

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

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



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

**Mgr. Martin Řeboun**

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

**Role of Next Generation Sequencing in Diagnostics and Prognosis of X-linked  
Lysosomal Storage Disorders**

Disertační práce

Školitel: **RNDr. Lenka Dvořáková, CSc.**

Konzultant: **doc. MUDr. Martin Magner, Ph.D.**

Praha, 2022

## **Prohlášení**

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

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

V Praze, 16. června 2022

Podpis

## **Identifikační záznam**

ŘEBOUN, Martin. *Role sekvenace nové generace v diagnostice a prognóze X-vázaných lysosomálních střídavých onemocnění. [Role of Next Generation Sequencing in Diagnostics and Prognosis of X-linked Lysosomal Storage Disorders]*. Praha, 2022. Počet stran 110, počet příloh 6. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu. Vedoucí závěrečné práce/Školitel Dvořáková, Lenka.

## **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 prób pro identifikaci malých a strukturních variant (rozsáhlé delece a duplikace) 2) amplikonové 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*.

Amplikonovým 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.

### **Klíčová slova**

Sekvenace nové generace, mozaicismus, alelově specifická exprese, inaktivace chromosomu X, Danonova choroba, mukopolysacharidóza typu II, Fabryho choroba

## **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 (mukopolysaccharidosis 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.

### **Key words**

Next generation sequencing, mosaicism, allele specific expression, X chromosome inactivation, Danon disease, mukopolysaccharidosis type II, Fabry disease

## **Poděkování**

Na prvním místě bych rád poděkoval paní RNDr. Lence Dvořákové, CSc., své školitelce, za odborné vedení, nekonečnou trpělivost, neutuchající elán a víru v mou osobu, díky níž jsem se dostal až na konec. Velký dík náleží panu doc. MUDr. Martinu Magnerovi, Ph.D., za konzultace a všechny připomínky a podněty týkající se nejen přípravy této práce, ale i předešlých publikací, a paní primářce Ing. Karolíně Peškové za veškerou podporu, kterou mně osobně i našemu týmu poskytla při vědeckém bádání.

Dále bych rád poděkoval všem kolegům z laboratoře sekvenačního centra, laboratoře DNA diagnostiky a laboratoře pro studium vzácných onemocnění za přátelství, podporu a pomoc v práci i v životě.

Tato práce byla podporována grantovými projekty: GAUK 580716, MZ ČR – RVO VFN64165

# Obsah

Prohlášení .....	2
Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Obsah.....	7
Seznam pojmů a zkratk .....	10
1. Úvod.....	14
1.1 Lysosom a lysosomální střeďavá onemocnění.....	14
1.1.1 Lysosomální střeďavá onemocnění .....	15
1.1.2 X-vázaná onemocnění .....	16
1.1.3 Fabryho choroba.....	16
1.1.4 Mukopolysacharidóza typu II.....	18
1.1.5 Danonova choroba.....	21
1.2 Chromosom X a jeho inaktivace .....	26
1.2.1 Vývoj lidského gonosomu.....	26
1.2.2 Ustanovení X-inaktivace .....	26
1.2.3 Stav X-inaktivace v populaci .....	28
1.2.4 X-inaktivace v tkáních .....	29
1.2.5 Metody pro stanovení X-inaktivace .....	30
1.3 Somatické varianty .....	31
1.4 Sekvenování nové generace.....	32
2. Cíle.....	37
3. Metody .....	39
3.1 Izolace nukleových kyselin z krve a tkání .....	39
3.2 Panelové hybridizační sekvenování nové generace.....	39

3.2.1	Laboratorní příprava hybridizačních knihoven .....	39
3.2.2	Bioinformatické zpracování dat z hybridizačního sekvenování .....	41
3.3	Amplikonové sekvenování .....	42
3.3.1	Stanovení alelických poměrů při analýze alelově specifické exprese, somatického mozaicismu a X-inaktivace .....	42
3.3.2	Příprava PCR produktů a RT-PCR produktů .....	43
3.3.3	Amplikonové sekvenování nové generace – Nextera XT .....	45
3.3.4	Zpracování dat z amplikonového sekvenování .....	46
3.4	Stanovení inaktivace chromosomu X s využitím metylačních sond .....	47
3.5	Stanovení somatických variant .....	48
4.	Výsledky .....	49
4.1	Zavedení metod NGS a zhodnocení jejich přínosu pro diagnostiku X-vázaných lysosomálních onemocnění .....	49
4.1.1	Diskuze a závěr k prvnímu cíli .....	54
4.2	Využití metod NGS pro analýzu somatického mozaicismu a sestřihových variant u pacientů s X-vázanými lysosomálními onemocněními .....	56
4.2.1	Genotypová-fenotypová korelace u mukopolysacharidózy II. typu .....	56
4.2.2	Genetická analýza somatického mozaicismu a XCI u Danonovy choroby .....	58
4.2.3	Genetická analýza XCI a somatického mozaicismu u dívky s MPS II .....	67
4.2.4	Diskuze a závěr k druhému cíli práce .....	69
4.3	Využití metod NGS pro analýzu transkripčních variant a studium X-inaktivace u pacientů s X-vázanými lysosomálními onemocněními .....	71
4.3.1	Diskuze a závěr k třetímu cíli práce .....	77
5.	Závěr .....	81
6.	Seznam publikací autora .....	82
6.1	Publikace, které jsou podkladem disertační práce .....	82



6.2	Publikace bez vztahu k tématu disertace .....	83
7.	Literatura.....	84
8.	Přílohy:.....	110

## Seznam pojmů a zkratek

<i>ABCD1</i>	gen asociovaný s X-vázanou cerebrální adrenoleukodystrofií (ATP Binding Cassette Subfamily D Member 1)
ABCD4	protein asociovaný s metylmalonovou acidurií
<i>AIFM1</i>	gen pro apoptózu indukující faktor (apoptosis inducing factor mitochondria associated 1)
<i>AR</i>	gen pro androgenní receptor (Androgen Receptor)
AR-MSP	metyl specifické PCR pro androgenní receptor (androgen receptor methylation-specific PCR)
BWA	software pro mapování variant (Burrows-Wheeler aligner)
cDNA	komplementární DNA (Complementary DNA)
ClinVar	databáze klinických variant
<i>CNKSR2</i>	gen pro (Connector Enhancer Of Kinase Suppressor Of Ras 2)
CNS	centrální nervová soustava
CNV	strukturní varianta - změna počtu kopií nukleových kyselin (copy number variant)
CNVkit	software pro analýzu strukturních variant
dbNSFP	databáze patogenních skóre
DD	Danonova choroba (Danon disease)
EDTA	polyaminokarboxylová kyselina
EGA	embryonální aktivace genomu
<i>FANCB</i>	gen asociovaný s Fanconiho anémií typu B (FA complementation group B)
FASTQ	datový formát sekvenačních dat
FD	Fabryho choroba (Fabry disease)

GAG glykosaminoglykan

GATK software pro identifikaci variant (Genome analysis toolkit)

GERP++ patogenní skóre fylogenetické konzervovanosti variant v lidském genomu (genomic evolutionary rate profiling)

*GLA* gen pro  $\alpha$ -galaktosidázu A (galactosidase alpha)

GnomAD databáze lidských genetických variant (genome aggregation database)

H3K27me3 modifikovaný histon

HGMD databáze lidských variant (human gene mutation database)

HKMP hypertrofická kardiomyopatie

HT1 hybridizační pufr (Illumina)

HUMARA metoda pro vyšetření X-inaktivace v genu *AR* (human androgene receptor assay)

*IDS* gen pro iduronát-2-sulfatázu (iduronate-2-sulfatase)

*IDS2* pseudogen ke genu *IDS*

*IL2RG* gen pro X-vázanou těžkou kombinovanou imunodeficienci (interleukin 2 receptor subunit gamma)

LAMP1 lysosomální membránový protein 1 (lysosomal associated membrane protein 1)

*LAMP2* gen pro lysosomální membránový protein 2 (lysosomal associated membrane protein 2)

LIMP 1/2 lysosomální integrální membránové proteiny

long-range PCR dlouhý PCR produkt, který je amplifikován za speciálních podmínek

LSD lysosomální střeďavé onemocnění (lysosomal storage disease)

MAF frekvence minoritní alely (minor allele frequency)

MPS II mukopolysacharidóza typu II

mRNA	mediátorová RNA (messenger ribonucleic acid)
NGS	sekvenování nové generace - masivně paralelní sekvenování (next generation sequencing)
NMD	mechanismus odbourávání mRNA (nonsense-mediated mRNA decay)
PAR	pseudoautosomální oblast (pseudoautosomal regions)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
Q30	označení skóre kvality s pravděpodobností 99,9% správného určení nukleotidu
qPCR	metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce (quantitative polymerase chain reaction)
<i>Rab7</i>	Ras monomerní G protein
RFLP	polymorfismus v délce restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
RNA-FISH	metoda fluorescenční in situ hybridizace (RNA-fluorescence in situ hybridization)
<i>RP2</i>	gen asociovaný s X-vázanou formou retinitis pigmentosa (retinitis pigmentosa 2 activator of ARL3 GTPase)
RT-PCR	reverzní polymerázová řetězová reakce (reverse transcription polymerase chain reaction)
SNARE	membránové receptory
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nukleotid polymorphism)
SRY	gen určující pohlaví (sex-determining region Y)
STR	krátká tandemová repetice (short tandem repeats)
VNTR	polymorfismus v počtu tandemových repetice (variable number tandem repeat)
WES	sekvenování celých exomů (whole exome sequencing)

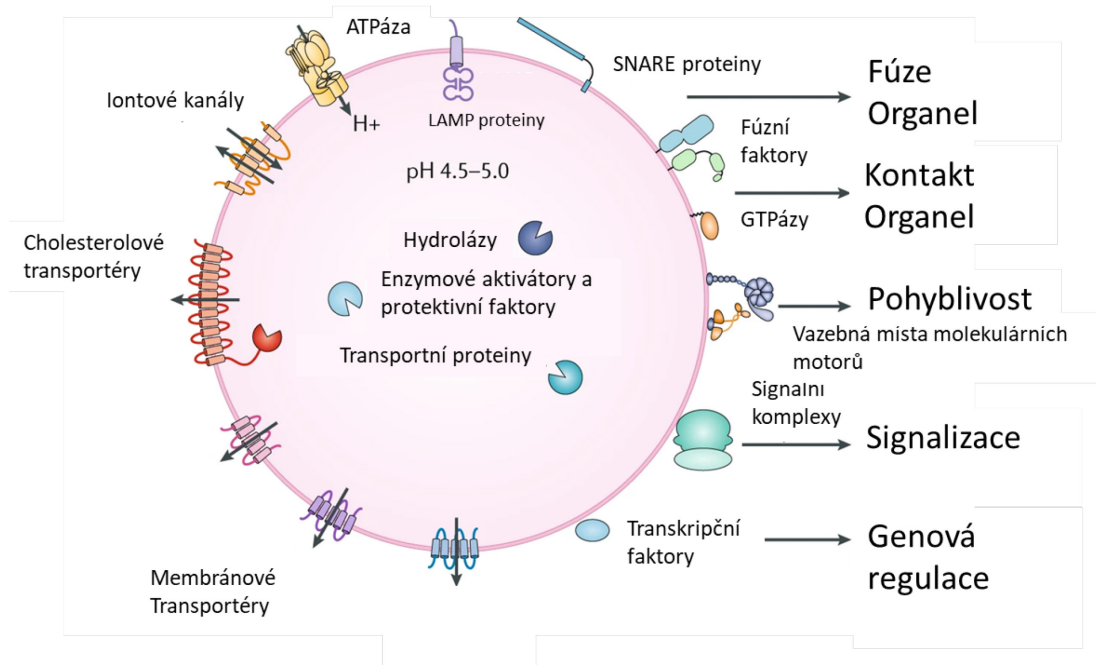
WGS	sekvenování celých genomů (whole genome sequencing)
WT	normální alela (wild type allele)
Xa	aktivní alela X
XACT	lidská nekódující RNA (X active coating transcript)
XCI	inaktivace chromosomu X (X chromosome inactivation)
Xi	neaktivní alela X
XIST	lidská nekódující RNA (X-inactive specific transcript)
Xist	myší nekódující RNA (X-inactive specific transcript)
$\alpha$ -gal	enzym $\alpha$ -galaktosidáza A
1x TE	pufř z tris(hydroxymetyl)aminomethanu a polyaminokarboxylové kyseliny

# 1. Úvod

## 1.1 Lysosom a lysosomální střešná onemocnění

Organela lysosomu byla popsána v roce 1955 belgickým biochemikem Christianem de Duvem (de Duve et al. 1955). V témže roce byla zobrazena pomocí elektronové mikroskopie a byly v ní lokalizovány hydrolytické enzymy (Novikoff et al. 1956). Pojmenování lysosom odráží základní roli této organely ve štěpení/lýzi makromolekul a recyklaci takto získaných stavebních jednotek. Dalším de Duvovým objevem byla organela peroxisomu (De Duve a Baudhuin 1966). De Duve v roce 1974 za své objevy týkající se strukturní a funkční organizace buňky získal Nobelovou cenu.

Lysosomy jsou důležitou součástí endosomálně-lysosomálního systému buňky, v němž zauímají roli klíčového regulátora homeostázy (Obrázek 1) a podílí se na celé řadě buněčných procesů: zejména intracelulární degradaci makromolekul a zpracování materiálu z endocytózy a autofagie. Podílí i na signalizaci, sekreci, recyklaci membrán a dalších funkcích (Winchester 2001; Schwake et al. 2013; Perera a Zoncu 2016).



**Obrázek 1: Vlastnosti a funkce lysosomů:** Lysosomy obsahují specifické lumenální, integrální membránové a periferně asociované proteiny. Lumen lysosomu obsahuje kyselé hydrolázy, enzymové aktivátory a také transportní proteiny. Kyselé pH lysosomálního lumen je udržováno ATPázou zabudovanou do membrány. Lysosomální membrána obsahuje: 1) vysoce glykosylované proteiny, které chrání membránu před degradací 2) iontové kanály a transportéry udržující iontovou homeostázu 3) transportéry pro cholesterol a další lipidy 4) přenašeče cukrů, nukleosidů, aminokyselin a dalších produktů lysosomální degradace 5) SNARE proteiny, které zprostředkovávají fúzi lysosomů s jinými organelami. Upraveno dle (Ballabio a Bonifacino 2020)

Lysosomy mají průměr 0,2-0,3  $\mu\text{m}$  a jsou ohraničeny fosfolipidovou membránou s nízkým obsahem cholesterolu, která je z vnitřní strany chráněna glykokalyxem – až 10 nm silnou vrstvou chránící membránu před účinky vlastních hydroláz. Glykokalyx je tvořen řetězci oligosacharidů obsažených v membránových glykoproteinech (LAMP1, LAMP2, LIMP1 a LIMP2). V samotné membráně se nachází na 300 proteinů odpovědných za řadu pochodů, např. snížení pH lysosomu nebo interakce s dalšími buněčnými organelami, mezi které patří endoplasmatické retikulum, mitochondrie, pozdní endosom nebo autofagosom. Na interakci se podílí např. GTPáza Rab7 a SNARE proteiny. Přenos látek mezi lysosomy a cytolem zajišťuje řada transportérů (např. ABCD4 transportér kobalaminu), iontových kanálů (např. TRPML1-3, TPC1-2, P2X4) a další membránové proteiny (Winchester 2001; Bajaj et al. 2019; Trivedi et al. 2020).

V lumen lysosomů se nachází bezmála 60 solubilních hydrolytických enzymů, jako jsou proteázy, sulfatázy, nukleázy, lipázy, fosfatázy a glykosidázy, které se podílejí na komplexní degradaci makromolekul v nízkém pH (méně než 5). Lumen lysosomů obsahuje také vápenaté ionty o koncentraci 0,5 mM (tj. 5000x vyšší oproti cytosolu). (Trivedi et al. 2020).

Modifikace hydroláz směřujících do lysosomu probíhá v *cis* Golgiho aparátu, ve kterém jsou příslušné proteiny označeny pomocí manóza-6-fosfátového zbytku. Modifikované proteiny se potom za vyššího pH váží na manóza-6-fosfátový receptor v *trans* Golgi aparátu. Prostřednictvím vezikul pokrytých klatrinem se modifikované proteiny transportují do pozdního endosomu, kde se vlivem nižšího pH komplex rozpadá. Z pozdního endosomu se odštěpí váčky, které transportují hydrolázy do cílových lysosomů (Trivedi et al. 2020).

### 1.1.1 Lysosomální střeďavá onemocnění

Lysosomální střeďavá onemocnění (LSD) jsou monogenní onemocnění způsobená deficitem některé z lysosomálních hydroláz, jejich aktivátorů nebo lysosomálních transportérů či strukturních proteinů (Platt et al. 2018).

Lysosomální onemocnění se mohou 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 strádání 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 strádán 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.

### **1.1.2 X-vázaná onemocnění**

Z historického pohledu se k X-vázaným onemocněním přistupovalo jako k onemocněním postihujícím výhradně muže - hemizygoty nesoucí pouze jednu kopii chromosomu X. Ženy byly převážně vnímány jako heterozygotní přenašečky, u kterých se onemocnění běžně klinicky nemanifestuje (Migeon 2013). Ukazuje se však, že řada X-vázaných onemocnění se projevuje i u heterozygotních žen. U některých chorob je jejich manifestace u žen - heterozygotek častá (např. Fabryho choroba nebo deficit ornitintraskarbamylázy), u jiných X-vázaných onemocnění jsou klinické projevy onemocnění u dívek velice vzácné (např. plně vyjádřený fenotyp Duchennovy svalové dystrofie nebo mukopolysacharidózy typ II) (Silva et al. 2020; de Camargo Pinto et al. 2011).

### **1.1.3 Fabryho choroba**

Fabryho-Andersenova, dále jen Fabryho choroba (Fabry disease, FD; OMIM #301500), je lysosomální strádavé onemocnění řazené mezi glykolipidózy. Jeho příčinou jsou mutace v *GLA* genu, které vedou k snížené nebo nulové aktivitě enzymu lysosomální hydrolázy  $\alpha$ -galaktosidázy



A ( $\alpha$ -gal), jehož funkcí je štěpení  $\alpha$ -galaktosylových zbytků z glykosfingolipidů. Částečně degradované glykosfingolipidy - převážně globotriaosylceramid a digalaktosylceramid se akumulují v lysosomech a následně dochází k poškození na buněčné, tkáňové i orgánové úrovni (Ortiz et al. 2018; Germain 2010).

První kazuistiky Fabryho choroby byly publikovány na konci 19. století anglickým chirurgem Wiliamem Andersonem a německým dermatologem Johannesem Fabrym (Fabry 1898). Lipidová podstata strádáního materiálu byla určena v padesátých letech 20. století (Sweeley a Klionsky 1963). Enzymový deficit  $\alpha$ -galaktosidázy A byl objasněn americkým lékařem Rosco O'Bradym v roce 1967 (Brady et al. 1967). Kompletní sekvence genu *GLA*, kódujícího enzym  $\alpha$ -galaktosidázu A, byla rozřešena až v roce 1989 (Kornreich et al. 1989).

Fabryho choroba je po Gaucherově chorobě (deficit glukosylcerebrosidázy, dědičnost AR) druhým nejčastějším lysosomálním strádavým onemocněním s prevalencí udávanou v rozmezí 1:40–60 000 (Meikle et al. 1999). Rozsáhlé screeningové studie ovšem poukazují na frekvenci výrazně vyšší, např. 1:4 600 v severoitalské populaci (Spada et al. 2006) a 1:1 521 v populaci taiwanské (Lin et al. 2009). V české populaci se prevalence Fabryho choroby odhaduje na 1:76 000, i když autoři připouští, že vzhledem k heterogenní klinické manifestaci onemocnění může být zastoupení výrazně vyšší (Reková et al. 2018).

#### **1.1.3.1.1 Klinické projevy Fabryho choroby**

Klasická forma onemocnění se u mužů projevuje často již na přelomu první a druhé dekády života, a to kožními angiokeratomy, tedy drobnými červenými papulkami lokalizovanými v oblasti pasu a pupeční jizvy, a dále hypohidrózou (sníženým pocením). Při postižení periferního nervového systému jsou prvním a také nejčastějším symptomem onemocnění pálivé nebo bodavé bolesti dlaní, prstů a lýtek, případně i dalších částí těla (Lidove et al. 2006). V dalším průběhu se přidává postižení srdce (hypertrofická kardiomyopatie, poruchy srdečního rytmu), ledvin (chronické renální selhání) a postižení rohovky (cornea verticillata). Projevem postižení autonomního nervového systému jsou gastrointestinální příznaky jako průjemy a nadýmání. Důležitou patologií představuje postižení CNS pod obrazem ischemické cévní mozkové příhody (Rolfes et al. 2005). U některých jedinců se první příznaky nemoci projeví až v dospělosti, přičemž pozdní forma se může omezit na kardiální či renální postižení. Onemocnění může vést

k předčasné smrti ve čtvrté či páté dekádě života. Projevy FD u žen se pohybují od asymptomatického přenašečství, které je spíš výjimkou, až po plně rozvinutou formu srovnatelnou s manifestací u mužů (Lenders et al. 2016). K nástupu onemocnění u žen dochází zpravidla později než u hemizygotů.

#### **1.1.3.1.2 Genetická podstata Fabryho choroby**

Gen *GLA* je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu X, konkrétně v lokusu Xq22.1. Je tvořen sedmi exony, známa je jediná transkripční varianta NM\_000169.3, která kóduje proteinový produkt dlouhý 429 aminokyselin (NP\_000160.1). Podle databáze „Human Gene Mutation Database“ (HGMD) bylo v červnu 2022 v literatuře popsáno 1104 patogenních variant a 6 polymorfismů spojených s onemocněním (Quinodoz et al. 2022).

#### **1.1.3.1.3 Diagnostika a léčba Fabryho choroby**

Diagnosticky se u mužů využívá stanovení enzymové aktivity  $\alpha$ -gal v plazmě, leukocytech nebo fibroblastech. Zatímco u mužů s FD je enzymová aktivita nulová nebo zbytková do deseti procent kontrol, u heterozygotních žen se aktivita enzymu pohybuje v širokém rozmezí od téměř nulové až po fyziologickou. U žen je proto nutno diagnózu stanovit molekulárně-genetickým vyšetřením (Nakano et al. 2013; Michaud et al. 2020).

FD se léčí enzymovou substituční terapií, a to intravenózním podáváním rekombinantního enzymu v infuzi. Terapie významně zmírňuje kardiální, renální i neuropatické příznaky onemocnění a celkově zpomaluje progresi onemocnění (Lipinski et al. 2014; El Dib et al. 2016). Pro pacienty s určitými mutacemi je také dostupná orálně podávaná chaperonová léčba. Chaperony zvyšují stabilitu a facilitují transport mutované formy  $\alpha$ -gal do lysosomů díky vazbě do aktivního centra enzymu. Po přechodu do lysosomu molekula chaperonu disociuje. V důsledku efektivnějšího přenosu enzymu do lysosomu je dosaženo vyšší enzymové aktivity (McCafferty a Scott 2019; Lenders a Brand 2021)

### **1.1.4 Mukopolysacharidóza typu II**

Mukopolysacharidóza typu II (MPS II, OMIM #309900) je jediným X-vázaným zástupcem ze skupiny mukopolysacharidóz. Příčinou mukopolysacharidóz je deficit některého z lysosomálních

enzymů spojených s poruchou degradace glykosaminoglykanů (GAG), dříve mukopolysacharidů, a jejich následným střádáním v různých orgánech. GAG díky své chemické povaze určují pevnost a elasticitu pojivové tkáně. Mají důležitou roli v růstu a diferenciaci buněk a mezibuněčné interakci (Demydchuk et al. 2017).

Klinické projevy mukopolysacharidóz jsou vysoce variabilní, spojené s progresivním charakterem postižení. Typickým nálezem u této skupiny onemocnění je kraniofaciální dysmorfie ve smyslu hrubých obličejových rysů, makrocefalie, hepato- a splenomegalie, pupeční a/nebo tříselná kýla, syndrom karpálního tunelu. U dětí dochází k disproporčnímu malému vzrůstu, k omezení hybnosti kloubů a bederní kyfóze. Postižení CNS je variabilní (Wraith et al. 2008).

Příčinou MPS II je deficit hydrolázy iduronát-2-sulfatázy, která katalyzuje první krok katabolismu dermatansulfátu a heparansulfátu. Udávaná incidence onemocnění v české populaci je 1:230 000 (Poupetová et al. 2010), celosvětová incidence se pak udává v rozmezí 1: 92 000 až 1:260 000 (D'Avanzo et al. 2020).

#### **1.1.4.1 Klinické projevy mukopolysacharidózy typ II**

První nespecifické příznaky onemocnění zahrnují větší obvod hlavy, záněty horních cest dýchacích a středního ucha, ztuhlost malých i velkých kloubů a pupečnickovou a/nebo tříselnou kýlu. V případě závažnější formy se už v batolecím věku objevuje hepatomegalie a progredují morfologické změny v obličejí. V průběhu růstu dochází ke změnám ve tvaru a struktuře kostí. Až dvě třetiny postižených chlapců vykazuje v různé míře snížení intelektu (Wraith et al. 2008). Střádání GAG ve srdečních chlopních vede k postupnému rozvoji srdečního selhání. Častá je také ztráta sluchu. Jedinci se závažnější formou se bez léčby dožívají v průměru 15 let. U mírnějších forem může délka dožití přesáhnout 50 let. Příznaky popsané u typického pacienta jsou zobrazeny na fotografii (Obrázek 2).



**Obrázek 2:** Fenotyp 19letého pacienta s mukopolysacharidózou typu II. Nápadná je nízká postava, kraniofaciální dysmorfie ve smyslu hrubých rysů v obličeji, soudkovitý hrudník, bederní lordóza s hrudní kyfózou, kontraktury velkých i malých kloubů, pupeční kýla. (Publikováno se souhlasem pacienta, snímky z archivu doc. MUDr. Martina Magnera, Ph.D.)

#### 1.1.4.2 Genetická podstata mukopolysacharidózy typ II

Mukopolysacharidóza typu II je způsobena mutacemi genu *IDS* (iduronate-2-sulfatáza), který je lokalizován do lokusu Xq28 a zahrnuje 9 exonů o celkové délce 44kb. Gen kóduje 550 aminokyselin dlouhý polypeptid. Celý glykosylovaný protein má velikost 76 kDa a skládá se ze dvou podjednotek. Těžký řetězec obsahující katalytické místo má velikost 42 kDa. Lehký řetězec má velikost 14 kDa a dává vzniknout hydrofobnímu obalu. Klíčovým prvkem katalytického místa je posttranslačně modifikovaný cystein 84 (Demydchuk et al. 2017; Froissart et al. 1995).

Pro *IDS* gen byl popsán nefunkční pseudogen *IDS2*, lokalizovaný v invertované orientaci přibližně 20kb distálně od funkčního genu (Froissart et al. 1998). Pseudogen vykazuje vysokou sekvenční homologii pro exony a introny 2 a 3. Pro exon 3 je shoda dokonce 100%. Vysoce homologní je i intron 7 (Bunge et al. 1998). Do roku 2022 bylo pro gen *IDS* v databázi HGMD publikováno na 729 variant, 63 z nich jsou rozsáhlé delece a inserce a duplikace. 21 variant představuje rozsáhlé přestavby, mezi kterými dominují homologní nealelické rekombinace mezi homologními oblastmi genu *IDS* a jeho pseudogenu *IDS2* (Quinodoz et al. 2022).

#### **1.1.4.3 Diagnostika a léčba mukopolysacharidózy typ II**

Při vyslovení podezření na MPS II je jako první indikováno biochemické vyšetření profilu glykosaminoglykanů v moči. Uvedené vyšetření nejenom potvrdí onemocnění ze skupiny mukopolysacharidóz, ale pomáhá blíže zacílit na některý z jejich typů. Následuje vyšetření enzymové aktivity nejčastěji v leukocytech, diagnóza je souběžně potvrzena molekulárně-genetickým vyšetřením.

Pro pacienty je dostupná enzymová substituční terapie rekombinantním enzymem. Jedná se o infuzní léčbu aplikací jedenkrát týdně, u které zpravidla dochází k ústupu hepatomegalie a ke zpomalení progresu onemocnění. Léčba však neovlivňuje postižení CNS (enzym neprochází hematoencefalickou bariérou), ani postižení srdečních chlopní a pojivové tkáně (Scarpa et al. 2011).

K manifestaci MPS II u heterozygotek dochází jen velmi vzácně. Všechny doposud popsané případy manifestace MPS II u žen, se vyznačovaly kompletním deficitem enzymu iduronát-2-sulfatázy. Nejčastější příčinou deficitu byla výhradní exprese mutované alely, způsobená extrémním zešikmením X-inaktivace (Kloska et al. 2011; Winchester et al. 1992; Sohn et al. 2010). Další příčinou manifestace je komplexní chromosomální přestavba znemožňující expresi genu *IDS* (Manara et al. 2010) nebo mutace na obou alelách (Cudry et al. 2000).

#### **1.1.5 Danonova choroba**

Danonova choroba (DD, OMIM #300257) je vzácné X-vázané onemocnění s klinickými projevy jak u mužů, tak i u žen. Referenční fenotyp u mužů zahrnuje kardiomyopatii, myopatii kosterních svalů a mírný kognitivní deficit. Zpočátku bylo onemocnění mylně klasifikováno jako varianta

Pompeho choroby s fyziologickou aktivitou kyselé maltázy (alfa-glukosidázy) a označováno jako Glykogenóza IIb (GSDIIb) (Danon et al. 1981). Klasifikace byla upravena po vyloučení akumulace glykogenu, který se naopak u Pompeho choroby střádá (Nishino et al. 2000).

Jedná se o velice vzácné onemocnění, od popisu nemoci v roce 1981 do roku 2020 bylo popsáno pouze 500 případů (Cenacchi et al. 2020). Recentní práce založené na metodách průtokové cytometrie a sekvenování nové generace (NGS) však ukazují, že Danonova choroba je s velkou pravděpodobností poddiagnostikována (Cenacchi et al. 2020; Gurka et al. 2020). Pacienti s Danonovou chorobou mohou být vedeni např. pod diagnózou hypertrofické (HKMP) či dilatační kardiomyopatie (Tabulka 1) (Cenacchi et al. 2020; Brambatti et al. 2019),

*Tabulka 1: Zastoupení Danonovy choroby mezi pacienty s onemocněním srdce. Data převzata z (Cenacchi et al. 2020)*

Skupina	Zastoupení [%]	Původní zdroj
Děti s HKMP	4-6	(Yang et al. 2005; Fu et al. 2016; Hayashi et al. 2018)
Dospělí s HKMP	0,7-4	(Mazzarotto et al. 2019; Charron et al. 2004; Arad et al. 2005)
Dospělí s koncentrickou HKMP	6–8	(Cheng et al. 2012)
Pacienti se zesílenými stěnami levé komory a preexcitací na EKG	17–30	(Arad et al. 2005; Liu et al. 2018; 2019)
Pacienti s vakuolární myopatií a HKMP	33	(Fanin et al. 2006)

Rozdíl v manifestaci mezi pohlavími je znatelný u hypertrofické kardiomyopatie, kterou ve studii Bouček a kolektiv 2011 vyvinulo 88 % mužů, ale pouze 33 % žen, i když většina pacientek vyvinula jinou formu kardiálního onemocnění. (Boucek et al. 2011). Rozdíly byly popsány i u Wolffova-Parkinsonova-Whiteova syndromu, který se projevil u 68,2 % mužů, ale pouze u 26,7 % žen (Brambatti et al. 2019). Podobně neurokognitivní složka je u mužů přítomna ve 100 %, zatímco u žen jen asi v polovině případů (Tabulka 2). U muskulárně skeletální složky jsou u mužů výrazně zvýšené svalové enzymy (kreatinkináza, alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza). Retinální abnormality se vyskytují u obou pohlaví v podobné míře (Boucek et al. 2011; Brambatti et al. 2019).

