

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Současné metody analýzy genomu a jejich využití v
hledání genetických příčin nemocí**

Mgr. Viktor Stránecký

2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie
Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc
Školící pracoviště: Ústav dědičných metabolických poruch
Školitel: doc.Ing. Stanislav Kmoch, CSc.

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

Abstrakt

Studium vzácných onemocnění je vhodným přístupem pro nalezení genetické a molekulární podstaty lidských znaků a výrazně napomohlo k identifikaci genů, objasnění jejich funkce a přispělo k charakterizaci funkce metabolických drah a buněčných procesů. V průběhu posledních 30-ti let byla vazebná analýza nejúspěšnějším přístupem k hledání genů podmiňujících Mendelovská onemocnění a přispěla k identifikaci řady genů, přesto podstata mnohých onemocnění zůstává stále neznámá. Nové metody studia lidského genomu, zejména technologie DNA čipů, masivně paralelní sekvenování (next generation sequencing) a metody analýzy takto získaných dat, představují způsob jak efektivně identifikovat příčinu geneticky podmíněných onemocnění na základě přímého pozorování mutací v celém genomu postižených jedinců. Tyto metody nahrazují tradiční způsob identifikace genů reprezentovaný vazebnou analýzou a sekvenováním kandidátních genů a stávající se standardním přístupem pro objasnění molekulární podstaty onemocnění. V této práci popisují možnosti studia vzácných genetických podmíněných onemocnění a výsledky dosažené s využitím těchto postupů - identifikaci genů podmiňujících mukopolysacharidózu typ IIIC (*TMEM76*), izolovaný defekt ATP syntázy (*TMEM70*), Rotorův syndrom (*SLCO1B3* a *SLCO1B1*), autozomálně dominantní ANCL (*DNAJC5*) a GAPO syndrom (*ANTXR1*).

Abstract

The study of rare genetic diseases presents unique opportunity to uncover the genetic and molecular basis of human traits and greatly helped to the identification of genes, to the elucidation of their function and to the characterization of metabolic pathways and cellular processes. Over the past decades, linkage analysis has been appropriate approach to search for the genes causing Mendelian diseases and contributed to the identification of many genes, but the genetic cause of many diseases remains unknown. New methods of studying the human genome, microarray technology and massively parallel sequencing (next generation sequencing), represent a way to efficiently identify the cause of genetically determined diseases, based on direct observation of mutations in the genome of affected individuals. These techniques replaced the traditional method of disease gene identification represented by linkage analysis and sequencing of candidate genes and have become the standard approach to elucidate the molecular basis of diseases. In this work, i describe the the results achieved by using these methods - identification of the genes underlying mucopolysaccharidosis type IIIC, isolated defect of ATP synthase, Rotor syndrome, autosomal dominant ANCL and GAPO syndrome.

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt..... | 3 |
| Obsah | 5 |
| Úvod | 5 |
| Cíl dizertační práce | 8 |
| Technologie DNA čipů | 9 |
| Sekvenační technologie | 9 |
| Metody hledání genů podmiňujících dědičná onemocnění | 10 |
| Vazebná analýza | 12 |
| Homozygotní mapování..... | 12 |
| Asociační analýza | 12 |
| Analýza počtu změn kopií DNA | 13 |
| Exomové sekvenování | 13 |
| Studium genetické podstaty vzácných onemocnění | 15 |
| Rotorův syndrom | 15 |
| Deficit ATP syntázy | 17 |
| Mukopolysacharidóza typu IIIC..... | 18 |
| Autozomálně dominantní ANCL..... | 18 |
| GAPO syndrom | 20 |
| Výsledky..... | 21 |
| Závěr | 22 |
| Literatura..... | 23 |
| Seznam publikací, které jsou podkladem dizertační práce | 29 |
| Seznam ostatních publikací | 29 |

Úvod

Skutečnost, že některé znaky rostlin a živočichů se přenášejí z předků na potomky, je lidstvu známa již od starověku. Záznamy o chovu koní za účelem vylepšení některých jejich vlastností pocházejí již z období Sumerské říše, tedy z 3.-2. tisíciletí př. n. l. Ve starověkém Egyptě lidé ručně opylovali datle, aby zvýšili výnosy a podpořili jejich požadované charakteristiky.

První přenos onemocnění na potomky byl popsán již v talmudickém textu z 5. století n.l., v němž autoři v souvislosti s krvácivými projevy při rituální obřizce chlapců, popisují symptomy a charakteristiky přenosu onemocnění, *Rafei D'ma*, dnes známého jako hemofilie. Prvotní poznatky a mylné představy o zákonitostech

dědičnosti byly v průběhu historie vyvracovány a nahrazovány poznatky novými. Až ve druhé polovině 19. století byly učiněny objevy, které významným způsobem přispěly k rozvoji znalostí o zákonitostech dědičnosti, tak jak je známe dnes. Zásadními se v tomto ohledu staly experimenty J.G. Mendela. V roce 1866 publikoval opat brněnského augustiniánského kláštera, J. G. Mendel, výsledky svých pokusů s hrachorem pod názvem: *“Pokusy s rostlinnými hybridy”* a na základě hodnocení sledovaných znaků rodičovských rostlin a hybridů v dalších generacích formuloval základní pravidla dědičnosti.

Již téměř zapomenutá práce J. G. Mendela byla znovuobjevena v roce 1900 prakticky současně třemi vědci; Hugo De Vriesem, Carlem Corrensem a Ericem von Tschermakem. Až toto “znovuobjevení” je považováno za událost, jež vedla k založení nového vědního oboru, genetiky. Autorem tohoto pojmu je William Bateson. Bateson přispěl k rozvoji genetiky nejen svým experimentálním výzkumem, ale také hledáním souvislostí mezi výsledky základního výzkumu dědičnosti na zvířatech a rostlinách a množstvím klinických záznamů o dědičných onemocněních lidí, jež byla na začátku 20. století k dispozici. Při svých experimentech s hrachorem objevil W. Bateson a R. Punnett výjimky, které neodpovídaly Mendelovým závěrům. Bateson tyto výjimky přisoudil genové vazbě, kterou exaktně vysvětlil až T. H. Morgan. Morgan, identifikoval u octomilky skupiny genů, které v rámci skupiny buď nerekombinují, nebo rekombinují omezeně. Odhalil tak funkci chromozomů při přenosu genetické informace a potvrdil, že geny lokalizované na stejném chromozómu jsou ve vazbě.

Na začátku 20. století bylo popsáno i první dědičné metabolické onemocnění, alkaptonurie. Archibald Garrod, identifikoval řadu případů tohoto onemocnění a zároveň si povšimnul, že onemocnění se objevuje s typickým opakujícím se vzorcem dědičnosti. Znalosti z oblasti biochemie umožnily Garrodovi popsat první metabolické onemocnění člověka, u kterého byla prokázána platnost mendelovských zákonů dědičnosti. V první polovině 20. století bylo učiněno několik dalších významných objevů. H. J. Muller objevil schopnost rentgenových paprsků indukovat bodové mutace u octomilky a v roce 1944 O. Avery prokázal, že DNA je genetickým materiálem buněk.

Důležitým milníkem bylo určení přesné struktury molekuly DNA J. Watsonem a F. Crickem v roce 1953. I přes tento objev však zatím nebylo zřejmé, jakým

způsobem řídí DNA syntézu proteinů a jakou roli v celém procesu hraje RNA. Definice centrálního dogmatu molekulární biologie popisujícího směr přenosu genetické informace z DNA do RNA a pak do proteinu, objev mRNA (Jacob F. and Monod J., 1961) a rozluštění genetického kódu (Nirenberg M. W. and Matthaei J. H., 1961) plně objasnilo mechanismus funkčního vyjádření genetické informace.

Řada dalších objevů, zejména pak objev restričních endonukleáz (Smith H. O. and Wilcox K. W., 1970), rekombinantní DNA (Jackson D. A. et al., 1972), klonování DNA (Cohen S. N. et al., 1973), sekvenování DNA (Sanger F. and Coulson A. R., 1975), polymerázové řetězové reakce (Mullis K. B. and Faloona F. A., 1987) a polymorfních genetických markerů (Kan Y. W. and Dozy A. M., 1978) vedla k rozvoji metod molekulární genetiky umožňujících manipulaci, studium funkce a vlastností DNA. Tyto metody a postupy pozičního klonování umožnily studium genetické podstaty onemocnění a patofyziologických procesů s nimi spojených. Využití postupů pozičního klonování vedlo k identifikaci mnoha genů podmiňujících vzácná (Gusella J. F. et al., 1983; Koenig M. et al., 1987; Tsui L. C. et al., 1985) i populačně častá onemocnění (Hall J. M. et al., 1990; Miki Y. et al., 1994).

