

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta

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

Ing. Lenka Piherová

2021

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Školící pracoviště: Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, Laboratoř pro studium vzácných nemocí.

Školitel: prof. Ing. Stanislav Kmoch, CSc.

Konzultant: MUDr. Jakub Sikora, PhD.

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

# Obsah

Obsah.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	4
Úvod.....	5
Cíle práce.....	5
Metodika.....	6
Sekvenační technologie.....	6
Sekvenování nové generace (NGS).....	6
Výsledky.....	9
I. Studium genetické podstaty vybraných vzácných onemocnění a identifikace kauzálních genů a patogenních variant.....	9
I.a Objasnění molekulární podstaty vzácné akadské varianty Fanconiho syndromu.....	9
I.b Objasnění molekulární podstaty vzácné vrozené srdeční vady. ....	10
II. Studium genetické příčiny kardiomyopatií.....	11
II.a Studium architektury dilatační kardiomyopatie (DKMP) a patofyziologických mechanismů vedoucích k fenotypovému obrazu remodelace levé komory srdeční a k srdečnímu selhání.....	12
II.b Studium variant v genech kontraktilního systému kardiomyocytů vedoucích k různým fenotypickým projevům. ....	13
II.c Studium variant způsobujících Danonovu chorobu u žen. ....	14
Závěr.....	17
Použitá literatura .....	18
Seznam publikací doktoranda: .....	21
1. publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertace.....	21
2. Publikace <i>in extenso</i> bez vztahu k tématu disertace.....	22

## 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 akadské 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.

## 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 *NDUFAF6* and *PLDI* 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.

# 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.

Ve své dizertační 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.

## Cíle práce

Cílem této dizertační práce bylo využití metod sekvenování nové generace ke studiu vybraných vzácných onemocnění a identifikované kandidátní geny a nalezené varianty charakterizovat pomocí dostupných molekulárně genetických, buněčných a proteomických technik.

Jednotlivé části dizertační práce:

- I. Studium genetické podstaty vybraných vzácných onemocnění a identifikace kauzálních genů a patogenních variant.
  - a. Objasnění molekulární podstaty vzácné akadáské varianty Fanconiho syndromu.
  - b. Objasnění molekulární podstaty vzácné vrozené srdeční vady.
- II. Studium genetické příčiny kardiomyopatií.

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

- a. Studium variant v genech kontraktálního systému kardiomyocytů vedoucích k různým fenotypickým projevům.
- b. Studium variant způsobujících Danonovu chorobu.

## Metodika

Z důvodu nutnosti vysokokapacitního sekvenování byly vyvinuty nové technologie sekvenování (NGS, Next Generation Sequencing). Ty umožňují sekvenovat až stovky miliónů molekul najednou a jsou označovány jako masivně paralelní sekvenování (Massively Parallel Sequencing).

### 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; Lander et al., 2001). Limitem této technologie je vysoká cena a možnost číst maximálně stovky vzorků najednou o délce ~1000 párů bází (bp).

Z důvodu nutnosti 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.

### Sekvenování nové generace (NGS)

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.

#### 1. Příprava, obohacení a amplifikace DNA knihovny

Molekula DNA je nejprve naštěpena na kratší fragmenty. V současné době je nejpoužívanější mechanická nebo enzymatická metoda. Následuje enzymatické ošetření konců a ligace adaptorů. Při následné amplifikaci pomocí přidaných adaptorů jsou fragmenty specificky označeny přidáním unikátního kódu. Pro hybridizaci jsou použity