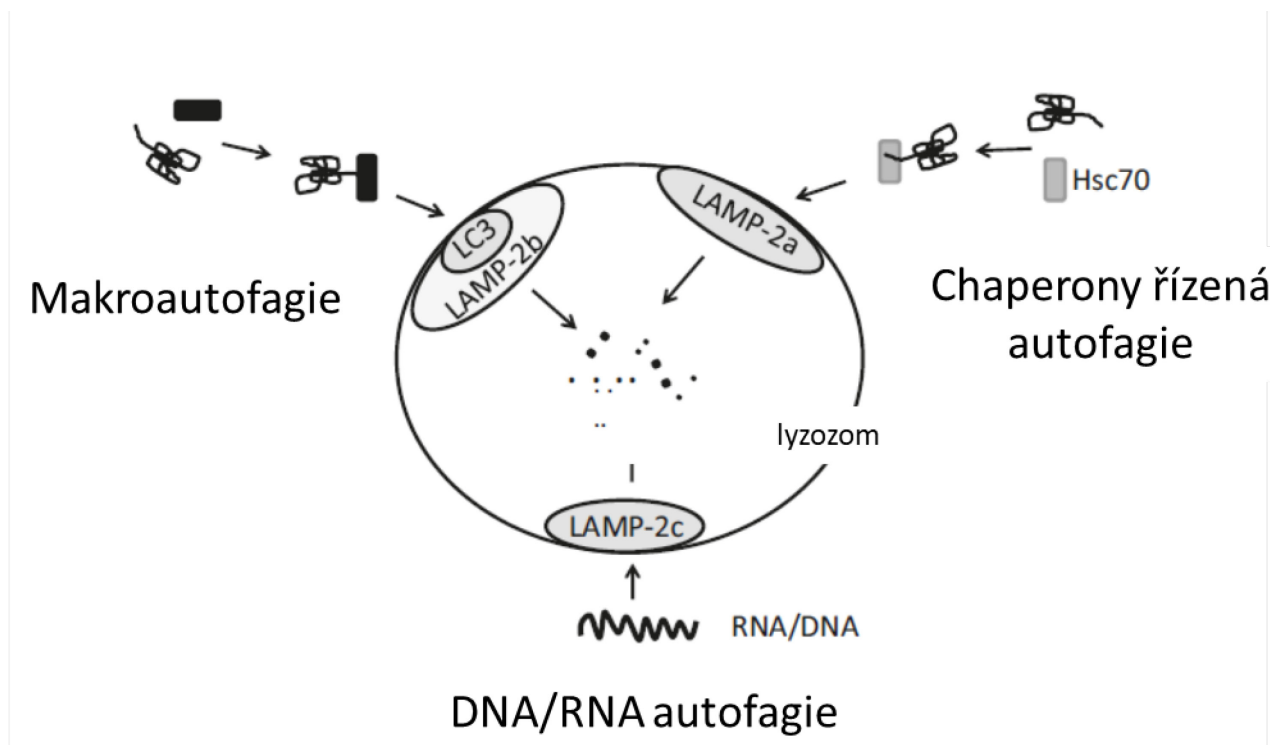
**Tabulka 2: Rozdíly projevech Danonovy choroby v závislosti na pohlaví. Stanoveno v kohortě 26 pacientů a 18 pacientek s DD (Boucek et al. 2011)**

	<b>Muži (n=26) [%]</b>	<b>Ženy (n=18) [%]</b>
<b>Kardiální složka</b>	88,5	77,7
<b>Neurokognitivní složka</b>	100	46,6
<b>Muskulární složka</b>	80	50

Muži jsou většinou diagnostikováni do třetí dekády života, zatímco ženy jsou díky mírnějšímu průběhu zpravidla diagnostikovány později, někdy až v šesté dekádě života, a to často až na základě odhalení nemoci u jejich synů. U žen tak většinou nedochází k včasnému zahájení léčby ani efektivnímu klinickému ani genetickému poradenství, hrozí u nich riziko náhlé smrti a riziko nemoci je zároveň předáváno do další generace (Boucek et al. 2011; Brambatti et al. 2019).

#### **1.1.5.1 Genetická podstata onemocnění Danonovy choroby**

Danonova choroba je způsobena mutacemi v genu *LAMP2* (lysosomal associated membrane protein 2) (Nishino et al. 2000). *LAMP2* je membránový protein, který se podílí na transportu makromolekul a interakcích lysosomů s endosomy a plasmatickou membránou. Gen je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu X a je tvořen devíti exony, přičemž devátý exon má tři alternativní varianty vedoucí ke vzniku tří různých sestřihových variant mRNA. Exony 1 až 8 a část exonu 9 kódují lumenální doménu proteinu. Tato část proteinu je silně glykosylována, aby bylo zabráněno její degradaci v kyselém prostředí (Eskelinen 2005; Mrschtik a Ryan 2015). Transmembránová a cytoplasmatická část proteinu je kódována alternativními exony 9. Alternativní sestřih dává vzniknout třem izoformám, které plní specifickou funkci při lysosomální autofagii, přičemž cytoplasmatická část proteinu slouží jako receptor proteinů a dalších molekul určených k degradaci (Nishino et al. 2000). Funkce jednotlivých izoform je shrnuta na obrázku (Obrázek 3). Izoforma *LAMP2A* se účastní chaperony řízené autofagie a mikroautofagie (Cenacchi et al. 2020), *LAMP2B* je spojována s makroautofagií (Bandyopadhyay et al. 2008; Nishino et al. 2000; Pajares et al. 2018) a u nejslaběji exprimované izoformy *LAMP2C* se předpokládá její zapojení do degradace nukleových kyselin - RNautofagie a DNautofagie (Fujiwara et al. 2013a; 2013b; Hase et al. 2015).



**Obrázek 3: Funkce izoform proteinu LAMP2 při lysosomální autofagii.** Strukturně se jednotlivé izoformy proteinu odlišují až v posledním exonu (exon 9). Izoforma A se podílí na chaperony řízené autofagii a mikroautofagii, izoforma B se podílí na makroautofagii a izoforma C je zapojena do degradace nukleových kyselin (Cenacchi et al. 2020).

Podle databáze HGMD (Quinodoz et al. 2022) bylo v genu *LAMP2* publikováno 107 patogenních variant, z toho 79 (tj 74%) variant je nulových (21 nonsense, 44 malých delecí nebo duplikací, 12 rozsáhlých delecí a 2 rozsáhlé duplikace). Tento údaj je důležitý z hlediska laboratorní diagnostiky. Nulové mutace jednoznačně vylučují přítomnost aberantního proteinu a v těchto případech lze využít metodu průtokové cytometrie.

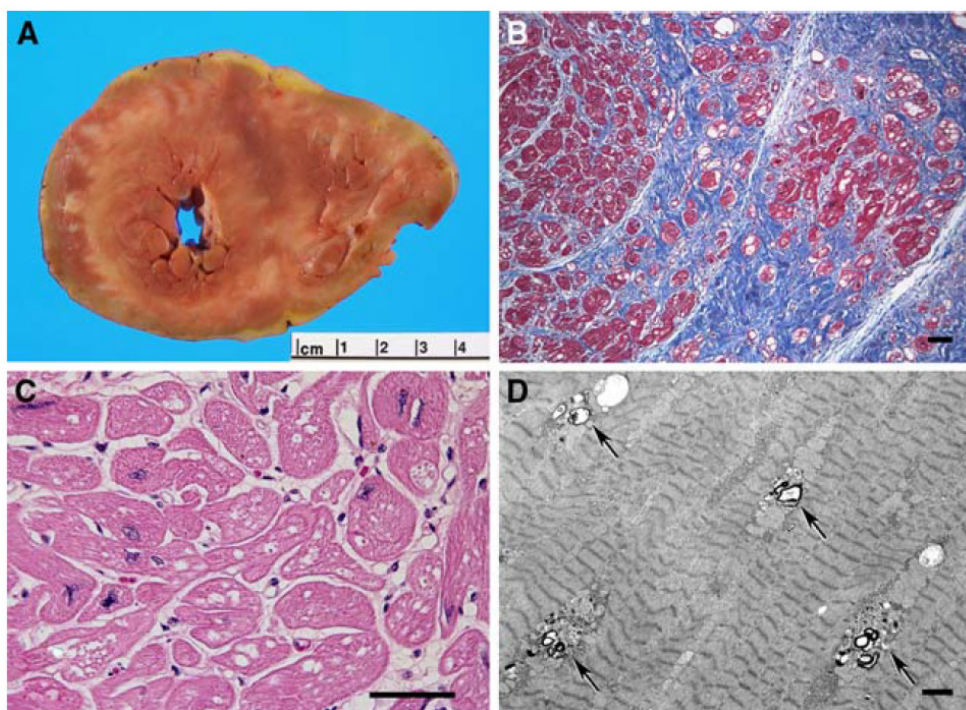
### 1.1.5.2 Diagnostika Danonovy choroby

Diagnostika u pacientů s Danonovou chorobou byla v minulosti založena na biopsii srdečního a kosterního svalu, popřípadě na vyšetření explantátu srdce po transplantaci pomocí elektronové mikroskopie v kombinaci s imunohistologií LAMP2 (Obrázek 4) (Taylor et al. 2007). Problematické je použití této metody u žen vzhledem k jejich mozaikovitě expresi alel. Kosterní sval vzniká v průběhu vývoje splynutím několika sousedních buněk v syncytium, tedy mnohjadernou buňku. Zatímco u mužů splynutí buněk nemá na přítomnost patologického



proteinu vliv, u žen se splýváním v syncytia zastoupení proteinu sníží a interpretace vyšetření může být nejednoznačná (Majer et al. 2012; Hedberg Oldfors et al. 2015).

Gen *LAMP2* je významně exprimován v leukocytech. U mužů lze deficit proteinu stanovit pomocí western blotu (Fanin et al. 2006). Velmi spolehlivou a citlivou metodou pro diagnostiku DD se ukázala být průtoková cytometrie (Regelsberger et al. 2009). Je založena na detekci LAMP2 negativních buněk oproti kontrolnímu proteinu LAMP1. Využití metody je podmíněno tím, že mutace nedovoluje produkci mutantního proteinu. Tento typ mutací v genu *LAMP2* podle HGMD výrazně převládá. Díky metodě průtokové cytometrie je možno efektivně posoudit nejasné genetické nálezy např. u variant nejasného významu (VUS) nebo v případech delecí/multiplikací. U žen lze tyto výsledky porovnávat se stavem mozaiky X-inaktivace (Majer et al. 2012).



**Obrázek 4:** Vzorek srdečního svalu od 14ti letého pacienta s Danonovou chorobou. a) Příčný řez explantovaným srdcem ukazující biventrikulární hypertrofii a fibrózu. b) Mikrofotografie (trichromové barvení) ukazující rozsáhlou fibrózu modře a kardiomyocyty červeně (měřítko odpovídá 100  $\mu$ m). c) Mikrofotografie (barvení hematoxylinem a eosinem) ukazující rozsáhlou vakuolizaci kardiomyocytů (měřítko odpovídá 100  $\mu$ m). d) Elektronový mikrosnímek ukazující mnohočetné autofagické vakuoly (šipky), korelující s cytoplasmatickou vakuolizací pozorovanou světelnou mikroskopií (měřítko odpovídá 1  $\mu$ m). Převzato z (Taylor et al. 2007).

## 1.2 Chromosom X a jeho inaktivace

### 1.2.1 Vývoj lidského gonosomu

Chromosom X je lidský gonosom, tedy jeden ze dvou chromosomů určujících pohlaví. Ženské pohlaví je určeno kombinací dvou X chromosomů (XX), zatímco mužské pohlaví je určeno kombinací chromosomů X a Y. Oba gonosomy se vyvinuly z páru identických autosomů. Chromosom X je submetacentrický, obsahuje 862 identifikovaných genů (Juchniewicz et al. 2021). Pouze 54 z nich má svůj protějšek na chromosomu Y, na kterém se shlukují do dvou pseudoautosomálních oblasti PAR I a II. Chromosom Y prošel rozsáhlou několikastupňovou inverzí, při které byla potlačena rekombinace a došlo k eliminaci přenosu SRY regionu určujícího pohlaví (Bachtrog 2013).

### 1.2.2 Ustanovení X-inaktivace

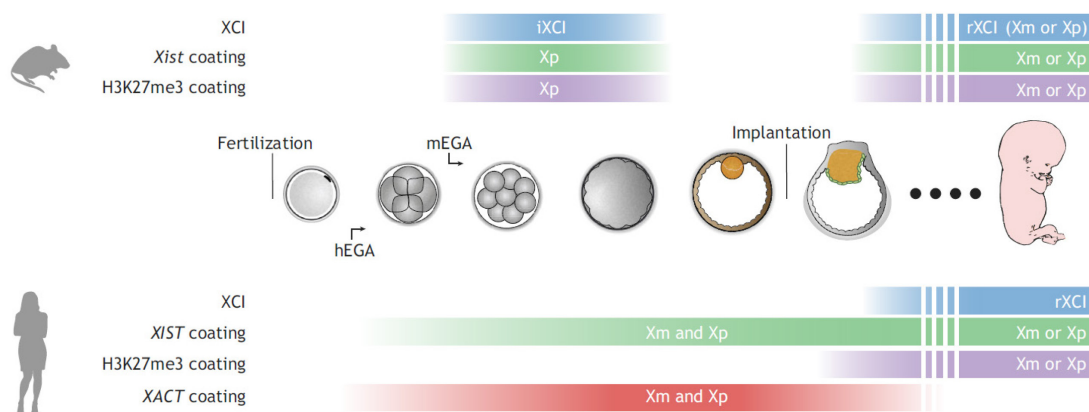
Většina poznatků o ustanovení X-inaktivace byla získána pozorováním myších embryí (Obrázek 6). U myši dochází k inaktivaci chromosomu X ve dvou krocích. V prvním kroku dojde ve čtyřbuněčném stádiu k imprintovanému umlčení paternálního chromosomu X. V tomto stavu je buňka udržována až do stádia blastocysty, ve které je opět aktivován paternální chromosom a následně je u těchto buněk náhodně umlčen jeden z chromosomů. V procesu X-inaktivace hraje ústřední roli dlouhá nekódující RNA, *Xist* (X-inactive specific transkript). V průběhu X-inaktivace se *Xist* akumuluje v cis fázi na budoucím inaktivním X chromosomu v regionech, které jsou pravděpodobně částečně značeny histonem H3K27me3 (Engreitz et al. 2013) *Xist* pak spouští kaskádu dějů, které vedou ke stabilnímu umlčení celého chromosomu (vyřazení RNA polymerázy II, modifikace histonů a metylace DNA) (Cerase et al. 2015) Exprese *Xist* je řízena faktory lokalizovanými v blízkosti genu *Xist* v regionu nazývaném X-inaktivační centrum. V této oblasti je lokalizována další dlouhá nekódující RNA *Tsix*, která potlačuje expresi *Xist* z aktivního chromosomu (Patrat et al. 2020).

Studie provedené na lidských embryích před implantací naznačují, že řada molekulárních mechanismů popsaných u myši není napříč živočišnými druhy konzervována (Migeon 2017). U člověka nedochází k ustanovení inaktivace bezprostředně po oplození vajíčka, po krátkou dobu jsou oba chromosomy aktivní. Kdy dojde k nevratnému ustanovení inaktivace, není přesně známo. Na základě studie založené na sekvenaci RNA z jedné buňky (Petropoulos et al. 2016) byl formulován model, ve kterém jsou z počátku oba X chromosomy aktivní a následně dochází

k utlumení exprese z obou chromosomů. K asymetrii exprese mezi jednotlivými chromosomy, spojované s klasickou představou inaktivace, došlo podle autorů studie až od pátého dne vývoje. Při opětovné analýze dat jinou skupinou však byly původní závěry o snížení exprese z obou alel zpochybněny (Moreira de Mello et al. 2017).

Při průběhu asymetrického utlumení dochází ke specifické expresi a akumulaci *XIST* (lidský analog myši *Xist*) na chromosomu vybraném k inaktivaci. Exprese *XIST* je u člověka detekovatelná ve čtyřbuněčném stádiu, v průběhu času se zvyšuje. V sedmém dni od oplodnění koreluje exprese této RNA se stavem potlačené exprese z chromosomů X (Sahakyan et al. 2017).

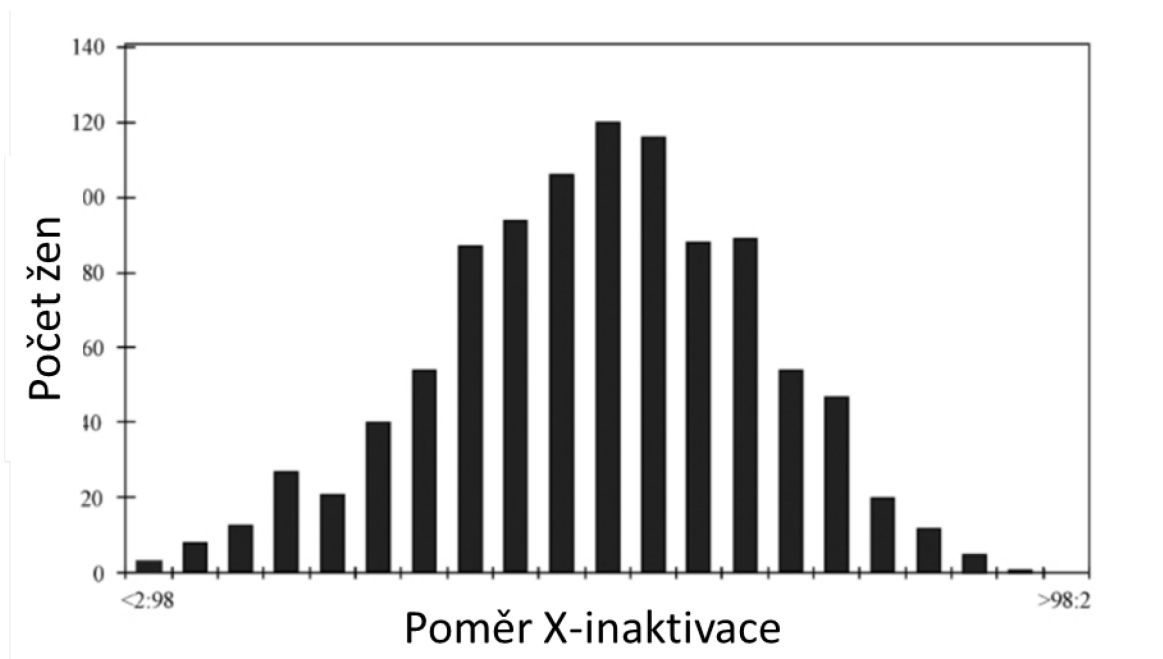
U člověka není analog myšního genu *Tsix* v embryích transkribován a předpokládá se přítomnost jiného mechanismu, kterým by mohla být exprese dlouhé nekódující RNA, *XACT*. Výzkumy s kombinovaným přístupem využívající RNA sekvenování v jedné buňce (single cell RNA sequencing) a RNA-FISH (fluorescenční in situ hybridizace RNA) ukázaly, že exprese *XACT* silně koreluje s expresí *XIST* (Vallot et al. 2017).



**Obrázek 5: Porovnání charakteristických znaků při ustanovení X-inaktivace během raného vývojem myši a člověka.** Během preimplantačního vývoje **myši** (nahore) je inaktivace chromosomu X úzce spojena s expresí nekódující RNA *Xist* a probíhá ve dvou krocích. První krok je navázán na embryonální aktivaci genomu (*mEGA*), v tomto stadiu je systematicky inaktivován paternální chromosom X (*Xp*) (*iXCI* – imprintovaná X-inaktivace - modrá). Tento stav je udržován až do vytvoření časných blastocyst. Poté následuje druhý krok ustavení náhodné X-inaktivace (*rXCI*- modrá). Při tomto procesu je náhodně inaktivována maternální X (*Xm*) nebo *Xp* alela. V průběhu vývoje myši koreluje exprese histonu *H3K27me3* (fialová) s expresí *Xist* na inaktivovaném chromosomu X (zelená). Preimplantační vývoj u **člověka** (dole) probíhá bez imprintované inaktivace. Exprese *XIST* během embryonální aktivity genomu (*hEGA*) probíhá z maternálního i paternálního chromosomu. Současně je v preimplantačním období na aktivním X chromosomu exprimována i dlouhá nekódující RNA, *XACT* (červená). K expresi *H3K27me3* na inaktivním chromosomu X dochází až v postimplantačním stadiu (Patrat et al. 2020).

### 1.2.3 Stav X-inaktivace v populaci

Předpokládá se, že výběr inaktivovaného chromosomu X je zcela náhodný. Maternální i paternální chromosom má stejnou pravděpodobnost být inaktivován a poměr inaktivace by u většiny žen měl být rozdělen s poměrem 50:50. Tuto domněnku potvrzuje analýza inaktivace X chromosomu v periferní nebo v pupečnickové krvi novorozeneček (n = 590) a populace zdravých dospělých žen (n = 415), celkem 1005 žen (Amos-Landgraf et al. 2006). Ve studii bylo prokázáno, že u 75 % žen byla inaktivace rozložena náhodně (Obrázek 7, medián 50:50), čtvrtina žen vykazovala vyšší poměr 70:30 ve prospěch jedné z alel a 8 % z těchto žen vykazovalo rozložení XCI v poměru vyšším než 80:20. Extrémní posun v poměru více než 95:5 byl přítomen u minima žen (0,8 %) (Amos-Landgraf et al. 2006). Tyto výsledky do značné míry podporují i data získaná na krevních vzorcích z kohorty 79 dívek a jejich rodičů pomocí RNA sekvenování. U více než poloviny dívek a žen byla inaktivace vyvážená, s poměrem nižším než 65:35 (Shvetsova et al. 2019).



**Obrázek 6:** Poměrné zastoupení inaktivní paternální/maternální alely v populaci. Stav inaktivace stanovený u 1005 žen je na grafu zobrazen ve 21 skupinách v rozsahu od 2:98 do 98:2. Skupiny vykazují normální distribuci, přičemž průměr distribuce je 49:51 a medián 50:50 Převzato z (Amos-Landgraf et al. 2006).

Vyšší míra inaktivace jedné z alel byla stanovena v populaci starších žen, kdy byl pozorován nárůst výrazného zešíkmení XCI (více jak 90:10) v krvi, bukálních stěrech a moči v průměru u 16

% žen starších 60 let (Sharp et al. 2000). Tento jev byl pozorován ve vzorcích krve v řadě dalších prací (Amos-Landgraf et al. 2006; Busque et al. 1996; Fey et al. 1994; Gale et al. 1997; Sandovici et al. 2004), zatímco v jedné recentní publikaci potvrzen nebyl (Shvetsova et al. 2019). V průřezové studii 350 žen ve věku mezi 0 - 88 let (Hatakeyama et al. 2004) je poukázáno na fakt, že posun v inaktivaci se výrazněji projevuje až po 30. roce života. Na podobný trend upozorňují i (Sandovici et al. 2004), kteří sledovali výrazný posun XCI až u žen starších šedesáti let. V práci jsou popsány tři teorie vysvětlující výraznější posun XCI ve vyšším věku. První dvě teorie popisují zdravé ženy, u nichž k posunu dochází náhodně. Budeme-li sledovat například posun XCI směrem k aktivní paternální alele, může být příčinou 1) s věkem spojená redukce v poolu kmenových buněk nesoucích aktivní maternální X chromosom nebo 2) redukce celkového poolu kmenových buněk kompenzovaná nadprodukcí buněk s aktivním paternálním chromosomem. Třetí teorie je zaměřena na sekundární XCI způsobenou patologickým zásahem, např. rozvojem myelodysplázie.

Selekční výhoda způsobená přítomností mutace na jedné alele X-vázaného genu byla pozorována u některých monogenních onemocnění. Např. příčinou jednoho z typů kombinované poruchy oxidativní fosforylace je mutace v X-vázaném genu *AIFM1*, který je zapojen do průběhu apoptózy. U zdravých heterozygotek nesoucích mutaci v genu *AIFM1* byla v krevních lymfocytech pozorována prakticky nulová exprese transkriptu z mutované alely. U ostatních sledovaných typů buněk (bukální stěry a močový epitel) nebyl posun v XCI tak výrazný (Ghezzi et al. 2010). Mezi další popsána onemocnění spojená se sekundárním typem inaktivace patří X-vázaná těžká kombinovaná imunodeficiencie (gen *IL2RG*) (Puck et al. 1992) nebo Fanconioho anémie typu B (gen *FANCB*) (Meetei et al. 2004). O selekčním vlivu sekundární X-inaktivace se také spekuluje v případě některých sekvenčních variant lokalizovaných na chromosomu X, stojících za mentálním postižením u žen (Plenge et al. 2002).

#### **1.2.4 X-inaktivace v tkáních**

Vyšetření inaktivace se provádí z dostupných tkání, nejčastěji se jedná o leukocyty či bukální stěry. Jestli je možné tato data extrapolovat i na ostatní tkáně a orgány je zatím málo diskutovanou otázkou, i když závažnost průběhu onemocnění ze stavu XCI stanoveného v krvi se v literatuře běžně hodnotí (Hoon et al. 2015). Na základě dostupných dat se předpokládá, že odchylka mezi jednotlivými tkáněmi může výrazně přesáhnout 10 % (Bittel et al. 2008). Stejně

tak může mít vliv na zastoupení inaktivovaných chromosomů kultivace buněk. Je možné, že u buněk s vysokou mitotickou aktivitou, na které jsou vyvíjeny nízké selekční tlaky, bude nalezen jiný poměr inaktivovaných chromosomů než u buněk s nižší mitotickou aktivitou (Orstavik 2009).

### 1.2.5 Metody pro stanovení X-inaktivace

V současnosti se využívají převážně dva molekulárně-genetické přístupy stanovení inaktivace chromosomu X.

Prvním přístupem je nepřímé stanovení inaktivace založené na štěpení genomové DNA pomocí restričních metylačně-senzitivních endonukleáz a následné amplifikaci tandemových repetit (STR). Aktivní chromosom X může být od inaktivního rozlišen na základě rozdílné metylace CpG ostrůvku v promotorových oblastech. Nejrozšířenějším zástupcem této metody je metoda HUMARA (Allen et al. 1992). Postup využívá polymorfni tandemovou repetici (CAG) v nepřekládané oblasti prvního exonu genu *AR* kódujícího androgenní receptor (HUMARA, human androgen receptor). Rozpoznávací místa pro restriční enzymy *HpaII* a *HhaI*, nacházející se v blízkosti genu, jsou na inaktivním chromosomu metylována. Metylace zaručuje jejich nepřístupnost pro restriční enzymy, u kterých se předpokládá, že kompletně rozštěpí aktivní (nemetylovaný) chromosom. Stanovení poměru X-inaktivace standardně probíhá odečtením relativního zastoupení (poměr ploch nebo výšek píků) vzniklých produktů rozdělených pomocí kapilární elektroforézy. Na základě této metody byla vyvinuta metoda metylačně-specifické polymerázové řetězové reakce (AR-MSP, AR methylation-specific PCR), ve které je vynechán krok enzymatického štěpení a dochází ke konverzi nemetylovaných cytozinů na uracil, zatímco metylované cytoziny jsou zachovány. Výhodou tohoto uspořádání je zvýšení přesnosti odečtením komplementárního poměru pro aktivní chromosom (Kubota et al. 1999).

Na metylaci DNA je založena i řada dalších metod využívajících především dinukleotidové STR repetice (Bertelsen et al. 2011; Beever et al. 2003; Carrel a Willard 1996). Tyto metody jsou méně výhodné zejména kvůli nízkému rozlišení, které se projevuje vznikem tzv. stutterů. Proto je vhodnější využívat repetice trinukleotidové, například v genech *CNKSR2*, *TMEM185A* a *HMGB3* (Musalkova et al. 2015), popřípadě tetranukleotidové repetice jako je repetice v genu *RP2* (Machado et al. 2014). Popsány jsou i metody využívající k analýze polymorfismy délky restričních fragmentů (RFLP), popřípadě polymorfismy v počtu tandemových repetit (VNTR) (Vogelstein et al. 1987; Boyd a Fraser 1990).

Důležitou informací pro využití metyl-senzitivních metod je jejich informační výtěžnost, tzn., jakou populační frekvenci má polymorfismus, na němž je metoda založena. U HUMARA, jako zlatého standardu metylačních metod, byla primárně uvedena informativnost dosahující 90 % (Allen et al. 1992). Vlivem stutterů však informativnost klesá na 78 %. Ze stejného důvodu je u dinukleotidových repetit udávaná informativnost 75-90 % jen těžko dosažitelná. U trinukleotidových a tetranukleotidových repetit je udávaná informativnost 60 -80% (Musalkova et al. 2015).

Druhým typem metody pro stanovení XCI je výrazně méně využívaná relativní kvantifikace transkriptu pomocí benigních jednonukleotidových variant (SNP). Zástupcem těchto metod je alelově specifické PCR. Vyšetřením SNP v genu *XIST* bylo stanoveno zešíkmení XCI u dvou zdravých žen (Rupert et al. 1995). Dalšími metodickými postupy jsou kvantitativní PCR využívající technologie TaqMan sond a metoda NGS pyrosekvenování (Busque et al. 2009; Mossner et al. 2013). V současnosti se pro analýzu transkriptu využívá i RNA sekvenování v kombinaci s celogenomovým, popřípadě celoexomovým sekvenováním (Shvetsova et al. 2019; Tukiainen et al. 2017; Szelinger et al. 2014).

### 1.3 Somatické varianty

V lidských buňkách dochází k replikační chybě v průměru jednou za  $10^8$  replikovaných nukleotidů. To dává vzniknout 30 – 100 *de novo* variantám pro každou další generaci. I když je původ těchto změn převážně popsán u spermatogeneze a oogeneze, mohou tyto varianty vzniknout i postzygoticky a zapříčinit tak mozaikovitý vývoj embrya. Ve studii (Acuna-Hidalgo et al. 2015) autoři sledovali tria, u kterých mutace nalezená u probanda nebyla identifikovaná u jeho rodičů. Sekvenační analýzy ukázaly, že 7 ze 107 (6,5%) předpokládaných zárodečných *de novo* mutací jsou ve skutečnosti postzygotické mozaiky a 0,1 % mutací (4 ze 4081 vyšetřovaných případů) má původ v somatických mutacích rodičů.

Mezi postzygotickými variantami mají vysoké procento zastoupení copy number varianty (CNV). Vznik somatických CNV byl popsán u buněk v embryonálním stadiu, ale i ve zcela diferenciovaných tkáních. (O’Huallachain et al. 2012; Vanneste et al. 2009). K manifestaci patologického účinku somatické varianty je důležité nejen vývojové stádium, ale i typ postižené tkáně (Shirley et al. 2013).

Stanovení skutečného rozsahu mozaiky není v současnosti triviálním problémem. Pro minoritně zastoupené varianty narážíme na mez citlivosti zavedených sekvenačních metod. Pro somatické varianty s vysokým zastoupením je naopak technologicky obtížné stanovit jejich postzygotický původ (Rohlin et al. 2009; Acuna-Hidalgo et al. 2015).

Případy postzygotického mozaicismu byly popsány i u X-vázaných střádavých lysosomálních onemocnění. V nedávné studii Fabryho choroby byl popsán první případ maternálního původu varianty, kdy kauzální varianta byla identifikována u dvou ze tří potomků, což v kombinaci s haplotypovou analýzou umožnilo doložit germinální mozaicismus u matky (Pianese et al. 2019). Paternální původ kauzální varianty byl poprvé popsán ve studii (Dobrovolný et al. 2005). *De novo* somatický původ varianty byl popsán u symptomatického pacienta s pozdním nástupem manifestace. K prokázání somatického původu varianty u pacienta se autoři rozhodli poté, co varianta nebyla identifikována u jeho dcery. Zastoupení varianty bylo u pacienta provedeno technikou masivně paralelního sekvenování ve vybraných tkáních: v bukálních stěrech (58 %), krvi (84 %) a močovém epitelu (85 %) (Bae et al. 2020).

Danonovy choroby byly popsány dva případy přenosu maternální somatické varianty na syny (Chen et al. 2012; Majer et al. 2014). Maternálně somatický původ varianty byl popsán také u pacienta s Hunterovým syndromem. Kauzální varianta byla nalezena v maternálních leukocytech, lymfocytech a lymfoblastocytech v 7% zastoupení. Ve fibroblastech bylo zastoupení mutované alely 22% (Froissart et al. 1997; 2007). V další práci byl popsán somatický původ mutace c.463\_464delinsCCGTATAGCTGG v močovém sedimentu matky probanda (Alcántara-Ortigoza et al. 2016). V roce 2021 bylo využito NGS metod k prokázání somatického původu varianty u 3 matek pacientů s MPS II, kdy se zastoupení mutovaných alel pohybovalo v rozmezí od 13 do 49 % (Oliveira Netto et al. 2021).