Zásadním milníkem v oblasti lidské genetiky byl Projekt lidského genomu (Human Genome Project) zahájený v roce 1990 s cílem určit přesnou sekvenci párů bází tvořících lidskou DNA a identifikovat všechny geny lidského genomu. První hrubá verze byla publikována v únoru 2001 (Consortium I. H. G. S., 2001) a k 50. výročí objevu struktury DNA byl projekt dokončen. Poznatky získané v rámci Projektu lidského genomu umožnily rozvoj mnoha nových technologií a metod analýzy geneticky podmíněných onemocnění. Znalost sekvence lidského genomu a popsaná variabilita (SNP) umožnila návrh genotypovacích DNA čipů a jejich následné využití při konstrukci haplotypové mapy lidského genomu (International HapMap C., 2005) a studium genetické podstaty řady komplexních onemocnění pomocí celogenomových asociačních studií (Welter D. et al., 2014). Potřeba levného a vysoko-kapacitního sekvenování vedla k vývoji nových masivně paralelních sekvenačních technologií (Metzker M. L., 2010) a způsobila revoluci v možnostech studia populační variability lidského genomu (Genomes Project C. et al., 2012) a s ní spojených onemocnění. Technologie DNA čipů, NGS sekvenování a metody analýzy takto získaných dat představují nový způsob, kterým mohou být studována geneticky podmíněná onemocnění. Nahrazují tradiční způsob identifikace genů reprezentovaný vazebnou analýzou a sekvenováním kandidátních genů a stávají se

standardním přístupem pro objasnění molekulární podstaty onemocnění (Bamshad M. J. et al., 2011).

Zavedení technologií DNA čipů, NGS sekvenování, postupů analýzy takto získaných dat a jejich využití při studiu molekulární podstaty vzácných onemocnění bylo hlavním cílem mé dizertační práce.

Cíl dizertační práce

Hlavním cílem mé dizertační práce bylo zavedení technologie DNA čipů, NGS sekvenování, metod analýzy a interpretace takto získaných dat umožňujících jejich využití při studiu molekulární podstaty vzácných onemocnění. Dílčími cíli bylo:

- 1) Rozvoj technologie vlastních oligonukleotidových čipů pro studium genové exprese a změn genové dávky ve studiu genetických příčin vzácných nemocí
- 2) Využití SNP čipů pro celogenomové genotypování, genetické mapování a analýzu změn genové dávky
- 3) Využití komerčně dostupných DNA čipů pro studium genové exprese
- 4) Zavedení a využití metod masivně paralelního sekvenování ve studiu genetických příčin vzácných nemocí a DNA diagnostice

Technologie DNA čipů

DNA čipy jsou relativně novou technologií pro kvalitativní a kvantitativní analýzu nukleových kyselin, která je používána od poloviny 90. let minulého století. Jejich hlavní výhodou je možnost vyšetření velkého množství úseků nukleových kyselin v jednom experimentu. V principu jsou DNA čipy malé pevné nosiče, na kterých mohou být imobilizovány v přesných pozicích až miliony oligonukleotidů (dříve i BAC nebo EST). Oligonukleotidy (probes) jsou navrženy tak, aby specificky hybridizovaly s komplementárními sekvencemi analyzované nukleové kyseliny (target). Po hybridizaci je detekován a kvantifikován fluorescenční signál pro každou z detekčních prób. Intenzita signálu odpovídá množství navázané analyzované nukleové kyseliny. DNA čipy byly nejprve využívány pro analýzu genové exprese (Schena M. et al., 1995), genotypování mitochondriálního genomu (Chee M. et al., 1996) a komparativní genomovou hybridizaci (CGH) (Solinas-Toldo S. et al., 1997). Možnosti jejich použití byly limitovány neznalostí referenčních sekvencí umožňující návrh detekčních sond. Teprve dokončení projektu lidského genomu umožnilo využití DNA čipů i pro jiné aplikace – vazebnou analýzu (Matsuzaki H. et al., 2004), celogenomové asociační studie (Klein R. J. et al., 2005), obohacení DNA (Hodges E. et al., 2007) a řadu dalších. V současnosti se pro přípravu používají různé technologie, které se liší použitým nosičem a způsobem přípravy detekčních sond (Hughes T. R. et al., 2001; Michael K. L. et al., 1998; Pease A. C. et al., 1994).

Sekvenační technologie

Možnost využití dideoxynukleotidů pro terminaci elongace sekvenovaného řetězce (Sanger F. et al., 1977) představovala zásadní mezník v historii DNA sekvenování. Tato myšlenka umožnila dohromady s objevem polymerázové řetězové reakce (Mullis K. B. and Faloona F. A., 1987) vývoj automatického Sangerova sekvenování (Ansorge W. et al., 1987; Smith L. M. et al., 1986), které se stalo nejpoužívanější DNA sekvenační technologií pro téměř dalších 20 let. Během tohoto období byla optimalizována pro čtení delších DNA fragmentů a pro vyšší kapacitu. V současnosti tato technologie umožňuje simultánní sekvenování až 384 fragmentů s maximální délkou čtení až tisíc párů bází (bp). Automatické Sangerovo sekvenování bylo hlavní technologií využívanou v rámci Projektu lidského genomu “Human Genome Project” zahájeném v roce 1990 s cílem identifikovat tři miliardy párů bází tvořících lidský genom. První výsledky tohoto projektu byly publikovány za deset let od zahájení

projektu (Venter J. C. et al., 2001) a projekt byl dokončen po dalších třech letech (International Human Genome Sequencing C., 2004). Projekt lidského genomu vyžadoval rozsáhlé a ekonomicky náročné sekvenování a ve svém důsledku vedl nejen k identifikaci lidského genomu, ale také k vývoji nových sekvenačních technologií. Nové sekvenační technologie označované jako "next generation sequencing" poskytují možnost analyzovat celé genomy. Principem těchto metod je postup, který umožňuje náhodně rozmístit a poté amplifikovat jednotlivé molekuly komplexní směsi DNA. S využitím polymerázy nebo ligázy jsou v opakujících se krocích do analyzovaných řetězců DNA inkorporovány komplementární báze a tento proces je monitorován detekcí fluorescenčního nebo jiného signálu. Toto umožňuje generovat statisíce až miliardy sekvenačních čtení s délkou 75 až 1000. Jejich rozvoj způsobil revoluci v možnostech studia variability lidského genomu jednotlivců (Levy S. et al., 2007; Wheeler D. A. et al., 2008) a následně i celých populací (Siva N., 2008). V rámci tohoto projektu bylo možné během pouhých 4 let analyzovat kompletní sekvenci genomu 1092 jednotlivců ze 14 různých populací (Genomes Project C. et al., 2012). Jádrem výzkumu se proto přesouvá od získávání sekvenčních dat k problematice jejich analýzy, interpretace, ukládání a zálohování.

Metody hledání genů podmiňujících dědičná onemocnění

Propojení genotypu s fenotypem je jedním z hlavních cílů genetiky. Unikátní možnosti studia v tomto ohledu nabízí výzkum vzácných geneticky podmíněných onemocnění.

Vzácná geneticky podmíněná onemocnění jsou skupinou převážně monogenních onemocnění, která dle definice postihují méně než 1 osobu z 2000 v Evropské Unii nebo méně než 1 osobu z 1250 ve Spojených státech (Remuzzi G. and Garattini S., 2008). Počet vzácných onemocnění je odhadován na více než 7000 (McKusick V. A., 2007). Přibližně u poloviny z nich je genetická příčina stále neznámá a pouze pro 5% z těchto onemocnění existuje v současnosti účinná léčba (Rohn J., 2013). Identifikace genů odpovědných za tato onemocnění umožňuje molekulární diagnostiku, prenatální diagnostiku a představuje první krok k lepšímu porozumění fyziologické funkce genů, proteinů a spojených biologických procesů, které je nezbytné pro vývoj léčiv.

Metody používané k objasnění genetické podstaty lidských onemocnění a dalších znaků spojených se zdravím jedince často vychází ze zjednodušujícího rozdělení na monogenní, vzácná a komplexní, populačně častá onemocnění. Nejpoužívanější metodou v poslední době bylo genetické mapování pomocí vazebné analýzy, které není závislé na jakékoliv předchozí znalosti biologie nebo funkce, a místo toho je založeno čistě na sledování dědičnosti studovaných znaků ve spojení s genetickými markery. S pomocí vazebné analýzy a sekvenování kandidátních genů byla odhalena molekulární podstata řady známých fenotypů s předpokládanou mendelovskou dědičností. Například geny pro cystickou fibrózu (Tsui L. C. et al., 1985), Huntigtonovu chorobu (Gusella J. F. et al., 1983) a diabetes mellitus (Bell G. I. et al., 1984).

Na druhém konci spektra celogenomové asociační studie identifikovaly velké množství oblastí přispívajících ke vzniku komplexních onemocnění (Welter D. et al., 2014), bohužel prakticky ve všech případech tyto oblasti vysvětlují pouze malou část pozorované heritability studovaných znaků (Manolio T. A. et al., 2009). Navíc i velká část populačně častých onemocnění, u kterých byla dříve předpokládána složitá multifaktoriální dědičnost, je nyní považována za heterogenní skupinu vzácných onemocnění (McClellan J. and King M. C., 2010).