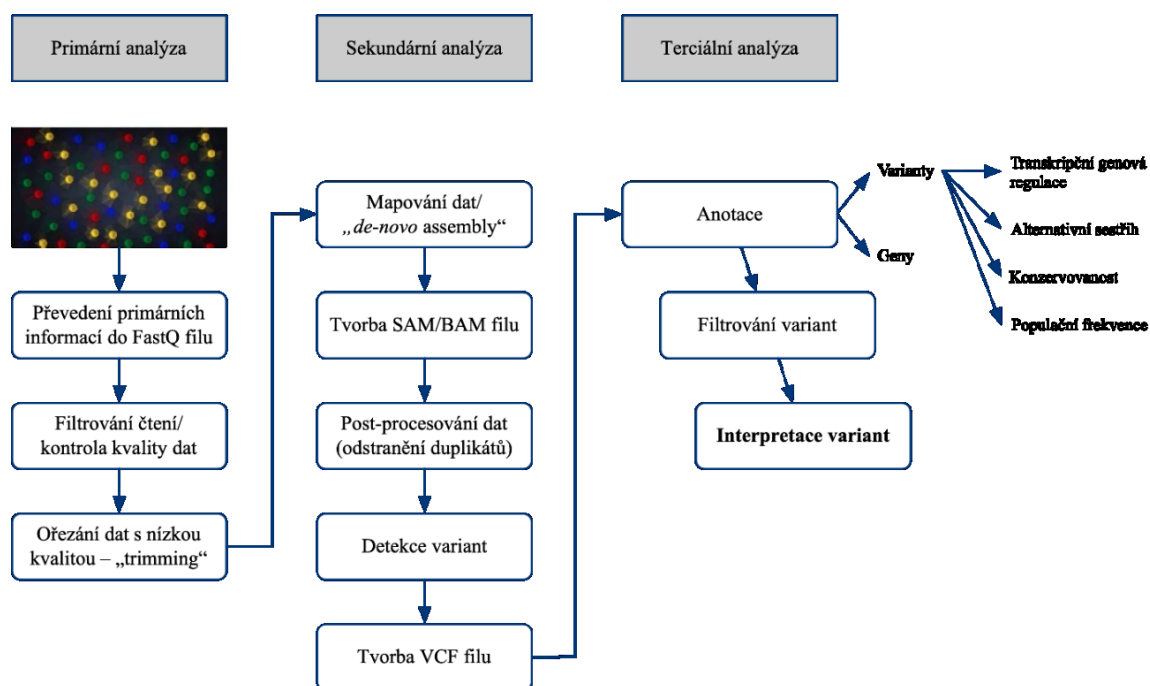
oligonukleotidové sondy značené biotinem, komplementární k oblastem zájmu sekvenování. Cílené obohacení připravované DNA knihovny vede k získání pouze požadované informace. V případě, že cílem je sekvenování celého genomu, krok cíleného obohacení se vynechá.

## 2. Sekvenování

V průběhu svého doktorského studia jsem využila sekvenační technologii SOLiD a Illumina. SOLiD sekvenování (Valouev et al., 2008) pracuje na principu sekvenování ligací a výhodou tohoto systému je nízká chybovost čtení. Nevýhodou je časová náročnost a krátká délka čtení. V současné době jsou nejpoužívanější sekvenační platformou jsou sekvenátory firmy Illumina (Bentley et al., 2008), které využívají metodu můstkové amplifikace, při které se vytvářejí prostorově oddělené shluky amplifikovaných fragmentů. Sekvenování je založeno na cyklické reverzibilní terminaci (CRT). Při sekvenační reakci je fluorescenčně značený nukleotid inkorporován, detekován, odštěpena fluorescenční značka a reakce pokračuje dalším cyklem. Cyklus se podle požadované délky čtení fragmentu opakuje 100x až 300x. V této práci byl využit sekvenátor HiSeq 2500 (laboratoř UBLG - FN Motol).

## 3. Bioinformatická analýza

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



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

#### **4. Interpretace sekvenčních dat**

V této práci byla sekvenční data získávána s cílem identifikovat variantu či varianty, které mohou vysvětlit fenotypy velké skupiny pacientů. Sekvenční data byla získávána v rámci širokého spektra projektů a jejich interpretace byla závislá na prvotní biologické otázce.

##### **Filtrování variant**

Výsledkem sekvenování nové generace jsou seznamy desítek tisíc variant, ale pouze jedna či několik z nich jsou kauzální. Za kandidátní varianty jsou považovány nesynonymní záměny, sestřihové varianty a delece nebo inserce, které způsobují změnu čtecího rámce. Na základě rodinné anamnézy je nutné stanovit model dědičnosti.

Varianty vybrané pro další analýzu svou biologickou funkcí odpovídají fenotypovým projevům pacienta. Kauzalita variant byla ověřena z údajů uvedených v literatuře nebo na základě funkčních studií. Kvalita kandidátních variant byla ověřena prohlížeči genomických variant IGV (Robinson et al., 2017).

