

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
I. lékařská fakulta

**Role sekvenace nové generace v diagnostice a prognóze X-vázaných  
lysosomálních střídavých onemocnění**

Mgr. Martin Řeboun

2022

## **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, Sekvenační centrum  
Diagnostických laboratoří DPM

Školitel: RNDr. Lenka Dvořáková, CSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Martin Magner, PhD.

Disertační 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

|  |    |
|--|----|
| Abstrakt .....   | 4  |
| Abstract .....   | 5  |
| 1 Úvod.....  | 6  |
| 2 Cíle.....  | 6  |
| 3 Metodika .....   | 7  |
| 4 Výsledky .....   | 8  |
| 4.1 Zavedení metod NGS a zhodnocení jejich přínosu pro diagnostiku X-vázaných lysosomálních onemocnění.....                              | 8  |
| 4.2 Využití metod NGS pro analýzu somatického mozaicismu a sestřihových variant u pacientů s X-vázanými lysosomálními onemocněními ..... | 10 |
| 4.3 Využití metod NGS pro analýzu transkripčních variant a studium X-inaktivace u pacientů s X-vázanými lysosomálními onemocněními ..... | 13 |
| 5 Závěr .....  | 16 |
| 6 Seznam publikací autora .....  | 18 |
| 6.1 Publikace, které jsou podkladem disertace.....   | 18 |
| 6.2 Publikace bez vztahu k tématu disertace .....  | 19 |
| 7 Literatura.....  | 20 |

## Abstrakt

Charakterizace molekulárně genetické podstaty monogenních onemocnění spočívá nejen v identifikaci patogenní varianty, ale i v popisu jejího vlivu na strukturu a stabilitu vznikající RNA. Kromě toho u X-vázaných onemocnění vstupuje u heterozygotních pacientek do hry X-inaktivace. V předkládané disertační práci jsme využili metody sekvenování nové generace ke studiu tří X-vázaných lysosomálních onemocnění (mukopolysacharidóza typ II, MPS II; Danonova choroba, DD; Fabryho choroba, FD). Využili jsme dva metodické postupy: 1) panelové sekvenování s použitím hybridizačních průb pro identifikaci nukleotidových variant, delecí/duplikací malého rozsahu a strukturních variant (rozsáhlé delece a duplikace) 2) ampliconové sekvenování pro vyšetření somatického mozaicismu a alelově specifické exprese.

Panelové sekvenování umožnilo na molekulárně genetické úrovni potvrzení Danonovy choroby u dvou pacientů, u kterých byla identifikována duplikace dvou exonů a delece pěti exonů v genu *LAMP2*.

Ampliconovým sekvenováním jsme analyzovali somatický mozaicismus v rodinách pacientů s Danonovou chorobou a mukopolysacharidózou typu II a identifikovali první případ somatického mozaicismu u pacienta s Danonovou chorobou.

Metoda alelově specifické exprese rozšířila paletu metod používaných při vyšetření X-inaktivace a její přínos se projevil zejména při minimalizaci chybné interpretace výsledků.

Výsledky uvedené v této disertační práci prokázaly význam metod sekvenování nové generace pro diagnostiku X-vázaných lysosomálních onemocnění, objasnění molekulárního podkladu fenotypových projevů a ve vybraných případech i k určení jejich prognózy.

## Abstract

The characterisation of the molecular-genetic etiology of monogenic diseases includes not only the identification of the pathogenic variant, but also the description of its effect on the RNA structure and stability. Additionally, the X-inactivation plays an important role in X-linked diseases. In the presented thesis, we applied the methods of next generation sequencing to study three lysosomal disorders (mukopolysacharidosis type II, MPS II; Danon disease, DD; Fabry disease, FD). Two methodological approaches have been used: 1) panel sequencing with hybridization probes for identification of single nucleotide variants, small deletions/duplications and structure variants (CNVs) 2) amplicon sequencing for analysis of somatic mosaicism and allele specific expression.

The panel sequencing enabled us to confirm the molecular-genetic basis of DD in two patients with the identification of two exons duplication and five exons deletion in *LAMP2*, respectively.

The somatic mosaicism was being analyzed by the amplicon sequencing in families with DD, MPS II. We could identify the first case of somatic mosaicism in a patient with DD.

The allele specific expression has enlarged the group of methods used in X-inactivation analysis. Its impact has been proved particularly in minimizing misinterpretation of XCI results.

Results published in this thesis proved the importance of the next generation sequencing methods for the diagnosis of X-linked lysosomal storage disease, shedding light on their molecular basis leading to particular phenotype manifestation and even in determining their prognosis in selected cases.

# 1 Úvod

Lysosomální střádavá onemocnění (LSD) jsou monogenní onemocnění způsobená deficitem některé z lysosomálních hydroláz, jejich aktivátorů nebo lysosomálních transportérů či strukturních proteinů. Mohou se manifestovat v dětství i v dospělosti. Fenotyp je vysoce variabilní od těžkých forem s časnou manifestací v nízkém věku a nepříznivou prognózou až po lehčí formy s nástupem ve vyšším věku a mírnějším průběhem (Rajkumar a Dumpa 2021). Souhrnná incidence LSD je odhadována na jedno ze 7700 narozených dětí (Meikle et al. 1999), incidence v České republice se udává na jedno z 8300 dětí (Poupetová et al. 2010).

Fenotyp onemocnění závisí na typu akumulovaného substrátu a místu jeho akumulace. Postižen může být prakticky jakýkoli orgán v těle. Např. u Pompeho nemoci s nedostatečnou aktivitou  $\alpha$ -glukosidázy (gen *GAA*) je charakteristické střádání glykogenu v lysosomech svalových buněk. Manifestuje se postižením kosterního svalu a u infantilní formy i srdce (Morales a Anilkumar 2021). U Gaucherovy choroby je pak střádán glukocerebrosid v makrofázích retikuloendoteliálního systému. Klinicky je tak vyjádřena splenomegalie, doprovázená anémií, trombocytopenií a projevy onemocnění skeletu (Mistry et al. 2015). U řady lysosomálních onemocnění stojí v popředí neurologické postižení, např. celková degenerace nervového systému spojená s hluchotou a slepotou způsobená ztrátou funkce podjednotky A nebo B  $\beta$ -hexosaminidázy u Tay-Sachsovy, respektive Sandhoffovy choroby (Gilbert et al. 1975).

Dědičnost dosud popsaných LSD je autosomálně recesivní s výjimkou tří onemocnění, jejichž dědičnost je vázaná na chromosom X: Fabryho choroba, Danonova choroba a mukopolysacharidóza typ II (Hunterův syndrom). Tato práce se věnuje studiu genetických aspektů právě těchto tří posledně jmenovaných onemocnění.

## 2 Cíle

Diagnostika X-vázaných lysosomálních onemocnění je komplexní proces, jehož podstatnou součástí je molekulárně genetické vyšetření. Problematika je specifická u žen, u kterých jsou jak klinický fenotyp, tak výsledky laboratorních nálezů ovlivněny fenoménem X-inaktivace. Cílem této disertační práce bylo zavést a zhodnotit význam moderní diagnostické metody, sekvenace nové generace (NGS), pro charakterizaci genotypu a genotypově-fenotypové korelace u pacientů s těmito onemocněními.