#### **1.4 Sekvenování nové generace**

Možnost stanovení pořadí nukleotidů ve studovaném fragmentu nukleové kyseliny byla popsána na konci 70. letech 20. století britským biochemikem a dvojnásobným nositelem Nobelovy ceny Frederickem Sangerem. Sangerovo kapilární sekvenování je založeno na terminaci elongační reakce pomocí dideoxynukleotidů (Sanger et al. 1977) a v uplynulých pěti dekadách se stalo zlatým standardem při určení sekvence DNA. V 90. letech se stalo hlavním nástrojem při analýze



lidského genomu v projektu „Human Genome Project“ (International Human Genome Sequencing Consortium 2004). Náročnost a délka projektu vedla ve svém důsledku k rozvoji nových sekvenačních technologií, které označujeme jakožto sekvenování nové generace nebo masivně paralelní sekvenování (NGS). Masivně paralelní sekvenování není synonymem pro jedno technické řešení, jako je tomu u Sangerova sekvenování, ale souhrnným názvem pro několik postupů, které dokážou simultánně přečíst sekvence tisíců až milionů krátkých fragmentů nukleové kyseliny. Výsledná informace je následně získána pomocí bioinformatického zpracování přečtených fragmentů, mapováním na referenční genom nebo pomocí „*de novo assembly*“ postupu, při kterém je sekvenovaný genom znovu sestaven skrze překrývající se části fragmentů. NGS může být použito pro analýzu celých genomů (whole genome sequencing - WGS), nebo jen pro analýzu vybraných obohacených částí - například všech kódujících částí genů tzv. whole exome sequencing (WES) nebo jen několika vybraných genů spojených s vybraným onemocněním, tzv. panelové sekvenování. Panelové a WES sekvenování se dnes standardně používá v diagnostice dědičných onemocnění (Behjati a Tarpey 2013).

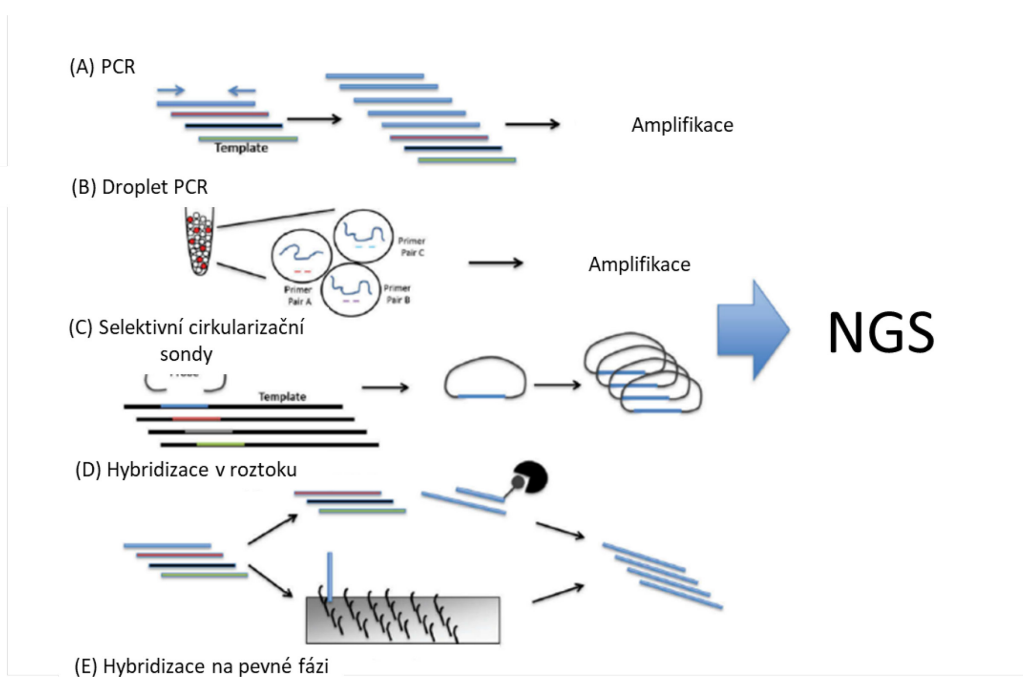
NGS lze dále dělit podle postupu obohacování vybraných úseků. V současné době jsou využívány především tři metodické postupy (Obrázek 8). Prvním z těchto postupů je multiplex PCR, které dokáže namnožit řadu vybraných regionů v jedné reakci. Výhodou PCR obohacování je technologická nenáročnost, rychlost přípravy knihovny a minimální množství spotřebované DNA (<10 ng) na vstupu. Mezi nevýhody PCR se řadí tvorba dimerů mezi primery a nespecifické amplifikační produkty. PCR může být zdrojem chyb způsobených nesprávnou činností polymerázy, které mohou vést k detekci nových variant nepřítomných v původní sekvenci. Specifická reakce je ovlivněna množstvím primerů a jejich cross-reaktivitou, zastoupením GC bohatých regionů, popřípadě přítomností jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v místě nasedání primerů, které mohou vést k alelickému drop-outu jedné z alel (Ballester et al. 2016).

Řadu chyb a specifitu je možno ovlivnit využitím specifických molekulárních indexů, experimentálním uspořádáním přípravy pomocí droplet-PCR, při kterém jsou specifické primery lokalizovány vždy na jedné olejové kapce nebo využitím Long-range PCR (Peng et al. 2015; Harismendy a Frazer 2009).

Druhým rozšířeným metodickým přístupem jsou hybridizační metody. Ty se dělí mezi hybridizační metody na pevné fázi (využívající microarray) a hybridizační metody v kapalně fázi

(využívající reakce biotinylované sondy s avidinem vázaným na magnetickou částici), které jsou výrazně rozšířenější, protože nevyžadují dodatečné přístrojové vybavení. Oba tyto přístupy mají oproti PCR nevýhodu v relativně větším množství požadovaného vstupního materiálu a delšímu času na přípravu knihovny z důvodu hybridizace (až desítky hodin). Další nevýhodou je nižší účinnost hybridizace v regionech s vysokým nebo naopak velmi nízkým obsahem GC párů (Tewhey et al. 2009).

Třetí metodou využívající jednovláknovou DNA molekulu je metoda selekčních cirkulárních sond. Primární sondy mají na svých koncích dvě sekvence komplementární k hledané sekvenci. Ke vzniku cirkulární sondy dojde po navázání na cílové sekvence. Sonda je následně amplifikována pomocí PCR. Přebývající lineární úseky DNA mohou být odstraněny pomocí exonukleáz. Mezi výhody tohoto systému se řadí vysoká specifita a jednoduchost. Nevýhodou je vysoké množství potřebné DNA a nízká uniformita pokrytí (Ballester et al. 2016).



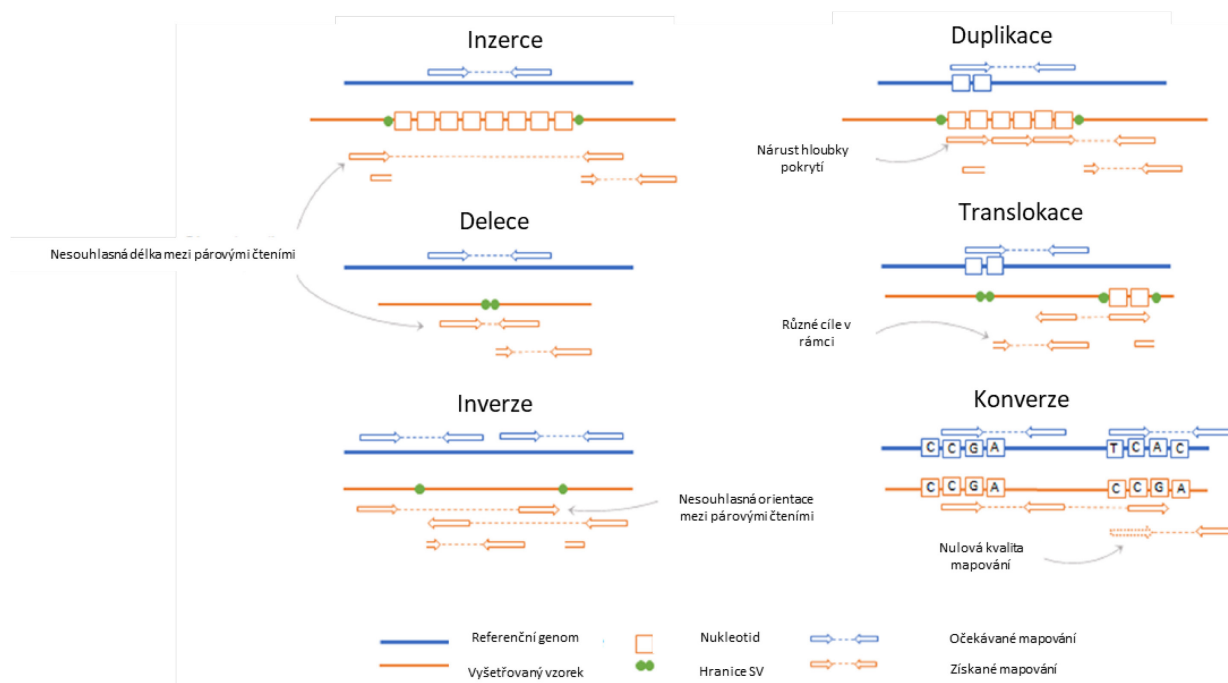
**Obrázek 7: Cílové strategie obohacování analyzovaného genetického materiálu.** (A) Tradiční polymerázová řetězová reakce (PCR) využívá páry primerů specifické pro oblast zájmu, která je amplifikována. Může být multiplexována pro amplifikaci více oblastí zájmu v jedné zkumavce. (B) Microdroplet PCR využívá mikrokapky generované v olejové emulzi; každá mikrokapka obsahuje jednu molekulu DNA spolu s párem primerů pro amplifikaci oblastí zájmu. (C) Selekktivní cirkulární sondy se vážou na oblasti ohraničující cílovou sekvenci, následuje extenze a ligace, čímž se vytvoří kruhová molekula. Nekruhové molekuly DNA jsou degradovány endonukleázami. Kruhové molekuly obsahující cílovou sekvenci jsou amplifikovány pomocí PCR. (D) Biotinylovaná sonda se váže na cílovou sekvenci a je zachycena částicí kuliček. Zachycená sekvence je poté amplifikována pomocí PCR a je provedeno sekvenování. (E) Jinou variantou je využití čipu se sondami komplementárními k oblastem zájmu. Cílové sekvence se vážou na sondy a zbývající molekuly jsou odmyty. Zachycená DNA je disociována z čipu a amplifikována pomocí PCR s následnou sekvenční analýzou (Ballester et al. 2016).

Při analýze lidského genomu metodou NGS se v současnosti nejvíce uplatňují sekvenátory generující krátká čtení. Typickým představitelem jsou sekvenátory Illumina (San-Diego, USA), které mohou číst krátká párová čtení maximálně o délce 2x300 nukleotidů, ale běžně se využívá čtení pouze 2x75 nebo 2x150. Tento postup je vhodný pro identifikaci nejběžnějších jednonukleotidových záměn (SNV), které jsou v genomických projektech detekovány v řádech milionů (1000 Genomes Project Consortium et al. 2010; 2012). Mezi další varianty, které lze z těchto sekvenačních dat jednoznačně identifikovat, patří malé delece nebo duplikace, které svojí délkou nepřesáhnou průměrnou délku čtení, a to zejména v kombinaci s vhodným algoritmem mapujícím rozdělená čtení (tzv. split-ready) (Chen et al. 2016; Ye et al. 2018).

K identifikaci strukturních variant (SV) se zpravidla využívá interference varianty s jednotlivými čteními, které ji obsahují. Tato interference dává vzniknout jednoznačným mapovacím vzorům, které lze pro tento účel využít (Obrázek 9). Prvním z těchto vzorů je pokles nebo zvýšení počtu čtení oproti nepostižené části genomu nebo zdravým kontrolám. Dalším jednoznačným vzorem je změna vzdálenosti mezi mapovanými polohami párových čtení. Delší vzdálenost mezi mapovanými párovými čteními indikuje více bází DNA v referenčním genomu, než bylo stanoveno ve vzorku pacienta, a tedy delecii. Naopak kratší vzdálenost může být charakteristickým znakem inserce. Možným znakem SV je i nesouhlasná orientace párových čtení. Párová čtení se obvykle mapují na opačné řetězce DNA. Ve vzácných případech, ve kterých jedno čtení z páru překrývá počátek SV, může relativní mapování čtení v páru vykazovat neočekávanou směrovost. Pokud tedy jedno ze čtení končí v obráceném segmentu, obě čtení by byla mapována na stejný řetězec DNA. Podobně tandemové duplikace často vykazují inverzní pořadí čtení (upstream čtení na zadní straně, downstream čtení na dopředném řetězci), protože v DNA pacienta tato čtení patří ke dvěma sekvenčními kopiemi stejného referenčního segmentu DNA. Posledním vzorem je selhání párového mapování. Tento jev může být vysvětlen překrytím čtení přes bod zlomu rozsáhlé přestavby. Umístění druhého z páru čtení může být použita k určení počátku a rozsahu této varianty (Zverinova a Guryev 2021).

Vyžití těchto vzorů může být neprůkazné v metodických přístupech jako je WES nebo panelové sekvenování. Hloubka čtení v exomových nebo v panelových datech je nerovnoměrná a algoritmy nástrojů pro detekci CNV musí rozlišit změny v pokrytí způsobené například fragmentací nebo postupem obohacení (Zverinova a Guryev 2021). Stejně tak se výrazně snižuje pravděpodobnost, že oproti celogenomovému sekvenování bude hledaný zlomový bod

v obohacené části. I přes zřejmé nedostatky metody je NGS jedním z nejkompexnějších nástrojů vhodných pro detekci strukturních variant. Oproti cytogenetickým metodám (např. fluorescenční *in situ* hybridizace, které zpravidla detekují varianty kolem 1 Mb nebo SNP array čipům, které dosahují citlivosti detekce okolo 20 kb (Roca et al. 2019)) lze pomocí NGS detekovat CNV v rozlišení stovek nukleotidů současně s identifikací i dalších variant. Význam a účinnost této detekce určitě vzroste po masivnějším zavedení NGS technologií schopných číst dlouhá čtení v řádech desetitisíců nukleotidů.



**Obrázek 8: Identifikace strukturních variant pomocí vzorů z mapovaných párových čtení.** U jevu inzerce a delece je hlavním vzorem nesouhlasná délka mezi párovými čteními. U inverzních variant je hlavním vzorem nesouhlasná orientace párových čtení. U duplikace je převládajícím vzorem nárůst hloubky pokrytí. Translokace se projevuje mapováním jednoho čtení do různých cílů. Konverze se v sekvenačních datech projevuje nulovou kvalitou mapování. Převzato z (Zverinova a Guryev 2021)

## 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.

Stanovili jsme tři konkrétní cíle:

### **1) Zavedení metod NGS a zhodnocení jejich přínosu pro diagnostiku X-vázaných lysosomálních onemocnění**

**Hypotéza:** NGS využívající hybridizační próby je vhodnou metodou pro analýzu mutací, protože v rámci jednoho vyšetření umožňuje identifikaci variant malého rozsahu i variant typu CNV (copy number varianty).

#### **Dílčí cíle:**

- 1) Zavést metodu hybridizačního panelového sekvenování včetně návrhu hybridizačních sond.
- 2) Připravit bioinformatickou analýzu nukleotidových variant, delecí/duplikací malého rozsahu a strukturních variant (CNV).
- 3) 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**

**Hypotéza:** Hluboké čtení stovek až tisíců cílů získaných amplikonovým sekvenováním je vhodnou metodou pro analýzu somatického mozaicismu a sestřihových variant.

#### **Dílčí cíle:**

- 1) Zavést metodu pro analýzu somatických mutací na úrovni genomové DNA a sestřihových variant na úrovni RNA, včetně bioinformatického zpracování.
- 2) 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**

#### **Hypotéza:**

- 1) Hluboké čtení amplikonového sekvenování umožní detekci různých transkripčních variant a jejich relativní zastoupení.
- 2) Metody alelově specifické exprese (ASE) založené na hlubokém čtení amplikonového sekvenování zvýší spolehlivost a zkvalitní interpretaci výsledků X-inaktivace.

#### **Dílčí cíle:**

- 1) Zhodnotit přínos metody ASE pro charakterizaci mutací na úrovni RNA (zjištění vlivu mutace na stabilitu transkriptu).
- 2) Zavést metody ASE pro vyšetření polymorfních SNP a mutantních alel pro vyšetření X-inaktivace.
- 3) Porovnat využití metod ASE s běžně používanými metylačně specifickými metodami a posoudit limity obou typů metod.

## 3. Metody

### 3.1 Izolace nukleových kyselin z krve a tkání

Izolace nukleových kyselin z lymfocytů byla provedena pomocí QiaAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Izolace z bukalních stěrů, slin, moči, popřípadě vlasových folikulů byla provedena kitem QIAamp DNA Micro Kit. RNA z krevních vzorků byla izolována pomocí kitu BiOstic Blood Total RNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). Ve všech případech bylo postupováno podle standartního protokolu daného výrobcem kitu. Kvalita a koncentrace izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky.

### 3.2 Panelové hybridizační sekvenování nové generace

#### 3.2.1 Laboratorní příprava hybridizačních knihoven

Pro přípravu hybridizačních knihoven byl využit systém Roche SeqCap EZ library, přičemž bylo postupováno podle doporučeného návodu ve verzi 5.1. (Anon. 2015). Prvním krokem přípravy knihovny je rozštěpení vstupní genomové DNA na fragmenty dlouhé přibližně 300 nukleotidů. Tento krok byl prováděn pomocí ultrasonikátoru Bioruptor se vstupním množstvím 500 ng patientské DNA ředěné v 1xTE pufru (nízká koncentrace EDTA, Invitrogen) v celkovém objemu 100  $\mu$ l.

Z fragmentovaného vzorku bylo použito 50  $\mu$ l pro přípravu knihovny kitem Kapa Kit LT (Roche). Při tomto postupu dochází nejdříve k zatupení ostrých konců vzniklých fragmentů, které probíhá enzymaticky při 30minutové inkubaci fragmentované DNA při teplotě 20°C. Následně byla provedena izolace produktu pomocí magnetických kuliček (Agencourt AMPure XP beads, Beckman-Coulter). Po očištění následoval krok, ve kterém je k zatupeným koncům přidán právě jeden nukleotid A. Vzorek DNA byl inkubován v enzymatické směsi po 30 minut při teplotě 30°C. Přes tento nukleotid došlo ve finálním kroku k ligaci adaptérů. Adaptéry jsou speciální technické sekvence DNA obsahující sekvenační primery, specifický patientský index a terminální sekvenci sloužící k uchycení fragmentu na povrch sekvenační cely. Vzorek byl inkubován v ligační směsi 20 minut při teplotě 20°C. Mezi jednotlivými kroky byl vzorek opakovaně purifikován pomocí magnetických kuliček (Agencourt AMPure XP beads, Beckman-Coulter). Následným krokem byla duální délková selekce fragmentů pomocí různých objemů magnetických kuliček; při tomto kroku byly z jednotlivých vzorků odstraněny fragmenty výrazně

kratší nebo delší, než je pro sekvenační reakci ideálních 300 nukleotidů (rozsah délek fragmentů 150-500 nukleotidů). Takto očištěná knihovna byla amplifikována v „Pre-capture“ PCR reakci (Tabulka 3).

*Tabulka 3: Podmínky „Pre-capture“ PCR reakce předcházející hybridizaci. Teplota vřeka 100°C*

Teplota	čas	
98 °C	48 sec	
98 °C	15 sec	
60 °C	30 sec	Opakovat 6x
72 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
15 °C	∞	

*Tabulka 4: Podmínky „Post-capture“ PCR reakce následující hybridizaci. Teplota vřeka 100°C*

Teplota	čas	
98 °C	45 sec	
98 °C	15 sec	
60 °C	30 sec	Opakovat 9x
72 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
15 °C	∞	

Po amplifikaci vzorků byla provedena první kontrola kvality pomocí spektrofotometru. Poměr absorbančí při vlnových délkách 260 a 280 nm byl v požadovaném rozsahu 1,7 – 2,0. Koncentrace amplifikovaných upravených vzorků byla stanovena pomocí fluorimetru Qubit (Invitrogen). Délka fragmentů byla ověřena pomocí přístroje Bioanalyzer (Agilent) a byla v požadovaném rozsahu 150-500 nukleotidů.

Knihovna jednotlivých patientských vzorků byla po úspěšné kontrole kvality ekvimolárně smíchána do výsledného mixu, který byl následně 14 hodin hybridizován s vybranou sadou práb SeqCap® EZ probe pool (Roche). V tomto kroku došlo k obohacení vybraných úseků.

Hybridizační próby SeqCap® EZ probe pool (Roche) pro jednotlivé panely byly navrženy pomocí online nástroje NimbleDesign®. V panelech jsou obohaceny exonové regiony vybraných genů s přesahem minimálně 30 nukleotidů do intronových nebo nepřekládaných oblastí. Pro diagnostické využití jsme připravili 3 panely (metabolický, kardiologický a skeletální), které obsahují i geny spojené s X-vázanými lysosomálními onemocněními. Soupis vyšetřovaných genů je uveden v příloze této práce (Supplement: 8). Po úspěšné hybridizaci byla provedena druhá PCR reakce (Tabulka 4).

Po izolaci finální knihovny byla opět provedena kontrola kvality pomocí přístroje Bioanalyzer (Agilent) a fluorimetricky stanovena její koncentrace (Qubit, Invitrogen). Závěrečná příprava



knihovny k sekvenaci zahrnovala denaturaci 0,2M hydroxidem sodným a přidání 2 objemových procent vnitřního sekvenačního standardu PhiX (V3) (Illumina). Pair-endové sekvenování proběhlo na přístroji Miseq (Illumina, San-Diego) s využitím sekvenační chemie MiSeq Reagent Kit v3 s délkou čtení 2x75 nukleotidů.

### **3.2.2 Bioinformatické zpracování dat z hybridizačního sekvenování**

K třídění a úpravě dat využitých k analýze dochází automaticky na sekvenačním přístroji. Z obrazových primárních souborů jsou získány komprimované textové soubory FASTQ, které jsou pomocí softwaru Miseq reporter (Illumina) rozděleny do skupin podle jednotlivých sekvenačních indexů. K analýze jsou využita pouze ta čtení, jejichž kvalita čtení průměrně převyšuje skóre Q30

V prvním kroku vlastní analýzy byla u vstupních dat provedena kontrola kvality a úprava pomocí nástroje Trimmomatic. Z počátků a konců jednotlivých čtení byly odstraněny nukleotidy, pokud jejich kvalita klesla pod práh kvality Q30. Dále byly odstraněny čtení kratší 50 nukleotidů a následně ta čtení, jejichž průměrná kvalita klesla pod hodnotu Q30. Znovu byla provedena kontrola kvality takto vzniklých .fastq souborů. Druhým krokem bylo pair-endové mapování na lidský genom hg19 pomocí mapovacího nástroje BWA – MEM (Li 2012). Následně byla pomocí softwarového balíčku GATK 3.8 (Poplin et al. 2018) provedena recalibrace mapování a došlo k opětovnému mapování SNP a malých indelů. Z recalibrovaných dat byly identifikovány varianty pomocí nástroje GATK – HaplotypeCaller. Odečet variant (SNP a menší INDEL) proběhl pouze v regionech zařazených do panelu u nukleotidů s minimálním mapovacím skóre 10, minimálním prahem spolehlivosti s hodnotou 5 a minimálním pokrytím 20 čtení. Pro analýzu je ideální hloubka 100-150 čtení. Následně byly tyto varianty anotovány nástrojem ANNOVAR (Yang a Wang 2015). K anotaci byla použita data z databáze dbNSFP (Liu et al. 2020), ClinVar (Landrum et al. 2020) a GnomAD (Karczewski et al. 2020). Analýza středně rozsáhlých strukturních variant byla provedena nástrojem Manta (Chen et al. 2016).

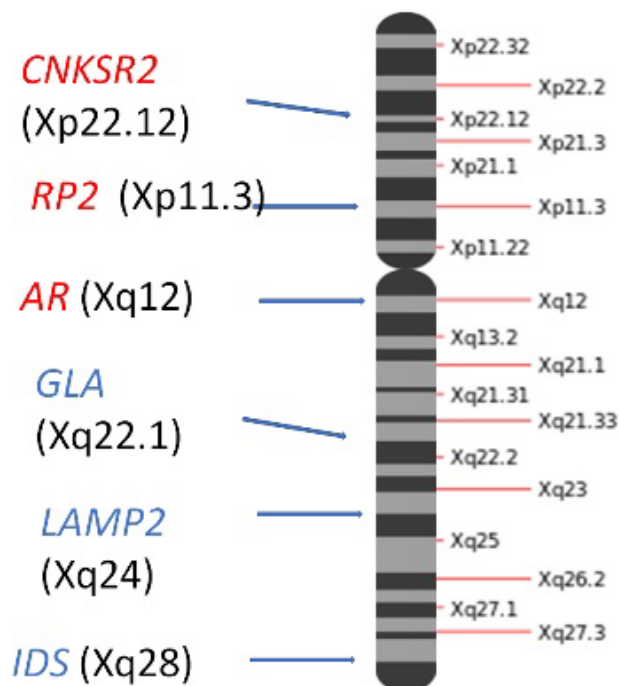
Pro analýzu rozsáhlých CNV byl využit nástroj CNVkit (Talevich et al. 2016). Tento postup využívá analýzy hloubky pokrytí a porovnává toto pokrytí oproti referenci postavené z dat ostatních pacientů sekvenovaných za stejných podmínek jakožto analyzovaný pacient.

### 3.3 Amplikonové sekvenování

#### 3.3.1 Stanovení alelických poměrů při analýze alelově specifické exprese, somatického mozaicismu a X-inaktivace

Amplikonové sekvenování bylo využito pro analýzu somatického mozaicismu v genech *LAMP2* a *IDS* na úrovni genomové DNA a pro analýzu alelově specifické exprese (ASE) na úrovni transkriptu. Metoda ASE sloužila ke stanovení vlivu kauzálních mutací ve sledovaných genech (*IDS*, *LAMP2* a *GLA*) na transkript a dále k určení poměrného zastoupení alel pomocí dvou benigních SNP v genech *LAMP2* a *IDS*.

V genu *LAMP2* byl využit benigní SNP rs12097 (c.156A>T, p.Val52=) lokalizovaný v druhém exonu s vysokou populační frekvencí v exomové databázi GnomAD (frekvence minoritní alely MAF=0,39), s benigním hodnocením 2,13 v databázi fylogenetické konzervovanosti variant (GERP++). Varianta byla 9x zmíněna v databázi ClinVar jakožto benigní bez konfliktních záznamů. V genu *IDS* byla využita varianta rs1141608 (NM\_000202.8, c.438C>T, p.Thr146=), která je populačně frekventní (MAF= 0,275), lokalizována v lehce konzervované oblasti (GERP++ 1,13) s benigním hodnocením v predikčních databázích, tak i v databázi ClinVar. Kombinací výsledků vyšetření SNP získáváme informaci o stavu transkripce z různých míst chromosomu X. Tohoto přístupu jsme využili při studiu XCI, kdy byla data z ASE analýz porovnána s výsledky XCI stanovené pomocí metylačně senzitivních sond (*AR*, *RP2* a *CNKSR2*) kterými se podrobněji zabýváme v kapitole 3.4. Lokalizace jednotlivých transkripčních a metylačně senzitivních sond je zobrazena na obrázku (Obrázek 10).



**Obrázek 9:** Rozmístění jednotlivých sond na chromosomu X. Červeně zvýrazněné geny označují metylačně senzitivní sondy. Modře jsou označené sondy využité pro transkripční studie.

### 3.3.2 Příprava PCR produktů a RT-PCR produktů

Reverzní transkripce RNA na cDNA pro přípravu produktů reverzní polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) byla provedena pomocí sady High Capacity RNA to cDNA (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Pro reakci bylo využito 20  $\mu$ l RNA. Inkubace za přítomnosti 2x RT pufru a enzymatického mixu probíhala při teplotě 37 °C po dobu 60 minut.

K přípravě PCR a RT-PCR produktů sloužících jako alelově specifické sondy, které byly následně sekvenovány pomocí amplikonového sekvenování, bylo využito 25  $\mu$ l reakčního mixu. Reakční mix obsahoval 1  $\mu$ l patientské cDNA, 12,5  $\mu$ l bezbarvého reakčního mixu - Plain Master Mix (TopBio) 1,5  $\mu$ l primerů a 10  $\mu$ l vody. Využité primery jsou uvedeny v příslušných publikacích. Reakční podmínky jsou uvedeny v tabulkách (Tabulky 5-10).

**Tabulka 5: Podmínky PCR reakce LAMP2 (délka produktu 285bp)**

Teplota	Čas
94 °C	2 min
94 °C	20 sec
58 °C	20 sec
71 °C	20 sec
71 °C	5 min
15 °C	∞

**Tabulka 7: Podmínky PCR reakce IDS (délka produktu 320bp)**

Teplota	Čas
94 °C	2 min
94 °C	15 sec
60 °C	15 sec
71 °C	40 sec
71 °C	5 min
15 °C	∞

**Tabulka 9: Podmínky RT- PCR reakce pro fragment 1 z cDNA genu GLA (délka produktu 780bp)**

Teplota	Čas
95 °C	40 sec
95 °C	15 sec
61 °C	22 sec
71 °C	30 sec
95 °C	15 sec
62 °C	20 sec
72 °C	30 sec
72 °C	5 min
15 °C	∞

**Tabulka 6: Podmínky RT- PCR reakce pro fragment 1 z cDNA genu LAMP2 (délka produktu 545bp)**

Teplota	Čas
94 °C	2 min
94 °C	30 sec
58 °C	30 sec
71 °C	50 sec
71 °C	5 min
15 °C	∞

**Tabulka 8: Podmínky RT- PCR reakce pro fragment z cDNA genu IDS (délka produktu 585bp)**

Teplota	Čas
94 °C	2 min
94 °C	15 sec
60 °C	15 sec
71 °C	40 sec
71 °C	5 min
15 °C	∞

**Tabulka 10: Podmínky RT- PCR reakce pro fragment 2 z cDNA genu GLA (délka produktu 776bp)**

Teplota	Čas
95 °C	1 min
95 °C	30 sec
61 °C	20 sec
71 °C	35 sec
95 °C	30 sec
62 °C	20 sec
72 °C	35 sec
72 °C	5 min
15 °C	∞

### 3.3.3 Amplikonové sekvenování nové generace – Nextera XT

Pro splnění druhého a třetího cíle bylo zavedeno amplikonové sekvenování tzv. single-plexová příprava sekvenační knihovny využívající systému Nextera XT DNA Library kit (Illumina). Tento ve své podstatě unikátní postup, byl vyvinut na Endokrinologickém ústavu v Praze a poprvé publikován v (Sykorova et al. 2015). Využití obdobných single-plexových příprav knihoven bylo popsáno ve stejném období (De Leeneer et al. 2015). Sekvenovaný vzorek, který je označen kombinací dvou indexů, je připraven z PCR, RT-PCR nebo long-range PCR produktů pocházejících od různých pacientů. Produkty značené stejnými indexy musí být sekvenčně unikátní, je nepřipustné kombinovat stejné nebo sekvenčně podobné PCR produkty od různých pacientů nebo kombinovat PCR a RT-PCR produkty od stejného pacienta. Produkty musí mít minimální délku 150 nukleotidů, aby je bylo možné enzymaticky fragmentovat a připravit z nich sekvenační knihovnu. V prvním kroku přípravy tzv. sekvenační knihovny jsou míseny neizolované produkty, u kterých není známa přesná koncentrace. Mísení probíhá 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. Z takto připravených směsí se odebere 10  $\mu$ l pro purifikaci.

Směs PCR produktů je purifikována pomocí magnetických kuliček Agencourt AMPure XP (Beckman- Coulter) a eluována do 40  $\mu$ l vody. Koncentrace výsledné směsi určené k enzymatickému štěpení - tagmentaci je stanovována fluorimetricky pomocí přístroje Qubit a kitu Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Thermo).

Tagmentace je enzymatický proces fragmentace vstupní DNA za současné ligace technických sekvencí, tzv. adaptérů, pomocí transposonu s obchodním názvem tagmentáza. Do reakce se přidá 5  $\mu$ l přečištěné směsi PCR produktů o koncentraci 0,2 ng/ $\mu$ l spolu s 10  $\mu$ l tagmentačního pufru a 5  $\mu$ l amplicon tagment mix. Takto připravená směs se 5 minut inkubuje při 55°C, následně je schlazena na 10°C. Po ochlazení je enzym okamžitě neutralizován pomocí pufru. V následujícím kroku je tagmentovaná DNA amplifikována a indexována (N7XX, S5XX). Maximální možná kombinace indexů v kitu je 96. K 25  $\mu$ l vzorků je přidáno 15  $\mu$ l Nextera PCR master mix a 5  $\mu$ l index 1 (N7XX) a 5  $\mu$ l indexu 2 (S5XX), které slouží jako primery. Celkový objem reakce činil 50  $\mu$ l. Pro PCR amplifikaci je využit program uvedený v tabulce (Tabulka 11).

