (restrikčními endonukleázami, transponázami, fragmentázami, fragmentací polymerizací (Ignatov et al., 2019). Získané fragmenty je nutné enzymaticky ošetřit a připojit adaptory. Při následné amplifikaci pomocí přidaných adaptorů je možné zároveň fragmenty specificky označit přidáním unikátního kódu. Tento krok umožní následně pracovat s více vzorky v jedné reakci, což vede jak ke snížení pracnosti, tak k menší finanční náročnosti přípravy knihovny.

### *Obohacení DNA knihovny*

Cílené obohacení připravované DNA knihovny vede k získání pouze požadované informace. Jedná se o obohacení DNA knihovny o vybrané úseky genomu (např. mitochondriální genom, exomy – kódující úseky genů, vybrané geny).

Jedna z variant cíleného obohacení je multiplex PCR reakce. Nevýhodou všech metod založených na PCR je to, že v průběhu amplifikace dochází k zanesení chyb v důsledku chybovosti DNA polymerázy.

Metody cíleného obohacení exomu jsou v dnešní době nejvyužívanější metodou a pomocí kombinace vzorků s odlišnými unikátními kódy je možné snížit sekvenační náklady a zpracovat více vzorků najednou. Pro hybridizaci se používají oligonukleotidové sondy, které jsou značeny biotinem. Tyto sondy jsou komplementární k oblastem zájmu sekvenování. Pro cílenou detekci jsou tyto metody nejvhodnější, neboť cílí až na tisíce různých oblastí a nedochází k zanášení chyb tak, jako u obohacení pomocí PCR. Navíc tyto metody poskytují dobrou reprodukovatelnost (Mamanova et al., 2010).

V případě, že cílem je sekvenování celého genomu, krok cíleného obohacení se vynechá.

#### *Amplifikace obohacené knihovny*

Amplifikace obohacené knihovny následně probíhá podle typu použitého sekvenátoru. Nejčastěji používaná platforma je od firmy Illumina, která využívá metodu můstkové amplifikace, při které se vytvářejí prostorově oddělené shluky amplifikovaných fragmentů. V případě sekvenátorů od firmy Ion Torrent dochází k amplifikaci pomocí emulzního PCR na kuličkách.

#### *Sekvenování*

Nejčastěji používaná metoda sekvenování je založená na cyklické reverzibilní terminaci (CRT), kterou využívají sekvenátory firmy Illumina (Bentley et al., 2008). Při ní je během sekvenační reakce inkorporován fluorescenčně značený nukleotid, následně je detekován a odštěpen a reakce pokračuje dalším cyklem. Cyklus se podle požadované délky čtení fragmentu opakuje 100 až 300x.

Další v současné době méně využívaná metoda je založená na principu přidávání jednoho nukleotidu (SNA), kterou využívá sekvenátor firmy IonTorrent (Rothberg et al., 2011).

#### *Limity sekvenování nové generace využívající amplifikaci fragmentů*

Díky výraznému rozšíření technik sekvenování nové generace a tím i jeho klesající cenou, dochází k jejímu častějšímu využívání v diagnostické praxi. Zároveň i s rostoucími znalostmi lidského genomu dochází k novým postupům identifikace kauzálních genů. Porovnáváme sekvence jedinců (pacient vs. zdravý jedinec) nebo tkání/buněčných linií. Již se nezabýváme malou částí genomu, ale díky novým technikám můžeme porovnávat funkčně důležité oblasti genomu a hledat vzácné varianty, které mohou vysvětlit studovaný fenotyp.

Přesto však popsanými technikami nelze správně analyzovat mnoho oblastí lidského genomu. Mezi tyto oblasti patří vysoce homologní části genomu, místa s vysokým obsahem GC či AT bází, repetitivní oblasti, expanze tandemových repetit, segmentální duplikace či transpozony.

V řadě případů je možné využít alternativní bioinformatické řešení, nicméně pro některé studie je vhodné využít metody, které nevyžadují amplifikaci knihovny a umožňují čtení jednotlivých molekul v reálném čase.

### **2.1.2 Sekvenování nové generace se čtením v reálném čase**

Již v roce 2009 byl připraven první komerčně dostupný sekvenátor čtoucí jednotlivé molekuly bez amplifikace (přístroj Helicos od firmy Helicos Biosciences) (Pushkarev et al., 2009). Tato metoda nebyla kvůli svým limitům (pomalá, drahá sekvenace umožňující čtení pouze o délce 32 bp), příliš úspěšná.

Novější technologie se čtením v reálném čase jsou v současné době využívány především pro vědecké účely, jejich rutinní zavedení v diagnostických laboratořích je limitováno požadovaným velkým množstvím vstupního materiálu a následnou složitou bioinformatickou analýzou.

#### *Technologie SMRT (Single – Molecule Real-Time)*

Tato technologie (Eid et al., 2009) byla komerčně představená firmou Pacific Biosciences (PacBio) v roce 2011. Principem metody je vytvoření cirkulární molekuly (SMRT bell) pomocí ligace vlásenkových adaptorů k sekvenované molekule DNA. Pomocí DNA polymerázy, která je navázána na sekvenační primer, jsou připojovány značené nukleotidy, které po začlenění uvolňují fluorescenční signál. Fluorescence je snímána v reálném čase a zaznamenává se nejen fluorescenční signál, ale i doba potřebná k inkorporaci nukleotidu, což se využívá k určení epigenetické modifikace. Průměrná délka získaných čtení je 10–16 kb (Ardui et al., 2018).

#### *Technologie nanopórového sekvenování*

Další metodou sekvenování v reálném čase je technologie nanopórového sekvenování (Clarke et al., 2009), komerčně představená v roce 2015 firmou Oxford Nanopore Technologies. Při přípravě sekvenačního vzorku jsou na oba konce DNA molekuly naligovány specifické adaptory, které mají 5' konci připevněný tzv. „motor

protein“. Ten slouží ke zpomalení průchodu molekuly DNA přes nanopór na sekvenační cele. Sekvenační cela se skládá ze dvou komor naplněných iontovým roztokem oddělených membránou, ve které jsou zasazeny proteinové póry. Aplikace napětí způsobuje iontový tok, díky kterému jednotlivé molekuly DNA procházejí skrz póry. Při průchodu jednotlivých bází pórem dochází ke změnám elektrického proudu, které jsou zaznamenávány pro každý jednotlivý nanopór a následně je z těchto dat odečítána sekvence procházející molekuly. Nevýhodou této technologie je vysoká chybovost čtení jednotlivých molekul (cca 15 %). Nejdelší popsaný osekvenovaný fragment pomocí této technologie je > 2 Mb (Payne et al., 2019).

## **2.2 Bioinformatická analýza sekvenačních dat**

Součástí sekvenačních technologií je zpracování získaných dat. Sekvenátory NGS jich produkují velké množství (GB až TB) v závislosti na použité metodě. Tato data není možné zpracovávat stejným způsobem jako data ze Sangerova sekvenování, a proto musíme využít složité bioinformatické analýzy.

### **2.2.1 Základní bioinformatická analýza**

Základní bioinformatickou analýzu můžeme rozdělit na primární, sekundární a terciární (obrázek č. 1).

#### *Primární analýza*

Primární analýza slouží k převedení primárních informací zaznamenaných v podobě obrázků do textové podoby (tzv. hrubá sekvenační data). Hrubá sekvenační data jsou uložena ve formátu FASTQ (Cock et al., 2010). Tento soubor obsahuje kromě sekvence čtených úseků řadu dalších informací včetně číselného vyjádření kvality čtení.

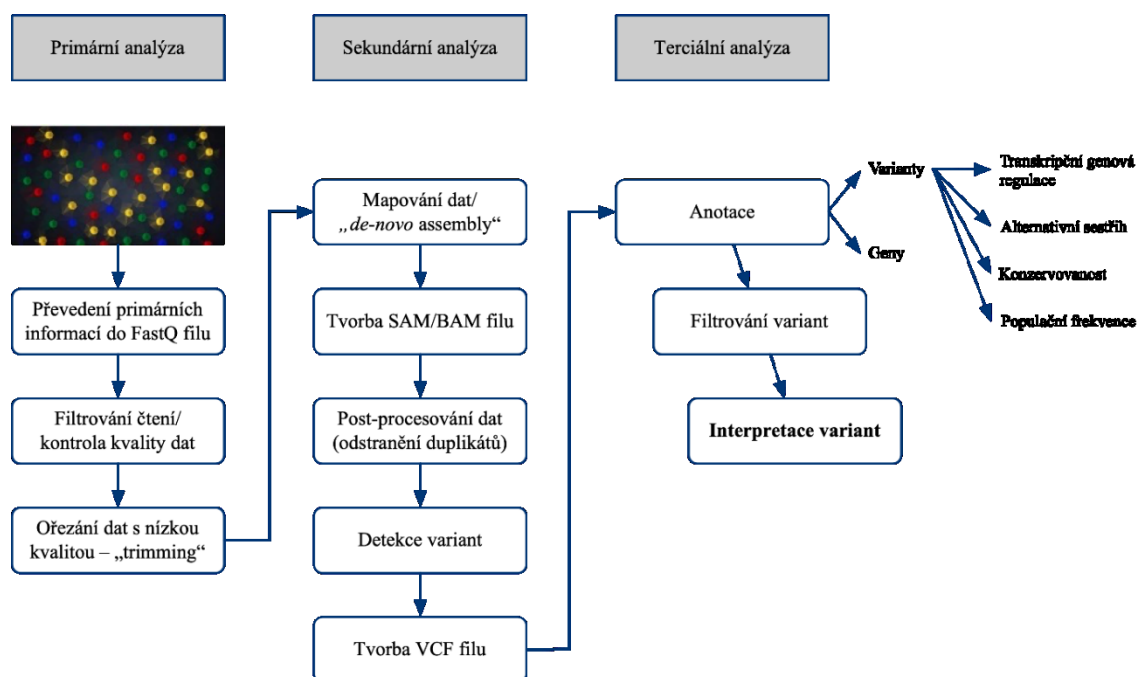
#### *Sekundární analýza*

Připravené FASTQ soubory jsou dále zpracovávány s cílem namapovat získané sekvence na referenční genom. Jedná se o výpočetně nejnáročnější a zároveň nejdůležitější krok celé bioinformatické analýzy (Flicek & Birney, 2009). Touto metodou dochází k přiřazení jednotlivých sekvencí ke správným místům referenční sekvence s co největší přesností. Metoda je založena na hledání maximální, nikoliv přesné shody.



Posledním krokem sekundární analýzy je detekce variant („variant calling“). Jsou při ní identifikovány veškeré odlišnosti od referenční sekvence, detekují se jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) a krátké inserce či delece.

Na konci sekundární analýzy jsou jednotlivé varianty lišící se od referenčního genomu definovány v souboru typu VCF (Variant Calling Format; Danecek et al., 2011). Ke každé variantě je přiložena informace o chromozomální pozici a kvalitě.



**Obr. 1.** Bioinformatická analýza dat. Převzato z (Pereira et al., 2020)

### Terciální analýza

Cílem terciální analýzy je dodat získaným variantám biologický smysl. Dochází k anotaci variant přidáním informací z různých databází a určení frekvence dané varianty v populaci. Tyto informace jsou následně využity pro filtrování kandidátních variant.

Důležitou informací u každé varianty je její frekvence v populaci. Tu lze určit z veřejně dostupných databází jako například databáze projektu 1000 genomů (1000 Genomes Project Consortium et al., 2015), Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>), ExAC (Lek et al., 2016) a gnomAD (Karczewski et al., 2019). Kromě veřejných databází je vhodné využít i národní a regionální databáze. V České republice pod záštitou Národního centra lékařské genomiky vytvořena veřejně dostupná databáze, která obsahuje varianty běžné pro českou populaci (<https://ncmg.cz>). Pro odhalení

variant, které jsou pouze častými chybami souvisejícími s použitou technologií sekvenování, je vhodné použít databázi dat vytvořené v každé laboratoři.

Anotací variant získáváme informace, v kterém genu a ve kterém transkriptu se varianta nachází, jaký má dopad na protein (změna smyslu, ztráta smyslu, posun čtecího rámce, ztráta/nový stop kodon atd.). Anotace genů je dalším krokem, pro který opět využíváme informace z velké řady biologických databází.

## 2.2.2 Interpretace sekvenačních dat

V této práci byla sekvenační data získávána s cílem identifikovat variantu či varianty, které mohou vysvětlit fenotypy pacientů a přispět ke stratifikaci velké skupiny pacientů s heterogenním onemocněním. Sekvenační data jsou získávána v rámci širokého spektra projektů a jejich interpretace je vždy závislá na prvotní biologické otázce.

### *Filtrování variant*

Výsledkem sekvenování nové generace jsou v závislosti na technologii seznamy desítek tisíc variant, ale pouze jedna či několik z nich jsou kauzální. Standardně jsou za kandidátní varianty považovány nesynonymní záměny, sestřihové varianty a delece nebo inserce, které způsobují změnu čtecího rámce. Pro správnou analýzu dat je nutné na základě rodinné anamnézy stanovit model dědičnosti.

Vždy jsou přednostně vybírány varianty a geny, které svou biologickou funkcí odpovídají fenotypovým projevům pacienta. Kauzalitu variant je nutné ověřit z údajů uvedených v literatuře nebo na základě funkčních studií. U každé kandidátní varianty je vhodné ověřit její kvalitu v prohlížeči genomických variant, jako je například IGV (Robinson et al., 2017).