Jednotlivé části disertační práce:

- 1) Zavedení metod NGS a zhodnocení jejich přínosu pro diagnostiku X-vázaných lysosomálních onemocnění
  - a) Zavést metodu hybridizačního panelového sekvenování včetně návrhu hybridizačních sond.
  - b) Připravit bioinformatickou analýzu nukleotidových variant, delecí/duplikací malého rozsahu a strukturních variant (CNV).
  - c) Ověřit výsledky a zhodnotit diagnostický přínos NGS.
- 2) Využití metod NGS pro analýzu somatického mozaicismu a sestřihových variant u pacientů s X-vázanými lysosomálními onemocněními
  - a) Zavést metodu pro analýzu somatických mutací na úrovni genomové DNA a sestřihových variant na úrovni RNA, včetně bioinformatického zpracování.
  - b) Aplikovat tuto metodu pro vyšetření v rodinách pacientů.
- 3) Využití metod NGS pro analýzu transkripčních variant a studium X-inaktivace u pacientů s X-vázanými lysosomálními onemocněními
  - a) Zhodnotit přínos metody alelově specifické exprese (ASE) pro charakterizaci mutací na úrovni RNA (zjištění vlivu mutace na stabilitu transkriptu).
  - b) Zavést metody ASE pro vyšetření polymorfních SNP a mutantních alel pro vyšetření X-inaktivace.
  - c) Porovnat využití metod ASE s běžně používanými metylačně specifickými metodami a posoudit limity obou typů metod.

### **3 Metodika**

K přípravě vzorků pro panelové sekvenování byla využívána standardní hybridizační metoda s využitím sond od firmy Roche (SeqCap EZ choice library) a ultrasonická fragmentace, která zaručuje vysokou kvalitu a délkovou uniformitu vznikajících fragmentů (Quail et al. 2009). Bioinformatické zpracování je rozděleno podle velikosti variant. V první fázi jsou identifikovány

SNV a malé delece/duplikace do 50 bp. V druhé části jsou analyzovány CNV od velikosti jednoho exonu po celé geny nebo skupiny genů. Analýza CNV je založena na tzv. hloubce čtení. Porovnává se počet čtení dané oblasti u pacienta oproti hodnotě počtu čtení získané z analýz všech ostatních pacientů sekvenovaných v tomtéž běhu. Signifikantně vyšší počet čtení u pacienta naznačuje duplikaci, výrazně nižší počet vede k podezření na delecii (Royer-Bertrand et al. 2021).

K ověření nálezu CNV jsme zvolili metodu kvantitativního PCR (qPCR) z genomové DNA.

Pro splnění druhého a třetího cíle bylo zavedeno amplikonové sekvenování tzv. single-plexová příprava sekvenační knihovny využívající systému Nextera XT DNA Library kit (Illumina) (Sykorova et al. 2015). Sekvenovaný vzorek o minimální délce 150 bp a označený kombinací dvou indexů, je připraven z PCR, RT-PCR nebo long-range PCR produktů od různých pacientů. V prvním kroku přípravy tzv. sekvenační knihovny probíhá mísení na základě délek jednotlivých produktů. Delší produkty jsou do reakce přidávány ve vyšším objemu, aby bylo zajištěno rovnoměrné pokrytí po celé délce produktu. V případě sekvenování somatických variant je PCR produkt dávkován v desetinásobném množství oproti ekvimolární hodnotě.

Další metody použité v této práci jsou metody pro vyšetření X-inaktivace založené na metylačně senzitivním štěpení a analýze délkových polymorfismů v lokusech *AR*, *RP2*, *CNKS2*.

## 4 Výsledky

### 4.1 Zavedení metod NGS a zhodnocení jejich přínosu pro diagnostiku X-vázaných lysosomálních onemocnění

V rámci cíleného panelového sekvenování jsme pro diagnostické účely zavedli vyšetření genů spojených s X-vázaným lysosomálním onemocněním. Výsledky sekvenační analýzy genů *LAMP2*, *IDS* a *GLA* ukazují, že všechny důležité oblasti, ve kterých se mohou nacházet mutace (exony, přiléhající části intronů, části nepřekládaných oblastí), jsou dobře pokryté (tj. počet čtení je vyšší než 20). To jsme ilustrovali u kontrol heterozygotních pro dva benigní SNP (rs12097, rs1141608) v genech *IDS* a *LAMP2* a u dvou pacientů nesoucích patogenní variantu v genu *GLA*.

V laboratoři je metoda využívána v rámci diagnostického procesu pacientů s metabolickými, kardiologickými a skeletálními onemocněními. Během uplynulých 5 let jsme touto metodou stanovili diagnózu u 228 pacientů. Naprostá většina (92 %) nalezených patogenních variant náleží do kategorie variant malého rozsahu a byla ověřena Sangerovým sekvenováním. Patogenní



varianty velkého rozsahu (tj. duplikace nebo delece, CNV) byly identifikovány u 19 pacientů. V osmi případech byla zjištěna delece jednoho exonu (7x heterozygotně, 1x hemizygotně), v jednom případě duplikace jednoho exonu v heterozygotním stavu. V dalších osmi případech se jednalo o heterozygotní deleci dvou a více exonů. Ve zbylých dvou případech byla identifikována rozsáhlá delece celé skupiny genů.

Možnost analyzovat rozsáhlé delece a duplikace (CNV varianty) metodou NGS je zásadní zejména pro molekulárně genetickou analýzu Danonovy choroby. Výsledky našeho pracoviště, kde byly CNV detekovány u 4 z 10 pacientů ukazují, že právě tento typ variant je častou příčinou onemocnění (Majer et al. 2014; 2018; 2020; Kousal et al. 2021). Tuto skutečnost podporují i práce dalších autorů (Yang et al. 2010; Burstein et al. 2021; Lines et al. 2014; Ceyhan-Birsoy et al. 2016).

Prokázali jsme, že panelové sekvenování a vypracovaná bioinformatická analýza vhodnou metodou k diagnostice SNV i stanovení přítomnosti CNV u řady metabolických, kardiologických a skeletálních onemocnění. Všechny reportované patogenní varianty, které jsme pomocí panelového sekvenování identifikovali, byly ověřeny pomocí dalších metod (Sangerovo sekvenování, qPCR nebo SNP microarray) a nebyl identifikován falešně pozitivní výsledek. Diagnózu jsme potvrdili u 228 z celkově 539 vyšetřených pacientů (42 %). Tento údaj odráží výběr pacientů, kteří jsou na vyšetření indikováni a které lze rozdělit na dvě skupiny. První skupinou jsou pacienti, jejichž diagnóza byla stanovena na základě jasných klinických a/nebo laboratorních nálezů, v tomto případě nacházíme patogenní varianty téměř ve 100 % případů. Druhou skupinu tvoří pacienti s nejasným nálezem, kteří na vyšetření přicházejí z důvodu diferenciální diagnostiky, a u těchto pacientů nacházíme genetickou příčinu jejich onemocnění výrazně méně často. U některých pacientů můžeme diagnózu minout z důvodu metodického. Metoda identifikuje exonové varianty, přiléhající části intronů a části 5' a 3' nepřekládaných oblastí. Do vyšetření jsou zahrnuty i některé publikované hluboké intronové varianty a varianty v regulačních oblastech, většina variant však v těchto nekódujících oblastech zůstává opominuta. Metoda panelového sekvenování používaného v naší laboratoři je srovnatelná s celoexomovým sekvenováním, kde se diagnostická výtěžnost pohybuje okolo 50 % (Kmoch a Zeman 2018).

Naše vyšetření přispělo ke stanovení diagnózy u jedné pacientky s DD (Majer et al. 2018), další pacienti diagnostikováni nebyli. Mezi důvody může patřit raritní výskyt studovaných onemocnění

i povaha těchto onemocnění. FD a MPS II jsou enzymopatie, jejich primární vyšetření probíhá na úrovni enzymologické, u pozitivních výsledků enzymologického vyšetření je metodou volby pro genetickou analýzu Sangerovo sekvenování nebo MLPA. U analýzy genu *IDS* jsou navíc zavedeny metody pro záchyt specifických přestaveb, založených na amplifikaci specifických PCR produktů indikujících přítomnost přestavby. PCR produkt je ověřen Sangerovým sekvenováním, které by NGS z principu metody nezachytilo. Geny pro X-vázaná lysosomální onemocnění jsou v panelech zařazeny pro případy pacientů s nejasnou etiologií klinických potíží nebo naopak pro pacienty s prokázaným deficitem, u kterých Sangerovo sekvenování/MLPA genetickou příčinu neobjasnily (MLPA nemusí ukázat delecí – sonda může sedět mimo její hranice).