**Tabulka 11: Podmínky PCR reakce při přípravě knihovny pomocí kitu Nextera XT (Illumina)**

Teplota	Čas	
72 °C	3 min	
95 °C	30 sec	
95 °C	10 sec	
55 °C	30 sec	Opakovat 12x
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	
10 °C	∞	

Po amplifikaci je znovu provedena purifikace produktů magnetickými kuličkami a fluorimetrem je stanovena koncentrace. Pomocí přístroje Bioanalyzer 2100 (Agilent) a kitu High Sensitivity DNA reagents a chips (Agilent) je stanovena průměrná délka jednotlivých směsí vzorků. Následně jsou spolu jednotlivé indexované směsi ekvimolárně smíchány s ohledem na jejich délku za vzniku finální sekvenační knihovny.

Sekvenační knihovna je denaturována pomocí 0,2M hydroxidu sodného. Stejně tak je denaturována 4nM PhiX knihovna sloužící jakožto vnitřní sekvenační standard. Působení NaOH je v obou knihovnách inhibováno pomocí HT1 hybridizačního pufru (Illumina, San Diego). Obě knihovny jsou smíseny v takovém poměru, aby výsledné zastoupení PhiX knihovny v sekvenačních datech odpovídalo 3 %. Výsledná směs je sekvenována na přístroji Miseq pomocí Miseq reagent kit V2 2x250 (Illumina, San Diego).

### **3.3.4 Zpracování dat z amplikonového sekvenování**

Pro analýzy byly využity demultiplexované .fastq soubory. U všech dat proběhla kontrola kvality pomocí nástroje FastQC (de Sena Brandine a Smith 2019) a následně úprava kvality čtení pomocí nástroje Trimmomatic (Bolger et al. 2014). Tento nástroj odfiltroval čtení kratší 50 bp, odstranil prvních a posledních 5 bp z každého čtení a vyloučil ta čtení, u kterých v průběhu sekvenace klesla kvalita jednotlivých bází pod Q30. Pro mapování dat získaných z klasických PCR produktů byl použit nástroj Bowtie2 (Langmead et al. 2009). Mapování získaných RT-PCR produktů bylo provedeno nástrojem TopHat (Trapnell et al. 2009), jehož mapovací algoritmy vycházejí z nástroje Bowtie2. Následně byla odstraněna duplicitní čtení pomocí nástrojů Picard tools.

Procentuální zastoupení varianty bylo manuálně odečteno v programu IGV (Robinson et al. 2017). Primárně byla data mapována na lidský referenční genom hg19. Při analýze varianty c.1122C>T vedoucí na transkripční úrovni k deleci 60 nukleotidů byla k mapování transkripčních dat využita referenční sekvence genu *IDS* NM\_000202. Odečteny byly varianty, které byly mapovány ve stovkách čtení pro zárodečné varianty a v tisících až desetitisících čtení pro analýzy somatických variant nebo analýzu transkriptu.

### 3.4 Stanovení inaktivace chromosomu X s využitím metylačních sond

Pro vyšetření byly zavedeny tři metody: HUMARA využívající repetici (CAG)<sub>n</sub> v genu lidského androgenního receptoru *AR*, dále trinukleotidová repetice v genu *CNKSR2* a tetranukleotidová repetice v genu *RP2*.

K metylačně senzitivní analýze v lokusech *AR*, *RP2* a *CNKSR2* bylo využito 100 ng DNA. K patientské DNA byl přidán reakční mix obsahující metylačně senzitivní restriktázu *HpaII*. Pro lokusy *AR* a *CNKSR2* navíc byl použit pomocný enzym *RsaI*. Paralelně s těmito vzorky byly připraveny i kontrolní vzorky bez restriktčního enzymu *HpaII*. Takto připravené vzorky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu minimálně 8 hodin. Inkubace byla ukončena inaktivací enzymů, tj. zahřátím reakční směsi na 80 °C. Následně byly vzorky amplifikovány pomocí PCR reakce. Podmínky PCR reakcí pro jednotlivé lokusy jsou uvedeny v tabulkách 12 a 13.

**Tabulka 12: Podmínky PCR reakce pro lokusy *AR* a *CNKSR2*. Teplota vřeka 100°C**

Teplota	Čas	
94 °C	2 min	
94 °C	15 sec	Opakovat 30x
63 °C	20 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	10 min	
15 °C	∞	

**Tabulka 13: Podmínky PCR reakce pro lokus *RP2*. Teplota vřeka 100°C**

Teplota	Čas	
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	Opakovat 25x
64 °C	30 sec	
68 °C	30 sec	
68 °C	10 min	
15 °C	∞	

K restriktční analýze bylo využito 0,5 µl vzorku amplifikovaného vzorku, který byl denaturován po dobu 3 minut při teplotě 95 °C v master mixu obsahujícím 9 µl formamidu,

0,5 µl standardu GeneScan 500 ROX. Ke kapilární elektroforéze byl využit sekvenátor 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Analýza STR lokusů byla provedena v programu Gene Mapper 5. K výpočtu poměru inaktivace chromosomů X byly použity hodnoty výšky a plochy vrcholů pro každou z alel (Racchi et al. 1998; Machado et al. 2014). Data byla hodnocena a označena jako informativní pouze v případě, pokud mezi jednotlivými alelami byl rozdíl minimálně jednoho (*RP2*) nebo dvou (*AR*, *CNKSR2*) opakování STR motivu.

### **3.5 Stanovení somatických variant**

Pro identifikaci somatických variant byla zavedena metoda masivně paralelního sekvenování PCR produktů obsahující studovanou variantu. Příprava a vyhodnocení sekvenačního experimentu je totožné s kapitolami 3.3.2 a 3.3.3. K ověření somatického původu variant byly využity krevní vzorky, vlasové folikuly, bukalní stěry a sliny od probandů, případně od jejich rodinných příslušníků.



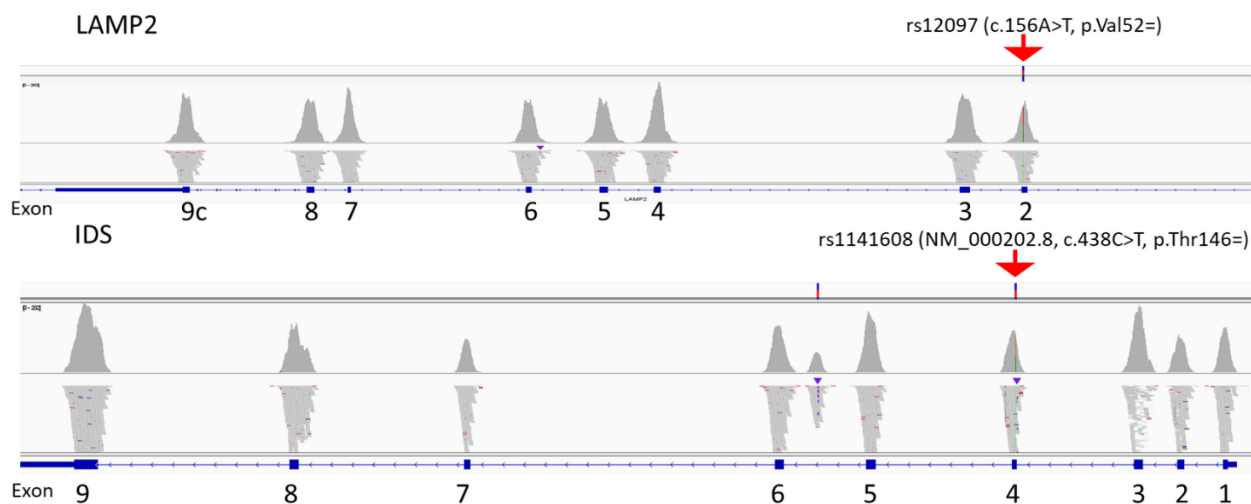
## 4. Výsledky

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

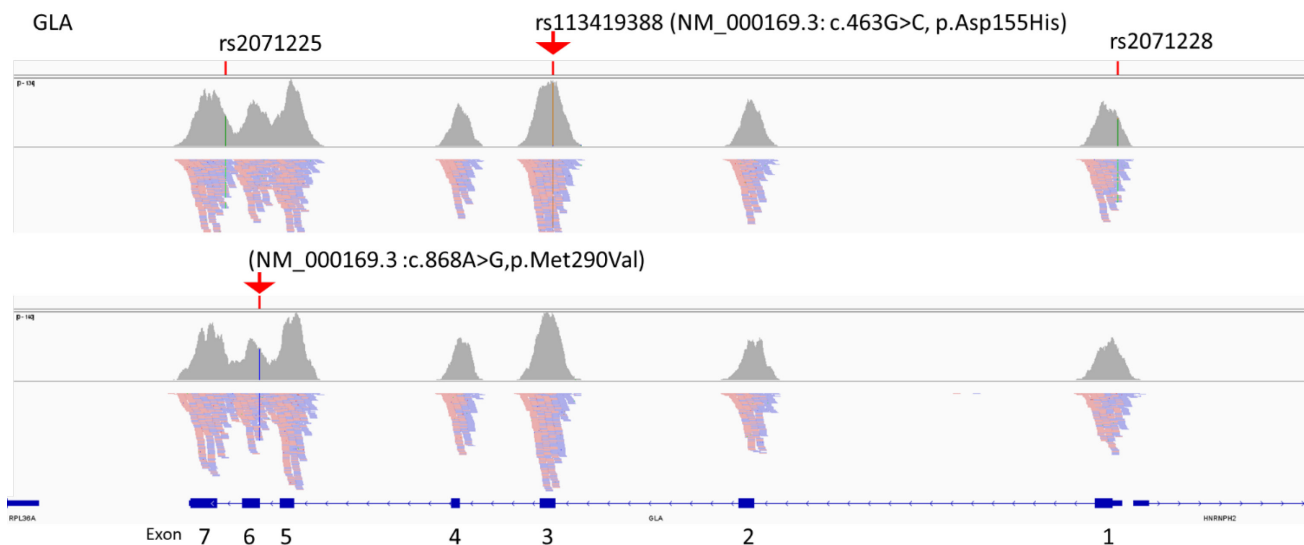
Metody, které byly zavedeny v rámci řešení prvního cíle disertační práce, byly využity v publikaci: LAMP2 exon-copy number variations in Danon disease heterozygote female probands: Infrequent or underdetected?(Majer et al. 2018).

Pro diagnostické účely jsme v rámci cíleného panelového sekvenování zavedli vyšetření genů spojených s X-vázaným lysosomálním onemocněním. K přípravě vzorků je 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. Výsledný počet kopií DNA je vyjádřen na logaritmické škále (Royer-Bertrand et al. 2021) .

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 je ilustrováno u kontrolních vzorků heterozygotních pacientek pro dva SNP (rs12097, rs1141608) genech *IDS* a *LAMP2* (Obrázek 11) a u dvou pacientů nesoucích patogenní variantu v genu *GLA* (Obrázek 12). K snížení kvality mapování, a tedy k snížení počtu informativních čtení, dochází pouze v genu *IDS* u exonu 3 a intronu 2 (Obrázek 11), ve kterém je část čtení mapována do vysoce homologní oblasti pseudogenu *IDS2*. Experimentální uspořádání metody pomocí hybridizačních sond je natolik robustní, že při bioinformatickém zpracování může být využito unikátně mapovaných čtení, lokalizovaných mimo duplikovanou oblast, k analýze jejich protějšků z páru, tak aby bylo dosaženo minimálního počtu dvaceti čtení.



**Obrázek 10: Pokrytí genů IDS a LAMP2 v datech z panelového sekvenování.** V horní části obrázku z prohlížeče IGV jsou zobrazena data pro gen LAMP2 s benigním SNP rs12097 v heterozygotním stavu (znázorněno červenou šipkou). V dolní části obrázku jsou data pro gen IDS s benigním SNP rs1141608 v heterozygotním stavu (znázorněno červenou šipkou). U genu IDS je vidět snížení kvality mapování v exonu 3, které je způsobené částečným mapováním dat do regionů v pseudogenu IDS2 s vysokou mírou homologií sekvence. Přesto všechny analyzované oblasti vyšetřovaných genů vykazují dostatečné pokrytí více než 20 čtení.



**Obrázek 11: Data z NGS panelového sekvenování kódujících exonů genu GLA pro kontrolní vzorky dvou pacientů, jejichž mutace spojené s Fabryho chorobou byly zjištěny Sangerovým sekvenováním.** U prvního pacienta byly ve shodě se Sangerovým sekvenováním identifikovány 3 hemizygotní varianty (označeno číslem SNP). První SNP byl identifikován v 5'UTR oblasti. Druhý SNP byl identifikován v intronu 6 a kauzální varianta (červená šipka) byla identifikována exonu 3. U druhého pacienta byla identifikována ve schodě se Sangerovým sekvenováním pouze hemizygotní kauzální varianta (červená šipka).

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 delecí dvou a více exonů. Ve zbylých dvou případech byla identifikována rozsáhlá delece celé skupiny genů.

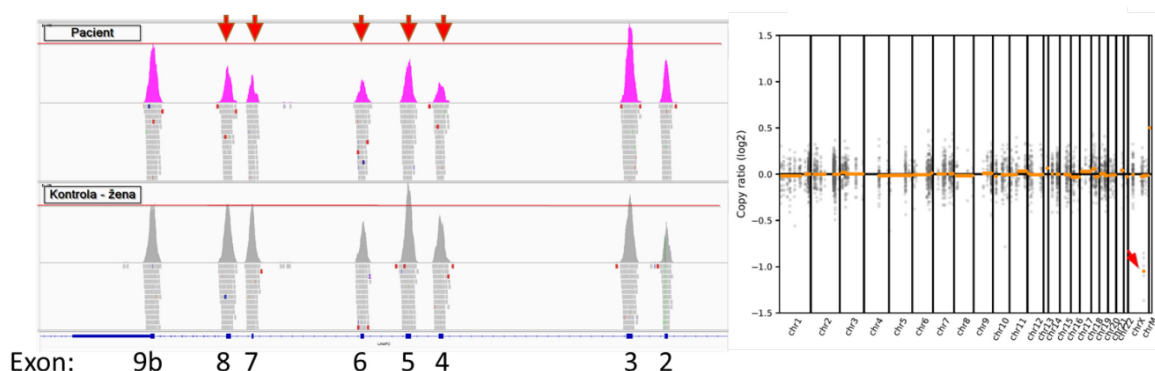
Pro vymezení CNV je běžně využíváno několik laboratorních přístupů, kterými je možné varianty detekovat a ověřit. Patří mezi ně multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) (Shen a Wu 2009), SNP microarray (Carter 2007) nebo sekvenování transkripčního produktu. U SNP microarray a MLPA analýzy existují limitace dané výrobcem například v rozsahu zařazených genů. Metoda MLPA je navíc limitována rozsahem, který umožní analyzovat maximálně 50 sond (Singh et al. 2021). U analýzy transkripčních produktů je nevýhodou nestabilita RNA. U velkých delecí nebo duplikací je velká pravděpodobnost, že mutovaná alela bude degradována v procesu nonsense-mediated mRNA decay (NMD).

Jako vhodnou alternativu k ověření nálezu z NGS jsme proto zvolili metodu kvantitativního PCR (qPCR) z genomové DNA, která je výhodná svojí cenou, jednoduchostí a škálovatelností. Metodu qPCR jsme použili pro vymezení přibližných hranic CNV, přesný rozsah varianty byl potom specifikován sekvenací překlenujícího PCR produktu. Delece zahrnující větší počet genů byly ověřeny metodou SNP microarray. Metodami použitými pro ověření byly všechny reportované varianty identifikovány a ve výsledcích z NGS nebyl popsán žádný falešně pozitivní nález.

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).

V publikaci Majer et al. 2018 popisujeme pacientku, u níž byla diagnóza Danonovy choroby primárně stanovena metodou qPCR a ověřena metodou průtokové cytometrie. Delece zasahující exony 4 – 8 v heterozygotním stavu identifikovaná metodou qPCR byla ověřena metodou panelového sekvenování za použití dvou sad hybridizačních prób. Spolupracující laboratoř využívá systém Illumina TruSight Cardiomyopathy Enrichment Kit od firmy

Illumina, v naší laboratoři probíhala sekvenace tak, jak je popsáno v kapitole 3.2 s využitím hybridizačních prób od firmy Roche. Obě analýzy vedly ke shodnému výsledku – identifikaci delece zasahující exony 4 – 8 v heterozygotním stavu. Výsledek získaný naším postupem je znázorněn na obrázku (Obrázek 13) a v tabulce (Tabulka 14). Přesný rozsah delece obsahující více než 11 tisíc nukleotidů byl specifikován sekvenací překlenujícího PCR produktu (*LAMP2*: NM\_002294.3: c.398-2306\_1093+1449del11154).

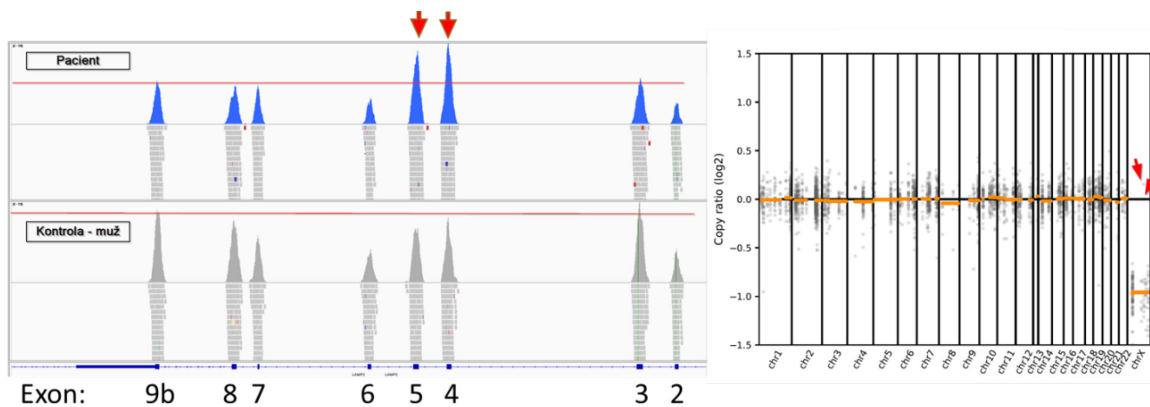


**Obrázek 12:** Zobrazení heterozygotní delece 5 exonů u pacientky s DD. V levé části obrázku je zobrazen histogram pokrytí získaný z prohlížeče IGV. V horní části jsou zobrazena data pacientky (růžová) pro *LAMP2*. Ve střední části histogramu je viditelný pokles signálu mezi exony 4 až 8 pod linií (červená) znázorňující 2 kopie tohoto genu. V dolní části je zobrazen kontrolní vzorek bez deletované oblasti. V pravé části je znázorněn bodový graf generovaný nástrojem CNVkit z patientských dat pro všechny regiony v panelu. Na ose Y je znázorněn počet kopií, na ose X jsou zobrazeny jednotlivé chromosomy. Šedé tečky znázorňují počet kopií pro jednotlivé regiony- exony. Oranžové tečky znázorňují průměrný počet kopií pro celé geny. Heterozygotní delece 5 exonů na chromosomu X je znázorněna červenou šipkou.

**Tabulka 14:** Výstup z programu CNVkit, který je využit k hodnocení CNV pro pacientku s delecí exonů 4 - 8 exonu (červeně). K hodnocení se využívá hodnota log<sub>2</sub>, která vyjadřuje počty kopií jednotlivých exonů následovně: 3 a více kopií >0,5; 2 kopie <0, 5 a > -0,76; 1 kopie < -0,78; žádná kopie < - 2. Transkripční varianty genu *LAMP2* Exon 9a - NM\_002294.3; exonu 9b- NM\_013995.2; exon 9C - NM\_001122606.1

Pozice	LAMP2 - NM_002294.3	Počet čtení	log <sub>2</sub>
chrX:119602925-119603059	exon 1	46.754	-0.067
chrX:119590470-119590659	exon 2	56.175	0.135
chrX:119589176-119589460	exon 3	96.979	0.083
chrX:119582789-119583018	exon 4	25.533	-1.366
chrX:119581660-119581915	exon 5	53.98	-0.992
chrX:119580124-119580317	exon 6	29.829	-0.905
chrX:119576418-119576552	exon 7	34.425	-1.097
chrX:119575549-119575784	exon 8	44.145	-0.853
chrX:119572973-119573183	exon 9b	78.095	-0.137
chrX:119565142-119565352	exon 9a	57.476	-0.075
chrX:119562303-119562516	exon 9c	55.474	0.138

Analýzu NGS jsme použili k ověření funkčnosti metody v rodině, ve které byla diagnostika Danonovy choroby včetně molekulárně genetického vyšetření dokončena a publikována před zavedením metody NGS v naší laboratoři (Majer et al. 2014). V této rodině byla Danonova choroba diagnostikována na základě vyšetření granulocytů průtokovou cytometrií u dvou bratrů, u nichž se před desátým rokem života rozvinula kardiomyopatie. Molekulárně genetické vyšetření bylo založeno na identifikaci abnormálně dlouhého produktu získaného z amplifikace celodélkové cDNA. Další analýzy byly provedeny vyšetřením genomové DNA. Pomocí qPCR byla identifikována duplikace 4. a 5. exonu, která byla ověřena a specifikována sekvenováním PCR produktu obsahujícího duplikovanou oblast. Duplikace měla celkový rozsah 6404 bp (NM\_002294.3: c.397+1822\_742-705dup6404). Variantu jsme ověřili panelovým sekvenováním, výsledky jsou uvedeny na obrázku (Obrázek 14) a v tabulce (Tabulka 15).



**Obrázek 13: Zobrazení duplikace exonů 4 a 5 u pacienta s DD.** V levé části obrázku je zobrazen histogram pokrytí získaný z prohlížeče IGV. V horní části jsou zobrazena data pacientů (modrá) pro LAMP2. ve střední části histogramu je viditelné zesílení signálu exonu 4 a 5 nad linií (červená) pro jednu kopii tohoto genu. V kontrolním vzorku (dolní část) tento jev není zachycen. V pravé části je znázorněn bodový graf generovaný nástrojem CNVkit z dat pacientů pro všechny regiony v panelu. Duplikace dvou exonu na X chromosomu je znázorněna pomocí červených šipek.

**Tabulka 15: Výstup z programu CNVkit, který je využit k hodnocení CNV pro pacienta s duplikací 4 a 5 exonu (červeně).** K hodnocení se využívá hodnota  $\log_2$ , která vyjadřuje počty kopií jednotlivých exonů následovně: 3 a více kopií  $>0,5$ ; 2 kopie  $<0, 5 a > -0,76$ ; 1 kopie  $< -0,78$ ; žádná kopie  $< -2$ . Transkripční varianty genu *LAMP2* Exon 9a - NM\_002294.3; exonu 9b- NM\_013995.2; exon 9C - NM\_001122606.1

Pozice	LAMP2	Počet čtení	log2
chrX:119602925-119603059	exon 1	37.684	-1.213
chrX:119590470-119590659	exon 2	33.775	-1.037
chrX:119589176-119589460	exon 3	66.008	-1.101
<b>chrX:119582789-119583018</b>	<b>exon 4</b>	<b>124.565</b>	<b>0.155</b>
<b>chrX:119581660-119581915</b>	<b>exon 5</b>	<b>110.596</b>	<b>0.004</b>
chrX:119580124-119580317	exon 6	39.705	-0.859
chrX:119576418-119576552	exon 7	60.798	-0.827
chrX:119575549-119575784	exon 8	58.293	-1.107
chrX:119572973-119573183	exon 9b	68.195	-1.081
chrX:119565142-119565352	exon 9a	52.821	-0.997
chrX:119562303-119562516	exon 9c	45.016	-1.158

#### 4.1.1 Diskuze a závěr k prvním cílům

Na základě výše uvedených výsledků je 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 indikovaných pacientů můžeme nález 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 v těchto nekódujících oblastech zůstává opominuta. Metoda panelového sekvenování používaného v naší laboratoři je srovnatelná s celoexomovým sekvenováním (WES), 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 delecii – sonda může sedět mimo její hranice).

Odlišná 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 delecce 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 srovnatelné 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 metoda NGS metabolického, kardiologického a panelu skeletálních 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**

Výsledky spojené s řešením problematiky druhého cíle práce jsme uveřejnili ve čtyřech publikacích v časopisech s IF (Dvorakova et al. 2017; Reboun et al. 2016; Majer et al. 2018; 2020). Uvádíme zde i dosud nepublikované výsledky, které jsou součástí připravované publikace (Majer et al. 2022).

### **4.2.1 Genotypová-fenotypová korelace u mukopolysacharidózy II. typu**

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. 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 ovlivňují 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.

U jednoho pacienta v souboru byla nalezena nukleotidová záměna c.1122C>T, která nevede k aminokyselinové substituci (p.Gly374Gly), ale k aktivaci 5' kryptického sestřihového místa a následně k deleci 60 nukleotidů 3' koncové části exonu 8 (r.1121\_1180del). Diagnóza byla u tohoto pacienta stanovena v pěti letech věku. Bylo pozorováno mírné zpoždění vývoje bez vývojové regrese, menší postava, velmi hrubé obličejové rysy, makrocefalie. Při

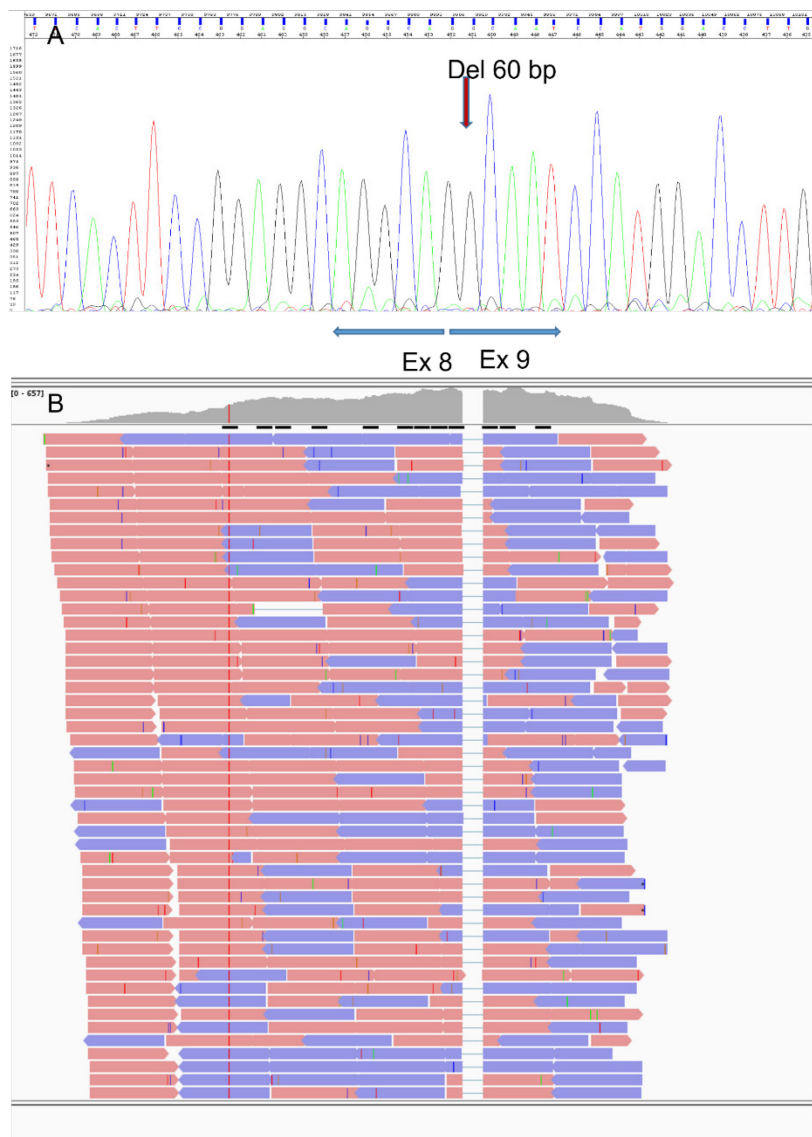


rentgenologickém vyšetření byl popsán typický obraz dysostosis multiplex. Prvním pozorovaným příznakem onemocnění byla chronická rýma. Ve věku 22 let byla přítomna pupečnicková a tříselná kýla, výrazná hepatomegalie a v menší míře i splenomegalie a postižení srdečních chlopní. Pacient dále trpěl záněty středního ucha a sluchovým postižením. Celkově byl pacientův fenotyp hodnocen jako středně závažný. V literatuře byla varianta c.1122C>T popsána u řady pacientů s různými fenotypovými projevy: 11 pacientů s mírným fenotypem (Rathmann et al. 1996, Gort et al. 1998, Amartino et al. 2014, Uttarilli et al. 2016, Alves et al. 2006)), 2 pacienti se středně těžkým fenotypem (Filocamo et al. 200), 7 pacientů s těžkým fenotypem (Karsten et al. 1998, Zhang et al. 2011, Uttarilli et al. 2016). V rozsáhlé studii 228 ruských pacientů s MPS II, byla tato varianta popsána u 15 pacientů, jejich fenotyp byl popsán jako středně závažný až závažný (Semyachkina et al. 2021).

Důvodem variabilního fenotypu může být přítomnost určité frakce normálního transkriptu u některých pacientů. Alves ve své práci popisuje pacienta, u něhož je dominantně transkribován abnormální transkript, ale v minoritní míře je zachován i transkript normální, jehož přítomnost dává vzniknout běžné izoformě enzymu v takové míře, která zaručuje zmírnění fenotypových projevů (Alves et al. 2006). Naopak absence normálního transkriptu může být způsobena individuálními rozdíly v procesu sestřihu a může vysvětlit rozdíly v závažnosti fenotypu jednotlivých pacientů (Zhou a Fu 2013).

U našeho pacienta jsme doplnili transkripční analýzu provedenou hlubokým amplikonovým sekvenováním RT-PCR produktu (Nextera, MiSeq, Illumina platform). Při hloubce 776 čtení byla detekována pouze deletovaná alela, zatímco správně sestřižená alela nebyla detekována ani jednou (Obrázek 15). Tento výsledek ukazuje, že 1) varianta c.1122C>T znatelně neovlivňuje stabilitu mRNA, 2) v případě našeho pacienta není přítomen normální transkript, který by vedl ke zmírnění příznaků. Středně závažný fenotyp lze vysvětlit tím, že delece 60 nukleotidů nevede k posunu ve čtecím rámci, ve výsledném aberantním proteinu je deletováno 20 aminokyselinových zbytků. Tento typ mutace nemusí být tak závažný jako mutace vedoucí k nestabilnímu transkriptu, což tato mutace dle našeho vyšetření není.

V exonu 8 je popsáno minimálně 6 dalších patogenních variant, z nichž jsou čtyři varianty hodnoceny jako závažné, včetně dvou nejbližších naší variantě (c.1123G>T a c.1025A>C) a dvě jsou hodnoceny jako středně závažné (c.1048A > C, c.1142 T > C) (Zhang et al. 2019).



