

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



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

**Vrozené vady čočky a předního segmentu oka**

Mgr. Jana Jedličková

2023

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

<b>Obor:</b>	Biochemie a patobiochemie
<b>Předseda oborové rady:</b>	prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.
<b>Školící pracoviště:</b>	Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, Laboratoř oční genetiky
<b>Školitel:</b>	Ing. Lubica Ďudřáková, Ph.D
<b>Konzultant:</b>	prof. MUDr. Petra Lišková, M.D., Ph.D

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

## OBSAH:

ABSTRAKT .....	4
ABSTRACT .....	4
Úvod .....	5
1.1. Dysgeneze předního segmentu oka .....	5
1.2. Diagnostika a molekulárně genetické přístupy při diagnostice pacientů s DPS.....	7
2. Hypotézy a cíle práce .....	8
3. Materiál a metodika .....	9
4. Výsledky.....	11
4.1. Identifikace příčinných variant v genu <i>PAX6</i> a ověření vlivu dvou variant na sestřih pre-mRNA.....	11
4.2. Molekulárně genetická diagnostika syndromu hereditární hyperferitinemie-katarakty ve třech českých rodinách .....	12
4.3. Molekulárně genetická analýza v rodině s chorioretinální dystrofií variabilně asociovanou s kolobomem duhovky, presenilní kataraktou, vrozeným glaukomem a albinismem .....	12
4.4. Komplexní fenotypová a funkční analýza autozomálně dominantních i recesivních variant v genu <i>FOXE3</i> .....	13
4.5. Molekulárně genetická analýza a popis fenotypu X-vázané megalokornei .....	14
4.6. Genetická a fenotypová charakterizace kohorty pacientů s výskytem Axenfeldova-Riegerova syndromu.....	15
4.6. Molekulárně genetická analýza pacientky s dysgenезí předního segmentu oka a výskytem tzv. slimáčích stop na rohovce.....	16
6. Diskuze a závěr.....	18
7. Použitá literatura.....	20
8. Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertace.....	22
9. Publikace <i>in extenso</i> bez vztahu k tématu disertace .....	23

## ABSTRAKT

Přední segment oka zahrnuje oční víčka, řasy a slzný film, rohovku, spojivku, duhovku, zornici, řasnaté tělísko, komorový úhel a oční čočku. Katarakta (neboli zákal oční čočky) a dysgeneze předního segmentu oka jsou značně heterogenní skupinou onemocnění, která jsou z velké části monogenně dědičná.

Hlavním cílem této disertační práce byla molekulárně genetická analýza 51 pacientů z 23 rodin s kataraktami a dysgenézemi předního segmentu oka, přičemž byla použita řada moderních i konvenčních metod, jako např. sekvenování nové generace, přímé sekvenování, bioinformatické a funkční analýzy včetně sestřihových vektorů.

Identifikovali jsme 24 kauzálních variant v kódujících, nekódujících i regulačních oblastech genů *PAX6*, *FTL*, *FOXC1*, *PITX2*, *FOXE3* a *CHRDLL1*. Potvrdili jsme roli varianty n.37C>T v *MIR204* na vzniku chorioretinální dystrofie variabilně asociované s kolobomem duhovky, časně manifestující kataraktou a kongenitálním glaukomem.

Výsledky této práce napomohly ustanovit molekulární diagnózu u řady pacientů, což následně umožnilo zlepšit poradenství pacientům a jejich příbuzným z hlediska prognózy ztráty zrakových funkcí a rizika vzniku sekundárního glaukomu.

## ABSTRACT

The anterior segment of the eye includes the eyelids, eyelashes, tear film, cornea, conjunctiva, iris, pupil, ciliary body, chamber angle, and lens. Cataracts and anterior segment dysgenesis are a highly heterogeneous group of diseases exhibiting all types of Mendelian inheritance.

The aim of this thesis was molecular genetic analysis of 51 patients from 23 families with congenital and early onset cataracts and/or anterior segment dysgenesis, using a modern as well as conventional methods, such as next-generation sequencing, direct sequencing, bioinformatic and functional analyzes including the use of artificial splicing vectors.

We identified 24 causal variants in the coding, non-coding and regulatory regions of the *PAX6*, *FTL*, *FOXC1*, *PITX2*, *FOXE3*, and *CHRDLL1* genes. We confirmed the role of the n.37C>T variant in *MIR204* in the development of chorioretinal dystrophy variably associated with iris coloboma, early-onset cataracts and congenital glaucoma.

Establishing molecular genetics diagnosis improves patient counselling and their relatives in terms of the prognosis and risk of developing secondary glaucoma.

# Úvod

Vzácná onemocnění tvoří různorodou skupinu život ohrožujících nebo závažných chronických stavů čítající mezi 5 000 až 8 000 různými klinickými jednotkami (Haendel et al. 2020). Dle Evropské unie jsou tato onemocnění definována jako ta, které postihují méně než 5 osob z 10 000 obyvatel (Bax 2021). Přibližně 80 % je geneticky podmíněno, nicméně kauzální geny mnohých z nich nebyly doposud určeny (Bax 2021). Nejčastější typy těchto chorob zahrnují dědičné metabolické poruchy, systémová autoimunitní a revmatologická onemocnění, endokrinologická, kardiovaskulární onemocnění, v neposlední řadě také onemocnění oka (Haendel et al. 2020). Molekulárně genetický výzkum těchto vzácných onemocnění často umožňuje identifikaci a definici kandidátních genů a efektivní studium základních patofyziologických a molekulárních procesů v lidských buňkách a metabolických dráhách

Molekulárně genetický výzkum těchto vzácných onemocnění často umožňuje identifikaci a definici kandidátních genů a efektivní studium základních patofyziologických a molekulárních procesů v lidských buňkách a metabolických dráhách. Co se týká vývojových onemocnění oka, tento typ výzkumu může pomoci podhalit více z molekulárních mechanismů vzniku jednotlivých očních struktur a jejich posloupnosti.