Odlíšná situace nastává u DD, kde mohou být pacienti primárně diagnostikováni na kardiologickém panelu, protože mezi hlavní příznaky patří hypertrofická kardiomyopatie (HKMP). Vzhledem k tomu, že častým typem mutace u DD jsou delece a duplikace velkého rozsahu, je NGS využívající hybridizační próby vhodným nástrojem pro diagnostiku pacientů s DD.

Citlivost bioinformatické analýzy pro CNV v naší laboratoři je srovnatelná s literárními daty (Royer-Bertrand et al. 2021). Do studie autoři zapojili 450 pacientů s různou diagnózou ze širokého spektra onemocnění zahrnující mimo jiné metabolická i kardiologická onemocnění. Autoři identifikovali patogenní CNV u 18 jedinců, zatímco v našem souboru se jednalo o 19 pacientů v souboru 539 pacientů. Zavedená NGS metabolického, kardiologického a panelu kostních onemocnění se stala rutinní součástí diagnostického procesu na našem pracovišti.

## **4.2 Využití metod NGS pro analýzu somatického mozaicismu a sestřihových variant u pacientů s X-vázanými lysosomálními onemocněními**

V první práci jsme se zabývali otázkou predikce závažnosti projevů MPS II a to v unikátní kohortě 44 pacientů s tímto vzácným onemocněním z České republiky, Slovenska, Srbska a Chorvatska (Dvorakova et al. 2017). Naše výsledky ukázaly, že ani stanovení aktivity iduronátsulfatázy v leukocytech ani zjištění exkreční frakce glykosaminoglykanů v moči nemá pro stanovení tíže onemocnění prediktivní hodnotu. Mutační analýza provedená u 38 pacientů vedla k identifikaci 8 variant velkého rozsahu (rozsáhlé delece, rekombinace genu *IDS* s pseudogenem), 10 variant malého rozsahu (6 delecí, 2 duplikace, 2 inserce) a 20 nukleotidových záměn způsobujících záměnu aminokyselinového zbytku, vznik předčasného terminačního kodonu nebo ovlivňujících

sestřih. Velké přestavby vedly bez výjimky k závažným projevům onemocnění, což je výsledek v souladu s literárními daty (Brusius-Facchin et al. 2014). Nulové varianty malého rozsahu vedly až na jednu výjimku rovněž těžkému fenotypu. Výjimkou byla inserce 4 nukleotidů v exonu 9 nalezená u 2 bratrů s mírným fenotypem. Předpokládaný efekt této mutace je vznik předčasného terminačního kodonu vedoucího ke ztrátě celé malé enzymové podjednotky (14 kDa). Mutace v této oblasti identifikované u dalších pacientů z našeho souboru i prezentovaných v literatuře (Kosuga et al. 2016) jsou spojeny s těžkým fenotypem. Pro mírný fenotyp jsme nenašli uspokojivé vysvětlení.

Ve skupině jednonukleotidových záměn bylo nalezeno 6 rekurentních variant popsanych v řadě publikací (p.Asn63Asp, p.Pro86Leu, p.Arg88Cys, p.Arg88His, p.Ser333Leu, p.Arg468Gln). Fenotyp našich pacientů odpovídal literárním údajům, u těchto mutací lze opět pozorovat genotypovou-fenotypovou korelaci.

Hluboké amplikonové sekvenování RNA bylo použito pro charakterizaci sestřihové varianty *IDS*: c.1122C>T u pacienta se středně závažným fenotypem MPS II. Vyšetření RNA ukázalo, že varianta způsobuje delecii 60 nukleotidů a nevede k posunu ve čtecím rámci, vliv na stabilitu transkriptu nebyl detekován. V literatuře byla tato rekurentní varianta popsána u pacientů s variabilní škálou fenotypů, která může souviset s přítomností určitého podílu normálního transkriptu u některých pacientů. Normální transkript jsme u našeho pacienta nedetekovali, přesto však i výhradně zastoupený produkt deletované alely u něj stačil k manifestaci pouze intermediárního fenotypu.

Hluboké amplikonové sekvenování DNA jsme dále použili pro vyšetření somatického mozaicismu. V některých rodinách u rodičů nenacházíme patogenní mutace, které jsou příčinou onemocnění u jejich postiženého dítěte. Obvyklou příčinou tohoto nálezu je vznik mutace *de novo*. V takovém případě rodiče nenesou riziko pro příští těhotenství. Cca 6,5% mutací však má původ v somatických mutacích rodičů (Acuna-Hidalgo et al. 2015). Somatický mozaicismus je proto nutné zvažovat z důvodu rizika přenosu mutace na další potomky.

Uvedené problematice jsme se věnovali zejména u pacientů s Danonovou chorobou. V rodině první pacientky jsme nezjistili somatický mozaicismus u rodičů ani postzygotický mozaicismus u pacientky. V rodině druhé pacientky opět somatický mozaicismus u rodičů nebyl detekován, postzygotický vznik mutace nebylo možné vyšetřit z důvodu limitace metody. Naopak somatický mozaicismus popisujeme u třetího pacienta s projevy Danonovy choroby. Metodou amplikonového

sekvenování jsme určili poměrné zastoupení mutované a WT alely v různých tkáních včetně srdeční, ve všech tkáních byla mutovaná alela přítomna v cca polovině buněk.

Somatický mozaicismus DD byl doposud publikován pouze u žen. První publikovaná prokázaná somatická mozaika byla u DD popsána v případě asymptomatické matky, u které bylo identifikováno 20 % mutovaných buněk (Chen et al. 2012). Somatický mozaicismus byl detekován i u zdravé matky dvou postižených chlapců u které bylo průtokovou cytometrií stanoveno pouze 0,061 % *LAMP2* deficitních buněk (Majer et al. 2014). V roce 2019 byla metodou paralelního sekvenování identifikována mozaika 16 – 30 % u pacientky s DD, u které se projevil kardiální a oční příznaky (Meinert et al. 2019).

Na rozdíl od DD, kde somatický mozaicismus doposud u muže nebyl publikován, Bae 2020 popisuje pacienta s pozdním nástupem příznaků Fabryho choroby. Mozaikovitě zastoupení mutované alely bylo stanoveno pomocí NGS v krvi (84%), bukálních stěrech (58%) a močovém sedimentu (85%) (Bae et al. 2020, s. 200).

Poslední pacientkou popsanou v této kapitole byla manifestní heterozygotka pro mukopolysacharidózu II. Přestože pacientka nesla rekurentní mutaci c.1403G>A (p.Arg468Gln), tato mutace nebyla identifikována ani u jednoho z rodičů. Somatický mozaicismus u rodičů nebyl prokázán

Manifestace MPS II u žen je velmi vzácná, naše kazuistika byla podle odborné literatury ve světě 17. případem dívky manifestující MPS II (Reboun et al. 2016), přičemž do dnešního dne bylo v literatuře popsáno pouze devatenáct manifestních heterozygotek.. Manifestace je podmíněna kompletním deficitem enzymu, jehož genetickou příčinou mohou být komplexní chromosomální přestavby postihující expresi genu *IDS* (Manara et al. 2010) nebo mutace přítomné na obou alelách (Broadhead et al. 1986; Semyachkina et al. 2019). Nejčastější příčinou je přítomnost jedné mutované alely v kombinaci s kompletním zešíkmením X-inaktivace (XCI) vedoucí k výhradní expresi mutované alely (Jurecka et al. 2012; Piña-Aguilar et al. 2013; Lonardo et al. 2014; Tuschl et al. 2005). Příčinou manifestace námi popisované pacientky popisované je právě tento případ – prokázali jsme výhradní expresi mutované alely p.Arg468Gln způsobenou kompletním zešíkmením X-inaktivace.

V souhrnu naše výsledky ukazují, že pro charakterizaci klinických příznaků (MPS II) i pro interpretaci výsledků dalších metod (průtoková cytometrie u Danonovy choroby) je důležitá znalost stavu X-inaktivace.