**Obrázek 14: Analýza transkriptu u muže s MPS II.** Varianta *c.1403G>A* vede k deleci 60 nukleotidů (fialová šipka) na rozhraní exonu 8 a 9 (modrá šipka). (A) Na chromatogramu ze Sangerova sekvenování je patrná pouze mutovaná alela. (B) Na záznamu NGS mapování z IGV je rovněž zachycena pouze mutovaná alela. Při počtu 776 čtení nebyla normální alela (WT) detekována. Data jsou mapována oproti referenční sekvenci NM\_000202.8

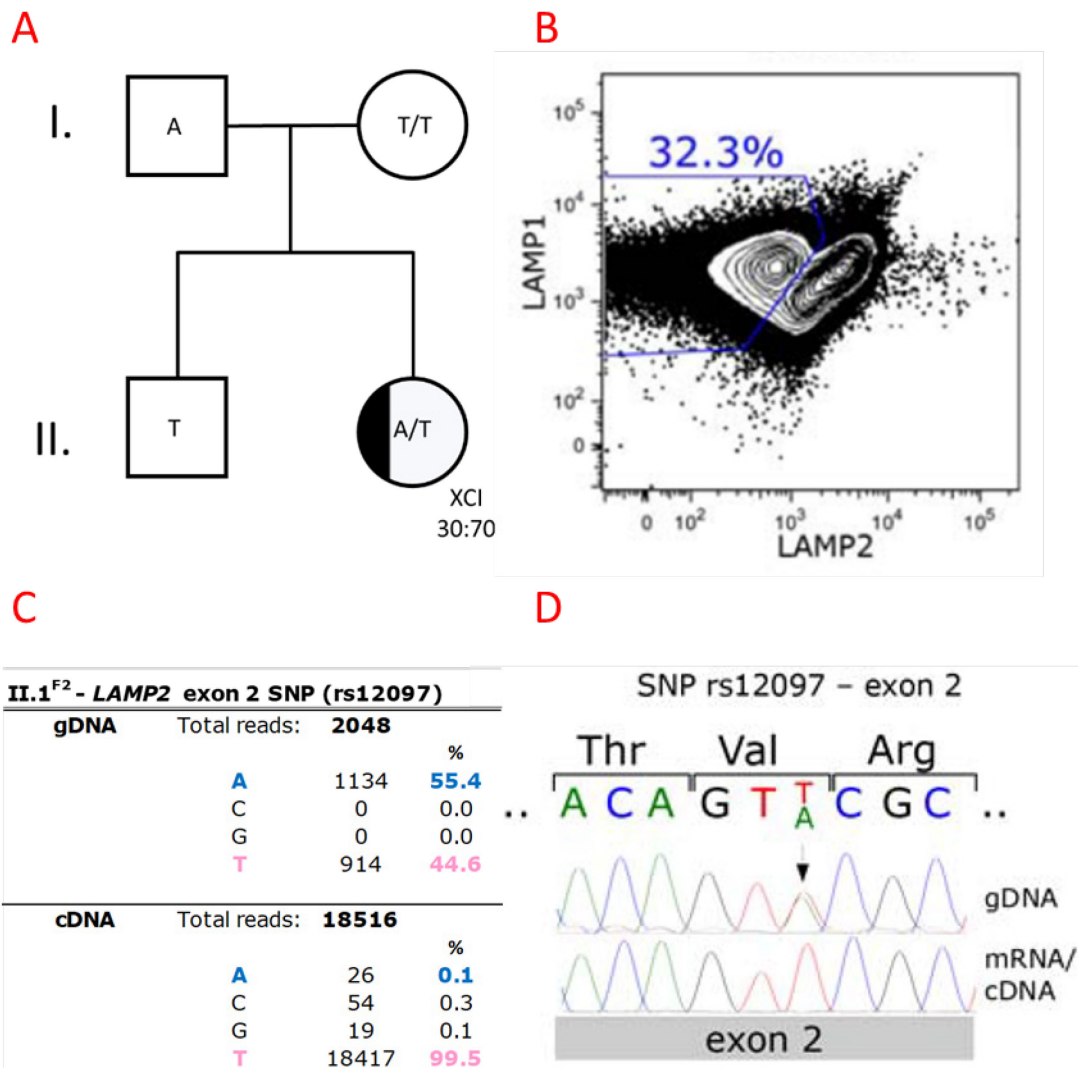
## 4.2.2 Genetická analýza somatického mozaicismu a XCI u Danonovy choroby

Problematiku jsme zpracovávali ve dvou publikacích (Majer et al. 2018; 2020) a přinášíme zde i některá nepublikovaná data z připravované publikace (Majer et al. 2022).

### 4.2.2.1 Pacientka 1

V publikaci (Majer et al. 2018) je popsána pacientka, jejíž příčinou onemocnění je delece zahrnující exony 4-9C, detekovaná na jedné alele genu *LAMP2*. Hypertrofická kardiomyopatie byla u této pacientky diagnostikována v 11 letech. Při progresi onemocnění

musela mít v 19 letech implantován dvoukomorový kardioverter defibrilátor. Primární diagnóza byla určena průtokovou cytometrií, kdy bylo identifikováno 32,3 % LAMP2 deficitních granulocytů (Obrázek 16B). Tato hodnota korelovala se stavem XCI 70:30. Vyšetření polymorfismu rs12097 ve 2. exonu genu *LAMP2* ukázalo, že matka je homozygotkou pro alelu nesoucí thymin (T), zatímco otec je hemizygotem pro alelu nesoucí adenin (A) (Obrázek 16A). Pacientka je tedy dle předpokladu heterozygotkou pro A/T a v souladu se stavem XCI by transkribované alely měly být detekovány v poměru 70:30. Ve skutečnosti však analýza transkriptu ukázala výhradní expresi maternální alely (Obrázek 16C, D). Pravděpodobnou příčinou tohoto výsledku je odbourávání mutované alely procesem NMD, což je u velké delecce obvyklý jev. Mutovaná alela je podle této analýzy paternálního původu.

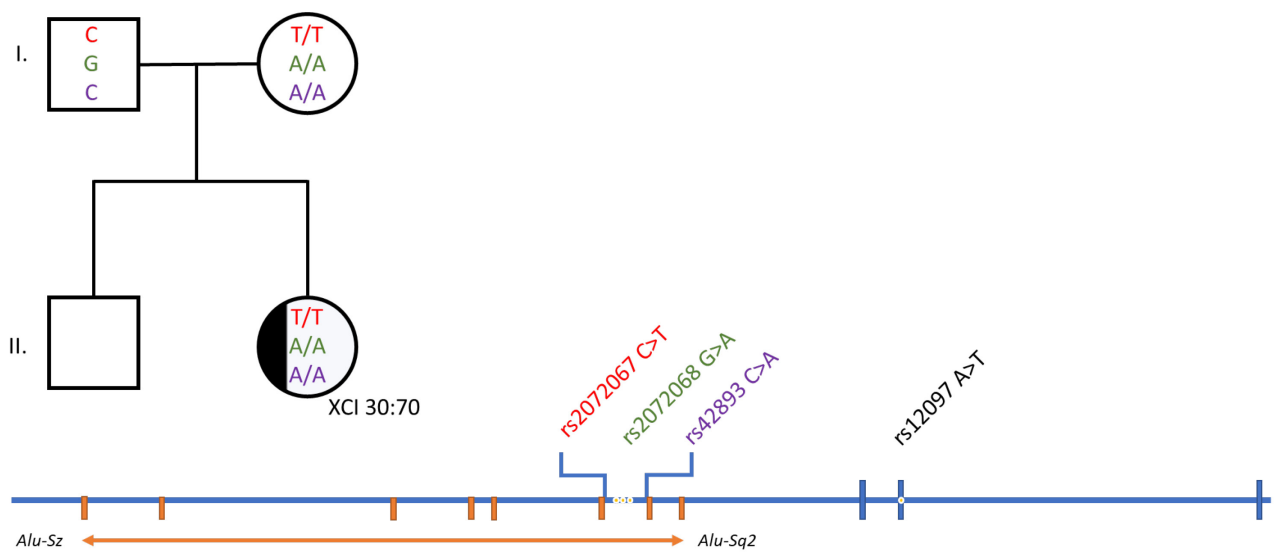


Obrázek 15: **Genetické analýzy u pacientky 1 s DD.** A) rodokmen pacientky znázorňující distribuci alel rs12097 v rodině a stav XCI stanovený v krevním vzorku probandky. B) Graf zobrazující poměr exprese proteinů LAMP2 (osa X) vůči kontrolnímu proteinu LAMP1 (osa Y) v granulocytech stanovený průtokovou cytometrií. LAMP2 deficitní buňky jsou zvýrazněny rámečkem a vyjádřeny v procentuálním zastoupení. C) tabulka zobrazuje ztrátu heterozygosity SNP (rs12097) u probandky na úrovni transkriptu oproti stavu na úrovni gDNA stanovenou pomocí NGS. D) zobrazení ztráty heterozygosity SNP (rs12097) u probandky na úrovni transkriptu oproti stavu na úrovni gDNA stanovenou pomocí Sangerova sekvenování. Publikováno (Majer et al. 2018).

Patogenní varianta zahrnující delecii exonů 4 – 9C nebyla při primárním vyšetření detekována u rodičů. Proto jsme se zabývali otázkou somatického mozaicismu u rodičů a otázkou somatického postzygotického původu varianty u pacientky.

Somatický mozaicismus u rodičů byl vyšetřen pomocí specifického nested PCR ve vzorcích periferní krve, ve vlasových kořínkách, bukálních stěrech, močovém sedimentu a spermatu. Varianta nebyla identifikována u žádného z rodičů.

Somatický postzygotický původ varianty u pacientky by se dal ověřit přítomností určité frakce nedeletované alely. Za tímto účelem byla u rodičů osekvenována oblast, ve které je u pacientky přítomna delece. V této oblasti byly vybrány tři intronové SNP (rs2072067, rs2072068, rs42893). Všechny 3 SNP pocházejí z intronu 5 a splňují podmínku, že rodiče nejsou nositeli stejných alel. Otec je hemizygotem pro majoritní alelu a matka byla homozygotkou pro minoritní alelu u všech těchto 3 SNP (Obrázek 17).



**Obrázek 16: Rodokmen pacientky I s DD znázorňující distribuci alel s vyznačenými SNP.** rs2072067(červeně), rs2072068(zeleně), rs42893(fialově) v rodině a lokalizaci těchto SNP v intronu 5 genu LAMP2 vzhledem k deletované oblasti mezi 4-9 exonem (oranžová). SNP rs12097 charakterizovaný na obrázku 16 je v exonu 2 před deletovanou oblastí.

Za účelem stanovení citlivosti metody a relativní kvantifikace případně identifikované mozaiky byly připraveny směsné vzorky zahrnující paternální a maternální PCR produkty v různých poměrech (100:0 50:50, 20:80, 10:90, 5:95, 3:97, 2:98, 1:99 a 0:100). Jednotlivé směsné vzorky rodičů a PCR produkt probandky byly analyzovány amplikonovým sekvenováním.

Jak je znázorněno v tabulce (Tabulka 16) při hlubokém sekvenování v rozmezí 6 – 16 tisíc čtení, vybrané varianty dobře odpovídají teoretickému zastoupení jednotlivých nukleotidů. Výraznější rozdíl je pouze u mixu s teoretickým 50% zastoupením paternální DNA. Chyba pravděpodobně vznikla při ředění mixu. Data vykazují dobrou shodu při stanovení

jednotlivých poměrů pro různé SNP s rozdíly maximálně desetin procent. Největší rozdíl byl v mixu s 5% zastoupením paternálního produktu až 0,6 %.

Hlubokým sekvenováním produktu probandky nebyl identifikován paternální haplotyp a byly detekovány pouze nukleotidy získané od matky. V zastoupení maternálních nukleotidů v produktu probandky bylo 99,8 % pro rs2072067 a 99,9 % pro rs2072068 a rs42893. Toto zastoupení přesně odpovídá zastoupení nukleotidů stanoveném v maternálním produktu (mix označen jako 0:100 Tabulka 16). Postzygotická mozaika u pacientky nebyla prokázána.

**Tabulka 16: Shrnutí dat využitých pro detekci případného postzygotického somatického mozaicismu u pacientky 1 s DD.** Citlivost metody byla testována pomocí ředící řady, výsledky jsou ukázány v prvních 8 řádcích tabulky. Bylo využito hlubokého sekvenování 3 benigních SNP (rs2072067, rs2072068, rs42893). První sloupec představuje zastoupení alel v ředící řadě. Modře je znázorněna paternální alela, růžově alela maternální. Položka total reads představuje celkový počet čtení. Červeným rámečkem je zvýrazněno porovnání dat stanovených pro matku a probandku, u které byla detekována výhradně maternální alela. Publikováno v (Majer et al. 2018)

Family 2 - LAMP2 intron 5 SNPs				
mixing ratio		rs2072067	rs2072068	rs42893
		Total reads: 8604	9302	12029
<b>I.1<sup>F2</sup></b>	<b>100%</b>	A 0.2	A <b>0.1</b>	A <b>0.2</b>
<b>I.2<sup>F2</sup></b>	<b>0%</b>	C <b>99.6</b>	C 0.0	C <b>99.7</b>
		G 0.0	G <b>99.8</b>	G 0.0
		T <b>0.2</b>	T 0.1	T 0.1
		Total reads: 6271	6655	7509
<b>I.1<sup>F2</sup></b>	<b>50%</b>	A 0.2	A <b>58.5</b>	A <b>58.7</b>
<b>I.2<sup>F2</sup></b>	<b>50%</b>	C <b>42.0</b>	C 0.1	C <b>41.2</b>
		G 0.2	G <b>41.3</b>	G 0.0
		T <b>57.6</b>	T 0.1	T 0.0
		Total reads: 10058	10481	10811
<b>I.1<sup>F2</sup></b>	<b>20%</b>	A 0.0	A <b>80.9</b>	A <b>80.5</b>
<b>I.2<sup>F2</sup></b>	<b>80%</b>	C <b>19.0</b>	C 0.1	C <b>19.5</b>
		G 0.1	G <b>19.0</b>	G 0.0
		T <b>80.9</b>	T 0.0	T 0.0
		Total reads: 10930	11598	12258
<b>I.1<sup>F2</sup></b>	<b>10%</b>	A 0.0	A <b>91.8</b>	A <b>91.5</b>
<b>I.2<sup>F2</sup></b>	<b>90%</b>	C <b>8.0</b>	C 0.1	C <b>8.5</b>
		G 0.1	G <b>8.0</b>	G 0.0
		T <b>91.8</b>	T 0.1	T 0.0
		Total reads: 12342	12960	13788
<b>I.1<sup>F2</sup></b>	<b>5%</b>	A 0.1	A <b>96.0</b>	A <b>95.5</b>
<b>I.2<sup>F2</sup></b>	<b>95%</b>	C <b>4.0</b>	C 0.1	C <b>4.5</b>
		G 0.1	G <b>3.9</b>	G 0.0
		T <b>95.9</b>	T 0.0	T 0.0
		Total reads: 6333	6787	8251
<b>I.1<sup>F2</sup></b>	<b>3%</b>	A 0.1	A <b>96.9</b>	A <b>97.2</b>
<b>I.2<sup>F2</sup></b>	<b>97%</b>	C <b>3.0</b>	C 0.2	C <b>2.7</b>
		G 0.1	G <b>2.9</b>	G 0.0
		T <b>96.8</b>	T 0.0	T 0.0
		Total reads: 11484	12008	13314
<b>I.1<sup>F2</sup></b>	<b>2%</b>	A 0.1	A <b>98.2</b>	A <b>98.2</b>
<b>I.2<sup>F2</sup></b>	<b>98%</b>	C <b>1.7</b>	C 0.1	C <b>1.6</b>
		G 0.3	G <b>1.6</b>	G 0.0
		T <b>97.9</b>	T 0.1	T 0.1
		Total reads: 10476	10924	11536
<b>I.1<sup>F2</sup></b>	<b>1%</b>	A 0.1	A <b>99.1</b>	A <b>99.1</b>
<b>I.2<sup>F2</sup></b>	<b>99%</b>	C <b>0.7</b>	C 0.1	C <b>0.9</b>
		G 0.1	G <b>0.8</b>	G 0.0
		T <b>99.1</b>	T 0.0	T 0.0
		Total reads: 14764	15402	15926
<b>I.1<sup>F2</sup></b>	<b>0%</b>	A 0.0	A <b>99.9</b>	A <b>99.9</b>
<b>I.2<sup>F2</sup></b>	<b>100%</b>	C <b>0.1</b>	C 0.1	C <b>0.1</b>
		G 0.1	G <b>0.0</b>	G 0.0
		T <b>99.8</b>	T 0.0	T 0.0
proband		Total reads: 8740	9172	10200
<b>II.1<sup>F2</sup></b>	<b>100%</b>	A 0.0	A <b>99.9</b>	A <b>99.9</b>
		C <b>0.0</b>	C 0.1	C <b>0.1</b>
		G 0.1	G <b>0.0</b>	G 0.0
		T <b>99.8</b>	T 0.0	T 0.0

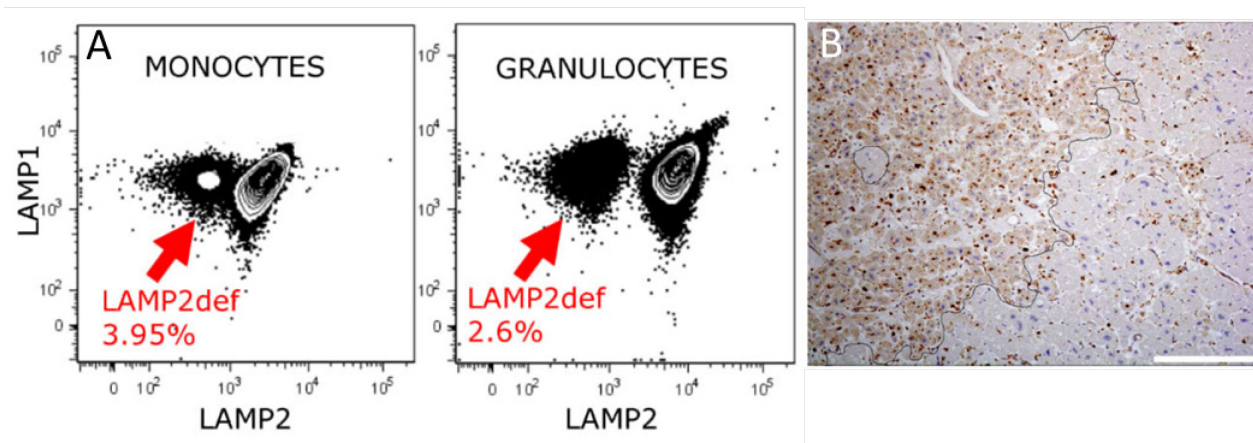
#### 4.2.2.2 Pacientka 2

U pacientky s mírnou mentální retardací popsané v (Majer 2020) byla diagnostikována dilatační kardiomyopatie s oboustranným srdečním selháním s následnou nutností transplantace srdce. Při zpětném zhodnocení elektrokardiogramů byla jako jedna z možných příčin zvažována i DD. Tato diagnóza byla prokázána průtokovou cytometrií, pomocí níž byla identifikována malá LAMP2 deficitní frakce monocytů (cca 4 %) a granulocytů (přibližně 3 %).

Molekulárně genetické vyšetření identifikovalo rozsáhlou delecí zahrnující kromě celého genu *LAMP2*, další tři geny *ATP1B4*, *TMEM255A* a *ZBTB33* a část genu *CUL4B*. Tato rozsáhlá delece nebyla zjištěna u rodičů probandky. Somatický mozaicismus nebyl prokázán v krvi žádného z rodičů a ani ve spermatu otce. K vyšetření postzygotického vzniku mutace u pacientky nebylo možné použít stejných benigních intronových SNP, jako v předchozím případě. Rodiče pro toto vyšetření nebyli informativní, protože oba nesli stejný haplotyp. Původ postzygotické mozaiky proto nebyl stanoven.

Výsledek průtokové cytometrie byl v souladu s vyšetřením inaktivace v krvi a dalších tkáních metodou HUMARA (periferní leukocyty 96:4, buňky sliznice 89:11, vlasové folikuly 94:6 a močový sediment 89:11). Výsledky ukazující téměř výhradní zastoupení normální alely (WT) v periferních tkáních lze vysvětlit sekundárním zesílením XCI, tj. selektivním zvýhodněním proliferace buněk nesoucích aktivní WT alelu. Tyto nálezy jsou v souladu s publikovanými daty, které ukazují sekundární XCI v hematopoetické tkáni heterozygotek pro *CUL4B* (Zou et al. 2007).

Na rozdíl od periferních tkání imunohistopatologická analýza srdečního svalu ukázala, že počet LAMP2 deficitních kardiomyocytů zhruba odpovídal kardiomyocytům exprimujícím normální LAMP2 (Obrázek 18). Tento výsledek ukazuje, že sekundární inaktivace v srdeční tkáni zřejmě neprobíhá. Tkáňové rozdíly v sekundární XCI byly pozorovány i u heterozygotní *Cul4b* knock-outované myši (Jiang et al. 2012).



**Obrázek 17: Distribuce LAMP2 pozitivních a LAMP2 negativních buněk u pacientky 2 s DD.** A) Graf zobrazující poměr exprese proteinů LAMP2 (osa X) vůči kontrolnímu proteinu LAMP1 (osa Y) v monocytech a granulocytech stanovený průtokovou cytometrií. LAMP2 deficitní buňky jsou zvýrazněny šipkou a vyjádřením v procentuálním zastoupení. B) Fotografie z imunohistologického vyšetření stanovující poměr LAMP2 deficitních a LAMP2 normálních kardiomyocytů přibližně v poměru 50:50. Publikováno v (Majer et al. 2020).

#### 4.2.2.3 Pacient 3

U pacienta z připravované publikace (Majer et al. 2022 *in prep*), byla na základě dušnosti při sportu diagnostikována hypertrofická kardiomyopatie v 15 letech života. Během tří let došlo k vývoji systolické dysfunkce levé komory. Následná rychlá progresse srdečního selhání vedla ve věku 21 let k transplantaci srdce. V genu *LAMP2* byla ve vzorku krve prokázána delece dvou nukleotidů, která vedla k posunu ve čtecím rámci od 64 pozice a předčasnému ukončení translace o 11 aminokyselinových zbytků (NM\_002294.3: c.190\_191delGT, p.Val64Asnfs\*11). Nalezená varianta byla již dříve popsána u hemizygotního chlapce (He et al. 2014). Unikátní byl nálezn v tom, že varianta byla u našeho pacienta identifikována pouze v polovině všech čtení z NGS. Takový nálezn lze očekávat u heterozygotních žen, u muže jde však o nálezn raritní. Vysvětlením může být rozsáhlá duplikace, Klinefelterův syndrom, chimerismus nebo somatický mozaicismus.

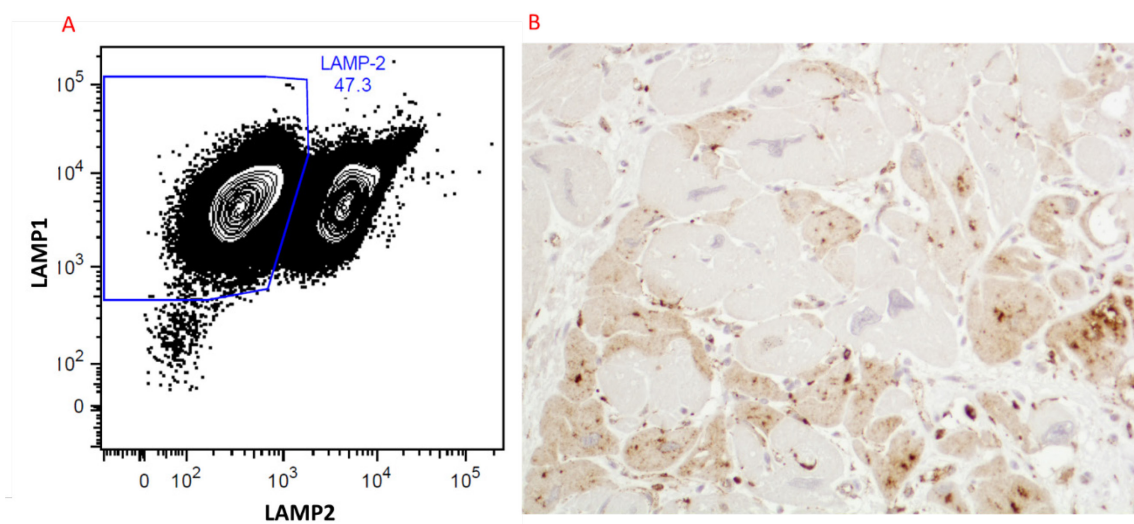
Somatický mozaicismus byl v první fázi vyšetřen v periferních tkáních (krev, močový sediment, bukální stěry). Využili jsme amplikonové sekvenování pomocí kitu Nextera XT na úrovni genomové DNA a sekvenování na přístroji Miseq. Tímto postupem jsme v krvi stanovili zastoupení WT a mutované alely v poměru 55:45 (Tabulka 17). Tato data korelují s výsledky průtokové cytometrie, kterou bylo identifikováno 47,3 % LAMP2 deficitních buněk (Obrázek 19). Zastoupení jednotlivých alel bylo v močovém sedimentu srovnatelné s krví (48:52). Oproti tomu výrazný rozdíl v zastoupení varianty byl zjištěn v bukálních



stěrech, kde mutovaná alela byla zastoupena pouze 28 %. Analýza z nového PCR produktu výsledky z bukálních stěrů potvrdila (71:29).

**Tabulka 17: Zastoupení varianty v periferních tkáních pacienta 3 s DD a v krvi jeho matky.** Data byla získána pomocí NGS na úrovni gDNA. WT značí normální alelu. MUT značí kauzální variantu - delecii dvou nukleotidů LAMP2: NM\_002294.3 c.190\_191delGT

gDNA	WT(%)	MUT(%)	Čtení
Krev	54.6	45.4	5463
Močový epitel	47.9	52.1	1855
Bukální stěr	71.9	28.1	1948
Matka (krev)	100.0	0.0	2700



**Obrázek 18: Distribuce LAMP2 pozitivních a LAMP2 negativních buněk u pacienta 3 s DD.** A) Graf zobrazující poměr exprese proteinů LAMP2 (osa X) vůči kontrolnímu proteinu LAMP1 (osa Y) v granulocytech stanovený průtokovou cytometrií u pacienta 3 s DD. LAMP2 deficitní buňky jsou zvýrazněny modrým boxem a vyjádřením v procentuálním zastoupení. B) Fotografie z imunohistologického vyšetření ve vzorku srdeční tkáně stanovují poměr LAMP2 deficitních a LAMP2 normálních buněk přibližně v poměru 50:50.

Imunohistologické vyšetření provedené ve třech vzorcích srdeční tkáně ukázalo, že zastoupení LAMP2 deficitních buněk je přibližně 50 % (Obrázek 19B). Tento nálezn byl ve shodě s výsledky amplikonového sekvenování na úrovni genomové DNA Tabulka 18.

Pomocí amplikonového sekvenování byla provedena i transkripční analýza v krvi a vzorcích srdečního svalu. U izoform *LAMP2A* a *LAMP2B* byla zjištěna téměř výhradní exprese WT alely (> 99 %). U izoformy *LAMP2C*, jejíž exprese je ve sledovaných tkáních velmi nízká,

jsme detekovali zastoupení mutované alely ve 2,2 – 3,3 % (Tabulka 18). Velmi pravděpodobně se jedná o technický artefakt, vzniklý při přípravě produktu, která využívá v případě *LAMP2C* 40 cyklů PCR oproti 37 cyklech použitých u *LAMP2A* a *B*. Výsledky transkripční analýzy ukazují kompletní nestabilitu mutované alely na úrovni RNA způsobenou pravděpodobně mechanismem NMD.

**Tabulka 18: Zastoupení patogenní varianty v srdeční tkáni pacienta s DD.** Data byla získána pomocí amplikonového sekvenování na úrovni gDNA a cDNA s ohledem na jednotlivé transkripční varianty. WT značí běžnou populační alelu. MUT značí kauzální variantu -deleci dvou nukleotidů v *LAMP2*: NM\_002294.3 c.190\_191delGT. RV – pravá komora, VS – septum, LV – levá komora.

gDNA		WT(%)	MUT(%)	Čtení
Srdce RV	-	50.0	50.0	742
Srdce VS	-	61.7	38.3	128
Srdce LV	-	59.2	40.8	213
cDNA	Transkript	WT(%)	MUT(%)	Čtení
Krev	LAMP2B	99.3	0.7	2772
	LAMP2A	99.2	0.8	1069
Srdce RV	LAMP2B	99.1	0.9	462
	LAMP2A	99.1	0.9	1374
	LAMP2C	96.7	3.3	1165
Srdce VS	LAMP2B	99.6	0.4	495
	LAMP2A	99.8	0.2	978
	LAMP2C	97.4	2.6	777
Srdce LV	LAMP2B	99.8	0.2	658
	LAMP2A	99.5	0.5	1359
	LAMP2C	97.8	2.2	604

Naše výsledky tak v souhrnu ukazují první případ muže s prokázanou somatickou mozaikou pro mutaci v genu *LAMP2*, a to v poměru přibližně 50:50 ve většině sledovaných tkání včetně tkáně srdeční.

### 4.2.3 Genetická analýza XCI a somatického mozaicismu u dívky s MPS II

V kohortě pacientů (Dvorakova et al. 2017) byla jedna dívka s klinicky plně vyjádřeným onemocněním. Manifestace MPS II u dívek je vzácná, genetické analýze u pacientky jsme věnovali samostatnou publikaci (Reboun et al. 2016).

V prvních letech života pacientky probíhal její vývoj bez nápadností. Ve třetím roce života byly u dívky již patrné hrubé obličejové rysy, mírná hepatosplenomegalie, kontraktury velkých kloubů a lehké opoždění vývoje. V moči byla detekována zvýšená exkrece heparan- a dermatansulfátu (60,5– 65,7 g/mol kreatininu; norma < 15.5), což je nález vysoce suspektní pro mukopolysacharidózu typu I, II nebo VI. Vzhledem k tomu, že se jedná o dívku, byla v této fázi vyšetření X-vázaná MPS II z těchto tří onemocnění nejméně pravděpodobnou diagnózou. Aktivita enzymu iduronát-2-sulfatázy v leukocytech (0,46 nmol/4 h/mg, 19 nmol/4 h/ml) srovnatelná s hodnotami hemizygotních pacientů však vedla právě k diagnóze MPS II. Na molekulární úrovni byla u dívky pomocí Sangerova sekvenování v genu *IDS* v heterozygotním stavu identifikována varianta c.1403G>A (p.Arg468Gln, rs113993946). Jedná se o rekurentní mutaci (Brusius-Facchin et al. 2014), jejíž patogenita byla prokázána ve funkční studii (Sukegawa-Hayasaka et al. 2006). Mutace byla již dříve popsána u manifestující heterozygotky japonského původu, která zdělila mutaci od své matky (Sukegawa et al. 1997).

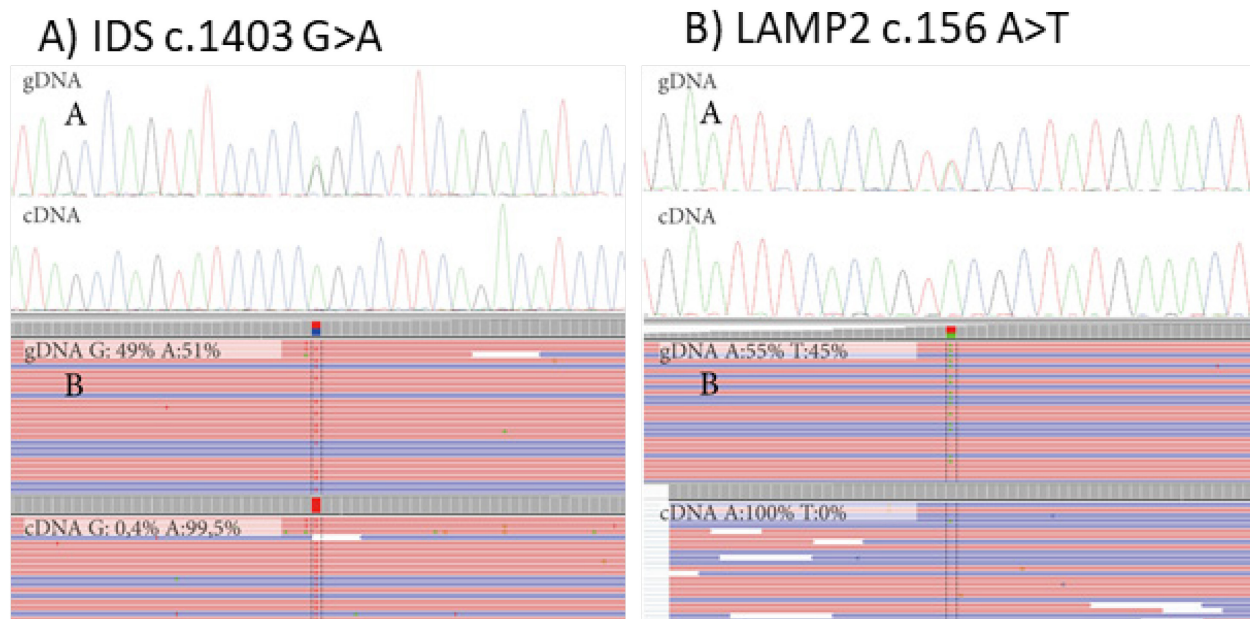
U rodičů naší pacientky nebyla mutace Sangerovým sekvenováním identifikována. Abychom detekovali případný somatický mozaicismus ve tkáních rodičů, provedli jsme analýzu hlubokým amplikonovým sekvenováním – Nextera XT, (MiSeq, Illumina) ve třech buněčných typech, DNA byla izolovaná z periferních leukocytů, močového sedimentu a bukalních stěrů. Počet čtení odpovídající mutované alele (A) představoval ve všech sledovaných vzorcích zastoupení v desetínách až setinách procent, což je hodnota na úrovni experimentální chyby a srovnatelná s počtem čtení zbylých dvou nukleotidů (C, T; Tabulka 19). Somatický mozaicismus u rodičů nebyl prokázán.