Existuje mnoho faktorů, které komplikují možnost využití tradičních technik, například pouze malé množství pacientů dostupných k analýze, snížená penetrance onemocnění, heterogenita a snížená reprodukční schopnost postižených jedinců (Antonarakis S. E. and Beckmann J. S., 2006). Obejít tyto problémy je možné s využitím sekvenačního přístupu, kdy lze mutace identifikovat přímo prostřednictvím sekvenování (Ng S. B. et al., 2010). Přestože cena sekvenování dramaticky poklesla, stále není dostatečně nízká, aby bylo možné provádět celogenomové sekvenování v rozsáhlých genetických studiích s dostatečnou statistickou silou. Efektivnějším přístupem je zaměřit se pouze na relevantní genomické oblasti (exom). S rozvojem NGS se těžiště přesouvá od identifikace k interpretaci variant, jsou identifikovány desetitisíce variant, ale pouze jedna nebo dvě vysvětlují onemocnění. Postup filtrace variant proto představuje zásadní krok v identifikaci příčinných genů.

V následující části jsou popsány principy využívaných metod.

Vazebná analýza

Vazba je tendence lokusů se dědit společně, protože nejsou odděleny rekombinací během meiózy díky malé vzájemné vzdálenosti. Cílem vazebné analýzy je identifikovat chromozomální oblast, která segreguje se sledovaným fenotypem v jedné nebo více rodinách. To se provádí pomocí celogenomového genotypování pravidelně rozložených genetických markerů se známou chromozomální pozicí a následnou počítačovou analýzou. V průběhu počítačové analýzy je pro každý marker a všechny analyzované jedince vypočtena celková pravděpodobnost jako podíl pravděpodobnosti, že dva lokusy jsou ve vazbě (rekombinační frakce = θ) a pravděpodobnosti, že ve vazbě nejsou (rekombinační frakce = 0,5). Tento poměr udává pravděpodobnost vazby a logaritmus tohoto poměru se označuje jako LOD skóre (Morton N. E., 1955). Na základě konvence se hodnota LOD skóre větší než 3 považuje za důkaz vazby a hodnota menší než -2 za vyloučení vazby. Markery, které nerekombinují se studovaným fenotypem díky vzájemné blízkosti s hledaným genem, vymezují kandidátní oblast obsahující hledaný gen. Protože počet rekombinací je v rámci rodiny omezen, výsledná vazebná oblast má obvykle velikost 1- 10 cM.

Homozygotní mapování

Homozygotní mapování je dalším postupem pro lokalizaci genů podmiňujících vzácná recesivní onemocnění (Lander E. S. and Botstein D., 1987). Tento přístup předpokládá příbuznost rodičů postiženého jedince. Principem metody je hledání dlouhých autozygotních oblastí (identical by descent, pocházejících od společného předka), které pravděpodobně obsahují genetickou variantu podmiňující fenotyp. Homozygotní mapování lze provádět s využitím genotypovacích čipů s vysokou hustotou nebo genotypů získaných pomocí exomového sekvenování.

Asociační analýza

Asociační analýza je přístupem pro mapování genů, který přímo testuje vztah mezi konkrétní alelou, genotypem nebo haplotypem a studovaným znakem (onemocněním). Asociační studie jsou vhodným nástrojem pro posouzení kandidátních genů, upřesnění oblastí definovaných vazebnou analýzou a díky dostupnosti DNA čipů s vysokou hustotou také pro celogenomové mapování oblastí spojených s populačně častými, komplexními onemocněními (Cardon L. R. and Bell J. I., 2001). V typickém uspořádání, případ-kontrola, je porovnávána alelická

frekvence určitého genetického markeru mezi skupinou nepříbuzných kontrol a skupinou nepříbuzných jedinců nesoucích studovaný znak. Tyto dvě skupiny musí být srovnatelné z hlediska etnického původu. Pokud je nalezena asociace mezi zkoumanou genetickou variantou a onemocněním, lze předpokládat, že tato varianta nějakým způsobem souvisí s onemocněním, nebo je ve vazebné nerovnováze s příčinnou mutací. Nevýhodou asociační analýzy je množství falešně pozitivních výsledků, v důsledku různého populačního rozvrstvení porovnávaných skupin (Cardon L. R. and Palmer L. J., 2003). Výhodou naopak schopnost detekovat geny s relativně malým příspěvkem ke studovanému onemocnění.

Analýza počtu změn kopií DNA

Delece a duplikace, typy strukturních variant s velikostí větší než 50bp jsou označovány jako CNV (copy number variants) (MacDonald J. R. et al., 2014). CNV významným způsobem přispívají ke genetické variabilitě populace – v současné době bylo identifikováno více než 350 tis. CNV ovlivňujících přibližně 9.5% lidského genomu (Zarrei M. et al., 2015), mohou být zděděny nebo vznikají de-novo v průběhu meiotického dělení. CNV jsou asociovány s řadou patologických stavů, jako jsou například schizofrenie (Malhotra D. and Sebat J., 2012), autismus (Pinto D. et al., 2014), Crohnova choroba (Wellcome Trust Case Control C. et al., 2010) a mnoha dalších. Informace o CNV z různých projektů jsou shromažďovány v databázích. Příkladem jsou Database of Genomic Variants (Lafrate A. J. et al., 2004) obsahující varianty nalezené v kontrolních souborech a databáze DECIPHER obsahující varianty nalezené v souborech pacientů (Firth H. V. et al., 2009). Identifikace CNV je možná s využitím genotypovacích nebo CGH čipů, pomocí kterých je možné v závislosti na použité platformě spolehlivě detekovat změny větší než 10kb (Haraksingh R. R. et al., 2011). Další, zejména v poslední době využívanou metodou je celogenomové sekvenování, které oproti DNA čipům umožňuje přesné určení pozice a je vhodné i pro identifikaci velmi malých změn (Mills R. E. et al., 2011).

Exomové sekvenování

U vzácných Mendelovských onemocnění se předpokládá, že mutace mají velký efekt a proto se unikátně vyskytují pouze u pacientů nebo s velmi malou frekvencí v populaci, jsou lokalizovány v oblastech genomu kódujících proteiny a přímo ovlivňují funkci proteinu kódovaného mutovaným genem (Ng S. B. et al., 2010).

Efektivním přístupem proto je zaměřit se pouze na oblasti genomu kódující proteiny (exom). Exomové sekvenování je proces ve kterém jsou analyzovány všechny oblasti kódující proteiny v celém genomu (Ng S. B. et al., 2009). V současnosti existuje mnoho komerčně dostupných řešení pro přípravu exomových sekvenačních knihoven, které se liší velikostí cílené oblasti (Clark M. J. et al., 2011). Některé obsahují pouze kódující oblasti - exony, jiné i další funkčně významné elementy např. miRNA nebo nepřekládané oblasti genů. Výsledkem exomového sekvenování jsou desítky tisíc variant, je proto důležité zvolit přístup umožňující efektivně vybrat kandidátní varianty. Počet kandidátních variant je možné výrazně omezit i správným výběrem vzorků pro analýzu (Cheung C. Y. et al., 2014). Například pro dominantní onemocnění je vhodným přístupem vybrat jedince, které odděluje největší počet meióz. Analýza exomových dat je založena na filtrování nalezených variant, které se obvykle provádí dle kvality genotypu, efektu varianty na sekvenci proteinu, populační frekvenci varianty (1000Genomes, EVS, ExAC, dbSNP), přítomnosti varianty v databázi patogenních variant (HGMD (Stenson P. D. et al., 2009), ClinVar (Landrum M. J. et al., 2014)), genomické pozici varianty - pokud jsou k dispozici výsledky vazebné analýzy nebo homozygotního mapování, evoluční konzervovanosti (PhyloP (Pollard K. S. et al., 2010), GERP skóre (Cooper G. M. et al., 2005)), predikce škodlivosti varianty (SIFT (Ng P. C. and Henikoff S., 2001), PolyPhen (Adzhubei I. A. et al., 2010), CADD (Kircher M. et al., 2014)), předpokládaného modelu dědičnosti onemocnění (segregace varianty v rámci rodiny a u postižených jedinců), exprese genů v tkáních postižených studovaným onemocněním a relevanci známé funkce genů ke studovanému onemocnění. Parametry pro filtrování je nutné nastavit podle předpokládaného modelu dědičnosti a prevalence studovaného onemocnění. Nesprávné nastavení filtračních kroků může odstranit i příčinnou variantu. Úspěšnost exomového sekvenování při identifikaci genů podmiňujících Mendelovská onemocnění se pohybuje okolo 60% (Gilissen C. et al., 2012). Hlavní nevýhodou exomového sekvenování jsou především technická omezení (problematické pokrytí GC bohatých a sekvenčně nespecifických oblastí) a omezení daná principem této metody (závislost na definici oblastí v použitém kitu, nemožnost detekovat nekódující varianty, omezená možnost detekce CNV).

Studium genetické podstaty vzácných onemocnění

Rotorův syndrom

Rotorův syndrom (RS, OMIM#237450) je typem vzácné dědičné konjugované hyperbilirubinémie spojené s koproporfyrinurií a sníženým jaterním vstřebáváním mnoha diagnostických látek včetně choleoscintigrafických radiofarmak (Fretzayas A. M. et al., 1994). Svůj název nese po filipínském lékaři Arturovi Bellezovi Rotorovi, který syndrom s velmi vzácnou prevalencí popsal již v roce 1948 (A. B. Rotor L. M., A. Florentin, 1948). RS je autozomálně recesivní onemocnění, které je klinicky podobné dalšímu typu vrozené hyperbilirubinémie, Dubin-Johnsonovu syndromu (DJS, OMIM#237500). Hlavním rozdílem oproti DJS je nepřítomnost pigmentových deposit v hepatocytech. Bilirubin je látka vznikající rozkladem hemu a jeho metabolismus byl dosud popisován jako jednosměrný proces skládající se ze dvou kroků. Nejprve je nekonjugovaný bilirubin přenesen do hepatocytu, kde se konjuguje s glukuronovou kyselinou za pomoci glukuronosyltransferázy a následně je vyloučen do žluče.