### 4.3 Využití metod NGS pro analýzu transkripčních variant a studium X-inaktivace u pacientů s X-vázanými lysosomálními onemocněními

Fenotyp žen s Fabryho chorobou je velmi variabilní, od asymptomatického průběhu po závažnou klinickou manifestaci srovnatelnou s postižením u hemizygotních mužů (Lenders et al., 2016). Na tíži klinických projevů se podílí typ mutace a věk pacientek, podíl XCI na výsledném fenotypu ale zůstává doposud nevyjasněný. Pokud by byla korelace mezi stavem XCI a tíží klinických příznaků FD jednoznačně prokázána, bylo by možné využít znalost stavu XCI k predikci průběhu onemocnění a včasnému, správně načasovanému zahájení léčby. Podle některých studií zešíkmení XCI ve prospěch exprese mutované alely vede k těžšímu fenotypu a rychlejší progresi onemocnění. Korelace byla pozorována na úrovni kazuistik (Hossain et al. 2017; 2019; Morrone et al. 2003; Redonnet-Vernhet et al. 1996; Yanagisawa et al. 2019) i v souborech pacientek (Dobrovolny et al. 2005; Echevarria et al. 2016). Jiní autoři však došli k opačným výsledkům a vliv XCI na fenotyp zpochybňují (Elstein et al. 2012; Juchniewicz et al. 2018; Maier et al. 2006; Rossanti et al. 2021).

Sporné výsledky z publikovaných prací mohou být částečně vysvětleny komplikacemi v hodnocení klinické závažnosti (je třeba zvažovat heterogenitu symptomů, věk a variabilitu v postižení jednotlivých orgánů). Problém však může spočívat i v metodickém přístupu. V řadě z uvedených publikovaných prací byla XCI stanovena pouze jednou metodou ve vzorku jedné tkáně. Naše úsilí jsme proto zaměřili na vyhledávání metodických úskalí a jejich řešení. Tomuto tématu jsme se věnovali v prezentované práci provedené na souboru 35 FD pacientek se známou mutací a různou tíží klinických projevů (Řeboun et al. 2022). V algoritmu vyšetření a správné interpretace výsledků XCI byla použita transkripční analýza využívající amplikonové sekvenování.

V literatuře nejužívanější metodou pro vyšetření XCI je metoda založená na sledování metylace v oblasti délkového polymorfismu lokusu genu *AR* (Xq12), případně *RP2* (Xp11.3). V naší práci jsme použili obě tyto sondy (*AR* i *RP2*). Kromě těchto často používaných a publikovaných metylačně senzitivních metod jsme ale nově zavedli i další analýzu alelově specifické exprese (ASE) metodou amplikonového sekvenování využívající heterozygotní SNP (*IDS*, *LAMP2*). Základní podmínkou pro použití těchto SNP ve vyšetření XCI bylo, že geny *IDS* a *LAMP2* neunikají X-inaktivaci. To znamená, že jsou skutečně exprimovány pouze z aktivního chromosomu X (Carrel a Willard 2005). Další důležitou podmínkou využití těchto SNP je vysoká frekvence heterozygotek pro tyto SNP v populaci. V našem souboru bylo zastoupeno sedmnáct žen (49 %)

heterozygotních, a tedy informativních pro SNP v genu *IDS* (rs1141608), a devět žen (25%) heterozygotních pro polymorfismus v genu *LAMP2* (rs12097). U heterozygotních žen byl amplikonovým sekvenováním analyzován RT-PCR produkt obsahující SNP. Počet čtení nukleotidů v místě SNP pak reprezentuje poměrné zastoupení alel, které podle naší hypotézy odpovídá X-inaktivaci.

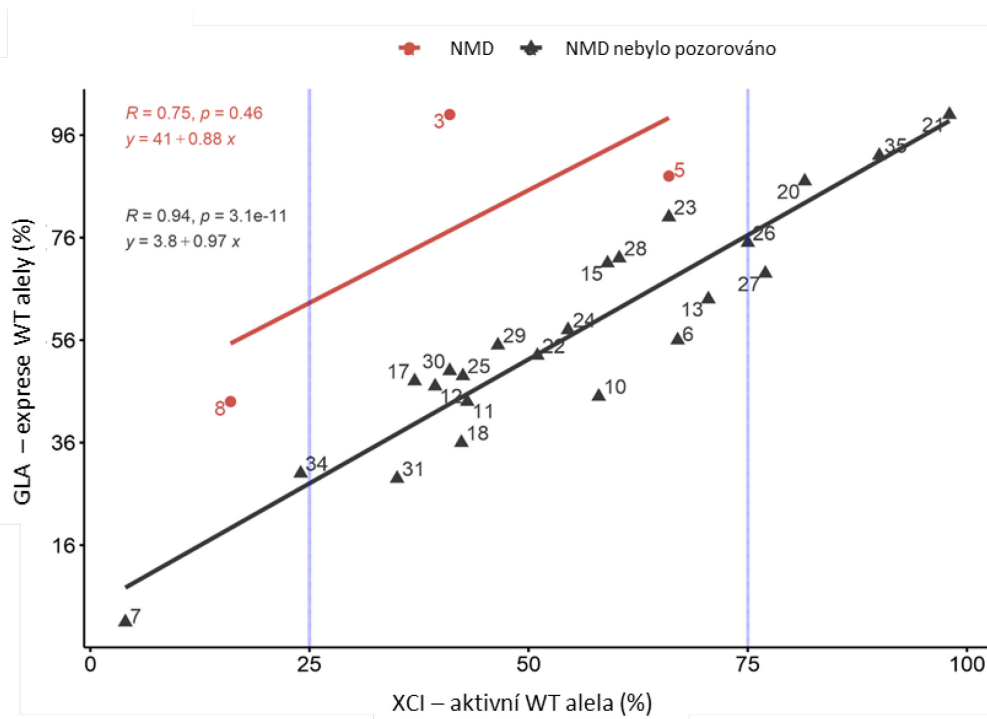
Výsledky tohoto vyšetření jsme pak porovnali s výsledky metylačních metod. Příkladem srovnání obou metod byla pacientka 35, u které jsme získali shodné výsledky z analýzy exprese alel u benigního SNP v genu *IDS* (89:11) a metylačně senzitivní metody za použití sondy v genu *AR* (91:9). Velmi dobrou korelaci obou metod jsme zjistili v celém souboru pacientek. Jediný výrazně odlehlý výsledek jsme pozorovali u pacientky 10 v sondě *AR*. Sonda *AR* vykazuje zešikmení XCI k jedné z alel (80/20), zatímco u dalších sond byla XCI náhodná (u metylační sondy (*RP2*) byl poměr 63/37, u nepřímé transkripční sondy v genu *IDS* 47/53).

Metodický postup amplikonového sekvenování jsme dále využili pro stanovení exprese mutovaných alel přímo v genu *GLA*. Porovnáním výsledků transkripční analýzy genu *GLA* a metylačně specifických metod pro stanovení XCI jsme získali shodné výsledky u většiny pacientek nesoucích missense mutace. U 3 pacientek (26, 34 a 35) však vyšetření vedla k reciprokým hodnotám. U pacientek 26 a 35 metylační sondy použité pro vyšetření XCI ukazovaly zešikmení ve prospěch mutované alely, analýza exprese *GLA* ukázala preferenční expresi WT alely. Naopak, u pacientky 34 metylační analýza ukazovala preferenční umlčení chromosomu s mutovanou alelou, zatímco expresní studie prokázala téměř výhradní expresi právě mutované alely. Tento náleží lze vysvětlit jevem crossing – over a ukazuje na riziko používání nepřímých sond.

Po korekci na crossing – over odpovídalo poměrné zastoupení mutované a normální alely v genu *GLA* výsledkům XCI u všech missense mutací, jak závažných, tak hypomorfních (tj. zachovávajících určitou reziduální enzymovou aktivitu). Tento výsledek ukazuje na stabilitu transkriptu u všech těchto uvedených mutací.