**Tabulka 19: Výsledky z amplikonového sekvenování varianty c. 1403G>A v genu *IDS* v krvi probandky a v různých tkáních rodičů**

	Tkáň	Počet čtení	Normální alela (G)	Mutovaná alela (A)	Normální alela (%)	Mutovaná alela (%)
Probandka	krev	266523	129633	136478	49	51
Matka	krev	316872	315947	364	99.7	0.11
	moč	16007	15969	9	99.7	0.06
	bukální stěry	24177	24114	21	99.7	0.09
Otec	krev	225319	224700	253	99.7	0.11
	moč	1380	1377	2	99.7	0.1
	bukální stěry	72733	72228	406	99.3	0.5

Mutace na druhé alele nebyla zjištěna Sangerovým sekvenováním, MLPA analýzou ani metodami specifickými pro vyšetření rekombinace mezi genem *IDS* a pseudogenem *IDS2*. Nejpravděpodobnějším vysvětlením manifestace tedy bylo výrazné zešíkmení XCI ve prospěch mutované alely.

Pro analýzu XCI jsme použili vyšetření dvou metylačně senzitivních sond (*AR* a *CNKSR2*) a transkripční analýzu pro benigní SNP v genu *LAMP2* (rs12097). Metylačně senzitivní sondy shodně ukazovaly ve vzorcích z leukocytů i bukálních stěrů téměř výlučnou expresi jedné alely (poměr aktivních alel se pohyboval mezi 96:4 – 98:2). Kompletní inaktivace jedné alely byla dále podpořena transkripční analýzou benigního SNP v genu *LAMP2*, který vykazoval 100% expresi pouze jedné z alel. K identifikaci aktivní alely byla použita transkripční analýza *IDS* pomocí amplikonového sekvenování, která potvrdila téměř exkluzivní expresi mutované alely (Obrázek 20).



**Obrázek 19: Vyšetření XCI u dívky se vzácnou manifestací MPS II.** A) Stanovení exprese mutované alely v genu *IDS* u kauzální varianty *IDS*:NM\_000202.8 c.1403 G>A. V horní části je záznam ze Sangerova sekvenování gDNA, který uprostřed chromatogramu zobrazuje heterozygotní záměnu této varianty. Při sekvenování cDNA je vidět pouze exprese mutované alely. V dolní části je zobrazen stejný výsledek získaný pomocí paralelního sekvenování, který zachytil v 99,5 % čtení mutovanou alelu. B) zobrazení exprese výhradně jedné alely benigního heterozygotní SNP v genu *LAMP2* pomocí Sangerova (horní část obrázku) a ampliconového sekvenování.

#### 4.2.4 Diskuze a závěr k druhému cíli práce

Hluboké ampliconové 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 delecí 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 výhradně zastoupený produkt deletované alely u něj stačil k manifestaci pouze intermediárního fenotypu.

Hluboké ampliconové 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 projeví 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%), bukových stěrech (58%) a močovém sedimentu (85%) (Bae et al. 2020).

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 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 je právě tento případ – prokázali jsme výhradní expresi mutované alely p.Arg468Gln způsobenou kompletním zešikmením 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. Této problematice se budeme věnovat v další kapitole.

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

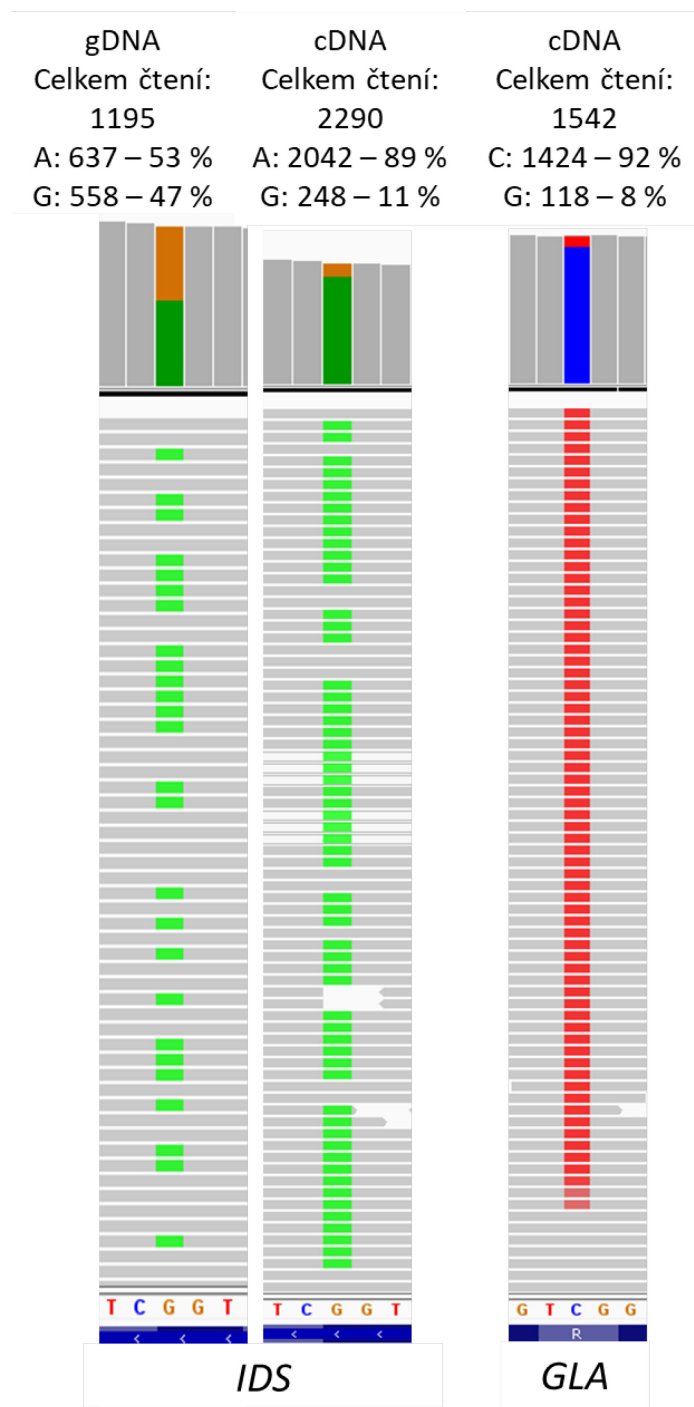
Výsledky komplexní analýzy studia X-inaktivace u žen s Fabryho nemocí byly publikovány v práci: (Řeboun et al. 2022)

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 zešikmení 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 ampliconového 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) (Tabulka 20). U heterozygotních žen byl ampliconovým 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 (Obrázek 21).

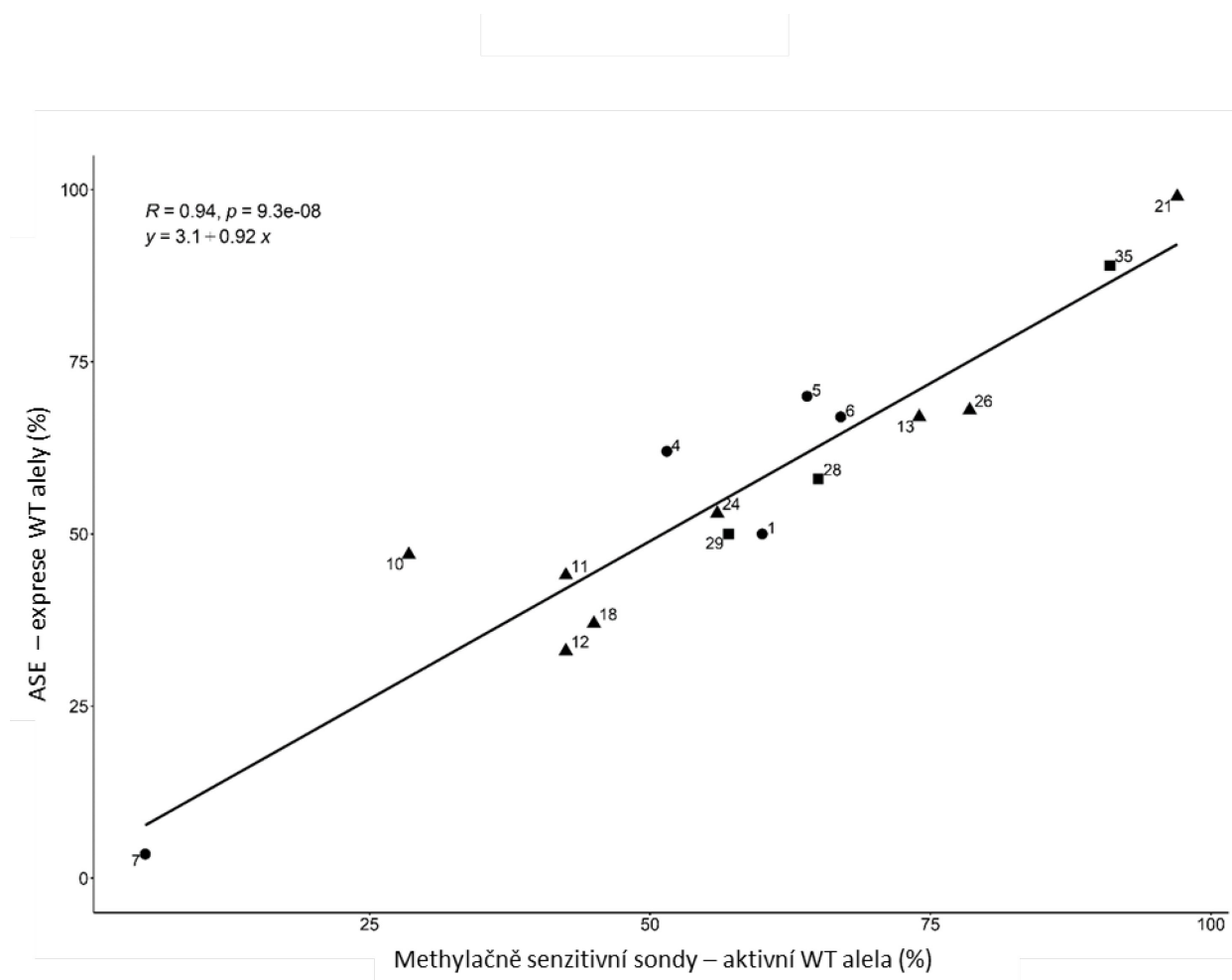




**Obrázek 20:** Vyšetření X-inaktivace a exprese mutované alely metodou ampliconového sekvenování u pacientky 35 z Tabulky 20. Zastoupení alel je zobrazeno v prohlížeči IGV. Výsledek sekvenování DNA v 1. sloupci ukazuje heterozygotii pro benigní SNP v genu *IDS* (rs1141608). 2. sloupec ukazuje zastoupení alel v transkriptu, tj. preferenční expresi jedné alely v poměru 89:11. Exprese hypomorfní mutované alely (*GLA*: c.902G>A, p.Arg301Gln) ve 3. sloupci odpovídá procentuálně expresi SNP v *IDS*.

Výsledky tohoto vyšetření jsme pak porovnali s výsledky metylačních metod. Příkladem srovnání obou metod je 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

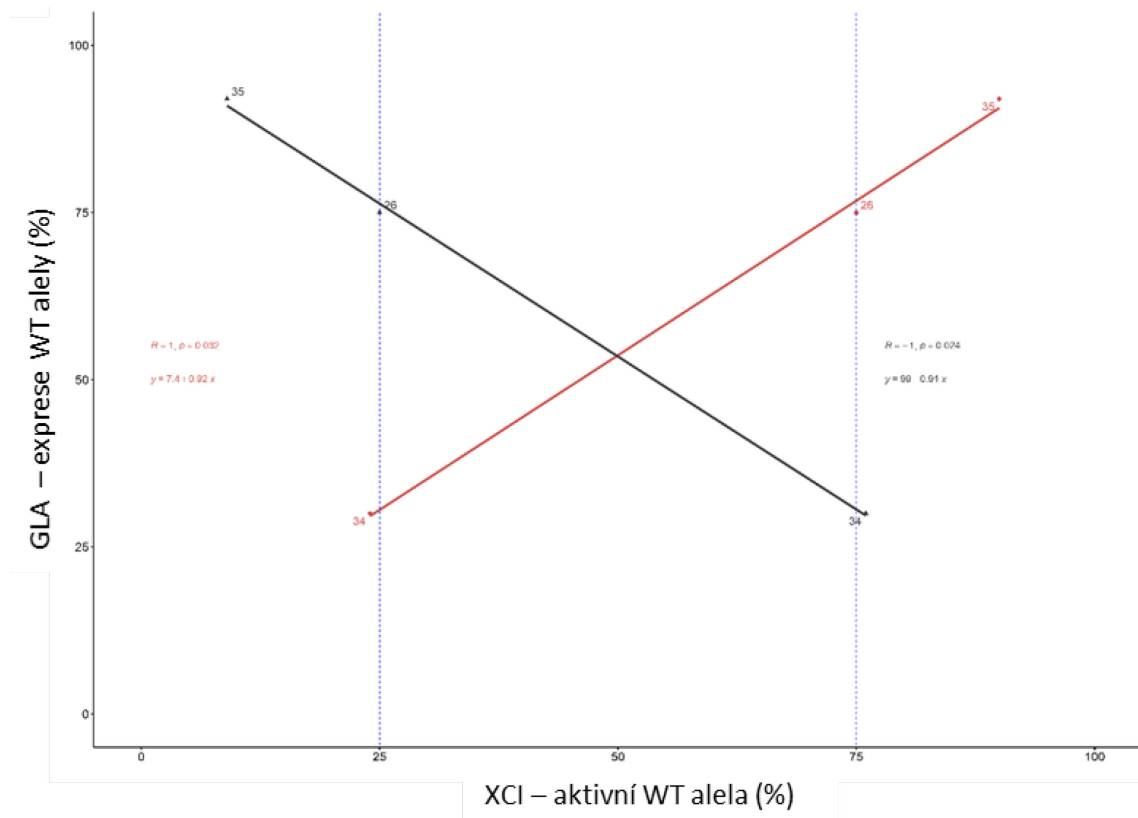
genu *AR* (91:9) (Obrázek 21). Velmi dobrou korelaci obou metod jsme zjistili v celém souboru pacientek (Tabulka 20, Obrázek 22). Jediný výrazně odlehlý výsledek jsme pozorovali u pacientky 10 v sondě *AR*. Sonda *AR* vykazuje zešíkmení XCI k jedné z alel (80/20), zatímco u dalších sond byla XCI náhodná (u metylační sondy (*RP2*) byl poměr 63/37, u nepřímé transkripční sondy v genu *IDS* 47/53.



**Obrázek 21: Korelace metylačních a alelově specifických expresních sond.** XCI byla stanovena v leukocytech periferní krve 16 pacientek FD, které byly polymorfni pro alespoň jednu z metylačních sond (*AR*, *RP2*, osa X) a současně pro alespoň jednu z ASE sond (*IDS*, *LAMP2*, osa Y). V grafu vynesené hodnoty korelačního koeficientu (*R*) a statistické významnosti (*p*) vypovídají o vysoké shodě obou provedených nepřímých metod bez ohledu na typ mutace v genu *GLA* uvedený v (Tabulka 20) (bod – nulové mutace, trojúhelník – závažné missense mutace, čtvereček – hypomorfni mutace).

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 (Tabulka 20). 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 zešíkmení 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 (Obrázek 23). Tento nálezn lze vysvětlit jevem crossing – over a ukazuje na riziko používání nepřímých sond.

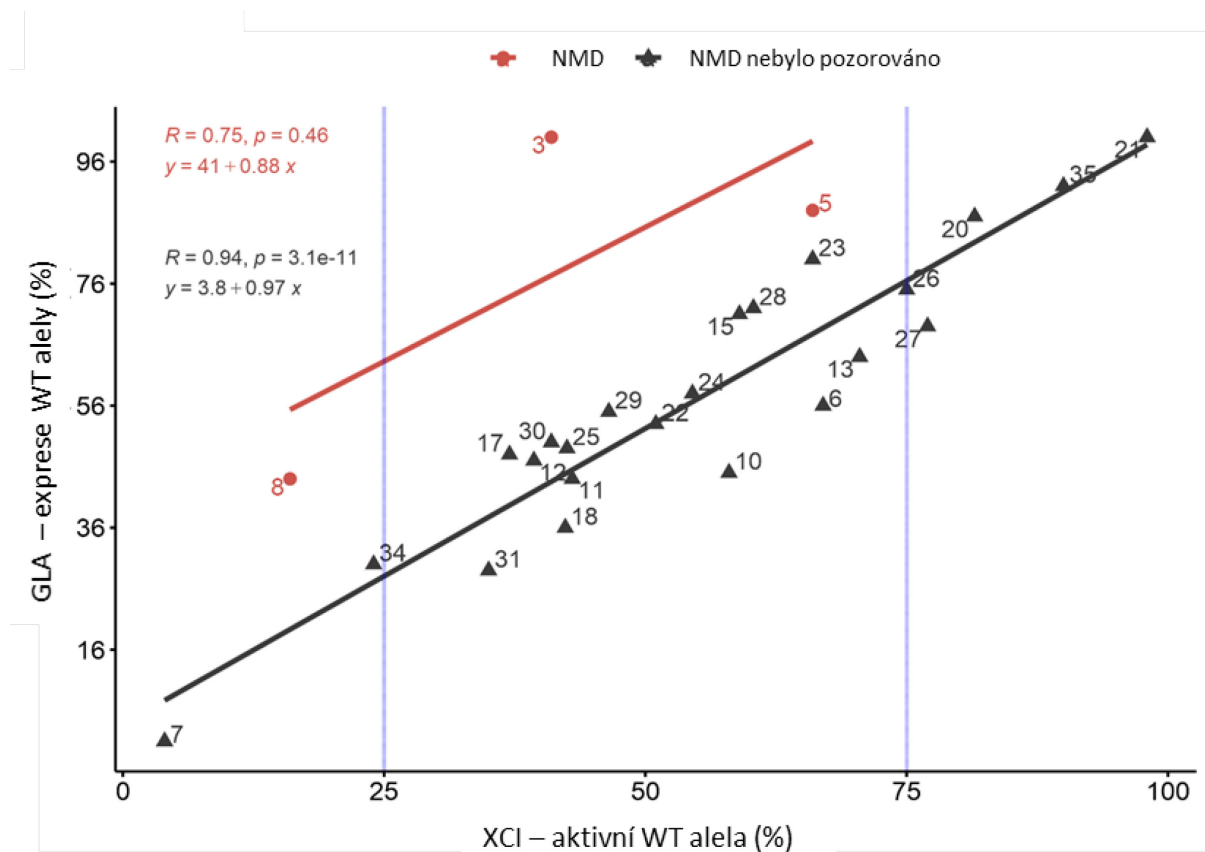


**Obrázek 22: Znáznornění jevu crossing – over detekovaného u pacientek 26, 34, 35 s Fabryho chorobou.** Segregace alel AR, RP2 s mutantní alelou genu *GLA* byly založeny na analýze probandů a/nebo rodinných příslušníků, specifikováno v poznámce k tabulce (Tabulka 20). Na ose X je znázorněn stav XCI v procentuálním zastoupení WT alely, Na ose Y je v procentech vynesena exprese WT alely genu *GLA*. Nekorigovaná data jsou znázorněna černými trojúhelníky, hodnota XCI WT alely je nepřímo úměrná expresi *GLA*. Korigovaná data ukazující přímou úměru jsou znázorněna červenými body. Svislé modré čerchované čáry vymezují hranici zešíkmení XCI (25:75) V grafu jsou vyneseny korelační koeficienty (R), statistická významnost (p) a rovnice lineární regrese.

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) (Tabulka 20). Tento výsledek ukazují

na stabilitu transkriptu u všech těchto uvedených mutací. Příklad výsledku analýzy u hypomorfni mutace (*GLA*: c.902G>A, p.Arg301Gln) je znázorněn na (Obrázek 21).

Rozdíly mezi stavem XCI a zastoupením mutované alely v transkriptu jsme pozorovali u tří pacientek nesoucích nulové mutace (Obrázek 24, Tabulka 20). 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 nálezn lze vysvětlit odbouráváním poškozené mRNA z mutovaných transkriptů mechanismem 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 (Tabulka 20).



**Obrázek 23: 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.

#### 4.3.1 Diskuze a závěr k třetímu cíli práce

Stěžejním přínosem práce věnované XCI u pacientek s Fabryho chorobou (Řeboun 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)

Jak jsme ukázali výše, 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.

Závěrem lze shrnout, že hodnocení XCI u pacientek s FD přineslo několik důležitých nových pohledů:

1) Výsledky metod založených na metylaci a ASE využitím pro hodnocení XCI spolu úzce korelují a mohou se doplňovat, protože používané sondy nemusí být plně informativní. Využití více testovaných lokusů umožňuje správnou identifikaci stavu XCI ve většině vzorků a minimalizuje potenciální chybu.

2) Správné hodnocení XCI u pacientek s FD může být ztíženo jevem crossing-over. Pro správnou interpretaci výsledků doporučujeme provést srovnávací expresní analýzu transkriptu GLA a/nebo měření zbytkové enzymové aktivity  $\alpha$ -gal.

3) Výsledek stanovení XCI může být ovlivněn typem tkáně, ve které jsou analýzy prováděny. Stav XCI se navíc může měnit s věkem pacientky.

**Tabulka 20: Genotypy genu GLA, aktivity enzymu  $\alpha$ -gal, stav inaktivace chromosomu X a transkripce genu GLA. Hodnoceno v leukocytech 35 žen nesoucích heterozygotní variantu pro Fabryho chorobu.**

Paci	Rodina	Mutace v genu GLA	Predikce varianty na proteinové úrovni	Věk	Enzymová aktivita (nmol/h/mg)	XCI: Metylační sondy (% wt/mut) (&)		XCI: Alelově specifická exprese (%)(&)		Exprese genu GLA (% wt/mut)	Reference
						AR	RP2	IDS	LAMP2		
<b>Nulové mutace</b>											
<b>1</b>	1	c.195-1692_369+754del	p.Ser65Argfs*7	72	11.0	NI	60/40	50/50	NI	NI	(Dobrovolny et al. 2005)
<b>2</b>				34	36.5	42/58	35/65	NI	NI	NI	
<b>3</b>	2	c.559_560delAT (\$)	p.Met187Valfs*6	62	39.8	36/64	46/54	NI	NI	<b>100/0</b>	(Nowak et al. 2018)
<b>4</b>	3	c.674_732del59	p.His225Leufs*5	72	16.5	52/48	51/49	62/38	NI	NI	(Dobrovolny et al. 2005)
<b>5</b>	4	c.881T>G (\$)	p.Leu294*	34	32.5	64/36	64/36	NI	70/30	<b>88/12</b>	(Blaydon et al. 2001)
<b>6</b>	5	c.1024C>T	p.Arg342*	24	49.0	65/35	69/31	60/40	74/26	56/44	(Davies et al. 1993)
<b>7</b>				52	0.5	5/95	NI	0/100	7/93	1/99	
<b>8</b>	6	c.1034dupT (\$)	p.Ser345Phefs*30	68	20.6	<b>18/82</b>	<b>14/86</b>	NI	NI	44/56	Nepublikováno
<b>Missense&amp;sestřihové mutace s vážným fenotypem</b>											
<b>9</b>	7	c.194+2T>C (r.194_195ins[194+1_194+14])	p.Ser65Argfs*61	32	32.5	NI	39/61	NI	NI	NI	(Dobrovolny et al. 2005)
<b>10</b>	8	c.277G>A	p.Asp93Asn	46	27.5	<b>80/20</b>	63/37	47/53	NI	45/55	(Shabbeer et al. 2005)
<b>11</b>	9	c.463G>C	p.Asp155His	63	34.8	44/56	41/59	NI	44/56	44/56	(Dobrovolny et al. 2005)
<b>12</b>				34	25.4	49/51	36/64	33/67	NI	47/53	
<b>13</b>	10	c.488G>T	p.Gly163Val	54	13.9	NI	<b>26/74</b>	67/33	NI	<b>64/36</b>	(Eng et al. 1997)
<b>14</b>	11	c.511G>C	p.Gly171Arg	59	17.9	51/49	NI	NI	NI	NA	(Dobrovolny et al. 2005)
<b>15</b>	12	c.551A>G	p.Tyr184Cys	60	25.9	37/63	55/45	NI	NI	71/29	Nepublikováno
<b>16</b>				50	39.9	30/70	NI	NI	NI	NA	
<b>17</b>	13	c.671A>C	p.Asn224Thr	60	14.1	NI	NI	37/63	NI	48/52	Nepublikováno
<b>18</b>				31	14.2	47/53	43/57	37/63	NI	36/64	
<b>19</b>	14	c.801+3A>G (r.801_802ins[801+1_801+36])	p.Leu268Valfs*4	56	8.6	NI	7/93	NI	NI	NI	(Shabbeer et al. 2006)
<b>20</b>	15	c.950T>C	p.Ile317Thr	55	32.2	<b>83/17</b>	<b>80/20</b>	NI	NI	<b>87/13</b>	(Shabbeer et al. 2002)
<b>21</b>	16#	c.1025G>A	p.Arg342Gln	70	57.4	NI	<b>97/3</b>	NI	99/1	<b>100/0</b>	(Ploos van Amstel et al. 1994; Lukas et al. 2013)
<b>22</b>				37	31.2	NI	NI	NI	51/49	53/47	

<b>23</b>	17#	c.1025G>A	p.Arg342Gln	27	26.6	66/34	NI	NI	NI	<b>80/20</b>	(Ploos van Amstel et al. 1994)
<b>24</b>	18	c.1078G>A	p.Gly360Ser	49	31.6	56/44	NI	53/47	NI	58/42	(Dobrovlny et al. 2005)
<b>25</b>				38	26.2	NI	NI	48/52	37/63	49/51	
<b>26</b>	19	c.1085C>T	p.Pro362Leu	67	NA	<b>21/79 (‡)</b>	<b>22/78 (‡)</b>	68/32	NI	<b>75/25(‡)</b>	(Shabbeer et al. 2002)
<b>27</b>				59	34.7	NI	NI	77/23	77/23	69/31	
<b>Missense&amp;sestřihové hypomorfni mutace</b>											
<b>28</b>				59	29.2	NI	65/35	64/36	52/48	72/28	
<b>29</b>	20	c.644A>G	p.Asn215Ser	69	27.8	43/57	NI	50/50	NI	55/45	(Davies et al. 1993; Lukas et al. 2013)
<b>30</b>				66	30.3	41/59	NI	NI	NI	50/50	
<b>31</b>				68	23.9	NI	NI	35/65	NI	29/71	
<b>32</b>	21	c.801+48T>G	p.Leu268Valfs*4	36	31.7	59/41	NI	NI	NI	NI	(Palecek et al. 2014)
<b>33</b>		(r.801_802ins[801+1_801+66])		70	56.6	64/36	NI	NI	NI	NI	
<b>34</b>	22	c.902G>A	p.Arg301Gln	72	13.9	<b>76/24 (‡)</b>	NI	NI	NI	<b>30/70(‡)</b>	(Lukas et al. 2013; Sakuraba et al. 1990)
<b>35</b>				26	32.1	<b>9/91 (‡)</b>	NI	89/11	NI	<b>92/8(‡)</b>	

Pacientky 8, 15, 17, 24, 25, 34 představují probandky – první případy popsáné v rodině. NA - vzorek nebyl k dispozici pro analýzu; NI – neinformativní lokus pro analýzu XCI nebo pro tento typ mutace *GLA* není možné zavedenou metodou analyzovat expresi - V případě metylačních sond a exprese *GLA* je zešíkmení XCI znázorněno tučným zvýrazněním WT alely. Pacientky, u kterých byl detekován crossing-over mezi metylační sondou a genem *GLA*, jsou podbarveny šedě s (‡). Symbol (\$) značí nestabilitu mRNA (NMD). (#) Rodiny 16 a 17 mají stejnou mutaci bez prokázané příbuznosti. (&) Segregace alel AR a RP2 oproti mutantní alele *GLA* byla založena na analýze probanda a/nebo jiných členů rodiny. Rodinné vztahy mezi probandy a pacientkami s posunem XCI jsou: Pacientka 20: Sestra hemizygotního pacienta. Pacientka 21: Teta z matčiny strany hemizygotního probanda. Pacientka 26: Matka pacientky 27 a teta pacientky 25 (z matčiny strany). Pacientka 34: Matka hemizygotního pacienta. Pacientka 35: Neteř pacientky 34 a sestřenice hemizygotního pacienta. Segregace alel *IDS* a *LAMP2* byla odvozena z exprese *GLA*. Hodnoty aktivit  $\alpha$ -gal naměřené v leukocytech 477 kontrol v letech 2003 -2020 byly v rozmezí 24,8 – 103,0 nmol.mg-1.h-1, průměr 59,7 nmol.mg-1.h-1, SD 14,6, medián 58,7 nmol .mg-1.h-1



## 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 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 disertační práce

**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/ccm-2016-0715](https://doi.org/10.1515/ccm-2016-0715) **IF 3.556**

MUSALKOVA, Dita, Eva STICOVA, **Martin REBOUN**, Jitka SOKOLOVA, Jakub KRIJT, Jitka HONZIKOVA, Jiri GURKA, Magdalena NEROLDLOVA, 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

1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, G. R. ABECASIS, D. ALTSHULER, A. AUTON, L. D. BROOKS, R. M. DURBIN, R. A. GIBBS, M. E. HURLES a G. A. MCVEAN, 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* [online]. **467**(7319), 1061–1073. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature09534

1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, Goncalo R. ABECASIS, Adam AUTON, Lisa D. BROOKS, Mark A. DEPRISTO, Richard M. DURBIN, Robert E. HANDSAKER, Hyun Min KANG, Gabor T. MARTH a Gil A. MCVEAN, 2012. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* [online]. **491**(7422), 56–65. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature11632

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

ALCÁNTARA-ORTIGOZA, M.a., B. GARCÍA-DE TERESA, A. GONZÁLEZ-DEL ANGEL, J. BERUMEN, M. GUARDADO-ESTRADA, L. FERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J.i. NAVARRETE-MARTÍNEZ, M. MAZA-MORALES a R. RIUS-DOMÍNGUEZ, 2016. Wide allelic heterogeneity with predominance of large IDS gene complex rearrangements in a sample of Mexican patients with Hunter syndrome. *Clinical Genetics* [online]. **89**(5), 574–583. ISSN 1399-0004. Dostupné z: doi:10.1111/cge.12738

ALLEN, R. C., H. Y. ZOGHBI, A. B. MOSELEY, H. M. ROSENBLATT a J. W. BELMONT, 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *American Journal of Human Genetics*. **51**(6), 1229–1239. ISSN 0002-9297.