##### **Interpretace výsledků**

Interpretace výsledků byla provedena na základě doporučení Americké společnosti lékařské genetiky a genomiky (ACMG) (Richards et al., 2015). 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. Sekvenční varianty byly rozděleny do skupin patogenní, pravděpodobně patogenní, varianta neznámého významu, benigní a pravděpodobně benigní.

Kombinací jednotlivých přístupů byl vytvořen seznam jednotek variant, z nichž byly přímo určeny kauzální varianty nebo byly dále studovány s cílem potvrdit či vyvrátit jejich kauzalitu.



# Výsledky

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

V rámci svého doktorského studia jsem se podílela na objasnění příčin vzniku několika vybraných vzácných onemocnění.

### I. a Objasnění molekulární podstaty vzácné akadáské varianty Fanconiho syndromu

Fanconiho syndrom je vzácné onemocnění, které se projevuje sníženým vstřebáváním elektrolytů a organických sloučenin v proximálních tubulech ledvin (Bökenkamp & Ludwig, 2010; Klootwijk et al., 2015). Námí studovaná varianta Fanconiho syndromu (Acadian variant of Fanconi syndrome, AVFS), se objevuje pouze u Akáďanů v Novém Skotsku. Tento typ je charakterizován generalizovanou dysfunkcí proximálních tubulů, která vede k pomalu progredujícímu chronickému selhání ledvin, spojenému s intersticiální fibrózou plic (Wornell et al., 2007).

Obdrželi jsme biologický materiál od dvanácti pacientů z osmi rodin, jejichž rodokmeny vykazují charakter autozomálně recesivní dědičnosti s efektem zakladatele.

Exomové sekvenování bylo provedeno u tří nemocných a jednoho zdravého člena rodiny. Standardními metodami filtrování nebyly nalezeny žádné pravděpodobné kauzální varianty. Pomocí homozygotního mapování byla nalezena homozygotní oblast genomu větší než 2Mb. Oblast zájmu byla zúžena na chromozom 8 (chr8:90958422-96960058 (hg19)). V této oblasti jsme nenalezli žádnou kandidátní variantu, proto bylo provedeno exomové sekvenování rozšířené o 5' a 3' nepřekládané oblasti. Kandidátní varianty nebyly nalezeny ani tímto přístupem a na základě těchto výsledků bylo přikročeno ke genomovému sekvenování. Homozygotní mapování genomových dat zúžilo kandidátní oblast na chr8:94423201-96206283 (hg19), která obsahovala 322 variant. Při filtrování byly upřednostněny varianty vzácné, konzervované a predikované jako patogenní. Těmto parametrům odpovídala pouze jedna varianta chr8:96046914T>C, rs575462405, v genu *NDUFAF6*.

Analýzy sestřihových variant předpověděly, že kandidátní varianta 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 byla prokázána 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, byla izolována celková RNA z kožních fibroblastů a z plicní biopsie pacientů. Produkty reverzní transkripce byly sekvenovány pomocí technik nové generace. Bylo nalezeno deset různých transkripčních izoform. Varianta rs575462405 v kombinaci s variantou rs74395342 ovlivňuje sestřih a syntézu izoform *NDUFAF6*, tvoří se mitochondriální jeho izoforma a tím dochází k poruše tvorby a funkce respiračního komplexu I. Kauzalita této varianty byla potvrzena dalšími experimenty.

### **I. b 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). Genetické příčiny těchto vrozených vad jsou stále do značné míry neprozkoumané.

V naší laboratoři byla studována rodina, u níž došlo k pěti potratům z důvodu srdečních anomálií. Filtrováním variant jsme určili jako pravděpodobnou příčinu srdečních defektů přítomnost dvou variant v genu *PLD1*.

Gen *PLD1* 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.

Ve spolupráci s dalšími laboratořemi (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*. 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 byl ze vzorku RNA z periferní krve rodičů potvrzen 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 *PLDI* netoleruje homozygotní varianty vedoucí ke ztrátě funkce.