### *Interpretace výsledků*

Interpretace výsledků NGS je velmi složitá a je proto vhodné použít doporučení Americké společnosti lékařské genetiky a genomiky (ACMG) (Richards et al., 2015), která zajišťují konzistenci v interpretaci variant a jsou jím daná přesná kritéria pro jednotlivá hodnocení variant. Hodnocení vychází z frekvence varianty v populaci, počítačové analýzy a *in silico* predikce, funkční analýzy, segregace varianty s onemocněním, původu *de novo* a dalších kritérií zahrnujících informace z databází či literatury. Dle jejich vzájemné kombinace lze jednotlivé sekvenční varianty klasifikovat do skupin „patogenní“,

„pravděpodobně patogenní“, „varianta neznámého významu“, „benigní“ a „pravděpodobně benigní“.

Kombinací jednotlivých přístupů je možné získat seznam jednotek variant, z nichž lze v některých případech rovnou určit kauzální variantu nebo je lze dále studovat s cílem potvrdit či vyvrátit jejich kauzalitu.

### **2.2.3 Další analýzy sekvenačních dat**

Získaná data z NGS sekvenování je možné využít i pro další analýzy, které jsem použila ve své práci – konkrétně pro homozygotní mapování (Hartmannova et al., 2016) a detekci změn genové dávky (Filip Majer et al., 2018, 2020).

#### *Homozygotní mapování*

Metoda homozygotního mapování je vhodná pro hledání kauzálních genů (nikoliv variant) u vzácných recesivních onemocnění, především u dětí z příbuzenských svazků (Eric S Lander & Botstein, 1987) či v izolovaných populacích s vysokou mírou příbuznosti. Předpokladem pro použití této metody je hypotéza, že kauzální varianta bude ležet v některé z homozygotních oblastí, které pocházejí od společného předka (IBD, identity by descent).

#### *Detekce změny genové dávky*

Strukturní varianty jsou definovány jako inserce, delece a duplikace oblastí DNA větších než 1kb (Freeman, 2006). Souhrnně jsou tyto varianty nazývány změny genové dávky (CNV, Copy Number Variation). Pro detekci CNV jsou vhodnější metody se čtením v reálném čase či celogenomové sekvenování. Detekce CNV variant je u sekvenování s cíleným obohacením problematická a nepříliš spolehlivá.

### 3. Cíle dizertační práce

Hlavním cílem mé práce bylo využít metod sekvenování nové generace ke studiu vybraných vzácných onemocnění a identifikované kandidátní geny a varianty charakterizovat pomocí dostupných molekulárně genetických, buněčných a proteomických technik.

Jednotlivé části dizertační práce mají tyto cíle:

- I. Studium genetické podstaty vybraných vzácných onemocnění a identifikace kauzálních genů a patogenních variant.
  - a. Objasnění molekulární podstaty vzácné akadské varianty Fanconihho syndromu.
  - b. Objasnění molekulární podstaty vzácné vrozené srdeční vady.
- II. Studium genetické příčiny kardiomyopatií.
  - a. Studium architektury dilatační kardiomyopatie (DKMP) a patofyziologických mechanismů vedoucích k fenotypovému obrazu remodelace levé komory srdeční a k srdečnímu selhání.
  - b. Studium variant v genech kontraktilního systému kardiomyocytů vedoucích k různým fenotypickým projevům.
  - c. Studium variant způsobujících Danonovu chorobu.

#### 4. Seznam publikací, které jsou podkladem disertace

Hartmannová H, Piherová L, Tauchmannová K, Kidd K, Acott PD, Crocker JF, Oussedik Y, Mallet M, Hodaňová K, Stránecký V, Přistoupilová A, Barešová V, Jedličková I, Živná M, Sovová J, Hůlková H, Robins V, Vrbacký M, Pecina P, Kaplanová V, Houštěk J, Mráček T, Thibeault Y, Bleyer AJ, Kmoch S. (2016) **Acadian variant of Fanconi syndrome is caused by mitochondrial respiratory chain complex I deficiency due to a non-coding mutation in complex I assembly factor *NDUFAF6***. Hum Mol Genet 25:4062–4079. doi: 10.1093/hmg/ddw245; **IF = 5.1, sdílené prvoautorství**

Lahrouchi N, Postma AV, Salazar CM, De Laughter DM, Tjong F, Piherová L, Bowling FZ, Zimmerman D, Lodder EM, Ta-Shma A, Perles Z, Beekman L, Ilgun A, Gunst Q, Hababa M, Škorić-Milosavljević D, Stránecký V, Tomek V, de Knijff P, de Leeuw R, Robinson JY, Burn SC, Mustafa H, Ambrose M, Moss T, Jacober J, Niyazov DM, Wolf B, Kim KH, Cherny S, Rousounides A, Aristidou-Kallika A, Tanteles G, Ange-Line B, Denommé-Pichon AS, Francannet C, Ortiz D, Haak MC, Ten Harkel AD, Manten GT, Dutman AC, Bouman K, Magliozzi M, Radio FC, Santen GW, Herkert JC, Brown HA, Elpeleg O, van den Hoff MJ, Mulder B, Airola MV, Kmoch S, Barnett JV, Clur SA, Frohman MA, Bezzina CR. (2021) **Biallelic loss-of-function variants in *PLD1* cause congenital right-sided cardiac valve defects and neonatal cardiomyopathy**. J Clin Invest. 131(5): e142148. doi: 10.1172/JCI142148.; **IF = 11.864**

Chaloupka A, Piherova L, Grochova I, Binova J, Krejci J, Spinarova L, Stranecky V, Kmoch S, Kubanek M. **Genetic architecture of recent-onset dilated cardiomyopathy in Moravian patients assessed by whole-exome sequencing and its clinical correlates**. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2019, 163(4):309-317 | DOI: 10.5507/bp.2018.054; **IF = 1.00, sdílené prvoautorství**

Kubánek M, Schimerová T, Piherová L, Brodehl A, Krebsová A, Ratnavadivel S, Stanasiuk C, Hansíková H, Zeman J, Paleček T, Houštěk J, Drahota Z, Nůsková H, Mikešová J, Zámečník J, Macek M Jr, Ridzoň P, Malusková J, Stránecký V, Melenovský V, Milting H, Kmoch S. **Desminopathy: Novel Desmin Variants, a New Cardiac Phenotype, and Further Evidence for Secondary Mitochondrial Dysfunction**. J Clin

Med. 2020 Mar 29;9(4):937. doi: 10.3390/jcm9040937.; **IF = 3.303, sdílené prvoautorství**

Gurka J, Piherova L, Majer F, Chaloupka A, Zakova D, Pelak O, Krebsova A, Peichl P, Krejci J, Freiburger T, Melenovsky V, Kautzner J, Kalina T, Sikora J, Kubanek M. **Danon disease is an underdiagnosed cause of advanced heart failure in young female patients: a LAMP2 flow cytometric study.** ESC Heart Fail. 2020 Oct;7(5):2534-2543. doi: 10.1002/ehf2.12823. Epub 2020 Jul 13.; **IF = 3.407, sdílené prvoautorství**

Majer F, Piherova L, Reboun M, Stara V, Pelak O, Norambuena P, Stranecky V, Krebsova A, Vlaskova H, Dvorakova L, Kmoch S, Kalina T, Kubanek M, Sikora J. **LAMP2 exon-copy number variations in Danon disease heterozygote female probands: Infrequent or underdetected?** Am J Med Genet A. 2018 Sep 8. doi: 10.1002/ajmg.a.40430. PMID: 30194816; **IF = 2.125, sdílené prvoautorství**

Majer F, Kousal B, Dusek P, Piherova L, Reboun M, Mihalova R, Gurka J, Krebsova A, Vlaskova H, Dvorakova L, Krihova J, Liskova P, Kmoch S, Kalina T, Kubanek M, Sikora J. **Alu-mediated Xq24 deletion encompassing *CUL4B*, *LAMP2*, *ATP1B4*, *TMEM255A*, and *ZBTB33* genes causes Danon disease in a female patient.** Am J Med Genet A. 2020 Jan;182(1):219-223. doi: 10.1002/ajmg.a.61416. Epub 2019 Nov 15.; **IF = 2.125**

## 5. Výsledky a komentář k vybraným publikovaným pracím

### 5.1 Studium genetické podstaty vybraných vzácných onemocnění a identifikace kauzálních genů a patogenních variant

#### 5.1.1 Objasnění molekulární podstaty vzácné akademické varianty Fanconioho syndromu

Fanconioho syndrom je vzácné onemocnění, které se projevuje sníženým vstřebáváním elektrolytů a organických sloučenin v proximálních tubulech ledvin (Bökenkamp & Ludwig, 2010; Klootwijk et al., 2015). Může být způsobené toxiny (Hall et al., 2014), léky (Kitterer et al., 2015) nebo genetickými mutacemi ovlivňujícími funkci proximálních tubulů (Klootwijk et al., 2015; Solano et al., 2014).

Varianta Fanconioho syndromu (Acadian variant of Fanconi syndrome, AVFS), kterou jsme studovali, se projevuje pouze u Akáďanů, v populaci s efektem zakladatele v kanadském Novém Skotsku. Tento typ onemocnění je charakterizován generalizovanou dysfunkcí proximálních tubulů, která vede k pomalu progredujícímu chronickému selhání ledvin, spojenému s intersticiální fibrózou plic (Wornell et al., 2007).

Pro studium příčiny tohoto onemocnění jsme měli k dispozici materiál od dvanácti pacientů z osmi rodin. Ze struktury rodokmenů jsme předpokládali autozomálně recesivní model dědičnosti s efektem zakladatele.

Nejprve jsme provedli exomové sekvenování u tří nemocných a jednoho zdravého člena rodiny. Standardními metodami filtrování jsme nenalezli žádné pravděpodobné kauzální varianty, proto jsme využili metodu homozygotního mapování a určili homozygotní oblasti genomu větší než 2Mb. Těmto podmínkám vyhovovala pouze oblast na chromozomu 8 (chr8:90958422-96960058 (hg19)). Vzhledem k předpokládanému typu dědičnosti jsme se zaměřili na homozygotní varianty, které by byly sdílené pouze u pacientů, a nikoliv u zdravých členů rodiny. Nalezli jsme variantu s nízkou frekvencí výskytu v populaci v genu *OTUD6B* (chr8:92097062G>A; rs3210518, hg19). Segregační analýzou v rodinách jsme potvrdili relevanci vybrané homozygotní oblasti.

Pro identifikaci kauzálních variant jsme dále provedli exomové sekvenování rozšířené o 5' a 3' nepřekládané oblasti. Kandidátní varianty nebyly nalezeny ani tímto přístupem, podařilo se nám ale zpřesnit hranice homozygotní oblasti (chr8:94242350-

97172487 (hg19)). Na základě těchto výsledků jsme přikročili ke genomovému sekvenování, neboť jsme na základě předchozích výsledků předpokládali, že onemocnění je způsobeno mutacemi v nekódující oblasti.

Homozygotní mapování genomových dat dále zúžilo kandidátní oblast na chr8:94423201-96206283 (hg19), která obsahovala 322 variant. Při filtrování jsme upřednostnili varianty vzácné, konzervované, predikované jako patogenní. Těmto parametrům odpovídala pouze jedna varianta chr8:96046914T>C, rs575462405, v genu *NDUFAF6*.

Nalezená varianta se nachází ve druhém intronu genu *NDUFAF6* (NM\_152416.3; c.298-768T>C). Vliv této varianty jsme analyzovali pomocí nástrojů predikujících efekt sestřihových variant. Provedené analýzy předpověděly, že kandidátní varianta pravděpodobně ovlivňuje sestřih, neboť vytváří nové akceptorové místo sestřihu. Ve vzdálenosti 37 bází od této varianty se u pacientů nachází populačně častá varianta chr8:96046951A>G (c.298-731A>G), rs74395342), která vytváří nové donorové místo sestřihu. Pomocí Sangerova sekvenování jsme prokázali přítomnost obou variant chr8:96046914T>C a chr8:96046951A>G v homozygotním stavu u nemocných jedinců ze všech osmi rodin.

*NDUFAF6* kóduje asemblační faktor 6 komplexu I respiračního řetězce NADH dehydrogenázy. Tento protein tvoří několik různých izoform, včetně jedné, která je predikovaná jako mitochondriální (McKenzie et al., 2011).

Pro potvrzení vlivu nalezené varianty na sestřih, jsme izolovali celkovou RNA z fibroblastů a z plicní biopsie pacientů. Produkty reverzní transkripce jsme osekvenovali pomocí technik nové generace. Tímto způsobem jsme našli celkem deset různých transkripčních izoform.

Touto studií jsme prokázali, že varianta rs575462405 v kombinaci s variantou rs74395342 ovlivňuje sestřih a syntézu *NDUFAF6* izoform, netvoří se mitochondriální izoforma. Tím dochází k poruše tvorby a funkce respiračního komplexu I. Význam této varianty byl potvrzen dalšími experimenty.

AVFS je způsobená deficitem mitochondriálního komplexu I respiračního řetězce v důsledku varianty v nekódující oblasti. Výsledky byly využity pro diagnostiku a prevenci onemocnění a zároveň rozšiřují spektrum defektů respiračního řetězce a poruch respiračního komplexu I.



Příspěvek autorky dizertace k této studii:

Podílela jsem se na přípravě sekvenačních knihoven, analýze dat, prováděla jsem filtrování variant, veškeré homozygotní mapování, ověřování variant a jejich segregaci v rodinách. Izolovala jsem RNA z tkání a buněčných linií a následně jsem z dat získaných sekvenováním popsala sestřihové varianty, jak u zdravých členů rodiny, tak u pacientů. Analyzovala jsem tkáňové lyzáty pomocí metody Western blot.

Podílela jsem se na přípravě publikace, kde jsem sdíleným prvním autorem.