AMOS-LANDGRAF, James M., Amy COTTLE, Robert M. PLENGE, Mike FRIEZ, Charles E. SCHWARTZ, John LONGSHORE a Huntington F. WILLARD, 2006. X Chromosome–Inactivation Patterns of 1,005 Phenotypically Unaffected Females. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **79**(3), 493–499. ISSN 0002-9297. Dostupné z: doi:10.1086/507565

Anon., 2015. SeqCap EZ Choice. *SeqCap EZ Library SR Users Guide v5.1 Aug 2015.pdf* [online] [vid. 2015-11-11]. Dostupné z: <http://sequencing.rocke.com/products/nimblegen-seqcap-target-enrichment/seqcap-ez-system/seqcap-ez-choice.html>

ARAD, Michael, Barry J. MARON, Joshua M. GORHAM, Walter H. JOHNSON, J. Philip SAUL, Antonio R. PEREZ-ATAYDE, Paolo SPIRITO, Gregory B. WRIGHT, Ronald J. KANTER, Christine E. SEIDMAN a J. G. SEIDMAN, 2005. Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* [online]. **352**(4), 362–372. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa033349

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

BACHTROG, Doris, 2013. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nature Reviews. Genetics* [online]. **14**(2), 113–124. ISSN 1471-0064. Dostupné z: doi:10.1038/nrg3366

BAJAJ, Lakshya, Parisa LOTFI, Rituraj PAL, Alberto DIRONZA, Jaiprakash SHARMA a Marco SARDIELLO, 2019. Lysosome biogenesis in health and disease. *Journal of neurochemistry* [online]. **148**(5), 573–589. ISSN 0022-3042. Dostupné z: doi:10.1111/jnc.14564

BALLABIO, Andrea a Juan S. BONIFACINO, 2020. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **21**(2), 101–118. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/s41580-019-0185-4

BALLESTER, Leomar Y., Rajyalakshmi LUTHRA, Rashmi KANAGAL-SHAMANNA a Rajesh R. SINGH, 2016. Advances in clinical next-generation sequencing: target enrichment and sequencing technologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. **16**(3), 357–372. ISSN 1744-8352. Dostupné z: doi:10.1586/14737159.2016.1133298

BANDYOPADHYAY, Urmil, Susmita KAUSHIK, Lyuba VARTICOVSKI a Ana Maria CUERVO, 2008. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **28**(18), 5747–5763. ISSN 1098-5549. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.02070-07

BEEVER, Christy, Betty P. Y. LAI, Sarah E. L. BALDRY, Maria S. PEÑAHERRERA, Ruby JIANG, Wendy P. ROBINSON a Carolyn J. BROWN, 2003. Methylation of ZNF261 as an assay for determining X chromosome inactivation patterns. *American Journal of Medical Genetics. Part A* [online]. **120A**(3), 439–441. ISSN 1552-4825. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.a.20045

BEHJATI, Sam a Patrick S. TARPEY, 2013. What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition* [online]. **98**(6), 236–238. ISSN 1743-0593. Dostupné z: doi:10.1136/archdischild-2013-304340

BERTELSEN, Birgitte, Zeynep TÜMER a Kirstine RAVN, 2011. Three new loci for determining x chromosome inactivation patterns. *The Journal of molecular diagnostics: JMD* [online]. **13**(5), 537–540. ISSN 1943-7811. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmoldx.2011.05.003

BITTEL, D. C., M. F. THEODORO, N. KIBIRYEVA, W. FISCHER, Z. TALEBIZADEH a M. G. BUTLER, 2008. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. *Journal of Medical Genetics* [online]. **45**(5), 309–313. ISSN 1468-6244. Dostupné z: doi:10.1136/jmg.2007.055244

BLAYDON, D., J. HILL a B. WINCHESTER, 2001. Fabry disease: 20 novel GLA mutations in 35 families. *Human Mutation* [online]. **18**(5), 459. ISSN 1098-1004. Dostupné z: doi:10.1002/humu.1219

BOLGER, Anthony M., Marc LOHSE a Bjoern USADEL, 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)* [online]. **30**(15), 2114–2120. ISSN 1367-4811. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btu170

BOUCEK, Dana, Jean JIRIKOWIC a Matthew TAYLOR, 2011. Natural history of Danon disease. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* [online]. **13**(6), 563–568. ISSN 1530-0366. Dostupné z: doi:10.1097/GIM.0b013e31820ad795

BOYD, Y. a N. J. FRASER, 1990. Methylation patterns at the hypervariable X-chromosome locus DXS255 (M27 beta): correlation with X-inactivation status. *Genomics* [online]. **7**(2), 182–187. ISSN 0888-7543. Dostupné z: doi:10.1016/0888-7543(90)90539-7

BRADY, Roscoe O., Andrew E. GAL, Roy M. BRADLEY, Erik MARTENSSON, Andrew L. WARSHAW a Leonard LASTER, 1967. Enzymatic Defect in Fabry's Disease. *New England Journal of Medicine* [online]. **276**(21), 1163–1167. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM196705252762101

BRAMBATTI, Michela, Oren CASPI, Alessandro MAOLO, Elliott KOSHI, Barry GREENBERG, Matthew R. G. TAYLOR a Eric D. ADLER, 2019. Danon disease: Gender differences in presentation and outcomes. *International Journal of Cardiology* [online]. **286**, 92–98. ISSN 1874-1754. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijcard.2019.01.020

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

BUNGE, S., M. RATHMANN, C. STEGLICH, M. L. BONDESON, A. TYLKI-SZYMANSKA, E. POPOWSKA a A. GAL, 1998. Homologous nonallelic recombinations between the iduronate-sulfatase gene and pseudogene cause various intragenic deletions and inversions in patients with mucopolysaccharidosis type II. *European journal of human genetics: EJHG* [online]. **6**(5), 492–500. ISSN 1018-4813. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ejhg.5200213

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

BUSQUE, L., R. MIO, J. MATTIOLI, E. BRAIS, N. BLAIS, Y. LALONDE, M. MARAGH a D. G. GILLILAND, 1996. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood*. **88**(1), 59–65. ISSN 0006-4971.

BUSQUE, Lambert, Yves PAQUETTE, Sylvie PROVOST, Denis-Claude ROY, Ross L. LEVINE, Luigina MOLLICA a D. Gary GILLILAND, 2009. Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies. *Blood* [online]. **113**(15), 3472–3474. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2008-12-195677

CARREL, L. a H. F. WILLARD, 1996. An assay for X inactivation based on differential methylation at the fragile X locus, FMR1. *American Journal of Medical Genetics* [online]. **64**(1), 27–30. ISSN 0148-7299. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19960712)64:1<27::AID-AJMG3>3.0.CO;2-O

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

CARTER, Nigel P, 2007. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nature genetics* [online]. **39**(7 Suppl), S16–S21. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng2028

CENACCHI, G., V. PAPA, V. PEGORARO, R. MAROZZO, M. FANIN a C. ANGELINI, 2020. Review: Danon disease: Review of natural history and recent advances. *Neuropathology and Applied Neurobiology* [online]. **46**(4), 303–322. ISSN 0305-1846, 1365-2990. Dostupné z: doi:10.1111/nan.12587

CERASE, Andrea, Greta PINTACUDA, Anna TATTERMUSCH a Philip AVNER, 2015. Xist localization and function: new insights from multiple levels. *Genome Biology* [online]. **16**, 166. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi:10.1186/s13059-015-0733-y

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

CUDRY, S., I. TIGAUD, R. FROISSART, V. BONNET, I. MAIRE a D. BOZON, 2000. MPS II in females: molecular basis of two different cases. *Journal of Medical Genetics*. **37**(10), E29. ISSN 1468-6244.

DANON, M. J., S. J. OH, S. DIMAURO, J. R. MANALIGOD, A. EASTWOOD, S. NAIDU a L. H. SCHLISELFELD, 1981. Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* [online]. **31**(1), 51–57. ISSN 0028-3878. Dostupné z: doi:10.1212/wnl.31.1.51

D'AVANZO, Francesca, Laura RIGON, Alessandra ZANETTI a Rosella TOMANIN, 2020. Mucopolysaccharidosis Type II: One Hundred Years of Research, Diagnosis, and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(4). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21041258

DAVIES, J. P., B. G. WINCHESTER a S. MALCOLM, 1993. Mutation analysis in patients with the typical form of Anderson-Fabry disease. *Human Molecular Genetics* [online]. **2**(7), 1051–1053. ISSN 0964-6906. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/2.7.1051

DE DUVE, C. a P. BAUDHUIN, 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews* [online]. **46**(2), 323–357. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.1966.46.2.323

DE LEENEER, Kim, Jan HELLEMANS, Wouter STEYAERT, Steve LEFEVER, Inge VEREECKE, Eveline DEBALS, Brecht CROMBEZ, Machteld BAETENS, Mattias VAN HEETVELDE, Frauke COPPIETERS, Jo VANDESOMPELE, Annelies DE JAEGHER, Elfride DE BAERE, Paul COUCKE a Kathleen CLAES, 2015. Flexible, Scalable, and Efficient Targeted Resequencing on a Benchtop Sequencer for Variant Detection in Clinical Practice. *Human Mutation* [online]. **36**(3), 379–387. ISSN 1098-1004. Dostupné z: doi:10.1002/humu.22739

DE CAMARGO PINTO, Louise Lapagesse, Sharbel Weidner MALUF, Sandra LEISTNER-SEGAL, Camila ZIMMER DA SILVA, Ana BRUSIUS-FACCHIN, Maira Graef BURIN, Silvia BRUSTOLIN, Juan LLERENA, Lucia MORAES, Leonardo VEDOLIN, Alice SCHUCH, Roberto GIUGLIANI a Ida Vanessa Doederlein SCHWARTZ, 2011. Are MPS II heterozygotes actually asymptomatic? A study based on clinical and biochemical data, X-inactivation analysis and imaging evaluations. *American Journal of Medical Genetics. Part A* [online]. **155A**(1), 50–57. ISSN 1552-4833. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.a.33770

DE DUVE, C., B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX a F. APPELMANS, 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue\*. *Biochemical Journal* [online]. **60**(4), 604–617. ISSN 0006-2936. Dostupné z: doi:10.1042/bj0600604

DEMYDCHUK, Mykhaylo, Chris H. HILL, Aiwu ZHOU, Gábor BUNKÓCZI, Penelope E. STEIN, Denis MARCHESAN, Janet E. DEANE a Randy J. READ, 2017. Insights into Hunter syndrome from the structure of iduronate-2-sulfatase. *Nature Communications* [online]. **8**, 15786. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms15786

DE SENA BRANDINE, Guilherme a Andrew D. SMITH, 2019. Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Research* [online]. **8**, 1874. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.21142.2

DOBROVOLNY, Robert, Lenka DVORAKOVA, Jana LEDVINOVA, Sudheera MAGAGE, Jan BULTAS, Jean C. LUBANDA, Milan ELLEDER, Debora KARETOVA, Marketa PAVLIKOVA a Martin HREBICEK, 2005. Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the  $\alpha$ -galactosidase A gene in the Czech and Slovak population. *Journal of Molecular Medicine* [online]. **83**(8), 647–654. ISSN 1432-1440. Dostupné z: doi:10.1007/s00109-005-0656-2



DOBROVOLNÝ, Robert, Lenka DVOŘÁKOVÁ, Jana LEDVINOVÁ, Sudheera MAGAGE, Jan BULTAS, Jean C. LUBANDA, Helena POUPĚTOVÁ, Milan ELLEDER, Debora KARETOVÁ a Martin HŘEBÍČEK, 2005. Recurrence of Fabry disease as a result of paternal germline mosaicism for  $\alpha$ -galactosidase a gene mutation. *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. **134A**(1), 84–87. ISSN 1552-4833. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.a.30533

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

ECHEVARRIA, L., K. BENISTAN, A. TOUSSAINT, O. DUBOURG, A. A. HAGEGE, D. ELADARI, F. JABBOUR, C. BELDJORD, P. DE MAZANCOURT a D. P. GERMAIN, 2016. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clinical Genetics* [online]. **89**(1), 44–54. ISSN 1399-0004. Dostupné z: doi:10.1111/cge.12613

EL DIB, Regina, Huda GOMAA, Raíssa Pierri CARVALHO, Samira E. CAMARGO, Rodrigo BAZAN, Pasqual BARRETTI a Fellype C. BARRETO, 2016. Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. **7**, CD006663. ISSN 1469-493X. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD006663.pub4

ELSTEIN, Deborah, Ella SCHACHAMOROV, Rachel BEERI a Gheona ALTARESCU, 2012. X-inactivation in Fabry disease. *Gene* [online]. **505**(2), 266–268. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2012.06.013

ENG, C. M., G. A. ASHLEY, T. S. BURGERT, A. L. ENRIQUEZ, M. D'SOUZA a R. J. DESNICK, 1997. Fabry disease: thirty-five mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with classic and variant phenotypes. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*. **3**(3), 174–182. ISSN 1076-1551.

ENGREITZ, Jesse M., Amy PANDYA-JONES, Patrick MCDONEL, Alexander SHISHKIN, Klara SIROKMAN, Christine SURKA, Sabah KADRI, Jeffrey XING, Alon GOREN, Eric S. LANDER, Kathrin PLATH a Mitchell GUTTMAN, 2013. The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **341**(6147), 1237973. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1237973

ESKELINEN, Eeva-Liisa, 2005. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* [online]. **1**(1), 1–10. ISSN 1554-8627. Dostupné z: doi:10.4161/auto.1.1.1270

FABRY, Joh, 1898. Ein Beitrag zur Kenntniss der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Archiv für Dermatologie und Syphilis* [online]. **43**(1), 187–200. ISSN 1432-069X. Dostupné z: doi:10.1007/BF01986897

FANIN, Marina, Anna C. NASCIMBENI, Luigi FULIZIO, Marco SPINAZZI, Paola MELACINI a Corrado ANGELINI, 2006. Generalized lysosome-associated membrane protein-2

defect explains multisystem clinical involvement and allows leukocyte diagnostic screening in Danon disease. *The American Journal of Pathology* [online]. **168**(4), 1309–1320. ISSN 0002-9440. Dostupné z: doi:10.2353/ajpath.2006.050646

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

FEY, M. F., S. LIECHTI-GALLATI, A. VON ROHR, B. BORISCH, L. THEILKÄS, V. SCHNEIDER, M. OESTREICHER, S. NAGEL, A. ZIEMIECKI a A. TOBLER, 1994. Clonality and X-inactivation patterns in hematopoietic cell populations detected by the highly informative M27 beta DNA probe. *Blood*. **83**(4), 931–938. ISSN 0006-4971.

FROISSART, R., I. MAIRE, V. BONNET, T. LEVADE a D. BOZON, 1997. Germline and somatic mosaicism in a female carrier of Hunter disease. *Journal of Medical Genetics* [online]. **34**(2), 137–140. ISSN 0022-2593. Dostupné z: doi:10.1136/jmg.34.2.137

FROISSART, R., G. MILLAT, M. MATHIEU, D. BOZON a I. MAIRE, 1995. Processing of iduronate 2-sulphatase in human fibroblasts. *The Biochemical Journal* [online]. **309** ( Pt 2), 425–430. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj3090425

FROISSART, Roseline, Isabel Moreira DA SILVA a Irène MAIRE, 2007. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)* [online]. **96**(455), 71–77. ISSN 1651-2227. Dostupné z: doi:10.1111/j.1651-2227.2007.00213.x

FROISSART, Roseline, Irène MAIRE, Gilles MILLAT, Stéphane CUDRY, Anne-Marie BIROT, Véronique BONNET, Olivier BOUTON a Dominique BOZON, 1998. Identification of iduronate sulfatase gene alterations in 70 unrelated Hunter patients. *Clinical Genetics* [online]. **53**(5), 362–368. ISSN 1399-0004. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0004.1998.tb02746.x

FU, Lijun, Sushan LUO, Shuang CAI, Wenjing HONG, Ying GUO, Jinjin WU, Tingliang LIU, Chongbo ZHAO, Fen LI, Huimin HUANG, Meirong HUANG a Jian WANG, 2016. Identification of LAMP2 Mutations in Early-Onset Danon Disease With Hypertrophic Cardiomyopathy by Targeted Next-Generation Sequencing. *The American Journal of Cardiology* [online]. **118**(6), 888–894. ISSN 1879-1913. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjcard.2016.06.037

FUJIWARA, Yuuki, Akiko FURUTA, Hisae KIKUCHI, Shu AIZAWA, Yusuke HATANAKA, Chiho KONYA, Kenko UCHIDA, Aya YOSHIMURA, Yoshitaka TAMAI, Keiji WADA a Tomohiro KABUTA, 2013a. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* [online]. **9**(3), 403–409. ISSN 1554-8635. Dostupné z: doi:10.4161/auto.23002

FUJIWARA, Yuuki, Hisae KIKUCHI, Shu AIZAWA, Akiko FURUTA, Yusuke HATANAKA, Chiho KONYA, Kenko UCHIDA, Keiji WADA a Tomohiro KABUTA, 2013b. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy* [online]. **9**(8), 1167–1171. ISSN 1554-8635. Dostupné z: doi:10.4161/auto.24880

GALE, R. E., A. K. FIELDING, C. N. HARRISON a D. C. LINCH, 1997. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *British Journal of Haematology* [online]. **98**(3), 512–519. ISSN 0007-1048. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2141.1997.2573078.x

GERMAIN, Dominique P., 2010. Fabry disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **5**(1), 30. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/1750-1172-5-30

GHEZZI, Daniele, Irina SEVRIUKOVA, Federica INVERNIZZI, Costanza LAMPERTI, Marina MORA, Pio D'ADAMO, Francesca NOVARA, Orsetta ZUFFARDI, Graziella UZIEL a Massimo ZEVIANI, 2010. Severe X-linked mitochondrial encephalomyopathy associated with a mutation in apoptosis-inducing factor. *American Journal of Human Genetics* [online]. **86**(4), 639–649. ISSN 1537-6605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajhg.2010.03.002

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.

GURKA, Jiri, Lenka PIHEROVA, Filip MAJER, Anna CHALOUPKA, Daniela ZAKOVA, Ondrej PELAK, Alice KREBSOVA, Petr PEICHL, Jan KREJCI, Tomas FREIBERGER, Vojtech MELENOVSKY, Josef KAUTZNER, Tomas KALINA, Jakub SIKORA a Milos KUBANEK, 2020. Danon disease is an underdiagnosed cause of advanced heart failure in young female patients: a LAMP2 flow cytometric study. *ESC heart failure* [online]. **7**(5), 2534–2543. ISSN 2055-5822. Dostupné z: doi:10.1002/ehf2.12823

HARISMENDY, Olivier a Kelly FRAZER, 2009. Method for improving sequence coverage uniformity of targeted genomic intervals amplified by LR-PCR using Illumina GA sequencing-by-synthesis technology. *BioTechniques* [online]. **46**(3), 229–231. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/000113082

HASE, Katsunori, Yuuki FUJIWARA, Hisae KIKUCHI, Shu AIZAWA, Fumihiko HAKUNO, Shin-Ichiro TAKAHASHI, Keiji WADA a Tomohiro KABUTA, 2015. RNautophagy/DNautophagy possesses selectivity for RNA/DNA substrates. *Nucleic Acids Research* [online]. **43**(13), 6439–6449. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkv579

HATAKEYAMA, C., C. L. ANDERSON, C. L. BEEVER, M. S. PEÑAHERRERA, C. J. BROWN a W. P. ROBINSON, 2004. The dynamics of X-inactivation skewing as women age. *Clinical Genetics* [online]. **66**(4), 327–332. ISSN 0009-9163. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0004.2004.00310.x

HAYASHI, Takeharu, Kousuke TANIMOTO, Kayoko HIRAYAMA-YAMADA, Etsuko TSUDA, Mamoru AYUSAWA, Shinichi NUNODA, Akira HOSAKI a Akinori KIMURA, 2018. Genetic background of Japanese patients with pediatric hypertrophic and restrictive cardiomyopathy. *Journal of Human Genetics* [online]. **63**(9), 989–996. ISSN 1435-232X. Dostupné z: doi:10.1038/s10038-018-0479-y

HE, J., Y. WANG a T. JIANG, 2014. Danon disease. A novel mutation in the LAMP-2 gene and ophthalmic abnormality. *Herz* [online]. **39**(7), 877–879. ISSN 1615-6692. Dostupné z: doi:10.1007/s00059-013-3900-5

HEDBERG OLDFORS, Carola, Gyöngyvér MÁTHÉ, Kate THOMSON, Mar TULINIUS, Kristjan KARASON, Ingegerd ÖSTMAN-SMITH a Anders OLDFORS, 2015. Early onset cardiomyopathy in females with Danon disease. *Neuromuscular disorders: NMD* [online]. **25**(6), 493–501. ISSN 1873-2364. Dostupné z: doi:10.1016/j.nmd.2015.03.005

HOON, Bas de, Kim MONKHORST, Peter RIEGMAN, Joop S. E. LAVEN a Joost GRIBNAU, 2015. Buccal swab as a reliable predictor for X inactivation ratio in inaccessible tissues. *Journal of Medical Genetics* [online]. **52**(11), 784–790. ISSN, 1468-6244. Dostupné z: doi:10.1136/jmedgenet-2015-103194

HOSSAIN, Mohammad Arif, Chen WU, Hiroko YANAGISAWA, Takashi MIYAJIMA, Keiko AKIYAMA a Yoshikatsu ETO, 2019. Future clinical and biochemical predictions of Fabry disease in females by methylation studies of the GLA gene. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* [online]. **20** [vid. 2019-11-02]. ISSN 2214-4269. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgmr.2019.100497

HOSSAIN, Mohammad Arif, Hiroko YANAGISAWA, Takashi MIYAJIMA, Chen WU, Ayumi TAKAMURA, Keiko AKIYAMA, Rina ITAGAKI, Kaoru ETO, Takeo IWAMOTO, Takayuki YOKOI, Kenji KUROSAWA, Hironao NUMABE a Yoshikatsu ETO, 2017. The severe clinical phenotype for a heterozygous Fabry female patient correlates to the methylation of non-mutated allele associated with chromosome 10q26 deletion syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **120**(3), 173–179. ISSN 10967192. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2017.01.002

CHARRON, P., E. VILLARD, P. SÉBILLON, P. LAFORÊT, T. MAISONOBE, L. DUBOSCQ-BIDOT, N. ROMERO, V. DROUIN-GARRAUD, T. FRÉBOURG, P. RICHARD, B. EYMARD a M. KOMAJDA, 2004. Danon's disease as a cause of hypertrophic cardiomyopathy: a systematic survey. *Heart (British Cardiac Society)* [online]. **90**(8), 842–846. ISSN 1468-201X. Dostupné z: doi:10.1136/hrt.2003.029504

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

CHEN, Xiaoyu, Ole SCHULZ-TRIEGLAFF, Richard SHAW, Bret BARNES, Felix SCHLESINGER, Morten KÄLLBERG, Anthony J. COX, Semyon KRUGLYAK a Christopher T. SAUNDERS, 2016. Manta: rapid detection of structural variants and indels for germline and cancer sequencing applications. *Bioinformatics (Oxford, England)* [online]. **32**(8), 1220–1222. ISSN 1367-4811. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btv710

CHENG, Zhongwei, Quancai CUI, Zhuang TIAN, Hongzhi XIE, Lianfeng CHEN, Ligang FANG, Kongbo ZHU a Quan FANG, 2012. Danon disease as a cause of concentric left

ventricular hypertrophy in patients who underwent endomyocardial biopsy. *European Heart Journal* [online]. **33**(5), 649–656. ISSN 1522-9645. Dostępne z: doi:10.1093/eurheartj/ehr420

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* [online]. **431**(7011), 931–945. ISSN 1476-4687. Dostępne z: doi:10.1038/nature03001

JIANG, Baichun, Wei ZHAO, Jupeng YUAN, Yanyan QIAN, Wenjie SUN, Yongxin ZOU, Chenhong GUO, Bingxi CHEN, Changshun SHAO a Yaoqin GONG, 2012. Lack of Cul4b, an E3 ubiquitin ligase component, leads to embryonic lethality and abnormal placental development. *PloS One* [online]. **7**(5), e37070. ISSN 1932-6203. Dostępne z: doi:10.1371/journal.pone.0037070

JUCHNIEWICZ, Patrycja, Anna KŁOSKA, Anna TYLKI-SZYMAŃSKA, Joanna JAKÓBKIEWICZ-BANECKA, Grzegorz WĘGRZYN, Marta MOSKOT, Magdalena GABIG-CIMIŃSKA a Ewa PIOTROWSKA, 2018. Female Fabry disease patients and X-chromosome inactivation. *Gene* [online]. **641**, 259–264. ISSN 0378-1119. Dostępne z: doi:10.1016/j.gene.2017.10.064

JUCHNIEWICZ, Patrycja, Ewa PIOTROWSKA, Anna KŁOSKA, Magdalena PODLACHA, Jagoda MANTEJ, Grzegorz WĘGRZYN, Stefan TUKAJ a Joanna JAKÓBKIEWICZ-BANECKA, 2021. Dosage Compensation in Females with X-Linked Metabolic Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(9), 4514. ISSN 1422-0067. Dostępne z: doi:10.3390/ijms22094514

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. Dostępne z: doi:10.1002/ajmg.a.34415

KARCZEWSKI, Konrad J., Laurent C. FRANCIOLI, Grace TIAO, Beryl B. CUMMINGS, Jessica ALFÖLDI, Qingbo WANG, Ryan L. COLLINS, Kristen M. LARICCHIA, Andrea GANNA, Daniel P. BIRNBAUM, Laura D. GAUTHIER, Harrison BRAND, Matthew SOLOMONSON, Nicholas A. WATTS, Daniel RHODES, Moriel SINGER-BERK, Eleina M. ENGLAND, Eleanor G. SEABY, Jack A. KOSMICKI, Raymond K. WALTERS, Katherine TASHMAN, Yossi FARJOUN, Eric BANKS, Timothy POTERBA, Arcturus WANG, Cotton SEED, Nicola WHIFFIN, Jessica X. CHONG, Kaitlin E. SAMOCHA, Emma PIERCE-HOFFMAN, Zachary ZAPPALA, Anne H. O'DONNELL-LURIA, Eric Vallabh MINIKEL, Ben WEISBURD, Monkol LEK, James S. WARE, Christopher VITTAL, Irina M. ARMEAN, Louis BERGELSON, Kristian CIBULSKIS, Kristen M. CONNOLLY, Miguel COVARRUBIAS, Stacey DONNELLY, Steven FERRIERA, Stacey GABRIEL, Jeff GENTRY, Namrata GUPTA, Thibault JEANDET, Diane KAPLAN, Christopher LLANWARNE, Ruchi MUNSHI, Sam NOVOD, Nikelle PETRILLO, David ROAZEN, Valentin RUANO-RUBIO, Andrea SALTZMAN, Molly SCHLEICHER, Jose SOTO, Kathleen TIBBETTS, Charlotte TOLONEN, Gordon WADE, Michael E. TALKOWSKI, Benjamin M. NEALE, Mark J. DALY a Daniel G. MACARTHUR, 2020. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456

humans. *Nature* [online]. **581**(7809), 434–443. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2308-7

KLOSKA, A., J. JAKÓBKIEWICZ-BANECKA, A. TYLKI-SZYMAŃSKA, B. CZARTORYSKA a G. WĘGRZYN, 2011. Female Hunter syndrome caused by a single mutation and familial XCI skewing: implications for other X-linked disorders. *Clinical Genetics* [online]. **80**(5), 459–465. ISSN 1399-0004. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01574.x

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

KORNREICH, R., D. F. BISHOP a R. J. DESNICK, 1989. The gene encoding alpha-galactosidase A and gene rearrangements causing Fabry disease. *Transactions of the Association of American Physicians*. **102**, 30–43. ISSN 0066-9458.

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

KUBOTA, T., S. NONOYAMA, H. TONOKI, M. MASUNO, K. IMAIZUMI, M. KOJIMA, K. WAKUI, M. SHIMADZU a Y. FUKUSHIMA, 1999. A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. *Human Genetics*. **104**(1), 49–55. ISSN 0340-6717.

LANDRUM, Melissa J., Shanmuga CHITIPIRALLA, Garth R. BROWN, Chao CHEN, Baoshan GU, Jennifer HART, Douglas HOFFMAN, Wonhee JANG, Kuljeet KAUR, Chunlei LIU, Vitaly LYOSHIN, Zenith MADDIPATLA, Rama MAITI, Joseph MITCHELL, Nuala O'LEARY, George R. RILEY, Wenyao SHI, George ZHOU, Valerie SCHNEIDER, Donna MAGLOTT, J. Bradley HOLMES a Brandi L. KATTMAN, 2020. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Research* [online]. **48**(D1), D835–D844. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkz972

LANGMEAD, Ben, Cole TRAPNELL, Mihai POP a Steven L. SALZBERG, 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* [online]. **10**(3), R25. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25

LENDERS, Malte a Eva BRAND, 2021. Precision medicine in Fabry disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* [online]. **36**(Suppl 2), 14–23. ISSN 1460-2385. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfab038

LENDERS, Malte, Julia B. HENNERMANN, Christine KURSCHAT, Arndt ROLFS, Sima CANAAN-KÜHL, Claudia SOMMER, Nurcan ÜÇEYLER, Christoph KAMPMANN, Nesrin KARABUL, Anne-Katrin GIESE, Thomas DUNING, Jörg STYPMANN, Johannes KRÄMER, Frank WEIDEMANN, Stefan-Martin BRAND, Christoph WANNER a Eva BRAND, 2016. Multicenter Female Fabry Study (MFFS) - clinical survey on current treatment of females with Fabry disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **11** [vid. 2020-03-01]. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/s13023-016-0473-4

LI, Heng, 2012. Exploring single-sample SNP and INDEL calling with whole-genome de novo assembly. *Bioinformatics (Oxford, England)* [online]. **28**(14), 1838–1844. ISSN 1367-4811. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bts280

LIDOVE, Olivier, Roland JAUSSAUD a Sélim ARACTINGI, 2006. Dermatological and soft-tissue manifestations of Fabry disease: characteristics and response to enzyme replacement therapy. In: Atul MEHTA, Michael BECK a Gere SUNDER-PLASSMANN, ed. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS* [online]. Oxford: Oxford PharmaGenesis [vid. 2020-09-04]. ISBN 978-1-903539-03-3. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11605/>

LIN, Hsiang-Yu, Kah-Wai CHONG, Ju-Hui HSU, Hsiao-Chi YU, Chun-Che SHIH, Cheng-Hung HUANG, Shing-Jong LIN, Chen-Huan CHEN, Chuan-Chi CHIANG, Huey-Jane HO, Pi-Chang LEE, Chuan-Hong KAO, Kang-Hsiang CHENG, Chuen HSUEH a Dau-Ming NIU, 2009. High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circulation. Cardiovascular Genetics* [online]. **2**(5), 450–456. ISSN 1942-3268. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCGENETICS.109.862920

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

LIPINSKI, S., E. KOMLÓDI-PÁSZTOR a O. GOKER-ALPAN, 2014. Agalsidase alfa for the treatment of fabry disease: a closer look [online]. Dostupné z: doi:10.4155/CLI.14.35

LIU, Xiaoming, Chang LI, Chengcheng MOU, Yibo DONG a Yicheng TU, 2020. dbNSFP v4: a comprehensive database of transcript-specific functional predictions and annotations for human nonsynonymous and splice-site SNVs. *Genome Medicine* [online]. **12**(1), 103. ISSN 1756-994X. Dostupné z: doi:10.1186/s13073-020-00803-9

LIU, Yang, Xin CHEN, Feng WANG, Yingcong LIANG, Hai DENG, Hongtao LIAO, Qianhuan ZHANG, Bin ZHANG, Xianzhang ZHAN, Xianhong FANG, Michael SHEHATA, Xunzhang WANG, Yumei XUE a Shulin WU, 2019. Prevalence and clinical characteristics of Danon disease among patients with left ventricular hypertrophy and concomitant electrocardiographic

preexcitation. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* [online]. 7(5), e638. ISSN 2324-9269. Dostupné z: doi:10.1002/mgg3.638

LIU, Yang, Feng WANG, Xin CHEN, Yingcong LIANG, Hai DENG, Hongtao LIAO, Fang RAO, Wei WEI, Qianhuan ZHANG, Bin ZHANG, Xianzhang ZHAN, Xianhong FANG, Sandeep NAIR, Michael SHEHATA, Xunzhang WANG, Yumei XUE a Shulin WU, 2018. Fasciculoventricular Pathways Responsible for Ventricular Preexcitation in Patients With Danon Disease. *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* [online]. 11(9), e006704. ISSN 1941-3084. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCEP.118.006704

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

LUKAS, Jan, Anne-Katrin GIESE, Arseni MARKOFF, Ulrike GRITTNER, Ed KOLODNY, Hermann MASCHER, Karl J. LACKNER, Wolfgang MEYER, Phillip WREE, Viatcheslav SAVIOUK a Arndt ROLFS, 2013. Functional characterisation of alpha-galactosidase a mutations as a basis for a new classification system in fabry disease. *PLoS genetics* [online]. 9(8), e1003632. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1003632

MACHADO, Filipe Brum, Fabricio Brum MACHADO, Milena Amendro FARIA, Viviane Lamim LOVATEL, Antonio Francisco ALVES DA SILVA, Claudia Pamela RADIC, Carlos Daniel DE BRASI, Álvaro Fabricio Lopes RIOS, Susana Marina Chuva DE SOUSA LOPES, Leonardo Serafim DA SILVEIRA, Carlos Ramon RUIZ-MIRANDA, Ester Silveira RAMOS a Enrique MEDINA-ACOSTA, 2014. 5meCpG Epigenetic Marks Neighboring a Primate-Conserved Core Promoter Short Tandem Repeat Indicate X-Chromosome Inactivation. *PLoS ONE* [online]. 9(7) [vid. 2018-07-09]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0103714

MAIER, Esther M., Stephanie OSTERRIEDER, Catharina WHYBRA, Markus RIES, Andreas GAL, Michael BECK, Adelbert A. ROSCHER a Ania C. MUNTAU, 2006. Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992). Supplement* [online]. 95(451), 30–38. ISSN 0803-5326. Dostupné z: doi:10.1080/08035320600618809

MAJER, F., H. VLASKOVA, L. KROL, T. KALINA, M. KUBANEK, L. STOLNAYA, L. DVORAKOVA, M. ELLEDER a J. SIKORA, 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* [online]. 498(2), 183–195. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2012.02.004

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

MAZZAROTTO, Francesco, Francesca GIROLAMI, Beatrice BOSCHI, Fausto BARLOCCO, Alessia TOMBERLI, Katia BALDINI, Raffaele COPPINI, Ilaria TANINI, Sara BARDI, Elisa CONTINI, Franco CECCHI, Elisabetta PELO, Stuart A. COOK, Elisabetta CERBAI, Corrado POGGESI, Francesca TORRICELLI, Roddy WALSH a Iacopo OLIVOTTO, 2019. Defining the diagnostic effectiveness of genes for inclusion in panels: the experience of two decades of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy at a single center. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* [online]. **21**(2), 284–292. ISSN 1530-0366. Dostupné z: doi:10.1038/s41436-018-0046-0

MCCAFFERTY, Emma H. a Lesley J. SCOTT, 2019. Migalastat: A Review in Fabry Disease. *Drugs* [online]. **79**(5), 543–554. ISSN 1179-1950. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-019-01090-4

MEETEL, Amom Ruhikanta, Marieke LEVITUS, Yutong XUE, Annette L. MEDHURST, Michel ZWAAN, Chen LING, Martin A. ROOIMANS, Patrick BIER, Maureen HOATLIN, Gerard PALS, Johan P. DE WINTER, Weidong WANG a Hans JOENJE, 2004. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nature Genetics* [online]. **36**(11), 1219–1224. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng1458

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

MIGEON, Barbara, 2013. *Females Are Mosaics: X Inactivation and Sex Differences in Disease*. 2 edition. B.m.: Oxford University Press.