RS jsme začali studovat v roce 2006 ve spolupráci s Institutem klinické a experimentální medicíny. Vzhledem k dosud nejasné molekulární podstatě RS a jeho podobnosti s DJS byla nejprve testována hypotéza, že RS by mohl být alelickou variantou DJS, který je způsoben mutacemi v genu *ABCC2* (Paulusma C. C. et al., 1997). Proto byla u dvou pacientů provedena mutační analýza genu *ABCC2* s využitím Sangerova sekvenování s negativním výsledkem. Také imunohistochemické nálezy neukázaly žádný rozdíl oproti zdravým kontrolám. Pro vyloučení velkých delecí v genu *ABCC2*, které nejsou detekovatelné Sangerovým sekvenováním, byl navržen DNA čip pro komparativní genomovou hybridizaci (CGH). Pomocí CGH nebyly nalezeny žádné změny v počtu kopií u všech exonů genu *ABCC2*. Tyto výsledky vyloučily možnost, že RS je alelickou variantou DJS (příloha 1a).

Ve studiu RS jsme dále pokračovali genotypováním 11 pacientů z 8 rodin s využitím DNA čipu Affymetrix SNP 6.0. Homozygotní mapování definovalo u všech pacientů jedinou společnou oblast na chromozomu 12 přítomnou na třech různých

haplotypech. Souběžně provedená analýza počtu změn kopií odhalila dvě změny ve stejné oblasti, homozygotní delecii části genu *SLCO1B3* přítomnou na haplotypu R1 a homozygotní delecii v oblasti genů *SLCO1B3*, *SLCO1B7* a *SLCO1B1* na haplotypu R2. Následná sekvenační analýza odhalila homozygotní mutace v genu *SLCO1B3* u haplotypu R1 a v genech *SLCO1B3* a *SLCO1B1* u haplotypu R3. U všech probandů byly nalezeny delece nebo mutace postihující obě alely genů *SLCO1B3* a *SLCO1B1*. Absence proteinů OAPT1B3 a OATP1B1, které jsou kódovány geny *SLCO1B3* a *SLCO1B1* byla potvrzena imunohistochemickým barvením jaterních biopsií pacientů. Tyto výsledky potvrdily, že RS je způsoben kompletním defektem obou alel genů *SLCO1B1* a *SLCO1B3*.

Proteiny OATP1B1 a OATP1B3 lokalizované na sinusoidní membráně hepatocytu jsou hlavními jaterními transportéry převážně organických aniontů ale i dalších látek. Bylo prokázáno, že jejich substráty je řada endogenních, ale i exogenních látek, jako jsou například žlučové kyseliny, steroidní sulfáty, thyroïdní hormony, konjugovaný bilirubin, statiny, paclitaxel, rifampicin a mnoho dalších (Hagenbuch B. and Gui C., 2008; Niemi M. et al., 2011).

Nezávisle byl skupinou z The Netherlands Cancer Institute v Amsterdamu studován transport bilirubinu na myším modelu s deficiencí proteinů Oatp1a/1b, Abcc3 a Abcc2, myších homologů lidských proteinů OATP1B1, OATP1B3, ABCC3 a ABCC2. U *Slco1a/1b*^{-/-} myši byly pozorovány zvýšené hodnoty bilirubinu v plazmě, ty jsou významně sníženy u *Slco1a/1b*; *Abcc3*^{-/-} myši, přičemž bylo dokázáno, že Abcc3 protein odpovídá z největší části za zvýšené hodnoty bilirubinu v plazmě. Z výsledků práce vyplývá, že Abcc3 transportuje konjugovaný bilirubin z hepatocytů zpět do krve a proteiny Oatp1a a Oatp1b transportují tento bilirubin z krve zpět do hepatocytů. Transgenní exprese lidského OATP1B3 nebo OATP1B1 proteinu v *Slco1a/1b*^{-/-} myši vede k normalizaci hladin bilirubinu v plazmě. Tím bylo potvrzeno, že oba lidské proteiny OATP1B3 i OATP1B1 transportují konjugovaný bilirubin z plazmy zpět do hepatocytu. Tyto výsledky ukazují, že exkreční dráha bilirubinu není jednosměrným transportem bilirubinu z krve do hepatocytu a následně do žluče. Ale že část konjugovaného bilirubinu je z hepatocytu vyloučena pomocí transportéru ABCC3 do krve, odkud je zpětně reabsorbována pomocí OATP1B3 a OATP1B1 a následně je vyloučena do žluče pomocí transportéru ABCC2.

Propojení výsledků těchto studií umožnilo objasnit příčinu a projevy Rotorova syndromu a definovat nový mechanismus transportu bilirubinu v játrech.

Deficit ATP syntázy

Mitochondriální ATP syntáza je klíčovým enzymem mitochondriálního energetického metabolismu katalyzujícím syntézu ATP v procesu oxidativní fosforylace. ATP syntáza je proteinový komplex složený z 16 typů podjednotek (Collinson I. R. et al., 1996), dvě z těchto jednotek jsou kódovány mtDNA (*ATP6, ATP8*) a zbytek jadernou DNA. Mitochondriální onemocnění spojená s izolovaným deficitem ATP syntázy jaderného původu (OMIM#604273) jsou charakterizována snížením množství enzymu pod 30% spojeným se ztrátou syntetické i hydrolytické aktivity (Houstek J. et al., 1999). Onemocnění se projevuje již v novorozeneckém nebo kojeneckém období, nejčastějšími příznaky jsou laktátová acidóza, hypertrofická kardiomyopatie, poškození CNS a 3-metylglutakonová acidurie (Sperl W. et al., 2006). S cílem identifikovat gen podmiňující onemocnění jsme navrhli vlastní čip pro studium genové exprese h-MitoArray obsahující celkem 1632 převážně mitochondriálních genů a využili jej ke studiu genové exprese ve fibroblastech pacientů s popsáním defektem ATP syntázy. Porovnání expresních profilů, funkční anotace a metoda genového obohacení rozdělila pacienty do tří specifických skupin, kandidátní gen však nebyl nalezen (příloha 2a). Proto jsme ve studiu dále pokračovali a pomocí genotypovacích čipů Affymetrix analyzovali 8 postižených jedinců a 13 jejich rodičů nebo nepostižených sourozenců celkem z 6 rodin. Pomocí homozygotního mapování byla nalezena jediná společná oblast na chromozomu 8 o velikosti přibližně 1 Mb obsahující celkem 7 genů. Současně byla analyzována genová exprese v patientských a kontrolních fibroblastech s využitím DNA čipu Agilent 44k. Propojení výsledků těchto analýz definovalo kandidátní gen - *TMEM70*, který se nacházel ve sdílené homozygotní oblasti a zároveň měl významně sníženou expresi oproti kontrolním vzorkům. Sekvenační analýzou tohoto genu byla nalezena homozygotní mutace 317-2A > G (NM017866) vedoucí k aberantnímu sestřihu a ztrátě transkriptu. Následně byla shodná mutace identifikována u 23 z 25 dostupných pacientů. Funkční význam této mutace byl potvrzen komplementační studií. Vnesení wt formy genu *TMEM70* do patientských fibroblastů vedlo ke zvýšení množství ATP syntázy a obnovení funkce respiračního řetězce. Fylogenetická analýza potvrdila přítomnost homologů genu *TMEM70* u vyšších eukaryot a rostlin,

ne však u kvasinek a hub. Bylo tak prokázáno, že *TMEM70* se účastní biogeneze ATP syntázy u vyšších eukaryot a jeho defekt je relativně častou příčinou mitochondriálních onemocnění, zvláště v romské populaci.

Mukopolysacharidóza typu IIIC

Mukopolysacharidózy (MPS) patří do skupiny stárádavých lysozomálních onemocnění, jejichž příčinou je deficit enzymů katalyzujících degradaci glykosaminoglykanů. Mukopolysacharidóza typu IIIC (MPSIIIC, Sanfilippo syndrom C, OMIM #252930) je autozomálně recesivní onemocnění způsobené deficitem enzymu alfa-glukosamin N-acetyltransferázy (Klein U. et al., 1978), které se projevuje převážně postižením centrálního nervového systému. Gen pro N-acetyltransferázu byl již dříve mapován do 8.3 cM oblasti na chromozómu 8 (Ausseil et al. 2004).