Hartmannová H, Piherová L, Tauchmannová K, et al (2016) **Acadian variant of Fanconi syndrome is caused by mitochondrial respiratory chain complex I deficiency due to a non-coding mutation in complex I assembly factor *NDUFAF6***. Hum Mol Genet 25:4062–4079. doi: 10.1093/hmg/ddw245; IF = 5.1

### 5.1.2 Objasnění molekulární podstaty vzácné vrozené srdeční vady

Vrozené srdeční vývojové vady jsou nejčastějším typem vrozených vad při narození dítěte. Představují až jednu třetinu všech vrozených anomálií, s celosvětovým výskytem sedm na tisíc živě narozených dětí (Dolk et al., 2011). Skupina pravostranných vývojových srdečních vad zahrnuje abnormality plicních a trikuspidálních chlopní, pravé komory a výtokového traktu pravé komory. Genetické příčiny těchto vrozených vad jsou do značné míry neprozkoumané.

V naší laboratoři jsme pomocí celoexomového sekvenování studovali rodinu, v níž u došlo postupně k pěti potratům. U dvou plodů byl ultrazvukem potvrzen defekt komorového septa, atypický průběh křížení velkých cév, extrémně dilatovaná pravá komora a dysplastická trikuspidální chlopeň. Filtrováním variant jsme určili jako pravděpodobnou příčinu srdečních defektů přítomnost dvou variant v genu *PLDI*.

Gen *PLDI* kóduje enzym fosfolipázu D1, která hydrolyzuje fosfatidylcholin za vzniku fosfatidové kyseliny a cholinu a patří mezi proteiny signálních kaskád. Dříve popsané recesivní varianty v tomto genu byly asociovány s vážnými vývojovými vadami srdce. Myší modely postrádající fosfolipázu D1 vykazují při echokardiografickém vyšetření mírně poškozenou funkci plicní a trikuspidální chlopně (Nelson & Frohman, 2015). Nicméně zatím nebylo vysvětleno, proč dysfunkce tohoto proteinu vede k vývojovým abnormalitám trikuspidální chlopně.

Ve spolupráci s dalšími laboratoři (Sobreira et al., 2015) zabývajícími se studiem vzácných onemocnění bylo identifikováno 29 pacientů z celkem 20 rodin. Ve všech rodinách byl pozorován autozomálně recesivní způsob dědičnosti a přítomnost variant v genu *PLD1*.

Dvacet sedm pacientů vykazovalo vrozené formy malformace srdečních chlopní postihujících převážně pravou stranu myokardu. Tyto defekty byly charakterizovány závažnými abnormalitami trikuspidální a plicní chlopně, hypoplastickou pravou komorou a hypoplastickou plicní tepnou. V šesti případech bylo těhotenství ukončeno z důvodu srdeční vady se špatnou prognózou (gestační rozmezí 13-22 týdnů). Čtyři pacienti přežili méně než rok v důsledku strukturální srdeční vady. Většina živě narozených dětí vyžadovala chirurgický zákrok už v prvních dnech nebo měsících života.

U dvou pacientů se objevila těžká izolovaná novorozenecká kardiomyopatie bez vrozené vývojové vady srdce. Oba pacienti zemřeli krátce po porodu a bylo u nich provedeno genetické vyšetření panelu 300 genů souvisejících s kardiomyopatií s negativním výsledkem.

Žádný z pacientů, kteří přežili kojenecký věk, neměl dysmorfické rysy, mentální postižení nebo výrazné zpoždění vývoje, což naznačuje, že ztráta funkce *PLD1* je spojena převážně s izolovaným srdečním onemocněním.

Celkově bylo v rámci studie popsáno 29 variant, z nichž se ve dvaceti případech jednalo o záměny bází, dalších sedm z nich vedlo k vytvoření předčasného stop kodonu a dvě varianty ovlivňovaly sestřih proteinu. V naší laboratoři jsme ze vzorku RNA z periferní krve rodičů potvrdili vznik chybně sestřiženého proteinu *PLD1*.

Až na dvě výjimky nebyly identifikované varianty nalezeny v homozygotním stavu v databázi gnomAD (stav k říjnu 2019). Databáze gnomAD obsahuje 42 předpokládaných variant *PLD1* typu „loss of function“ (očekávaný počet je 62) a žádná z variant se nevyskytuje v homozygotním stavu, což naznačuje, že *PLD1* netoleruje homozygotní varianty vedoucí ke ztrátě funkce.

V rámci této studie jsme rozšířili fenotypové spektrum vývojových srdečních vad souvisejících s genem *PLD1*. Ve všech případech jsme popsali podstatnou ztrátu enzymatické aktivity a prokázali jsme, že inhibice *PLD1* snižuje mezenchymově-epitelový přechod (EMT), což je stěžejní raný krok ve valvulogenezi.

Príspevek autorky dizertace k této studii:

V rámci studie jsem se podílela na přípravě vzorků, sekvenaci, analýze dat, ověření variant a jejich segregaci. Izolovala jsem RNA ze vzorku periferní krve rodičů a následně pomocí RT-PCR potvrdila chybný sestřih genu *PLDI* u nosiče sestřihové varianty.

Podílela jsem se na přípravě publikace.

Najim Lahrouchi, Alex V Postma, Christian M Salazar, et al (2021) **Biallelic loss-of-function variants in *PLDI* cause congenital right-sided cardiac valve defects and neonatal cardiomyopathy.** J Clin Invest. 131(5): e142148. doi: 10.1172/JCI142148.; **IF = 11.864**

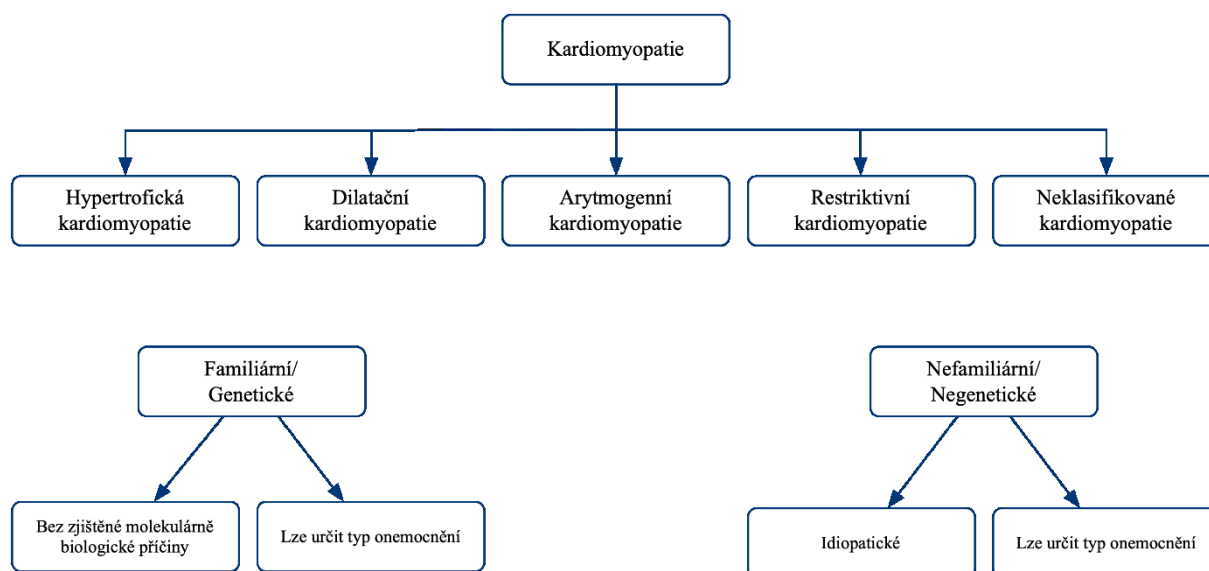
## 5.2 Studium genetické příčiny kardiomyopatií

Kardiomyopatie jsou onemocnění spojená se strukturálním a funkčním postižením srdečního svalu při vyloučení ischemické choroby srdeční, hypertenze, chlopenní vady či vrozené srdeční vady, které by mohly tuto abnormalitu způsobit (Elliott et al., 2008). Jedná se o chronická onemocnění srdečního svalu, která vedou nejčastěji k dilataci srdečních komor a závažné poruše jejich systolické funkce, což charakterizuje dilatační kardiomyopatii. Další abnormalitou je ztlušťování stěn srdečních komor, typické pro hypertrofickou kardiomyopatii nebo závažná porucha poddajnosti srdečních komor, která charakterizuje restriktivní kardiomyopatii. Poslední dvě jednotky jsou spojeny především s poruchou diastolické funkce srdečních komor. Mezi kardiomyopatie patří také tzv. kanálopatie, kde jsou v popředí poruchy srdečního rytmu u makroskopicky normálního srdce. Odhadovaná prevalence kardiomyopatií v populaci je uváděna 3 % (McKenna et al., 2017). Jedná se o velmi heterogenní skupinu onemocnění, která má často genetickou podstatu. Kardiomyopatie se mohou vyskytovat izolovaně nebo jsou součástí systémových onemocnění, jako jsou různé malformační syndromy, neuromuskulární postižení a strádání onemocnění (Calcagni et al., 2018; Sweet et al., 2018).

Pacienti s kardiomyopatiemi jsou ohroženi rozvojem srdečního selhání a závažnými poruchami srdečního rytmu. Srdeční selhání je charakterizováno neschopností srdce přečerpávat krev v souladu s metabolickými potřebami tkání, nebo se tak děje za cenu patologicky zvýšených plicních tlaků srdečních oddílů. Klinicky se srdeční selhání projevuje námahovou dušností, únavou a otoky dolních končetin. Kromě městnání krve v žilní části plicního a systémového řečiště dochází u nemocných s těžšími formami srdečního selhání

také k poklesu srdečního výdeje a hypoperfuzi orgánů. U pacientů se mohou objevit různé druhy arytmii jako jsou síňokomorové převodní poruchy, fibrilace síní, komorové tachykardie nebo fibrilace komor, které se projevují bušením srdce, krátkodobou ztrátou vědomí, oběhovou zástavou nebo jako náhlá srdeční smrt.

Klasifikace kardiomyopatií doznala v průběhu let mnoha změn. Historické rozdělení kardiomyopatií na primární či idiopatické a sekundární bylo třeba upravit zejména s ohledem na rychle se rozvíjející poznatky na poli genetické diagnostiky a molekulární biologie. Odborné stanovisko Pracovní skupiny pro choroby myokardu a perikardu Evropské kardiologické společnosti (ESC) z roku 2008 (Elliott et al., 2008) navrhlo klasifikační schéma, ve kterém jsou kardiomyopatie rozděleny dle morfologického a funkčního obrazu a každá z nich je pak dále rozdělena na familiární a nefamiliární formy (obrázek č. 2).



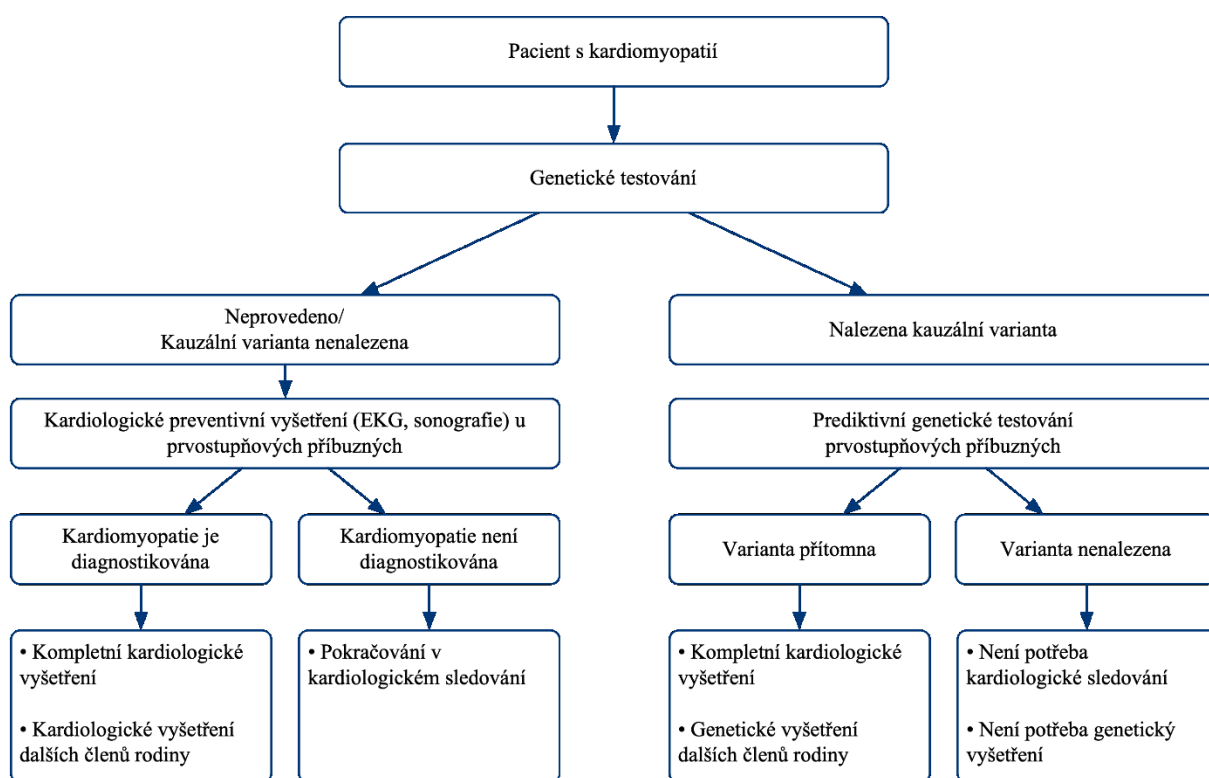
**Obr. 2.** Klasifikace kardiomyopatií navržené Pracovní skupinou pro choroby myokardu a perikardu Evropské kardiologické společnosti z roku 2008. Převzato z (Elliott et al., 2008)

Hlavní morfologické typy zahrnují hypertrofickou kardiomyopatii, dilatační kardiomyopatii, arytmogenní kardiomyopatii, restriktivní kardiomyopatii a další neklasifikované kardiomyopatie.