Rozdíly mezi stavem XCI a zastoupením mutované alely v transkriptu jsme pozorovali u tří pacientek nesoucích nulové mutace (Obrázek 1). U pacientky 3, která je heterozygotkou pro mutaci c.559\_560delAT, byla exprimována pouze WT alela genu *GLA*, zatímco poměr XCI podle metylačních sond byl náhodný (*AR* = 36/64, *RP2* = 46/54). Tento náleží lze vysvětlit odbouráváním poškozené mRNA z mutovaných transkriptů mechanismem nonsense-mediated decay (NMD). K

částečnému odbourávání dochází i u pacientky 5 s nonsense mutací (c.881T>G; p.Leu294\*) a pacientky 8 nesoucí duplikaci (c.1034dupT; p.Ser345Phefs\*30). Naopak, předčasný terminační kodon (c.1024C>T; p.Arg342\*) k NMD nevedl, jak je patrné z výsledků pacientky 6, která vykazuje náhodnou XCI a vyváženou expresi obou alel.



**Obrázek 1: Vztah mezi stavem XCI a expresí genu GLA u pacientek s Fabryho chorobou.** Stav XCI je vyjádřen v procentuálním zastoupení WT alely (osa X). Na Ose Y je zobrazena exprese WT alely genu GLA. Černé trojúhelníčky představují pacientky, které nesou stabilní alelu genu GLA. Červená kolečka odpovídají částečnému (Pacientky 5 a 8) nebo úplnému (Pacientka 3) NMD. V datech XCI je zohledněn vznik crossing-overu. Korelační koeficienty a statistická významnost vyjádřují hodnoty R a p, lineární regrese je vyjádřena rovnicí pro obě skupiny (s prokázaným/neprokázaným) NMD. Svislé modré čerchované čáry vymezují hranici zešíkmení stavu XCI (25:75).

Výsledek vyšetření XCI může být ovlivněn i tkáňovou specifitou a faktorem věku. V souboru 15 pacientek, u kterých byly dostupné vzorky více tkání (periferní krev, bukalní stěry, sliny, moč), jsme identifikovali 6 pacientek, které vykazovaly významné rozdíly v XCI při vyšetření v různých tkáních. Rozdílné hodnoty XCI mezi archivními vzorky krve (náběr provedený před více než 6 lety) a recentním náběrem jsme pozorovali u dvou z osmi vyšetřených pacientek.

Stěžejním přínosem práce věnované XCI u pacientek s Fabryho chorobou (Řeboun et al. 2022) bylo poukázání na možnosti chybné interpretace metod používaných k detekci XCI. Popsali jsme zaměnitelnost nepřímých ASE a metylačních sond. Kombinace použitých metod může přispět k eliminaci specifických nedostatků obou metodických přístupů. Využití metylačních sond je

limitováno zjištěním, že ve vzácných případech stav metylace v daném lokusu neodpovídá stavu XCI (Swierczek et al. 2012). Tato situace je pravděpodobným vysvětlením u pacientky 10, kdy sonda *AR* vykazuje zešíkmení XCI k jedné z alel, zatímco další použité sondy (*RP2* a *IDS*) korelují s hodnotou analýzy transkriptu pro *GLA* a vykazují vyváženou expresi alel. Limitací ASE sond může být nerovnoměrná exprese alely, ke které může dojít například jevem NMD nebo variantou v regulační oblasti genu. Varianty modulující transkripci, byly popsány v promotoru genu *LAMP2* (Pang et al. 2012) nebo v 5' nepřekládané oblasti genu *GLA* (Ferreira et al. 2015)

Prokázali jsme, že výsledky metod využívajících nepřímé sondy, jak metylační, tak ASE, mohou být ovlivněny jevem crossing – over. Důvodem je značná vzdálenost mezi lokusy těchto sond a kauzálním genem, v našem případě *GLA*. Na každém metacentrickém chromosomu dochází podle literatury minimálně ke dvěma přesmykům (Coop a Przeworski 2007). Přítomnost jevu crossing – over může vést k chybnému posouzení fáze, tzn., že na základě vyšetření nepřímých sond nelze rozlišit, zda je dominantně aktivní WT nebo mutovaná alela. Eliminaci tohoto jevu lze provést analýzou vzorku otce a detailní segregací v rodině, vzorky pro takovéto analýzy jsou však jen zřídka dostupné. Analýza transkriptu *GLA* je proto zásadní pro správnou interpretaci výsledků XCI. I tato metoda však má své limity. Detekce jevu crossing-over pomocí analýzy exprese *GLA* není možná u pacientek s mutacemi ovlivňujícími stabilitu mRNA vedoucím k NMD. V prezentované kohortě byla zjištěna snížená stabilita mRNA u tří pacientek nesoucích nulovou mutaci. Protože enzymová aktivita  $\alpha$ -gal není ovlivněna typem mutace ani nestabilitou mRNA (Řeboun et al. 2022), je pro identifikaci jevu crossing-over u těchto pacientek možné využít enzymologické vyšetření.

## 5 Závěr

1) Metoda panelového sekvenování s použitím hybridizačních prób zavedená v naší laboratoři je vhodná pro identifikaci malých patogenních variant a rozsáhlých delecí/duplikací v jednom kroku. To je zásadní zejména pro molekulárně genetickou analýzu Danonovy choroby, u které jsou právě velké delece nebo duplikace častou příčinou onemocnění. Pacienti s Danonovou chorobou mohou být tak zachyceni v rámci diferenciální diagnostiky hledání genetické příčiny jejich hypertrofické kardiomyopatie

2) Amplikonové sekvenování umožňuje identifikaci minoritně zastoupených alel. V naší práci byla tato metoda využita pro vyšetření somatického mozaicismu a charakterizaci sestřihové varianty. Přítomnost/absence somatického mozaicismu je důležitou informací při vedení genetického



poradenství. Vyšetření je nutno zvážit ve všech rodinách, ve kterých nebyli rodiče probanda identifikováni jako přenašeči kauzální mutace.

U mutací vedoucích k chybnému sestřihu může být v určitém procentu zachován normální transkript, což může zmírnit klinickou manifestaci. Vyšetření vlivu sestřihové varianty na transkript tak může mít dopad na prognózu onemocnění.

3) Amplikonové sekvenování umožňuje vyšetření alelově specifické exprese, které jsme v této práci použili ke studiu X-inaktivace. X-inaktivace je jedním ze zásadních faktorů sledovaných u manifestních heterozygotek s X-vázanými onemocněními. Korelace fenotypu pacientek se stavem X-inaktivace je ve vybraných případech možná, nicméně často interpretačně komplikovaná. Metodické postupy shrnuté v této práci poukazují na metodická úskalí, která je potřeba zohlednit při interpretaci výsledků X-inaktivace.

Vytyčené cíle této práce byly splněny, hypotézy potvrzeny a dosažené výsledky byly zpracovány v pěti článcích publikovaných v časopisech s impakt faktorem. Výše popisované metody byly použity v dalších šesti publikacích nesouvisejících s tématem disertační práce.