Pro upřesnění již dříve reportované kandidátní oblasti na chromozómu 8 byla provedena vazebná analýza s využitím STR markerů u 5 pacientů ze 4 nepříbuzných rodin a jejich 49 rodinných příslušníků diagnostikovaných na základě vyšetření aktivity N-acetyltransferázy. Výsledkem byla kandidátní oblast o velikosti 2.6 cM obsahující 32 známých nebo predikovaných genů. Následně byla provedena expresní analýza těchto genů v leukocytech pacientů s využitím připraveného DNA čipu. *HGSNAT* (dříve *TMEM76*) byl vybrán jako kandidátní gen na základě známých vlastností enzymu (předpokládaná velikost proteinu, přítomnost transmembránových domén) a snížené exprese tohoto genu u pacientů. S využitím sekvenační analýzy na rozšířeném souboru pacientů byly nalezeny v genu *HGSNAT* 4 nesmyslné mutace, 11 mutací měnících smysl, 2 mutace způsobují posun čtecího rámce, 6 sestřihových mutací a jedna rozsáhlá delece. Funkční význam genu *HGSNAT* byl potvrzen komplementační studií.

Autozomálně dominantní ANCL

Neuronální ceroidní lipofuscinózy (NCL) jsou heterogenní skupinou vzácných dědičně podmíněných neurodegenerativních onemocnění, jejichž společným znakem je na buněčné úrovni stárádání autofluorescentního materiálu (lipufuscinu) v lysozomech neuronů CNS a v periferních tkáních. Mezi charakteristické projevy onemocnění patří progresivní porucha zraku, epilepsie, parkinsonismus a zhoršení kognitivních funkcí vedoucí k demenci. Podle věku nástupu onemocnění jsou NCL

děleny na infantilní, pozdně infantilní, časně juvenilní, juvenilní a adultní formy (Mole S. E. et al., 2011). Léčba žádné z forem NCL není v současnosti dostupná, jedinou možností je prevence onemocnění s využitím postupů prenatální a preimplantační diagnostiky. Ve spojení s NCL bylo doposud popsáno dvanáct genů (*PPT1, TPP1, CLN3, CLN5, CLN6, MFSD8, CLN8, CSTD, CTSF, GRN, ATP13A2, KC TD7*). Genetická podstata autozomálně dominantní adultní formy neuronální ceroidní lipofuscinózy (ANCL) (*CLN4B*, OMIM#162350) nebyla zatím objasněna.

Pro studium molekulární podstaty autozomálně dominantní ANCL byla využita kombinace metod vazebné analýzy, expresní analýzy, analýzy počtu změn kopií a exomového sekvenování. Výsledky vazebné analýzy nejprve definovaly pět kandidátních oblastí na chromosomech 1, 4, 15, 20 a 22. Paralelně provedená analýza změn počtu kopií u 7 pacientů neodhalila žádné CNV větší než 10kb segregující s onemocněním. Následně byla s cílem identifikovat varianty ovlivňující množství transkripce provedena analýza genové exprese v leukocytech 4 pacientů a kontrol. Výsledkem této analýzy byl seznam 2131 rozdílně exprimovaných genů, z nichž se 65 nacházelo v oblastech definovaných vazebnou analýzou. Vzhledem ke stále velkému počtu kandidátních genů bylo provedeno exomové sekvenování jednoho pacienta na sekvenátoru SOLiD 4. Pomocí exomového sekvenování bylo identifikováno u tohoto pacienta celkem 957 unikátních variant nepřítomných v populačních databázích (dbSNP, 1000Genomes). Propojením výsledků vazebné analýzy, expresní analýzy a exomového sekvenování byla nalezena heterozygotní mutace v genu *DNAJC5* c.346_348delCTC (p. Leu116del). Segregace této mutace byla u dalších postižených členů rodiny ověřena Sangerovým sekvenováním. Díky spolupráci s Rare NCL Gene Consortium byla sekvenační analýzou následně nalezena stejná mutace u dalšího nepříbuzného pacienta a zároveň identifikovaná druhá varianta c.344T>G(p.Leu115Arg) u 3 dalších nepříbuzných pacientů.

DNAJC5 kóduje cysteine-string protein alpha (CSP α), evolučně konzervovaný membránový protein lokalizovaný v synaptických membránách neuronů (Tobaben S. et al., 2001). Jeho mutace vedou u modelových organismů k neurodegeneraci a zkrácení délky života (Schmitz F. et al., 2006; Zinsmaier K. E. et al., 1994). Význam nalezených variant na funkci proteinu byl ověřen pomocí *in-silico* analýzy, kdy nalezené mutace snižují hydrofobicitu a palmitoylaci proteinu, studií v tkáňových kulturách neuronálních buňek byla zjištěna změna lokalizace mutovaného proteinu a

imunohistochemické barvení ukázalo snížené množství nebo absenci proteinu v šedé hmotě mozkové kůry pacientů. Prokázali jsme tak, že mutace v genu *DNAJC5* jsou příčinou autozomálně dominantní formy ANCL.

GAPO syndrom

Gapo syndrom (OMIM#230740) je velmi vzácné autozomálně recesivní onemocnění. Název syndromu je zkratkou anglických slov popisujících hlavní projevy syndromu - **G**rowth retardation (růstovou retardaci), **A**lopecia (plešatost), **P**seudoanodontia (porucha prořezávání zubů) a **O**ptic atrophy (atrofie optického nervu) (Tipton R. E. and Gorlin R. J., 1984). Doposud bylo celosvětově popsáno pouze okolo 40 pacientů. Většina postižených tímto syndromem pochází z příbuzenských svazků.

Ve spolupráci s Klinikou dětského a dorostového lékařství jsme měli možnost studovat již dříve reportovanou rodinu s jedním postiženým potomkem (Baxova A. et al., 1997). S využitím DNA čipu Affymetrix SNP 6.0 bylo provedeno genotypování celé rodiny. Analýza počtu kopií neidentifikovala žádnou delecii nebo amplifikaci větší než 10 kb, která by odpovídala předpokládanému modelu dědičnosti. Pomocí homozygotního mapování byly nalezeny dvě rozsáhlé homozygotní oblasti na chromozomu 2 a 4, obsahující 114 a 29 genů. Vzhledem k velikosti nalezených oblastí bylo provedeno exomové sekvenování celé rodiny. Analýza exomových dat identifikovala tři kandidátní mutace odpovídající autozomálně recesivnímu modelu dědičnosti, z nichž se pouze jedna nacházela v homozygotní oblasti. Nalezená homozygotní mutace v genu *ANTXR1* (c.C505>T; p.R169X) nebyla přítomna v žádné z populačních databází. Sekvenační analýzou genu *ANTXR1* dalšího dostupného pacienta byla nalezena mutace (c.C262>T; p.R88X) a rekurence byla dále potvrzena díky mezinárodní spolupráci analýzou dalších dvou rodin (c.C262>T; p.R88X a sestřihová mutace c.1435–12A>G). *ANTXR1* (dříve TEM8, tumor endothelial marker 8) je transmembránový glykoprotein typu I lokalizovaný na plazmatické membráně, který byl původně popsán jako nádorově specifický endoteliální marker, jehož exprese je zvýšená během procesu nádorové angiogeneze (St Croix B. et al., 2000). Krátce poté, byl nezávisle identifikován jako receptor pro toxin *Bacillus anthracis* (ATR) (Bradley K. A. et al., 2001). Mezi jeho funkce patří zprostředkování interakce buňky s komponentami extracelulární matrix (Hotchkiss K. A. et al., 2005), vazba ligandů k aktinovému cytoskeletu (Yang M. Y. et al., 2011) a regulace buněčné adheze (Werner E. et al., 2006). Funkční význam

nalezených mutací byl potvrzen podstatně sníženým množstvím transkriptu, nepřítomností proteinu ve fibroblastech pacientů a barvení phalloidinem také prokázalo výrazné změny v síti aktinových vláken cytoskeletu fibroblastů.

Výsledky

Tato dizertační práce představuje možnosti využití nových genomických technik ve studiu genetické podstaty řady vzácných onemocnění a jejich úspěšnou aplikaci. Předkládanými výsledky jsou:

1. Objasnění genetické podstaty Rotorova syndromu (*SLCO1B1* a *SLCO1B3*) a popsání nového mechanismu transportu bilirubinu v játrech s využitím vlastních oligonukleotidových čipů, homozygotního mapování a analýzy změn počtu kopií DNA (příloha 1a a 1b).
2. Identifikace genu odpovědného za izolovaný deficit ATP syntázy (*TMEM70*) pomocí vlastního čipu H-MitoArray, analýzy genové exprese, vazebné analýzy a homozygotního mapování (příloha 2a a 2b).
3. Identifikace genu podmiňujícího mukopolysacharidózu typu IIIC (*TMEM76*) s využitím vazebné analýzy a analýzy genové exprese na vlastních DNA čipech (příloha 3).
4. Objasnění genetické podstaty adultní formy autozomálně dominantní neuronální ceroidní lipofuscinózy (*DNAJC5*) s využitím kombinace vazebné analýzy, analýzy genové exprese, analýzy změn počtu kopií DNA a exomového sekvenování (příloha 4).
5. Objasnění genetické podstaty GAPO syndromu (*ANTXR1*) s využitím analýzy změn počtu kopií DNA, homozygotního mapování a exomového sekvenování (příloha 5).