V rámci této studie bylo rozšířeno fenotypové spektrum vývojových srdečních vad souvisejících s genem *PLDI*. Ve všech případech byla popsána ztráta enzymatické aktivity a bylo prokázáno, že inhibice fosfolipázy D1 snižuje mezenchymově-epitelový přechod (EMT), což je stěžejní raný krok ve valvulogenezi.

## II. Studium genetické příčiny kardiomyopatií

Kardiomyopatie jsou heterogenní skupinou onemocnění, s často genetickou podstatou, spojených 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). Odhadovaná prevalence kardiomyopatií v populaci je 3 % (McKenna et al., 2017). 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.

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

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

## **II. a Studium 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 příčiny (Elliott et al., 2008; Yancy et al., 2013). 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.

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 a které predikční program 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. Celkem byly nalezeny varianty ve 28 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 kontraktálního 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.

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.

## II. b Studium variant v genech kontraktálního 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 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.

Ve skupině 372 českých pacientů s neobjasněnou příčinou kardiomyopatie bylo identifikováno šest pacientů s desminopatií, nesoucích šest vzácných variant (tabulka č. 1) v genu *DES* (MAF<0,0005).

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

**Tab. 1** Varianty nalezené v desminu u šesti pacientů.

Ve všech šesti rodinách bylo provedeno klinické kaskádové vyšetření i segregáční analýza. Ta ve třech rodinách potvrdila familiární výskyt onemocnění. S desminopatií byl diagnostikován také jeden pacient s nonkompaktní kardiomyopatií. Tento typ kardiomyopatie byl u desminopatií identifikován jen v několika málo (Arbustini et al., 2016; Marakhonov et al., 2019; van Waning et al., 2018).

U pěti pacientů bylo provedeno imunohistochemické vyšetření vzorků kosterního svalu a myokardu na přítomnost patogenních agregátů. Překvapivě nebyly v případě varianty

p.(R454W) nebyly desminové agregáty detekovány v kosterním svalu, ale byly přítomny v srdeční tkáni. V případě varianty p.(Q364H) chyběly agregáty v obou typech tkání. Výsledek byl potvrzen na proteinové úrovni pomocí Western blot analýzy. Tento nálezn je v souladu s již dříve publikovanými daty, kdy ke správnému určení diagnózy musí vést genetické vyšetření a diagnostika nemůže být založena na nálezu agregátů v kosterní svalovině (Clemen et al., 2013).

Byly popsány nové varianty v desminu vedoucí k desminopatii a tím bylo potvrzeno široké fenotypové spektrum tohoto onemocnění. Práce potvrdila nutnost genetické diagnostiky u pacientů s podezřením na desminopatie, kdy lze imunohistochemické vyšetření použít pouze pro případné potvrzení diagnózy.

## **II. c Studium variant způsobujících Danonovu chorobu u žen.**

Danonova choroba (DD) je X-vázané onemocnění charakterizované mentální retardací, kardiomyopatií a myopatií kosterního svalu. DD je způsobena mutacemi v lysozomálním membránovém proteinu 2 (*LAMP2*), které vedou k dysfunkci autofagozomálně-lysozomálního systému, a tím k narušení autofagie. U mužů detekujeme patogenní varianty v genu *LAMP2* hemizygotně a patofyziologickým podkladem DD, ve většině případů je úplná absence *LAMP2* ve tkáních. Prognóza přežití je u nich vzhledem k rychlému terminálnímu srdečnímu selhání a maligním arytmiím velmi špatná. U žen, které jsou heterozygotkami pro patogenní *LAMP2* varianty, se onemocnění projevuje přibližně kolem 20. roku života a progreduje do terminální fáze většinou během 3. - 4. decénia. Deficit *LAMP2* u žen s DD je mozaikovitý a je ovlivněn stupněm X-inaktivace v konkrétní tkáni. Významný podíl žen s DD dospěje k terminálnímu srdečnímu selhání (Brambatti et al., 2019). Včasná identifikace žen s tímto onemocněním je důležitá pro jejich prognostickou stratifikaci a rodinné poradenství.

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 (Majer et al., 2012; Sikora et al., 2015) a to jak u žen, tak i u mužů.

Většina z více než sta 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 DD 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.