MIGEON, Barbara R., 2017. Choosing the Active X: The Human Version of X Inactivation. *Trends in Genetics* [online]. **33**(12), 899–909. ISSN 0168-9525. Dostupné z: doi:10.1016/j.tig.2017.09.005

MICHAUD, Martin, Wladimir MAUHIN, Nadia BELMATOUG, Roselyne GARNOTEL, Naiya BEDREDDINE, Florian CATROS, Sophie ANCELLIN, Olivier LIDOVE a Francis GACHES, 2020. When and How to Diagnose Fabry Disease in Clinical Practice. *The American Journal of the Medical Sciences* [online]. **360**(6), 641–649. ISSN 1538-2990. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjms.2020.07.011

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 Arayamparambil 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/>

MOREIRA DE MELLO, Joana C., Gustavo R. FERNANDES, Maria D. VIBRANOVSKI a Lygia V. PEREIRA, 2017. Early X chromosome inactivation during human preimplantation development revealed by single-cell RNA-sequencing. *Scientific Reports* [online]. **7**, 10794. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-11044-z

MORRONE, A., C. CAVICCHI, T. BARDELLI, D. ANTUZZI, R. PARINI, M. DI ROCCO, S. FERIOZZI, O. GABRIELLI, R. BARONE, G. PISTONE, C. SPISNI, R. RICCI a E. ZAMMARCHI, 2003. Fabry disease: molecular studies in Italian patients and X inactivation analysis in manifesting carriers. *Journal of Medical Genetics*. **40**(8), e103. ISSN 1468-6244.

MOSSNER, Maximilian, Florian NOLTE, Gero HÜTTER, Jana REINS, Marion KLAUMÜNZER, Verena NOWAK, Julia OBLÄNDER, Katrin ACKERMANN, Silke WILL, Henning RÖHL, Uwe NEUMANN, Martin NEUMANN, Olaf HOPFER, Claudia D. BALDUS, Wolf-Karsten HOFMANN a Daniel NOWAK, 2013. Skewed X-inactivation patterns in ageing healthy and myelodysplastic haematopoiesis determined by a pyrosequencing based transcriptional clonality assay. *Journal of Medical Genetics* [online]. **50**(2), 108–117. ISSN , 1468-6244. Dostupné z: doi:10.1136/jmedgenet-2012-101093

MRSCHTIK, Michaela a Kevin M. RYAN, 2015. Lysosomal proteins in cell death and autophagy. *The FEBS journal* [online]. **282**(10), 1858–1870. ISSN 1742-4658. Dostupné z: doi:10.1111/febs.13253

MUSALKOVA, Dita, Jakub MINKS, Gabriela STORKANOVA, Lenka DVORAKOVA a Martin HREBICEK, 2015. Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis. *Blood Cells, Molecules & Diseases* [online]. **54**(2), 210–216. ISSN 1096-0961. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcmd.2014.10.001

NAKANO, Sachie, Yoshihito MORIZANE, Noriko MAKISAKA, Toshihiro SUZUKI, Tadayasu TOGAWA, Takahiro TSUKIMURA, Ikuo KAWASHIMA, Hitoshi SAKURABA a Futoshi SHIBASAKI, 2013. Development of a Highly Sensitive Immuno-PCR Assay for the Measurement of  $\alpha$ -Galactosidase A Protein Levels in Serum and Plasma. *PLOS ONE* [online]. **8**(11), e78588. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0078588

NISHINO, I., J. FU, K. TANJI, T. YAMADA, S. SHIMOJO, T. KOORI, M. MORA, J. E. RIGGS, S. J. OH, Y. KOGA, C. M. SUE, A. YAMAMOTO, N. MURAKAMI, S. SHANSKE, E. BYRNE, E. BONILLA, I. NONAKA, S. DIMAURO a M. HIRANO, 2000. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* [online]. **406**(6798), 906–910. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35022604

NOVIKOFF, A. B., H. BEAUFAY a C. DE DUVE, 1956. Electron microscopy of lysosomerich fractions from rat liver. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. **2**(4 Suppl), 179–184. ISSN 0095-9901.

NOWAK, Albina, Thomas P. MECHTLER, Thorsten HORNEMANN, Joanna GAWINECKA, Eva THESWET, Max J. HILZ a David C. KASPER, 2018. Genotype, phenotype and disease severity reflected by serum LysoGb3 levels in patients with Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **123**(2), 148–153. ISSN 1096-7206. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2017.07.002

O’HUALLACHAIN, Maeve, Konrad J. KARCEWSKI, Sherman M. WEISSMAN, Alexander Eckehart URBAN a Michael P. SNYDER, 2012. Extensive genetic variation in somatic human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **109**(44), 18018–18023. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1213736109

OLIVEIRA NETTO, Alice Brinckmann, Ana Carolina BRUSIUS-FACCHIN, Sandra LEISTNER-SEGAL, Francyne KUBASKI, Juliana JOSAHKIAN a Roberto GIUGLIANI, 2021. Detection of Mosaic Variants in Mothers of MPS II Patients by Next Generation Sequencing. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. **8**, 789350. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2021.789350

ORSTAVIK, Karen Helene, 2009. X chromosome inactivation in clinical practice. *Human Genetics* [online]. **126**(3), 363–373. ISSN 1432-1203. Dostupné z: doi:10.1007/s00439-009-0670-5

ORTIZ, Alberto, Dominique P. GERMAIN, Robert J. DESNICK, Juan POLITEI, Michael MAUER, Alessandro BURLINA, Christine ENG, Robert J. HOPKIN, Dawn LANEY, Aleš

LINHART, Stephen WALDEK, Eric WALLACE, Frank WEIDEMANN a William R. WILCOX, 2018. Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **123**(4), 416–427. ISSN 1096-7206. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2018.02.014

PAJARES, Marta, Ana I. ROJO, Esperanza ARIAS, Antonio DÍAZ-CARRETERO, Ana María CUERVO a Antonio CUADRADO, 2018. Transcription factor NFE2L2/NRF2 modulates chaperone-mediated autophagy through the regulation of LAMP2A. *Autophagy* [online]. **14**(8), 1310–1322. ISSN 1554-8635. Dostupné z: doi:10.1080/15548627.2018.1474992

PALECEK, Tomas, Jitka HONZIKOVA, Helena POUPETOVA, Hana VLASKOVA, Petr KUCHYNKA, Lubor GOLAN, Sudheera MAGAGE a Ales LINHART, 2014. Prevalence of Fabry disease in male patients with unexplained left ventricular hypertrophy in primary cardiology practice: prospective Fabry cardiomyopathy screening study (FACSS). *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **37**(3), 455–460. ISSN 1573-2665. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-013-9659-2

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

PATRAT, Catherine, Jean-François OUIMETTE a Claire ROUGEULLE, 2020. X chromosome inactivation in human development. *Development (Cambridge, England)* [online]. **147**(1). ISSN 1477-9129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.183095

PENG, Quan, Ravi VIJAYA SATYA, Marcus LEWIS, Pranay RANDAD a Yexun WANG, 2015. Reducing amplification artifacts in high multiplex amplicon sequencing by using molecular barcodes. *BMC genomics* [online]. **16**, 589. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-015-1806-8

PERERA, Rushika M. a Roberto ZONCU, 2016. The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. **32**, 223–253. ISSN 1530-8995. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125125

PETROPOULOS, Sophie, Daniel EDGÄRD, Björn REINIUS, Qiaolin DENG, Sarita Pauliina PANULA, Simone CODELUPPI, Alvaro PLAZA REYES, Sten LINNARSSON, Rickard SANDBERG a Fredrik LANNER, 2016. Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell* [online]. **165**(4), 1012–1026. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2016.03.023

PIANESE, Luigi, Antonio FORTUNATO, Serena SILVESTRI, Francesco G. SOLANO, Alberto BURLINA, Alessandro P. BURLINA a Michele RAGNO, 2019. Maternal germline mosaicism in Fabry disease. *Neurological Sciences* [online]. **40**(6), 1279–1281. ISSN 1590-3478. Dostupné z: doi:10.1007/s10072-019-03754-1

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

PLATT, Frances M., Alessandra D'AZZO, Beverly L. DAVIDSON, Elizabeth F. NEUFELD a Cynthia J. TIFFT, 2018. Lysosomal storage diseases. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. **4**(1), 1–25. ISSN 2056-676X. Dostupné z: doi:10.1038/s41572-018-0025-4

PLENGE, Robert M., Roger A. STEVENSON, Herbert A. LUBS, Charles E. SCHWARTZ a Huntington F. WILLARD, 2002. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. *American Journal of Human Genetics* [online]. **71**(1), 168–173. ISSN 0002-9297. Dostupné z: doi:10.1086/341123

PLOOS VAN AMSTEL, J. K., R. P. JANSSEN, J. G. DE JONG, B. C. HAMEL a R. A. WEVER, 1994. Six novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in families with Fabry disease. *Human Molecular Genetics* [online]. **3**(3), 503–505. ISSN 0964-6906. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/3.3.503

POPLIN, Ryan, Valentin RUANO-RUBIO, Mark A. DEPRISTO, Tim J. FENNEL, Mauricio O. CARNEIRO, Geraldine A. Van der AUWERA, David E. KLING, Laura D. GAUTHIER, Ami LEVY-MOONSHINE, David ROAZEN, Khalid SHAKIR, Joel THIBAUT, Sheila CHANDRAN, Chris WHELAN, Monkol LEK, Stacey GABRIEL, Mark J. DALY, Ben NEALE, Daniel G. MACARTHUR a Eric BANKS, 2018. *Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples* [online]. [vid. 2022-01-16]. Dostupné z: doi:10.1101/201178

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

PUCK, J. M., C. C. STEWART a R. L. NUSSBAUM, 1992. Maximum-likelihood analysis of human T-cell X chromosome inactivation patterns: normal women versus carriers of X-linked severe combined immunodeficiency. *American Journal of Human Genetics*. **50**(4), 742–748. ISSN 0002-9297.

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

QUINODOZ, Mathieu, Virginie G. PETER, Katarina CISAROVA, Beryl ROYER-BERTRAND, Peter D. STENSON, David N. COOPER, Sheila UNGER, Andrea SUPERTI-FURGA a Carlo RIVOLTA, 2022. Analysis of missense variants in the human genome reveals widespread gene-specific clustering and improves prediction of pathogenicity. *American Journal of Human Genetics* [online]. **109**(3), 457–470. ISSN 1537-6605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajhg.2022.01.006

RACCHI, O., R. MANGERINI, D. RAPEZZI, M. ROLFO, G. F. GAETANI a A. M. FERRARIS, 1998. X chromosome inactivation patterns in normal females. *Blood Cells, Molecules & Diseases* [online]. **24**(4), 439–447. ISSN 1079-9796. Dostupné z: doi:10.1006/bcmd.1998.0213

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.

REDONNET-VERNHET, I, J K PLOOS VAN AMSTEL, R P JANSEN, R A WEVERS, R SALVAYRE a T LEVADE, 1996. Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galactosidase A gene. *Journal of Medical Genetics*. **33**(8), 682–688. ISSN 0022-2593.

REGELSBERGER, G., R. HÖFTBERGER, W. F. PICKL, G. J. ZLABINGER, U. KÖRMÖCZI, U. SALZER-MUHAR, D. LUCKNER, O. A. BODAMER, J. A. MAYR, W. H. MUSS, H. BUDKA a H. BERNHEIMER, 2009. Danon disease: Case report and detection of new mutation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **32**(S1), 115–122. ISSN 1573-2665. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-009-1097-9

REKOVÁ, Petra, Klára SEDLÁKOVÁ, Gabriela DOSTÁLOVÁ a Aleš LINHART, 2018. Fabry disease, an overview and the most common neurological manifestations. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. **81/114**(2), 156–163. ISSN 12107859, 18024041. Dostupné z: doi:10.14735/amcsnn2018156

ROBINSON, James T., Helga THORVALDSDÓTTIR, Aaron M. WENGER, Ahmet ZEHIR a Jill P. MESIROV, 2017. Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Research* [online]. **77**(21), e31–e34. ISSN 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0337

ROCA, Iria, Lorena GONZÁLEZ-CASTRO, Helena FERNÁNDEZ, M<sup>a</sup> Luz COUCE a Ana FERNÁNDEZ-MARMIESSE, 2019. Free-access copy-number variant detection tools for targeted next-generation sequencing data. *Mutation Research* [online]. **779**, 114–125. ISSN 1873-135X. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrrev.2019.02.005

ROHLIN, Anna, Josephine WERNERSSON, Yvonne ENGWALL, Leif WIKLUND, Jan BJÖRK a Margareta NORDLING, 2009. Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: Comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Human Mutation* [online]. **30**(6), 1012–1020. ISSN 1098-1004. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/humu.20980>

ROLFS, Arndt, Tobias BÖTTCHER, Marlies ZSCHIESCHE, Peter MORRIS, Bryan WINCHESTER, Peter BAUER, Uwe WALTER, Eilhard MIX, Mathias LÖHR, Klaus HARZER, Ulf STRAUSS, Jens PAHNKE, Annette GROSSMANN a Reiner BENECKE, 2005. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet (London, England)* [online]. **366**(9499), 1794–1796. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(05)67635-0

ROSSANTI, Rini, Kandai NOZU, Atsushi FUKUNAGA, China NAGANO, Tomoko HORINOUCI, Tomohiko YAMAMURA, Nana SAKAKIBARA, Shogo MINAMIKAWA, Shinya ISHIKO, Yuya AOTO, Eri OKADA, Takeshi NINCHOJI, Noritoshi KATO, Shoichi MARUYAMA, Keiji KONO, Shinichi NISHI, Kazumoto IJIMA a Hideki FUJII, 2021. X-chromosome inactivation patterns in females with Fabry disease examined by both ultra-deep RNA sequencing and methylation-dependent assay. *Clinical and Experimental Nephrology* [online]. ISSN 1437-7799. Dostupné z: doi:10.1007/s10157-021-02099-4

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

RUPERT, J. L., C. J. BROWN a H. F. WILLARD, 1995. Direct detection of non-random X chromosome inactivation by use of a transcribed polymorphism in the XIST gene. *European journal of human genetics: EJHG* [online]. **3**(6), 333–343. ISSN 1018-4813. Dostupné z: doi:10.1159/000472322

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

SAHAKYAN, Anna, Rachel KIM, Constantinos CHRONIS, Shan SABRI, Giancarlo BONORA, Thorold W. THEUNISSEN, Edward KUOY, Justin LANGERMAN, Amander T. CLARK, Rudolf JAENISCH a Kathrin PLATH, 2017. Human Naive Pluripotent Stem Cells Model X Chromosome Dampening and X Inactivation. *Cell Stem Cell* [online]. **20**(1), 87–101. ISSN 1875-9777. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2016.10.006

SAKURABA, H., A. OSHIMA, Y. FUKUHARA, M. SHIMMOTO, Y. NAGAO, D. F. BISHOP, R. J. DESNICK a Y. SUZUKI, 1990. Identification of point mutations in the alpha-galactosidase A gene in classical and atypical hemizygotes with Fabry disease. *American Journal of Human Genetics*. **47**(5), 784–789. ISSN 0002-9297.

SANDOVICI, Ionel, Anna K. NAUMOVA, Mark LEPPERT, Yendi LINARES a Carmen SAPIENZA, 2004. A longitudinal study of X-inactivation ratio in human females. *Human Genetics* [online]. **115**(5), 387–392. ISSN 0340-6717. Dostupné z: doi:10.1007/s00439-004-1177-8

SANGER, F., S. NICKLEN a A. R. COULSON, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **74**(12), 5463–5467. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.74.12.5463

SCARPA, Maurizio, Zsuzsanna ALMÁSSY, Michael BECK, Olaf BODAMER, Iain A BRUCE, Linda DE MEIRLEIR, Nathalie GUFFON, Encarna GUILLÉN-NAVARRO, Pauline HENSMAN, Simon JONES, Wolfgang KAMIN, Christoph KAMPMANN, Christina LAMPE, Christine A LAVERY, Elisa LEÃO TELES, Bianca LINK, Allan M LUND, Gunilla MALM, Susanne PITZ, Michael ROTHERA, Catherine STEWART, Anna TYLKI-SZYMAŃSKA, Ans VAN DER PLOEG, Robert WALKER, Jiri ZEMAN a James E WRAITH, 2011. Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **6**, 72. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/1750-1172-6-72

SEMYACHKINA, A. N., E. Y. VOSKOBEOVA, E. Y. ZAKHAROVA, E. A. NIKOLAEVA, I. V. KANIVETS, A. D. KOLOTII, 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

SHABBEER, Junaid, Misi ROBINSON a Robert J. DESNICK, 2005. Detection of alpha-galactosidase a mutations causing Fabry disease by denaturing high performance liquid chromatography. *Human Mutation* [online]. **25**(3), 299–305. ISSN 1098-1004. Dostupné z: doi:10.1002/humu.20144

SHABBEER, Junaid, Makiko YASUDA, Stacy D. BENSON a Robert J. DESNICK, 2006. Fabry disease: identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Human Genomics* [online]. **2**(5), 297–309. ISSN 1479-7364. Dostupné z: doi:10.1186/1479-7364-2-5-297

SHABBEER, Junaid, Makiko YASUDA, Edlira LUCA a Robert J DESNICK, 2002. Fabry disease: 45 novel mutations in the  $\alpha$ -galactosidase A gene causing the classical phenotype. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **76**(1), 23–30. ISSN 1096-7192. Dostupné z: doi:10.1016/S1096-7192(02)00012-4

SHARP, A., D. ROBINSON a P. JACOBS, 2000. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Human Genetics*. **107**(4), 343–349. ISSN 0340-6717.

SHEN, Yiping a Bai-Lin WU, 2009. Designing a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* [online]. **36**(4), 257–265. ISSN 1673-8527. Dostupné z: doi:10.1016/S1673-8527(08)60113-7

SHIRLEY, Matthew D., Hao TANG, Carol J. GALLIONE, Joseph D. BAUGHER, Laurence P. FRELIN, Bernard COHEN, Paula E. NORTH, Douglas A. MARCHUK, Anne M. COMI a Jonathan PEVSNER, 2013. Sturge-Weber syndrome and port-wine stains caused by somatic



mutation in GNAQ. *The New England Journal of Medicine* [online]. **368**(21), 1971–1979. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoal213507

SHVETSOVA, Ekaterina, Alina SOFRONOVA, Ramin MONAJEMI, Kristina GAGALOVA, Harmen H. M. DRAISMA, Stefan J. WHITE, Gijis W. E. SANTEN, Susana M. Chuva de Sousa LOPES, Bastiaan T. HEIJMANS, Joyce van MEURS, Rick JANSEN, Lude FRANKE, Szymon M. KIEŁBASA, Johan T. den DUNNEN a Peter A. C. 't HOEN, 2019. Skewed X-inactivation is common in the general female population. *European Journal of Human Genetics* [online]. **27**(3), 455. ISSN 1476-5438. Dostupné z: doi:10.1038/s41431-018-0291-3

SCHWAKE, Michael, Bernd SCHRÖDER a Paul SAFTIG, 2013. Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* [online]. **14**(7), 739–748. ISSN 1600-0854. Dostupné z: doi:10.1111/tra.12056

SILVA, Thiago Henrique da, Isabela Pessa ANEQUINI, Francis Meire FÁVERO, Mariana Callil VOOS, Acary Souza Bulle OLIVEIRA, Juliana Aparecida Rhein TELLES a Fátima Aparecida CAROMANO, 2020. Functional performance and muscular strength in symptomatic female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Arquivos De Neuro-Psiquiatria* [online]. **78**(3), 143–148. ISSN 1678-4227. Dostupné z: doi:10.1590/0004-282X20190168

SINGH, Ashish Kumar, Maren Fridtjofsen OLSEN, Liss Anne Solberg LAVIK, Trine VOLD, Finn DRABLØS a Wenche SJURSEN, 2021. Detecting copy number variation in next generation sequencing data from diagnostic gene panels. *BMC medical genomics* [online]. **14**(1), 214. ISSN 1755-8794. Dostupné z: doi:10.1186/s12920-021-01059-x

SOHN, Young Bae, Su Jin KIM, Sung Won PARK, Hyung-Doo PARK, Chang-Seok KI, Chi Hwa KIM, Seung Won HUH, Sunghee YEAU, Kyung-Hoon PAIK a Dong-Kyu JIN, 2010. A mother and daughter with the p.R443X mutation of mucopolysaccharidosis type II: Genotype and phenotype analysis. *American Journal of Medical Genetics. Part A* [online]. **152A**(12), 3129–3132. ISSN 1552-4833. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.a.33589

SPADA, Marco, Severo PAGLIARDINI, Makiko YASUDA, Turgut TUKEL, Geetha THIAGARAJAN, Hitoshi SAKURABA, Alberto PONZONE a Robert J. DESNICK, 2006. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *American Journal of Human Genetics* [online]. **79**(1), 31–40. ISSN 0002-9297. Dostupné z: doi:10.1086/504601

SUKEGAWA, K., X. Q. SONG, M. MASUNO, T. FUKAO, N. SHIMOZAWA, S. FUKUDA, K. ISOGAI, H. NISHIO, M. MATSUO, S. TOMATSU, N. KONDO a T. ORII, 1997. Hunter disease in a girl caused by R468Q mutation in the iduronate-2-sulfatase gene and skewed inactivation of the X chromosome carrying the normal allele. *Human Mutation* [online]. **10**(5), 361–367. ISSN 1059-7794. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:5<361::AID-HUMU5>3.0.CO;2-I

SUKEGAWA-HAYASAKA, K., Z. KATO, H. NAKAMURA, S. TOMATSU, T. FUKAO, K. KUWATA, T. ORII a N. KONDO, 2006. Effect of Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) mutations on molecular phenotypes of iduronate-2-sulfatase: enzymatic activity, protein processing and structural analysis. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **29**(6), 755–761. ISSN 1573-2665. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-006-0440-7

SWEELEY, C. C. a B. KLIONSKY, 1963. FABRY'S DISEASE: CLASSIFICATION AS A SPHINGOLIPIDOSIS AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A NOVEL GLYCOLIPID. *The Journal of Biological Chemistry*. **238**, 3148–3150. ISSN 0021-9258.

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.

SZELINGER, Szabolcs, Ivana MALENICA, Jason J. CORNEVEAUX, Ashley L. SINIARD, Ahmet A. KURDOGLU, Keri M. RAMSEY, Isabelle SCHRAUWEN, Jeffrey M. TRENT, Vinodh NARAYANAN, Matthew J. HUENTELMAN a David W. CRAIG, 2014. Characterization of X chromosome inactivation using integrated analysis of whole-exome and mRNA sequencing. *PloS One* [online]. **9**(12), e113036. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0113036

TALEVICH, Eric, A. Hunter SHAIN, Thomas BOTTON a Boris C. BASTIAN, 2016. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLOS Computational Biology* [online]. **12**(4), e1004873. ISSN 1553-7358. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pcbi.1004873

TAYLOR, Matthew R. G., Lisa KU, Dobromir SLAVOV, Jean CAVANAUGH, Mark BOUCEK, Xiao ZHU, Sharon GRAW, Elisa CARNIEL, Carl BARNES, Dianna QUAN, Ryan PRALL, Mark A. LOVELL, Gary MIERAU, Patsy RUEGG, Naresh MANDAVA, Michael R. BRISTOW, Jeffrey A. TOWBIN, Luisa MESTRONI, a FAMILIAL CARDIOMYOPATHY REGISTRY, 2007. Danon disease presenting with dilated cardiomyopathy and a complex phenotype. *Journal of Human Genetics* [online]. **52**(10), 830–835. ISSN 1434-5161. Dostupné z: doi:10.1007/s10038-007-0184-8

TEWHEY, Ryan, Masakazu NAKANO, Xiaoyun WANG, Carlos PABÓN-PEÑA, Barbara NOVAK, Angelica GIUFFRE, Eric LIN, Scott HAPPE, Doug N. ROBERTS, Emily M. LEPROUST, Eric J. TOPOL, Olivier HARISMENDY a Kelly A. FRAZER, 2009. Enrichment of sequencing targets from the human genome by solution hybridization. *Genome Biology* [online]. **10**(10), R116. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2009-10-10-r116

TRAPNELL, Cole, Lior PACHTER a Steven L. SALZBERG, 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics (Oxford, England)* [online]. **25**(9), 1105–1111. ISSN 1367-4811. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btp120

TRIVEDI, Purvi C., Jordan J. BARTLETT a Thomas PULINILKUNNIL, 2020. Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. *Cells* [online]. **9**(5), E1131. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9051131

TUKIAINEN, Taru, Alexandra-Chloé VILLANI, Angela YEN, Manuel A. RIVAS, Jamie L. MARSHALL, Rahul SATIJA, Matt AGUIRRE, Laura GAUTHIER, Mark FLEHARTY, Andrew KIRBY, Beryl B. CUMMINGS, Stephane E. CASTEL, Konrad J. KARCZEWSKI, François AGUET, Andrea BYRNES, GTEX CONSORTIUM, LABORATORY, DATA ANALYSIS & COORDINATING CENTER (LDACC)—ANALYSIS WORKING GROUP, STATISTICAL METHODS GROUPS—ANALYSIS WORKING GROUP, ENHANCING GTEX (EGTEX) GROUPS, NIH COMMON FUND, NIH/NCI, NIH/NHGRI, NIH/NIMH, NIH/NIDA, BIOSPECIMEN COLLECTION SOURCE SITE—NDRI, BIOSPECIMEN COLLECTION SOURCE SITE—RPCI, BIOSPECIMEN CORE RESOURCE—VARI, BRAIN BANK REPOSITORY—UNIVERSITY OF MIAMI BRAIN ENDOWMENT BANK, LEIDOS BIOMEDICAL—PROJECT MANAGEMENT, ELSI STUDY, GENOME BROWSER DATA INTEGRATION & VISUALIZATION—EBI, GENOME BROWSER DATA INTEGRATION & VISUALIZATION—UCSC GENOMICS INSTITUTE, UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, Tuuli LAPPALAINEN, Aviv REGEV, Kristin G. ARDLIE, Nir HACOHEN a Daniel G. MACARTHUR, 2017. Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature* [online]. **550**(7675), 244–248. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature24265

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

VALLOT, Céline, Catherine PATRAT, Amanda J. COLLIER, Christophe HURET, Miguel CASANOVA, Tharvesh M. LIYAKAT ALI, Matteo TOSOLINI, Nelly FRYDMAN, Edith HEARD, Peter J. RUGG-GUNN a Claire ROUGEULLE, 2017. XACT Noncoding RNA Competes with XIST in the Control of X Chromosome Activity during Human Early Development. *Cell Stem Cell* [online]. **20**(1), 102–111. ISSN 1875-9777. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2016.10.014

VANNESTE, Evelyne, Thierry VOET, Cédric LE CAIGNEC, Michèle AMPE, Peter KONINGS, Cindy MELOTTE, Sophie DEBROCK, Mustapha AMYERE, Miikka VIKKULA, Frans SCHUIT, Jean-Pierre FRYNS, Geert VERBEKE, Thomas D’HOOGHE, Yves MOREAU a Joris R. VERMEESCH, 2009. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nature Medicine* [online]. **15**(5), 577–583. ISSN 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/nm.1924

VOGELSTEIN, B., E. R. FEARON, S. R. HAMILTON, A. C. PREISINGER, H. F. WILLARD, A. M. MICHELSON, A. D. RIGGS a S. H. ORKIN, 1987. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Research*. **47**(18), 4806–4813. ISSN 0008-5472.

WINCHESTER, B., E. YOUNG, S. GEDDES, S. GENET, J. HURST, H. MIDDLETON-PRICE, N. WILLIAMS, M. WEBB, A. HABEL a S. MALCOLM, 1992. Female twin with Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning.

*American Journal of Medical Genetics* [online]. **44**(6), 834–838. ISSN 0148-7299. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.1320440625

WINCHESTER, Bryan G., 2001. Lysosomal membrane proteins. *European Journal of Paediatric Neurology* [online]. **5**, 11–19. ISSN 1090-3798, 1532-2130. Dostupné z: doi:10.1053/ejpn.2000.0428

WRAITH, J. Edmond, Michael BECK, Roberto GIUGLIANI, Joe CLARKE, Rick MARTIN, Joseph MUENZER, a HOS INVESTIGATORS, 2008. Initial report from the Hunter Outcome Survey. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* [online]. **10**(7), 508–516. ISSN 1530-0366. Dostupné z: doi:10.1097/gim.0b013e31817701e6

YANAGISAWA, Hiroko, Mohammad Arif HOSSAIN, Takashi MIYAJIMA, Kazuaki NAGAO, Toshiyuki MIYASHITA a Yoshikatsu ETO, 2019. Dysregulated DNA methylation of GLA gene was associated with dysfunction of autophagy. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **126**(4), 460–465. ISSN 1096-7206. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2019.03.003

YANG, Hui a Kai WANG, 2015. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nature Protocols* [online]. **10**(10), 1556–1566. ISSN 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2015.105

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

YANG, Zhao, Colin J. MCMAHON, Liana R. SMITH, Jeathrina BERSOLA, Adekunle M. ADESINA, John P. BREINHOLT, Debra L. KEARNEY, William J. DREYER, Susan W. DENFIELD, Jack F. PRICE, Michelle GRENIER, Naomi J. KERTESZ, Sarah K. CLUNIE, Susan D. FERNBACH, James F. SOUTHERN, Stuart BERGER, Jeffrey A. TOWBIN, Karla R. BOWLES a Neil E. BOWLES, 2005. Danon disease as an underrecognized cause of hypertrophic cardiomyopathy in children. *Circulation* [online]. **112**(11), 1612–1617. ISSN 1524-4539. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.546481

YE, Kai, Li GUO, Xiaofei YANG, Eric-Wubbo LAMIJER, Keiran RAINE a Zemin NING, 2018. Split-Read Indel and Structural Variant Calling Using PINDEL. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. **1833**, 95–105. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-8666-8\_7

ZOU, Yongxin, Qiji LIU, Bingxi CHEN, Xiyu ZHANG, Chenhong GUO, Haibin ZHOU, Jiangxia LI, Guimin GAO, Yishou GUO, Chuanzhu YAN, Jianjun WEI, Changshun SHAO a Yaoqin GONG, 2007. Mutation in CUL4B, which encodes a member of cullin-RING ubiquitin ligase complex, causes X-linked mental retardation. *American Journal of Human Genetics* [online]. **80**(3), 561–566. ISSN 0002-9297. Dostupné z: doi:10.1086/512489

ZVERINOVA, Stepanka a Victor GURYEV, 2021. Variant calling: Considerations, practices, and developments. *Human Mutation* [online]. ISSN 1098-1004. Dostupné z: doi:10.1002/humu.24311

## 8. Přílohy:

**Příloha 1:** Seznam genů v panelech

**Příloha 2:** 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**

**Příloha 3:** DVORAKOVA, Lenka, Hana VLASKOVA, Adrijan SARAJLIJA, Daniejela Petrović RAMADZA, Helena POUPETOVA, Eva HRUBA, Anna HLAVATA, Vladimír BZDUCH, Karolína PESKOVA, Gabriela STORKANOVA, Bozica KECMAN, 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**

**Příloha 4:** 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**

**Příloha 5:** 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**

**Příloha 6:** 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**