Závěr

Má práce významně přispěla k zavedení technologie masivně paralelního sekvenování, k rozvoji technologie DNA čipů, zavedení postupů bioinformatické analýzy a interpretace takto získaných dat v Ústavu dědičných metabolických poruch. Tyto metody a postupy jsou dnes základním přístupem pro studium molekulární podstaty geneticky podmíněných onemocnění a DNA diagnostiku známých onemocnění.

1. Zavedení těchto metod a postupů umožnilo jejich úspěšné využití ve více než 20 projektech a vedlo k objasnění genetické molekulární příčiny MPSIIIC (příloha 3), deficitu ATP syntázy (příloha 2a a 2b), Rotorova syndromu (příloha 1a a 1b), Kufsovy choroby (příloha 4), GAPO syndromu (příloha 5), X-vázané familiární kardiomyopatie (Hartmannova H. et al., 2013), poruchy glykosylace (Park E. J. et al., 2014) a dětské slepoty (Kmoch S. et al., 2015). S jejich využitím byl také studován mechanismus leukemogeneze (Takacova S. et al., 2012), hypercholesterolémie (Kolarova H. et al., 2014), příčina mitochondriálních onemocnění (Vondrackova A. et al., 2014), příčina dědičné hemochromatózy (Neroldova M. et al., 2015) a příčina deficitu OTC (Storkanova G. et al., 2013).

2. Tyto metody a postupy představují univerzální technologickou platformu pro studium genetických příčin nemocí v ČR. V současnosti jsou tyto postupy využívány ve spolupráci s IKEM, VFN, FN Motol a Fyziologickým ústavem AV v řadě dalších projektů – studiu vzácných nemocí, familiárních kardiomyopatií, rakoviny prsu, příčin statinové myopatie, genetické komponenty násilného chování, familiárních nefropatií, neurodegenerativních onemocnění a mitochondriálních onemocnění.

2. Identifikace kauzálních genů umožnila diagnostiku a prevenci onemocnění s využitím postupů prenatální a preimplantační diagnostiky.

3. Souhrnná data tvoří základ české populační databáze variant pro efektivní analýzu dat produkovaných masivně paralelním sekvenováním.

4. Získané zkušenosti umožnily vývoj kitů pro obohacení DNA o vybrané oblasti a zavedení metod DNA diagnostiky založené na NGS pro mitochondriální, metabolická a onkologická onemocnění.

Literatura

- A. B. Rotor L. M., A. Florentin, 1948, *Familial non-hemolytic jaundice with direct van den Bergh reaction*. Acta medica Philippina. **5**: p. 37-49.
- Adzhubei I. A., Schmidt S., Peshkin L., et al., 2010, *A method and server for predicting damaging missense mutations*. Nat Methods. **7**(4): p. 248-249.
- Ansorge W., Sproat B., Stegemann J., et al., 1987, *Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis*. Nucleic Acids Res. **15**(11): p. 4593-4602.
- Antonarakis S. E. and Beckmann J. S., 2006, *Mendelian disorders deserve more attention*. Nat Rev Genet. **7**(4): p. 277-282.
- Bamshad M. J., Ng S. B., Bigham A. W., et al., 2011, *Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery*. Nat Rev Genet. **12**(11): p. 745-755.
- Baxova A., Kozlowski K., Obersztyń E., et al., 1997, *GAP0 syndrome (Radiographic clues to early diagnosis)*. Radiol Med. **93**(3): p. 289-291.
- Bell G. I., Horita S., and Karam J. H., 1984, *A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus*. Diabetes. **33**(2): p. 176-183.
- Bradley K. A., Mogridge J., Mourez M., et al., 2001, *Identification of the cellular receptor for anthrax toxin*. Nature. **414**(6860): p. 225-229.
- Cardon L. R. and Bell J. I., 2001, *Association study designs for complex diseases*. Nat Rev Genet. **2**(2): p. 91-99.
- Cardon L. R. and Palmer L. J., 2003, *Population stratification and spurious allelic association*. Lancet. **361**(9357): p. 598-604.
- Clark M. J., Chen R., Lam H. Y., et al., 2011, *Performance comparison of exome DNA sequencing technologies*. Nat Biotechnol. **29**(10): p. 908-914.
- Cohen S. N., Chang A. C., Boyer H. W., et al., 1973, *Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A. **70**(11): p. 3240-3244.
- Collinson I. R., Skehel J. M., Fearnley I. M., et al., 1996, *The F1F0-ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratio of the subunits in the stalk region linking the F1 and F0 domains*. Biochemistry. **35**(38): p. 12640-12646.
- Consortium I. H. G. S., 2001, *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature. **409**(6822): p. 860-921.
- Cooper G. M., Stone E. A., Asimenos G., et al., 2005, *Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence*. Genome Res. **15**(7): p. 901-913.
- Firth H. V., Richards S. M., Bevan A. P., et al., 2009, *DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*. Am J Hum Genet. **84**(4): p. 524-533.
- Fretzayas A. M., Garoufi A. I., Moutsouris C. X., et al., 1994, *Cholescintigraphy in the diagnosis of Rotor syndrome*. J Nucl Med. **35**(6): p. 1048-1050.

- Genomes Project C., Abecasis G. R., Auton A., et al., 2012, *An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes*. *Nature*. **491**(7422): p. 56-65.
- Gilissen C., Hoischen A., Brunner H. G., et al., 2012, *Disease gene identification strategies for exome sequencing*. *Eur J Hum Genet*. **20**(5): p. 490-497.
- Gusella J. F., Wexler N. S., Conneally P. M., et al., 1983, *A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease*. *Nature*. **306**(5940): p. 234-238.
- Hagenbuch B. and Gui C., 2008, *Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family*. *Xenobiotica*. **38**(7-8): p. 778-801.
- Hall J. M., Lee M. K., Newman B., et al., 1990, *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. *Science*. **250**(4988): p. 1684-1689.
- Haraksingh R. R., Abyzov A., Gerstein M., et al., 2011, *Genome-wide mapping of copy number variation in humans: comparative analysis of high resolution array platforms*. *PLoS One*. **6**(11): p. e27859.
- Hartmannova H., Kubanek M., Sramko M., et al., 2013, *Isolated X-Linked Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by a Novel Mutation of the Four-and-a-Half LIM Domain 1 Gene*. *Circ Cardiovasc Genet*.
- Hodges E., Xuan Z., Balija V., et al., 2007, *Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing*. *Nat Genet*. **39**(12): p. 1522-1527.
- Hotchkiss K. A., Basile C. M., Spring S. C., et al., 2005, *TEM8 expression stimulates endothelial cell adhesion and migration by regulating cell-matrix interactions on collagen*. *Exp Cell Res*. **305**(1): p. 133-144.
- Houstek J., Klement P., Floryk D., et al., 1999, *A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin*. *Hum Mol Genet*. **8**(11): p. 1967-1974.
- Hughes T. R., Mao M., Jones A. R., et al., 2001, *Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer*. *Nat Biotechnol*. **19**(4): p. 342-347.
- Chee M., Yang R., Hubbell E., et al., 1996, *Accessing genetic information with high-density DNA arrays*. *Science*. **274**(5287): p. 610-614.
- Cheung C. Y., Marchani Blue E., and Wijsman E. M., 2014, *A statistical framework to guide sequencing choices in pedigrees*. *Am J Hum Genet*. **94**(2): p. 257-267.
- Iafraite A. J., Feuk L., Rivera M. N., et al., 2004, *Detection of large-scale variation in the human genome*. *Nat Genet*. **36**(9): p. 949-951.
- International HapMap C., 2005, *A haplotype map of the human genome*. *Nature*. **437**(7063): p. 1299-1320.
- International Human Genome Sequencing C., 2004, *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. *Nature*. **431**(7011): p. 931-945.
- Jackson D. A., Symons R. H., and Berg P., 1972, *Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules*

- containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. **69**(10): p. 2904-2909.
- Jacob F. and Monod J., 1961, *Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins*. J Mol Biol. **3**: p. 318-356.
- Kan Y. W. and Dozy A. M., 1978, *Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation*. Proc Natl Acad Sci U S A. **75**(11): p. 5631-5635.
- Kircher M., Witten D. M., Jain P., et al., 2014, *A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants*. Nat Genet. **46**(3): p. 310-315.
- Klein R. J., Zeiss C., Chew E. Y., et al., 2005, *Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration*. Science. **308**(5720): p. 385-389.
- Klein U., Kresse H., and von Figura K., 1978, *Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase in skin fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A. **75**(10): p. 5185-5189.
- Kmoch S., Majewski J., Ramamurthy V., et al., 2015, *Mutations in PNPLA6 are linked to photoreceptor degeneration and various forms of childhood blindness*. Nat Commun. **6**: p. 5614.
- Koenig M., Hoffman E. P., Bertelson C. J., et al., 1987, *Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals*. Cell. **50**(3): p. 509-517.
- Kolarova H., Tesarova M., Svecova S., et al., 2014, *Lipoprotein Lipase Deficiency: Clinical, Biochemical and Molecular Characteristics in Three Patients with Novel Mutations in the LPL Gene*. Folia Biol (Praha). **60**(5): p. 235-243.
- Lander E. S. and Botstein D., 1987, *Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children*. Science. **236**(4808): p. 1567-1570.
- Landrum M. J., Lee J. M., Riley G. R., et al., 2014, *ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype*. Nucleic Acids Res. **42**(Database issue): p. D980-985.
- Levy S., Sutton G., Ng P. C., et al., 2007, *The diploid genome sequence of an individual human*. PLoS Biol. **5**(10): p. e254.
- MacDonald J. R., Ziman R., Yuen R. K., et al., 2014, *The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome*. Nucleic Acids Res. **42**(Database issue): p. D986-992.
- Malhotra D. and Sebat J., 2012, *CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics*. Cell. **148**(6): p. 1223-1241.
- Manolio T. A., Collins F. S., Cox N. J., et al., 2009, *Finding the missing heritability of complex diseases*. Nature. **461**(7265): p. 747-753.
- Matsuzaki H., Loi H., Dong S., et al., 2004, *Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array*. Genome Res. **14**(3): p. 414-425.