Jako familiární (geneticky podmíněné) jsou označovány ty případy, ve kterých se kardiomyopatie vyskytuje alespoň u dvou pokrevních příbuzných nebo pokud jsou v rodinné anamnéze pacienta jinak neobjasněná náhlá úmrtí či srdeční selhání v mladém věku (do 40 let). Většina familiárních kardiomyopatií se řadí mezi monogenní onemocnění (Hershberger et al., 2018). Nefamiliární (geneticky nepodmíněné) formy jsou pak rozděleny na idiopatické (bez zjištěné příčiny) a získané (srdeční dysfunkce je způsobena jiným onemocněním). Stále

přítom platí základní podmínka vyplývající z obecné definice kardiomyopatií, že jako příčina musí být vyloučena ischemická choroba srdeční, hypertenze, chlopenní vada či jiná vrozená srdeční vada.

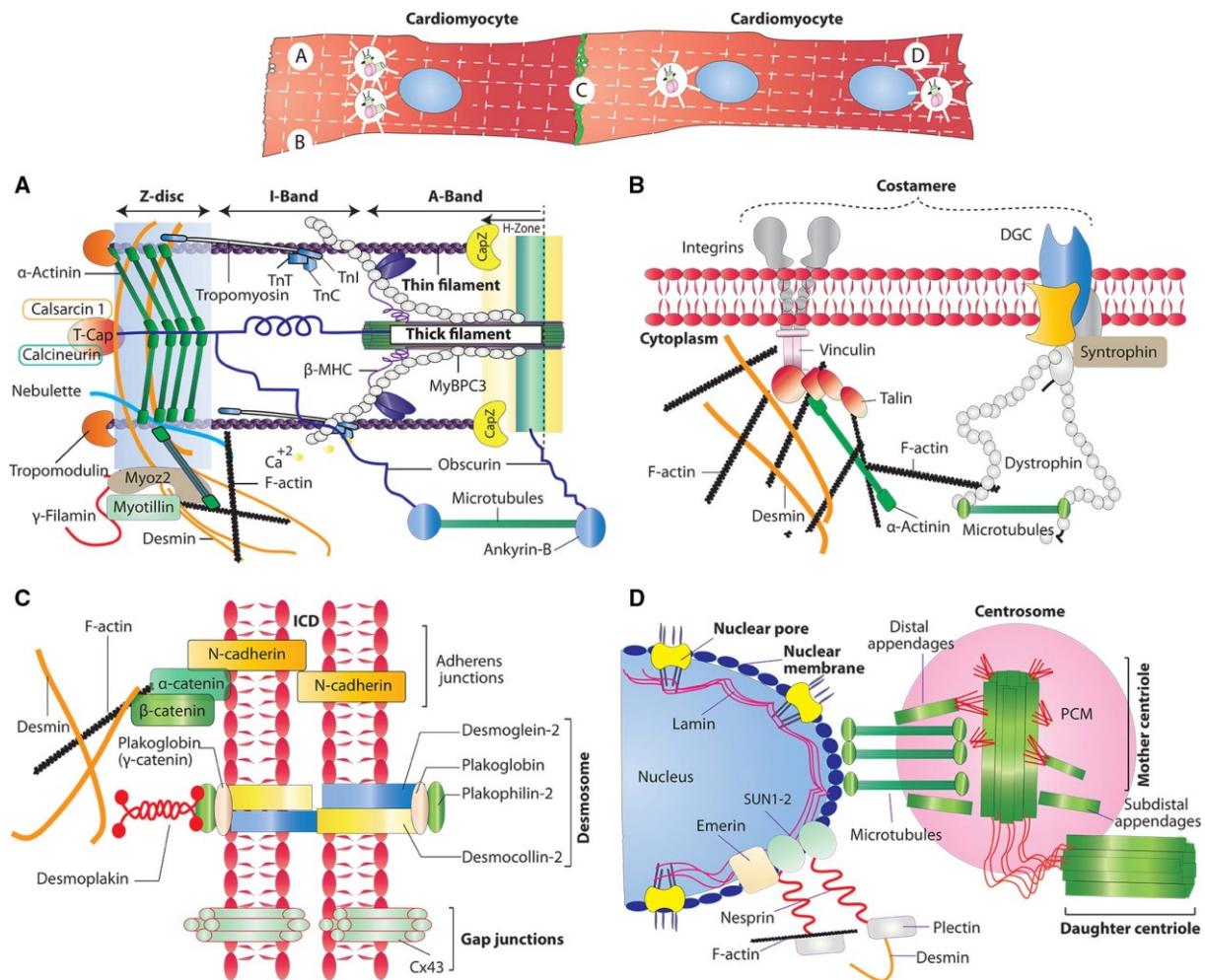
Genetické vyšetření je důležitou součástí péče o pacienty s kardiomyopatiemi (Charron et al., 2010). Přispívá k upřesnění diagnózy onemocnění a je významné pro genetické poradenství v rodinách (obrázek č. 3). Výsledek je vždy nutné hodnotit s přihlédnutím k mnoha dalším faktorům (typ dědičnosti, variabilní, často věkově závislé expresivity a penetrance a klinickému fenotypu) a je nutné mít na paměti, že negativní výsledek nevylučuje genetickou příčinu onemocnění.



**Obr. 3.** Postup vyšetření dalších členů rodiny u pacienta s podezřením na genetický původ onemocnění (Charron et al., 2010).

Kardiomyopatie vykazují nejčastěji autozomálně dominantní typ dědičnosti (AD). Autozomálně recesivní typ dědičnosti (AR) u dospělých pacientů je výjimečný. X-vázané kardiomyopatie se u mužů projevují již v dětském věku, u žen dochází k nástupu onemocnění později (Danonova choroba, Becker/Duchennův syndrom). U kardiomyopatií je nutné počítat i s mitochondriální dědičností (MELAS syndrom). Pro kardiomyopatie je charakteristická variabilní expresivita a nekompletní penetrance, což značně komplikuje diagnostiku.

V současné době je s kardiomyopatiemi spojováno okolo 70 různých genů (McNally & Mestroni, 2017). Tyto geny kódují sarkomerické, cytoskeletální, mitochondriální, desmosomální proteiny i proteiny jaderné obálky (obrázek č. 4).



**Obr. 4.** Struktura kardiomyocytu: sarkomera, kostamera, interkalační disk a jádro s centrozomem. **A** – Sarkomera: tlustá filamenta se skládají z lehkého a těžkého řetězce myozinu, tenká filamenta obsahují molekuly aktinu. Aktinová vlákna jsou propojena s komplexem troponinů a tropomyozinu, který hraje klíčovou roli v regulaci kontrakce sarkomery. Dalšími důležitými složkami sarkomery, které zajišťují mechanickou odolnost a strukturální integritu buňky, jsou titin, MYBPC3,  $\alpha$ -aktinin a myomezin. Sarkomera je složena z několika částí: M-band, A-band, I-band a nakonec Z-disk. **B** – Kostamera se skládá z dystroglykanu a komplexu proteinů integrin-vinkulin-talin, který spojuje extracelulární matrix s myofibrilami a sarkolemou prostřednictvím aktinu a mikrotubulů. **C** – Interkalační disky spojují sousední kardiomyocyty a jsou nezbytné pro mezibuněčnou komunikaci a integritu tkáně. **D** – Jádro a centrozom: složky jaderné obálky (lamin, SUN1-2 a emerin) jsou těsně spojeny s aktinem, mitochondriemi a desminovými filamenty prostřednictvím

*nesprinů. Integrita centrozomu hraje klíčovou roli při dělení kardiomyocytů. (Ali et al., 2020)*

Nejčastějšími genetickými příčinami onemocnění jsou patogenní změny v genech *TTN*, *MYH7*, *MYBPC3*, *LMNA*, *SCN5A*, *DSP*, *TPM1*, *DES*, *FLNC*, *PLN*. V některých genech se za patogenní považují pouze varianty vedoucí k předčasnému ukončení proteinu - tzv. trunkující varianty (Mazzarotto et al., 2020). Jedním z těchto genů je titin – (nejdelší lidský protein) a počet nalezených trunkujících variant v tomto genu dosahuje v případě dilatační kardiomyopatie až 20 % všech popsaných kauzálních příčin (Schafer et al., 2017). V případě kardiomyopatií jsou velmi časté varianty specifické pro danou rodinu, tzv. privátní mutace. Je popsáno velmi nízké procento případů sdílených variant. Takové varianty jsou popsány u třech genů *RBM20* (Guo et al., 2012; S. Li et al., 2013), *PLN* (van der Zwaag et al., 2013) a *TMEM43* (Milting et al., 2015)

Ve své dizertační práci představuji několik studií, které byly součástí spolupráce s řadou významných českých klinických kardiologických pracovišť. V rámci této spolupráce jsme pomocí exomového sekvenování charakterizovali velké skupiny pacientů, převážně s dilatační kardiomyopatií.

### **5.2.1 Studium genetické architektury dilatační kardiomyopatie (DKMP) a patofyziologických mechanismů vedoucích k fenotypovému obrazu remodelace levé komory srdeční a k srdečnímu selhání**

Dilatační kardiomyopatie (DKMP) je po ischemické chorobě srdeční nejčastější onemocnění vedoucí k chronickému srdečnímu selhání a je nejčastějším důvodem k transplantaci srdce. Je heterogenní etiologie včetně genetické, zánětlivé, toxické a metabolické příčiny (Elliott et al., 2008; Yancy et al., 2013).

Přesná prevalence DKMP není známa. První odhad byl prováděn v letech 1975-1984 a diagnóza se opírala pouze o echokardiografická, angiografická a *post-mortem* provedená hodnocení. Tehdy odhadovaná prevalence onemocnění byla 1: 2 500 (Codd et al., 1989). V novějších studiích, především díky rozvoji řady diagnostických metod se odhaduje prevalence 1: 250 (Hershberger et al., 2013). Stejně jako ostatní kardiomyopatie se DKMP dělí na familiární (genetické) a nefamiliární (negenetické) formy.

Klinická diagnóza DKMP je založena na přítomnosti dilatace a systolické dysfunkce levé komory při absenci abnormálních plnicích podmínek či ischemické choroby srdeční, které by mohly tuto abnormalitu způsobit (Elliott et al., 2008; Pinto et al., 2016).

Velkým diagnostickým problémem jsou pacienti s recentně vzniklou (méně než šest měsíců) dilatační kardiomyopatií (RDKMP). Klinický průběh onemocnění může být značně variabilní, v rozsahu od úplné reverzní remodelace levé komory (LKS), přes přetrvávání systolické dysfunkce LKS až po rychlou progresi do konečného stádia srdečního selhání. Reverzní remodelace LKS u pacientů s RDKMP je příznivým prognostickým ukazatelem pro další vývoj onemocnění (Merlo et al., 2011). Je charakterizována částečným zlepšením systolické funkce LKS (absolutní vzestup ejekční frakce  $>10$  procentních bodů) a zmenšením objemu LKS (relativní zmenšení end-diastolického rozměru LKS  $> 10\%$ ).

Cílem naší studie bylo sestavit genetickou mapu recentně vzniklých dilatačních kardiomyopatií u 83 pacientů pomocí celoexomového sekvenování a studovat korelaci mezi genotypem a fenotypem. Pacienti s RDKMP byli dobře klinicky klasifikováni a charakterizováni jak při vstupním vyšetření, tak i při kontrole po 12ti měsících. U všech pacientů bylo provedeno celoexomové sekvenování a byla u nich studována souvislost mezi remodelací levé komory a genetickou příčinou.

Nalezené varianty byly hodnoceny podle kritérií ACMG (Richards et al., 2015). Pro další korelaci byly použity pouze varianty, které odpovídaly klasifikaci patogenní, pravděpodobně patogenní a vybrané varianty nejasného významu, které predikční software MutationTaster2 (Schwarz et al., 2014) hodnotil jako patogenní.

Ve studované skupině pacientů byla pozitivní rodinná anamnéza zjištěna u 14 pacientů, zatímco dalších 69 pacientů bylo diagnostikováno jako sporadické případy. U 45 pacientů byla nalezena vzácná patogenní varianta některého z kardiomyopatických genů, která vedla k vysvětlení patogeneze onemocnění. Dle očekávání, spektrum genů nesoucích patogenní varianty bylo široké. Celkem byly nalezeny varianty ve 28 různých genech. Většinu těchto variant představovaly trunkující varianty v genu pro titin. Další varianty byly nalezeny zejména v sarkomerických genech, desmozomech a proteinech jaderné obálky. Méně časté byly varianty v genech, které kódují jaderné proteiny a v genech kódujících iontové kanály. Byly nalezeny také varianty v genech, které nebyly dříve přímo asociovány s DKMP, ale jsou anotovány buď k jiným skupinám kardiomyopatií anebo mají výrazně zvýšenou expresi v srdci a lze předpokládat, že mají vliv na funkci kontraktilního aparátu



kardiomyocytů. Tyto geny jsou dále studovány. U jedenácti pacientů jsme našli více patogenních variant, což koresponduje s výsledky jiných studií, že v případě kardiomyopatií se nemusí jednat o monogenní onemocnění (Burke et al., 2016).

Touto studií byla zjištěna korelace výsledků genetických analýz s dvanáctiměsíčním klinickým pozorováním pacientů. U pacientů, u kterých byla nalezena suspektně patogenní varianta jiného kardiomyopatického genu než titinu, byl zaznamenán významně nižší výskyt reverzní remodelace LKS ve srovnání s ostatními pacienty. Kontrolní skupinu tvořili pacienti s negativním genetickým vyšetřením.