## 1.1. Dysgeneze předního segmentu oka

Dysgeneze předního segmentu (ASD, anterior segment dysgenesis) představují skupinu poruch, které postihují vývoj přední části oka, včetně rohovky, duhovky, spojivky, očních víček, komorového úhlu, řasnatého tělíska a oční čočky (Sowden 2007). ASD představují klinicky i geneticky široké spektrum vývojových poruch, přičemž často vznikají na podkladě abnormální diferenciaci mesenchymu, konkrétně pak buněk neurální lišty (Sowden 2007). Jmenovitě se jedná o stavy jako zakalení rohovky (opacifikace), často spojované s vrůstáním cév do jejího stromatu, nedovyvinutí (hypoplazie) duhovky, rozštěpy duhovky (kolobom), přítomností výrazného zadního embryotoxonu (rozšíření Schwalbeho, což je kolagenové zhuštění Descemetovy membrány mezi trabekulární síťovinou a endotelem rohovky), korektomie zornice nebo oční čočky (atypické umístění) (Sowden 2007). Může se také jednat o stavy, jakými jsou nanofthalmus (zmenšení celého oka, které je jinak funkčně normální), mikroftalmus (zmenšení předního nebo zadního segmentu oka), anoftalmus (oko zcela chybí), heterochromie (různobarevné duhovky způsobené nerovnoměrnou distribucí

melaninu), polykorie (výskyt vícero zornic), kryptoftalmus (nedochází k oddělení očních víček) nebo sklerokornea (částečné, nebo úplné zakalení rohovky). Mezi doprovodné projevy patří také nystagmus (kmitavé pohyby očí), strabismus (šilhání), nebo ambyopie (tupozrakost) (Sowden 2007). U více než poloviny pacientů s ASD dochází v důsledku poruchy odtoku komorové tekutiny ke vzniku sekundárního glaukomu, který může v konečném důsledku vést až k neuropatii zrakového nervu (Idrees et al. 2006, Alward 2000).

Vrozené vývojové vady očních tkání mohou vznikat jak na podkladě genetických příčin, pak také během intrauterinního vývoje embrya, působením nejrůznějších mutagenů (např. intrauterinní infekce), vnějších faktorů (alkoholový fetální syndrom), nebo nevhodnou medikací matky během těhotenství (teratogeny) (Idrees et al. 2006). Na základě důkladných prenatalních screeningů, které jsou v České republice už běžnou praxí, se předpokládá, že většina ASD (především pak bilaterálních) vniká na podkladě genetických příčin (Haargaard et al. 2004).

ASD bývají spojovány se všemi typy dědičnosti: autozomálně dominantní, autozomálně recesivní, X-vázané, často s neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou (Ma, Grigg and Jamieson 2019). ASD se mohou vyskytovat izolovaně, ale mohou se také manifestovat v rámci nejrůznějších syndromů (Axenfeldův-Riegerův syndrom, Petersova anomálie, aj.) (Ma et al. 2019).

Prevalence ASD se pohybuje v závislosti na konkrétní populaci a na typu onemocnění od 1 postiženého na 200 000 obyvatel v případě Axenfeldova-Riegerova syndromu, až po 1 postiženého na 10 000 jedinců v případě kongenitálního glaukomu (Meyer-Marcotty et al. 2008, Titheradge et al. 2014, Aponte, Diehl and Mohny 2010).

Vývoj oka je řízen složitou sítí molekulárních interakcí, které závisí na přesné časové i místní expresi četných transkripčních faktorů. Z tohoto důvodu nejčastějšími geny, jejichž mutace vedou ke vzniku ASD, jsou právě transkripční faktory, mezi které patří geny *PAX6*, *PITX2*, *FOXC1*, *FOXE3* aj. (Reis and Semina 2011). ASD nejsou izolovanou klinickou entitou, ale na molekulárně-genetické úrovni se prolínají také jinými klinickými jednotkami např. s anomáliemi postihujícími sítnici.

## 1.2. Diagnostika a molekulárně genetické přístupy při diagnostice pacientů s DPS

Molekulárně genetická diagnostika pacientů s ASD pomáhá při poskytování přesnější prognózy vývoje onemocnění z hlediska rizika přenosu onemocnění na další generace. Předpokladem pro úspěšný výsledek genetického screeningu je v první řadě přesná klinická diagnostika a pečlivá genealogická analýza včetně sestavení rodokmenu, která slouží k odhadu typu dědičnosti konkrétního onemocnění a později k segregáčním analýzám (Bennett et al. 1995). Vyšetření v rámci jedné rodiny může často zkomplikovat neúplná penetrance a variabilní expresivita (Meyer-Marcotty et al. 2008) (Titheradge et al. 2014). Penetrance značí míru shody mezi genotypem a očekávaným fenotypem, přičemž daný genotyp nemusí vždy jednoznačně determinovat fenotyp v plném rozsahu. Expresivita vyjadřuje různou povahu (míru postižení) daného genotypu ve fenotypu. U nositelů stejného genotypu můžeme nacházet celé spektrum morfologických odchylek.

Samotné genetické testování může v praxi znamenat přímé Sangerovo sekvenování kódujících úseků konkrétního genu, v případě že daný fenotyp přesně koreluje s konkrétní diagnostickou jednotkou (např. při výskytu izolované aniridie, sekvenování kódujících úseků genu *PAX6*, nebo genů *PITX2*, *FOXC1* v případě Axenfeldova-Riegerova syndromu) (Moosajee, Hingorani and Moore 1993) (Seifi and Walter 2018). Pokud se jedná o komplexnější, nebo nejasný fenotypový nález, může se přistoupit k cíleným genovým panelům, k exomovému sekvenování nebo k sekvenování celého genomu (Reis and Semina 2011). V některých případech je potřeba provést vyšetření variant počtu kopií (CNV, copy number variation), pro odhalení rozlehlejších delecí, nebo duplikací, anebo k vyšetření karyotypu, pro odhalení nejruznějších chromozomálních přestaveb (Royer-Bertrand et al. 2021). V případě rozsáhlejších rodin s jasným hereditárním výskytem onemocnění v každé generaci s doposud neobjasněnou příčinou, se dá přistoupit ke genomovému sekvenování většího počtu rodinných příslušníků a následně k vazebným analýzám (Ott, Wang and Leal 2015).

Ověření patogenního vlivu jednotlivých variant je velmi komplexní proces a může zahrnovat techniky klonování, použití *in silico* predikčních programů, nebo nejruznější funkční studie.

## 2. Hypotézy a cíle práce

Cílem mé disertační práce bylo zkoumat molekulárně genetickou příčinu u 51 pacientů s klinickým obrazem ASD, kongenitálními kataraktami anebo časně manifestujícími kataraktami a s nimi spojenými syndromy.

### Dílčí cíle práce:

1. Identifikace příčinných variant v genu *PAX6* a ověření vlivu dvou variant na sestřih pre-mRNA
2. Objasnění molekulárně genetické příčiny syndromu hereditární hyperferitinémie-katarakty ve třech rodinách českého původu
3. Molekulárně genetická analýza v rodině s chorioretinální dystrofií, variabilně asociovanou s kolobomem duhovky, presenilní kataraktou, vrozeným glaukomem a albinismem
4. Komplexní fenotypová a funkční analýza autozomálně dominantních i recesivních variant v genu *FOXE3*
5. Molekulárně genetická analýza a popis fenotypu X-vázané megalokornei
6. Genetická a fenotypová charakterizace kohorty pacientů s výskytem Axenfeldova-Riegerova syndromu
7. Molekulárně genetická analýza pacientky s dysgenezí předního segmentu oka a výskytem slimáčích stop na rohovce



### 3. Materiál a metodika

Během experimentální části disertační práce bylo použito široké spektrum metod. Detailní popis a další informace o jednotlivých metodách jsou uvedeny v souvisejících publikacích. Na níže uvedeném obrázku je stručně uveden postup při molekulárně genetické diagnostice probandů s ASD.

- Důkladné oftalmologické vyšetření zahrnující vyšetření nejlépe korigované zrakové ostrosti (NKZO), měření výše nitroočního tlaku, fotografie předního segmentu oka a vyšetření fundu
- V případě potřeby bylo doplněno celkové vyšetření pediatrem, vyšetření sluchu, neurologické vyšetření, biochemické vyšetření (měření sérových hladin feritinu, železa, aj.) nebo MRI mozku
- Genealogické vyšetření (zpracováno v programu HaploPainter)
- Izolace DNA ze vzorků venózní krve pomocí kitu Gentra Puregene Blood Kit Plus (QIAGEN) nebo ze vzorků slin pomocí kitu PrepIT-L2P (DNA Genotek)
- Spektrofotometrické měření koncentrace a čistoty DNA na přístroji Nanodrop One (ThermoFisher Scientific)
- Fluorometrické měření koncentrace DNA na přístroji Qubit (ThermoFisher Scientific)
- Příprava primerů pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) pomocí programu Primer3 a následná analýza oligonukleotidů programem OligoAnalyzer Tool
- PCR reakce byla prováděna pomocí mastermixu Platinum SuperFi II Green PCR Master Mix (Invitrogen) v termocykleru Biometra TOne 96 G (Analytik Jena)
- Pročištění PCR produktů pomocí ExoSAP-IT (ThermoFisher Scientific)
- Analýza PCR produktu pomocí čtyřkapilárního analyzátoru 3130 Genetic Analyzer, šestnáctikapilárního 3130xl Genetic Analyzer a čtyřadvacetikapilárního 3500 Genetic Analyzer (všechny značky Applied Biosystems, USA)
- Analýza sekvenčních dat ve formátu Chromatogram file (.seq) ve volně dostupném softwaru Chromas 2.6.6 (Technelysium)
- Exomové a genomové sekvenování na platformě Illumina, analyzátozem NovaSeq 6000s (Illumina)
- Sekvence ve formátu FASTAQ (.fq) byly bioanalyticky zpracovány v programu Novoalign společnosti NovoCraft, mapovány na sekvenci lidského referenčního

genomu (UCSC Genome Browser hg19) a následně zkonvertovány do souborů formátu BAM (.bam) a BAI (.bai)

- Data dále analyzována pomocí softwaru Integrative Genomics Viewer (IGV)
- Vyšetření CNV pro odhalení rozlehlejších delecí nebo duplikací pomocí Infinium Global Screening Array-24 (Illumina)
- Vyšetření paternity/maternity pomocí kitu AmpFLSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific) a AMLX/Y testem

### **Popis nalezených, potenciálně patogenních variant**

- Anotace nalezených variant probíhala dle doporučení Human Genome Variation Society (HGVS)
- Frekvence nalezených variant byly kontrolovány v databázi gnomAD v2.1.1 zobrazující data z 125 748 exomů a 15 708 genomů a také ve verzi 3.1.2 zobrazující data z 76 156 genomů od nepříbuzných jedinců (přístup 6/2023)
- Hodnocení patogenity detekovaných variant dle doporučení American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Richards et al. 2015)

### **Predikční analýzy a funkční studie**

- Zhodnocení patogenity variant pomocí kombinace predikčních algoritmů: Revel, SIFT, Polyphen2, MutationTaster2, FATHMM, nástroj miRDB. aj.
- *Ab initio* semi-empirické predikce sekundární a terciální struktury proteinů (program I-Tasser)
- Klonování a transfekce
- Ověření vlivu variant na sestřih pre-mRNA metodou Exon-trappingu – metoda byla optimalizována v diplomové práci
- Western blot analýzy
- RNA izolace a Real-Time qPCR
- Gelová zpomalovací analýza (EMSA, Electrophoretic mobility shift assay)
- Kvantifikační proteinová analýza (ELISA)
- Imunobarvení pomocí N-koncového epitopu FLAG
- Analýza transkripční aktivity proteinů byla testována pomocí luciferázových kotransfekčních testů za použití (FHB)6-TK-luc reportéru

## 4. Výsledky

V průběhu vypracovávání disertačního projektu se povedlo zpracovat a ve formě publikačních výstupů zpracovat popis fenotypu a molekulárně genetické příčiny u 51 pacientů z 23 rodin vyšetřených na Oční klinice 1. LF UK a VFN v Praze s různými typy ASD a kataraktami.

### 4.1. Identifikace příčinných variant v genu *PAX6* a ověření vlivu dvou variant na sestřih pre-mRNA

Molekulárně genetická analýza v šesti rodinách s nálezem aniridie pomohla odhalit kauzální varianty v genu *PAX6* (referenční sekvence NM\_000280.4; NG\_008679.1) pomocí přímého sekvenování u tří probandů (rodiny 2, 5 a 6) a u zbylých tří pomocí exomového sekvenování (rodiny 1, 3 a 4).

U probandky z rodiny 1 byla v heterozygotním stavu identifikována doposud nepopsaná delece 11 nukleotidů c.111\_120del, která způsobuje posun čtecího rámce; p.(Arg38Thrfs\*13).

U probandky z rodiny 2 byla v heterozygotním stavu nalezena varianta c.183C>G, která vede ke tvorbě stop kodonu; p.(Tyr61\*). Tato varianta byla již dříve popsána ve spojitosti s výskytem aniridie (Perez-Solorzano et al. 2017).

Varianta c.622C>T p.(Arg208Trp) byla identifikována hned ve dvou rodinách; v rodině 3 a 4. Aminokyselinová substituce se nachází ve vysoce konzervované doméně, nesoucí jaderný lokalizační signál, tzv. homeonukleární lokalizační signál, přičemž konzervovanost této sekvence byla ověřena programem T-coffee.

V rodině 5 a 6 se povedlo odhalit variantu na rozhraní intron-exon; c.1032+1G>A (rodina 5) a c.1183+1G>T (rodina 6). Tyto varianty, byly vyhodnoceny dostupnými *in silico* predikčními nástroji jako narušující sestřih. Experimentální ověření a charakterizace vlivu obou variant na sestřih molekuly pre-mRNA bylo provedeno metodou Exon-trappingu.

Varianta c.1032+1G>A vede k vynechání celého exonu 11 ze sekvence mRNA, k posunu čtecího rámce s předpokládanou inzercí předčasného stop kodonu po začlenění 25 jiných aminokyselin (p.Val306Alafs\*26). Varianta c.1183+1G>T vede k vynechání celého exonu 12 ze sekvence mRNA, přičemž pravděpodobně dochází k začlenění 129 jiných aminokyselinových zbytků a tím také k prodloužení proteinu o 51 aminokyselin oproti referenční proteinové sekvenci (p.Pro346Aspfs\*130).

## **4.2. Molekulárně genetická diagnostika syndromu hereditární hyperferitinemie-katarakty ve třech českých rodinách**

Studie stanovila molekulárně genetickou diagnózu u tří českých probandů s HHCS u kterých bylo provedeno komplexní oční i systémové vyšetření, včetně měření sérových hladin feritinu i železa. U všech probandů byla nalezena varianta v oblasti 5'UTR genu *FTL* (referenční sekvence NM\_000146.3; NG\_008152.1).

U všech ze tří probandů byly detekovány patogenní varianty v 5'UTR oblasti genu *FTL*: c.-161C>T, c.-167C>T a c.-168G>C, přítomné v heterozygotním stavu. Všechny tyto mutace byly již dříve popsány ve spojitosti s HHCS (Millonig, Muckenthaler and Mueller 2010, Mumford et al. 1998, Balas et al. 1999, Campagnoli et al. 2002). Dvě segregovaly v rodině s fenotypem onemocnění a v jednom případě (c.-167C>T) se varianta vyskytla u probandky izolovaně. Před stanovením molekulární diagnózy byla u dvou probandů stanovena nesprávná diagnóza HH.

Ačkoli je HHCS je velmi vzácný s odhadovanou prevalencí 1 postižený na 200 000 jedinců, naše výsledky zdůrazňují potřebu dále zvyšovat povědomí o této nemoci (Craig et al. 2003). Ani nepřítomnost rodinné anamnézy nevyklučuje diagnózu HHCS, jelikož patogenní varianta se vzácně může objevit de novo. Alarmující je, že nekódující oblasti mohou být vynechávány z diagnostických genových panelů, čímž unikají detekci.

## **4.3. Molekulárně genetická analýza v rodině s chorioretinální dystrofií variabilně asociovanou s kolobomem duhovky, presenilní kataraktou, vrozeným glaukomem a albinismem**

Tato práce popisuje molekulárně genetickou analýzu třígenerační rodiny (rodina 10) s výskytem dvou klinických jednotek; retinální dystrofie s časnou manifestací, variabilně asociovanou s kolobomem duhovky, presenilní kataraktou a vrozeným glaukomem spolu s albinismem.

Klinické vyšetření probanda, odhalilo bilaterální retinální dystrofii, v minulosti chybně diagnostikovanou jako vrozenou toxoplazmózu (ve věku 13 let) spolu s kongenitální kataraktou. Při posledním vyšetření ve věku 41 let byla zdokumentována pokročilá oboustranná chorioretinální atrofie.

Proband měl čtyři děti; dvě dcery a dva syny, přičemž obě dcery postiženy podobným očním fenotypem ve variabilním rozsahu a stejně tak matka probanda.

Exomové sekvenování provedené u nejmladší dcery probanda odhalilo heterozygotní variantu n.37C>T v *MIR204*. (referenční sekvence NR\_029621.1). Segregační analýza potvrdila přítomnost varianty n.37C>T u všech dalších členů rodiny s diagnózou progresivní dystrofie sítnice, tj. u probanda, jeho matky a nejstarší dcery.

Varianta n.37C>T byla již v minulosti popsána u 6 členů pětigenerační rodiny britského původu spolu s fenotypem „retinální dystrofie s kolobomem duhovky s nebo bez vrozené katarakty“ (MIM #616722) (Conte et al. 2015).

Varianta n.37C>T molekuly miR-204 se nachází v místě tzv. seed sekvence, což je v pořadí 2. - 8. nukleotid miRNA vlásenky na jejím 5' konci. Seed sekvence je zodpovědná za rozpoznávání cílových molekul mRNA, jelikož s nimi vykazuje vysokou míru komplementarity. Substituce n.37C>T se nachází přímo v 5. místě této seed sekvence a vede ke změně rozpoznávacího místa, tím pádem také k cílení na jiný repertoár mRNA molekul.

Albinismus se v rodině vyskytl s variabilními projevy hned ve dvou generacích (manželka probanda: II:3, nejstarší dcera: III:1 a oba synové: III:2 a III:3). Mírnější forma se u synů III:2 a III:3 manifestovala pouze ve formě makulární hypoplazie.

U partnerky probanda se nám povedlo odhalit rozsáhlou přestavbu genu *OCA2* (MIM \*611409, referenční sekvence NM\_000275.3) na jedné alele a missense variantu c.1327G>A p.(Val443Ile) v pozici trans. Složitá genová přestavba byla již dříve několikrát popsána (Rooryck et al. 2011, Loftus et al. 2021). Jedná se o vystřížení téměř 184 kb dlouhého, úseku genu (zahrnující exony 3-19), který je invertován a inzertován do oblasti intronu 2.

Loftus a kol. navrhli označovat tuto strukturální variantu (SV) jako alelu „143 kb; 184 kb CxSV“ (Loftus et al. 2021). *In silico* programy predikovaly vznik aberantního transkriptu mRNA s novým sestřihovým místem mezi exony 2 a 20, což by mohlo vést k předčasnému zkrácení transkriptu a k tvorbě nefunkčního produktu p.(Ser77Hisfs\*7), pravděpodobně likvidovaném NMD mechanismem.

#### **4.4. Komplexní fenotypová a funkční analýza autozomálně dominantních i recesivních variant v genu *FOXE3***

Do rozsáhlé studie, která zahrnovala molekulárně genetickou diagnostiku 16 rodin z celého světa s nálezem patogenní varianty v genu *FOXE3* (referenční sekvence NM\_012186.3), bylo zařazeno také 12 pacientů z tří rodin českého původu (v původní publikaci rodiny 7, 15 a 16, Příloha 4). V případně rodiny 11, se jednalo o autozomálně

recesivní typ dědičnosti a ve zbývajících dvou případech šlo o autozomálně dominantní typ dědičnosti (rodina 12 a 13). Ve všech případech byla identifikována genetická příčina onemocnění a některé varianty byly ověřeny funkčními *in vitro* experimenty (také dvě ze čtyř variant nalezených u českých probandů).

U probandky z rodiny 11 byly nalezeny, na základě exomového sekvenování, dvě příčinné varianty v genu *FOXE3* c.244A>G p.(Met82Val) a c.543delG p.(Pro182Argfs\*42). Obě varianty také nesla sestra probandky, jejíž fenotyp byl podobný. Varianta c.244A>G byla již několikrát v literatuře popsána jako kauzální a v naší kohortě 16 rodin byla také nejčastější (Iseri et al. 2009). Místo, ve kterém se tato mutace nachází, je součástí FHD domény a je evolučně konzervované pro celou rodinu *FOX* genů, napříč mnoha taxony (Clark et al. 1993). Naopak varianta c.543delG nebyla doposud v literatuře popsána a jedná se o variantu, která způsobuje posun čtecího rámce, v jehož důsledku dochází k začlenění 41 chybných aminokyselin do vznikajícího peptidu a tím také k začlenění předčasného stop kodonu.

Na základě exomových dat probandky z rodiny 12 byla identifikována jedna varianta v genu *FOXE3* c.959G>C p.(\*320Serext\*72). Tato varianta se nachází přímo v sekvenci stop-kodonu (TGA>TCA), zachovává sice čtecí rámec, ale přidává na C-konec peptidu 72 aminokyselin. Takto může dojít ke změně celé *FOXE3* sekundární a terciální struktury a tím i jeho funkce jako transkripčního faktoru a schopnosti vytvářet dimery (Bremond-Gignac et al. 2010).

Na základě exomových dat probanda z rodiny 13 byla nalezena heterozygotně varianta v genu *FOXE3* c.958T>C p.(\*320Argext\*72). Její přítomnost byla následně prokázána také u dcery, sestry, neteře i jeho matky (tyto však měly pouze kongenitální nebo juvenilní oboustranné katarakty). Tato varianta také modifikuje stop-kodon (TGA>CGA), podobným způsobem jako v případě rodiny 12, zachovává čtecí rámec a také přidává na C-konec proteinu *FOXE3* 72 aminokyselin.

V rámci přípravy publikace, proběhlo na pracovišti zahraničního spolupracovníka prof. E. Seminy (Medical College of Wisconsin, USA) také funkční ověření několika variant, včetně dvou variant českých probandů; p.Met82Val a p.\*320Serext\*72. Kombinace funkčních analýz prokázala jasně patogenní efekt obou těchto variant.

#### **4.5. Molekulárně genetická analýza a popis fenotypu X-vázané megalokornei**

Do studie bylo celkově zařazeno 10 probandů, přičemž 4 z nich byli českého původu. Na základě Sangerova sekvenování kódujících úseků genu *CHRD1* (referenční sekvence

NM\_001143981.2) se nám ve všech případech povedlo nalézt pravděpodobně kauzální variantu a všechny byly popsány zcela poprvé; NM\_001143981.2: c.1123C>T, c.976A>T, c.94+1G>A a c.207G>C. Varianty byly následně podrobeny klasifikaci dle ACMG, a až na variantu c.207G>C, byly všechny hodnoceny jako patogenní a ze svého principu (nesmyslné, nebo ovlivňující sestřih) vedou ke ztrátě funkce (loss-of-function) genu *CHRDLI*.

Varianta c.207G>C p.(Glu69Asp) byla dle ACMG klasifikace hodnocena jako varianta nejasného významu (PM2, PP3, PP4). Tato varianta se nachází přímo na hranici exonu a intronu. Ke genetickému vyšetření byl dostupný pouze proband a nemohli jsme proto sledovat její kosegregaci s fenotypem v rodině. Některé *in silico* predikční programy variantu označovaly jako potenciálně ovlivňující sestřih, což také vyplývá z její polohy na rozhraní exon/intron. Pro definitivní ustanovení patogenity této varianty by bylo potřeba provést funkční ověření sestřihu pre-mRNA na mRNA.

Všichni probandi s hemizygotními patogenními variantami v *CHRDLI* vykazovali charakteristický fenotyp MGC1 se zvýšeným horizontálním průměrem rohovky (rozsah 13,5–16,0 mm), sníženou centrální tloušťkou rohovky (rozsah 354–456 µm) a abnormálně hlubokou přední komorou (rozsah 4,66–6,31 mm). Atrofie duhovky byla dokumentována u 4 z 5 pacientů. Další doprovodné fenotypové projevy jako hypoplazie duhovky, presenilní katarakta, nebo gerontoxon (šedobílý prstenec lipidových depozit rohovky při limbu oka) vznikaly s věkem. Za zmínku stojí především klinický nálezn probanda IV:1 z rodiny 17, který si ve věku 39 let všimnul defektů zorného pole z důvodu bilaterálního glaukomu, který ve spojitosti s MGC1 nebývá běžně popisován.

#### **4.6. Genetická a fenotypová charakterizace kohorty pacientů s výskytem Axenfeldova-Riegerova syndromu**

Do doposud nejrozsáhlejší studie pacientů s ARS bylo začleněno 128 jedinců s kauzálními variantami v genech *PITX2* (referenční sekvence NM\_153427.2) a *FOXC1* (referenční sekvence NM\_001453.2), z toho 81 nových jedinců, včetně 8 pacientů z 5 rodin českého původu. Takto velký soubor pacientů nám pomohl upřesnit fenotypové projevy jednotlivých typů ARS.

Ve skupině probandů českého původu se vyskytovaly dvě rodiny s nálezem mutace v genu *PITX2*, dvě s nálezem varianty v genu *FOXC1* a jedna probandka nesla rozsáhlou (2,7 Mbp) delecí na konci krátkého raménka chromozomu 6, na kterém se nachází hned několik genů, mezi nimi také *FOXC1*.

Souhrnné výsledky velkého počtu vyšetřených jedinců naznačují, že k rozvoji sekundárního glaukomu nedošlo pouze u přibližně 50 % jedinců, jak bylo doposud v literatuře uváděno, ale až u 66 – 72 % (Alward 2000). U pacientů s variantami v *FOXC1* docházelo k časnějšímu vzniku glaukomu (již v dětském věku) a oftalmologické i systémové projevy pacientů byly výrazně variabilnější v porovnání se skupinou s mutacemi v *PITX2*. *PITX2* podmíněné ARS zahrnovalo typické spektrum ASD, dále zubní anomálie (mikrodoncii, hypodoncii nebo oligodoncii) a pupeční anomálie. Na druhé straně, fenotypické spektrum ARS podmíněné mutacemi ve *FOXC1* zahrnovalo výrazně více očních (rohovkové opacity, aniridie) a systémových projevů (vrozené srdeční vady, poruchy sluchu, anomálie skeletu, hypermobilita, bolesti kloubů, hypoplazie skloviny, vysoká zubní kazivost a poruchy příjmu potravy se strukturálními anomáliemi jícnu). Dodatečné MRI mozku vyšetřovaných jedinců odhalilo vysoce penetrantní hyperintenzitu bílé hmoty mozkové, kolpocefalii/ventrikulomegalii a časté arachnoidální cysty.

Jednotné pojmenování ARS pro všechny jedince nesoucí patogenní varianty ve *FOXC1* nebo *PITX2* genu může být pro probandy a jejich rodinné příslušníky velmi matoucí a nedává jim velmi přesné informace o prognóze jejich stavu. Výsledky z této rozsáhlé studie byly použity k vytvoření dvou specifických léčebných a preventivních plánů specifických pro tyto dva typy ARS, v závislosti na genotypu.

#### **4.6. Molekulárně genetická analýza pacientky s dysgenezí předního segmentu oka a výskytem tzv. slimáčích stop na rohovce**

„Snail-tracks“ jsou lineární rohovkové léze, překládané jako slimáčí stopy, jevící se při vyšetření šterbinovou lampou jako šedo-bílé pruhy a skvrny nacházející se na vnitřním povrchu rohovky. Jedná se o změny v uskupení endotelových buněk a Descemetovy membrány. Klinické vyšetření pacientky s ASD a jednostranným nálezem slimáčích stop na levém oku prokázalo také mírnou hypoplazii duhovky a korektopii na obou očích a iridokorneální adheze na pravém oku. Kromě typických rysů ASD byly rohovky ploché, se středními hodnotami keratometrie 38,8 D na pravém a 39,5 D na levém oku. Hustota endotelových buněk byla u pacientky oboustranně snížena na hodnoty 1964 buněk/mm<sup>2</sup> na oku pravém a 1373 buněk/mm<sup>2</sup> na oku levém (referenční hodnota v rané dospělosti přibližně 2940 (±345) buněk/mm<sup>2</sup>, v pozdějším věku 2394 (±416) buněk/mm<sup>2</sup>) (Vaiciulienė et al. 2022) (Galgauskas et al. 2012). U pacientky byl zaznamenán také mírný kraniofaciální dysmorfismus (hypertelorismus a široký plochý hřbet nosu) bez nálezů dalších systémových poruch.



Analýza exomových dat odhalila doposud nepopsanou variantu v genu *FOXCI*: NM\_001453.3: c.605delC p.(Pro202Argfs\*113) v heterozygotním stavu. Přítomnost varianty byla následně ověřena pomocí Sangerova sekvenování. Tato varianta nebyla přítomna u rodičů ani u nepostížené sestry. Testování maternity a paternity podpořilo její vznik *de novo* mechanismem, nebo jako následek germinálního mozaicismu. Dle doporučení ACMG byla klasifikována jako patogenní (PVS1, PS2, PP4). Vyšetření bylo doplněno také o CNV analýzu, v rámci které nebyly zjištěny žádné další varianty/delece/duplikace/inzerce asociované s endotelovými dystrofiemi rohovky nebo vznikem ASD.

Tato práce rozšiřuje známé spektrum popsanych mutací v genu *FOXCI* a navíc byla zcela poprvé varianta v tomto genu nalezena u pacientky s výskytem slimáčích stop na rohovce. Vzhledem k tomu, že *FOXCI* je transkripční faktor nezbytný pro diferenciaci mezenchymálních buněk, které jsou zodpovědné za vývoj rohovky, nelze vyloučit, že slimáččí stopy jsou vzácným projevem ASD asociované s *FOXCI*. K potvrzení této souvislosti jsou však nutné další studie.

## 6. Diskuze a závěr

Tato práce byla zaměřena na hledání genetických příčin vývojových anomálií postihujících přední část oka, velice heterogenní skupiny onemocnění vykazující všechny typy Mendelovské dědičnosti. V průběhu vypracovávání dílčích cílů práce jsme se pokusili navrhnout nový diagnostický algoritmus, který by mohl pomoci zvýšit procento ustanovení molekulární diagnózy pacientů s izolovanými i systémovými ASD a kataraktami a zároveň také zkrátit čas k jejímu určení.

Celkem bylo vyšetřeno a analyzováno 94 pacientů s kongenitálními kataraktami a ASD ze 60 rodin, a dále více než 80 rodinných příslušníků prvního stupně. U přibližně poloviny probandů byla katarakta a ASD asociovaná s postižením dalších orgánů anebo s přidruženou oční vadou. Do výše zmíněných publikací bylo zahrnuto 51 pacientů z 23 rodin a 33 rodinných příslušníků prvního stupně. Z 24 probandů z 23 publikovaných rodin (v jednom případě šlo o souběh dvou klinických jednotek) se nám na základě přímého sekvenování podařilo odhalit 13 případů, 9 případů pomohlo odhalit exomové sekvenování, v jednom případě genomové sekvenování a v posledním případě kombinace CNV vyšetření a genomového sekvenování.

Hlavním cílem tedy byl výzkum molekulárně genetických příčin ASD a kongenitálních katarakt a optimalizace diagnostického procesu u těchto klinických jednotek v rámci specifík národního zdravotního systému. Naplánované cíle byly v tomto ohledu splněny v plném rozsahu.

Výsledky práce shrnují informace o výskytu, fenotypu a příčinných patogenních variant a mechanismů vzniku různých typů ASD a kongenitálních katarakt. V průběhu vypracovávání dílčích cílů, byla potvrzena nezastupitelná úloha exomového a také genomového sekvenování v laboratorní diagnostice těchto chorob. Význam exomového sekvenování jako součást diagnostického procesu byl potvrzen, jelikož pomohlo identifikovat kauzální varianty u 38 % pacientů z naší kohorty. Genomové sekvenování se osvědčilo jako spolehlivá metoda ke stanovení přesného rozsahu a uspořádání složité přestavby v jednom případě (4 % kauzalit). Vzhledem k tomu, že funkční anotace genomových dat je stále na prahu našeho poznání, výtěžek při stanovení příčinných variant neměl větší přidanou hodnotu.

Tato práce mimo jiné také upozorňuje na fakt, že jak kongenitální katarakty, pak také ADS mohou být způsobené i nekódujícími variantami a na základě i těchto výsledků bylo doporučeno akreditované laboratoři Agel v České republice zařadit do

diagnostických panelů vybranou nekódující oblast genu *FTL* (do budoucna také regulační oblast *MIR204*).

Molekulárně genetická diagnostika pacientů s ASD a kataraktami hraje nezastupitelnou roli při identifikaci genů, které se zapojují během různých fází vývoje oka, a tím také zlepšuje naše chápání jednotlivých biologických mechanismů.

Výsledky, kterých jsme dosáhli, pomohly zlepšit poradenství pacientům a jejich příbuzným z hlediska prognózy ztráty zrakových funkcí, rizika vzniku sekundárního glaukomu (a tedy v rámci personalizované medicíny i optimalizovat frekvenci pravidelných kontrol u oftalmologa) a také jsme pomohli upřesnit údaje o rizicích dalšího přenosu onemocnění v jednotlivých rodinách. Pacient se znalostí vlastní molekulární diagnózy má výraznou výhodu: konec nekonečného diagnostického procesu, stanovení prognózy a upřesnění léčby, přístup ke správnému genetickému poradenství a potvrzení způsobilosti (nebo nezpůsobilosti) pro klinické studie a v budoucnu také případné genové terapie. Výsledky práce umožnily v kontextu personalizované medicíny zavedení multidisciplinárního přístupu k pacientům s kongenitálními kataraktami a ASD jak na úrovni klinické, tak i výzkumné.

Mimo publikační výsledky měl tak projekt velmi pozitivní dopad na péči o pacienty s ASD kongenitálními kataraktami a vedl ke značné osvětě jak mezi odborníky, tak i laiky, kteří se i na základě výsledků této práce obracejí na pracoviště Klinické oční genetiky při Oční klinice 1.LF UK a VFN v Praze. Rozšířila se i síť spolupracujících oftalmologů a pediatrů v rámci ČR.

Správně provedená a interpretovaná molekulárně genetická analýza v rodinách postižených jedinců, pomohla identifikovat jedince rizikové pro rozvoj onemocnění, pomohla v odhadu jejich prognózy a začlenila se tak do standardní klinické praxe. Závěrem je potřeba zdůraznit, že centralizace péče o pacienty s ASD a kongenitálními kataraktami a jejich molekulárně genetická analýza jsou zásadními faktory vedoucími ke zkrácení diagnostického procesu u těchto pacientů.

## 7. Použitá literatura

- Alward, W. L. (2000) Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. *Am J Ophthalmol*, 130, 107-15.
- Aponte, E. P., N. Diehl & B. G. Mohny (2010) Incidence and clinical characteristics of childhood glaucoma: a population-based study. *Arch Ophthalmol*, 128, 478-82.
- Balas, A., M. J. Aviles, F. Garcia-Sanchez & J. L. Vicario (1999) Description of a new mutation in the L-ferrin iron-responsive element associated with hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome in a Spanish family. *Blood*, 93, 4020-1.
- Bax, B. E. (2021) Biomarkers in Rare Diseases. *Int J Mol Sci*, 22.
- Bennett, R. L., K. A. Steinhaus, S. B. Uhrich, C. K. O'Sullivan, R. G. Resta, D. Lochner-Doyle, D. S. Markel, V. Vincent & J. Hamanishi (1995) Recommendations for standardized human pedigree nomenclature. *J Genet Couns*, 4, 267-79.
- Bremond-Gignac, D., P. Bitoun, L. M. Reis, H. Copin, J. C. Murray & E. V. Semina (2010) Identification of dominant FOXE3 and PAX6 mutations in patients with congenital cataract and aniridia. *Mol Vis*, 16, 1705-11.
- Campagnoli, M. F., R. Pimazzoni, S. Bosio, G. Zecchina, M. DeGobbi, P. Bosso, B. Oldani & U. Ramenghi (2002) Onset of cataract in early infancy associated with a 32G-->C transition in the iron responsive element of L-ferritin. *Eur J Pediatr*, 161, 499-502.
- Clark, K. L., E. D. Halay, E. Lai & S. K. Burley (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, 364, 412-20.
- Conte, I., K. D. Hadfield, S. Barbato, S. Carrella, M. Pizzo, R. S. Bhat, A. Carissimo, M. Karali, L. F. Porter, J. Urquhart, S. Hateley, J. O'Sullivan, F. D. Manson, S. C. Neuhaus, S. Banfi & G. C. Black (2015) MiR-204 is responsible for inherited retinal dystrophy associated with ocular coloboma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E3236-45.
- Craig, J. E., J. B. Clark, J. L. McLeod, M. A. Kirkland, G. Grant, J. E. Elder, M. G. Toohey, L. Kowal, H. F. Savoia, C. Chen, S. Roberts, M. G. Wirth & D. A. Mackey (2003) Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: prevalence, lens morphology, spectrum of mutations, and clinical presentations. *Arch Ophthalmol*, 121, 1753-61.
- Galgauskas, S., D. Krasauskaite, M. Pajaujis, G. Juodkaite & R. S. Asoklis (2012) Central corneal thickness and corneal endothelial characteristics in healthy, cataract, and glaucoma patients. *Clin Ophthalmol*, 6, 1195-9.
- Haargaard, B., J. Wohlfahrt, H. C. Fledelius, T. Rosenberg & M. Melbye (2004) A nationwide Danish study of 1027 cases of congenital/infantile cataracts: etiological and clinical classifications. *Ophthalmology*, 111, 2292-8.
- Haendel, M., N. Vasilevsky, D. Unni, C. Bologna, N. Harris, H. Rehm, A. Hamosh, G. Baynam, T. Groza, J. McMurry, H. Dawkins, A. Rath, C. Thaxon, G. Bocci, M. P. Joachimiak, S. Kohler, P. N. Robinson, C. Mungall & T. I. Oprea (2020) How many rare diseases are there? *Nat Rev Drug Discov*, 19, 77-78.
- Idrees, F., D. Vaideanu, S. G. Fraser, J. C. Sowden & P. T. Khaw (2006) A review of anterior segment dysgeneses. *Surv Ophthalmol*, 51, 213-31.
- Iseri, S. U., R. J. Osborne, M. Farrall, A. W. Wyatt, G. Mirza, G. Nurnberg, C. Kluck, H. Herbert, A. Martin, M. S. Hussain, J. R. Collin, M. Lathrop, P. Nurnberg, J. Ragoussis & N. K. Ragge (2009) Seeing clearly: the dominant and recessive nature of FOXE3 in eye developmental anomalies. *Hum Mutat*, 30, 1378-86.

- Loftus, S. K., L. Lundh, D. E. Watkins-Chow, L. L. Baxter, E. Pairo-Castineira, P. Nisc Comparative Sequencing, I. J. Jackson, W. S. Oetting, W. J. Pavan & D. R. Adams (2021) A custom capture sequence approach for oculocutaneous albinism identifies structural variant alleles at the OCA2 locus. *Hum Mutat*, 42, 1239-1253.
- Ma, A. S., J. R. Grigg & R. V. Jamieson (2019) Phenotype-genotype correlations and emerging pathways in ocular anterior segment dysgenesis. *Hum Genet*, 138, 899-915.
- Meyer-Marcotty, P., N. Weisschuh, P. Dressler, J. Hartmann & A. Stellzig-Eisenhauer (2008) Morphology of the sella turcica in Axenfeld-Rieger syndrome with PITX2 mutation. *J Oral Pathol Med*, 37, 504-10.
- Millonig, G., M. U. Muckenthaler & S. Mueller (2010) Hyperferritinaemia-cataract syndrome: worldwide mutations and phenotype of an increasingly diagnosed genetic disorder. *Hum Genomics*, 4, 250-62.
- Moosajee, M., M. Hingorani & A. T. Moore. 1993. PAX6-Related Aniridia. In *GeneReviews((R))*, eds. M. P. Adam, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp & A. Amemiya. Seattle (WA).
- Mumford, A. D., T. Vulliamy, J. Lindsay & A. Watson (1998) Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: two novel mutations in the L-ferritin iron-responsive element. *Blood*, 91, 367-8.
- Ott, J., J. Wang & S. M. Leal (2015) Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet*, 16, 275-84.
- Perez-Solorzano, S., O. F. Chacon-Camacho, M. C. Astiazaran, G. Ledesma-Gil & J. C. Zenteno (2017) PAX6 allelic heterogeneity in Mexican congenital aniridia patients: expanding the mutational spectrum with seven novel pathogenic variants. *Clin Exp Ophthalmol*, 45, 875-883.
- Reis, L. M. & E. V. Semina (2011) Genetics of anterior segment dysgenesis disorders. *Curr Opin Ophthalmol*, 22, 314-24.
- Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H. L. Rehm & A. L. Q. A. Committee (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 17, 405-24.
- Rooryck, C., F. Morice-Picard, E. Lasseaux, D. Cailley, H. Dollfus, S. Defoort-Dhellemme, B. Duban-Bedu, T. J. de Ravel, A. Taieb, D. Lacombe & B. Arveiler (2011) High resolution mapping of OCA2 intragenic rearrangements and identification of a founder effect associated with a deletion in Polish albino patients. *Hum Genet*, 129, 199-208.
- Royer-Bertrand, B., K. Cisarova, F. Niel-Butschi, L. Mittaz-Crettol, H. Fodstad & A. Superti-Furga (2021) CNV Detection from Exome Sequencing Data in Routine Diagnostics of Rare Genetic Disorders: Opportunities and Limitations. *Genes (Basel)*, 12.
- Seifi, M. & M. A. Walter (2018) Axenfeld-Rieger syndrome. *Clin Genet*, 93, 1123-1130.
- Sowden, J. C. (2007) Molecular and developmental mechanisms of anterior segment dysgenesis. *Eye (Lond)*, 21, 1310-8.
- Titheradge, H., F. Togneri, D. McMullan, L. Brueton, D. Lim & D. Williams (2014) Axenfeld-Rieger syndrome: further clinical and array delineation of four unrelated patients with a 4q25 microdeletion. *Am J Med Genet A*, 164A, 1695-701.
- Vaiciulienė, R., N. Rylskytė, G. Baguzytė & V. Jasinskis (2022) Risk factors for fluctuations in corneal endothelial cell density (Review). *Exp Ther Med*, 23, 129.

## 8. Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

### Prvoautorské

1. **Moravikova J**, Kozmik Z, Hlavata L, Putzova M, Skalicka P, Michaelides M, Malinka F, Dudakova L, Liskova P. **Phenotype Variability in Czech Patients Carrying PAX6 Disease-Causing Variants**. *Folia Biol.* (2020);66(4):123-132. IF = 1,167, O3
2. **Moravikova J**, Honzik T, Jadvidzakova E, Zdrahalova K, Kremlikova Pourova R, Korbasova M, Liskova P, Dudakova L. **Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome in three Czech families: molecular genetic testing and clinical implications**. *J AAPOS.* (2020) Dec;24(6):352.e1-352.e5. doi: 10.1016/j.jaapos.2020.07.014. IF = 1,6, Q2
3. **Jedlickova J**, Vajter M, Barta T, Black G, Perveen R, Mares J, Fichtl M, Kousal B, Dudakova L and Liskova P. **MIR204 n.37C>T variant as a cause of chorioretinal dystrophy variably associated with iris coloboma, early-onset cataracts and congenital glaucoma**. *Clinical Genetics.* (2023);1-9. doi:10.1111/cge. IF = 4,296, Q1

### Spoluautorské

1. Reis LM, Sorokina EA, Dudakova L, **Moravikova J**, Skalicka P, Malinka F, Seese SE, Thompson S, Bardakjian T, Capasso J, Allen W, Glaser T, Levin AV, Schneider A, Khan A, Liskova P, Semina EV. **Comprehensive phenotypic and functional analysis of dominant and recessive FOXE3 alleles in ocular developmental disorders**. *Hum Mol Genet.* (2021) Aug 12;30(17):1591-1606. doi: 10.1093/hmg/ddab142. IF = 3,5, Q1
2. Dudakova L, Tuft S, Cheong SS, Skalicka P, **Jedlickova J**, Fichtl M, Hlozaneck M, Filous A, Vaneckova M, Vincent AL, Hardcastle AJ, Davidson AE, Liskova P. **Novel disease-causing variants and phenotypic features of X-linked megalocornea**. *Acta Ophthalmol.* (2022) Jun;100(4):431-439. doi: 10.1111/aos.15022. IF = 3,4, Q1
3. Reis LM, Maheshwari M, Capasso J, Atilla H, Dudakova L, Thompson S, Zitano L, Lay-Son G, Lowry RB, Black J, Lee J, Shue A, Kremlikova Pourova R, Vaneckova M, Skalicka P, **Jedlickova J**, Trkova M, Williams B, Richard G, Bachman K, Seeley AH, Costakos D, Glaser TM, Levin AV, Liskova P, Murray JC, Semina EV. **Axenfeld-Rieger syndrome: more than meets the eye**. *J Med Genet.* (2022) Jul 26;jmedgenet-2022-108646. doi: 10.1136/jmg-2022-108646. IF = 4, Q1
4. Skalicka P, **Jedlickova J**, Horinek A, Trkova M, Davidson AE, Tuft SJ, Dudakova L, Liskova P. **Snail Track Lesion with Flat Keratometry in Anterior Segment Dysgenesis Caused by a Novel FOXC1 Variant**. *J Clin Med.* (2022) Aug 31;11(17):5166. doi: 10.3390/jcm11175166. IF = 3,9, Q1

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

a) s IF

Liskova P, Hafford-Tear NJ, Skalicka P, Malinka F, **Jedlickova J**, Ďudáková L, Pontikos N, Davidson AE, Tuft S. **Posterior corneal vesicles are not associated with the genetic variants that cause posterior polymorphous corneal dystrophy.** *Acta Ophthalmol.* (2022) Nov;100(7):e1426-e1430., IF = 3,4, Q1

Liu S, Sadan AN, Muthusamy K, Zarouchlioti C, **Jedlickova J**, Pontikos N, Thaung C, Hardcastle AJ, Netukova M, Skalicka P, Dudakova L, Bunce C, Tuft SJ, Davidson AE, Liskova P. **Phenotype and genotype of concurrent keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy.** *Acta Ophthalmol.* (2023) Mar 7., IF = 3,4, Q1

b) bez IF

Hlavatá L, Dudakova L, **Moravikova J**, Zobanova A, Kousal B, Liskova P. **Molekulárně genetická příčina achromatopsie u dvou pacientů českého původu.** *Cesk Slov Oftalmol.* (2019); 366–370.

Vergaro A, Rezková L, Fichtl M, **Jedličková J**, Ďudáková L, Růžičková E, Lišková P. **Primary open-angle glaucoma due to mutations in the MYOC gene.** *Cesk Slov Oftalmol.* (2022) Summer;78(5):242-248.