- McClellan J. and King M. C., 2010, *Genetic heterogeneity in human disease*. Cell. **141**(2): p. 210-217.
- McKusick V. A., 2007, *Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM*. Am J Hum Genet. **80**(4): p. 588-604.
- Metzker M. L., 2010, *APPLICATIONS OF NEXT-GENERATION SEQUENCING Sequencing technologies - the next generation*. Nature Reviews Genetics. **11**(1): p. 31-46.
- Michael K. L., Taylor L. C., Schultz S. L., et al., 1998, *Randomly ordered addressable high-density optical sensor arrays*. Anal Chem. **70**(7): p. 1242-1248.
- Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., et al., 1994, *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science. **266**(5182): p. 66-71.
- Mills R. E., Walter K., Stewart C., et al., 2011, *Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing*. Nature. **470**(7332): p. 59-65.
- Mole S. E., Williams R. E., and Goebel H. H., 2011, *The neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease)*. 2nd ed, Oxford: Oxford University Press. xxx, 444 p.
- Morton N. E., 1955, *Sequential tests for the detection of linkage*. Am J Hum Genet. **7**(3): p. 277-318.
- Mullis K. B. and Faloona F. A., 1987, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol. **155**: p. 335-350.
- Neroldova M., Frankova S., Stranecky V., et al., 2015, *Hereditary haemochromatosis caused by homozygous HJV mutation evolved through paternal disomy*. Clin Genet. **87**(1): p. 96-98.
- Ng P. C. and Henikoff S., 2001, *Predicting deleterious amino acid substitutions*. Genome Res. **11**(5): p. 863-874.
- Ng S. B., Turner E. H., Robertson P. D., et al., 2009, *Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes*. Nature. **461**(7261): p. 272-276.
- Ng S. B., Bigham A. W., Buckingham K. J., et al., 2010, *Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome*. Nat Genet. **42**(9): p. 790-793.
- Ng S. B., Nickerson D. A., Bamshad M. J., et al., 2010, *Massively parallel sequencing and rare disease*. Hum Mol Genet. **19**(R2): p. R119-124.
- Niemi M., Pasanen M. K., and Neuvonen P. J., 2011, *Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake*. Pharmacol Rev. **63**(1): p. 157-181.
- Nirenberg M. W. and Matthaei J. H., 1961, *The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides*. Proc Natl Acad Sci U S A. **47**: p. 1588-1602.
- Park E. J., Grabinska K. A., Guan Z., et al., 2014, *Mutation of Nogo-B receptor, a subunit of cis-prenyltransferase, causes a congenital disorder of glycosylation*. Cell Metab. **20**(3): p. 448-457.

- Paulusma C. C., Kool M., Bosma P. J., et al., 1997, *A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome*. *Hepatology*. **25**(6): p. 1539-1542.
- Pease A. C., Solas D., Sullivan E. J., et al., 1994, *Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**(11): p. 5022-5026.
- Pinto D., Delaby E., Merico D., et al., 2014, *Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders*. *Am J Hum Genet*. **94**(5): p. 677-694.
- Pollard K. S., Hubisz M. J., Rosenbloom K. R., et al., 2010, *Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies*. *Genome Res*. **20**(1): p. 110-121.
- Remuzzi G. and Garattini S., 2008, *Rare diseases: what's next?* *Lancet*. **371**(9629): p. 1978-1979.
- Rohn J., 2013, *Billions spent on rare diseases*. *Nat Biotech*. **31**(5): p. 368-368.
- Sanger F. and Coulson A. R., 1975, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. *Journal of Molecular Biology*. **94**(3): p. 441-448.
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A. R., 1977, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **74**(12): p. 5463-5467.
- Schena M., Shalon D., Davis R. W., et al., 1995, *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. *Science*. **270**(5235): p. 467-470.
- Schmitz F., Tabares L., Khimich D., et al., 2006, *CSPalpha-deficiency causes massive and rapid photoreceptor degeneration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(8): p. 2926-2931.
- Siva N., 2008, *1000 Genomes project*. *Nat Biotechnol*. **26**(3): p. 256.
- Smith H. O. and Wilcox K. W., 1970, *A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties*. *J Mol Biol*. **51**(2): p. 379-391.
- Smith L. M., Sanders J. Z., Kaiser R. J., et al., 1986, *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis*. *Nature*. **321**(6071): p. 674-679.
- Solinas-Toldo S., Lampel S., Stilgenbauer S., et al., 1997, *Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances*. *Genes Chromosomes Cancer*. **20**(4): p. 399-407.
- Sperl W., Jesina P., Zeman J., et al., 2006, *Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin*. *Neuromuscul Disord*. **16**(12): p. 821-829.
- St Croix B., Rago C., Velculescu V., et al., 2000, *Genes expressed in human tumor endothelium*. *Science*. **289**(5482): p. 1197-1202.
- Stenson P. D., Ball E. V., Howells K., et al., 2009, *The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central mutation database for molecular diagnostics and personalized genomics*. *Hum Genomics*. **4**(2): p. 69-72.
- Storkanova G., Vlaskova H., Chuzhanova N., et al., 2013, *Ornithine carbamoyltransferase deficiency: molecular characterization of 29 families*. *Clin Genet*. **84**(6): p. 552-559.

- Takacova S., Slany R., Bartkova J., et al., 2012, *DNA damage response and inflammatory signaling limit the MLL-ENL-induced leukemogenesis in vivo*. *Cancer Cell*. **21**(4): p. 517-531.
- Tipton R. E. and Gorlin R. J., 1984, *Growth retardation, alopecia, pseudo-anodontia, and optic atrophy--the GAPO syndrome: report of a patient and review of the literature*. *Am J Med Genet*. **19**(2): p. 209-216.
- Tobaben S., Thakur P., Fernandez-Chacon R., et al., 2001, *A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine*. *Neuron*. **31**(6): p. 987-999.
- Tsui L. C., Buchwald M., Barker D., et al., 1985, *Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker*. *Science*. **230**(4729): p. 1054-1057.
- Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., et al., 2001, *The sequence of the human genome*. *Science*. **291**(5507): p. 1304-1351.
- Vondrackova A., Vesela K., Kratochvilova H., et al., 2014, *Large copy number variations in combination with point mutations in the TYMP and SCO2 genes found in two patients with mitochondrial disorders*. *Eur J Hum Genet*. **22**(3): p. 431-434.
- Wellcome Trust Case Control C., Craddock N., Hurles M. E., et al., 2010, *Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls*. *Nature*. **464**(7289): p. 713-720.
- Welter D., MacArthur J., Morales J., et al., 2014, *The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations*. *Nucleic Acids Res*. **42**(Database issue): p. D1001-1006.
- Werner E., Kowalczyk A. P., and Faundez V., 2006, *Anthrax toxin receptor 1/tumor endothelium marker 8 mediates cell spreading by coupling extracellular ligands to the actin cytoskeleton*. *J Biol Chem*. **281**(32): p. 23227-23236.
- Wheeler D. A., Srinivasan M., Egholm M., et al., 2008, *The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing*. *Nature*. **452**(7189): p. 872-876.
- Yang M. Y., Chaudhary A., Seaman S., et al., 2011, *The cell surface structure of tumor endothelial marker 8 (TEM8) is regulated by the actin cytoskeleton*. *Biochim Biophys Acta*. **1813**(1): p. 39-49.
- Zarrei M., MacDonald J. R., Merico D., et al., 2015, *A copy number variation map of the human genome*. *Nat Rev Genet*. **16**(3): p. 172-183.
- Zinsmaier K. E., Eberle K. K., Buchner E., et al., 1994, *Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of Drosophila*. *Science*. **263**(5149): p. 977-980.