Příspěvek autorky dizertace k této studii:

V rámci studie jsem se podílela na přípravě vzorků a jejich sekvenování. Prováděla jsem analýzu a celkové filtrování komplexních dat u celé skupiny pacientů s kardiomyopatiemi, tyto varianty jsem následně klasifikovala dle ACMG kritérií. Spolupracovala jsem na statistické analýze. Podílela jsem se na přípravě publikace, kde jsem sdíleným prvním autorem.

Chaloupka A., Piherova L., at al. **Genetic architecture of recent-onset dilated cardiomyopathy in Moravian patients assessed by whole-exome sequencing and its clinical correlates.** Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2019, 163(4):309-317 | DOI: 10.5507/bp.2018.054; IF = 1.00

### **5.2.2 Studium variant v genech kontraktilního systému kardiomyocytů vedoucích k různým fenotypickým projevům**

Desminopatie je vzácné dědičné onemocnění s prevalencí méně než 1 : 2 000 (Clemen et al., 2013), které je způsobeno patogenními variantami v desminu (Goldfarb et al., 1998). Mezi klinické projevy tohoto onemocnění patří kardiomyopatie, svalová myopatie, respirační dysfunkce a obličejová paralýza v podobě potíží s polykáním. První klinické příznaky se u pacientů objevují kolem třicátého roku života (Goldfarb et al., 2004). Pro desminopatie je charakteristickým nálezem záchyt desmin pozitivních agregátů, které pocházejí z degradovaných složek myofibrilárního aparátu a desminu v kosterním svalu a myokardu.

Desmin tvoří svalově specifická intermediální (střední) filamenta podílející se na tvorbě dynamické vnitrobuněčné sítě, která propojuje sarkomery se sarkolemou,

mitochondriemi a zajišťuje komunikaci s buněčným jádrem (Capetanaki et al., 2007). Hlavní funkcí této sítě je udržení morfologické integrity svalových buněk a buněčných organel během svalové kontrakce. Mutace v desminu nebo jeho absence často vedou k tvorbě agregátů tvořených jak desminem, tak i dalšími cytoskeletárními proteiny. Dochází k rozvolnění intracelulární sítě a deformaci sarkomerického aparátu („disarray“), což je mechanismus vedoucí k onemocnění.

Patogenní varianty v desminu jsou nejčastěji asociovány s dilatační kardiomyopatií (D. Li et al., 1999; Taylor et al., 2007; van Spaendonck-zwarts et al., 2011), méně často s restriktivní kardiomyopatií (Arbustini et al., 1998; Goldfarb et al., 1998; Purevjav et al., 2012) a arytmogenní kardiomyopatií (Klauke et al., 2010). U řady pacientů s desminopatií je zároveň popisována sekundární mitochondriální dysfunkce (McCormick et al., 2015).

Pacienty s desminopatií jsme pomocí celoexomového sekvenování identifikovali ve skupině 372 českých pacientů s neobjasněnou příčinou kardiomyopatie. Zastoupení jednotlivých typů kardiomyopatií v této skupině je uveden v tabulce č. 2. V této skupině jsme detekovali šest vzácných variant v genu *DES* (MAF<0,0005).

**Tab 2.** Zastoupení jednotlivých typů familiárních i sporadických kardiomyopatií ve skupině 372 českých pacientů vyšetřených pomocí celoexomového sekvenování.

Kardiomyopatie	Zastoupení pacientů ve skupině
Dilatační kardiomyopatie	81 %
Nonkompaktní kardiomyopatie	7 %
Restriktivní kardiomyopatie	6 %
Arytmogenní kardiomyopatie	6 %

Jednotlivé varianty, jejich lokalizace a druh diagnostikované kardiomyopatie jsou uvedeny v tabulce č. 3. Dříve provedená meta-analýza (van Spaendonck-zwarts et al., 2011) rozložení patogenních variant podél genu ve vztahu k fenotypu spojovala varianty nacházející se v 2B-helikální doméně p.(Q364H) a p.(R406W) se svalovým i srdečním fenotypem. Naopak, varianty nacházející se na N-konci proteinu se projevují zejména jako izolovaná kardiomyopatie, což bylo potvrzeno i u pacientů v naší studii.

Ve všech šesti rodinách bylo provedeno klinické kaskádové vyšetření i segreganční analýza. Ta ve třech rodinách potvrdila familiární výskyt onemocnění. S desminopatií byl

diagnostikován také pacient s nonkompaktní kardiomyopatií. Tento typ kardiomyopatie byl u desminopatií identifikován jen v několika málo případech (Arbustini et al., 2016; Marakhonov et al., 2019; van Waning et al., 2018).

**Tab 3.** *Varianty detekované v DES*

Varianta	Druh kardiomyopatie	Lokalizace
p.K43E	Arytmogenní KMP	N - konec
p.S57L	Dilatační KMP	N - konec
p.A210D	Dilatační KMP	1B $\alpha$ – helikální doména
p.Q364H	Nonkompaktní KMP + myopatie	2B $\alpha$ – helikální doména
p.R406W (Dalakas et al., 2000)	Arytmogenní KMP + myopatie	2B $\alpha$ – helikální doména
p.R454W (Bär et al., 2007)	Restriktivní KMP + myopatie	C - konec

U pěti pacientů bylo provedeno imunohistochemické vyšetření vzorků kosterního svalu a myokardu na přítomnost patogenních agregátů. Překvapivě nebyly v případě varianty p.(R454W) detekovány desminové agregáty v kosterním svalu, ale byly přítomny v srdeční tkáni. Proteomická analýza ukázala sníženou expresi desminu u této varianty pomocí Western blot analýzy. Tento nález je v souladu s již dříve publikovanými daty, kdy ke správnému určení diagnózy musí vést genetické vyšetření a diagnostika nemůže být založena na nálezů agregátů v kosterní svalovině (Clemen et al., 2013).

Podařilo se nám popsat nové varianty v desminu vedoucí k desminopatii. Potvrdili jsme široké fenotypové spektrum tohoto onemocnění a rozšířili jsme evidenci o vztahu desminopatie a nonkompaktní kardiomyopatie. Práce potvrdila nutnost genetické diagnostiky u pacientů s podezřením na desminopatie, kdy imunohistochemické vyšetření lze použít pouze pro případné potvrzení diagnózy.

Příspěvek autorky dizertace k této studii:

V rámci studie jsem se podílela na přípravě vzorků a sekvenování. Prováděla jsem analýzu celkové filtrování komplexních dat u celé skupiny pacientů s kardiomyopatiemi a ověřování variant a jejich segregaci v rodinách. Provedla jsem proteomickou analýzu

bioptických vzorků. Podílela jsem se na přípravě publikace, kde jsem sdíleným prvním autorem.

Kubánek M, Schimerová T, Piherová L. et al. **Desminopathy: Novel Desmin Variants, a New Cardiac Phenotype, and Further Evidence for Secondary Mitochondrial Dysfunction.** J Clin Med. 2020 Mar 29;9(4):937. doi: 10.3390/jcm9040937. IF = 3.303

### 5.2.3 Studium variant způsobujících Danonovu chorobu u žen

Danonova choroba (DD) je X-vázané onemocnění charakterizované u nemocných mužů mentální retardací, kardiomyopatií a myopatií kosterního svalu. Poprvé byla popsána v roce 1981 u dvou chlapců s mentální retardací, kardiomegalií a proximální myopatií. Ve svalové biopsii těchto (a všech dalších) DD pacientů byla pozorována výrazná vakuolizace cytoplazmy svalových buněk spojená s akumulací glykogenu avšak bez průvodního deficitu lysozomální alfa-glukosidasy (Danon et al., 1981). Molekulární podstata tohoto onemocnění byla definována až v roce 2000 (Nishino et al., 2000). Bylo zjištěno, že DD je způsobena mutacemi v lysozomálním membránovém proteinu 2 (*LAMP2*), které vedou k dysfunkci autofagozomálně-lysozomálního systému.

DD se manifestuje u mužů již v dětském věku, pravidlem je rozvoj pokročilého srdečního selhání během 2. decénia, zaznamenán byl i výskyt maligních komorových arytmií. Klinické podezření na DD vzniká u mladých mužů s těžkou formou hypertrofické kardiomyopatie, kteří mají v EKG extrémní voltáž QRS komplexů a obraz preexcitace. Diagnózu podporuje přítomnost mentální retardace a dále zvýšení aktivity kreatinkinázy v séru, která je indikátorem myopatie kosterního svalu. U mužů detekujeme patogenní varianty v genu *LAMP2* hemizygotně a patofyziologickým podkladem DD u mužů je ve většině případů úplná absence *LAMP2* ve tkáních. Prognóza přežití vzhledem k rychlému terminálnímu srdečnímu selhání a maligním arytmiím je u mužských pacientů velmi špatná. Terapeutickou metodou volby je u těchto pacientů transplantace srdce.

U žen, které jsou heterozygotkami pro patogenní *LAMP2* varianty, se onemocnění projevuje přibližně kolem 20. roku života a progreduje do terminální fáze až během 3. - 4. decénia. Deficit *LAMP2* u žen s DD je mozaikovitý a je ovlivněn stupněm X-inaktivace v konkrétní tkáni. Průměrný věk přežití žen s DD je 35 let, v různé míře je u nich vyjádřeno postižení kognitivních funkcí, postižení kosterního svalstva je minimální (Boucek et al.,

2011). Provedené meta-analýzy publikovaných studií o Danonově chorobě ukázaly, že podobně jako u mužů, významný podíl žen s DD dospěje k terminálnímu srdečnímu selhání (Brambatti et al., 2019). U některých žen je také popisováno riziko náhlé srdeční smrti v souvislosti s DD (Miani et al., 2012). Včasná identifikace žen s tímto onemocněním je důležitá pro jejich prognostickou stratifikaci a klinicko-genetické poradenství v jejich rodinách.

Glykoprotein LAMP2 je receptor lokalizovaný v lysozomální membráně. V buňkách je exprimován ve třech alternativních sestřihových variantách (B, A a C), které se liší v primární aminokyselinové sekvenci C-terminální transmembránové a cytosolické části proteinu. Nejhojnější varianta (LAMP2B) je kritickou proteinovou komponentou makroautofagické dráhy. Patogenní mutace v genu *LAMP2* vedou k deficitu proteinu v autofagozomálně-lysozomálním systému. Důsledkem je zejména dysfunkce procesu makroautofagie a důsledkem je akumulace vakuol v cytoplazmě.

Kvůli významné expresi LAMP2 v leukocytech periferní krve můžeme u pacientů s DD v těchto buňkách deficit LAMP2 snadno prokázat. U mužů s DD lze kompletní deficit LAMP2 v leukocytech potvrdit pomocí Western blotu (Fanin et al., 2006) nebo nátěru periferních krevních buněk (Regelsberger et al., 2009). Nicméně v současné době se diagnosticky využívá průtoková cytometrie (F. Majer et al., 2012; Sikora et al., 2015) a to jak u žen, tak i u mužů.

Většina z více než sto popsaných patogenních variant v genu *LAMP2* vede k poruchám syntézy proteinu. Kauzální *LAMP2* missense varianty jsou u DD velmi vzácné (Brambatti et al., 2019).

V rámci své práce jsem se postupně podílela na třech studiích popisujících molekulární podstatu Danonovy choroby u žen.

Ženy s DD se klinicky příliš neliší od jiných pacientek se srdečním selháním vzniklým na podkladě dilatační nebo hypertrofické kardiomyopatie. Úskalím pro molekulární diagnostiku DD může být přítomnost delecí *LAMP2*, které mohou být použitím klasických diagnostických metod přehlédnuty. Přitom ženy s DD mají nepochybně horší prognózu než jiné ženy s neischemickou kardiomyopatií, a protože jsou v reprodukčním věku, je správná diagnóza důležitá také z hlediska genetického poradenství.

Porovnání počtu diagnostikovaných pacientů a pacientek nás vedlo k zamyšlení, zda ženy nejsou v případě DD přehlíženy, a tím i poddiagnostikovány. Tyto důvody nás vedly

k provedení studie (Gurka et al., 2020) prevalence Danonovy choroby u žen s neischemickou kardiomyopatií, které dospěly do fáze pokročilého srdečního selhání před 40. rokem života.

V období od listopadu 2016 až do října 2018 jsme vyšetřili skupinu 60 žen, z nichž 47 bylo již po transplantaci srdce, 2 ženy byly na mechanické srdeční podpoře a 11 bylo v předtransplantačním sledování. U této skupiny jsme hodnotili klinická (zejména kardiologická) data. Abnormální EKG profily byly revidovány k potvrzení/vyloučení přítomnosti známk preexcitace.

Genetická příčina vzniku kardiomyopatie byla známá u 15 pacientek, z toho u dvou byla již dříve diagnostikována Danonova choroba. U zbylých 45 žen bez známé příčiny vzniku onemocnění bylo provedeno vyšetření periferní krve pomocí průtokové cytometrie na detekci LAMP2 deficitních buněk. Současně proběhlo u této skupiny celoxomové sekvenování. Pomocí těchto metod bylo popsáno 5 dalších pacientek s Danonovou chorobou.

Kombinací klinických dat, průtokové cytometrie a genetického vyšetření se nám podařilo charakterizovat skupinu žen s vážným srdečním selháním před 40 rokem života.

Fenotyp hypertrofické kardiomyopatie a elektrokardiografický obraz preexcitace byly signifikantně častější u pacientek s DD než u pacientek s jinými kardiomyopatiemi, nicméně neumožňovaly spolehlivou identifikaci žen s DD na základě jejich klinických nálezů. Zjištěná prevalence DD u žen s pokročilým srdečním selháním způsobeným neischemickou kardiomyopatií před 40. rokem života byla 12 %. Prokázali jsme, že použitá metoda průtokové cytometrie je efektivní screeningovou diagnostickou metoda pro detekci DD u žen.