## 6 Seznam publikací autora

### 6.1 Publikace, které jsou podkladem disertace

**REBOUN, Martin**, Jitka RYBOVA, Robert. DOBROVOLNY, Josef VCELAK, Tereza VESELKOVÁ, Gabriela STORKANOVA, Dita MUSALKOVA, Martin HREBICEK, Jana LEDVINOVA, Martin MAGNER, Jiri ZEMAN, Karolina PESKOVA a Lenka DVORAKOVA, 2016. **X-Chromosome Inactivation Analysis in Different Cell Types and Induced Pluripotent Stem Cells Elucidates the Disease Mechanism in a Rare Case of Mucopolysaccharidosis Type II in a Female.** *Folia Biologica*. **62**(2), 82–89. ISSN 0015-5500. **IF 0,939**

DVORAKOVA, Lenka, Hana VLASKOVA, Adrijan SARAJLIJA, Daniejela Petrović RAMADZA, Helena POUPETOVA, Eva HRUBA, Anna HLAVATA, Vladimír BZDUCH, Karolína PESKOVA, Gabriela STORKANOVA, Božica KECCMAN, Gordana DJORDJEVIC, Ivo BARIC, Ksenija FUMIC, Ingeborg. BARISIC, **Martin REBOUN**, Jan KULHANEK, Jiri ZEMAN a Martin MAGNER, 2017. **Genotype-phenotype correlation in 44 Czech, Slovak, Croatian and Serbian patients with mucopolysaccharidosis type II.** *Clinical Genetics* [online]. **91**(5), 787–796. ISSN 1399-0004. Dostupné z: doi:[10.1111/cge.12927](https://doi.org/10.1111/cge.12927) **IF 3,512**

MAJER, Filip, Lenka PIHEROVA, **Martin REBOUN**, Veronika STARA, Ondrej PELAK, Patricia NORAMBUENA, Viktor STRANECKY, Alice KREBSOVA, Hana VLASKOVA, Lenka DVORAKOVA, Stanislav KMOCH, Tomas KALINA, Milos KUBANEK a Jakub SIKORA, 2018. **LAMP2 exon-copy number variations in Danon disease heterozygote female probands: Infrequent or underdetected?** *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. **176**(11), 2430–2434. ISSN 1552-4833. Dostupné z: doi:[10.1002/ajmg.a.40430](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.40430) **IF 2.186**

MAJER, Filip, Bohdan KOUSAL, Petr DUSEK, Lenka PIHEROVA, **Martin REBOUN**, Romana MIHALOVA, Jiri GURKA, Alice KREBSOVA, Hana VLASKOVA, Lenka DVORAKOVA, Jana KRIHOVA, Petra LISKOVA, Stanislav KMOCH, Tomas KALINA, Milos KUBANEK a Jakub SIKORA, 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* [online]. **182**(1), 219–223. ISSN 1552-4833. Dostupné z: doi:[10.1002/ajmg.a.61416](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61416) **IF 2.125**

**REBOUN, Martin**, Jakub SIKORA, Martin MAGNER, Helena WIEDERLECHNEROVÁ, Alena ČERNÁ, Helena POUPĚTOVÁ, Gabriela ŠTORKÁNOVA, Dita MUŠÁLKOVÁ, Gabriela DOSTÁLOVÁ, Lubor GOLÁŇ, Aleš LINHART a Lenka DVOŘÁKOVÁ, 2022. **Pitfalls of X-chromosome inactivation testing in females with Fabry disease.** *American Journal of Medical Genetics. Part A* [online]. ISSN 1552-4833. Dostupné z: doi:[10.1002/ajmg.a.62728](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62728) **IF 2.802**

## 6.2 Publikace bez vztahu k tématu disertace

HALKOVA, Tereza, Sarka DVORAKOVA, Eliska VACLAVIKOVA, Vlasta SYKOROVA, Josef VCELAK, Pavla SYKOROVA, Petr VLCEK, Martin REBOUN, Rami KATRA, Daniela KODETOVA, Melanie SCHRUMPF, Tom VAN WEZEL, Hans MORREAU a Bela BENDLOVA, 2015. A novel RET/PTC variant detected in a pediatric patient with papillary thyroid cancer without ionization history. *Human Pathology* [online]. **46**(12), 1962–1969. ISSN 0046-8177. Dostupné z: doi:[10.1016/j.humpath.2015.08.013](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.08.013) **IF 2.791**

SYKOROVA, Vlasta, Sarka DVORAKOVA, Josef VCELAK, Eliska VACLAVIKOVA, Tereza HALKOVA, Daniela KODETOVA, Petr LASTUVKA, Jan BETKA, Petr VLCEK, **Martin REBOUN**, Rami KATRA a Bela BENDLOVA, 2015. Search for New Genetic Biomarkers in Poorly Differentiated and Anaplastic Thyroid Carcinomas Using Next Generation Sequencing. *Anticancer Research*. **35**(4), 2029–2036. **IF 1.895**

KRIJT, Jakub, Jitka SOKOLOVÁ, Pavel JEŠINA, Lenka DVOŘÁKOVÁ, **Martin ŘEBOUN**, Katarína BRENNEROVÁ, Martin MISTRÍK, Jiří ZEMAN, Tomáš HONZÍK a Viktor KOŽICH, 2017. Activity of the liver enzyme ornithine carbamoyltransferase (OTC) in blood: LC-MS/MS assay for non-invasive diagnosis of ornithine carbamoyltransferase deficiency. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. **55**(8), 1168–1177. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:[10.1515/cclm-2016-0715](https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0715) **IF 3.556**

MUSALKOVA, Dita, Eva STICOVA, **Martin REBOUN**, Jitka SOKOLOVA, Jakub KRIJT, Jitka HONZIKOVA, Jiri GURKA, Magdalena NEROLDOVA, Tomas HONZIK, Jiri ZEMAN, Milan JIRSA, Lenka DVORAKOVA a Martin HREBICEK, 2018. Variable X-chromosome inactivation and enlargement of pericentral glutamine synthetase zones in the liver of heterozygous females with OTC deficiency. *Virchows Archiv* [online]. **472**(6), 1029–1039. ISSN 1432-2307. Dostupné z: doi:[10.1007/s00428-018-2345-x](https://doi.org/10.1007/s00428-018-2345-x) **IF 2.868**

MUSALKOVA, Dita, Filip MAJER, Ladislav KUCHAR, Ondrej LUKSAN, Befekadu ASFAW, Hana VLASKOVA, Gabriela STORKANOVA, **Martin REBOUN**, Helena POUPETOVA, Helena JAHNOVA, Helena HULKOVA, Jana LEDVINOVA, Lenka DVORAKOVA, Jakub SIKORA, Milan JIRSA, Marie T. VANIER a Martin HREBICEK, 2020. Transcript, protein, metabolite and cellular studies in skin fibroblasts demonstrate variable pathogenic impacts of NPC1 mutations. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **15**(1), 85. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:[10.1186/s13023-020-01360-5](https://doi.org/10.1186/s13023-020-01360-5) **IF 2.868**

ZEMANOVA, Marketa, Petr CHRASTINA, Lenka DVORAKOVA, **Martin REBOUN**, Hana VLASKOVA, Helena JAHNOVA, Nabil EL-LABABIDI, Jana CEPOVA, Tomas HONZIK a Jiri ZEMAN, 2021. X-linked adrenoleukodystrophy: phenotype-genotype correlation in hemizygous males and heterozygous females with ABCD1 mutations. *Neuro Endocrinology Letters*. **42**(5), 359–367. ISSN 2354-4716. **IF 0.765**

## 7 Literatura

ACUNA-HIDALGO, Rocio, Tan BO, Michael P. KWINT, Maartje VAN DE VORST, Michele PINELLI, Joris A. VELTMAN, Alexander HOISCHEN, Lisenka E.L.M. VISSERS a Christian GILISSEN, 2015. Post-zygotic Point Mutations Are an Underrecognized Source of De Novo Genomic Variation. *American Journal of Human Genetics* [online]. **97**(1), 67–74. ISSN 0002-9297. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajhg.2015.05.008

BAE, Eun Hui, Jong Moon CHOI, Chang Seok KI, Seong Kwon MA, Han-Wook YOO a Soo Wan KIM, 2020. A late-onset male Fabry disease patient with somatic mosaicism of a classical GLA mutation: a case report. *Annals of Palliative Medicine* [online]. ISSN 2224-5839. Dostupné z: doi:10.21037/apm-19-635

BROADHEAD, D. M., J. M. KIRK, A. J. BURT, V. GUPTA, P. M. ELLIS a G. T. BESLEY, 1986. Full expression of Hunter's disease in a female with an X-chromosome deletion leading to non-random inactivation. *Clinical Genetics*. **30**(5), 392–398. ISSN 0009-9163.