Seznam publikací, které jsou podkladem dizertační práce

Hřebíček, M., Jirásek, T., Hartmannová, H., Nosková, L., **Stránecký, V.**, Ivánek, R., Kmoch, S., Cebecauerová, D., Vítek, L., Mikulecký, M., Subhanová, I., Hozák, P., Jirsa, M. Rotor-type hyperbilirubinaemia has no defect in the canalicular bilirubin export pump, 2007, *Liver International*, 27 (4), pp. 485-491. **IF:3.840**

Van De Steeg, E*, **Stránecký, V***, Hartmannová, H., Nosková, L., Hřebíček, M., Wagenaar, E., Van Esch, A., De Waart, D.R., Oude Elferink, R.P.J., Kenworthy, K.E., Sticová, E., Al-Edreesi, M., Knisely, A.S., Kmoch, S., Jirsa, M., Schinkel, A.H. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver, 2012, *Journal of Clinical Investigation*, 122 (2), pp. 519-528. **IF:13.069**

Čížková, A., **Stránecký, V.**, Ivánek, R., Hartmannová, H., Nosková, L., Piherová, L., Tesařová, M., Hansíková, H., Honzík, T., Zeman, J., Paul, J., Sperl, W., Mayr, J.A., Seneca, S., Houštěk, J., Kmoch, S. Development of a human mitochondrial oligonucleotide microarray (h-MitoArray) and gene expression analysis of fibroblast cell lines from 13 patients with isolated F1F0 ATP synthase deficiency, 2008, *BMC Genomics*, 9, art. no. 38. **IF:3.926**

Čížková, A., **Stránecký, V.**, Mayr, J.A., Tesařová, M., Havlíčková, V., Paul, J., Ivánek, R., Kuss, A.W., Hansíková, H., Kaplanová, V., Vrbacký, M., Hartmannová, H., Nosková, L., Honzík, T., Drahot, Z., Magner, M., Hejzlarová, K., Sperl, W., Zeman, J., Houštěk, J., Kmoch, S. TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy, 2008, *Nature Genetics*, 40 (11), pp. 1288-1290. **IF:30.259**

Hřebíček, M., Mrázová, L., Seyrantepe, V., Durand, S., Roslin, N.M., Nosková, L., Hartmannová, H., Ivánek, R., Čížková, A., Poupětová, H., Sikora, J., Uřinová, J., **Stránecký, V.**, Zeman, J., Lepage, P., Roquis, D., Verner, A., Ausseil, J., Beesley, C.E., Maire, I., Poorthuis, B.J.H.M., Van De Kamp, J., Van Diggelen, O.P., Wevers, R.A., Hudson, T.J., Fujiwara, T.M., Majewski, J., Morgan, K., Kmoch, S., Pshezhetsky, A.V. Mutations in TMEM76* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome), 2006, *American Journal of Human Genetics*, 79 (5), pp.807-819. **IF:11.092**

Nosková, L*, **Stránecký, V***, Hartmannová, H., Přistoupilová, A., Barešová, V., Ivánek, R., Hlková, H., Jahnová, H., Van Der Zee, J., Staropoli, J.F., Sims, K.B., Tyynelä, J., Van Broeckhoven, C., Nijssen, P.C.G., Mole, S.E., Elleder, M., Kmoch, S. Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis, 2011, *American Journal of Human Genetics*, 89 (2), pp. 241-252. **IF:10.603**

Stránecký, V., Hoischen, A., Hartmannová, H., Zaki, M.S., Chaudhary, A., Zudaire, E., Nosková, L., Barešová, V., Přistoupilová, A., Hodaňová, K., Sovová, J., Hůlková, H., Piherová, L., Hehir-Kwa, J.Y., De Silva, D., Senanayake, M.P., Farrag, S., Zeman, J., Martásek, P., Baxová, A., Afifi, H.H., St. Croix, B., Brunner, H.G., Temtamy, S., Kmoch, S. Mutations in ANTXR1 cause GAPO syndrome, 2013, *American Journal of Human Genetics*, 92 (5), pp. 792-799. **IF:11.202**

* shared first authorship

Seznam ostatních publikací

Stanislav Kmoch, Jacek Majewski, Vasanth Ramamurthy, Sang Ni Cao, Ian MacDonald, Huanan Ren, Irma Lopez, Somayyeh Fahiminiya, Vincent Sun, Vafa Keser, Ayesha Khan, **Viktor Stranecky**, Hana Hartmannova, Anna Pristoupilova, Katerina Hodanova, Lenka Piherova, Ladislav Kuchar, Alica Baxova, Rui Chen, Hui Wang, Xia Wang, Angela Pyle, Helen Griffin, Miranda Splitt, Julianna Sallum, John Tolmie, Julian Sampson, Patrick Chinnery, Sudeshna Dutta, José Luiz Pedroso, Dror Sharon, Eyal Banin, Doris Kretzschmar, Michel Cayouette, Robert Koenekoop. Mutations in PNPLA6 are linked to photoreceptor degeneration and various forms of childhood blindness. *Nature Communications* 2015 Jan 9;6:5614. **IF:10.742**

EJ, Grabińska KA, Guan Z, **Stránecký V**, Hartmannová H, Hodaňová K, Barešová V, Sovová J, Jozsef L, Ondrušková N, Hansíková H, Honzík T, Zeman J, Hůlková H, Wen R, Kmoch S, Sessa WC. Mutation of Nogo-B receptor, a subunit of cis-prenyltransferase, causes a congenital disorder of glycosylation. *Cell Metab.* 2014 Sep 2;20(3):448-57. **IF:16.747**

Vondráčková, A., Veselá, K., Kratochvílová, H., Kučerová Vidrová, V., Vinšová, K., **Stránecký, V.**, Honzík, T., Hansíková, H., Zeman, J., Tesařová, M., Large copy number variations in combination with point mutations in the TYMP and SCO2 genes found in two patients with mitochondrial disorders, 2014, *European Journal of Human Genetics*, 22 (3), pp. 431-434. **IF:4.319**

Neřoldová, M., Fraňková, S., **Stránecký, V.**, Honsová, E., Lukšan, O., Beneš, M., Michalová, K., Kmocho, S., Jirsa, M., Hereditary haemochromatosis caused by homozygous HJV mutation evolved through paternal disomy, 2014, *Clinical Genetics*, 2015 Jan;87, pp. 96-8. **IF:3.944**

Storkanová, G., Vlasková, H., Chuzhanová, N., Zeman, J., **Stránecký, V.**, Majer, F., Pesková, K., Luksan, O., Jirsa, M., Hřebíček, M., Dvoraková, L., Ornithine carbamoyltransferase deficiency: Molecular characterization of 29 families, 2013, *Clinical Genetics*, 84 (6), pp. 552-559. **IF:3.944**

Hartmannová, H., Kubanek, M., Sramko, M., Piherová, L., Nosková, L., Hodanová, K., **Stránecký, V.**, Přistoupilová, A., Sovová, J., Marek, T., Malusková, J., Ridzon, P., Kautzner, J., Hulková, H., Kmocho, S. Isolated X-linked hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel mutation of the four-and-a-half LIM domain 1 gene, 2013, *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 6 (6), pp. 543-55 **IF:6.728**

Kmocho, S., **Stránecký, V.**, Emes, R.D., Mitchison, H.M. Bioinformatic perspectives in the neuronal ceroid lipofuscinoses, 2013, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832 (11), pp. 1831-1841. **IF:4.910**

Ehling, R., Nosková, L., **Stránecký, V.**, Hartmannová, H., Přistoupilová, A., Hodaňová, K., Benke, T., Kovacs, G.G., Ströbel, T., Niedermüller, U., Wagner, M., Nachbauer, W., Janecke, A., Budka, H., Boesch, S., Kmocho, S. Cerebellar dysfunction in a family harboring the PSEN1 mutation co-segregating with a Cathepsin D variant p.A58V, 2013, *Journal of the Neurological Sciences*, 326 (1-2), pp. 75-82. **IF:2.243**

Takacová, S., Slány, R., Bartková, J., **Stránecký, V.**, Doležel, P., Luzna, P., Bartek, J., Divoky, V. DNA Damage Response and Inflammatory Signaling Limit the MLL-ENL-Induced Leukemogenesis In Vivo, 2012, *Cancer Cell*, 21 (4), pp. 517-531. **IF:26.566**

Havlíčková Karbanová, V., Čížková Vrbacká, A., Hejzlarová, K., Nůsková, H., **Stránecký, V.**, Potocká, A., Kmocho, S., Houšťek, J. Compensatory upregulation of respiratory chain complexes III and IV in isolated deficiency of ATP synthase due to TMEM70 mutation, 2012, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817 (7), pp. 1037-1043. **IF:5.132**

Kovářová, N., Čížková Vrbacká, A., Pecina, P., **Stránecký, V.**, Pronicka, E., Kmocho, S., Houšťek, J. Adaptation of respiratory chain biogenesis to cytochrome c oxidase deficiency caused by SURF1 gene mutations, 2012, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822 (7), pp. 1114-1124. **IF:5.387**

Živná, M., Hůlková, H., Matignon, M., Hodaňová, K., Vyleťal, P., Kalbáčková, M., Barešová, V., Sikora, J., Blažková, H., Živný, J., Ivánek, R., **Stránecký, V.**, Sovová, J., Claes, K., Lerut, E., Fryns, J.-P., Hart, P.S., Hart, T.C., Adams, J.N., Clemessy, M., Gasc, J.-M., Gübler, M.-C., Antignac, C., Elleder, M., Kapp, K., Grimbert, P., Bleyer, A.J., Kmocho, S. Dominant Renin Gene Mutations Associated with Early-Onset Hyperuricemia, Anemia, and Chronic Kidney Failure, 2009, *American Journal of Human Genetics*, 85 (2), pp. 204-213. **IF:12.303**