Druhá studie (Filip Majer et al., 2018) byla zaměřena na hledání patogenních variant v genu *LAMP2* u dvou pacientek s klinickým podezřením na DD a s průkazem populace LAMP2 deficitních leukocytů pomocí průtokové cytometrie. V prvním případě se při amplifikaci specifické RNA podařilo připravit krátký PCR produkt, který prokázal delecí části genu. V druhém případě klasické metody nevedly k určení přesné molekulárně-genetické příčiny.

Využitím metod sekvenování nové generace a následnou detekcí změny genové dávky se nám podařilo u obou pacientek najít velké exonové delecce. V prvním případě se jednalo o delecí exonů 4-8 a v druhém o delecí exonů 4-9. Absence aberantního mRNA/cDNA produktu u druhé pacientky je pravděpodobně výsledkem „nonsense-

mediated mRNA decay (NMD)“ mechanismu. V obou případech byl nález velkých delecí ověřen pomocí qPCR.

Třetí studie (Filip Majer et al., 2020) byla zaměřena na hledání genetické příčiny onemocnění u další pacientky s podezřením na DD. Pacientce byla ve věku 25 let diagnostikována dilatační kardiomyopatie s oboustranným srdečním selháváním a o tři měsíce později podstoupila transplantaci srdce. Po 11 letech od klinické diagnózy dilatační kardiomyopatie bylo provedeno opětovné hodnocení EKG nálezů pacientky z doby před transplantací a jako jedna z možných příčin byla zvažována Danonova choroba.

Pro potvrzení či vyvrácení této diagnózy byla provedena průtoková cytometrie detekující LAMP2 deficitní buňky (granulocyty a monocyty). U této pacientky byla nalezená pouze malá populace (3 %) těchto buněk. Histopatologické vyšetření explantátu pacientky potvrdilo hypertrofii a vakuolizaci kardiomyocytů. Cílené imunohistochemické barvení sice potvrdilo přítomnost LAMP2 deficitních /LAMP2 pozitivních kardiomyocytů. Na rozdíl od leukocytů periferní krve, byl ale poměr obou populací kardiomyocytů ~1:1.

Stejně jako v předchozí studii klasické molekulárně-genetické nepomohly určit kauzální příčinu onemocnění. Proto jsme opět očekávali přítomnost velké delece na jedné z alel. Sekvenování genomu s nízkým pokrytím ukázalo na možnou delecí celého genu *LAMP2*.

Jedna hranice delece byla lokalizována v sousedním genu *CUL4B*. Trunkující varianty v genu *CUL4B* jsou u mužů asociovány s těžkou mentální retardací (Tarpey et al., 2007; Zou et al., 2007) a způsobují extrémní zešíkmení X-inaktivace, což vysvětluje nález malé populace LAMP2 deficitních buněk u pacientky. Ze sekvenačních dat bylo patrné, že delece je velmi rozsáhlá. Deletovány byly i další sousední geny *ATP1B4*, *TMEM255A* a *ZBTB33*. *ATP1B4* je svalově specifický protein lokalizovaný na vnitřní straně jaderné obálky (Zhao et al., 2004), *TMEM255A* je pravděpodobně transmembránový protein (UniProtKB) a *ZBTB33* je transkripční faktor obsahující zinkový prst zapojený do regulace buněčného cyklu (Schackmann et al., 2013). Fenotypický obraz variant v těchto genech není popisován, a proto příspěvek delece těchto genů ke klinickému obrazu pacientky není jasný.

Při snaze určit druhou hranici delece jsme použitím metody „PCR genome walking“ našli v místě zlomu genomové DNA zbytky Alu sekvencí (*AluJb* a *AluSx1*). Detailní analýzou této části genomu byla nalezena inverze homeoboxu *RHOXF2/RHOXF1/RHOXF2* jako součást komplexního Xq24 přeskupení.

Podářilo se nám popsat kauzální příčinu onemocnění u této pacientky, které bylo způsobeno delecí pěti genů.

Přispěvek autorky dizertace k těmto studiím:

V rámci studie jsem se podílela na přípravě vzorků a sekvenování. Prováděla jsem analýzy a celkové filtrování komplexních dat u celé skupiny patientek. Podílela jsem se na přípravě qPCR experimentů. Podílela jsem se na přípravě publikací, kde jsem ve dvou případech sdíleným prvním autorem.

A) Gurka J, Piherova L. et al. **Danon disease is an underdiagnosed cause of advanced heart failure in young female patients: a LAMP2 flow cytometric study.** ESC Heart Fail. 2020 Oct;7(5):2534-2543. doi: 10.1002/ehf2.12823. Epub 2020 Jul 13.; **IF = 3.407**

B) Majer F, Piherova L., et al. **LAMP2 exon-copy number variations in Danon disease heterozygote female probands: Infrequent or underdetected?** Am J Med Genet A. 2018 Sep 8. doi: 10.1002/ajmg.a.40430. PMID: 30194816; **IF = 2.125**

C) Majer F, Kousal B at al. **Alu-mediated Xq24 deletion encompassing CUL4B, LAMP2, ATP1B4, TMEM255A, and ZBTB33 genes causes Danon disease in a female patient.** Am J Med Genet A. 2020 Jan;182(1):219-223. doi: 10.1002/ajmg.a.61416. Epub 2019 Nov 15., **IF = 2.125**



## 6. Souhrn výsledků

Tato dizertační práce představuje využití nových metod sekvenace nové generace ve studiu molekulární podstaty vzácných onemocnění. Souhrnnými výsledky s ohledem na cíle dizertační práce jsou:

I. Studium genetické podstaty vybraných vzácných onemocnění a identifikace kauzálních genů a patogenních variant.

a) Identifikace kauzální nekódující mutace v genu *NDUFAF6*, a objasnění mechanismu vzniku vzácné varianty Fanconiho syndromu pomocí kombinace metod exomového a genomového sekvenování, homozygotního mapování a sekvenování transkriptů.

### **Příloha 1a**

b) Identifikace kauzálních variant v genu *PLDI* způsobujících vzácnou srdeční vývojovou vadu, rozšíření fenotypového spektra variant nalézajících se v *PLDI*. **Příloha 1b**

II. Studium genetické příčiny kardiomyopatií.

a) Sestavení genetické mapy u pacientů s recentně diagnostikovanou dilatační kardiomyopatií a provedení korelace klinických a genetických dat. **Příloha 2a**

b) Identifikace a studium nových variant v genu *DES* vedoucím k různým fenotypovým projevům. **Příloha 2b**

c) Identifikace nových patogenních variant způsobujících Danonovu chorobu u žen. **Přílohy 2c, 2d a 2e**

## 7. Význam dosažených výsledků

Výrazný pokrok v molekulárně-genetických metodách, konkrétně zavedení celoexomové sekvenace do klinické praxe, vedl ke zpřesnění diagnostiky řady vzácných onemocnění. I když v řadě případů nemáme k dispozici specifickou léčbu daných onemocnění, jsou tyto nálezy důležité pro pochopení patofyziologie těchto onemocnění, pro genetické poradenství a ve vybraných případech také pro rizikovou stratifikaci pacientů.

Obecnou limitací celoexomové sekvenace jsou finanční náročnost a dále velké časové, softwarové a hardwarové požadavky při bioinformatické analýze. Úskalí má také interpretace výsledků vyšetření, kdy jsou zachyceny velká množství variant nejasného významu, nebo lze zachytit závažné genetické varianty, které souvisí s jiným než vyšetřovaným onemocněním a mohou mít pro pacienta zásadní dopady. Prvním krokem ke komplexním molekulárně-genetickým vyšetřením je proto pečlivá klinicko-genetická konzultace, která po domluvě s pacientem stanoví hranice, v jakých se bude vyšetření a jeho interpretace pohybovat. Dalším krokem je pečlivá korelace genetických nálezů s klinickým obrazem onemocnění, nejlépe přímou komunikací s ošetřujícími lékaři. Nelze podceňovat ani metodu sdělení výsledku pacientovi a také další lékařskou a psychologickou péči.

Byla navázána úzká spolupráce s řadou českých kardiologických pracovišť (IKEM, II. interní klinika VFN Praha, I. interní kardiologická klinika FNUSA v Brně a I. interní klinika FNOL v Olomouci), která umožňuje studium geneticky podmíněných kardiomyopatií v České republice. Určení molekulárně-biologické podstaty onemocnění v korelaci s klinickými daty přispívají k detailnějšímu porozumění vzniku kardiomyopatií a k posunu diagnostických schémat ve směru zvyšující se důležitosti genetického testování u pacientů s kardiomyopatiemi a tvorbě multidisciplinárních týmů hodnotících genetické nálezy. Součástí spolupráce je i tvorba databáze lokálních variant a využití shodných interpretačních nástrojů mezi laboratořemi provádějícími vyšetření geneticky podmíněných onemocnění srdce.

## 8. Seznam publikací, které nejsou součástí dizertace

Kousal B, Majer F, Vlaskova H, Dvorakova L, Piherova L, Meliska M, Langrova H, Palecek T, Kubanek M, Krebsova A, Gurka J, Stara V, Michaelides M, Kalina T, Sikora J, Liskova P. **Pigmentary retinopathy can indicate the presence of pathogenic *LAMP2* variants even in somatic mosaic carriers with no additional signs of Danon disease.** Acta Ophthalmol. 2021 Feb;99(1):61-68. doi: 10.1111/aos.14478.; **IF = 3.153**

Rücklová K, Piherová L, Kubuš P. **Genetické příčiny syndromu náhlého úmrtí kojence. Co přineslo sekvenování nové generace.** Čes-slov Pediat 2020; 75 (1): 20-26.

Stránecký V, Neřoldová M, Hodaňová K, Hartmannová H, Piherová L, Zemánková P, Přistoupilová A, Vrablík M, Adámková V, Kmoch S, Jirsa M. **Large copy-number variations in patients with statin-associated myopathy affecting statin myopathy-related loci.** Physiol Res. 2016 Dec 13;65(6):1005-1011. doi: 10.33549/physiolres.933284.; **IF = 1.655**

Neřoldová M, Stránecký V, Hodaňová K, Hartmannová H, Piherová L, Přistoupilová A, Mrázová L, Vrablík M, Adámková V, Hubáček JA, Jirsa M, Kmoch S. **Rare variants in known and novel candidate genes predisposing to statin-associated myopathy.** Pharmacogenomics. 2016 Aug;17(13):1405-14. doi: 10.2217/pgs-2016-0071; **IF = 2.339**

Kmoch S, Majewski J, Ramamurthy V, Cao S, Fahiminiya S, Ren H, MacDonald IM, Lopez I, Sun V, Keser V, Khan A, Stránecký V, Hartmannová H, Přistoupilová A, Hodaňová K, Piherová L, Kuchař L, Baxová A, Chen R, Barsottini OG, Pyle A, Griffin H, Splitt M, Sallum J, Tolmie JL, Sampson JR, Chinnery P; Care4Rare Canada, Banin E, Sharon D, Dutta S, Grebler R, Helfrich-Foerster C, Pedroso JL, Kretzschmar D, Cayouette M, Koenekoop RK. **Mutations in *PNPLA6* are linked to photoreceptor degeneration and various forms of childhood blindness.** Nat Commun. 2015 Jan 9; 6:5614. doi: 10.1038/ncomms6614.; **IF = 12.121**

Hartmannova H, Kubanek M, Sramko M, Piherova L, Noskova L, Hodanova K, Stranecky V, Pristoupilova A, Sovova J, Marek T, Maluskova J, Ridzon P, Kautzner J, Hulkova H, Kmoch S. **Isolated X-linked hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel mutation of the four-and-a-half LIM domain 1 gene.** Circ Cardiovasc Genet. 2013 Dec;6(6):543-51. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000245; **IF = 4.534**

Stránecký V, Hoischen A, Hartmannová H, Zaki MS, Chaudhary A, Zudaire E, Nosková L, Barešová V, Přistoupilová A, Hodaňová K, Sovová J, Hůlková H, Piherová L, Hehir-Kwa JY, de Silva D, Senanayake MP, Farrag S, Zeman J, Martásek P, Baxová A, Afifi HH, St Croix B, Brunner HG, Temtamy S, Kmoč S. **Mutations in *ANTXR1* cause GAPO syndrome.** Am J Hum Genet. 2013 May 2;92(5):792-9. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.03.023. Epub 2013 Apr 18.; **IF = 10.502**

Cízková A, Stránecký V, Ivánek R, Hartmannová H, Nosková L, Piherová L, Tesarová M, Hansíková H, Honzík T, Zeman J, Divina P, Potocká A, Paul J, Sperl W, Mayr JA, Seneca S, Houstěk J, Kmoč S. **Development of a human mitochondrial oligonucleotide microarray (h-MitoArray) and gene expression analysis of fibroblast cell lines from 13 patients with isolated F1Fo ATP synthase deficiency.** BMC Genomics. 2008 Jan 25; 9:38. doi: 10.1186/1471-2164-9-38.; **IF = 3.730**

Bystricka D, Lenz O, Mraz I, Piherova L, Kmoč S, Sip M. **Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses.** J Virol Methods. 2005 Sep;128(1-2):176-82. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.04.009.; **IF = 1.746**

Stibůrková B, Majewski J, Hodanová K, Ondrová L, Jerábková M, Zikánová M, Vylet'al P, Sebesta I, Marinaki A, Simmonds A, Matthijs G, Fryns JP, Torres R, Puig JG, Ott J, Kmoč S. **Familial juvenile hyperuricaemic nephropathy (FJHN): linkage analysis in 15 families, physical and transcriptional characterisation of the FJHN critical region on chromosome 16p11.2 and the analysis of seven candidate genes.** Eur J Hum Genet. 2003 Feb;11(2):145-54. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200937.; **IF = 4.349**

Kmoč S, Brynda J, Asfaw B, Bezouska K, Novák P, Rezacová P, Ondrová L, Filipec M, Sedláček J, Elleder M. **Link between a novel human gammaD-crystallin allele and a unique cataract phenotype explained by protein crystallography.** Hum Mol Genet. 2000 Jul 22;9(12):1779-86. doi: 10.1093/hmg/9.12.1779.; **IF = 5.10**