V období od listopadu 2016 až do října 2018 (Gurka et al., 2020) jsme vyšetřili skupinu 60 žen, z nichž 47 bylo již po transplantaci srdce, 2 ženy byly na mechanické srdeční podpoře a 11 v předtransplantačním sledování. U této skupiny byla hodnocena klinická data, abnormální EKG profily byly revidovány k potvrzení/vyloučení přítomnosti známek preexcitace. Genetická příčina vzniku kardiomyopatie byla známá u 15 pacientek, z toho u dvou byla již dříve diagnostikována DD. 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 charakterizováno dalších 5 pacientek s DD.

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 významně častější u pacientek s DD než u pacientek s jinými kardiomyopatiemi, nicméně neumožňovaly spolehlivou identifikaci žen s DD na základě 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 metodou 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 delecii 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 delece. V prvním případě se jednalo o delecii exonů 4 - 8 a v druhém o delecii 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. U této pacientky byla nalezena pouze malá populace (3 %) těchto buněk. Histopatologické vyšetření explantátu pacientky potvrdilo hypertrofii a vakuolizaci kardiomyocytů a cílené imunohistochemické barvení 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 metody nevedly ke zjištění kauzální příčiny onemocnění. Proto jsme opět očekávali přítomnost velké delecce na jedné z alel. Sekvenování genomu s nízkým pokrytím ukázalo na možnou delecí celého genu *LAMP2*.

Jedna hranice delecce byla lokalizována v sousedním genu *CUL4B*. Deletovány byly i další sousední geny *ATP1B4*, *TMEM255A* a *ZBTB33*.

Druhá hranice delecce byla stanovena pomocí „PCR genome walking“ - v místě zlomu byly nalezeny v 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.

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



## Závěr

Tato dizertační práce představuje využití metod sekvenace nové generace ve studiu molekulární podstaty vzácných onemocnění a identifikace kauzálních genů a patogenních variant.

V rámci dizertační práce byla identifikována kauzální nekódující mutace v genu *NDUFAF6*, a objasněn mechanismus vzniku vzácné varianty Fanconioho syndromu pomocí kombinace metod exomového a genomového sekvenování, homozygotního mapování a sekvenování transkriptů. Dále byly identifikovány kauzální varianty v genu *PLD1*, které způsobují vzácnou srdeční vývojovou vadu, a došlo k rozšíření fenotypového spektra variant nalézajících se v *PLD1*. V části práce, která se zabývala studiem genetických příčin kardiomyopatií, byla sestavena genetická mapa pacientů s recentně diagnostikovanou dilatační kardiomyopatií a provedena korelace klinických a genetických dat. Další analýza sekvenačních dat vedla k identifikaci a následné charakterizaci nových variant v genu *DES* vedoucím k různým fenotypovým projevům. Širší pohled na problematiku Dannonovy choroby vedl k identifikaci nových patogenních variant způsobujících toto onemocnění u žen.

V rámci této dizertační práce 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.

## Použitá literatura

- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Goldfarb, L. G., Park, K. Y., Cervenáková, 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>
- 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>
- 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>
- 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., Lehoczy, 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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., Anastasakis, 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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.jjcc.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>
- Valouev, A., Ichikawa, J., Tonthat, T., Stuart, J., Ranade, S., Peckham, H., Zeng, K., Malek, J. A., Costa, G., McKernan, K., Sidow, A., Fire, A., & Johnson, S. M. (2008). A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Research*, *18*(7), 1051–1063. <https://doi.org/10.1101/gr.076463.108>
- 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., Dalingshaus, 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>
- 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>

## Seznam publikací doktoranda:

### 1. publikace *in extenso*, 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**

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**

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

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

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

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

## 2. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

### a) s IF

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

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, Kretschmar 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**

Hartmannová H, Kubanek M, Sramko M, Piherová L, Nosková L, Hodanová K, Stránecký V, Přistoupilová A, Sovová J, Marek T, Malusková J, Ridzon P, Kautzner J, Hulková 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, Kmoch 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, Kmoch 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, Piherová L, Kmoch 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, Kmoch 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**

Kmoch S, Brynda J, Asfaw B, Bezouska K, Novák P, Rezáčová P, Ondrová L, Filipец 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**

b) bez IF

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.