BRUSIUS-FACCHIN, A. C., I. V. D. SCHWARTZ, C. ZIMMER, M. G. RIBEIRO, A. X. ACOSTA, D. HOROVITZ, I. L. MONLLEÓ, M. I. B. FONTES, A. FETT-CONTE, R. P. Oliveira SOBRINHO, A. R. DUARTE, R. BOY, P. MABE, M. ASCURRA, M. DE MICHELENA, K. L. TYLEE, G. T. N. BESLEY, M. C. V. GARRETON, R. GIUGLIANI a S. LEISTNER-SEGAL, 2014. Mucopolysaccharidosis type II: identification of 30 novel mutations among Latin American patients. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **111**(2), 133–138. ISSN 1096-7206. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2013.08.011

BURSTEIN, Danielle S., J. William GAYNOR, Heather GRIFFIS, Alyssa RITTER, Matthew J. O'CONNOR, Joseph W. ROSSANO, Kimberly Y. LIN a Rebecca C. AHRENS-NICKLAS, 2021. Genetic variant burden and adverse outcomes in pediatric cardiomyopathy. *Pediatric Research* [online]. **89**(6), 1470–1476. ISSN 1530-0447. Dostupné z: doi:10.1038/s41390-020-1101-5

CARREL, Laura a Huntington F. WILLARD, 2005. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* [online]. **434**(7031), 400–404. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature03479

CEYHAN-BIRSOY, Ozge, Trevor J. PUGH, Mark J. BOWSER, Elizabeth HYNES, Ashley L. FRISELLA, Lisa M. MAHANTA, Matt S. LEBO, Sami S. AMR a Birgit H. FUNKE, 2016. Next generation sequencing-based copy number analysis reveals low prevalence of deletions and duplications in 46 genes associated with genetic cardiomyopathies. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* [online]. **4**(2), 143–151. ISSN 2324-9269. Dostupné z: doi:10.1002/mgg3.187

COOP, Graham a Molly PRZEWORSKI, 2007. An evolutionary view of human recombination. *Nature Reviews. Genetics* [online]. **8**(1), 23–34. ISSN 1471-0056. Dostupné z: doi:10.1038/nrg1947

DVORAKOVA, Lenka, Hana VLASKOVA, Adrijan SARAJLIJA, Daniejela Petrović RAMADZA, Helena POUPETOVA, Eva HRUBA, Anna HLAVATA, Vladimir BZDUCH, arolína PESKOVA, Gabriela STORKANOVA, Bozica KECMAN, Gordana DJORDJEVIC, Ivo BARIC, Ksenija FUMIC, Ingeborg I. BARISIC, Martin REBOUN, Jan KULHANEK, Jiri ZEMAN a Martin MAGNER, 2017. Genotype-phenotype correlation in 44 Czech, Slovak, Croatian and Serbian patients with mucopolysaccharidosis type II. *Clinical Genetics* [online]. **91**(5), 787–796. ISSN 1399-0004. Dostupné z: doi:10.1111/cge.12927

FERREIRA, Susana, Carlos REGUENGA a João Paulo OLIVEIRA, 2015. The Modulatory Effects of the Polymorphisms in GLA 5'-Untranslated Region Upon Gene Expression Are Cell-Type Specific. *JIMD reports* [online]. **23**, 27–34. ISSN 2192-8304. Dostupné z: doi:10.1007/8904\_2015\_424

GILBERT, F, R KUCHERLAPATI, R P CREAGAN, M J MURNANE, G J DARLINGTON a F H RUDDLE, 1975. Tay-Sachs' and Sandhoff's diseases: the assignment of genes for hexosaminidase A and B to individual human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **72**(1), 263–267. ISSN 0027-8424.

CHEN, Xiao-Ling, Yan ZHAO, Hai-Ping KE, Wen-Ting LIU, Zhen-Fang DU a Xian-Ning ZHANG, 2012. Detection of somatic and germline mosaicism for the LAMP2 gene mutation c.808dupG in a Chinese family with Danon disease. *Gene* [online]. **507**(2), 174–176. ISSN 1879-0038. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2012.06.064

JURECKA, Agnieszka, Zita KRUMINA, Zbigniew ŻUBER, Agnieszka RÓZDŻYŃSKA-ŚWIĄTKOWSKA, Anna KŁOSKA, Barbara CZARTORYSKA a Anna TYLKI-SZYMAŃSKA, 2012. Mucopolysaccharidosis type II in females and response to enzyme replacement therapy. *American Journal of Medical Genetics. Part A* [online]. **158A**(2), 450–454. ISSN 1552-4833. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.a.34415

KMOCH, Stanislav a Jiří ZEMAN, 2018. Modern methods in diagnostics and research of molecular bases of rare diseases. *Casopis Lekarů Ceskych*. **157**(3), 133–136. ISSN 0008-7335.

KOSUGA, Motomichi, Ryuichi MASHIMA, Asami HIRAKIYAMA, Naoko FUJI, Tadayuki KUMAGAI, Joo-Hyun SEO, Mari NIKAIDO, Seiji SAITO, Kazuki OHNO, Hitoshi SAKURABA a Torayuki OKUYAMA, 2016. Molecular diagnosis of 65 families with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) characterized by 16 novel mutations in the IDS gene: Genetic, pathological, and structural studies on iduronate-2-sulfatase. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **118**(3), 190–197. ISSN 1096-7206. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2016.05.003

KOUSAL, Bohdan, Filip MAJER, Hana VLASKOVA, Lenka DVORAKOVA, Lenka PIHEROVA, Martin MELISKA, Hana LANGROVA, Tomas PALECEK, Milos KUBANEK, Alice KREBSOVA, Jiri GURKA, Veronika STARA, Michel MICHAELIDES, Tomas KALINA, Jakub SIKORA a Petra LISKOVA, 2021. Pigmentary retinopathy can indicate the presence of pathogenic LAMP2 variants even in somatic mosaic carriers with no additional signs of Danon disease. *Acta Ophthalmologica* [online]. **99**(1), 61–68. ISSN 1755-3768. Dostupné z: doi:10.1111/aos.14478

LINES, Matthew A., Stacy HEWSON, William HALLIDAY, Peter J. B. SABATINI, Tracy STOCKLEY, Anne I. DIPCHAND, Sarah BOWDIN a Komudi SIRIWARDENA, 2014. Danon Disease Due to a Novel LAMP2 Microduplication. *JIMD reports* [online]. **14**, 11–16. ISSN 2192-8304. Dostupné z: doi:10.1007/8904\_2013\_277

LONARDO, Fortunato, Paola DI NATALE, Susanna LUALDI, Fabio ACQUAVIVA, Cristina CUOCO, Francesca SCARANO, Marianna MAIOLI, Luigi Michele PAVONE, Grazia DI GREGORIO, Mirella FILOCAMO a Gioacchino SCARANO, 2014. Mucopolysaccharidosis type II in a female patient with a reciprocal X;9 translocation and skewed X chromosome inactivation. *American Journal of Medical Genetics. Part A* [online]. **164A**(10), 2627–2632. ISSN 1552-4833. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.a.36667

MAJER, Filip, Bohdan KOUSAL, Petr DUSEK, Lenka PIHEROVA, Martin REBOUN, Romana MIHALOVA, Jiri GURKA, Alice KREBSOVA, Hana VLASKOVA, Lenka DVORAKOVA, Jana KRIHOVA, Petra LISKOVA, Stanislav KMOCH, Tomas KALINA, Milos KUBANEK a Jakub SIKORA, 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* [online]. **182**(1), 219–223. ISSN 1552-4833. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.a.61416

MAJER, Filip, Ondrej PELAK, Tomas KALINA, Hana VLASKOVA, Lenka DVORAKOVA, Tomas HONZIK, Tomas PALECEK, Petr KUCHYNKA, Martin MASEK, Jiri ZEMAN, Milan ELLEDER a Jakub SIKORA, 2014. Mosaic tissue distribution of the tandem duplication of LAMP2 exons 4 and 5 demonstrates the limits of Danon disease cellular and molecular diagnostics. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **37**(1), 117–124. ISSN 1573-2665. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-013-9617-z