## 9. Literatura

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., Korbel, J. O., Marchini, J. L., McCarthy, S., McVean, G. A., & Abecasis, G. R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, *526*(7571), 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
- Ali, H., Braga, L., & Giacca, M. (2020). Cardiac regeneration and remodelling of the cardiomyocyte cytoarchitecture. *FEBS Journal*, *287*(3), 417–438. <https://doi.org/10.1111/febs.15146>
- Arbustini, E., Favalli, V., Narula, N., Serio, A., & Grasso, M. (2016). Left Ventricular Noncompaction: A Distinct Genetic Cardiomyopathy? *Journal of the American College of Cardiology*, *68*(9), 949–966. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.05.096>
- Arbustini, E., Morbini, P., Grasso, M., Fasani, R., Verga, L., Bellini, O., Dal Bello, B., Campana, C., Piccolo, G., Febo, O., Opasich, C., Gavazzi, A., & Ferrans, V. J. (1998). Restrictive cardiomyopathy, atrioventricular block and mild to subclinical myopathy in patients with desmin-immunoreactive material deposits. *Journal of the American College of Cardiology*, *31*(3), 645–653. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(98\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(98)00026-6)
- Ardui, S., Ameer, A., Vermeesch, J. R., & Hestand, M. S. (2018). Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Research*, *46*(5), 2159–2168. <https://doi.org/10.1093/nar/gky066>
- Bär, H., Goudeau, B., Wälde, S., Casteras-Simon, M., Mücke, N., Shatunov, A., Goldberg, Y. P., Clarke, C., Holton, J. L., Eymard, B., Katus, H. A., Fardeau, M., Goldfarb, L., Vicart, P., & Herrmann, H. (2007). Conspicuous involvement of desmin tail mutations in diverse cardiac and skeletal myopathies. *Human Mutation*, *28*(4), 374–386. <https://doi.org/10.1002/humu.20459>
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L., Bignell, H. R., Boutell, J. M., Bryant, J., Carter, R. J., Keira Cheetham, R., Cox, A. J., Ellis, D. J., Flatbush, M. R., Gormley, N. A., Humphray, S. J., ... Smith, A. J. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, *456*(7218), 53–59.

<https://doi.org/10.1038/nature07517>

- Bökenkamp, A., & Ludwig, M. (2010). Disorders of the renal proximal tubule. *Nephron - Physiology*, *118*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1159/000320880>
- Boucek, D., Jirikowic, J., & Taylor, M. (2011). Natural history of Danon disease. *Genetics in Medicine*, *13*(6), 563–568. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31820ad795>
- Brambatti, M., Caspi, O., Maolo, A., Koshi, E., Greenberg, B., Taylor, M. R. G., & Adler, E. D. (2019). Danon disease: Gender differences in presentation and outcomes. *International Journal of Cardiology*, *286*, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.01.020>
- Burke, M. A., Cook, S. A., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2016). Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, *68*(25), 2871–2886. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.08.079>
- Calcagni, G., Adorisio, R., Martinelli, S., Grutter, G., Baban, A., Versacci, P., Digilio, M. C., Drago, F., Gelb, B. D., Tartaglia, M., & Marino, B. (2018). Clinical Presentation and Natural History of Hypertrophic Cardiomyopathy in RASopathies. *Heart Failure Clinics*, *14*(2), 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2017.12.005>
- Capetanaki, Y., Bloch, R. J., Kouloumenta, A., Mavroidis, M., & Psarras, S. (2007). Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Experimental Cell Research*, *313*(10), 2063–2076. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.033>
- Charron, P., Arad, M., Arbustini, E., Basso, C., Bilinska, Z., Elliott, P., Helio, T., Keren, A., McKenna, W. J., Monserrat, L., Pankuweit, S., Perrot, A., Rapezzi, C., Ristic, A., Seggewiss, H., Van Langen, I., & Tavazzi, L. (2010). Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: A position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal*, *31*(22), 2715–2728. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq271>
- Clarke, J., Wu, H. C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S., & Bayley, H. (2009). Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.12>
- Clemen, C. S., Herrmann, H., Strelkov, S. V., & Schröder, R. (2013). Desminopathies: Pathology and mechanisms. *Acta Neuropathologica*, *125*(1), 47–75.

<https://doi.org/10.1007/s00401-012-1057-6>

Cock, P. J. A., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., & Rice, P. M. (2010). The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*, *38*(6), 1767–1771.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkp1137>

Codd, M. B., Sugrue, D. D., Gersh, B. J., & Melton, L. J. (1989). Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy: A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*, *80*(3), 564–572.

<https://doi.org/10.1161/01.CIR.80.3.564>

Dalakas, M. C., Park, K. Y., Semino-Mora, C., Lee, H. S., Sivakumar, K., & Goldfarb, L. G. (2000). Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *The New England Journal of Medicine*, *342*(11), 770–780. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003163421104>

Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., & Durbin, R. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, *27*(15), 2156–2158.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>

Danon, M. J., Oh, S. J., DiMauro, S., Manaligod, J. R., Eastwood, A., Naidu, S., & Schliselfeld, L. H. (1981). Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology*, *31*(1), 51 LP – 51. <https://doi.org/10.1212/WNL.31.1.51>

Dolk, H., Loane, M., & Garne, E. (2011). Congenital heart defects in Europe: Prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005. *Circulation*, *123*(8), 841–849.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.958405>

Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., DeWinter, A., Dixon, J., ... Turner, S. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, *323*(5910), 133–138.

<https://doi.org/10.1126/science.1162986>

Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kühl, U., Maisch, B., McKenna, W. J., Monserrat, L., Pankuweit, S., Rapezzi, C., Seferovic, P., Tavazzi, L., & Keren, A. (2008). Classification of the

- cardiomyopathies: A position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal*, 29(2), 270–276. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm342>
- European Union. (2000). *Regulation (EC) N°141/2000 of the European Parliament and of the Council of 16 December 1999 on orphan medicinal products.*
- Fanin, M., Nascimbeni, A. C., Fulizio, L., Spinazzi, M., Melacini, P., & Angelini, C. (2006). Generalized lysosome-associated membrane protein-2 defect explains multisystem clinical involvement and allows leukocyte diagnostic screening in danon disease. *American Journal of Pathology*, 168(4), 1309–1320. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050646>
- Federal Food, Drug, and C. A. (1983). Orphan Drug Act. *WEEKLY COMPILATION OF PRESIDENTIAL DOCUMENTS*, 19(1), 2049–2066.
- Ferreira, C. R. (2019). The burden of rare diseases. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 179(6), 885–892. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61124>
- Flicek, P., & Birney, E. (2009). Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly. *Nature Methods*, 6(S11), S6–S12. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1376>
- Freeman, J. L. (2006). Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Research*, 16(8), 949–961. <https://doi.org/10.1101/gr.3677206>
- Goldfarb, L. G., Park, K. Y., Cervenákova, L., Gorokhova, S., Lee, H. S., Vasconcelos, O., Nagle, J. W., Semino-Mora, C., Sivakumar, K., & Dalakas, M. C. (1998). Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nature Genetics*, 19(4), 402–403. <https://doi.org/10.1038/1300>
- Goldfarb, L. G., Vicart, P., Goebel, H. H., & Dalakas, M. C. (2004). Desmin myopathy. *Brain*, 127(4), 723–734. <https://doi.org/10.1093/brain/awh033>
- Guo, W., Schafer, S., Greaser, M. L., Radke, M. H., Liss, M., Govindarajan, T., Maatz, H., Schulz, H., Li, S., Parrish, A. M., Dauksaite, V., Vakeel, P., Klaassen, S., Gerull, B., Thierfelder, L., Regitz-Zagrosek, V., Hacker, T. A., Saupe, K. W., Dec, G. W., ... Gotthardt, M. (2012). RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing. *Nature Medicine*, 18(5), 766–773. <https://doi.org/10.1038/nm.2693>
- Gurka, J., Piherova, L., Majer, F., Chaloupka, A., Zakova, D., Pelak, O., Krebsova, A., Peichl, P., Krejci, J., Freiburger, T., Melenovsky, V., Kautzner, J., Kalina, T., Sikora,



- J., & Kubanek, M. (2020). Danon disease is an underdiagnosed cause of advanced heart failure in young female patients: a LAMP2 flow cytometric study. *ESC Heart Failure*, 7(5), 2534–2543. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12823>
- Hall, A. M., Bass, P., & Unwin, R. J. (2014). Drug-induced renal fanconi syndrome. *Qjm*, 107(4), 261–269. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hct258>
- Hartmannova, H., Piherova, L., Tauchmannová, K., Kidd, K., Acott, P. D., Crocker, J. F. S., Oussedik, Y., Mallet, M., Hodaňová, K., Stránecký, V., Přistoupilová, A., Barešová, V., Jedličková, I., Živná, M., Sovová, J., Hůlková, H., Robins, V., Vrbacký, M., Pecina, P., ... Kmoch, S. (2016). Acadian variant of Fanconi syndrome is caused by mitochondrial respiratory chain complex I deficiency due to a non-coding mutation in complex I assembly factor NDUFAF6. *Human Molecular Genetics*, 25(18), 4062–4079. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw245>
- Hershberger, R. E., Givertz, M. M., Ho, C. Y., Judge, D. P., Kantor, P. F., McBride, K. L., Morales, A., Taylor, M. R. G., Vatta, M., & Ware, S. M. (2018). Genetic Evaluation of Cardiomyopathy—A Heart Failure Society of America Practice Guideline. *Journal of Cardiac Failure*, 24(5), 281–302. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2018.03.004>
- Hershberger, R. E., Hedges, D. J., & Morales, A. (2013). Dilated cardiomyopathy: The complexity of a diverse genetic architecture. *Nature Reviews Cardiology*, 10(9), 531–547. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2013.105>
- Ignatov, K. B., Blagodatskikh, K. A., Shcherbo, D. S., Kramarova, T. V., Monakhova, Y. A., & Kramarov, V. M. (2019). Fragmentation Through Polymerization (FTP): A new method to fragment DNA for next-generation sequencing. *PLOS ONE*, 14(4), e0210374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210374>
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011), 931–945. <https://doi.org/10.1038/nature03001>
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., Walters, R. K., ... MacArthur, D. G. (2019). Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *BioRxiv*, 531210.

<https://doi.org/10.1101/531210>

Kitterer, D., Schwab, M., Alscher, M. D., Braun, N., & Latus, J. (2015). Drug-induced acid-base disorders. *Pediatric Nephrology*, *30*(9), 1407–1423.

<https://doi.org/10.1007/s00467-014-2958-5>

Klauke, B., Kossmann, S., Gaertner, A., Brand, K., Stork, I., Brodehl, A., Dieding, M., Walhorn, V., Anselmetti, D., Gerdes, D., Bohms, B., Schulz, U., Zu Knyphausen, E., Vorgerd, M., Gummert, J., & Milting, H. (2010). De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*, *19*(23), 4595–4607. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq387>

Klootwijk, E. D., Reichold, M., Unwin, R. J., Kleta, R., Warth, R., & Bockenhauer, D. (2015). Renal Fanconi syndrome: Taking a proximal look at the nephron. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *30*(9), 1456–1460. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu377>

Kraus, A. J., Brink, B. G., & Siegel, T. N. (2019). Efficient and specific oligo-based depletion of rRNA. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48692-2>

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., ... International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>

Lander, Eric S, & Botstein, D. (1987). Homozygosity Mapping : A Way to Map Human Recessive Traits with the DNA of Inbred Children. *Science*, *236*(4808), 1567–1570.

Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A. H., Ware, J. S., Hill, A. J., Cummings, B. B., Tukiainen, T., Birnbaum, D. P., Kosmicki, J. A., Duncan, L. E., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Berghout, J., ... MacArthur, D. G. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, *536*(7616), 285–291. <https://doi.org/10.1038/nature19057>

Li, D., Tapscoft, T., Gonzalez, O., Burch, P. E., Quiñones, M. A., Zoghbi, W. A., Hill, R., Bachinski, L. L., Mann, D. L., & Roberts, R. (1999). Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*, *100*(5), 461–464.

<https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.5.461>

Li, S., Guo, W., Dewey, C. N., & Greaser, M. L. (2013). Rbm20 regulates titin alternative splicing as a splicing repressor. *Nucleic Acids Research*, *41*(4), 2659–2672.

