

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Valeriia Kopytko

Stav metylace DNA v genu *SHOX* a jeho význam v etiologii Léřiho-
Weillovy dyschondrosteózy

The state of DNA methylation in the *SHOX* gene and its importance in the etiology of
Léri-Weill dyschondrosteosis

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Roman Šolc, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Valeriia Kopytko

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucímu své práce RNDr. Romanu Šolcovi, Ph.D., za jeho cenné rady, odborný dohled, kontrolu této práce z jazykového hlediska a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování práce věnoval. Mé díky patří také RNDr. Kateřině Hirschfeldové, Ph.D. a RNDr. Pavlíně Čapkové, Ph.D., za poskytnutí vzorků patientské DNA pro účely této studie. Ráda bych také poděkovala RNDr. Štěpánce Hrdé, Ph.D., za pomoc při optimalizaci sekvenace. Obzvláště bych pak chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře molekulární antropologie za vytvoření přátelské a příjemné pracovní atmosféry. V neposlední řadě velice děkuji své rodině za jejich podporu a trpělivost.

ABSTRAKT

Úvod: Gen *SHOX* se nachází v pseudoautosomálním regionu 1 na konci krátkého raménka chromosomů X a Y (Xp22.32/Yp11.32) a kóduje transkripční faktor, který reguluje proliferaci a diferenciaci chondrocytů v růstových chrupavkách. Haploinsuficience *SHOX* je asociována s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou (LWD) a idiopatickým nízkým vzrůstem (ISS). Ve většině případů je způsobena CNV („copy number variation“) zahrnujícími exony *SHOX* a/nebo jeho regulační elementy, nicméně přibližně u 30 % případů zůstává příčina patologického fenotypu neodhalena. Oproti delecím zahrnujícím regulační elementy *SHOX*, zůstává význam duplikací v některých případech kontroverzní. Duplikace zahrnující regulační prvky v regionu *SHOX* byly popsány u pacientů s fenotypem LWD/ISS, ale také u zdravých jedinců. Za normálního stavu jsou CpG ostrůvky obklopující gen *SHOX* hypometylovány, což odpovídá skutečnosti, že *SHOX* nepodléhá inaktivaci. Některé studie ovšem předpokládají, že změny v úrovni metylace DNA genů mohou být asociovány s přestavbami v jejich okolí a známá je též role změn profilu metylace DNA v etiopatogenezi některých chorob. Cílem této práce bylo ověřit možný vliv duplikací zahrnujících regulační sekvence genu *SHOX* na stav metylace DNA tohoto genu, a to u pacientů s fenotypem LWD. Dalším cílem bylo ověřit, zda změny v metylačním profilu *SHOX* u pacientů s LWD/ISS bez detekovaných mutací mohou být zodpovědné za vznik patologického fenotypu.

Materiál a metody: Výzkumný soubor se skládal ze: a) 20 pacientů s fenotypem LWD a duplikací zahrnující regulační elementy *SHOX*; b) 30 pacientů s fenotypem LWD/ISS bez detekovaných strukturních a bodových mutací v oblasti *SHOX*; c) 23 zdravých jedinců. Zaměřili jsme se na stav metylace dvou CpG ostrůvků v „up-stream“ oblasti genu *SHOX*. Vzorky genomické DNA nejdříve podstoupily bisulfitovou konverzi, následně byly amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce a produkty reakce byly nakonec osekvenovány pomocí Sangerovy sekvenční metody. Stanovení míry metylace jednotlivých CpG dinukleotidů bylo provedeno za použití softwaru ABSP tool.

Výsledky: Naše výsledky naznačují, že CpG ostrůvky v oblasti *SHOX* vykazují nižší úroveň metylace u pacientů s duplikací, než u zdravých jedinců, ovšem pouze u jednoho ostrůvku byl zaznamenaný rozdíl statisticky významný (CpG1: $p = 0,4224$; CpG 3: $p < 0,0001$). Výsledky metylačního profilování CpG ostrůvků u pacientů bez nalezené bodové či strukturní mutace naznačují, že metylační indexy pacientů se odlišovaly od

průměru skupiny zdravých jedinců alespoň o dvojnásobek směrodatné odchylky u 86,6 % pacientů v případě ostrůvku CpG 1, a u 70 % pacientů ve sledovaném úseku ostrůvku CpG 3. Rozdíl v úrovni metylace byl ovšem pozorován u jednotlivých CpG dinukleotidů, nikoliv u všech CpG v ostrůvku zároveň.

Závěr: Na základě provedené analýzy jsme zjistili, že duplikace v regulačních oblastech genu *SHOX* u pacientů s fenotypem LWD vedou ke statisticky významnému snížení míry metylace DNA pouze v CpG 3 ostrůvku genu *SHOX*. Biologický efekt tohoto rozdílu však bude patrně nevýznamný vzhledem k obecně velmi nízké míře metylace. Metylační indexy pacientů s fenotypem LWD/ISS bez detekovaných mutací se odchyľují od průměru zdravých jedinců, nicméně jedná se o rozdíly v jednotkách procentních bodů. Za patologický fenotyp u těchto pacientů budou pravděpodobně zodpovědné jiné molekulárně-genetické mechanismy, nežli metylace DNA. Otázkami pro další výzkum zůstávají efekty konkrétních duplikací v závislosti na jejich lokaci, síla reálného biologického efektu pozorované změny metylace i význam změn profilu metylací v etiologii LWD a ISS.

Klíčová slova: metylace DNA, CpG ostrůvky, haploinsuficience, gen *SHOX*, Lériho-Weilova dyschondrosteóza

ABSTRACT

Introduction: The *SHOX* gene is located in pseudoautosomal region 1 at the end of the short arm of the X and Y chromosomes (Xp22.32/Yp11.32) and encodes a transcription factor that regulates chondrocyte proliferation and differentiation in growth plate. *SHOX* haploinsufficiency is associated with Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). In most cases, it is caused by a CNV (copy number variation) involving *SHOX* exons and/or its regulatory elements; however, in approximately 30% of cases, the cause of the pathological phenotype remains undiscovered. Compared to deletions involving *SHOX* regulatory elements, the significance of duplications remains controversial in some cases. Duplications involving regulatory elements in the *SHOX* region have been described in patients with the LWD/ISS phenotype, but also in healthy individuals. Under normal conditions, the CpG islands flanking the *SHOX* gene are hypomethylated, which corresponds to the fact that *SHOX* escapes inactivation. However, some studies assume that changes in the DNA methylation level of genes can be associated with rearrangements in their surroundings, the role of changes in the DNA methylation profile in the etiopathogenesis of some diseases is also known. The aim of this thesis was to verify the possible influence of duplications involving regulatory sequences of the *SHOX* gene on the DNA methylation status of this gene, in patients with the LWD phenotype. Another goal was to verify whether changes in *SHOX* methylation profiles in LWD/ISS patients without mutations could be responsible for the pathological phenotype.

Material and Methods: Material consisted of: a) 20 patients with LWD phenotype and duplication involving *SHOX* regulatory elements; b) 30 patients with LWD/ISS phenotype without any structural or point mutations in the *SHOX* region; c) 23 healthy individuals. We focused on the methylation status of two CpG islands in the up-stream region of the *SHOX*. Genomic DNA samples were first subjected to bisulfite conversion, then amplified using the polymerase chain reaction, and the reaction products were finally sequenced using the Sanger sequencing method. Determination of the level of methylation of individual CpG dinucleotides was performed using the ABSP tool software.

Results: Our results indicate, that CpG islands in the *SHOX* region show a lower level of methylation in patients carrying a duplications than in healthy individuals, but only one island showed a statistically significant difference (CpG 1: $p = 0,4224$; CpG 3: $p <$

0,0001). The results of methylation profiling of CpG islands in patients without a point or structural mutation indicate that the methylation indexes of patients differed from the average of the group of healthy individuals by at least $\pm 2SD$ in 86,6 % of patients in the case of CpG 1 island, and in 70 % of patients in the monitored section of CpG 3 island. However, the difference in methylation level was observed for individual CpG dinucleotides, not for all CpGs in the island simultaneously.

Conclusion: Based on the analysis, we found that duplications in the regulatory regions of the *SHOX* gene in patients with the LWD phenotype lead to a statistically significant decrease in the level of DNA methylation only in the CpG 3 island. However, the biological effect of this difference will probably be insignificant due to the generally very low level of methylation. The methylation indexes of patients with the LWD/ISS phenotype without any mutations deviate from the mean of healthy individuals; however, these differences are in units of percentage points. Molecular-genetic mechanisms other than DNA methylation are likely to be responsible for the pathological phenotype in these patients. Questions for further research include the effects of specific duplications depending on their location, the strength of the real biological effect of the observed methylation changes, and the significance of changes in the methylation profile in the etiology of LWD and ISS.

Key words: DNA methylation, CpG islands, haploinsufficiency, *SHOX* gene, Léri-Weill dyschondrosteosis

OBSAH

1 ÚVOD	10
1.1 Epigenetické mechanismy	10
1.1.1 Metylace DNA	10
1.2 Gen <i>SHOX</i>	13
1.2.1 Struktura genu <i>SHOX</i>	15
1.2.2 Exprese <i>SHOX</i>	17
1.2.3 Protein <i>SHOX</i> : funkce a interakce	18
1.2.4 Regulační mechanismy <i>SHOX</i>	21
1.2.5 Mutace genu <i>SHOX</i>	24
1.3 Lériho-Weillova dyschondrosteóza	25
1.3.1 Haploinsuficience <i>SHOX</i>	27
1.3.2 Molekulární podstata syndromu Léri-Weill.....	28
1.4 Změny metylačního profilu genu <i>SHOX</i>	31
2 CÍLE PRÁCE	33
3 MATERIÁL A METODY	34
3.1 Výzkumný soubor.....	34
3.1.1 Izolace DNA.....	36
3.2 Bisulfitová konverze	36
3.2.1 Měření koncentrace DNA	37
3.3 Polymerázová řetězová reakce.....	38
3.4 Gelová elektroforéza.....	40
3.5 Bisulfitová sekvenace	41
3.6 Zpracování chromatogramu a výpočet úrovně metylace	41
3.7 Ověření přesnosti bisulfitové sekvenace.....	42
4 VÝSLEDKY	44

4.1 Srovnání úrovně metylace DNA u ostrůvku CpG 1	44
4.1.1 Srovnání úrovně metylace jednotlivých CpG dinukleotidů v CpG 1 ostrůvku	45
4.2 Srovnání úrovně metylace DNA u ostrůvku CpG 3	49
4.2.1 Srovnání úrovně metylace jednotlivých CpG dinukleotidů v CpG 3 ostrůvku	50
4.3 Metylační profilování u pacientů bez kauzální strukturní nebo bodové mutace v genu <i>SHOX</i>	53
4.4 Ověření přesnosti bisulfitové sekvenace.....	57
5 DISKUZE.....	60
6 ZÁVĚR	66
SEZNAM ZKRATEK	67
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	70
Příloha 1 – Porovnání úrovně metylace na základě lokalizace duplikací.....	85
Příloha 2 – Charakteristika pacientů bez detekovaných mutací	87

1 ÚVOD

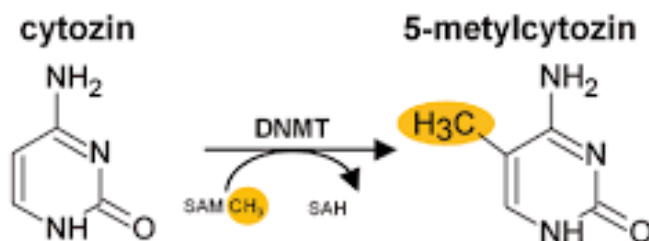
1.1 Epigenetické mechanismy

Epigenetické mechanismy jsou důležitými regulátory genové exprese, které vytvářejí potenciálně dědičné změny v genové expresi, aniž by se změnila základní nukleotidová sekvence DNA (deoxyribonukleová kyselina). Epigenetické změny přetrvávají v řadě mitotických dělení somatických buněk a mohou být předávány i dalším generacím; jejich typickým projevem je variabilní expresivita a neúplná penetrance. Epigenetické mechanismy jsou také základem procesů zásadních pro lidský vývoj, jako je udržování pluripotence, potlačení exprese transponovatelných elementů a modifikace transkripce a translace genů změnou dostupnosti promotoru či destabilizací cílových transkriptů. Mezi epigenetické mechanismy patří: metylace/demethylace DNA, modifikace histonů (které zasahují na úrovni transkripční aktivity genů) a RNA interference (na úrovni post-transkripční aktivity genů). Methylace DNA se uplatňuje hlavně při inaktivaci chromosomu X a genovém imprintingu, což je mechanismus regulace genové exprese, při kterém jsou imprintované geny transkribovány pouze z jedné alely, a to z alely určitého rodičovského původu. Modifikace histonů zahrnuje například: acetylaci, metylaci, ubiquitinaci, fosforylaci a sumoylaci. Tyto změny souvisí se změnami kondenzace chromatinu a s regulací aktivity genů, tím pádem aktivují anebo inhibují genovou transkripci. RNA interference je mechanismus, který se podílí na regulaci transkripce a translace pomocí malých nekódujících regulačních RNA („microRNA“ či „short interfering RNA“), jež se navážou na cílové úseky mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina) a inhibují je.

1.1.1 Methylace DNA

Methylace DNA je jedním z hlavních a nejvíc prostudovaných epigenetických mechanismů. V roce 1925 objevili Johnson a Coghill 5-metylcytosin v živých buňkách, při analýze izolovaných a krystalizovaných nukleových kyselin z *Mycobacterium tuberculosis*, ve snaze identifikovat její patogenní determinantu (Mattei et al., 2022). Po třiatdvaceti letech, zaznamenal Rollin Hotchkiss metylovaný cytosin pomocí papírové chromatografie při analýze DNA získané z telecího brzlíku. Následně byla prokázána

přítomnost metylovaného cytosinu i v DNA jiných organismů. Už tehdy se předpokládalo, že modifikace cytosinu se může podílet na regulaci genové exprese, což se prokázalo v 80. letech minulého století (Compere and Palmiter, 1981).



Obrázek 1: Modifikace cytosinu v poloze 5 katalyzovaná DNA-metyltransferázou (Gibney et Nolan, 2010), upraveno.

U člověka proces metylace spočívá v kovalentní adici metylové skupiny z S-adenosyl-L-methioninu (SAM) na pátý uhlík cytosinu (pozice C5) v dinukleotidu CpG, což je Cytosin-fosfát-Guanin (Obr. 1). Při demetylaci DNA dochází k odstranění metylové skupiny z 5-methylcytosinu. Dinukleotidy CpG se vyskytují zejména v repetitivních sekvencích a takzvaných CpG ostrůvcích. Tyto ostrůvky jsou úseky DNA dlouhé zhruba 1000 párů bází, CpG dinukleotidy se v nich vyskytují s vyšší frekvencí, než ve zbytku genomu, a jsou lokalizovány především v promotorových oblastech, blízko místa začátku transkripce, což zdůrazňuje jejich význam v regulaci genomických procesů (Saxonov et al., 2006). Za normálního stavu tato místa metylována nejsou a je umožněna transkripce určitého genu. V lidských somatických buňkách je metylováno přibližně 70 % CpG dinukleotidů (Chen and Riggs, 2011). Methylace CpG ostrůvků ve zdravé tkáni je pozorována pouze ve specifických situacích, jako jsou imprinting genů nebo inaktivace chromosomu X (Baylin and Herman, 2000). Zajímavé je, že jedním ze společných rysů CpG ostrůvků v porovnání s jinými úseky DNA, je menší obsah nukleosomů, což je základní stavební jednotka chromatinu tvořená histonovým oktamerem, který je obalený řetězcem DNA. Čím těsněji je DNA spojena s histonovými proteiny, tím méně může probíhat genová exprese. Kromě imprintovaných genů reguluje metylace DNA CpG ostrůvků genovou expresi během vývoje a diferenciaci. Protože CpG ostrůvky jsou spojeny s kontrolou genové exprese, dalo by se očekávat, že mohou vykazovat tkáňově specifické vzorce metylace DNA. Moore et al. (2013) uvádí, že metylace CpG ostrůvků může narušit vazbu transkripčních faktorů, umožnit vazbu represivních proteinů vázajících se na metylovou skupinu a

stabilně umlčet genovou expresi. CpG ostrůvky, zejména ty spojené s genovými promotory, jsou však metylovány jen zřídka.

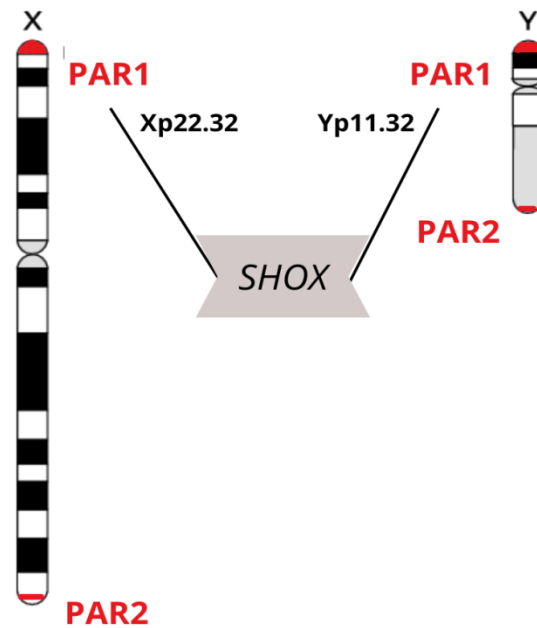
Metylace je katalyzována rodinou enzymů DNA-metyltransferáz (Dnmt), sdílejících podobnou strukturu s velkou N-koncovou regulační doménou a C-koncovou katalytickou doménou, majících jedinečné funkce a vzorce exprese. Enzymy této rodiny se dělí na udržovací a *de novo* metyltransferázy. K udržovacím patří Dnmt1, která zůstává aktivní po celou dobu života a zachovává původně vytvořený metylační vzor. Během replikace DNA se Dnmt1 transportuje do replikační vidličky, kde se tvoří nově syntetizovaná hemimetylovaná DNA. Dnmt1 se váže na nově syntetizované vlákno DNA a metyluje jej tak, aby přesně napodobila původní metylační vzor přítomný před replikací DNA (Hermann et al., 2004). Z tohoto důvodu se Dnmt1 nazývá udržovací Dnmt, protože zachovává původní metylační vzorec DNA v buněčné linii. Díky tomuto procesu dochází v dceřiných buňkách k obnovení metylačního vzoru, což je jedním z důležitých mechanismů epigenetické dědičnosti. *De novo* metyltransferázy Dnmt3a a Dnmt3b jsou si velmi podobné ve struktuře a funkci, metylaci DNA provádějí *de novo*, jsou exprimovány pouze v rané fázi embryonálního vývoje, kdy je DNA totálně demetylována, a určují vzorec metylace DNA (Okano et al., 1999).

Metylace a demetylace jsou reversibilní procesy. Dynamická rovnováha mezi nimi hraje klíčovou úlohu v různých biologických kontextech ovlivňujících nejen vývoj organismů, ale také různé patologické stavy a vznik onemocnění. Když mluvíme o změně míry metylace, můžeme rozlišovat hypermetylaci a hypometylaci. Termín hypometylace se často používá pro označení celkového snížení úrovně metylace DNA v genomu anebo při lokální relativní demetylaci DNA. Na druhou stranu, hypermetylace označuje nadměrnou metylaci v určitých oblastech DNA.

U člověka je metylováno přibližně 1 % genomu. Metylace DNA je nezbytná pro umlčení retrovirových elementů, regulaci tkáňově specifické genové exprese, genomový imprinting a inaktivaci chromosomu X. Důležité je, že metylace DNA v různých oblastech genomu může mít různé vlivy na aktivitu genů. Metylace DNA reguluje genovou expresi rekrutováním proteinů zapojených do genové represe nebo inhibicí vazby transkripčního faktoru (faktorů) na DNA. Během vývoje se vzorec metylace DNA v genomu mění v důsledku dynamického procesu zahrnujícího jak *de novo* metylaci DNA, tak demetylaci (Moore et al., 2013).

1.2 Gen *SHOX*

Gen *SHOX* („short stature homeobox gene“) se nachází v pseudoautosomálním regionu 1 (PAR1) (Obr. 2) na konci krátkého raménka chromosomů X a Y (Xp22.32/Yp11.32) a kóduje transkripční faktor, který reguluje proliferaci a diferenciaci chondrocytů v růstových chrupavkách. Tento gen byl poprvé identifikován skupinou Rao et al. (1997) při analýze DNA pacientů s nízkou výškou postavy a Turnerovým syndromem.



Obrázek 2: Pseudoautosomální regiony PAR1 a PAR2 na pohlavních chromosomech X, Y a schematická lokalizace genu SHOX (Blaschke and Rappold, 2001), upraveno.

Geny nacházející se v PAR1 nepodléhají lyonizaci. Lyonizace (inaktivace chromosomu X) je fyziologický proces, pomocí kterého je jeden z chromosomů X umlčen s cílem kompenzace dávky genů vázaných na X. Geny pseudoautosomálních regionů gonosomů jsou přítomné ve dvou kopiích a obě dvě kopie jsou zapotřebí pro normální fyziologickou funkci.

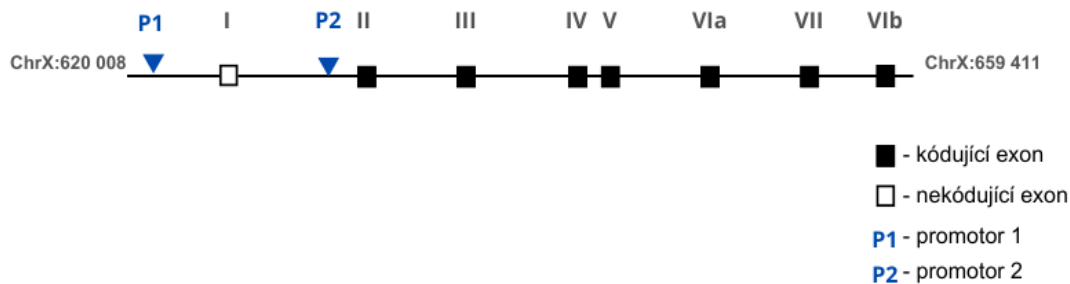
Pseudoautosomální regiony (PAR) jsou specifické oblasti lokalizované na chromosomech X a Y, obsahující homologní sekvence, díky kterým je umožněna rekombinace pohlavních chromosomů během meiozy (pro zajištění správné segregace gamet během mužské meiózy). Pro geny umístěné v těchto regionech platí autosomální typ dědičnosti. V lidském genomu nalézáme dvě pseudoautosomální oblasti – PAR1 a

PAR2, které mají odlišný původ a vlastnosti. PAR1 je evolučně a biologicky významnější oblast a vyznačuje se vysokým obsahem CpG dinukleotidů a repetitivních sekvencí. K těmto sekvencím patří *Alu*-elementy (krátké rozptýlené jaderné elementy) (Ross et al., 2005), které v některých případech mohou být zodpovědné za přestavby v PAR1, a to prostřednictvím dvou mechanismů: nealelické homologní rekombinace (NAHR; „non-allelic homologous recombination“) a nehomologního spojování konců (NHEJ; „non-homologous end joining“) (Blaschke and Rappold, 2006; Benito-Sanz et al., 2012). PAR1 je přibližně 2,7 Mb dlouhý, nachází se na krátkých raménkách pohlavních chromosomů a byl do nich začleněn během posledních 105 milionů let (Monteiro et al., 2021). Naproti tomu, PAR2 vznikl duplikací úseku chromosomu X na Y po divergenci lidí a šimpanzů před 6 miliony let (Otto et al., 2011), je dlouhý 330 kb a umístěný na dlouhých raménkách pohlavních chromosomů. Crossing-over v PAR1, během mužské meiózy, je nutný pro správný rozchod chromosomů X a Y k opačným pólům buňky (disjunkce) (Charlesworth, 2002). V souladu s tím je míra rekombinace PAR1 u mužů výjimečně zvýšená, přibližně 17 krát vyšší, než průměr celého genomu, zatímco míra rekombinace PAR1 u žen je jen mírně nad průměrem genomu (Hinch et al., 2014). PAR2 má mnohem menší frekvenci rekombinací, která se odhaduje na pouhé 1 % u mužské meiózy, a je extrémně vzácná u ženské gametogeneze. Nerovnoměrnost meiotické rekombinace je tedy vázaná na pohlaví, protože u ženské meiózy se celý chromosom X rekombinuje rovnoměrně po celé své délce (včetně PAR), zatímco při spermatogenezi se rekombinace vyskytuje pouze v PAR. Snížení frekvence rekombinací v PAR1 může vést ke vzniku aneuploidních spermií, které po splnutí s haploidním vajíčkem způsobují numerické chromosomové mutace: monosomie X anebo Turnerův syndrom, trisomie X – Klinefelterův syndrom.

Dohromady oba dva regiony obsahují 29 genů (24 geny v PAR1, 5 genů v PAR2), které se účastní buněčné signalizace, regulace transkripce a mitochondriálních funkcí. Všechny charakterizované geny v rámci PAR1 unikají inaktivaci X, zatímco dva nejproximálnější geny PAR2 (*SPRY3* a *SYBL1*) inaktivaci podléhají (Ciccodicola et al., 2000). Mutace genů z těchto regionů jsou skutečně spojovány s různými nemocemi u lidí, včetně leukemie, schizofrenie, bipolární afektivní poruchy a infertility (Dos Santos et al., 2022). Ale gen *SHOX* je doposud jediným genem v PAR1, který je definitivně spojen se skeletálním vývojem. Tudiž fenotypy vykazující nízkou výšku postavy vznikají v důsledku haploinsuficience (HI) *SHOX*, lokalizovaného v PAR1.

1.2.1 Struktura genu *SHOX*

Gen *SHOX* má délku přibližně 40 kb a je umístěn zhruba 500 kb od konce telomer pohlavních chromosomů. *SHOX* patří k homeoboxovým genům, což jsou geny s vysoce konzervovanou doménou – homeodoménou, která se u *SHOX* skládá ze 60 aminokyselin (AMK). Translací genů s homeoboxem vzniká protein nesoucí úsek odpovídající homeoboxu. Tento úsek je vlastní homeodoména, která se následně váže do regulačních oblastí dalších genů a tím reguluje jejich transkripci. Geny této rodiny regulují embryogenezi a vývoj jedince (Gehring et al., 1994) a jejich produkty mohou působit jako aktivátory či represory transkripce při expresi různých cílových genů. Homeodoména *SHOX* se skládá ze tří helixů, z nichž první je oddělen od helixu II a III malou smyčkou. Helixy II a III tvoří motiv helix-smyčka-helix vázající DNA. Na základě analýzy dat odvozených ze studia jiných homeodoménových proteinů, je známo, že specifický helix III se váže do velkého žlábků DNA a to je předpokladem pro aktivaci transkripce (Wilson et al., 1995; Wolberger et al., 1991), zatímco N-koncová část se váže do malého žlábků DNA. Před navázáním na DNA je proteinová homeodoména transportována do jádra pomocí aparátu, který rozpoznává krátkou sekvenci na proteinu jako jaderný lokalizační signál („nuclear localization signal“, NLS) (Macara, 2001). V proteinu *SHOX* byl NLS definován jako sekvence skládající se z 5 aminokyselin (AKCRK), lokalizovaných na helixu III. Důležité je, že „missense“ (záměna aminokyseliny) mutace ovlivňující NLS byla identifikována u pacientů s diagnostikovanou Lériho-Weillovou dyschondrosteózou (LWD). (Benito-Sanz et al., 2006; Schneider et al., 2005). Kromě vazby na DNA se homeodoména podílí na protein-proteinových interakcích, jako je například tvorba homo- či heterodimerů a také na dimerizaci proteinů (Wilson et al., 1993). „Missense“ mutace zahrnující homeodoménu *SHOX* nalezené u pacientů s LWD a ISS („idiopathic short stature“, idiopatický nízký vzrůst) snižují schopnost proteinu tvořit dimery a tím zhoršují transkripční aktivitu genu (Marchini et al., 2016).



Obrázek 3: **Struktura genu SHOX.** Římské číslice představují jednotlivé exony genu SHOX. Autorka.

Gen *SHOX* se skládá ze 7 exonů (Obr. 3), které kódují dva hlavní alternativně sestřižené transkripty *SHOXa* a *SHOXb*. Transkripty jsou identické na svém 5' konci, ale liší se ve svém koncovém exonu (6a, 6b) na 3' konci (Rao et al., 1997) a jsou translatovány do dvou odlišných izoform proteinu: *SHOXa* ze 292 AMK, *SHOXb* ze 225 AMK. Alternativní použití dvou různých promotorů vede ke vzniku dvou mRNA lišících se v 5'UTR („untranslated region“, nepřekládaná oblast), ale generujících identické proteiny (Blaschke et al., 2003). *SHOXa* a *SHOXb* obsahují výše popsanou homeodoménu kódovanou exonem 3 a 4, konzervovanou DNA-vázací doménu, charakteristickou pro rodinu transkripčních faktorů obsahujících homeodoménu. *SHOXa* navíc obsahuje doménu OAR (*otp*, *aristales*, *rax*), u níž se předpokládá, že má transaktivační funkci a podílí se na protein-proteinových interakcích (Rao et al., 1997), zatímco *SHOXb* tuto funkci postrádá. *SHOXb* se ovšem váže na stejnou sekvenci DNA jako *SHOXa* a tvoří s ním heterodimery. Tím pádem může *SHOXb* představovat modulátor aktivity *SHOXa* (Rao et al., 2001). Podobně jako jiné párové homeodoménové proteiny se *SHOX* přednostně váže na palindromatické motivy typu 5'-TAAT(N)₂₋₃ATTA, kde N znamená počet nukleotidů oddělujících palindromatické sekvence od sebe (Wilson et al., 1993). Studie na kvasinkovém dvouhybridním systému za použití proteinu *SHOX* ukázaly, že se *SHOX* může vázat na DNA i jako monomer a homodimer (Rao et al., 2001).

Znalost struktury genu *SHOX* byla rozšířena skupinou Durand et al. v roce 2011, kdy vědci objevili další 4 exony: 2a, 7-1, 7-2, 7-3, které kódují nové izoformy *SHOX*. Za použití kvantitativní PCR v reálném čase a primerů, zahrnujících sekvence od exonu 2 do exonu 5 byly odhaleny pruhy, lišící se od očekávaných. Sekvenování tohoto úseku

ukázalo, že do *SHOX* cDNA bylo zahrnuto 88 nukleotidů v pozici mezi exonem 2 a exonem 3, a tento úsek byl následně pojmenován jako exon 2a. Také bylo zjištěno, že začlenění exonu 2a do mRNA způsobuje posun čtecího rámce a předčasný stop kodon v exonu 3. Předpokládaný výsledný protein by tedy byl zkrácen, postrádal homeodoménu a skládal by se ze 124 aminokyselin. Pomocí primerů zahrnujících úsek sekvence od exonu 5 až 7 byly nalezeny další alternativní 5' sestřihová místa exonu 7, která vedou k dalším izoformám proteinu *SHOX*.

1.2.2 Exprese *SHOX*

Studie genové exprese odhalily jasný rozdíl ve vzorcích exprese izoform *SHOXa* a *SHOXb*, kde obě dvě jsou predominantně exprimovány ve fibroblastech kostní dřeně. Zatímco *SHOXa* je také exprimována v několika dalších tkáních, jako jsou kosterní svaly, placenta, slinivka břišní a srdce, exprese *SHOXb* je primárně omezena na ledviny a kosterní svalstvo plodu (Marchini et al., 2007). V embryonální a fetální tkáni byla nejsilnější exprese obou izoform pozorována ve svalech, kůži a několika nervových tkáních, jako jsou mozek, mícha, oko a mozkové pleny (Durand et al., 2011). Byla také prokázána exprese *SHOX* v mozečku, thalamu a bazálních gangliích. V souladu s kosterními abnormalitami pozorovanými u pacientů nízkého vzrůstu odhalily hybridizační experimenty *in situ* exprese *SHOX* ve vyvíjejících se končetinách a prvním a druhém faryngeálním oblouku u lidských embryí (Clement-Jones et al., 2000). Exprese ve vyvíjejících se končetinách je detekována ve stádiu 14 podle Carnegie (C14), což je systém užívaný k popisu vývojového stupně embryí, v tomto stádiu je embryo staré 33 dní. Během chondrifikace tkání končetin se exprese *SHOX* výrazně zvyšuje v oblasti předchrupavčitého základu lokte. Následně ve fázi C21, kdy kosti paže už se dají identifikovat, exprese je stále omezená na oblast kolem distálního konce humeru, radia a ulny (Marchini et al., 2007). Může být přítomna i v několika kostech zápěstí. Exprese *SHOX* v dolních končetinách má velmi podobný profil jako exprese v tkáních horních končetin. Další důkaz pro roli *SHOX* ve vývoji kostí poskytuje zjištění z roku 2004: protein *SHOX* byl detekován v růstové ploténce hypertrofických chondrocytů (Munns et al., 2004). Bylo také popsáno, že exprese *SHOX* indukuje zástavu buněčného cyklu a apoptózu v buňkách osteosarkomu, stejně jako v primárních chondrocytech, což implikuje roli *SHOX* v procesech regulujících diferenciaci chondrocytů (Marchini et al., 2004). Ale exprese nebyla pozorována v jiných buňkách

růstové ploténky, jako jsou osteoblasty a osteoklasty. Společně jsou tyto výsledky v souladu s přímou biologickou funkcí *SHOX* při diferenciaci a zrání chondrocytů. Exprese *SHOX* v loketním a kolenním kloubu může vysvětlit ohnutí a zkrácení předloktí a bérců u pacientů s Léřiho-Weillovou dyschondrosteózou a u některých pacientů s Turnerovým syndromem. Madelungova deformita a zkrácené metakarpy pozorované u LWD mohou být důsledkem ztráty exprese *SHOX* v distální části ulny a radia; nedostatek jeho exprese v prvním a druhém faryngeálním oblouku pravděpodobně přispívá k viditelným rysům Turnerova syndromu jako je mikrognacie, vysoce klenuté patro a senzorineurální hluchota (Clement-Jones et al., 2000).

Ve své práci Durand et al. (2011) zanalyzovali exprese nových izoform *SHOX* (2a, 7-1, 7-2, 7-3) pomocí RT-PCR. Transkript obsahující exon 2a byl detekován v několika fetálních a dospělých tkáních, s nejvýraznější expresí v oku a mozku plodu, dospělé kostní dřeni a kosterních svalech. Exprese *SHOX* v mozku naznačuje jeho další funkci během vývoje mozku plodu a udržování mozkových funkcí. U pacientů s LWD, Turnerovým nebo Langerovým syndromem, nebo ISS („idiopathic short stature“, ISS) s haploinsuficiencí *SHOX* však nebyly popsány zjevné mozkové malformace nebo kognitivní vývojové zpoždění. Tři odlišné varianty sestřihu exonu 7 byly exprimovány v některých fetálních a embryonálních tkáních a také v kultivovaných dermálních fibroblastech. Ale exprese nebyla pozorována v žádné z dospělých tkání. Což by ve výsledku mohlo znamenat, že tyto izoformy mohou plnit svou funkci pouze během raného vývoje jedince.

1.2.3 Protein *SHOX*: funkce a interakce

Růst a vývoj skeletálního systému jedince je velice dynamický proces, který závisí na mnoha molekulárních mechanismech. Dlouhé kosti osifikují enchondrálně, to znamená postupnou náhradou chrupavčitého skeletu. Růstová ploténka, nacházející se mezi epifýzami a diafýzou, zůstává aktivní po celou dobu růstu kosti a zajišťuje nepřetržitý přísun chondrocytů pro enchondrální osifikaci. Pro pochopení mechanismů působení proteinu *SHOX* na molekulární úrovni a objasnění patologií spojených s nedostatkem *SHOX* je důležité se zaměřit na geny a proteiny se kterými přímo interaguje. *SHOX* funguje jako transkripční regulátor při proliferaci a diferenciaci chondrocytů, kostní maturaci, chondrogenezi, zastavení buněčného růstu a apoptóze chondrocytů, a to prostřednictvím přímého působení na své cílové geny: *NPPB*, *FGFR3*

a *CTGF (CCN2)* (Marchini et al., 2004, 2007a; Decker et al., 2011; Beiser et al., 2014; Hristov et al., 2014).

Gen *NPPB* („natriuretic peptid B“) kóduje natriuretický peptid B (BNP), který působí jako natriuretický, diuretický a vazodilatační faktor, inhibuje sekreci reninu a aldosteronu, celkově má důležitou roli při udržování kardiovaskulární homeostáze. Navzdory tomu existují studie, které naznačují, že natriuretické peptidy BNP a CNP stejně jako receptory („natriuretic peptide receptor“, NPR) představují důležité regulátory enchondrální osifikace (Jaubert et al., 1999; Chusho et al., 2000; Yasoda et al., 2004). Skupina Marchini et al. (2007a) prokázala schopnost SHOX aktivovat endogenní promotor *NPPB*, a to přímou vazbou do regulační oblasti *NPPB*. Ko-exprese SHOX a BNP byla pozorovaná v chondrocytech pozdní proliferativní a hypertrofické oblasti růstové ploténky. Navíc u dvou pacientů s LWD nesoucích mutací v genu *SHOX* byla pozorována snížená aktivace promotoru *NPPB*. Z toho vyplývá, že SHOX je pozitivním regulátorem exprese BNP, přičemž BNP se pravděpodobně také podílí na diferenciaci chondrocytů.

Gen *FGFR3* („fibroblast growth factor receptor 3“) kóduje několik izoforem proteinu FGFR3, který je součástí rodiny čtyř receptorů fibroblastového růstového faktoru sdílejících podobnou strukturu a funkce. Tyto proteiny se podílí na regulaci buněčného růstu, procesu buněčné proliferace a diferenciaci, tvorbě krevních cév a hojení ran. Členové rodiny FGFR jsou schopné vázat devět souvisejících fibroblastových růstových faktorů (FGF), které jsou známými mitogeny (Wilkie et al., 1995). FGFR3 je exprimován v růstové ploténce, reguluje růst dlouhých kostí, a to tak, že omezuje tvorbu kostní tkáně z chrupavky (enchondrální osifikace). Je to způsobeno především schopností FGFR3 akcelarovat diferenciaci chondrocytů v hypertrofické zóně růstové ploténky. Skupina Decker et al. (2011) prokázala, že SHOX aktivuje promotor *FGFR3*, a to navázáním na více „up-stream“ sekvencí. Aktivace FGFR3 potlačuje růst dlouhých kostí a následně indukuje skeletální dysplázii.

Gen *CTGF* („connective tissue growth factor“), také známý jako *CCN2* („cellular communication network factor 2“) kóduje protein, který je vylučován vaskulárními endotelovými buňkami. Tento protein má úlohu při proliferaci a diferenciaci chondrocytů a při buněčné adhezi. CCN2 interaguje s mnoha molekulami přítomnými v růstové ploténce: s molekulami extracelulární matrix (fibronektin, aggrecan),

receptory buněčného povrchu, růstovými faktory či některými dalšími CCN. Právě pomocí komplexních interakcí s výše zmíněnými faktory vykonává CCN2 kritickou roli ve vývoji, údržbě a regeneraci chrupavky (Kubota and Takigawa, 2011). Protein je exprimován hlavně chondrocyty prehypertrofické a hypertrofické vrstvy růstové ploténky. Také bylo ukázáno, že „up-stream“ region genu *CCN2* obsahuje více než čtyřicet 5'-ATTA/TAAT- motivů, které již byly dříve identifikovány jako cílové sekvence pro SHOX (Rao et al., 2001; Decker et al., 2011). Protein SHOX se váže na vysoce konzervovanou oblast genu *CTGF* (Beiser et al., 2014). Fyziologický význam interakce SHOX-*CTGF*/CTGF potvrzuje ko-exprese proteinů v zóně hypertrofických chondrocytů. CCN2 se účastní mnoha biologických procesů, ale vliv SHOX na expresi CCN2 v těchto procesech zůstává neodhalený.

Protein SHOX také interaguje se zástupci rodiny transkripčních faktorů SOX („SRY-box transcription factor“). Tato rodina je rozdělena do několika skupin (A-H) na základě jejich homologie v rámci domény HMG („high mobility group“), což je vysoce konzervovaná DNA-vázající doména. SOX9 (SoxE) je nezbytný pro udržení a diferenciaci chondrocytů, exprimuje se ve všech chondro-progenitorových buňkách a chondrocytech, ale exprese je zrušená v hypertrofických chondrocytech růstové ploténky (Wright et al., 1995; Ng et al., 1997). SOX9 funguje ve spolupráci se SOX5 (SoxD) a SOX6 (SoxD) a spolu jsou hlavními regulátory diferenciaci chondrocytů (Ikeda et al., 2004). Imunoprecipitační testy potvrdily interakci SHOX/SOX5 a SHOX/SOX6 v lidských buňkách, zatímco imunohistochemické analýzy prokázaly ko-expresi těchto proteinů v růstových plotenkách lidských embryí v 18. a 32. gestačním týdnu (Aza-Carmona et al., 2011). SHOX navíc reguluje transkripci *SOX5* a *SOX6* (Hoffmann et al., 2021). Výsledky studie Aza-Carmona et al. (2011) ukazují, že SHOX interaguje se SOX5, SOX6 a SOX9 při aktivaci „up-stream“ zesilovače genu *ACAN*, a že mutace genu *SHOX* tuto aktivaci inhibuje. Z toho vyplývá, že interakce SHOX s trojicí SOX ovlivňuje expresi *ACAN*. Produkt toho genu – protein aggrecan je důležitou složkou extracelulární matrix v chrupavce, váže fibrily kolagenu II. typu a udržuje vodu. Homozygotní mutace v tomto genu způsobuje těžkou skeletální dysplázií (Tompson et al., 2009).

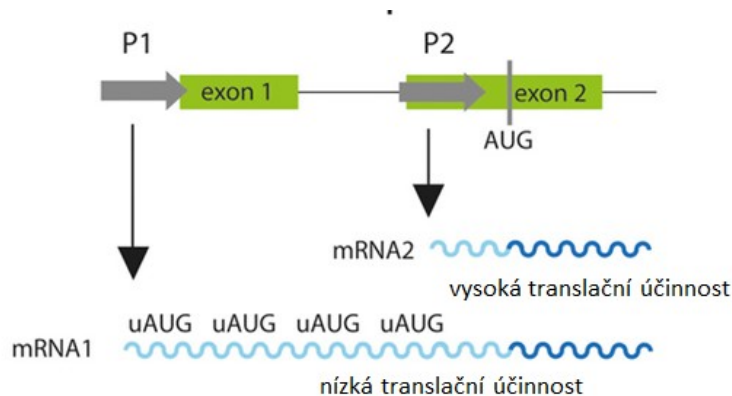
Biologická role proteinu SHOX a s ním souvisejících drah v růstové ploténce se má za prokázanou. Přítomnost SHOX v růstové ploténce, a to zejména v hypertrofické oblasti, kde chondrocyty podléhají apoptóze naznačuje, že absence funkčního proteinu

SHOX nejspíše podporuje atypickou proliferaci a patologickou diferenciaci chondrocytů. Změna rovnováhy mezi oběma procesy by mohla vést k patologickému růstu kostí do délky, což vysvětluje fenotypy pacientů s nízkým vzrůstem.

1.2.4 Regulační mechanismy *SHOX*

Regulace exprese homeoboxového genu *SHOX* – je důležitým prvkem pro pochopení jeho funkce a hlavně pro objasnění etiologie onemocnění spojených s patologií *SHOX* na různých úrovních. Exprese *SHOX* je omezená na určité části těla během specifických fází vývoje, což znamená přísnou časoprostorovou regulaci. Mechanismy regulace *SHOX* na transkripční a post-transkripční úrovni zahrnují: alternativní promotory, cis-regulační sekvence (enhancery neboli zesilovače) a alternativní exony.

Dříve již bylo popsáno, že dva alternativní promotory, P1 a P2, řídí expresi *SHOX* na transkripční úrovni. Tyto dva promotory generují dvě třídy mRNA, které kódují identické proteiny, které se liší pouze ve své 5' nepřekládané oblasti (UTR), přítomností sedmi kodonů AUG „up-stream“ od otevřeného čtecího rámce *SHOX*. 5'-UTR oblast mRNA transkribované z genu *SHOX* se skládá ze dvou exonů (I a II) a její délka má 694 nukleotidů. Promotor P1 se nachází před prvním exonem, P2 sídlí uvnitř exonu 2 (432 bp „up-stream“ od iniciačního kodonu AUG). Transkripty vzniklé aktivitou promotoru P1 a obsahující sedm kodonů AUG podléhají translaci se sníženou účinností, a tím poskytují zajímavý mechanismus regulace hladiny proteinu SHOX nejenom na transkripční, ale i translační úrovni (Blaschke et al., 2003). (Obr. 4). Promotor P2 odpovídá za tvorbu transkriptu s vysokou translační účinností, což by mohlo pravděpodobně znamenat, že P2 je aktivní při okamžité potřebě vysokých hladin proteinu SHOX. Ale příčiny, kvůli kterým je jeden promotor upřednostňován před druhým, a molekulární mechanismy řídící jejich individuální aktivitu zatím nejsou prozkoumány.



Obrázek 4: **Model regulace aktivity genu *SHOX*** (Marchini et al., 2016), upraveno. Transkripce je regulována dvěma promotory P1 a P2, které generují různé transkripty: mRNA1 s nízkou účinností translace kvůli přítomnosti sedmi kodonů AUG, mRNA2 s vysokou účinností translace.

Kromě sekvencí kódujících proteiny obsahuje lidský genom značné množství regulační DNA. Konzervované nekódující oblasti („conserved non-coding element“ – CNE; „evolutionary conserved sequence“ – ECS; „evolutionary conserved region“ – ECR) se často nacházejí v blízkosti genů podílejících se na vývoji jedince, zejména transkripčních faktorů, což znamená, že tyto prvky mají zásadní regulační roli ve vývoji jedince. CNE také koncepčně souvisí s „cis-regulačními moduly“ neboli CRM, které jsou definovány jako regulační prvky, které interagují s transkripčními faktory za účelem nastavení tkáňově specifické genové exprese (Howard a Davidson, 2004). Obecně také platí, že tyto regulační prvky se zachovaly během evoluce, kvůli jejich zásadní roli v regulaci transkripce genů.

Funkční studie ukázaly, že CNE působí jako zesilovače aktivity promotoru genu *SHOX* v lidských buňkách (Benito-Sanz et al., 2012; Fukami et al., 2006). Z toho vyplývá, že konzervované nekódující oblasti patří k dalším regulačním prvkům *SHOX* a obklopují jeho kódující část z obou stran: CNE-5, CNE-3 a CNE-2 nacházející se „up-stream“ a CNE2, CNE3, CNE4, CNE5, CNE6, CNE7/ECR1, CNE8 a CNE9/ECS4 ležící „down-stream“ (Obr. 5), z nichž transkripčně aktivní jsou pouze CNE4, CNE5, CNE7/ECR1 a CNE9/ECS4 (Benito-Sanz et al., 2012; Chen et al., 2009; Fukami et al., 2006). Zároveň je CNE9 pravděpodobně nejdůležitějším regulačním elementem (Marchini et al., 2016). Studie Sabherwal et al. (2007) potvrdila, že promotor P1 interaguje s CNE9; následně pomocí tvorby chromatinové smyčky CNE9 zvyšuje

expresi proteinu SHOX. Nově identifikovaným cis-regulačním prvkem *SHOX* je ZED („Zeugopodal Enhancer Downstream of *SHOX*“), lokalizovaný 7 kb „up-stream“ od CNE9 (Skuplik et al., 2018). Některé studie uvádí, že dalším regionem obsahující potenciální regulační prvek *SHOX*, může být oblast X : 917,000 – 1,029,000 „down-stream“ od CNE9 (Bunyan et al., 2014; Tsuchiya et al., 2014), jelikož delece v tomto regionu byly identifikované u jedinců s normálním a LWD fenotypem.



Obrázek 5: **Konzervované nekódující elementy (CNE) obklopující gen *SHOX*.** Černá barva znázorňuje transkripčně aktivní CNE: CNE-5, CNE-3, CNE-2 v „up-stream“ oblasti; CNE4, CNE5, CNE7/ECR1, CNE9/ECS4 v „down-stream“ oblasti. Šedá – neaktivní CNE, bez známé regulační funkce (CNE2, CNE3, CNE6, CNE8).
Autorka.

Durand et al. (2011) shrnují základní regulační mechanismy *SHOX* následovně: Zaprvé, *SHOX* má dva různé promotory, které generují transkripty s identickou kódovací kapacitou, ale liší se v 5'UTR, což vede k různé translační účinnosti transkriptu. Zadruhé, je známo, že proteinová izoforma SHOXb postrádá OAR transaktivační doménu, a proto není schopna aktivovat transkripci, což vede k tomu, že SHOXb nejspíš působí jako negativní regulátor SHOXa, anebo jako modulátor jeho aktivity. Zatřetí, nové alternativní izoformy, které byly popsány v kapitole o expresi *SHOX*, patrně přispívají k jemné regulaci exprese (Durand et al., 2011).

Fosforylace proteinu SHOX se také jeví jako jeden z regulačních mechanismů. Biochemická studie skupiny Marchini et al. (2006) prokázala, že *in vivo* je SHOX fosforylován výhradně na pozici Ser106 (serin). Během fosforylace hraje nejspíše

důležitou roli kaseinkináza II (CKII), protože dokáže fosforylovat *SHOX in vitro* a inhibitory CKII silně snižují fosforylace *SHOX in vivo*. Předpokládá se, že fosforylace moduluje biologické funkce *SHOX*, protože protein s mutací S106A (serin na pozici 106 nahrazen alaninem), který má defekt ve fosforylaci, není schopen aktivovat transkripci, i když si zachovává jadernou lokalizaci a schopnost vazby na DNA (Marchini et al., 2006).

1.2.5 Mutace genu *SHOX*

Mutace postihující *SHOX* či jeho regulační oblasti jsou velice variabilní jak na úrovni genetické, tak fenotypové. Fenotypy jedinců nesoucích změny v genu *SHOX* se liší v závislosti na typu mutace a na tom, zda je mutace přítomna v jedné či obou alelách genu. Haploinsuficience *SHOX* – ztráta jedné funkční alely genu, je zodpovědná za přibližně 5 % případů idiopatického nízkého vzrůstu (ISS; OMIM 300582) a 70 – 90 % případů syndromu Léri-Weill (LWD; OMIM 127300) (Benito-Sanz et al., 2012; Rosilio et al., 2012; Schneider et al., 2005). Kompletní delece jedné kopie *SHOX* je také součástí Turnerova syndromu, kdy pacienti postrádají chromosom X a jedním z fenotypových znaků toho syndromu je nízký vzrůst. Homozygotní ztráta *SHOX* má za následek závažnější Langerovou mezomelickou dysplázií (Zinn et al., 2002), kdežto duplikace celého genu *SHOX* u jedinců s trizomií pohlavních chromosomů (47, XXX; 47, XXY; 47, XYY) je spojená s normálním až vysokým vzrůstem (Bunyan et al., 2013; Thomas et al., 2009), a to v důsledku nadměrné exprese *SHOX* (Adamson et al., 2002). Je třeba poznamenat, že duplikace *SHOX* je většinou spojená s vysokým vzrůstem, nicméně jsou popsány případy kompletní a částečné duplikace i u jedinců s LWD a ISS (Benito-Sanz et al., 2011). Celkově, lze předpokládat, že genotyp-fenotypová korelace v případě duplikace záleží na tom, zda-li zahrnuje regulační sekvence *SHOX* a v jakém rozsahu (Fukami et al., 2015; Thomas et al., 2009). Bodové mutace (mutace v rozsahu jednoho nukleotidu) se v genu *SHOX* či jeho regulačních sekvencích také vyskytují (Cormier-Daire et al., 1999; Huber et al., 2006; Sabherwal et al., 2004). V rámci těchto mutací můžeme hovořit o deleci jednoho nukleotidu, inzerci či substituci (tranzici nebo transverzi). Nejčastěji je ovlivněn bodovými mutacemi exon 3, který kóduje větší část homeodomény (Marchini et al., 2007; Shears et al., 1998;).

1.3 Lériho-Weillova dyschondrosteóza

Jak již bylo zmíněno výše, Lériho-Weillova dyschondrosteóza anebo syndrom Léri-Weill (LWS) – je vzácná pseudoautosomálně dominantní genetická porucha, vyskytující se v důsledku mutací postihujících gen *SHOX*. André Léri a Jean A. Weill byli francouzští lékaři, kteří v roce 1929 poprvé popsali LWD na základě rozdílného fenotypu pacienta, jenž se odlišoval od již známých diagnóz, jako jsou achondroplázie a chondroektodermální dysplázie. Hlavním rozdílem bylo mesomelické zkrácení končetin, což znamená zkracování středního segmentu dlouhých kostí, a to včetně přilehlých kostí (Mohan et al., 1988).



Obrázek 6: *Rentgenové snímky Madelungovy deformity (A, B) a zdravého zápěstí (C)* (Farr et al., 2012), upraveno. *A. Předozadní snímek Madelungovy deformity ukazující V-tvar radiokarpálního kloubu. B. Laterální snímek; Hlava ulny vyčnívá dorzálně, celé zápěstí vykazuje palmární subluxaci. C. Předozadní snímek normálního zápěstí.*

Dyschondrosteóza Léri-Weill představuje syndrom nízkého vzrůstu doprovázený mesomelickým zkrácením předloktí a bérce, bilaterální Madelungovou deformitou a občas skoliózou. Madelungova deformita předloktí se vyznačuje zakřivením a zkrácením radia s dorzální subluxací distální části ulny, jež má za následek vklínění a

deformaci karpálních kostí (Obr. 6) (Suzuki et al., 2014). Tato deformita je často doprovázena bolestivou a omezenou pohyblivostí zápěstí. Skupina Suzuki et al. (2014) navrhla hypotézu, že ztráta jedné funkční alely *SHOX* vede k předčasné fúzi epifýz na distálním konci radia, a to narušením programované buněčné smrti chondrocytů v hypertrofické zóně růstové ploténky. Narušení fyziologického růstu radia v důsledku časně fúze epifýz, a to v kombinaci s normálním růstem ulny, je nejspíš základem deformity.

Pohlaví jedince, věk a fáze pubertálního vývoje mají vliv na závažnost deformity, ale nikoliv na její počáteční vývoj. Prevalence vzniku nemoci u žen je čtyřikrát vyšší než u mužů (Lichtenstein et al., 1980), proto se dyschondrosteóza dříve považovala za X-vázanou dominantní chorobu. Ženy jsou exponovány účinkům gonadálních estrogenů od relativně raného věku v porovnání s muži. Proto se diskutuje, že vyšší hladina estrogenu by mohla být jednou z příčin způsobujících závažnější průběh LWD u žen. V práci Weise et al. (2001) bylo prokázáno, že estrogen urychluje naprogramované stárnutí (senescenci) růstové ploténky, což způsobuje dřívější proliferativní vyčerpání a následně dřívější fúzi růstových plotének. Tím pádem se dá předpokládat, že gonadální estrogény způsobují předčasnou skeletální maturaci v souladu s haploinsuficiencí *SHOX*.

Nízký vzrůst u pacientů s dyschondrosteózou je velmi variabilní; u dospělých jedinců kolísá od 135 cm do normální průměrné výšky dané populace. Výška postavy je považovaná za nízkou v případě, kdy odpovídá < -2 SDS (skóre směrodatné odchylky) pro daný věk, pohlaví, populaci anebo se extrémně vychyluje z pásma genetického růstového potenciálu jedince. Skupina Ross et al. (2001) zkoumala také potenciální vliv pohlaví a věku na výšku pacientů s dyschondrosteózou, nakonec žádné významné účinky nebyly prokázány.

Pro detekci dyschondrosteózy je zásadní identifikovat charakteristické kosterní rysy. LWD se typicky vyvíjí u dětí ve věku 6-11 let, ale těžce se v tomto věku diagnostikuje, jelikož specifické znáky této poruchy se objevují až během druhé dekády života. Časně a mírné známky Madelungovy deformity je možné rozpoznat pomocí rentgenových snímků ruky a zápěstí, abnormality jsou viditelné mezi 2. a 5. rokem života. Podle Ogata et al. (2001) se první známky deformity často projevují metafyzární lucencí a epifyzární hypoplázií mediální strany distální části radia u prepubertálních

pacientů a zmenšením karpálního úhlu u pubertálních nebo dospělých pacientů. Rappold et al. (2007) vyvinuli svůj fenotypový skórovací systém pro skrínink jedinců s podezřením na deficienci *SHOX* pro odlišení od pacientů ISS. Jako indikátory LWD navrhli 8 klinických znaků: poměr rozpětí paží/výška, poměr výška/výška vsedě, index tělesné hmotnosti, cubitus valgus (deformita při které je předloktí při plném natažení odkloněno od těla do větší míry, než je obvyklé), krátké a deformované předloktí, svalová hypertrofie a dislokace ulny.

Jedinci nesoucí změny v oblasti genu *SHOX* vykazují značnou fenotypovou heterogenitu a v některých případech jsou probandi nesoucí kauzativní varianty v genu dokonce zcela asymptomatictí s normální výškou postavy (Babu et al., 2021). Naopak jsou popsány případy, kdy jedinci vykazující fenotyp LWD nemají žádné zjevné mutace *SHOX* a předpokládá se, že za patologický fenotyp mohou být zodpovědné změny v regulačních oblastech anebo v jiném neznámém genu. Například Schiller et al. (2000) se zaměřili na fenotypovou a genetickou heterogenitu u rodin s LWS a detekovali delece *SHOX* pouze u 10 z 18 zkoumaných rodin, přičemž velikost delece nekorelovala se závažností fenotypu. Fenomén heterogenity je u syndromů způsobených haploinsuficiencí pozorován často.

1.3.1 Haploinsuficience *SHOX*

Haploinsuficience je stav, při kterém celková hladina produktu (proteinu) exprimovaného konkrétním genem je snížena přibližně o polovinu. Je to genetický fenomén, který nastává, když jedna kopie genu je inaktivovaná či deletovaná, a zbyvajících funkčních kopií genu není postačující k produkci potřebného množství proteinu a zachování normální funkce. Tento stav může být důsledkem *de novo* nebo zděděné mutace. V podstatě se jedná o ztrátu jedné alely genu a taková ztráta může být způsobena řadou patologických procesů. Při HI účinek mutantní alely není kompenzován účinkem alely normální. Spektrum mutací vedoucích k haploinsuficienci je široké: kompletní delece, mutace regulační oblasti ovlivňující aktivitu promotoru nebo intragenové změny vedoucí ke zrušení aktivity proteinu (Veitia, 2002). Přesná čísla HI genů a HI nemoci u lidí nejsou známé, kvůli obtížnosti systematického odlišení HI od jiné formy dominantní dědičnosti (Fuller et al., 2019), jelikož oba stavy vznikají v důsledku heterozygotní mutace. Metabolická a molekulární databáze dědičných onemocnění („The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease“) a OMIM

(„The Online Mendelian Inheritance in Man“) uvádí, že 65 % mutací v genech pro transkripční faktory vykazují dominantní typ dědičnosti a existuje několik studií, které ukazují, že tato dominance je způsobena haploinsuficiencí (Veitia, 2002). Navíc HI geny vykazují vyšší hladiny exprese během raného vývoje a větší tkáňovou specifitu (Huang et al., 2010).

Taková ztráta funkční alely genu *SHOX* je příčinou vzniku LWD ve 70 - 90 % případů. Množství genového produktu (proteinu SHOX) není postačující pro normální funkci a vede k abnormálnímu fenotypu pacientů s LWD. Haploinsuficience genu *SHOX* narušuje normální architekturu růstové ploténky (Munns et al., 2001) a vede k předčasné fúzi růstových plotének, předčasné skeletální maturaci a lokalizovanému zastavení kosterního růstu (Ogata et al., 2001). Haploinsuficience *SHOX* je běžná pro chromosomové aberace pohlavních chromosomů asociovaných s terminální delecí Xp a Yp (Ogata et al., 2001). Důležité je, že identická mutace v *SHOX* oblasti (např. duplikace zahrnující CNE9) může způsobit buď syndrom LWD nebo fenotyp ISS (Bunyan et al., 2021; Sandoval et al., 2014), což také naznačuje komplexní genetickou a fenotypovou heterogenitu patologie tohoto genu.

1.3.2 Molekulární podstata syndromu Léri-Weill

V kapitole 1.2.5 bylo uvedeno, že gen *SHOX* může být ovlivněn různými typy mutací: delecí, duplikací, bodovými mutacemi. Pro pochopení etiologie LWD je důležité se zaměřit nejenom na samotný typ mutace, ale i na její lokalizaci a rozsah. Genetické defekty, jako jsou variace v počtu kopií („copy number variation“, CNV) a mutace, které přispívají ke ztrátě jedné funkční alely *SHOX*, se mohou vyskytovat nejenom v kódující části genu, ale i v jeho regulačních elementech (Benito-Sanz et al., 2005; Binder, 2011; Rappold et al., 2007). Je známo, že taková ztráta funkční alely je častěji způsobena varibilitou v počtu kopií (která se projevuje formou delecí a duplikací), než bodovými mutacemi (Benito-Sanz et al., 2005; Benito-Sanz et al., 2011; Fukami et al., 2008). CNV zasahující jeden nebo více regulačních prvků *SHOX*, spolu s patogenními nukleotidovými substitucemi a CNV ovlivňujícími exony *SHOX* zodpovídají za 70 až 90 % případů LWD (Binder and Rappold, 2005; updated 2018). Nicméně, i přes tyto známé příčiny vzniku LWD, značné procento případů zatím zůstává s nejasnou etiologií.

Delece celého genu či mikrolece zahrnující exony *SHOX* 1-6a, b a/nebo jeho regulační elementy jsou nejčastějším typem mutace u pacientů s fenotypem LWD (Benito-Sanz et al., 2005; Fukami et al., 2008; Sabherwal et al., 2007; Shears et al., 1998). Ačkoli velké delece v chromosomální DNA jsou obecně vzácné, vysoký výskyt delecí *SHOX* je snadno pochopitelný kvůli vyššímu obsahu tandemových nebo rozptýlených repetitivních sekvencí v pseudoautosomální oblasti, což má za následek vyšší výskyt strukturních abnormalit. Zároveň velikost delece v kódující oblasti genu může být variabilní a nekoreluje se závažností fenotypových projevů (Schiller et al., 2000). CNV zasahující do CNE obklopující gen *SHOX* mohou vyvolat stejný efekt na fenotyp, jako změny v genu samotném. Je to dáno tím, že regulační prvky *SHOX* jsou zodpovědné za kontrolu exprese genu a chyba v sekvenci CNE může vést k abnormální funkci genu *SHOX*. Ale skupina Rosilio et al. (2012) předpokládá, že CNV zahrnující pouze „down-stream“ zesilovače vedou k mírnějším fenotypovým projevům, než mutace v kódujícím regionu *SHOX*. Avšak v případě „down-stream“ abnormalit fenotypový projev zase záleží na rozsahu a přesné lokalizaci mutace. Tak kompletní 3' delece jednoho či více CNE se projevuje stejně jako mutace kódujícího regionu (Benito-Sanz et al., 2005; Fukami et al., 2005), zatímco mikrolece zahrnující enhancer CNE7/ECR1 (nacházející se „down-stream“) vede k variabilnímu fenotypu (od asymptomatických jedinců po LWD) (Benito-Sanz et al., 2012).

Frekvence vyskytu CNV zahrnujících aktivní regulační elementy lokalizované „up-stream“ (CNE-5, CNE-3, CNE-2) a „down-stream“ (CNE4, CNE5, CNE7/ECR1, CNE9/ECS4) je pravděpodobně odlišná. Variabilita v počtu kopií se častěji vyskytuje v „down-stream“ regulačních elementech a podle Chen et al. (2009) i Rosilio et al. (2012) je ve většině případů způsobena delecemi. Avšak zda abnormality vyskytující se v „down-stream“ regulačních prvcích jsou častěji představeny duplikacemi či delecemi zůstává nejasné, jelikož několik studií naopak ukazují vyšší frekvenci duplikací v dané oblasti, zvláště u jedinců s fenotypem LWD (Fukami et al., 2016; Sandoval et al., 2014; Shima et al., 2016). Delece vyskytující se v „up-stream“ regionu mohou zasahovat jeden či více CNE, ale podle dřívějších výzkumů byly tyto CNV nalezeny jen u jedinců s ISS (Benito-Sanz et al., 2012; Bunyan et al., 2021), což naznačuje že tyto delece mohou být spojeny s mírnějším fenotypem, kdežto delece „down-stream“ regionu jsou asociovány s fenotypem LWD. Jedinci vykazující fenotypové známky Léri-Weill

dyschondrosteózy mohou také mít CNV v „up-stream“ regionu genu *SHOX*, nicméně se dá předpokládat, že se jedná hlavně o duplikace (Bunyan et al., 2016).

Oproti delecím, zůstává význam duplikací v některých případech kontroverzní. Jak již bylo zmíněno, fenotypy jedinců nesoucích duplikace v oblasti genu *SHOX* jsou velmi variabilní a zahrnují jedince s nízkým, normálním až vysokým vzrůstem. Duplikace v regionu *SHOX* byly popsány jak u pacientů s LWD, tak i ISS. Celkově jsou duplikace v CNE („down-stream“ a „up-stream“) vzácné a jejich lokalizace a rozsah jsou variabilní, což komplikuje stanovení genotyp-fenotypové korelace. Duplikace lokalizované v „up-stream“ regulačních prvcích (CNE-5, CNE-3, CNE-2) byly pozorovány jak u pacientů s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou, tak u jedinců s idiopaticky nízkým vzrůstem (Bunyan et al., 2014; Fukami et al., 2015; Sandoval et al., 2014). Kdežto duplikace zahrnující „down-stream“ regulační elementy byly popsány nejenom u pacientů s LWD a ISS fenotypem, ale i u zdravých jedinců s normální výškou postavy (Gherlan et al., 2023; Hirschfeldova and Solc, 2017). Významné je, že duplikace zahrnující „down-stream“ oblast CNE7 - CNE9, a to včetně nedávno identifikovaného ZED a kandidátního regionu X : 917,000 – 1,029,000, jsou častěji asociovány s pacienty LWD a ISS, než se zdravými jedinci (Bunyan et al., 2021; Fanelli et al., 2022; Hirschfeldova and Solc, 2017).

Bodové mutace také přispívají ke vzniku Lériho-Weillovy dyschondrosteózy. Jednonukleotidové přestavby zasahují do různých exonů *SHOX* a způsobují záměnu aminokyseliny či vznik stop-kodonu. LWD může způsobit například tranzice C/T v exonu 4, čímž dojde k záměně aminokyseliny arginin na terminační kodon a tím pádem se zkrátí oba dva genové produkty „down-stream“ od homeodomény proteinu (Cormier-Daire et al., 1999). V jiné studii u pacienta s nízkým vzrůstem byla odhalena nukleotidová substituce C/A v kodonu 35 v exonu 2, při které tyrosin se také mění na terminační kodon, a další substituce G/A byla pozorována v exonu 3, což vede k záměně aminokyseliny agrinin na histidin (Jorge et al., 2006). Kromě toho nebyly pozorovány žádné fenotypové rozdíly mezi pacienty s „missense“ mutacemi a pacienty s „nonsense“ mutacemi genu *SHOX*.

1.4 Změny metylačního profilu genu *SHOX*

Geny lokalizované na chromosomu X se dělí na tři skupiny: geny, které nepodléhají inaktivaci, inaktivované geny, geny vykazující variabilní inaktivaci. (Tukiainen et al., 2018). *SHOX* patří do první skupiny, jelikož je lokalizován v regionu PAR1, který je důležitý pro správnou segregaci X a Y chromosomů. Lyonizace jednoho z chromosomů X má tendenci měnit metylační profil DNA cílových genů. Inaktivní X (X_i) vykazuje nižší úroveň metylace, než aktivní X (X_a), a to v intragenových a intergenových oblastech genů, které prochází procesem inaktivace (Cotton et al., 2011). Promotory umlčených genů na X_i naopak mají zvýšenou metylaci (Sharp et al., 2011). Je to v souladu s tím, že CpG dinukleotidy v promotorech genů, které nepodléhají inaktivaci jsou hypometylované ve srovnání s CpG dinukleotidy genů inaktivovaných (Cotton et al., 2015). Jedním z vysvětlení by mohl být vyšší počet CpG dinukleotidů v promotorové oblasti, které jsou potenciálními cíli metyltransferáz. Je možné to zhodnotit tak, že za normálního stavu geny, které nepodléhají inaktivaci, mají nižší úroveň metylace promotorových oblastí a zvýšenou intragenovou metylaci. Inaktivace X je spojená s vysokým metylačním indexem CpG dinukleotidů na neaktivním chromosomu X, a to v místech s vysokou densitou CpG.

Jedna třetina X-chromosomálních genů má bialelickou expresi, to znamená že se exprimují z aktivního i neaktivního X chromosomu. Donedávna se předpokládalo, že veškeré geny v PAR1 nepodléhají inaktivaci a vykazují bialelickou expresi v buňkách obou pohlaví. Nicméně jsou předpoklady, že intenzita exprese z X_a a X_i není stejná. Geny, které se vyhýbají inaktivaci, jsou exprimovány z X_i na úrovni, která odpovídá 10 – 95 % exprese z aktivního chromosomu X (Carrel and Willard, 2005; Balaton et al., 2015). Skupina Tukiainen et al. (2018) prokázala, že geny pseudoautosomálního regionu 1 mají u mužů vyšší hladiny exprese v různých tkáních, což naznačuje, že kombinovaná exprese z X_a a X_i u žen nedosahuje stejné úrovně exprese, jako z chromosomů X a Y u mužů. Tyto výsledky demonstrují, že můžeme očekávat rozdílné metylační profily genů pseudoautosomálního regionu 1 u mužů a žen. Avšak v případě genu *SHOX* byla také pozorována náhodná klonální monoalelická exprese (Garieri et al., 2018), kdežto jiné geny PAR1 se exprimují z obou alel. Je možné, že tento jev souvisí s evolucí genu *SHOX*. Podle evolučních studií se zdá, že gen *SHOX* byl původně umístěn na autosomu a teprve později v důsledku nebalancované translokace přemístěn na pohlavní chromosom (Graves et al., 1998). Je známo, že monoalelická exprese

(nebo-li genový imprinting) je epigenetický jev charakteristický pro autosomální chromosomy a proto se diskutuje, že *SHOX* mohl zachovat tyto vlastnosti vzhledem ke svému původu.

Jak již bylo uvedeno výše, *SHOX* nepodléhá inaktivaci, takže se předpokládá, že CpG ostrůvky v blízkosti genu budou hypometylované, to znamená budou vykazovat nízkou úroveň metylace. Potvrzuje to také studie Ogushi et al. (2019) ve které bylo prokázáno, že zdraví jedinci a jedinci nesoucí změny v genu *SHOX* a/nebo regulačních regionech mají podobný metylační profil. CpG ostrůvky obklopující *SHOX* byly hypometylované u obou skupin. Na rozdíl od toho skupina Suzuki et al. (2016) popsala případ hypermetylace několika CpG dinukleotidů v CpG ostrůvku v blízkosti *SHOX*, a to u pacientky nesoucí komplexní přestavby na chromosomu X.

2 CÍLE PRÁCE

Abychom rozšířili vědomosti o stavu metylace DNA v oblasti genu *SHOX* u pacientů s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou, zaměřili jsme se na tři CpG ostrůvky lokalizované v regionu *SHOX*. Tento výzkum částečně navazoval na publikaci Ogushi et al. (2019), kde autoři zkoumali vliv CNV v regulačních sekvencích *SHOX* na stav metylace DNA u pacientů s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou. V této diplomové práci jsme se hlavně zaměřili na vliv duplikací v regulačních oblastech genu *SHOX* na stav metylace DNA u pacientů s LWD. Tento přístup nám umožní lépe porozumět, jak specifické strukturální změny v regulačních oblastech genu *SHOX* ovlivňují epigenetické mechanismy regulace genové exprese. Analýza stavu metylace CpG ostrůvků v oblasti genu *SHOX* u pacientů s LWD bez strukturních přestaveb nebo bodových mutací by také mohla vést k lepšímu pochopení etiologie tohoto syndromu. Na základě toho jsme definovali cíle diplomové práce:

- 1) Ověřit teorii, že přítomnost duplikací v regulačních oblastech genu *SHOX* vede u pacientů s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou ke změnám v metylaci v rámci tohoto genu.
- 2) Zjistit, zda se míra metylace DNA v genu *SHOX* u pacientů s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou bez nálezu kauzální strukturní nebo bodové mutace odlišuje od zdravých jedinců.

Pro naplnění cílů této práce jsme zformulovali dvě pracovní hypotézy:

- 1) Míra metylace DNA ve vybraných CpG ostrůvcích v genu *SHOX* se bude mezi pacienty s duplikací v regulačních oblastech genu *SHOX* a zdravými jedinci signifikantně lišit.
- 2) Pacienti s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou bez nálezu kauzální strukturní nebo bodové mutace se v míře metylace DNA ve vybraných CpG ostrůvcích v genu *SHOX* budou vůči průměru kontrolní skupiny zdravých jedinců odlišovat alespoň o dvojnásobek směrodatné odchylky.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Výzkumný soubor

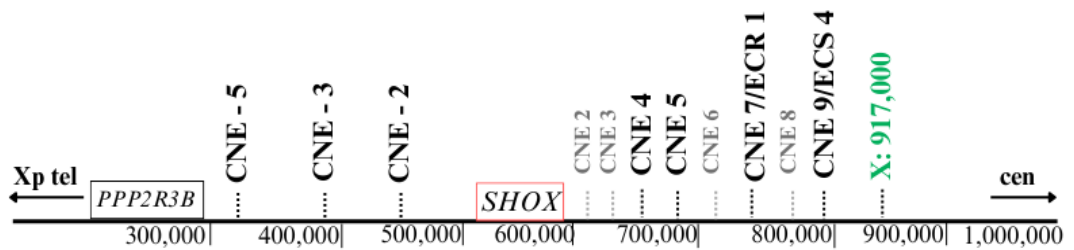
Výzkumný soubor se skládal ze tří skupin jedinců: a) pacienti s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou a duplikací v regulačních oblastech genu *SHOX* (Obr. 7), b) pacienti s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou bez nálezu kauzální strukturní nebo bodové mutace, c) zdraví jedinci (Tab. 1).

Tabulka 1: *Osoby zařazené do studie*

Skupina	Počet	Pohlaví		Věkový průměr (v letech)	Věkové rozpětí
		Ženy	Muži		
a)	20	10	10	14,54	4 – 46
b)	30	14	16	12,6	3,3 – 41,5
c)	23	15	8	27	18 – 49

DNA od pacientů ze skupiny a) i b) byla v rámci dlouhodobé spolupráce poskytnuta Ústavem biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a Ústavem lékařské genetiky fakultní nemocnice v Olomouci (DNA byla izolovaná ze vzorku periferní krve standardní vysolovací metodou anebo za použití přístroje na automatizovanou izolaci a purifikaci nukleových kyselin QIAcube Connect MDx; Qiagen). Vzorky krve od zdravých jedinců byly vybrány z krevní banky naší laboratoře. Kontrolní soubor byl sestaven tak, aby zahrnoval jedince různých věkových skupin, a to s cílem odstínit vliv věku na změny metylace DNA v oblasti genu *SHOX*.

U všech vzorků (a, b, c) byla v rámci dřívějších studií provedena detekce genových přestaveb metodou MLPA („Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification“) za použití následujících komerčních kitů: P018B *SHOX*, P018-D1 *SHOX*, P018-G1 *SHOX* (MRC Holland). Tato metoda umožňuje detekovat změny v počtu kopií sekvencí DNA. MLPA je obzvláště užitečná pro identifikaci delecí nebo duplikací genů, které mohou být příliš malé na to, aby byly detekovány pomocí tradičních cytogenetických metod.



Obrázek 7: *Lokalizace duplikací zasahujících do regulačních oblastí genu SHOX u 20 pacientů s LWD (GRCh38/hg38.) CNE (vysoce konzervované nekódující DNA elementy) – černá barva znázorňuje transkripčně aktivní CNE (CNE-5, CNE-3, CNE-2 v „up-stream“ oblasti; CNE4, CNE5, CNE7/ECR1, CNE9/ECS4 v „down-stream“ oblasti) šedá – neaktivní CNE, bez známé regulační funkce (CNE2, CNE3, CNE6, CNE8), zelená – kandidátní regulační region SHOX. Modré horizontální boxy představují rozsah a umístění duplikací. Autorka.*

3.1.1 Izolace DNA

Izolace DNA u skupiny zdravých jedinců se prováděla ze vzorků zmražené krve, která byla uchovávána při -20 °C po dobu několika let. Izolace byla provedena pomocí komerčního kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit; QiaGen.

Postup izolace DNA:

1. Do 1,5 ml zkumavky bylo přidáno 20 µl QIAGEN Proteázy a 200 µl krve.
2. Ke vzorku bylo přidáno 200 µl pufru AL.
3. Proběhla inkubace vzorku po dobu 10 minut při 56 °C.
4. Ke vzorku bylo přidáno 200 µl 96 % etanolu. Vzorek byl promíchán pomocí vortex.
5. Obsah zkumavky byl přepipetován na kolonku QIAamp Mini nasazenou na 2 ml sběrací zkumavku. Proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při 10 000 rpm („round per minute“). Tekutina ze sběrací zkumavky byla odstraněna.
6. Kolonka QIAamp Mini byla přemístěna do nové sběrací zkumavky. Na kolonku bylo napipetováno 500 µl pufru AW1. Proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při 10 000 rpm. Tekutina ze sběrací zkumavky byla odstraněna.
7. Na kolonku bylo přidáno 500 µl pufru AW2. Proběhla centrifugace po dobu 3 minut při 14 000 rpm. Tekutina ze sběrací zkumavky byla odstraněna.
8. Kolonka byla přemístěna do nové 1,5 ml zkumavky Eppendorf, na kolonku bylo napipetováno 200 µl destilované vody. Proběhla inkubace po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Dale vzorek byl centrifugován 1 minutu při 8000 rpm pro eluci DNA.

3.2 Bisulfitová konverze

Vzorky nejdříve podstoupily bisulfitovou konverzi za použití kitu EZ-DNA Methylation-Lightning Kit; Zymo Research. Tato metoda se používá při analýze metylace DNA pro identifikaci metylovaných cytosinů v sekvenci DNA. Princip bisulfitové konverze spočívá ve vystavení DNA třístupňové chemické reakci (sulfonace, hydrolytická deaminace, alkalická desulfonace), během které se nemetylované cytosiny konvertují na uracil, zatímco metylované cytosiny zůstávají nezměněné. Při následné polymerázové řetězové reakci se konvertované cytosiny amplifikují jako thymin.

Postup bisulfitové konverze:

1. Do 0,2 ml PCR mikrozkušavky bylo přidáno 20 μ l DNA (koncentrace vstupní DNA 200 - 500 ng) a 130 μ l Lightning Conversion Reagent. Centrifugace proběhla po dobu 30 sekund při 8000 rpm.
2. Vzorky byly přenesené do termocyklieru. Teplotní profil: 98 °C – 8 min, 54 °C – 60 min, 4 °C – ∞ .
3. Na kolonku Zymo-SpinTM nasazenou na 2 ml sběrací zkumavku bylo přidáno 600 μ l M-Binding Buffer.
4. Vzorky z kroku č.2 byly přepipetovány na kolonku s pufrem.
5. Proběhla centrifugace po dobu 30 sekund při 14 000 rpm. Filtrát byl odstraněn.
6. Na kolonku bylo přidáno 100 μ l M-Wash pufru. Proběhla centrifugace po dobu 30 sekund při 14 000 rpm. Filtrát byl odstraněn.
7. Na kolonku bylo přidáno 200 μ l L-Desulphonation pufru. Proběhla inkubace po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Následně byly vzorky zcentrifugovány při 14 000 rpm.
8. Na kolonku bylo přidáno 200 μ l M-Wash Buffer. Centrifugace proběhla po dobu 30 sekund při 14 000 rpm. Krok byl zopakován dvakrát.
9. Kolonka byla vložena do nové 1,5 ml zkumavky. Na kolonku bylo pipetováno 12 μ l ddH₂O. Vzorek byl inkubován po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Poté byl centrifugován po dobu 45 sekund při 14 000 rpm.

3.2.1 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla vždycky změřena před a po bisulfitové konverzi pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Před zahájením měření bylo nutné vyčistit optiku přístroje pomocí destilované vody a změřit absorbanci pozadí. Poté byl vzorek v objemu 1 μ l aplikován na optiku přístroje. Po každém měření byla optika přístroje důkladně očištěna. Před konverzi byla koncentrace měřena jako dsDNA („double-stranded DNA“), po bisulfitové konverzi jako ssDNA („single-stranded DNA“), jelikož po konverzi dochází k chemické modifikaci některých bází, což způsobí denaturaci dvojitěvláknové DNA.

3.3 Polymerázová řetězová reakce

Po provedení bisulfitové konverze proběhla amplifikace fragmentů tří CpG ostrůvků lokalizovaných v regulační oblasti genu *SHOX* (Tab. 2). Tato metoda umožňuje vytvoření velkého množství identických kopií cílové sekvence DNA, a to pomocí specifických primerů, které se navážou na koncové části cílového úseku. Primery pak slouží jako matrice pro DNA polymerázu, která kopíruje cílový fragment DNA. CpG ostrůvky a sekvence primerů pro dané úseky byly zvolené dle publikace Ogushi et al. (2019) (Tab. 3). První ostrůvek je lokalizovaný „up-stream“ od nekódujícího exonu 1, ostrůvek CpG 2 se nachází přímo v exonu 1, třetí ostrůvek zahrnuje část kódujícího exonu 2 genu *SHOX*. Velikost amplifikovaných fragmentů CpG 1 – 153 bp („base pair“, párů bází), CpG 2 – 176 bp, CpG 3 – 134 bp.

Tabulka 2: Lokalizace CpG ostrůvků na chromosomu X a počet jednotlivých CpG dinukleotidů. (UCSC Genome Browser on Human (GRCh38/hg38)).

Lokalizace ostrůvků	Množství CpG v rámci ostrůvku
CpG island 1: chrX: 619,008 - 620,527	155
CpG island 2: chrX: 623,829 - 624,591	66
CpG island 3: chrX: 629,695 - 631,462	163
Lokalizace zkoumaného úseku	Množství CpG v rámci úseku
CpG island 1: chrX: 620,234 - 620,387	13
CpG island 2: chrX: 624,445 - 624,621	6
CpG island 3: chrX: 630,608 - 630,742	7

Tabulka 3: Sekvence primerů pro CpG ostrůvky (1, 2, 3) získané od autorů publikace Ogushi et al. (2019).

	Sekvence 5' - 3', F	Sekvence 3' - 5', R
CpG 1	GGGAGGAAGGAGGTG- AATTAGG	AAACCAAAAAAAAAACA -CACTTTACT
CpG 2	AGAAATGGGAGGGTG- GATAG	TTCCAAAACCCAACCTC- ACCAAACCTCTA
CpG 3	GGAAGTTAAATAGTG- ATGAAATGAGAAGAA	CCCCCATACCCTACCTA -TCTAATACAAT

Po několika neúspěšných cyklech PCR bylo zjištěno, že sekvence primerů získané od autorů publikace neodpovídají přesně referenční sekvenci DNA. Kontrola pozice

primerů byla provedena pomocí online programu MultAlin („Multiple sequence alignment tool“). Nejdříve byly sekvence tři CpG ostrůvků staženy z webové stránky UCSC Genome Browser on Human (GRCh38/hg38), následně byly pomocí programu MultAlin sekvence primerů porovnány s referenčními sekvencemi. Výsledkem bylo zjištění minimálně jedné chyby v každém páru primerů (Tab. 4).

Tabulka 4: Upravené sekvence primerů pro CpG ostrůvky (1, 2, 3), které byly použité při PCR.

	Sekvence 5' - 3'	Sekvence 3' - 5'
CpG 1	GGGAGGAAGGTGGTG- AATTAGG	AAACCAAAAAAAAAA- CACACTTTACT
CpG 2	AGAAATGGGAGGGTG- GATAG	TTCCAAAACCAAAC- TCACCAAACCTCTA
CpG 3	GGATGTAAATAGT- GATGAAATGAGAAGAA	CCCCCATACTACTACC- TATCTAATACAAT

Pro zlepšení výsledků sekvenování a zachycení všech CpG dinukleotidů v rámci amplifikovaného úseku k primerům pro ostrůvek CpG 3 byly přidány sekvence pro primery M13 (M13F, M13R). Tyto primery slouží ke zjednodušení sekvenování produktů PCR a ke snížení ztráty bází na 5' konci řetězce. Sekvence těchto primerů se přidává na konce specifických primerů (F, R), což při následném sekvenování PCR produktu prodlužuje samotné čtení. Sekvence M13 primerů:

M13F 5' - GTA AAA CGA CGG CCA GT -3'

M13R 5' - AAC AGC TAT GAC CAT G -3'

Reakční směs pro každý pár primerů byla stejná a její složení bylo následující: 12,5 µl Combi PPP Master Mixu; Top-Bio s.r.o, který obsahuje Taq DNA polymerázu, jednotlivé nukleotidy (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), chlorid hořečnatý MgCl₂, reakční pufr (pH 8,8) a také barviva a aditiva, která jsou nezbytná pro následnou elektroforézu. K master mixu se dále přidalo 0,7 µl 5 µM roztoku primerů (F – „forward“, R – „reverse“), 0,9 µl PCR H₂O (voda zbavena nukleáz) a 2 µl DNA po bisulfitové konverzi. Finální objem reakce činil 25 µl.

PCR byla provedena za použití termocykleru Tproffesional 96 Gradient; Biometra. Termocykler umožňuje cyklické řízení teploty vzorku DNA, což je nezbytné

pro úspěšnou amplifikaci. Každý cyklus se skládá z tří teplotních úrovní: při první (denaturace) se rozštěpí dvojitá DNA, při druhé („annealing“) se na DNA navážou primery a při třetí (extenze) se aktivuje Taq DNA polymeráza. Teplota nasedání primerů se pro každý CpG ostrůvek lišila, jelikož je závislá na délce primerů a počtu GC párů.

Nastavení teplotního profilu:

- 1) Počáteční denaturace: 95 °C, 3 minuty;
 - 2) Denaturace DNA: 95 °C, 20 sekund;
 - 3) Nasednutí primerů („annealing“): CpG 1 – 59 °C, 40 sekund; CpG 2 – 57,1 °C, 40 sekund; CpG 3 – 59 °C, 40 sekund;
 - 4) Extenze: 72 °C, 1 minuta;
 - 5) Finální extenze: 72 °C, 5 minut;
 - 6) Chlazení: 4 °C, ∞.
- Celkový počet cyklů (kroky 2 - 4): 40.

3.4 Gelová elektroforéza

Pro ověření průběhu PCR a úspěšnosti amplifikace chemicky modifikované DNA s použitím specifických primerů pro CpG ostrůvky byla použita elektroforetická separace nukleových kyselin, tedy gelová elektroforéza. Princip této metody spočívá v elektroforetické migraci nabitých molekul v gelu, který je pod vlivem elektrického pole. V závislosti na velikosti amplifikovaného fragmentu putuje negativně nabitá DNA k pozitivně nabitému pólu s rozdílnou rychlostí. Interkalační barvivo se váže mezi jednotlivé báze v molekule DNA a po dokončení elektroforézy umožňuje vizualizaci DNA pod UV světlem.

Pro elektroforézu byl použit 2% agarozový gel, do kterého bylo přidáno interkalační barvivo GelRed Nucleic Acid Gel Stain; Biotium. Do první jamky na gelu bylo napipetováno 1,25 µl ladderu („ladder“, žebříček – GeneRuler 100 bp; Thermo Scientific) smíchaného se 4 µl ddH₂O a 1 µl nanášecího pufru (6x TriTrack DNA Loading Dye; Thermo Scientific), do ostatních jamek 5 µl produktu PCR. Napětí bylo nastaveno na 95 V a migrace fragmentů probíhala po dobu 75 minut. Po ukončení byl gel nasníman pomocí přístroje Molecular Imager Gel Doc XR system a snímky byly vyhodnoceny pomocí počítačového programu ImageLab.

3.5 Bisulfitová sekvenace

Pro analýzu metylace jednotlivých CpG dinukleotidů v rámci CpG ostrůvků, byly produkty PCR osekvenovány (Sangerovo sekvenování). Bisulfitová sekvenace umožňuje identifikovat metylované cytosiny v sekvenci DNA tím, že při ošetření DNA bisulfitem zůstanou metylované cytosiny nezměněné, zatímco nemetylované cytosiny se konvertují na uracil.

Produkty PCR před sekvenací byly nejdříve přečištěny pomocí kitu SAP-Exo; Biogen. Ke 5 μl PCR produktu bylo přidáno 1 μl SAP-Exo mixu, vzorky byly zvortexovány a vloženy do termocykleru. Inkubace probíhala po dobu 20 minut při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$, 20 minut při teplotě 80 $^{\circ}\text{C}$. Celkový objem vzorku pro sekvenční reakci činil 8 μl : 1 μl primeru R (ze 5 μM zásobního roztoku), DNA naředěná na koncentraci 5 ng/100 bp, zbytek byl doplněn ddH₂O. Samotná sekvenace byla provedena v Laboratoři sekvenace DNA biologické sekce PřF UK (BIOCEV) na genetickém analyzátoru ABI 3500 Life Technologies za použití BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kitu.

3.6 Zpracování chromatogramu a výpočet úrovně metylace

Po získání dat ze sekvenování jednotlivé chromatogramy ve formátu (.ab1) byly zpracovány pomocí ABSP („Analysis of Bisulfite Sequencing PCR“) nástroje, což je softwarový balíček, který funguje pomocí programovacího jazyka R (Denoulet et al., 2023). Tento nástroj provádí analýzu metylace jednotlivých CpG dinukleotidů za použití dat získaných během bisulfitového sekvenování produktů PCR.

Prvním krokem při zhodnocení úrovně metylace je porovnání sekvence získané po sekvenaci s referenční sekvencí, která se do programu vkládá manuálně. Tento krok je nutný k získání informace o lokalizaci všech CpG míst v rámci zkoumané sekvence DNA. Při tomto porovnání také probíhá ořezávání sekvenčního čtení na základě kvality. Minimální procento identity zarovnání sekvencí bylo stanoveno na hodnotu 80 %. Dále následovala analýza účinnosti bisulfitové konverze, která vypovídá o efektivitě přeměny cytosinů na uracil (a později na thymin při PCR) v sekvenci DNA během procesu bisulfitové konverze. Sekvence, vykazující účinnost konverze nižší 90 % byly vyloučeny z analýzy anebo reanalyzovány.

Dalším parametrem použitým pro stanovení kvality sekvence bylo Phred quality score, což je měřítko kvality identifikace bází generovaných DNA sekvenováním.

Hodnota Phred score byla nastavena na 30, což znamená, že možnost zařazení chybné báze je 1:1000.

Posledním krokem byl samotný výpočet úrovně metylace. Jak již bylo zmíněno bisulfitová konverze nechává metylované cytosiny v řetězci beze změn, proto cytosinový signál v CpG dinukleotidu bude odrážet úroveň metylace cytosinu v tomto místě. Naopak, thyminový signál odráží množství cytosinu (jelikož během konverze nemetylované cytosiny se přeměňují na uracil, který se následně amplifikuje jako thymin). Relativní velikost těchto píků bude úměrná celkovému procentu metylovaných cytosinů. Úroveň metylace pro každý CpG dinukleotid v DNA amplikonu lze tedy kvantifikovat měřením poměru mezi výškami píku cytosinu a thyminu v případě sekvenace s přímým primerem (první vzorec) anebo mezi výškami píku adeninu a guaninu v případě práce se zpětným primerem (druhý vzorec) (Parrish et al., 2012) :

$$\% \text{ metylace} = \frac{\text{výška píku } C}{(\text{výška píku } C + \text{výška píku } T)} \times 100\%$$

$$\% \text{ metylace} = \frac{\text{výška píku } G}{(\text{výška píku } G + \text{výška píku } A)} \times 100\%$$

Sekvenace byla provedena ve třech opakováních pro každou hladinu metylace. Hodnoty metylace pro jednotlivý CpG dinukleotid byly následně spočítány jako průměr ze tří hodnot.

3.7 Ověření přesnosti bisulfitové sekvenace

Pro ověření přesnosti a správnosti bisulfitového sekvenování byla použita komerční 100% metylovaná lidská celogenomová DNA a 0% metylovaná lidská celogenomová DNA (Human Methylated & Non-Methylated (WGA) DNA Set; ZymoResearch). Z těchto vzorků byla připravena ředící řada od 0% do 100% metylace v krocích po 25%. Takto naředěná DNA prošla celým protokolem, od bisulfitové konverze až po vyhodnocení úrovně metylace, a to za použití primerů pro jednotlivé CpG ostrůvky.

Tento postup je důležitý pro adekvatní vyhodnocení experimentálních dat (Parrish et al., 2012), proto pro každý amplifikovaný úsek (CpG 1 a CpG 3) byla odvozena standardní křivka vytvořena za použití metylačních dat získaných po bisulfitové sekvenaci komerčních DNA standardů (0%, 25%, 50%, 75%, 100%).

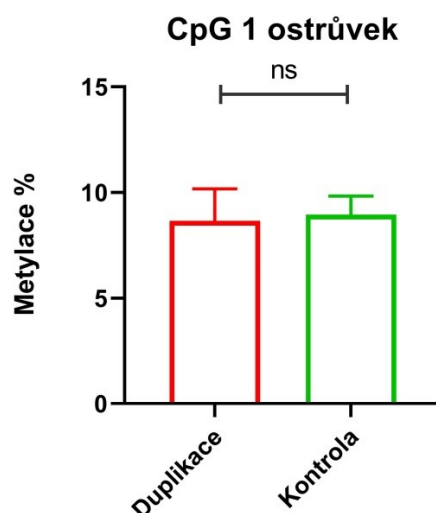
4 VÝSLEDKY

V rámci této práce byly nakonec analyzovány pouze dva CpG ostrůvky genu *SHOX* (CpG 1 a CpG 3). Ostrůvek CpG 2 se do analýzy nepodařilo zařadit z technických důvodů. Již ve fázi optimalizace podmínek PCR docházelo k chybám, kdy se při gelové elektroforéze objevovaly nespecifické produkty. Navzdory opakovaným pokusům o optimalizaci, zahrnujícím změnu primerů, teplotních profilů a složení reakční směsi, se nepodařilo získat specifické a spolehlivé výsledky pro tento ostrůvek. Proto byla další analýza tohoto ostrůvku z experimentu vynechána.

4.1 Srovnání úrovně metylace DNA u ostrůvku CpG 1

Pro ověření předpokladu, že duplikace v regulačních oblastech genu *SHOX* u jedinců se syndromem Léri-Weill vedou ke změnám ve stavu metylace DNA v rámci tohoto genu, bylo nejdříve provedeno srovnání průměrné hodnoty metylace za celý ostrůvek CpG 1 mezi skupinou pacientů s duplikací a zdravými jedinci. Hodnoty metylace pro jednotlivé CpG dinukleotidy v rámci amplifikovaného úseku byly spočítány jako průměr ze tří hodnot získaných z nezávislých opakování sekvenční reakce (vždy se zpětným primerem).

Ke statistickému zpracování dat byl použit program GraphPad Prism 8. V první řadě bylo provedeno testování normálního rozložení dat (Anderson-Darling, D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov). Následně pomocí nepárového t-testu jsme provedli srovnání průměrné metylace u ostrůvku CpG 1 mezi skupinou pacientů s duplikací a kontrolní skupinou zdravých jedinců. Rozdíl v úrovni metylace za celý ostrůvek nebyl statisticky významný ($p = 0,4224$) (Graf 1).

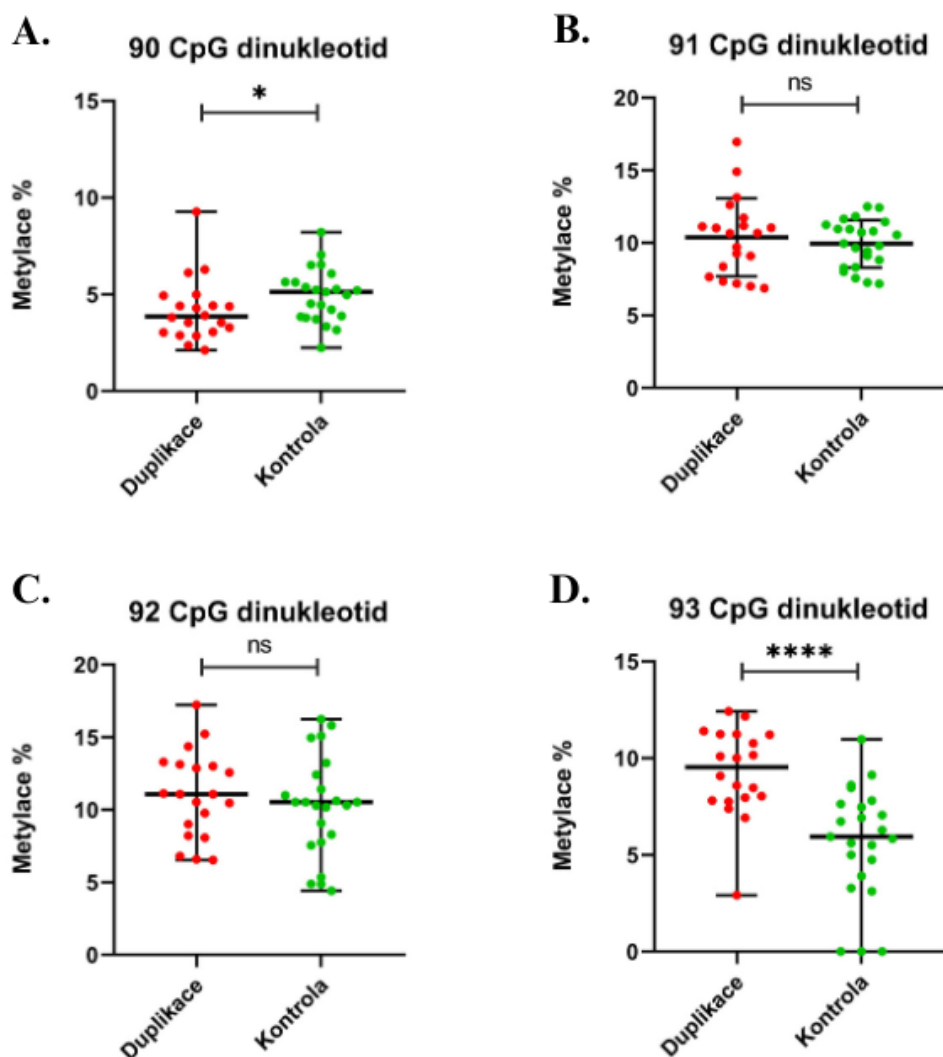


*Graf 1: Srovnání průměrné metylace DNA u ostrůvku CpG 1 mezi pacienty s duplikací a zdravými jedinci. Červený sloupec reprezentuje pacienty s LWD a duplikací v regulačních oblastech genu SHOX, zelený sloupec reprezentuje zdravé jedince. Hranice boxu představují průměr, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku, ns – nesignifikantní. Hodnoty sloupců: **Duplikace:** průměr 8,652. **Kontrola:** průměr 8,953; $P = 0,4224$.*

4.1.1 Srovnání úrovně metylace jednotlivých CpG dinukleotidů v CpG 1 ostrůvku

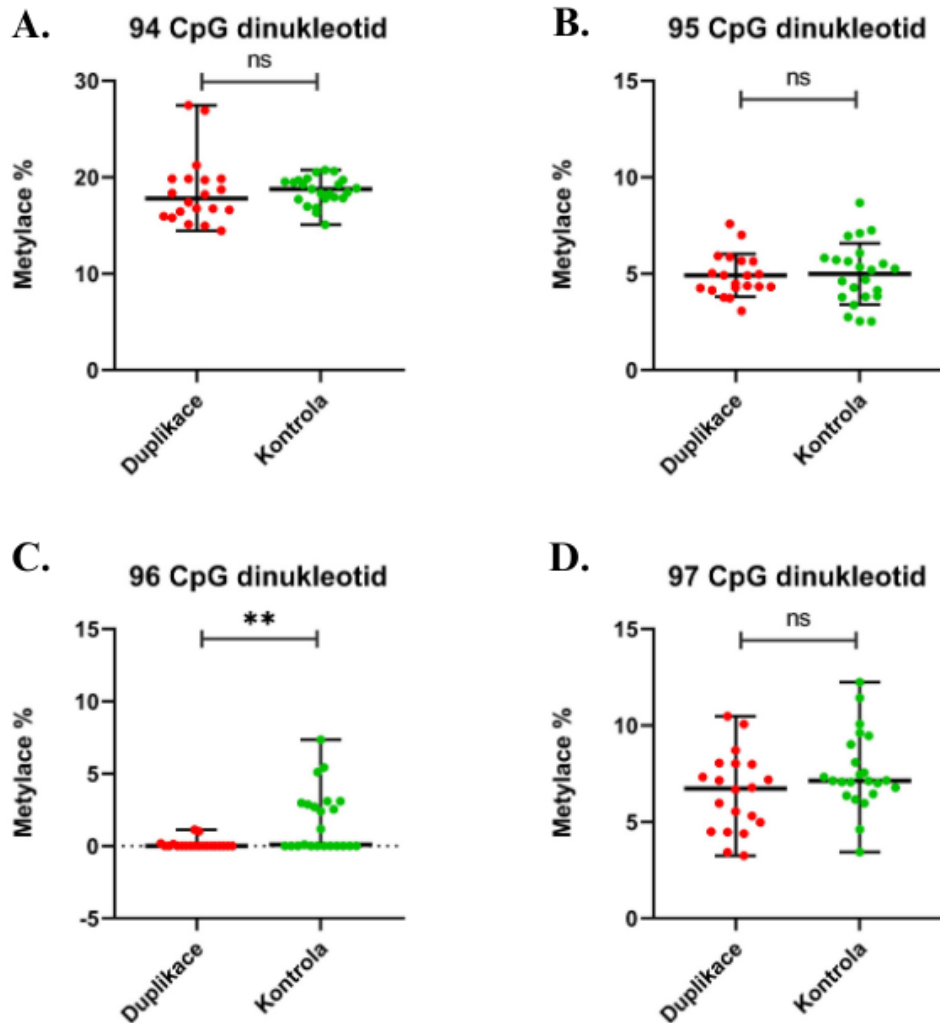
Porovnání stavu metylace na úrovni jednotlivých CpG dinukleotidů v rámci ostrůvku CpG 1 bylo provedeno mezi skupinou pacientů s duplikací v regulačních oblastech genu *SHOX* a zdravými jedinci, kde každá hodnota metylace (%) u jednotlivého pacienta/jedince byla vypočítána jako průměrná hodnota ze tří opakování sekvenace. Celkem je v amplifikovaném úseku 13 CpG dinukleotidů, přičemž číslování začíná od 90. CpG a končí 102. CpG dinukleotidem, což je dáno reálným umístěním dinukleotidů v ostrůvku CpG1 (Grafy 2 – 5).

Před samotným porovnáním byl vždy proveden test normálního rozdělení dat (Anderson-Darling, D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov) a také test identifikace odlehlých pozorování (ROUT (Q = 1 %)). V případě kdy data vykazovala normální rozdělení byl proveden nepárový t-test, v opačném případě Mann-Whitneyho U test. Statisticky významný rozdíl v úrovni metylace mezi skupinou pacientů s duplikací a zdravými jedinci byl pozorován pouze u 5 CpG dinukleotidů: 90. CpG ($p = 0,0261$), 93. CpG ($p < 0,0001$), 96. CpG ($p = 0,0078$), 100. CpG ($p < 0,0001$), 102. CpG ($p = 0,0048$).



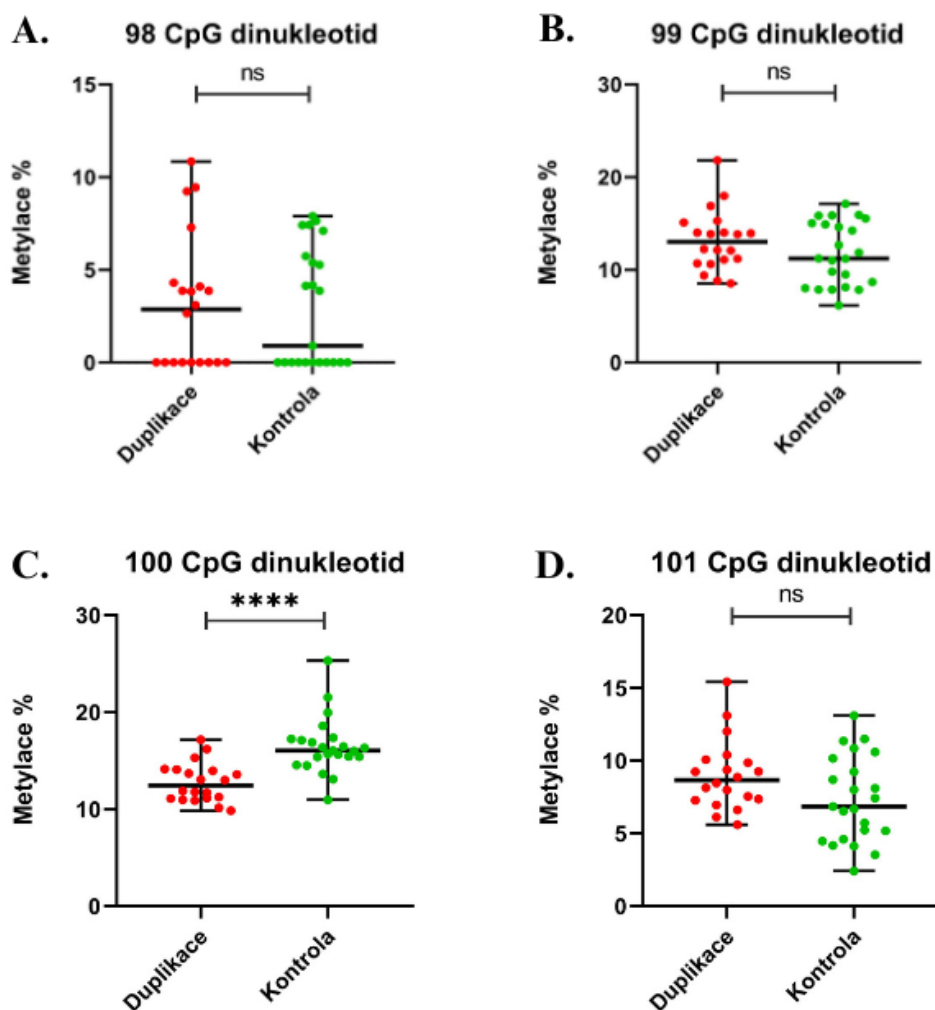
Graf 2: Srovnání stavu metylace 90 CpG (A), 91 CpG (B), 92 CpG (C) a 93 CpG (D) dinukleotidů mezi pacienty s duplikací a zdravými jedinci (kontrola). Červené body reprezentují pacienty s duplikací v regulačních oblastech genu SHOX, zelené body reprezentují zdravé jedince. Hvězdičky nahoře znázorňují statisticky významný rozdíl, ns – nesignifikantní rozdíl.

*A. Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace**: medián 3,850; **Kontrola**: medián 5,12; $P = 0,0261$. **B.** Horizontální čáry uprostřed představují průměr, chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hodnoty plotů: **Duplikace**: průměr 10,37; **Kontrola**: průměr 9,924; $P = 0,5128$. **C.** Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace**: medián 11,06; **Kontrola**: medián 10,52; $P = 0,4012$. **D.** Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace**: medián 9,535; **Kontrola**: medián 5,940; $P < 0,0001$.*



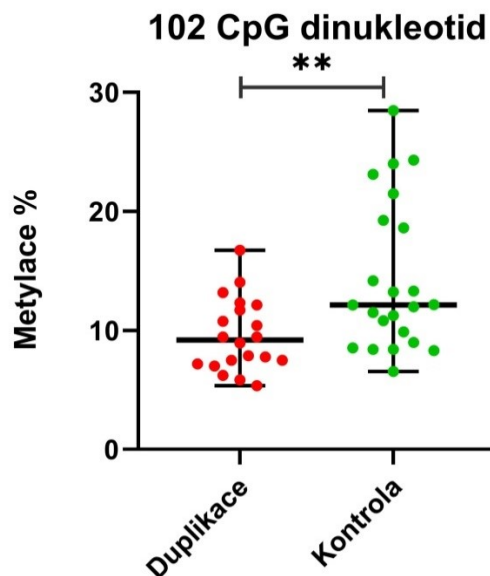
Graf 3: Srovnání stavu metylace 94 CpG (A), 95 CpG (B), 96 CpG (C) a 97 CpG (D) dinukleotidů mezi pacienty s duplikací a zdravými jedinci (kontrola). Červené body reprezentují pacienty s duplikací v regulačních oblastech genu *SHOX*, zelené body reprezentují zdravé jedince. Hvězdičky nahoře znázorňují statisticky významný rozdíl, ns – nesignifikantní rozdíl.

A. Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace:** medián 17,8; **Kontrola:** medián 18,76; $P = 0,3012$. **B.** Horizontální čáry uprostřed představují průměr, chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hodnoty plotů: **Duplikace:** průměr 4,906; **Kontrola:** průměr 4,989; $P = 0,8455$. **C.** Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace:** medián 0,00; **Kontrola:** medián 0,09; $P = 0,0078$. **D.** Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace:** medián 6,725; **Kontrola:** medián 7,130; $P = 0,1435$.



Graf 4: Srovnání stavu metylace 98 CpG (A), 99 CpG (B), 100 CpG (C) a 101 CpG (D) dinukleotidů mezi pacienty s duplikací a zdravými jedinci (kontrola). Červené body reprezentují pacienty s duplikací v regulačních oblastech genu SHOX, zelené body reprezentují zdravé jedince. Hvězdičky nahoře znázorňují statisticky významný rozdíl, ns – nesignifikantní rozdíl.

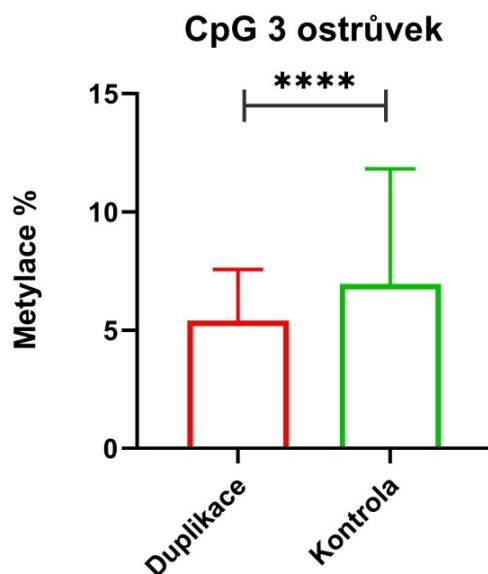
A. Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace:** medián 2,870; **Kontrola:** medián 0,890; $P = 0,9345$. **B.** Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace:** medián 13,02; **Kontrola:** medián 11,22; $P = 0,3157$. **C.** Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace:** medián 12,44; **Kontrola:** medián 16,03; $P < 0,0001$. **D.** Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace:** medián 8,660; **Kontrola:** medián 6,850; $P = 0,0684$.



Graf 5: Srovnání stavu metylace 102 CpG dinukleotidu mezi pacienty s duplikací a zdravými jedinci (kontrola). Červené body reprezentují pacienty s duplikací v regulačních oblastech genu *SHOX*, zelené body reprezentují zdravé jedince. Hvězdičky nahoře znázorňují statisticky významný rozdíl. Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace:** medián 9,190; **Kontrola:** medián 12,12; $P = 0,0048$.

4.2 Srovnání úrovně metylace DNA u ostrůvku CpG 3

Pro porovnání stavu metylace DNA mezi pacienty s duplikací v regulačních oblastech genu *SHOX* a zdravými jedinci v rámci ostrůvku CpG 3 byla provedena stejná analýza jako u ostrůvku CpG 1 (test odlehlých pozorování, test normality dat, Mann-Whitneyho U test). Na začátku bylo provedeno srovnání průměrné metylace za celý ostrůvek mezi dvěma skupinami jedinců, kde jsme pozorovali statisticky významný rozdíl v hladině metylace. Zdraví jedinci vykazovali vyšší míru metylace ve srovnání s pacienty s duplikací v regulačních oblastech genu *SHOX* ($p < 0,0001$) (Graf 6).

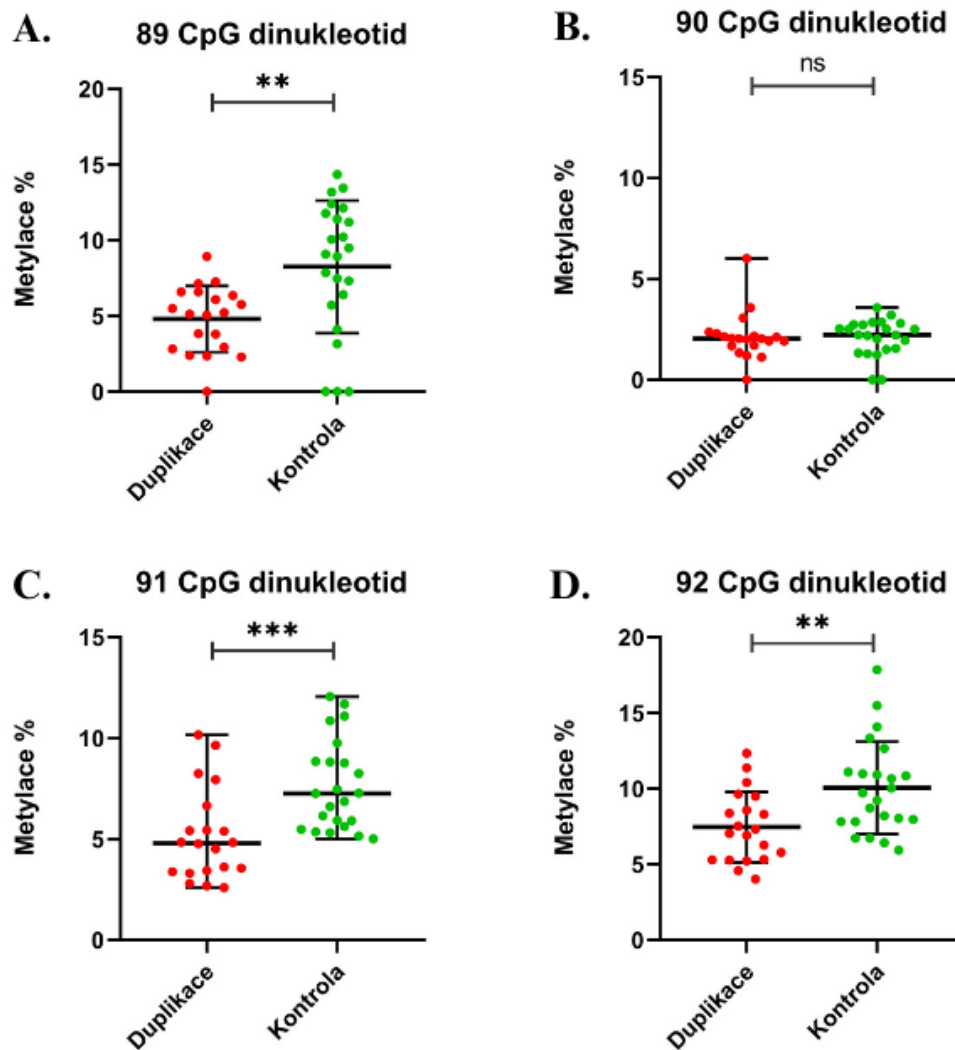


*Graf 6: Srovnání průměrné metylace DNA u ostrůvku CpG 3 mezi pacienty s duplikací a zdravými jedinci (kontrola). Červený sloupec reprezentuje pacienty s LWD a duplikací v regulačních oblastech genu SHOX, zelený sloupec reprezentuje zdravé jedince. Hranice boxu představují medián, chybové úsečky znázorňují rozptyl. Hvězdičky nahoře znázorňují statisticky významný rozdíl. Hodnoty sloupců: **Duplikace:** medián 5,410; **Kontrola:** medián 6,950; $P < 0,0001$.*

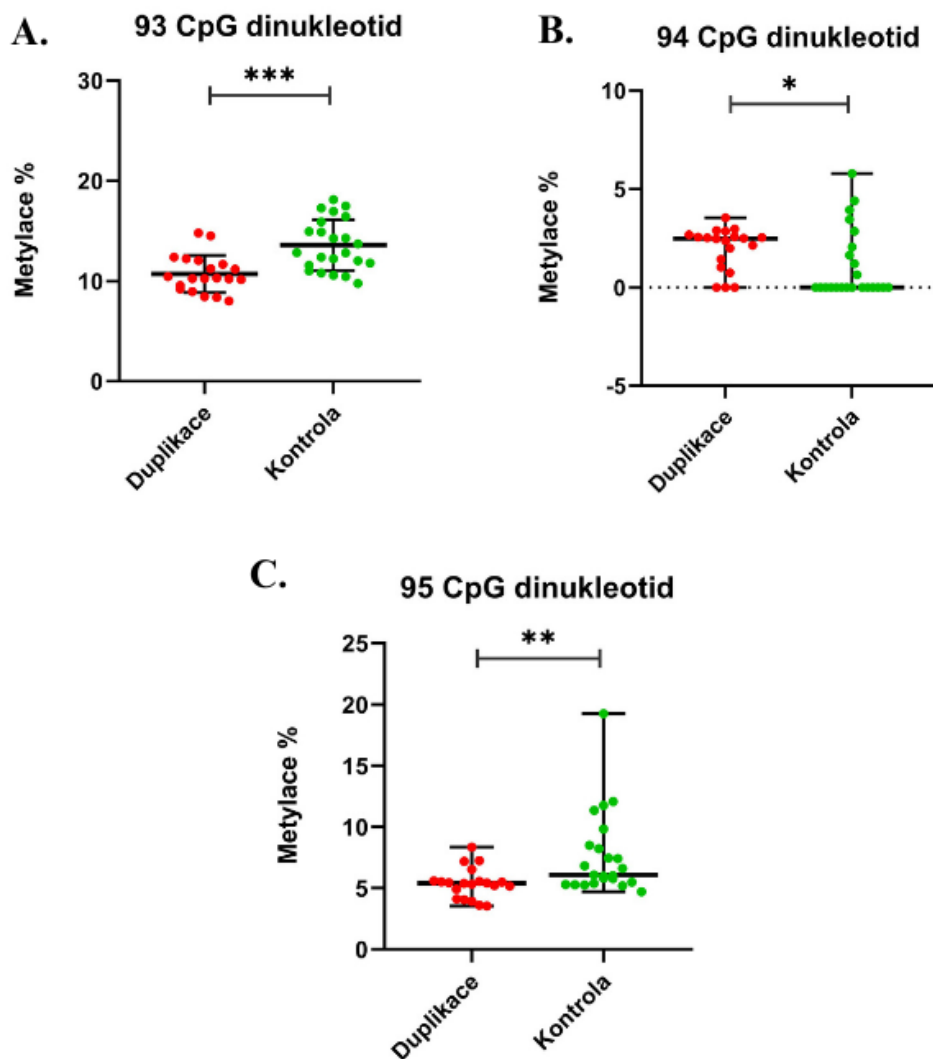
4.2.1 Srovnání úrovně metylace jednotlivých CpG dinukleotidů v CpG 3 ostrůvku

Porovnání stavu metylace CpG dinukleotidů, kterých bylo v rámci amplifikovaného úseku sedm, mezi skupinou pacientů s duplikací a kontrolní skupinou zdravých jedinců bylo provedeno stejně jako u ostrůvku CpG 1 (Test odlehlých pozorování, test normality dat, nepárový t-test anebo Mann-Whitneyho U test).

Výsledky statistické analýzy odhalily významné rozdíly v úrovni metylace jednotlivých CpG dinukleotidů mezi skupinou pacientů s duplikací a zdravými jedinci (Grafy 7 – 8). Ze sedmi zkoumaných CpG dinukleotidů šest vykazovalo statisticky významný rozdíl v míře metylace. U pěti CpG dinukleotidů byla pozorována vyšší úroveň metylace u zdravých jedinců: 89. CpG ($p = 0,0027$), 91. CpG ($p = 0,0003$), 92. CpG ($p = 0,0034$), 93. CpG ($p = 0,0001$), 95. CpG ($p = 0,0031$). Naopak, pouze u jednoho CpG dinukleotidu byla pozorována vyšší hladina metylace u pacientů nesoucích duplikaci v regulační oblasti, a tento rozdíl byl také statisticky významný (94. CpG; $p = 0,0191$).



*Graf 7: Srovnání stavu metylace 89 CpG (A), 90 CpG (B), 91 CpG (C) a 92 CpG (D) dinukleotidů mezi pacienty s duplikací a zdravými jedinci (kontrola). Červené body reprezentují pacienty s duplikací v regulačních oblastech genu SHOX, zelené body reprezentují zdravé jedince. Hvězdičky nahoře znázorňují statisticky významný rozdíl, ns – nesignifikantní. A. Horizontální čáry uprostřed představují průměr, chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hodnoty plotů: **Duplikace**: průměr 4,804; **Kontrola**: průměr 8,249; $P = 0,0027$. B. Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace**: medián 2,040; **Kontrola**: medián 2,230; $P = 0,3360$. C. Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace**: medián 4,800; **Kontrola**: medián 7,260; $P = 0,0003$. D. Horizontální čáry uprostřed představují průměr, chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hodnoty plotů: **Duplikace**: průměr 7,455; **Kontrola**: průměr 10,06; $P = 0,0034$.*



Graf 8: Srovnání stavu metylace 93 CpG (A), 94 CpG (B), 95 CpG (C) dinukleotidů mezi pacienty s duplikací a zdravými jedinci (kontrola). Červené body reprezentují pacienty s duplikací v regulačních oblastech genu SHOX, zelené body reprezentují zdravé jedince. Hvězdičky nahoře znázorňují statisticky významný rozdíl, ns – nesignifikantní. **A.** Horizontální čáry uprostřed představují průměr, chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hodnoty plotů: **Duplikace:** průměr 10,71; **Kontrola:** průměr 13,59; $P = 0,0001$. **B.** Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace:** medián 2,485; **Kontrola:** medián 0,000. $P = 0,0191$. **C.** Horizontální čáry uprostřed představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty plotů: **Duplikace:** medián 5,410; **Kontrola:** 6,080; $P = 0,0031$.

4.3 Metylační profilování u pacientů bez kauzální strukturní nebo bodové mutace v genu *SHOX*

Pro posouzení předpokladu, zda se míra metylace DNA v genu *SHOX* u pacientů s LWD bez nálezu kauzální strukturní nebo bodové mutace bude odlišovat od zdravých jedinců, bylo provedeno metylační profilování 30 pacientů, u nichž příčina výskytu onemocnění není známa. Metylační profilování, tedy posouzení stavu metylace (%) jednotlivých CpG dinukleotidů, bylo provedeno zvlášť u ostrůvků CpG 1 a CpG 3 (Tab. 5 a Tab. 6). Tato analýza zahrnovala porovnání úrovně metylace pacientů s LWD (n = 30) a průměrnou metylaci zdravých jedinců (n = 23).

Pokud od hodnoty metylace pacienta odečteme průměrnou metylaci zdravých jedinců a tuto hodnotu vydělíme směrodatnou odchylkou, získáme tzv. standardizovanou odchylku. Tento ukazatel nám poskytuje informaci o tom, jak moc se daná hodnota metylace pacienta odchyluje od průměru zdravých jedinců, vyjádřenou v násobcích směrodatné odchylky. Výpočet standardizované odchylky u jednotlivého pacienta:

$$\frac{\% \text{ metylace u pacienta} - \text{průměrné \% metylace kontrol}}{\text{směrodatná odchylka } (\sigma)}$$

Tento ukazatel nám umožňuje kvantifikovat, jak moc se daná hodnota metylace liší od průměru zdravých jedinců, a to ve standardizovaných jednotkách, což usnadňuje porovnávání mezi jednotlivými pacienty. Pokud je odchylka kladná, znamená to, že hodnota metylace pacienta je nad průměrem zdravých jedinců, a naopak, pokud je záporná, znamená to, že hodnota metylace pacienta je pod průměrem zdravých jedinců. Zbarvení buněk v tabulce odpovídá míře této odlišnosti. Světle růžové buňky značí, že hodnota metylace pacienta se v daném místě (CpG) liší od průměru zdravých kontrol minimálně o 2 SD směrem k vyšším hodnotám, tmavě růžové buňky značí odchylku od průměru větší než 3 SD. Naopak, světle modré buňky indikují, že hodnota metylace je alespoň o 2 SD pod průměrem zdravých jedinců, tmavě modré buňky označují odchylku od průměru směrem dolů větší než 3 SD. Tento barevný kód umožňuje rychle a snadno vizualizovat velikosti a směru odchylek metylačních profilů pacientů ve srovnání se zdravými jedinci.

Tabulka 5: Metylační profily pacientů s LWD a hodnoty standardizované odchylky vyjádřené v násobcích směrodatné odchylky pro jednotlivé CpG dinukleotidy v rámci CpG 1 ostrůvku (Pacienti 1 – 15).

	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	průměr
Kontrola	průměrné % metylace													
n = 23	4,952	9,924	10,228	5,652	18,586	4,989	1,684	7,587	2,909	11,773	16,496	7,325	14,290	8,953
	směrodatná odchylka													
	1,380	1,634	3,456	2,910	3,118	1,590	2,141	2,001	3,206	3,394	2,901	2,952	6,252	0,877
Pacient														
1	% metylace													
	4,550	10,080	9,550	6,990	18,790	4,860	5,190	6,200	7,180	8,160	9,640	5,440	8,170	8,062
	odchylka													
	-0,291	0,095	-0,196	0,460	0,065	-0,081	1,638	-0,693	1,332	-1,065	-2,363	-0,639	-0,979	-1,017
2	% metylace													
	14,67	21,03	19,01	16,47	32,29	3,09	11,76	9,29	0	25,95	42,37	50,84	9,58	19,719
	odchylka													
	7,042	6,797	2,541	3,718	4,395	-1,194	4,706	0,851	-0,907	4,177	8,919	14,741	-0,753	12,276
3	% metylace													
	4,36	11,19	4,8	6,81	18,23	4,68	0	5,21	0	10,31	9	6,85	7,16	6,815
	odchylka													
	-0,429	0,775	-1,571	0,398	-0,114	-0,194	-0,787	-1,188	-0,907	-0,431	-2,584	-0,161	-1,140	-2,438
4	% metylace													
	4,74	11,36	9,71	7,09	17,94	4,31	7,42	10,07	12,43	13,86	15,17	9,34	12,9	10,488
	odchylka													
	-0,154	0,879	-0,150	0,494	-0,207	-0,427	2,679	1,241	2,970	0,615	-0,457	0,683	-0,222	1,749
5	% metylace													
	3,58	3,61	9,36	7,64	17,35	4,26	5,05	4,71	0	14,45	14,01	17,14	10,23	8,568
	odchylka													
	-0,994	-3,864	-0,251	0,683	-0,396	-0,458	1,572	-1,438	-0,907	0,789	-0,857	3,325	-0,649	-0,439
6	% metylace													
	3,67	10,6	10,56	6,48	16,14	4,01	5,13	5,57	6,19	8,73	10,03	4,32	8,63	7,697
	odchylka													
	-0,929	0,414	0,096	0,285	-0,784	-0,616	1,610	-1,008	1,023	-0,897	-2,229	-1,018	-0,905	-1,433
7	% metylace													
	4,3	10,62	9,23	7,05	19,75	4,92	5,39	6,14	6,56	8,11	9,72	4,52	8,08	8,030
	odchylka													
	-0,472	0,426	-0,289	0,480	0,373	-0,043	1,731	-0,723	1,139	-1,079	-2,336	-0,950	-0,993	-1,053
8	% metylace													
	3,76	12,53	11,88	6,47	17,15	3,25	3,6	5,58	7,73	11,45	12,57	9,22	10,04	8,864
	odchylka													
	-0,864	1,595	0,478	0,281	-0,461	-1,094	0,895	-1,003	1,504	-0,095	-1,353	0,642	-0,680	-0,102
9	% metylace													
	1,84	5,29	5,34	5,45	11,19	3,33	0,32	2,49	0	7,71	6,91	5,95	3,24	4,543
	odchylka													
	-2,255	-2,836	-1,414	-0,069	-2,372	-1,043	-0,637	-2,547	-0,907	-1,197	-3,304	-0,466	-1,767	-5,029
10	% metylace													
	5,09	12,85	8,76	7,19	18,67	4,1	5,28	6,53	6,67	7,69	7,83	5,22	7,1	7,922
	odchylka													
	0,100	1,791	-0,425	0,529	0,027	-0,559	1,680	-0,528	1,173	-1,203	-2,987	-0,713	-1,150	-1,177
11	% metylace													
	4,17	10,77	10,03	6,79	17,58	4,09	4,40	5,88	6,03	7,24	7,64	4,41	6,79	7,371
	odchylka													
	-0,567	0,518	-0,057	0,391	-0,323	-0,565	1,269	-0,853	0,973	-1,336	-3,053	-0,987	-1,200	-1,805
12	% metylace													
	1,63	8,57	6,39	4,57	10,34	3,89	0,44	2,83	0	7,3	9,56	4,59	4,61	4,978
	odchylka													
	-2,407	-0,829	-1,111	-0,372	-2,645	-0,691	-0,581	-2,377	-0,907	-1,318	-2,391	-0,926	-1,548	-4,532
13	% metylace													
	4,94	11,82	11,18	6,8	19,28	3,9	4,56	4,91	5,45	6,09	6,99	4,25	5,73	7,377
	odchylka													
	-0,009	1,160	0,275	0,395	0,223	-0,685	1,343	-1,338	0,793	-1,674	-3,277	-1,042	-1,369	-1,798
14	% metylace													
	15,33	26,27	17,72	23,35	40,88	11,31	0	0	29,83	33,9	59,18	49,28	9,86	24,378
	odchylka													
	7,520	10,004	2,168	6,082	7,150	3,975	-0,787	-3,792	8,397	6,519	14,714	14,212	-0,709	17,587
15	% metylace													
	1,72	6,21	5,95	4,93	10,09	1,33	1,02	2,91	4	9,7	9,79	4,66	3,87	5,091
	odchylka													
	-2,342	-2,273	-1,238	-0,248	-2,725	-2,301	-0,310	-2,337	0,340	-0,611	-2,312	-0,903	-1,667	-4,404

Tabulka 5: Metylační profily pacientů s LWD a hodnoty standardizované odchylky vyjádřené v násobcích směrodatné odchylky pro jednotlivé CpG dinukleotidy v rámci CpG 1 ostrůvku (Pacienti 16 – 30).

Pacient	Kontrola n = 23										průměrné % metylace	směrodatná odchylka	průměr		
	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99				100	101
16	% metylace	4,78	15,7	8,82	7,85	17,39	7,48	1,02	10,1	16,24	12,73	13,64	7,14	11,59	10,345
	odchylka	-0,125	3,535	-0,407	0,755	-0,384	1,567	-0,310	1,256	4,158	0,282	-0,984	-0,063	-0,432	1,586
17	% metylace	4,02	11,7	8,61	6,57	17,67	4,23	0	6,59	5,96	6,74	7,9	4,5	6,77	7,020
	odchylka	-0,675	1,087	-0,468	0,315	-0,294	-0,477	-0,787	-0,498	0,952	-1,483	-2,963	-0,957	-1,203	-2,205
18	% metylace	3,79	10,51	8,42	5,32	17,44	4,55	0,52	5,71	8,72	13,63	13,96	9,21	10,65	8,648
	odchylka	-0,842	0,359	-0,523	-0,114	-0,368	-0,276	-0,544	-0,938	1,813	0,547	-0,874	0,639	-0,582	-0,348
19	% metylace	3,63	11,53	8,88	3,95	19,18	4,16	0	5,68	8,05	15,14	14,9	9,3	10,72	8,855
	odchylka	-0,958	0,983	-0,390	-0,585	0,191	-0,521	-0,787	-0,953	1,604	0,992	-0,550	0,669	-0,571	-0,112
20	% metylace	4,32	12,87	8,85	5,8	18,08	5,08	2,58	5,85	11,63	16,8	12,69	9,42	11,13	9,623
	odchylka	-0,458	1,803	-0,399	0,051	-0,162	0,057	0,418	-0,868	2,720	1,481	-1,312	0,710	-0,505	0,764
21	% metylace	4,3	8,43	8,74	4,25	13,39	4,4	2,81	0	7,21	5,82	14,7	7,69	4,84	6,660
	odchylka	-0,472	-0,914	-0,431	-0,482	-1,666	-0,370	0,526	-3,792	1,342	-1,754	-0,619	0,124	-1,512	-2,615
22	% metylace	4,56	8,21	11,67	7,88	18,81	5,83	0	7,73	8,78	12,36	14,21	7,54	10,31	9,068
	odchylka	-0,284	-1,049	0,417	0,766	0,072	0,529	-0,787	0,071	1,831	0,173	-0,788	0,073	-0,637	0,131
23	% metylace	13,16	15,42	1,44	23,02	22,6	21,75	0	9,96	0	27,17	39,96	25,21	18,13	16,755
	odchylka	5,948	3,364	-2,543	5,968	1,287	10,542	-0,787	1,186	-0,907	4,537	8,088	6,059	0,614	8,896
24	% metylace	3,58	20,62	22,88	30,77	49,13	13,94	15,2	5,8	16,01	22,64	44,98	35,76	12,36	22,590
	odchylka	-0,994	6,546	3,661	8,632	9,796	5,630	6,313	-0,893	4,086	3,202	9,819	9,632	-0,309	15,549
25	% metylace	2,88	5,67	8,39	6,13	18,54	13,38	6,39	11,43	0	9,6	24,12	14,7	10,79	10,155
	odchylka	-1,501	-2,603	-0,532	0,164	-0,015	5,277	2,198	1,921	-0,907	-0,640	2,628	2,498	-0,560	1,370
26	% metylace	5,47	4,11	11,22	5,9	13,44	9,14	6,15	3,36	0	10,14	22,1	5,35	7,16	7,965
	odchylka	0,375	-3,558	0,287	0,085	-1,650	2,611	2,086	-2,112	-0,907	-0,481	1,932	-0,669	-1,140	-1,128
27	% metylace	3,87	8,71	10,1	12,45	24,74	3,48	0	5,2	3,45	10,59	12,46	14,62	5,35	8,848
	odchylka	-0,784	-0,743	-0,037	2,336	1,974	-0,949	-0,787	-1,193	0,169	-0,349	-1,391	2,471	-1,430	-0,121
28	% metylace	3,92	8,65	9,18	6,28	16,97	4,14	0,44	7,79	6,01	6,35	8,33	3,69	5,73	6,729
	odchylka	-0,748	-0,780	-0,302	0,216	-0,518	-0,534	-0,581	0,101	0,967	-1,598	-2,815	-1,231	-1,369	-2,536
29	% metylace	4,24	11,67	19,2	8,82	13,63	12,82	0	5,85	6,17	8,58	20,55	13,52	10,73	10,445
	odchylka	-0,516	1,069	2,596	1,089	-1,589	4,925	-0,787	-0,868	1,017	-0,941	1,397	2,099	-0,569	1,700
30	% metylace	4,04	11,81	9,68	7,02	19,81	7,11	4,4	9,01	9,94	11,09	13,5	14,98	18,76	10,858
	odchylka	-0,661	1,154	-0,159	0,470	0,393	1,334	1,269	0,711	2,193	-0,201	-1,033	2,593	0,715	2,171

Tabulka 6: Metylační profily pacientů s LWD a hodnoty standardizované odchylky pro jednotlivé CpG dinukleotidy v rámci CpG 3 ostrůvku (Pacienti 1 – 20).

		89	90	91	92	93	94	95	průměr
Kontrola	průměrné % metylace	8,248	2,102	7,632	10,055	13,592	1,128	7,638	7,199
	n = 23 směrodatná odchylka (σ)	4,372	0,906	2,234	3,048	2,531	1,756	3,360	1,583
Pacient		89	90	91	92	93	94	95	průměr
1	% metylace	4,300	2,430	4,780	6,790	9,080	4,330	6,690	5,486
	odchylka	-0,903	0,362	-1,277	-1,071	-1,783	1,823	-0,282	-1,082
2	% metylace	4,370	2,950	4,140	4,300	10,020	6,190	7,330	5,614
	odchylka	-0,887	0,936	-1,563	-1,888	-1,411	2,883	-0,092	-1,001
3	% metylace	5,600	4,110	7,370	9,910	13,580	0,000	6,610	6,740
	odchylka	-0,606	2,216	-0,117	-0,048	-0,005	-0,642	-0,306	-0,290
4	% metylace	2,430	1,640	6,740	12,160	14,050	0,000	7,060	6,297
	odchylka	-1,331	-0,510	-0,399	0,691	0,181	-0,642	-0,172	-0,570
5	% metylace	4,430	3,500	9,220	11,060	13,650	1,950	7,900	7,387
	odchylka	-0,873	1,543	0,711	0,330	0,023	0,468	0,078	0,119
6	% metylace	3,760	2,430	7,910	10,970	12,740	2,610	6,950	6,767
	odchylka	-1,027	0,362	0,124	0,300	-0,337	0,844	-0,205	-0,273
7	% metylace	13,500	0,000	11,030	16,180	14,330	0,000	8,430	9,067
	odchylka	1,201	-2,320	1,521	2,010	0,292	-0,642	0,236	1,180
8	% metylace	14,480	1,340	9,450	19,440	13,560	0,000	7,120	9,341
	odchylka	1,425	-0,841	0,814	3,079	-0,013	-0,642	-0,154	1,353
9	% metylace	5,830	0,000	6,390	6,460	6,190	0,000	3,810	4,097
	odchylka	-0,553	-2,320	-0,556	-1,179	-2,925	-0,642	-1,139	-1,960
10	% metylace	16,480	0,000	8,780	11,280	14,120	0,000	4,100	7,823
	odchylka	1,883	-2,320	0,514	0,402	0,209	-0,642	-1,053	0,394
11	% metylace	19,290	4,120	5,770	8,330	15,200	1,210	7,520	8,777
	odchylka	2,526	2,227	-0,833	-0,566	0,635	0,047	-0,035	0,997
12	% metylace	4,640	2,240	8,180	10,800	16,310	2,010	8,770	7,564
	odchylka	-0,825	0,152	0,245	0,244	1,074	0,502	0,337	0,231
13	% metylace	4,300	0,180	7,870	10,280	11,670	1,900	9,900	6,586
	odchylka	-0,903	-2,121	0,107	0,074	-0,759	0,440	0,673	-0,388
14	% metylace	11,490	3,930	10,690	10,490	15,050	1,970	5,870	8,499
	odchylka	0,742	2,018	1,369	0,143	0,576	0,479	-0,526	0,821
15	% metylace	7,150	0,000	9,800	6,870	12,660	2,000	6,240	6,389
	odchylka	-0,251	-2,320	0,970	-1,045	-0,368	0,497	-0,416	-0,512
16	% metylace	11,100	0,000	18,330	19,790	22,450	1,450	19,530	13,236
	odchylka	0,652	-2,320	4,789	3,194	3,500	0,183	3,539	3,813
17	% metylace	5,990	5,110	16,900	8,310	16,170	0,000	13,320	9,400
	odchylka	-0,516	3,320	4,149	-0,573	1,019	-0,642	1,691	1,390
18	% metylace	11,580	0,100	13,470	24,540	28,390	2,630	15,620	13,761
	odchylka	0,762	-2,210	2,613	4,752	5,847	0,855	2,376	4,145
19	% metylace	12,750	0,000	13,210	22,750	0,000	0,810	23,540	10,437
	odchylka	1,030	-2,320	2,497	4,165	-5,370	-0,181	4,733	2,045
20	% metylace	7,010	3,900	0,300	6,090	28,230	1,490	17,350	9,196
	odchylka	-0,283	1,985	-3,282	-1,301	5,783	0,206	2,890	1,261

Tabulka 6: *Metylační profily pacientů s LWD a hodnoty standardizované odchylky pro jednotlivé CpG dinukleotidy v rámci CpG 3 ostrůvku (Pacienti 21 – 30).*

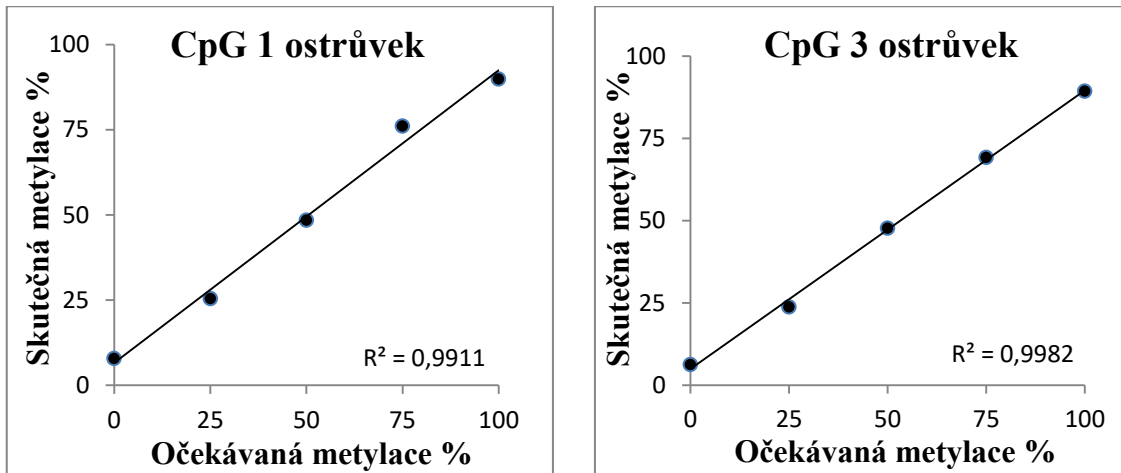
		89	90	91	92	93	94	95	průměr
Kontrola	průměrné % metylace	8,248	2,102	7,632	10,055	13,592	1,128	7,638	7,199
	n = 23 směrodatná odchylka (σ)	4,372	0,906	2,234	3,048	2,531	1,756	3,360	1,583
Pacient		89	90	91	92	93	94	95	průměr
21	% metylace	15,500	0,000	20,100	25,390	29,590	0,000	20,350	15,847
	odchylka	1,659	-2,320	5,581	5,031	6,321	-0,642	3,783	5,463
22	% metylace	10,020	3,120	5,200	9,430	18,700	1,110	4,780	7,480
	odchylka	0,405	1,124	-1,089	-0,205	2,018	-0,010	-0,851	0,177
23	% metylace	9,920	4,720	4,120	10,490	12,540	0,000	5,280	6,724
	odchylka	0,382	2,890	-1,572	0,143	-0,416	-0,642	-0,702	-0,300
24	% metylace	9,050	2,290	0,000	5,440	15,020	0,000	6,260	5,437
	odchylka	0,183	0,208	-3,416	-1,514	0,564	-0,642	-0,410	-1,113
25	% metylace	11,390	2,410	5,260	7,690	7,670	0,000	5,730	5,736
	odchylka	0,719	0,340	-1,062	-0,776	-2,340	-0,642	-0,568	-0,925
26	% metylace	13,370	2,700	6,440	8,330	10,950	0,000	6,190	6,854
	odchylka	1,172	0,660	-0,534	-0,566	-1,044	-0,642	-0,431	-0,218
27	% metylace	13,320	2,010	5,520	11,370	11,380	0,000	6,420	7,146
	odchylka	1,160	-0,102	-0,945	0,431	-0,874	-0,642	-0,363	-0,034
28	% metylace	9,230	1,700	7,860	6,530	11,170	2,470	10,460	7,060
	odchylka	0,225	-0,444	0,102	-1,156	-0,957	0,764	0,840	-0,088
29	% metylace	6,680	0,440	7,560	6,910	14,610	0,000	6,560	6,109
	odchylka	-0,359	-1,834	-0,032	-1,032	0,402	-0,642	-0,321	-0,689
30	% metylace	8,500	2,110	7,050	9,190	14,650	5,300	11,540	8,334
	odchylka	0,058	0,009	-0,261	-0,284	0,418	2,376	1,161	0,717

4.4 Ověření přesnosti bisulfitové sekvenace

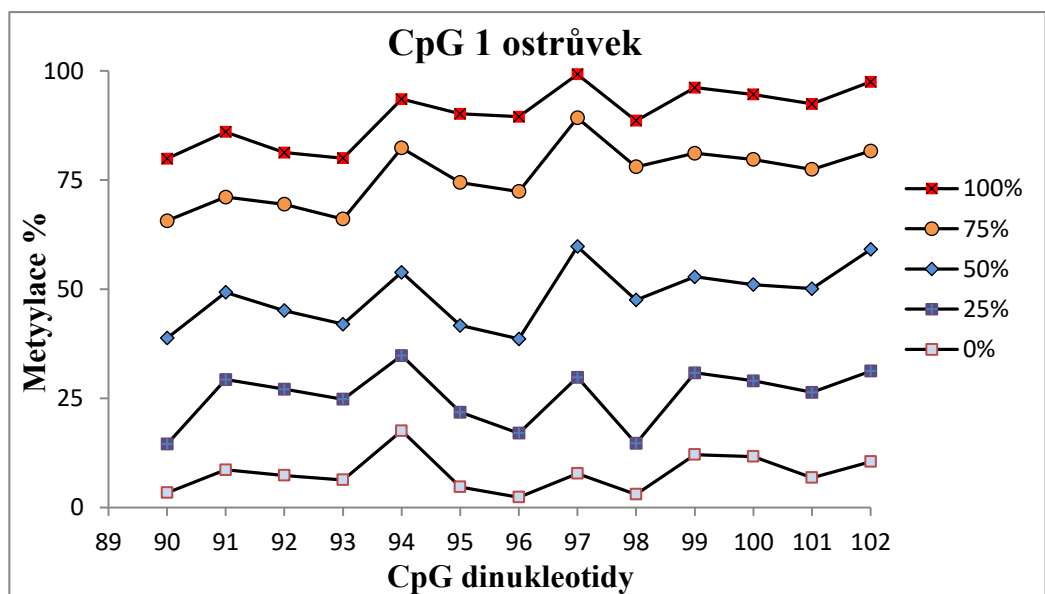
Při nezávislé kontrole jednotlivých primerů pro ostrůvek CpG 1 a ostrůvek CpG 3 za použití metylačních standardů (Human Methylated & Non-Methylated (WGA) DNA Set; ZymoResearch) se nám podařilo prokázat lineární vztah mezi očekávanou a skutečnou úrovní metylace (Graf 9). Skutečná metylace (%) v tomto případě byla vypočítána jako průměr za celý ostrůvek pro každou hladinu metylace (0% - 100%).

Výsledky ukazují, že přímé bisulfitové sekvenování je vysoce přesné při měření metylace DNA, jelikož skutečné hodnoty metylace jsou ve shodě s očekávanými hodnotami. Vysoký korelační koeficient ($r = 0,99$ pro CpG 1; $r = 0,99$ pro CpG3) naznačuje pozitivní lineární korelaci, což potvrzuje spolehlivost bisulfitového sekvenování pro kvantifikaci úrovně metylace DNA. P-hodnoty ($p < 0,01$) potvrzují statistickou významnost korelačního koeficientu.

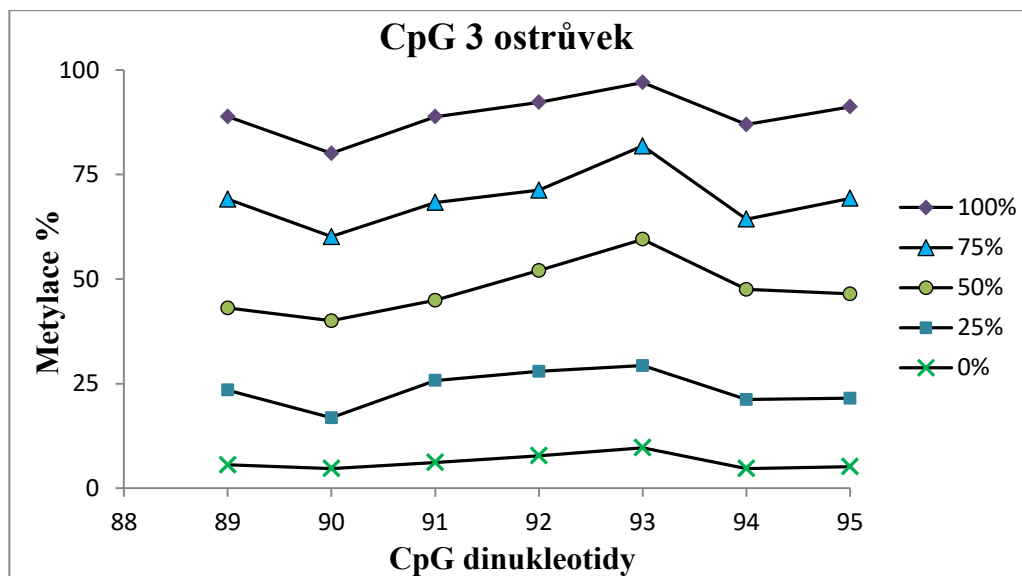
Skutečná metylace (%) pro jednotlivé CpG dinukleotidy v rámci ostrůvků CpG 1 a CpG 3 také potvrzuje přesnost bisulfitové sekvenace (Graf 10 a 11).



Graf 9: Přesnost bisulfitového sekvenování u ostrůvků CpG 1 a CpG 3. Grafy znázorňují vztah mezi skutečnou průměrnou metylací získanou za použití komerčních metylačních standardů (Human Methylated & Non-Methylated (WGA) DNA Set; ZymoResearch) a očekávanou metylací. $P < 0,01$ platí pro oba grafy.



Graf 10: Hodnoty metylace pro jednotlivé CpG dinukleotidy (90. až 102.) v rámci CpG 1 ostrůvku zobrazené pro každou hladinu očekávané metylace (0 % – 100 %).



Graf 11: Hodnoty metylace pro jednotlivé CpG dinukleotidy (89. až 95.) v rámci CpG 3 ostrůvku zobrazené pro každou hladinu očekávané metylace (0 % – 100 %).

5 DISKUZE

Inaktivace chromosomu X je asociována s hypermetylací promotorových oblastí umlčených genů (Cotton et al., 2011). Geny lokalizované v oblasti PAR1 unikají lyonizaci a jsou exprimovány z aktivního i neaktivního chromosomu X (Carrel and Willard, 2005; Prothero et al., 2009). Za normálního stavu CpG ostrůvky obklopující gen *SHOX* vykazují sníženou hladinu metylace, což odpovídá skutečnosti, že *SHOX* nepodléhá inaktivaci (Rao et al., 1997). Haploinsuficience *SHOX* je asociována s fenotypem LWD/ISS a ve většině případů je způsobena CNV zahrnujícími exony *SHOX* a/nebo jeho regulační elementy (Chen et al., 2009; Rosilio et al., 2012), nicméně přibližně u 30 % případů příčina patologického fenotypu zůstává neodhalená. Duplikace zahrnující regulační prvky *SHOX* jsou vzácné a jejich vliv na fenotyp je variabilní. Mechanismus skrz který duplikace v regulačních oblastech genu *SHOX* vedou k poruchám jeho exprese zatím není jednoznačně interpretovaný.

Jedním z cílů této práce bylo posoudit vliv duplikací lokalizovaných v regulačních oblastech genu *SHOX* na stav metylace DNA u jedinců s fenotypem LWD. Ověřit, zda tyto duplikace mohou být zodpovědné za takové změny v metylaci DNA, které ovlivňují regulaci exprese tohoto genu. Pomocí přímého bisulfitového sekvenování vzorků DNA jsme zjistili, že pacienti s duplikací v regulačních oblastech genu *SHOX* vykazují nižší průměrnou úroveň metylace v případě ostrůvku CpG 3, než zdraví jedinci, a ten rozdíl je vysoce signifikantní ($p < 0,0001$). Při srovnání metylačního vzorce pacientů a zdravých jedinců s indexy metylačních standardů, můžeme říci, že se v případě obou skupin jedná o nízkou úroveň metylace, tudíž o hypometylaci ostrůvku CpG 3. Metylační indexy jednotlivých CpG dinukleotidů u obou skupin jedinců (duplikace a kontrola) se v rámci ostrůvku 3 pohybují na hladině 0 % - 25 %, podle metylačních profilů komerčních standardů. U ostrůvku CpG 1 nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v úrovni metylace mezi pacienty a zdravými jedinci ($p = 0,4224$). Zajímavé je, že na úrovni jednotlivých CpG dinukleotidů v rámci ostrůvku CpG 1 byly zaznamenány rozdíly v hladině metylace mezi dvěma skupinami. Tak 7 ze 13 CpG dinukleotidů, což činí 53,84 %, vykazovaly vyšší hladinu metylace u zdravých jedinců oproti pacientům s duplikací, ovšem pouze u čtyř CpG byl rozdíl statisticky signifikantní (90. CpG, $p = 0,0261$; 96. CpG, $p = 0,0078$; 100. CpG, $p < 0,0001$; 102. CpG, $p = 0,0048$).

Výsledky této analýzy naznačují, že ačkoli statisticky významný rozdíl byl pozorován pouze u ostrůvku CpG 3, trend k mírnému snížení úrovně metylace u pacientů s duplikací v regulačních oblastech byl patrný i u ostrůvku CpG 1. Tato zjištění indikují, že duplikace v regulačních oblastech pravděpodobně mohou vést k mírnému snížení metylace DNA v oblasti genu *SHOX*. V souhrnu jsme pozorovali hypometylací DNA u obou ostrůvků (CpG 1 a CpG 3), a to jak u pacientů s duplikací v regulačních oblastech, tak u zdravých jedinců. U kontrolní skupiny je taková hladina metylace v souladu se zjištěním Cotton et al. (2011) a Tukiainen et al. (2018), které naznačují, že za normalního stavu geny nepodléhající lyonizaci mají nízkou úroveň metylace DNA v CpG ostrůvcích. Dále je důležité zmínit, že hypometylace CpG ostrůvků u pacientů nesoucích duplikace v regulačních oblastech genu *SHOX* by se mohla částečně shodovat s výsledky Ogushi et al. (2019), které naznačují, že CpG ostrůvky v oblasti genu *SHOX* zůstávají hypometylované u pacientů s přestavbami v regulačních oblastech, stejně jak u zdravých jedinců. Jejich soubor pacientů ovšem zahrnoval i jedince s delecí v regulačních oblastech.

V souvislosti s tím jsme se dále zaměřili na rozdíl v úrovni metylace u pacientů s duplikací s ohledem na lokalizaci duplikovaného úseku. Je známo, že duplikace zahrnující „up-stream“ regulační prvky byly popsány u jedinců s fenotypem LWD a ISS (Bunyan et al., 2016; Shima et al., 2016), kdežto duplikace zahrnující „down-stream“ regulační prvky jsou asociovány jak s patologickým, tak i s normálním fenotypem (Benito-Sanz et al., 2012; Fukami et al., 2015). Při porovnání úrovně metylace DNA pacientů v závislosti na lokalizaci duplikací jsme zaznamenali tendenci k výraznějšímu snížení úrovně metylace u pacientů s duplikací „up-stream“, nežli u pacientů s duplikací „down-stream“, ve srovnání se zdravými kontrolami, a to u obou ostrůvků, tento rozdíl ovšem nebyl statisticky významný (Příloha 1). Pro pochopení, zda tyto rozdíly mohou mít patologický efekt, bude nutné v budoucnu porovnat stav metylace DNA u pacientů s fenotypem LWD a fenotypově zdravými jedinci s analogickou duplikací. Jedná se zejména o duplikaci zahrnující regulační prvek CNE-9 a „down-stream“ kandidátní regulační region X: 917,000, jelikož duplikace zahrnující tyto oblasti byly opakovaně zaznamenány u jedinců s odlišným fenotypem (Bunyan et al., 2014; Bunyan et al., 2021; Hirschfeldova and Solc, 2017).

Na základě výsledků této analýzy je obtížné vyvodit jednoznačný závěr a zhodnotit, zda tak malé odlišnosti v úrovni metylace u pacientů s duplikací zahrnující

regulační elementy mohou být zodpovědné za patologický fenotyp u těchto jedinců, přestože jsou statisticky signifikantní. Rozsah průměrné metylace CpG 1 ostrůvku u pacientů s duplikací se pohyboval mezi 6,66 % a 12,03 %, zatímco u kontrolní skupiny činil 7,41 % až 10,60 %. V CpG 3 ostrůvku byl rozsah průměrné metylace u pacientů s duplikací stanoven na 3,51 % až 7,56 %, zatímco u zdravých jedinců 5,05 % - 11,82 %. I když v CpG 3 ostrůvku byl zaznamenán vysoce signifikantní rozdíl v průměrné metylaci mezi skupinou pacientů s duplikací a kontrolní skupinou ($p < 0,0001$), stále se jedná o rozdíly v řádu jednotek procentních bodů. V CpG 1 ostrůvku jsou hodnoty průměrné metylace o několik jednotek procentních bodů vyšší oproti ostrůvku CpG 3, avšak rozdíl mezi skupinou pacientů a zdravými jedinci nebyl statisticky významný. U ostrůvku CpG 1 byl největší rozdíl v metylaci (%) mezi pacienty a zdravými jedinci pozorován v dinukleotidu č. 100. Medián míry metylace u pacientů v tomto místě činil 12,44 %, zatímco u kontrolní skupiny 16,03 %, což představuje rozdíl 3,59 procentních bodů. V ostrůvku CpG 3 byl pozorován největší rozdíl v metylaci (%) mezi pacienty a zdravými jedinci v dinukleotidu č. 89. Průměrná úroveň metylace u pacientů byla v tomto místě stanovena na 4,805 %, u zdravých jedinců na 8,249 %, což představuje rozdíl pouze 3,445 procentních bodů. Tyto výsledky naznačují, že i při přítomnosti signifikantních rozdílů v metylaci mezi pacienty a zdravými jedinci, jedná se o relativně malé rozdíly, které mohou být ovlivněny nejspíše biologickou variabilitou. Některé studie předpokládají, že duplikace zahrnující kódující region genu *SHOX* a některý z jeho regulačních prvků mohou narušit expresi změnou vzdálenosti mezi promotorem *SHOX* a jeho enhancery (Fukami et al., 2015). Taková změna vzdálenosti by mohla narušit jejich interakci, což ve výsledku může vést k zablokování transkripce, nedostatečné aktivaci genu, nesprávnému sestřihu mRNA nebo chybnému skládání polypeptidových řetězců (Marchini et al., 2016). Ovšem, umlčení transkripce bývá často asociováno s hypermetylací promotoru. VanderKraats et al. (2013) uvádí, že charakterizovat promotory jednoduše jako „metylované“ či „nemetylované“ je nedostatečné, jelikož existují různé metylační vzorce, které korelují se změnou exprese. Jinými slovy, korelace mezi hypermetylovaným promotorem a narušením genové exprese není absolutní. Tak například Brenet et al. (2011) naznačují, že metylace DNA „down-stream“ od místa začátku transkripce v oblasti prvního exonu je mnohem více asociována s umlčením transkripce, než metylace v „up-stream“ promotorové oblasti. Ověření stavu metylace v dalších CpG ostrůvcích v oblasti *SHOX* by mohlo poskytnout důležité informace pro pochopení mechanismu regulace exprese tohoto genu.

Represivní účinky metylace se mohou šířit na přilehlé oblasti, a to v závislosti na počtu metylovaných CpG dinukleotidů (Curradi et al., 2002). Vzhledem k tomu, že aktuální analýza byla zaměřena pouze na dva CpG ostrůvky, je možné, že další potenciálně významné oblasti nebyly zachyceny. Podrobná analýza metylace v dalších částech genu *SHOX* by mohla odhalit klíčové aspekty epigenetické regulace a přispět k lepšímu porozumění genotyp-fenotypové korelace v případě duplikací zahrnující regulační elementy *SHOX*.

V této práci jsme se také zaměřili na změny ve stavu metylace DNA v genu *SHOX* jako jednu z dalších možných příčin výskytu Lériho-Weillovy dyschondrosteózy, a to u pacientů bez nalezené mutace v kódující části genu či jeho regulačních elementech. Jako opora pro tuto hypotézu slouží zejména umístění genu *SHOX* v oblasti PAR1, a s tím spojené možné změny v metylaci DNA. Pro ověření tohoto předpokladu bylo provedeno metylační profilování dvou CpG ostrůvků v oblasti genu *SHOX* u 30 pacientů s fenotypem LWD/ISS, u nichž nebyla detekována žádná potenciálně kauzální strukturní ani bodová mutace v kódující části genu či jeho regulačních prvcích.

Výsledky znázorněné v tabulkách 5 – 6 umožňují detailní analýzu metylačních profilů pacientů. Tak 26 ze 30 pacientů bez mutací, což činí 86,6 %, se odlišovalo v úrovni metylace alespoň o dvojnásobek směrodatné odchylky vůči průměru skupiny zdravých jedinců v rámci ostrůvku CpG 1. Tento rozdíl v metylaci byl ovšem pozorován pouze u jednotlivých CpG dinukleotidů, nikoliv na všech CpG místech v ostrůvku. Průměrná metylace za celý ostrůvek CpG 1 se u pacientů pohybovala v rozsahu 0 % až 25 %, což se významně neodlišuje od kontrolní skupiny. Podle Li et al. (2014) se za metylovaný dinukleotid považuje takový, jehož hladina metylace se pohybuje mezi 70 - 100 %. Je nutné zdůraznit, že u některých pacientů se odchylky od průměru zdravých jedinců projevovaly téměř na každém CpG místě v rámci sledovaného ostrůvku, a to u pacientů P2, P14, P23, P24 (Tab. 5). Pacienti P2, P14 a P24 jsou muži s fenotypem ISS, kdežto P23 je žena s fenotypem LWD (Příloha 2, Tab. 1). Hladina metylace u těchto pacientů byla na některých místech výrazně vyšší, než průměr skupiny zdravých jedinců. Tak například, úroveň metylace CpG dinukleotidu č. 100 u P14 stanoví 59,18 %, kdežto průměr kontrolní skupiny na stejném místě činí 16,49 % (jedná se tedy o rozdíl o téměř 15 SD). Při srovnání průměrné metylace v rámci celého ostrůvku mezi pacienty P2 (19,719 %), P14 (24,378 %), P23 (16,755 %), P24 (22,590 %) a kontrolní skupinou (8,953 %), jsme pozorovali několikanásobné

rozdíly. Přesto nemůžeme s jistotou tvrdit, že tyto rozdíly mají biologický význam, neboť hladiny metylace se stále nacházejí na relativně nízké úrovni. Stadler et al. (2011) uvádí, že přibližně jeden z deseti CpG dinukleotidů má střední úroveň metylace, mezi 10 % až 70 %, což podle Sheffield et al. (2017) a Schwartzman et al. (2015) odráží buď mezibuněčnou heterogenitu anebo epigenomickou a transkripční heterogenitu. Metylační indexy pacientů P9 (M, LWD), P12 (Ž, LWD) a P15 (M, ISS) naopak vykazují nižší hodnoty metylace vůči průměru skupiny zdravých jedinců, a to na větším počtu CpG míst v rámci sledovaného úseku. Tyto výsledky jsou ve shodě s naší předchozí analýzou.

Výsledky metylačního profilování ostrůvku CpG 3 u pacientů s fenotypem LWD/ISS bez detekovaných mutací v oblasti genu *SHOX* naznačují, že 70 % jedinců se minimálně v jednom CpG místě odlišovali alespoň o dvojnásobek směrodatné odchylky vůči průměru kontrolní skupiny. U čtyř pacientů (P16, P18, P19, P21) (Tab. 6) jsme zaznamenali odchylky v hladině metylace téměř u všech CpG dinukleotidů. Ukázalo se, že u těchto pacientů byla míra metylace CpG dinukleotidu č. 92 téměř dvojnásobně vyšší oproti průměru kontrolní skupiny na stejném místě (P16 – 19,79 %, P18 – 24,54 %, P19 – 22,750 %, P21 – 25,390 %, průměr kontrolní skupiny – 10,055 %). Hodnota průměrné metylace za celý ostrůvek se u P16, P18, P19 a P21 ovšem jen mírně odlišovala od průměru skupiny zdravých jedinců (P16 – 13,236 %, P18 – 13,761 %, P19 – 10,437 %, P21 – 15,847 %, průměr kontrolní skupiny – 7,199 %). I přesto se ukázalo, že metylační indexy těchto pacientů a také průměr kontrolní skupiny zdravých jedinců zůstávají na relativně nízké úrovni ve srovnání s komerčními standardy.

Hladina metylace u 30 sledovaných pacientů se na některých místech skutečně odlišovala od průměru zdravých jedinců v rámci ostrůvku CpG 3. Zatímco jsme pozorovali tendenci ke snížení metylace u 90. CpG dinukleotidu, na ostatních místech byly rozdíly spíše náhodné a neměly žádný systematický vzorec. Celkově metylační profilování CpG 3 ostrůvku tedy ukázalo, že rozdíly v metylaci nejsou výrazné a pravděpodobně jsou způsobeny biologickou variabilitou. Podobné metylační profily byly zaznamenány pouze u čtyř pacientů (P16, P18, P19, P21). U zbývajících pacientů se metylační indexy buď vůbec nelišily od průměru kontrolní skupiny, nebo vykazovaly odchylky pouze v jednom až dvou dinukleotidech, což může odpovídat přirozené heterogenitě.

Existuje jen několik prací, které se zabývaly vlivem změn v metylačním profilu genu na výskyt genetického onemocnění. V jedné z těchto studií bylo stanoveno, že změny v metylaci DNA v oblasti promotoru skutečně mají vliv na výskyt onemocnění, avšak tyto změny byly výrazně větší než ty, které jsme pozorovali během naší analýzy. Zorzo et al. (2023) ve své studii analyzovali metylační profily dvou CpG ostrůvků v promotorech genu *LDLR* („Low Density Lipoprotein Receptor“) u jedinců s familiární hypercholesterolemií (FH) bez detekovaných mutací v genech asociovaných s touto nemocí. Pro stanovení úrovně metylace autoři použili metodu MS-HRM („Methylation-Sensitive High-Resolution Melting“) a PCR. Teplota tání (T_m) každého vzorků byla analyzována srovnáním relativní polohy T_m vzorků mezi příslušnými T_m metylačních standardů (0 % a 100 %). Teplota tání dvouřetězcové DNA slouží jako parametr, který přímo souvisí se stavem metylace vzorku, což umožňuje stanovit procento metylace. Výsledky práce naznačují, že pacienti s fenotypem FH bez detekovaných mutací a mírou metylace, která odpovídá $T_m > 90$ % (a to pouze v jednom ze dvou promotorů), mají čtyřikrát vyšší riziko výskytu FH ve srovnání s jedinci s nižší úrovní metylace v tomto promotoru. Dále také studie Xiao et al. (2014) a Akika et al. (2017) naznačují, že výsledky analýzy stavu metylace provedené metodou MS-HRM jsou konzistentní s výsledky získanými pomocí přímého bisulfitového sekvenování. Na základě předkládaných prací lze zhodnotit výsledky našich pozorování tak, že rozdíly v úrovni metylace, které jsme pozorovali u pacientů s fenotypem LWD/ISS bez detekovaných mutací v regionu *SHOX*, pravděpodobně nejsou přímo zodpovědné za vznik patologického fenotypu u těchto jedinců.

6 ZÁVĚR

V této práci jsme se zaměřili na změny ve stavu metylace DNA v oblasti genu *SHOX* u pacientů s fenotypem LWD a duplikací zahrnující regulační elementy genu a u pacientů s fenotypem LWD/ISS bez detekovaných strukturních ani bodových mutací v oblasti *SHOX*. Srovnali jsme míru metylace DNA u pacientů s patologickým fenotypem a duplikací v regulačních sekvencích a u zdravých kontrol, a to ve dvou CpG ostrůvčích genu *SHOX*. Dále jsme také porovnali změny v míře metylace DNA u pacientů s duplikací s ohledem na lokalizaci duplikovaného úseku „up-stream“ či „down-stream“ od kódující oblasti *SHOX*. Přímé bisulfitové sekvenování nám umožnilo hodnocení míry metylace na úrovni jednotlivých CpG dinukleotidů u pacientů bez detekovaných mutací v regionu *SHOX*.

Na základě získaných výsledků jsme dospěli k následujícím závěrům:

- Duplikace v regulačních oblastech genu *SHOX* u pacientů s fenotypem LWD vedou ke statisticky významnému snížení hladiny metylace DNA v ostrůvku CpG 3.
- Rozdíl v úrovni metylace DNA mezi pacienty s duplikací a zdravými jedinci v ostrůvku CpG 1 není signifikantní. Přesto byl u těchto pacientů rovněž pozorován trend k mírnému snížení hladiny metylace.
- Biologický efekt pozorovaného rozdílu v případě obou ostrůvků bude pravděpodobně nevýznamný vzhledem k obecně velmi nízké míře metylace.
- Pozorovali jsme tendenci k vyšší míře metylace DNA u pacientů s duplikací zahrnující „down-stream“ regulační elementy oproti pacientům nesoucím „up-stream“ duplikace, rozdíl však není statisticky signifikantní.
- Pro stanovení biologického významu pozorovaných změn bude nutné provést rozšířenější analýzu, která bude zahrnovat větší počet CpG ostrůvků v regionu *SHOX*. Dále je důležité se zaměřit na konkrétní duplikace, které mají variabilní fenotypový projev.
- Metylační indexy pacientů s fenotypem LWD/ISS bez detekovaných mutací v regionu *SHOX* se skutečně odlišují od průměru skupiny zdravých jedinců, nicméně jedná se o rozdíly v jednotkách procentních bodů.
- Za patologické fenotypy LWD/ISS u pacientů bez detekovaných mutací pravděpodobně budou zodpovědné jiné molekulárně-genetické mechanismy, než změny v úrovni metylace DNA.

SEZNAM ZKRATEK

5'UTR	5' nepřekládaná oblast
<i>ACAN</i>	Gen kódující protein agrecan
AMK	Aminokyselina
BNP	B-type natriuretic peptide
bp	Komplementární páry bází
cDNA	Komplementární DNA
CK II	Enzym kaseinkináza II
CNE	Conserved non-coding element
CNP	C-type natriuretic peptid
CNV	Copy number variation
CpG	Cytosine-phosphate-Guanin
CRM	Cis-regulační moduly
<i>CTGF/CCN2</i>	Gen kódující connective tissue growth factor, další název cellular communication network factor 2
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
Dnmt	DNA-metyltransferáza
dsDNA	Dvouvláknová DNA
ECR	Evolutionary conserved region
ECS	Evolutionary conserved sequence
FGF	Fibroblastový růstový faktor
<i>FGFR3</i>	Gen kódující fibroblast growth factor receptor 3
HI	Haploinsuficience

HMG	High mobility group
ISS	Idiopathic short stature
LWD	Lériho-Weillová dyschondrosteóza
LWS	Syndrom Leri-Weill
MLPA	Multiplex ligation probe amplification
mRNA	Messenger RNA
NAHR	Nealelická homologní rekombinace
NHEJ	Nehomologní spojování konců
NLS	Jaderný lokalizační signál
<i>NPPB</i>	Gen kódující natriuretický peptid B
NPR	Natriuretic peptide receptor
OAR	Transaktivační doména
OMIM	The Online Mendelian Inheritance in Man
P1	Promotor 1 genu <i>SHOX</i>
P2	Promotor 2 genu <i>SHOX</i>
PAR1	Pseudoautosomální region 1
PAR2	Pseudoautosomální region 2
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RNA	Ribonukleová kyselina
RT-PCR	PCR spojená s reverzní transkripcí
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDS	Skóre směrodatné odchylky
Ser	Aminokyselina serin

<i>SHOX</i>	Short stature homeobox-containing gene
SOX	SRY-box transkripční faktor
<i>SPRY3</i>	Gen kódující protein sprouty homolog 3
ssDNA	Jednovláknová DNA
<i>SYBL1</i>	Gen kódující synaptobrevin-like protein 1
Xa	Aktivní X chromosom
Xi	Inaktivní X chromosom

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- Adamson, K. A., Cross, I., Batch, J. A., Rappold, G. A., Glass, I. A., & Ball, S. G. (2002). Trisomy of the short stature homeobox-containing gene (*SHOX*), resulting from a duplication-deletion of the X chromosome. *Clinical Endocrinology*, *56*(5), 671–675.
- Akika, R., Awada, Z., Mogharbil, N., & Zgheib, N. K. (2017). Region of interest methylation analysis: a comparison of MSP with MS-HRM and direct BSP. *Molecular Biology Reports*, *44*(3), 295–305.
- Aza-Carmona, M., Shears, D. J., Yuste-Checa, P., Barca-Tierno, V., Hisado-Oliva, A., Belinchón, A., Benito-Sanz, S., Rodríguez, J. I., Argente, J., Campos-Barros, A., Scambler, P. J., & Heath, K. E. (2011). *SHOX* interacts with the chondrogenic transcription factors *SOX5* and *SOX6* to activate the aggrecan enhancer. *Human Molecular Genetics*, *20*(8), 1547–1559.
- Babu, D., Vannelli, S., Fanelli, A., Mellone, S., Baffico, A. M., Corrado, L., Essa, W. A., Grandone, A., Bellone, S., Monzani, A., Vinci, G., De Sanctis, L., Stuppia, L., Prodam, F., & Giordano, M. (2021). Variants in the 5'UTR reduce *SHOX* expression and contribute to *SHOX* haploinsufficiency. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, *29*(1), 110–121.
- Balaton, B. P., Cotton, A. M., & Brown, C. J. (2015). Derivation of consensus inactivation status for X-linked genes from genome-wide studies. *Biology of Sex Differences*, *6*, 35.
- Baylin, S. B., & Herman, J. G. (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics: TIG*, *16*(4), 168–174.
- Beiser, K. U., Glaser, A., Kleinschmidt, K., Scholl, I., Röth, R., Li, L., Gretz, N., Mechtersheimer, G., Karperien, M., Marchini, A., Richter, W., & Rappold, G. A. (2014). Identification of novel *SHOX* target genes in the developing limb using a transgenic mouse model. *PloS One*, *9*(6), e98543.
- Benito-Sanz, S., Barroso, E., Heine-Suñer, D., Hisado-Oliva, A., Romanelli, V., Rosell, J., Aragonés, A., Caimari, M., Argente, J., Ross, J. L., Zinn, A. R., Gracia, R., Lapunzina, P., Campos-Barros, A., & Heath, K. E. (2011). Clinical and Molecular Evaluation of *SHOX*/*PAR1* Duplications in Léri-Weill Dyschondrosteosis (LWD)

- and Idiopathic Short Stature (ISS). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(2), E404–E412.
- Benito-Sanz, S., Del Blanco, D. G., Aza-Carmona, M., Magano, L. F., Lapunzina, P., Argente, J., Campos-Barros, Á., & Heath, K. E. (2006). PAR1 deletions downstream of SHOX are the most frequent defect in a Spanish cohort of Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. In *Human Mutation*, 27(10), 1062–1062.
- Benito-Sanz, S., Royo, J. L., Barroso, E., Paumard-Hernández, B., Barreda-Bonis, A. C., Liu, P., Gracia, R., Lupski, J. R., Campos-Barros, Á., Gómez-Skarmeta, J. L., & Heath, K. E. (2012). Identification of the first recurrent PAR1 deletion in Léri-Weill dyschondrosteosis and idiopathic short stature reveals the presence of a novel SHOX enhancer. *Journal of Medical Genetics*, 49(7), 442–450.
- Benito-Sanz, S., Thomas, N. S., Huber, C., Gorbenko del Blanco, D., Aza-Carmona, M., Crolla, J. A., Maloney, V., Rappold, G., Argente, J., Campos-Barros, A., Cormier-Daire, V., & Heath, K. E. (2005). A novel class of Pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Léri-Weill dyschondrosteosis. *American Journal of Human Genetics*, 77(4), 533–544.
- Binder G, Rappold GA. (2005). [updated 2018]. *SHOX Deficiency Disorders*. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews®, Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023. PMID: 20301394.
- Binder, G. (2011). Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy. *Hormone Research in Paediatrics*, 75(2), 81–89.
- Blaschke, R. J., & Rappold, G. (2006). The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(3), 233–239.
- Blaschke, R. J., & Rappold, G. A. (2001). SHOX in short stature syndromes. *Hormone Research*, 55 Suppl 1, 21–23.
- Blaschke, R. J., Töpfer, C., Marchini, A., Steinbeisser, H., Janssen, J. W. G., & Rappold, G. A. (2003). Transcriptional and translational regulation of the Léri-

- Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47820–47826.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A. J., Socci, N. D., & Scandura, J. M. (2011). DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PloS One*, 6(1), e14524.
- Bunyan, D. J., Baffico, M., Capone, L., Vannelli, S., Iughetti, L., Schmitt, S., Taylor, E.-J., Herridge, A. A., Shears, D., Forabosco, A., & Coviello, D. A. (2016). Duplications upstream and downstream of SHOX identified as novel causes of Leri-Weill dyschondrosteosis or idiopathic short stature. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 170A(4), 949–957.
- Bunyan, D. J., Baker, K. R., Harvey, J. F., & Thomas, N. S. (2013). Diagnostic screening identifies a wide range of mutations involving the SHOX gene, including a common 47.5 kb deletion 160 kb downstream with a variable phenotypic effect. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 161A(6), 1329–1338.
- Bunyan, D. J., Gevers, E., Hobbs, J. I., Duncan-Flavell, P. J., Howarth, R. J., Holder-Espinasse, M., Klee, P., Van-Heurk, R., Lemmens, L., Carminho-Rodrigues, M. T., Mohamed, Z., Goturu, A., Hughes, C. R., Ajzensztejn, M., & Thomas, N. S. (2021). Rare dosage abnormalities flanking the SHOX gene. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 22(1), 1–9.
- Bunyan, D. J., Taylor, E.-J., Maloney, V. K., & Blyth, M. (2014). Homozygosity for a novel deletion downstream of the SHOX gene provides evidence for an additional long range regulatory region with a mild phenotypic effect. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 164A(11), 2764–2768.
- Carrel, L., & Willard, H. F. (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 434(7031), 400–404.
- Ciccodicola, A., D'Esposito, M., Esposito, T., Gianfrancesco, F., Migliaccio, C., Miano, M. G., Matarazzo, M. R., Vacca, M., Franzè, A., Cuccurese, M., Cocchia, M., Curci, A., Terracciano, A., Torino, A., Cocchia, S., Mercadante, G., Pannone, E., Archidiacono, N., Rocchi, M., D'Urso, M. (2000). Differentially regulated and

- evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. *Human Molecular Genetics*, 9(3), 395–401.
- Clement-Jones, M., Schiller, S., Rao, E., Blaschke, R. J., Zuniga, A., Zeller, R., Robson, S. C., Binder, G., Glass, I., Strachan, T., Lindsay, S., & Rappold, G. A. (2000). The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Human Molecular Genetics*, 9(5), 695–702.
- Compere, S. J., & Palmiter, R. D. (1981). DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene lymphoid cells. *Cell*, 25(1), 233–240.
- Cormier-Daire, V., Belin, V., Cusin, V., Viot, G., Girlich, D., Toutain, A., Moncla, A., Vekemans, M., Le Merrer, M., & Munnich, A. (1999). SHOX gene mutations and deletions in dyschondrosteosis or Leri-Weill syndrome. *Acta Paediatrica*, 88(433), 55–59.
- Cotton, A. M., Lam, L., Affleck, J. G., Wilson, I. M., Peñaherrera, M. S., McFadden, D. E., Kobor, M. S., Lam, W. L., Robinson, W. P., & Brown, C. J. (2011). Chromosome-wide DNA methylation analysis predicts human tissue-specific X inactivation. *Human Genetics*, 130(2), 187–201.
- Cotton, A. M., Price, E. M., Jones, M. J., Balaton, B. P., Kobor, M. S., & Brown, C. J. (2015). Landscape of DNA methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation. *Human Molecular Genetics*, 24(6), 1528–1539.
- Curradi, M., Izzo, A., Badaracco, G., & Landsberger, N. (2002). Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(9), 3157–3173.
- Decker, E., Durand, C., Bender, S., Rödelsperger, C., Glaser, A., Hecht, J., Schneider, K. U., & Rappold, G. (2011). FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Human Molecular Genetics*, 20(8), 1524–1535.
- Denoulet, M., Brulé, M., Anquez, F., Vincent, A., Schnipper, J., Adriaenssens, E., Toillon, R.-A., Le Bourhis, X., & Lagadec, C. (2023). ABSP: an automated R tool to efficiently analyze region-specific CpG methylation from bisulfite sequencing PCR. *Bioinformatics*, 39(1).

- Dos Santos, C. S., Mendes, T., & Antunes, A. (2022). The genes from the pseudoautosomal region 1 (PAR1) of the mammalian sex chromosomes: Synteny, phylogeny and selection. *Genomics*, *114*(4), 110419.
- Durand, C., Roeth, R., Dweep, H., Vlatkovic, I., Decker, E., Schneider, K. U., & Rappold, G. (2011). Alternative splicing and nonsense-mediated RNA decay contribute to the regulation of SHOX expression. *PloS One*, *6*(3), e18115.
- Fanelli, A., Vannelli, S., Babu, D., Mellone, S., Cucci, A., Monzani, A., Al Essa, W., Secco, A., Follenzi, A., Bellone, S., Prodam, F., & Giordano, M. (2022). Copy number variations residing outside the SHOX enhancer region are involved in Short Stature and Léri-Weill dyschondrosteosis. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *10*(1), e1793.
- Farr, S., Grill, F., Ganger, R., Graf, A., & Girsch, W. (2012). Pathomorphologic findings of wrist arthroscopy in children and adolescents with chronic wrist pain. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, *28*(11), 1634–1643.
- Fukami, M., Dateki, S., Kato, F., Hasegawa, Y., Mochizuki, H., Horikawa, R., & Ogata, T. (2008). Identification and characterization of cryptic SHOX intragenic deletions in three Japanese patients with Léri-Weill dyschondrosteosis. *Journal of Human Genetics*, *53*(5), 454–459.
- Fukami, M., Kato, F., Tajima, T., Yokoya, S., & Ogata, T. (2006). Transactivation Function of an ~800-bp Evolutionarily Conserved Sequence at the SHOX 3' Region: Implication for the Downstream Enhancer. In *The American Journal of Human Genetics*, *78*(1), 167–170.
- Fukami, M., Naiki, Y., Muroya, K., Hamajima, T., Soneda, S., Horikawa, R., Jinno, T., Katsumi, M., Nakamura, A., Asakura, Y., Adachi, M., Ogata, T., Kanzaki, S., & Japanese SHOX study group. (2015). Rare pseudoautosomal copy-number variations involving SHOX and/or its flanking regions in individuals with and without short stature. *Journal of Human Genetics*, *60*(9), 553–556.

- Fukami, M., Okuyama, T., Yamamori, S., Nishimura, G., & Ogata, T. (2005). Microdeletion in the SHOX 3' region associated with skeletal phenotypes of Langer mesomelic dysplasia in a 45,X/46,X,r(X) infant and Leri-Weill dyschondrosteosis in her 46,XX mother: implication for the SHOX enhancer. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 137(1), 72–76.
- Fukami, M., Seki, A., & Ogata, T. (2016). SHOX Haploinsufficiency as a Cause of Syndromic and Nonsyndromic Short Stature. *Molecular Syndromology*, 7(1), 3–11.
- Fuller, Z. L., Berg, J. J., Mostafavi, H., Sella, G., & Przeworski, M. (2019). Measuring intolerance to mutation in human genetics. *Nature Genetics*, 51(5), 772–776.
- Garieri, M., Stamoulis, G., Blanc, X., Falconnet, E., Ribaux, P., Borel, C., Santoni, F., & Antonarakis, S. E. (2018). Extensive cellular heterogeneity of X inactivation revealed by single-cell allele-specific expression in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(51), 13015–13020.
- Gehring, W. J., Affolter, M., & Bürglin, T. (1994). Homeodomain proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 487–526.
- Gibney, E. R., & Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), 4–13.
- Graves, J. A., Wakefield, M. J., & Toder, R. (1998). The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Human Molecular Genetics*, 7(13), 1991–1996.
- Hermann, A., Gowher, H., & Jeltsch, A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 61(19-20), 2571–2587.
- Hinch, A. G., Altemose, N., Noor, N., Donnelly, P., & Myers, S. R. (2014). Recombination in the human Pseudoautosomal region PAR1. *PLoS Genetics*, 10(7), e1004503.

- Hirschfeldova, K., & Solc, R. (2017). Comparison of SHOX and associated elements duplications distribution between patients (Léri-Weill dyschondrosteosis/idiopathic short stature) and population sample. *Gene*, *627*, 164–168.
- Hoffmann, S., Roeth, R., Diebold, S., Gogel, J., Hassel, D., Just, S., & Rappold, G. A. (2021). Identification and Tissue-Specific Characterization of Novel SHOX-Regulated Genes in Zebrafish Highlights SOX Family Members Among Other Genes. *Frontiers in Genetics*, *12*.
- Howard, M. L., & Davidson, E. H. (2004). cis-Regulatory control circuits in development. *Developmental Biology*, *271*(1), 109–118.
- Hristov, G., Marttila, T., Durand, C., Niesler, B., Rappold, G. A., & Marchini, A. (2014). SHOX triggers the lysosomal pathway of apoptosis via oxidative stress. *Human Molecular Genetics*, *23*(6), 1619–1630.
- Huang, N., Lee, I., Marcotte, E. M., & Hurles, M. E. (2010). Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome. *PLoS Genetics*, *6*(10), e1001154.
- Huber, C., Rosilio, M., Munnich, A., Cormier-Daire, V., & French SHOX GeNeSIS Module. (2006). High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *Journal of Medical Genetics*, *43*(9), 735–739.
- Charlesworth, B. (2002). The evolution of chromosomal sex determination. *Novartis Foundation Symposium*, *244*, 207–219; discussion 220–224, 253–257.
- Chen, J., Wildhardt, G., Zhong, Z., Röth, R., Weiss, B., Steinberger, D., Decker, J., Blum, W. F., & Rappold, G. (2009). Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *Journal of Medical Genetics*, *46*(12), 834–839.
- Chen, Z.-X., & Riggs, A. D. (2011). DNA methylation and demethylation in mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(21), 18347–18353.
- Chusho, H., Ogawa, Y., Tamura, N., Suda, M., Yasoda, A., Miyazawa, T., Kishimoto, I., Komatsu, Y., Itoh, H., Tanaka, K., Saito, Y., Garbers, D. L., & Nakao, K. (2000). Genetic models reveal that brain natriuretic peptide can signal through

- different tissue-specific receptor-mediated pathways. *Endocrinology*, 141(10), 3807–3813.
- Jaubert, J., Jaubert, F., Martin, N., Washburn, L. L., Lee, B. K., Eicher, E. M., & Guénet, J. L. (1999). Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor C gene (Npr3). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18), 10278–10283.
- Jorge, A. A. L., Souza, S. C., Nishi, M. Y., Billerbeck, A. E., Libório, D. C. C., Kim, C. A., Arnhold, I. J. P., & Mendonca, B. B. (2006). SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clinical Endocrinology*, 66(1), 130-135.
- Kubota, S., & Takigawa, M. (2011). The role of CCN2 in cartilage and bone development. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 5(3), 209–217.
- Leri, A. and Weill, T. (1929). Une affection congenitale et symmetrique du developpment ossew: la dyschondrosteose. *Bulletin et Memoires de la Societe Medicale Hopitaux de Paris*, 53: 1491-1494.
- Li, E., & Zhang, Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5), a019133.
- Lichtenstein, J. R., Sundaram, M., & Burdge, R. (1980). Sex-influenced expression of Madelung's deformity in a family of dyschondrosteosis. *Journal of Medical Genetics*, 17(1), 41–43.
- Macara, I. G. (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 65(4), 570–594.
- Marchini, A., Daeffler, L., Marttila, T., Schneider, K. U., Blaschke, R. J., Schnölzer, M., Rommelaere, J., & Rappold, G. (2006). Phosphorylation on Ser106 modulates the cellular functions of the SHOX homeodomain protein. *Journal of Molecular Biology*, 355(3), 590–603.

- Marchini, A., Häcker, B., Marttila, T., Hesse, V., Emons, J., Weiss, B., Karperien, M., & Rappold, G. (2007a). BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Human Molecular Genetics*, *16*(24), 3081–3087.
- Marchini, A., Marttila, T., Winter, A., Caldeira, S., Malanchi, I., Blaschke, R. J., Häcker, B., Rao, E., Karperien, M., Wit, J. M., Richter, W., Tommasino, M., & Rappold, G. A. (2004). The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(35), 37103–37114.
- Marchini, A., Ogata, T., & Rappold, G. A. (2016). A Track Record on SHOX: From Basic Research to Complex Models and Therapy. *Endocrine Reviews*, *37*(4), 417–448.
- Marchini, A., Rappold, G., & Schneider, K. U. (2007). *SHOX* at a glance: from gene to protein. *Archives of Physiology and Biochemistry*, *113*(3), 116–123.
- Mattei, A. L., Bailly, N., & Meissner, A. (2022). DNA methylation: a historical perspective. *Trends in Genetics*, *38*(7), 676–707.
- Mohan, V., Gupta, R. P., Helmi, K., & Marklund, T. (1988). Leri-Weill syndrome (dyschondrosteosis): a family study. *Journal of Hand Surgery*, *13*(1), 16–18.
- Monteiro, B., Arenas, M., Prata, M. J., & Amorim, A. (2021). Evolutionary dynamics of the human pseudoautosomal regions. *PLoS Genetics*, *17*(4), e1009532.
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *38*(1), 23–38.
- Munns, C. F. J., Glass, I. A., LaBrom, R., Hayes, M., Flanagan, S., Berry, M., Hyland, V. J., Batch, J. A., Philips, G. E., & Vickers, D. (2001). Histopathological analysis of Leri-Weill dyschondrosteosis: Disordered Growth Plate. *Hand Surgery*, *6*(1), 13–23.
- Munns, C. J. F., Haase, H. R., Crowther, L. M., Hayes, M. T., Blaschke, R., Rappold, G., Glass, I. A., & Batch, J. A. (2004). Expression of SHOX in human fetal and

- childhood growth plate. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(8), 4130–4135.
- Ng, L. J., Wheatley, S., Muscat, G. E., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., Bell, D. M., Tam, P. P., Cheah, K. S., & Koopman, P. (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Developmental Biology*, 183(1), 108–121.
- Ogata, T., Matsuo, N., & Nishimura, G. (2001). SHOX haploinsufficiency and overdosage: impact of gonadal function status. *Journal of Medical Genetics*, 38(1), 1–6.
- Ogushi, K., Hattori, A., Suzuki, E., Shima, H., Izawa, M., Yagasaki, H., Horikawa, R., Uetake, K., Umezawa, A., Ishii, T., Muroya, K., Namba, N., Tanaka, T., Hirano, Y., Yamamoto, H., Soneda, S., Matsubara, K., Kagami, M., Miyado, M., & Fukami, M. (2019a). DNA Methylation Status of SHOX-Flanking CpG Islands in Healthy Individuals and Short Stature Patients with Pseudoautosomal Copy Number Variations. *Cytogenetic and Genome Research*, 158(2), 56–62.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247–257.
- Otto, S. P., Pannell, J. R., Peichel, C. L., Ashman, T.-L., Charlesworth, D., Chippindale, A. K., Delph, L. F., Guerrero, R. F., Scarpino, S. V., & McAllister, B. F. (2011). About PAR: the distinct evolutionary dynamics of the pseudoautosomal region. *Trends in Genetics*, 27(9), 358–367.
- Parrish, R. R., Day, J. J., & Lubin, F. D. (2012). Direct bisulfite sequencing for examination of DNA methylation with gene and nucleotide resolution from brain tissues. *Current Protocols in Neuroscience*, 7, Unit 7.24.
- Prothero, K. E., Stahl, J. M., & Carrel, L. (2009). Dosage compensation and gene expression on the mammalian X chromosome: one plus one does not always equal two. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 17(5), 637–648.

- Rao, E., Blaschke, R. J., Marchini, A., Niesler, B., Burnett, M., & Rappold, G. A. (2001). The Leri–Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Human Molecular Genetics*, *10*(26), 3083–3091.
- Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., Rump, A., Niesler, B., Mertz, A., Muroya, K., Binder, G., Kirsch, S., Winkelmann, M., Nordsiek, G., Heinrich, U., Breuning, M. H., Ranke, M. B., Rosenthal, A., Ogata, T., & Rappold, G. A. (1997). Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature Genetics*, *16*(1), 54–63.
- Rappold, G., Blum, W. F., & Shavrikova, E. P. (2007). Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *Journal of Medical*, *44*: 306-313.
- Rosilio, M., Huber-Lequesne, C., Sapin, H., Carel, J.-C., Blum, W. F., & Cormier-Daire, V. (2012). Genotypes and phenotypes of children with SHOX deficiency in France. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *97*(7), E1257–E1265.
- Ross, J. L., Scott, C., Jr, Marttila, P., Kowal, K., Nass, A., Papenhausen, P., Abboudi, J., Osterman, L., Kushner, H., Carter, P., Ezaki, M., Elder, F., Wei, F., Chen, H., & Zinn, A. R. (2001). Phenotypes Associated with SHOX Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *86*(12), 5674–5680.
- Ross, M. T., Grafham, D. V., Coffey, A. J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., Platzer, M., Howell, G. R., Burrows, C., Bird, C. P., Frankish, A., Lovell, F. L., Howe, K. L., Ashurst, J. L., Fulton, R. S., Sudbrak, R., Wen, G., Jones, M. C., Hurler, M. E., Bentley, D. R. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, *434*(7031), 325–337.
- Sabherwal, N., Bangs, F., Röth, R., Weiss, B., Jantz, K., Tiecke, E., Hinkel, G. K., Spaich, C., Hauffa, B. P., van der Kamp, H., Kapeller, J., Tickle, C., & Rappold, G. (2007). Long-range conserved non-coding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Human Molecular Genetics*, *16*(2), 210–222.

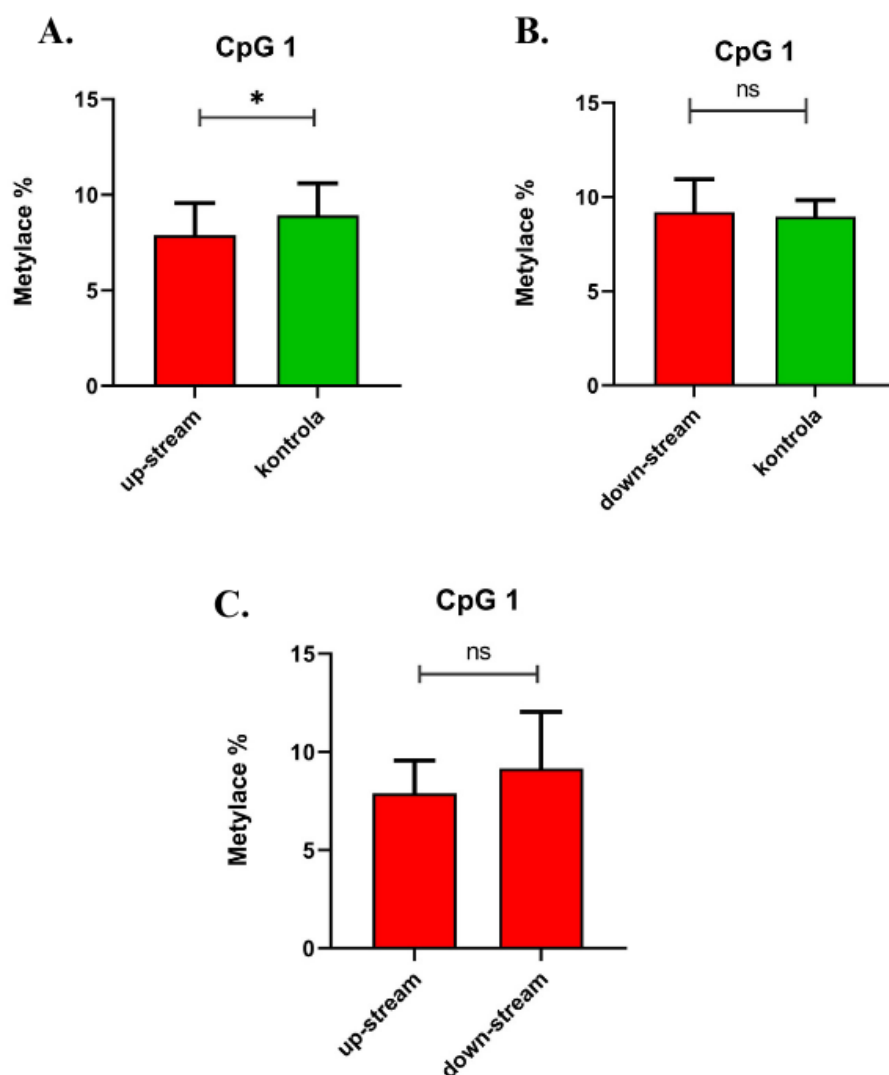
- Sabherwal, N., Schneider, K. U., Blaschke, R. J., Marchini, A., & Rappold, G. (2004). Impairment of SHOX nuclear localization as a cause for Léri-Weill syndrome. *Journal of Cell Science*, *117*(14), 3041–3048.
- Sandoval, G. T. V., Jaimes, G. C., Barrios, M. C., Cespedes, C., & Velasco, H. M. (2014). SHOX gene and conserved noncoding element deletions/duplications in Colombian patients with idiopathic short stature. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *2*(2), 95–102.
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(5), 1412–1417.
- Sharp, A. J., Stathaki, E., Migliavacca, E., Brahmachary, M., Montgomery, S. B., Dupre, Y., & Antonarakis, S. E. (2011). DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome Research*, *21*(10), 1592–1600.
- Shears, D. J., Vassal, H. J., Goodman, F. R., Palmer, R. W., Reardon, W., Superti-Furga, A., Scambler, P. J., & Winter, R. M. (1998). Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nature Genetics*, *19*(1), 70–73.
- Sheffield, N. C., Pierron, G., Klughammer, J., Datlinger, P., Schönegger, A., Schuster, M., Hadler, J., Surdez, D., Guillemot, D., Lapouble, E., Freneaux, P., Champigneulle, J., Bouvier, R., Walder, D., Ambros, I. M., Hutter, C., Sorz, E., Amaral, A. T., de Álava, E., Tomazou, E. M. (2017). DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma. *Nature Medicine*, *23*(3), 386–395.
- Shima, H., Tanaka, T., Kamimaki, T., Dateki, S., Muroya, K., Horikawa, R., Kanno, J., Adachi, M., Naiki, Y., Tanaka, H., Mabe, H., Yagasaki, H., Kure, S., Matsubara, Y., Tajima, T., Kashimada, K., Ishii, T., Asakura, Y., Fujiwara, I., Fukami, M. (2016). Systematic molecular analyses of SHOX in Japanese patients with idiopathic short stature and Leri–Weill dyschondrosteosis. *Journal of Human Genetics*, *61*(7), 585–591.

- Schiller, S., Spranger, S., Schechinger, B., Fukami, M., Merker, S., Drop S. LS., Tröger J., Knoblauch, H., Kunze, J., Seidel, J., & Rappold, G. (2000). Phenotypic variation and genetic heterogeneity in Léri-Weill syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 8, 54–62.
- Schneider, K. U., Marchini, A., Sabherwal, N., Röth, R., Niesler, B., Marttila, T., Blaschke, R. J., Lawson, M., Dunic, M., & Rappold, G. (2005). Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *Human Mutation*, 26(1), 44–52.
- Schwartzman, O., & Tanay, A. (2015). Single-cell epigenomics: techniques and emerging applications. *Nature Reviews. Genetics*, 16(12), 716–726.
- Skuplik, I., Benito-Sanz, S., Rosin, J. M., Bobick, B. E., Heath, K. E., & Cobb, J. (2018). Identification of a limb enhancer that is removed by pathogenic deletions downstream of the SHOX gene. *Scientific Reports*, 8(1), 14292.
- Stadler, M. B., Murr, R., Burger, L., Ivanek, R., Lienert, F., Schöler, A., van Nimwegen, E., Wirbelauer, C., Oakeley, E. J., Gaidatzis, D., Tiwari, V. K., & Schübeler, D. (2011). DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature*, 480(7378), 490–495.
- Suzuki, E., Shima, H., Toki, M., Hanew, K., Matsubara, K., Kurahashi, H., Narumi, S., Ogata, T., Kamimaki, T., & Fukami, M. (2016). Complex X-chromosomal rearrangements in two women with ovarian dysfunction: Implications of chromothripsis/chromoanasythesis-dependent and -independent origins of complex genomic alterations. *Cytogenetic and Genome Research*, 150(2), 86–92.
- Suzuki, Takayama, Ogata, & Fukami. (2014). Skeletal deformity associated with SHOX deficiency. *Clinical Pediatric Dermatology (Wilmington. Del.)*. 23(3), 65-72.
- Thomas, N. S., Harvey, J. F., Bunyan, D. J., Rankin, J., Grigelioniene, G., Bruno, D. L., Tan, T. Y., Tomkins, S., & Hastings, R. (2009). Clinical and molecular characterization of duplications encompassing the human SHOX gene reveal a variable effect on stature. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 149A(7), 1407–1414.

- Tompson, S. W., Merriman, B., Funari, V. A., Fresquet, M., Lachman, R. S., Rimoin, D. L., Nelson, S. F., Briggs, M. D., Cohn, D. H., & Krakow, D. (2009). A Recessive Skeletal Dysplasia, SEMD Aggrecan Type, Results from a Missense Mutation Affecting the C-Type Lectin Domain of Aggrecan. *American Journal of Human Genetics*, *84*(1), 72–79.
- Tsuchiya, T., Shibata, M., Numabe, H., Jinno, T., Nakabayashi, K., Nishimura, G., Nagai, T., Ogata, T., & Fukami, M. (2014). Compound heterozygous deletions in pseudoautosomal region 1 in an infant with mild manifestations of langer mesomelic dysplasia. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *164A*(2), 505–510.
- Tukiainen, T., Villani, A.-C., Yen, A., Rivas, M. A., Marshall, J. L., Satija, R., Aguirre, M., Gauthier, L., Fleharty, M., Kirby, A., Cummings, B. B., Castel, S. E., Karczewski, K. J., Aguet, F., Byrnes, A., Consortium, G., Lappalainen, T., Regev, A., Ardlie, K. G., MacArthur, D. G. (2018). Corrigendum: Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature*, *555*(7695), 274.
- VanderKraats, N. D., Hiken, J. F., Decker, K. F., & Edwards, J. R. (2013). Discovering high-resolution patterns of differential DNA methylation that correlate with gene expression changes. *Nucleic Acids Research*, *41*(14), 6816–6827.
- Veitia, R. A. (2002). Exploring the etiology of haploinsufficiency. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *24*(2), 175–184.
- Weise, M., De-Levi, S., Barnes, K. M., Gafni, R. I., Abad, V., & Baron, J. (2001). Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(12), 6871–6876.
- Wilkie, A. O., Morriss-Kay, G. M., Jones, E. Y., & Heath, J. K. (1995). Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Current Biology: CB*, *5*(5), 500–507.
- Wilson, D. S., Guenther, B., Desplan, C., & Kuriyan, J. (1995). High resolution crystal structure of a paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA. *Cell*, *82*(5), 709–719.

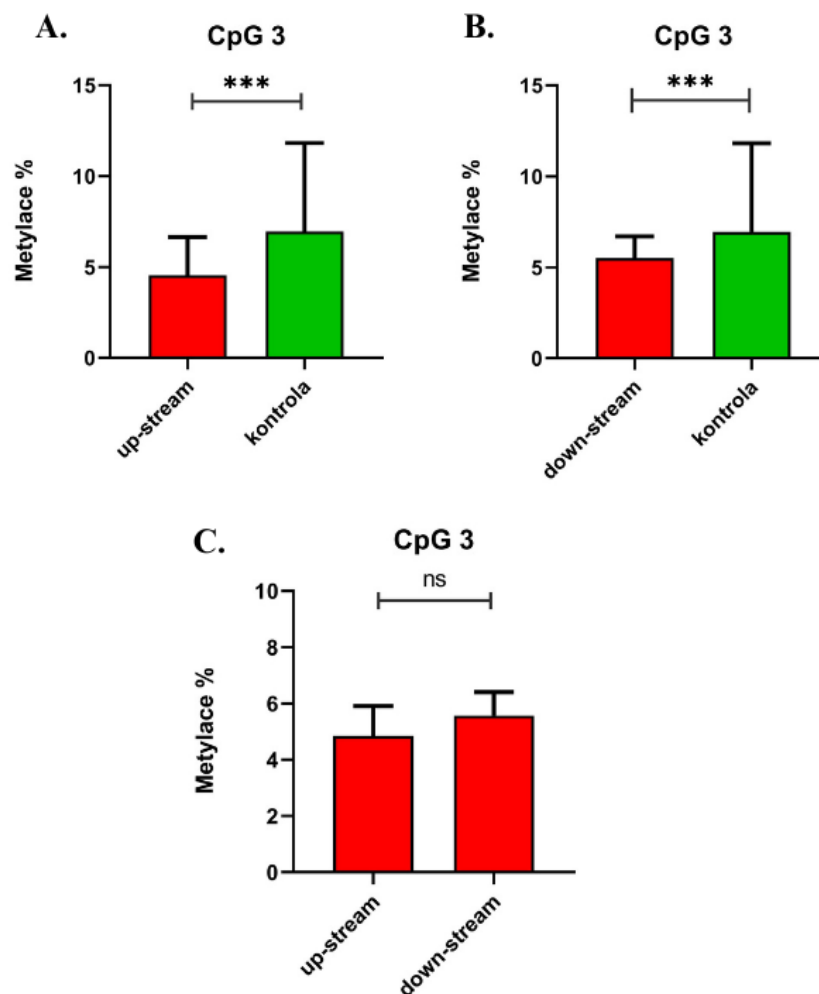
- Wilson, D., Sheng, G., Lecuit, T., Dostatni, N., & Desplan, C. (1993). Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes & Development*, 7(11), 2120–2134.
- Wolberger, C., Vershon, A. K., Liu, B., Johnson, A. D., & Pabo, C. O. (1991). Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell*, 67(3), 517–528.
- Wright, E., Hargrave, M. R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., Gangadharan, U., Greenfield, A., & Koopman, P. (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nature Genetics*, 9(1), 15–20.
- Xiao, Z., Li, B., Wang, G., Zhu, W., Wang, Z., Lin, J., Xu, A., & Wang, X. (2014). Validation of methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM) for the detection of stool DNA methylation in colorectal neoplasms. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 431, 154–163.
- Yasoda, A., Komatsu, Y., Chusho, H., Miyazawa, T., Ozasa, A., Miura, M., Kurihara, T., Rogi, T., Tanaka, S., Suda, M., Tamura, N., Ogawa, Y., & Nakao, K. (2004). Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nature Medicine*, 10(1), 80–86.
- Zinn, A. R., Wei, F., Zhang, L., Elder, F. F., Scott, C. I., Jr, Marttila, P., & Ross, J. L. (2002). Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. *American Journal of Medical Genetics*, 110(2), 158–163.
- Zorzo, R. A., Suen, V. M. M., Santos, J. E., Silva-Jr, W. A., Suazo, V. K., Honorato, A. L. S. C., Santos, R. D., Jannes, C. E., Pereira, A., Krieger, J. E., & Liberatore-Jr, R. D. R. (2023). LDLR gene's promoter region hypermethylation in patients with familial hypercholesterolemia. *Scientific Reports*, 13(1), 9241.

Příloha 1 – Porovnání úrovně metylace na základě lokalizace duplikací



Graf 1: Srovnání úrovně metylace mezi zdravými jedinci a pacienty na základě lokalizace duplikace „up-stream“ či „down-stream“ od kódující oblasti genu SHOX v ostrůvku CpG 1. Červený sloupec reprezentuje pacienty s LWD a duplikací v regulačních oblastech genu SHOX, zelený sloupec reprezentuje zdravé jedince. Hvězdička nahoře znázorňuje statisticky významný rozdíl, ns – nesignifikantní rozdíl.

*A. Hranice boxu představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty sloupců: **Up-stream**: medián 7,880; **Kontrola**: medián 8,920; $P = 0,0273$. B. Hranice boxu představují průměr, chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hodnoty sloupců: **Down-stream**: průměr 9,188; **Kontrola**: průměr 8,953; $P = 0,6007$. C. Hranice boxu představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty sloupců: **Up-stream**: medián 7,880; **Down-stream**: medián 9,150; $P = 0,2290$.*



Graf 2: Srovnání úrovně metylace mezi zdravými jedinci a pacienti na základě lokalizace duplikace „up-stream“ či „down-stream“ od kódující oblasti genu SHOX v ostrůvku CpG 3. Červený sloupec reprezentuje pacienty s LWD a duplikací v regulačních oblastech genu SHOX, zelený sloupec reprezentuje zdravé jedince. Hvězdička nahoře znázorňuje statisticky významný rozdíl, ns – nesignifikantní rozdíl.

*A. Hranice boxu představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty sloupců: **Up-stream**: medián 4,540; **Kontrola**: medián 6,950; $P = 0,0002$. B. Hranice boxu představují medián, chybové úsečky představují rozptyl. Hodnoty sloupců: **Down-stream**: medián 5,510; **Kontrola**: medián 6,950; $P = 0,0008$. C. Hranice boxu představují průměr, chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Hodnoty sloupců: **Up-stream**: průměr 4,844; **Down-stream**: průměr 5,567; $P = 0,1157$.*

Příloha 2 – Charakteristika pacientů bez detekovaných mutací

Tabulka 1: *Klinický profil pacientů bez detekovaných mutací v regionu SHOX*

Pacient	Pohlaví	Fenotyp	Výška	Věk měřené výšky	SD	MLPA P018 SHOX	Madelungova deformita
P1	Ž	LWD	142,8	12,7	-2,5	negativní	ANO
P2	M	ISS	128,6	11,0	-2,6	negativní	NE
P3	M	LWD	?	?	?	delL5101	ANO
P4	Ž	LWD	139,6	20,5	-4,5	negativní	ANO
P5	Ž	LWD	133,5	12,0	-2,6	negativní	NE
P6	Ž	ISS	?	13,0	-3,0	negativní	NE
P7	M	LWD	?	16,7	-2,8	negativní	NE
P8	Ž	LWD	100,20	5,8	-2,5	negativní	ANO
P9	M	LWD	91,00	4,5	-2,5	negativní	ANO
P10	M	LWD	?	14,9	-3,7	negativní	NE
P11	Ž	LWD	?	9,2	-2,6	negativní	NE
P12	Ž	LWD	100,00	5,3	?	negativní	ANO
P13	Ž	LWD	146,00	14,5	-2,5	negativní	ANO
P14	M	ISS	114,9	9,4	< -2,5	negativní	NE
P15	M	ISS	111,50	8,0	-2,5	negativní	NE
P16	Ž	LWD	151,00	41,5	?	negativní	ANO
P17	Ž	LWD	129,00	11,5	-2,2	negativní	NE
P18	M	LWD	128,0	12,5	< -2,5	negativní	NE
P19	M	LWD	104,0	6,0	-1,8	negativní	NE
P20	M	ISS	?	11,5	-2,5	negativní	NE
P21	M	ISS	137,8	12,0	?	negativní	NE
P22	M	ISS	127,00	13,5	-4,0	negativní	NE
P23	Ž	LWD	133,30	12,7	-2,0	negativní	NE
P24	M	ISS	110,00	6,9	?	negativní	NE
P25	Ž	LWD	109,00	7,8	-2,6	negativní	ANO
P26	M	LWD	115,00	8,2	-2,1	negativní	ANO
P27	M	LWD	134,00	12,7	-1,4	negativní	NE
P28	Ž	LWD	115,50	9,3	-2,5	negativní	NE
P29	M	LWD	84,00	3,3	-1,6	negativní	NE
P30	Ž	LWD	151,00	39,5	?	negativní	ANO