MAJER, Filip, Lenka PIHEROVA, Martin REBOUN, Veronika STARA, Ondrej PELAK, Patricia NORAMBUENA, Viktor STRANECKY, Alice KREBSOVA, Hana VLASKOVA, Lenka DVORAKOVA, Stanislav KMOCH, Tomas KALINA, Milos KUBANEK a Jakub SIKORA, 2018. LAMP2 exon-copy number variations in Danon disease heterozygote female probands: Infrequent or underdetected? *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. **176**(11), 2430–2434. ISSN 1552-4833. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.a.40430

MANARA, Renzo, Angelica RAMPAZZO, Mara CANANZI, Leonardo SALVIATI, Rodica MARDARI, Paola DRIGO, Rosella TOMANIN, Nicoletta GASPAROTTO, Elena PRIANTE a Maurizio SCARPA, 2010. Hunter syndrome in an 11-year old girl on enzyme replacement therapy with idursulfase: brain magnetic resonance imaging features and evolution. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **33 Suppl 3**, S67-72. ISSN 1573-2665. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-009-9023-8

MEIKLE, P. J., J. J. HOPWOOD, A. E. CLAGUE a W. F. CAREY, 1999. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* [online]. **281**(3), 249–254. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.281.3.249

MEINERT, Monika, Elisabet ENGLUND, Carola HEDBERG-OLDFORS, Anders OLDFORS, Björn KORNHALL, Catarina LUNDIN a Elisabeth WITTSTRÖM, 2019. Danon disease presenting with early onset of hypertrophic cardiomyopathy and peripheral pigmentary retinal

dystrophy in a female with a de novo novel mosaic mutation in the LAMP2 gene. *Ophthalmic Genetics* [online]. **40**(3), 227–236. ISSN 1744-5094. Dostupné z: doi:10.1080/13816810.2019.1627464

MISTRY, Pramod K., Nadia BELMATOUG, Stephan VOM DAHL a Roberto GIUGLIANI, 2015. Understanding the natural history of Gaucher disease. *American Journal of Hematology* [online]. **90 Suppl 1**, S6-11. ISSN 1096-8652. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.24055

MORALES, Jose A. a Arayampambil C. ANILKUMAR, 2021. Glycogen Storage Disease Type II. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2021-12-19]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470558/>

PANG, Shuchao, Dongfeng CHEN, Aimei ZHANG, Xianyun QIN a Bo YAN, 2012. Genetic analysis of the LAMP-2 gene promoter in patients with sporadic Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* [online]. **526**(1), 63–67. ISSN 1872-7972. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2012.07.044

PIÑA-AGUILAR, Raul E., Gerardo R. ZARAGOZA-ARÉVALO, Isabella RAU, Andreas GAL, Miguel A. ALCÁNTARA-ORTIGOZA, Mónica S. LÓPEZ-MARTÍNEZ a Yuritzi SANTILLÁN-HERNÁNDEZ, 2013. Mucopolysaccharidosis type II in a female carrying a heterozygous stop mutation of the iduronate-2-sulfatase gene and showing a skewed X chromosome inactivation. *European Journal of Medical Genetics* [online]. **56**(3), 159–162. ISSN 1878-0849. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmg.2012.11.006

POUPETOVÁ, Helena, Jana LEDVINOVÁ, Linda BERNÁ, Lenka DVORÁKOVÁ, Viktor KOZICH a Milan ELLEDER, 2010. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *Journal of inherited metabolic disease* [online]. **33**(4), 387–396. ISSN 1573-2665. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-010-9093-7

QUAIL, Michael A., Harold SWERDLOW a Daniel J. TURNER, 2009. Improved protocols for the illumina genome analyzer sequencing system. *Current Protocols in Human Genetics* [online]. **Chapter 18**, Unit 18.2. ISSN 1934-8258. Dostupné z: doi:10.1002/0471142905.hg1802s62

RAJKUMAR, Venkatraman a Vikramaditya DUMPA, 2021. Lysosomal Storage Disease. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2021-12-19]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563270/>

REBOUN, Martin, J. RYBOVA, R. DOBROVOLNY, J. VCELAK, T. VESELKOVÁ, G. STORKANOVA, D. MUSALKOVA, M. HREBICEK, J. LEDVINOVA, M. MAGNER, J. ZEMAN, K. PESKOVA a L. DVORAKOVA, 2016. X-Chromosome Inactivation Analysis in Different Cell Types and Induced Pluripotent Stem Cells Elucidates the Disease Mechanism in a Rare Case of Mucopolysaccharidosis Type II in a Female. *Folia Biologica*. **62**(2), 82–89. ISSN 0015-5500.

ROYER-BERTRAND, Beryl, Katarina CISAROVA, Florence NIEL-BUTSCHI, Laureane MITTAZ-CRETTOL, Heidi FODSTAD a Andrea SUPERTI-FURGA, 2021. CNV Detection from Exome Sequencing Data in Routine Diagnostics of Rare Genetic Disorders: Opportunities

and Limitations. *Genes* [online]. **12**(9), 1427. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes12091427

ŘEBOUN, Martin, Jakub SIKORA, Martin MAGNER, Helena WIEDERLECHNEROVÁ, Alena ČERNÁ, Helena POUPĚTOVÁ, Gabriela ŠTORKÁNOVA, Dita MUŠÁLKOVÁ, Gabriela DOSTÁLOVÁ, Lubor GOLÁŇ, Aleš LINHART a Lenka DVOŘÁKOVÁ, 2022. Pitfalls of X-chromosome inactivation testing in females with Fabry disease. *American Journal of Medical Genetics. Part A* [online]. ISSN 1552-4833. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.a.62728

SEMYACHKINA, A. N., E. Y. VOSKOBEOVA, E. Y. ZAKHAROVA, E. A. NIKOLAEVA, I. V. KANIVETS, A. D. KOLOTIL, G. V. BAYDAKOVA, M. N. KHARABADZE, R. G. KURAMAGOMEDOVA a N. V. MELNIKOVA, 2019. Case report: a rare case of Hunter syndrome (type II mucopolysaccharidosis) in a girl. *BMC medical genetics* [online]. **20**(1), 66. ISSN 1471-2350. Dostupné z: doi:10.1186/s12881-019-0807-x

SWIERCZEK, Sabina I., Lucie PITERKOVA, Jaroslav JELINEK, Neeraj AGARWAL, Sue HAMMOUD, Andrew WILSON, Kimberly HICKMAN, Charles J. PARKER, Bradley CAIRNS a Josef T. PRCHAL, 2012. Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state. *Blood* [online]. **119**(13), e100–e109. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2011-11-390351

SYKOROVA, Vlasta, Sarka DVORAKOVA, Josef VCELAK, Eliska VACLAVIKOVA, Tereza HALKOVA, Daniela KODETOVA, Petr LASTUVKA, Jan BETKA, Petr VLCEK, Martin REBOUN, Rami KATRA a Bela BENDLOVA, 2015. Search for New Genetic Biomarkers in Poorly Differentiated and Anaplastic Thyroid Carcinomas Using Next Generation Sequencing. *Anticancer Research*. **35**(4), 2029–2036.

TUSCHL, Karin, Andreas GAL, Eduard PASCHKE, Susanne KIRCHER a Olaf A. BODAMER, 2005. Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatric Neurology* [online]. **32**(4), 270–272. ISSN 0887-8994. Dostupné z: doi:10.1016/j.pediatrneurol.2004.10.009

YANG, Zhao, Birgit H. FUNKE, Linda H. CRIPE, G. Wesley VICK, Debora MANCINI-DINARDO, Liana S. PEÑA, Ronald J. KANTER, Brenda WONG, Brandy H. WESTERFIELD, Jaquelin J. VARELA, Yuxin FAN, Jeffrey A. TOWBIN a Matteo VATTA, 2010. LAMP2 microdeletions in patients with Danon disease. *Circulation. Cardiovascular Genetics* [online]. **3**(2), 129–137. ISSN 1942-3268. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCGENETICS.109.901785