<https://doi.org/10.1093/nar/gks1362>

Majer, F., Vlaskova, H., Krol, L., Kalina, T., Kubanek, M., Stolnaya, L., Dvorakova, L., Elleder, M., & Sikora, J. (2012). Danon disease: A focus on processing of the novel LAMP2 mutation and comments on the beneficial use of peripheral white blood cells in the diagnosis of LAMP2 deficiency. *Gene*, *498*(2), 183–195.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.02.004>

Majer, Filip, Kousal, B., Dusek, P., Piherova, L., Reboun, M., Mihalova, R., Gurka, J., Krebsova, A., Vlaskova, H., Dvorakova, L., Krihova, J., Liskova, P., Kmoch, S., Kalina, T., Kubanek, M., & Sikora, J. (2020). Alu-mediated Xq24 deletion encompassing CUL4B, LAMP2, ATP1B4, TMEM255A, and ZBTB33 genes causes Danon disease in a female patient. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *182*(1), 219–223. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61416>

Majer, Filip, Piherova, L., Reboun, M., Stara, V., Pelak, O., Norambuena, P., Stranecky, V., Krebsova, A., Vlaskova, H., Dvorakova, L., Kmoch, S., Kalina, T., Kubanek, M., & Sikora, J. (2018). LAMP2 exon-copy number variations in Danon disease heterozygote female probands: Infrequent or underdetected? *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *176*(11), 2430–2434. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.40430>

Mamanova, L., Coffey, A. J., Scott, C. E., Kozarewa, I., Turner, E. H., Kumar, A., Howard, E., Shendure, J., & Turner, D. J. (2010). Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nature Methods*, *7*(2), 111–118.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.1419>

Marakhonov, A. V., Brodehl, A., Myasnikov, R. P., Sparber, P. A., Kiseleva, A. V., Kulikova, O. V., Meshkov, A. N., Zharikova, A. A., Koretsky, S. N., Kharlap, M. S., Stanasiuk, C., Mershina, E. A., Sinitsyn, V. E., Shevchenko, A. O., Mozheyko, N. P., Drapkina, O. M., Boytsov, S. A., Milting, H., & Skoblov, M. Y. (2019). Noncompaction cardiomyopathy is caused by a novel in-frame desmin (DES) deletion mutation within the 1A coiled-coil rod segment leading to a severe filament assembly defect. *Human Mutation*, *40*(6), 734–741. <https://doi.org/10.1002/humu.23747>

Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), 560–564.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
- Mazzarotto, F., Tayal, U., Buchan, R. J., Midwinter, W., Wilk, A., Whiffin, N., Govind, R., Mazaika, E., De Marvao, A., Dawes, T. J. W., Felkin, L. E., Ahmad, M., Theotokis, P. I., Edwards, E., Ing, A. Y., Thomson, K. L., Chan, L. L. H., Sim, D., Baksi, A. J., ... Walsh, R. (2020). Reevaluating the Genetic Contribution of Monogenic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*, 143(3), 387–398.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.037661>
- McCormick, E. M., Kenyon, L., & Falk, M. J. (2015). Desmin common mutation is associated with multi-systemic disease manifestations and depletion of mitochondria and mitochondrial DNA. *Frontiers in Genetics*, 6(JUN), 1–5.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00199>
- McKenna, W. J., Maron, B. J., & Thiene, G. (2017). Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circulation Research*, 121(7), 722–730.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309711>
- McKenzie, M., Tucker, E. J., Compton, A. G., Lazarou, M., George, C., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2011). Mutations in the gene encoding C8orf38 block complex I assembly by inhibiting production of the mitochondria-encoded subunit ND1. *Journal of Molecular Biology*, 414(3), 413–426. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.10.012>
- McNally, E. M., & Mestroni, L. (2017). Dilated cardiomyopathy: Genetic determinants and mechanisms. *Circulation Research*, 121(7), 731–748.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309396>
- Merlo, M., Pyxaras, S. A., Pinamonti, B., Barbati, G., Di Lenarda, A., & Sinagra, G. (2011). Prevalence and prognostic significance of left ventricular reverse remodeling in dilated cardiomyopathy receiving tailored medical treatment. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(13), 1468–1476.  
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.11.030>
- Miani, D., Taylor, M., Mestroni, L., D'Aurizio, F., Finato, N., Fanin, M., Brigido, S., & Proclemer, A. (2012). Sudden death associated with Danon disease in women. *American Journal of Cardiology*, 109(3), 406–411.  
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.09.024>

- Milting, H., Klauke, B., Christensen, A. H., Müsebeck, J., Walhorn, V., Grannemann, S., Münnich, T., Šarič, T., Rasmussen, T. B., Jensen, H. K., Mogensen, J., Baecker, C., Romaker, E., Laser, K. T., Zu Knyphausen, E., Kassner, A., Gummert, J., Judge, D. P., Connors, S., ... Anselmetti, D. (2015). The TMEM43 Newfoundland mutation p.S358L causing ARVC-5 was imported from Europe and increases the stiffness of the cell nucleus. *European Heart Journal*, *36*(14), 872–881.  
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu077>
- Nelson, R. K., & Frohman, M. A. (2015). Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D. *Journal of Lipid Research*, *56*(12), 2229–2237.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.R059220>
- Nguengang, S., Deborah, W., Annie, M. L., Charlotte, O., Charlotte, R., Lanneau, V., Murphy, D., Le, Y., & Ana, C. (2020). Estimating cumulative point prevalence of rare diseases : analysis of the Orphanet database. *European Journal of Human Genetics*, 165–173. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>
- Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, J. E., Oh, S. J., Koga, Y., Sue, C. M., Yamamoto, A., Murakami, N., Shanske, S., Byrne, E., Bonilla, E., Nonaka, I., DiMauro, S., & Hirano, M. (2000). Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease) [In Process Citation]. *Nature*, *406*(6798), 906–910.
- Payne, A., Holmes, N., Rakyan, V., & Loose, M. (2019). Bulkvis: A graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files. *Bioinformatics*, *35*(13), 2193–2198.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty841>
- Pereira, R., Oliveira, J., & Sousa, M. (2020). Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(1), 132. <https://doi.org/10.3390/jcm9010132>
- Pinto, Y. M., Elliott, P. M., Arbustini, E., Adler, Y., Anastakis, A., Böhm, M., Duboc, D., Gimeno, J., De Groote, P., Imazio, M., Heymans, S., Klingel, K., Komajda, M., Limongelli, G., Linhart, A., Mogensen, J., Moon, J., Pieper, P. G., Seferovic, P. M., ... Charron, P. (2016). Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: A position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal*, *37*(23), 1850–1858.

<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv727>

- Purevjav, E., Arimura, T., Augustin, S., Huby, A. C., Takagi, K., Nunoda, S., Kearney, D. L., Taylor, M. D., Terasaki, F., Bos, J. M., Ommen, S. R., Shibata, H., Takahashi, M., Itoh-satoh, M., Mckenna, W. J., Murphy, R. T., Labeit, S., Yamanaka, Y., Machida, N., ... Towbin, J. A. (2012). Molecular basis for clinical heterogeneity in inherited cardiomyopathies due to myopalladin mutations. *Human Molecular Genetics*, *21*(9), 2039–2053. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds022>
- Pushkarev, D., Neff, N. F., & Quake, S. R. (2009). Single-molecule sequencing of an individual human genome. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1561>
- Regelsberger, G., Höftberger, R., Pickl, W. F., Zlabinger, G. J., Körmöczi, U., Salzer-Muhar, U., Luckner, D., Bodamer, O. A., Mayr, J. A., Muss, W. H., Budka, H., & Bernheimer, H. (2009). Danon disease: Case report and detection of new mutation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *32*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1007/s10545-009-1097-9>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S. J., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., & Committee, A. L. Q. A. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *17*(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Richter, T., Nestler-Parr, S., Babela, R., Khan, Z. M., Tesoro, T., Molsen, E., & Hughes, D. A. (2015). Rare Disease Terminology and Definitions-A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value in Health*, *18*(6), 906–914. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2015.05.008>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Wenger, A. M., Zehir, A., & Mesirov, J. P. (2017). Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Research*, *77*(21), e31–e34. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0337>
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., ... Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome

- sequencing. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10242>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schackmann, R. C. J., Tenhagen, M., van de Ven, R. A. H., & Derksen, P. W. B. (2013). P120-catenin in cancer - mechanisms, models and opportunities for intervention. *Journal of Cell Science*, *126*(16), 3515–3525. <https://doi.org/10.1242/jcs.134411>
- Schafer, S., De Marvao, A., Adami, E., Fiedler, L. R., Ng, B., Khin, E., Rackham, O. J. L. L., Van Heesch, S., Pua, C. J., Kui, M., Walsh, R., Tayal, U., Prasad, S. K., Dawes, T. J. W. W., Ko, N. S. J. J., Sim, D., Chan, L. L. H. H., Chin, C. W. L. L., Mazzarotto, F., ... Cook, S. A. (2017). Titin-truncating variants affect heart function in disease cohorts and the general population. *Nature Genetics*, *49*(1), 46–53. <https://doi.org/10.1038/ng.3719>
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). Mutationtaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods*, *11*(4), 361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
- Sikora, J., Majer, F., & Kalina, T. (2015). LAMP2 flow cytometry in peripheral white blood cells is an established method that facilitates identification of heterozygous Danon disease female patients and mosaic mutation carriers. *Journal of Cardiology*, *66*(1), 88–89. <https://doi.org/10.1016/j.jcc.2014.12.014>
- Sobreira, N., Schiettecatte, F., Valle, D., & Hamosh, A. (2015). GeneMatcher: A Matching Tool for Connecting Investigators with an Interest in the Same Gene. *Human Mutation*, *36*(10), 928–930. <https://doi.org/10.1002/humu.22844>
- Solano, A., Lew, S. Q., & Ing, T. S. (2014). Dent-wrong disease and other rare causes of the Fanconi syndrome. *Clinical Kidney Journal*, *7*(4), 344–347. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfu070>
- Sweet, M. E., Mestroni, L., & Taylor, M. R. G. (2018). Genetic Infiltrative Cardiomyopathies. *Heart Failure Clinics*, *14*(2), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2017.12.003>
- Tarpey, P. S., Raymond, F. L., O'Meara, S., Edkins, S., Teague, J., Butler, A., Dicks, E., Stevens, C., Tofts, C., Avis, T., Barthorpe, S., Buck, G., Cole, J., Gray, K., Halliday,

- K., Harrison, R., Hills, K., Jenkinson, A., Jones, D., ... Partington, M. (2007). Mutations in CUL4B, Which Encodes a Ubiquitin E3 Ligase Subunit, Cause an X-linked Mental Retardation Syndrome Associated with Aggressive Outbursts, Seizures, Relative Macrocephaly, Central Obesity, Hypogonadism, Pes Cavus, and Tremor. *The American Journal of Human Genetics*, *80*(2), 345–352.  
<https://doi.org/10.1086/511134>
- Taylor, M. R. G., Slavov, D., Ku, L., Di Lenarda, A., Sinagra, G., Carniel, E., Haubold, K., Boucek, M. M., Ferguson, D., Graw, S. L., Zhu, X., Cavanaugh, J., Sucharov, C. C., Long, C. S., Bristow, M. R., Lavori, P., & Mestroni, L. (2007). Prevalence of desmin mutations in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, *115*(10), 1244–1251.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646778>
- The Lancet Diabetes & Endocrinology. (2019). Spotlight on rare diseases. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *7*(2), 75. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30006-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30006-3)
- van der Zwaag, P. A., van Rijsingen, I. A. W., de Ruiter, R., Nannenberg, E. A., Groeneweg, J. A., Post, J. G., Hauer, R. N. W., van Gelder, I. C., van den Berg, M. P., van der Harst, P., Wilde, A. A. M., & van Tintelen, J. P. (2013). Recurrent and founder mutations in the Netherlands-Phospholamban p.Arg14del mutation causes arrhythmogenic cardiomyopathy. *Netherlands Heart Journal*, *21*(6), 286–293.  
<https://doi.org/10.1007/s12471-013-0401-3>
- van Spaendonck-zwarts, K. Y., van Hessem, L., Jongbloed, J. D. H., & de Walle, H. E. K. (2011). Desmin-related myopathy: a review and meta-analysis. In *Clinical genetics* (Issue 80, pp. 354–366).
- van Waning, J. I., Caliskan, K., Hoedemaekers, Y. M., van Spaendonck-Zwarts, K. Y., Baas, A. F., Boekholdt, S. M., van Melle, J. P., Teske, A. J., Asselbergs, F. W., Backx, A. P. C. M., du Marchie Sarvaas, G. J., Dalinghaus, M., Breur, J. M. P. J., Linschoten, M. P. M., Verlooi, L. A., Kardys, I., Dooijes, D., Lekanne Deprez, R. H., IJpma, A. S., ... Majoor-Krakauer, D. (2018). Genetics, Clinical Features, and Long-Term Outcome of Noncompaction Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, *71*(7), 711–722. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.12.019>
- Vissers, L. E. L. M., Van Nimwegen, K. J. M., Schieving, J. H., Kamsteeg, E. J., Kleefstra, T., Yntema, H. G., Pfundt, R., Van Der Wilt, G. J., Krabbenborg, L., Brunner, H. G., Van Der Burg, S., Grutters, J., Veltman, J. A., & Willemsen, M. A. A. P. (2017). A



clinical utility study of exome sequencing versus conventional genetic testing in pediatric neurology. *Genetics in Medicine*, 19(9), 1055–1063.

<https://doi.org/10.1038/gim.2017.1>

Wornell, P., Crocker, J. F. S., Wade, A., Dixon, J., & Acott, P. D. (2007). An Acadian variant of Fanconi syndrome. *Pediatric Nephrology*, 22(10), 1711–1715.

<https://doi.org/10.1007/s00467-007-0553-8>

Yancy, C. W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D. E., Drazner, M. H., Fonarow, G. C., Geraci, S. A., Horwich, T., Januzzi, J. L., Johnson, M. R., Kasper, E. K., Levy, W. C., Masoudi, F. A., McBride, P. E., McMurray, J. J. V., Mitchell, J. E., Peterson, P. N., Riegel, B., ... Wilkoff, B. L. (2013). 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: A report of the american college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines. *Circulation*, 128(16), 240–327.

<https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31829e8776>

Zhao, H., Pestov, N. B., Korneenko, T. V., Shakhparonov, M. I., & Modyanov, N. N.

(2004). Accumulation of  $\beta$ m, a structural member of X,K-ATPase  $\beta$ -subunit family, in nuclear envelopes of perinatal myocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 286(4 55-4), 757–767. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00358.2003>

Zou, Y., Liu, Q., Chen, B., Zhang, X., Guo, C., Zhou, H., Li, J., Gao, G., Guo, Y., Yan, C., Wei, J., Shao, C., & Gong, Y. (2007). Mutation in CUL4B, Which Encodes a Member of Cullin-RING Ubiquitin Ligase Complex, Causes X-Linked Mental Retardation.

*The American Journal of Human Genetics*, 80(3), 561–566.

<https://doi.org/10.1086/512489>

## **10 Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace**